

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Tina T. Kamčeva

**INTERAKCIJA KOMPLEKSA PLATINE I
RUTENIJUMA SA PANKREASNOM
FOSFOLIPAZOM A₂ I FOSFOLIPIDIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Tina T. Kamčeva

**THE INTERACTION OF PLATINUM AND
RUTHENIUM COMPLEXES WITH
PANCREATIC PHOSPHOLIPASE A₂ AND
PHOSPHOLIPIDS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentori:

Prof. dr Miloš Mojović

Docent

Fakultet za fizičku hemiju

Univerzitet u Beogradu

dr Marijana Petković

Naučni savetnik

Laboratorija za fizičku hemiju

Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije za odbranu:

Prof. dr Miloš Mojović

Docent

Fakultet za fizičku hemiju

Univerzitet u Beogradu

dr Marijana Petković

Naučni savetnik

Laboratorija za fizičku hemiju

Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Goran Bačić

Redovni profesor

Univerzitet u Beogradu

Fakultet za fizičku hemiju

Prof. dr Živadin Bugarčić

Redovni profesor

Prirodno-matematički fakultet

Univerzitet u Kragujevcu

Datum odbrane: _____

Posvećeno mojoj, divnoj mami

Zahvalnica

Istraživanje i prikupljanje eksperimentalnih rezultata predstavljenih u ovoj disertaciji je u najvećem delu sprovedeno u Laboratoriji 050 (Laboratorija za fizičku hemiju) Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ u Beogradu. Stoga se najpre zahvaljujem saradnicama naučno istraživačke grupe kojoj pripadam, dr Marijani Petković, Bojani Damnjanović, Maji Radisavljević i Ivi Vukićević, na saradnji i pomoći pri prikupljanju eksperimentalnih podataka i pisanju naučnih radova, kao i na nesebičnoj podršci i prijateljstvu, zbog čega mi je rad sa njima istovremeno predstavljao veliko zadovoljstvo. Posebnu zahvalnost dugujem dr Marijani Petković, na pruženoj pomoći i savetovanju kroz celo trajanje doktorskih studija, kao i na ukazanom poverenju i uopšte velikoj podršci i zalaganju za moj ulazak u naučnu zajednicu. Zahvalnost zaslužuju i svi zaposleni Laboratorije 050 za pozitivnu radnu atmosferu i pruženu podršku. Zahvaljujem se i kolegama i koleginicama iz istraživačke grupe profesora dr Živadina Bugarčića sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu za sintetisanje i analizu kompleksa platine i rutenijuma i gostoprimstvo na Hemijskom institutu.

Izuzetno sam zahvalna na saradnji i gostoprimstvu kolegama i koleginicama sa Instituta za medicinsku fiziku i biofiziku Univerziteta u Lajpcigu, gde su prikupljeni najznačajniji rezultati ove disertacije. Posebnu zahvalnost zaslužuju profesor dr Jürgen Arnhold i njegovi saradnici na velikoj pomoći u eksperimentalnom radu, obradi rezultata i konstruktivnim kritikama i predlozima u toku pisanja naučnih radova.

Zahvaljujem se mentoru, dr Milošu Mojoviću sa Fakulteta za fizičku hemiju na saradnji pri izradi ove disertacije, kao i drugim profesorima i studentskoj službi ovog fakulteta na razumevanju i izlasku u susret pri organizovanju ispita i odbrana seminarskih radova, koji su sastavni deo doktorskih studija.

Na kraju, velika žrtva i podrška mojih roditelja i sestre, kao i razumevanje mog supruga i dragih prijatelja bila je ključna za uspešnu izradu ove doktoske disertacije.

Hvala vam na tome!

Interakcija kompleksa platine i rutenijuma sa pankreasnom fosfolipazom A₂ i fosfolipidima

Rezime

Kompleksi platine se koriste u tretmanima različitih tipova kancera od kasnih sedamdesetih godina prošlog veka, kada je zvanično odobrena upotreba neorganskog kompleksa *cis*-diamino-dihloroplatine (II). Princip terapije zasnovane na kompleksima platine je interakcija sa molekulom DNK, pri čemu se onemogućava dalja deoba ćelija i podstiče programirana smrt ćelija, odnosno apoptoza. Glavni nedostaci ovog vida terapije su sporedni toksični efekti, koji su rezultat interakcije kompleksa sa zdravim ćelijama i različitim biomolekulima na njihovom putu do ćelijskog jedra, kao i razvijanje ćelijske rezistencije na lek. Osim sinteze novih kompleksa, kombinacijom drugih liganada i metalnih centara i razvoja metoda za ciljanu dostavu lekova, jedan od načina poboljšanja hemoterapije jeste izučavanje novih ćelijskih meta, kao što su enzimi neophodni za rast i razvoj tkiva kancera i stvaranje metastaza.

Jedan od enzima označenih kao „meta“ ili ciljani molekul u terapiji kancera i zapaljenskih procesa je fosfolipaza A₂. Ovaj enzim katalizuje hidrolizu membranskih fosfolipida, pri čemu se oslobađaju odgovarajući lizolipidi i masne kiseline, odnosno signalni molekuli koji učestvuju u procesima apoptoze, karcinogeneze i zapaljenskih procesa. Nivo fosfolipaze A₂ i njena aktivnost su povišeni u kanceroznim tkivima i ćelijama, dok je pokazano da specifični inhibitori ovog enzima umanjuju metastatski potencijal kancera.

U ovom radu ispitan je uticaj kompleksa platine i rutenijuma: [PtCl₂(*dach*)], [PtCl₄(*bipy*)], [PtCl₄(*en*)], [PtCl₂(*en*)], [RuCl₂(*bipy*)₂]Cl, [RuCl₂(*en*)₂]Cl i *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] na strukturu i aktivnost pankreasne fosfolipaze A₂. Imajući u vidu da enzimska aktivnost fosfolipaze A₂ zavisi od sastava i organizacije supstrata, odnosno membranskih lipida, istovremeno je ispitan i efekat koji isti kompleksi metala imaju na fosfolipidni dvosloj (liposome i eritrocite) i strukturu fosfolipida.

Eksperimentalni rezultati interakcije kompleksa sa fosfolipazom A₂ i sa fosfolipidima prikupljeni su korišćenjem metoda: MALDI-TOF masene spektrometrije, fluorescentne spektrometrije, tankoslojne hromatografije, nuklearne magnetne rezonancije i UV/VIS spektrofotometrije. Svi ispitani kompleksi utiču na organizaciju i propustljivost fosfolipidnih membrana i posredno utiču na aktivnost fosfolipaze A₂. Primenom navedenih metoda nije detektovano stvaranje adukata između kompleksa metala i fosfolipida. Dva kompleksa, [PtCl₄(bipy)] i [RuCl₂(bipy)₂]Cl, stvaraju adukate sa fosfolipazom A₂ i direktno inhibiraju njenu enzimatsku aktivnost. Tip inhibicije je akompetetivan, što znači da se oba kompleksa intenzivnije vezuju i inhibiraju enzim u prisustvu supstrata, što je potvrđeno odgovarajućim kinetičkih parametarima i razlikom u masenim spektrima kompleksa i enzima sa i bez dodatka supstrata.

Ključne reči: Fosfolipaza A₂; Fosfolipidi; Kompleksi metala; MALDI-TOF masena spektrometrija; Platina; Rutenijum; Terapija kancera.

Naučna oblast: Fizička hemija

Uža naučna oblast: Biofizička hemija

UDK:

The Interaction of Platinum and Ruthenium Complexes with Pancreatic Phospholipase A₂ and phospholipids

Summary

Platinum complexes have been used for treatments of various types of cancer since the late seventies, when the use of inorganic complex *cis*-diamminedichloroplatinum(II) was officially approved. The principle of therapy based on platinum complexes is their interaction with DNA molecules, which prevents further cell division and promotes programmed cell death or apoptosis. The main disadvantages of this therapy are toxic side effects, as a consequence of interaction of platinum complexes with a variety of biomolecules and healthy cells on their way to the cell nucleus, as well as the development of cellular resistance to the drug. In addition to the synthesis of new metal complexes with different ligands or/and metal centers and to the development of targeted drug delivery, the improvement of chemotherapy is possible to achieve by revealing new cellular targets, such as enzymes necessary for the growth and spread of cancer tissues and formation of metastasis.

One of the enzymes marked as a target of cancer and inflammation therapeutics is phospholipase A₂. Phospholipase A₂ catalyzes the hydrolysis of membrane phospholipids followed by the release of appropriate lysophospholipids and fatty acids, signaling molecules involved in apoptosis, inflammation and carcinogenesis. Cancer tissues are associated to elevated concentration and activity of phospholipase A₂ and it is well known that specific inhibitors of this enzyme reduce the metastatic potential of cancer.

In this dissertation the effect of platinum and ruthenium complexes: [PtCl₂(*dach*)], [PtCl₄(*bipy*)], [PtCl₄(*en*)], [PtCl₂(*en*)], [RuCl₂(*bipy*)₂]Cl, [RuCl₂(*en*)₂]Cl and *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] on the structure and activity of pancreatic phospholipase A₂ is investigated. Bearing in mind that the enzymatic activity of phospholipase A₂ depends on the composition and organization of the substrate, the effect of some metal complexes on the phospholipid bilayers (liposomes and erythrocytes) is examined.

Experimental results were obtained by following methods: MALDI-TOF mass spectrometry, fluorescence spectrometry, thin-layer chromatography, nuclear magnetic resonance and UV/VIS spectrophotometry. All investigated complexes affect the organization and permeability of phospholipid membranes and indirectly modify the activity of phospholipase A₂. Adducts between metal complexes and phospholipids were not detected by chosen methods. Complexes, [PtCl₄(*bipy*)] and [RuCl₂(*bipy*)₂]Cl, create adducts with phospholipase A₂ and directly inhibit its enzymatic activity. The mechanism of inhibition is mainly uncompetetive, which means that both complexes bind and inhibit the enzyme intensively in the presence of substrate. Type of inhibition is determined due to calculation of kinetic parameters and confirmed by the differences in mass spectra of the enzyme and metal complexes with and without the presence of substrate.

Keywords: Phospholipase A₂; Phospholipids; Metal complexes; MALDI-TOF mass spectrometry; Platinum; Ruthenium; Cancer therapy.

Academic Expertise: Physical Chemistry

Major in: Biophysical Chemistry

UDC:

SADRŽAJ

Informacije o mentoru i članovima komisije	iii
Posveta	v
Zahvalnica	vi
Podaci o doktorskoj disertaciji na srpskom jeziku	vii
Podaci o doktorskoj disertaciji na engleskom jeziku	ix
1. KOMPLEKSI METALA U MEDICINI	1
1.1. Kompleksi metala u terapiji kancera	3
1.1.1. Kompleksi platine	4
1.1.2. Kompleksi rutenijuma	8
1.1.3. Kompleksi drugih metala sa antitumorskim dejstvom	13
2. INTERAKCIJA KOMPLEKSA METALA SA BIOMOLEKULIMA	15
2.1. Interakcija sa DNK	15
2.2. Interakcija sa proteinima	20
3. FOSFOLIPIDI	28
3.1. Klasifikacija i značaj glicerofosfolipida (fosfolipida)	28
3.2. Interakcija kompleksa metala sa lipidima	32
3.3. Fosfolipaze i metabolizam fosfolipida	35
3.3.1. Fosfolipaze A ₂	38
3.3.1.1. Sekretorne fosfolipaze A ₂ , sPLA ₂	39
4. HIPOTEZA I CILJ DISERTACIJE	43
4.1. Hipoteza	43
4.2. Cilj disertacije	44
5. EKSPERIMENTALNI DEO	45
5.1. Kompleksi metala	45
5.1.1. Određivanje lipofilnosti kompleksa	46
5.2. Hemoliza humanih eritrocita kompleksima metala	47
5.3. Lipidi	48
5.3.1. Izolovanje lipida iz humanih eritrocita	48
5.4. Lipozomi (LUV)	49

5.4.1. Rastvarači i priprema smeše lipida	49
5.4.2. Priprema lipozoma	50
5.5. Tankoslojna hromatografija visokih performansi (HPTLC)	51
5.6. MALDI TOF masena spektrometrija	52
5.6.1. Opšti principi MALDI TOF masene spektrometrije	52
5.6.2. Analiza kompleksa metala	55
5.6.3. Analiza lipida	56
5.6.4. Analiza fosfolipaze A ₂	57
5.7. Fluorescentna spektrometrija	58
5.7.1. Interakcija fosfolipaze A ₂ sa kompleksima metala	58
5.7.2. Interakcija lipozoma sa kompleksima metala	59
5.8. Nuklearna magnetna rezonancija	60
5.9. UV/Vis spektrofotometrija	60
6. REZULTATI I DISKUSIJA	62
6.1. Lipofilnost kompleksa	63
6.2. Hemoliza humanih eritrocita u prisustvu kompleksa	65
6.2.1. Interakcija kompleksa sa smešom lipida iz eritrocita	67
6.2.2. Ispitivanje lipidnog sastava membrane eritrocita, pre i posle inkubiranja sa kompleksima	74
6.3. Interakcija kompleksa sa čistim klasama lipida	75
6.4. Interakcija kompleksa sa lipozomima različitog sastava	78
6.5. Određivanje aktivnosti fosfolipaze A ₂ i ispitivanje uticaja kompleksa na aktivnost fosfolipaze A ₂	82
6.5.1. Određivanje aktivnosti fosfolipaze A ₂	82
6.5.2. Uticaj kompleksa [RuCl ₂ (<i>bipy</i>)]Cl i [PtCl ₂ (<i>bipy</i>)] na aktivnost fosfolipaze A ₂	86
6.6. Ispitivanje vezivanja kompleksa metala za enzim PLA ₂	89
6.6.1. Ispitivanje vezivanja kompleksa za enzim MALDI TOF masenom spektrometrijom	89
6.6.2. Ispitivanje vezivanja kompleksa [RuCl ₂ (<i>bipy</i>)]Cl i [PtCl ₂ (<i>bipy</i>)] za enzim u prisustvu supstrata-fosfolipida	93

6.6.3. Ispitivanje vezivanja kompleksa za enzim metodom fluorescentne spektroskopije	95
6.6.4. Ispitivanje interakcije kompleksa $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})]\text{Cl}$ sa enzimom metodom nuklearne magnetne rezonancije	97
6.7. Pregled dobijenih rezultata i SAR analiza	99
7. ZAKLJUČAK	101
8. LITERATURA	104
Lista skraćenica	xiv
Biografija autora	xvii
Izjava o autorstvu	
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	
Izjava o korišćenju	

1. KOMPLEKSI METALA U MEDICINI

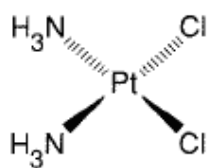
Prema istorijskim podacima, metali su našli svoju upotrebu u medicini još nekoliko stotina godina p.n.e. Neki od primera su: lokalna upotreba cinka za brže zarastanje rana, korišćenje srebra kao antibakterijskog sredstva za prevenciju infekcija ili pravljenje rastvora rđe za lečenje opšte slabosti organizma (malokrvnost). Međutim, navedeni primeri su više zasnovani na iskustvima ili verovanju naroda u natprirodne moći nekih metala, nego na njihovom racionalnom korišćenju i upotrebi uz poznavanje mehanizama njihovog delovanja.

Danas je poznato da kompleksi nekih metala imaju antibakterijsko i antivirusno dejstvo, pa se oni koriste u modernoj medicini za tretiranje virusnih infekcija. Poznato je inhibitorsko delovanje jona Zn^{2+} na virusnu DNK polimerazu kod pacijenata sa herpesom,¹ kao i delotvoran efekat osmijum karbohidratnih polimera na artritis.² Poliaksoanioni volframa bili su uključeni u terapiju pacijenata obolelih od side,³ dok su karboksilatni kompleksi bakra poznati po svom anti-inflamatornom, antiulceroznom i analgetskom dejstvu.⁴

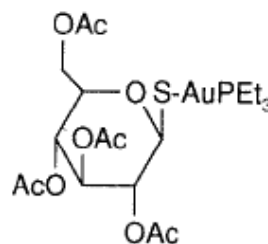
Smatra se da je prava revolucija u terapiji neorganskim lekovima počela šezdesetih godina dvadesetog veka, otkrićem anti-tumorskog dejstva *cis*-platine (*cis*-diaminodihloroplatina). Interesantno je pomenuti da je do ovog otkrića došlo sasvim slučajno i da biofizičar Barnet Rozenberg (*Barnett Rosenberg*) sa Državnog Univerziteta u Mičigenu, koji je dokazao anti-tumorsko dejstvo kompleksa platine *in vitro*, nije uspeo da dobije finansijsku podršku Nacionalnog Instituta za Kancer (*National Cancer Institute*) za nastavak istraživanja. U tom trenutku je bilo nezamislivo smatrati da tretiranje teškim metalima, kao što je platina, može da doprinese lečenju tumora. Može se reći da je Platinol (komercijalno ime za *cis*-platinu), samo zahvaljujući angažovanju Rozenberga i njegove grupe i njihovom daljem istraživanju o ličnom trošku, konačno odobren od Američke Administracije za Hranu i Lekove (U.S. FDA) 1979. godine.⁵ To je danas jedan od najupotrebljavanijih hemoterapeutika.

Dug vremenski period koji je bio potreban da teški metali uđu u kliničku upotrebu nije tako neočekivan, jer se neki od ovih metala prirodno ne nalaze u organizmu i nemaju svoju biološku funkciju. Opšte poznati toksični efekti teških metala

i teška trovanja olovom ili živom u istoriji dali su svoj doprinos skepticizmu prema takvom pristupu lečenja. Čak i teški elementi kao što su: V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Mo i Cd, koji su esencijalni mikroelementi u organizmu i čiji nedostatak dovodi do ozbiljnih zdravstvenih problema ili smrti, u većim količinama imaju toksične efekte.⁶ Vodeći se latinskom poslovicom da samo doza određuje toksičnost supstance ("Sola dosis facit venenum"), danas je već veliki broj kompleksa metala ušao u kliničku upotrebu u terapiji različitih bolesti, a svakodnevno se u laboratorijama ispituju i nove kombinacije metala i liganada. Dva danas najpoznatija leka koja se koriste modernoj medicini, a sadrže metalni jon, su *cisplatina* (Pt) i *auranofin* (Au), pri čemu je posebno interesantno to da ni platina ni zlato nemaju prirodnu biološku funkciju u organizmu. Prvi se koristi u terapiji kancera urinogenitalnih organa, glave i vrata, pluća, stomaka, grudi i prostate, dok je auranofin uključen u tretmane pacijenata sa reumatoidnim artritismom.



***cis*-diaminodihloroplatina(II)**
cisplatina ili *cis*-DDP



2,3,4,5-tetra-O-acetil-1-1-β-D-tioglukoza (triethylfosfin)zlato(I)
auranofin

Slika 1. Struktura *cisplatine* (levo) i *auranofina* (desno), dva najpoznatija terapeutika na bazi metala. Prvi se koristi u terapiji raznih vrsta kancera, dok se drugim tretira artritis.

Jedinjenja, odnosno kompleksi prelaznih metala imaju važnu ulogu ne samo u terapiji, već i u dijagnostici raznih bolesti, jer se koriste kao kontrastna jedinjenja u tehnikama oslikavanja tkiva, organa ili tumora. U te svrhe koriste se jedinjenja koja sadrže radioizotope ⁵⁷Co, ⁶⁷Ga, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, koji su kratkoživeći emiteri niskoenergetskih γ fotona i čije se zračenje detektuje scintilacionim kamerama.⁷ Za dijagnostiku se još koristi i tehnika nuklearne magnetne rezonance, gde se kompleksi

metala Gd(III), Fe(III) i Mn(II) koriste za oslikavanje tumora mozga, gastrointestinalnog trakta ili srca, respektivno.⁸ Ovi metali, osim što se specifično nagomilavaju u određenim tkivima, svojim paramagnetizmom utiču na relaksaciju protona molekula vode u tom tkivu. Protoni vode u zdravom i bolesnom tkivu imaju različita relaksaciona vremena, što je i osnovni princip na kome se zasniva oslikavanje ovom tehnikom nuklearne medicine. Obe tehnike se dopunjuju i podjednako koriste u dijagnostici, ali je za njihov razvoj presudno sintetisanje novih, stabilnijih kompleksa, koji se selektivno nagomilavaju u određenim tkivima.

1.1. Kompleksi metala u terapiji kancera

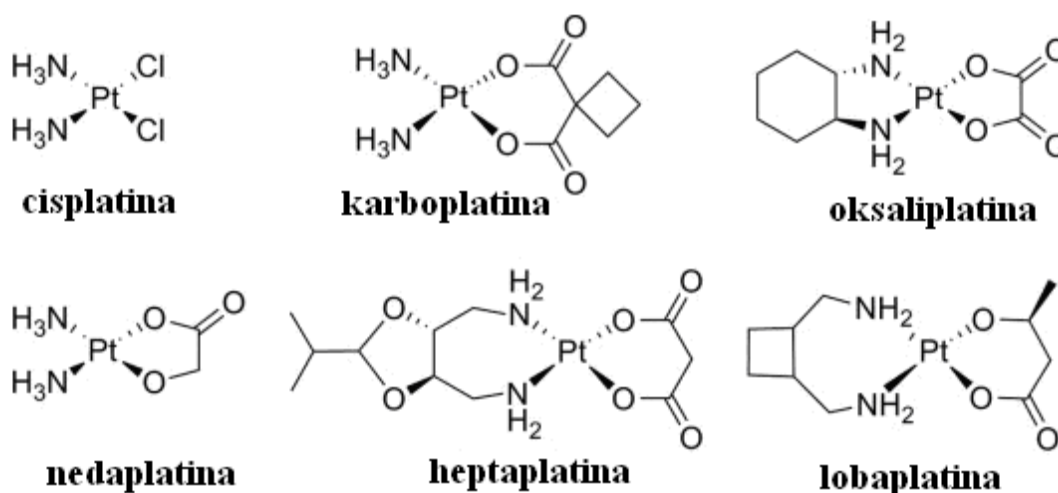
Nesumnjivo je da mnogi kompleksi metala imaju anti-tumorsko dejstvo „*in vitro*“, međutim put koji je potrebno preći od trenutka kada se dokaže njihovo dejstvo na kulturama bakterija ili ćelija sisara, preko malih životinja do pacijenata je dug. Nekad je za testiranje potencijalnog leka potrebno i više od deset godina. U proseku, samo jedan od čak 7000 različitih potencijalnih lekova koji se sintetišu u istraživačkim laboratorijama, zaista dođe do klinike i bude zvanično odobren, što u proseku traje 13 godina i košta oko 250 miliona dolara.⁹ Iz tog razloga, trenutno se u terapiji tumora koriste samo kompleksi platine, dok se svakodnevno sintetišu i testiraju novi kompleksi platine i drugih metala.

Kompleksi platine koje je odobrila FDA su *cis*-platina (1978), karboplatina (1993) i oksaliplatina (2002),^{10,11} dok se u pojedinim zemljama koristi i Nedaplatina (Japan),¹² Lobaplatina (Kina)¹³ i Heptaplatina (Južna Koreja).¹⁴

Kompleksi platine u fazi kliničkog ispitivanja su još: Satraplatina (prvi kompleks platine za oralnu upotrebu, u III fazi kliničkog ispitivanja),¹⁵ Pikoplatina,¹⁶ ProLindac (kopolimer),¹⁷ Lipoplatina (lipozomalna formulacija *cis* platine)¹⁸ i Lipoxal (lipozomalna formulacija oksaliplatine)¹⁹.

Od potencijalnih hemioterapeutika koji se ne baziraju na platini, posebnu pažnju privlače rutenijumski kompleksi, od kojih su NAMI-A i KP1019 ušli u prvu fazu

kliničkog ispitivanja.^{20,21} Dat je i osvrt na istraživanja posvećena kompleksima drugih metala kao potencijalnih hemoterapeutika.



Slika 2. Strukture kompleksa platine odobrenih od Američke administracije za hranu i lekove (gornji red) i kompleksa platine koji se koriste u Japanu, J. Koreji i Kini (donji red).

1.1.1. Kompleksi platine

Biološku aktivnost kompleksa *cis*-platine otkrio je sredinom XX veka biofizičar Barnet Rozenberg na Univerzitetu u Mičigenu. Otkriće je bilo slučajno, jer je cilj eksperimenta bio da se ispituju efekti električnog polja na rast i deobu ćelija bakterije *Escherichia coli* u kulturi. Suprotno njegovim očekivanjima, bakterije su rasle, ali bez ćelijske deobe, tako da je za krajnji rezultat eksperimenta Rozenberg dobijao bakterijske filamente dugačke i do 1cm. Uzrok tome bila je činjenica da su naučnici prevideli da platinske elektrode koje koriste u eksperimentu reaguju sa amonijačnim puferom i da se u rastvoru formiraju kompleksi platine. Dva od formiranih kompleksa platine, *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] i *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₄], sprečavala su deobu ćelija i davala isti rezultat i bez prisustva električnog polja. Rozenberg i njegovi saradnici su o svom trošku nastavili istraživanje, ispitujući anti-tumorsko dejstvo ovih kompleksa *in vivo*.

Injekcija *cis*-DDP (*cis*-dihloro-diamino-platine) je testirana na miševima sa implantiranim čvrstim sarkomom-180 i pokazalo se da u roku od nekoliko dana dovodi do nekroze, smanjenja veličine, a u nekim slučajevima i do potpunog uništavanja tumora.⁹ Komercijalno ime za *cis*-platinu (*cis*-DDP) je *Platinol*, a koristi se u terapiji kancera testisa, jajnika, bešike, pluća, dojki, cerviksa, stomaka, prostate, glave i vrata i ezofagealnog kancera. *Cis*-platina se pokazala kao jako efikasan hemoterapeutik, naročito u terapiji raka jajnika i testisa, međutim glavni nedostaci ovog kompleksa su toksičnost za vitalne organe i razvijanje ćelijske rezistencije.

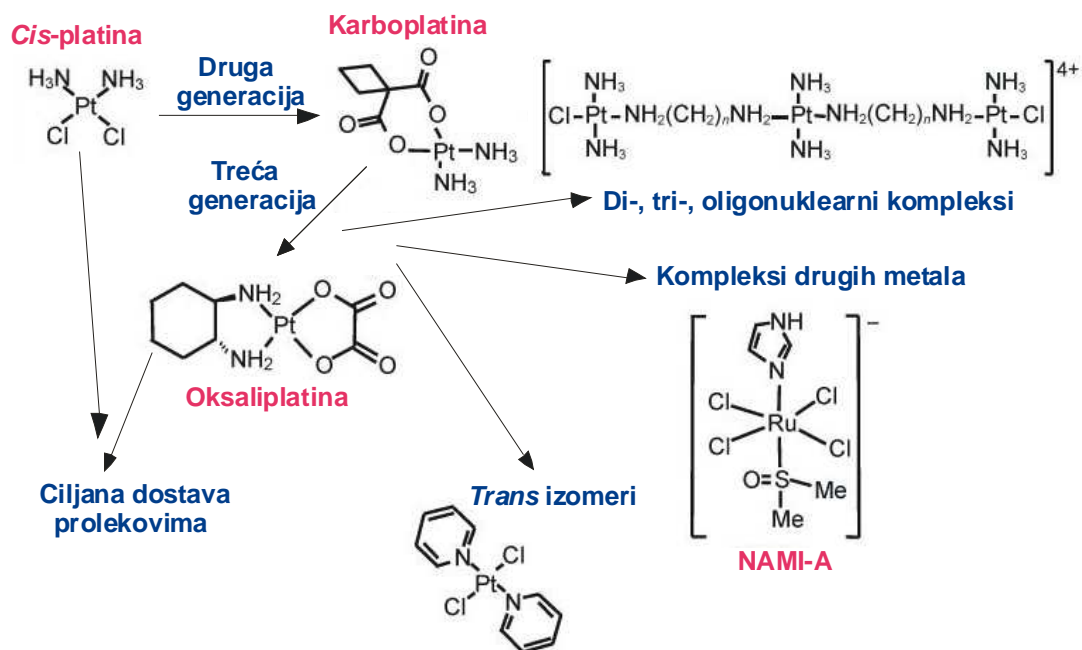
Najizraženiji toksični efekat *cis*-platine je nefrotoksičnost, pa se ranih 1970-ih neretko dešavalo da pacijent razvije akutnu bubrežnu insuficijenciju. Razlog za to je bila proksimalna tubularna disfunkcija i smanjena glomerularna filtracija. Platina se nagomilava u bubrezima, gde reaguje sa tiolnim komponentama, zbog čega dolazi do povećane urinarne ekskrecije tubularnih enzima, (β_2 -mikroglobulin, alanin aminopeptidaza i N-acetil glukozamin), proteina i jona Mg^{2+} (hipomagnezemija u 75% slučajeva), Ca^{2+} (hipokalcemija) i Na^+ (hiponatremija). Danas se ovi efekti ublažavaju adekvatnom hidratacijom pre i posle unošenja *cis*-platine u kombinaciji sa osmotskim diuretikom, kao što je manitol, produženom infuzijom (6 sati umesto 2 sata), frakcionisanjem terapije ili korišćenjem nefroprotektivnih agenasa (organska tiosulfatna jedinjenja). Ostali toksični efekti *cis*-platine su: neuropatija, ototoksičnost, mijelosupresija, opadanje kose i mučnina.

Drugi nedostatak upotrebe *cis*-platine u hemoterapiji jeste razvoj ćelijske rezistencije. Mehanizam razvoja ćelijske rezistencije nije poznat, ali se zna da više faktora utiče na promenu senzitivnosti ćelije na platinu. Ćelijsku rezistenciju karakteriše smanjena apsorpcija leka u ćelijama, povećan refluks i inaktivacija kompleksa biomolekulima koji poseduju tiolne grupe. Osim toga, značajnu ulogu ima i promenjena ekspresija regulatornih proteina uključenih u ćelijsku signalizaciju i kontrolu apoptotskih mehanizama, kao i promenjena koncentracija enzima za reparaciju DNK molekula.

Problem neurotoksičnosti i ćelijske rezistencije na *cis*-platinu naveo je na nova istraživanja i sintetisanje novih kompleksa platine (slika 3). Kompleksi platine sintetisani kao analozi *cis*-DDP, gde su hloridni ligandi zamenjeni drugim ligandima

nazivaju se kompleksi platine druge generacije, dok kompleksi sa zamenjenim amino grupama pripadaju trećoj generaciji kompleksa platine. Dalji razvoj neorganske hemije doveo je do sinteze kompleksa platine u obliku prolekova koji se u ćeliji transformišu u aktivnu formu, zatim dinuklearnih i oligonuklearnih kompleksa platine, a onda i do sinteze kompleksa drugih metala.

Prvi kompleks platine druge generacije, odobren za kliničku upotrebu u terapiji kancera, je karboplatina, poznata po imenu *Paraplatin*. Hloridni joni zamenjeni su karboksilatnim jonima (slika 2), što čini da novi kompleks bude stabilniji i da je potrebno više vremena za njegovu hidrolizu i formiranje adukata sa DNK. U kliničkoj praksi, karboplatina je jednako efikasna koliko i *cis*-platina u lečenju tumora, dok su neki sporedni efekti, mučnina, leukopenija i nefrotoksičnost umanjeni.²²



Slika 3. Šematski prikaz razvoja sinteze kompleksa metala od *cis*-DDP do kompleksa drugih metala²³

Oksaliplatin (slika 2) pripada kompleksima platine treće generacije i najmlađi je odobren lek baziran na platini, poznat pod komercijalnim nazivom *Eloxatin*. Osim

ublaženih toksičnih efekata, upotreba oksaliplatine omogućava efikasniju terapiju kancera koji su rezistentni na *cis*-platinu. Poznato je da tumori rezistentni na *cis*-DDP, npr. kolorektalni tumor, pokazuju veliku osetljivost prema oksaliplatini, kada se koristi u kombinaciji sa 5-fluorouracilom i foliničnom kiselinom.²³

Svi kompleksi druge i treće generacije imaju drugačiju kinetiku ligandne izmene i reaguju znatno sporije od *cis*-platine, ali su njihovi adukti sa DNK stabilniji, što smanjuje verovatnoću reverzibilne veze i reakcije sa drugim biomolekulima, S-donorima u ćeliji.²³ Razlog za sporu hidrolizu je posedovanje stabilnijih liganada od jona hlora u prvobitnom kompleksu, dok reaktivnost kompleksa i stabilnost adukata sa DNK zavisi od amino grupa.²⁴ Spora kinetika ligandne izmene je karakteristična i za Pt(IV) komplekse. Isprva se verovalo da oni deluju tako što se u reduktivnoj sredini kancera redukuju do Pt(II) kompleksa i tako aktiviraju. Međutim, postoje podaci o interakciji Pt(IV) kompleksa u neredukovanoj formi sa DNK i njenim fragmentima.²⁵

Jedna od ideja za smanjenje toksičnih efekata kompleksa platine je bila sintetisanje tzv. prolekova, tj. kompleksa platine koji se administriraju u neaktivnoj formi, a zatim se kontrolisano aktiviraju na željenom mestu u organizmu. Primer su nereaktivni kompleksi azido-Pt(IV), koji se aktiviraju lokalnim UV ozračivanjem i redukuju u aktivne Pt(II) amino komplekse.²⁶

Potražnja za boljim hemoterapeutikom proširila je izbor i na *trans*-izomere platine, za koje se najverovatnije zbog neaktivnosti *trans* analoga *cis*-platine smatralo da su takođe biološki neaktivni. Otkriće da se zamenom amino grupa u *trans* izomerima nekim „glomaznijim“ ligandima dobijaju kompleksi veće citotoksičnosti i manjeg afiniteta za druge važne biomolekule, navelo je naučnike da ponovo razmotre *trans* analoge platine u hemoterapiji. Pokazano je da ovi kompleksi pokazuju veću citotoksičnost prema ćelijama kancera jajnika koje su rezistentne na *cis*-platinu.²⁷

Dinuklearni i trinuklearni kompleksi platine (slika 3) su još jedan zanimljiv primer novosintetisanih kompleksa karakterističnih po tome što formiraju višestruke veze sa molekulom DNK.²⁸ Predstavnik grupe je BBR3464, trinuklearni kompleks platine, koji je ušao u II fazu kliničkog testiranja i dao ohrabrujuće rezultate u terapiji kancera pankreasa, pluća i melanoma rezistentnih na *cis*-platinu,²⁹ ali je dalje istraživanje prekinuto jer nije pokazao dovoljnu efikasnost.

Strategija ciljane dostave hemoterapeutika dovela je do razvoja posebne grupe analoga *cis*-platine. Radi se o kompleksima platine koji su inkorporirani u micle sa dodatnim polimernim omotačom, za koji su često vezani biomolekuli. Polimerni omotač, najčešće od polietilen-glikola (PEG) sprečava interakciju kompleksa sa tiolnim grupama biomolekula i omogućava dužu stabilnost kompleksa u cirkulaciji, kao i veću selektivnost prema tumoru.³⁰ Biomolekuli koji se inkorporiraju u PEG omotač dodatno povećavaju specifičnost ovih komponenti za određena tkiva. Primeri su galaktoza i holna kiselina za ciljanu dostavu u tumor jetre ili derivati estrogena za tkiva sa receptorom za estrogen.³¹⁻³³

Karakteristika porfirina da se akumulira u neoplastičnim tkivima i da se koristi u fotodinamičkoj terapiji, poslužila je za sintetisanje nove klase kompleksa, tj. konjugata platine i porfirina. Kompleksi platine sa hematoporfirinom i tetraarilporfirinom se selektivno nagomilavaju u ćelijama tumora, a dodatno anti-tumorsko dejstvo je indukovano lokalnim ozračivanjem.^{34,35}

Upotreba lipozoma za ciljanu dostavu različitih lekova i hranljivih materija kombinovana je i sa kompleksima platine. Ovaj vid dostave je veoma efikasan i predstavlja jedan od najnovijih pristupa ciljane dostave lekova baziranim na kompleksima platine i u ovom radu biće detaljnije opisan. Lipozomalne formulacije *cis*-platine i oksaliplatine, tj. Lipoplatina (*Lipoplatin*) i Lipoksal (*Lipoxal*) ušli su u III i I fazu kliničkog ispitivanja, respektivno.

1.1.2. Kompleksi rutenijuma

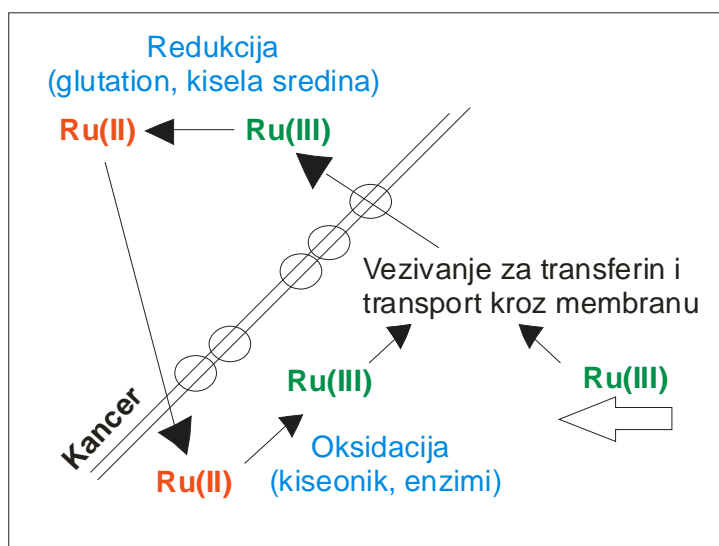
Kompleksi rutenijuma imaju veliki potencijal za upotrebu u terapiji kancera i to su jedini neplatinski kompleksi koji su ušli u fazu kliničkog testiranja kao hemoterapeutici. Kompleksi rutenijuma imaju najmanje tri značajne karakteristike, zbog kojih se smatra da bi se mogli uspešno primenjivati u terapiji kancera. To su:

- kinetika ligandne izmene,
- širok opseg oksidacionih stanja,

- i osobina rutenijuma da imitira gvožđe u biohemijskim procesima.

Kinetika ligandne izmene određuje biološku aktivnost kompleksa metala i njegovu interakciju sa makromolekulima, kao što su proteini i manji biomolekuli, S-donori. Parametri kinetike ligandne izmene za komplekse Ru(II) i Ru(III) su slični onima za komplekse Pt(II).

Rutenijum u fiziološkim uslovima može postojati u tri oksidaciona stanja: Ru(II), Ru(III) i Ru(IV), koja karakterišu različite biološke aktivnosti. Kompleksi Ru(III) su biološki inertniji od analognih Ru(II) i Ru(IV) kompleksa, a posebno je važno to što pod uticajem sredine mogu promeniti svoje oksidaciono stanje. Glutation, askorbat i proteini sa jednoelektronskim transferom su redukciona sredstva za Ru sa višim oksidacionim brojem, a molekularni kiseonik i citohrom oksiduju Ru(II). Redoks potencijal rutenijuma predstavlja potencijal za efikasniju hemoterapiju. Ideja je da se lekovi sintetišu kao relativno inertni kompleksi Ru(III), koji bi se aktivirali redukcijom u kiselijoj sredini, sa manjom koncentracijom kiseonika i povećanom koncentracijom glutaciona, kao što je slučaj sa ćelijama kancera. Redoks proces je reverzibilan, pa bi se aktivni kompleks Ru(II) u normalno prokrvljenim tkivima sa većom koncentracijom kiseonika, oksidovao do inertnog kompleksa Ru(III).³⁶

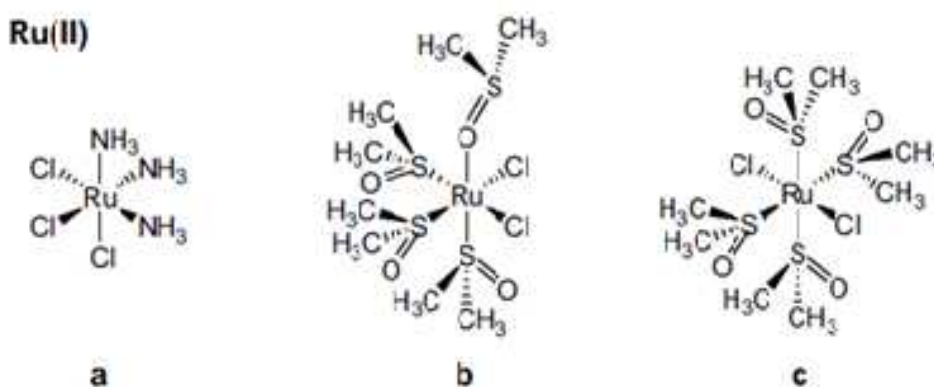


Slika 4. Promena oksidacionog stanja rutenijuma u zdravom i tkivu kancera. Ru(III) kompleksi su prolekovi, koji se u reduktivnoj sredini (tumor) transformišu u reaktivne Ru(II) komplekse.

Mimikrija gvožđa je još jedna važna osobina kompleksa rutenijuma. Rutenijum se na molekularnom nivou ponaša kao gvožđe i veže za biomolekule kao što su albumin i transferin. Čelije koje se ubrzano dele, kao što su ćelije kancera, imaju povišenu potrebu za gvoždem i broj transferinskih receptora na njihovoj površini je povećan 2-12 puta u odnosu na zdravu ćeliju istog tipa.³⁷ Vezujući se za transferin, kompleksi rutenijuma selektivnije deluju na tumorska tkiva i samim tim se sporedni neželjeni efekti terapije smanjuju.³⁸ Karakteristika kompleksa rutenijuma, koja ih izdvaja od ostalih kompleksa i doprinosi različitom mehanizmu njihovog antikancerogenog dejstva, jeste činjenica da su ovi kompleksi delotvorniji protiv metastaza kancera, nego protiv primarnih tumora. Smatra se da je razlog za to što sprečavaju odvajanje i migraciju ćelija tumora i njihovu ponovnu adheziju na udaljeno zdravo tkivo.^{39,40}

Među prvim kompleksima rutenijuma, čija su anti-tumorska dejstva ispitana, bio je strukturni analog *cis*-platine, hloro-amino kompleks Ru(III). Klark (*Clarck*) je sa svojim saradnicima prvi objavio rezultate o anti-tumorskoj aktivnosti kompleksa *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃] (slika 5a).²⁰ Osim toga, ispitana je i citotoksičnost još jednog amino kompleksa rutenijuma, koji se koristi kao sredstvo za bojenje aldehid fiksiranih mukopolisaharida u histologiji, kompleksa rutenijum crveno.⁴¹ Elektroneutralnost i slaba rastvorljivost ovih kompleksa u vodi je vrlo brzo prebacila fokus na komplekse rutenijuma sa *dms*o ligandima (dimetilsulfoksid). Prvi od ove grupe kompleksa, *cis*-[RuCl₂(*dms*o)₄] (slika 5b), nije pokazao citotoksičnost *in vitro* i ima tri puta manju citotoksičnost *in vivo*. Međutim, dalje istraživanje *dms*o kompleksa je nastavljeno zbog interesantnog podatka da pri maksimalnoj dozi, ovaj kompleks pokazuje veliku aktivnost i prema primarnom tumoru i metastazama na primeru miša sa čvrstim metastaznim tumorom.⁴² Citotoksičnost *trans* izomera Ru(II) kompleksa, *trans*-[RuCl₂(*dms*o)₄] (slika 5c), je čak oko 20 puta veća od *cis*-analogu i ovaj kompleks je efikasniji u smanjenju broja spontanih metastaza. U eksperimentima na miševima, kojima je operativno uklonjen primarni tumor, *trans*-[RuCl₂(*dms*o)₄] je, čak i u poređenju sa *cis*-platinom, dao bolje rezultate po pitanju postoperativnog produženja životnog veka. Dakle, *trans* izomer kompleksa Ru(II) je pokazao manju aktivnost prema primarnom tumoru, ali veću selektivnost i efikasnost prema metastazama.⁴³ Ova činjenica ukazala je na razliku u mehanizmu reakcija kompleksa rutenijuma u odnosu na komplekse geometrijskih izomera platine.⁴⁴

Pravu revoluciju među kompleksima rutenijuma pokrenula su dva izostrukturalna kompleksa Ru(III): $[ImH]trans-[RuCl_4(Im)_2]$ i $[IndH]trans-[RuCl_4(Ind)_2]$, poznatiji po imenima ICR i KP1019, respektivno (Im = imidazol i Ind = indazol). Osim što su ovi kompleksi pokazali aktivnost prema nekoliko različitih tipova tumora, posebno je interesantno to što su aktivni prema kolorektalnim autohtonim tumorima rezistentnim na komplekse platine.⁴⁵ Oba kompleksa su predstavljena na slici 6. KP1019 je drugi kompleks rutenijuma koji je započeo fazu kliničkog testiranja 2003. godine. Iako ima sporiju kinetiku ligandne izmene i nema anti-metastatsku aktivnost, lakše se transportuje u ćelije i pokazuje aktivnost prema kolorektalnim tumorima rezistentnim na *cis*-platinu.⁴⁶ Takav rezultat je potpora daljem istraživanju i sintezi novih kompleksa rutenijuma i drugih metala, koji su aktivni prema tumorima rezistentnim na platinu.



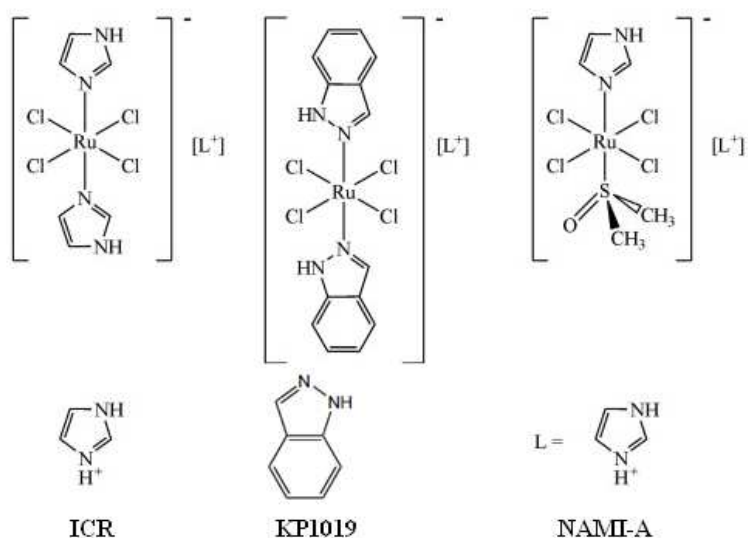
Slika 5. Struktura reprezentativnih Ru(II) kompleksa sa antitumorskom aktivnošću: a) *fac*- $[RuCl_3(NH_3)_3]$, b) *cis*- $[RuCl_2(dmsO)_4]$, c) *trans*- $[RuCl_2(dmsO)_4]$.

Ranih 1990-tih, sintetisan je $[Na]trans-[RuCl_4(Im)(dmsO-S)]$ ili NAMI, koji je strukturalni analog sa ranije sintetisanim kompleksom ICR. Kompleks je aktivan prema čvrstim metastazirajućim tumorima⁴⁷, ali je u prekliničkim istraživanjima zamenjen svojim analogom, odnosno imidazolnom solju istog kompleksa, NAMI-A ($[ImH]trans-[RuCl_4(Im)(dmsO-S)]$). Kompleks NAMI-A (slika 6) je prvi kompleks rutenijuma koji je ušao u fazu kliničkog testiranja, 1999. godine. NAMI-A inhibira razvoj i rast

pulmonarnih metastaza u svim eksperimentalnim modelima čvrstih tumora *in vivo*. Ovdje je važno naglasiti da se anti-tumorska aktivnost NAMI-A ne zasniva na interakciji sa molekulom DNK, već sa proteinima na ćelijskoj membrani ili sa kolagenom u ekstracelularnom prostoru.^{48,49}

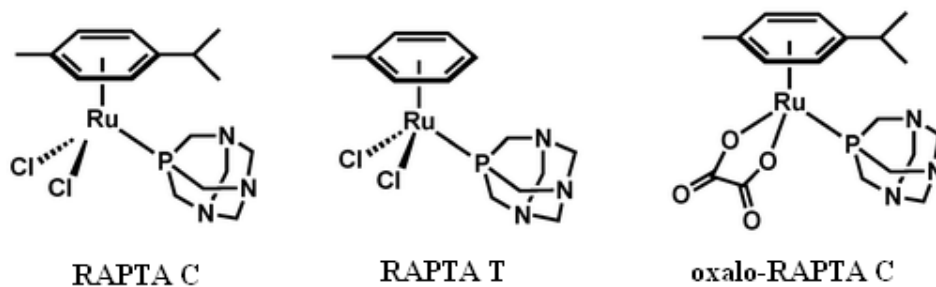
Veliku klasu kompleksa rutenijuma čine arenski kompleksi Ru(II), koji se odlikuju većom stabilnošću prema hidrolizi i dospevaju u neizmenjenom obliku do citoplazme. Pretpostavlja se da deluju kao katalizatori za oksidaciju glutationa, čime doprinose povećanju ćelijskog oksidativnog stresa i programiranoj ćelijskoj smrti, tj. apoptozi.

Arenski kompleksi inhibiraju enzime važne za napredovanje kancera (tiodredoksin reduktaza i katpepsin B) ili za razvoj ćelijske rezistancije na lek (glutation S-transferaza). Posebnu klasu arenških kompleksa rutenijuma čine tzv. RAPTA kompleksi, koji osim dva hloridna liganda sadrže i jedan relativno hidrofobni, facijalno koordinisan aromatični prsten i jedan PTA ligand (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantan). Struktura odabranih RAPTA kompleksa prikazana je na slici 7. RAPTA kompleksi su pokazali anti-metastatsko dejstvo i manju toksičnost prema zdravim ćelijama čak i posle dužeg izlaganja milimolarnim koncentracijama.^{50,51}



Slika 6. Struktura kompleksa a) [ImH]*trans*-[RuCl₄(Im)₂] ili ICR, b) [IndH]*trans*-[RuCl₄(Ind)₂] ili KP1019, c) ([ImH]*trans*-[RuCl₄(Im)(dmsos-S)] ili NAMI-A.

Kompleksi rutenijuma sa polipiridinskim ligandima su izučavani uporedo sa polipiridinskim kompleksima platine, zbog ispoljenog vezivanja za DNK i citotoksičnosti. Za razliku od ostalih kompleksa, polipiridinski ligandi nisu lako odlazeće grupe, pa se se njihovo dejstvo svodi na interkalaciju DNK.⁵² Osim toga, ovi kompleksi modifikuju funkciju ćelijske membrane i proces ćelijske adhezije.⁵³



Slika 7. Struktura odabranih kompleksa rutenijuma iz grupe RAPTA

Sintetisani su i brojni oligonuklearni kompleksi rutenijuma, među kojima treba pomenuti komplekse sa klasterima rutenijuma,⁵⁴ komplekse sa platinom i rutenijumom,⁵⁵ komplekse rutenijuma tzv. DNK interkalatora⁵⁶ i supramolekularne komplekse rutenijuma, kao što je tzv. „Trojanski konj“.⁵⁷

1.1.3. Kompleksi drugih metala sa antitumorskim dejstvom

Ohrabrujući rezultati istraživanja kompleksa rutenijuma, koji pokazuje aktivnost prema tumorima rezistentnim na komplekse platine, usloveli su dalja istraživanja i otkriće novih kompleksa drugih metala sa anti-tumorskim dejstvom. Osim kompleksa rutenijuma, u istraživanjima su pozitivne preliminarne rezultate dali kompleksi titanijuma, galijuma, gvožđa, kobalta, zlata, osmijuma, bizmuta, rodijuma i vanadijuma.⁵⁸

Kompleksi titanijuma, budotitan i titanocen dihlorid, su u prekliničkim studijama pokazali aktivnost prema različitim vrstama kancera. Međutim, navedeni

kompleksi su slabo rastvorljivi u vodi, hidrolitički nestabilni u fiziološkim uslovima i čak 70-80 % ukupne primljene količine se veže za proteine plazme.⁵⁹

Kompleksi galijuma ispoljavaju anti-tumorsko dejstvo uticajem na strukturu DNK i biosintezu proteina, inhibicijom enzima (ATP-aze i DNK polimeraze) ili uticajem na funkciju mitohondrija.⁶⁰ Galijum nitrat, dat intravenozno, nema efekte na određene vrste kancera, kao što su melanom ili rak dojke, ali je u kombinaciji sa drugim hemoterapeuticima aktivan protiv metastatskih urotelijalnih karcinoma. Galijum hlorid i galijum maltolat imaju sinergistički efekat sa ostalim agensima, kao što su *paclitaxel*, *gemcitabine* i *orvinorelbine*.⁵⁹

Prvi kompleksi gvožđa sa anti-tumorskim dejstvom su bili ferocenijum pikrat i ferocenijum trihloroacetat. Citotoksičnost ferocenijumskih soli se zasniva na formiranju reaktivnih kiseoničnih vrsta i stvaranju oksidativnog stresa, pa oni posredno deluju na DNK.⁶¹ Posebnu klasu kompleksa gvožđa su gvožđe karbonil nukleozidi, za koje je dokazano da izazivaju programiranu smrt ćelija.⁶²

Predstavnik kompleksa kobalta sa citotoksičnim i anti-proliferativnim efektom je heksakarbonil dikobaltni kompleks propargiličkog estra acetilsalicilne kiseline ili Co-ASS. Interesantan je podatak da se za ovaj kompleks i njemu po strukturi slične komplekse ne može uspostaviti korelacija između lipofilnosti, transporta u ćeliju i citotoksičnosti. Na primer, ćelije humane leukemije akumuliraju za jedan red veličine manje kobalta u odnosu na ćelije kancera dojke, dok je istovremeno proliferativni efekat na ove ćelije veći.⁶³ Pretpostavlja se da se dejstvo kompleksa kobalta ispoljava preko inhibicije ciklooksigenaza, odnosno da prvenstveno deluju kao anti-inflamatorni lekovi.

Fosfino kompleksi zlata (*Auranofin*) su se najpre koristili u tretmanima reumatoidnog artritisa.⁶⁴ Međutim, kasnije je dokazana i njihova aktivnost na rast tumorskih ćelija u kulturi i *in vivo*. Drugu grupu kompleksa zlata čine kompleksi sa bis(difenilfosfino)etanskim ligandima, kao što je $[\text{Au}(\text{dppf})_2]\text{Cl}$. Osim što reaguje sa molekulom DNK, ovaj kompleks menja membranski potencijal mitohondrija, povećavajući njihovu respiraciju i permeabilnost.⁶⁵ Pretpostavlja se da je ovaj efekat izazvan posredno, preko inhibicije tioredoksin reduktaze.⁶⁶

Podaci o strukturi, sintezi, anti-tumorskom dejstvu i interakcijama sa biomolekulima kompleksa drugih metala su detaljnije opisani u literaturi.^{58,67,29}

2. INTERAKCIJA KOMPLEKSA METALA SA BIOMOLEKULIMA

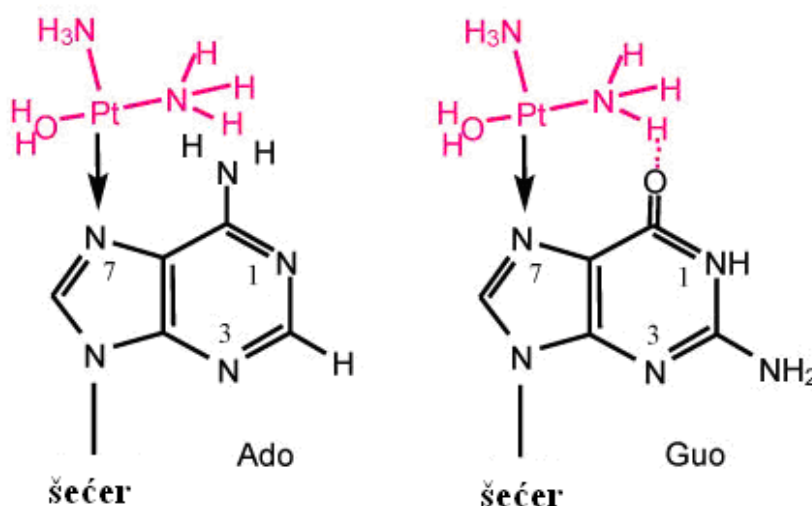
U ovom odeljku je pažnja posvećena interakciji kompleksa platine i rutenijuma sa različitim biomolekulima. Pre svega, opisana je interakcija kompleksa metala sa molekulom DNK, odnosno metom hemoterapeutika koji za cilj imaju da zaustave dalju replikaciju i razmnožavanje ćelija.

Međutim, kompleksi metala interaguju i sa drugim biomolekulima, peptidima i proteinima, preko atoma azota ili sumpora. Ovde je važno istaći prednosti kompleksa metala nad organskim klasičnim lekovima, čije se dejstvo zasniva na interakciji sa biomolekulima. Naime, geometrija klasičnih organskih lekova ograničena je mogućnostima ugljenika da gradi 3 vrste veza sa karakterističnom geometrijom: linearnu (sp -hibridizacija), trigonalno planarnu (sp^2 -hibridizacija) i tetraedarsku (sp^3 -hibridizacija). Upotreba prelaznih metala u neorganskoj medicini, omogućava sintezu kompleksa sa oktaedarskim centrom i 6 supstituenata, koji može da formira čak 30 stereoizomera. Poređenja radi, asimetrični tetraedarski ugljenik daje mogućnost za ukupno dva stereoizomera. Broj mogućih stereoizomera opisuje sposobnost metalnog centra da gradi trodimenzionalne strukture i tako poveća broj mogućih interakcija sa biomolekulima. Novi pristupi hemoterapiji se zasnivaju na sintezi kompleksa metala, koji selektivno inhibiraju ćelijske enzime, važne za rast i razvoj tumora. Primer je interakcija kompleksa metala sa ciklooksigenazama i drugim proinflamatornim enzimima koji potpomažu širenje kancera i stvaranje metastaza.

2.1. Interakcija sa DNK

Kompleksi platine i rutenijuma interaguju sa molekulom DNK na više različitih načina i mehanizam ovih interakcija je detaljno ispitan. Kompleks metala se može vezati za molekul DNK preko koordinativnih veza ili se može ugraditi (interkalirati) u molekul preko nekovalentnih interakcija, kao što su elektrostatičke interakcije ili građenje vodoničnih veza. Osim toga, kompleksi metala mogu oksidovati molekul DNK ili inicirati hidrolizu molekula.

Molekul DNK sadrži više potencijalnih mesta za vezivanje Pt. To su atomi kiseonika u fosfatnoj grupi i ribози, kao i atomi kiseonika i azota u purinskim i pirimidinskim bazama. Najčešće se metali vezuju za molekul DNK preko baza i to na N7 pozicijima na guaninu i adeninu, N3 poziciji na citozinu ili deprotonovanoj N3 poziciji na timinu i uracilu.^{68,69} Međutim, može se reći da količina vezane platine za polinukleotid zavisi od količine guanina u lancu. Naime, veza kompleksa *cis*-platine i guanozina je verovatnija od veze sa adenozinom zbog dodatne stabilnosti ostvarene formiranjem vodonične veze.²³ Po ulasku u ćeliju, u sredini sa manjom koncentracijom hloridnih jona, dolazi do hidratacije kompleksa i zamene hloridnih liganada molekulima vode. Kompleks u ovoj formi reaguje sa adenozinom i guanozinom tako što se platina koordiniše za atom azota u oba slučaja, ali sa guanozinom formira dodatnu vodoničnu vezu (slika 8).

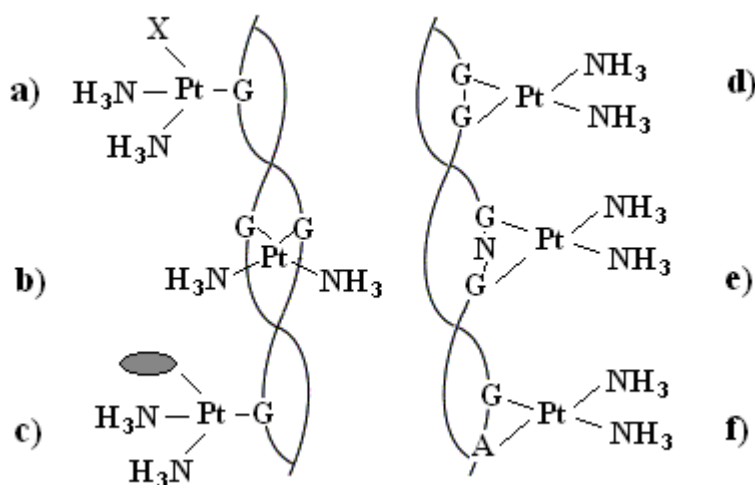


Slika 8. Interakcija kompleksa *cis*-platine sa adenozinom i guanozinom. Formiranje vodonične veze između vodonika iz amino grupi kompleksa i kiseonika u molekulu guanozina, čini ovu vezu stabilnijom.²³

Najviše adukata sa DNK, platina formira preko intralančanih veza između dva susedna guanina (65%) (slika 9d) ili susednih guanina i adenina (25%) (slika 9f). Ostali DNK-platina adukti formiraju se preko monofunkcionalno vezane *cis*-platine za

guaninsku bazu (slika 9a), interlančane veze između dva guanina (slika 9b) i intralančane veze dva guanina razdvojena sa jednom ili više baza (slika 9e).⁷⁰

Doprinos svakog od ovih adukata citotoksičnom efektu *cis*-platine još uvek nije precizno određen. *In vitro* studije na prokariotskim i eukariotskim ćelijama, kao i *in vivo* studije dokazale su da DNK adukti sa *cis*-platinom i *trans*-platinom blokiraju dejstvo DNK-polimeraze, neophodne za replikaciju DNK lanca.^{71,72} Imajući u vidu da *trans* izomer *cis*-platine nema anti-tumorsko dejstvo, može se zaključiti da inhibicija DNK replikacije nije jedini faktor koji određuje efikasnost anti-tumorskog kompleksa.



Slika 9. Šematski prikaz mogućih veza kompleksa *cis*-platine i DNK: a) monofunkcionalna veza kompleksa i guanina (X=Cl, OH); b) interlančana veza sa dva guanina; c) *cis*-platina vezana za guanin i protein; d) intralančana veza sa dva susedna guanina; e) intralančana veza sa dva guanina razdvojena sa jednom ili više baza; f) intralančana veza sa susednim guaninom i adeninom.

Uticao oba kompleksa na proces transkripcije DNK je komplikovaniji za interpretaciju, pa je dosta pažnje posvećeno aspektu veće citotoksičnosti jednog kompleksa zbog uticaja na procese reparacije odnosno „popravke“ DNK lanca. Naime, najčešći adukti *cis*-platine i DNK (1,2-intralančani adukti), deformišu trodimenzionalnu strukturu DNK lanca i onemogućavaju prirodan proces enzimske popravke lanca. Ovakav rezultat je potvrđen u *in vitro* studiji i iako se ne može sa sigurnošću tvrditi da

je inhibicija reparativnih mehanizama ključ anti-tumorske aktivnosti, indikativno je da neaktivni kompleks *trans-DDP* zbog svoje geometrije ne može da formira 1,2-intralančane adukte. Grupa naučnika na čelu sa Stefanom Lipardom (*Stephen Lippard*) sa Tehnološkog Instituta u Masačusetsu, ispitala je uticaj kompleksa platine na reparativne mehanizme DNK i najpre otkrila da određeni proteini u znatno većoj meri „prepoznaju“ i vežu adukte Pt-DNK od neizmenjenih molekula DNK.⁷³ Svi proteini koji su ispoljavali veći afinitet prema DNK aduktima platine su u svojoj strukturi posedovali sličnu ili identičnu sekvencu amino-kiselina, poznatu pod nazivom grupa visoke mobilnosti ili HMG (*high mobility groups*), pa su nazvani: proteini sa HMG domenom. Proteini sa HMG domenom se vežu za Pt-DNK adukte *in vitro*, dok je *in vivo* dokazano da su genetski modifikovane ćelije, bez gena za sintezu ovih proteina, manje senzitivne na *cis*-platinu. Postoje dve teorije o uticaju proteina sa HMG domenom na pojačanu citotoksičnost *cis*-platine. Jedna teorija ukazuje na to da su mnogi proteini koji pripadaju ovoj grupi transkripcioni faktori i da je apoptoza ćelija u kojima se protein sa HMG domenom vezao za adukte *cis*-platine i DNK najverovatnije izazvana transkripcionim mehanizmima. Po drugoj teoriji, protein sa HMG domenom interaguje sa aduktom Pt-DNK preko fenil grupe, koja se veže za adukt preko „procepa“ u strukturi koji nastaje nakon vezivanja platine za molekul DNK. Na taj način, ovi proteini savijaju i deformišu molekul DNK, time usporavajući i otežavajući njegovu reparaciju drugim enzimima, što utiče na normalne funkcije ćelije (replikaciju, transkripciju) i moguće dovodi do apoptoze.

Saznanje o proteinima sa HMG domenom, navelo je naučnike da započnu upotrebu drugih proteina, koji bi se još jače i stabilnije vezivali za adukte DNK i platine, ali i da sintetišu nove analoge *cis*-platine koji bi formirali najstabilniju formaciju kompleks-DNK-protein.^{73,74} Jedan od primera za to su kompleksi platine sa *dach* (1,2-diaminocikloheksan) ligandima, koji grade stabilnije adukte sa DNK i tako povećavaju citotoksičnost kompleksa.⁷⁵

Nekovalentne interakcije sa DNK, kao što su interkalacija ili građenje vodoničnih veza, su podjednako važne kao kovalentne interakcije, jer se preko njih može ispoljavati citotoksičnost kompleksa metala. Planarni aromatični heterociklični ligandi, kao što su fenantrolin ili terpiridin, mogu se „zaglaviti“ između para azotnih baza u molekulu DNK preko dipol-dipol interakcija. Vodonične veze se formiraju

između koordinisanih liganada i polinukleotida, preko atoma kiseonika u fosfatnim grupama na molekulu DNK. Na primer, ukoliko ligandi kompleksa sadrže amino grupe, vodonik iz amino grupa gradi vodonične veze sa kiseonikom iz fosfata ili sa azotom iz purinskih baza.

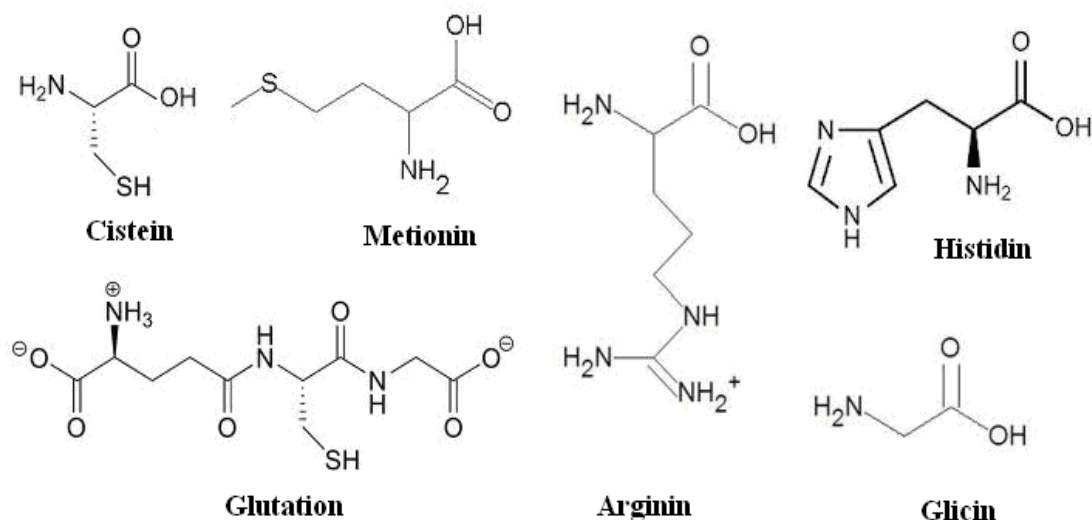
Neretko, kompleksi interaguju sa molekulom DNK gradeći istovremeno i kovalentne i nekovalentne veze. Primer je reakcija *cis*-DDP sa guaninom, gde je Pt koordinisana na poziciji N7, ali amino ligandi grade vodoničnu vezu sa fosfatom.⁷⁶ Kada su u pitanju voluminozniji ligandi, onda se i sterne interakcije moraju uzeti u obzir. Kompleks Pt(*terpy*)Cl⁺ interaguje i koordinišući platinu, ali i preko liganda, interkalacijom. Međutim, zbog sternih efekata, interakcije ne mogu biti simultane, pa se u dizajniranju novih kompleksa metala gde je meta DNK molekul, mora voditi računa ne samo o izboru liganada koji ispoljavaju jake nekovalentne interakcije sa mononukleotidima, već i o specifičnoj geometriji kompleksa.

Redoks reakcije metala sa polinukleotidima predstavljaju posebnu vrstu interakcije, gde prisustvo metala može modifikovati molekul DNK i bez prethodnog kovalentnog vezivanja ili interkalacije. Tipičan primer redoks reakcije je Fentonova reakcija, gde dvovalentno gvožđe u prisustvu hidrogen peroksida proizvodi hidroksilni radikal i posredno deluje na DNK, prekidajući šećerno-fosfatni skelet molekula.⁷⁷ Joni metala proizvode i druge slobodne radikale, kao što su superoksid ili singletni kiseonik. Kompleksi rutenijuma Ru(*phen*)₃²⁺ u prisustvu svetlosti stvaraju singletni kiseonik, pa fotoliza adukta DNK i ovog kompleksa dovodi do prekidanja DNK lanca u prisustvu kiseonika i u slabo alkalnoj sredini. Za razliku od hidroksilnog radikala koji reaguje sa prstenastom strukturom šećera, singletni kiseonik oksiduje azotne baze, najviše guanin.⁷⁸

Hidrolitičke reakcije nukleinskih kiselina u prisustvu metalnih jona su interesantne sa stanovišta reverzibilnosti. U redoks reakciji, oksidovanjem šećera, dolazi do odvajanja fragmenta šećera i azotne baze od polimera DNK, koji je zatim nemoguće direktno vratiti u prethodno stanje, za razliku od hidrolitičke reakcije. Metali su Luisove kiseline i polarizuju vezu između kiseonika i fosfora u fosfodiesteru. Primer je strategija za hidrolitički prekid lanca DNK u prisustvu Ru(DIP)₂ Macro sa dodatim Zn²⁺, Cd²⁺ ili Pb²⁺ *in situ*. Kompleks rutenijuma se najpre veže za DNK, a zatim preko dietilentriaminskih grupa koordiniše dvovalentne jone koji podstiču hidrolizu DNK.⁷⁹

2.2. Interakcija sa proteinima

Od samog otkrića anti-tumorskog dejstva *cis*-platine, istraživanja o mehanizmu dejstva ove komponente bila su usredsređena na interakciju sa molekulom DNK, iako je pokazano da samo nešto manje od 1% platine u ćeliji interaguje sa DNK.⁸⁰ Na svom putu od administracije u krv pacijenta do jedra ćelije, kompleksi platine i rutenijuma reaguju sa brojnim drugim biomolekulima, odnosno nukleofilima, koji sadrže N- ili S- elektron donorske atome. Amino-kiseline preko kojih se ostvaruje veza sa peptidima i proteinima su cistein i drugi tioli, histidin i drugi imidazoli, arginin i drugi guanidini i glicin (slika 10).



Slika 10. Strukturne kiseline koje interaguju sa kompleksima metala (cistein, metionin, arginin, histidin i glicin) i glutation.

Samo neki od biomolekula za koje se vežu kompleksi platine i rutenijuma su: transportni proteini u krvnoj plazmi (albumin, transferin, hemoglobin), membranski proteini za transport dvovalentnih jona metala ili membranski transporteri za bakar, peptidi glutation i metalotionein u ćelijskoj citoplazmi ili enzimi: ciklooksigenaza, kolagenaza, acetilholinesteraza, tioredoksin reduktaza i proteolitički enzimi. Interakcija kompleksa metala sa drugim biomolekulima osim DNK određuje sudbinu kompleksa metala i njihovu efikasnost u sprečavanju razmnožavanja ili migracije tumorskih ćelija.

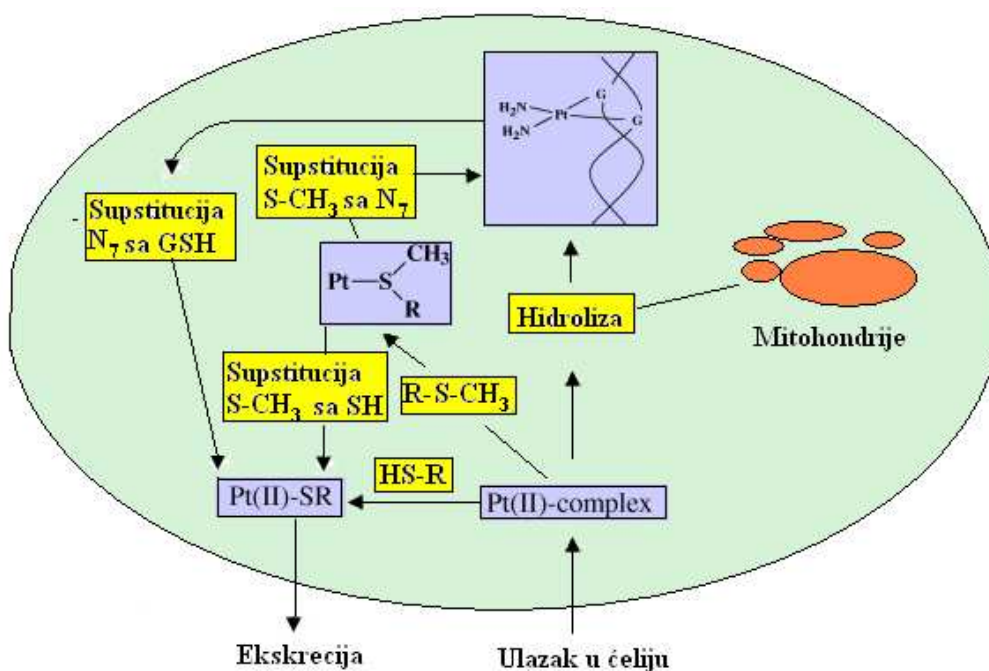
U većini slučajeva, vezivanje kompleksa platine i rutenijuma za biomolekule dovodi do inaktivacije kompleksa, podstiče razvoj ćelijske rezistencije i izbacivanje kompleksa iz ćelije ili povećava toksične efekte, kao što je nefrotoksičnost. S druge strane, interakcija sa proteinima za transport kroz membranu povećava efikasnost kompleksa metala, olakšavajući njihov unos u ćeliju, a inhibicija metalo-proteinaza, ciklooksigenaza i tioredoksin-reduktaza doprinosi anti-metastatskom i anti-tumorskom dejstvu kompleksa rutenijuma i platine. Iz navedenih razloga, medicinska neorganska hemija pridaje sve više značaja proteinima i enzimima kao potencijalnim metama kompleksa metala u hemoterapiji.

Najčešće mesto vezivanja platine i rutenijuma za protein je cistein, amino-kiselina sa tiolskom grupom (-SH). Funkcionalna grupa cisteina se lako oksiduje i formira disulfidni most cistin (RSSR) koji ima važnu ulogu pri formiranju odgovarajuće trodimenzionalne strukture proteina u nativnom stanju. Metali se koordinišu preko S-donorskog atoma za cistein i biomolekule koji ga sadrže, kao i za metionin, drugu amino-kiselinu sa ovim atomom.⁸¹ Smatra se da je interakcija platine sa biomolekulima koji sadrže cistein ili metionin uzrok negativnih efekata hemoterapije, kao što su nefrotoksičnost, gastrointestinalno trovanje, ototoksičnost, neurotoksičnost i kardiotoksičnost.⁸²⁻⁸⁴ Pt(II) ima znatno veći afinitet prema S-donorima, naročito tiolima, u odnosu na N-donore u DNK bazama.⁸³

Kada se platina po ulasku u ćeliju veže za neki od S-biomolekula, njena dalja subina je određena jačinom te interakcije. Na slici 11 je šematski prikazano nekoliko kompetitivnih reakcija kompleksa platine sa biomolekulima i DNK. Najkraći put do molekula DNK je prostom hidrolizom, odnosno aktivacijom kompleksa. Međutim, aktivirani kompleks može reagovati sa cisteinom ili biomolekulom koji sadrži cistein (R-SH) i biti izbačen iz ćelije. Ukoliko reaguje sa metioninom ili biomolekulom koji sadrži metionin (R-S-CH₃), od stabilnosti formirane veze zavisi da li će modifikovani kompleks dalje supstituisati grupu S-CH₃ sa N₇, odnosno reagovati sa guaninom iz DNK ili sa tiolnom grupom SH i biti ekskretovan iz ćelije.

Pretpostavlja se da su adukti Pt sa molekulima koji sadrže sumpor (tioetri) ćelijski rezervoari platine i da predstavljaju intermedijere kompleksa platine koji se transformišu u Pt-DNK adukte.^{85,86} S druge strane, interakcija sa proteinima bogatim cisteinom (glutation ili metalotionein) dovodi do inaktivacije kompleksa platine, koji

mogu da zamene mesto sa azotnom bazom iz već formiranog Pt-DNK adukta ili sa tioetrom iz Pt-tioetra, formirajući stabilne Pt-tiolate.⁸⁴ Pt-glutation adukt se izbacuje iz ćelije aktivnim membranskim transportom u roku od 12 sati, pa se pretpostavlja da je glutacion uzrok ćelijske rezistencije na platinu i nefrotoksičnosti.⁸⁷ Eksperimentalno se može dokazati da sa povećanjem koncentracije glutaciona u ćeliji, platina u manjoj meri koordiniše za DNK. Paradoksalno, platina koordinisana za sam cistein se transformiše do Pt-DNK adukta.⁸⁸



Slika 11. Šematski prikaz kompetitivnih reakcija kompleksa platine sa DNK, cisteinskim i metioninskim grupama u ćeliji⁸⁴

Na prvi pogled, može se zaključiti da postoji korelacija između efikasnosti terapije platinom i nivoa glutaciona u ćeliji. Glutacion je detoksikant i pomaže izbacivanje endogenih i egzogenih štetnih produkata van ćelije, ali su do sada dobijeni oprečni rezultati: studija na ćelijama jajnika pokazuje da se sa povećanjem koncentracije glutaciona smanjuje efikasnost *cis*-platine. Međutim, u drugim studijama na pacijentima je prikazana povećana efikasnost platine kada se daje zajedno sa glutationom.^{89,88}

Metalotionein (MT) je protein koji se sastoji od 61 amino-kiseline, od kojih su čak 20 cisteini i jedan metionin na N-terminusu.⁹⁰ Osnovna funkcija metalotioneina je da veže jone teških metala, pa tako veže i jone žive i kadmijuma, ali i tiolatne klastere Pt(II).⁹¹⁻⁹³ U nativnoj formi MT veže čak 3-4 Pt(II), pri tome istiskujući Zn, Cd i Cu.⁹⁴ Pretpostavlja se da MT ima ulogu u transportu platine i njenoj akumulaciji, ali je dokazano i da njegova povećana koncentracija u ćeliji ukazuje na rezistenciju na *cis*-platinu.⁹⁵

Serumski albumin (66,5 kDa) je mali protein čije su funkcije održavanje konstantne pH vrednosti krvi, transport masnih kiselina i detoksikacija.⁹⁶ Koncentracija ovog tiola u krvi je čak 5 g u 100 ml, pa preko cisteina i metionina može da veže većinu kompleksa Cu(II), Ni(II), Hg(II), Ag(II), Au(I) i Pt(II) u plazmi.⁹⁶⁻⁹⁸ Od 585 amino-kiselina od kojih se sastoji, 35% su cisteini, gde je samo jedan u redukovanoj formi, dok ostali imaju strukturnu ulogu. U krvi, taj jedan cisteinski ostatak na poziciji 34 u 30% slučajeva gradi disulfidne mostove sa cisteinom i glutationom, dok ostatak veže jone metala. Humani serum albumin ima još i 6 metioninskih ostataka kojima može da redukuje i koordiniše metalne jone.⁹⁹ Čak 72,3 % platine se veže za albumin, dok se pri istim uslovima inkubacije 39,5 % veže za α_1 -glikoprotein, a 49,2 % za γ -globulin.¹⁰⁰

Pomoću ESI¹ (elektron sprej jonizacije) masene spektrometrije dokazano je vezivanje *cis*-platine, karboplatine i oksaliplatine za hemoglobin.¹⁰¹ Istom metodom je dokazano i vezivanje kompleksa platine (ne i *trans* izomera) za metioninske i histidinske nastavke na mioglobinu.¹⁰²

Dok neki proteini imaju ulogu rezervoara platine u organizmu, transferin je primer serumskog proteina koji veže kompleks platine ili rutenijuma i tako doprinosi njenoj većoj efikasnosti, vezujući se za transferinske receptore na ćelijama. Tripsinskom digestijom adukta *cis*-platina-transferin dokazano je vezivanje platine na treoninskom (457) ostatku, koji predstavlja mesto za vezivanje Fe(III). To je potvrđeno tehnikama masene spektrometrije sa tzv. „mekom“ jonizacijom.^{103,104} Vezivanje platine za transferin značajno odlaže eliminaciju kompleksa iz organizma, dok se rutenijum pri vezivanju za transferin ponaša isto kao i gvožđe, što doprinosi većoj selektivnosti i efikasnosti transporta u ćelije kancera. Naime, kada se transferin dodaje zajedno sa kompleksom KP1019 u ekvimolarnom odnosu i sa prirodnom relativnom

¹ Videti listu skraćenica.

koncentracijom Fe(III) (30 %), količina rutenijuma u ćelijama se poveća za čak četiri puta u odnosu na slučaj kada se unosi sam kompleks bez transferina.¹⁰⁵

U interakciji sa serumskim proteinima, kompleksi platine indukuju konformacione promene tih biomolekula. Ova činjenica je važna, jer praćenjem promene strukture proteina eksperimentalnim metodama, može se zaključiti o interakciji ili vezivanju kompleksa metala za biomolekule. Posebno je značajno istaći uticaj kompleksa platine na mikrodomene proteina za vezivanje drugih molekula ili na promenu sekundarne strukture i inaktivaciju proteina. Uticaj platine na promene mikrodomena na albuminu ili drugim proteinima koji sadrže triptofan, meri se fluorescentnom mikroskopijom. Vezivanjem platine za albumin smanjuje se intenzitet fluorescencije triptofana za 30-75% u odnosu na početnu vrednost. Takvi rezultati ukazuju na promene sekundarne strukture u hidrofobnom „džepu“ proteina.

Platina interaguje sa albuminom i drugim proteinima i tako što formira dimere, pa podstiče agregaciju.¹⁰⁰ Slično je i sa predstavnicima anti-tumorskih kompleksa rutenijuma, KP1019 i KP418, čiji se uticaj na strukturu proteina prati merenjem smanjenja intenziteta fluorescencije triptofana. Vezivanje platine i rutenijuma za serumske proteine utiče i na reakcije drugih biomolekula. Na primer, u prisustvu rutenijum N-heterocikličnih komponenti, reaktivnost albumina sa bilirubinom, hemom, lekom varfarin (*warfarin*) ili metalima (Cu(II)) se smanjuje.

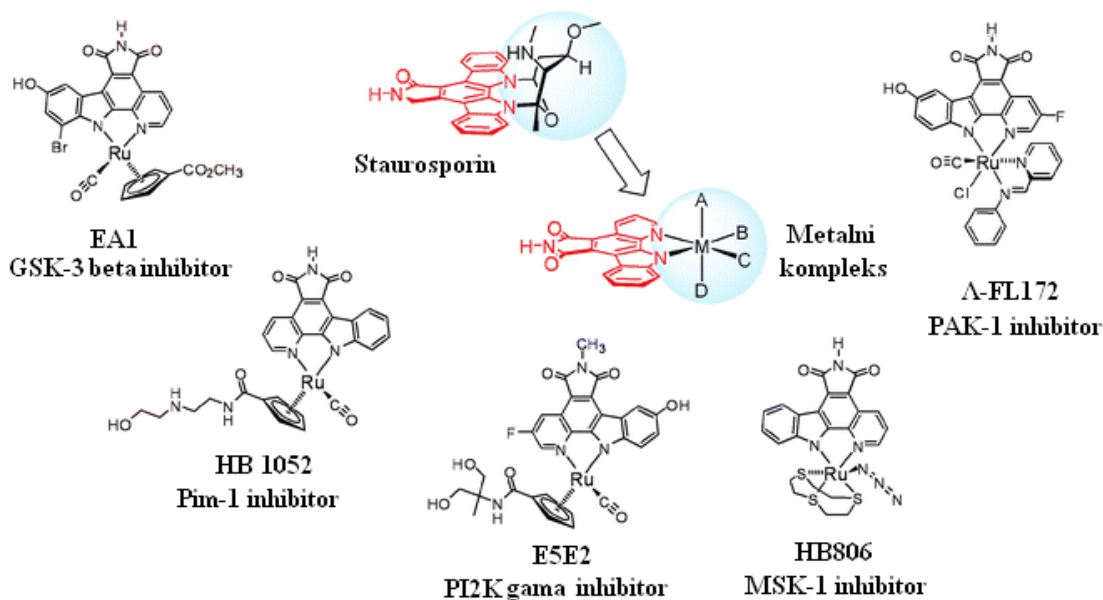
Imajući u vidu činjenicu da funkcija biomolekula zavisi od njihove strukture, jasno je da vezivanje i interakcija kompleksa metala sa biomolekulima modifikuje njihovu funkciju. Interakcija kompleksa platine i rutenijuma sa enzimima stoga predstavlja jedan od novih pristupa modernoj hemoterapiji.¹⁰⁶

Na ćelijama kvasca i na sisarima je dokazano da se izostavljanjem gena za membranski transporter za bakar Crt1, smanjuje akumulacija platine u ćeliji i povećava ćelijska rezistencija na komplekse platine.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Na membranama humanih ćelija ekspimirano je nekoliko vrsta membranskih proteina za transport organskih katjona, koji takođe učestvuju u aktivnom transportu kompleksa platine u ćeliju i smatra se da je ekspresija ovih proteina važan parametar za ispitivanje ćelijske rezistencije i citotoksičnosti leka.¹¹⁰⁻¹¹²

Primer netradicionalne mete u hemoterapiji su kinaze. Mutacija kinaza ili poremećen metabolizam ovih enzima su povezani sa različitim bolestima kod ljudi.

Osim toga, kinaze pripadaju velikoj porodici enzima sa određenom strukturom i specifičnim mestima za vezivanje molekula ATP (adenozin tri fosfat), što ih čini pogodnim za dizajniranje selektivnih inhibitora. Komponente koje bi se kompetitivno sa ATP vezivale za specifično mesto na kinazama, mogle bi delovati kao inhibitori ovih enzima. Jedan od inhibitora kinaza je organska komponenta staurosporin, koja je poslužila kao inspiracija za sintezu kompleksa rutenijuma sa istim karakteristikama.¹⁰⁶ Modifikacijom strukture ATP-kompetitivnih indolokarbazolnih alkaloida, dobijeno je nekoliko kompleksa rutenijuma, koji u nanomolarnim ili pikomolarnim količinama inhibiraju različite kinaze (slika 12).¹¹³

Jedan od primera je kompleks EA1, inhibitor GSK-3 kinaza, enzima koji upravljaju ćelijskom proliferacijom u tumoru pankreasa. Na ovom mestu treba skrenuti pažnju na to da mala promena u strukturi kompleksa rutenijuma, kao što je dodavanje još jedne hidroksilne grupe, povećava afinitet i specifičnost kompleksa za GSK-3 kinazu.¹¹⁴ Kompleks rutenijuma HB1052 (slika 12) je inhibitor kinaze Pim-1, uključene u progresiju ćelijskih ciklusa, proces apoptoze i transkripcione aktivacije i druge procese ćelijske komunikacije.¹¹⁵



Slika 12. Primeri kompleksa rutenijuma, sintetisanih po uzoru na staurosporin, inhibitor kinaza.¹⁰⁶

Polipiridilni kompleksi rutenijuma (II) pokazuju bakteriostatičko, baktericidno i anti-tumorsko dejstvo, a takođe je poznato da inhibiraju enzim acetilholinesterazu (AChE). Smatra se da se katjonski kompleks rutenijuma veže za anjonski periferni deo na AChE kombinacijom elektrostatičkih i hidrofobnih interakcija.¹¹⁶

Polioksometali, kao što je rutenijum-okso-oksalato klaster pokazuju antiviralnu aktivnost *in vitro* i *in vivo*, jer deluju kao inhibitori transkriptaza.^{117,118} Polioksometali, koji su aktivni protiv HIV-1 (humani virus imunodeficijencije) imaju najmanje tri mehanizma delovanja, od kojih su dva inhibicija HIV reverzne transkriptaze i inhibicija HIV proteaze.

Kompleksi Šifovih baza sa Cu(II) i Fe(III) deluju kao inhibitori serinskih proteaza trombina i tripsina, pri čemu je zaključeno da metali imaju samo strukturnu ulogu.¹¹⁹ Kinetički inertniji metali rutenijuma, rodijuma i iridijuma predstavljaju odgovorajuću modifikaciju ovih kompleksa, jer omogućavaju drugačiju strukturu ligandne sfere i potencijalno veći afinitet i selektivnost.

Pored kinaza, najčešće razmatrani enzimi, potencijalne mete za komplekse metala u hemoterapiji su tioredoksin reduktaza i glutation reduktaza. Poznato je da *bis*-alkilirajući agensi, *cis*-platina i arsen trioksid interaguju sa selenocisteinskim peptidom na karboksilnom kraju tioredoksin reduktaze i tako je inaktiviraju, onemogućavajući redukciju tioredoksina. Uloga glutation reduktaze jeste da redukuje oksidovani oblik glutationa (GSSG) do GSH, koji je jedan od glavnih antioksidanata u ćeliji. Pretpostavlja se da inaktiviranje tioredoksin reduktaze i glutation reduktaze doprinosi citotoksičnom efektu hemoterapeutika, preko poremećaja u regulatornom metabolizmu tiola i indukovanjem oksidativnog stresa..¹²⁰⁻¹²²

Enzimi ciklooksigenaza-1 i -2 katalizuju početni korak stvaranja prostaglandina u brojnim patofiziološkim procesima i imaju ulogu u procesima zapaljenja i karcinogeneze.¹²³ Ćelije kancera su bogate većim količinama COX-2 (ciklooksigenaza), pa se smatra da je ovaj enzim takođe meta nesteroidnih anti-kancerogenih agenasa. Klinička testiranja su pokazala da selektivni inhibitori COX-2 smanjuju broj i veličinu kolorektalnih polipa.¹²⁴

Pretpostavlja se da anti-metastatsko dejstvo kompleksa rutenijuma NAMI-A leži u interakciji sa matriks metalo-proteinazama MMP-2 i MMP-9, koje inhibira pri mikromolarnim koncentracijama i istovremenom vezivanju za kolagen iz

ekstacelularnog matriksa pluća. Ovaj kompleks se selektivno veže za kolagen u plućima i tu deluje na ćelije tumora sa metastatskim potencijalom, inhibirajući enzime čija je aktivnost neophodna za stvaranje metastaza na plućima.^{125,126}

Daljim istraživanjima i manipulisanjem mehanizmom progresije kancera i razvojem ćelijske rezistencije je moguće unapređenje hemoterapije. Na primer, ukoliko je uzrok ćelijske rezistencije povećana količina glutathion S-transferaze u ćeliji nakon tretmana kompleksom platine, postoji mogućnost da se uporedo sa *cis*-platinom pacijent tretira kompleksom koji će inhibirati ovaj enzim. Kompleksi rutenijuma koji inhibiraju glutathion S-transferazu pokazuju visoku efikasnost protiv karcinoma jajnika u ćelijskoj kulturi.¹²⁷

Može se zaključiti da se delovanje kompleksa platine na primarne lezije svodi na interakciju sa DNK, onemogućavanje ćelijskog rasta i razmnožavanja. Međutim, delovanjem na druge biomolekule, peptide i enzime, može se uticati na efikasnost terapije, modifikacijom procesa koji utiču na ćelijsku rezistenciju, stvaranje slobodnih radikala i transport komponenti u i van ćelije.

3. FOSFOLIPIDI

Prvi kontakt lekova sa ćelijom se ostvaruje preko ćelijske membrane i njihova interakcija sa membranskim proteinima i lipidima je presudna za transport ispitivanog kompleksa metala i njegovu akumulaciju u ćeliji, izbacivanje iz ćelije ili eventualno razvoj ćelijske rezistencije. S druge strane, lipidi koji izgrađuju ćelijsku membranu predstavljaju izvor sekundarnih glasnika, pa posredno imaju ulogu u regulaciji signalnih puteva u ćeliji. Od sastava i rasporeda lipida u ćelijskoj membrani zavisi aktivnost enzima ključnih za transdukciju signala unutar ćelije i međućelijsku komunikaciju. Iz tog razloga je važno ispitati interakciju kompleksa metala sa lipidima koji ulaze u sastav ćelijske membrane i enzimima, uključenim u lipidni metabolizam.

3.1. Klasifikacija i značaj glicerofosfolipida (fosfolipida)

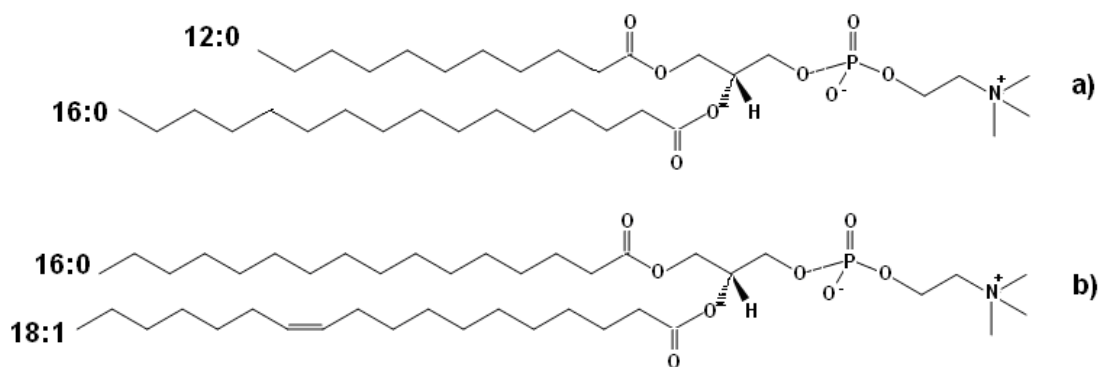
Lipidi predstavljaju široku i heterogenu grupu molekula, rastvornih u organskim rastvaračima (hloroform, benzen, metanol...). Po definiciji, lipidi su hidrofobni molekuli nastali (u celosti ili delom) karboanjonskom kondenzacijom tioestara i/ili karbokatjonskom kondenzacijom izoprenskih jedinica. Lipidi obuhvataju najširu grupu različitih molekula, podeljenih u 8 kategorija: masne kiseline, glicerolipide, glicerofosfolipide, sfingolipide, saharolipide i poliketide (izvedeni kondenzacijom ketoacilnih subjedinica) i sterole i prenole (dobijeni kondenzacijom izoprenskih jedinica).^{128,129}

Za građu ćelijske membrane, najznačajnija je klasa glicerofosfolipida ili fosfolipida. Glicerofosfolipidi se, u odnosu na prirodu polarne grupe na *sn-3* poziciji glicerolskog ostatka (eukariote i eubakterija) mogu dalje podeliti u grupe:

- Glicerofosfoholin
- Glicerofosfoetanolamin
- Glicerofosfoserin

- Glicerofosfoglicerol
- Glicerofosfoglicerofosfati
- Glicerofosfoinozitol
- Glicerofosfoinozitol monofosfati, bifosfati i trifosfati
- Drugi (Glicerofosfati, gliceropirofosfati, glicerofosfoglicerofosfogliceroli, glikozilglicerofosfolipidi, glicerofosfoinozitolglikani, glicerofosfonoholini, glicerofosfonoetanolamini...)

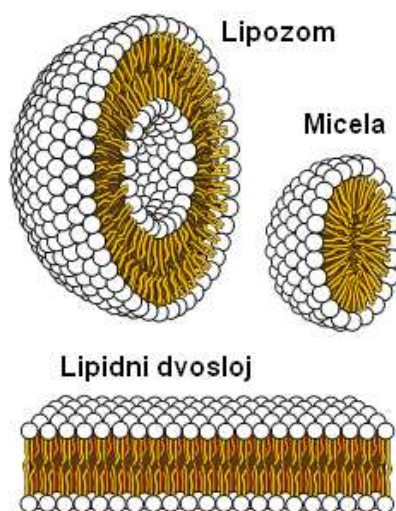
Svaka od grupa sa istom polarnom glavom se dalje razlikuje po supstuentu na *sn*-1 i *sn*-2 na ostatku glicerola. Na primer, u slučaju fosfatidilholina (glicerofosfoholina), u zavisnosti od masnih kiselina na *sn*-1 i *sn*-2, razlikuju se na primer PC(12:0/16:0) ili PC(16:0/18:1) prikazani na slici 13. Brojevi u zagradama označavaju masne kiseline, pri čemu je svaka masna kiselina određena sa dva broja: brojem ugljenikovih atoma i brojem dvostrukih veza. Dakle, PC(12:0/16:0) predstavlja 1-dodekanoil-2-oktadekanoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin, a PC(16:0/18:1) 1-heksadekanoil-2-oktadekanoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin. Masne kiseline imaju i trivijalne nazive, pa se prikazani fosfolipidi (slika 13) zovu još i 1-lauroil-2-palmitoil-fosfatidilholin i 1-plamitoil-2-oleoil-fosfatidilholin, respektivno ili LPPC i POPC.



Slika 13. Primeri strukture dva fosfatidilholina sa različitim masnim kiselinama na *sn*-1 i *sn*-2 poziciji: a) PC(12:0/16:0), 1-lauroil-2-palmitoil-fosfatidilholin ili 1-dodekanoil-2-oktadekanoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin; b) PC(16:0/18:1), 1-plamitoil-2-oleoil-fosfatidilholin ili 1-heksadekanoil-2-oktadekanoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin.

Nezasićene masne kiseline se mogu razlikovati po mestu i položaju dvostruke veze. Dvostruka veza se u imenu fosfolipida označava brojem ugljenikovog atoma posle kojeg se javlja i slovom E ili Z, u zavisnosti od toga da li je u *trans* ili *cis* položaju. Na primer, fosfolipid na slici 13b) je 1-heksadekanoil-2-(11-Z-oktadekanoil)-*sn*-glicero-3-fosfoholin. Ukoliko se na ovim pozicijama nalaze dva različita supstituenta, što je najčešće i slučaj, drugi ugljenikov atom glicerola, koji je inače simetričan, postaje hiralni centar molekula.

Masne kiseline predstavljaju hidrofobni „rep“, a funkcionalna grupa (holin, serin, inozitol, etanolamin..) polarnu „glavu“ fosfolipida. Zbog takve građe, fosfolipidi se mogu organizovati u: liposome, micelle, lipidni dvosloj (slika 14). U vodenom rastvoru, lipidi spontano formiraju dvosloj ili seriju dvosloja razdvojene vodom, tako da su hidrofobni delovi (masne kiseline) okrenuti prema unutrašnjosti dvosloja, a hidrofilni delovi fosfolipida prema vodenoj sredini. Na ovakav način su lipidi organizovani i u ćelijskoj membrani.

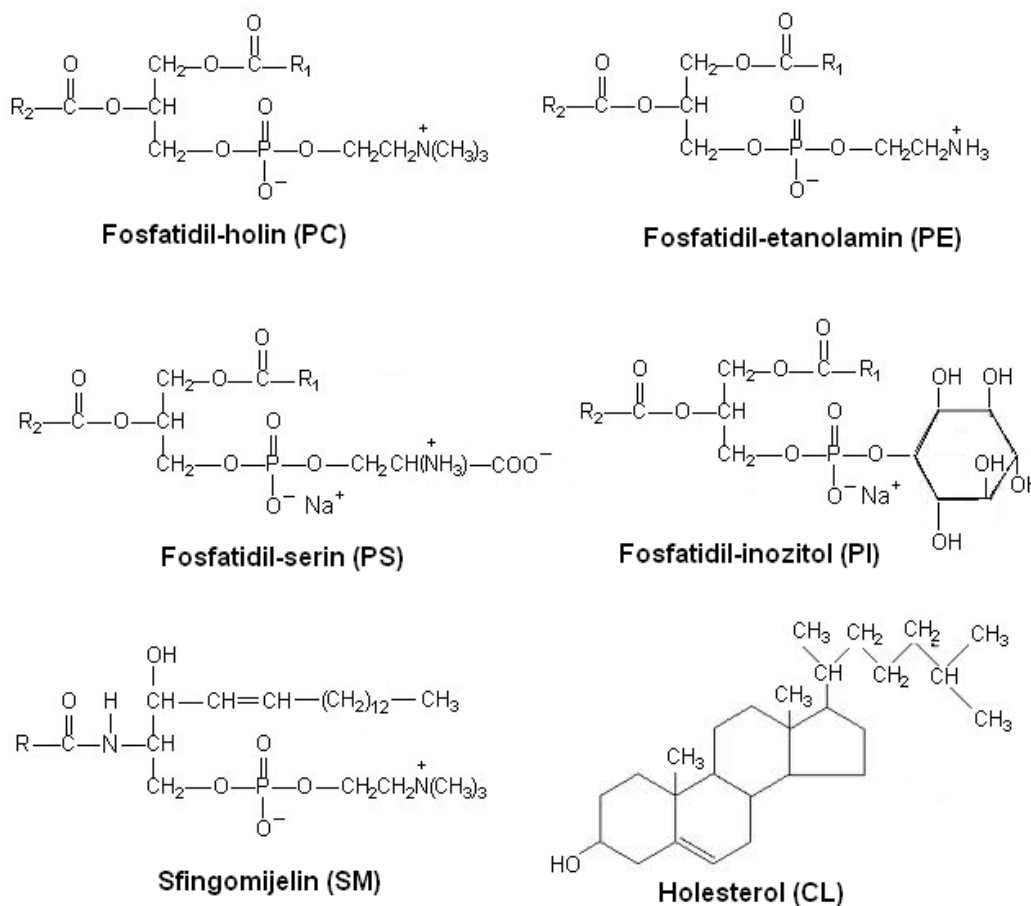


Slika 14. Lipidi organizovani u micelle, liposome i lipidni dvosloj

Fosfolipidni sastav ćelijske membrane varira u zavisnosti od tipa i funkcije ćelije. Na primer, membranske fosfolipide bakterije *M. Capsulatus* čine uglavnom fosfatidiletanolamin (74%) i fosfatidilholin (8%), dok je u slučaju eukariotskih ćelija

odnos drugačiji (fosfatidilholin 50% i fosfatidiletanolamin 20%, dok ostatak čine fosfatidilinozitol, fosfatidilserin i sfingomijelin (slika 15).^{130,131}

Osim fosfolipida, u membrani se nalaze i druge klase lipida. Važnu ulogu za osobine ćelijske membrane ima holesterol, koji povećava njenu fluidnost i sprečava kristalizaciju dvosloja. Holesterol je u velikim količinama zastupljen u membrani nervnih ćelija, ali i u membrani spermatozoida. Ova činjenica zajedno sa visokim procentom polinezasićenih masnih kiselina i povećanoj aktivnosti fosfolipaza pri kapacitaciji za rezultat ima visoku fluidnost membrane spermatozoida i olakšanu fuziju sa membranom jajne ćelije.^{132,133}



Slika 15. Molekulske formule klasa nekih od lipida najzastupljenijih u ćelijskoj membrani eukariota; R=masnokiselinski ostatak

Raspored lipida, odnosno sastav fosfolipida u unutrašnjem i spoljnom sloju ćelijske membrane je takođe važan za funkcionisanje ćelije. Asimetrija membrane u odnosu na sastav fosfolipida je kod zdravih, funkcionalnih ćelija takva da se u spoljašnjem sloju, okrenuti prema spoljašnjoj sredini, nalaze uglavnom fosfolipidi koji sadrže holin kao polarnu funkcionalnu grupu (PC i SM).¹³⁴ Fosfatidil-serin (PS) se nalazi u sloju ćelijske membrane, koji je okrenut prema citoplazmi, zajedno sa fosfatidil-etanolaminom (PE). Zbog ovakvog rasporeda fosfolipida u ćelijskoj membrani, spoljašnji sloj membrane je pozitivno naelektrisan, dok je unutrašnji sloj negativno naelektrisan. Prelazi fosfolipida iz jednog u drugi sloj (tzv. flip-flop) kretanje je prisutno, ali je kontrolisano enzimima. Fosfatidil-serin na spoljašnjoj strani membrane ukazuje na apoptozu, što se koristi za razlikovanje apoptotičnih i nekrotičnih ćelija u fluocitometriji.¹³⁵

Fosfolipidi na površini membrane nisu ravnomerno raspoređeni, već formiraju domene i mikrodomene na membrani, obogaćene određenom klasom fosfolipida. Ova karakteristika je posebno uočljiva na primeru sfingolipida, koji imaju tendenciju da se grupišu sa holesterolom i formiraju „lipidne splavove“ u ćelijskoj membrani. „Lipidni splavovi“ su razlikuju od ostalih delova membrane po sastavu, ali posredno i po drugim osobinama koje zavise od dužine lanaca u sfingolipidima.^{136–138}

3.2. Interakcija kompleksa metala sa lipidima

U većini slučajeva, događaji i reakcije koje se odvijaju na membrani, nakon interakcije kompleksa prelaznih metala sa membranskim biomolekulima (tabela 1) utiču na druge unutarćelijske mete preko sistema signalne transdukcije i transmembranskog transportnog sistema.

Dodatno, joni metala indukuju oksidativni stres, lipidnu peroksidaciju i degradaciju biopolimera. Mehanizam stvaranja slobodnih radikala i oksidativnog stresa je ili direktno ili preko interakcije sa glutationom i glutation peroksidazom, kao što je opisano u odeljku interakcije sa biomolekulima. Hidrolizovani, pozitivno naelektrisani kompleksi metala interaguju i sa fosfolipidima i sa proteinima u membrani, ali i nehidrolizovani kompleks *cisplatin*e može da se veže za proteine putem mehanizma

spore ligandne izmene.¹³⁹ Važno je naglasiti da je vezivanje kompleksa metala za tiolatne i tioetarske atome sumpora u proteinima i peptidima na membrani mnogo jače od vezivanja za polarne grupe fosfolipida, koje je slabo i reverzibilno. Konstanta vezivanja Pt-protein je za 2-4 reda veličine veće od konstante vezivanja Pt-lipozom.^{139,100}

Tabela 1. Potencijalna mesta vezivanja kompleksa metala na ćelijskoj membrani¹³⁹

Meta	Mesto vezivanja	Karakter veze
Fosfolipidi	-NMe ₃ ⁺ , -PO ₄ ²⁻ , -COOH, -NH ₃ ⁺	Elektrostatička i koordinativna
Peptidi	-SH, -SCH ₃ , -COOH, -NH ₂ , -CONH ₂	Kovalentna i koordinativna
Oligosaharidi	-OH	Koordinativna
Holesterol	-OH	Koordinativna

Međutim, slabe i reverzibilne interakcije kompleksa metala sa lipidima nisu zanemarljive jer mogu da interferiraju sa drugim ćelijskim procesima i predmet su interesovanja iz nekoliko razloga:

- Fosfolipidi su u ćelijkoj membrani organizovani u supramolekularni sistem zbog slabih interakcija sa susednim molekulima i u neprestanom su kretanju (lateralna difuzija, flip-flop kretanje, fluidnost membrane);
- Vezivanje jona i malih molekula za polarnu glavu fosfolipida utiče na njihovu konformaciju i izmenu membranske strukture i osobina, kao što je permeabilnost;
- Membranski sastav fosfolipida ćelija tumora je moguće modifikovati *in vivo* i *in vitro*, što otvara mogućnosti za manipulaciju interakcije kompleksa metala sa membranom i može dovesti do povećanja citotoksičnog efekta;^{140,141}
- Polivalentni metali mogu da formiraju veze između susednih molekula (lipid-lipid, lipid-protein) imobilizirajući fosfolipide;

- Ćelija predstavlja neravnotežni sistem i reverzibilna vezivanja i konformacione promene na membrani mogu poremetiti ćelijsku funkciju. Štaviše, smatra se da rane konformacione promene i inicirani signalni putevi na ćelijskoj membrani podstrestvom hemoterapeutika indukuju ćelijsku smrt;¹⁴²
- Metalni joni indukuju oksidativni stres i oštećuju fosfolipide.¹³⁹

Na primeru kompleksa *cis*platine je zaključeno da hidrolizovani pozitivni kompleksi platine imaju afinitet prema negativno naelektrisanim, odnosno anjonskim fosfolipidima, ali ne i sa cviteronskim fosfolipidima. Najjaća interakcija je sa fosfatidilserinom (PS) i fosfatidnom kiselinom (PA) i prisutno je vezivanje čak i na višim pH vrednostima i sa većim koncentracijama Cl⁻ jona u puferu.^{143,144} Vezivanje platine za fosfatidilserin organizovan u liposome i dvosloje, ali ne i u eritrocitima, dokazan je kako tehnikama tankoslojne hromatografije, tako i NMR spektroskopijom čvrstog stanja.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Polinuklearni platinski kompleksi se takođe vezuju za fosfolipide elektrostatičkim interakcijama i vodoničnim vezama, po afinitetu PA>PS>PG>PE>PC.¹⁴⁸

Međutim, veza *cis*platine i fosfatidilserina je reverzibilna i konverzija kompleksa Pt-PS je moguća inkubiranjem sa glutationom, prema čijoj tiolnoj grupi platina ima veći afinitet. Konverzija pokazuje koncentracionu zavisnost od glutationa.¹⁴⁹ Glutacion kompetetivno sa fosfatidilserinom veže *cis*platinu i konvertuje formirane komplekse, pa se zaključuje da u *in vivo* sistemima interakcija kompleksa platine i fosfolipida ne može imati direktan citotoksični efekat.¹⁵⁰

Dakle, interakcija sa fosfolipidima samo posredno utiče na citotoksičnost kompleksa, uzimajući u obzir signalnu ulogu lipida, mehanizme transporta kompleksa kroz lipidni dvosloj i korelaciju promene u fluidnosti i permeabilnosti ćelijske membrane i efikasnosti hemoterapeutika.^{151-153,142} Naime, razvoj rezistencije ćelija kancera je povezan sa smanjenom fluidnošću lipidnog dvosloja, smanjenom koncentracijom masnih kiselina C_{18:1} i C_{18:3}, smanjenim nivoem nezasićenih masnih kiselina i smanjenom akumulacijom kompleksa u ćeliji.^{154,155} Ova činjenica je dalje podstakla naučnike za razvoj novih kompleksa koji modifikuju fluidnost membrane ili se lakše transportuju kroz membranu, zahvaljujući hidrofobnim ligandima (sintetički

ligandi, masne kiseline). Jedan od primera su kompleksi rutenijuma sa *tris*-bipiridil ligandima, koji se nagomilava u ćelijskoj membrani i tako posredno indukuje citotoksični efekat.¹⁵⁶ Malim promenama strukture i lipofilnosti kompleksa rutenijuma, može se uticati na odnos njegove akumulacije u membrani i vezivanja za DNK.¹⁵⁷

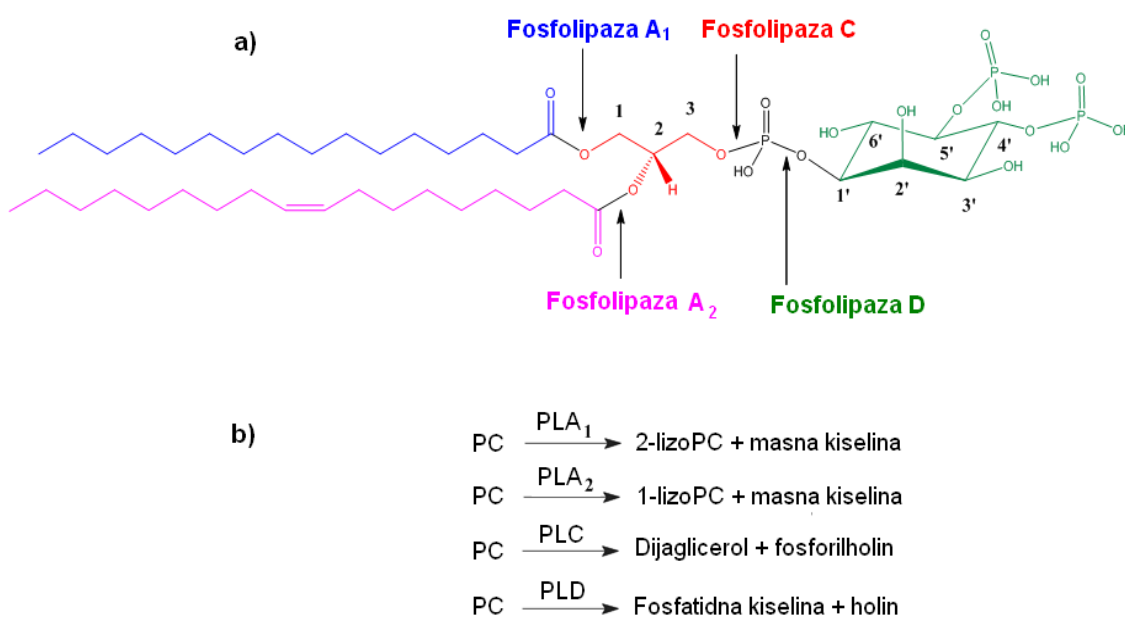
Jedan od modernih pristupa hemoterapiji podrazumeva ne samo sintezu kompleksa u određenim granicama lipofilnosti, kako bi se olakšao transport kroz membranu, već strategiju ciljane dostave lekova pomoću lipozoma.^{158,159} Lipozomi se sastoje iz lipidnog dvosloja koji okružuje polarni rastvarač i gde se može inkorporirati hidrofilna komponenta (slika 14). Dodatni sloj od polietilenglikola (PEG) štiti lipozome od „curenja“ i degradacije makrofagama i omogućava im da slobodno cirkulišu kroz krvotok i akumuliraju se na mestima sa propustljivijim kapilarima što je indikacija mnogih patoloških procesa.^{160,161} Sistem dostave lekova i hormona lipozomima je dugo primenjivan u praksi, ali kada je u pitanju transport hemoterapeutika na bazi kompleksa metala, glavni problem predstavlja kontrola i inicijacija degradacije lipozoma na željenom mestu. Primeri kontrolisane dostave lipozomima uključuje inicijaciju njihove degradacije na mestu tumora pomoću ultrazvuka ili promene temperature.^{162,163} Poznavanje lipidnog metabolizma, dovelo je na ideju da se kao događaj za inicijaciju degradacije lipozoma koristi enzim, sekretorna fosfolipaza A₂. Poznato je da se mesta sa zapaljenskim reakcijama i tkiva kancera odlikuju povišenim koncentracijama ovog enzima, pa je formiranje lipozoma od lipida senzitivnih na fosfolipazu A₂ način za selektivnu i specifičnu dostavu leka obolelom tkivu.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ S druge strane, enzim fosfolipaza A₂ je sam po sebi, meta hemoterapeutika. Kao i cikooksigenaze, fosfolipaze predstavljaju inflamatorne enzime, važne za sintezu prostaglandina i koncentracija ovih enzima je u korelaciji sa karcinogenezom, invazijom i metastazom tumora.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰

3.3. Fosfolipaze i metabolizam fosfolipida

Lipidi sekundarni glasnici i drugi biološki aktivni fosfolipidni metaboliti nastaju u reakcijama katalizovanim enzimima-fosfolipazama i/ili lipazama. Fosfolipaze pripadaju širokoj porodici enzima, prisutnih u gotovo svim ćelijama sisara, čija je

zajednička karakteristika da hidrolizuju fosfolipide, pri čemu se oslobađaju masne kiseline i druge lipofilne komponente.

Prvi enzim fosfolipaze otkriven je 1986. godine, kada je izolovan iz humanog pankreasnog soka. Izolovanjem enzima sa sličnom funkcijom iz različitih egzokrinih žlezda kod sisara i iz zmijskog otrova, kasnije je utvrđeno da se radi o grupi relativno malih (14 kDa) i stabilnih enzima, specifične strukture sa velikim brojem cisteinskih disulfidnih mostova.



Slika 16. a) Podela fosfolipaza na PLA₁, PLA₂, PLC i PLD na osnovu mesta delovanja na supstratu, fosfolipidu. Kao primer supstrata prikazan je molekul 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilinozitol-4',5' bifosfat (PIP₂); b) Reakcije i reakcioni proizvodi fosfolipaza PLA₁, PLA₂, PLC i PLD sa fosfatidil-holinom, kao supstratom.

Najpre se smatralo da fosfolipaze imaju samo digestivnu ulogu, ali sa otkrićem novih tipova sekretorne fosfolipaze u neutrofilima kod sisara i intracelularnih fosfolipaza u humanim trombocitima i neutrofilima, rasvetljene su mnoge druge, važne fiziološke funkcije ovih enzima. Fosfolipaze imaju važnu ulogu u homeostazi ćelijske membrane i metabolizmu lipida, odbrani organizma od patogena i predstavljaju

toksičnu komponentu otrova raznih vrsta zmija i insekata. produkti koji nastaju kao posledica aktivnosti fosfolipaze su prekursori za sintezu raznih bioaktivnih signalizirajućih komponenti, pa je fosfolipaza posredno važna za unutrašnju i spoljašnju ćelijsku komunikaciju. Na osnovu mesta delovanja na molekulu fosfolipida, fosfolipaze se dele na A₁, A₂, C ili D (slika 16).

Fosfolipaze A₁ (PLA₁) i A₂ (PLA₂) hidrolizuju acil estarsku vezu na fosfolipidu na pozicijama *sn*-1 ili *sn*-2, oslobađajući arahidonsku kiselinu i odgovarajući lizofosfolipid. Arahidonska kiselina se dejstvom drugih enzima u organizmu (ciklooksigenaza ili 5-lipooksigenaza) modifikuje do aktivnih inflamatornih medijatora, prostaglandina, leukotriena i tromboksana, koji se vezuju za receptore na susednim ćelijama.¹⁷¹ Arahidonska kiselina se može pasivnom difuzijom transportovati do ćelijskog jedra i interagovati sa transkripcionom faktorima i kontrolisati transkripciju DNK za citokine i hormone. Arahidonska kiselina nastala aktivnošću fosfolipaza, posredno utiče na rast i razvoj tumora i u literaturi se navodi kao meta modernih hemoterapeutika.¹⁷²⁻¹⁷⁴

Drugi produkt reakcije katalizovane fosfolipazama A₁ i A₂, lizofosfolipidi, zastupljeni su u ćelijskim membranama u tragovima i njihova koncentracija je kontrolisana reakcijama reacidacije, kojima se prevode u fosfolipide. Lizolipidi imaju deterđentske osobine i utiču na permeabilnost ćelijskih membrana.¹⁷⁵ Poznato je i da lizolipidi regulišu rast i diferencijaciju ćelija i da predstavljaju mitogene agense.^{176,177} Visoka koncentracija lizolipida dovodi se u vezu sa različitim patološkim stanjima.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ Lizofosfatidilholin oštećuje endotelijalne ćelije posredno, indukujući oksidativni stres i stvaranje visoke koncentracije azot-oksida, NO. Kao rezultat, na mestu inflamacije, javlja se povišena ekspresija adhezivnih molekula na endotelijalnim ćelijama.¹⁸¹ Lizofosfolipid interaguje i sa fosfolipazama, utičući tako i na sopstvenu produkciju.^{182,183} Fosfolipaza B (PLB) je termin uveden za bakterijski enzim koji hidrolizuje fosfolipide na *sn*-1 i *sn*-2 poziciji, sa istim afinitetom. Ovaj enzim je poznat i kao lizofosfolipaza.

Fosfolipaze C (PLC) imaju najvažniju ulogu u ćelijskoj signalizaciji. One katalizuju hidrolizu glicerofosfatne veze, pri čemu se oslobađa fosfat sa polarnom glavom masne kiseline (npr. holin fosfat) i dijaglicerol. Ukoliko je supstrat PIP₂ (Slika 16.), proizvodi reakcije su inozitol-trifosfat (IP₃), koji difunduje u citoplazmu i

dijaglicerol (DAG), koji se zadržava u ćelijskoj membrani. IP_3 se u citoplazmi veže za receptore na endoplazmatičnom retikulumu i što dovodi do povećanja koncentracije jona Ca^{2+} u citoplazmi, a samim tim i do aktiviranja brojnih enzima zavisnih od kalcijuma.¹⁸⁴ Osnovna funkcija DAG jeste da veže i aktivira protein kinazu (PKC), centralni molekul u intracelularnim signalnim putevima.

Fosfolipaze D (PLD) hidrolizuju fosfodietersku vezu P-O, posle fosfata (Slika 16) oslobađajući fosfatidnu kiselinu i alkohol. Fosfatidna kiselina (PA) je najvažniji molekul u brojnim inflamatornim procesima i ćelijskoj signalizaciji.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Ona aktivira fosfolipaze PLD i moduliše aktivnost tirozin kinaza,¹⁸⁸ aktivira protein kinaze i posredno NADPH oksidaze¹⁸⁹⁻¹⁹¹ i ima ulogu inflamatornog medijatora.¹⁹²

Svaka od fosfolipaza (PLA_1 , PLA_2 , PLC i PLD) predstavlja velike grupe sličnih enzima, koji su dodatno podeljeni u grupe, na osnovu strukturnih ili funkcionalnih karakteristika. Tako, na primer, pod nazivom fosfolipaze A_2 , podrazumeva se 14 podgrupa ovog enzima. Najbolje su ispitane fosfolipaza PLA_2 i PLC zbog njihovog značaja za fosfolipidni metabolizam i ćelijsku signalizaciju, kao i zbog njihove uloge u zapaljenskim procesima i drugim patofiziološkim stanjima.

3.3.1. Fosfolipaze A_2

Fosfolipaze A_2 (PLA_2) katalizuju hidrolizu estarske veze između masne kiseline na *sn*-2 poziciji membranskih glicerofosfolipida, pri čemu se oslobađaju arahidonska kiselina (AA) i lizo-fosfolipid koji ostaje u membrani. Oba produkta su bioaktivni molekuli i imaju višestruku funkciju. Do sada je kod sisara otkriven i okarakterisan veliki broj enzima PLA_2 , koji se mogu klasifikovati u 14 grupa ili u 5 familija (Tabela 1.) na osnovu svojih strukturnih osobina ili funkcije. Glavnih 5 kategorija fosfolipaze A_2 su: sekretorne ($sPLA_2$), citosolne ($cPLA_2$), fosfolipaze A_2 nezavisne od Ca^{2+} ($iPLA_2$), acetilhidrolaze specifične za trombocit-aktivirajući faktor (PAF-AH) i lizozomalne fosfolipaze A_2 .

3.3.1.1. Sekretorne fosfolipaze A₂

Do sada otkriveni i okarakterisani enzimi sekretorne fosfolipaze A₂ kod sisara se mogu klasifikovati u 7 grupa, odnosno 14 podgrupa (tabela 2). Sve sekretorne fosfolipaze A₂ su zavisne od jona Ca²⁺, tako da pri milimolarnim koncentracijama ovog jona hidrolizuju sve glicerofosfolipide nezavisno od masno kiselinskog ostatka. Fosfolipaze A₂ koje pripadaju ovoj grupi enzima, bogate su cisteinom i imaju u proseku 5-7 disulfidnih mostova, koji stabilizuju njihovu terciarnu strukturu. Iako su podeljene na 10 grupa na osnovu razlika u sekvenci aminokiselina, struktura i položaj amino kiselina koji čine aktivno mesto enzima i mesto vezivanja jona Ca²⁺ su slični kod svih izozoma. Mehanizam hidrolize je takođe sličan za sve sekretorne fosfolipaze A₂. Enzimi ove grupe su rastvorni u vodi i imaju malu molekulsku masu, od oko 11-14 kDa.¹⁹⁴ Sekretorne fosfolipaze A₂ ne pokazuju specifičnost prema određenom tipu "polarne glave" ili masnokiselinskog ostatka na supstratu. Međutim, postoje načini da se strukturnim modifikacijama alosterički kontrolišu vezivanje supstrata za enzim i proces hidrolize na granici faza. Na primer, pokazano je da se sekretorna pankreasna PLA₂ aktivira specifičnim vezivanjem holata.¹⁹⁴ Primarna funkcija sPLA₂ jeste hidroliza ekstracelularnih fosfolipida, a značaj aktivacija kaskade arahidonske kiseline. Primeri su sekretorna fosfolipaza A₂ u zmijskom otrovu ili inflamatornim ćelijama, koje aktiviraju druge inflamatorne i imune ćelije, posredno preko citokina. Osim toga, mnoge ćelije poseduju membranski receptor sa visokim afinitetom za sPLA₂ i veća zaposednutost ovih receptora dovodi se u vezu sa karakterističnim ćelijskim odgovorima, kao što su proliferacija, hemokineza ili kontrakcija glatkih mišića.

Prva otkrivena sekretorna fosfolipaza kod sisara je izolovana 1986. godine iz pankreasnog soka. Ova grupa enzima se označava sa PLA₂-IB. Svi izozomi u ovoj grupi imaju karakterističnu ekstenziju u srednjem delu molekula, građenu od 5 amino-kiselina, koja se zove još i pankreasna petlja. Druga karakteristika ove grupe je disulfidni most između cisteina označenih kao Cys¹¹ i Cys⁷⁷.^{195,194} Osnovna funkcija grupe PLA₂-IB grupe je digestija fosfolipida, a može se naći u pankreasnom soku i u drugim organima kao što su: pluća, bubrezi i slezina.

Tabela 2. Klasifikacija fosfolipaza A₂ na osnovu svojih strukturnih osobina i funkcije.¹⁹³

Grupa		Poreklo	Ime	Veličina / kDa	Zavisnost od Ca ²⁺
I	A	Otrov kobre/krajta	sPLA ₂	13-15	μM za katalizu
	B	Pankreas kod sisara			
II	A	Humana sinovijalna tečnost/trombociti		15	
	B	Otrov zvečarke/poskoka			
	C	Otrov gabonskog poskoka		14-15	
	D	Testisi pacova/miša			
	E	Humani/mišji pankreas/slezina		16-17	
F	Humani/mišji mozak/srce/uterus				
III		Mišji testis/embrion		15-18	
IV	A	Humane U937 ćelije/trombociti Ć. Linija 264.7/bubreg pacova		cPLA ₂ α	
	B	Humani pankreas/jetra/srce/mozak	cPLA ₂ β	114	
	C	Humano srce/skeletni mišić	cPLA ₂ γ	61	0
V		Srce/pluća/makrofage kod sisara	sPLA ₂	14	μM za katalizu
VI	A1	P388D1 macrofage, CHO ćelije	iPLA ₂ -A	84-85	0
	A2	Humani limfociti/testis	iPLA ₂ -B	88-90	
	B	Ljudsko srce/skeletni mišić	iPLA ₂ γ or iPLA ₂ -2	88	
VII	A	Plazma čoveka/miša/svinje/govečeta	PAF-AH	45	
	B	Jetra/bubreg čoveka/govečeta	PAF-AH(II)	40	
VIII	A	Ljudski mozak	PAF-AHib α ₁	26	
	B	Ljudski mozak	PAF-AHib α ₂		
IX		Otrov iz puža	sPLA ₂	14	μM za katalizu
X		Jetra/timus/leukociti kod ljudi			
XI	A	Zelene mladice pirinča	PLA ₂ -I	12.4	
	B	Zelene mladice pirinča	PLA ₂ -II	12.9	
XII		Srce/bubreg/koža/mišić sisara	sPLA ₂	18.7	nM za katalizu
XIII		Parvovirus		<10	
XIV		Simbiotička gljiva/Streptomyces		13-19	

Druga grupa sekretornih fosfolipaza A₂ (sPLA₂-IIA) klonirana je 1989. godine. Strukturna karakteristika ove grupe je disulfidni most između cisteina Cys⁵⁰ i cisteina na C-terminusu, kao i ekstenzija na C-terminusu od 7 amino kiselina. Nivo sPLA₂-IIA je u korelaciji sa nekoliko zapaljenskih procesa i bolesti, kao što je kancer.^{196,197} Inhibicija ovog enzima specifičnim inhibitorima usporava rast tumora i podstiče apoptozu ćelija.^{198,199} Fosfolipaza sPLA₂-IIA pokazuje slabu interakciju sa neaktiviranim ćelijama, vezivanjem za delove ćelijske membrane bogate fosfatidilholinom. Međutim, u aktiviranim ćelijama se sortira u vezikulama ili perinuklearnim komorama, vezujući se za glipikan, odnosno glikozil-fosfatidilinozitol HSPG.^{200,201} Slova „HS“ označavaju heparan sulfat, linearni polisaharid prisutan u svim životinjskim tkivima. Međutim, ovaj polisaharid se javlja u obliku proteoglikana („PG“), jer se vezuje za proteine na ćelijskoj površini ili u ekstracelularnom matriksu. Nakon preraspodele, odnosno odgovarajućeg sortiranja, sPLA₂-IIA deluje tako što oslobađa arahidonsku kiselinu (AA) iz membranskih mikrodomena, pri čemu indukuje promene u ćelijskoj membrani, u vidu alteracija u asimetriji, ubrzane oksidacije i povećane fluidnosti.²⁰² Interesantan podatak je i da određeni soj miševa, kod kojih je genteskom mutacijom sasvim uklonjen gen za sPLA₂-IIA, pokazuje rezistenciju na kolorektalne tumore, iako je tačan razlog za to nepoznat.²⁰³

Nakon 5 godina posle otkrića sPLA₂-IIA, klonirana su još dva izozoma sekretorne fosfolipaze A₂, 1994. godine. Prvi od ova dva je sPLA₂-IIC, koji se karakteriše još jednim, dodatnim disulfidnim mostom između cisteina Cys⁸⁷ i Cys⁹³.²⁰⁴ Drugi izozom otkriven iste godine je sPLA₂-V. Ovaj enzim nema dodatne disulfidne mostove specifične za grupe I i II sekretornih fosfolipaza A₂, kao ni produžetak na C-terminusu, čije se prisustvo u organima povećava proinflamatornim stimulansima.²⁰⁵ sPLA₂-V ima visok afinitet prema heparanoidima i fosfatidil-holinu i oslobađa arahidonsku kiselinu preko dva različita mehanizma.^{201,200,206} Jedan je preko vezivanja za HSPG, kao i sPLA₂-IIA, dok je drugi način direktno vezivanje za fosfatidil-holin, na spoljašnjoj strani membrane. Dakle, drugi mehanizam ne zahteva posebne preraspodele u ćelijskoj membrani, što znači da sPLA₂-V, može da oslobađa arahidonsku kiselinu iz nestimuliranih ćelija znatno efikasnije nego sPLA₂-IB ili druge fosfolipaze iz grupe II sekretornih fosfolipaza A₂.

sPLA₂-IID je po svojoj strukturi najbližnja sPLA₂-IIA, a eksprimirana je u organima imunog sistema i sistema organa za varenje. sPLA₂-IIE je slična prethodno opisanom izozomu fosfolipaze sa znatno manjim afinitetom za heparanoid.¹⁹⁴ sPLA₂-IIF je jedinstvena grupa sekretornih fosfolipaza, specifična po ekstenziji na C-terminusu od čak 30 amino-kiselina i dodatnim cisteinskim ostatkom, koji ovim enzimima omogućava formiranje homodimera ili heterodimera. Enzimi ove grupe nemaju afinitet za vezivanje heparanoida, ali funkciju oslobađanja arahidonske kiseline obavljaju najverovatnije delujući na perturbovane mikrodomene na ćelijskoj membrani. Jedinstvena ekstenzija na C-terminusu ima ključnu ulogu na trajanje interakcije između enzima i ćelijske membrane i produkciju arahidonske kiseline.¹⁹⁴

Grupa sPLA₂-X ima dodatne specifične disulfidne mostove (kao i enzimi grupe I i II), poseduje ekstenziju na C-terminusu (kao i enzimi grupe II) i propeptid specifičan za grupu I. sPLA₂-X je sintetisana kao zimogen, a onda se odstranjenjem propeptida na N-terminusu, formira aktivan enzim, koji ima veliki afinitet za interakciju sa receptorima za sekretornu fosfolipazu A₂. Zbog izuzetno visokog afiniteta ovog enzima za fosfatidilholin, fosfolipaza grupe sPLA₂-X oslobađa arahidonsku kiselinu sa spoljašnje strane ćelijske membrane. Arahidonska kiselina zatim difunduje kroz citosol i dolazi do perinuklearne ciklooksigenaze (COX) ili 5-lipooksigenaze 5-LOX, gde se konvertuje u eikozanoide. Interesantno je da je nivo ove fosfolipaze značajno povećan u slučajevima nekih vrsta kancera debelog creva, što ukazuje na mogući ulogu u COX-2-zavisnoj tumorogenezi.¹⁹⁴

Grupa sPLA₂-III je za razliku od ostalih sekretornih fosfolipaza A₂ znatno veći protein i ima čak oko 55 kDa. Sastoji se iz tri domena: jedinstvenih N- i C- terminusa i centralnog domena koji je sa svojih 10 cisteina i amino-kiselinskim ostacima na katalitičkoj petlji i mestu za vezivanje Ca²⁺ prepoznatljiva karakteristika ove grupe. sPLA₂-XII predstavlja grupu enzima od oko 19 kDa, koji su karakteristični po centralnom katalitičkom domenu sa His/Asp amino-kiselinskim ostacima, dok su cisteini van katalitičkog mesta locirani drugačije nego kod ostalih fosfolipaza. Osim toga, mesto ili petlja gde se vezuje Ca²⁺ (sa amino kiselinskim nizom: X₁CG₁X₂G₂) je izmenjena tako što je G₂ ostatak u sekvenci zamenjen prolinom. Enzim je najviše prisutan u srcu, skeletnim mišićima, bubrezima i pankreasu.¹⁹⁴

4. HIPOTEZA I CILJ DISERTACIJE

4.1. Hipoteza

Dosadašnje iskustvo je pokazalo da su osnovni nedostaci hemoterapije kancera bazirane na kompleksima platine:

- štetni toksični efekti i
- razvoj ćelijske rezistencije na lek.

U skladu sa tim, jedan od vidova poboljšanja hemoterapije je izučavanje mehanizma interakcije sa drugim ćelijskim komponentama pored DNK, kao što su proinflamatorni enzimi i lipidi, inflamatorni medijatori. Jedan od enzima, čija su povišena ekspresija i aktivnost u korelaciji sa razvojem nekoliko vrsta kancera kod ljudi, fosfolipaza A₂, označena je kao potencijalna meta za anti-tumorsku terapiju.

Pitanje koje se postavlja nakon pregleda literature jeste da li izabrani kompleksi platine i rutenijuma utiču na strukturu i aktivnost sekretorne fosfolipaze A₂. Prva pretpostavka je da se kompleksi metala vezuju za enzim preko jednog od 7 disulfidnih mostova, koliko ih ovaj enzim sadrži i da ta interakcija može dovesti do modifikovanja aktivnosti enzima.

Fosfolipaza A₂, slično drugim enzimima, menja konformaciju prilikom vezivanja supstrata/fosfolipida za aktivno mesto, pa je važno ustanoviti da li se kompleksi prelaznih metala vežu za enzim u obe konformacije (pre i posle vezivanja supstrata za enzim), kako to utiče na enzim i da li je ova veza dovoljno jaka da se može detektovati izabranim metodama.

Imajući u vidu da su supstrat za PLA₂ fosfolipidi, koji u fiziološkim uslovima formiraju karakteristične strukture (lipozomi, membrane), potrebno je odgovoriti na pitanje da li i kako kompleksi prelaznih metala utiču na organizaciju fosfolipida. Najjednostavniji način za ispitivanje interakcije kompleksa sa fosfolipidnim strukturama jeste ispitivanje integriteta, odnosno propustljivosti tih struktura u prisustvu kompleksa. Pretpostavka je da se kompleksi mogu, u zavisnosti od lipofilnosti i

ukupnog naelektrisanja, inkorporirati u lipidne strukture ili narušiti njihovu organizaciju, što bi u oba slučaja imalo negativan uticaj na interfacijalnu aktivaciju PLA₂.

4.2. Cilj disertacije

U skladu sa navedenom hipotezom, cilj ove disertacije je da se ispita uticaj kompleksa platine i rutenijuma na samu sekretornu (pankreasnu) fosfolipazu A₂, kao i na ćelijsku membranu i liposome, koji su supstrat za ovaj enzim. U okviru toga, bilo je potrebno ispitati:

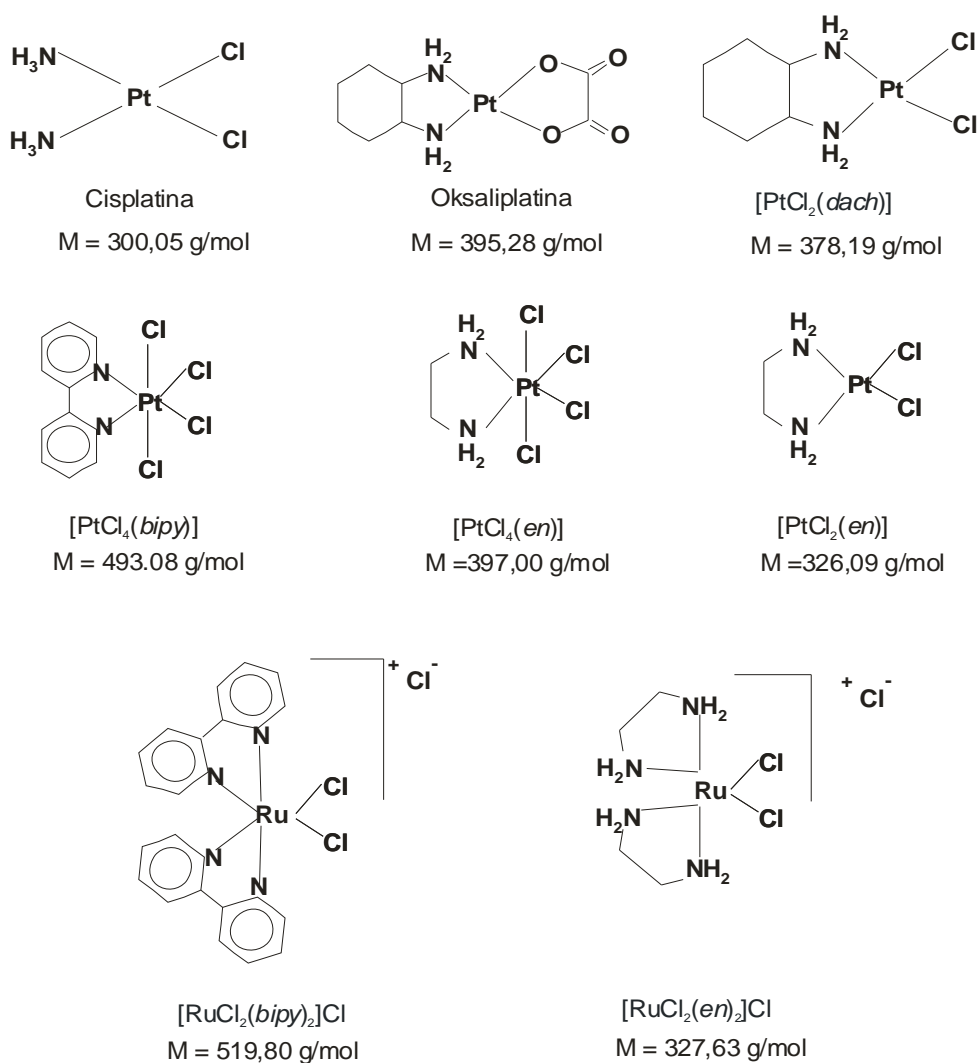
- uticaj kompleksa na aktivnost PLA₂ i utvrditi mehanizam moguće inhibicije;
- vezivanje kompleksa Pt i Ru za enzim;
- tip interakcije izabranih kompleksa Pt i Ru sa pojedinačnim klasama fosfolipida i smešom fosfolipida koja odgovara sastavu ćelijske membrane;
- uticaj izabranih kompleksa metala na strukturu i stabilnost lipidnog dvosloja (na laboratorijski formiranim lipozomima i na izolovanim eritrocitima).

Dobijeni rezultati mogu doprineti uspostavljanju veze između strukture kompleksa prelaznih metala i njihove biološke aktivnosti (*structure-activity relationship*, SAR), koja za najviši cilj ima razvoj „racionalne“ ili „ciljane“ hemoterapije. Poslednje podrazumeva racionalnu manipulaciju bioloških efekata kompleksa prelaznih metala promenom njihove hemijske strukture.

5. EKSPERIMENTALNI DEO

5.1. Kompleksi metala

Za izradu doktorske disertacije korišćeni su kompleksi platine i rutenijuma sa ligandima: *dach* (1,2-diaminocikloheksan), *bipy* (2,2'-bipiridin), *en* (etilendiamin), kao i komercijalno dostupni *cis*-platina i *oxali*-platina. Struktura svih korišćenih kompleksa je prikazana na slici 17.



Slika 17. Struktura i hemijske formule kompleksa platine i rutenijuma korišćenih za izradu doktorske disertacije

Kompleksi Cisplatina (*cis*-diaminoplatina(II) dihlorid ili Pt(NH₃)₂Cl₂) i Oksaliplatina ([SP-4-2(1*R-trans*)]-(1,2-cikloheksandiamin-N,N')[etandioata(2--)-O,O']platina) su dostupni kao lekovi korišćeni u hemoterapiji kancera i kupljeni od kompanije Sigma (*Taufkirchen*, Nemačka). Ostali kompleksi: [PtCl₂(*dach*)], [PtCl₄(*bipy*)], [PtCl₄(*en*)], [PtCl₂(*en*)], [RuCl₂(*bipy*)₂]Cl, [RuCl₂(*en*)₂]Cl su dobijeni na poklon od naučno-istraživačke grupe prof. Živadina Bugarčića sa Hemijskog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu, gde su sintetisani i okarakterisani metodama ultraljubičaste spektrofotometrije (UV-VIS), nuklearne magnetne rezonancije (NMR) i tačne hromatografije (HPLC). Ligandi *dach*, *en* i *bipy* su skraćenice za (1*R*,2*R*)-1,2-diaminocikloheksan), etilendiamin i 2,2'-bipiridin.²⁰⁷⁻²⁰⁹

5.1.1. Određivanje lipofilnosti kompleksa

Lipofilnost kompleksa je određena kao particioni, odnosno koeficijent raspodele svakog pojedinačnog kompleksa metala između vode i alkohola, 1-oktanol. Svi kompleksi metala su rastvoreni do koncentracije 1 mg/ml u sledećim rastvaračima: fiziološki rastvor (*cis*-platina), metanol ([PtCl₄(*bipy*)] i [RuCl₂(*en*)₂]Cl), metanol:voda u zapreminskom odnosu 1:1 ([PtCl₄(*en*))] i metanol:voda u zapreminskom odnosu 4:1 ([RuCl₂(*bipy*)₂]Cl). Ista količina svakog od kompleksa je nanešena na po dve TLC pločice (Sillica gel 60, *Merck*) i ostavljena da rastvarač sasvim ispari. U dve zasebne kadice su sipane destilovana voda (5 ml) i čist 1-oktanol (5 ml) u koje su zatim uronjene TLC pločice. Nakon što front rastvarača (voda ili oktanol) dostigne visinu od oko 1 cm od gornjeg kraja pločice, pločice se vade i suše pod strujom toplog vazduha, a zatim smeštaju u zatvorene staklene posude sa nekoliko kristala joda. Pare joda i UV lampa su korišćeni za detekciju. Određene su R_f vrednosti svakog od kompleksa u 1-oktanolu i vodi i izračunata je vrednost logK_{o/w} prema jednačini 1:

$$\log K_{o/w} = \log \frac{Rf_o}{Rf_w}, \quad \text{Jednačina 1}$$

Rf_0 predstavlja odnos rastojanja (u cm) koje pređu kompleks metala i front mobilne faze (1-oktanol) na TLC pločici kada je mobilna faza 1-oktanol, dok je Rf_w odnos rastojanja (u cm) koje pređe kompleks metala i front mobilne faze (voda) u slučaju kada je mobilna faza voda. Pozitivna vrednost $\log K_{o/w}$ označava lipofilne komplekse metala, dok je negativna vrednost svojstvena hidrofiličnim kompleksima. Određivanje vrednosti $\log K_{o/w}$ omogućava kvantitativno poređenje kompleksa metala po lipofilnosti i stvaranje korelacije između lipofilnosti kompleksa i njihove interakcije sa lipozomima.

5.2. Hemoliza humanih eritrocita kompleksima metala

Eritrociti, odnosno crvena krvna zrnca su izolovana iz pune krvi zdravih volontera prema Hofmanovom (Hoffman) protokolu.²¹⁰ Ukratko, krv je uzorkovana u plastične tube zapremine 5 ml sa dodatkom EDTA. Puna krv je zatim centrifugirana (5 min, 1200 rpm=obrta po minutu) i nakon otklanjanja seruma (supernatanta), crvena krvna zrnca su isprana tri puta sa sveže pripremljenim izotoničnim fiziološkim rastvorom (0,9 % NaCl). Između svakog ispiranja, eritrociti se centrifugiraju po 5 min na 1200 rpm. Nakon zadnjeg ispiranja, crvena krvna zrnca su razblažena fosfatnim puferom (pH=7,4). Finalna koncentracija je određena brojanjem krvnih ćelija pod mikroskopom i iznosila je oko 5×10^8 eritrocita/ml.

Hemoliza eritrocita u prisustvu različitih kompleksa metala je merena po Hofmanovom protokolu, gde je osnovni princip kvantitativno određivanje oslobođenog hemoglobina zasićenog kiseonikom.²¹⁰ Eritrociti su inkubirani sa rastvorima kompleksa metala različite koncentracije i za različite vremenske intervale na konstantnoj temperaturi od 37°C. Negativnu kontrolu (0%) su činili eritrociti inkubirani sa fosfatnim puferom pri istim uslovima, dok su eritrociti inkubirani sa hladnom destilovanom vodom bili pozitivna kontrola (100% lizirani eritrociti). Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani (5 min, 5000 rpm) i merena apsorbcija supernatanta. Apsorbcija uzoraka i pozitivne i negativne kontrole je merena na talasnoj dužini od 541 nm na UV/VIS spektrofotometru *Lambda 35 (Perkin Elmer, SAD)*.

Procenat hemolize je preračunat prema jednačini 2, u kojoj svaka od vrednosti predstavlja srednju dobijenu vrednost dobijenu merenjem vrednosti apsorbancije uzorka u triplikatu.

$$hemoliza(\%) = \frac{A(uzorak) - A(neg.kontrola)}{A(poz.kontrola)} \times 100\% \quad \text{Jednačina 2.}$$

5.3. Lipidi

U eksperimentima su korišćene čiste klase lipida (*Sigma*, Taufkirchen, Nemačka i *Avanti Polar Lipids*, Alabaster, Alabama, SAD), kao i lipidi izolovani iz eritrocita.

5.3.1. Izolovanje lipida iz humanih eritrocita

Lipidi iz eritrocita su izolovani iz pune krvi na dva načina, prema metodi po Folhu (*Folch*)²¹¹ i po metodi prema Rouzu i Oklanderu²¹² (*Rose* i *Oklander*). Obe metode su dale sličan rezultat po pitanju interakcije lipida sa kompleksima metala, ali se drugom metodom sasvim uklanja zaostali pigment od eritrocita. Za izolovanje eritrocita korišćena je procedura opisana u odeljku 5.2.

Izolovanje lipida iz eritrocita po Folhu podrazumeva mešanje 0,4 ml izolovanih eritrocita sa 4,5 ml metanola. Nakon 30 min dodaje se još 3 ml hloroforma i inkubira uz lagano mešanje još 30 min. Uzorak se centrifugira 10 min na 500xg i sakupi supernatant. Supernatant se upari do suva, a ekstrahovani lipidi se rastvore u što manjoj zapremini smeše metanol:hloroform (1:1) i čuva na temperaturi -20 °C do upotrebe.

Po drugoj metodi, 1 ml izolovanih eritrocita se lizira grubim mešanjem (vorteksiranjem) sa 1 ml hladne destilovane vode. Nakon 15 min dodaje se 11 ml izopropanola i uzorak se meša oko 1 sat. Nakon toga, dodaje se 7 ml hloroforma i uzorak meša još oko sat vremena, pa centrifugira 30 min na 500xg. Supernatant se baci, a donji sloj (hloroform) se razblaži tako da ukupan odnos rastvarača bude

hloroform:metanol (2:1). Uzorak se može i jednom isprati sa 0,05 M KCl (0,2% zapremine).

U oba slučaja, izvedena su po dva tipa eksperimenata. Kako bi prirodni sastav lipida sa kojima se testira interakcija kompleksa metala bila što približnija sastavu u ćelijskim membranama u prirodnim uslovima, najpre su izolovani lipidi iz eritrocita, pa su dalje korišćeni u eksperimentima. Međutim, takođe je testiran uticaj kompleksa metala na lipide u ćelijskoj membrani eritrocita. To je izvedeno tako što se izolovani eritrociti inkubiraju sa kompleksima metala na 37 °C, varirajući vreme inkubacije i koncentraciju kompleksa u rangu 10^{-6} M do 10^{-3} M. Nakon inkubacije, lipidi su izolovani prema opisanim procedurama i dalje analizirani.

5.4. Lipozomi (LUV)

Lipozomi su pripremljeni prema standardnoj proceduri za pripremu velikih unilamelarnih vezikula (LUV).^{213,214}

5.4.1. Rastvarači i priprema smeše lipida

Pripremljeni su rastvori pufera i boje 6-karboksifluoresceina (*Sigma-Aldrich*). Pufer se sastoji od 10 mM HEPES-a i 100 mM NaCl, a rastvor boje je pripremljen u koncentraciji 60 mM u istom puferu, sa konačnom pH vrednosti 7,4. Pufer i 6-karboksifluorescein moraju imati što približniju vrednost osmolarnosti, kako bi se u odgovarajućim eksperimentima izbegao efekat "curenja" boje iz lipozoma u prisustvu rastvora pufera. Stoga je prvo izmerena osmolarnost rastvora 6-karboksifluoresceina, a zatim su naknadno podeševani osmolarnost i pH vrednost pufera. Osmolarnost rastvora je merena pomoću semi-mikro osmometra (*QES*, Malezija), koji radi na principu merenja razlike u tački mržnjenja rastvora različite osmolarnosti.

Sastav lipozoma je variran i pripremljeni lipozomi su bili formirani od pojedinačnih klasa lipida: POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin ili PC 16:0/18:1); POPS (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoserin ili PS 16:0-18:1);

mešavine POPC i POPS u odnosu 1:1; mešavine POPC, POPS i holesterola u odnosu 2:2:1 i kompleksne mešavine različitih klasa lipida čiji sastav odgovara sastavu ćelijske mebrane eritrocita. Poslednja smeša je sadržala sledeće klase lipida: holesterol (29%), fosfatidilholin (19%), fosfatidiletanolamin (19%), sfingomijelin (19%), fosfatidilserin (0.09%), fosfatidilinozitol (0.02%), lizofosfatidilholin (0.2%) i fosfatidnu kiselinu (0.01%), pri čemu je konačan procentni sastav masnih kiselina bio: 16:0 (27%), 18:0 (23%), 18:1 (20%), 18:2 (13%), 20:4 (14%) i 3% za ostale masne kiseline. Sve klase lipida korišćene za pripremu lipozoma kupljene su od kompanija *Sigma* (Taufkirchen, Nemačka) i *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, Alabama, SAD) i čuvani kao rastvori koncentracije 10 mg/ml u čistom hloroformu na temperaturi -80 °C.

5.4.2. Priprema lipozoma

Alikvoti lipida u hloroformu su mešani u željenom odnosu u staklenom balonu sa okruglim dnom, a zatim upareni do suva pod vakuumom. Suvi ostatak, odnosno lipidni film je zatim resuspendovan (5 min uz vorteks) u odgovarajućoj zapremini HEPES pufera ili rastvora boje 6-karboksifluoresceina (za eksperimente "curenja" lipozoma, koji će biti objašnjeni u odeljku fluorescentne spektroskopije (5.7.2.)). U oba slučaja, rastvarači su hidrofilni i lipidi spontano formiraju multilamelarne liposome različitih dijametara. Kako bi se rastvarači inkorporirani u liposome ravnomerno rasporedili u lipozomima i formirali veliki unilamelarni lipozomi, uvode se ciklusi dehidratacije i rehidratacije.²¹⁵ Lipozomi se podvrgavaju naglom zaleđivanju u tečnom azotu (rehidratacija) i topljenju u vodenom kupatilu na 30°C (rehidratacija) u 10 ciklusa. Formirani veliki unilamelarni lipozomi (LUV) variraju u veličini, pa se suspenzija pod pritiskom propušta 10 puta kroz polikarbonanti filter sa porama veličine 100 nm, kroz termostatirani ekstruder (*LIPEX Biomembranes*, Vankuver, Kanada).

Za ispitivanje interakcije kompleksa metala sa lipozomima u kojima je inkorporiran pufer, potrebno je samo napraviti rastvore komplekse metala u istom puferu i sa istom osmomolarnošću i ispitivati interakciju metodama tankoslojne hromatografije (TLC) i MALDI (laserska desorpcija i jonizacija potpomognuta matricom/matriksom) masene spektrometrije. Lipozomi sa inkorporiranom bojom se

neposredno pre upotrebe u eksperimentima metodom fluorescentne spektrometrije moraju odvojiti od viška rastvora boje koja nije inkorporirana. Odvajanje lipozoma sa inkorporiranom bojom od ostatka boje u rastvoru vrši se tehnikom hromatografije u koloni punjenoj gelom *Sephadex G-50* (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Nemačka). Mobilna faza je ranije opisan pripremljeni pufer iste osmomolarnosti. Suspenzija se u koloni deli na dve frakcije, "bržu" frakciju sa lipozomima i drugu, "sporiju", frakciju sa bojom. Lipozomi se na kraju kolone skupljaju u kivete i ukupna koncentracija fosfolipida se može odrediti kvantifikacijom fosfora u uzorku. Finalna koncentracija lipozoma posle prolaska kroz ekstruder i kolonu je 2-3 mM. Lipozomi sa inkorporiranom fluorescentnom bojom mogu da se koriste odmah u eksperimentu ili se mogu čuvati na temperaturi 5-6 °C, ali se neposredno pred upotrebu moraju ponovo propustiti kroz hromatografsku kolonu, jer inkorporirana boja vremenom izlazi iz lipozoma. Tehnika praćenja brzine "curenja" fluorescentne boje iz lipozoma pod uticajem različitih agenasa moguća je metodom fluorescentne spektrometrije, opisane u odelljku 5.7.

5.5. Tankoslojna hromatografija visokih performansi (HPTLC)

Za razdvajanje lipida u smeši na zasebne klase lipida, kao i za ispitivanje interakcije između zasebnih klasa lipida i kompleksa metala, korišćena je tehnika tankoslojne hromatografije visokih performansi (HPTLC).²¹⁶

Uzorci (klase lipida inkubirane sa kompleksima ili sa fosfolipazom A₂, smeša lipida) se nanose na pločice za tankoslojnu hromatografiju sa silika-gelom 60 (HPTLC, *Merck*, Nemačka) i postavljaju uspravno u kadice sa mobilnom fazom (hloroform:etanol:voda:tetraetilamin u zapreminskom odnosu 30:35:7:36). Kada mobilna faza dostigne visinu od otprilike 1 cm od gornjeg kraja pločice, pločica se izvadi i sasvim osuši. Za vizuelizaciju se koristi sprej (0,05 mg/ml primulin u 80% acetonu). Nakon sušenja, frakcije se detektuju pod UV lampom, a analiziraju pomoću MALDI TOF masene spektrometrije. Međutim, posebne pogodnosti predstavlja tehnika spregnute HPTLC-MALDI koja omogućava da se na pločici za uzorke za masenu

spektrometriju prethodno razdvoje uzorci tankoslojnom hromatografijom.^{217,218} Ova tehnika je korišćena za razdvajanje klasa lipida izolovanih iz eritrocita.

5.6. MALDI TOF masena spektrometrija

Skraćenica MALDI-TOF MS potiče od engleskog naziva za ovu tehniku: *Matrix-Assited Laser Desorption and Ionization Mass Spectrometry Time Of Flight*. U bukvalnom prevodu, MALDI MS znači: masena spektrometrija sa laserskom desorpcijom i jonizacijom uz korišćenje matrice, a TOF predstavlja vrstu masenog analizatora, koji razdvaja jone na bazi vremena preleta kroz cev pod visokim naponom. To je jedna od tehnika masene spektrometrije sa „mekom“ jonizacijom uzorka, što je čini izuzetno pogodnom metodom za analizu biomolekula, kao što su nukleinske kiseline, proteini, peptidi, šećeri, lipidi, ali i raznih drugih makromolekula. Osim toga, metoda je veoma osetljiva, tolerantna na neorganske soli u biološkim uzorcima, ima visoku rezoluciju, a priprema uzoraka i snimanje spektara je relativno jednostavno i brzo.^{219,220}

Maseni spektri prezentovani u disertaciji su snimljeni na *Autoflex (Bruker Daltonics, Nemačka)* MALDI-TOF i *Voyager Biospectrometry DE Pro workstation (PerSeptive Biosystems, Framingham, USA)* MALDI-TOF masenom spektrometru u pozitivnom i negativnom, reflektornom i linearnom modu. Oba spektrometra su opremljena pulsniim azotnim laserom (337 nm) i kalibrisani su podešavanjem signala koji potiče od protonovanog DHB adukta na odgovarajuću vrednost (155.034 Da). Sve matrice korišćene za MALDI analizu kupljene su od kompanije Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka).

5.6.1. Opšti principi MALDI TOF masene spektrometrije

Osnovna funkcija matrice ili matriksa jeste da apsorbuje lasersko zračenje i da posredno „senzibilisano“ potpomogne desorpciju i jonizaciju uzorka, sprečavajući tako defragmentaciju biomolekula direktnim laserskim zračenjem. Matrica mora biti

relativno male molekulske mase (lako isparljiva), ali opet dovoljno velike kako ne bi isparila za vreme pripreme uzorka. Zbog relativno malih masa i s obzirom na to da se dodaju u velikom višku u odnosu na uzorak, matrice daju veliki broj intenzivnih signala u regionima malih masa, što treba imati u vidu pri analizi malih molekula. Matrice su uglavnom kiseline, pa su joni u MALDI masenom spektru uglavnom protonski adukti biomolekula. Hemijska struktura matrica je karakteristična po hromofori, aromatičnom prstenu ili konjugovanim dvostrukim vezama, što im omogućava da apsorbuju u ultraljubičastoj (UV) ili infra-crvenoj (IR) oblasti elektromagnetnog zračenja. Obično sadrže polarne grupe i rastvorljive su u vodi.

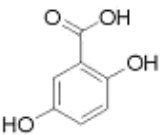
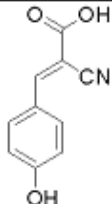
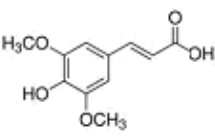
Pri izboru matrice se mora voditi računa da se signali koji potiču od same matrice ne preklapaju sa signalima koji potiču od uzorka u masenom spektru. Matrica mora da bude rastvorljiva u istim rastvaračima kao i uzorak, kako bi se postigla homogena kokristalizacija i bolja reproducibilnost masenih spektara. Za analizu pojedinih klasa molekula, postoji nekoliko odgovarajućih matrica koje se najčešće upotrebljavaju i u tabeli 3 su date strukturne formule i molekulske mase matrica koje su upotrebljavane u izradi disertacije, korišćeni rastvarači, talasne dužine lasera za koje se mogu upotrebljavati i njihova primena u disertaciji.

Nanošenje uzorka i matrice varira od primene kako bi se postigla što bolja kokristalizacija i homogenost matrice i uzorka, a time i reproducibilnost tehnike. Primjenjivane su tehnike premiksa (prethodno mešanje matrice i analita), „sendvič“ metoda (matrica, analit, matrica sa sukcesivnim ubrzanim sušenjem fenom) i tehnika pri kojoj su matrica i analit mešani na samoj pločici. Za svaku kombinaciju matrice i uzorka, način nanošenja se prethodno testira. Na primer, za analizu lipida je najbolje koristiti metod nanošenja rastvora lipida na ploču, ubrzano sušenje, a zatim nanošenje matrice (DHB ili CHCA) sa ubrzanim sušenjem. Međutim, isti pristup u analizi proteina daje nehomogene ko-kristale uzorka i matrice.

Za kvantitativnu analizu se pre nanošenja na pločicu, u smešu analita i matrice dodaje i mala količina unutrašnjeg standarda, a isparivanje uzorka se pospešuje sušenjem u toploj vazdušnoj struji. Važno je da odnos matrice i uzorka bude takav da je matrica u višku (500-1000 puta u molskom odnosu), a pri razvijanju eksperimentalne metode se isprobavaju različiti odnosi i prihvata onaj koji daje spektre najboljeg kvaliteta.

Uzorak se pod visokim vakuumom ozračuje laserom, pri čemu prvenstveno matrica u višku apsorbira energiju lasera i prenosi je na uzorak, a zatim se zajedno desorbiraju i jonizuju. Mehanizam jonizacije i desorpcije uzorka i matrice nije sasvim razjašnjen, pa se još uvek ne zna da li se jonizacija dešava u čvrstoj fazi pre desorpcije ili u gasovitoj fazi. Joni analita i matrice se, nakon desorpcije ubrzavaju u električnom polju (20 kV) i promenom polariteta se mogu analizirati samo pozitivni ili samo negativni joni.

Tabela 3. Matrice za MALDI-TOF analizu molekula korišćenih u disertaciji sa punim imenom, strukturnom formulom, molekulskom masom i izabranim načinom pripreme, talasnom dužinom pri kojoj se koriste (masnim brojevima je označena talasna dužina na kojoj su korišćeni) i molekulima za čiju se analizu koriste. ACN=acetonitril, TFA=trifluorosirćetna kiselina

Matrica	Naziv	Strukturna formula	Masa g/mol	Priprema	λ /nm	Primena
DHB	2,5-dihidroksibenzojeva kiselina		154,12	0,5 M u metanolu 0,1% TFA	337 355 266	Lipidi, kompleksi metala
CHCA	α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina		189,17	Zasićen rastvor u 50% ACN 0,1% TFA	337 355	Lipidi, kompleksi metala
SA	3,5-dimetoksi-4-hidroksicimetna kiselina Sinapinska kiselina,		224,21	Zasićen rastvor u 30-50% ACN 0,1% TFA	337 355 266	Enzim PLA ₂

Ubrzani joni stižu do analizatora, koji je u slučaju MALDI spektrometara najčešće TOF („time of flight“) tipa, odnosno razdvaja jone na osnovu vremena preleta. Joni koji stignu do analizatora imaju istu kinetičku energiju, stečenu ubrzavanjem u električnom polju iste jačine, a u analizatoru (visoki vakuum i bez električnog polja) imaju različite brzine kretanja. Svi joni prelaze isti put do detektora, pa se razdvajaju na osnovu

vremena koje je potrebno da pređu analizador. „Vreme preleta“ zavisi od odnosa njihove mase i naelektrisanja. Korišćena su dva tipa detektora: reflektorni i linearni. Reflektorni se razlikuje po dodatnom elektrostatičkom reflektoru, kojim se joni skreću u električnom polju i prelaze duži put. Na osnovu njihovog skretanja, koriguje se disperzija u kinetičkoj energiji jona sa istim odnosom mase i naelektrisanja, a tako povećavaju rezolucija i preciznost merenja. Reflektorni mod je pogodan za analizu manjih molekula, kao i za snimanje izotopske distribucije pojedinih jona, dok se linearni detektor koristi za analizu molekula velikih masa. Intenziteti signala u masenom spektru su proporcionalni broju jona određenog odnosa mase i naelektrisanja, koji stignu do detektora.

5.6.2. Analiza kompleksa metala

Svi kompleksi metala (slika 17) su analizirani u pozitivnom reflektornom modu uz odloženu ekstrakciju. Korišćene su matrice DHB i CHCA, čije su osobine i način pripreme prikazane u Tabeli 3. Kompleksi su analizirani jednostavnim nanošenjem rastvora kompleksa (0,5-0,9 μl) i matrice (0,5-0,9 μl) na MALDI pločicu i ubrzanim sušenjem pod strujom toplog vazduha (fen). Probana je i sendvič metoda, ali se pokazalo da ova metoda u analizi kompleksa metala ne daje bolje rezultate. Koncentracije kompleksa metala koje su analizirane su u rangju 10^{-6} - 10^{-3} M. Važno je naglasiti da je oba kompleksa rutenijuma, $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ i $[\text{RuCl}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$, kao i kompleks platine sa bupiridinskim ligandom $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ bilo moguće analizirati i bez upotrebe matrice. Naime, već ranije je pokazano da ovi kompleksi imaju svojstva da apsorbuju lasersko zračenje, ili zbog aromatičnog bupiridinskog prstena ili zbog elektronske konfiguracije kompleksa, pa je moguća analiza LDI pristupom (laserska desorpcija i jonizacija).²²¹ U skladu sa tim, ovi kompleksi su se za analizu MALDI TOF spektrometrijom, naročito u eksperimentima gde je ispitivana interakcija sa lipidima, pripremali u nižoj koncentraciji (10^{-4} ili 10^{-5} M). U suprotnom, desorpcija i jonizacija ovih kompleksa je bila toliko intenzivna, da nije bilo moguće detektovati signale drugih molekula u sistemu.

5.6.3. Analiza lipida

Lipidi su izuzetno pogodni za analizu MALDI-TOF masenom spektrometrijom.^{222,223} Imaju male mase, jednostavnu fragmentaciju i postoji nekoliko opštih pravila za analizu svake od klasa fosfolipida. Za izradu disertacije korišćeni su lipidi iz različitih izvora (komercijalno nabavljene klase lipida, lipidi izolovani iz eritrocita i žumanceta kokošijeg jajeta i lipidi (lizolipidi) nastali kao reakcioni proizvodi) i u svim slučajevima su korišćene matrice CHCA i DHB (tabela 3). Nanošenje uzorka na pločicu podrazumeva nanošenje sloja lipida sa ubrzanim sušenjem, pa onda matrice sa ubrzanim sušenjem. U svim slučajevima se koristi reflektorni mod, ali u zavisnosti od toga koji se fosfolipid analizira, bira se negativni ili pozitivni mod detektora. Detekcija negativnih jona zavisi od osobina njegove funkcionalne grupe. Fosfatidna kiselina je dva puta negativno naelektrisana u fiziološkim uslovima, pa bi za njenu detekciju u pozitivnom reflektornom modu potrebno tri katjona, dva za neutralizaciju i jedan za protonovanje. Logično je da se takvi molekuli analiziraju u negativnom modu.

U masenom spektru prisutni su adukti lipida sa H^+ , K^+ , Na^+ u zavisnosti od sredine, pufera koji se koristi. Interakcija sa kompleksima metala je ispitivana jednostavnim inkubiranjem kompleksa metala sa pojedinačnim klasama lipida ili smešom lipida iz eritrocita. Nakon određenog vremena inkubacije, smeša je zajedno sa matricom nanešena na pločicu za uzorke i snimana u reflektornom modu. Vezivanje kompleksa metala i fosfolipida rezultovalo bi u pojavljivanju novog signala u masenom spektru, koji ne potiče od samog fosfolipida, samog kompleksa metala ili matrice.

Kvantifikacija lipida je moguća dodavanjem unutrašnjeg standarda. Unutrašnji standard može biti lipid iste klase fosfolipida sa što bližim fizičko-hemijskim osobinama kao i analit i sa razlikom u masi. Unutrašnji standard se uvek dodaje u istoj koncentraciji u sve uzorke pre nanošenja na pločicu. Dodavanje unutrašnjeg standarda omogućava da se signali koji potiču od analita porede sa intenzitetom signala i poznatom koncentracijom unutrašnjeg standarda. U izradi ove disertacije, za kvantifikaciju lizolipida LPC 16:0 koji nastaju reakcijom hidrolize fosfolipida PC 16:0/18:1, korišćen je lizolipid LPC 14:0 kao unutrašnji standard. Detaljna procedura je opisana u odeljku 5.6.4.

Komplikovane smeše lipida je pre analize potrebno razložiti na klase lipida i napredak u tom smislu je mogućnost da se simultano koriste tehnike tankoslojne hromatografije i MALDI TOF masene spektrometrije. Naime, dizajnirane su nove pločice za MALDI analizu na kojima je moguće razdvojiti komponente tanskoslojnom hromatografijom, a zatim na istu pločicu, preko razdvojenih frakcija dodati odgovarajuću matricu i analizirati uzorak pomoću MALDI TOF masenog spektrometra. Ova metoda je izuzetno korisna, jer se na ovaj način izbegava ekstrakcija svake od klasa lipida posle hromatografije i frakcije se analiziraju bez gubitka uzorka. U disertaciji je korišćen prototip pločice za HPTLC-MALDI TOF analizu, pri čemu je pločica za HPTLC posle razdvajanja lipida zalepljena na prototip MALDI pločice i razdvojene klase lipida su direktno analizirane.

5.6.4. Analiza fosfolipaze A₂

Rastvor enzima pankreasne fosfolipaze A₂ (*Sigma*, Taufkirchen, Nemačka) je pripremljen u Tris puferu (50mM TRIS, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 5,4 mM deoksiholat, pH=5) u koncentraciji 0,0125 mg/ml. Aktivnost enzima po proizvođaču je 163 U/mg, pri čemu je 1U definisan kao količina enzima koja hidrolizuje 1 μmol L-α-fosfatidil-holina po minuti, pri čemu nastaju L-α-lizo-fosfatidil-holin i masna kiselina, na pH=8 i na temperaturi 37°C. Enzim ima masu 14000 Da i sniman je u m/z rangu 10000-15000 Da. Kao matriks je korišćen rastvor sinapinske kiseline i prilikom nanošenja enzima i matrice na ploču, uzorci su ostavljeni da kokristalizuju na sobnoj temperaturi. Za tako visoke mase, korišćen je linearni detektor. Na ovaj način može se snimiti signal čiste fosfolipaze A₂, ali se može pratiti i promena u masenom spektru prilikom dodavanja kompleksa metala. Kompleksi metala su prethodno inkubirani sa enzimom u različitim koncentracionim odnosima, a zatim su uzorci zajedno sa matricom nanošeni na MALDI pločicu, kako je to ranije opisano.²²⁴

Određivanje aktivnosti fosfolipaze A₂ je moguće posredno, praćenjem potrošnje supstrata (fosfolipid) ovog enzima ili stvaranja produkta reakcije (lizolipid). U ovoj disertaciji korišćeni su lipidi izolovani iz žumanceta jajeta u koncentraciji 10 mg/ml, unutrašnji standard LPC 14:0 u koncentraciji 0,2 mg/ml i kompleksi platine i rutenijuma

koncentracije 1 mM. Najpre su fosfolipidi inkubirani sa enzimom tako da je varirana koncentracija supstrata (0,312, 0,625, 1,250, 1,875, 3,125, 6,250) koncentracija kompleksa metala (1mM, 0,1 mM i 0,01 mM) i vreme inkubacije (30 s, 1 min, 5 min, 10 min i 30 min inkubacije). Reakcija je prekinuta dodavanjem smeše hloroform:metanol (1:1 zapreminski odnos), pri čemu se supstrat i produkti rastvorni u organskom rastvaraču odvajaju od enzima rastvornog u vodi. Dodat je unutrašnji standard i nakon grubog mešanja (vorteks) i centrifugiranja, odvojen je sloj sa hloroformom (fosfolipidi i lizofosfolipidi) i uparen do suva. Film sa lipidima je resuspendovan u DHB matrici i 1,5 µl je nanešeno na MALDI pločicu i nakon ubrzanog sušenja uzorak je analiziran u pozitivnom reflektornom modu sa m/z rangom 400-1200. Za kvantifikaciju su u obzir uzeti signali koji potiču od vodoničnog i natrijumovog adukta lizofosfolipida LPC 16:0 (m/z=496,3 i m/z=518,3 respektivno) koji predstavlja produkt reakcije i signal od vodoničnog i natrijumovog adukta unutrašnjeg standarda LPC 14:0 (m/z=468,4 i m/z=490,3 respektivno). Koncentracija produkta je preračunata na osnovu jednačine 3:

$$c(\text{produkt}) = \frac{\frac{S}{N}(\text{produkt})}{\frac{S}{N}(\text{s tan dard})} \cdot c(\text{s tan dard}) \quad \text{Jednačina 3}$$

S/N predstavlja odnos “signal/šum” za svaku komponentu u istom masenom spektru. Svaka od S/N vrednosti korišćenih u jednačini 3 predstavlja srednju vrednost iz minimum 5 različitih masenih spektara.

5.7. Fluorescentna spektrometrija

Metoda fluorescentne spektrometrije je u disertaciji korišćena za ispitivanje interakcije kompleksa platine i rutenijuma sa enzimom PLA₂, kao i za praćenje otpuštanja enkapsulirane fluorescentne boje, karboksifluoresceina, iz lipozoma različitog sastava pod uticajem istih kompleksa. Svi spektri su snimani na *Jobin Yvon Fluoromax 2* fluorescentnom spektrometru (*Edison, USA*).

5.7.1. Interakcija fosfolipaze A₂ sa kompleksima metala

Enzim PLA₂ u svojoj strukturi sadrži jedan triptofan (Trp3), amino kiselinu koja omogućava da se promene u strukturi PLA₂ mogu pratiti fluorescentnom spektrometrijom. Triptofan se nalazi na površini enzima u nativnoj formi, izložen spoljašnjoj sredini.²²⁵ Ukoliko enzim promeni konformaciju, promena položaja triptofana uzrokuje promene u spektrima fluorescencije.^{226,227} Talasna dužina ekscitacije ove amino-kiseline je 280 nm, a emisioni spektri fluorescencije su snimani u opsegu 300-500 nm, sa korakom od 1 nm. Početna zapremina enzima u kiveti je bila 1200 ml (10 mM u PBS-u), a promene u spektrima fluorescencije su praćene posle sukcesivnog dodavanja 0, 5, 10, 20, 30, 40 i 50 ml svakog od kompleksa (1 mM u PBS-u).

5.7.2. Interakcija lipozoma sa kompleksima metala

Jedna od metoda za ispitivanje interakcije kompleksa metala sa lipidima i membranama, jeste metoda praćenja brzine isticanja fluorescentne boje („leakage“) iz lipozoma pod uticajem kompleksa metala.^{228,229} „Curenje“ boje iz lipozoma se prati preko povećanja intenziteta fluorescentne emisije na 517 nm, što omogućava da se posredno prati stabilnost lipidnih membrana sa vremenom, temperaturom i u prisustvu ispitivanih kompleksa metala. Procedura formiranja lipozoma je detaljno opisana u delu 5.3.2. Formirani lipozomi se izotoničnim puferom razblaže 1000 puta i inkubiraju sa kompleksima metala, tako da finalna koncentracija kompleksa bude 0,1 mM. Fluorescentna boja, koja se koristi u eksperimentu se ekscituje na talasnoj dužini 488 nm, a intenzitet emisije na talasnoj dužini 513 nm je sniman u kontinuitetu 2 sata. Nakon 2 sata, u svaki od uzoraka se dodaje 20 µl Triton-a X-100 (*Sigma*, Taufkirchen, Nemačka) koji sasvim rasturi organizaciju lipozoma i omogući da sva boja izađe napolje. Intenzitet fluorescencije u tom trenutku je uzet za 100%. „Curenje“ lipozoma u prisustvu kompleksa metala u procentima je preračunato za vreme od: 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90 i 120 min i predstavljeno u zavisnosti od vremena. Izračunati su i upoređeni

nagibi linearnih krivih, koji predstavljaju brzinu destabilizacije ili narušavanja strukture lipozoma u prisustvu kompleksa metala.

5.8. Nuklearna magnetna rezonancija

Spektri nuklearne magnetne rezonancije su snimljeni na *Bruker DRX600* spektrometru (*Bruker*, Rheinstetten, Nemačka). Snimani su spektri samog enzima PLA₂, izotopski obeleženog lipida, smeše enzima i lipida, kao i spektri titracije kompleksima. Pufer se priprema kao rastvor 50 mM Tris-a, 100 mM NaCl i 5 mM CaCl₂, i pH vrednost se podesi na 5. Koncentracija enzima u istom puferu je bila 0,4 mM. Izotopski obeležen lipid je dodecylfosfolin-d₃₈ (*Sigma*, Taufkirchen, Nemačka), gde su vodonikovi atomi zamenjeni izotopom, deuterijumom ([CD₃(CD₂)₁₁O](O⁻)P(=O)OCD₂CD₂N⁺(CD₃)₃). Koncentracija lipida je 83 mM, a koncentracija kompleksa je u rangu 0,1-1 mM. Prilikom pripreme uzoraka, na ukupnu zapreminu od 500 µl ispitivane smeše, dodavano je 55,5 µl teške vode, tako da je ukupan rastvarač uzorka zapravo 10% D₂O. Protonski, ¹H NMR spektri su snimljeni upotrebom WATERGATE W5 pulsne sekvence²³⁰ za supresiju signala koji potiču od vode (H₂O).

5.9. UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis spektrofotometrija je korišćena za praćenje aktivnosti fosfolipaze A₂ i uticaj kompleksa metala na aktivnost tog enzima. Ukratko, za eksperimente u kojima se ispitivala interakcija kompleksa i enzima, pripremljena je serija rastvora PLA₂ inkubiranih sa kompleksima Pt(II) u puferu PBS (pH=7.4). Koncentracija enzima je bila 25 µM, dok je koncentracija dodavanog kompleksa varirala od 2,5 do 250 µM. Spektri su snimljeni posle najmanje 1 sata inkubacije na 37°C u oblasti talasnih dužina 240-400 nm. Za eksperimente u kojima je ispitivana aktivnost fosfolipaze A₂ u prisustvu kompleksa, korišćen je kolorimetrijski esej dobijen od proizvođača (*Sigma Aldrich*). U ovom slučaju, pufer je Tris (500 mM) sa dodatkom 10 mM CaCl₂, pH vrednosti 8,5.

Supstrat je bio lecitin izolovan iz žumanceta kokošijeg jajeta, čija je koncentracija određena Stjuartovom metodom. Rastvor enzima pripreman je pred upotrebu kao rastvor 0,01 mg/ml PLA₂ u hladnoj dejonizovanoj vodi. Priprema se serija rastvora supstrata različite koncentracije sa 1,5% deoksiholatom i puferom. Dodaje se enzim sa CaCl₂ u sve uzorke, osim za slepu probu. Posle 5 min se na alikvote uzoraka i slepe probe od 0,2 ml dodaju dodaje 1,5 ml etra (25% u alkoholu), 0,2 ml hidroksilamina (2M) i 0,2 ml NaOH (14%). Nakon inkubacije od 20 min na 25 °C u sve uzorke i slepu probu se dodaje po 0,3 ml rastvora HCl (3N) i FeCl₃ (10%) i snima intenzitet apsorbancije na talasnoj dužini od 570 nm. Aktivnost enzima se računa tako što se od apsorbancije uzoraka oduzme apsorbancija slepe probe i razlika podeli sa vremenom inkubacije, nagibom standardne krive, masom enzima po ml reakcione smeše, konverzionim faktorom od 0,5 (lizolecitin koji nastaje kao produkt reakcije čini pola vrednosti apsorbancije na 570 nm) i konverzionim faktorom 0,8 (jer je molekulska masa fosfolipida u žumancetu aproksimirana na 800 g/mol, kako bi se rezultat preveo u mg jedinice). Aktivnost enzima je izražena u jedinicama U/mg, pri čemu jedna jedinica (1U) katalizuje hidrolizu 1 μmol fosfatidil-holina do lizofosfatidil-holina i masne kiseline, po minuti, na pH=8,5 i na temperaturi 37⁰C.

6. REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati prikazani u ovoj disertaciji se odnose na interakciju kompleksa platine i rutenijuma sa lipidima, i to sa:

- pojedinačnim klasama lipida,
- smešom klasa lipida,
- lipidima izolovanim iz eritrocita,
- lipozomima,

a zatim i na interakciju sa:

- eritrocitima i
- fosfolipazom A₂, enzimom koji je od značaja za metabolizam lipida u ćelijskoj membrani i lipidnu signalizaciju koja je deo upalnih i patoloških procesa.

Supstrat za fosfolipazu A₂ nije rastvoran u istoj sredini kao i enzim. Reakcija hidrolize fosfolipida se dešava na granici faza: vodene u kojoj je rastvoren enzim i organske u kojoj je fosfolipid, supstrat reakcije. Aktivnost fosfolipaze A₂ zbog toga može biti modifikovana promenom organizacije fosfolipida, koji u fiziološkim uslovima formiraju lipozome i membranske strukture, dok se sa dodatkom deterdženata rastvaraju ili obrazuju micelle. Jedinjenja koja utiču na strukturu, zakrivljenost ili sastav membrane ili organizaciju fosfolipida u membrani, utiču na način ili na brzinu vezivanja supstrata za enzim i tako posredno modifikuju njenu aktivnost. Iz tog razloga je najpre ispitana interakcija kompleksa metala sa rastvorenim fosfolipidima (uz dodatak deterdženta, koji povećavaju dostupnost mesta za hidrolizu enzimu) u smeši i sa pojedinačnim klasama lipida, lipidima organizovanim u membrane i sa eritrocitima. Nakon ispitivanja interakcije fosfolipida sa kompleksima platine i rutenijuma, koje imaju za cilj da isključe mogućnost posredne inhibicije fosfolipaze, ispitano je vezivanje istih kompleksa za fosfolipazu A₂ metodama MALDI-TOF masene spektrometrije, fluorescentne spektrometrije i nuklearne magnetne rezonancije.

Testirana je interakcija kompleksa: [PtCl₂(*dach*)], [PtCl₄(*bipy*)], [PtCl₄(*en*)], [PtCl₂(*en*)], [RuCl₂(*bipy*)₂]Cl, [RuCl₂(*en*)₂]Cl, čija je struktura data na slici 17. Nijedan od ovih kompleksa nije komercijalno dostupan, već je poklon istraživačke grupe

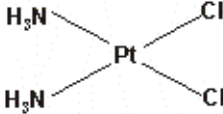
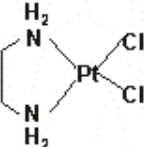
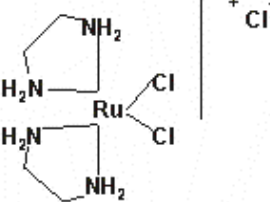
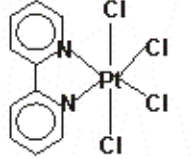
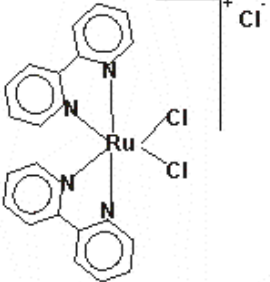
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu. U nekim eksperimentima je, međutim, kao kontrola korišćena i *cis*-platina (*cis*-DDP), odobrena od FDU kao terapeutik u tretmanima različitih vrsta kancera.

6.1. Lipofilnost kompleksa

Lipofilnost kompleksa predstavlja prvu odrednicu o interakciji i afinitetu pojedinačnih kompleksa prema lipidima, odnosno govori o njihovoj rastvorljivosti, transportu kroz ćelijsku membranu pasivnom difuzijom, metabolizmu i farmakokinetici, što je naročito važno u sintetisanju novih lekova.²³¹ Lipofilnost je određena kao koeficijent raspodele kompleksa u sistemu rastvarača oktanol/voda, kao što je to opisano u odeljku 5.1.1. Rezultati ($\log K_{0/w}$) su predstavljeni u tabeli 4. zajedno sa odgovarajućim strukturnim formulama i molekulskim masama kompleksa. Negativne vrednosti $\log K_{0/w}$ su odlika hidrofilnih kompleksa, dok su pozitivne vrednosti karakteristične za hidrofobne (lipofilne komplekse); u tabeli 4, kompleksi su poređani od najhidrofilnijeg do najlipofilnijeg.

Najhidrofilniji među kompleksima je *cis*-platina, koji za ligande ima dve amino grupe i dva atoma hlora, dok je najlipofilniji kompleks Ru(III) sa dva *bipy* liganda. Može se zaključiti da su kompleksi platine i rutenijuma, koji sadrže bipyridinski ligand generalno lipofilniji od kompleksa sa etilendiaminskim ligandima i kompleksa koji za ligande imaju amino grupe. Osim toga, kompleksi sa dva *bipy* liganda ili sa dva *en* liganda su hidrofobniji od odgovarajućih kompleksa sa jednim *bipy* ili *en* ligandom. Među ispitanim kompleksima, kompleksi rutenijuma su pokazali veću lipofilnost od kompleksa platine. Međutim, razlog za to je najverovatnije karakteristična struktura ovih kompleksa, koji uvek sadrže dva liganda, u odnosu na ispitivane komplekse platine sa jednim ligandom. U tabeli nedostaju podaci za kompleks *cis*-PtCl₂(1,2-*dach*), ali se po podacima iz literature i poređenjem rezultata lipofilnosti, ovaj kompleks može svrstati u tabelu kao lipofilniji od kompleksa sa *en* ligandima, a hidrofilniji od kompleksa sa *bipy* ligandima.²³²

Tabela 4. Strukturne formule, molekulske mase kompleksa metala i logaritmovane vrednosti njihovih particionih koeficijenata u sistemu oktanol/voda. Kompleksi su poredani od najhidrofilnijeg (najmanja vrednost vrednost $\log K_{0/w}$) do najlipofilnijeg (najveća vrednost $\log K_{0/w}$). Detaljna procedura eksperimenta je opisana u Eksperimentalnom delu (5.1.1.).

Kompleks	Strukturna formula	M/(g/mol)	$\log K_{0/w}$
$\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$		300,05	-1.14
$[\text{PtCl}_2(\text{en})]$		326,09	-1.09
$[\text{RuCl}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$		327,63	-0.60
$[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$		493,08	-0.18
$[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$		519,8	0.86

Iz podataka o lipofilnosti kompleksa se može doneti zaključak o njihovoj rastvorljivosti, permeabilnosti, distribuciji i toksičnosti, međutim u ovoj disertaciji su eksperimenti sa određivanjem lipofilnosti poslužili kao parametar za preliminarno poređenje kompleksa po njihovom afinitetu prema lipidima.

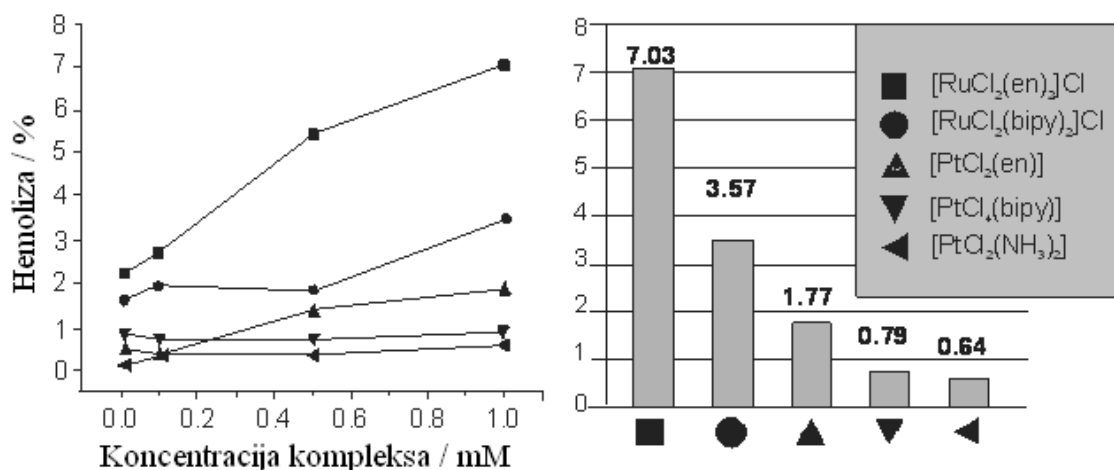
Naime, vrednost $\log K_{o/w}$ ne uzima u obzir druge fizičko-hemijske karakteristike kompleksa, kao što su veličina kompleksa i njegovo naelektrisanje i moguće promene (npr. hidroliza) u fiziološkim uslovima. Takođe, u literaturi se mogu naći različiti predloženi okviri u kojima treba da se nalazi lipofilnost neke komponente, kako bi ona po svojim ADMET (adsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija, toksičnost) karakteristikama bila idealan kandidat za novi lek. Predloženi okviri zavise od baze podataka pojedinih istraživačkih grupa, vrste lekova koje se ispituju i od metoda koje se koriste za određivanje lipofilnosti tih komponenti.²³¹ Uopšteno, smatra se da komponente sa sličnim vrednostima lipofilnosti imaju sličan mehanizam transporta u ćeliju.^{233,234}

6.2. Hemoliza humanih eritrocita u prisustvu kompleksa

Crvena krvna zrnca sisara se u literaturi često koriste kao model za ispitivanje farmakokinetike, transporta i citotoksičnosti komponenti.²³⁵ Hidrofilni kompleksi se zbog svoje rastvorljivosti u polarnim rastvaračima slabije transportuju kroz lipidni dvosloj, pa novosintetisani kompleksi platine i rutenijuma često imaju lipofilne ligande. Međutim, u tom slučaju se javlja problem sa slabom rastvorljivošću ovih komponenti u vodi i većom destruktivnošću prema crvenim krvnim zrnima. Naime, lipofilne komponente, koje imaju veći afinitet prema lipidnom dvosloju, mogu da destabilizuju ćelijsku membranu, što se meri stepenom hemolize.^{236,237} Procedura izolovanja eritrocita iz pune krvi i merenja hemolize u procentima je detaljno opisana u odeljku 5.2. Testiran je uticaj kompleksa *cis*-Pt(NH₃)₂Cl₂, [PtCl₄(*bipy*)], [PtCl₂(*en*)], [RuCl₂(*bipy*)₂]Cl i [RuCl₂(*en*)₂]Cl na hemolizu eritrocita u zavisnosti od njihove koncentracije, kao i vremena inkubiranja i dobijeni rezultati su prikazani na slici 18.

Na slici 18 prikazani su rezultati hemolize eritrocita u procentima liziranih ćelija nakon 4 sata inkubacije u zavisnosti od koncentracije kompleksa (levo) i izdvojeni su

rezultati hemolize posle 4 sata inkubacije sa kompleksima pri najvišoj koncentraciji (desno). Najveći efekat na hemolizu eritrocita imaju kompleksi rutenijuma, $[\text{RuCl}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$ i $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ sa 7.05 % i 3.57 % liziranosti eritrocita nakon 4 sata inkubacije (koncentracija kompleksa 1 mM) u odnosu na kontrolu. Kompleksi platine, pri istoj koncentraciji i za isto vreme inkubacije imaju manji efekat na hemolizu. $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$ lizira 1.77 %, $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ lizira 0.79 % i cisplatina lizira samo 0.64 % eritrocita više nego kontrola (izotonični pufer, pH=7,4). Ukoliko se prati zavisnost hemolize od koncentracije kompleksa metala sa kojima su eritrociti inkubirani (slika 18, levo), lako je uočljiva korelacija izmjeđu povećanja koncentracije kompleksa rutenijuma i većeg procenta hemolize. Osim za kompleks platine sa etilendiaminskim ligandom, ne postoji jasna koncentraciona zavisnost hemolize eritrocita u slučaju inkubiranja eritrocita sa $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ i *cis*-platinom.



Slika 18. Uticaj kompleksa $[\text{RuCl}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$, $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$, $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$, $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ i $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ na hemolizu eritrocita. Dijagram levo predstavlja hemolizu eritrocita posle 4 sata inkubacije u zavisnosti od koncentracije kompleksa, dok su na desnom dijagramu prikazani rezultati hemolize (u procentima) nakon 4 sata inkubacije sa najvišom koncentracijom kompleksa (1 mM).

Poredeći rezultate uticaja kompleksa metala na hemolizu eritrocita i rezultate dobijene za lipofilnost kompleksa, može se zaključiti da postoji jasna korelacija između

afiniteta kompleksa prema lipidima i njihovog uticaja na stabilnost membrane crvenih krvnih zrnaca. *Cis*-platina, kao najhidrofilniji od testiranih kompleksa, pokazuje najmanji uticaj na destabilizaciju membrane odnosno hemolizu eritrocita. Kompleksi sa dva *en* ili *bipy* liganda, veće lipofilnosti imaju jači efekat na destabilizaciju eritrocita, što je u skladu sa podacima u literaturi.^{237,236} Međutim, kompleksi platine i rutenijuma sa etilendiaminskim ligandom imaju oko dva puta veći efekat na destabilizaciju membrane eritrocita, nego kompleksi sa istim metalnim centrom i bipyridinskim ligandima, što nije u skladu sa njihovim eksperimentalno određenim lipofilnostima. Ovakav rezultat implicira da u interakciji kompleksa metala sa membranama eritrocita, lipofilnost kompleksa ima važnu ulogu, ali nije i jedini parametar koji utiče na destabilizaciju eritrocita.

Pored gore navedenih rezultata, veoma je važno kritički razmotriti samu metodu i njen uticaj na rezultate. Naime, procenat liziranih eritrocita se u ovoj metodi određuje posredno, merenjem apsorbancije oslobođenog hemoglobina na talasnoj dužini njegovog apsorcionog maksimuma. U tom smislu je važno uzeti u obzir i moguću interakciju i vezivanje kompleksa platine za hemoglobin, što bi moglo da dovede do toga da su merene vrednosti apsorbancije i odgovarajući stepeni hemolize manji nego što je to zapravo slučaj.²³⁸ Eksperiment u kojem je meren stepen hemolize eritrocita najbliže odgovara prirodnim, fiziološkim uslovima u kojima ispitivana komponenta interaguje sa ćelijama u organizmu nakon njene administracije.

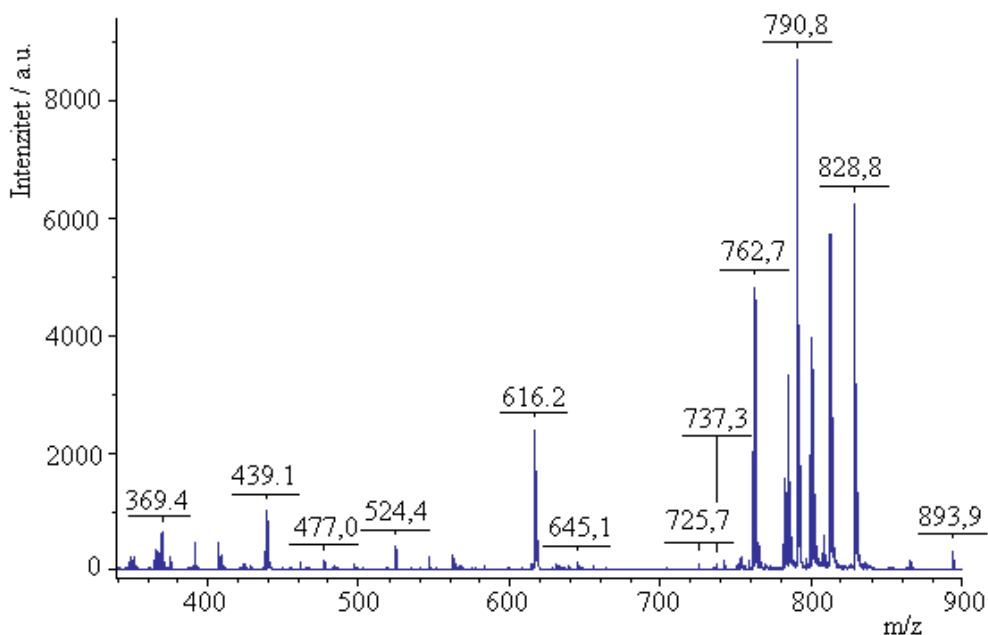
Kompleksi platine i rutenijuma mogu da interaguju sa lipidima ili sa proteinima u ćelijskoj membrani eritrocita. Kako bi se ustanovilo da li pri interakciji sa kompleksima dolazi do promene sastava lipida u membrani eritrocita, lipidi su izolovani iz tretiranih i netretiranih eritrocita i njihov sastav je ispitivan kombinacijom metoda MALDI TOF MS i HPTLC.

6.2.1. Interakcija kompleksa sa smešom lipida iz eritrocita

Kako bi se ispitao uticaj kompleksa metala isključivo na lipidni deo eritrocita, najpre su lipidi izolovani iz membrane eritrocita, a zatim inkubirani sa kompleksima platine i rutenijuma sa bipyridinskim ligandima, koji su pokazali najveći afinitet prema

lipidima. Nakon inkubiranja, lipidi su najpre razdvojeni metodom HPTLC, analizirani MALDI-TOF masenom spektrometrijom, a zatim su odgovarajući spektri upoređeni. Identifikacija signala iz masenih spektara prikazanih na data je u tabeli 5. Poređeni su maseni spektri lipida i lipida inkubiranih sa $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$, po redosledu po kojem se smeša razdvajala na HPTLC pločici.

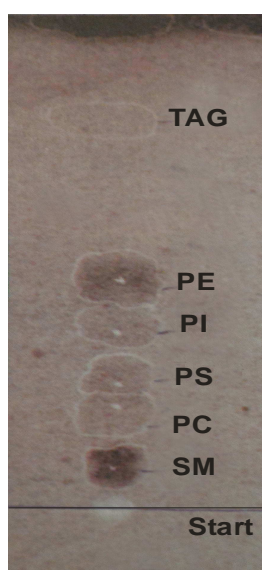
Lipidi izolovani iz eritrocita predstavljaju složenu smešu, koju je pre analize MALDI-TOF spektrometrijom potrebno razdvojiti na klase. Naime, određene klase lipida u smeši onemogućavaju detekciju i analizu ostalih klasa, kao što je već ranije eksperimentalno pokazano.²³⁹ Na Slici 19 je prikazan MALDI TOF maseni spektar smeše lipida izolovane iz eritrocita, snimljen u pozitivnom reflektornom modu. Maseni spektar ovako složene smeše lipida omogućava detekciju samo nekoliko klasa lipida istovremeno.



Slika 19. MALDI TOF maseni spektar smeše lipida izolovane iz eritrocita po proceduri detaljno opisanoj u odeljku 6.3.1. Spektar je snimljen u pozitivnom reflektornom modu uz korišćenje DHB matrice. Na masenom spektru se može uočiti da dominiraju adukti fosfatidil-holina (m/z vrednosti u rang 733-809), koji najverovatnije onemogućavaju analizu drugih klasa lipida pristunih u smeši.

Iako se, bez prethodnog razdvajanja, ne može precizno odrediti sastav smeše, na osnovu karakterističnih m/z regiona u kojima se javljaju signali u MALDI TOF masenom spektru, mogu se identifikovati određene klase lipida.²⁴⁰ U smeši su najzastupljeniji adukti fosfatidil-holina (m/z vrednosti u rangu 733-809), sfingomijelina (m/z u rangu 702-750) i triacil-glicerola (m/z u rangu 806-950), kao i nešto manje lizo-fosfolipida (m/z u rangu 495-543). Ovakav vid analize se ne može koristiti za kvantifikaciju pojedinih klasa lipida, niti za ispitivanje interakcije kompleksa metala i smeše lipida iz eritrocita, jer je moguće da su joni i adukti nekih klasa lipida sasvim ilidelimično supresovani jonima fosfatidil-holina u istom spektru.²³⁹

Razdvajanje smeše lipida na pojedinačne klase izvedeno je metodom tankoslojne hromatografije visokih performansi, kako je to opisano u odeljku 5.5. Rezultat razdvajanja (HPTLC pločica sa razdvojenim klasama lipida) je prikazan na Slici 20.



Slika 20. HPTLC pločica sa razdvojenim klasama lipida iz smeše lipida izolovane iz eritrocita. Skraćenice označavaju sfingomijelin (SM), fosfatidil-holin (PC), fosfatidil-serin (PS), fosfatidil-inozitol (PI), fosfatidil-etanolamin (PE) i triacil-glicerol (TAG).

Tek pri razdvajanju smeše lipida na klase, uočava se klasa fosfatidil-serina, koja se teško detektuje u pozitivnom reflektornom modu u prisustvu drugih fosfolipida. Za

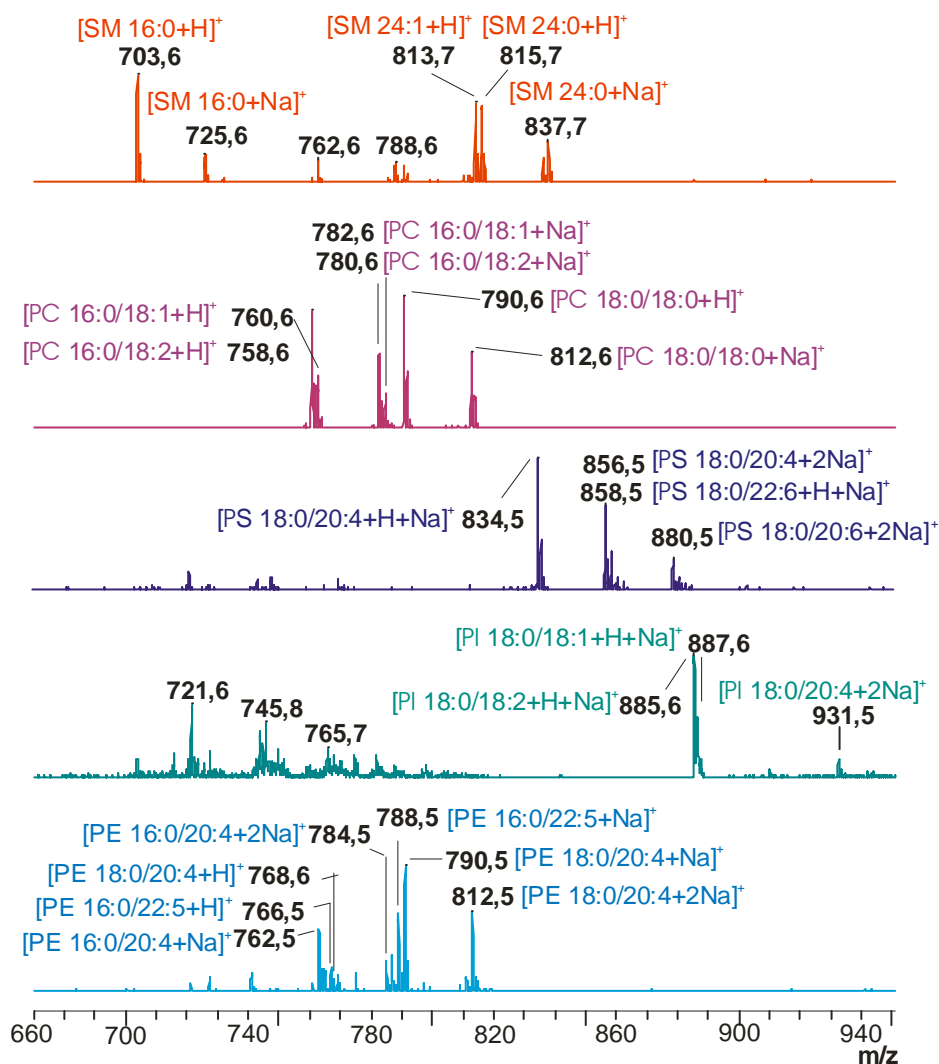
prikazano razdvajanje klasa lipida pri zadatim eksperimentalnim uslovima važi pravilo da lipidi sa dužim masno-kiselinskim ostatkom imaju veći afinitet prema mobilnoj fazi, prelaze duži put na HPTLC pločici i bolje se razdvajaju od lipida sa kraćim masno-kiselinskim ostacima.²⁴¹ Ukoliko su prisutni u dovoljno visokoj koncentraciji, lizolipidi takođe sporije putuju u odnosu na odgovarajuće lipide i prelaze znatno manji put na HPTLC pločici.²⁴¹ Na Slici 20 je prikazana HPTLC pločica, na kojoj, nakon razdvajanja fosfolipida na klase nisu uočeni lizolipidi. Identifikacija razdvojenih klasa lipida je potvrđena MALDI-TOF masenom spektrometrijom. U ovom slučaju, HPTLC pločica je zalepljena za specijalni prototip MALDI-TOF pločice za kombinovanje HPTLC i MALDI-TOF masene spektrometrije, obeležena su mesta sa klasama lipidima, nanešena je DHB matrica i direktno su bez ekstrakcije i gubitka uzorka, analizirani spektri klasa lipida. Za svaku od klasa lipida, menjani su uslovi snimanja na MALDI-TOF spektrometru (m/z opseg, jačina lasera), radi bolje detekcije. Maseni spektri pojedinačnih klasa lipida i asignacija odgovarajućih signala je data na Slici 21.

Matrica DHB daje većinu signala u masenom spektru do oko $m/z = 400$, pa nije prikazan spektar matrice, odnosno, spektri su snimani u opsegu iznad $m/z = 400$, pošto se najveći broj lipida od interesa nalazi u ovom regionu. Pri kombinovanju ove dve tehnike, pločica koja se koristi nije izdubljena i ne postoje označena mesta ili bunarčići za uzorke. Međutim, ivice pločice su obeležene brojevima i slovima, pa je svaka od klasa lipida koje su razdvojene na HPTLC pločici bila određena jednim slovom i brojem ili nizom brojeva (dva ili tri broja ukoliko je razdvajanje slabo).

Na taj način je omogućeno da se snimaju maseni spektri po zamišljenoj liniji koja spaja razdvojene klase lipida, od mesta obeleženog kao Start na HPTLC pločici do linije fronta mobilne faze. MALDI-TOF maseni spektri na Slici 21 su poređani po redosledu idući od početka do kraja HPTLC pločice.

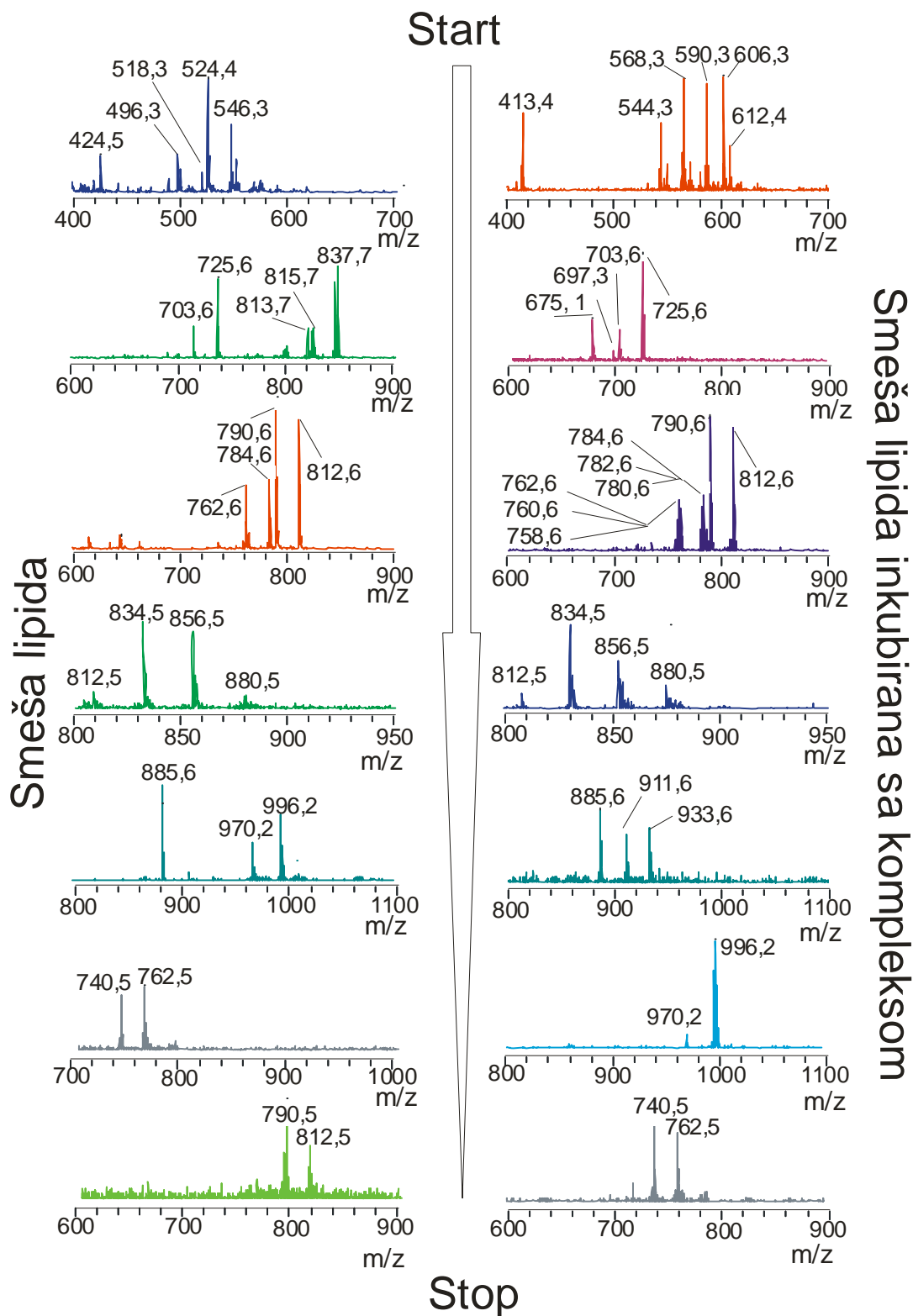
Ukoliko se analizira prva detektovana klasa lipida na pločici i snime uzastopno tri spektra duž detektovane vrste, može se dokazati da se u prvom spektru javljaju lipidi sa kraćim masno-kiselinskim ostacima, a u drugom i trećem masenom spektru lipidi sa dućim masno-kiselinskim ostacima. Isti je slučaj i sa dve različite klase lipida koje su suviše blizu jedna druge. Iako se na HPTLC pločici ne vidi da se dve klase preklapaju, u masenom spektru se detektuju obe klase lipida. Na primer, na slici 21 su u masenom

spektre fosfatidil-inozitola detektovani i signali koji potiču od lipida koji pripadaju klasi fosfatidil-etanolamina.



Slika 21. MALDI-TOF maseni spektar HPTLC pločice na kojoj je razdvojena smeša lipida izolovana iz eritrocita. Maseni spektri su poređani po redosledu po kojem su snimani idući od početka prema kraju pločice.

Među masenim spektrima smeše lipida i lipida inkubiranih sa kompleksima nema većih razlika (slika 22). Identifikovane su iste klase lipida kao i ranije, a neznatne razlike u spektrima potiču zbog neznatno drugačijeg razdvajanja lipida u prisustvu i bez prisustva kompleksa.



Slika 22. MALDI-TOF maseni spektri smeše lipida i smeše lipida inkubirane sa kompleksom $[PtCl_4(bipy)]$, koji su razdvajani pri istim uslovima na HPTLC pločici. Oznake "start" i "stop" označavaju smer kretanja klasa lipida na pločici.

U tabeli 5 je većina signala lipida identifikovana, osim dva koji su obeleženi zvezdicom. Međutim, zbog izotopske strukture i poređenja ovih signala sa signalima iz masenog spektra kompleksa potvrđeno je da to nisu signali koji potiču od kompleksa metala ili potencijalnog adukta metala i lipida. Najverovatnije je da ovi signali pripadaju lizo-fosfatidiletanolaminima, koji se na HPTLC pločici pojavljuju pre PI, a u uslovima MALDI-TOF masene spektrometrije LPE mogu formirati dimere.^{241,242}

Tabela 5. Identitet signala lipida iz masenih spektara na slici 22.

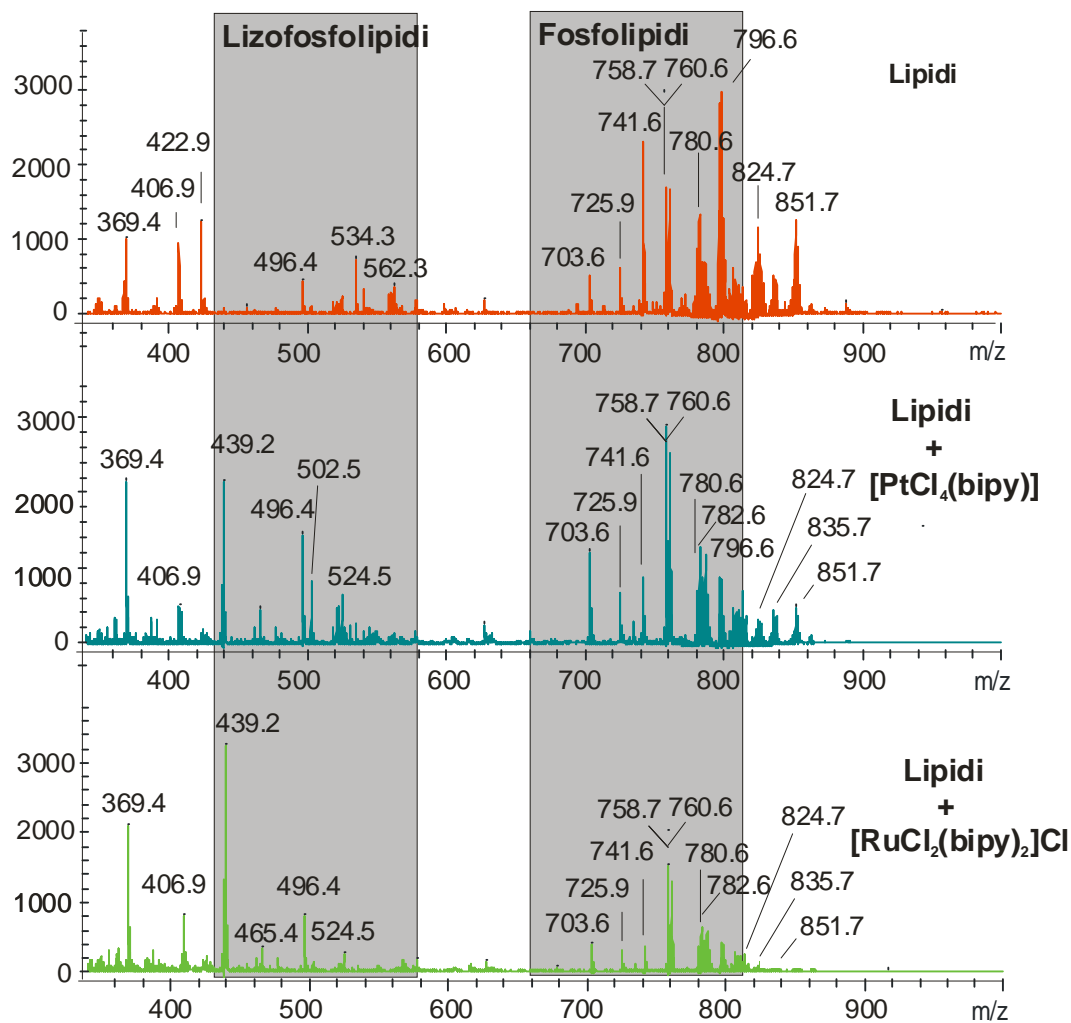
m/z	Identifikacija signala lipida na slici 22.	
496,3	[LPC 16:0 + H ⁺] ⁺	LPC
518,3	[LPC 16:0 + Na ⁺] ⁺	
524,4	[LPC 18:0 + H ⁺] ⁺	
544,3	[LPC 18:1 + Na ⁺] ⁺	
546,3	[LPC 18:0 + Na ⁺] ⁺	
568,3	[LPC 22:6 + H ⁺] ⁺	
590,3	[LPC 22:6 + Na ⁺] ⁺	
606,3	[LPC 24:1 + H ⁺] ⁺	
612,4	[LPC 24:4 + H ⁺] ⁺	SM
675,1	[SM 14:0+ H ⁺] ⁺	
697,3	[SM 14:0 + Na ⁺] ⁺	
703,6	[SM 16:0+ H ⁺] ⁺	
725,9	[SM 16:0 + Na ⁺] ⁺	
813,7	[SM 24:1 + H ⁺] ⁺	
815,7	[SM 24:0 + H ⁺] ⁺	
837,7	[SM 24:0+ Na ⁺] ⁺	PC
758,6	[PC 16:0/18:2 + H ⁺] ⁺	
760,6	[PC 16:0/18:1 + H ⁺] ⁺	
762,6	[PC 16:0/18:0 + H ⁺] ⁺	
780,6	[PC 16:0/18:2 + Na ⁺] ⁺	
782,6	[PC 16:0/18:1 + Na ⁺] ⁺	
784,6	[PC 16:0/18:0 + Na ⁺] ⁺	
790,6	[PC 18:0/18:0 + H ⁺] ⁺	
812,6	[PC 18:0/18:0 + Na ⁺] ⁺	PS
812,5	[PS 18:0/18:1 + H ⁺ + Na ⁺] ⁺	
834,5	[PS 18:0/18:1 + 2Na ⁺] ⁺	
856,5	[PS 18:0/20:4 + 2Na ⁺] ⁺	
880,5	[PS 18:0/22:6 + 2Na ⁺] ⁺	PI
885,6	[PI 18:0/18:2 + H ⁺ + Na ⁺] ⁺	
911,6	[PI 18:0/20:3 + H ⁺ + Na ⁺] ⁺	
933,6	[PI 18:0/20:3 + 2Na ⁺] ⁺	
970,2	*	PE
996,2	*	
740,5	[PE 16:0/20:4 + H ⁺] ⁺	

762,5	[PE 16:0/20:4 + Na ⁺] ⁺	
970,2	*	
996,2	*	
740,5	[PE 16:0/20:4 + H ⁺] ⁺	PE
762,5	[PE 16:0/20:4 + Na ⁺] ⁺	
790,5	[PE 18:0/20:4 + Na ⁺] ⁺	
812,5	[PE 18:0/20:4 + 2Na ⁺] ⁺	

6.2.2. Ispitivanje lipidnog sastava membrane eritrocita, pre i posle inkubiranja sa kompleksima

Lipidi izolovani iz eritrocita koji su prethodno inkubirani sa kompleksima metala analizirani su na prethodno opisan način (odjeljak 6.2.1.). U ovom slučaju, kompleksi metala mogu interagovati i sa drugim komponentama u membrani eritrocita i poređenja radi, na slici 23 data su tri masena spektra lipida: izolovanih iz netretiranih eritrocita i eritrocita prethodno inkubiranih sa [PtCl₄(bipy)] i sa [RuCl₂(bipy)₂]Cl.

Kao i u prethodnom slučaju, bez razdvajanja lipida po klasama metodom tankoslojne hromatografije, nije moguće doneti zaključak o interakciji kompleksa metala sa pojedinačnim klasama lipida. Na slici 23 se poređenjem masenih spektara može uočiti da lipidi izolovani iz netretiranih eritrocita u masenom spektru daju manji broj signala slabog intenziteta u m/z regionu karakterističnom za lizolipide. S druge strane, lipidi izolovani iz eritrocita inkubiranih sa kompleksima metala, imaju manje signala koji potiču od fosfolipida i povećan broj signala u regionu lizolipida. Ovakav rezultat ukazuje na to da kompleksi metala interaguju sa ćelijskom membranom eritrocita i da je jedan od rezultata te interakcije liziranje fosfolipida. Međutim, nije jasno da li je promena strukture fosfolipida posledica interakcije kompleksa metala sa proteinima ili fosfolipidima u ćelijskoj membrani. Zbog nemogućnosti da se u komplikovanoj smeši lipida (slika 23) identifikuju sve klase lipida i da bi se isključila mogućnost liziranja fosfolipida kao posledica interakcije kompleksa platine i rutenijuma sa drugim komponentama membrane, ili nekom komponentom koja je ko-ekstrahovana sa lipidima, u narednom delu disertacije kompleksi su inkubirani sa pojedinačnim komercijalno dostupnim klasama fosfolipida, formiranim u lipozome.



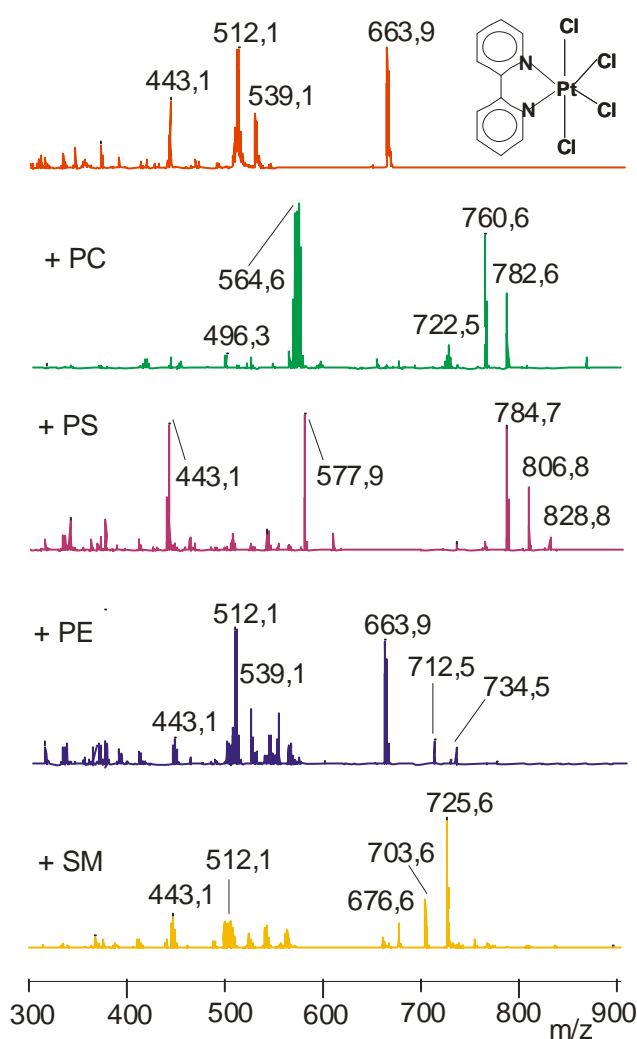
Slika 23. MALDI-TOF maseni spektar smeše lipida izolovanih iz membrane netretiranih eritrocita i eritrocita inkubiranih sa kompleksima [PtCl₄(bipy)] i [RuCl₂(bipy)₂]Cl na 37 °C tri sata pre ekstrakcije.

6.3. Interakcija kompleksa sa pojedinačnim klasama lipida

Svi kompleksi platine i rutenijuma su inkubirani sa čistim, komercijalno dostupnim klasama lipida, fosfatidil-holinom, fosfatidil-serinom, fosfatidil-etanolaminom i sfingomijelinom. Cilj eksperimenta je bio da se ustanovi da li kompleksi platine i rutenijuma formiraju adukte sa klasama lipida i da li ta interakcija

može dovesti do njihovog liziranja. Uzorci su inkubirani 2 sata, 24 sata i 48 sati, a zatim analizirani MALDI TOF masenom spektrometrijom i tankoslojnom hromatografijom.

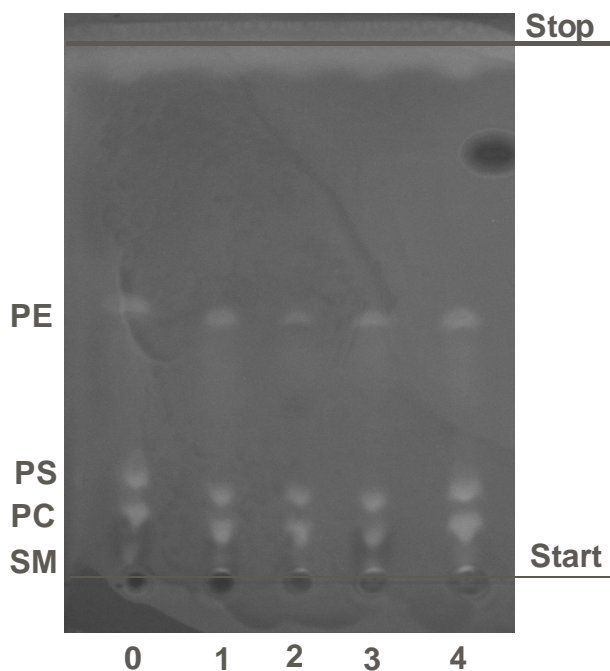
U MALDI-TOF masenim spektrima inkubiranih klasa lipida sa kompleksima metala, ni u jednom slučaju nisu detektovani novi signali, koji ne potiču od samih lipida ili kompleksa metala. Na slici 24 su prikazani i upoređeni MALDI TOF maseni spektri samo jednog od kompleksa, $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ inkubiranog sa fosfatidil-holinom, fosfatidil-serinom, fosfatidil-etanolaminom ili sfingomijelinom.



Slika 24. MALDI-TOF maseni spektri samog kompleksa $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ i istog kompleksa inkubiranog sa fosfatidil-holinom, fosfatidil-serinom, fosfatidil-etanolaminom i sfingomijelinom.

Na prvom spektru na slici 24 (sam kompleks) uočavaju se karakteristični spektri za $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$. Tri najintenzivnija signala sa izraženom izotopskom strukturom (karakterističnom za komplekse metala) imaju m/z vrednosti 512,1 (protonovani adukt kompleksa i molekul vode), 530,1 (protonovani adukt kompleksa i dva molekula vode) i 663,9 (protonovani adukt kompleksa sa 3 bupiridinska liganda).²⁴⁴ U drugom spektru (kompleks inkubiran sa fosfatidil-holinom) se osim signala koji potiču od protonovanog i natrijumovog adukta PC 16:0/18:1 ($m/z=760,6$ i $m/z=782,6$ respektivno), uočavaju i signali kompleksa metala sa izotopskom strukturom oko $m/z=564,4$ i $m/z=722,1$. Iako se ovi signali ne pojavljuju u prvom spektru samog kompleksa, oni ne potiču od direktne interakcije sa fosfatidil-holinom. Oba signala pripadaju aduktima platine sa tri bupiridinska liganda.²⁴⁴ Signali koji potiču od fosfatidil-serina na trećem spektru sa vrednostima $m/z=784,7$, $m/z=806,8$ i $m/z=828,8$ pripadaju protonovanim i natrijumovim aduktima: $[\text{PS } 16:0/18:1+\text{H}^++\text{Na}^+]^+$, $[\text{PS } 16:0/18:1+2\text{Na}^+]^+$ i $[\text{PS } 18:0/20:1+\text{H}^++\text{Na}^+]^+$. U četvrtom spektru (kompleks sa fosfatidil-etanolaminom) signali na $m/z=712,5$ i $m/z=734,5$ pripadaju protonovanom i natrijumovom aduktu PE 16:0/18:4, dok signali sa $m/z=676,6$, $m/z=703,6$ i $m/z=725,6$ na petom spektru (kompleks inkubiran sa sfingomijelinom) potiču od protonovanog adukta SM 14:0 i protonovanog i natrijumovog adukta SM 16:0, respektivno. Nezavisno od vremena inkubacije i opsega u kojem su snimani spektri, nisu uočeni novi signali koji bi poticali od adukta kompleksa i neke od klasa lipida. Sličan rezultat je dobijen i pri inkubaciji lipida sa drugim kompleksima. Klasa lipida za koju je najviše očekivano da će graditi adukte sa kompleksima je fosfatidil-serin, zbog podataka u literaturi o elektrostatičkoj interakciji ovih komponenti. Međutim, nepostojanje novih signala u prikazanim masenim spektrima, ne isključuje ovu interakciju. Moguće je da su ovi adukti isuviše nestabilni i ne mogu stići do detektora. U slučaju ispitivanja kompleksa metala sa drugim klasama lipida, značajno je da nisu detektovane povećane količine odgovarajućih lizo-fosfolipida. Ostali kompleksi platine i rutenijuma su dali slične rezultate. Iako se ne može sa sigurnošću isključiti mogućnost da kompleksi formiraju adukte sa fosfatidil-serinom (zbog slabe i reverzibilne veze koju možda nije moguće detektovati MALDI-TOF masenom spektrometrijom), može se zaključiti da kompleksi metala ne podstiču liziranje pojedinačnih klasa lipida. Slaba interakcija zasnovana na Van der Valsovim silama je još jednom potvrđena tankoslojnom hromatografijom, gde

su svi korišćeni kompleksi uticali na slabije razdvajanje ("kašnjenje" pojedinačnih klasa) smeše čistih klasa lipida. Razlike u referentnim vrednostima su ipak minimalne i neće biti predmet dalje diskusije u ovoj disertaciji (slika 25).



Slika 25. HPTLC pločica na kojoj je razdvajana smeša lipida (sfingomijelin SM 16:0, fosfatidil-holin PC 16:0/18:1, fosfatidil-serin PS 16:0/18:1 i fosfatidil-etanolamin Pe16:0/16:0) bez prisustva kompleksa metala (0) i prethodno inkubirana sa kompleksima $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ (1), $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ (2), $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$ (3) i $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ (4).

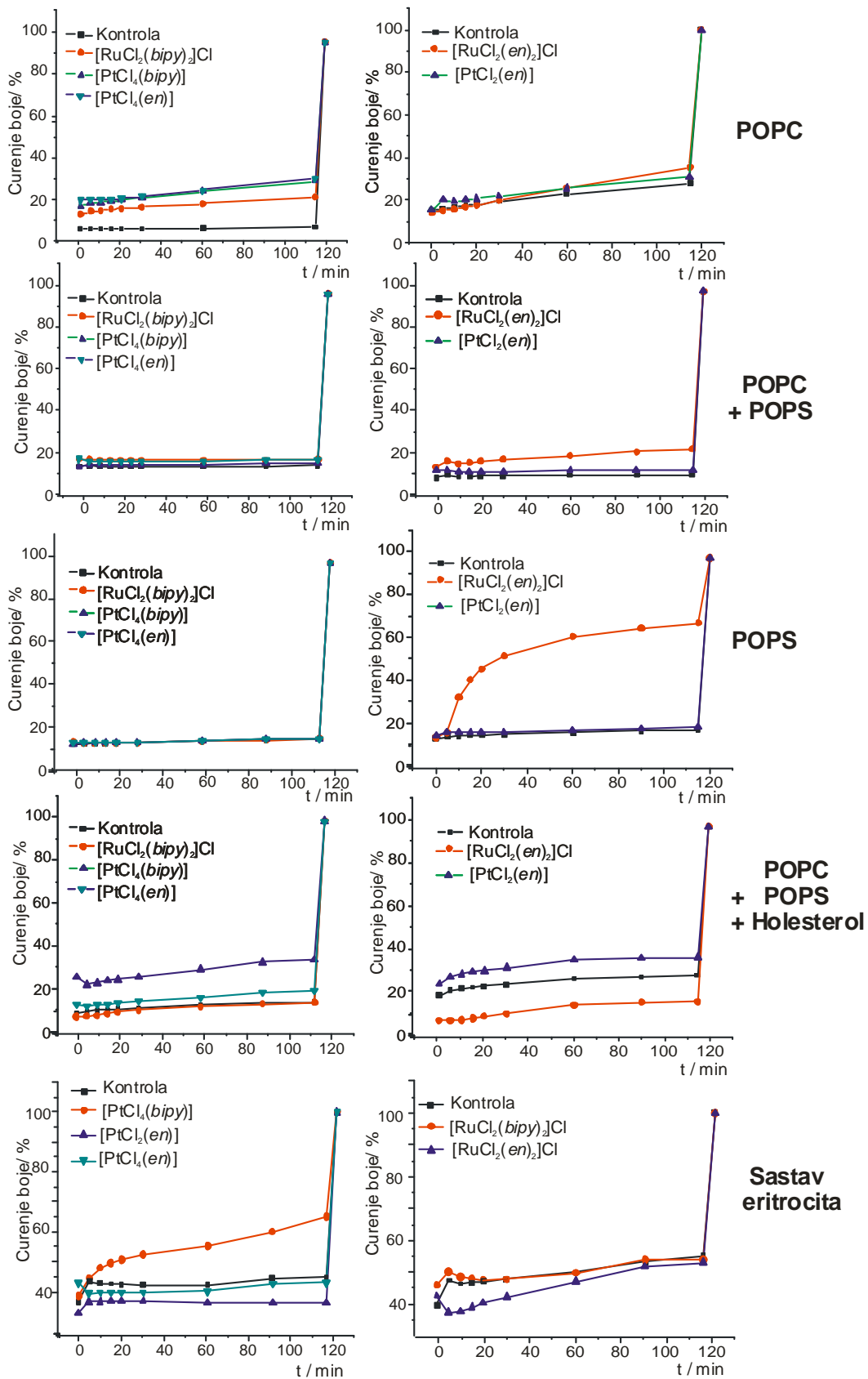
6.4. Interakcija kompleksa sa lipozomima različitog sastava

U ovom delu disertacije, uticaj kompleksa platine i rutenijuma na stabilnost membrane je ispitivan sa lipozomima kontrolisanog sastava. Kao što je navedeno u prethodnom delu, povod za ove eksperimente je bio da se isključi mogućnost destabilizacije membrane kompleksima metala zbog interakcije sa drugim (nelipidnim) komponentama u membrani eritrocita. Detaljna procedura pripreme lipozoma i korišćene metode je opisana u Eksperimentalnom delu (5.4.). Ukratko, u lipozome kontrolisanog sastava i veličine (100 nm) je inkorporirana fluorescentna boja, čija se

brzina izlaska ("curenja") iz lipozoma prati sa i bez prisustva kompleksa metala. Efekat kompleksa metala na stabilnost membrana je izražen u procentima, pri čemu je kao 100 % "curenja boje" ili destabilizacije lipozoma, uzet intenzitet fluorescencije posle dodavanja deterženta Triton-X. Napravljeno je 5 serija lipozoma sa različitim lipidnim sastavom: POPC; POPS; POPC + POPS; POPC + POPS + Holesterol i od smeše najzastupljenijih klasa lipida u ćelijskoj membrani eritrocita (odjeljak 5.4.). Intenzitet fluorescencije kontrole i lipozoma inkubiranih sa $[\text{RuCl}_2(en)_2]\text{Cl}$, $[\text{RuCl}_2(bipy)_2]\text{Cl}$, $[\text{PtCl}_4(bipy)]$, i $[\text{PtCl}_4(en)]$ je meren u kontinuitetu 120 min, a rezultati liziranja eritrocita u procentima u zavisnosti od vremena su prikazani na slici 26. Po dva grafika su prikazana za svaki sastav lizolipida iz objektivnih razloga. Naime, uzorak kontrole je sniman istovremeno sa uzorcima inkubiranim sa kompleksima metala, a u spektrofotometar ima mogućnost za simultano snimanje 4 uzorka (lipozomi kontrole i lipozomi sa tri različita kompleksa). Pošto snimanje fluorescencije traje dva sata, za druga dva kompleksa se mora koristiti nova kontrola, kako bi se isključio uticaj vremena, odnosno spontanog curenja fluorescentne boje iz lipozoma.

Nagla promena intenziteta fluorescencije (izazvana destabilizacijom lipozoma i curenjem fluorescentne boje) u 120-om minutu je posledica dodavanja deterženta, koji u potpunosti razori strukturu lipozoma.

Iz prikazanih rezultata, može se zaključiti da su lipozomi građeni od POPC relativno stabilni i testirani kompleksi metala imaju neznatan uticaj na stabilnost lipozoma. Stabilnost lipozoma se drastično menja nakon dodavanja POPS u sastav lipozoma. U tom slučaju, uticaj kompleksa na njihovu stabilnost se pojačava. Kompleks metala koji se izdvaja po svom efektu na stabilnost lipozoma je $[\text{RuCl}_2(en)_2]\text{Cl}$. Ovaj efekat je još uočljiviji kada je kompleks rutenijuma inkubiran sa lipozomima sastavljenih isključivo od POPS: za 2 sata inkubacije sa POPS lipozomima, $[\text{RuCl}_2(en)_2]\text{Cl}$ lizira čak više od 50% lipozoma u odnosu na kontrolni uzorak. Dodavanjem holesterola se fluidnost i destabilizacija kontrolnih lipozoma povećava i efekat pojedinačnih kompleksa je zanemarljiv.



Slika 26. Zavisnost stepena destabilizacije lipozoma ili curenja inkorporirane fluorescentne boje (u %) od vremena za različite komplekse metala i različit sastav lipozoma.

U slučaju lipozoma sastavljenih od najzastupljenijih lipida u membrani eritrocita, nešto veći uticaj na stabilnost kompleksa ima $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$. Ukupno naelektrisanje POPC kompleksa je neutralno i slab uticaj kompleksa metala na stabilnost POPC lipozoma se može objasniti samo slabom interakcijom zasnovanom na lipofilnosti ovih komponenti. U literaturi su objavljeni slični rezultati sa komplekse cinka sa velikim lipofilnim ligandima, koji pokazuju jaku asocijaciju sa cviterjonskim membranama, karakterističnim i za zdrave ćelije sisara.²²⁸

Međutim, POPS je fosfolipid sa anjonskom polarnom glavom i očekivana je jača interakcija katjona metala ili molekula sa POPS lipozomima.²⁴³ Pretpostavlja se da je kompleks $[\text{RuCl}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$ ispoljio najveći efekat na hemolizu eritrocita i destabilizaciju POPS lipozoma zbog svog naelektrisanja i geometrije. Ova osobina je izuzetno korisna u dizajniranju kompleksa čija je uloga selektivno nekovalentno oslobađanje inkorporiranih komponenti iz lipozoma.²²⁸ Smanjivanjem procenta POPS u lipozomima se i efekat kompleksa na destabilizaciju lipozoma smanjuje. Povećavanjem procenta holesterola u sastavu lipozoma i dodavanjem drugih klasa lipida (naročito onih sa nezasićenim masnim kiselinama), povećava se fluidnost i nestabilnost membrane, a samim tim najizraženiji efekat u tom slučaju imaju kompleksi sa bipiridinskim ligandima, koji se najbolje rastvaraju u lipidima. Bez obzira na jačinu efekta kompleksa metala na stabilnost lipozoma, interakcija se uglavnom zasniva na slabim Van der Valsovim silama i može se uspostaviti korelacija sa lipofilnošću kompleksa, osim u slučaju lipozoma građenih od POPS, kada su uključene i elektrostatičke interakcije.

Ispitivanje interakcije kompleksa metala na stabilnost lipozoma i organizaciju lipida u membrani je značajna zbog daljih eksperimenata u kojima se lipidi koriste kao supstrat za ispitivanje aktivnosti fosfolipaze A_2 i ispitivanje uticaja kompleksa metala na aktivnost ovog enzima. Naime, specifičnost ovog enzima je to što je on rastvoran u vodi, dok je njegov supstrat (lipid) hidrofoban, pa brzina reakcije i katalitička moć enzima zavisi od dostupne površine za reakciju. U tom smislu je važno obezbediti reproducibilne uslove i konstantnu reakcionu površinu organizovanjem fosfolipida u lipozome isključivanjem mogućnosti da kompleksi metala čiji se uticaj na enzim ispituje, utiču na organizaciju lipida. Dakle, kao supstrat se u eksperimentima ispitivanja aktivnosti fosfolipaze u prisustvu kompleksa metala mogu koristiti čiste klase POPC i najverovatnije nekog drugog elektroneutralnog fosfolipida ili prirodne

smeše fosfolipida sa najvećim procentom elektroneutralnih (cviterjonskih) fosfolipida, kao što je smeša lipida izolovana iz žumanceta kokošijeg jajeta, koja se u najvećem procentu sastoji od lecitina.

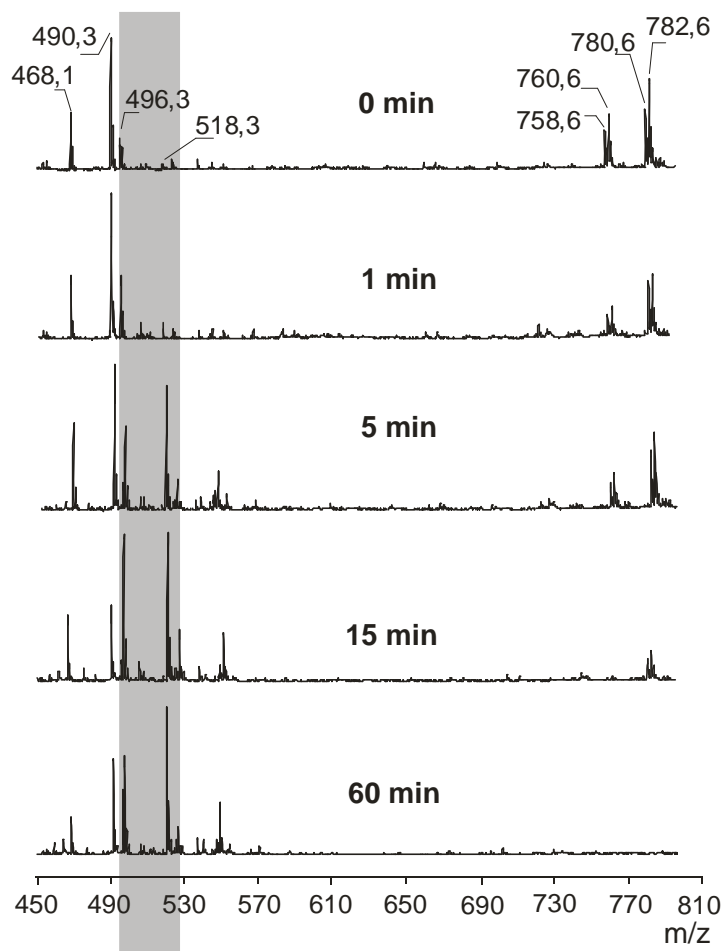
6.5. Određivanje aktivnosti fosfolipaze A₂ i ispitivanje uticaja kompleksa na aktivnost fosfolipaze A₂

Pre nego što je ispitan uticaj kompleksa prelaznih metala na aktivnost PLA₂, bilo je neophodno da se uspostavi odgovarajuća metoda u kojoj će uslovi biti što je moguće približniji fiziološkim. Pošto za analizu lipida/fosfolipida MALDI TOF MS-om nije neophodna bilo kakva modifikacija supstrata ili proizvoda, ova metoda je izabrana za određivanje uticaja kompleksa na aktivnost enzima. Fosfolipaza A₂, kao što je već objašnjeno, katalizuje hidrolizu estarske veze na *sn*-2 poziciji na glicerolnoj osnovi fosfolipida, pri čemu se oslobađa odgovarajući lizo-fosfolipid i masna kiselina. Klasa fosfolipida koja se koristi u eksperimentima je fosfatidil-holin, jer je u eksperimentima opisanim u prethodnom delu, u kojima je ispitivana interakcija kompleksa metala i lipida, pokazano da kompleksi metala neznatno utiču na stabilnost ovih lipozoma (za razliku od PS) i ne doprinose stvaranju lizo-fosfatidilholina, kada su inkubirani sa čistim klasama fosfatidil-holina (za razliku od eritrocita). S obzirom na to da se ovaj pristup ne koristi rutinski za određivanje kinetičkih parametara enzimskih reakcija, bilo je prvo neophodno ispitati mogućnosti upotrebe MALDI TOF MS u tu svrhu, što će biti opisano u narednom delu teze.

6.5.1. Određivanje aktivnosti fosfolipaze A₂

Reakcija hidrolize estarske veze na *sn*-2 poziciji glicerolnog ostatka fosfolipida katalizovana fosfolipazom A₂ se može pratiti posredno, merenjem koncentracije fosfatidil-holina, koja se smanjuje sa vremenom ili koncentracije lizo-fosfolipida, koja se sa vremenom povećava. Na slici 27 su prikazani MALDI TOF maseni spektri fosfatidil-holina PC 16:0/18:2 i PC 16:0/18:1 inkubiranog sa fosfolipazom A₂ i sa

dodatim unutrašnjim standardom, LPC 14:0. Priprema eksperimenta i koncentracije svake od komponenti je detaljno opisana u odeljku 5.6.4. u ovoj disertaciji.

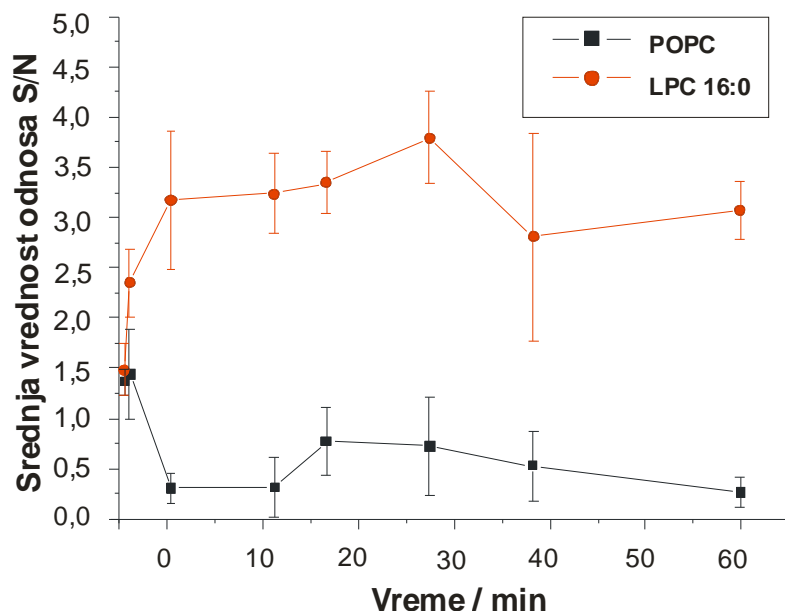


Slika 27. MALDI TOF maseni spektri fosfatidil-holina PC 16:0/18:2 i PC 16:0/18:1 inkubiranog sa fosfolipazom A₂ i sa dodatim unutrašnjim standardom, LPC 14:0. Signali na m/z=758,6 i m/z=760,6 potiču od protonovanih adukata PC 16:0/18:2 i PC 16:0/18:1, dok signali na vrednostima m/z=780,6 i m/z=782,6 pripadaju natrijumovim aduktima ovih lipida, respektivno. Unutrašnji standard LPC 14:0 daje signale istog intenziteta na m/z vrednostima 468,1 i 490,3. Produkt reakcije, LPC 16:0 (m/z=496,3 i m/z=518,3 za protonovani i natrijumov adukt, respektivno) je označen sivim pravougaonikom na svim spektrima.

Maseni spektri inkubacione smeše su snimani nakon 0, 1, 5, 15 i 60 min reakcije. Supstrat u reakciji, PC 16:0/18:2 i PC 16:0/18:1 daje signale na m/z=758,6 i m/z=760,6 (protonovani adukti) i na m/z=780,6 i m/z=782,6 (natrijumovi adukti). Lako

se uočava da se intenzitet signala supstrata smanjuje sa vremenom, tako da se posle 15 min reakcije mogu detektovati samo natrijumovi adukti lipida, koji su intenzivniji, jer se reakcija odvijala u puferu koji sadrži Na^+ jone. No, svi adukti supstrata nestaju posle 60 min inkubacije sa enzimom. S druge strane, proizvod reakcije, LPC 16:0, odnosno intenzitet njegovih vodoničnih i natrijumovih adukata ($m/z=496,3$ i $m/z=518,3$, respektivno) raste sa vremenom i na slici 27 je osenčen sivom bojom. Određena količina lizolipida se detektuje i u na samom početku reakcije (0 min), zbog oksidacije komercijalnog fosfatidilholina, što se dešava u toku čuvanja fosfolipida sa nezasićenim masnokiselinskim ostacima.²⁴⁵ Unutrašnji standard LPC 14:0 je u sve uzorke dodat u istoj koncentraciji i signali na m/z vrednostima 468,1 i 490,3 na izabranim spektrima na Slici 27 su uvek istog intenziteta. Koncentracija fosfatidil-holina ili lizofosfatidilholina i aktivnost fosfolipaze se preračunava koristeći podatke o koncentraciji unutrašnjeg standarda i odnosa signal/šum unutrašnjeg standarda i uzorka (odeljak 5.6.4.).

Za određivanje aktivnosti fosfolipaze se može koristiti promena koncentracije supstrata ili produkta reakcije sa vremenom.



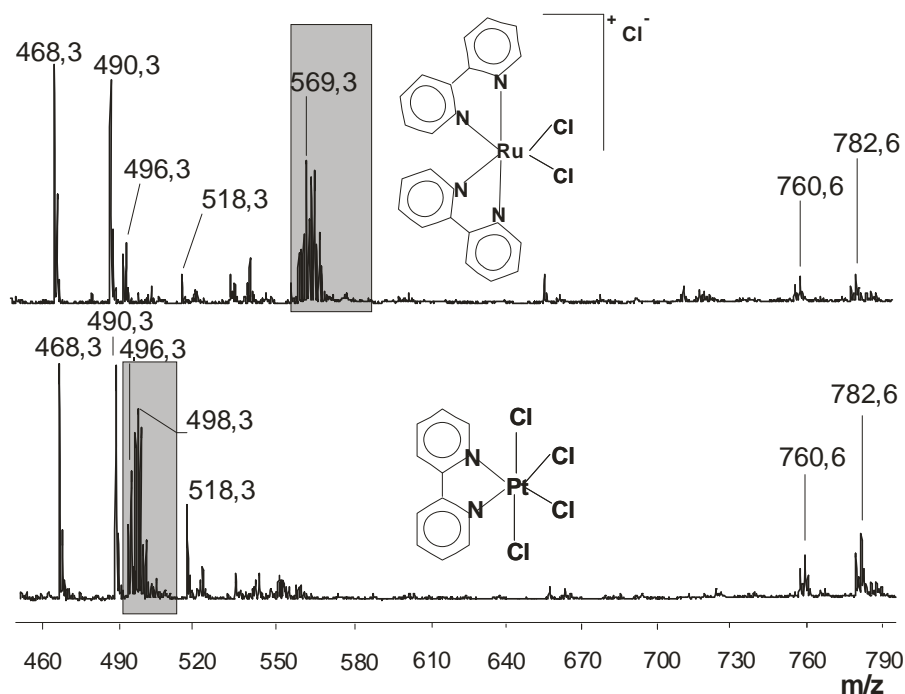
Slika 28. Krive zavisnosti odnosa intenzitet/šum signala (S/N) natrijumovih adukata PC 16:0/18:1 ($m/z=782,57$) i LPC 16:0 ($m/z=518,32$) od vremena inkubacije fosfatidil-holina sa enzimom PLA_2 .

Na slici 28 su prikazane krive zavisnosti odnosa intenzitet/šum signala koji potiču od supstrata i proizvoda sa vremenom inkubacije sa enzimom, mereni u odnosu na dodati unutrašnji standard sa ucrtanim srednjim greškama.

Za računanje aktivnosti fosfolipaze A₂ praćena je promena koncentracije proizvoda reakcije (lizofosfatidilholina) sa vremenom. Prvi razlog za to jeste što signali koji potiču od supstrata (fosfatidil-holin) nestaju u masenom spektru već nakon 15 min. Osim toga, u budućim eksperimentima, u kojima će se računati uticaj kompleksa metala na aktivnost fosfolipaze A₂ je važno naglasiti da postoji tip inhibicije, čiji je mehanizam takav da se posle vezivanja supstrata za enzim i njegovog liziranja, produkt reakcije, lizolipid, ne otpušta u sredinu.²⁴⁶ Mereći količinu produkta, a ne supstrata sa vremenom reakcije, izbegava se mogućnost da se ovaj vid inhibicije previdi. Poređenjem rezultata na slici 28, može se izračunati odnos promene koncentracije supstrata i promene koncentracije produkta reakcije, što omogućava da se aktivnost enzima predstavi u jedinicama koje liziraju određenu količinu supstrata po jedinici vremena i mg enzima. Naime, nagibi krivih na Slici 28 u prvih 5 minuta reakcije predstavljaju brzine stvaranja produkta ili nestajanja supstrata sa vremenom. Nagib za krivu povećanja S/N i koncentracije LPC 16:0 je 0,3909, dok je apsolutna vrednost nagiba krive smanjenja koncentracije PC 16:0/18:1 duplo veća i iznosi 7,3695. Rezultat dobijen za maksimalnu brzinu stvaranja produkta reakcije, LPC 16:0 u prisustvu enzima PLA₂ je $(5.33 \pm 1.28) \times 10^{-5}$ M/min. Preračunata maksimalana brzina nestajanja supstrata PC 16:0/18:1 je otud $(10.61 \pm 2.55) \times 10^{-5}$ M/min, a aktivnost enzima je (8.49 ± 2.04) U/mg. 1U je definisan kao količina enzima koja hidrolizuje 1 μ mol PC 16:0/18:1 do LPC 16:0 i masnu kiselinu, po minuti, na pH=8 i temperaturi 37 °C. Dobijena vrednost je mnogo manja od vrednosti koju je dao proizvođač (163 U/mg), što govori o tome da je za korišćenje ove metode za samo određivanje aktivnosti enzima potrebno uvesti određene korekcije u računu, koje bi obuhvatale efekte kao što su: razlike u jonizacionim i desorpcionim karakteristikama supstrata, produkta reakcije i unutrašnjeg standarda; različiti koeficijenti raspodele ovih komponenti prilikom ekstrakcije iz reakcione smeše; različite brzine odvajanja od enzima i još neki drugi. Međutim, ova metoda ipak pruža mogućnost za brzo poređenje uticaja različitih komponenti na aktivnost enzima, kao što će to biti pokazano u sledećem odeljku.^{224,247}

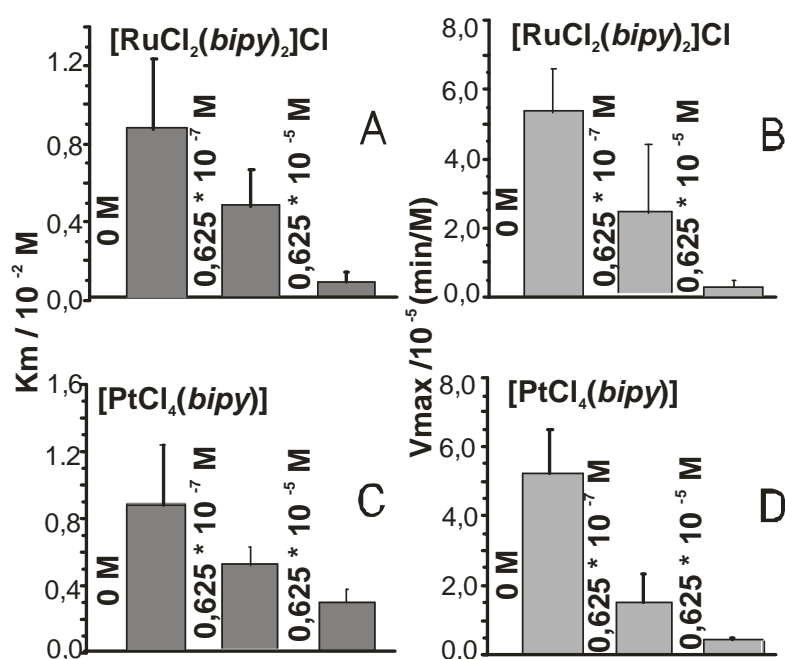
6.5.2 Uticaj kompleksa $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ i $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ na aktivnost fosfolipaze A_2

Jedina razlika eksperimenata u kojima se meri uticaj kompleksa metala na aktivnost fosfolipaze A_2 u odnosu na prethodne eksperimente merenja aktivnosti jeste dodavanje odgovarajućih kompleksa u reakcionu smešu. Shodno tome, u masenim spektrima se simultano sa signalima supstrata i produkta pojavljuju i signali kompleksa metala sa kojim se smeša inkubira (slika 29).



Slika 29. MALDI TOF maseni spektri fosfatidil-holina PC 16:0/18:2 i PC 16:0/18:1 inkubiranog sa fosfolipazom A_2 i sa dodatim unutrašnjim standardom, LPC 14:0 i kompleksima $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ (gornji maseni spektar) ili $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ (donji maseni spektar). Signali na $m/z=758,6$ i $m/z=760,6$ potiču od protonovanih adukata PC 16:0/18:2 i PC 16:0/18:1, dok signali na vrednostima $m/z=780,6$ i $m/z=782,6$ pripadaju natrijumovim aduktima ovih lipida, respektivno. Unutrašnji standard LPC 14:0 daje signale istog intenziteta na m/z vrednostima 468,1 i 490,3, a produkt reakcije, LPC 16:0 signale na $m/z=496,3$ i $m/z=518,3$ za protonovani i natrijumov adukt, respektivno. Osenčena grupa signala oko $m/z=569,3$ na gornjem masenom spektru i $m/z=498,6$ na donjem masenom spektru potiču od adukata kompleksa.

Kompleks rutenijuma, $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ se karakteriše grupom signala u masenom spektru na slici 29 (gornji maseni spektar) u opsegu m/z vrednosti od 565 do 573, sa najintenzivnijim signalom na $m/z=569,3$. Grupa signala je posledica relativne prirodne izotopske zastupljenosti izotopa rutenijuma u jedinjenju od ^{96}Ru do ^{104}Ru . Najintenzivniji signal potiče od adukta originalnog kompleksa, koji je u vodenoj sredini zamenio dva hloridna liganda jednim bipyridinskim ligandom.²²¹ Kako ovi, tako ni drugi signali kompleksa rutenijuma ne ometaju detekciju i kvantitativnu analizu lizolipida. Međutim, grupa signala koja potiče od kompleksa platine, $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$, koja se javlja u m/z opsegu 494-498 se sasvim preklapa sa signalom LPC 16:0 na $m/z=496,3$. To je još jedan od razloga zašto se u određivanju aktivnosti fosfolipaze A_2 i uticaja kompleksa metala na njenu aktivnost uzimaju u obzir samo natrijumovi adukti LPC 16:0. U ovom slučaju, to je signal sa vrednošću $m/z=518,3$. Pomenuta grupa signala koja interferira sa LPC 16:0 na slici 29 (donji maseni spektar) potiče od natrijumovog adukta kompleksa platine, koji je prethodno zamenio jedan neutralni molekul HCl molekulom H_2O . Detaljni opis masenih spektara ovih prelaznih metala je dat u literaturi.^{224,221}



Slika 30. Vrednosti Km (A i C) i Vmax (B i D) za enzimsku aktivnost fosfolipaze A_2 u prisustvu kompleksa $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ (A–B) and $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ (C–D).

Oba kompleksa metala značajno smanjuju aktivnost fosfolipaze A₂, koji je iz dobijenih masenih spektara izračunat po ranije opisanoj proceduri. Dodavanje kompleksa rutenijuma u inkubacionu smešu u koncentraciji od $0,625 \times 10^{-7}$ M smanjuje vrednost Km fosfolipaze do 50% početne vrednosti, a pri 100 puta većoj koncentraciji smanjuje Km do oko samo 10% početne vrednosti. S druge strane, kompleks platine pri istim koncentracijama smanjuje Km vrednost do 60% i 30% početne vrednosti (slika 30). Oba kompleksa utiču i na smanjenje vrednosti Vmax. Rezultati aktivnosti fosfolipaze A₂ sa i bez prisustva kompleksa su prikazani tabelarno (tabela 6).

Tabela 6. Aktivnost i parametri aktivnosti fosfolipaze A₂ sa i bez prisustva kompleksa [PtCl₄(bipy)] i [RuCl₂(bipy)₂]Cl

	c kompleksa (M)	Vmax (M(LPC)/min)	Vmax (M(PC)/min)	Akt. enzima (U/mg)
PLA ₂	0,000	$(5,33 \pm 1,28) \cdot 10^{-5}$	$(10,61 \pm 2,55) \cdot 10^{-5}$	$(8,49 \pm 2,04)$
[PtCl ₄ (bipy)]	$0,625 \cdot 10^{-7}$	$(1,50 \pm 0,44) \cdot 10^{-5}$	$(2,99 \pm 0,80) \cdot 10^{-5}$	$(2,39 \pm 0,64)$
	$0,625 \cdot 10^{-5}$	$(0,42 \pm 0,11) \cdot 10^{-5}$	$(0,84 \pm 0,22) \cdot 10^{-5}$	$(0,67 \pm 0,18)$
[RuCl ₂ (bipy) ₂]Cl	$0,625 \cdot 10^{-7}$	$(2,50 \pm 0,60) \cdot 10^{-5}$	$(4,98 \pm 1,20) \cdot 10^{-5}$	$(3,98 \pm 0,96)$
	$0,625 \cdot 10^{-5}$	$(0,32 \pm 0,08) \cdot 10^{-5}$	$(0,64 \pm 0,16) \cdot 10^{-5}$	$(0,51 \pm 0,13)$

Kako bi se utvrdio tip inhibicije, konstruisani su Lajnviver-Burkovi dijagrami (*Lineweaver-Burk*), na osnovu kojih je zaključeno da ispitivani kompleksi ispoljavaju akompetitivni vid inhibicije enzima.²²⁴ To znači da kompleksi metala uglavnom interaguju sa kompleksom enzim-supstrat i na taj način onemogućavaju otpuštanje i detekciju slobodnog produkta, lizolipida.

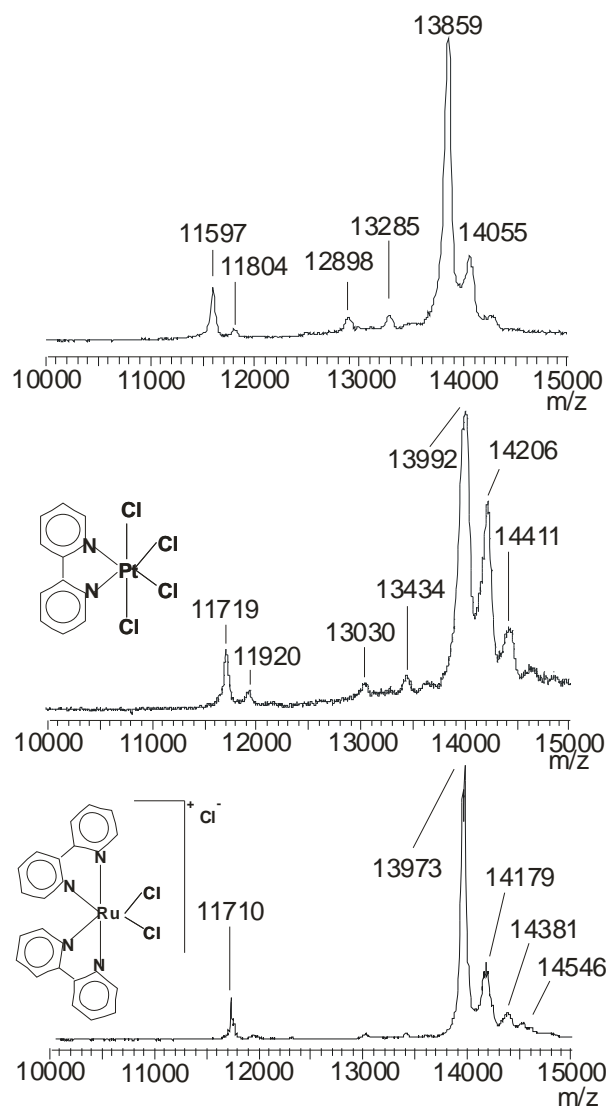
Na sličan način dokazan je inhibitorni efekat kompleksa *cis*-platine i [PtCl₂(dach)] na aktivnost pankreasne fosfolipaze A₂.²⁴⁷ Osim toga, izvedeni su eksperimenti merenja aktivnosti fosfolipaze A₂ metodom UV/Vis spektrofotometrije, međutim dobijeni rezultati za aktivnost samog enzima su veoma male i ova metoda ne može biti korišćena za određivanje uticaja kompleksa metala na aktivnost fosfolipaze A₂.

6.6. Ispitivanje vezivanja kompleksa za enzim fosfolipazu A₂

U prethodnom delu je pokazano da kompleksi rutenijuma i platine sa bipyridinskim ligandima, [RuCl₂(bipy)₂]Cl i [PtCl₄(bipy)] inhibiraju enzim fosfolipazu A₂. Naime, metodom MALDI-TOF masene spektrometrije utvrđeno je da se u prisustvu ovih kompleksa formira i detektuje manja količina reakcionog proizvoda-lizolipida u odnosu na enzim pri istim uslovima, ali bez prisustva kompleksa. Interakcija oba kompleksa sa lipidima i lizolipidima nije detektovana. Obzirom da fosfolipaza A₂ deluje na granici faza lipid-vodena sredina, smatra se da bilo koji proces koji ometa dostupnost lipida (supstrata) enzimu utiče na merenu aktivnost fosfolipaze A₂. To je i razlog zbog koga je interakcija kompleksa sa lipidima detaljno ispitana, jer je poznato da neke supstance inhibiraju fosfolipazu A₂, menjanjem naelektrisanja ili organizacije supstrata.²⁴⁸⁻²⁵¹ U ovom delu, biće ispitano da li se kompleksi metala vezuju za fosfolipazu A₂, ako se vezuju, na koji način i da li to vezivanje i kako utiče na promenu konformacije ili aktivnosti enzima. Korišćene su tehnike MALDI-TOF masene spektrometrije, fluorescentne spektrometrije i nuklearno-magnetne rezonancije.

6.6.1. Ispitivanje vezivanja kompleksa za enzim MALDI-TOF masenom spektrometrijom

”Meke” metode masene spektrometrije, koje omogućavaju detekciju nefragmentovanih biomolekula, često omogućavaju ispitivanje vezivanja tih biomolekula sa drugim molekulima. Vezivanje se potvrđuje novim signalima u masenom spektru sa m/z vrednostima većim od m/z vrednosti karakterističnim za biomolekul koji se ispituje.²⁵²⁻²⁵⁵ Enzim fosfolipaza A₂ je inkubiran najpre sa kompleksima za koje je prethodno potvrđeno da imaju inhibitorno dejstvo na enzim, [RuCl₂(bipy)₂]Cl, [PtCl₄(bipy)]. Maseni spektri fosfolipaze A₂ posle 4h inkubiranja sa ovim kompleksima su prikazani na slici 31. Svi maseni spektri su snimljeni uz korišćenje matrice SA (sinapinska kiselina). Komercijalno nabavljen enzim, sekretorna fosfolipaza A₂ iz pankreasa divlje svinje, ima molekulsku težinu od oko 13,9 kDa, određenu od strane proizvođača.



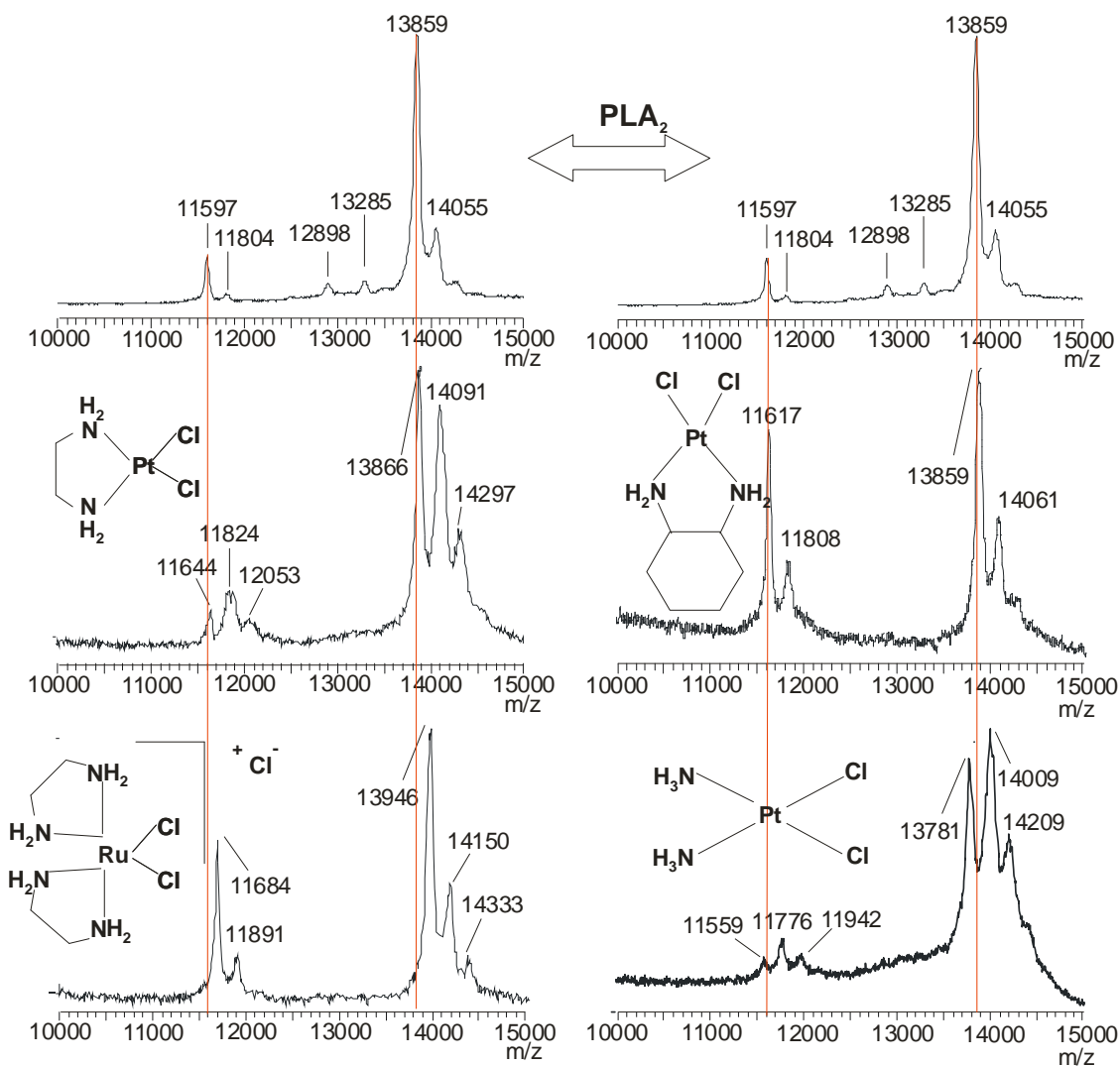
Slika 31. MALDI-TOF maseni spektri fosfolipaze A₂ i fosfolipaze A₂ inkubirane 4 sata sa kompleksima [PtCl₄(bipy)] i [RuCl₂(bipy)₂]Cl. Pojava novih signala sa većim m/z vrednostima je indikacija za stvaranje adukata fosfolipaze A₂ sa kompleksima.

U MALDI-TOF masenom spektru u linearnom modu, enzim se detektuje po najintenzivnijem signalu na m/z=13859. Signal na m/z=14055 potiče od izoenzima fosfolipaze A₂. Naime, u literaturi se navodi da pankreasna fosfolipaza sadrži dva izozoma, α-izoenzim molekulske mase 14000 Da i β-izoenzimom, čija je molekulska masa za oko 5% veća.²⁵⁶ Osim toga, u masenom spektru enzima, uočavaju se karakteristični signali na m/z=11597 i m/z=11804, koji nisu identifikovani. Nakon inkubiranja enzima sa kompleksima [PtCl₄(bipy)] i [RuCl₂(bipy)₂]Cl, m/z vrednosti

signala karakterističnih za fosfolipazu se menjaju za oko 130 i 110, respektivno. Osim toga, u oba spektra se pojavljuju novi signali, pa umesto dva signala karakteristična za enzim, pojavljuje se i treći signal, $m/z=14411$ za $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ i $m/z=14381$ za $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$. Standardna devijacija navedenih m/z vrednosti iznosi oko 0,3% ukupne mase enzima, što znači da razlika u m/z vrednostima dva uzastopna spektra samog enzima može da bude i do $\Delta m/z=40$. Linearni detektor i generalno MALDI-TOF masena spektrometrija imaju manju rezoluciju kada se analiziraju molekuli velikih masa nego kada se snimaju molekuli male mase i koristi reflektorni mod. Standardna devijacija signala u uzastopnim masenim spektrima od $\Delta m/z=40$ (oko 0,3% vrednosti molekulske mase enzima) je suviše velika da bi se potvrdilo vezivanje platine, rutenijuma ili liganda za enzim ili utvrdio odnos ovih komponenti u novonastalom kompleksu. Naime, standardna devijacija predstavlja čak oko 25% atomske mase platine, 50% atomske mase rutenijuma ili oko 36% *bipy* liganda.

Slični rezultati su dobijeni i pri inkubiranju fosfolipaze A_2 sa drugim kompleksima metala. Maseni spektri fosfolipaze A_2 same i inkubirane sa kompleksima $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$, $[\text{RuCl}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$, $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ i *cis*- $\text{PtCl}_2(\text{NH}_2)_2$ prikazani su na slici 32. Analizirajući masene spektre na slici 32 zapaža se pojava novog (trećeg) signala u slučaju kada je PLA_2 inkubirana sa kompleksima $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$, $[\text{RuCl}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$ i *cis*- $\text{PtCl}_2(\text{NH}_2)_2$ ($m/z=14297$, $m/z=14333$ i $m/z=14209$, respektivno), ali ne i kada je enzim inkubiran sa kompleksom $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$. Ako se uporede maseni spektri fosfolipaze A_2 inkubirane sa kompleksima *cis*- $\text{PtCl}_2(\text{NH}_2)_2$ i $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$, koji takođe inhibiraju ovaj enzim, uočava se razlika u masenim spektrima koja je objašnjena različitim strukturnim karakteristikama kompleksa.²⁴⁷ Ukratko, smatra se da pošto oba kompleksa imaju isti metalni centar, Pt(II) i dva ista liganda (Cl), razlika u njihovoj interakciji sa enzimom potiče zbog razlike u sternim efektima bidentatnog *dach* liganda. Međutim, s obzirom da se iste promene javljaju i kod kompleksa sa glomaznim, bidentatnim *bipy* ligandima, objašnjenje mehanizma interakcije zahteva detaljnija ispitivanja. Zapaža se pomeranje signala koji potiče od PLA_2 prema većim m/z vrednostima prilikom inkubiranja enzima sa $[\text{RuCl}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$ i prema manjim m/z vrednostima, kada je enzim inkubiran sa *cis*- $\text{PtCl}_2(\text{NH}_2)_2$ (slika 32). Ovaj rezultat se ne objašnjava kao posledica interakcije kompleksa metala i enzima, jer se i maksimumi signala u uzastopno snimljenim masenim spektrima samog enzima razlikuju za $\Delta m/z=40$, što unosi dodatne probleme u

identifikaciji adukata enzima i kompleksa metala. Dakle, uzima se u obzir samo pojava signala sa novim, višim m/z vrednostima. Na slikama 31 i 32 su, radi poređenja pomeranja signala, crvenom linijom na svim spektrima obeležene m/z vrednosti prvog u grupi signala neinkubirane fosfolipaze A₂.

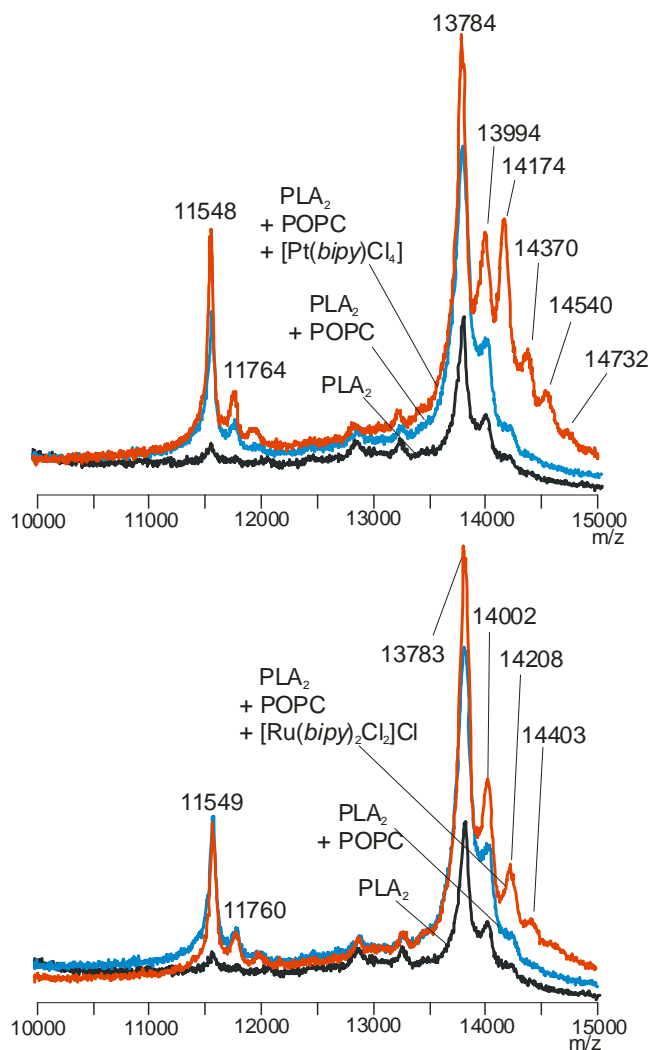


Slika 32. MALDI-TOF maseni spektri fosfolipaze A₂ i fosfolipaze A₂ inkubirane 4 sata sa kompleksima [PtCl₂(en)], [RuCl₂(en)₂]Cl, [PtCl₂(dach)] i cis-PtCl₂(NH₂)₂.

6.6.2. Ispitivanje vezivanja [PtCl₄(bipy)] i [RuCl₂(bipy)₂]Cl za enzim u prisustvu supstrata-fosfolipida

Na osnovu analize kinetičkih parametara (odjeljak 6.5.1.), dokazano je da kompleksi [PtCl₄(bipy)] i [RuCl₂(bipy)₂]Cl inhibiraju enzim PLA₂ i da je mehanizam inhibicije akompetetivan (smanjivanje V_{max} i K_m). Kompetetivni inhibitori se vezuju za aktivno mesto na enzimu i tako umanjuju verovatnoću vezivanja supstrata za enzim (smanjivanje K_m). Nekompetetivni inhibitori se vezuju za mesto na enzimu nezavisno od toga da li je on slobodan ili se supstrat već vezao, menjajući konformaciju enzima i inhibirajući katalizu (smanjivanje V_{max}). Akompetetivni inhibitori se vezuju za enzim-supstrat kompleks, stvarajući neaktivni kompleks enzim-supstrat-inhibitor. To bi značilo da bi kompleksi [PtCl₄(bipy)] i [RuCl₂(bipy)₂]Cl trebalo da pokažu jače vezivanje za PLA₂ u prisustvu supstrata, pošto se tek nakon vezivanja supstrata otvara/formira mesto za interakciju sa inhibitorom. Kako bi se to proverilo, snimljeni su maseni spektri fosfolipaze A₂, fosfolipaze A₂ inkubirane sa supstratom (PC 16:0/18:1) i fosfolipaze A₂ inkubirane sa supstratom (PC 16:0/18:1) i kompleksima [PtCl₄(bipy)] i [RuCl₂(bipy)₂]Cl. Svi maseni spektri su snimljeni pod istim uslovima i upoređeni su na slici 33. Maseni spektar same fosfolipaze A₂ je crne boje, dok je spektar fosfolipaze A₂ inkubirane sa supstratom (PC 16:0/18:1) plave boje. Ova dva masena spektra gotovo i da se ne razlikuju iako inhibiranje aktivnosti PLA₂ ukazuje na to da postoji interakcija. Razlog za izostanak ovog signala u masenom spektru je najverovatnije to što je spomenuto vezivanje samo prolazno i nedovoljno stabilno da bi se detektovalo korišćenom metodom. Ovu činjenicu treba imati u vidu i pri analizi ostalih signala, odnosno nepostojanje očekivanog signala u masenom spektru ne isključuje mogućnost stvaranja veze između dve komponente. Na slici 33 su prikazani maseni spektri fosfolipaze A₂ inkubirane sa odgovarajućim kompleksom nakon dodavanja supstrata, prikazani crvenom bojom. U slučaju kompleksa [PtCl₄(bipy)], mogu se detektovati i novi signali, koji nisu bili detektovani kada je kompleks inkubiran sa enzimom bez supstrata (slika 31). U odnosu na signale koje potiču od enzima i enzima inkubiranog sa supstratom, interakcija sa kompleksom ima za posledicu pojavu novih signala na m/z= 4174, m/z= 14370, m/z= 14540 i m/z= 14732. Ovakav rezultat nedvosmisleno ukazuje na to da kompleks [PtCl₄(bipy)] interaguje sa slobodnim enzimom, ali je ova interakcija

jača, kada je supstrat vezan za enzim. Objašnjenje leži u činjenici da kada se supstrat veže za enzim, enzim menja svoju konformaciju. Kompleks platine intenzivnije interaguje sa enzimom u konformaciji kada je supstrat već vezan najverovatnije jer pri promeni konformacije enzima, potencijalna mesta za vezivanje metala (amino-kiseline bogate atomom sumpora) postaju dostupnija za interakciju sa kompleksom, kao što je već napomenuto u prethodnom delu.



Slika 33. MALDI-TOF maseni spektri fosfolipaze A₂ (crno), fosfolipaze A₂ inkubirane sa supstratom (PC 16:0/18:1) (plavo) i fosfolipaze A₂ inkubirane sa supstratom i sa kompleksima [PtCl₄(bipy)] (gore, crveno) i [RuCl₂(bipy)₂]Cl (dole, crveno). Pojava novih signala u masenom spektru crvene boje ukazuje na interakciju enzima sa kompleksima.

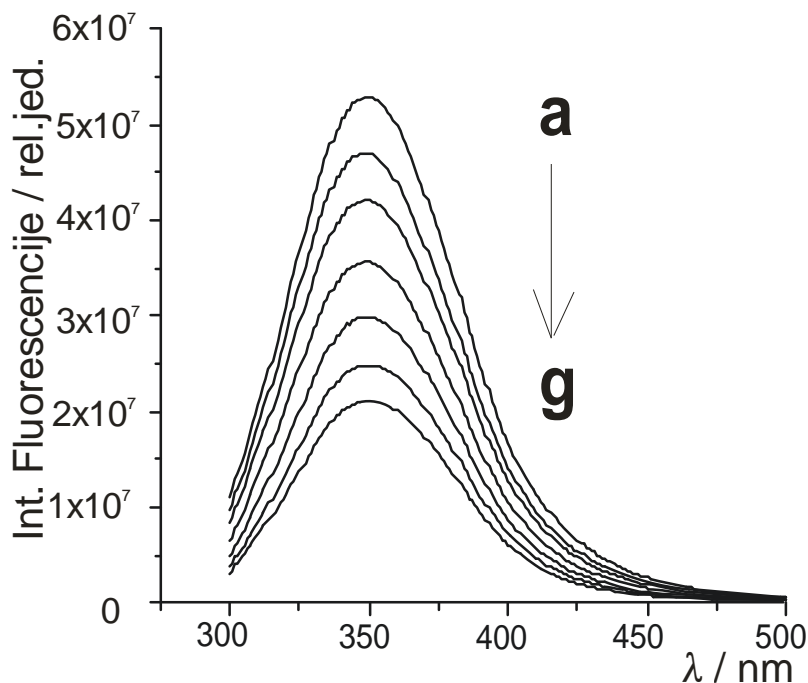
Interakcija kompleksa rutenijuma ($[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$) sa enzimom je takođe intenzivnija u slučaju kada je supstrat već vezan za enzim. Moglo bi se reći da se ovaj kompleks veže za enzim u obe konformacije, ali je afinitet prema aktivnoj konformaciji nešto veći. Snimljeni su i maseni spektri fosfolipaze A_2 inkubirane sa svim ostalim kompleksima ($[\text{PtCl}_2(\text{en})]$, $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$, $[\text{RuCl}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$, $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ i $\text{cis-PtCl}_2(\text{NH}_2)_2$) sa i bez supstrata, međutim nijedan od kompleksa nije ispoljio drugačiju interakciju sa enzimom u prisustvu supstrata u odnosu na enzim bez supstrata (spektri nisu prikazani).

Prethodno je dokazano da kompleksi metala ne interaguju sa lipidima, ne stvaraju adukte sa klasama lipida ili su veze reverzibilne i slabe, slabo utiču na strukturu i organizaciju lipozoma formiranih od cviterjonskih lipida (odeljci 6.3 i 6.4), pa se može reći da interakcija ispoljena na slici 33 potiče od vezivanja kompleksa za enzim u određenoj konformaciji. Zaključeno je da oba kompleksa, $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ i $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$, interaguju sa enzimom u slobodnoj formi, ali da je ta interakcija mnogo jača kada je enzim u konformaciji u kojoj je vezan i supstrat. Efekat je mnogo izraženiji kod kompleksa $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$, pa su urađeni dodatni eksperimenti, gde je ispitana interakcija kompleksa sa enzimom fluorescentnom spektroskopijom.

6.6.3. Ispitivanje vezivanja kompleksa za enzim metodom fluorescentne spektroskopije

Metoda fluorescentne spektroskopije omogućava da se na osnovu promena u spektrima fluorescentne emisije jednog triptofana na enzimu, zaključi o promeni konformacije tog enzima i vezivanju kompleksa za enzim.²⁵⁷ Snimani su spektri fluorescencije fosfolipaze A_2 , koje emituje pobuđeni triptofan uz titraciju kompleksima $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ i $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$. Titracija kompleksom $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$, kao i kompleksima $[\text{PtCl}_2(\text{en})]$, $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$, $[\text{RuCl}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$, $[\text{PtCl}_2(\text{dach})]$ i $\text{cis-PtCl}_2(\text{NH}_2)_2$ je neznatno smanjila intenzitet fluorescencije na talasnoj dužini fluorescentne emisije triptofana i efekat se pripisuje razblaženju uzorka. Međutim, titracija kompleksom $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ je za nekoliko redova veličine smanjivala intenzitet fluorescencije, u zavisnosti od ukupne dodate količine. Na slici 34 su prikazani fluorescentni spektri fosfolipaze A_2 sa dodatim kompleksom $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ u različitim koncentracijama.

Intenzitet fluorescencije triptofana se smanjuje srazmerno povećanju ukupne koncentracije dodatog kompleksa.

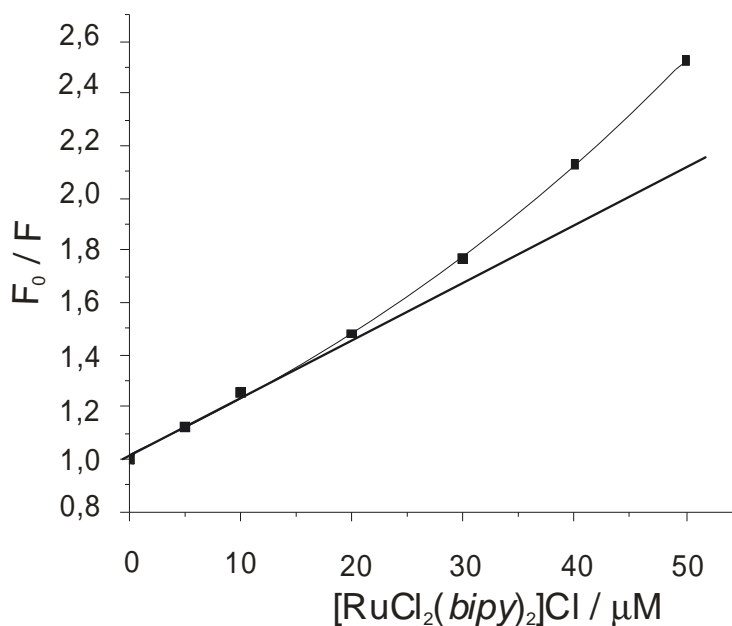


Slika 34. Spektri fluorescencije fosfolipaze A₂ titrovane kompleksom [RuCl₂(bipy)₂]Cl, čija je ukupna koncentracija u uzorku: a) 0 μM, b) 5 μM, c) 10 μM, d) 20 μM, e) 30 μM, f) 40 μM i g) 50 μM.

Ovakav rezultat se objašnjava statičkom ili dinamičkom interakcijom kompleksa sa fluoroforom, pri čemu statička interakcija podrazumeva formiranje adukta između kompleksa i fluorofore, dok dinamičku interakciju čine trenutne kolizije ovih molekula. Kako bi se odredio mehanizam interakcije u ovom slučaju, konstruisan je Stern-Volmerov dijagram, gde je predstavljena zavisnost odnosa intenziteta fluorescencije bez i sa dodatim kompleksom od koncentracije dodatog kompleksa. Stern-Volmerov dijagram za fosfolipazu A₂ titrovanu kompleksom [RuCl₂(bipy)₂]Cl, predstavljen je na slici 35.

Za manje koncentracije kompleksa (do 20 μM), Stern-Volmerov dijagram pokazuje linearnost, međutim, pri većim koncentracijama, odstupa od linearnosti. Može

se zaključiti da ispitivani kompleks ispoljava statičku i dinamičku interakciju sa enzimom. Fluorescentna spektrometrija je potvrdila prethodne rezultate dobijene MALDI-TOF masenom spektrometrijom, tj. vezivanje za enzim u obe konformacije, bez i sa vezanim supstratom, dok se kompleks platine, $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ intenzivno veže za enzim u konformaciji kada je supstrat već vezan.

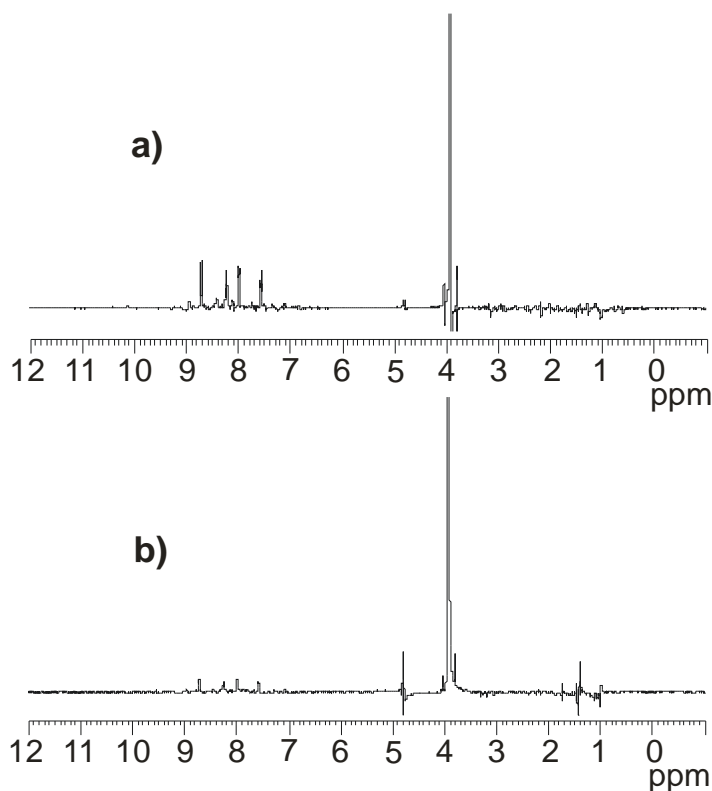


Slika 35. Stern-Volmerov dijagram, odnosno zavisnost F_0/F od koncentracije dodatog kompleksa, $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$. F_0 i F predstavljaju intenzitete fluorescentne emisije fosfolipaze A_2 (triptofana) bez i sa dodatim kompleksom odgovarajuće koncentracije, respektivno.

6.6.4. Ispitivanje interakcije kompleksa $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ sa enzimom metodom nuklearne magnetne rezonancije

Metoda nuklearne magnetne rezonancije je veoma korisna za ispitivanje strukture molekula. Za manje molekule se uspešno može koristiti jednodimenzionalna protonska nuklearna magnetna rezonancija (NMR). Kada su u pitanju složeniji molekuli, kao što su proteini, neophodno je korišćenje multidimenzionalne (2D ili 3D) i heteronuklearne NMR (^1H , ^{14}N). Međutim, za snimanje ovih spektara potrebno je genetski modifikovati i obeležiti fosfolipazu A_2 izotopima ^{14}N , što prevazilazi obim ove

disertacije. Ipak, pretpostavljeno je da se eventualne promene u strukturi enzima pod uticajem kompleksa mogu detektovati jednodimenzionalnom ^1H NMR spektroskopijom, ali bez mogućnosti da se precizno identifikuju. Na slici 36 data je prikazana razlika između ^1H NMR spektra fosfolipaze A_2 inkubirane sa kompleksom $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ i spektra same fosfolipaze A_2 (slika 36a) i razlika spektara fosfolipaze A_2 inkubirane sa lipidom i kompleksom $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ i bez kompleksa (slika 36b).



Slika 36. Razlika jednodimenzionalnih ^1H NMR spektara a) fosfolipaze A_2 inkubirane sa kompleksom $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ i same fosfolipaze A_2 i b) fosfolipaze A_2 inkubirane sa supstratom i kompleksom $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$ i bez kompleksa.

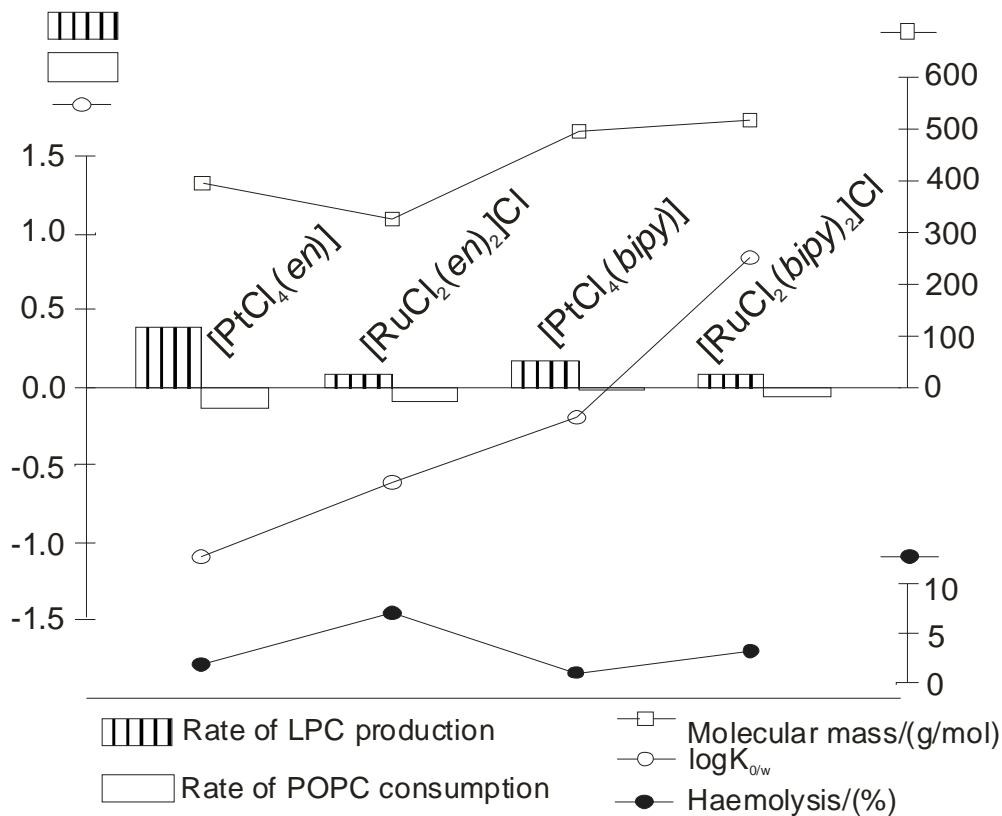
Četiri signala sa vrednostima hemijskih pomeraja između 7-9 ppm potiču od bupiridinskih liganada u kompleksu rutenijuma. Oba spektra se karakterišu izuzetno malim promenama u zavisnosti od prisustva kompleksa. Inkubiranje kompleksa sa fosfolipazom A_2 (slika 36a) ima za posledicu zanemarljive promene u intenzitetu i

hemijskom pomeraju signala enzima, koje nije moguće razložiti i identifikovati bez korišćenja 2D heteronuklearne NMR spektroskopije. Međutim, sa dodavanjem lipida, promena u spektrima je nešto uočljivija, u rangu ppm karakterističnom za signale lipida. Na osnovu ovih spektara, ne može se dobiti dotane informacije o mehanizmu interakcije kompleksa i enzima.

6.7. Pregled dobijenih rezultata i SAR analiza

Sa ciljem da se izvede zaključak o korelaciji strukturnih, fizičkih i fizičko-hemijskih osobina ispitivanih kompleksa sa njihovom biološkom aktivnošću u odnosu na inhibiciju pankreasne PLA₂, upoređeni su odgovarajući teorijski podaci i eksperimentalni rezultati o njihovoj strukturi sa rezultatima o njihovom inhibitorском efektu. Na slici 37 su na grafiku predstavljeni i upoređeni rezultati lipofilnosti kompleksa ($\log K_{o/w}$), uticaja kompleksa na hemolizu eritrocita (%), brzina produkcije LPC i hidrolize POPC, kao i podaci o strukturi i molekulskoj masi svih kompleksa [PtCl₄(*en*)], [RuCl₂(*bipy*)₂]Cl, [PtCl₄(*bipy*)] and [RuCl₂(*bipy*)₂]Cl. Svi ispitani kompleksi imaju oktaedralnu geometriju i zajednički metalni centar ili ligand,. Poređenjem odgovarajućih parova, može se izvesti nekoliko zaključaka. *i*) Kompleksi platine i rutenijuma sa *en* ligandima u većoj meri destabilizuju organizaciju lipidnih membrana eritrocita u odnosu na komplekse sa *bipy* ligandima. Oni su hidrofilni sa $\log K_{o/w}$ vrednostima manjim od -0.5 i ne vezuju se za PLA₂ nezavisno od prisustva supstrata. Ovi kompleksi mogu samo indirektno uticati na aktivnost PLA₂, menjajući faktore vezane za površinsku aktivaciju enzima; *ii*) Kompleksi rutenijuma za isti vremenski interval izazivaju procentualno veću destabilizaciju lipidnih membrana u odnosu na analogne komplekse platine, što ukazuje na to da jonski radijus i naelektrisanje metalnog centra utiče na indirektno inhibitorско dejstvo metalnih kompleksa; *iii*) Kompleksi rutenijuma i platine sa *bipy* ligandima su lipofilniji i u skladu sa tim ispoljavaju i jači inhibitorски efekat u odnosu na svoje analoge sa *en* ligandima. Ipak, veoma je komplikovano izvući jedinstven, generalni zaključak o korelaciji strukture i biološke aktivnosti kompleksa metala ili predvideti strukturu kompleksa sa

idealnom biološkom aktivnošću, imajući u vidu njihove različite moguće inhibitorske mehanizme



Slika 37. Korelacija fizičko-hemijskih osobina (lipofilnost ($\log K_{o/w}$), uticaj na hemolizu eritrocita (%), molekulska masa) i biološke aktivnosti (uticaj na produkciju LPC i hidrolizu POPC) kompleksa metala platine i rutenijuma: $[\text{PtCl}_4(\text{en})]$, $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$, $[\text{PtCl}_4(\text{bipy})]$ and $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl}$.

7. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata u eksperimentima opisanim u ovoj disertaciji, koji su za cilj imali ispitivanje interakcije kompleksa platine i rutenijuma sa lipidima i pankreasnom fosfolipazom A₂, može se izvesti nekoliko važnih zaključaka:

1. Ispitivani kompleksi metala utiču na organizaciju lipida i integritet fosfolipidnog dvosloja, ali ne dovode do hidrolize fosfolipida. Interakcija je uglavnom elektrostatičke prirode.

1.1. Ispitivani kompleksi se prema lipofilnosti, odnosno afinitetu prema lipidima mogu predstaviti nizom: $[\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl} > [\text{PtCl}_4(\text{bipy})] > [\text{PtCl}_2(\text{dach})] > [\text{RuCl}_2(\text{en})_2]\text{Cl} > [\text{PtCl}_2(\text{en})] > \text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$.

1.2. Kompleksi se prema uticaju na hemolizu eritrocita, odnosno uticaju na strukturu membrane eritrocita mogu predstaviti nizom: $[\text{RuCl}_2(\text{en})_2]\text{Cl} > [\text{RuCl}_2(\text{bipy})_2]\text{Cl} > [\text{PtCl}_2(\text{en})] > [\text{PtCl}_4(\text{bipy})] > \text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$. Kompleksi rutenijuma imaju veći uticaj na hemolizu eritrocita, što je najverovatnije posledica njihovog naelektrisanja i veličine: a) sastav lipida izolovanih iz eritrocita, kao ni čistih klasa lipida inkubiranih sa kompleksima nije izmenjen, što znači da nijedan od ispitivanih kompleksa ne utiče neposredno na sastav lipida; b) metodama MALDI TOF masene spektrometrije i tankoslojne hromatografije nije moguće detektovati stvaranje veze između kompleksa i pojedinačnih klasa fosfolipida iako je u literaturi drugim metodama potvrđeno vezivanje pozitivno naelektrisanih kompleksa metala sa fosfatidil-serinom i fosfatidil-etanolaminom; c) neznatno izmenjen sastav lipida, odnosno promena odnosa fosfolipida i odgovarajućih lizofosfolipida nakon inkubacije eritrocita sa kompleksima metala implicira da kompleksi mogu posredno uticati na hidrolizu fosfolipida.

1.3. Svi ispitivani kompleksi metala utiču na organizaciju i integritet lipozoma, odnosno povećavaju propustljivost ovih struktura. Variranjem sastava lipozoma utvrđeno je da se sa smanjivanjem procenta negativno naelektrisanih fosfolipida smanjuje uticaj kompleksa na integritet formiranih lipozoma, što ukazuje na to da je

interakcija kompleksa metala sa lipidima organizovanim u membrane elektrostatičke prirode.

2. Ispitivani kompleksi metala sa *bipy* ligandima utiču na aktivnost pankreasne fosfolipaze A₂, u interakciji sa samim enzimom ili preko uticaja na organizaciju supstrata. Njihov uticaj je inhibitorni, ali mehanizam može biti različit za različite komplekse.

2.1. Metodom MALDI TOF masene spektrometrije je pokazano da kompleksi platine i rutenijuma sa *bipy* ligandima, [RuCl₂(*bipy*)₂]Cl i [PtCl₄(*bipy*)], inhibiraju enzim fosfolipazu A₂, redukujući produkciju odgovarajućih lizofosfolipida: a) Kompleksi RuCl₂(*bipy*)₂]Cl i [PtCl₄(*bipy*)] umanju aktivnost fosfolipaze A₂ za 50% i 30%, respektivno i da inhibicija enzima zavisi od koncentracije kompleksa. b) Tip inhibicije najvećim delom akompetetivan, što znači da kompleksi RuCl₂(*bipy*)₂]Cl i [PtCl₄(*bipy*)] inhibiraju enzim u fazi formiranja kompleksa enzim-supstrat.

2.2. Kompleksi RuCl₂(*bipy*)₂]Cl i [PtCl₄(*bipy*)] se vezuju za pankreasnu fosfolipazu A₂, pri čemu je formiranje veze bez prisustva supstrata tranzitno i slabijeg intenziteta: a) na osnovu analize fluorescentnih spektara triptofana, dokazano je statička i dinamička interakcija RuCl₂(*bipy*)₂]Cl sa fluoroforom, što ukazuje na formiranje adukta između ispitanog kompleksa i enzima. b) oba kompleksa, [RuCl₂(*bipy*)₂]Cl i [PtCl₄(*bipy*)], formiraju adukte sa enzimom, što za posledicu ima pojavu dodatnih signala u MALDI TOF masenim spektrima sa većim m/z vrednostima u odnosu na signale karakteristične za sam enzim. U prisustvu supstrata, navedeni signali postaju intenzivniji i brojniji što još jednom potvrđuje pretežno akompetetivan mehanizam inhibicije kompleksa [RuCl₂(*bipy*)₂]Cl i [PtCl₄(*bipy*)].

Na kraju, kompleksi [RuCl₂(*bipy*)₂]Cl i [PtCl₄(*bipy*)], osim što utiču na organizaciju i integritet fosfolipidnog dvosloja i tako posredno menjaju aktivnost fosfolipaze A₂, dodatno se vezuju za enzim bez dodatog supstrata, ali je njihovo vezivanje intenzivnije u konformaciji enzima u prisustvu supstrata. Imajući u vidu da je fosfolipaza A₂ označena kao meta modernih hemoterapeutika i čija inhibicija sprečava inflamatorne procese i umanjuje metastatski potencijal kancera, ispitani kompleksi metala imaju terapijski potencijal. Međutim, postoje brojna pitanja na koja je potrebno

odgovoriti kada je u pitanju citotoksičnost ovih kompleksa i njihova specifičnost pri interakciji sa fosfolipazom i drugim biomolekulima *in vivo*.

8. LITERATURA

- 1 D.W. Hutchinson, Metal chelators as potential antiviral agents, *Antiviral Research*. 5 (1985) 193–205.
- 2 C.C. Hinckley, Osmium carbohydrate complexes, U.S. Patent 4346216, 1982.
- 3 G.-S. Kim, D.A. Judd, C.L. Hill, R.F. Schinazi, Synthesis, Characterization, and Biological Activity of a New Potent Class of Anti-HIV Agents, the Peroxonioobium-Substituted Heteropolytungstates, *J. Med. Chem.* 37 (1994) 816–820.
- 4 M. R. Arveiller, D.P. Huy, L. Maman, J.-P. Giroud, J.R.J. Sorenson, Non-steroidal anti-inflammatory drug-copper complex modulation of polymorphonuclear leukocyte migration, *Biochem. Pharmacol.* 39 (1990) 569–574.
- 5 B. Lippert, ed., *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, John Wiley & Sons, Inc., 2006.
- 6 P. Hunter, A toxic brew we cannot live without. Micronutrients give insights into the interplay between geochemistry and evolutionary biology, *EMBO Rep.* 9 (2008) 15–18.
- 7 C.-Y. Ke, C.J. Mathias, M.A. Green, Folate-receptor-targeted radionuclide imaging agents, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1143–1160.
- 8 R.C. Gamble, P.G. Schmidt, Contrast agents for NMR imaging, U.S. Patent 4728575, 1988.
- 9 I. Bertini, H. B. Gray, S. J. Lippard, J. S. Valentine, *Bioinorganic chemistry*, University Science Books, 1994.
- 10 O. Rixe, W. Ortuzar, M. Alvarez, R. Parker, E. Reed, K. Paull, et al., Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: Spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the national cancer institute's anticancer drug screen panel, *Biochem. Pharmacol.* 52 (1996) 1855–1865.
- 11 A. Ardizzoni, L. Boni, M. Tiseo, F.V. Fossella, J.H. Schiller, M. Paesmans, *et al.*, Cisplatin- Versus Carboplatin-Based Chemotherapy in First-Line Treatment

- of Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer: An Individual Patient Data Meta-Analysis, *JNCI J Natl. Cancer Inst.* 99 (2007) 847–857.
- 12 S. Mabuchi, T. Kimura, Nedaplatin: A Radiosensitizing Agent for Patients with Cervical Cancer, *Chemother. Res. Pract.* 2011 (2011) 1–10.
- 13 M.J. McKeage, Lobaplatin: a new antitumour platinum drug, *Expert Opin. Investig. Drugs.* 10 (2001) 119–128.
- 14 Y.J. Min, S.-J. Bang, J.W. Shin, D.H. Kim, J.H. Park, G.Y. Kim, *et al.*, Combination Chemotherapy with 5-Fluorouracil and Heptaplatin as First-line Treatment in Patients with Advanced Gastric Cancer, *J. Korean Med. Sci.* 19 (2004) 369–373.
- 15 H. Choy, C. Park, M. Yao, Current Status and Future Prospects for Satraplatin, an Oral Platinum Analogue, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 1633–1638.
- 16 C.-H. Tang, C. Parham, E. Shocron, G. McMahon, N. Patel, Picoplatin overcomes resistance to cell toxicity in small-cell lung cancer cells previously treated with cisplatin and carboplatin, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 67 (2011) 1389–1400.
- 17 D.P. Nowotnik, E. Cvitkovic, ProLindacTM (AP5346): A review of the development of a HPMa DACH platinum Polymer Therapeutic, *Adv. Drug Delivery Rev.* 61 (2009) 1214–1219.
- 18 G.P. Stathopoulos, T. Boulikas, Lipoplatin Formulation Review Article, *Journal of Drug Delivery.* 2012 (2012) 1–10.
- 19 A. Fedier, C. Poyet, D. Perucchini, T. Boulikas, D. Fink, MLH1-deficient tumor cells are resistant to lipoplatin, but retain sensitivity to lipoxal, *Anti-Cancer Drug.* 17 (2006) 315–323.
- 20 I. Bratsos, S. Jedner, T. Gianferrara, E. Alessio, Ruthenium Anticancer Compounds: Challenges and Expectations, *CHIMIA International Journal for Chemistry.* 61 (2007) 692–697.
- 21 C.G. Hartinger, M.A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessl, A. Egger, W. Berger, *et al.*, KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients, *Chem. Biodivers.* 5 (2008) 2140–2155.

- 22 D.S. Alberts, R.T. Dorr, New Perspectives on an Old Friend: Optimizing Carboplatin for the Treatment of Solid Tumors, *The Oncologist*. 3 (1998) 15–34.
- 23 J. Reedijk, Metal-Ligand Exchange Kinetics in Platinum and Ruthenium Complexes, *Platin. Met. Rev.* 52 (2008) 2–11.
- 24 J. Reedijk, The relevance of hydrogen bonding in the mechanism of action of platinum antitumor compounds, *Inorg. Chim. Acta.* 198–200 (1992) 873–881.
- 25 O. Nováková, O. Vrána, V.I. Kiseleva, V. Brabec, DNA Interactions of Antitumor Platinum(IV) Complexes, *Eur. J. Biochem.* 228 (1995) 616–624.
- 26 J. Kašpárková, F. Mackay, V. Brabec, P. Sadler, Formation of platinated GG cross-links on DNA by photoactivation of a platinum(IV) azide complex, *J. Biol. Inorg. Chem.* 8 (2003) 741–745.
- 27 Y. Najajreh, J.M. Perez, C. Navarro-Ranninger, D. Gibson, Novel Soluble Cationic trans-Diaminedichloroplatinum(II) Complexes that Are Active against Cisplatin Resistant Ovarian Cancer Cell Lines, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 5189–5195.
- 28 T. Muchova, S.M. Quintal, N.P. Farrell, V. Brabec, J. Kasarkova, Antitumor bifunctional dinuclear Pt(II) complex BBR3535 forms interduplex DNA cross-links under molecular crowding conditions, *J. Biol. Inorg. Chem.* 17 (2012) 239–245.
- 29 C.X. Zhang, S.J. Lippard, New metal complexes as potential therapeutics, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003) 481–489.
- 30 N. Nishiyama, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Kataoka, Cisplatin-Loaded Polymer-Metal Complex Micelle with Time-Modulated Decaying Property as a Novel Drug Delivery System, *Pharmaceut. Res.* 18 (2001) 1035–1041.
- 31 Y. Ohya, K. Nagatomi, T. Ouchi, Synthesis and Cytotoxic Activity of Macromolecular Prodrug of Cisplatin Using Poly(ethylene glycol) with Galactose Residues or Antennary Galactose Units, *Macromol. Biosci.* 1 (2001) 355–363.
- 32 O. Briz, M.A. Serrano, N. Rebollo, B. Hagenbuch, P.J. Meier, H. Koepsell, *et al.*, Carriers Involved in Targeting the Cytostatic Bile Acid-Cisplatin Derivative *scis-Diammine-chloro-cholyglycinate-platinum(II)* and *cis-Diammine-*

- bisursodeoxycholate-platinum(II) toward Liver Cells, *Mol Pharmacol.* 61 (2002) 853–860.
- 33 A. Jackson, J. Davis, R.J. Pither, A. Rodger, M.J. Hannon, Estrogen-Derived Steroidal Metal Complexes: Agents for Cellular Delivery of Metal Centers to Estrogen Receptor-Positive Cells, *Inorg. Chem.* 40 (2001) 3964–3973.
- 34 C. Lottner, K.-C. Bart, G. Bernhardt, H. Brunner, Hematoporphyrin-Derived Soluble Porphyrin–Platinum Conjugates with Combined Cytotoxic and Phototoxic Antitumor Activity, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2064–2078.
- 35 C. Lottner, K.-C. Bart, G. Bernhardt, H. Brunner, Soluble Tetraarylporphyrin–Platinum Conjugates as Cytotoxic and Phototoxic Antitumor Agents, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2079–2089.
- 36 P. Schluga, C.G. Hartinger, A. Egger, E. Reisner, M. Galanski, M.A. Jakupec, *et al.*, Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP, *Dalton Trans.* (2006) 1796–1802.
- 37 Allardyce C. S., Dyson P. J., Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects, *Platinum Met. Rev.* 45 (2001) 62–69.
- 38 G. Sava, S. Zorzet, T. Giraldi, G. Mestroni, G. Zassinovich, Antineoplastic activity and toxicity of an organometallic complex of ruthenium(II) in comparison with cis-PDD in mice bearing solid malignant neoplasms, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 20 (1984) 841–847.
- 39 R. Gagliardi, G. Sava, S. Pacor, G. Mestroni, E. Alessio, Antimetastatic action and toxicity on healthy tissues of Na[trans-RuCl₄(DMSO)Im] in the mouse, *Clin. Exp. Metastasis.* 12 (1994) 93–100.
- 40 A. Bergamo, A. Masi, P.J. Dyson, G. Sava, Modulation of the metastatic progression of breast cancer with an organometallic ruthenium compound, *Int. J. Oncol.* 33 (2008) 1281–1289.
- 41 M.J. Clarke, Ruthenium metallopharmaceuticals, *Coord. Chem. Rev.* 236 (2003) 209–233.
- 42 E. Alessio, Synthesis and Reactivity of Ru-, Os-, Rh-, and Ir-Halide–Sulfoxide Complexes†, *Chem. Rev.* 104 (2004) 4203–4242.

- 43 G. Mestroni, E. Alessio, G. Sava, S. Pacor, M. Coluccia, A. Boccarelli, Water-Soluble Ruthenium(III)-Dimethyl Sulfoxide Complexes: Chemical Behaviour and Pharmaceutical Properties, *Met. Based Drugs*. 1 (1994) 41–63.
- 44 I. Bratsos, A. Bergamo, G. Sava, T. Gianferrara, E. Zangrando, E. Alessio, Influence of the anionic ligands on the anticancer activity of Ru(II)-dmsso complexes: Kinetics of aquation and in vitro cytotoxicity of new dicarboxylate compounds in comparison with their chloride precursors, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 606–617.
- 45 C. Silvestru, Metal complexes in cancer chemotherapy. B. K. Keppler (ed), *Applied Organometallic Chemistry*. VCH Weinham and NY, 8 (1994) 499–500.
- 46 A. Levina, A. Mitra, P.A. Lay, Recent developments in ruthenium anticancer drugs, *Metallomics*. 1 (2009) 458–470.
- 47 E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo, G. Sava, Ruthenium Antimetastatic Agents, *Curr. Top. Med. Chem.* 4 (2004) 1525–1535.
- 48 G. Sava, F. Frausin, M. Cocchietto, F. Vita, E. Podda, P. Spessotto, *et al.*, Actin-dependent tumour cell adhesion after short-term exposure to the antimetastasis ruthenium complex NAMI-A, *Eur. J. Cancer*. 40 (2004) 1383–1396.
- 49 C. Casarsa, M.T. Mischis, G. Sava, TGFbeta1 regulation and collagen-release-independent connective tissue re-modelling by the ruthenium complex NAMI-A in solid tumours, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1648–1654.
- 50 G. Gasser, I. Ott, N. Metzler-Nolte, *Organometallic Anticancer Compounds*, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 3–25.
- 51 E. Antonarakis, A. Emadi, Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time?, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66 (2010) 1–9.
- 52 N.J. Wheate, C.R. Brodie, J.G. Collins, S. Kemp, J.R. Aldrich-Wright, DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis, *Mini Rev. Med. Chem.* 7 (2007) 627–648.
- 53 T. Gianferrara, I. Bratsos, E. Alessio, A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action, *Dalton Trans.* (2009) 7588–7598.
- 54 B. Therrien, W. Ang, F. Chérioux, L. Vieille-Petit, L. Juillerat-Jeanneret, G. Süss-Fink, *et al.*, Remarkable Anticancer Activity of Triruthenium-Arene

- Clusters Compared to Tetraruthenium-Arene Clusters, *J. Cluster Sci.* 18 (2007) 741–752.
- 55 A. Herman, J.M. Tanski, M.F. Tibbetts, C.M. Anderson, Synthesis, Characterization, and in Vitro Evaluation of a Potentially Selective Anticancer, Mixed-Metal [Ruthenium(III)–Platinum(II)] Trinuclear Complex, *Inorg. Chem.* 47 (2008) 274–280.
- 56 A.C.G. Hotze, E.P.L. van der Geer, H. Kooijman, A.L. Spek, J.G. Haasnoot, J. Reedijk, Characterization by NMR Spectroscopy, X-ray Analysis and Cytotoxic Activity of the Ruthenium(II) Compounds $[\text{RuL}_3](\text{PF}_6)_2$ ($\text{L} = 2$ -Phenylazopyridine or *o*-Tolylazopyridine) and $[\text{RuL}'_2\text{L}'](\text{PF}_6)_2$ ($\text{L}', \text{L}'' = 2$ -Phenylazopyridine, 2,2'-Bipyridine), *Eur. J. Inorg. Chem.* 2005 (2005) 2648–2657.
- 57 B. Therrien, G. Süss-Fink, P. Govindaswamy, A.K. Renfrew, P.J. Dyson, The ‘Complex-in-a-Complex’ Cations $[(\text{acac})_2\text{M}\subset\text{Ru}_6(\text{p-iPrC}_6\text{H}_4\text{Me})_6(\text{tpt})_2(\text{dhbq})_3]^{6+}$: A Trojan Horse for Cancer Cells, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 3773–3776.
- 58 B. Desoize, Metals and Metal Compounds in Cancer Treatment, *Anticancer Res.* 24 (2004) 1529–1544.
- 59 I. Ott, R. Gust, Non Platinum Metal Complexes as Anti-cancer Drugs, *Arch. Pharm.* 340 (2007) 117–126.
- 60 P. Collery, B. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, Gallium in cancer treatment, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 283–296.
- 61 P. Köpf-Maier, H. Köpf, E.W. Neuse, Ferricenium complexes: a new type of water-soluble antitumor agent, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 108 (1984) 336–340.
- 62 D. Schlawe, A. Majdalani, J. Velcicky, E. Heßler, T. Wieder, A. Prokop, *et al.*, Iron-Containing Nucleoside Analogues with Pronounced Apoptosis-Inducing Activity, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 1731–1734.
- 63 I. Ott, T. Koch, H. Shorafa, Z. Bai, D. Poeckel, D. Steinhilber, *et al.*, Synthesis, cytotoxicity, cellular uptake and influence on eicosanoid metabolism of cobalt-alkyne modified fructoses in comparison to auranofin and the cytotoxic COX inhibitor Co-ASS, *Org. Biomol. Chem.* 3 (2005) 2282–2286.

- 64 B.M. Sutton, E. McGusty, D.T. Walz, M.J. DiMartino, Oral gold. Antiarthritic properties of alkylphosphinegold coordination complexes, *J. Med. Chem.* 15 (1972) 1095–1098.
- 65 P.F. Smith, G.D. Hoke, D.W. Alberts, P.J. Bugelski, S. Lupo, C.K. Mirabelli, *et al.*, Mechanism of toxicity of an experimental bidentate phosphine gold complexed antineoplastic agent in isolated rat hepatocytes., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249 (1989) 944–950.
- 66 M.P. Rigobello, G. Scutari, R. Boscolo, A. Bindoli, Induction of mitochondrial permeability transition by auranofin, a Gold(I)-phosphine derivative, *Br. J. Pharmacol.* 136 (2002) 1162–1168.
- 67 P. Köpf-Maier, Complexes of metals other than platinum as antitumour agents, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 47 (1994) 1–16.
- 68 S.E. Sherman, D. Gibson, A.H. Wang, S.J. Lippard, X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: cis-[Pt(NH₃)₂(d(pGpG))], *Science.* 230 (1985) 412–417.
- 69 D.J. Hodgson, The Stereochemistry of Metal Complexes of Nucleic Acid Constituents, in: S.J. Lippard (Ed.), *Progress in Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., 2007: pp. 211–254.
- 70 M. Crul, R.C.A. van Waardenburg, J. Beijnen, J.H. Schellens, DNA-based drug interactions of cisplatin, *Cancer Treat. Rev.* 28 (2002) 291–303.
- 71 R.N. Bose, K. Allen, M. Wagner, E. Volckova, D. Li, R.T. Heath, DNA polymerase versus DNA binding to the anticancer drug, cis-platin, *Inorg. Chim. Acta.* 300–302 (2000) 937–943.
- 72 J.R. Bertino, *Encyclopedia of Cancer*, Academic Press, 1997.
- 73 U.-M. Ohndorf, M.A. Rould, Q. He, C.O. Pabo, S.J. Lippard, Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins, *Nature.* 399 (1999) 708–712.
- 74 R.C. Todd, S.J. Lippard, Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds, *Metallomics.* 1 (2009) 280–291.
- 75 J. Malina, C. Hofr, L. Maresca, G. Natile, V. Brabec, DNA interactions of antitumor cisplatin analogs containing enantiomeric amine ligands., *Biophys. J.* 78 (2000) 2008–2021.

- 76 A.M. Pyle, J.K. Barton, Probing Nucleic Acids with Transition Metal Complexes, in: S.J. Lippard (Ed.), *Progress in Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., 2007: pp. 413–475.
- 77 R.P. Hertzberg, P.B. Dervan, Cleavage of DNA with methidiumpropyl-EDTA-iron(II): reaction conditions and product analyses, *Biochemistry*. 23 (1984) 3934–3945.
- 78 H.Y. Mei, J.K. Barton, Tris(tetramethylphenanthroline)ruthenium(II): a chiral probe that cleaves A-DNA conformations, *PNAS*. 85 (1988) 1339–1343.
- 79 L.A. Basile, A.L. Raphael, J.K. Barton, Metal-activated hydrolytic cleavage of DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 7550–7551.
- 80 E. Wexselblatt, E. Yavin, D. Gibson, Cellular interactions of platinum drugs, *Inorg. Chim. Acta*. 393 (2012) 75-83.
- 81 T. Zimmermann, J.V. Burda, Reactions of cisplatin with cysteine and methionine at constant pH; a computational study, *Dalton Trans.* 39 (2010) 1295-1301.
- 82 M.A. Fuertes, C. Alonso, J.M. Pérez, Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance, *Chem. Rev.* 103 (2003) 645–662.
- 83 J. Reedijk, Why Does Cisplatin Reach Guanine-N7 with Competing S-Donor Ligands Available in the Cell?, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2499–2510.
- 84 D. Petrović, B. Stojimirović, B. Petrović, Z.M. Bugarčić, Ž.D. Bugarčić, Studies of interactions between platinum(II) complexes and some biologically relevant molecules, *Bioorga. Med. Chem.* 15 (2007) 4203–4211.
- 85 K.J. Barnham, M.I. Djuran, P. del Socorro Murdoch, P.J. Sadler, Intermolecular displacement of S-bound L-methionine on platinum(II) by guanosine 5'-monophosphate: implications for the mechanism of action of anticancer drugs, *Journal of the Chemical Society, Chem. Commun.* (1994) 721.
- 86 M.I. Djuran, E.L.M. Lempers, J. Reedijk, Reactivity of chloro- and aqua(diethylenetriamine)platinum(II) ions with glutathione, S-methylglutathione, and guanosine 5'-monophosphate in relation to the antitumor activity and toxicity of platinum complexes, *Inorg. Chem.* 30 (1991) 2648–2652.

- 87 A.K. Godwin, A. Meister, P.J. O'Dwyer, C.S. Huang, T.C. Hamilton, M.E. Anderson, High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89 (1992) 3070–3074.
- 88 E. Volckova, L.P. Dudones, R.N. Bose, HPLC Determination of Binding of Cisplatin to DNA in the Presence of Biological Thiols: Implications of Dominant Platinum-Thiol Binding to Its Anticancer Action, *Pharmaceut. Res.* 19 (2002) 124–131.
- 89 P. Mistry, L.R. Kelland, G. Abel, S. Sidhar, K.R. Harrap, The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines., *Br. J. Cancer.* 64 (1991) 215–220.
- 90 D.H. Hamer, Metallothionein1,2, *Ann. Rev. Biochem.* 55 (1986) 913–951.
- 91 A. Pattanaik, G. Bachowski, J. Laib, D. Lemkuil, C.F. Shaw 3rd, D.H. Petering, *et al.*, Properties of the reaction of cis-dichlorodiammineplatinum(II) with metallothionein, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 16121–16128.
- 92 K.B. Nielson, C.L. Atkin, D.R. Winge, Distinct metal-binding configurations in metallothionein., *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 5342–5350.
- 93 A.J. Żelazowski, J.S. Garvey, J.D. Hoeschele, In Vivo and in Vitro binding of platinum to metallothionein, *Arch. Biochem. Biophys.* 229 (1984) 246–252.
- 94 J. Bongers, J.U. Bell, D.E. Richardson, Platinum(II) binding to metallothioneins, *J. Inorg. Biochem.* 34 (1988) 55–62.
- 95 S.L. Kelley, A. Basu, B.A. Teicher, M.P. Hacker, D.H. Hamer, J.S. Lazo, Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs, *Science.* 241 (1988) 1813–1815.
- 96 D.C. Carter, J.X. Ho, Structure of serum albumin, *Adv. Protein Chem.* 45 (1994) 153–203.
- 97 A.I. Ivanov, J. Christodoulou, J.A. Parkinson, K.J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow, *et al.*, Cisplatin binding sites on human albumin, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14721–14730.
- 98 Christodoulou J., Sadler P.J., Tucker A., ¹H NMR of albumin in human blood plasma: drug binding and redox reactions at Cys34, *FEBS Lett.* 376 (1995) 1–5.

- 99 T. Peters Jr, Serum albumin, *Adv. Protein Chem.* 37 (1985) 161–245.
- 100 A.R. Timerbaev, C.G. Hartinger, S.S. Aleksenko, B.K. Keppler, Interactions of Antitumor Metallodrugs with Serum Proteins: Advances in Characterization Using Modern Analytical Methodology, *Chem. Rev.* 106 (2006) 2224–2248.
- 101 R. Mandal, R. Kalke, X.-F. Li, Interaction of Oxaliplatin, Cisplatin, and Carboplatin with Hemoglobin and the Resulting Release of a Heme Group, *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 1391–1397.
- 102 T. Peleg-Shulman, Y. Najajreh, D. Gibson, Interactions of cisplatin and transplatin with proteins. Comparison of binding kinetics, binding sites and reactivity of the Pt-protein adducts of cisplatin and transplatin towards biological nucleophiles, *J. Inorg. Biochem.* 91 (2002) 306–311.
- 103 C.S. Allardyce, P.J. Dyson, J. Coffey, N. Johnson, Determination of drug binding sites to proteins by electrospray ionisation mass spectrometry: the interaction of cisplatin with transferrin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 933–935.
- 104 I. Khalaila, C.S. Allardyce, C.S. Verma, P.J. Dyson, A mass spectrometric and molecular modelling study of cisplatin binding to transferrin, *Chembiochem.* 6 (2005) 1788–1795.
- 105 M. Pongratz, P. Schluga, M.A. Jakupec, V.B. Arion, C.G. Hartinger, G. Allmaier, *et al.*, 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. Atom. Spectrom.* 19 (2004) 46.
- 106 E. Meggers, Targeting proteins with metal complexes, *Chem. Commun.* (2009) 1001–1010.
- 107 S. Ishida, J. Lee, D.J. Thiele, I. Herskowitz, Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals, *PNAS.* 99 (2002) 14298–14302.
- 108 X. Lin, T. Okuda, A. Holzer, S.B. Howell, The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Pharmacol.* 62 (2002) 1154–1159.
- 109 I.-S. Song, N. Savaraj, Z.H. Siddik, P. Liu, Y. Wei, C.J. Wu, *et al.*, Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor

- agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells, *Mol. Cancer Ther.* 3 (2004) 1543–1549.
- 110 S. Yokoo, A. Yonezawa, S. Masuda, A. Fukatsu, T. Katsura, K.-I. Inui, Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity, *Biochem. Pharmacol.* 74 (2007) 477–487.
- 111 H. Burger, A. Zoumaro-Djayoon, A.W.M. Boersma, J. Helleman, E.M.J.J. Berns, R.H.J. Mathijssen, *et al.*, Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2), *Br. J. Pharmacol.* 159 (2010) 898–908.
- 112 T. Ludwig, C. Riethmüller, M. Gekle, G. Schwerdt, H. Oberleithner, Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport, *Kidney Int.* 66 (2004) 196–202.
- 113 J. Maksimoska, L. Feng, K. Harms, C. Yi, J. Kissil, R. Marmorstein, *et al.*, Targeting Large Kinase Active Site with Rigid, Bulky Octahedral Ruthenium Complexes, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 15764–15765.
- 114 A. Bergamo, G. Sava, Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy, *Dalton Trans.* (n.d.) 1267–1272.
- 115 T.M. Malte Bachmann, The serine/threonine kinase Pim-1., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 726–30.
- 116 Y. Bourne, P. Taylor, Z. Radić, P. Marchot, Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site, *EMBO J.* 22 (2003) 1–12.
- 117 E.L.-M. Wong, R.W.-Y. Sun, N.P.-Y. Chung, C.-L.S. Lin, N. Zhu, C.-M. Che, A mixed-valent ruthenium-oxo oxalato cluster $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$ with potent anti-HIV activities, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 4938–4939.
- 118 J.T. Rhule, C.L. Hill, D.A. Judd, R.F. Schinazi, Polyoxometalates in Medicine, *Chem. Rev.* 98 (1998) 327–358.
- 119 E. Toyota, K.K. Ng, H. Sekizaki, K. Itoh, K. Tanizawa, M.N. James, X-ray crystallographic analyses of complexes between bovine beta-trypsin and Schiff base copper(II) or iron(III) chelates, *J. Mol. Biol.* 305 (2001) 471–479.

- 120 S. Li, J. Zhang, J. Li, D. Chen, M. Matteucci, J. Curd, *et al.*, Inhibition of both thioredoxin reductase and glutathione reductase may contribute to the anticancer mechanism of TH-302, *Biol. Trace Elem. Res.* 136 (2010) 294–301.
- 121 A.-B. Witte, K. Anestål, E. Jerremalm, H. Ehrsson, E.S.J. Arnér, Inhibition of thioredoxin reductase but not of glutathione reductase by the major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds, *Free Radic. Biol. Med.* 39 (2005) 696–703.
- 122 E.S. Arnér, H. Nakamura, T. Sasada, J. Yodoi, A. Holmgren, G. Spyrou, Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 1170–1178.
- 123 J.-B. Méric, S. Rottey, K. Olaussen, J.-C. Soria, D. Khayat, O. Rixe, *et al.*, Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 59 (2006) 51–64.
- 124 N. Ghosh, R. Chaki, V. Mandal, S.C. Mandal, COX-2 as a target for cancer chemotherapy, *Pharmacol. Rep.* 62 (2010) 233–244.
- 125 A. Bergamo, B. Gava, E. Alessio, G. Mestroni, B. Serli, M. Cocchietto, *et al.*, Ruthenium-based NAMI-A type complexes with in vivo selective metastasis reduction and in vitro invasion inhibition unrelated to cell cytotoxicity, *Int. J. Oncol.* 21 (2002) 1331–1338.
- 126 G. Sava, S. Zorzet, C. Turrin, F. Vita, M. Soranzo, G. Zabucchi, *et al.*, Dual Action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to collagen, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 1898–1905.
- 127 W.H. Ang, A. De Luca, C. Chapuis-Bernasconi, L. Juillerat-Jeanneret, M. Lo Bello, P.J. Dyson, Organometallic ruthenium inhibitors of glutathione-S-transferase P1-1 as anticancer drugs, *ChemMedChem.* 2 (2007) 1799–1806.
- 128 E. Fahy, S. Subramaniam, H.A. Brown, C.K. Glass, A.H. Merrill Jr, R.C. Murphy, *et al.*, A comprehensive classification system for lipids, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 839–861.
- 129 E. Fahy, S. Subramaniam, R.C. Murphy, M. Nishijima, C.R.H. Raetz, T. Shimizu, *et al.*, Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids, *J. Lipid Res.* 50 Suppl (2009) S9–14.

- 130 H. Kadowaki, M.A. Grant, Relationship of membrane phospholipid composition, lactosylceramide molecular species, and the specificity of CMP-N-acetylneuraminase:lactosylceramide alpha 2,3-sialyltransferase to the molecular species composition of GM3 ganglioside., *J. Lipid Res.* 36 (1995) 1274–1282.
- 131 R.A. Makula, Phospholipid composition of methane-utilizing bacteria., *J. Bacteriol.* 134 (1978) 771–777.
- 132 J. Lessig, H.-J. Glander, J. Schiller, M. Petković, U. Paasch, J. Arnhold, Destabilization of the acrosome results in release of phospholipase A2 from human spermatozoa and subsequent formation of lysophospholipids, *Andrologia.* 38 (2006) 69–75.
- 133 S. Cerolini, A. Maldjian, F. Pizzi, T.M. Gliozzi, Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen, *Reproduction.* 121 (2001) 395–401.
- 134 B. Roelofsen, Molecular architecture and dynamics of the plasma membrane lipid bilayer: The red blood cell as a model, *Infection.* 19 (1991) S206–S209.
- 135 Y. Shounan, X. Feng, P.J. O’Connell, Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity, *J. Immunol. Methods.* 217 (1998) 61–70.
- 136 R. W. Alers, Cell Membrane Structures and Functions in: G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R.W. Albers, S.K. Fisher, M.D. Uhler (Ed.), *Basic Neurochemistry*, 6th ed, Lippincott-Raven., 1999.
- 137 M. Zampagni, E. Evangelisti, R. Cascella, G. Liguri, M. Becatti, A. Pensalfini, *et al.*, Lipid rafts are primary mediators of amyloid oxidative attack on plasma membrane, *J. Mol. Med.* 88 (2010) 597–608.
- 138 K. Rebolj, B. Bakrač, M. Garvas, K. Ota, M. Šentjurc, C. Potrich, *et al.*, EPR and FTIR studies reveal the importance of highly ordered sterol-enriched membrane domains for ostreolysin activity, *BBA-Biomembranes.* 1798 (2010) 891–902.
- 139 K. Wang, J. Lu, R. Li, The events that occur when cisplatin encounters cells, *Coord. Chem. Rev.* 151 (1996) 53–88.
- 140 G. Arancia, G. Donelli, Cell membranes as target for anticancer agents, *Pharmacol.- Res.* 24 (1991) 205–217.

- 141 C.P. Burns, H.L. Gurtoo, Membranes and Cancer Chemotherapy, *Cancer Invest.* 6 (1988) 439–451.
- 142 M.-T. Dimanche-Boitrel, O. Meurette, A. Rebillard, S. Lacour, Role of early plasma membrane events in chemotherapy-induced cell death, *Drug Resist. Update.* 8 (2005) 5–14.
- 143 G. Speelmans, W.H.H.M. Sips, R.J.H. Grisel, R.W.H.M. Staffhorst, A.M.J. Fichtinger-Schepman, J. Reedijk, *et al.*, The interaction of the anti-cancer drug cisplatin with phospholipids is specific for negatively charged phospholipids and takes place at low chloride ion concentration, *BBA-Biomembranes.* 1283 (1996) 60–66.
- 144 K.D. Taylor, R. Goel, F.H. Shirazi, M. Molepo, P. Popovic, D.J. Stewart, *et al.*, Pressure tuning infrared spectroscopic study of cisplatin-induced structural changes in a phosphatidylserine model membrane, *Br. J. Cancer.* 72 (1995) 1400–1405.
- 145 M. Jensen, M. Bjerring, N.C. Nielsen, W. Nerdal, Cisplatin interaction with phosphatidylserine bilayer studied by solid-state NMR spectroscopy, *J. Biol. Inorg. Chem.* 15 (2010) 213–223.
- 146 M. Jensen, W. Nerdal, Anticancer cisplatin interactions with bilayers of total lipid extract from pig brain: A ¹³C, ³¹P and ¹⁵N solid-state NMR study, *Eur. J. Pharm. Sci.* 34 (2008) 140–148.
- 147 K.N.J. Burger, R.W.H.M. Staffhorst, B. De Kruijff, Interaction of the anti-cancer drug cisplatin with phosphatidylserine in intact and semi-intact cells, *BBA-Biomembranes.* 1419 (1999) 43–54.
- 148 Q. Liu, Y. Qu, R. Van Antwerpen, N. Farrell, Mechanism of the Membrane Interaction of Polynuclear Platinum Anticancer Agents. Implications for Cellular Uptake[†], *Biochemistry-US.* 45 (2006) 4248–4256.
- 149 G. Speelmans, R.W.H.M. Staffhorst, K. Versluis, J. Reedijk, B. de Kruijff, Cisplatin Complexes with Phosphatidylserine in Membranes[†], *Biochemistry-US.* 36 (1997) 10545–10550.
- 150 K.N.J. Burger, R.W.H.M. Staffhorst, B. De Kruijff, Interaction of the anti-cancer drug cisplatin with phosphatidylserine in intact and semi-intact cells, *BBA-Biomembranes.* 1419 (1999) 43–54.

- 151 R.S. Pardini, Nutritional intervention with omega-3 fatty acids enhances tumor response to anti-neoplastic agents, *Chem. Biol. Interact.* 162 (2006) 89–105.
- 152 U.N. Das, N. Madhavi, G.S. Kumar, M. Padma, P. Sangeetha, Can tumour cell drug resistance be reversed by essential fatty acids and their metabolites?, *Prostag. Leukotr. Ess.* 58 (1998) 39–54.
- 153 J.A. Plumb, W. Luo, D.J. Kerr, Effect of polyunsaturated fatty acids on the drug sensitivity of human tumour cell lines resistant to either cisplatin or doxorubicin., *Br. J. Cancer.* 67 (1993) 728–733.
- 154 X. Liang, Y. Huang, Alteration of membrane lipid biophysical properties and resistance of human lung adenocarcinoma A549 cells to cisplatin, *Sci. China C, Life Sci.* 44 (2001) 25–32.
- 155 X. Liang, Y. Huang, Physical state changes of membrane lipids in human lung adenocarcinoma A549 cells and their resistance to cisplatin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 (2002) 1248–1255.
- 156 O. Zava, S.M. Zakeeruddin, C. Danelon, H. Vogel, M. Grätzel, P.J. Dyson, A Cytotoxic Ruthenium Tris(Bipyridyl) Complex that Accumulates at Plasma Membranes, *ChemBioChem.* 10 (2009) 1796–1800.
- 157 F.R. Svensson, M. Matson, M. Li, P. Lincoln, Lipophilic ruthenium complexes with tuned cell membrane affinity and photoactivated uptake, *Biophys. Chem.* 149 (2010) 102–106.
- 158 A.R. Khokhar, S. Al-Baker, T. Brown, R. Perez-Soler, Chemical and biological studies on a series of lipid-soluble (trans-(R,R)- and -(S,S)-1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) complexes incorporated in liposomes, *J. Med. Chem.* 34 (1991) 325–329.
- 159 R. Perez-Soler, I. Han, S. Al-Baker, A.R. Khokhar, Lipophilic platinum complexes entrapped in liposomes: improved stability and preserved antitumor activity with complexes containing linear alkyl carboxylate leaving groups, *Cancer Chemoth. Pharm.* 33 (1994) 378–384.
- 160 A. S. Janoff, *Liposomes: Rational Design*, Taylor & Francis, 1998.
- 161 V.P. Torchilin, V.G. Omelyanenko, M.I. Papisov, A.A. Bogdanov Jr., V.S. Trubetskoy, J.N. Herron, et al., Poly(ethylene glycol) on the liposome surface:

- on the mechanism of polymer-coated liposome longevity, *BBA-Biomembranes*. 1195 (1994) 11–20.
- 162 A. Schroeder, J. Kost, Y. Barenholz, Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes, *Chem. Phys. Lipids*. 162 (2009) 1–16.
- 163 D. Needham, G. Anyarambhatla, G. Kong, M.W. Dewhirst, A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model, *Cancer Res*. 60 (2000) 1197–1201.
- 164 T. Abe, K. Sakamoto, H. Kamohara, Y. Hirano, N. Kuwahara, M. Ogawa, Group II phospholipase A2 is increased in peritoneal and pleural effusions in patients with various types of cancer, *Int. J. Cancer*. 74 (1997) 245–250.
- 165 S. Yamashita, M. Ogawa, K. Sakamoto, T. Abe, H. Arakawa, J. Yamashita, Elevation of serum group II phospholipase A2 levels in patients with advanced cancer, *Clin. Chim. Acta*. 228 (1994) 91–99.
- 166 E. Kaiser, Phospholipase A2: its usefulness in laboratory diagnostics, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*. 36 (1999) 65–163.
- 167 Y.T. Jeon, Y.S. Song, Cyclooxygenases in cancer: chemoprevention and sensitization to conventional therapies, *Mini Rev. Med. Chem*. 6 (2006) 827–833.
- 168 S.-I. Yamashita, J.-I. Yamashita, K. Sakamoto, K. Inada, Y. Nakashima, K. Murata, *et al.*, Increased expression of membrane-associated phospholipase A2 shows malignant potential of human breast cancer cells, *Cancer*. 71 (1993) 3058–3064.
- 169 R. Lattanzio, M. Marchisio, R. La Sorda, N. Tinari, M. Falasca, S. Alberti, *et al.*, Overexpression of activated phospholipase C γ 1 is a risk factor for distant metastases in T1-T2, N0 breast cancer patients undergoing adjuvant chemotherapy, *Int. J. Cancer*. 132 (2012) 1022-1031.
- 170 W. Su, Q. Chen, M.A. Frohman, Targeting phospholipase D with small-molecule inhibitors as a potential therapeutic approach for cancer metastasis, *Future Oncol*. 5 (2009) 1477–1486.
- 171 S. W. Edwards, *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*, Cambridge University Press, 1994

- 172 J. Ghosh, C.E. Myers, Arachidonic Acid Stimulates Prostate Cancer Cell Growth: Critical Role of 5-Lipoxygenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235 (1997) 418–423.
- 173 S.H. Hong, I. Avis, M.D. Vos, A. Martínez, A.M. Treston, J.L. Mulshine, Relationship of Arachidonic Acid Metabolizing Enzyme Expression in Epithelial Cancer Cell Lines to the Growth Effect of Selective Biochemical Inhibitors, *Cancer Res.* 59 (1999) 2223–2228.
- 174 F. Marks, K. Müller-Decker, G. Fürstenberger, A causal relationship between unscheduled eicosanoid signaling and tumor development: cancer chemoprevention by inhibitors of arachidonic acid metabolism, *Toxicology.* 153 (2000) 11–26.
- 175 F.H. Chilton, R.C. Murphy, Remodeling of arachidonate-containing phosphoglycerides within the human neutrophil., *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 7771–7777.
- 176 Y.C. Chai, D.G. Binion, G.M. Chisolm, Relationship of molecular structure to the mechanism of lysophospholipid-induced smooth muscle cell proliferation, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279 (2000) H1830–1838.
- 177 J. Lu, Y. Xiao, L.M. Baudhuin, G. Hong, Y. Xu, Role of ether-linked lysophosphatidic acids in ovarian cancer cells, *J. Lipid Res.* 43 (2002) 463–476.
- 178 M. Falasca, D. Corda, Elevated levels and mitogenic activity of lysophosphatidylinositol in k-ras-transformed epithelial cells, *Eur. J. Biochem.* 221 (1994) 383–389.
- 179 Y. Xu, Y. Xiao, L.M. Baudhuin, B.M. Schwartz, The Role and Clinical Applications of Bioactive Lysolipids in Ovarian Cancer, *J. Soc. Gynecol. Investig.* 8 (2001) 1–13.
- 180 B.M. Schwartz, G. Hong, B.H. Morrison, W. Wu, L.M. Baudhuin, Y.-J. Xiao, *et al.*, Lysophospholipids Increase Interleukin-8 Expression in Ovarian Cancer Cells, *Gynecol. Oncol.* 81 (2001) 291–300.
- 181 E.A. Kim, J.A. Kim, M.H. Park, S.C. Jung, S.H. Suh, M.-G. Pang, *et al.*, Lysophosphatidylcholine induces endothelial cell injury by nitric oxide production through oxidative stress, *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 22 (2009) 325–331.

- 182 J.T. Wong, K. Tran, G.N. Pierce, A.C. Chan, K. O, P.C. Choy, Lysophosphatidylcholine Stimulates the Release of Arachidonic Acid in Human Endothelial Cells, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 6830–6836.
- 183 A. Gómez-Muñoz, L. O'Brien, R. Hundal, U.P. Steinbrecher, Lysophosphatidylcholine stimulates phospholipase D activity in mouse peritoneal macrophages, *J. Lipid Res.* 40 (1999) 988–993.
- 184 W.K. Kim-Park, M.A. Moore, Z.W. Hakki, M.J. Kowolik, Activation of the Neutrophil Respiratory Burst Requires Both Intracellular and Extracellular Calcium, *Ann. NY Acad. Sci.* 832 (1997) 394–404.
- 185 K. Athenstaedt, G. Daum, Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism, *Eur. J. Biochem.* 266 (1999) 1–16.
- 186 E.E. Kooijman, K.M. Carter, E.G. van Laar, V. Chupin, K.N.J. Burger, B. de Kruijff, What Makes the Bioactive Lipids Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid So Special?†, *Biochemistry-US.* 44 (2005) 17007–17015.
- 187 B.P. Young, J.J.H. Shin, R. Orij, J.T. Chao, S.C. Li, X.L. Guan, *et al.*, Phosphatidic Acid Is a pH Biosensor That Links Membrane Biogenesis to Metabolism, *Science.* 329 (2010) 1085–1088.
- 188 D. Geng, J. Chura, M.F. Roberts, Activation of Phospholipase D by Phosphatidic Acid enhanced vesicle binding, Phosphatidic acid-Ca²⁺ interaction, or an allosteric effect?, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 12195–12202.
- 189 L.C. McPhail, K.A. Waite, D.S. Regier, J.B. Nixon, D. Qualliotine-Mann, W.X. Zhang, *et al.*, A novel protein kinase target for the lipid second messenger phosphatidic acid, *Biochim. Biophys. Acta.* 1439 (1999) 277–290.
- 190 A. Palicz, T.R. Foubert, A.J. Jesaitis, L. Marodi, L.C. McPhail, Phosphatidic acid and diacylglycerol directly activate NADPH oxidase by interacting with enzyme components, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 3090–3097.
- 191 D.S. Regier, K.A. Waite, R. Wallin, L.C. McPhail, A phosphatidic acid-activated protein kinase and conventional protein kinase C isoforms phosphorylate p22(phox), an NADPH oxidase component, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 36601–36608.

- 192 H. Xiao, R.A. Siddiqui, M.H. Al-Hassani, D. Sliva, R.J. Kovacs, Phospholipids released from activated platelets improve platelet aggregation and endothelial cell migration, *Platelets*. 12 (2001) 163–170.
- 193 D.A. Six, E.A. Dennis, The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization, *BBA-Mol. Cell Biol. L*. 1488 (2000) 1–19.
- 194 I. Kudo, M. Murakami, Phospholipase A2 enzymes, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69 (2002) 3–58.
- 195 H.M. Verheij, A.J. Slotboom, G.H. de Haas, Structure and function of phospholipase A2, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91 (1981) 91–203.
- 196 R.J.A. Fijneman, R.T. Cormier, The roles of sPLA2-IIA (Pla2g2a) in cancer of the small and large intestine, *Front. Biosci.* 13 (2008) 4144–4174.
- 197 Z. Dong, Y. Liu, K.F. Scott, L. Levin, K. Gaitonde, R.B. Bracken, *et al.*, Secretory phospholipase A2-IIa is involved in prostate cancer progression and may potentially serve as a biomarker for Prostate Cancer, *Carcinogenesis*. (2010).
- 198 J.A. Yu, S. Kalatardi, J. Dohse, M.R. Sadaria, X. Meng, D.A. Fullerton, *et al.*, Group Iia sPLA2 Inhibition Attenuates NF- κ B Activity and Promotes Apoptosis of Lung Cancer Cells, *Anticancer Res.* 32 (2012) 3601–3607.
- 199 J.A. Yu, M.R. Sadaria, X. Meng, S. Mitra, L. Ao, D.A. Fullerton, *et al.*, Lung cancer cell invasion and expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) are attenuated by secretory phospholipase A2 inhibition, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 143 (2012) 405–411.
- 200 M. Murakami, T. Kambe, S. Shimbara, S. Yamamoto, H. Kuwata, I. Kudo, Functional association of type IIA secretory phospholipase A(2) with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 29927–29936.
- 201 M. Murakami, R.S. Koduri, A. Enomoto, S. Shimbara, M. Seki, K. Yoshihara, *et al.*, Distinct arachidonate-releasing functions of mammalian secreted phospholipase A2s in human embryonic kidney 293 and rat mastocytoma RBL-

- 2H3 cells through heparan sulfate shuttling and external plasma membrane mechanisms, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 10083–10096.
- 202 M. Murakami, T. Kambe, S. Shimbara, K. Higashino, K. Hanasaki, H. Arita, *et al.*, Different functional aspects of the group II subfamily (Types IIA and V) and type X secretory phospholipase A(2)s in regulating arachidonic acid release and prostaglandin generation. Implications of cyclooxygenase-2 induction and phospholipid scramblase-mediated cellular membrane perturbation, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 31435–31444.
- 203 M. MacPhee, K.P. Chepenik, R.A. Liddell, K.K. Nelson, L.D. Siracusa, A.M. Buchberg, The secretory phospholipase A2 gene is a candidate for the Mom1 locus, a major modifier of ApcMin-induced intestinal neoplasia, *Cell*. 81 (1995) 957–966.
- 204 J. Chen, S.J. Engle, J.J. Seilhamer, J.A. Tischfield, Cloning and characterization of novel rat and mouse low molecular weight Ca(2+)-dependent phospholipase A2s containing 16 cysteines, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 23018–23024.
- 205 J. Chen, S.J. Engle, J.J. Seilhamer, J.A. Tischfield, Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca(2+)-dependent phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 2365–2368.
- 206 M. Murakami, S. Shimbara, T. Kambe, H. Kuwata, M.V. Winstead, J.A. Tischfield, *et al.*, The functions of five distinct mammalian phospholipase A2S in regulating arachidonic acid release. Type IIA and type V secretory phospholipase A2S are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A2, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14411–14423.
- 207 S. Jovanović, B. Petrović, D. Čanović, Ž.D. Bugarčić, Kinetics of the substitution reactions of some Pt(II) complexes with 5'-GMP and L-histidine, *Int. J. Chem. Kinet.* 43 (2011) 99–106.
- 208 M. Arsenijević, M. Milovanović, V. Volarević, D. Čanović, N. Arsenijević, T. Soldatović, *et al.*, Cytotoxic properties of platinum(IV) and dinuclear platinum(II) complexes and their ligand substitution reactions with guanosine-5'-monophosphate, *Transit. Metal Chem.* 37 (2012) 481–488.

- 209 S. Jovanović, B. Petrović, Ž.D. Bugarčić, UV-Vis, HPLC, and ¹H-NMR studies of the substitution reactions of some Pt(IV) complexes with 5'-GMP and L-histidine, *J. Coord. Chem.* 63 (2010) 2419–2430.
- 210 N. Murthy, J.R. Robichaud, D.A. Tirrell, P.S. Stayton, A.S. Hoffman, The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption, *J. Control Release.* 61 (1999) 137–143.
- 211 J. Folch, M. Lees, G. H. S. Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226 (1957) 497–509.
- 212 H.G. Rose, M. Oklander, Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes, *J. Lipid Res.* 6 (1965) 428–431.
- 213 L. Thomas, H.A. Scheidt, A. Bettio, A.G. Beck-Sickinger, D. Huster, O. Zschörnig, The interaction of neuropeptide Y with negatively charged and zwitterionic phospholipid membranes, *Eur. Biophys. J.* 38 (2009) 663–677.
- 214 M.J. Hope, M.B. Bally, G. Webb, P.R. Cullis, Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential, *BBA-Biomembranes.* 812 (1985) 55–65.
- 215 L.D. Mayer, M.J. Hope, P.R. Cullis, A.S. Janoff, Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles, *BBA-Biomembranes.* 817 (1985) 193–196.
- 216 B. Fuchs, R. Süß, K. Teuber, M. Eibisch, J. Schiller, Lipid analysis by thin-layer chromatography--a review of the current state, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 2754–2774.
- 217 B. Fuchs, Analysis of phospholipids and glycolipids by thin-layer chromatography-matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1259 (2012) 62–73.
- 218 B. Fuchs, R. Süß, A. Nimptsch, J. Schiller, MALDI-TOF-MS Directly Combined with TLC: A Review of the Current State, *Chromatographia.* 69 (2009) 95–105.
- 219 F. Hillenkamp, M. Karas, The MALDI Process and Method, in: F. Hillenkamp, J. P. Katalinić (Eds), *MALDI MS: A practical Guide to Instrumentation*,

- Methods and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007. pp. 1–28.
- 220 M. Petković, T. Kamčeva, FAB, ESI and MALDI Mass Spectrometric methods in the study of metallo-drugs and their biomolecular interactions, *Metallomics*. 3 (2011) 550–565.
- 221 B. Damnjanović, T. Kamčeva, B. Petrović, Ž.D. Bugarčić, M. Petković, Laser desorption and ionization time-of-flight versus matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry of Pt(II) and Ru(III) metal complexes, *Anal. Methods*. 3 (2011.) 400–407.
- 222 B. Fuchs, J. Schiller, MALDI-TOF MS analysis of lipids from cells, tissues and body fluids, *Subcell. Biochem.* 49 (2008) 541–565.
- 223 B. Fuchs, J. Schiller, Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 111 (2009) 83–98.
- 224 T. Kamčeva, J. Flemmig, B. Damnjanović, J. Arnhold, A. Mijatović, M. Petković, Inhibitory effect of platinum and ruthenium bipyridyl complexes on porcine pancreatic phospholipase A2, *Metallomics*. 3 (2011) 1056–1063.
- 225 R.A. Steiner, H.J. Rozeboom, A. de Vries, K.H. Kalk, G.N. Murshudov, K.S. Wilson, et al., X-ray structure of bovine pancreatic phospholipase A2 at atomic resolution, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57 (2001) 516–526.
- 226 R.D. Ludescher, I.D. Johnson, J.J. Volwerk, G.H. De Haas, P.C. Jost, B.S. Hudson, Rotational dynamics of the single tryptophan of porcine pancreatic phospholipase A2, its zymogen, and an enzyme/micelle complex. A steady-state and time-resolved anisotropy study, *Biochemistry-US*. 27 (1988) 6618–6628.
- 227 L.S. Chang, C.C. Yang, Structural determinants of the intrinsic fluorescence emission in notexin and phospholipase A2 enzymes, *J. Protein Chem.* 12 (1993) 579–583.
- 228 A.J. Plaunt, M.B. Courbanou, K.D. Cuisson, K.M. Harmatys, B.D. Smith, Selective non-covalent triggered release from liposomes, *Chem. Commun.* 48 (2012) 8123–8125.
- 229 Y. Kapoor, B.A. Howell, A. Chauhan, Liposome Assay for Evaluating Ocular Toxicity of Surfactants, *IOVS*. 50 (2009) 2727–2735.

- 230 M. Liu, X. Mao, C. Ye, H. Huang, J.K. Nicholson, J.C. Lindon, Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 132 (1998) 125–129.
- 231 M.J. Waring, Lipophilicity in drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov.* 5 (2010) 235–248.
- 232 N. Margiotta, C. Marzano, V. Gandin, D. Osella, M. Ravera, E. Gabano, *et al.*, Revisiting [PtCl₂(cis-1,4-DACH)]: An Underestimated Antitumor Drug with Potential Application to the Treatment of Oxaliplatin-Refractory Colorectal Cancer, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 7182–7192.
- 233 J.A. Platts, D.E. Hibbs, T.W. Hambley, M.D. Hall, Calculation of the Hydrophobicity of Platinum Drugs, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 472–474.
- 234 A. Ghezzi, M. Aceto, C. Cassino, E. Gabano, D. Osella, Uptake of antitumor platinum(II)-complexes by cancer cells, assayed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 73–78.
- 235 P.H. Hinderling, Red Blood Cells: A Neglected Compartment in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, *Pharmacol. Rev.* 49 (1997) 279–295.
- 236 S.-J. Lim, M.-K. Lee, C.-K. Kim, Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticle powders, *J. Control. Release.* 100 (2004) 53–61.
- 237 R. Parthasarathy, P.G. Sacks, D. Harris, H. Brock, K. Mehta, Interaction of liposome-associated all-trans-retinoic acid with squamous carcinoma cells, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34 (1994) 527–534.
- 238 T. Lemma, R. Mandal, X.-F. Li, J. Pawliszyn, Investigation of interaction between human hemoglobin A0 and platinum anticancer drugs by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1803–1809.
- 239 M. Petkovic, J. Schiller, M. Müller, S. Benard, S. Reichl, K. Arnold, *et al.*, Detection of individual phospholipids in lipid mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: phosphatidylcholine prevents the detection of further species, *Anal. Biochem.* 289 (2001) 202–216.

- 240 M. Kliman, J.C. May, J.A. McLean, Lipid analysis and lipidomics by structurally selective ion mobility-mass spectrometry, *BBA-Mol. Cell Biol. L.* 1811 (2011) 935–945.
- 241 B. Fuchs, R. Süß, J. Schiller, An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research, *Prog. Lipid Res.* 49 (2010) 450–475.
- 242 J. Schiller, R. Süß, J. Arnhold, B. Fuchs, J. Lessig, M. Müller, et al., Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research, *Prog. Lipid Res.* 43 (2004) 449–488.
- 243 M. Radisavljević, T. Kamčeva, I. Vukićević, M. Radoičić, Z. Šaponjić, M. Petković, Colloidal TiO₂ nanoparticles as substrates for M(S)ALDI mass spectrometry of transition metal complexes, *Rapid Commun. Mass Sp.* 26 (2012) 2041–2050.
- 244 S. Ohnishi, T. Ito, Calcium-induced phase separations in phosphatidylserine-phosphatidylcholine membranes, *Biochemistry-US.* 13 (1974) 881–887.
- 245 S. Dussert, M.W. Davey, A. Laffargue, S. Doulebeau, R. Swennen, H. Etienne, Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds, *Physiol. Plant.* 127 (2006) 192–204.
- 246 D.B. Northrop, W.W. Cleland, The Kinetics of Pig Heart Triphosphopyridine Nucleotide-Isocitrate Dehydrogenase II. Dead-end and multiple inhibition studies, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 2928–2931.
- 247 M. Radisavljević, T. Kamčeva, Z.D. Bugarčić, M. Petković, Inhibitory effect of cisplatin and [Pt(dach)Cl₂] on the activity of phospholipase A₂, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* (2012) in press.
- 248 K.B. Glaser, Regulation of phospholipase A₂ enzymes: selective inhibitors and their pharmacological potential, *Adv. Pharmacol.* 32 (1995) 31–66.
- 249 G. Haukenes, H. Blom, False positive rubella virus haemagglutination inhibition reactions: Occurrence and disclosure, *Med. Microbiol. Immunol.* 161 (1975) 99–106.
- 250 R. Ganendren, F. Widmer, V. Singhal, C. Wilson, T. Sorrell, L. Wright, In Vitro Antifungal Activities of Inhibitors of Phospholipases from the Fungal Pathogen

- Cryptococcus neoformans, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 1561–1569.
- 251 J. Balsinde, M.A. Balboa, P.A. Insel, E.A. Dennis, Regulation and inhibition of phospholipase A2, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 (1999) 175–189.
- 252 Y. Chen, A.E. Hagerman, Characterization of Soluble Non-covalent Complexes between Bovine Serum Albumin and β -1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-d-glucopyranose by MALDI-TOF MS, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 4008–4011.
- 253 Q. Ma, Y. Li, J. Du, H. Liu, K. Kanazawa, T. Nemoto, et al., Copper binding properties of a tau peptide associated with Alzheimer's disease studied by CD, NMR, and MALDI-TOF MS, *Peptides.* 27 (2006) 841–849.
- 254 P. Hannewald, B. Maunit, J.-F. Muller, Tubulin-binding drug screening by MALDI-TOFMS, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4390–4397.
- 255 P. Hannewald, B. Maunit, J.-F. Muller, Screening of DHFR-binding drugs by MALDI-TOFMS, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 1335–1344.
- 256 F.M. Van Wezel, G.H. De Haas, Phospholipase A2 isoenzyme from porcine pancreas. Purification and some properties, *Biochim. Biophys. Acta.* 410 (1975) 299–309.
- 257 P. Sathyadevi, P. Krishnamoorthy, N.S.P. Bhuvanesh, P. Kalaiselvi, V. Vijaya Padma, N. Dharmaraj, Organometallic ruthenium(II) complexes: Synthesis, structure and influence of substitution at azomethine carbon towards DNA/BSA binding, radical scavenging and cytotoxicity, *Eur. J. Med. Chem.* 55 (2012) 420–431.

Lista skraćenica

AA	Arahidonska kiselina
AchE	Acetilholinesteraza
ATP	Adenozin tri fosfat
Bipy	2,2'-bipiridin
CHCA	α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina
Cis-DDP	<i>cis</i> -diamino-dihloro-platina(II)
COX	Ciklooksigenaza
cPLA₂	Citosolna fosfolipaza A ₂
Crt1	Membranski treanporter za bakar
Cys	Cistein
Dach	1,2-diaminocikloheksan
DAG	Dijaglicerol
DHB	2,5-dihidroksibenzojeva kiselina
DmsO	Dimetilsulfoksid
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
Dppe	Difenilfosfinoetanski ligand
EDTA	Etilen-diamin-tetra-sirćetna kiselina
En	Etilendiamin
ESI	Elektron-sprej jonizacija
GSH	Glutation redukovani
GSSG	Glutation oksidovani
HIV	Humani visrus imunodeficijencije
HMG	Grupa visoke mobilnosti
HPTLC	Tankoslojna hromatografija visokih performansi
HS	Heparan sulfat
HSPG	Glikozil-fosfatidilinozitol
Im	Imidazol
Ind	Indazol
IP₃	Inozil-trifosfat
iPLA₂	Fosfolipaza A ₂ nezavisna od jona Ca ²⁺
IR	Infra-crvena oblast elektromagnetnog spektra

LOX	Lipooksigenaza
LPE	Lizofosfatidil-etanolamin
LPPC	1-lauroil-2-palmitoil-fosfatidilholin
MALDI	Laserska desorpcija i jonizacija potpomognuta matricom/matriksom
MMP	Metaloproteinaza
MS	Masena spektrometija
MT	Metalotionein
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMR	Nuklearna magnetna rezonancija
PA	Fosfatidna kiselina
PAF-AH	Acetilhidrolaze specifične za trombocit-aktivirajući faktor
PBS	Fosfatni pufer
PC	Fosfatidil-holin
PC(12:0/16:0)	1-dodekanoil-2-oktadekanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
PC(16:0/18:1)	1-heksadekanoil-2-oktadekanoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
PE	Fosfatidil-etanolamin
PEG	Polietilen-glikol
PG	Fosfatidil-glicerol
PI	Fosfatidil-inozitol
PIP₂	Palmitoil-2-oleoil-fosfatidilinozitol-4',5' bifosfat
PKC	Protein kinaza
PLA₁, PLA₂	Fosfolipaza A ₁ i A ₂
PLB	Fosfolipaza B
PLC	Fosfolipaza C
PLD	Fosfolipaza D
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilholin
PS	Fosfatidil-serin
PTA	1,3,5-triaza-7-fosfaadamantan
RSSR	Disulfidni most
SA	3,5-dimetoksi-4-hidroksicimetna kiselina, sinapinska kiselina
SH	Tiolna grupa
SM	Sfingomijelin

sPLA₂	Sekretorna fosfolipaza A ₂
<i>Terpy</i>	Terpiridin
TLC	Tankoslojna hromatografija
TOF	Vreme preleta („time-of-flight“)
Trp	Triptofan
U.S. FDA	Američka administracija za hranu i lekove
UV	Ultraljubičasta oblast elektromagnetnog spektra

Biografija

Tina Kamčeva je rođena 22.03.1985. god. u Podgorici, gde je završila osnovnu školu i prirodno-matematički smer gimnazije.

Diplomirala je na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,77. Diplomski rad na temu „EPR detekcija i simulacija elektrohemijski generisanog vodoničnog adukta DEPMPO/H“, pod mentorstvom dr Miloša Mojovića, ocenjen je 10. Za izvanredne rezultate u toku studiranja nagrađena je od strane Srpskog hemijskog društva (2010) i Regionalne privredne komore u Užicu (2009).

Doktorske studije na Fakultetu za fizičku hemiju započela je 2009. godine. Od januara 2010. godine, radila je kao istraživač pripravnik, a od 2011. kao istraživač saradnik u Laboratoriji za fizičku hemiju INN „Vinča“. Učesnik je na projektu „Ispitivanje mehanizma reakcija kompleksa jona prelaznih metala sa biološki značajnim ligandima“ (172011) pod metorstvom dr Marijane Petković.

Deo eksperimentalnih rezultata za doktorsku disertaciju, Kamčeva je prikupila u toku boravka na Institutu za medicinsku fiziku i biofiziku Univerziteta u Lajpcigu, u grupi prof. dr Jurgena Arnholda (*Jürgen Arnhold*). Saradnja sa ovim prestižnim institutom je ostvarena zahvaljujući bilateralnoj saradnji sa INN „Vinča“ (2010) i istraživačke stipendije za doktorante i mlade naučnike od Nemačke službe za akademsku razmenu (*DAAD 2011*).

Član je Srpskog hemijskog društva (2010) i organizacije *Mensa* (2001). Bavila se popularizacijom nauke na festivalima nauke u Beogradu, Podgorici, Đenovi, Sofiji i Seulu i na manifestacijama u okviru INN „Vinča“. Govori tečno engleski, italijanski i norveški jezik.

Kamčeva je udata, trenutno živi u Bergenu u Norveškoj i radi kao istraživač u Laboratoriji za kliničku biohemiju pri Univerzitetnoj bolnici Haukeland.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Тина Камчева

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Интеракција комплекса платине и рутенијума са
панкреасном фосфолипазом А2 и фосфолипидима

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

Потпис докторанда

У Београду, 25.06.2013.

Тина Камчева

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Тина Камчева

Број уписа _____

Студијски програм докторске студије ФФХ

Наслов рада Интеракција комплекса платине и рутенијума са панкреасном
фосфолипазом А2 и фосфолипидима

Ментор проф. др Милош Мозовић и др Маријана Петковић

Потписани Тина Камчева

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

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 Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.06.2013.

Тина Камчева

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Интеракција комплекса платине и рутенијума са панкреасном фосфолипазом А₂ и фосфолипидима

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 25.06.2013.

Потпис докторанда

Кашисевић