

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marijana S. Pavlović

**ANTITUMORSKI POTENCIJAL
NOVOSINTETISANIH RUTENIJUM(II)-ARENSKIH
KOMPLEKSA SA BIOAKTIVNIM LIGANDIMA *IN*
*VITRO***

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marijana S. Pavlović

**ANTITUMOR POTENTIAL OF NEWLY
SYNTHESIZED RUTHENIUM(II)-ARENE
COMPLEXES WITH BIOACTIVE LIGANDS *IN VITRO***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Mentori:

Dr Nevenka Gligorijević, viši naučni saradnik

Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Dr Milica Markelić, docent

Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

Dr Aleksandra Korać, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

Dr Sanja Grgurić-Šipka, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Hemijski fakultet

Dr Sandra Arandžević, naučni savetnik

Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane:

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, na Odeljenju za eksperimentalnu onkologiju, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja broj III 41026, pod nazivom „Farmakodinamska i farmakogenomska ispitivanja novijih lekova u lečenju solidnih tumora“, u periodu od 2017. do 2020. godine.

Rukovodiocu projekta, naučnom savetniku dr sci med Siniši Raduloviću, dugujem veliku zahvalnost na ukazanoj prilici za angažman na projektu, na poverenju, korisnim savetima i uvek prisutnom optimizmu. Dr Nevenki Gligorijević se zahvaljujem na pomoći pri eksperimentalnom radu, a pre svega na izdvojenom vremenu, razumevanju i podršci. Dr Milici Markelić se zahvaljujem na stručnoj pomoći i svim vrednim savetima tokom pisanja disertacije. Prof. Aleksandri Korać i dr Sandri Arandelović se zahvaljujem na pomoći tokom izrade i pisanja ove disertacije i što su svojim iskustvom i stavovima doprineli njenoj finalizaciji. Prof. Sanji Grgurić-Šipka se zahvaljujem na saradnji i korisnim sugestijama vezanim za hemiju rutenijumskih kompleksa. Zahvaljujem se saradnicima sa Hemijskog fakulteta koji su sintetisali rutenijumske komplekse koji su bili predmet istraživanja ove doktorske teze.

Zahvaljujem se svim kolegama sa Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, a posebno onima koji su mi pružili moralnu podršku u najtežim trenucima, i pre svega – prijateljstvo.

Na kraju, zahvaljujem se svojim prijateljima i porodici na razumevanju, strpljenju i konstantnoj podršci. Neizmernu zahvalnost za postignuti uspeh i sve savladane dugogodišnje izazove dugujem svojoj majci Ljiljani i supruhu Milošu – bez vaše bezrezervne ljubavi ne bih istrajala.

Antitumorski potencijal novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa bioaktivnim ligandima *in vitro*

Sažetak

Cilj ove disertacije bio je ispitivanje antitumorskog potencijala novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa bioaktivnim ligandima *in vitro*. Ispitivani kompleksi sadrže ligande: 1) indometacin (**L1**) i mefenaminsku kiselinu (**L2**), kao predstavnike nesteroidnih antiinflatornih lekova (kompleksi **K1-K4**); 2) polipiridin (**L3**) (kompleksi **K5-K7**); i 3) 2-amino-4-metilbenzamid (**L4**) i 3-amino-N-metilbenzamid (**L5**), kao analoge inhibitora poli(ADP-ribozil) polimeraze (PARP) 3-aminobenzamida (3-AB) (kompleksi **K8-K11**). Antiproliferativni potencijal ovih kompleksa je ispitan primenom 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT) testa na humanim tumorskim ćelijskim linijama i višćelijskim tumorskim sferoidima, u poređenju sa cisplatinom. Mehanizmi dejstva najaktivnijih kompleksa su ispitani na ćelijskoj liniji koja je pokazala najveću senzitivnost, upotrebom protočne citofluorimetrije, fluorescentne mikroskopije i masene spektrometrije. Rezultati su pokazali da **L1** doprinosi aktivnosti i selektivnosti kompleksa **K1** i **K3** za ćelije trostruko-negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231. Kompleksi **K1** i **K3** dovode do zaustavljanja MDA-MB-231 ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa i apoptoze. Cimen u strukturi kompleksa **K7** doprinosi selektivnosti za ćelije malignog melanoma A375, ali u odnosu na cisplatinu, **K7** pokazuje nižu unutarćelijsku akumulaciju, odsustvo citotoksičnosti i ograničenu aktivnost na sferoidima. Iako su se kompleksi **K9** i **K11** (sa cimenom) pokazali kao potentniji PARP-1 inhibitori u odnosu na kompleks **K8** (sa toluenom) i 3-AB, **K8** pokazuje najveći antiproliferativni potencijal i afinitet prema nukleusu i DNK ćelija *BRC4*-mutiranog trostruko-negativnog karcinoma dojke HCC1937. Dobijeni rezultati pružaju osnov za dalje istraživanje mehanizama dejstva ovakvog tipa kombinovanih molekula u svrhu razvoja novih potencijalnih antitumorskih lekova.

Ključne reči: rutenijum(II)-arenski kompleksi, bioaktivni ligand, antitumorski potencijal *in vitro*, nesteroidni antiinflatorni lekovi (NSAIL), polipiridini, poli(ADP-ribozil) polimeraza (PARP), antiproliferativni potencijal, ćelijski ciklus, unutarćelijska akumulacija, višćelijski tumorski sferoidi

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Eksperimentalna onkologija

Antitumor potential of newly synthesized ruthenium(II)-arene complexes with bioactive ligands *in vitro*

Abstract

The aim of this thesis was to investigate the antitumor potential of newly synthesized ruthenium(II)-arene complexes with bioactive ligands *in vitro*. Investigated complexes contain ligands: 1) indomethacin (**L1**) and mefenamic acid (**L2**), as representatives of nonsteroidal antiinflammatory drugs (complexes **K1-K4**); 2) polypyridine (**L3**) (complexes **K5-K7**); and 3) 2-amino-4-methylbenzamide (**L4**) and 3-amino-N-methylbenzamide (**L5**), as analogs of poly(ADP-ribosyl) polymerase (PARP) inhibitor 3-aminobenzamide (complexes **K8-K11**). The antiproliferative potential of these complexes was examined on human tumor cell lines and multicellular tumor spheroids, in comparison to cisplatin, by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. The mechanisms of action of the most active complexes were examined on the most sensitive cell line by flow cytometry, fluorescence microscopy and mass spectrometry. The results showed that **L1** contributes to the activity and selectivity of the **K1** and **K3** complexes towards triple-negative breast cancer cells MDA-MB-231. The **K1** and **K3** complexes cause cell cycle arrest in the S phase and apoptosis of MDA-MB-231 cells. Cymene in the structure of the **K7** complex contributes to selectivity for A375 malignant melanoma cells, but compared to cisplatin, **K7** showed a lower intracellular accumulation, absence of cytotoxicity and limited activity on spheroids. Although the **K9** and **K11** complexes (with cymene) have shown to be more potent PARP-1 inhibitors than the **K8** complex (with toluene) and 3-AB, **K8** showed the greatest antiproliferative potential and affinity for the nucleus and DNA of *BRC4*-mutated triple-negative breast cancer cells HCC1937. The obtained results provide a basis for further research into the mechanisms of action of this type of combined molecules for the purpose of development of novel potential antitumor drugs.

Key words: ruthenium(II)-arene complexes, bioactive ligand, antitumor potential *in vitro*, nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs), polypyridines, poly(ADP-ribosyl) polymerase (PARP), antiproliferative potential, cell cycle, intracellular accumulation, multicellular tumor spheroids

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Experimental oncology

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Kompleksi metala u medicini	1
1.2. Kompleksi platine kao antitumorski agensi.....	2
1.2.1. Mehanizmi antitumorskog dejstva cisplatine	3
1.2.2. Rezistencija na cisplatinu	5
1.3. Kompleksi rutenijuma	6
1.3.1. Mehanizmi dejstva rutenijumskih kompleksa.....	7
1.3.2. Rutenijum(III) kompleksi u kliničkim ispitivanjima	8
1.3.2.1. NAMI-A	9
1.3.2.2. KP1019/KP1339.....	10
1.3.3. Rutenijum(II)-arenski kompleksi.....	11
1.3.3.1. RM175.....	12
1.3.3.2. RAPTA kompleksi	13
1.3.4. Rutenijum(II)-polipiridinski kompleksi	14
1.3.4.1. RDC11	14
1.3.4.2. TLD1433	15
1.3.5. Rutenijumski kompleksi konjugovani sa bioaktivnim ligandima	15
1.4. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL)	17
1.5. Poli(ADP-ribozil) polimeraze (PARP) i uloga PARP-1 u odgovoru na oštećenje DNK.....	20
1.5.1. PARP inhibitori.....	22
1.5.2. <i>BRC4</i> geni i sintetička letalnost	25
1.6. Ćelijska smrt.....	27
1.6.1. Apoptoza.....	29
1.6.1.1. Spoljašnji apoptotski put	29
1.6.1.2. Unutrašnji apoptotski put	29
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	32
3. MATERIJAL I METODE.....	33
3.1. Hemijske strukture ispitivanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa i liganada	33
3.2. Ćelijske linije	36
3.2.1. Održavanje i kultivacija ćelija	38
3.3. Ispitivanje antiproliferativnog potencijala rutenijum(II)-arenskih kompleksa	39
3.3.1. Određivanje vijabiliteta ćelija bojenjem tripan plavim	39
3.3.2. Određivanje preživljavanja ćelija MTT testom.....	40
3.3.2.1. Postavka eksperimenta i tretman ćelija.....	40
3.3.2.2. Obrada rezultata	40
3.4. Sortiranje ćelija na protočnom citofluorimetru na osnovu faza ćelijskog ciklusa nakon tretmana rutenijum(II)-arenskim kompleksima	41

3.5.	Kvantitativna analiza apoptotskog potencijala rutenijum(II)-arenskih kompleksa na protočnom citofluorimetru	42
3.6.	Mikroskopska analiza tipova ćelijske smrti dvojnim bojenjem akridin oranž/etidijum bromidom	43
3.7.	Analiza ukupne unutarćelijske akumulacije i lokalizacije rutenijuma(II) u unutarćelijskim kompartmentima metodom ICP-MS.....	44
3.7.1.	Priprema ćelijskih taloga	44
3.7.2.	Izolacija genomske DNK isoljavanjem	44
3.7.3.	Razdvajanje proteinskih frakcija iz unutarćelijskih kompartmenata.....	45
3.8.	Ispitivanje sposobnosti rutenijum(II)-arenskih kompleksa da inhibiraju aktivnost PARP-1 enzima upotrebom kolorimetrijskog PARP testa	45
3.9.	Ispitivanje interakcije rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa DNK pHOT-1 plazmida elektroforezom na agaroznom gelu	46
3.10.	Ispitivanje aktivnosti rutenijum(II)-arenskog kompleksa na 3D model sistemu višćelijskih tumorskih sferoida.....	47
4.	REZULTATI.....	49
4.1.	Rezultati ispitivanja antitumorskog potencijala rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa NSAIL (kompleksi K1-K4).....	49
4.1.1.	Antiproliferativni potencijal kompleksa K1-K4.....	49
4.1.2.	Uticaj kompleksa K1 i K3 na distribuciju MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.....	51
4.1.3.	Apoptotski potencijal kompleksa K1 i K3 u MDA-MB-231 ćelijama.....	51
4.1.4.	Unutarćelijska akumulacija i lokalizacija kompleksa K1 i K3 u MDA-MB-231 ćelijama..	53
4.2.	Rezultati ispitivanja antitumorskog potencijala rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa polipiridinom (kompleksi K5-K7)	55
4.2.1.	Antiproliferativni potencijal kompleksa K5-K7.....	55
4.2.2.	Uticaj kompleksa K7 na distribuciju A375 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa	57
4.2.3.	Apoptotski potencijal kompleksa K7 u A375 ćelijama	59
4.2.4.	Mikroskopska analiza A375 ćelija tretiranih kompleksom K7.....	61
4.2.5.	Unutarćelijska akumulacija i lokalizacija kompleksa K7 u A375 ćelijama	63
4.2.6.	Aktivnost kompleksa K7 na 3D modelu višćelijskih tumorskih sferoida	64
4.3.	Rezultati ispitivanja antitumorskog potencijala rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa analogima PARP inhibitora 3-aminobenzamida (kompleksi K8-K11).....	67
4.3.1.	PARP-1 inhibitorna aktivnost kompleksa K8-K11	67
4.3.2.	Antiproliferativni potencijal kompleksa K8-K11.....	68
4.3.3.	Uticaj kompleksa K8-K11 na distribuciju HCC1937 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa...	73
4.3.4.	Unutarćelijska akumulacija i lokalizacija kompleksa K8-K11 u HCC1937 ćelijama	74
4.3.5.	Interakcija kompleksa K8-K11 sa DNK pHOT-1 plazmida	76
5.	DISKUSIJA	78
5.1.	Antitumorski potencijal rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa NSAIL (kompleksi K1-K4)	79
5.2.	Antitumorski potencijal rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa polipiridinom (kompleksi K5-K7).....	83

5.3. Antitumorski potencijal rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa analogima PARP inhibitora 3-AB (kompleksi K8-K11).....	88
6. ZAKLJUČCI.....	94
7. LITERATURA.....	98
8. BIOGRAFIJA AUTORA.....	120

1. UVOD

Tumor ili neoplazma je naziv za patološki izmenjeno tkivo nastalo od ćelija koje karakteriše nekontrolisana proliferacija, gubitak sposobnosti diferencijacije i inhibicija ćelijskog umiranja apoptozom (Hanahan and Weinberg, 2011). Neoplastična transformacija je postepeni proces i do formiranja tumora dolazi usled narušavanja tkivne homeostaze. Tumori se klasifikuju kao benigni, koji ostaju inkapsulirani na mestu formiranja i ne dovode do letalnog ishoda, i maligni, koji tokom vremena stiču sposobnost da vrše invaziju u okolna i udaljena tkiva i formiraju sekundarne tumore ili metastaze (Weinberg, 2014). Nestabilnost genoma je jedna od osnovnih karakteristika tumorskih ćelija koja doprinosi progresiji tumora usled nastalih oštećenja u sistemima za reparaciju DNK (Hanahan and Weinberg, 2011). Akumulacija DNK oštećenja uzrokuje pojavu mutacija u tumor supresorskim genima i onkogenima i podstiče proliferaciju ćelija, dovodeći do klonalnog rasta tumora (Cahill *et al.*, 1999). Osim genetičkih, različiti sredinski faktori, kancerogeni hemijskog, fizičkog ili biološkog porekla, mogu pokrenuti razvoj maligne bolesti. Lečenje malignih bolesti podrazumeva hirurško odstranjivanje tumorskog tkiva, medikamentoznu terapiju (hemioterapija antineoplastičnim agensima, hormonska terapija, imunoterapija, ciljana terapija malim molekulima) ili terapiju zračenjem (radioterapija) (Arruebo *et al.*, 2011). Uprkos velikoj opštoj uspešnosti ovih tipova terapijskih pristupa, efikasnost lečenja onkoloških pacijenata je često ograničena brojnim faktorima, poput veličine tumorskog tkiva koje je potrebno ukloniti, stadijumom bolesti, pojavom metastaza i opštim zdravstvenim stanjem pacijenta. Kao rezultat, sistemska hemioterapija preostaje kao najčešća strategija za suzbijanje tumora. Danas se smatra da je većina malignih bolesti izlečiva ako se otkriju u ranom stadijumu. Međutim, i pored velikog progressa u saznanjima o biologiji malignih tumora i dostupnosti terapijskih agenasa, kancer predstavlja, posle kardiovaskularnih bolesti, drugi vodeći uzročnik smrti u savremenom svetu. Tendencija u porastu broja novoobolelih pacijenata od kancera je primetna kod oba pola, i predviđa se dalji porast u naredne dve decenije. Tokom 2020. godine, broj novih slučajeva pacijenata obolelih od kancera je procenjen na preko 19 miliona, dok je prijavljeni broj smrtnih ishoda uzrokovanih kancerom širom sveta iznosio 9,9 miliona (Sung *et al.*, 2021).

U istraživanje kancera su uključene brojne naučne discipline čiji je cilj da se podigne svest o prevenciji, unapredi dijagnostika i poboljša lečenje onkoloških pacijenata. Razvoj novih antitumorskih lekova, kao i unapređivanje efikasnosti već postojećih, predstavlja najveći izazov u borbi sa ovom opakom bolešću. Opsežna istraživanja su sprovedena kako bi se okarakterisali antiproliferativni efekti supstanci različitog porekla, počev od molekula prisutnih u prirodi i njihovih derivata, do organometalnih i neorganskih jedinjenja.

1.1. Kompleksi metala u medicini

Medicinska neorganska hemija je grana nauke koja se bavi otkrićem i sintezom novih terapijskih i dijagnostičkih agenasa na bazi metala koji pokazuju sposobnost interakcije sa različitim biološkim molekulima (Berners-Price and Sadler, 1996; Guo and Sadler, 1999; Frezza *et al.*, 2010). Jedna od karakteristika metala je da mogu lako da otpuste elektrone i da formiraju pozitivno-naelektrisane jone (katjone) sposobne da se vežu za negativno naelektrisane biomolekule, poput proteina i DNK (Orvig and Abrams, 1999). Usled postojanja širokog obima interakcija koje joni metala mogu ostvariti u biološkim sistemima, nije iznenađujuće što je tokom evolucije došlo do uključivanja mnogih metala u različite biološke procese. Tako se, na primer, gvožđe nalazi u sastavu proteina hemoglobina, odgovornog za transport kiseonika, cink je prisutan u strukturi mnogih proteina koji obavljaju esencijalne biološke funkcije, poput insulina, dok je kalcijum neophodna strukturna komponenta kostiju i važan je za brojne unutarćelijske procese (Orvig and Abrams, 1999).

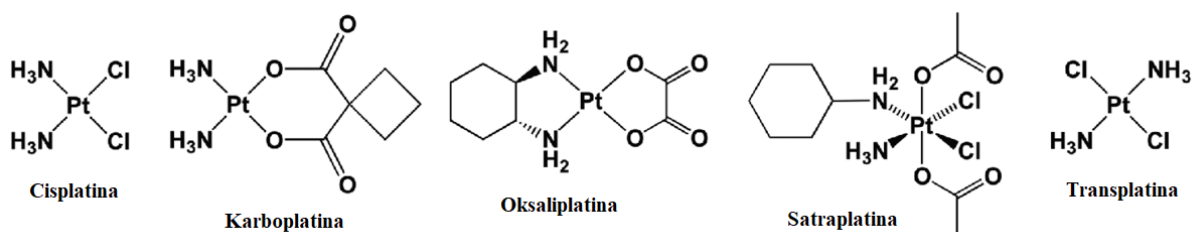
Metali pokazuju sposobnost formiranja kompleksa sa trodimenzionalnom (3D) strukturom, čime se omogućava usmeravanje funkcionalnih grupa ka definisanim molekulskim metama (Frezza *et al.*, 2010). Ono što kompleksima metala daje dodatnu prednost u odnosu na konvencionalna organska jedinjenja je prisustvo raznolikosti u hemijskim, optičkim, magnetnim, redoks i katalitičkim svojstvima, kao i u tipu dostupnih interakcija koje mogu da ostvare sa organskim jedinjenjima (vodonične, π ili

koordinacione veze) (Pizarro, Habtemariam and Sadler, 2010). Zbog ovakvih osobina, koordinacioni kompleksi metala su postali veoma atraktivni u svrhu razvoja antitumorskih agenasa.

Dominantno prisustvo terapeutika na bazi organskih jedinjenja na farmaceutskom tržištu je dovelo do toga da su razvoj medicinske neorganske hemije i racionalnog dizajniranja neorganskih jedinjenja za kliničku upotrebu započeti tek početkom 20-tog veka (Sadler, 1991; Orvig and Abrams, 1999). Studije odnosa između strukture i aktivnosti (eng. *Structure-activity relationship*, SAR) nekog agensa predstavljaju važan deo procesa dizajniranja lekova. Prvi koji je primenio SAR pravilo bio je Paul Ehrlich 1909. godine, prilikom konstruisanja neorganske supstance pod imenom arsfenamin (Salvarsan), koja se pokazala efikasnom za lečenje sifilisa (Orvig and Abrams, 1999). Paul Ehrlich se smatra i osnivačem hemioterapije i koncepta „magičnog metka” (eng. *Magic bullet*), koji opisuje upotrebu određene supstance kao idealnog terapijskog agensa kreiranog tako da selektivno deluje samo na uzročnika bolesti, bez štete po domaćina (Orvig and Abrams, 1999). Brojni kompleksi metala su do danas našli primenu kao antitumorski agensi (hemioterapeutici), antibakterijski, antivirusni i antiparazitski agensi, ili kao antidijabetici i radiosenzibilizujuć agensi (Sadler, 1991; Berners-Price and Sadler, 1996). Međutim, opsežnija upotreba neorganskih supstanci u svrhu zdravstvene nege ljudi u velikoj meri zavisi od prevazilaženja problema toksičnosti. Niske doze ne-esencijalnih elemenata najčešće mogu biti tolerisane bez štetnih posledica po organizam, dok su visoke doze uglavnom toksične. Sadler je ukazao na važnost karakterizacije nosivih supstanci koje sadrže metal (oblik u kom se primenjuje ne mora pod obavezno biti i aktivan oblik supstance, već ona može biti transformisana supstitucijom liganda i/ili redoks reakcijama pre nego što stigne do svoje molekulske mete), kao i na značaj ispitivanja aktivnog kompleksa metala u celini i pojedinačnih članova tog kompleksa (aktivni jon metala i aktivni ligandi), u svrhu dobijanja tačne informacije o aktivnosti i mehanizmu dejstva ispitivanog neorganskog jedinjenja (Sadler, 1991).

1.2. Kompleksi platine kao antitumorski agensi

Lekovi zasnovani na platini postali su skoro neizostavni u terapiji kancera, s obzirom da približno 50% svih onkoloških pacijenata koji se podvrgavaju lečenju hemioterapijom dobijaju upravo neki od klinički odobrenih platinskih lekova (Jakupec *et al.*, 2008; Dasari and Tchounwou, 2014). Slučajno otkriće antitumorskih svojstava platinskog kompleksa cisplatine (*cis*-diamindihloroplatina(II), *cis*-DDP, *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]), krajem 1960-tih godina, a potom i upotreba cisplatine u terapijske svrhe, doveli su do revolucije u medicini i hemioterapiji tumora (Slika 1) (Rosenberg *et al.*, 1969; Rosenberg, 1971, 1999; Frezza *et al.*, 2010; Muggia *et al.*, 2015). Michel Peyrone je prvi opisao cisplatinu 1845. godine, dok je njenu strukturu objasnio 1893. godine Alfred Werner. Cisplatina je koordinaciono jedinjenje sa kvadratno-planarnom geometrijom. Pod normalnim temperaturama i pritiscima, cisplatina pokazuje stabilnost, ali se tokom vremena može polako transformisati u svoj *trans*-izomer (Dasari and Tchounwou, 2014).



Slika 1. Strukturne formule cisplatine, karboplatine, oksaliplatine, satraplatine i transplatine (modifikovano prema (Hall *et al.*, 2014))

Cisplatina je bila prvi lek iz grupe platinskih kompleksa koja je odobrena za kliničku upotrebu 1978. godine od strane Američke agencije za hranu i lekove (eng. *United States Food and Drug Administration*, U.S. FDA), pod komercijalnim imenom Platinol®, i pokazala je posebno visoku efikasnost u lečenju karcinoma testisa i jajnika, kao i u lečenju karcinoma bešike, grlića materice, jednjaka, glave i vrata i nesitnoćelijskog karcinoma pluća (Feldman *et al.*, 2008; Frezza *et al.*, 2010; Dasari

and Tchounwou, 2014). Dodatno, cisplatina je pokazala značajnu antitumorsku aktivnost i kod sarkoma, kancera mekih tkiva, kostiju, mišića i krvnih sudova (Dasari and Tchounwou, 2014). Međutim, klinička upotreba cisplatine je ograničena usled pojave visoke opšte toksičnosti sa pratećim neželjenim efektima, poput nefrotoksičnosti, ototoksičnosti, gastrointestinalne toksičnosti, neurotoksičnosti i mijelosupresije, kao i primarne i stečene rezistencije kod nekih tumora (Sava, Bergamo and Dyson, 2011). Ova ograničenja su pokrenula obimna istraživanja citotoksičnosti cisplatine i drugih platinskih kompleksa, uključujući i studije interakcije različitih platinskih kompleksa sa nukleinskim kiselinama, ugljenim hidratima i proteinima, s ciljem da se razjasne molekularni mehanizmi aktivnosti cisplatine, i identifikuju ključne biomolekulske mete koje bi pomogle racionalnom dizajniranju efikasnijih koordinacionih kompleksa metala za tretman kancera. Iako je u narednim godinama nekoliko hiljada platinskih kompleksa sintetisano i ispitano na antitumorsku aktivnost *in vitro* i *in vivo*, u cilju pronalaza kompleksa niže toksičnosti i veće selektivnosti za tumorske ćelije, kao i šireg spektra aktivnosti u odnosu na cisplatinu, svega četrdesetak platinskih kompleksa je ušlo u kliničke studije, a od toga su samo karboplatina i oksaliplatina našle široku primenu u terapiji tumora (Harrap, 1985; Dasari and Tchounwou, 2014).

Karboplatina (*cis*-diamin(1,1-ciklobutan dikarboksilat)platina(II), Paraplatin®) je predstavnik druge generacije platinskih kompleksa koji je odobren za kliničku primenu 1989. godine za lečenje uznapredovalog kancera jajnika, uznapredovalog ili metastatskog kancera pluća, kancera glave i vrata (Slika 1). Karboplatina pokazuje povoljniji farmakokinetički profil u odnosu na cisplatinu, sporiju stopu konverzije u reaktivne vrste i sporiju stopu formiranja DNK adukta, što objašnjava povoljniji profil toksičnosti, dok je glavni nedostatak njeno mijelosupresivno dejstvo (Harrap, 1985; Sadler, 1991; Hall *et al.*, 2008; Dasari and Tchounwou, 2014).

Oksaliplatina (oksalat(R,R-1,2-diaminocikloheksan)platina(II), Eloxatin®) pripada trećoj generaciji platinskih kompleksa koji je odobren 2002. godine za lečenje metastatskog kancera debelog creva, najčešće u kombinaciji sa folnom kiselinom i 5-fluorouracilom (Slika 1) (de Gramont *et al.*, 2000). Zbog prirode unakrsne veze koju oksaliplatina formira sa DNK, proteini uključeni u mehanizme popravke pogrešno sparenih baza DNK ne prepoznaju nastale DNK adukate, što se smatra da doprinosi antitumorskoj aktivnosti oksaliplatine kod ćelija rezistentnih na cisplatinu (Raymond *et al.*, 1998). Dodatno, pokazalo se da oksaliplatina može specifično indukovati smrt tumorskih ćelija putem narušavanja biogeneze ribozoma (Bruno *et al.*, 2017) ili posredstvom T limfocita (imunogena ćelijska smrt) (Garg *et al.*, 2017).

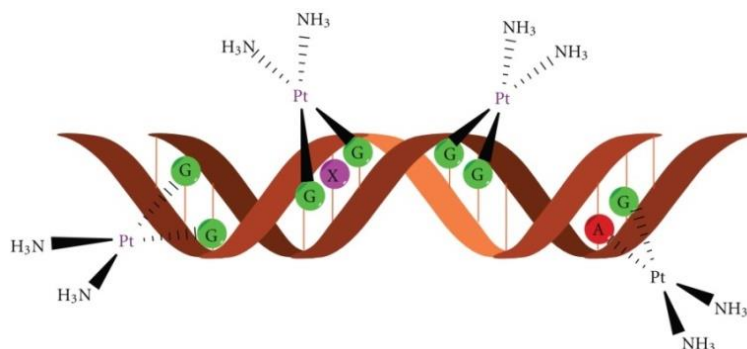
Satraplatina je oktaedarski kompleks platine(IV) koji je ispitan u fazi III kliničke studije kod pacijenata sa metastatskim karcinomom prostate (Slika 1) (Choy, Park and Yao, 2008). Suprotno kompleksima platine(II), koji se daju pacijentima intravenozno, satraplatina se može primenjivati oralno, usled kinetičke inertnosti, što minimalizuje pojavu neželjenih efekata (Frezza *et al.*, 2010).

1.2.1. Mehanizmi antitumorskog dejstva cisplatine

Pored pasivne difuzije, aktivni transport putem transportera za bakar tip 1 (eng. *Copper transport protein 1*, CTR1) se smatra većinski odgovornim za ulazak cisplatine u ćelije (Hall *et al.*, 2008; Sancho-Martínez *et al.*, 2012; Johnstone, Park and Lippard, 2014). Dodatno, studije su pokazale da transporteri za organske katjone tip 1 i 2 (eng. *Organic cation transporters 1 and 2*, OCT1/OCT2) olakšavaju ulazak oksaliplatine, ali ne i cisplatine u ćelije, što objašnjava efikasnost oksaliplatine kod kolorektalnog karcinoma, s obzirom da ćelije ovog tipa tumora ispoljavaju prekomernu ekspresiju OCT1 i OCT2 (Zhang *et al.*, 2006). Unutarćelijska koncentracija cisplatine je, takođe, direktno određena i njenim izbacivanjem iz ćelija, preko nekoliko analoga transportera koji učestvuje u rezistenciji na višestruke lekove tip 1 (eng. *Multidrug Resistance Transporter 1*, MDR1), označenog još i kao P-glikoprotein (P-gp). U ove transportere spadaju adenzin trifosfataza (eng. *Adenosine triphosphatase*, ATPaza) P-tipa za transport bakra (eng. *Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase 7A/B*, ATP7A/B), koja omogućava i znatnu akumulaciju cisplatine u unutarćelijskim organelama poput Goldžijevog aparata i lizozoma, i adenzin

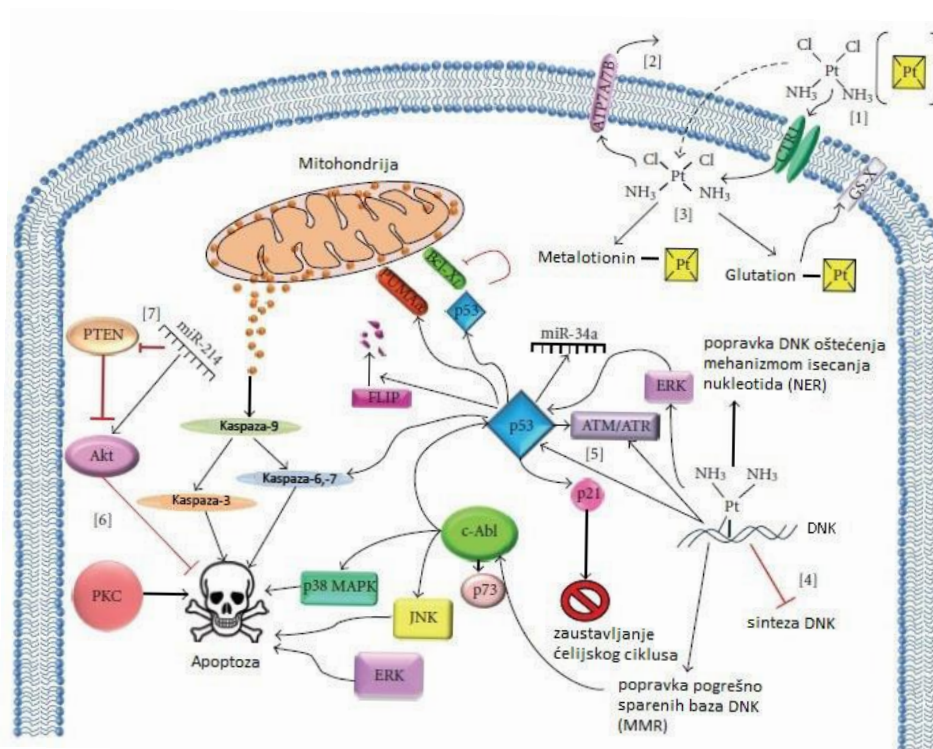
trifosfat (eng. *Adenosine triphosphate*, ATP)-zavisni transporter za molekule konjugovane sa glutationom (Sancho-Martínez *et al.*, 2012).

Ključni faktor koji objašnjava efikasnost cisplatine kao antitumorskog agensa je kinetika izmene liganada (Kostova, 2006). Visoka koncentracija hloridnih jona u krvnoj plazmi (~100 mM) onemogućava hidrolizu kinetički inertne cisplatine (Hall *et al.*, 2008). Međutim, nakon ulaska cisplatine u ćeliju, niska koncentracija hlorida (2-30 mM) u citoplazmi uzrokuje brzu hidrolizu, pri čemu relativno labilni hloridni joni bivaju zamenjeni molekulima vode, formirajući pozitivno naelektrisane reaktivne monohidrolizovane i bihidrolizovane vrste sposobne da interaguju sa aktinskim filamentima, različitim peptidima i proteinima koji sadrže tiolnu grupu, poput metionina, redukovanog glutationa, metalotionina, kao i sa nukleofilnim mestima na DNK (Sadler, 1991; Jamieson and Lippard, 1999; Cepeda *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2008; Sava, Bergamo and Dyson, 2011). Ovo se smatra ključnim korakom u aktivaciji cisplatine unutar ćelija, i favorizuje formiranje protein-DNK kompleksa, kao i DNK-DNK unutarlančanih i međulančanih adukata (Galluzzi *et al.*, 2014). Cisplatina se vezuje za atome azota na poziciji 7 (N7) u purinskim bazama (guanin (G) i adenin (A)) izloženim u velikom žljebu dvolančane DNK, formirajući bifunkcionalne DNK adukate, tačnije 1,2- i 1,3-unutarlančane d(GpG) ili d(ApG) unakrsne kovalentne veze (Slika 2) (Sadler, 1991; Jamieson and Lippard, 1999; Sancho-Martínez *et al.*, 2012). 1,2-d(GpG) adukti se smatraju odgovornim za citotoksičnu aktivnost cisplatine – uzrokuju oštećenje DNK koje dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u S i G2 fazama, inhibicije replikacije DNK i transkripcije (Todd and Lippard, 2009; L. Galluzzi *et al.*, 2012). Otkriće da strukturni izomer cisplatine, transplatina (*trans*-diamindihloroplatina(II), *trans*-DDP) (Slika 1), ispoljava nisku citotoksičnost *in vitro* i skoro potpuno odsustvo antitumorske aktivnosti *in vivo*, pripisuje se drugačijem tipu adukata koje formira sa DNK u odnosu na cisplatinu, nemogućnosti formiranja 1,2-unutarlančanih unakrsnih veza usled sternih smetnji, kao i sporij konverziji monofunkcionalnih u bifunkcionalne adukate (Bernal-Méndez *et al.*, 1997; Jamieson and Lippard, 1999; Trudu *et al.*, 2015).



Slika 2. Glavni tipovi adukata koje sa DNK formira cisplatina (preuzeto iz (Gómez-Ruiz *et al.*, 2012))

Nakon što se cisplatina veže za DNK, prenos signala o leziji na DNK je posredovan različitim signalnim molekulima, poput protein kinaze B (PKB, poznata i kao Akt), tirozin-protein kinaze c-Abl, p53 proteina, mitogenom-aktivirane protein kinaze (MAPK), c-Jun N-terminalne kinaze (JNK), kinaze regulisane vanćelijskim signalima (eng. *Extracellular signal regulated kinase*, ERK), kojima se moduliše citotoksičnost cisplatine (Slika 3) (Wang and Lippard, 2005; Cepeda *et al.*, 2007; Basu and Krishnamurthy, 2010). Lezije na DNK mogu biti prepoznate i uklonjenje mehanizmima popravke oštećenja DNK putem isecanja nukleotida, popravke pogrešno sparenih baza ili aktivnosti DNK-zavisnih protein kinaza (Chaney and Sancar, 1996; Jamieson and Lippard, 1999; Furuta *et al.*, 2002). Ukoliko nastalo oštećenje DNK nije moguće popraviti, dolazi do trajnog zaustavljanja ćelijskog ciklusa ili do ćelijske smrti, najčešće apoptoze (Jamieson and Lippard, 1999; Galluzzi *et al.*, 2014).



Slika 3. Pretpostavljeni molekularni mehanizmi dejstva cisplatine (modifikovano prema (Basu and Krishnamurthy, 2010))

Iako se genomska DNK smatra glavnom ćelijskom metom cisplatine, istraživanja su pokazala da cisplatin nakon intravenske primene interaguje sa proteinima plazme. U roku od 24 h od primene, preko 90% cisplatine u krvi je vezano za albumin, transferin i hemoglobin, što dovodi do inaktivacije najvećeg dela slobodnih molekula cisplatine, dok svega oko 1% cisplatine formira kovalentne veze sa DNK (Gonzalez *et al.*, 2001; Cepeda *et al.*, 2007). Dodatno, cisplatin može dovesti do znatnog sniženja redukovanog oblika glutationa i metionina u citoplazmi, i uzrokovati pomeranje redoks balansa ka oksidativnom stresu, što olakšava oštećenje DNK i može imati direktne citotoksične efekte (L. Galluzzi *et al.*, 2012). Sa druge strane, interakcija hidrolizovane cisplatine i endogenih nukleofila, može ograničiti količinu dostupnog reaktivnog oblika cisplatine, delujući kao citoprotektivni pufer (Galluzzi *et al.*, 2014). Jasno je da citotoksični/citostatski efekat cisplatine ne predstavlja puku posledicu njene genotoksične aktivnosti, već je uzrokovan poremećajem kompleksne ćelijske signalizacije kako u nukleusu, tako i u citoplazmi (Sancho-Martínez *et al.*, 2012). Pokazano je da u zavisnosti od primenjene koncentracije cisplatine zavisi kom tipu ćelijske smrti će ćelija podleći, pa tako visoke doze cisplatine mogu izazvati ćelijsku smrt po tipu nekroze. Dodatno, otkriveno je i da se nakon primene cisplatine, unutar jedne populacije tumorskih ćelija apoptoza i nekroza mogu odigravati istovremeno, usled postojanja razlika u metaboličkom statusu ćelija i unutarćelijskom nivou ATP, što ukazuje da postoji funkcionalna povezanost biohemijskih signalnih puteva koji dovode do apoptoze ili nekroze u tumorskim ćelijama tretiranih cisplatinom (Cepeda *et al.*, 2007; Gómez-Ruiz *et al.*, 2012).

1.2.2. Rezistencija na cisplatinu

Odgovor onkoloških pacijenata na terapiju cisplatinom je u početku lečenja visok, međutim, kod mnogih pacijenata posle određenog vremena dolazi do pojave recidiva i razvoja rezistencije na dalji tretman cisplatinom.

Galluzzi i saradnici su predložili sledeću podelu mehanizama rezistencije na cisplatinu (L. Galluzzi *et al.*, 2012; Galluzzi *et al.*, 2014):

1. Rezistencija uzrokovana smanjenim ulaskom cisplatine u ćeliju, povećanim izbacivanjem cisplatine van ćelije ili povećanom unutarćelijskom inaktivacijom cisplatine konjugacijom za glutation (eng. *Mechanisms of pre-target resistance*);
2. Rezistencija uzrokovana povećanim nivoom popravki DNK oštećenja mehanizmom isecanja nukleotida ili homolognom rekombinacijom (eng. *Mechanisms of on-target resistance*);
3. Rezistencija uzrokovana defektima u komponentama puteva prenosa signala koji bi inače doveli do apoptoze u odgovoru na oštećenje DNK (eng. *Mechanisms of post-target resistance*);
4. Rezistencija uzrokovana promenama u putevima prenosa signala koji nisu direktno aktivirani cisplatinom, ali interferiraju sa njenim citotoksičnim mehanizmom dejstva (eng. *Mechanisms of off-target resistance*).

Glavni problem u prevazilaženju rezistencije na cisplatinu je taj što često dolazi do aktivacije više mehanizama rezistencije istovremeno, i najčešće inhibicija jednog mehanizma koji održava rezistenciju ne dovodi do kompletnog ponovnog uspostavljanja senzitivnosti na ovaj hemioterapeutik, već ostaje određen nivo rezidualne rezistencije (L. Galluzzi *et al.*, 2012).

1.3. Kompleksi rutenijuma

Pored brojnih analoga platine, i drugi kompleksi metala iz grupe prelaznih metala, poput kompleksa cinka, bakra, zlata, rutenijuma, osmijuma, paladijuma, galijuma i titanijuma privukli su značajnu pažnju kao potencijalni antitumorski agensi (Hartinger *et al.*, 2006, 2008; Milacic *et al.*, 2006, 2008). Iako molekularni mehanizmi kojim ovi kompleksi ispoljavaju antitumorsku aktivnost nisu u potpunosti razjašnjeni, saznanja o njihovom transportu u tumorske ćelije, o ćelijskim metama i nishodnim efektima, kao i rana iskustva iz kliničkih studija (posebno sa rutenijumskim kompleksom KP1019 i galijumskim kompleksom KP46) ukazuju da ovi kompleksi ispoljavaju antitumorski potencijal različit od antitumorskog potencijala platinskih kompleksa (Jakupec *et al.*, 2008).

Zbog impresivnih napora posvećenih sintezi velikog broja strukturno različitih rutenijumskih kompleksa i izučavanju mehanizma dejstva, rutenijum (Ru) se smatra naslednikom platine, odnosno platinskih kompleksa, u potrazi za novim potencijalnim antitumorskim agensom. Dodatno, rutenijumski kompleksi, posebno oni sa planarnim ligandima, poput rutenijum(II)-polipiridinskih kompleksa, se uspešno razvijaju i kao antibakterijski, antiparazitski, antivirusni i antimalarijski agensi (Medici, Peana and Zoroddu, 2018). Smatra se da se neke od glavnih prednosti rutenijumskih kompleksa u odnosu na terapeutike bazirane na platini ogledaju upravo u tome što neki kompleksi rutenijuma pokazuju aktivnost prema ćelijskim linijama rezistentnim na cisplatinu. Mnogi rutenijumski kompleksi dovode do manje toksičnosti, i samim tim uzrokuju i manje neželjenih efekata, usled veće selektivnosti za ćelije kancera u poređenju sa netumorskim ćelijama, dok neki kompleksi rutenijuma pokazuju znatan antimetastatski efekat. Dodatno, hemijska priroda rutenijuma pruža višestruke mogućnosti za dizajn i sintezu novih rutenijumskih kompleksa.

Tokom više od tri decenije koliko traju istraživanja rutenijumskih kompleksa, usvojeni su određeni koncepti, koji se iako nisu našli eksperimentalnu potvrdu kod svakog ispitanog kompleksa rutenijuma, uzimaju kao opšte prihvaćeni, čime teoretski opravdavaju dalji razvoj kompleksa rutenijuma kao potencijalnih antitumorskih agenasa (Bergamo and Sava, 2011; Alessio, 2017). Neke od tih pretpostavljenih osobina rutenijuma su:

- Spora kinetika izmene liganada u rutenijumskim kompleksima u vodi (u rasponu od 10^{-2} - 10^{-3} s⁻¹) odgovara kinetici ćelijske deobe (mitoze), što doprinosi visokoj kinetičkoj stabilnosti molekula (Medici, Peana and Zoroddu, 2018);
- Rutenijum može da postoji u više stabilnih oksidacionih stanja (II, III i IV) u fiziološkim uslovima (Pal, Nandi and Mukherjee, 2018);
- Svojstvo Ru(III) da formira koordinaciona jedinjenja sa oktaedarskom geometrijom, što pruža bolju kontrolu nad sternim osobinama kompleksa usled prisustva dva dodatna aksijalna liganda (najčešće su u pitanju N- i S-donorski ligandi), dok Ru(II) organometalni kompleksi mogu da

imaju i tetraedarsku, odnosno, pseudo-oktaedarsku geometriju u obliku „klavirske stolice“ (eng. *Piano-stool*), usled formiranja barem jedne π veze sa arenskim ligandom (Levina, Mitra and Lay, 2009);

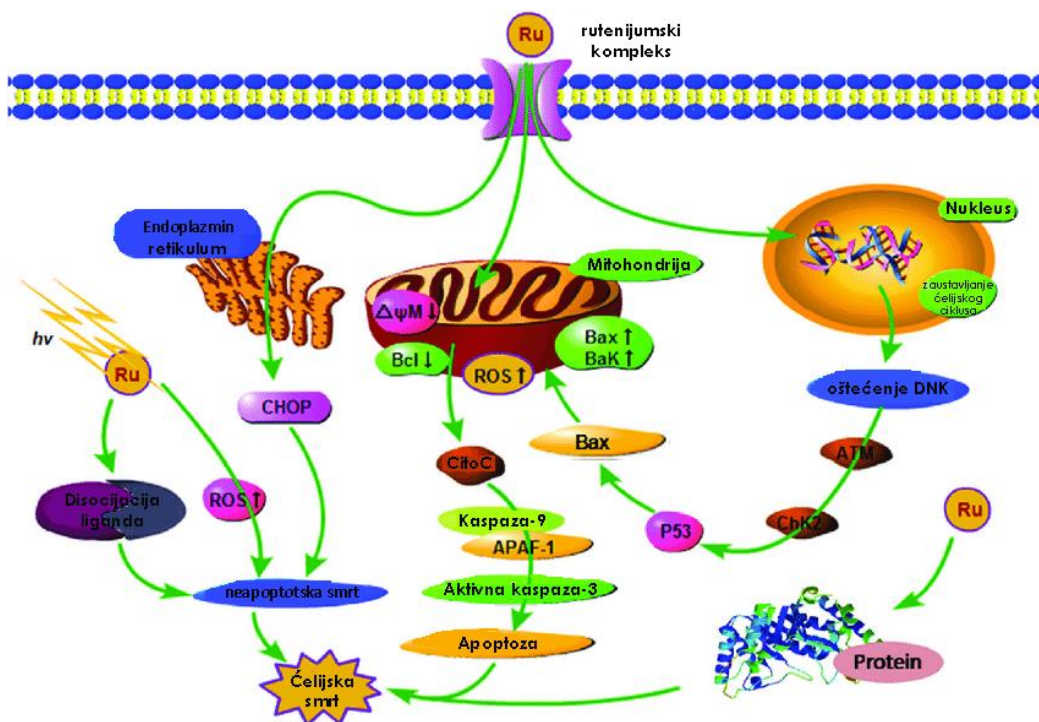
- Mogućnost primene rutenijuma u obliku relativno inertnog proleka Ru(III), koji može podleći redukciji do Ru(II), a potom i aktivaciji selektivno u tumorskom tkivu, pod dejstvom glutaciona i drugih bioloških reduktanata, dovodeći do minimalnog oštećenja zdravog tkiva – hipoteza „aktivacije redukcijom“ (Clarke, 2003; Pal, Nandi and Mukherjee, 2018);
- Sposobnost rutenijuma da imitira gvožđe, Fe(III), prilikom vezivanja za biomolekule poput transferina i albumina, što omogućava selektivni transport i ulazak u tumorske ćelije koje pokazuju prekomernu ekspresiju ovih proteina i povećanu potrebu za molekulima gvožđa – strategija „Trojanskog konja“ (Bergamo and Sava, 2011; Trondl *et al.*, 2014).

1.3.1. Mehanizmi dejstva rutenijumskih kompleksa

Mehanizmi kojim rutenijumski kompleksi ispoljavaju antitumorsku aktivnost su višestruki, i do danas još uvek nisu svi otkriveni. Jedan od pretpostavljenih mehanizama dejstva rutenijumskih kompleksa, koji ujedno predlaže i objašnjenje za manju opštu toksičnost rutenijumskih kompleksa u odnosu na komplekse platine, je opisan prethodno pomenutom hipotezom „aktivacije redukcijom“ (Clarke, 2003). U solidnim tumorima, posebno u onima koje karakteriše brz rast, je česta pojava slabe vaskularizacije i smanjenog dotoka nutrijenata (što za posledicu ima sniženu koncentraciju kiseonika i niži pH usled preferencijalne proizvodnje energije putem glikolize), kao i formiranja hipoksične (redukujuće) sredine. Stoga, upravo razlike u metabolizmu tumorskih i netumorskih ćelija okolnog tkiva mogu da favorizuju selektivnu konverziju Ru(III) kompleksa u Ru(II) komplekse u tumorskom tkivu (Clarke, 2003). Nastali Ru(II) kompleksi brže formiraju koordinacione veze sa biomolekulima u odnosu na Ru(III) komplekse, usled brže supstitucije liganada, što u kombinaciji sa očekivanim višim [Ru(II)/Ru(III)] odnosom u tumorskim ćelijama dovodi do selektivne toksičnosti. Pokazano je da rutenijumski kompleksi koji sadrže amino grupu mogu biti dodatno redukovani transmembranskim sistemima za prenos elektrona, što ukazuje da nije neophodno da rutenijumski kompleks uđe u ćeliju da bi bio redukovani (Laliberté *et al.*, 1987). Oksidacija Ru(II) natrag u Ru(III) je moguća pod dejstvom različitih oksidanasa (molekulski kiseonik, citohrom oksidaza), ali je malo verovatna u hipoksičnim tumorskim ćelijama (Stanbury, Haas and Taube, 1980). Međutim, neki istraživači su ukazali na nedostatke hipoteze „aktivacije redukcijom“, upravo usled činjenice da je eksperimentalna potvrda hipoteze dobijena samo *in vitro*, ali ne i *in vivo*, kao i činjenicom da ova hipoteza ne može da objasni selektivnost pojedinih rutenijumskih kompleksa prema metastazama (Bergamo and Sava, 2011).

Pretpostavlja se da je DNK nukleusa i u slučaju rutenijumskih kompleksa glavna ćelijska meta, dok se ostale interakcije rutenijuma sa biomolekulima unutar i van ćelije postepeno otkrivaju (Slika 4) (Bergamo *et al.*, 2012). Istraživanja su pokazala da se rutenijumski kompleksi mogu vezati za DNK kovalentno (ireverzibilno) ili nekovalentno (reverzibilno), na način različit od cisplatine, upravo usled oktaedarske geometrije koja utiče na konformaciju DNK. Smatra se da je upravo drugačiji način vezivanja za DNK u korelaciji sa drugačijim farmakološkim svojstvima i antitumorskim efektima rutenijumskih kompleksa u odnosu na platinske komplekse, što može biti i validno objašnjenje za citotoksične efekte nekih rutenijumskih kompleksa u tumorskim ćelijama rezistentnim na cisplatinu (Brabec and Nováková, 2006; Sava, Bergamo and Dyson, 2011). Osim DNK i proteini mogu biti mete rutenijumskih kompleksa, poput protein kinaza, acetilholinesteraza, P-gp, glutation-S-transferaze, cistein proteaza, telomeraza, histon deacetilaza ili topoizomeraza I i II (Zeng *et al.*, 2017; Pal, Nandi and Mukherjee, 2018; Thota *et al.*, 2018). Pretpostavlja se da rutenijumski kompleksi podjednako efikasno mogu interagovati i sa regulatornim enzimima u ćelijskoj membrani i/ili u citoplazmi, aktinskim filamentima u submembranskom regionu ćelije, za koje se smatra da su uključeni u specifičnu antimetastatsku aktivnost pojedinih rutenijumskih kompleksa, kao i sa kolagenom veziva (Levina, Mitra and Lay, 2009). Za Ru(II) komplekse je pokazano da mogu ući u ćeliju putem pasivne difuzije, aktivnog transporta ili endocitozom (Gill and Thomas, 2012). Specifično, rutenijum(II)-polipiridinski kompleksi su pokazali sposobnost da se akumuliraju u i drugim ćelijskim organelama, poput mitohondrija (Chen *et al.*, 2010; Pisani *et al.*, 2010), endoplazminog retikuluma (Gill *et al.*, 2013) i lizozoma (Huang, Yu, *et al.*,

2015). Levina i saradnici su ukazali na činjenicu da su neki od glavnih činilaca koji određuju mehanizam dejstva nekog rutenijumskog kompleksa upravo njegova lipofilnost, koja favorizuje internalizaciju kompleksa, kao i prisustvo labilnih liganada, poput hloridnih i karboksilatnih, koji favorizuju vezivanje kompleksa za fibrile poput kolagena i elastina (Levina, Mitra and Lay, 2009).

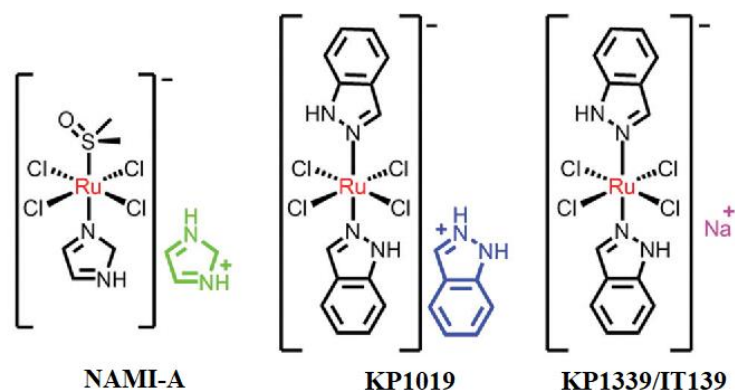


Slika 4. Prikaz osnovnih ćelijskih meta i pretpostavljenih molekularnih mehanizama dejstva rutenijumskih kompleksa (modifikovano prema (Zeng *et al.*, 2017))

1.3.2. Rutenijum(III) kompleksi u kliničkim ispitivanjima

Biološka aktivnost jednog kompleksa rutenijuma je prvi put pokazana 1976. godine na primeru hloro-aminskog Ru(III) kompleksa *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃], koji se smatra analogom hloro-aminskih kompleksa platine (Durig *et al.*, 1976), dok je par godina kasnije pokazano da analog ovog kompleksa, *cis*-[RuCl₂(NH₃)₄], ispoljava antitumorsku aktivnost (Clarke, Zhu and Frasca, 1999). Mestroni i saradnici su pokazali da kompleks rutenijuma(II), *cis*-[RuCl₂(DMSO)₄] (DMSO=dimetilsulfoksid), ne pokazuje citotoksičnost *in vitro*, ali da ispoljava toksičnost *in vivo*, najmanje tri reda veličine nižu od cisplatinu, kao i aktivnost prema primarnom i metastatskom mišjem tumorskom tkivu (Mestroni *et al.*, 1994). Dodatno, *trans*-izomer (*trans*-[RuCl₂(DMSO)₄]) je pokazao veću efikasnost od *cis*-izomera u redukciji broja i veličine metastaza spontano nastalih od primarnog tumora pluća kod miševa (Mestroni *et al.*, 1994). Ovaj kompleks je doprineo dužem preživljavanju tretiranih miševa nakon hirurškog uklanjanja primarnog tumora, u odnosu na cisplatinu. Selektivna aktivnost prema tumorskim metastazama se pokazala kao važna zajednička odlika i drugih rutenijumskih kompleksa, što je podstaklo intenzivna istraživanja antitumorskih svojstava Ru-DMSO kompleksa. Potraga za kompleksom veće biološke aktivnosti dovela je do istovremenog razvoja dva tipa rutenijum(III) kompleksa, od strane dve grupe istraživača – Sava i saradnici su radili na razvoju kompleksa označenog kao NAMI-A, dok je grupa istraživača koju je predvodio Keppler radila na razvoju kompleksa KP1019 (Alessio and Messori, 2019).

Rutenijumski kompleksi, KP1019 (indazolijum *trans*-[tetrahloridobis(1*H*-indazol)rutenat(III)]) i NAMI-A (imidazolijum *trans*-[tetrahlorido(DMSO)(imidazol)rutenat(III)]), su naizgled strukturno slični kompleksi rutenijuma(III) sa koordinisanim hloridnim i heterocikličnim ligandima, ali ispoljavaju različitu antitumorsku aktivnost: KP1019 ispoljava aktivnost prema primarnim tumorima, dok NAMI-A ispoljava aktivnost prema tumorskim metastazama (Slika 5) (Bratsos *et al.*, 2007; Coverdale, Laroiya-McCarron and Romero-Canelon, 2019).



Slika 5. Strukture rutenijum(III) kompleksa NAMI-A, KP1019 i KP1339/IT139 (modifikovano prema (Zeng *et al.*, 2017))

1.3.2.1. NAMI-A

NAMI-A je prvi rutenijumski kompleks koji je ušao u klinička ispitivanja 1999. godine (Slika 5) (Rademaker-Lakhai *et al.*, 2004). U pretkliničkim istraživanjima, NAMI-A je pokazao sposobnost da efikasno inhibira razvoj i rast metastaza u plućima, u svim eksperimentalnim modelima solidnih metastazirajućih tumora testiranih *in vivo*, uključujući i humani nesitnoćelijski karcinom pluća transplantiran u *nude* miša (Sava *et al.*, 1992; Bergamo and Sava, 2007; Bratsos *et al.*, 2007; Bergamo *et al.*, 2012). Aktivnost NAMI-A prema primarnom tumoru, kao i citotoksičnost *in vitro* su se pokazale zanemarljivim u poređenju sa cisplatinom (cisplatina ispoljava citotoksičnost prema ćelijskim kulturama u μM koncentracijama, dok NAMI-A ispoljava citotoksičnost tek pri mM koncentracijama), što doprinosi generalnoj manjoj toksičnosti NAMI-A za organizam (Bratsos *et al.*, 2007). Pokazano je da se NAMI-A akumulira u bubrezima, jetri i tkivima bogatim kolagenom (Bergamo *et al.*, 2012). Rezultati faze I kliničke studije su pokazali da NAMI-A nije toksičan po bubrege, za razliku od cisplatine, ali da izaziva pojavu bolnih plikova na koži kada se primeni u veoma visokim dozama, pa je $300 \text{ mg/m}^2/\text{dan}$ određeno kao maksimalna tolerisana doza (MTD) (Rademaker-Lakhai *et al.*, 2004). Nažalost, niska terapijska efikasnost, progresija bolesti kod 79% učesnika u kliničkoj studiji, stabilizacija bolesti tokom 21 nedelje kod jednog pacijenta sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća (faza I), i parcijalan odgovor kod 4% pacijenata sa nesitnoćelijskim karcinomom pluća na kombinovanu terapiju NAMI-A (450 mg/m^2) sa gemcitabinom (1 g/m^2) (faza I/II), ograničili su dalju upotrebu NAMI-A u klinici što je rezultovalo u okončanju daljih kliničkih istraživanja (Rademaker-Lakhai *et al.*, 2004; Leijen *et al.*, 2015).

Iako NAMI-A može interagovati sa slobodnom DNK, nukleusna DNK nije primarna meta ovog agensa *in vivo* (Moucheron, 2009). Pod fiziološkim uslovima (pH 7,4), u vodenoj sredini, na 37°C , NAMI-A podleže dvostepenoj hidrolizi hloridnih jona u roku od nekoliko minuta, nakon redukcije do Ru(II) pod dejstvom ćelijskih reduktanata (askorbinska kiselina, cistein, glutation), uz parcijalnu disocijaciju DMSO. Suprotno, na sobnoj temperaturi, u nešto kiselijim uslovima (pH 3,0-5,0) (uslovi pod kojima se NAMI-A primenjuje u vidu infuzije tokom nekoliko sati), NAMI-A pokazuje veću stabilnost, hidroliza hloridnih jona je suprimirana i odvija se samo spora disocijacija DMSO (Bratsos *et al.*, 2007). Iako je verovatno da *in vivo* dolazi do redukcije NAMI-A, pokazano je da „aktivacija redukcijom“ jeste moguća, ali da nije neophodna za aktivaciju NAMI-A (Bratsos *et al.*, 2007; Levina, Mitra and Lay, 2009). Pretpostavlja se da je za antimetastatsku aktivnost NAMI-A odgovoran DMSO prisutan u koordinacionom jezgru aktivnog metabolita ovog agensa (Bratsos *et al.*, 2007). NAMI-A pokazuje sposobnost da interferira sa ćelijskim ciklusom i da uzrokuje prolazno zaustavljanje ćelija u G2 fazi usled nemogućnosti prolaska kroz G2-M kontrolnu tačku, što je posledica aktivacije CHK1 (eng. *Checkpoint kinase 1*) kinaze koja se aktivira u odgovoru na oštećenje DNK (Gava *et al.*, 2006; Bergamo *et al.*, 2012).

Smatra se da NAMI-A dovodi do inhibicije nastanka metastaza *in vivo* putem:

- Regulacije adhezije zavisne od aktina i aktivacije receptora za kolagen (integrin $\alpha 5\beta 1$), što dovodi do remodelovanja citoskeleta (Bergamo *et al.*, 2012);
- Inhibicije invazije tumorskih ćelija podsticanjem fibroze i formiranja kapsule oko primarnog tumora putem regulacije ekspresije $\beta 1$ transformišućeg faktora rasta (eng. *Transforming growth factor $\beta 1$* , TGF $\beta 1$) u fibroblastima i tumorskim ćelijama (Bergamo *et al.*, 2012);
- Inhibicije matriksnih metaloproteinaza-2 i -9 (MMP-2 i MMP-9) (Bratsos *et al.*, 2007);
- Vezivanja za kolagen u vanćelijskom matriksu i stimulacije njegove produkcije (Bergamo *et al.*, 2012);
- Inhibicije angiogeneze indukovane vaskularnim endotelijskim faktorom rasta (eng. *Vascular endothelial growth factor*, VEGF) i inhibicije proliferacije endotelijskih ćelija dejstvom na MAPK kinaze (antiangiogena aktivnost) (Leijen *et al.*, 2015);
- Olakšavanja interakcije između tumorskih ćelija i tumor-infiltrirajućih limfocita putem modulacije ekspresije CD44 markera i unutarćelijskog adhezionog molekula-1 (eng. *Intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1) (Bergamo *et al.*, 2012);
- Selektivne inhibicije jonskih kanala za kalijum aktiviranih Ca^{2+} jonima (KCa3.1) koji su prekomerno ekspimirani u brojnim tumorskim ćelijama, kao što je slučaj kod leukemija (Coverdale, Laroiya-McCarron and Romero-Canelon, 2019).

1.3.2.2. KP1019/KP1339

Za razliku od NAMI-A, ćelije lakše preuzimaju KP1019, koji je ujedno i stabilniji prema hidrolizi (Slika 5) (Kapitza *et al.*, 2005; Alessio and Messori, 2019). Hartinger i saradnici su pokazali da KP1019 ispoljava znatnu aktivnost na brojnim tumorskim modelima *in vivo*, posebno na primeru primarnog kolorektalnog tumora rezistentnog na platinu, ali nema izraženu antimetastatsku aktivnost (Hartinger *et al.*, 2008). Za razliku od NAMI-A, KP1019 je pokazao citotoksičnu aktivnost *in vitro*, na panelu ćelija kolorektalnog karcinoma (Kapitza *et al.*, 2005).

U fazi I kliničkih ispitivanja KP1019 koja su započela 2003. godine, nije primećena dozno-ograničavajuća toksičnost; od 6 pacijenata koji su odabrani za ovu studiju (primali su KP1019 u dozama od 25-600 mg/dva puta nedeljno), kod 5 pacijenata je došlo do stabilizacije bolesti u trajanju od 8-10 nedelja (Hartinger *et al.*, 2006). Niža stopa pojave neželjenih efekata je objašnjena sposobnošću KP1019 da se brzo vezuje za transferin u krvi, u roku od nekoliko minuta, čime je citotoksičnost preferencijalno usmerena prema tumorskim ćelijama koje prekomerno ekspimiraju receptore za transferin (Hartinger *et al.*, 2008). Usled niske rastvorljivosti KP1019 u vodi, razvijen je njegov analog u vidu natrijumove soli, KP1339/IT139 (Slika 5) (Trondl *et al.*, 2014; Bytzek *et al.*, 2016). KP1339 je kasnije korišćen u fazi I kliničke studije za *in situ* pripremu KP1019, gde je određena MTD od 625 mg/m², a rezultati studije su pokazali stabilizaciju bolesti kod pacijenata sa neuroendokrinim tumorima i parcijalan odgovor kod jednog pacijenta sa kancerom debelog creva (Burriss *et al.*, 2016). Dodatno, studija koju su sproveli Heffeter i saradnici na Hep3B modelu humanog hepatocelularnog karcinoma transplantiranog u miša je pokazala da KP1339 pospešuje antitumorsku aktivnost sorafeniba *in vivo* (Heffeter *et al.*, 2013).

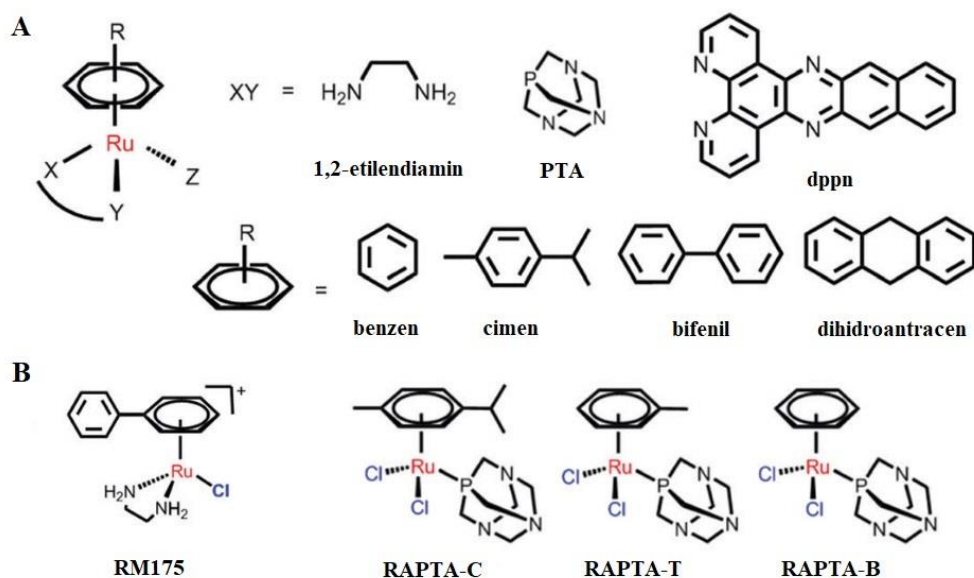
KP1019 je pokazao afinitet akumulacije u nukleusu, nakon aktivacije, kao i sposobnost da indukuje uvijanje i zakrivljenje DNK, najverovatnije usled vezivanja za N7 poziciju guanina i adenina i formiranja monofunkcionalnih DNK adukata (Hartinger *et al.*, 2006). KP1019 dovodi do apoptoze tumorskih ćelija primarnog tumora pokretanjem unutrašnjeg apoptotskog puta posredovanog mitohondrijama, spoljašnjeg apoptotskog puta ili putem interakcije sa DNK (Kapitza *et al.*, 2005; Hartinger *et al.*, 2006; Coverdale, Laroiya-McCarron and Romero-Canelon, 2019). Ćelijska smrt indukovana kompleksom KP1019 je nezavisna od statusa p53 proteina, što ukazuje da oštećenje DNK nije primarni mehanizam dejstva KP1019 (Hartinger *et al.*, 2008). KP1339 je pokazao sposobnost da dovodi do produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *Reactive oxygen species*, ROS), što za posledicu ima oksidativni stres, kao i da interaguje sa GRP78 proteinom, ključnim regulatorom u obradi pogrešno savijenih proteina, uzrokujući stres endoplazminog retikuluma (eng. *Endoplasmic reticulum stress*, ER-stres) (Dickson *et al.*, 2011; Trondl *et al.*, 2014; Flocke *et al.*, 2016). GRP78 se dovodi u vezu i sa pojavom

rezistencije, što govori u prilog potencijalu KP1339 da poveća senzitivnost već rezistentnih ćelija (Coverdale, Laroiya-McCarron and Romero-Canelon, 2019). Dodatno, pokazano je da se antiproliferativna aktivnost KP1339 povećava kada se inhibira popravka oštećenja DNK mehanizmima isecanja nukleotida i isecanja baza (Hartinger *et al.*, 2008). KP1019, takođe, ispoljava aktivnost u tumorskim ćelijama koje prekomerno ekspimiraju protein povezan sa rezistencijom na višestruke lekove tip 1 (eng. *Multidrug resistance-related protein 1*, MRP1) i proteine povezane sa rezistencijom kancera dojke (eng. *Breast cancer resistance-related protein*, BCRP) i pluća (eng. *Lung resistance protein*, LRP)(Hartinger *et al.*, 2006).

1.3.3. Rutenijum(II)-arenski kompleksi

Rutenijum(II)-arenski kompleksi predstavljaju grupu organometalnih kompleksa amfifilnog profila u kojima je hidrofobni arenski ligand vezan za hidrofilno jezgro rutenijuma i pruža okosnicu na koju se mogu dodati različiti bočni lanci za ciljanu hemioterapiju (Suss-Fink, 2010). Inicijalni razlog za razvoj rutenijum(II)-arenskih kompleksa kao potencijalnih antitumorskih agenasa je što u određenoj meri podsećaju na kvadratno-planarne komplekse platine (Dyson, 2007). Tipična struktura rutenijum(II)-arenskih kompleksa ($[Ru(\eta^6\text{-aren})(X)(Y)(Z)]$), pri čemu su X i Y najčešće NN-, NO-, OO- ili S-donorski ligandi, dok je Z obično odlazeća grupa, poput halogena) podrazumeva geometriju „klavirske stolice“, gde arenski deo kompleksa ($\eta^6\text{-aren}$, okupira tri koordinaciona mesta u kompleksu) predstavlja „sedište stolice“, dok ligandi predstavljaju „noge stolice“ (Yan *et al.*, 2005; Dougan and Sadler, 2007; Suss-Fink, 2010; Zeng *et al.*, 2017). Najčešći arenski prsten u strukturi rutenijum(II)-arenskih kompleksa je benzen, metilbenzen (toluen), *para*-metil-izopropil benzen (*p*-cimen), bifenil i dihidroantracen (Slika 6) (Zeng *et al.*, 2017). Ovi kompleksi se još označavaju i kao „polu-sendvič“ (eng. *Half-sandwich*) kompleksi. Pokazano je da vezivanje X i Y liganda u formu bidentatnog helirajućeg liganda doprinosi antitumorskoj aktivnosti kompleksa, dok se za komplekse sa tri monodentatna liganda smatra da su previše reaktivni sa biomolekulima unutar ćelije i/ili komponentama hranljive podloge za gajenje ćelija *in vitro*, te stoga bivaju inaktivirani pre nego što dođu do ciljnog molekula (Yan *et al.*, 2005; Moucheron, 2009). Helirajući ligand „polu-sendvič“ kompleksa doprinosi kontroli stabilnosti i kinetike izmene odlazećeg liganda. Rastvorljivost helirajućeg liganda u vodi, kao i veličina i tip helirajućeg liganda i odlazeće grupe mogu imati kritičan uticaj na antitumorsku aktivnost rutenijum(II)-arenskog kompleksa (Suss-Fink, 2010; Zeng *et al.*, 2017). Hidrofobna priroda pridruženog arena može olakšati internalizaciju kompleksa (doprinosi lipofilnosti kompleksa) i doprineti ostvarivanju interakcija sa unutarćelijskim biomolekulima kao potencijalnim metama (Yan *et al.*, 2005). Hidroliza Ru-Z veze se smatra fundamentalnim korakom u aktivaciji Ru(II) kompleksa, i ukoliko je hidroliza kompleksa prebrza, može se desiti da kompleks ne stigne do svoje ćelijske mete (Dougan and Sadler, 2007; Trudu *et al.*, 2015).

Nakon prvobitnog otkrića citotoksične aktivnosti rutenijum-arenskog kompleksa od strane Tocher i saradnika 1992. godine (Dale *et al.*, 1992), dalji razvoj ovog tipa kompleksa je u najvećoj meri bio predvođen dvema grupama istraživača – Dyson i saradnici su razvili RAPTA tip rutenijum-arenskih kompleksa, kojima je zajedničko da sadrže fosfoadamantanski (PTA=1,3,5-triaza-7-fosfo-triciklo-[3.3.1.1] dekan) ligand (Ang, 2007; Dyson, 2007), dok su Sadler i saradnici razvili RM175 ($[Ru(\eta^6\text{-bifenil})(N,N\text{-}1,2\text{-etilendiamin})Cl]^+PF_6^-$) kompleks sa etilendiaminskim ligandom (Slika 6) (Yan *et al.*, 2005; Dougan and Sadler, 2007).



Slika 6. (A) Tipična struktura rutenijum(II)-arenskih „polu-sendvič“ kompleksa, (B) strukture RM175 i RAPTA kompleksa (modifikovano prema (Zeng *et al.*, 2017))

1.3.3.1. RM175

RM175 i RAPTA kompleksi u roku od nekoliko sekundi do nekoliko minuta razmenjuju hloridne ligande (odlazeća grupa) nakon rastvaranja u vodi – stepen hidrolize RM175 je za red veličine veći od cisplatine, a stoga i brzina kojom se RM175 vezuje za biomolekule poput DNK (Slika 6) (Alessio, 2017). Iako je poznato da hidroliza omogućava kovalentno vezivanje RM175 kompleksa za N7 na guaninu u DNK, poput cisplatine, pokazano je da prisustvo arena doprinosi ostvarivanju hidrofobnih interakcija između RM175 i DNK, putem interkalacije arena između baznih parova (Chen *et al.*, 2003; Dougan and Sadler, 2007; Coverdale, Laroia-McCarron and Romero-Canelon, 2019). Ovo objašnjava i zašto su rezultujući RM175-DNK adukti rezistentniji na reparaciju u odnosu na cisplatinu-DNK adukte, i najčešće se ne uklanjaju isecanjem nukleotida, već nekim od ostalih mehanizama popravke DNK oštećenja (Brabec and Nováková, 2006; Bergamo *et al.*, 2012). Dodatno, ova pojava može i delimično objasniti zašto RM175 ne dovodi do unakrsne rezistencije sa cisplatinom *in vitro* i *in vivo* (Aird *et al.*, 2002). Istraživanje na ćelijama humanog kolorektalnog karcinoma HCT116 je pokazalo da RM175 dovodi do zaustavljanja ovih ćelija u G1 i G2 fazama ćelijskog ciklusa i do ushodne regulacije p53 i BAX (eng. *Bcl-2-associated X protein*) proteina, promovišući apoptozu samo kod onih ćelija koje imaju oba funkcionalna proteina, što ukazuje da su i p53 i BAX neophodni za RM175-indukovanu apoptozu (Hayward *et al.*, 2005). Na modelu humanih ćelija kancera jajnika A2780, RM175 je pokazao sličnu citotoksičnu aktivnost kao i karboplatina, ali nešto nižu nego cisplatinu (Morris *et al.*, 2001). Sadler i saradnici su приметili da varijacija u tipu odlazeće grupe, N,N-helirajućeg liganda i arenskog prstena može imati značajan efekat na hemijsku i biološku aktivnost ovog tipa kompleksa (Morris *et al.*, 2001). Pa tako, zamena etilendiaminskog liganda sa N,N-dimetil-etilendiaminom rezultuje u drastičnom gubitku citotoksičnosti rezultujućeg rutenijum(II) kompleksa, dok zamena 1,2-diaminobenzenom povećava citotoksičnost kompleksa (Dougan and Sadler, 2007). Dalje studije mehanizma dejstva RM175 kompleksa su otkrile da, osim vezivanja za DNK, ovaj kompleks inhibira MMP-2, narušavajući na taj način procese ćelijske invazije i migracije (Bergamo *et al.*, 2010). Pokazano je da humane ćelije invazivnog adenokarcinoma dojke MDA-MB-231 postaju rezistentnije na odvajanje od konstituenata vanćelijskog matriksa (fibronektin, poli-L-lizin) nakon izlaganja kompleksu RM175, dok kod netumorigenih i neinvazivnih ćelijskih linija ovaj efekat nije uočen, što ukazuje na selektivnost u dejstvu RM175 kompleksa prema invazivnim ćelijama koje su sklone formiranju metastaza (Coverdale, Laroia-McCarron and Romero-Canelon, 2019). *In vivo* studije na mišjem modelu karcinoma dojke su pokazale ograničenu efikasnost RM175 u suzbijanju primarnog tumora, ali bolju antimetastatsku aktivnost, pri čemu je primenjena doza direktno uticala na procenat redukcije tumorske mase (Bergamo *et al.*, 2010).

1.3.3.2. RAPTA kompleksi

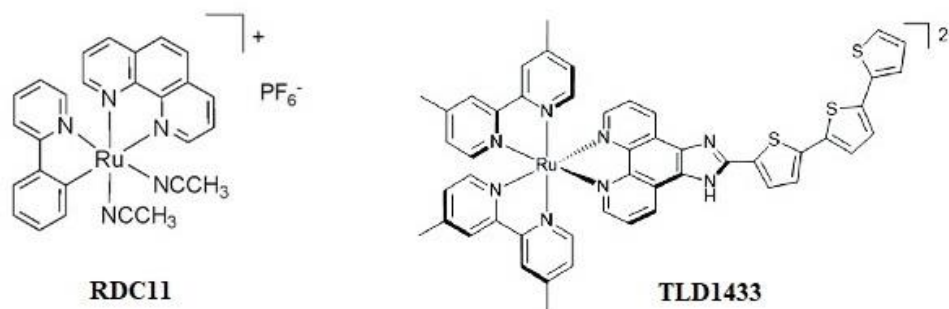
RAPTA kompleksi čine veliku familiju organometalnih kompleksa Ru(II) sa monodentatnim PTA ligandom i η^6 -arenskim ligandom (Slika 6) (Ang, 2007). RAPTA kompleksi pokazuju sličan obrazac aktivnosti kao i NAMI-A kompleks, uprkos očiglednim razlikama u njihovim oksidacionim stanjima, naelektrisanju, ligandima i geometriji. Prvi opisani kompleks iz ove grupe „polu-sendvič“ kompleksa bio je RAPTA-C ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{PTA})\text{Cl}_2]$), koji sadrži *p*-cimen kao η^6 -koordinisani aren. Za razliku od RM175, RAPTA kompleksi poseduju dva labilna hloridna liganda i hidrofilni PTA ligand, koji doprinose stabilizaciji kompleksa u +2 oksidacionom stanju, dok PTA doprinosi i povećanoj rastvorljivosti kompleksa u vodi (Murray *et al.*, 2016). Poput cisplatinе, i RAPTA kompleksi se mogu smatrati prolekovima, koji tek u uslovima niske (unutarćelijske) koncentracije hloridnih jona podležu brzom hidrolizi. Inicijalne studije su pokazale da kada se RAPTA-C inkubira u prisustvu superhelične DNK plazmida pBR322, u uslovima nižeg pH od fiziološkog ($\text{pH} < 7,0$), dolazi do njenog oštećenja, dok ova pojava nije uočena pri fiziološkom pH ($\text{pH} \geq 7,4$), što je ukazalo na moguću selektivnost u dejstvu RAPTA-C kompleksa prema hipoksičnom tumorskom tkivu (Allardyce *et al.*, 2001). RAPTA-C kompleks pokazuje slabu citotoksičnost *in vitro*, ali je citotoksičnost u određenoj meri veća prema tumorskim ćelijama u odnosu na netumorske ćelije (Scolaro *et al.*, 2005), pri čemu se smatra da upravo PTA ligand doprinosi selektivnosti kompleksa (Ang, 2007). *In vivo* eksperimenti na modelu karcinoma dojke kod miševa su pokazali da RAPTA-C i njegov benzenski analog, RAPTA-B ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-benzen})(\text{PTA})\text{Cl}_2]$), dovode do znatne redukcije veličine i broja metastaza u plućima tretiranih miševa, bez većeg uticaja na primarni tumor (Scolaro *et al.*, 2005). Casini i saradnici su pokazali da RAPTA-C formira stabilne adukte i inhibira funkciju katepsina B, cistein peptidaze odgovorne za degradaciju vanćelijskog matriksa i promovisanje metastaza (Casini *et al.*, 2008). Iako RAPTA kompleksi pokazuju manju antimetastatsku aktivnost u odnosu na NAMI-A, manje su toksični po miševе i mogu biti primenjeni u višim dozama. Variranjem strukture RAPTA-C kompleksa vezivanjem organskih supstituenata, poput inhibitora glutation-S-transferaze, može se povećati efikasnost kompleksa (Ang, 2007; Coverdale, Laroia-McCarron and Romero-Canelon, 2019). RAPTA-C dovodi do zaustavljanja ćelija u G2 fazi ćelijskog ciklusa usled nemogućnosti prolaska kroz G2-M kontrolnu tačku, indukuje apoptozu posredovanu aktivnošću mitohondrija i uzrokuje aktivaciju p53-JNK signalnog puta kod miševa sa EAC (eng. *Ehrlich ascites carcinoma*) karcinomom (Chatterjee *et al.*, 2008). Kombinovana terapija RAPTA-C sa erlotinibom (inhibitor receptora epidermalnog faktora rasta (eng. *Epidermal growth factor receptor*, EGFR)) i BEZ-235 (dvostruki inhibitor fosfatidilinozitol 3-kinaze (eng. *Phosphatidylinositol 3-kinase*, PI3K)) i ciljnog molekula za rapamicin kod sisara (eng. *Mammalian target of rapamycin*, mTOR)), je pokazala deset puta veću efikasnost u inhibiciji rasta tumora *in vivo*, u poređenju sa pojedinačnim tretmanima (Weiss *et al.*, 2015). Dyson i saradnici su pokazali da se RAPTA-C akumulira u hromatinu, potencijalno formirajući adukte na specifičnim histonskim mestima u okviru jezgra nukleozoma, što je ukazalo da primarna meta RAPTA-C kompleksa mogu biti proteini (Adhireksan *et al.*, 2014). *In vitro*, RAPTA-T ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-toluen})(\text{PTA})\text{Cl}_2]$) kompleks ispoljava umerenu, ali selektivnu citotoksičnost prema tumorskim ćelijama, sposobnost da selektivno inhibira pojedine korake u metastatskom procesu (odvajanje ćelija od primarnog tumora, migraciju/invaziju i adheziju za novi supstrat za rast), kao i veću selektivnost prema visoko invazivnim ćelijama karcinoma dojke u poređenju sa neinvazivnim i netumorigenim ćelijama (Bergamo *et al.*, 2008). RAPTA-T pokazuje određenu sličnost sa RAPTA-C u aktivnosti *in vivo*, gde uprkos zanemarljivoj redukciji primarnog tumora, RAPTA-T dovodi do smanjenja razvoja i rasta metastaza u plućima (Bergamo *et al.*, 2008). Lee i saradnici su pokazali da se RAPTA-T predominantno lokalizuje u ćelijskoj membrani MDA-MB-231 ćelija, u odnosu na neinvazivne MCF-7 ćelije (u saglasnosti sa selektivnim antimetastatskim dejstvom), ali da se u određenoj meri akumulira i u nukleolusu, što je u saglasnosti sa pretpostavkom da kada jednom dospe unutar ćelije, RAPTA-T asocira sa hromatinom (Lee *et al.*, 2017). Dodatne studije su pokazale preferencijalno vezivanje RAPTA kompleksa za proteine, čak i u prisustvu DNK (Casini *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2011; Adhireksan *et al.*, 2014; Babak *et al.*, 2015).

1.3.4. Rutenijum(II)-polipiridinski kompleksi

Rutenijum(II)-polipiridinski kompleksi predstavljaju veliku klasu rutenijumskih kompleksa koja je aktuelna u istraživanjima već nekoliko decenija. Osnovna karakteristika rutenijum(II)-polipiridinskih kompleksa je da sadrže u svojoj strukturi jedan ili više polipiridinskih N,N-helirajućih liganada, poput 2,2'-bipiridina (bpy), 1,10-fenantrolina (phen), dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppz), benzo[i]dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina (dppn), što doprinosi kinetičkoj inertnosti i lipofilnosti kompleksa (Zeng *et al.*, 2017). Oktaedarska geometrija daje mogućnost konstruisanja rutenijum(II)-polipiridina sa kompleksnom 3D strukturom, što doprinosi širokom spektru bioloških funkcija koje mogu ostvariti. Prisustvo polipiridinskih liganada omogućava ovim kompleksima da intenzivno i reverzibilno interaguju sa DNK i formiraju nekovalentne veze, putem interkalacije u DNK (ugrađivanjem između nukleotidnih baza dva lanca DNK) ili vezivanja za mali ili veliki žljeb DNK (Gill and Thomas, 2012; Mari *et al.*, 2015). Zahvaljujući sposobnosti da deluju kao interkalirajući agensi i da dovode do nastanka ROS, kao i osobinama fotoluminiscentnosti koju poseduju mnogi rutenijum(II)-polipiridinski kompleksi, ova jedinjenja su našla primenu u biološkim sistemima, za dijagnostičke i terapijske svrhe, kao luminescentne probe za specifično obeležavanje unutarćelijskih struktura i njihovu lokalizaciju ili kao citotoksični agensi (Schatzschneider *et al.*, 2008; Gill and Thomas, 2012; Gill *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016; Poynton *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018). Osim sa DNK, Ru(II)-polipiridinski kompleksi mogu reverzibilno interagovati i sa RNK i sa proteinima (Zeng *et al.*, 2017). Po prvi put je biološka aktivnost rutenijum(II)-polipiridinskih kompleksa pokazana na primeru dva enantiomerna kompleksa, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ i $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, pri čemu je otkriveno da mogu delovati kao inhibitori enzima acetilholinesteraze (Dwyer *et al.*, 1952). U daljem razvoju ovog tipa kompleksa, istraživači su se fokusirali na upotrebu interkalirajućih liganada sa većim aromatičnim površinama, i razvijeni su kompleksi $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ i $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{dppz}]^{2+}$ (Wheate *et al.*, 2007). Za ova dva kompleksa je pokazano da ne ispoljavaju fotoluminiscentiju u vodenom rastvoru na sobnoj temperaturi, dok nakon interkalacije u mali žljeb dvolančane DNK luminescentija naglo raste (eng. *Light switch effect*), što govori u prilog racionalnom dizajniranju ovakvih kompleksa kao dijagnostičkih agenasa, za fluorescentno obeležavanje ciljnih ćelija (Wheate *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2016). Dodatno, nekoliko grupa istraživača je sintetisalo serije rutenijum(II)-polipiridinskih kompleksa sa ligandima na bazi 2-fenilimidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina, za koje je pokazano da specifično ciljaju mitohondrije i indukuju apoptozu u cisplatina-rezistentnim ćelijama (Chen *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2014).

1.3.4.1. RDC11

RDC11 je jedan od najaktivnijih kompleksa RDC (eng. *Ruthenium-derived compound*) familije organometalnih rutenijum(II) kompleksa, koji sadrži dva polipiridinska liganda, i za koga su Gaiddon i saradnici pokazali da ispoljava citotoksičnu aktivnost prema širokom spektru tumorskih ćelijskih linija, uključujući i cisplatina-rezistentne (Slika 7) (Gaiddon *et al.*, 2005). Licono i saradnici su pokazali da RDC11 interaguje sa histonima, kao i da postoje značajne razlike u putevima prenosa signala koje aktiviraju RDC11 i cisplatina (Licono *et al.*, 2017). U poređenju sa cisplatinom, tretman RDC11 kompleksom dovodi do niže hronične toksičnosti *in vivo* i do veće inhibicije rasta različitih tipova tumora implantiranih u miševce (Meng *et al.*, 2009). Meng i saradnici su pokazali da RDC kompleksi ulaze u ćeliju aktivnim transportom, preko nekoliko transportnih proteina (Meng *et al.*, 2009). Ispitivanja mehanizma dejstva RDC11 kompleksa su pokazala slabu interakciju sa DNK, i ograničenu sposobnost formiranja oštećenja DNK, što je ukazalo na alternativne mehanizme kojima ispoljava antitumorsku aktivnost. RDC11 indukuje apoptozu u tumorskim ćelijama putem aktivacije transkripcionog faktora CHOP (eng. *C/EBP homologous protein*, član *CCAAT/enhancer-binding protein* familije transkripcionih faktora), ključnog medijatora odgovora na ER-stres (Meng *et al.*, 2009). Varijacijama u tipu liganda vezanog za rutenijum u RDC kompleksima razvijeni su potentniji kompleksi veće citotoksične aktivnosti *in vitro* i različite selektivnosti za tumorske ćelije određenog tkiva (Bergamo *et al.*, 2012).



Slika 7. Strukture RDC11 i TLD1433 kompleksa (modifikovano prema (Meng *et al.*, 2009), (Monro *et al.*, 2019))

Dobro poznata fotofizička i fotohemijška svojstva nekih rutenijum(II)-polipiridinskih kompleksa su doprinela tome da se ovaj tip kompleksa ispita u sklopu jednog specifičnog pristupa na polju antitumorske terapije, a koji podrazumeva primenu rutenijum(II)-polipiridinskih kompleksa kao foto-osetljivih (eng. *Photosensitizer*) prolekova u fotodinamičkoj terapiji (eng. *Photodynamic therapy*, PDT). PDT je medicinski priznata tehnika, koja se uveliko koristi u dermatologiji i oftalmologiji, kao i u terapiji tumora (Mari *et al.*, 2015; Monro *et al.*, 2019). To je neinvazivna tehnika koja se zasniva na principu upotrebe određenog jedinjenja kao foto-osetljivog agensa, koji u prisustvu kiseonika i svetlosti u crvenom ili blisko-crvenom delu spektra (>600 nm) dovodi do citotoksičnog oštećenja tkiva, usled povećane produkcije ROS, posebno singlet kiseonika ($^1\text{O}_2$) (Mari *et al.*, 2015). U kontekstu antitumorske terapije, PDT omogućava selektivno indukovanje smrti tumorskih ćelija, bez neželjenih efekata po zdrave ćelije. Kako bi se povećala senzitivnost za tumorsko tkivo, foto-osetljivi agensi se mogu kovalentno vezati za ligand za koji ciljane tumorske ćelije poseduju površinske receptore, koji su ili jedinstveni ili prekomerno ekspimirani. Dodatno, foto-osetljivi agensi mogu biti primenjeni u vidu nanočestica koje lako prolaze kroz vaskulaturu tumorskog tkiva ili mogu biti konstruisani tako da ciljaju određene ćelijske organele, poput mitohondrija, čime se osigurava da dođe do PDT-izazvane apoptoze tumorskih ćelija (Monro *et al.*, 2019). Inkapsulacijom rutenijum(II)-polipiridinskih kompleksa u nanočestice povećava se isporuka kompleksa i obezbeđuje se selektivno ciljanje tumorskih ćelija, čime se poboljšava efikasnost PDT (Zeng *et al.*, 2017).

1.3.4.2. TLD1433

SAR studije su omogućile sintezu i razvoj velikog broja rutenijum(II) kompleksa sa ligandima na bazi polipiridina kao foto-osetljivih agenasa, od kojih je kompleks $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{IP-TT})]^{2+}$ (dmb=4,4'-dimetil-2,2'-bipiridin, IP-TT=2-(2',2'':5'',2'''-tertiofen)-imidazo[4,5-f][1,10-fenantrolin]), kasnije označen kao TLD1433, pokazao veliki potencijal za PDT primenu (Slika 7) (Fong *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015; Monro *et al.*, 2019). TLD1433 je ujedno i jedini rutenijum(II)-polipiridinski kompleks koji je ušao u kliničke studije. Nakon što je uspešno završio fazu I, TLD1433 je u maju 2019. godine ušao u fazu IIa kliničke studije za PDT pacijenata sa specifičnim tipom nemuskularnog invazivnog karcinoma bešike (Monro *et al.*, 2019). Pokazano je da se ovaj kompleks vezuje za DNK plazmida i da dovodi do isecanja DNK u prisustvu svetlosti, kao i da se lokalizuje u nukleusu ćelija *in vitro* (Fong *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015). Fong i saradnici su pokazali da TLD1433 ispoljava nisku citotoksičnost u mraku, dok nakon osvetljavanja (optimalno svetlost talasne dužine 520 nm), dolazi do aktivacije TLD1433, što za posledicu ima visoku fototoksičnost (nekoliko μM), posebno prema ćelijama kolorektalnog karcinoma i glioma *in vitro* (Fong *et al.*, 2015). *In vivo*, TLD1433 dovodi do smanjenja primarnog tumora i produženog preživljavanja tretiranih miševa (Fong *et al.*, 2015).

1.3.5. Rutenijumski kompleksi konjugovani sa bioaktivnim ligandima

Kod solidnih tumora, monoterapija (terapija jednim agensom) može dovesti do značajne regresije tumora, ali je odgovor na ovu terapiju često ograničenog trajanja usled pojave rezistentnih ćelijskih klonova ili akumulacije oštećenja zdravog (netumorskog) tkiva. Lekovi dizajnirani da deluju na

individualne molekulske mete (eng. *Single-target drug*) obično ne mogu ostvariti adekvatan potencijal u borbi sa bolestima koje nastaju kao posledica promena u više od jednog gena (multigeneska oboljenja), kakva je kancer, ili sa oboljenjima koja pogađaju više tkiva ili tipova ćelija, kakve su dijabetes, inflamatorne i neurodegenerativne bolesti. Glavna strategija u prevazilaženju rezistencije na antitumorsku terapiju podrazumeva kombinovanu terapiju, odnosno upotrebu kombinacije dva ili više terapijskih agenasa koji imaju fundamentalno različite mehanizme dejstva i uzrokuju različit nivo toksičnosti prema zdravom tkivu. Cisplatina, karboplatina i oksaliplatina su do danas ispitane u kombinaciji sa hemioterapeutskim agensima različitog porekla i mehanizma dejstva, poput etoposida, mitomicina c, vinblastina, paklitaksela, gemcitabina, ciklofosfamida, doksorubicina, metotreksata, 5-fluorouracila, inhibitora histon deacetilaza ili inhibitora poli(ADP-ribozil) polimeraze, što je značajno poboljšalo preživljavanje brojnih onkoloških pacijenata (Cepeda *et al.*, 2007; Drean, Lord and Ashworth, 2016). Pored platinskih, i mnogi rutenijumski kompleksi su ispitani u kombinaciji sa različitim antitumorskim agensima koji se nalaze u širokoj primeni, i pokazano je da kombinovana terapija ima veću antitumorsku efikasnost u odnosu na pojedinačne agense, posebno u slučaju suzbijanja rasta rezistentnih tumorskih ćelija (Heffeter *et al.*, 2013; Bergamo, Riedel, *et al.*, 2015; Leijen *et al.*, 2015; Weiss *et al.*, 2015). Nažalost, višekomponentni kokteli lekova mogu imati štetne posledice usled kompleksne farmakokinetike i nepredvidivih interakcija primenjenih lekova (Anighoro, Bajorath and Rastelli, 2014).

Pojedinačni lekovi sa dvojnim ili više-targetnim potencijalom (eng. *Multi-target drug*) pokazuju određene prednosti u odnosu na kombinovanu terapiju: pojednostavljena farmakokinetika, veća ekonomičnost, mogućnost primene nižih doza terapijskih sredstava, prevazilaženje rezistencije, niža stopa pojave neželjenih efekata, kao i poboljšani ishod lečenja (Anighoro, Bajorath and Rastelli, 2014). Konstruisanje jednog terapijskog agensa koji istovremeno modulira više individualnih molekularnih meta, odnosno agensa koji ispoljava polifarmakološka svojstva, je postala paradigma u razvoju lekova, posebno na polju razvoja agenasa za lečenje multifunkcionalnih bolesti kakva je kancer (de Lera and Ganesan, 2016; Fu *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2017).

Zimmermann i saradnici su podelili više-targetne terapijske u tri kategorije, i to na one u kojima (Zimmermann, Lehár and Keith, 2007):

1. Pojedinačne komponente kombinovanog molekula utiču na različite ciljne molekule koji pripadaju istim ili različitim putevima prenosa signala unutar iste ili različitih ćelija, i tako obezbeđuju kombinovani efekat;
2. Jedna komponenta može da uzrokuje promene u metabolizmu druge, farmakološki aktivne komponente, ili može blokirati mehanizme koji dovode do rezistencije;
3. Pojedinačne komponente se vezuju za odvojena ciljna mesta na istoj biološkoj meti, obezbeđujući kombinovani efekat i pojačanu farmakološku aktivnost kombinovanog molekula.

U skorije vreme, istraživači u oblasti medicinske neorganske hemije se sve više fokusiraju na razvoj individualnih agenasa koji pokazuju afinitet ka različitim ćelijskim metama putem koordinacije biološki aktivnog organskog molekula (liganda) za jone metala (Sava, Bergamo and Dyson, 2011; Kenny and Marmion, 2019; Štarha and Trávníček, 2019; Golbaghi and Castonguay, 2020). Prednost ovakvog pristupa je upravo u tome što supstanca koja se uvodi u kompleks ima poznatu (ili bar željenu) biološku metu prema kojoj može ispoljiti biološku aktivnost. Do danas je ispitan veliki broj jedinjenja sa bioaktivnim ligandima vezanim za različite jone prelaznih metala, poput platine(II/IV), kobalta(II/III), cinka(II), vanadijuma(II), nikla(II), bakra(II), rodijuma(II), rutenijuma(II/III), osmijuma(II), iridijuma(III), paladijuma(II) i zlata(I), pri čemu su mnoga od ovih kombinovanih jedinjenja ispoljila znatan antitumorski potencijal (Renfrew, Bryce and Hambley, 2013; Banerjee *et al.*, 2015; Mokesch *et al.*, 2015; Kosiha, Parthiban and Elango, 2018; Li, Liu and Tian, 2018; Štarha and Trávníček, 2019; Golbaghi and Castonguay, 2020). S obzirom da su među prelaznim metalima, pored platinskih, rutenijumski kompleksi široko ispitivani kao potencijalni antitumorski agensi zbog svojih već pomenutih osobina, uvođenje biološki aktivnog liganda u strukturu rutenijumskog kompleksa i konstruisanje kombinovanog molekula (eng. *Combi-molecules*) može poboljšati potencijal oba agenasa, i

postići različit i širi spektar biološke aktivnosti, u poređenju sa pojedinačnim polaznim rutenijumskim kompleksom ili ligandom (Golbaghi *et al.*, 2019).

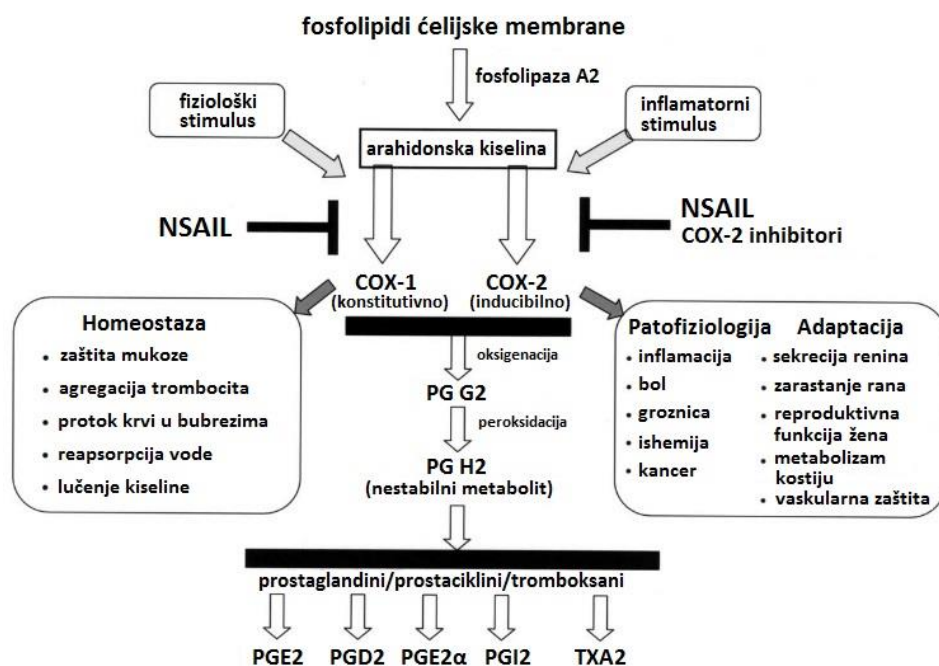
Mnogi rutenijumski kompleksi su pokazali sposobnost da interaguju sa različitim enzimima koji imaju važne uloge u metaboličkim putevima i drugim putevima prenosa signala povezanih sa kancerom, stoga, ciljanje upravo enzima uključenih u internalizaciju agenasa u ćelije, proliferaciju tumorskih ćelija, metastaziranje, produkciju ROS, popravku oštećenja DNK i regulaciju ćelijske smrti, omogućava postizanje veće terapijske efikasnosti (Dwyer *et al.*, 1952; Zhang, Carroll and Meggers, 2004; Casini *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2011; de Camargo *et al.*, 2016; Merlino, 2016). Većina rutenijum(II) kompleksa je pokazala sposobnost vezivanja za aktivno mesto enzima upravo preko svojih bioaktivnih liganada (Zeng *et al.*, 2017). Jedan primer racionalno dizajniranog kombinovanog molekula je ethaRAPTA, u kome je etakrinska kiselina (etha) vezana za rutenijum(II)-arenski deo RAPTA kompleksa (Chatterjee *et al.*, 2011). Etakrinska kiselina je inhibitor enzima glutation-S-transferaze, koji je povezan sa pojavom rezistencije i često je prekomerno ekspimiran u tumorima rezistentnim na cisplatinu. Konstruisanjem ovako hibridnog molekula povećava se citotoksičnost kompleksa i aktivnost prema rezistentnim tumorima. Na primeru ethaRAPTA kompleksa je pokazano da i jon rutenijuma pokazuje sposobnost vezivanja za aktivno mesto enzima (Kilpin and Dyson, 2013).

Kilpin i Dyson su predložili klasifikaciju inhibitora enzima na bazi metala u tri glavne klase, zavisno od uloge koju ima jezgro kompleksa sa jonom metala u inhibitornim procesima, i to na (Kilpin and Dyson, 2013):

1. Komplekse u kojima je ligand biološki aktivna komponenta odgovorna za vezivanje za enzim i inhibiciju aktivnosti enzima, dok se jon metala ne vezuje direktno za enzim;
2. Komplekse u kojima je jon metala reaktivan, dok ligandi najčešće nemaju biološku aktivnost, ali imaju ulogu da stabilizuju kompleks;
3. Komplekse gde su i jon metala i ligandi biološki aktivni i podjednako odgovorni za biološku aktivnost kompleksa.

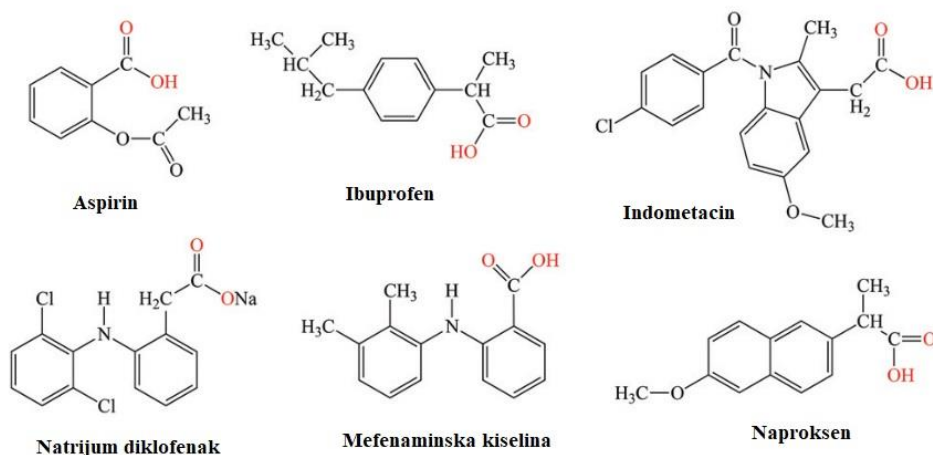
1.4. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi (NSAIL)

Za nesteroidne antiinflamatorne lekove (NSAIL) je pokazano da poseduju antitumorska svojstva, što ih čini pogodnim za upotrebu u kombinovanoj terapiji sa hemioterapeutskim agensima za lečenje kancera (Duffy *et al.*, 1998; Jänne and Mayer, 2000; Thun, Henley and Patrono, 2002). NSAIL se generalno koriste u terapiji akutnog i hroničnog bola, često praćenih inflamatornim stanjima. Osnovni molekularni mehanizam dejstva NSAIL se zasniva na inhibiciji enzima ciklooksigenaza (eng. *Cyclooxygenase*, COX) (Slika 8) (Jänne and Mayer, 2000).



Slika 8. Šematski prikaz osnovnih funkcija ciklooksigenaza-1/2 (COX-1, COX-2) i mehanizma dejstva nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL) (modifikovano prema (Hussain, Gupta and Mukhtar, 2003)).

Klinički podaci su pokazali da je progresija tumora često praćena hroničnom inflamacijom povezanom sa prekomernom ekspresijom COX-1 i COX-2, koje su ključne za biosintezu inflamatornih prostaglandina (PG) (Hussain, Gupta and Mukhtar, 2003). COX-1 je konstitutivno ekspimirana u mnogim tkivima i ima važnu ulogu u zaštiti gastrointestinalne mukoze i agregaciji trombocita, pa se smatra da ima *house-keeping* funkciju, dok je COX-2 inducibilni enzim (konstitutivno je ekspimiran u bubrezima i mozgu kod ljudi), čija ekspresija može biti pokrenuta u inflamatornim stanjima, tokom zarastanja rana, kao i tokom neoplastične transformacije ćelija (Thun, Henley and Patrono, 2002). NSAIL se međusobno razlikuju u sposobnosti da inhibiraju COX-1 ili COX-2, što zavisi od primenjene koncentracije i tipa tkiva, pa tako acetilsalicilna kiselina (Aspirin) primenjena u niskim dozama preferencijalno inhibira COX-1 (ireverzibilnim mehanizmom), dok većina ostalih konvencionalnih NSAIL (ibuprofen, indometacin), inhibiraju podjednako i COX-1 i COX-2 reverzibilnim mehanizmom (označavaju se još i kao neselektivni COX inhibitori), dok nova klasa NSAIL inhibira specifično COX-2, što smanjuje neželjene efekte, ali ujedno povećava i rizik od vaskularnih oboljenja (Willoughby, Moore and Colville-Nash, 2000; Thun, Henley and Patrono, 2002). NSAIL se mogu osim prema mehanizmu dejstva (selektivnosti prema jednom tipu COX enzima) klasifikovati i na osnovu karakteristične hemijske grupe, i podeliti u nekoliko hemijskih klasa: salicilati (acetilsalicilna kiselina), fenilalkanoične kiseline (ibuprofen, ketoprofen, naproksen, indometacin, diklofenak), oksikami (piroksikam, meloksikam, tenoksikam), antranilne kiseline (mefenaminska kiselina), sulfonamidi, furanoni i propanamidi (Slika 9) (Weder *et al.*, 2002).



Slika 9. Strukture nekih od predstavnika nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL) (modifikovano prema (Psomas and Kessissoglou, 2013))

Prekomerna ekspresija COX-2 je prvo uočena na primeru kolorektalnog karcinoma (koncentracija prostaglandina E₂ viša u tumorskom tkivu kolorektuma nego u okolnoj mukozi), da bi kasnije bila otkrivena kod različitih tipova humanih karcinoma, uključujući i karcinom dojke (Howe *et al.*, 2001; Thun, Henley and Patrono, 2002). Pokazano je da je COX-2 uključen ne samo u inicijaciju, već i u progresiju tumora, mada tačan mehanizam kojim ciklooksigenaze doprinose tumorigenezi još uvek nije do kraja razjašnjen. NSAIL mogu inhibirati razvoj kolorektalne neoplazije (adenomatozne polipoze) putem dva odvojena mehanizma dejstva. Jedan mehanizam podrazumeva sposobnost NSAIL da ponovo pokrenu proces ćelijske smrti kod ćelija kolorektuma koje imaju germinativnu mutaciju u APC (eng. *Adenomatous polyposis coli*) genu, odgovornom za nastanak adenomatoznih polipa, a drugi mehanizam se odnosi na inhibiciju angiogeneze, putem inhibicije ekspresije proangiogenih faktora, poput VEGF (Tsuji *et al.*, 1998; Jänne and Mayer, 2000; Thun, Henley and Patrono, 2002). NSAIL, takođe, mogu indukovati apoptozu ćelija mehanizmom nezavisnim od dejstva COX, putem aktivacije kaspaza ili inhibicijom aktivacije nuklearnog faktora kB (eng. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF-kB), a mogu i inhibirati proliferaciju ćelija putem nishodne regulacije ekspresije β-katenina (Jänne and Mayer, 2000; Smith, Hawcroft and Hull, 2000). Za prostaglandine se smatra da posredno doprinose tumorigenezi, putem stimulacije proliferacije tumorskih ćelija i supresije imunskog sistema (Howe *et al.*, 2001). Osim ciklooksigenaza, pokazano je da NSAIL mogu selektivno inhibirati i lipoksigenazu (eng. *Lipoxygenase*, LOX), enzim koji ima angiogenu aktivnost i prekomerno je ekspimiran u mnogim tumorima (Kenny and Marmion, 2019).

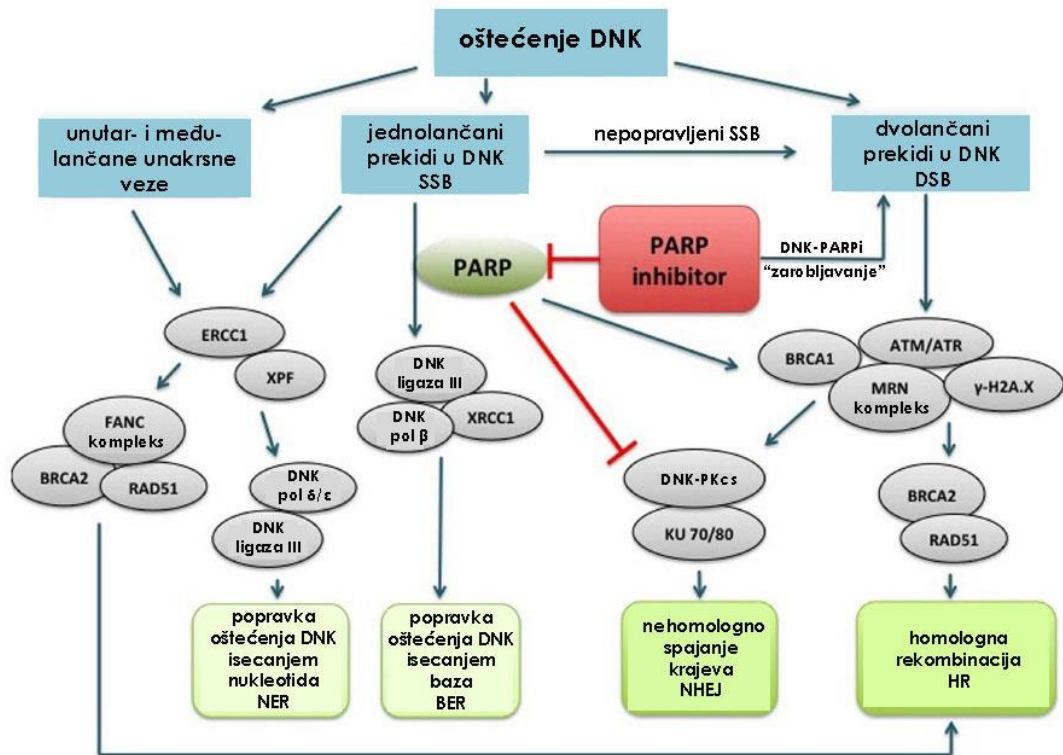
Ciklooksigenaze predstavljaju atraktivnu ćelijsku metu, odnosno mogu biti iskorišćene kao bioaktivni ligandi za konstruisanje više-targetnih antitumorskih agenasa na bazi metala. Do danas su različiti NSAIL (aspirin, ibuprofen, naproksen, indometacin, diklofenak) konjugovani za metale (platina, rutenijum, osmijum, bakar, cink, kobalt), pri čemu je pokazano da ovakvi hibridni molekuli pokazuju veći antitumorski potencijal *in vitro* i *in vivo* u odnosu na pojedinačne polazne komponente, pri čemu je citotoksičnost metal-NSAIL kompleksa u nivou ili niža od citotoksičnosti cisplatine, dok su pojedini hibridni molekuli pokazali i sposobnost prevazilaženja rezistencije na cisplatinu (Psomas and Kessissoglou, 2013; Cheng *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2015; Neumann *et al.*, 2015; Plano *et al.*, 2016; Alves Rico *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2017; Intini *et al.*, 2017; Paul *et al.*, 2017; Mandal *et al.*, 2018). Formirani metal-NSAIL kompleksi mogu biti mononuklearni ili dinuklearni, a NSAIL može biti koordinisan za metal preko karboksilne grupe kao monodentatni ligand, kao bidentatni helirajući ligand ili kao bidentatni ligand koji je vezan za dva jona metala (Psomas and Kessissoglou, 2013). Istraživanja aktivnosti rutenijumskog kompleksa sa ibuprofenom, na C6 ćelijama glioma pacova, su pokazala da ovaj kompleks dovodi do inhibicije proliferacije ćelija glioma putem povišenja ekspresije p21 i p27 proteina, zaustavljanja ćelija u G1 i G2 fazi ćelijskog ciklusa, sniženja mitohondrijalnog membranskog potencijala, sniženja ekspresije Bcl-2 (eng. *B-cell lymphoma 2*) proteina, i posledične apoptoze ćelija, kao i

do povišenja ekspresije COX-1 proteina (Benadiba *et al.*, 2010). Kompleks je takođe pokazao sposobnost da dovede do smanjenja veličine tumora *in vivo*, na modelu ortotopnog glioma kod pacova, i do inhibicije proliferacije humanih ćelija glioma *in vitro* (Benadiba *et al.*, 2014). Dodatno, jedna grupa istraživača je pokazala da hibridni molekul u formi platina(IV) proleka, dobijen vezivanjem cisplatine za aspirin, ispoljava bolja antitumorska i antiinflamatorna svojstva u humanim ćelijama karcinoma prostate *in vitro*, i uzrokuje nižu nefrotoksičnost i ototoksičnost nego u slučaju kada se cisplatina i aspirin primene u obliku kombinovane terapije (Pathak *et al.*, 2014). Mehanizam dejstva ovog hibridnog molekula se zasniva na sniženju ekspresije COX-2 proteina i sniženju nivoa inflamatornih citokina, faktora nekroze tumora alfa (eng. *Tumor necrosis factor α* , TNF α) i interleukina-6, uz istovremeno povećanje sekrecije antiinflamatornog citokina, interleukina-10 (Pathak *et al.*, 2014).

1.5. Poli(ADP-ribozil) polimeraze (PARP) i uloga PARP-1 u odgovoru na oštećenje DNK

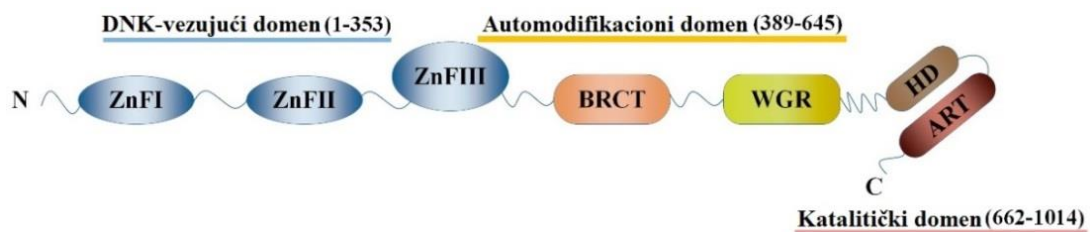
Svaka ćelija dnevno doživljava više desetina hiljada genotoksičnih lezija koje mogu dovesti do višestrukih oštećenja DNK, poput jednolančanih prekida DNK (eng. *Single strand break*, SSB), dvolančanih prekida DNK (eng. *Double strand break*, DSB), formiranja unakrsnih kovalentnih veza između baza unutar jednog lanca DNK ili između dva lanca DNK, ili do formiranja adukata na bazama DNK (Ciccia and Elledge, 2011). Do danas je identifikovano pet glavnih i nekoliko pridruženih mehanizama reparacije DNK, čija je uloga da održavaju stabilnost genoma (Hoeijmakers, 2001; Pearl *et al.*, 2015). Dok se SSB ispravljaju mehanizmima isecanja nukleotida, isecanja baza ili popravkom pogrešno sparenih baza, DSB se ispravljaju mehanizmima homologne rekombinacije ili nehomolognog spajanja krajeva (Slika 10) (Cerrato, Morra and Celetti, 2016).

Familija enzima poli(ADP-ribozil) polimeraza (PARP) (druga imena: poli(ADP-ribozil) sintetaze, poli(ADP-ribozil) transferaze) se sastoji od više od 17 članova prisutnih kod eukariota (Schreiber *et al.*, 2006). Ovi enzimi su kodirani različitim genima i grupisani u pet potklasa na osnovu strukturne organizacije i lokalizacije u ćeliji, pri čemu većina poseduje konzervisani katalitički domen (Amé, Spenlehauer and De Murcia, 2004; Min and Im, 2020). Članovi PARP proteinske familije su uključeni u različite procese u ćeliji, poput popravki oštećenja DNK, remodelovanja hromatina, kao i regulacije transkripcije, diferencijacije ćelije, ćelijskog metabolizma, inflamacije, ćelijskog ciklusa, epitelno-mezenhimske tranzicije tumorskih ćelija i ćelijske smrti (Schreiber *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2011; Pu *et al.*, 2014; Bai, 2015; Bock and Chang, 2016; Brown *et al.*, 2017; Ohmoto and Yachida, 2017). Nizak nivo oštećenja DNK dovodi do aktivacije PARP enzima koji učestvuje u popravci DNK, što omogućava preživljavanje ćelije. Sa druge strane, obimna oštećenja DNK dovode do prekomerne ekspresije PARP enzima, što uzrokuje nekrozu ćelija, a povezano je sa nastankom oksidativnog stresa i razvojem metaboličkih i inflamatornih bolesti, neurodegenerativnih poremećaja, kao i kancera (Tentori, Portarena and Graziani, 2002; Cepeda *et al.*, 2006; Byers *et al.*, 2012; Bai, 2015; Benafif and Hall, 2015). PARP-1 (Mw = 113 kDa) je prvi okarakterisani (Chambon, Weill and Mandel, 1963), a ujedno je i najzastupljeniji i najbolje izučeni protein iz PARP familije (Cepeda *et al.*, 2006). PARP-1 je visoko konzervisani protein, lokalizovan u nukleusu i vezan za hromatin, koji je kodiran *ADPRT-1* (eng. *ADP-ribosyltransferase-1*) genom i odgovoran je za oko 90% ukupne bazalne i stimulisane aktivnosti PARP familije (Zaremba and Curtin, 2007; Bai, 2015). Smatra se ključnim akterom u popravci SSB mehanizmom isecanja baza, ali i u popravci DSB mehanizmom homologne rekombinacije, putem aktivacije ATM (eng. *Ataxia telangiectasia mutated*)/ATR (eng. *Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) proteinskog kompleksa, uz istovremenu inaktivaciju DNK-zavisne protein kinaze, DNK-PK α (eng. *DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*) uključene u mehanizam reparacije DNK nehomolognim spajanjem krajeva, što PARP-1 čini centralnim proteinom u kompleksnom sistemu popravki oštećenja DNK, sa važnom ulogom u nadzoru i održavanju integriteta genoma (Slika 10) (Satoh and Lindahl, 1992; Schreiber *et al.*, 2006; De Vos, Schreiber and Dantzer, 2012; O'Sullivan *et al.*, 2014; Bai, 2015; Brown *et al.*, 2017; Chaudhuri and Nussenzweig, 2017).



Slika 10. Dijagram koji prikazuje specifične tipove oštećenja DNK i proteine uključene u različite mehanizme popravke tih oštećenja (modifikovano prema (O’Sullivan *et al.*, 2014))

Strukturno, PARP-1 se sastoji od tri funkcionalno različita domena (Slika 11) (Tao, Gao and Liu, 2009; Jain and Patel, 2019; Min and Im, 2020). N-terminalni DNK-vezujući domen sadrži tri ZnF (eng. *Zinc finger*) motiva, odgovorna za prepoznavanje DNK oštećenja i vezivanje PARP-1 za ista putem alosteričke aktivacije. Centralni automodifikacioni domen sadrži BRCT (eng. *Breast cancer susceptibility protein C terminus*) motiv, koji je meta za auto-poli(ADP-ribozilaciju), i WGR motiv, bogat aminokiselinama triptofanom (W), glicinom (G) i argininom (R), sa važnom ulogom u pokretanju popravke oštećenja DNK putem interakcije sa ZnF motivima i katalitičkim domenom. Automodifikacioni domen PARP-1 enzima pomaže kreiranju negativnog naelektrisanja koje omogućava disocijaciju enzima sa DNK, čineći DNK pristupačnom proteinima koji vrše popravku oštećenja DNK. Oslobođeni PARP enzim podleže procesu reaktivacije brzo hidrolizom poli(ADP-ribozil) jedinica koju vrši poli(ADP-ribozil) glikohidrolaza (PARG) (Cepeda *et al.*, 2006). C-terminalni katalitički domen sadrži HD (eng. *Helical domain*) subdomen i ADP-riboziltransferazni (ART) domen sa akceptorskim mestom za nikotinamid adenin dinukleotid (NAD⁺). Visoko konzervisani region u okviru katalitičkog domena formira aktivno mesto enzima i označava se kao „PARP potpis“ (eng. *PARP signature*). Katalitički domen PARP enzima katalizuje najmanje tri reakcije: vezivanje prve ADP-ribozil jedinice za akceptorsku amino kiselinu (reakcija inicijacije), dodavanje novih ADP-ribozil jedinica na postojeće (reakcija elongacije), i formiranje razgranatog poli(ADP-ribozil) lanca (reakcija grananja) (Ruf *et al.*, 1998).

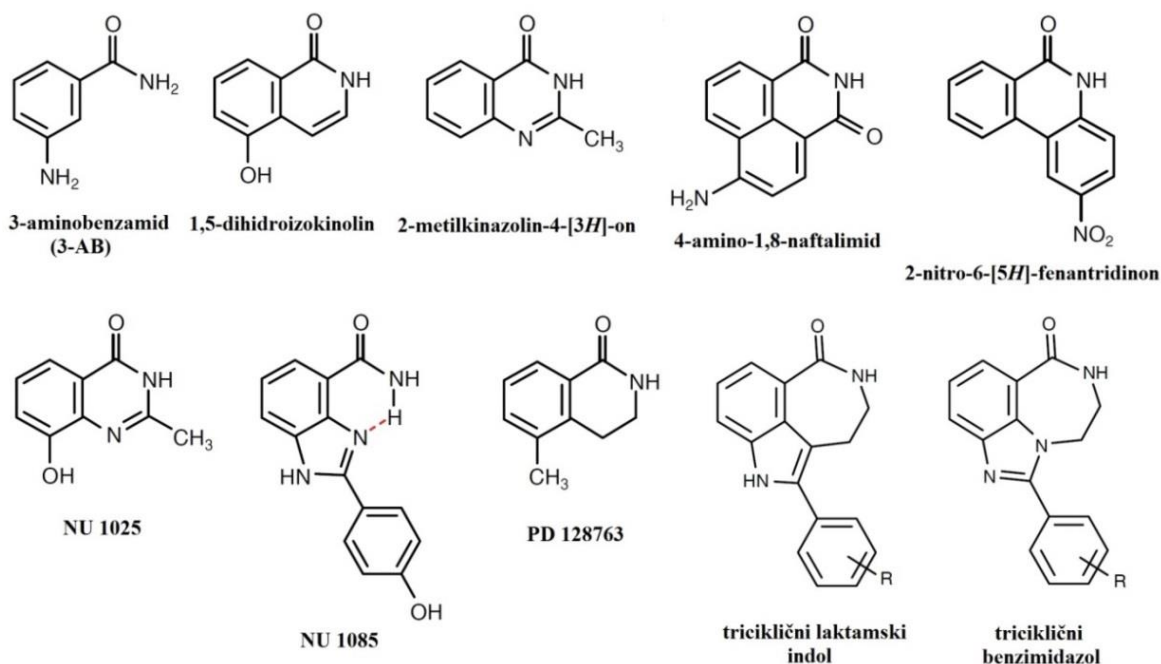


Slika 11. Strukturna i funkcionalna organizacija humanog poli(ADP-ribozil) polimeraza-1 (PARP-1) enzima (modifikovano prema (Min and Im, 2020))

Nakon oštećenja DNK izazvanog egzogenim toksinima, jonizujućim ili ultravioletnim zračenjem, oksidativnim stresom, ćelijskim metabolitima ili hemioterapeutskim agensima, PARP-1 biva regrutovan na mesto prekida u DNK, gde se potom katalitički aktivira vezivanjem u obliku homodimera za oštećenu DNK, preko ZnFI i ZnFIII motiva, i olakšava dalju popravku DNK (Cepeda *et al.*, 2006; Zaremba and Curtin, 2007; Thomas *et al.*, 2019). Nakon vezivanja za mesto DNK oštećenja, aktivirani PARP-1 koristi β -NAD⁺ kao supstrat, seče ga na nikotinamid i ADP-ribozil jedinice, koje se potom kovalentno vezuju za aminokiselinske ostatke (glutamat, aspartat i lizin) i generišu linearne ili razgranate poli(ADP-ribozil) lance (PAR), dužine 200-300 aminokiselinskih ostataka. Ovaj proces post-translacione modifikacije je označen kao „PARilacija“ (eng. *PARylation*) i odvija se na samom PARP enzimu (autoPARilacija) i na akceptorskim proteinima (transPARilacija), poput histona i proteina uključenih u popravku oštećenja DNK (De Vos, Schreiber and Dantzer, 2012; Cerrato, Morra and Celetti, 2016). Prisustvo PAR lanaca na mestu prekida u DNK, dovodi do relaksacije hromatina i omogućava regrutovanje i nekovalentno vezivanje proteina za popravku SSB, poput XRCC1 (eng. *X-ray repair cross-complementing protein 1*), DNK ligaze 3 i DNK polimeraze β (Slika 10) (El-Khamisy *et al.*, 2003; Schreiber *et al.*, 2006; Chaudhuri and Nussenzweig, 2017; Min and Im, 2020).

1.5.1. PARP inhibitori

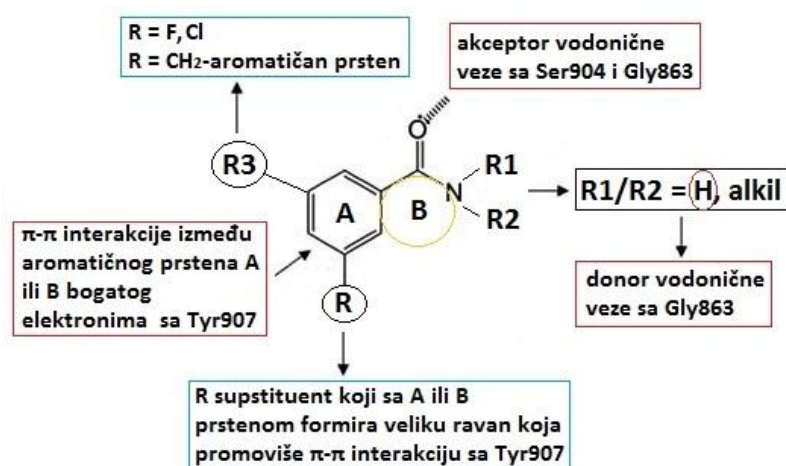
Otkriće uloga PARP-1 enzima u odgovoru na oštećenje DNK, kao i u regulaciji ćelijske smrti omogućilo je razvoj potentnih malih molekula nazvanih PARP inhibitori. Pokazano je da inhibicija PARP enzima može da dovede do supresije popravke oštećenja DNK i da poveća senzitivnost tumorskih ćelija na DNK-oštećujuće agense (Zaremba and Curtin, 2007). Analози nikotinamida, poput supstituisanih benzamida, su razvijeni kao prva generacija „klasičnih“ PARP inhibitora, od kojih je 3-aminobenzamid (3-AB) i dalje aktuelan u istraživanjima (Slika 12) (Purnell and Whish, 1980). Studija sprovedena 1980. godine na modelu L1210 mišjih ćelija leukemije je pokazala da 3-AB sprečava popravku oštećenja DNK i povećava citotoksičnost DNK-alkilirajućih agenasa (Durkacz *et al.*, 1980). Iako je 3-AB pokazao deset do dvadeset puta veću efikasnost u inhibiciji PARP enzima od nikotinamida, kao i sposobnost da inhibira glukozni metabolizam, doze nikotinamida i 3-AB neophodne za dostizanje efikasne PARP inhibicije *in vitro* (3-10 mM) i *in vivo* (nekoliko stotina mg/kg) su previsoke i toksične za bezbednu primenu u medicini (Southan and Szabó, 2003; Curtin, 2005). Uprkos ograničenoj rastvorljivosti i unutarćelijskoj akumulaciji derivata nikotinamida i benzamida, kao i usled nedostatka potentnosti i specifičnosti za PARP-1 enzim, ove supstance se još uvek koriste kao eksperimentalni alati za proučavanje biološke uloge aktivacije PARP-1 enzima u ćelijskim procesima, kao i za proučavanje fizioloških posledica PARP inhibicije *in vivo* (Cepeda *et al.*, 2006). Benasik i saradnici su razvili niz potentnijih inhibitora, označenih kao druga generacija PARP inhibitora, kao što su 1,5-dihidroizokinolin, 2-metilkinazolin-4-[3H]-on, 4-amino-1,8-naftalimid i 2-nitro-6-[5H]-fenantridinon (Slika 12) (Banasik *et al.*, 1992). SAR studije su omogućile razvoj PARP inhibitora kao što su 8-hidroksi-2-metilkinazolin-4-[3H]-on (NU 1025), 2-(4-hidroksifenil)-1H-benzimidazol-4-karboksamid (NU 1085) i 3,4-dihidro-5-metilizokinolinon (PD 128763), koji su se pokazali pedeset puta potentnijim od 3-AB (Slika 12) (Zaremba and Curtin, 2007). U pretkliničkim istraživanjima i ranim kliničkim studijama, triciklični laktamski indoli i benzimidazoli, supstituisani fenantridinoni, ftalazinoni i kinazolinoni su pokazali značajnu antitumorsku aktivnost (Slika 12) (Cepeda *et al.*, 2006; Zaremba and Curtin, 2007; Jain and Patel, 2019).



Slika 12. Strukture predstavnika prve i druge generacije PARP inhibitora (modifikovano prema (Curtin, 2005))

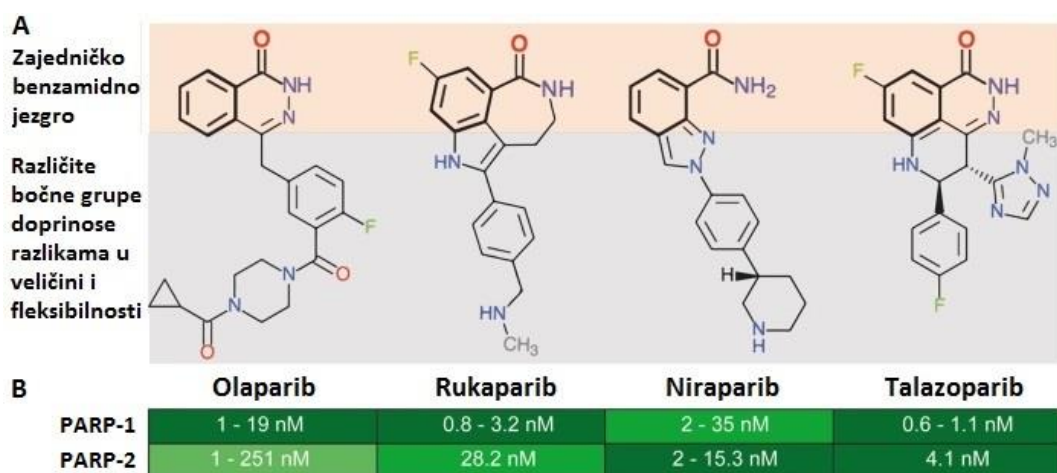
Većina PARP inhibitora je dizajnirana tako da imitira supstrat-enzim interakcije između NAD^+ i PARP-1. Zbog strukturne sličnosti PARP inhibitora sa supstratom, ovi agensi su sposobni da deluju kao kompetitivni inhibitori, blokirajući vezivanje NAD^+ za katalitički domen PARP-1 (Jain and Patel, 2019). SAR studije su omogućile identifikaciju farmakofore, odnosno određenih strukturnih osobina PARP inhibitora koje doprinose efikasnom vezivanju za ciljno mesto na PARP-1 enzimu (Slika 13) (Ferraris, 2015; Jain and Patel, 2019; Zhao *et al.*, 2020):

- Prisustvo šestočlanog aromatičnog prstena A (preferencijalno benzenov prsten) bogatog elektronima (neophodno za interakcije sa aminokiselinskim ostatkom Tyr907 preko π orbitala (eng. π - π *stacking*), doprinosi bioaktivnosti PARP inhibitora);
- Karboksamidna komponenta u *cis*- ili *anti*-konfiguraciji u sklopu prstena A ili „pseudocikličnog prstena“ B sa karbonylnom grupom na drugom ugljenikovom atomu (olakšava formiranje vodoničnih veza sa aminokiselinskim ostacima Ser904 i Gly863);
- R3 grupa na petom ugljenikovom atomu u odnosu na karboksamidnu komponentu (mali atomi poput halogena) ili velika grupa vezana za A prsten preko metilenske grupe (doprinosi većoj bioaktivnosti i afinitetu za PARP-1);
- R supstituent koji sa A prstenom formira veliku ravan koja promovise π - π *stacking* sa Tyr907;
- Ukoliko se slobodna $-\text{NH}$ grupa karboksamidne komponente uključi u aromatični prsten kao donor vodonične veze, tada slobodna $-\text{NH}$ grupa i R supstituent treba da budu na dva različita aromatična prstena.



Slika 13. Strukturni zahtevi potentnih PARP inhibitora. Crvenim uokvireni su nazivi struktura neophodnih za PARP-1 inhibitornu aktivnost, dok su plavim uokvireni nazivi dodatnih struktura koje doprinose većoj bioaktivnosti inhibitora. Žutim uokviren je petočlani ili šestočlani prsten ili „pseudociklični prsten“ (modifikovano prema (Zhao *et al.*, 2020))

Poslednjih godina postignut je veliki progres u razvoju PARP inhibitora (Ferraris, 2015). Do danas, četiri PARP inhibitora iz treće generacije (olaparib (LYNPARZA, AstraZeneca Pharmaceuticals LP), rukaparib (RUBRACA, Clovis Oncology Inc.), niraparib (ZEJULA, Tesaro, Inc.) i talazoparib (TALZENNA, Pfizer Inc.)) su odobrena od strane U.S. FDA za kliničku upotrebu, dok je veliparib (ABT-888, Abbvie) u kasnim fazama kliničkih studija (Slika 14) (Lord and Ashworth, 2017; Jain and Patel, 2019; Sachdev *et al.*, 2019). Olaparib je prvi PARP inhibitor koji je odobren 2014. godine kao monoterapija za lečenje pacijentkinja sa metastatskim karcinomom jajnika koje su prethodno primile tri ili više linija hemioterapije, i koje su nosioci germinativne mutacije u *BRCA* (eng. *Breast cancer susceptibility gene*) genima, dok je rukaparib potom odobren 2016. godine za istu indikaciju (Kim *et al.*, 2015; Syed, 2017). Dodatno, olaparib, niraparib i rukaparib su odobreni kao terapija održavanja (eng. *Maintenance therapy*) kod pacijentkinja sa relapsirajućim, epitelnim karcinomom jajnika, jajovoda ili primarno peritonealnim karcinomom, nezavisno od statusa *BRCA* gena (mutiran ili normalni alel (eng. *Wild type*, WT)), koje su postigle odgovor (potpun ili delimičan) na hemioterapiju zasnovanu na platini (Caruso *et al.*, 2017; Lord and Ashworth, 2017; Jiang *et al.*, 2019). Tokom 2018. godine, olaparib i talazoparib su odobreni za lečenje pacijentkinja sa metastatskim karcinomom dojke koje su nosioci germinativne *BRCA* mutacije i kod kojih je snižena ekspresija receptora za humani epidermalni faktor rasta 2 (HER2/neu) (Hoy, 2018; Caulfield, Davis and Byers, 2019; Exman, Barroso-Sousa and Tolaney, 2019). Poslednje dve godine su proširene indikacije za primenu navedenih PARP inhibitora, te su stoga odobreni i kao terapija održavanja kod pacijenata sa germinativnim *BRCA*-mutiranim metastatskim adenokarcinomom pankreasa (olaparib), kao monoterapija kod pacijenata sa germinativnim ili somatskim *BRCA*-mutiranim metastatskim karcinomom prostate (olaparib i rukaparib), ili kao kombinovana terapija (olaparib) sa bevacizumabom u prvoj liniji terapije održavanja kod pacijentkinja sa uznapredovalim epitelnim karcinomom jajnika, kod kojih su pronađeni defekti u genima koji kodiraju za proteine uključene u reparaciju DNK putem homologne rekombinacije, odnosno koje ispoljavaju nedostatak homologne rekombinacije (eng. *Homologous recombination deficiency*, HRD) (Golan *et al.*, 2019).



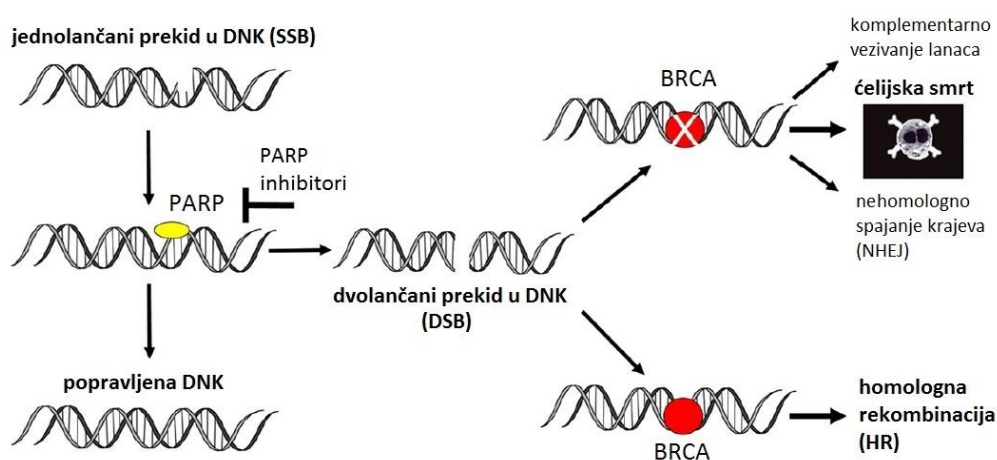
Slika 14. Strukture PARP inhibitora treće generacije koji su odobreni kao terapeutici od strane U.S. FDA. (A) Benzamidno jezgro i farmakofora koja je zajednička za sve ove PARP inhibitore je boldovana i prikazana u polju osenčenom rožim. Različite bočne grupe doprinose razlikama u veličini i fleksibilnosti pojedinačnih PARP inhibitora i prikazane su u polju osenčenom sivim. (B) Literaturni podaci o specifičnosti PARP inhibitora za PARP-1 ili PARP-2, prikazane u obliku IC_{50} vrednosti (koncentracija koja dovodi do 50% smanjenja aktivnosti enzima) (modifikovano prema (Antolin *et al.*, 2020))

1.5.2. *BRCA* geni i sintetička letalnost

BRCA1 gen se nalazi na hromozomu 17 i kodira za BRCA1 protein koji učestvuje u prepoznavanju DNK oštećenja, aktivaciji i regrutovanju ključnih proteina uključenih u popravku DSB, dok se *BRCA2* gen nalazi na hromozomu 13 i kodira za BRCA2 protein koji učestvuje u regrutaciji RAD51 proteina na mesto DSB, čime omogućava popravku oštećenja DNK putem homologne rekombinacije, tokom S i G2 faza ćelijskog ciklusa (Roy, Chun and Powell, 2012). Mutacije u *BRCA1* i/ili *BRCA2* tumor supresorskim genima su odgovorne za većinu naslednih karcinoma dojke i jajnika (učestalost germinativne *BRCA* mutacije kod karcinoma dojke je 5-10%, dok je kod karcinoma jajnika 1-18%) (Pal *et al.*, 2005; Malone *et al.*, 2006; Alsop *et al.*, 2012). Za nosioce germinativne *BRCA* mutacije se životni rizik za razvoj karcinoma dojke procenjuje na 40-80%, a za karcinom jajnika na 11-40% (Malone *et al.*, 2006; Petrucelli, Daly and Feldman, 2010; Kuchenbaecker *et al.*, 2017). Pokazano je da većina karcinoma dojke koja se razvije kod pacijenata koji su nosioci mutacije u *BRCA1* genu najčešće pripadaju trostruko-negativnom tipu invazivnog kancera dojke (Chen *et al.*, 2018). Nosioci germinativne *BRCA* mutacije imaju povećani rizik i za razvoj kancera debelog creva, želuca, prostate, pankreasa i melanoma (Petrucelli, Daly and Feldman, 2010). Gubitak funkcije *BRCA* gena može biti i posledica somatskih mutacija, epigenetičkog utišavanja putem hipermetilacije *BRCA1* promotora ili prekomerne ekspresije *BRCA2*-transkripcionog supresora EMSY (Esteller *et al.*, 2000; Hennessy *et al.*, 2010; Koczkowska *et al.*, 2016; Lord and Ashworth, 2016; Winter *et al.*, 2016). Kod ćelija koje razviju HRD fenotip, kao posledicu mutacije u *BRCA* genima, dolazi do aktivacije drugih mehanizama reparacije DNK, poput nehomolognog spajanja krajeva, što uzrokuje pojavu alteracija u DNK i može podstaći tumorigenezu ili progresiju kancera kreiranjem genomske nestabilnosti, čime se delimično može objasniti veza između mutacije u *BRCA* genima i povećanog rizika za razvoj kancera (Roy, Chun and Powell, 2012).

PARP inhibitori su prvi lekovi odobreni u terapeutske svrhe koji su dizajnirani tako da deluju po principu sintetičke letalnosti selektivno ciljajući tumorske ćelije sa defektima u *BRCA* genima i na taj način deluju kao personalizovana terapija (Bryant *et al.*, 2005; Farmer *et al.*, 2005). Sintetička letalnost je genetički koncept baziran na ideji da defekti samo jednog od dva gena imaju male ili nikakve efekte na ćeliju ili organizam, dok kombinacija defekata oba gena dovodi do smrti ćelije (Slika 15) (Kaelin, 2005; Ashworth, Lord and Reis-Filho, 2011). U pretkliničkim modelima, *BRCA*-mutirane tumorske ćelije su pokazale više od hiljadu puta veću senzitivnost na PARP inhibitore u odnosu na ćelije sa WT *BRCA*

alelom (Bryant *et al.*, 2005; Farmer *et al.*, 2005). Prvobitno je mehanizam sintetičke letalnosti PARP inhibitora u *BRC*A-mutiranim tumorskim ćelijama objašnjavan činjenicom da inhibicija PARP enzima izaziva akumulaciju endogenih oštećenja i nastanak perzistentnih SSB, što u nekim slučajevim rezultuje u kolapsu replikacione viljuške, potencijalno kreirajući DSB, koji u HRD ćelijama imaju citotoksičan efekat (Farmer *et al.*, 2005). Međutim, istraživanja su pokazala da je efikasnost PARP inhibitora (posebno klinički odobrenih) u HRD tumorskim ćelijama posledica „zarobljavanja“ PARP-1 enzima na mestu oštećenja DNK nakon inhibicije PARP-1 enzimske aktivnosti i formiranja citotoksičnog PARP-DNK kompleksa (Murai *et al.*, 2012; Shen, Aoyagi-Scharber and Wang, 2015). S obzirom da je homologna rekombinacija neophodna za razrešenje ovako nastalog PARP-DNK kompleksa, u HRD ćelijama dolazi do zaustavljanja replikacije DNK i transkripcije, onemogućava se dalja popravka DNK, autoPARilacija i oslobađanje PARP enzima sa DNK, što dovodi do smrti ćelije (Pommier, O'Connor and de Bono, 2016). Na primeru PARP inhibitora trenutno odobrenih za terapiju je pokazano da upravo razlike u sposobnosti PARP inhibitora da „zarobe“ PARP-1 enzim na mestu DNK lezije mogu biti bolji prediktor citotoksičnosti u *BRC*A-mutiranim ćelijama *in vitro*, u odnosu na prostu inhibiciju PARilacije (Murai *et al.*, 2014).



Slika 15. Sintetička letalnost PARP inhibitora u *BRC*A-mutiranim tumorima (modifikovano prema (Cerrato, Morra and Celetti, 2016))

Sve je veći broj dokaza koji ukazuje da i tumori kod kojih se ređe detektuju mutacije u *BRC*A1/2 genima, poput melanoma, kancera pluća, i debelog creva, takođe mogu odgovoriti na terapiju PARP inhibitorima (Fong *et al.*, 2009; O'Sullivan *et al.*, 2014). Istraživanja su pokazala da bi se primena PARP inhibitora mogla proširiti na tumore koji ispoljavaju HRD fenotip usled mutacija u nekim od sledećih gena: *ATM*, *ATR*, *CHK1/2*, gen koji kodira za protein koji vrši funkciju partnera i lokalizatora *BRCA2* (eng. *Partner and localizer of BRCA2, PALB2*), gen koji kodira za protein koji interaguje sa *BRCA2* – *RAD51*, gen za replikacioni protein A1 (eng. *Replication protein A1, RPA1*), fosfatasa i tenzin homolog gen (eng. *Phosphatase and tensin homolog, PTEN*), geni koji kodiraju za proteine uključene u proteinski kompleks MRN (*MRE11-RAD50-NBS1*), *XRCC2/XRCC3*, *EMSY*, geni koji kodiraju za FANC grupu proteina (eng. *Fanconi anemia complementation group, FANCD2, FANCA, FANCC*) (McCabe *et al.*, 2006; Mendes-Pereira *et al.*, 2009; Cerrato, Morra and Celetti, 2016). Neki od sporadičnih tumora koji su HRD uprkos tome što su *BRC*A WT ispoljavaju isti histološki obrazac i slične kliničko-patološke i molekulske karakteristike kao tumori sa germinativnim *BRC*A mutacijama, te su stoga označeni kao tumori *BRC*Aness fenotipa. Smatra se da bi pacijenti sa ovakvim tipom tumora mogli ispoljiti adekvatan odgovor na terapiju PARP inhibitorima (Turner, Tutt and Ashworth, 2004; Lord and Ashworth, 2016). Stečena rezistencija na PARP inhibitoru monoterapiju je uočena kod većine pacijenata sa uznapredovalim oblicima kancera, čak i kod onih sa *BRC*Aness fenotipom. Pokazano je da HRD fenotip i senzitivnost na PARP inhibitore mogu biti „poništeni“ usled nastanka sekundarnih, revertnih somatskih mutacija (ponovno uspostavljanje normalne funkcije *BRC*A gena), mutacija u samom PARP-1 enzimu (narušavanje „zarobljavanja“ PARP-1 na DNK), gubitka aktivnosti PARP enzima (obnavljanje PARilacije), inaktivacije grupe proteina koji inhibiraju homolognu

rekombinaciju (obnavljanje ovog mehanizma reparacije DNK) ili usled povišene ekspresije gena koji kodira za P-gp (povećano izbacivanje PARP inhibitora iz ćelija) (Sakai *et al.*, 2008; Bunting *et al.*, 2010; Barber *et al.*, 2013; Lord and Ashworth, 2013; Noordermeer and van Attikum, 2019). Sekundarne mutacije u *BRCA1* ili *BRCA2* genima takođe mogu biti uzrok kliničke rezistencije na hemioterapiju baziranu na platini (Sakai *et al.*, 2008; Norquist *et al.*, 2011). Pokazalo se da rezistencija na hemioterapiju zasnovanu na platini može poslužiti kao važan prediktor rezistencije na PARP inhibitornu terapiju, ukazujući da dele neke zajedničke mehanizme delovanja (Fong *et al.*, 2010). Pored rezistencije, pojava toksičnosti usled *off-target* aktivnosti mnogih PARP inhibitora i posledično kumulativno oštećenje normalnog tkiva, zatim, kratak poluživot leka, slaba rastvorljivost i apsorpcija, kao i nedostatak selektivnosti između PARP-1 i PARP-2 enzima, predstavljaju neke od nedostataka PARP inhibitorne terapije (Zhao *et al.*, 2020).

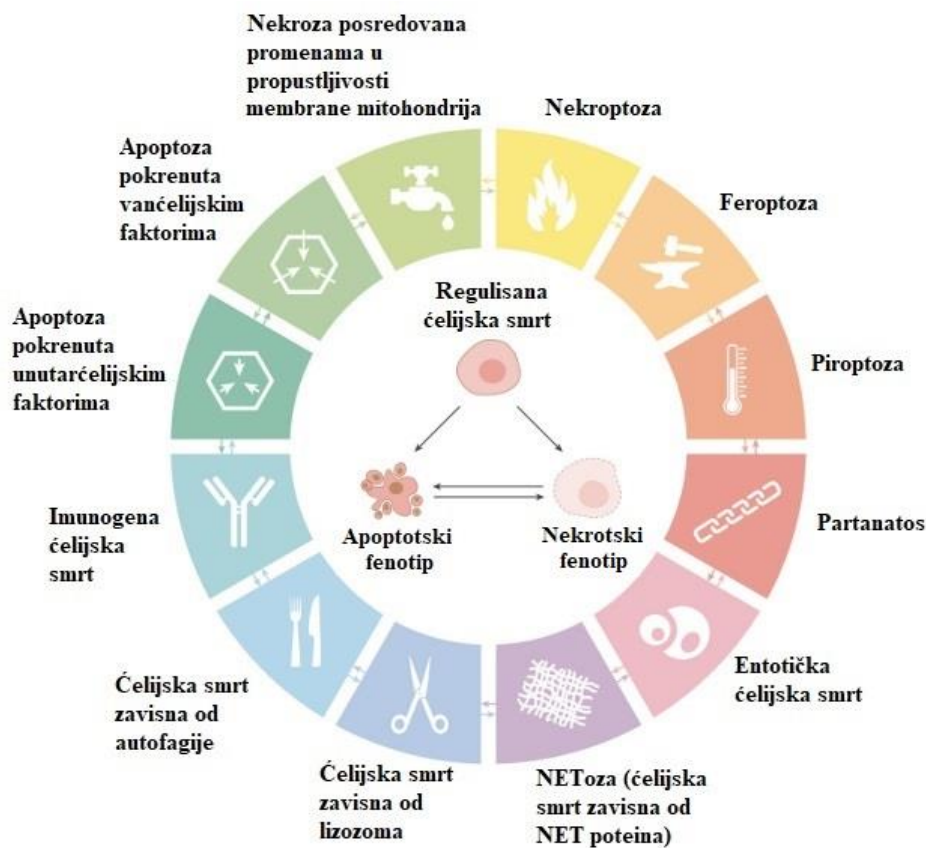
Još od prvih otkrića i pretkliničkih dokaza o sposobnosti pojedinih supstanci iz prve i druge generacije PARP inhibitora da indukuju hemio- i radiosenzitizaciju tumorskih ćelija na DNK-oštećujuće agense, poput jonizujućeg zračenja, alkilirajućih agenasa (temozolomid), hemioterapeutika baziranih na platini, inhibitora topoizomeraze i topoizomeraznih otrova (kamptotecin, topotekan, irinotekan, doksorubicin) ili inhibitora deobnog vretena (taksani), veliki broj studija se fokusirao na sinergističke citotoksične efekte kombinovane terapije PARP inhibitora i konvencionalnih hemio- i radioterapeutika (Delaney *et al.*, 2000; Tentori *et al.*, 2001; Drea, Lord and Ashworth, 2016). Pokazano je da efikasnost kombinovane terapije PARP inhibitora sa različitim hemioterapeuticima umnogome zavisi od mehanizma dejstva individualnog PARP inhibitora, kao i od same regulacije PARP-1 (Matulonis and Monk, 2017). Nekoliko kliničkih studija se bavi procenom tolerabilnosti i efikasnosti kombinovane terapije koja podrazumeva primenu visokih doza PARP inhibitora u kombinaciji sa niskom dozom hemioterapeutika (eng. *High PARP inhibitor/low chemo approach*). Platinski kompleksi indukuju pojavu „molekulskog pejzaža”, odnosno obrasca oštećenja DNK koje može potencirati aktivnost agenasa kojima je meta upravo oštećena DNK, poput PARP inhibitora, a poznato je da PARP-1 enzim prepoznaje i efikasno se vezuje za DNK modifikovanu dejstvom platine (Guggenheim *et al.*, 2009; Zhu, Chang and Lippard, 2010; Basourakos *et al.*, 2017). Imajući u vidu sve osobine rutenijumskih kompleksa, a najviše tendenciju da nakon ulaska u ćelije ciljaju dvolančanu DNK, kompleksi rutenijuma (posebno rutenijuma(II)) mogu predstavljati odgovarajuće „nosače“ koji bi doveli bioaktivni ligand sa PARP-1 inhibitornim potencijalom bliže njegovoj ćelijskoj meti, odnosno oštećenoj DNK.

1.6. Ćelijska smrt

Ćelijska smrt je esencijalna za brojne fiziološke procese i odvija se tokom ranih stupnjeva razvika višćelijskih organizama, tokom embriogeneze i diferencijacije, dok kasnije tokom života ima ulogu u održavanju homeostaze tkiva. Još jedan primer da ćelijska smrt može biti regulisan proces (eng. *Regulated cell death*, RCD) se odnosi na ulogu koju ćelijska smrt ima u uklanjanju nepovratno oštećenih i/ili potencijalno štetnih ćelija (Galluzzi and Vitale, 2018). Promene u regulaciji ćelijske smrti dovode do nastanka brojnih patoloških stanja, poput kancera. Rezistencija prema ćelijskoj smrti je jedna od glavnih karakteristika tumorskih ćelija i može objasniti pojavu recidiva nakon hemioterapije, stoga se razvoj antitumorskih lekova fokusira upravo na dizajniranje agenasa sposobnih da efikasno dovedu do ćelijske smrti (prvenstveno apoptoze) tumorske ćelije, a ne samo da inhibiraju njen rast, kako bi se postigao kompletan odgovor pacijenta na terapiju (Ghobrial, Witzig and Adjei, 2005). Ćelijska smrt može nastupiti i kao posledica trenutnog oštećenja ćelija uzrokovanog činiocima fizičke, hemijske ili mehaničke prirode, koji ne dovode do aktivacije specifične molekulske mašinerije, i ovakva ćelijska smrt se označava kao neočekivana ćelijska smrt (eng. *Accidental cell death*, ACD) (Galluzzi and Vitale, 2018). Za razliku od ACD koja nije programiran ćelijski proces, RCD najčešće podrazumeva programirani proces kontrolisan složenom molekulsom mašinerijom i putevima prenosa signala u ćeliji, što omogućava farmakološku i/ili genetičku modulaciju (Galluzzi and Vitale, 2018).

Galluzzi i saradnici su 2007. godine predložili klasifikaciju tipova ćelijske smrti prema morfološkoj manifestaciji letalnog procesa (apoptoza (ćelijska smrt tipa I), autofagija (ćelijska smrt tipa II), nekroza (ćelijska smrt tipa III) i mitotska katastrofa), enzimološkom kriterijumu (da li uključuje

učestće nukleaza i ostalih proteaza, poput kaspaza ili katepsina), funkcionalnim aspektima (programiran ili neprogramiran proces, fiziološki ili patološki) ili na osnovu toga da li ćelijska smrt dovodi do aktivacije imunskog sistema (imunogen ili neimunogen proces) (Galluzzi *et al.*, 2007). Kerr i saradnici su još početkom 1970-tih godina opisali morfološke promene koje se odvijaju u apoptotskim ćelijama, a odnose se na zaokrugljivanje ćelije i smanjenje njenog volumena, povlačenje ćelijskih izraštaja, kondenzaciju hromatina (piknoza) i fragmentaciju nukleusa (karioreksa), pojavu mehurova na ćelijskoj membrani (eng. *Blebbing*) (integritet membrane ostaje očuvan) i posledično stvaranje apoptotskih tela (intaktne male vezikule koje sadrže cele organele i/ili delove nukleusa), koje efikasno uklanjaju okolne ćelije sa fagocitnom sposobnošću (*in vivo*), bez pokretanja imunološke reakcije (Kerr, Wyllie and Currie, 1972). Sa druge strane, ćelije koje podležu nekrozi pokazuju karakterističan morfološki izgled, različit od ćelija koje podležu apoptozi, koji se ogleda u porastu zapremine ćelije (onkoza), bubrenju organela, denaturaciji proteina citoplazme, pri čemu dolazi do gubitka integriteta ćelijske membrane i do posledičnog izlivanja ćelijskog sadržaja u vanćelijsku sredinu (Galluzzi *et al.*, 2007; Golstein and Kroemer, 2007). Iako se morfološke karakteristike umiruće ćelije još uvek koriste kao jedan od osnovnih kriterijuma prilikom konstantovanja modaliteta ćelijske smrti, postalo je jasno da je uz morfološke neophodno ispitati i biohemijske, genetičke i farmakološke aspekte smrti specifične ćelije. Komitet za nomenklaturu tipova ćelijske smrti (eng. *Nomenclature Committee on Cell Death*, NCCD) je 2018. godine predložio proširenu klasifikaciju na dvanaest osnovnih podtipova regulisane ćelijske smrti, na osnovu načina prenosa molekulskih signala uključenih u pokretanje, sprovođenje i izvršenje procesa ćelijske smrti, kao i na osnovu njihovog patofiziološkog značaja, pri čemu postoji određeni stepen međusobne povezanosti između individualnih molekulskih mehanizama (Slika 16) (Galluzzi and Vitale, 2018). Dodatno, svaki od podtipova regulisane ćelijske smrti se može manifestovati čitavim spektrom morfoloških osobina u rasponu od apoptotskog do potpuno nekrotskog fenotipa, kao i od antiinflamatornog i tolerogenog profila do proinflamatornog i imunogenog (Galluzzi and Vitale, 2018).



Slika 16. Osnovni podtipovi regulisane ćelijske smrti prema Galluzzi i saradnici (modifikovano prema (Galluzzi and Vitale, 2018))

1.6.1. Apoptoza

Apoptoza je jedan od najbolje okarakterisanih tipova ćelijske smrti i podrazumeva usko regulisani, energetski-zavisan proces koji se odvija kroz niz sukcesivnih koraka, zbog čega se označava i kao programirana ćelijska smrt. Apoptoza se može odvijati preko dva odvojena puta za prenos signala u ćeliji, pokrenuta stimulusima različitog porekla: **spoljašnji apoptotski put** i **unutrašnji apoptotski put**. Postoji još jedan signalni put koji dovodi do apoptoze i koji je zavisn od aktivnosti enzima granzima B i perforina, a primarni je mehanizam apoptoze koji koriste citotoksični T limfociti i ćelije prirodne ubice (eng. *Natural killer cells*, NK), kako bi uklonile virusom inficirane ili maligno transformisane ćelije (Rousalova and Krepela, 2010).

1.6.1.1. Spoljašnji apoptotski put

Spoljašnji apoptotski put pokreću signali iz vanćelijske sredine koje prepoznaju dva tipa transmembranskih receptora u ćelijskoj membrani, receptori smrti (eng. *Death receptors*), čija aktivacija zavisi od vezivanja specifičnih liganada, i receptori zavisnosti (eng. *Dependence receptors*), do čije aktivacije dolazi kada nivo njihovih specifičnih liganada padne ispod određenog praga (Galluzzi and Vitale, 2018). Vezivanje liganada, poput FAS liganda receptora smrti na površini ćelije (eng. *Fas cell surface death receptor ligand*, FASL, poznat i kao CD95L ili APO-1L), TNF α ili TNF-povezanog liganda koji indukuje apoptozu (eng. *TNF-related apoptosis inducing ligand*, TRAIL) za odgovarajuće receptore smrti (FAS/CD95/APO-1, TNFR1 ili TRAILR1/2, redom), koji poseduju slične vanćelijske domene bogate cisteinom, omogućava stabilizaciju receptora u obliku homotrimera i interakciju sa nizom adapterskih proteina, poput FAS-asociranog proteina sa domenom smrti (eng. *Fas-associated via death domain*, FADD) (u slučaju FAS i TRAILR1/2) i TNFR-asociranog proteina sa domenom smrti (eng. *TNFR-associated via death domain*, TRADD) (u slučaju TNFR1) preko domena smrti (eng. *Death domain*, DD) na unutarćelijskom delu receptora (Slika 17) (Ashkenazi and Dixit, 1998; Wajant, 2002). Domen smrti ima važnu ulogu u prenošenju signala sa površine ćelije na unutarćelijske signalne molekule. Adapterski proteini potom pokreću formiranje signalnog kompleksa koji izaziva ćelijsku smrt (eng. *Death-inducing signalling complex*, DISC) putem regrutovanja inicijatorske prokaspaze-8 (ili prokaspaze-10) preko svojih efektorskih domena smrti (eng. *Death effector domains*, DED), koji su homologni DED domenima prokaspaze-8 (L. Galluzzi *et al.*, 2012). Dolazi do homodimerizacije i aktivacije prokaspaze-8 autoproteolitičkim sečenjem (Galluzzi and Vitale, 2018). Aktivirana kaspaza-8 proteolitički aktivira nishodne efektorske kaspaze-3 i -7, čime započinje egzekuciona faza apoptoze, na način nezavisan od mitohondrija, što je karakteristično za limfocite i druge ćelije koje pripadaju „tipu I“ (Barnhart, Alappat and Peter, 2003). Sa druge strane, kod ćelija koje pripadaju „tipu II“ (hepatociti, β ćelije pankreasa, i većina tumorskih ćelija), kod kojih je aktivacija kaspaza-3 i -7 inhibirana dejstvom proteina iz grupe inhibitora apoptoze, poput X-vezanog inhibitora apoptoze (eng. *X-linked inhibitor of apoptosis*, XIAP), kaspaza-8 dovodi do proteolitičkog sečenja proapoptotskog proteina Bcl-2 familije, BID (eng. *BH3-interacting domain death agonist*), pri čemu nastaje aktivna forma tBID (eng. *Truncated form of BID*), što dovodi do permeabilizacije spoljašnje membrane mitohondrija, oslobađanja mitohondrijalnih faktora, poput citohroma c i aktivacije nishodne kaskade prenosa signala koji dovode do regulisane ćelijske smrti (Slika 17) (Wajant, 2002; Barnhart, Alappat and Peter, 2003).

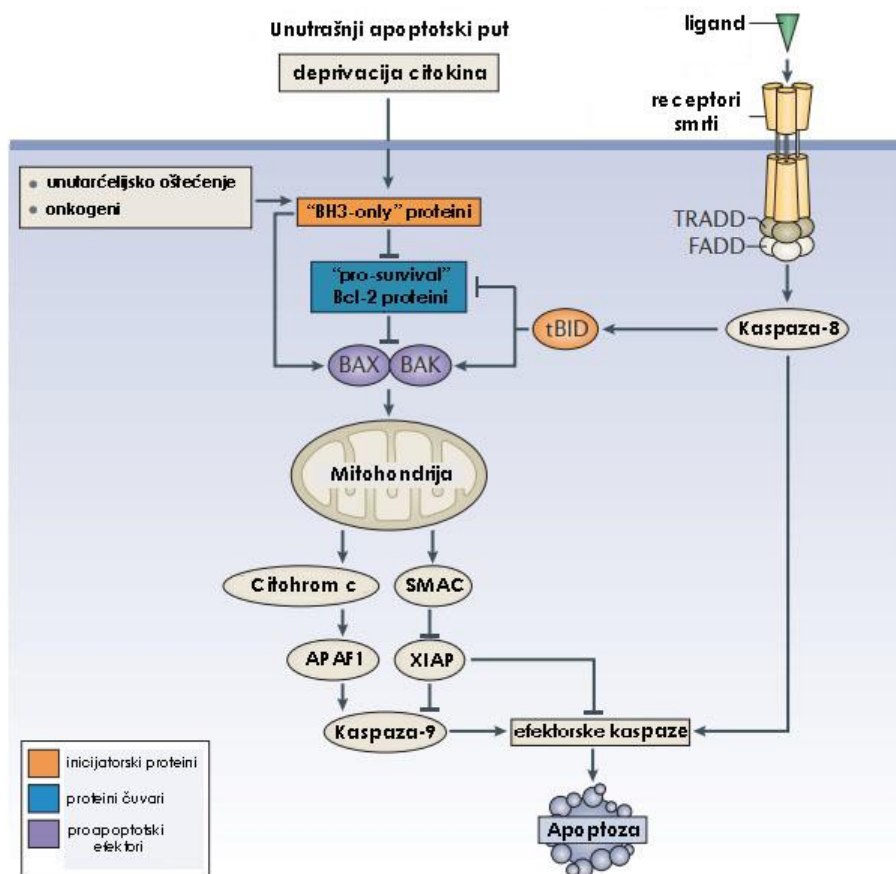
1.6.1.2. Unutrašnji apoptotski put

Različiti unutarćelijski faktori koji narušavaju homeostazu i normalno funkcionisanje ćelije, poput DNK lezija (kao moguća posledica dejstva hemioterapeutika), nemogućnosti odigravanja replikacije DNK, povećanog nivoa ROS, povišene koncentracije kalcijuma u citosolu, ER-stresa ili iznenadnog sniženja nivoa faktora rasta, hormona i citokina neophodnih za preživljavanje ćelije, mogu dovesti do pokretanja unutrašnjeg apoptotskog puta (Galluzzi and Vitale, 2018). Iako su signali koji mogu pokrenuti unutrašnji apoptotski put heterogeni, zajedničko je to da je ovaj proces posredovan aktivnošću mitohondrija. Česta je pojava da ćelija pokušava da se izbori sa novonastalim stresom i preživi tako što se istovremeno uz aktivaciju proapoptotskog puta prenosa signala, aktivira i antiapoptotska signalna kaskada. Kada se balans ovih signala (koji se održava u nivou membrane

mitohondrija) naruši tako da prevladaju proapoptotski signali, dolazi do kritičnog koraka unutrašnjeg apoptotskog puta – permeabilizacije spoljašnje membrane mitohondrija (eng. *Mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) (Slika 17) (Kroemer, Galluzzi and Brenner, 2007). MOMP podrazumeva nepovratan proces, koji je kontrolisan proapoptotskim i antiapoptotskim članovima evoluciono konzervisane Bcl-2 familije regulatornih proteina, koji sadrže od jedan do četiri visoko konzervisana Bcl-2 homologa domena (BH), BH1-BH4 (Czabotar *et al.*, 2014).

Bcl-2 familiju proteina čine tri strukturno i funkcionalno odvojene podgrupe (Czabotar *et al.*, 2014):

1. Proteini koji sadrže samo BH3 domen (eng. *BH3-only proteins*), označavaju se i kao inicijatorski proteini i prenose signale za pokretanje apoptoze: BIM (eng. *Bcl-2-interacting mediator of cell death*), PUMA (eng. *p53-upregulated modulator of apoptosis*), NOXA (eng. *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*), HRK (eng. *Harakiri, Bcl-2-interacting protein*), BMF (eng. *Bcl-2-modifying factor*), BAD (eng. *Bcl-2-associated agonist of cell death*), BIK (eng. *Bcl-2-interacting killer*), tBID;
2. Proteini sa BH1-BH4 domenima, označavaju se kao čuvari i obezbeđuju signale za preživljavanje ćelije (eng. *Pro-survival proteins*) – antiapoptotski proteini: Bcl-2, BCL-X_L (eng. *B-cell lymphoma-extra large*), BCL-W (eng. *Bcl-2-like protein 2*), MCL1 (eng. *Myeloid cell leukemia sequence 1*), A1 (eng. *Bcl-2-related protein*), BCL-B (eng. *Bcl-2-like protein 10*);
3. Proteini sa BH1-BH4 domenima, označavaju se kao efektorski, proapoptotski proteini: BAX, BAK (eng. *Bcl-2 antagonist/killer*), BOK (eng. *Bcl-2-related ovarian killer*).



Slika 17. Unutrašnji i spoljašnji apoptotski put (modifikovano prema (Czabotar *et al.*, 2014))

Ravnoteža između antiapoptotskih proteina i BH3 proteina sa kojim interaguju održava homeostazu tkiva, stoga prekomerna ekspresija članova antiapoptotske grupe Bcl-2 familije proteina ili sniženje ekspresije proapoptotskih članova može uzrokovati tumorigenezu (Adams and Cory, 2007). Razumevanje molekularnih mehanizama dejstva i kompleksnih interakcija proteina Bcl-2 familije dovelo je do velikog interesovanja za razvoj novih antitumorskih agenasa koji specifično ciljaju i modifikuju

funkciju određenih članova Bcl-2 proteinske familije (Adams and Cory, 2007; Czabotar *et al.*, 2014). Tumor supresorski protein p53, koji se aktivira u odgovoru na različite oblike ćelijskog stresa, uključujući oštećenje DNK, hipoksiju ili aktivaciju onkogeni, ima ključnu ulogu u apoptozi putem regulacije transkripcije članova Bcl-2 familije, *BAX* i *PUMA* (Riley *et al.*, 2008).

Nakon što dovoljno inicijatorskih BH3 proteina bude stimulirano u odgovoru na citotoksične stimulse, dolazi do oligomerizacije BAX i BAK proteina, permeabilizacije spoljašnje membrane mitohondrija i otvaranja mitohondrijskih transmembranskih pora (Slika 17) (Adams and Cory, 2007; Luna-Vargas and Chipuk, 2016). Usled toga dolazi do promene u mitohondrijalnom membranskom potencijalu ($\Delta\Psi_m$), praćenog prestankom sinteze ATP molekula, oslobađanjem toksičnih proteina iz međumembranskog prostora mitohondrija u citosol, poput citohroma c, faktora indukcije apoptoze (eng. *Apoptosis-inducing factor*, AIF), endonukleaze G i Diablo proteina, kao i do posledične inhibicije respiratornog lanca, čime se pojačava produkcija ROS molekula i amplifikuje apoptotski signal (Kroemer, Galluzzi and Brenner, 2007). Citohrom c zatim interaguje u citosolu sa aktivirajućim faktorom 1 apoptotske proteaze (eng. *Apoptotic protease activating factor 1*, APAF1) i dATP, i formira supramolekulski kompleks označen kao apoptozom, koji pokreće proteolitičku aktivaciju prokaspaze-9 (Li *et al.*, 1997). Aktivirana kaspaza-9 katalizuje proteolitičku aktivaciju egzekutorskih kaspaza-3 i -7 (Julien and Wells, 2017). Diablo protein, poznat i kao SMAC (eng. *Second mitochondria-derived activator of caspases*) i HTRA2 (eng. *High temperature requirement protein A2*) protein olakšavaju aktivaciju kaspaza putem inhibicije članova proteinske familije inhibitora apoptoze (eng. *Inhibitor of apoptosis*, IAP), koji imaju ulogu u inhibiciji apoptoze putem vezivanja za kaspaze (Slika 17) (Eckelman, Salvesen and Scott, 2006). Katalitička aktivnost egzekutorskih kaspaza je odgovorna za mnoge morfološke i biohemijske manifestacije apoptotskih ćelija, poput fragmentacije DNK u regionu između nukleozoma na fragmente veličine 180 bp nakon dejstva dezoksiribonukleaze (eng. *Deoxyribonuclease*, DNase) aktivirane kaspazom (eng. *Caspase-activated DNase*, CAD), translokacije membranskog fosfolipida fosfatidilserina sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane i formiranja apoptotskih tela (Nagata, 2005; Galluzzi and Vitale, 2018). Sa druge strane, AIF i endonukleaza G se translociraju u nukleus gde posreduju u fragmentaciji DNK velikih razmera, nezavisno od kaspaza (L Galluzzi *et al.*, 2012). Serin-proteaza HTRA2 takođe doprinosi i sprovođenju apoptoze, na način nezavisan od kaspaza, tako što dovodi do isecanja proteina citoskeleta (L Galluzzi *et al.*, 2012).

Specifična forma apoptoze izazvana odvajanjem ćelija od vanćelijskog matriksa je označena kao anoikis (Paoli, Giannoni and Chiarugi, 2013). Pod uslovima kada su ćelije vezane za vanćelijski matriks, signali za preživljavanje, inicirani integrinima i drugim medijatorima ćelija-vanćelijski matriks interakcija, poput receptora faktora rasta, sprečavaju nastanak anoikisa. Odvajanje ćelija od vanćelijskog matriksa uzrokuje aktivaciju BIM i BMF proteina, i posledičnu apoptozu posredovanu kaspazama. Primećeno je da tumorske metastatske ćelije često pokazuju rezistenciju prema anoikisu putem aktivacije MAPK1 kinaze (poznate i kao ERK2) i antiapoptotskih članova Bcl-2 familije proteina, kao i putem epitelno-mezenhimske tranzicije i ushodne regulacije matriksnih metaloproteinaza (Galluzzi and Vitale, 2018).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U Laboratoriji za farmakologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije je do sada ispitan antitumorski potencijal velikog broja rutenijumskih kompleksa sa različitim ligandima *in vitro*, pri čemu su se upravo serije rutenijum(II)-arenskih kompleksa pokazale kao najaktivnije prema malignim ćelijama, sa antiproliferativnim potencijalom i sposobnosti da izazovu apoptotsku ćelijsku smrt (Jovanović *et al.*, 2016).

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je bio da se ispita antitumorski potencijal *in vitro* serije od jedanaest novih rutenijum(II)-arenskih kompleksa koji su svrstani u tri grupe, u zavisnosti od tipa biološki aktivnog liganda koji je vezan za rutenijum(II)-arenski deo. Ligandi koji su uključeni u komplekse su: 1) NSAIL – dva liganda, 2) polipiridin – jedan ligand, i 3) analozi PARP inhibitora 3-AB – dva liganda. Kompleksi su dizajnirani tako da predstavljaju kombinovani molekul za koji se očekuje da ima jači ili specifičniji antitumorski efekat u poređenju sa pojedinačnim polaznim kompleksom (rutenijum(II)-aren) ili ligandom.

Osnovni ciljevi ove doktorske disertacije su:

- Ispitivanje antitumorskog potencijala novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa na humanim tumorskim ćelijskim linijama poreklom iz različitih tipova tumora. Analiza antiproliferativnog potencijala *in vitro* je obuhvatila dva najznačajnija aspekta, a to su poređenje sa cisplatinom kao referentnim jedinjenjem i ispitivanje toksičnosti za normalne (netumorske) ćelije;
- Ispitivanje mehanizama antitumorskog dejstva najaktivnijeg kompleksa (jednog ili više) iz svake grupe kompleksa na ćelijskim linijama koje su pokazale najveću senzitivnost pri inicijalnom skriningu: potencijal indukovanja ćelijske smrti (kao i tip ćelijske smrti), uticaj na ćelijski ciklus, unutarćelijska akumulacija, distribucija po ćelijskim kompartmentima, potencijal vezivanja za DNK;
- Ispitivanje aktivnosti odabranog kompleksa na 3D model sistemu višćelijskih tumorskih sferoida;
- Ispitivanje sposobnosti rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa analogima PARP inhibitora 3-AB da inhibiraju aktivnost PARP-1 enzima, kao i da interaguju sa DNK poreklom iz pHOT-1 plazmida;
- Razmatranje uticaja strukture kompleksa na aktivnost i mehanizam dejstva u pogledu uticaja tipa bioaktivnog liganda i arenskog liganda i malih razlika u njihovoj strukturi;
- Potencijalno otkriće novih kompleksa rutenijuma sa većom selektivnošću za tumorske ćelije i drugačijim mehanizmima dejstva od cisplatine – vodećih jedinjenja (eng. *Leading compounds*);
- Dobijanje smernica za naredne sinteze i razvoj jedinjenja na bazi rutenijuma sa potencijalno novim biološkim aktivnostima i većom antitumorskom aktivnošću.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Hemijske strukture ispitivanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa i liganada

Hemijske strukture rutenijum(II)-arenskih kompleksa i liganada, čija je antitumorska aktivnost ispitivana u ovoj doktorskoj tezi *in vitro*, su prikazane u Tabeli 1. Sinteza i hemijska karakterizacija kompleksa rutenijuma(II) je urađena na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Sanje Grgurić-Šipka. U pitanju je serija od ukupno jedanaest novih rutenijum(II)-arenskih kompleksa (**K1-K11**). Kompleksi su dizajnirani tako da predstavljaju tri grupe kombinovanih molekula, u zavisnosti od tipa liganada koji je vezan za rutenijum(II)-arenski deo. Koordinisani ligandi su predstavnici tri strukturno i funkcionalno različita tipa biološki aktivnih molekula.

Grupe ispitivanih hibridnih rutenijum(II)-arenskih kompleksa su:

1. Kompleksi **K1-K4** sa indometacinom (**L1**, analog indolacetatne kiseline) ili mefenaminskom kiselinom (**L2**, analog N-fenilantranilne kiseline), kao predstavnicima NSAID;
2. Kompleksi **K5-K7** sa polipiridinom (**L3**), kao potencijalnim DNK interkalirajućim agensom;
3. Kompleksi **K8-K11** sa 2-amino-4-metilbenzamidom (**L4**) ili 3-amino-N-metilbenzamidom (**L5**), kao analogima 3-AB, inhibitora DNK reparacionog enzima PARP-1. Polazni kompleksi rutenijuma(II) sadrže kao arenski deo toluen (**RA1**) ili cimen (**RA2**).

Karakterizacija novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa **K1-K11** je izvršena metodama elementarne analize, IC i NMR (^1H i ^{13}C) spektroskopije, kao i elektrosprej masene spektrometrije (Tadić *et al.*, 2018; Pavlović *et al.*, 2019, 2020).

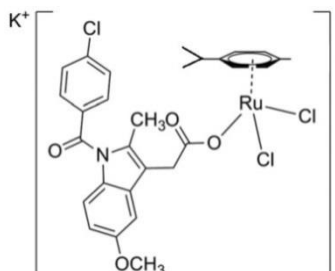
U kompleksima **K1-K4**, ligandi (**L1** i **L2**) su preko kiseonika kao donorske grupe monodentatno koordinisani za jezgro rutenijuma. Kompleksi **K1** i **K3** sadrže kao zajednički bioaktivni ligand indometacin, dok kompleksi **K2** i **K4** sadrže mefenaminsku kiselinu. U kompleksima **K1** i **K2** je za rutenijum vezan *p*-cimen kao arenski ligand, dok je u kompleksima **K3** i **K4** za rutenijum vezan toluen.

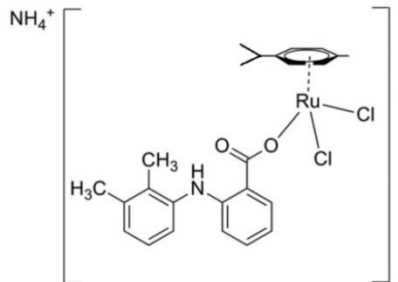
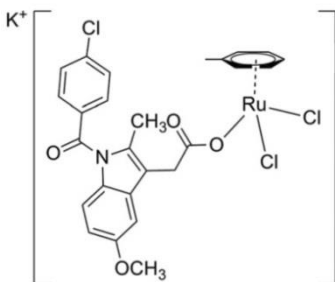
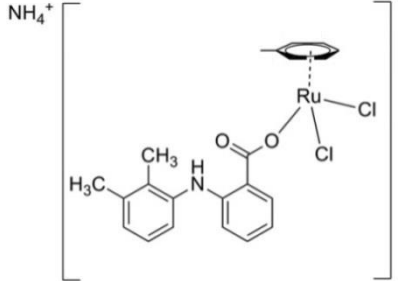
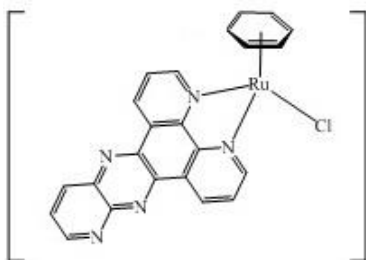
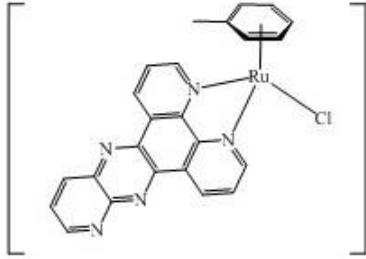
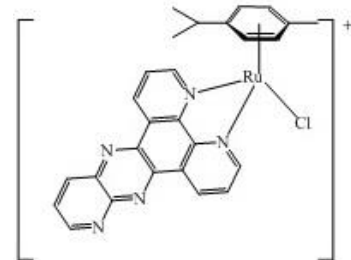
Kod sva tri kompleksa **K5-K7** je polipiridinski ligand (**L3**) koordinisan za rutenijum bidentatno, preko dva atoma azota, a kompleksi se razlikuju međusobno u zavisnosti od vezanog arenskog liganada: benzen (**K5**), toluen (**K6**) ili *p*-cimen (**K7**).

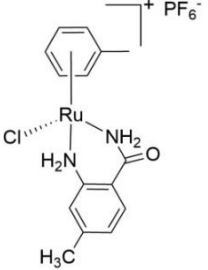
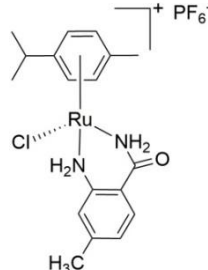
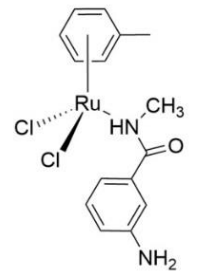
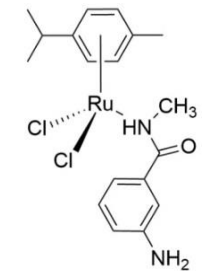
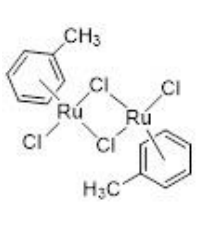
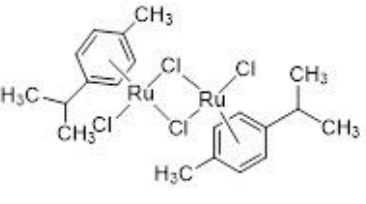
Kompleksi **K8** i **K9** sadrže bidentatno-vezani ligand **L4**, preko dva atoma azota, dok je u kompleksima **K10** i **K11**, ligand **L5** koordinisan za rutenijum monodentatno, preko jednog atoma azota. Kompleksi **K8** i **K10** sadrže toluen kao arenski ligand, dok kompleksi **K9** i **K11** sadrže cimen.

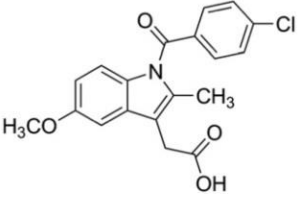
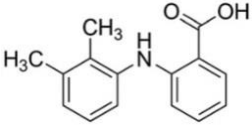
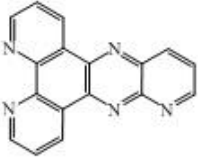
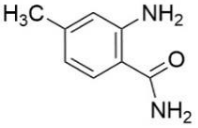
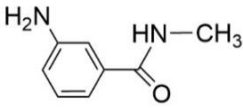
Kao referentno jedinjenje korišćena je cisplatin, dok je pri ispitivanju aktivnosti kompleksa **K8-K11**, usled specifičnosti dizajnirane grupe kompleksa, dodatno kao referentno jedinjenje korišćen i 3-AB.

Tabela 1. Oznake, hemijske strukture i nazivi ispitivanih jedinjenja

Oznaka jedinjenja	Strukturna formula jedinjenja	Hemijski naziv jedinjenja
K1		$\text{K}[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{L1})\text{Cl}_2]$

K2		$(\text{NH}_4)[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\mathbf{L2})\text{Cl}_2]$
K3		$\text{K}[\text{Ru}(\eta^6\text{-toluen})(\mathbf{L1})\text{Cl}_2]$
K4		$(\text{NH}_4)[\text{Ru}(\eta^6\text{-toluen})(\mathbf{L2})\text{Cl}_2]$
K5		$[\text{Ru}(\eta^6\text{-benzen})(\mathbf{L3})\text{Cl}]\text{PF}_6$
K6		$[\text{Ru}(\eta^6\text{-toluen})(\mathbf{L3})\text{Cl}]\text{PF}_6$
K7		$[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\mathbf{L3})\text{Cl}]\text{PF}_6$

K8		[Ru(η ⁶ -toluen)(L4)Cl]PF ₆
K9		[Ru(η ⁶ - <i>p</i> -cimen)(L4)Cl]PF ₆
K10		[Ru(η ⁶ -toluen)(L5)Cl]PF ₆
K11		[Ru(η ⁶ - <i>p</i> -cimen)(L5)Cl]PF ₆
RA1		[Ru(η ⁶ -toluen)Cl ₂] ₂
RA2		[Ru(η ⁶ - <i>p</i> -cimen)Cl ₂] ₂

L1		2-[1-(4-hlorobenzoil)-5-metoksi-2-metilindol-3-il]acetatna kiselina (indometacin)
L2		2-(2,3-dimetilanilino)benzoeva kiselina (mefenaminska kiselina)
L3		pirido[2',3':5,6]pirazin[2,3-f][1,10]fenantrolin
L4		2-amino-4-metilbenzamid
L5		3-amino-N-metilbenzamid

Rutenijum(II)-arenski kompleksi i ligandi su skladišteni na sobnoj temperaturi, na suvom i tamnom mestu. Štok rastvori ispitivanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa i liganada su napravljeni u DMSO, neposredno pre upotrebe. Stabilnost kompleksa u DMSO/fosfatnom puferu (pH 7,4) je ispitana UV-vis spektroskopijom, pri čemu su se svi kompleksi pokazali kao stabilni (Patra *et al.*, 2013).

3.2. Čelijske linije

Antiproliferativni potencijal rutenijum(II)-arenskih kompleksa i liganada ispitan je na panelu humanih tumorskih čelijskih linija različitog porekla, i to: ćelijama karcinoma dojke (HCC1937, MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7, MDA-MB-361), ćelijama hronične mijeloidne leukemije (K562), ćelijama adenokarcinoma pluća (A549), ćelijama malignog melanoma (A375), ćelijama adenokarcinoma debelog creva (LS 174T), kao i na dve normalne, zdrave (netumorske) humane čelijske linije: fetalni fibroblasti pluća (MRC-5) i ćelije epitela bronhija (BEAS-2B). Karakteristike ćelija korišćenih u ovoj doktorskoj tezi su prikazane u Tabeli 2 i Tabeli 3. Na osnovu genetičkih i fenotipskih karakteristika (Tabela 2), HCC1937, MDA-MB-231 i MDA-MB-453 su klasifikovane kao trostruko-negativne ćelije karcinoma dojke, dok MCF-7 i MDA-MB-361 ćelije karakteriše prisustvo receptora za estrogen (ER) i

progesteron (PR), te se klasifikuju kao hormon-senzitivne. Od navedenih ćelijskih linija, samo HCC1937 ćelije poseduju homozigotnu mutaciju (5382insC) u *BRC A1* genu koja uzrokuje kompletan gubitak funkcije BRCA1 proteina (Tomlinson *et al.*, 1998), dok ostale četiri ćelijske linije karcinoma dojke iz panela poseduju WT *BRC A1* gen. Korišćene ćelijske linije su iz kolekcije ćelijskih linija Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije.

Tabela 2. Karakteristike humanih ćelija kancera dojke korišćenih u ovoj doktorskoj tezi

Ćelije/ Karakteristike	HCC1937	MDA-MB-231	MDA-MB-453	MCF-7	MDA-MB-361
Ćelijski tip/ Morfologija	epitelne ćelije	mezenhimske ćelije (visoko metastatske)	epitelne ćelije	epitelne ćelije	epitelne ćelije
Tip tumora	TNM stadijum IIB, gradus 3, infiltrirajući karcinom duktusa	adenokarcinom	adenokarcinom	invazivni karcinom duktusa	adenokarcinom
Poreklo tumora	primarni tumor	metastaza (pleuralna efuzija)	metastaza (perikardijalna efuzija)	metastaza (pleuralna efuzija)	metastaza (mozak)
Klasifikacija tumora	ćelije bazalnog tipa A	ćelije bazalnog tipa B	HER2/neu amplifikovan	luminalne ćelije	luminalne ćelije
Specifični receptori	ER(-), PR(-), HER2/neu(-)	ER(-), PR(-), HER2/neu(-)	ER(-), PR(-), HER2/neu(-)*	ER(+), PR(+), HER2/neu(-)	ER(+), PR(-), HER2/neu(+)
<i>BRC A1</i> status	mutacija (hom., 5382insC)	WT	WT	WT	WT
<i>TP53</i> status	mutacija**	mutacija (hom.)	WT	WT	WT
Mutacije u drugim genima	<i>PTEN</i> (hom. del.)	<i>BR AF</i> (het.), <i>CDKN2A</i> (hom.), <i>KRAS</i> (het.), <i>NF2</i> (hom.)	<i>CDH1</i> (hom.), <i>PIK3CA</i> (het.), <i>KRAS</i>	<i>CDKN2A</i> (hom.), <i>PIK3CA</i> (het. akt. mut.)	<i>CDKN2A</i> (hom.), <i>PIK3CA</i> (het.)

Skraćenice: hom. – homozigotna mutacija; het. – heterozigotna mutacija; del. – delecija; ins. – insercija; akt. mut. – aktivirajuća mutacija; *TP53* – gen za protein p53; *BR AF* – B-Raf proto-onkogen, serin/treonin kinaza; *CDKN2A* – gen za ciklin-zavisni inhibitor kinaza 2A (eng. *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*); *KRAS* – KRAS proto-onkogen; *NF2* – gen za neurofibromin 2; *CDH1* – gen za kadherin 1; *PIK3CA* – gen za katalitičku subjedinicu alfa fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat 3-kinaze (eng. *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*). *Za MDA-MB-453 ćelije, *HER2/neu* gen je amplifikovan, ali nije visoko eksprimiran. **Za HCC1937 ćelije, stečena mutacija u *TP53* genu sa gubitkom WT alela

Tabela 3. Karakteristike ostalih humanih tumorskih i netumorskih ćelija korišćenih u ovoj doktorskoj tezi

Ćelije/ Karakteristike	K562	A549	A375	LS 174T	MRC-5	BEAS-2B
Ćelijski tip/ Morfologija	limfoblasti	epitelne ćelije	epitelne ćelije	epitelne ćelije	fibroblasti	epitelne ćelije
Tkivo/organ	kosna srž	pluća	koža	kolon	normalni fibroblasti pluća fetusa	normalne ćelije epitela bronhija transformisane adenovirusom 12-SV40
Tip tumora	hronična mijeloidna leukemija	nesitnoćelijski karcinom pluća	maligni melanom	adenokarcinom	/	/
Poreklo tumora	metastaza (pleuralna efuzija)	primarni tumor	primarni tumor	primarni tumor	/	/

3.2.1. Održavanje i kultivacija ćelija

Sve korišćene ćelijske linije, sa izuzetkom K562, su adherentne ćelije koje su održavane u kulturi u vidu monosloja u kompletnom hranljivom medijumu.

HCC1937, MDA-MB-453, MDA-MB-361, K562, A549, A375, LS 174T, MRC-5 i BEAS-2B su gajene u kompletnoj hranljivoj podlozi RPMI 1640 (eng. *Roswell Park Memorial Institute*), dok su MDA-MB-231 i MCF-7 ćelije gajene u hranljivoj podlozi DMEM (eng. *Dulbecco's modified Eagle's medium*). Prilikom pripreme kompletnog hranljivog medijuma, RPMI podloga (pH 7,2) je obogaćena sa 10% fetalnog goveđeg seruma (eng. *Fetal calf serum*, FCS), termički inaktivisanog (30 minuta, 56 °C), L-glutaminom (2 mM), HEPES (25 mM), penicilinom (100 IU/ml) i streptomycinom (100 µg/ml). DMEM podloga (pH 6,9) je takođe obogaćena termički inaktivisanim 10% FCS (30 minuta, 56 °C), L-glutaminom (2 mM), penicilinom (100 IU/ml) i streptomycinom (100 µg/ml). Za održavanje HCC1937, MDA-MB-231 i MCF-7 ćelija, adekvatne hranljive podloge su dodatno obogaćene D-glukozom (finalna koncentracija 4,5 g/l).

Reagensi za održavanje ćelijskih kultura: RPMI 1640, DMEM, FCS, L-glutamin, penicilin, streptomycin i D-glukoza, su proizvodi kompanije Sigma-Aldrich Co (Nemačka). HEPES je proizvod kompanije Capricorn Scientific GmbH (Nemačka). Polietilenski sudovi za kultivaciju adherentnih ćelija i ćelija u suspenziji, mikrotitarske ploče sa 96 i 6 bunarčića sa ravnim dnom, mikrotitarske ploče sa 96 bunarčića čije je dno u obliku slova „U“, kao i plastične epruvete za citofluorimetar, su proizvodi kompanije Thermo Scientific (SAD).

Za gajenje ćelija korišćeni su polietilenski sudovi za kultivaciju adherentnih ćelija (sve ćelijske linije izuzev K562) i ćelija u suspenziji (K562), sa površinom za kultivaciju od 25-75 cm², i zapremine od 7-25 ml. Ćelije su gajene u inkubatoru, na temperaturi od 37 °C, pri atmosferi vazduha obogaćenog sa 5% CO₂ i zasićenog vodenom parom. Ćelije su svakodnevno posmatrane pod svetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss, Nemačka), pri uveličanju objektiva 3,2x i 6,3x, radi inspekcije rasta ćelija u kulturi, brzine ćelijske deobe, kao i potrošnje hranljivih materija iz podloge, na osnovu čega je utvrđeno

kada ih je potrebno presaditi u svežu podlogu, odnosno „pasažirati“. Čelije su pasažirane nakon što monosloj ćelija prekrije 80% površine suda za kultivaciju, odnosno čelije dostignu 80% konfluencije, ili nakon što su nutrijenti iz podloge bili potrošeni, što se uočava na osnovu promene boje medijuma kao posledice promene u pH vrednosti. Pasažiranje ćelija je vršeno u sterilnoj komori sa kontinuiranim protokom vazduha (laminaru), uz korišćenje tehnika za sterilan rad sa ćelijskim kulturama, sterilnih laboratorijskih sudova i nošenjem zaštitne laboratorijske opreme. Svi reagensi potrebni za postupak pasažiranja ćelija su pre korišćenja zagrevani na 37 °C, u vodenom kupatilu.

Iz suda za kultivaciju sa ćelijama spremnim za pasažiranje, prvo je pažljivo odlivena podloga. Dno suda sa zalepljenim ćelijama (sud površine 25 cm²) je isprano sa 3 ml sterilnog fiziološkog rastvora puferisanog fosfatom (eng. *Phosphate-buffered saline*, PBS, Torlak, Srbija), koji je potom pažljivo odliven. Zatim je naliveno 2 ml rastvora 0,25% tripsin-0.53 mM EDTA, i čelije su inkubirane na 37 °C, 3-5 minuta. Promena morfološkog izgleda ćelija je praćena pod svetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss), pri uveličanju objektiva 3,2x i 6,3x. Nakon što su sve čelije dobile sferan oblik i odlepile se od podloge, dalje dejstvo tripsina je neutralisano dodavanjem 5 ml hranljive podloge. Upotrebom šprica i igle, ćelijska suspenzija je prenesena u plastičnu polistirensku epruvetu. Laganim pokretima pipete, uvlačenjem i izbacivanjem sadržaja iz nastavka pipete, do pet puta, ćelijska suspenzija je u epruveti razbijena na pojedinačne ćelije. Jedan deo zapremine suspenzije ćelija je vraćen u sud za gajenje ćelija, dopunjen svežom podlogom, i odložen u inkubator na 37 °C, za dalju propagaciju. Preostala količina ćelijske suspenzije je korišćena za eksperimente (Freshney, 2010).

3.3. Ispitivanje antiproliferativnog potencijala rutenijum(II)-arenskih kompleksa

3.3.1. Određivanje vijabiliteta ćelija bojenjem tripan plavim

Jedan od indirektnih načina za procenu ćelijske proliferacije je merenje vijabiliteta ćelija. Ćelijski vijabilitet se može definisati kao brojnost živih ćelija u ukupnoj populaciji ćelija uzorka. Procena ćelijskog vijabiliteta se može vršiti posmatranjem ćelija pod svetlosnim mikroskopom, dok je za kvantifikaciju vijabilnih ćelija neophodno određivanje koncentracije ćelija. Tripan plavo test omogućava određivanje brojnosti vijabilnih ćelija procenom integriteta ćelijske membrane i zasniva se na činjenici da žive, vijabilne ćelije poseduju intaktnu ćelijsku membranu koja sprečava boju tripan plavo da prođe kroz istu, te se citoplazma ćelije uočava kao neobojena (Strober, 2001). U ćelijama sa narušenim integritetom membrane, tripan plavo ulazi u ćeliju i boji je plavo.

U 50 µl ćelijske suspenzije u hranljivoj podlozi je dodato 450 µl rastvora boje tripan plavo, tako da je finalna koncentracija boje 0,04%. Obojena ćelijska suspenzija je promešana na vorteksu, do 3 sekunde, i 20 µl ove suspenzije je preneseno pipetom na hemocitometarsku pločicu za brojanje ćelija (Neubauer). Čelije su brojane u roku od 5 minuta od mešanja sa bojom tripan plavo. Prosečan broj živih (neobojenih) ćelija po polju pločice (svaka pločica ima četiri velika polja u kojima se broje ćelije, a svako polje je dalje izdvojeno na 16 manjih kvadranta) je određen brojanjem ćelija pod svetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss), pri uveličanju objektiva 6,3x. Svaki od četiri velikih kvadranta ima površinu od 1 mm², a dubina hemocitometarske komore iznosi 0,1 mm. Zapremina jednog velikog polja na komori za brojanje je stoga 10⁻⁴ cm³. S obzirom da 1 cm³ odgovara zapremini od 1 ml, broj ćelija po mililitru početne ćelijske suspenzije u medijumu (10⁶/ml) je izračunat po sledećoj formuli:

$$N = N_s \times R \times 10^4$$

N_s – prosečan broj živih ćelija po jednom velikom polju pločice za brojanje

R – faktor razblaženja ćelija u rastvoru za brojanje (u ovom slučaju iznosi 10)

Ukoliko je više od 90% ćelija ostalo neobojeno u odnosu na totalni broj ćelija izbrojanih na hemocitometarskoj pločici, za ćelijsku liniju se smatra da je vijabilna, i ovakve ćelije su korišćene za dalje eksperimente.

3.3.2. Određivanje preživljavanja ćelija MTT testom

3.3.2.1. Postavka eksperimenta i tretman ćelija

Uticao ispitivanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa, u poređenju sa njihovim polaznim jedinjenjima i cisplatinom kao referentnim jedinjenjem, na preživljavanje i rast ćelija u kulturi je određen kolorimetrijskim MTT testom (Supino, 1995). MTT test može poslužiti kao indirektni pokazatelj ćelijske proliferacije putem merenja metaboličke aktivnosti ćelija. Zasniva se na činjenici da žive, metabolički aktivne ćelije redukuju tetrazolijumsku so 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT) žute boje, mitohondrijalnim i van-mitohondrijalnim dehidrogenazama, do nerastvorljivih kristala formazana plave boje. Nakon rastvaranja kristala formazana, apsorbancija se može očitati spektrofotometrijski, na čitaču mikrotitarskih ploča, na talasnoj dužini od 570 nm.

Od početne suspenzije ćelija (za svaku ispitivanu ćelijsku liniju) u medijumu (10^6 /ml), pripremljena su razblaženja u svežoj hranljivoj podlozi, i zasađeno je po 100 μ l odgovarajućeg razblaženja ćelija u bunarčice mikrotitarske ploče sa 96 bunarčića sa ravnim dnom. Shodno razlikama u morfološkim i fiziološkim odlikama ispitivanih ćelijskih linija, kao i u vremenu potrebnom za ćelijsku deobu, ćelije su zasejane u sledećem broju (iskazano kao broj ćelija po bunarčiću): HCC1937 10000, MDA-MB-231 7000, MDA-MB-453 4000, MCF-7 8000, MDA-MB-361 10000, K562 6000, A549 5000, A375 6000, LS 174T 6000, MRC-5 5000 i BEAS-2B 7000. Sve ćelijske linije za svaki od pojedinačnih tretmana su sađene u triplikatu, odnosno u tri bunarčića mikrotitarske ploče, dok je u dodatna tri bunarčića ploče sipano samo po 100 μ l hranljive podloge (slepa proba). Adherentne ćelijske linije koje su korišćene za eksperimente su ostavljene 24 h u inkubatoru na 37 °C (vazduh zasićen parom, sa 5 % CO₂), da se adekvatno zalepe za dno bunarčića, i otpočnu sa rastom i proliferacijom pre dodavanja tretmana. K562 ćelije koje se gaje u suspenziji zahtevaju samo period stabilizacije od 2 h, nakon čega su spremne za dodavanje tretmana. Kompleksi **K1-K4** i ligandi **L1-L2**, su pripremljeni kao 30 mM štokovi; kompleksi **K5-K7** i ligand **L3**, kao 10 mM štokovi, dok su kompleksi **K8-K11** i ligandi **L4-L5**, pripremljeni kao 80 mM štokovi. Ispitivana jedinjenja su odmeravana na analitičkoj vagi, sa tačnošću merenja na četiri decimale (Mettler Toledo, H43, SAD). Polazni štok cisplatine je bio koncentracije 1 mg/ml (3,33 mM). Za svaki od polaznih štokova ispitivanih jedinjenja su napravljena serijska razblaženja u odgovarajućoj hranljivoj podlozi, tako da finalne koncentracije jedinjenja po bunarčiću ploče budu redom: 18,75 μ M, 37,5 μ M, 75 μ M, 150 μ M i 300 μ M (za komplekse **K1-K4** i ligande **L1-L2**); 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M i 100 μ M (za komplekse **K5-K7**, ligand **L3** i cisplatinu); 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M i 800 μ M (za komplekse **K8-K11** i ligande **L4-L5**). Procenat DMSO po bunarčiću nije prelazio 1%. Nakon 24 h od zasejavanja ćelija (odnosno nakon 2 h u slučaju K562 ćelija), u triplikate bunarčića sa ćelijama, kao i u triplikate bunarčića samo sa medijumom (slepa proba), sipano je po 50 μ l svakog razblaženja ispitivanog jedinjenja. Ćelije su potom izložene kontinuiranom dejstvu ispitivanih jedinjenja naredna 72 h, u inkubatoru na 37 °C (vazduh zasićen parom, sa 5 % CO₂). Nakon inkubacije, u svaki bunarčić mikrotitarske ploče je dodato po 20 μ l MTT rastvora (5 mg/ml u PBS, Sigma-Aldrich Co). Mikrotitarske ploče su inkubirane naredna 4 h, u inkubatoru na 37 °C, u mraku. Nakon inkubacije, dodato je po 100 μ l 10% rastvora natrijum dodecil sulfata (eng. *Sodium dodecyl sulphate*, SDS, Sigma-Aldrich Co) u svaki bunarčić, kako bi se rastvorili formirani kristali formazana. Apsorbancije su očitane nakon 24 h na čitaču mikrotitarskih ploča (Thermo Scientific Multiscan EX 200-240V, SAD) na 570 nm. Urađena su dva do tri nezavisna eksperimenta za svaki ispitivani agens na određenoj ćelijskoj liniji.

3.3.2.2. Obrada rezultata

Nakon što se vrednosti apsorbancije slepih proba oduzmu od odgovarajućih vrednosti apsorbancija kontrolnih ćelija (netretirane ćelije) i odgovarajućih vrednosti apsorbancija tretiranih ćelija, srednje vrednosti apsorbancija kontrolnih ćelija (A_K) i srednje vrednosti apsorbancija ćelija tretiranih različitim koncentracijama ispitivanih agenasa (A) se mogu iskoristiti za određivanje procenta preživljavanja ćelija pod dejstvom ispitivanih agenasa (Monks *et al.*, 1991), putem sledeće formule:

$$\text{Preživljavanje ćelija (\%)} = A/A_K \times 100$$

Upotrebom Prism Graph Pad 6.0 softvera, moguće je konstruisati krivu koja prikazuje zavisnost preživljavanja ćelija (%) od koncentracije ispitivane supstance. Iz ove krive se dobija podatak o koncentraciji agensa koja dovodi do smanjenja preživljavanja ćelija za 50%, i predstavlja IC_{50} vrednost (eng. *Inhibitory concentration*), izraženu u $\mu M \pm$ standardna devijacija (SD). IC_{50} vrednosti (kao i $0,5xIC_{50}$ i $2xIC_{50}$) dobijene MTT testom su korišćene kao koncentracije ispitivanih agenasa kojima su tretirane ćelije u ostalim eksperimentima.

Selektivnost u antitumorskom dejstvu ispitivanih supstanci prema ćelijama kancera, u odnosu na normalne ćelije, je određena preko indeksa selektivnosti (eng. *Selectivity index*, SI), koji je za svaku ćelijsku liniju izračunat na sledeći način: $SI_{HCC1937}$ (IC_{50} BEAS-2B/ IC_{50} HCC1937), $SI_{MDA-MB-231}$ (IC_{50} BEAS-2B/ IC_{50} MDA-MB-231 ili IC_{50} MRC-5/ IC_{50} MDA-MB-231), $SI_{MDA-MB-453}$ (IC_{50} BEAS-2B/ IC_{50} MDA-MB-453), SI_{MCF-7} (IC_{50} BEAS-2B/ IC_{50} MCF-7), $SI_{MDA-MB-361}$ (IC_{50} BEAS-2B/ IC_{50} MDA-MB-361), SI_{K562} (IC_{50} MRC-5/ IC_{50} K562), SI_{A549} (IC_{50} MRC-5/ IC_{50} A549), SI_{A375} (IC_{50} MRC-5/ IC_{50} A375) i SI_{LS174T} (IC_{50} MRC-5/ IC_{50} LS 174T).

3.4. Sortiranje ćelija na protočnom citofluorimetru na osnovu faza ćelijskog ciklusa nakon tretmana rutenijum(II)-arenskim kompleksima

Uticaj rutenijum(II)-arenskih kompleksa i cisplatine na ćelijski ciklus tretiranih ćelija analiziran je na protočnom citofluorimetru (FACSCalibur™ BD Biosciences, SAD), koji sortira ćelije na osnovu fluorescencije (eng. *Fluorescence-activated cell sorting*, FACS), nakon bojenja propidijum jodidom (eng. *Propidium iodide*, PI) (Ormerod, 1994). Metoda se zasniva na određivanju sadržaja DNK po ćeliji, koji zavisi od faze ćelijskog ciklusa u kojoj se ćelija nalazi. PI je fluorescentna boja koja se vezuje za molekul DNK interkalacijom i produkuje crvenu fluorescenciju proporcionalnu sadržaju i stepenu kondenzacije DNK u ćeliji. S obzirom da PI može da se veže i za molekule RNK, neophodno je tretirati uzorke ribonukleazom A kako bi se degradovala RNK prisutna u uzorku.

Ćelije su zasađene u bunarčiće ploče sa 6 bunarčića, i to u sledećoj gustini: $3x10^5$ MDA-MB-231 ćelija po bunarčiću (za tretman kompleksima **K1** i **K3** i cisplatinom), $2x10^5$ A375 ćelija po bunarčiću (za tretman kompleksom **K7** i cisplatinom) i $2,5x10^5$ HCC1937 ćelija po bunarčiću (za tretman kompleksima **K8-K11**, polaznim rutenijum(II)-arenima **RA1-RA2**, ligandima **L4-L5** i cisplatinom). Ćelije su zasađene u 2 ml hranljive podloge po bunarčiću, a gustina ćelija je određena u skladu sa vremenom potrebnim za ćelijsku deobu, kao i koncentracijama primenjenih agenasa i dužinom trajanja tretmana. Ćelije su inkubirane 24 h u inkubatoru, na 37 °C (vazduh zasićen parom, sa 5% CO₂). Nakon inkubacije, medijum je odbačen. U bunarčiće sa ćelijama koje će poslužiti kao kontrolni uzorak je dodato 2 ml svežeg medijuma, dok su u ostale bunarčiće sa ćelijama dodati sveže pripremljeni rastvori ispitivanih supstanci određene koncentracije u odgovarajućoj hranljivoj podlozi. MDA-MB-231 ćelije su tokom 24 h bile izložene dejstvu kompleksa **K1** i **K3**, kao i cisplatine, u koncentracijama koje odgovaraju $0,5xIC_{50}$ (11 μM u slučaju **K1** i cisplatine, 13 μM u slučaju **K3**) i IC_{50} vrednostima (22 μM u slučaju **K1** i cisplatine, 26 μM u slučaju **K3**). A375 ćelije su inkubirane tokom 24 h, 48 h i 72 h u prisustvu kompleksa **K7** ili cisplatine, u koncentracijama koje odgovaraju $0,5xIC_{50}$ (7,9 μM u slučaju **K7**, 3,8 μM u slučaju cisplatine), IC_{50} (15,8 μM u slučaju **K7**, 7,5 μM u slučaju cisplatine) i $2xIC_{50}$ vrednostima (31,6 μM u slučaju **K7**, 15 μM u slučaju cisplatine). HCC1937 ćelije su inkubirane 72 h u prisustvu kompleksa **K8-K11**, polaznih rutenijum(II)-arena **RA1-RA2**, ligandima **L4-L5** ili cisplatine, u koncentracijama od 200 μM i 500 μM (kompleksi i ligandi) ili 5 μM i 10 μM (cisplatin). Nakon odgovarajućeg vremena inkubacije sa ispitivanim agensima, tretman je odbačen, ćelije su isprane sa PBS, tripsinizirane i potom centrifugirane 10 minuta na 1500 rpm (eng. *Revolutions per minute*). Ćelijski talog je zatim ispran sa PBS i ćelije su prebačene u plastične epruvete za citofluorimetar. Ponovljeno je centrifugiranje nakon čega je supernatant odbačen, a ćelijski talog je resuspendovan u 200 μl hladnog PBS, na ledu. Odmah zatim pažljivo (kap po kap) je dodat 1 ml hladnog 70% etanola, uz vorteksovanje. Epruvete sa fiksiranim ćelijskim uzorcima su ostavljene na -20 °C, preko noći. Nakon fiksacije u etanolu, ćelije su istaložene centrifugiranjem na 1500 rpm, tokom 10 minuta. Supernatant je odliven, a ćelije su isprane sa hladnim PBS kako bi se uklonili ostaci etanola. Uzorci su potom resuspendovani u 400 μl hladnog PBS, u koji je dodato 50 μl ribonukleaze A (eng. *Ribonuclease A*, RNaseA, Sigma-Aldrich

Co, 1 mg/ml), i inkubirani na 37 °C, tokom 30 minuta. Nakon RNaseA tretmana, a neposredno pre analize na protočnom citofluorimetru, uzorcima je dodato po 50 µl PI (Sigma-Aldrich Co, 400 µg/ml). Pripremljeni ćelijski uzorci su nakon dodavanja PI, u roku od 30 minuta, analizirani na protočnom citofluorimetru, podešenim tako da detektuje 10000 događaja. Intenzitet fluorescencije PI, koji je eksitovan na 488 nm argon-jonskim laserom, detektovan je na FL2 kanalu. Dobijeni podaci su analizirani uz pomoć CellQuest Pro softvera (BD Biosciences). Na osnovu dobijenih DNK histograma, analiziran je sadržaj DNK i određen je procenat Sub-G1 populacije ćelija i procenat ćelija zaustavljenih u G1, S i G2 fazama ćelijskog ciklusa.

3.5. Kvantitativna analiza apoptotskog potencijala rutenijum(II)-arenskih kompleksa na protočnom citofluorimetru

Kvantitativna analiza apoptotskog potencijala rutenijum(II)-arenskih kompleksa i cisplatine urađena je na protočnom citofluorimetru (FACSCalibur™ BD Biosciences). U tu svrhu upotrebljen je Aneksin V-FITC apoptotski kit za detekciju (BD Biosciences) (Van Engeland *et al.*, 1998).

Jedan od markera rane apoptoze je promena na ćelijskoj membrani koja se ogleda u translokaciji molekula fosfatidilserina iz njenog unutrašnjeg u spoljašnji monosloj. Aneksin V je humani protein poreklom iz placente koji se specifično vezuje za fosfatidilserin u prisustvu jona Ca²⁺. Aneksin V može biti konjugovan za fluorohrome, poput fluorescein izotiocijanata (FITC). Na taj način, aneksin V-FITC može poslužiti za brzu i preciznu kvantifikaciju ćelija kod kojih je došlo do translokacije fosfatidilserina, analizom na protočnom citofluorimetru. Aneksin V-FITC se najčešće koristi u kombinaciji sa bojama za koje je ćelijska membrana nepropusna, poput PI. S obzirom da se tokom ovog testa ispituju ćelije koje nisu prethodno fiksirane, PI će obeležiti samo one ćelije sa narušenim integritetom ćelijske membrane, odnosno ćelije koje su u kasnoj fazi apoptoze ili u nekrozi. Ovakvo dvojno bojenje omogućava precizno razlikovanje:

1. Živih ćelija – ne vezuju ni aneksin V-FITC ni PI (Aneksin V-FITC(-)/PI(-));
2. Ćelija u ranoj fazi apoptoze – boje se aneksin V-FITC, ali ne i PI (Aneksin V-FITC(+)/PI(-));
3. Ćelija u kasnoj fazi apoptoze ili u nekrozi – boje se i aneksin V-FITC i PI (Aneksin V-FITC (+)/PI(+));
4. Mrtvih ćelija – boje se samo PI (Aneksin V-FITC(-)/PI(+)).

Mana ovog testa je što ne pravi razliku između ćelija koje su u kasnoj apoptozi od onih koje umiru nekrozom, jer će se oba tipa ćelija obojiti i aneksin V-FITC i PI.

Na ploči sa 6 bunarčića, po jednom je zasađeno 3x10⁵ MDA-MB-231 ćelija (za tretman kompleksima **K1** i **K3** i cisplatinom) i 2x10⁵ A375 ćelija (za tretman kompleksom **K7** i cisplatinom). Ćelije su sađene u 2 ml hranljive podloge po bunarčiću, a gustina ćelija je određena u skladu sa vremenom potrebnim za ćelijsku deobu, kao i koncentracijama primenjenih agenasa i dužinom trajanja tretmana. Ćelije su inkubirane 24 h u inkubatoru, na 37 °C (vazduh zasićen parom, sa 5% CO₂). Nakon inkubacije, medijum je odbačen. U bunarčiće sa ćelijama koje će poslužiti kao kontrolni uzorak je dodato 2 ml svežeg medijuma, dok su u ostale bunarčiće sa ćelijama dodati sveže pripremljeni rastvori ispitivanih supstanci određene koncentracije u odgovarajućoj hranljivoj podlozi. MDA-MB-231 ćelije su tokom 24 h bile izložene dejstvu kompleksa **K1** i **K3**, kao i cisplatine, u koncentracijama koje odgovaraju 0,5xIC₅₀ (11 µM u slučaju **K1** i cisplatine, 13 µM u slučaju **K3**) i IC₅₀ vrednostima (22 µM u slučaju **K1** i cisplatine, 26 µM u slučaju **K3**). A375 ćelije su inkubirane tokom 24 h i 48 h u prisustvu kompleksa **K7** ili cisplatine, u koncentracijama koje odgovaraju 0,5xIC₅₀ (7,9 µM u slučaju **K7**, 3,8 µM u slučaju cisplatine), IC₅₀ (15,8 µM u slučaju **K7**, 7,5 µM u slučaju cisplatine) i 2xIC₅₀ vrednostima (31,6 µM u slučaju **K7**, 15 µM u slučaju cisplatine). Nakon isteka vremena inkubacije sa ispitivanim agensima, ćelije su isprane sa PBS, tripsinizirane i centrifugirane 10 minuta na 1500 rpm. Ćelije su potom isprane dva puta sa hladnim PBS i finalno resuspendovane u 200 µl pufera za vezivanje aneksina (10 mmol/l HEPES/NaOH (pH 7,4), 140 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l CaCl₂). 100 µl ćelijske suspenzije po uzorku (sadrži oko 1x10⁵ ćelija) je prebačeno u plastične epruvete za citofluorimetar, i pomešano sa 5 µl aneksin V-FITC i 5 µl PI. Nakon inkubacije od 15 minuta u mraku, u svaki uzorak je dodato po 400 µl

pufera za vezivanje aneksina. Uzorci su blago vorteksovani i analizirani korišćenjem FACSCalibur™ protočnog citofluorimetra (BD Biosciences) i CellQuest Pro softvera u toku narednog sata.

Radi podešavanja parametara za analizu uzoraka na protočnom citofluorimetru, za svaku ispitivanu ćelijsku liniju su pripremljena četiri kontrolna uzorka, i to:

1. Ćelije koje nisu podvrgnute bojenju;
2. Aneksin V-FITC bojene ćelije;
3. PI bojene ćelije;
4. Aneksin V-FITC/PI bojene ćelije.

3.6. Mikroskopska analiza tipova ćelijske smrti dvojnim bojenjem akridin oranž/etidijum bromidom

Izgled ćelija se često koristi kao kriterijum za razgraničavanje između različitih tipova ćelijske smrti, bez osvrta na biohemijske ili molekulske aspekte samog procesa umiranja ćelija. Dvojno bojenje ćelija akridin oranž/etidijum bromidom omogućava razlikovanje živih ćelija od apoptotskih i nekrotskih ćelija na fluorescentnom mikroskopu. Akridin oranž (AO) je vitalna fluorescentna katjonska boja koja ulazi u sve ćelije, uključujući i žive ćelije, kao i one koje su u ranoj fazi apoptoze, odnosno ćelije sa očuvanim integritetom ćelijske membrane. AO interaguje sa DNK putem interkalacije, emitujući zelenu fluorescenciju, dok sa RNK interaguje elektrostatičkim privlačenjem, pri čemu emituje crvenu fluorescenciju. Takođe, AO se može akumulirati i u drugim ćelijskim kompartmentima osim nukleusa, poput onih sa niskom pH vrednošću, kao što su lizozomi, gde postaje protonizovan i „zarobljen“. Etidijum bromid (EtBr) je fluorescentna boja koja se interkalacijom vezuje za dvolančanu DNK i fluorescira narandžasto nakon izlaganja ultraljubičastom zračenju. EtBr može da uđe samo u ćelije kod kojih je narušen integritet ćelijske membrane, odnosno u ćelije koje su u kasnoj fazi apoptoze ili u nekrozi (Atale *et al.*, 2014).

Nakon dvojnog bojenja ćelija AO/EtBr, posmatranjem pod fluorescentnim mikroskopom mogu se razlikovati sledeći tipovi ćelija:

1. Žive ćelije – zeleno-fluorescirajući nukleus očuvane strukture (AO(+)/EtBr(-));
2. Ćelije u ranoj fazi apoptoze – zeleno-fluorescirajući nukleus sa intaktnom ćelijskom membranom i kondenzovanim ili fragmentisanim hromatinom (AO(+)/EtBr(-));
3. Ćelije u kasnoj fazi apoptoze – narandžasto-fluorescirajući nukleus sa kondenzovanim i fragmentisanim hromatinom; formiraju se mehurovi na površini ćelijske membrane, i finalno dolazi do i narušavanja integriteta ćelijske membrane i nastanka apoptotskih tela (Xu, Lai and Hua, 2019) u kojima se nalaze fragmenti nukleusa i ćelijske organele (AO(+)/EtBr(+));
4. Ćelije u nekrozi – narandžasto/crveno-fluorescirajući nukleus očuvane strukture u ranoj fazi nekroze; u kasnijim fazama nekroze dolazi do dezintegracije nukleusa, bubrenja mitohondrija i endoplazminog retikuluma, vakuolizacije citoplazme, oštećenja ćelijske membrane i oslobađanja ćelijskog sadržaja (AO(-)/EtBr(+)).

U bunarčiće mikrotitarske ploče sa 96 bunarčića sa ravnim dnom zasađene su A375 ćelije (5000 ćelija po bunarčiću) u 100 µl hranljive podloge. Nakon 24 h rasta u inkubatoru, na 37 °C (vazduh zasićen parom, sa 5 % CO₂), ćelije su tretirane kompleksom **K7** ili cisplatinom, u koncentracijama koje odgovaraju IC₅₀ (15,8 µM u slučaju **K7**, 7,5 µM u slučaju cisplatine) i 2xIC₅₀ vrednostima (31,6 µM u slučaju **K7**, 15 µM u slučaju cisplatine). Nakon 72 h inkubacije, kontrolne ćelije (netretirane), i ćelije tretirane ispitivanim agensima, su isprane sa PBS i potom bojene smešom boja AO (5 mg/ml) i EtBr (3 mg/ml) pripremljenom u PBS. Finalna koncentracija AO je bila 5 µg/ml, a finalna koncentracija EtBr 3 µg/ml. Odmah nakon toga, ćelije su posmatrane pod fluorescentnim mikroskopom (ZOE™ Fluorescent Cell Imager Bio-Rad Laboratories, Inc, SAD), opremljenim monohromatskom kamerom (12 bit CMOS, 5 MP), pri uveličanju objektiva 20x. Ćelije su analizirane korišćenjem crvenog i zelenog kanala (za detekciju AO i EtBr signala), kao i pri standardnoj (eng. *Bright field*) iluminaciji kako bi se uočile eventualne morfološke promene.

3.7. Analiza ukupne unutarćelijske akumulacije i lokalizacije rutenijuma(II) u unutarćelijskim kompartmentima metodom ICP-MS

Nivoi ukupne unutarćelijske akumulacije metala rutenijuma(II) i platine(II), akumulacije u specifičnim unutarćelijskim frakcijama (citoplazma, ćelijska membrana i membrane organela, citoskelet, nukleus), kao i vezivanja za nukleusnu DNK ćelija tretiranih ispitivanim rutenijum(II)-arenskim kompleksima ili cisplatinom su određeni upotrebom masene spektrometrije sa indukovanom kuplovanom plazmom (eng. *Inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) i iCAP Qc ICP-MS spektrometra (Thermo Scientific) sa Qtegra kompjuterskim softverom (Ott, Biot and Hartinger, 2014).

3.7.1. Priprema ćelijskih taloga

U flaskove za gajenje ćelija od 25 cm² je zasađeno 8x10⁵ MDA-MB-231 ćelija (za tretman kompleksima **K1** i **K3**) i 5x10⁵ HCC1937 ćelija (za tretman kompleksima **K8-K11**), u 5 ml odgovarajućeg medijuma, u duplikatu za svaki tretman. U flaskove za gajenje ćelija od 75 cm² je zasađeno 2x10⁶ A375 ćelija (za tretman kompleksom **K7** i cisplatinom), u 10 ml medijuma, u duplikatu za svaki tretman. Gustina ćelija zasađenih u flaskove je određena u skladu sa vremenom inkubacije, vremenom potrebnim za ćelijsku deobu, kao i koncentracijama primenjenih agenasa i dužinom trajanja tretmana. MDA-MB-231 i A375 ćelije su inkubirane 24 h, dok su HCC1937 ćelije inkubirane 72 h, na 37 °C (vazduh zasićen parom, sa 5 % CO₂), pre dodavanja ispitivanih tretmana. Nakon inkubacije, medijum je odbačen, a ćelije su tretirane sa 5 ml (MDA-MB-231 i HCC1937) ili 10 ml (A375) sveže pripremljenih rastvora ispitivanih supstanci određene koncentracije u odgovarajućoj hranljivoj podlozi. Tokom 24 h, MDA-MB-231 ćelije su bile izložene dejstvu kompleksa **K1** i **K3**, dok su A375 ćelije bile izložene dejstvu kompleksa **K7** i cisplatine, u jednakim koncentracijama od 10 µM. HCC1937 ćelije su inkubirane 24 h u prisustvu 200 µM rastvora kompleksa **K8-K11**. Nakon isteka vremena inkubacije sa ispitivanim agensima, ćelije su isprane sa PBS, tripsinizirane i centrifugirane 10 minuta na 1500 rpm. Ćelijski talog je resuspendovan u 1 ml hladnog PBS, i 20 µl ove suspenzije je iskorišćeno za brojanje ćelija upotrebom tripan plavo testa. Ćelije su ponovo centrifugirane, i talog ćelija je smrznut na -80 °C.

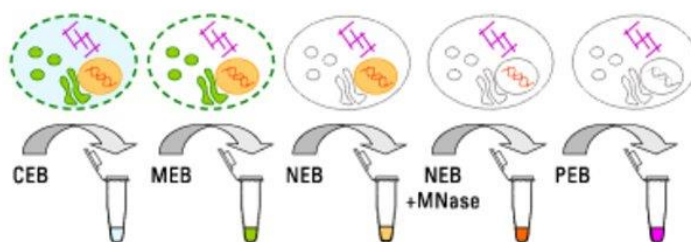
Ćelijski talozi pripremljeni za analizu ukupne unutarćelijske akumulacije rutenijuma(II)/platine(II) su kao takvi podvrgnuti ICP-MS analizi. Rezultat je izražen kao količina metala u nanogramima (ng) prisutna u uzorku od milion ćelija (ng metala/10⁶ ćelija). Iz ćelijskih taloga pripremljenih za analizu akumulacije rutenijuma(II) u DNK frakciji, kao i u proteinskim frakcijama iz unutarćelijskih kompartmenata, dalje je vršena izolacija genomske DNK i unutarćelijska frakcionacija, redom, pre analize na ICP-MS.

3.7.2. Izolacija genomske DNK isoljavanjem

Genomska DNK je izolovana isoljavanjem (Miller, Dykes and Polesky, 1988). Talog ćelija je prvo resuspendovan u 300 µl pufera za lizu (eng. *Leukocyte Lysing Buffer*, LLB), a potom je dodato 20 µl 10% SDS i 10 µl proteinaze K (20 mg/ml, iz zamrzivača). Uzorci su inkubirani na 56 °C oko 2 h, nakon čega je dodato 100 µl 6M NaCl. Nakon vorteksovanja, uzorci su centrifugirani 3 minuta na 14000 rpm. Supernatant koji sadrži rastvorenu DNK je prebačen u novu epruvetu u koju je zatim dodan 1 ml hladnog apsolutnog etanola i pažljivo je promućkano 30-tak puta dok se nisu formirali končići DNK. Nakon centrifugiranja 2 minuta na 14000 rpm, u talog koji sadrži DNK je dodan 1 ml 70% etanola i sadržaj epruvete je ponovo izmućkan. Ponovljeno je centrifugiranje od 2 minuta na 14000 rpm, kako bi se formirao talog DNK. Uzorci su potom ostavljeni 2 h u termostatu na 37 °C da ispari etanol. DNK je zatim resuspendovana u 100 µl destilovane vode koja ne sadrži nukleaze (eng. *Nuclease-free water*) i ostavljena preko noći u vodenom kupatilu na 37 °C da se rastvori. Koncentracija DNK je određena spektrofotometrijski merenjem apsorbancije i utvrđivanjem odnosa apsorbancija na 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280} nm) (BioSpec-nano spectrophotometer Shimadzu Biotech, Japan). Nivo rutenijuma(II) je određen u izolovanoj DNK frakciji, nakon što su uzorci pripremljeni za ICP-MS prema standardnoj proceduri, koristeći iCAP Qc ICP-MS spektrofotometar (Thermo Scientific) sa Qtegra kompjuterskim softverom. Rezultati su izraženi kao količina rutenijuma(II) u pikogramima po mikrogramu DNK (pg Ru/µg DNK).

3.7.3. Razdvajanje proteinskih frakcija iz unutarćelijskih kompartmenata

Talog ćelija pripremljen za analizu akumulacije rutenijuma(II)/platine(II) u specifičnim unutarćelijskim kompartmentima je podvrgnut procesu liziranja upotrebom seta za razdvajanje proteinskih frakcija iz ćelija u kulturi (Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells, kat. br. 78840, Thermo Scientific), prateći uputstva proizvođača (Slika 18). Set omogućava postepeno razdvajanje i pripremu proteinskih ekstrakata poreklom iz pet ćelijskih frakcija: citoplazmatska frakcija, membranska frakcija (ćelijska membrana i membrane organela), citoskeletna frakcija, frakcija solubilnih proteina nukleusa i frakcija proteina nukleusa vezanih za hromatin. Pre početka ekstrakcije, u svaki pufer je dodata određena količina koktela proteaznih inhibitora. U ćelijski talog je prvo dodato 200 μ l hladnog pufera za ekstrakciju proteina citoplazme (eng. *Cytoplasmic Extraction Buffer*, CEB), koji izaziva selektivnu permeabilizaciju ćelijske membrane, i uzorak je inkubiran na 4 °C, 10 minuta, uz blago mešanje. Nakon inkubacije, uzorak je centrifugiran 5 minuta na 2500 rpm na 4 °C. Supernatant sa citoplazmatskim sadržajem je prebačen u novu tubicu koja je prethodno ohlađena na ledu. U ćelijski talog je potom dodato 200 μ l hladnog pufera za ekstrakciju membranskih proteina (eng. *Membrane Extraction Buffer*, MEB), koji omogućava rastvaranje ćelijske membrane, membrane mitohondrija, endoplazminog retikuluma i Goldžijevog aparata, dok membrana nukleusa ostaje neoštećena. Uzorak je vorteksovan 5 sekundi, na najvećoj brzini, zatim je inkubiran na 4 °C, 10 minuta, uz blago mešanje, a potom centrifugiran 5 minuta na 5500 rpm na 4 °C. Supernatant koji sadrži membransku proteinsku frakciju je prebačen u novu tubicu. U ćelijski talog je zatim dodato 100 μ l hladnog pufera za ekstrakciju solubilnih proteina nukleusa (eng. *Nuclear Extraction Buffer*, NEB), i uzorak je vorteksovan 15 sekundi na najvećoj brzini. Nakon inkubacije od 30 minuta na 4 °C uz blago mešanje, uzorak je centrifugiran 5 minuta na 7500 rpm na 4 °C. Supernatant sa frakcijom solubilnih proteina nukleusa je prebačen u novu, prethodno ohlađenu tubicu. Pufer za ekstrakciju proteina nukleusa vezanih za hromatin je pripremljen tako što je u 100 μ l NEB pufera dodato 5 μ l CaCl_2 (100 mM) i 3 μ l nukleaze mikrokoka (eng. *Micrococcal Nuclease*, MNase, 100 IU/ μ l), na sobnoj temperaturi. Pufer je potom dodat u ćelijski talog i uzorak je vorteksovan 15 sekundi na najvećoj brzini. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, uzorak je ponovo vorteksovan 15 sekundi na najvećoj brzini, i potom centrifugiran 5 minuta na 13000 rpm. Supernatant koji sadrži frakciju proteina nukleusa vezanih za hromatin je prebačen u novu tubicu. Finalno, citoskeletna proteinska frakcija je dobijena nakon dodavanja 100 μ l PEB pufera (eng. *Pellet Extraction Buffer*) u preostali ćelijski talog. Uzorak je vorteksovan 15 sekundi, na najvećoj brzini, a potom inkubiran 10 minuta, na sobnoj temperaturi. Nakon 5 minuta centrifugiranja na 13000 rpm, supernatant je prebačen u novu tubicu. Svi uzorci su skladišteni na -80 °C, do momenta analize na ICP-MS. Rezultat je izražen kao količina rutenijuma(II)/platine(II) u nanogramima prisutna u uzorku od milion ćelija (ng metala/ 10^6 ćelija) i finalno iskazan kao raspodela metala po ćelijskim kompartmentima (u %, računajući da je zbir svih frakcija 100%).



Slika 18. Šematski prikaz protokola za razdvajanje proteinskih frakcija iz unutarćelijskih kompartmenata ćelija u kulturi (preuzeto sa <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/78840#/78840>)

3.8. Ispitivanje sposobnosti rutenijum(II)-arenskih kompleksa da inhibiraju aktivnost PARP-1 enzima upotrebom kolorimetrijskog PARP testa

Sposobnost rutenijum(II)-arenskih kompleksa (**K8-K11**) sa ligandima na bazi benzamida (**L4**, **L5**), kao i polaznih rutenijum(II)-arena (**RA1**, **RA2**) da inhibiraju aktivnost PARP-1 enzima je ispitana kolorimetrijskim PARP testom (HT Universal Colorimetric PARP Assay, kat. br. 4677-096-K,

Trevigen, SAD), prateći uputstva proizvođača (Lee *et al.*, 2013). Test omogućava merenje vezivanja biotinilovanog PARP-1 enzima za histonske proteine kojima je obloženo 96 bunarčića raspoređenih u nizove (eng. *Strip wells*). 3-AB (200 mM) je korišćen kao referentno jedinjenje. Štok rastvori ispitivanih rutenijumskih kompleksa i liganada su pripremljeni u DMSO (10 mM), neposredno pre upotrebe, i potom serijski razblaženi 1xPARP puferom do finalnih koncentracija: 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M i 1000 μ M. 3-AB je serijski razblažen 1xPARP puferom do istih finalnih koncentracija kao i kompleksi. Bunarčići obloženi histonima su prvo rehidratirani dodavanjem 50 μ l 1xPARP pufera po bunarčiću. Nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, PARP pufer je odliven, a u bunarčiće su dodata serijska razblaženja ispitivanih supstanci (10 μ l/bunarčiću). U bunarčiće je odmah zatim dodato po 15 μ l razblaženog PARP-1 enzima (0,5 IU/bunarčiću), i bunarčići su inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi. Bunarčići u koje je sipan samo PARP pufer, ali ne i PARP-1 enzim su iskorišćeni kao negativna kontrola, koja omogućava određivanje pozadinske apsorbancije. Bunarčići u koje je sipan samo PARP-1 enzim su iskorišćeni kao pozitivna kontrola, koja označava 100% aktivnost enzima. Nakon inkubacije, u sve bunarčiće je dodato po 25 μ l 1xPARP koktela koji sadrži aktivisanu DNK i biotinilovani NAD⁺. Nakon inkubacije od 60 minuta na sobnoj temperaturi, bunarčići su isprani dva puta sa rastvorom PBS i 0,1% Triton X-100 (200 μ l/bunarčiću), a potom dva puta samo sa PBS. U bunarčiće je dodato po 50 μ l razblaženog rastvora streptavidina konjugovanog sa peroksidazom rena (eng. *Streptavidin-horse-radish Peroxidase*, Strep-HRP). Nakon inkubacije od 60 minuta na sobnoj temperaturi, bunarčići su ponovo isprani dva puta sa rastvorom PBS i 0,1% Triton X-100 (200 μ l/bunarčiću), a potom dva puta samo sa PBS. Finalno, u bunarčiće je dodato po 50 μ l prethodno otopljenog kolorimetrijskog supstrata TACS-Sapphire (Trevigen, SAD), i bunarčići su inkubirani tokom 15 minuta, u mraku, na sobnoj temperaturi. Dodavanjem iste količine 0,2 M HCl po bunarčiću, kolorimetrijska reakcija je zaustavljena. Formirani žuto obojeni produkt reakcije je stabilan tokom 1 h na sobnoj temperaturi, tokom kojih je izmerena apsorbancija na talasnoj dužini od 450 nm, na čitaču mikrotitarskih ploča (Thermo Scientific Multiscan EX 200-240V). Razlike u intenzitetu žute boje oslikavaju efikasnost ispitivanih jedinjenja u inhibiciji PARP-1 enzima. Uzimajući u obzir kontrolu aktivnosti enzima, kao i negativnu kontrolu, dobijene vrednosti apsorbancija su konvertovane u relativne vrednosti koje odgovaraju procentu inhibicije aktivnosti PARP-1 enzima. Upotrebom Prism Graph Pad 6.0 softvera, konstruisana je kriva koja predstavlja zavisnost inhibicije PARP-1 enzima (%) od koncentracije ispitivane supstance. Iz ove krive je dobijen podatak o koncentraciji agensa koja dovodi do smanjenja aktivnosti PARP-1 za 50%, i predstavlja IC₅₀ vrednost, izraženu u μ M \pm SD.

3.9. Ispitivanje interakcije rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa DNK pHOT-1 plazmida elektroforezom na agaroznom gelu

Utica j rutenijum(II)-arenskih kompleksa (**K8-K11**), polaznih rutenijum(II)-arena (**RA1, RA2**), liganada na bazi benzamida (**L4, L5**), kao i cisplatine na tercijernu strukturu DNK, određen je ispitivanjem pokretljivosti (mobilnosti) DNK pHOT-1 plazmida (TopoGEN, SAD) elektroforezom na agaroznom gelu (Lee *et al.*, 2012). DNK pHOT-1 plazmida je prisutna u dve konformacije, i to kao superspiralizovana forma (forma I) i kao relaksirana, cirkularna forma (forma II). Forma I doživljava manji otpor prilikom putovanja kroz agarozni gel usled svoje kompaktne strukture, te putuje brže kroz gel i na gelu se uočava kao niža traka, dok forma II putuje sporije kroz gel i na gelu se uočava kao traka iznad superspiralizovane forme I. Male promene u tercijernoj strukturi DNK se mogu lako posmatrati na primeru plazmidne DNK, s obzirom da superhelična priroda plazmidne DNK verno oslikava određene forme unutarćelijske DNK, poput hromatina. Kako bi se dodatno ispitalo da li se istraživani rutenijumski kompleksi preferencijalno vezuju za mali ili veliki žljeb DNK, korišćene su dve probe koje omogućavaju identifikaciju potencijalnih mesta vezivanja kompleksa na superspiralizovanoj plazmidnoj DNK – 4',6-diamidino-2-fenilindol (eng. *4',6-diamidino-2-phenylindole*, DAPI), koji se vezuje za mali žljeb DNK (Tanious *et al.*, 1992) i metil zeleno (eng. *Methyl green*, MG), koji se vezuje za veliki žljeb DNK (Kim and Nordén, 1993). Cisplatina je korišćena kao referentno jedinjenje.

Štok rastvori ispitivanih rutenijumskih kompleksa i liganada su pripremljeni u DMSO (40 mM), neposredno pre upotrebe, i potom razblaženi 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl puferom (pH 7,2). Polazni štok cisplatine (3,33 mM) je serijski razblažen 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl puferom (pH 7,2) do

finalnih koncentracija: 12,5 μM , 25 μM , 50 μM i 100 μM . U prvom delu eksperimenta, 300 ng pHOT-1 plazmidne DNK (3,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) je inkubirano sa ispitivanim rutenijumskim kompleksima i ligandima (200 μM i 400 μM) ili cisplatinom tokom 24 h na 37 °C, u 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl puferu (pH 7,2). U drugom delu eksperimenta, 300 ng pHOT-1 plazmidne DNK (3,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) je prvo inkubirano sa 100 μM DAPI ili 100 μM MG tokom 60 minuta na 37 °C, u 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl puferu (pH 7,2), a potom su u tu reakcionu smešu dodati ispitivani rutenijum(II)-arenski kompleksi **K8-K11** (400 μM), i inkubacija je nastavljena još 23 h, na 37 °C. Nakon isteka inkubacije, uzorci su naneti na 0,8% agarozni gel, u kadici za elektroforezu sa 1xTBE puferom (Tris, borna kiselina i EDTA) (pH 8,0). U prvi bunarčić u nizu je naneto 2 μl markera (1 Kb DNA Ladder, kat. br. 15615-016, Invitrogen, SAD). U drugi bunarčić u nizu je dodata pHOT-1 plazmidna DNK (300 ng), pomešana sa bojom za vizuelizaciju uzoraka nanetih na gel, i predstavlja kontrolni uzorak. Boja se sastoji od mešavine bromfenol plavog i ksilen cijanola i glicerola u vodi (DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo Scientific, kat. br. R0611). U svaki naredni bunarčić u nizu, dodato je po 10 μl reakcione smeše svakog od ispitivanih uzoraka (rutenijumski kompleksi, ligandi ili cisplatina), prethodno pomešanih sa bojom za vizuelizaciju uzoraka. Elektroforeza je trajala 2 h, pri voltaži od 30 V. Po završetku elektroforeze, agarozni gel je potopljen u kadicu sa vodenim rastvorom GelRed boje (1:33000). Agarozni gel je bojen 1 h, u mraku, na sobnoj temperaturi, uz blago mešanje na šejkeru. Gel je potom vizuelizovan pod UV transiluminatorom. GelRed (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (10000x), kat. br. 41003, Biotium, SAD) je standardna boja za bojenje agaroznih gelova koja omogućava vizuelizaciju nukleinskih kiselina. Po strukturi je sličan EtBr, ali se smatra manje toksičnim. GelRed se vezuje za DNK putem interkalacije i vezivanja za mali žleb DNK (Anjomshoa and Torkzadeh-Mahani, 2016).

3.10. Ispitivanje aktivnosti rutenijum(II)-arenskog kompleksa na 3D model sistemu višćelijskih tumorskih sferoida

Primarna istraživanja aktivnosti potencijalnih antitumorskih lekova se obično sprovode na dvodimenzionalnom (2D) model sistemu, odnosno tumorskim ćelijskim linijama koje ne prikazuju najverodostojnije uslove *in vivo*, kao ni kompleksne interakcije između ćelija i komponenti vanćelijske sredine. Ćelije koje rastu kao 2D ćelijske kulture u monosloju se razlikuju kako morfološki, tako i metabolički od ćelija koje rastu u 3D okruženju. Dok su ćelije u 2D model sistemu uniformno izložene kiseoniku i nutrijentima, ćelije u 3D modelima su izložene gradijentu biohemijjskih signala. Višćelijski tumorski sferoidi predstavljaju heterogene ili homogene ćelijske agregate koji se mogu iskoristiti u istraživanjima kao 3D model koji oslikava svojstva solidnih tumora *in vitro*. Stoga je 3D model A375 ćelija uveden kako bi se ispitali efekti rutenijum(II)-arenskog kompleksa **K7** na vijabilitet pojedinačnih ćelija u sferoidu, kao i na kinetiku rasta sferoida, u poređenju sa cisplatinom, kao referentnim jedinjenjem.

A375 ćelije su zasađene u gustini od 1000 ćelija po bunarčiću, u 200 μl kompletnog RPMI medijuma, u slabo adherentnim mikrotitarskim pločama sa 96 bunarčića čije je dno u obliku slova „U“. Dno bunarčića je takvo da smanjuje sposobnost ćelija da adheriraju za plastiku i promoviše međućelijsku adheziju čime se formiraju sferoidi. Bunarčići su transparentni i omogućavaju posmatranje sferoida pod invertnim mikroskopom (Selby *et al.*, 2017). Nakon 72 h inkubacije ćelija u inkubatoru na 37 °C (vazduh zasićen parom, sa 5 % CO_2), ćelije spontano agregiraju na dnu slabo adherentnih bunarčića pod uticajem gravitacije. U svakom bunarčiću formirana je jedan višćelijski tumorski sferoid, prečnika približno 500 μm . Formiranje i rast sferoida su posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom (ZOE™ Fluorescent Cell Imager Bio-Rad Laboratories, Inc), opremljenim monohromatskom kamerom (12 bit CMOS, 5 MP), pri uveličanju objektiva 20x. Štok rastvor ispitivanog kompleksa **K7** je pripremljen u DMSO (10 mM), neposredno pre upotrebe.

Kako bi se ispitao uticaj kompleksa **K7** na preživljavanje ćelija u sferoidima, korišćen je MTT test. Medijum iz bunarčića sa sferoidima je nakon inkubacije pažljivo zamenjen sa 100 μl svežeg medijuma (za kontrolne bunarčiće) ili sa 100 μl medijuma u kome je serijski razblažen kompleks **K7** do finalnih koncentracija: 7,5 μM , 15 μM , 30 μM , 60 μM i 120 μM . Sferoidi su potom inkubirani naredna 72 h u inkubatoru na 37 °C (vazduh zasićen parom, sa 5 % CO_2). Nakon tretmana, svaki sferoid je

mehaničkim pokretima pipete razbijen na pojedinačne ćelije, i potom prebačen u bunarčić mikrotitarske ploče sa 96 bunarčića sa ravnim dnom. U bunarčiće je potom dodato po 20 μ l rastvora boje MTT (5 mg/ml u PBS, Sigma-Aldrich Co) i ploče su inkubirane naredna 4 h, u inkubatoru na 37 °C, u mraku. Nakon inkubacije, dodato je po 100 μ l 10% rastvora SDS po bunarčiću. Apsorbancije su očitane nakon 24 h, na čitaču mikrotitarskih ploča (Thermo Scientific Multiscan EX 200-240V) na 570 nm. Upotrebom Prism Graph Pad 6.0 softvera, konstruisana je kriva zavisnosti preživljavanja ćelija (%) od koncentracije ispitivane supstance, iz koje je određena IC₅₀ vrednost.

Uticaj kompleksa **K7** na rast i kompaktnost sferoida, kao i na vijabilitet pojedinačnih ćelija u sferoidu analiziran je na nivou svetlosne i fluorescentne mikroskopije, nakon bojenja sferoida kalcein-acetoksimetilestrom (kalcein-AM, Sigma-Aldrich Co) i PI. Metoda se zasniva na konverziji nefluorescentne boje kalcein-AM u zeleno fluorescirajući produkt kalcein pod uticajem unutarćelijskih esteraza, u živim ćelijama, što omogućava procenu ćelijskog vijabiliteta. Nakon formiranja, sferoidi su inkubirani sa kompleksom **K7** ili cisplatinom, u koncentraciji koja odgovara 3xIC₅₀ (47,4 μ M u slučaju **K7** i 22,5 μ M u slučaju cisplatine) i 10xIC₅₀ vrednostima (157,8 μ M u slučaju **K7** i 75,2 μ M u slučaju cisplatine), utvrđenih MTT testom na ćelijama u monosloju. Nakon 96 h inkubacije u inkubatoru na 37 °C (vazduh zasićen parom, sa 5 % CO₂), sferoidi su bojeni smešom kalcein-AM (4 mM) i PI (400 μ g/ml) pripremljenom u PBS, tokom 30 minuta, u mraku, na 37 °C. Finalna koncentracija kalcein-AM je bila 3 μ M, a finalna koncentracija PI 5 μ M. Odmah nakon toga, sferoidi su posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom (ZOE™ Fluorescent Cell Imager Bio-Rad Laboratories, Inc) opremljenim monohromatskom kamerom (12 bit CMOS, 5 MP), pri uveličanju objektiva 20x. Mikroskopska analiza sferoida pod dejstvom ispitivanih tretmana vršena je na nivou standardne *bright field* svetlosne mikroskopije, kao i na nivou fluorescentne mikroskopije, uz detekciju u zelenom i crvenom delu spectra. Reprezentativni sferoidi su slikani.

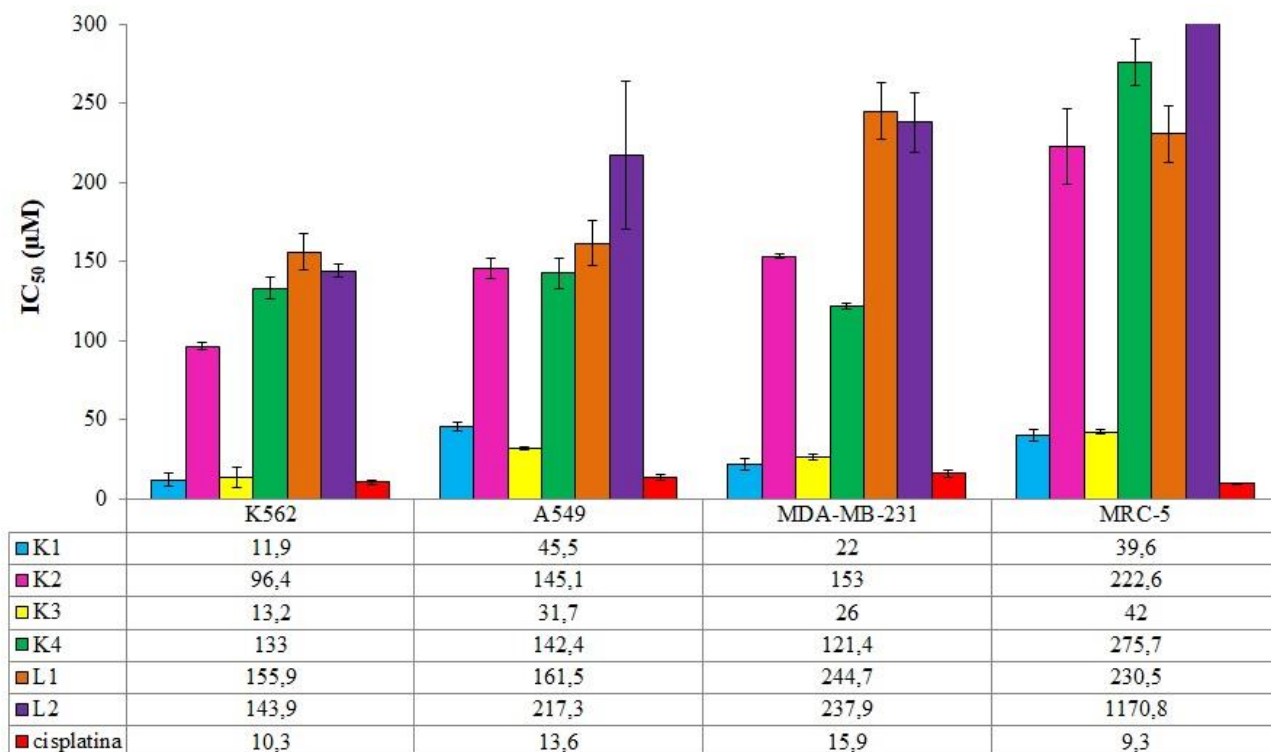
Ukratko, antiproliferativni potencijal rutenijum(II)-arenskih kompleksa **K1-K4** sa dva poznata NSAIL (indometacin (**L1**) i mefenaminska kiselina (**L2**)) je ispitan na humanim tumorskim ćelijama K562, A549 i MDA-MB-231 i normalnim (netumorskim) ćelijama MRC-5, primenom MTT testa. Kako bi se detaljnije ispitaio mehanizam dejstva kompleksa, analiziran je uticaj kompleksa na ćelijski ciklus i urađena je kvantitativna analiza apoptotskog potencijala kompleksa protočnom citofluorimetrijom. Akumulacija kompleksa unutar ćelija, lokalizacija u unutarćelijskim kompartmentima i sposobnost vezivanja za DNK su ispitani ICP-MS metodom. Antiproliferativni potencijal rutenijum(II)-arenskih kompleksa **K5-K7** sa polipiridinom (**L3**) i različitim arenskim ligandima (benzen, toluen ili cimen) je ispitan na humanim tumorskim ćelijama A549, A375, LS 174T, MCF-7 i MDA-MB-453 i normalnim (netumorskim) ćelijama MRC-5, u poređenju sa cisplatinom, upotrebom MTT testa. Kako bi se dobio bolji uvid u mehanizam aktivnosti ovakvog tipa rutenijumskih kompleksa, kao i u razlike u mehanizmu dejstva u odnosu na cisplatinu, ispitan je uticaj kompleksa na ćelijski ciklus, kao i apoptotski potencijal protočnom citofluorimetrijom. Unutarćelijska akumulacija i lokalizacija kompleksa u unutarćelijskim kompartmentima su ispitane ICP-MS metodom. Uticaj kompleksa na morfološki izgled ćelija, kao i aktivnost kompleksa na 3D modelu višćelijskih tumorskih sferoida su analizirani fluorescentnom mikroskopijom. Pri istraživanju antitumorskog potencijala rutenijum(II)-arenskih kompleksa **K8-K11** sa derivatima PARP inhibitora 3-AB *in vitro*, analiziran je inhibitorni potencijal kompleksa prema katalitičkoj aktivnosti PARP-1 enzima, upotrebom PARP kolorimetrijskog testa i antiproliferativni potencijal na humanim ćelijama kancera dojke koje su *BRC1*-mutirane (HCC1937), trostruko-negativne (MDA-MB-231, MDA-MB-453) ili hormon-zavisne (MCF-7, MDA-MB-361), kao i na normalnim (netumorskim) ćelijama BEAS-2B, upotrebom MTT testa. Kako bi se ispitaio mehanizam dejstva i potencijalne unutarćelijske mete, ispitan je uticaj kompleksa na ćelijski ciklus, interakcija i sposobnost vezivanja kompleksa za genomsku DNK ćelija i DNK plazmida u vanćelijskom sistemu, akumulacija kompleksa unutar ćelija i unutarćelijska lokalizacija u tretiranim ćelijama.

4. REZULTATI

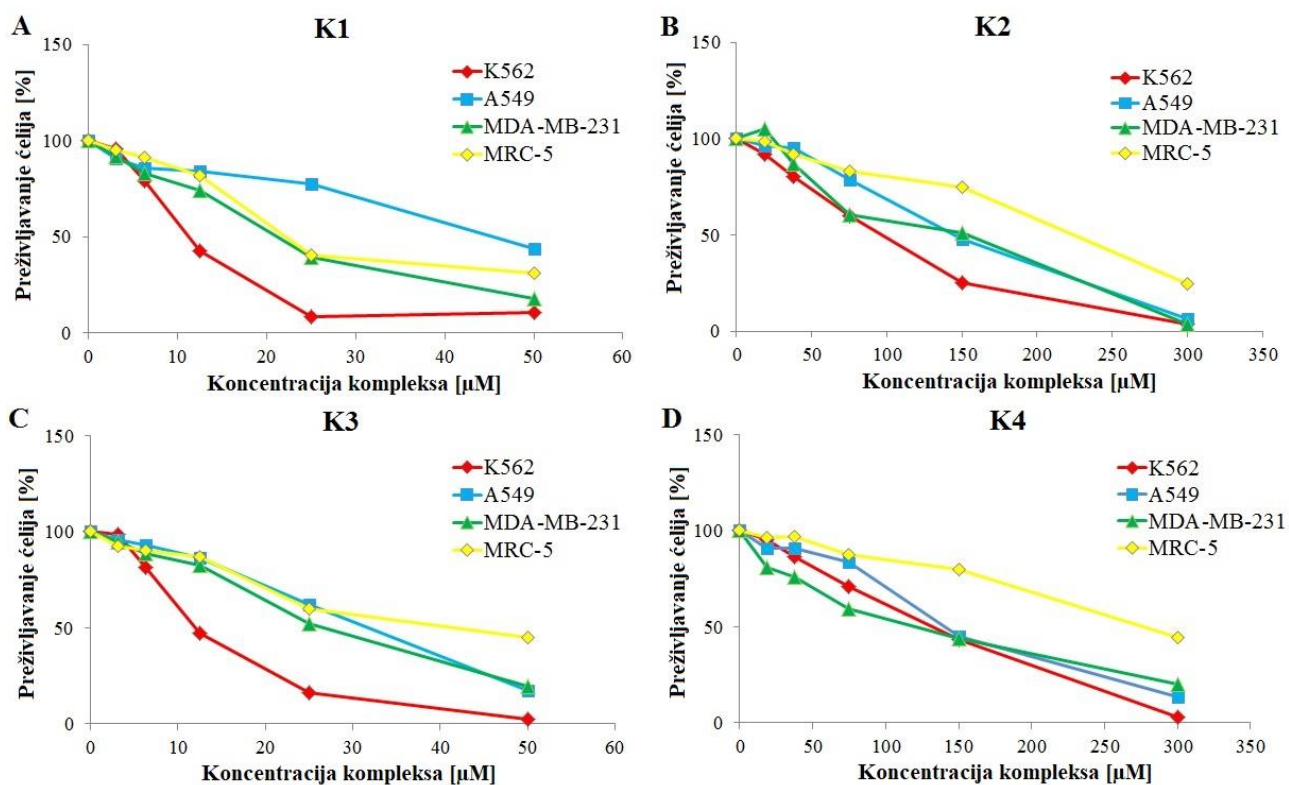
4.1. Rezultati ispitivanja antitumorskog potencijala rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa NSAIL (kompleksi K1-K4)

4.1.1. Antiproliferativni potencijal kompleksa K1-K4

Rutenijum(II)-arenski kompleksi **K1-K4** su ispoljili generalno veću antiproliferativnu aktivnost u poređenju sa indometacinom (**L1**) ili mefenaminskom kiselinom (**L2**), nakon 72 h kontinuiranog tretmana tumorskih ćelija K562, A549 i MDA-MB-231 i normalnih ćelija MRC-5. IC₅₀ vrednosti pomenutih kompleksa su u mikromolarnom opsegu od 11,9-275,7 μM, zavisno od ćelijske linije (Slika 19). Rezultati MTT testa pokazuju da kompleksi ispoljavaju koncentraciono-zavisnu antiproliferativnu aktivnost na svim testiranim ćelijskim linijama (Slika 20). Kompleksi **K1** i **K3**, sa analogom indolacetatne kiseline kao ligandom, su pokazali tri puta veći antiproliferativni potencijal u odnosu na komplekse **K2** i **K4**, na svim testiranim ćelijskim linijama. Ćelije hronične mijeloidne leukemije K562 su se pokazale kao najsenzitivnije na dejstvo kompleksa **K1** (IC₅₀=11,9±4,4 μM) i **K3** (IC₅₀=13,2±6,2 μM). Ove vrednosti su u nivou IC₅₀ vrednosti za cisplatinu (IC₅₀=10,3±1,2 μM), i primetno su niže od IC₅₀ vrednosti dobijenih za komplekse **K2** (IC₅₀=96,4±2,0 μM) i **K4** (IC₅₀=133±7,0 μM). Dodatno, MDA-MB-231 ćelije poreklom od adenokarcinoma dojke trostruko-negativnog tipa sa nedostatkom ER i PR receptora i bez prekomerne ekspresije HER2/neu receptora (Tabela 2), su ispoljile veću senzitivnost na dejstvo kompleksa **K1** (IC₅₀=22±3,6 μM) i **K3** (IC₅₀=26±1,7 μM) u odnosu na ćelije adenokarcinoma pluća A549, koje generalno karakteriše povećana rezistencija na tretman citotoksičnim agensima poput cisplatinu. Rezultati su pokazali izraženu selektivnost kompleksa **K1** i **K3** prema tumorskim ćelijama K562 i MDA-MB-231 u odnosu na zdrave ćelije fibroblasta pluća MRC-5 (Tabela 4). U odnosu na MRC-5, kompleksi **K1** i **K3** pokazuju 1,80 i 1,62 puta veću selektivnost prema MDA-MB-231 ćelijama.



Slika 19. Antiproliferativni potencijal ispitivanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa (**K1-K4**), liganada (**L1, L2**), kao i cisplatinu, na panelu ćelijskih linija, iskazan u obliku IC₅₀ vrednosti (μM±SD) dobijenih MTT testom nakon 72 h kontinuiranog tretmana



Slika 20. Reprezentativne krive preživljavanja K562, A549, MDA-MB-231 i MRC-5 ćelija nakon tretmana kompleksima (A) **K1**, (B) **K2**, (C) **K3** ili (D) **K4**

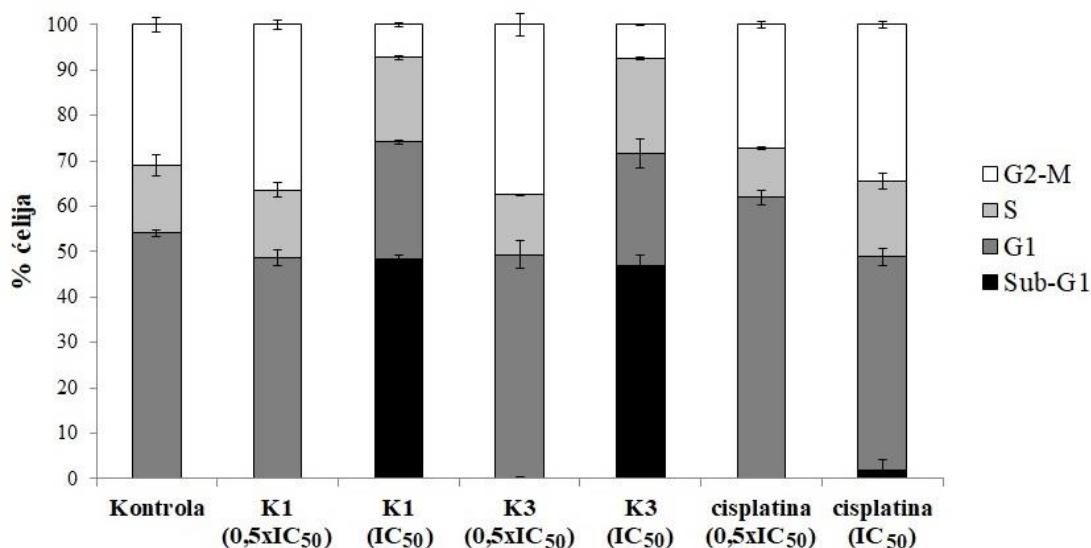
Tabela 4. Selektivnost ispitanih kompleksa (**K1-K4**), liganada (**L1, L2**), kao i cisplatine u antiproliferativnom dejstvu prema K562, A549 i MDA-MB-231 ćelijama u odnosu na normalne ćelije – fibroblaste pluća MRC-5, prikazana u obliku indeksa selektivnosti (SI)

Agens	*SI _{K562}	*SI _{A549}	*SI _{MDA-MB-231}
K1	3,33	0,87	1,80
K2	2,31	1,53	1,45
K3	3,18	1,32	1,62
K4	2,07	1,94	2,27
L1	1,48	1,43	0,94
L2	>2,08	>1,38	>1,26
cisplatina	0,90	0,68	0,58

Rezultati MTT testa ukazuju na to da se iz ispitivane grupe novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa ligandima na bazi NSAIL po svojoj aktivnosti na svim testiranim ćelijskim linijama kao vodeća jedinjenja izdvajaju kompleksi **K1** i **K3** sa indometacinom. Dalje istraživanje je usmereno na izučavanje molekularnih mehanizama antiproliferativnog dejstva ova dva kompleksa na MDA-MB-231 ćelijama humanog trostruko-negativnog karcinoma dojke koje su pokazale najizraženiju senzitivnost u odnosu na druge ćelijske linije korišćene u ovoj studiji.

4.1.2. Uticaj kompleksa K1 i K3 na distribuciju MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

Rezultati sortiranja ćelija na osnovu faza ćelijskog ciklusa su pokazali da pri koncentraciji od $0,5 \times IC_{50}$, kompleksi **K1** i **K3** utiču na ćelijski ciklus MDA-MB-231 ćelija, dovodeći do blagog povećanja procenta ćelija zaustavljenih u G2-M kontrolnoj tački (34,13% (**K1**) i 35,21% (**K3**), u poređenju sa 29,37% u kontroli), uz istovremeno smanjenje procenta ćelija zaustavljenih u G1 fazi (Slika 21). Promene u zastupljenosti ćelija u pojedinačnim fazama ćelijskog ciklusa su još uočljivije pri višoj koncentraciji kompleksa (IC_{50}). Nastale promene karakteriše primetan porast procenta Sub-G1 populacije ćelija (do 48,50% (**K1**) i 47,09% (**K3**), u poređenju sa kontrolom, 0,03%). Formirani Sub-G1 pik potiče od populacije ćelija sa fragmentisanim DNK molekulima koje su ušle u apoptozu. Istovremeno, dolazi do porasta udela ćelija zaustavljenih u S fazi (18,66% (**K1**) i 20,95% (**K3**), u poređenju sa 14,24% u kontroli), što je praćeno smanjenjem procenta G1 i G2-M populacije ćelija. Cisplatinu je ispoljila drugačije efekte na ćelijski ciklus MDA-MB-231 ćelija u odnosu na komplekse **K1** i **K3**. Pri nižoj koncentraciji ($0,5 \times IC_{50}$), cisplatinu dovodi do povećanja procenta ćelija zaustavljenih u G1 fazi, dok sa povišenjem koncentracije cisplatine (IC_{50}), raste udeo ćelija zaustavljenih u G2-M kontrolnoj tački.

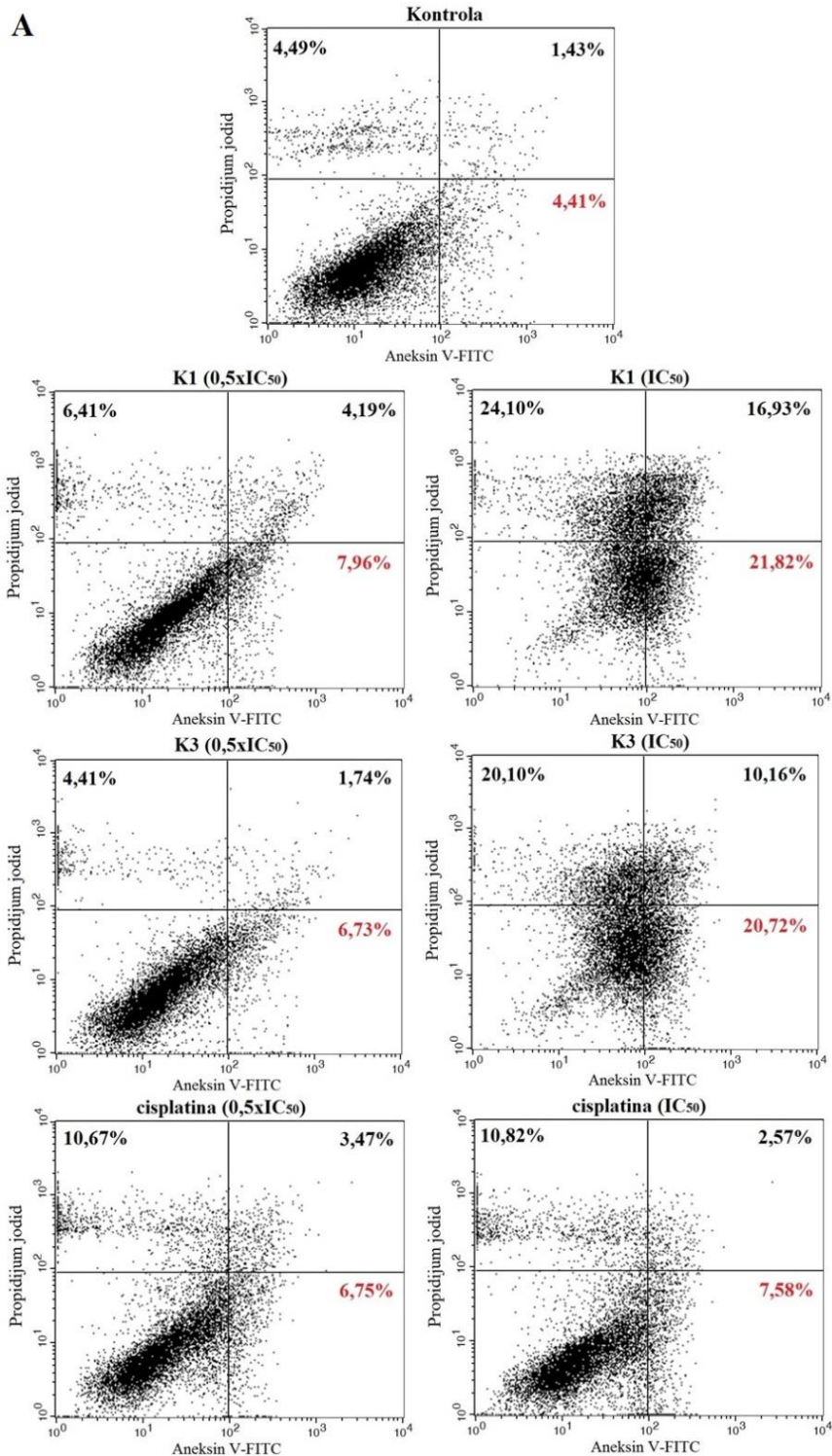


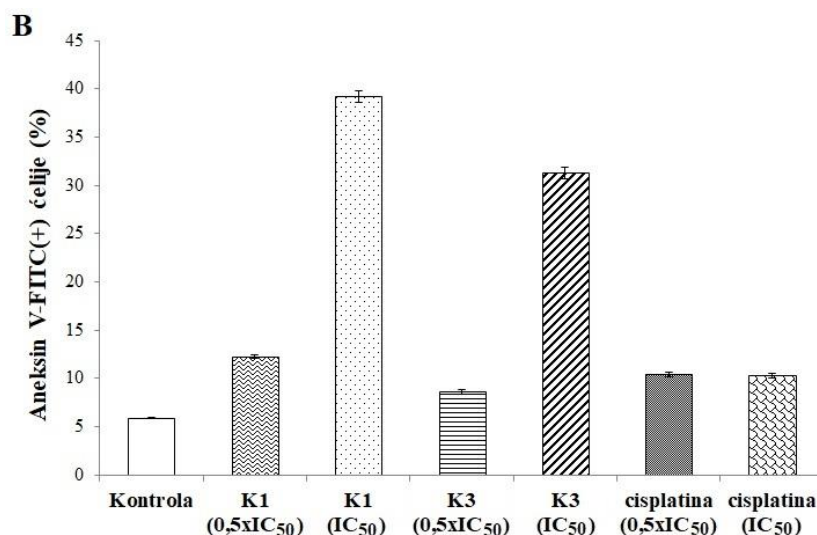
Slika 21. Sortiranje MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h kontinuiranog tretmana kompleksima **K1** i **K3** ili cisplatinom u koncentracijama jednakim $0,5 \times IC_{50}$ i IC_{50} . Prikazane su srednje vrednosti $\pm SD$ dobijene izvođenjem tri nezavisna eksperimenta

4.1.3. Apoptotski potencijal kompleksa K1 i K3 u MDA-MB-231 ćelijama

Apoptotski potencijal kompleksa **K1** i **K3** na MDA-MB-231 ćelijama je ispitivan dvojnim bojenjem ćelija aneksin V-FITC/PI i analizom na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani na Slici 22A u vidu tačkastih (eng. *Dot plot*) dijagrama. Iz rezultata se uočava da i ispitivani rutenijumski kompleksi i cisplatinu indukuju apoptozu MDA-MB-231 ćelija na koncentraciono-zavisnan način. Kompleksi **K1** i **K3** nakon 24 h tretmana pokazuju sličan potencijal indukcije apoptoze i sposobnost da uvedu MDA-MB-231 ćelije u ranu fazu apoptoze, što potvrđuje rezultate analize distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Pri koncentraciji od $0,5 \times IC_{50}$, kompleksi **K1** i **K3** dovode do porasta brojnosti rano-apoptotskih ćelija (7,96% odnosno 6,73%), u sličnom nivou kao i cisplatinu (6,75%). Viša koncentracija kompleksa (IC_{50}) uzrokuje primetno povećanje brojnosti Aneksin V-FITC(+)/PI(-) ćelija (preko 20% ćelija), što je čak tri puta više u odnosu na efekte cisplatine. Dodatno, tretman kompleksima **K1** i **K3** je doveo i do koncentraciono-zavisnog porasta brojnosti ćelija u kasnoj fazi apoptoze/nekrozi. Procenat ćelija detektovan u Aneksin V-FITC(+)/PI(+) regionu nakon tretmana IC_{50} koncentracijama je iznosio 16,93% (**K1**) i 10,16% (**K3**), u poređenju sa 1,43% u kontroli. Ukupan procenat Aneksin V-FITC(+) ćelija (rano-apoptotskih i kasno-apoptotskih/nekrotskih) je nakon

tretmana kompleksima iznosio $39,21 \pm 0,64\%$ (**K1**) i $31,32 \pm 0,62\%$ (**K3**) (Slika 22B). Tretman kompleksima **K1** i **K3** dovodi i do uočljivog porasta udela Aneksin V-FITC(-)/PI(-) ćelija (24,10% odnosno 20,10%), u odnosu na 4,49% u kontroli i 10,82% nakon tretmana cisplatinom.

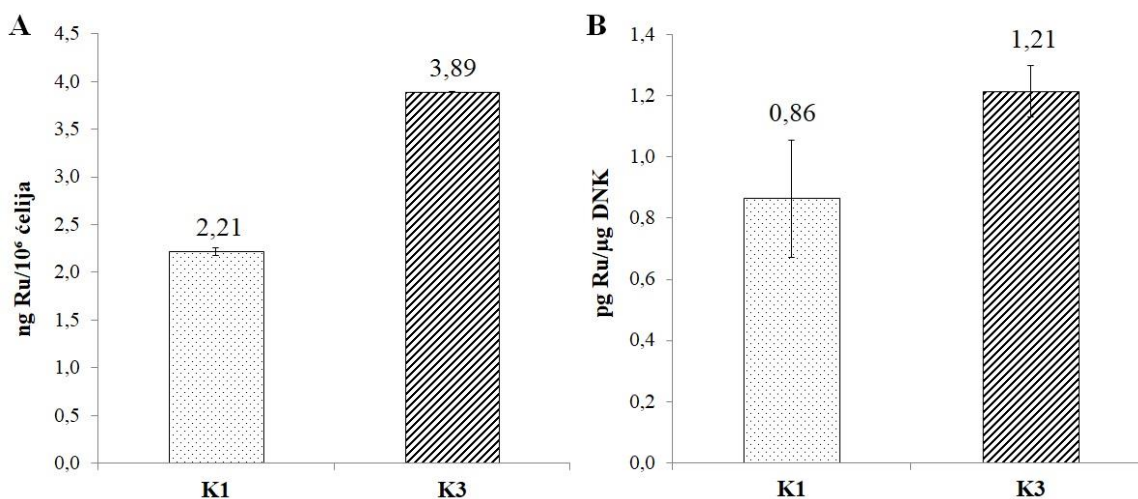


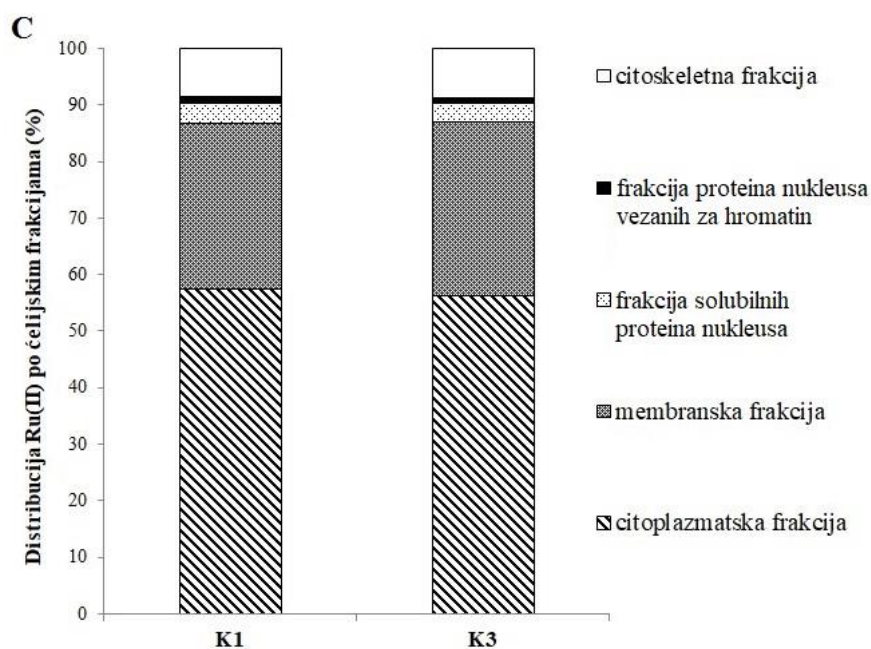


Slika 22. (A) Reprezentativni tačkasti dijagrami distribucije MDA-MB-231 ćelija nakon bojenja aneksin V-FITC/PI, na nivou protočne citofluorimetrije. Ćelije su tretirane 24 h kompleksima **K1** i **K3** ili cisplatinom u koncentracijama jednakim $0,5xIC_{50}$ i IC_{50} . Procentualno je prikazan udeo rano-apoptotskih ćelija (Aneksin V-FITC(+)/PI(-)), kasno-apoptotskih/nekrotskih ćelija (Aneksin V-FITC(+)/PI(+)) i mrtvih ćelija (Aneksin V-FITC(-)/PI(+)). (B) Kvantitativni prikaz ukupnih Aneksin V-FITC(+) (rano-apoptotskih i kasno-apoptotskih/nekrotskih) MDA-MB-231 ćelija nakon tretmana kompleksima **K1** i **K3** ili cisplatinom

4.1.4. Unutarćelijska akumulacija i lokalizacija kompleksa **K1** i **K3** u MDA-MB-231 ćelijama

Rezultati merenja ukupne akumulacije Ru(II) u MDA-MB-231 ćelijama nakon tretmana kompleksima **K1** i **K3** aplikovanim u subtoksičnim koncentracijama ($10 \mu\text{M}$) ukazuju da su oba kompleksa prisutna unutar ćelija nakon 24 h tretmana, ali da je nivo akumulacije ova dva kompleksa različit. Kompleks **K1** je detektovan u koncentraciji od $2,21 \pm 0,04 \text{ ng Ru}/10^6$ ćelija, a kompleks **K3** u koncentraciji od $3,89 \pm 0,01 \text{ ng Ru}/10^6$ ćelija (Slika 23A). Kompleks **K3** je takođe, pokazao i veći afinitet za vezivanje za DNK, s obzirom da je detektovan u DNK frakciji u koncentraciji od $1,21 \pm 0,08 \text{ pg Ru}/\mu\text{g DNK}$, za razliku od kompleksa **K1** koji je detektovan u koncentraciji od $0,86 \pm 0,19 \text{ pg Ru}/\mu\text{g DNK}$ (Slika 23B). Uvidom u distribuciju kompleksa nakon razdvajanja proteinskih frakcija iz unutarćelijskih kompartmenata, može se uočiti da kompleksi **K1** i **K3** pokazuju isti obrazac unutarćelijske lokalizacije (Slika 23C). Raspodela Ru(II) poreklom iz kompleksa po ćelijskim kompartmentima je sledeća: citoplazma > ćelijska membrana i membrane organela > citoskelet > nukleus (Tabela 5).





Slika 23. Kvantitativni prikaz (A) ukupne unutarćelijske akumulacije (ng Ru/10⁶ ćelija), (B) akumulacije u DNK frakciji (pg Ru/μg DNK), kao i (C) distribucije po ćelijskim kompartmentima (iskazano u % raspodele po proteinskim frakcijama) Ru(II) nakon tretmana MDA-MB-231 ćelija kompleksima **K1** i **K3**. Rezultati pod A i B su prikazani u obliku srednjih vrednosti ±SD

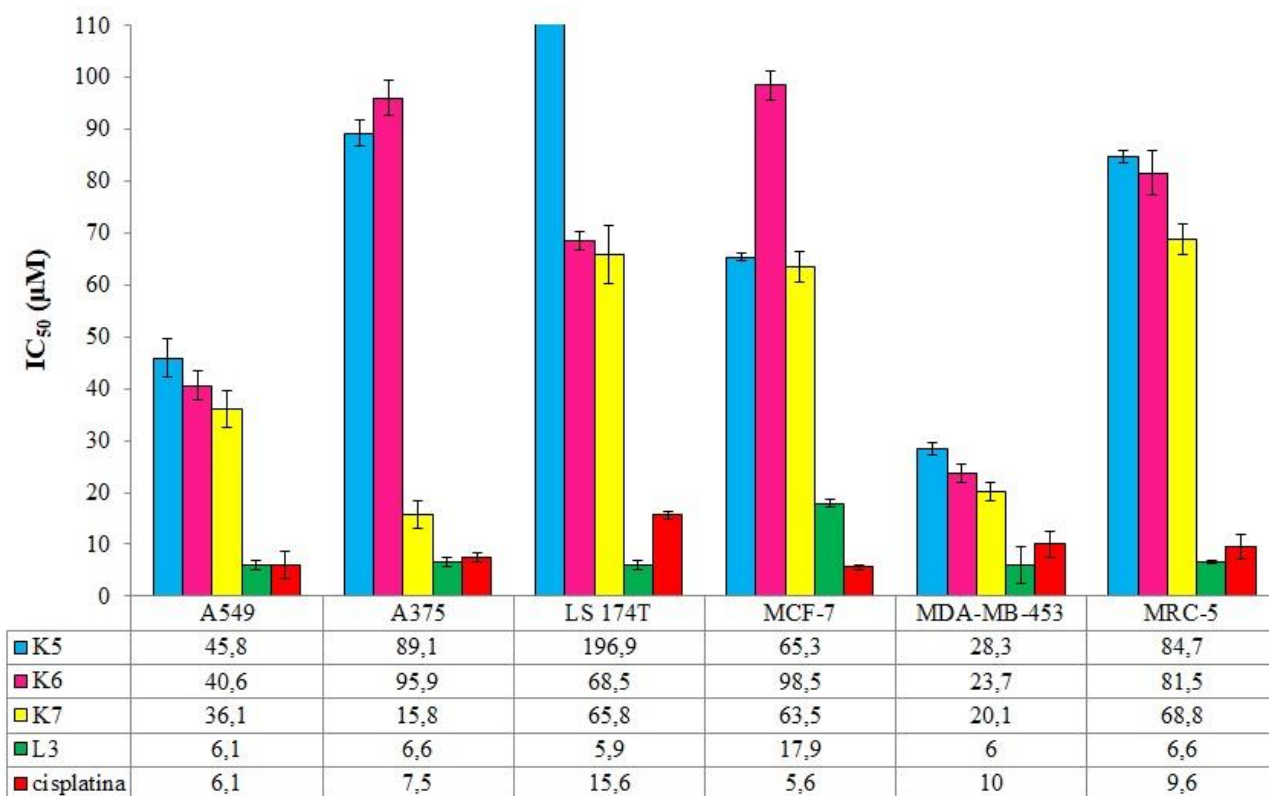
Tabela 5. Raspodela Ru(II) po unutarćelijskim proteinskim frakcijama nakon tretmana MDA-MB-231 ćelija kompleksima **K1** i **K3**

Unutarćelijska proteinska frakcija (%)	K1	K3
Citoplazmatska frakcija	57,3	56,1
Membranska frakcija	29,3	30,7
Frakcija solubilnih proteina nukleusa	3,6	3,3
Frakcija proteina nukleusa vezanih za hromatin	1,1	1,0
Citoskeletna frakcija	8,6	8,9

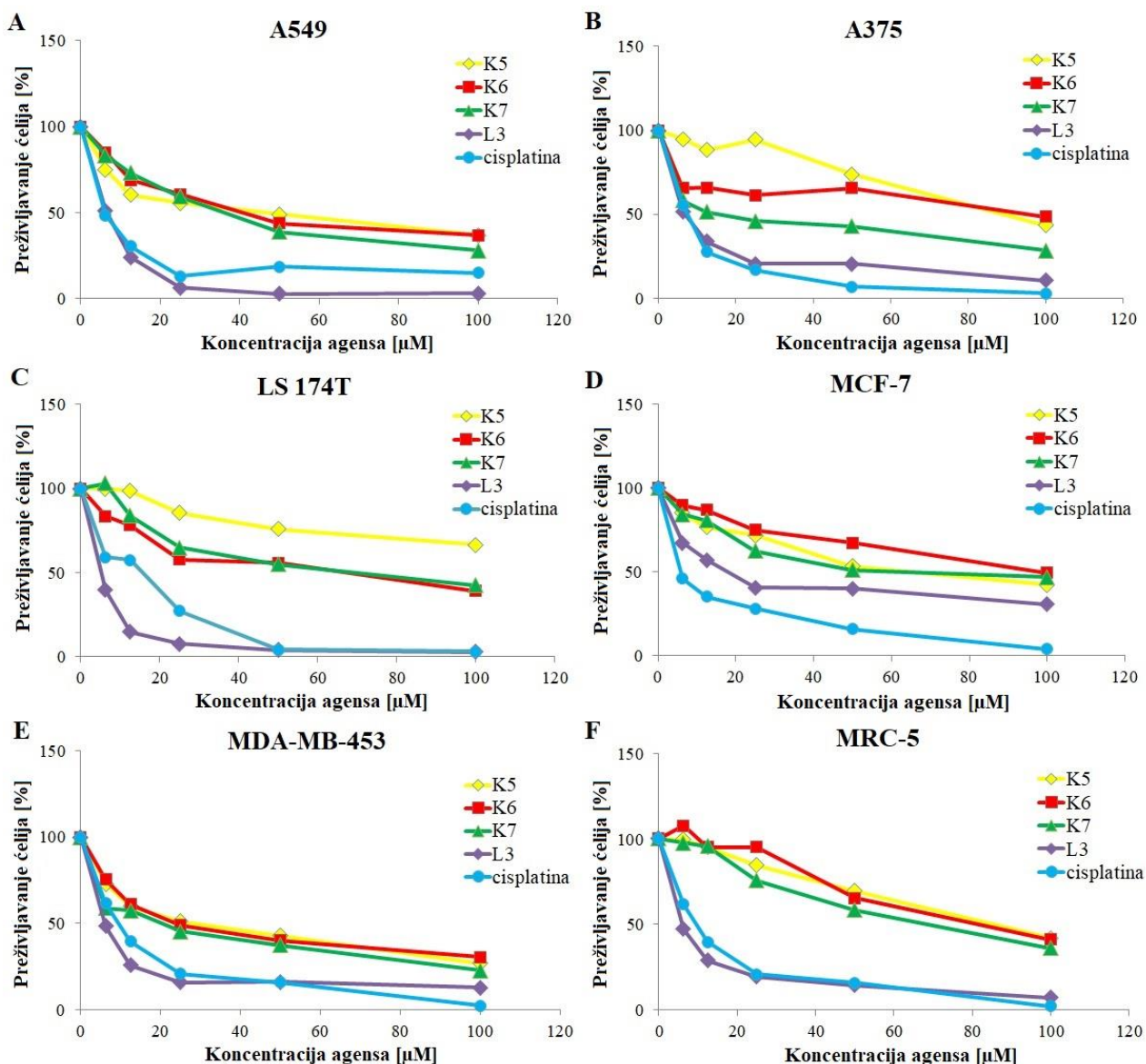
4.2. Rezultati ispitivanja antitumorskog potencijala rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa polipiridinom (kompleksi K5-K7)

4.2.1. Antiproliferativni potencijal kompleksa K5-K7

Rezultati ispitivanja antiproliferativne aktivnosti rutenijum(II) kompleksa sa različitim arenskim ligandima (benzen – **K5**, toluen – **K6** ili cimen – **K7**) i polipiridinskim ligandom (**L3**), su pokazali da se nakon 72 h kontinuiranog tretmana humanih tumorskih ćelija različitog porekla, IC_{50} vrednosti kreću u mikromolarnom opsegu od 15,8-98,5 μM , izuzev kompleksa **K5** koji se pokazao kao neaktivan na ćelijama adenokarcinoma debelog creva LS 174T ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$) (Slika 24). Ćelije adenokarcinoma dojke MDA-MB-453 su pokazale najveću senzitivnost na komplekse **K5-K7**, sa IC_{50} vrednostima nešto iznad 20 μM , za sva tri kompleksa. U okviru svake testirane ćelijske linije, kompleksi **K5-K7** su pokazali generalno ujednačenu aktivnost (Slika 25). Izuzetak su pokazale ćelije humanog malignog melanoma A375, koje su ispoljile najveću senzitivnost na dejstvo kompleksa **K7** ($IC_{50} = 15,8 \pm 2,7 \mu\text{M}$). Kompleks **K7** je pokazao približno šest puta veću aktivnost u odnosu na komplekse **K5** i **K6**, i čak 4,35 puta veću selektivnost u dejstvu prema A375 ćelijama u odnosu na normalne MRC-5 ćelije (Tabela 6). Polipiridinski ligand (**L3**) je, sa druge strane, pokazao ujednačenu i visoku citotoksičnost prema svim tretiranim ćelijskim linijama, sa IC_{50} vrednošću oko 6 μM (izuzev na MCF-7 ćelijama koje su se pokazale nešto rezistentnijim na dejstvo liganda), što je u nivou IC_{50} vrednosti koje su dobijene za cisplatinu.



Slika 24. Antiproliferativni potencijal ispitivanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa (**K5-K7**), liganda (**L3**), kao i cisplatinu, na panelu ćelijskih linija, iskazan u obliku IC_{50} vrednosti ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$) dobijenih MTT testom nakon 72 h kontinuiranog tretmana



Slika 25. Reprezentativne krive preživljavanja (A) A549, (B) A375, (C) LS 174T, (D) MCF-7, (E) MDA-MB-453 i (F) MRC-5 ćelija nakon tretmana kompleksima **K5-K7**, ligandom **L3** ili cisplatinom

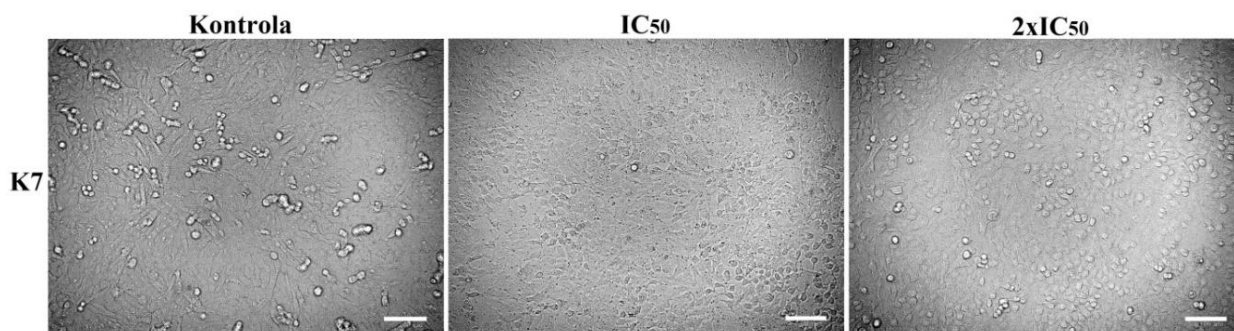
Tabela 6. Selektivnost ispitivanih kompleksa (**K5-K7**), liganda (**L3**) kao i cisplatinu u antiproliferativnom dejstvu prema A549, A375, LS 174T, MCF-7 i MDA-MB-453 ćelijama u odnosu na normalne ćelije – fibroblaste pluća MRC-5, prikazana u obliku indeksa selektivnosti (SI)

Agens	*SI _{A549}	*SI _{A375}	*SI _{LS 174T}	*SI _{MCF-7}	*SI _{MDA-MB-453}
K5	1,85	0,95	<0,84	1,29	2,99
K6	2	0,85	1,19	0,83	3,43
K7	1,9	4,35	1,05	1,08	3,42
L3	1,08	1	1,12	0,37	1,1
cisplatin	1,56	1,27	0,6	1,69	0,95

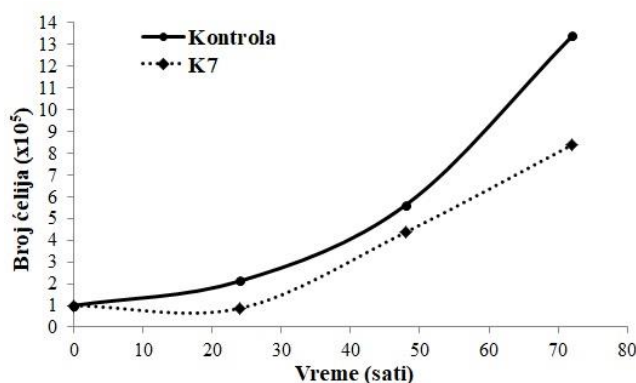
Rezultati MTT testa ukazuju na to da se iz ispitivane serije novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa polipiridinom kao ligandom po svojoj aktivnosti na svim testiranim ćelijskim linijama izdvaja kompleks **K7** kao vodeće jedinjenje. Može se zaključiti da aktivnost kompleksa **K5-K7**

zavisi od tipa η^6 -arenskog liganda pridruženog rutenijumu, i s tim u vezi, pokazalo se da je rutenijumski kompleks sa *p*-cimenom (**K7**) aktivniji od kompleksa sa benzenom (**K5**) ili toluenom (**K6**). Dalje istraživanje je usmereno na izučavanje molekulskih mehanizama antiproliferativnog dejstva kompleksa **K7** na A375 ćelijama humanog malignog melanoma koje su ispoljile najveću senzitivnost u odnosu na druge ćelijske linije korišćene u ovoj studiji.

Mikroskopska analiza A375 ćelija je pokazala da nakon tretmana kompleksom **K7** u trajanju od 72 h, pri koncentracijama koje odgovaraju IC_{50} (15,8 μM) i $2xIC_{50}$ (31,6 μM), morfologija ćelija ostaje očuvana i kompleks ne dovodi do uočljivog smanjenja gustine ćelija u odnosu na gustinu netretiranih ćelija, što nije u saglasnosti sa rezultatima MTT testa nakon tretmana istim koncentracijama kompleksa **K7** (Slika 26). Kako bi se ispitao vijabilitet A375 ćelija (uzimajući u obzir integritet ćelijske membrane) u prisustvu kompleksa **K7**, i dobijeni rezultati uporedili sa rezultatima metaboličkog MTT testa, ćelije su podvrgnute tripan plavo testu nakon 24 h, 48 h i 72 h kontinuirane inkubacije sa **K7** (IC_{50}). Broj živih i mrtvih ćelija u tretiranoj populaciji ćelija u poređenju sa netretiranim ćelijama je procenjen vizualno i određen kvantitativno, upotrebom svetlosne mikroskopije, a krive rasta ćelijske populacije su dobijene na osnovu brojnosti vijabilnih ćelija u ispitivanoj ćelijskoj populaciji. Rezultati su potvrdili da A375 ćelije zadržavaju sposobnost da se dele i rastu u prisustvu kompleksa **K7**, ali da je vreme potrebno za dupliranje broja ćelija produženo u prisustvu **K7** na 34 h, u poređenju sa 22 h kod netretiranih ćelija (Slika 27).



Slika 26. Mikrografije A375 kontrolnih ćelija i ćelija tretiranih kompleksom **K7** tokom 72 h u koncentracijama koje odgovaraju IC_{50} i $2xIC_{50}$ vrednostima. Uveliĉanje: 20x, skala: 100 μm

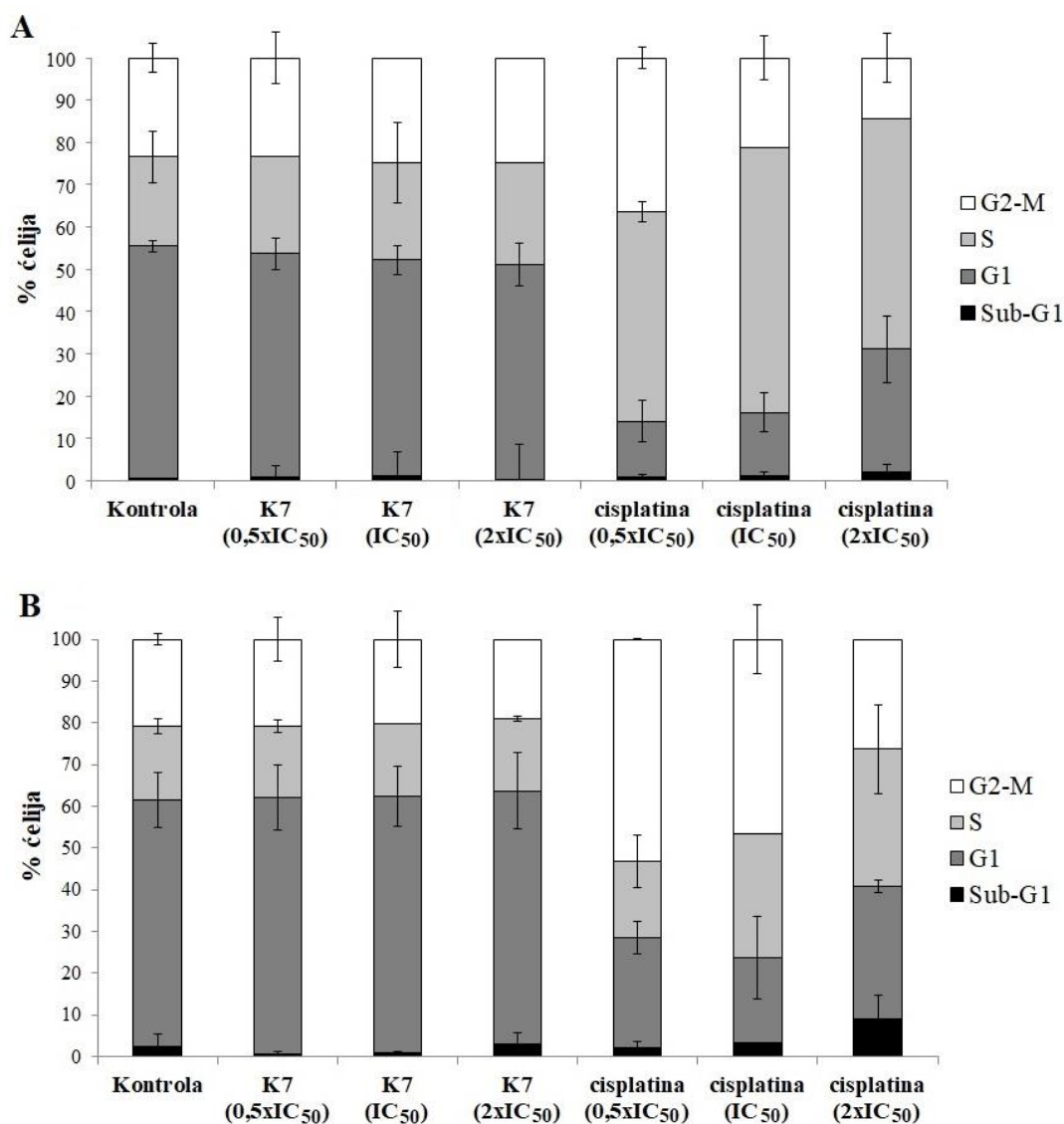


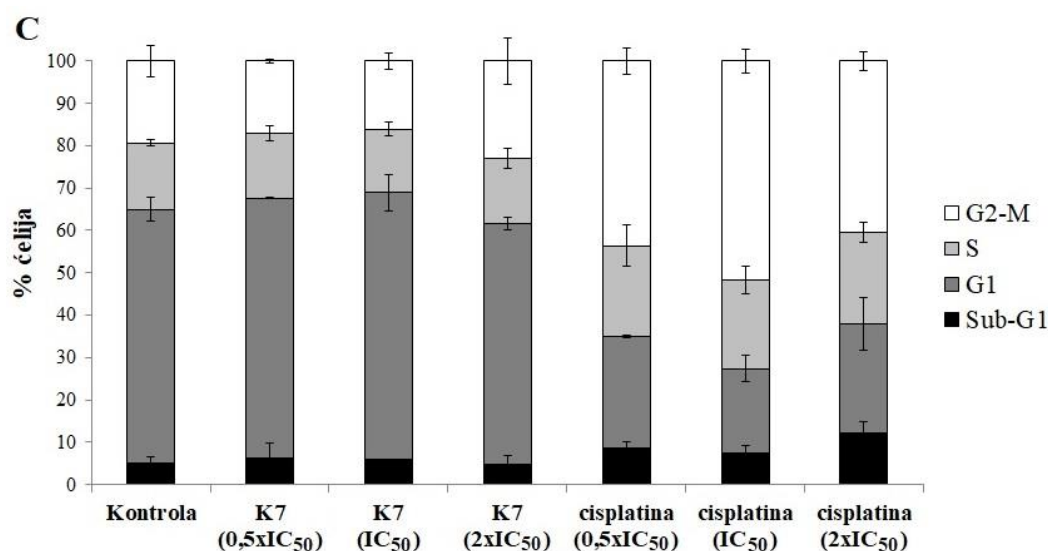
Slika 27. Reprezentativne krive rasta netretiranih (kontrola) i A375 ćelija inkubiranih tokom 72 h u prisustvu kompleksa **K7** (IC_{50})

4.2.2. Uticaj kompleksa **K7** na distribuciju A375 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

Rezultati sortiranja ćelija po fazama ćelijskog ciklusa su pokazali da povišenje koncentracije kompleksa **K7** (do $2xIC_{50}$), kao i produženje vremena inkubacije ćelija (do 72 h) sa kompleksom ne dovode do većih promena u distribuciji A375 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, kada se uporede sa kontrolnom ćelijskom populacijom (Slika 28). Nakon 72 h tretmana kompleksom **K7** ($2xIC_{50}$) uočava se tek neznatni porast u brojnosti ćelija zaustavljenih u G2-M kontrolnoj tački (do 22,86%, u poređenju sa

19,08% u kontroli) (Slika 28C). Ovakvi rezultati ukazuju da kompleks **K7** pod ispitivanim uslovima ne interferira sa ćelijskim ciklusom A375 ćelija. Sa druge strane, cisplatina je pokazala sposobnost da utiče na progresiju A375 ćelija kroz faze ćelijskog ciklusa na koncentraciono- i vremenski-zavisan način. Nakon 24 h tretmana, cisplatina je indukovala primetno povećanje procenta ćelija zaustavljenih u S fazi (do 48,02% ($0,5xIC_{50}$), 61,18% (IC_{50}) i 59,38% ($2xIC_{50}$), u poređenju sa 20,97% u kontroli) (Slika 28A). Duži tretman cisplatinom (48 h) izazvao je dalje promene u distribuciji A375 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, uočene kao smanjenje procenta ćelija zaustavljenih u S fazi i posledično povećanje udela ćelija zaustavljenih u G2-M kontrolnoj tački (Slika 28B). Tretman cisplatinom u trajanju od 72 h doveo je do još većeg nakupljanja G2-M ćelijske populacije (do 42,05% ($0,5xIC_{50}$), 49,75% (IC_{50}) i 39,03% ($2xIC_{50}$), u poređenju sa 19,08% u kontroli), kao i do koncentraciono-zavisnog povećanja Sub-G1 populacije ćelija (do 8,37% ($0,5xIC_{50}$), 7,26% (IC_{50}) i 11,75% ($2xIC_{50}$), u poređenju sa 5,09% u kontroli) (Slika 28C).



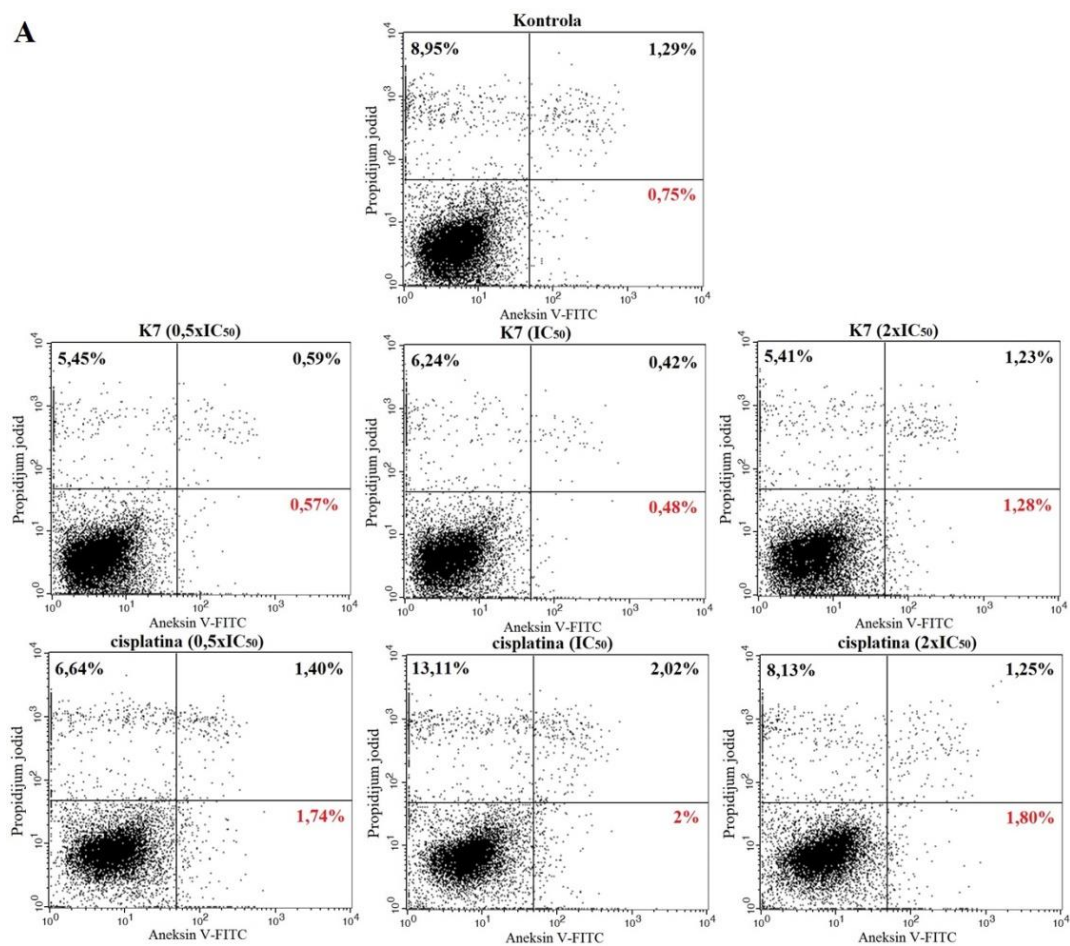


Slika 28. Sortiranje A375 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon (A) 24 h, (B) 48 h i (C) 72 h kontinuiranog tretmana kompleksom **K7** ili cisplatinom u koncentracijama jednakim 0,5xIC₅₀, IC₅₀ i 2xIC₅₀. Prikazane su srednje vrednosti ±SD dobijene izvođenjem tri nezavisna eksperimenta

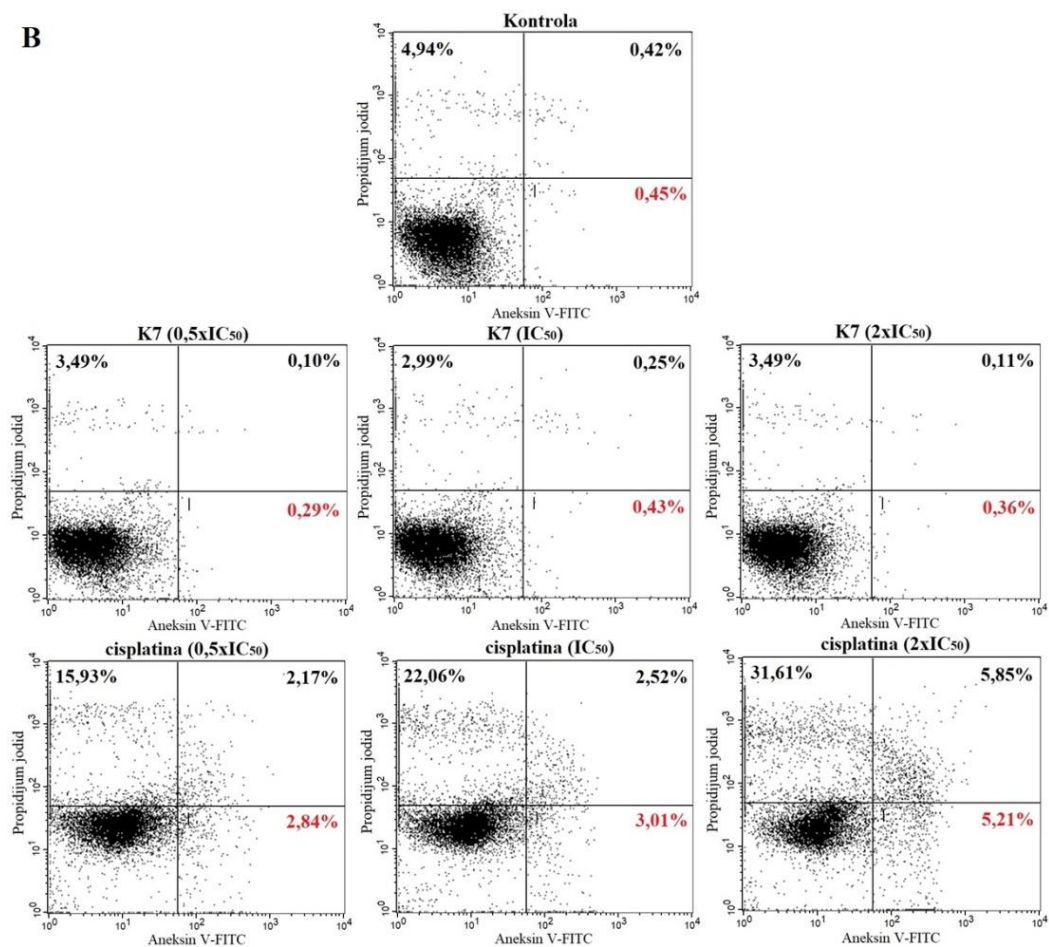
4.2.3. Apoptotski potencijal kompleksa **K7** u A375 ćelijama

Rezultati bojenja A375 ćelija aneksin V-FITC/PI analizirani protočnom citofluorimetrijom nakon tretmana ćelija kompleksom **K7** (0,5xIC₅₀, IC₅₀ i 2xIC₅₀) tokom 24 h i 48 h su pokazali da za navedeno vreme trajanja tretmana kompleks nije doveo do stimulacije ćelijske smrti po tipu apoptoze. Na Slici 29 se uočava da tek pri višoj koncentraciji **K7** (2xIC₅₀) dolazi do neznatnog povećanja procenta ćelija u Aneksin V-FITC(+)/PI(-) regionu (24 h), dok ova pojava nije uočena pri produženom tretmanu (48 h). Tretman A375 ćelija cisplatinom je, sa druge strane, doveo do koncentraciono- i vremenski-zavisnog povećanja udela ćelija u ranoj fazi apoptoze. Dodatno, cisplatina je uzrokovala i porast u procentu kasno-apoptotskih/nekrotskih ćelija nakon 48 h tretmana, pri čemu se znatna populacija ćelija pozicionira i u Aneksin V-FITC(-)/PI(+) regionu, karakterističnom za mrtve/oštećene ćelije sa degradovanim biomolekulima, što ide u prilog visokoj citotoksičnoj aktivnosti cisplatine u A375 ćelijama.

A



B



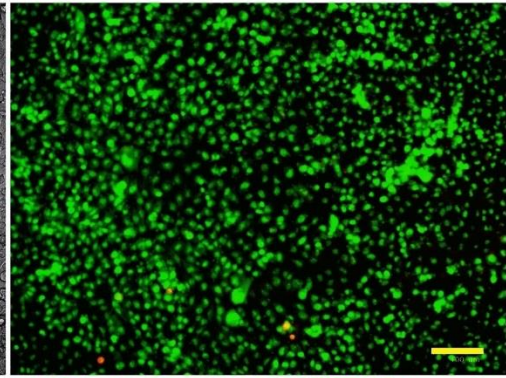
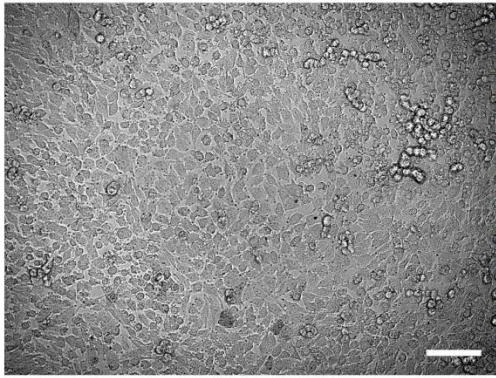
Slika 29. Reprezentativni tačkasti dijagrami distribucije A375 ćelija nakon bojenja aneksin V-FITC/PI, na nivou protočne citofluorimetrije. Ćelije su tretirane (A) 24 h i (B) 48 h kompleksom **K7** ili cisplatinom u koncentracijama jednakim $0,5xIC_{50}$, IC_{50} i $2xIC_{50}$. Procentualno je prikazan udeo rano-apoptotskih ćelija (Aneksin V-FITC(+)/PI(-)), kasno-apoptotskih/nekrotskih ćelija (Aneksin V-FITC(+)/PI(+)) i mrtvih ćelija (Aneksin V-FITC(-)/PI(+))

4.2.4. Mikroskopska analiza A375 ćelija tretiranih kompleksom **K7**

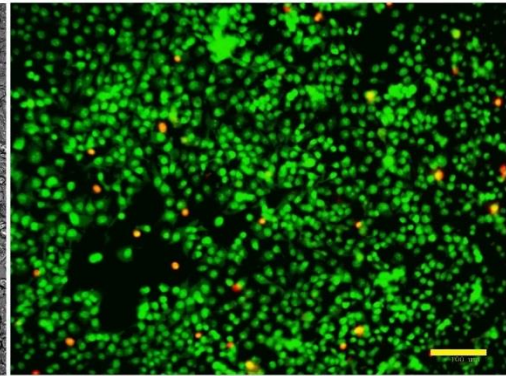
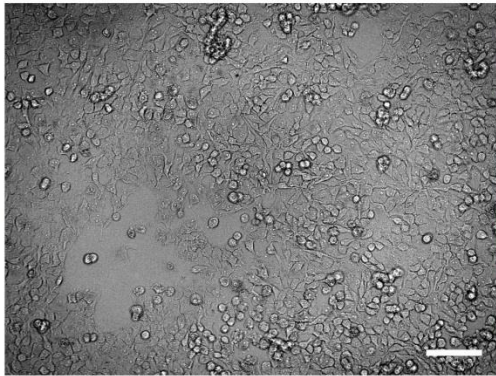
Mikroskopska analiza A375 ćelija nakon dvojnog bojenja AO/EtBr je pokazala da su u kontrolnoj (netretiranoj) populaciji ćelije guste, poligonalnog oblika i uglavnom vijabilne, o čemu svedoči obojenost samo AO (Slika 30A). Nakon 72 h tretmana kompleksom **K7** (IC_{50}), uočava se da dolazi do neznatnog koncentraciono-zavisnog smanjenja broja ćelija, ćelije dobijaju sferan oblik, dok su nukleusi i dalje uglavnom obojeni samo AO. Raskidanje međućelijskih veza, dalje smanjenje gustine ćelija i povećanje procenta ćelija sa EtBr u nukleusu (narandžast/crveni signal), sa ili bez kondenzacije hromatina, se uočavaju sa povišenjem koncentracije **K7** ($2xIC_{50}$). Ipak, drugi morfološki pokazatelji apoptoze, poput pojave mehurova na ćelijskoj membrani i apoptotskih tela, nisu uočeni. Sa druge strane, A375 ćelije tretirane nižom koncentracijom cisplatine (IC_{50}) počinju da gube normalan morfološki izgled, dolazi do redukcije broja ćelija i raskidanja međućelijskih veza i među vijabilnim (AO(+)/EtBr(-)) ćelijama, a ćelije su većinom sfernog oblika. Istovremeno, dolazi do primetne pojave pojedinačnih, krupnijih ćelija sa dugačkim ćelijskim nastavcima koji se pružaju u svim pravcima i daju ćelijama zvezdast oblik (Slika 30B). Predominantno se uočavaju ćelije u ranoj fazi apoptoze, sa očuvanom ćelijskom membranom i kondenzovanim hromatinom (obojenost samo AO), uz pojavu pojedinačnih ćelija sa EtBr u nukleusima (ćelije u kasnoj fazi apoptoze). Sa povišenjem koncentracije cisplatine ($2xIC_{50}$) uočava se pojava znatno krupnijih ćelija sa EtBr u nukleusima (crveni signal; ćelije u nekrozi).

A

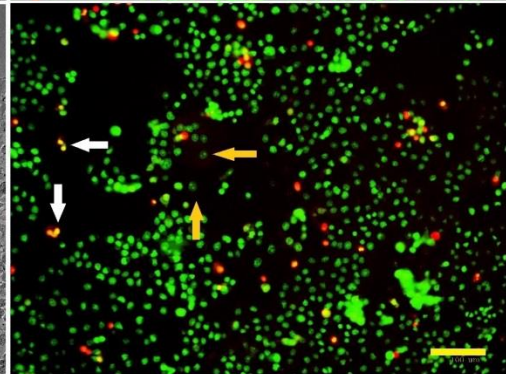
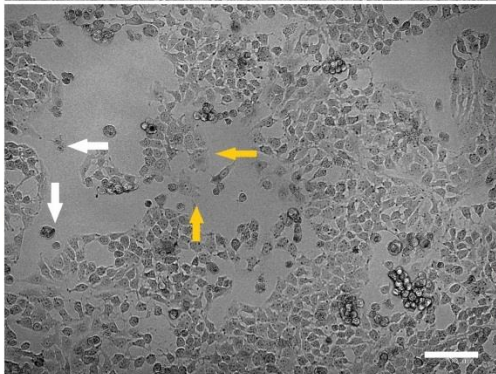
Kontrola



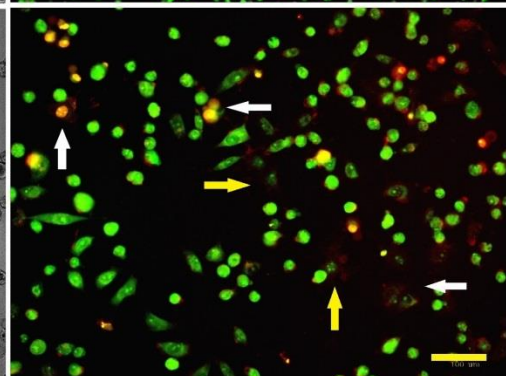
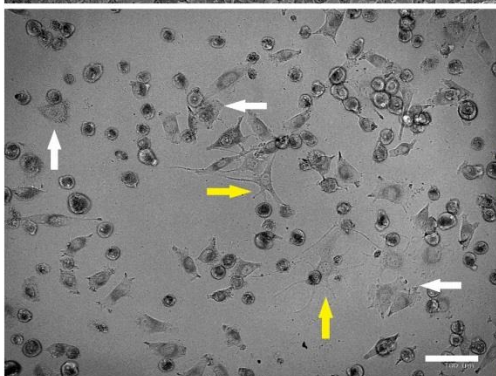
**K7
(IC₅₀)**



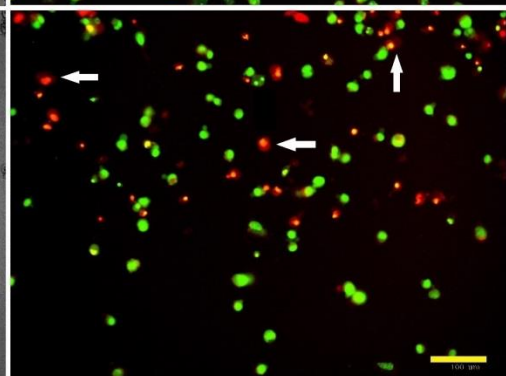
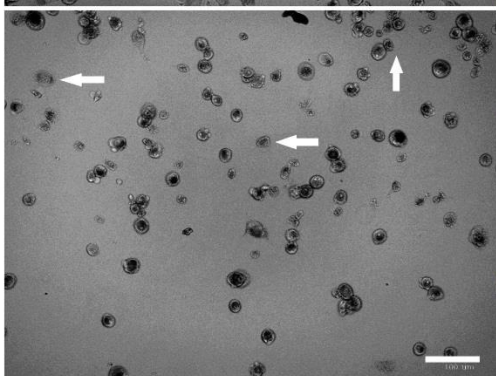
**K7
(2xIC₅₀)**

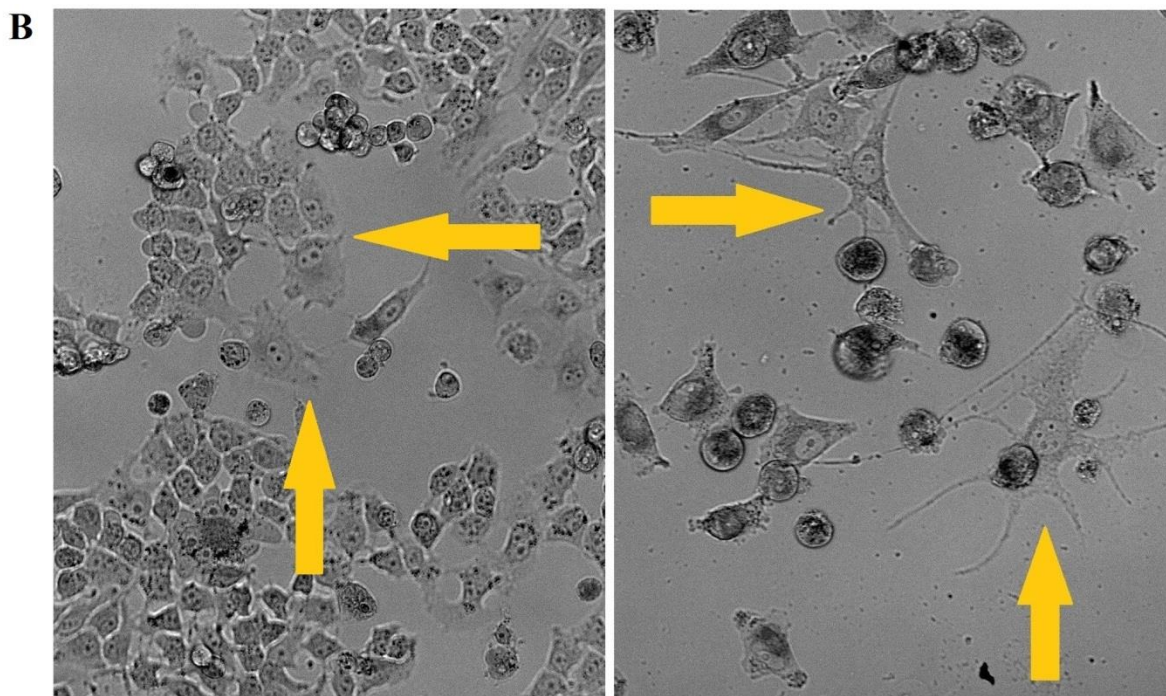


**cisplatina
(IC₅₀)**



**cisplatina
(2xIC₅₀)**

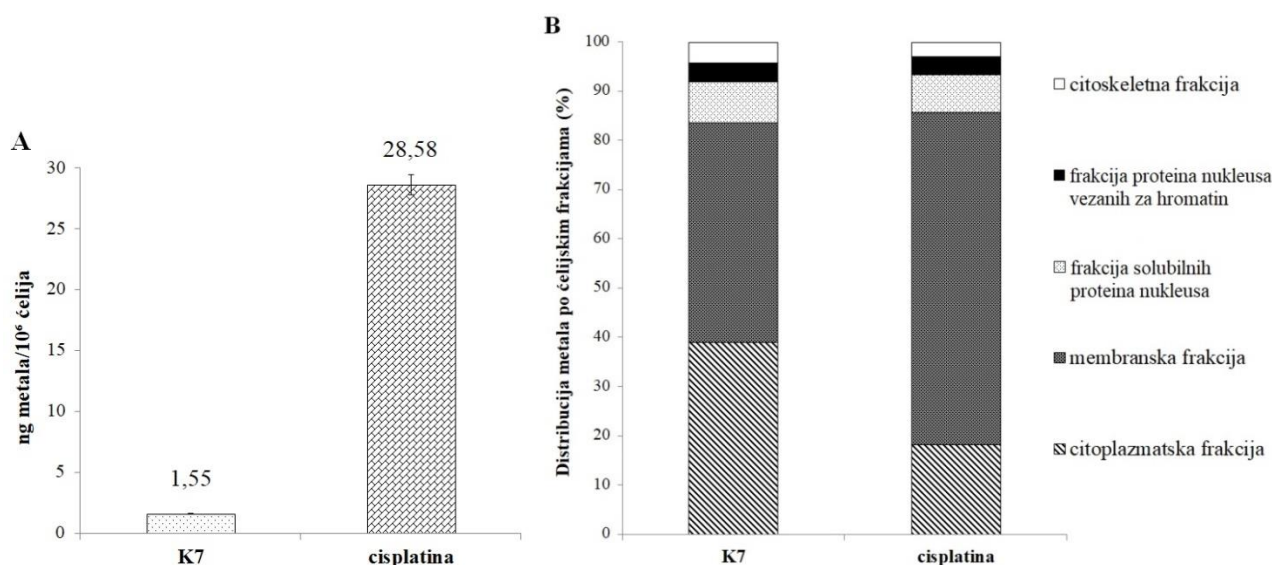




Slika 30. Mikrografije kontrolnih (netretiranih) A375 ćelija i ćelija tretiranih kompleksom **K7** ili cisplatinom tokom 72 h u koncentracijama koje odgovaraju IC_{50} i $2xIC_{50}$ vrednostima nakon bojenja AO/EtBr. (A) Levo na slici – rutinska svetlosna mikroskopija, desno – fluorescentna mikroskopija – detekcija AO (zeleno) i ErBr (crveno). Bele strelice ukazuju na unos ErBr u ćelije nakon tretmana ispitivanim agensima. Žute strelice ukazuju na promene u morfološkom izgledu ćelija nakon tretmana ispitivanim agensima – sa ćelija se pružaju izraštaji koji im daju zvezdast oblik. (B) Uveličani prikaz izmenjenih ćelija označenih strelicom; levo – ćelije tretirane kompleksom **K7** ($2xIC_{50}$), desno – ćelije tretirane cisplatinom (IC_{50}). Uveličanje: 20x, skala: 100 μm

4.2.5. Unutarćelijska akumulacija i lokalizacija kompleksa **K7** u A375 ćelijama

Nakon 24 h tretmana A375 ćelija kompleksom **K7**, odnosno cisplatinom, pri jednakim koncentracijama (10 μM), uočava se da su se i kompleks **K7** i cisplatina akumulirali u ćelijama, ali u različitoj meri. Kompleks **K7** je pokazao nižu akumulaciju u poređenju sa cisplatinom, s obzirom da je detektovano $1,55 \pm 0,04$ ng Ru/ 10^6 ćelija, poreklom od **K7** kompleksa i $28,58 \pm 0,8$ ng Pt/ 10^6 ćelija, poreklom od cisplatine (Slika 31A). Analiza prisustva Ru(II) i Pt(II) poreklom iz ispitivanih agenasa u proteinskim frakcijama poreklom iz unutarćelijskih kompartmenata je pokazala drugačiji obrazac unutarćelijske lokalizacije kompleksa **K7** i cisplatine (Slika 31B). Cisplatina se akumulirala u najvećoj meri u membranskoj frakciji, dok je kompleks **K7** pronađen u približno podjednakoj meri u membranskoj i citoplazmatskoj frakciji A375 ćelija. Dodatno, oba ispitivana agensa su pokazala podjednaku sposobnost da se akumuliraju u nukleusu (Tabela 7).



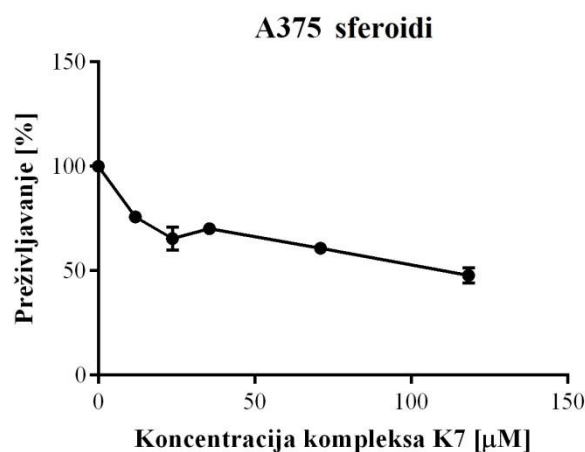
Slika 31. Kvantitativni prikaz (A) ukupne unutarćelijske akumulacije (ng metala/10⁶ ćelija) i (B) distribucije po ćelijskim kompartmentima (iskazano u % raspodele po proteinskim frakcijama) Ru(II) ili Pt(II) nakon tretmana A375 ćelija kompleksom **K7** ili cisplatinom

Tabela 7. Distribucija Ru(II)/Pt(II) po unutarćelijskim proteinskim frakcijama nakon tretmana A375 ćelija kompleksom **K7** ili cisplatinom

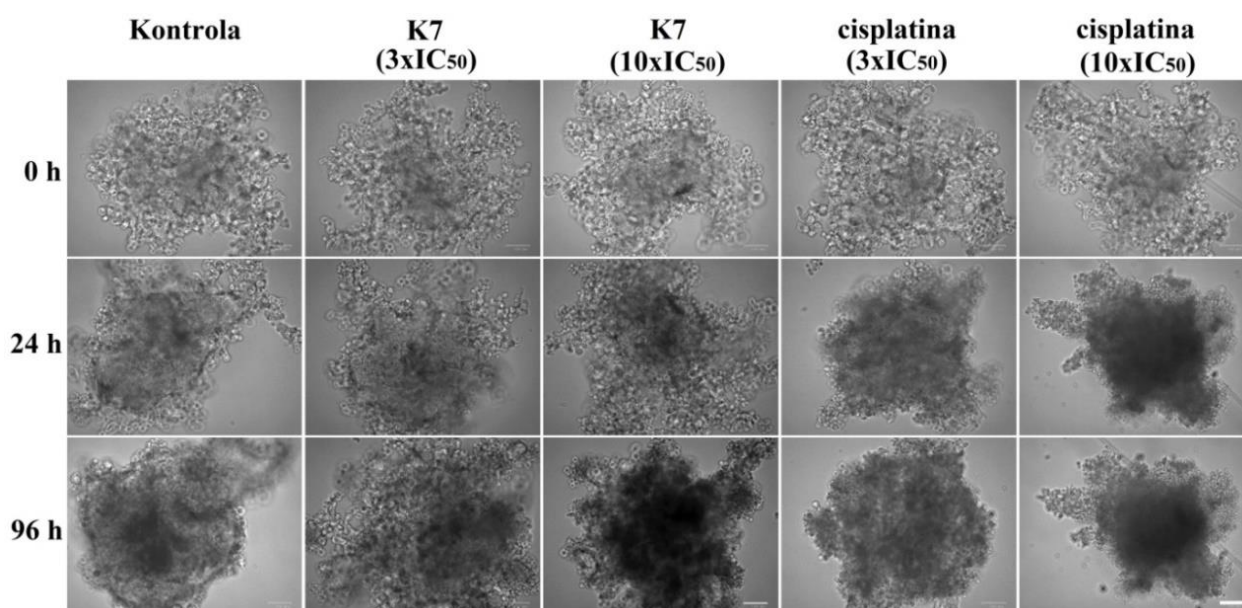
Unutarćelijska proteinska frakcija (%)	K7	cisplatin
Citoplazmatska frakcija	39,1	18,2
Membranska frakcija	44,6	67,5
Frakcija solubilnih proteina nukleusa	8,2	7,7
Frakcija proteina nukleusa vezanih za hromatin	3,9	3,6
Citokeletna frakcija	4,2	3,0

4.2.6. Aktivnost kompleksa **K7** na 3D modelu višćelijskih tumorskih sferoida

Nakon dobijanja rezultata antitumorske aktivnosti ispitivanog rutenijum(II)-arenskog kompleksa **K7** na 2D model sistemu, odnosno tumorskim ćelijskim linijama, aktivnost odabranog kompleksa je ispitana na 3D modelu višćelijskih tumorskih sferoida formiranih od A375 ćelija. A375 sferoidi su pokazali sedam puta manju senzitivnost na kompleks **K7** ($IC_{50}=110 \mu M$) (Slika 32) u odnosu na A375 ćelije kultivisane kao monosloj ($IC_{50}=15,8 \mu M$), što je u saglasnosti sa drugačijom organizacijom tumorskih ćelija u okviru sferoida. Mikroskopskom analizom A375 sferoida je uočeno postojanje razlika u efektima četvorodnevnog tretmana kompleksom **K7** ili cisplatinom na njihov rast (Slika 33). Veličina kontrolnih (netretiranih) sferoida i sferoida tretiranih nižom koncentracijom kompleksa **K7** ($3xIC_{50}$) je nastavila da se povećava tokom 96 h. Viša koncentracija kompleksa **K7** ($10xIC_{50}$) uzrokovala je zaustavljanje daljeg rasta sferoida, u određenom momentu između prvog i četvrtog dana od tretmana, s obzirom da se posle 96 h tretmana uočava smanjenje prečnika sferoida, kao i pojava centralno zasenčenog regiona sferoida. Sa druge strane, tretman cisplatinom ($3xIC_{50}$) je doveo do zaustavljanja rasta sferoida već nakon 24 h. Povišenje koncentracije cisplatine uzrokovalo je još izraženije smanjenje veličine sferoida i vremenski-zavisno povećanje centralnog zasenčenog regiona sferoida.

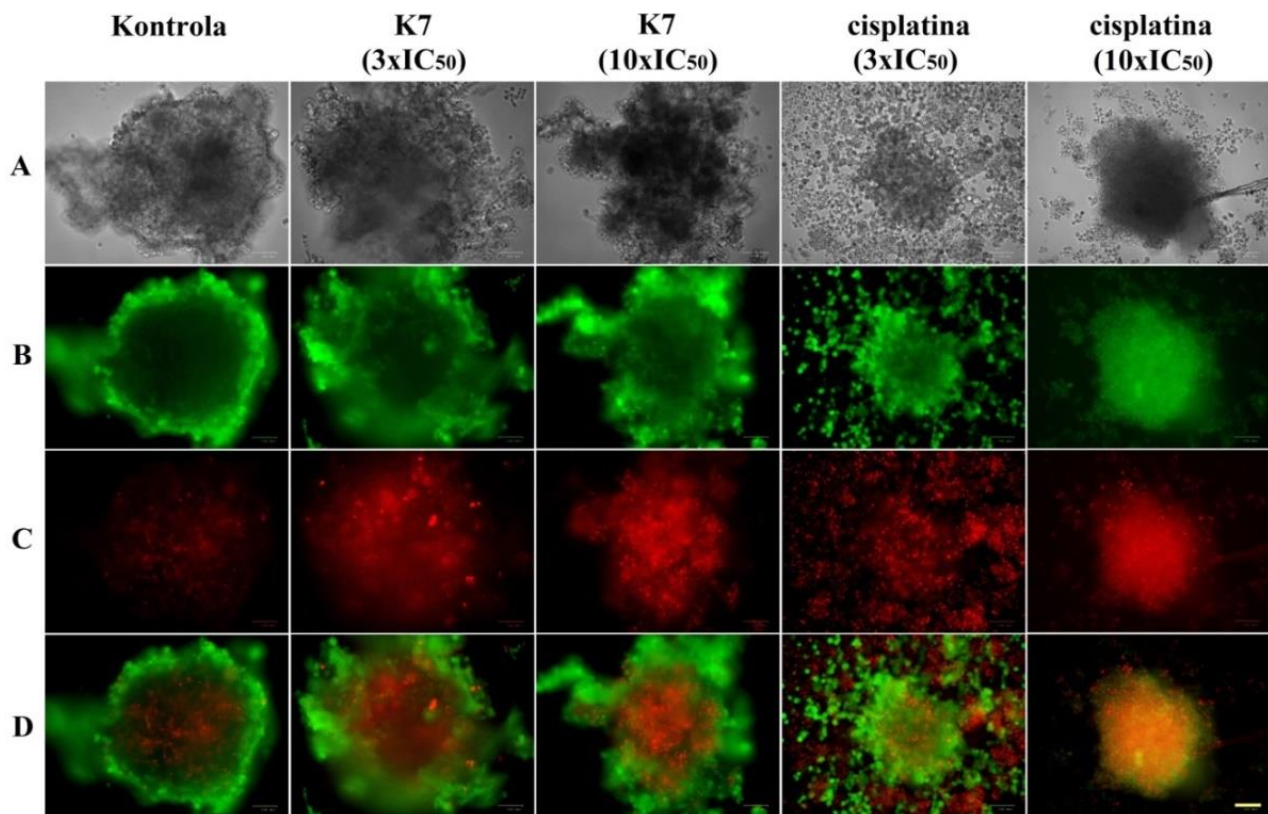


Slika 32. Kriva preživljavanja A375 sferoida nakon tretmana kompleksom **K7**



Slika 33. Inhibicija rasta A375 višćelijskih tumorskih sferoida tretiranih kompleksom **K7** ili cisplatinom tokom 96 h u koncentracijama koje odgovaraju 3xIC₅₀ i 10xIC₅₀ vrednostima. Formiranje i rast sferoida su posmatrani rutinskom svetlosnom mikroskopijom. Uveličanje: 20x, skala: 100 µm

Rezultati dvojnog bojenja sferoida kalcein-AM/PI su pokazali da kontrolni sferoidi zadržavaju kompaktnost nakon bojenja, pri čemu su ćelije u okviru sferoida predominantno žive. Na periferiji sferoida, u dijametru od ~100 µm, primetan je pojas vijabilnih ćelija, intenzivno obojenih kalcein-AM, dok je u centru sferoida prisutna manja populacija PI(+) ćelija (Slika 34). Takođe, uočava se da i kompaktnost sferoida tretiranih kompleksom **K7** ostaje očuvana. Sa povišenjem koncentracije **K7** (10xIC₅₀) dolazi do povećanja regiona sa PI(+) ćelijama, koje odgovara zasenčenom regionu sferoida uočenom rutinskom svetlosnom mikroskopijom. Mikroskopska analiza sferoida tretiranih cisplatinom (3xIC₅₀) je pokazala da dolazi do narušavanja strukture i kompaktnosti sferoida, naročito na periferiji sferoida. Pojedinačne ćelije i manje grupice ćelija sa periferije sferoida se odvajaju, dok manja populacija ćelija ostaje i dalje u obliku centralnog agregata, izgrađenog iz mešovite populacije kalcein-AM(+) i PI(+) ćelija. Primećuje se da dolazi do raskidanja međućelijskih veza ne samo između PI(+) ćelija, već i između vijabilnih (kalcein-AM(+)) ćelija. Viša koncentracija cisplatinu (10xIC₅₀) uzrokuje još intenzivnije narušavanje integriteta sferoida. Ćelije koje su se odvojile od sferoida izlaze iz vidnog polja, te se prividno uočava manji sferoid u odnosu na veličinu sferoida pre dodavanja boja. U preostalom agregatu ćelija prisutna je mešovita populacija kalcein-AM(+) i PI(+) ćelija.



Slika 34. Bojenje kalcein-AM/PI A375 višćelijskih tumorskih sferoida tretiranih kompleksom **K7** ili cisplatinom tokom 96 h u koncentracijama koje odgovaraju 3xIC₅₀ i 10xIC₅₀ vrednostima. Promene u sferoidima su posmatrane (A) rutinskom svetlosnom mikroskopijom, kao i korišćenjem (B) zelenog (kalcein-AM) i (C) crvenog (PI) kanala fluorescentnog mikroskopa. (D) Preklopljene slike (B) i (C). Uveličanje: 20x, skala: 100 μm

4.3. Rezultati ispitivanja antitumorskog potencijala rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa analogima PARP inhibitora 3-aminobenzamida (kompleksi K8-K11)

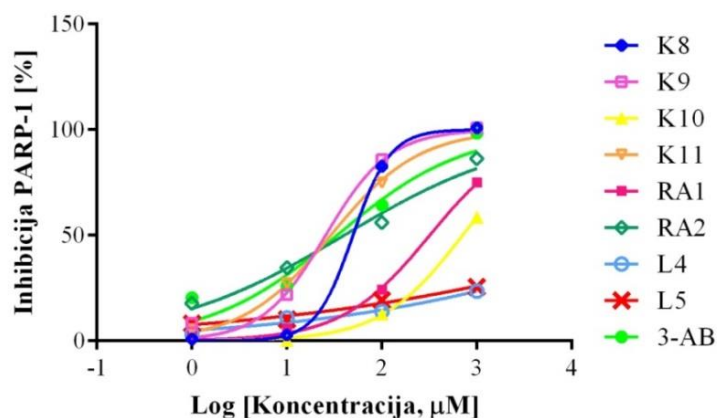
4.3.1. PARP-1 inhibitorna aktivnost kompleksa K8-K11

Prvi korak pri istraživanju serije rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa derivatima 3-AB (**K8-K11**) bio je da se ispita njihova sposobnost da inhibiraju aktivnost PARP-1 enzima *in vitro*, u vanćelijskom sistemu, upotrebom kolorimetrijskog PARP testa. Rezultati su prikazani u Tabeli 8 i na Slici 35. 3-AB, korišćen kao referentno jedinjenje, je pokazao sposobnost da inhibira aktivnost PARP-1 enzima za 50% pri koncentraciji od $33,8 \pm 2,2 \mu\text{M}$, što je u saglasnosti sa podacima iz literature (Curtin, 2005). Nasuprot tome, derivati 3-AB, ligandi **L4** i **L5**, su se pokazali kao manje sposobni da inhibiraju aktivnost PARP-1 ($\text{IC}_{50} > 1000 \mu\text{M}$), i uzrokovali su 23,6% i 25,5% PARP-1 inhibicije pri koncentraciji od $1000 \mu\text{M}$. Kompleksi **K8-K11** su pokazali znatno bolju PARP-1 inhibitornu aktivnost u odnosu na ligande, sa IC_{50} vrednostima u opsegu od $25,5-709,7 \mu\text{M}$. Izuzev **K10**, kompleksi **K8**, **K9** i **K11** su ispoljili sličnu koncentraciono-zavisnu PARP-1 inhibitornu aktivnost i dostigli su maksimalnu inhibitornu sposobnost (100% inhibicije PARP-1 enzimске aktivnosti) pri koncentraciji od $1000 \mu\text{M}$. Kompleksi sa cimenom kao arenskim ligandom, **K9** i **K11**, su se pokazali kao superiorni PARP-1 inhibitori (IC_{50} vrednosti su $25,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$ i $29,4 \pm 5,9 \mu\text{M}$) u odnosu na komplekse sa toluenom, **K8** i **K10** (IC_{50} vrednosti su $50,2 \pm 3,9 \mu\text{M}$ i $709,7 \pm 92,2 \mu\text{M}$). Dodatno, kompleksi **K9** i **K11** su ispoljili niže IC_{50} vrednosti u odnosu na 3-AB. Razlike u sposobnosti inhibicije PARP-1 se uočavaju i između dva polazna rutenijumska kompleksa, pri čemu se kompleks sa cimenom, **RA2**, pokazao kao osam puta potentniji PARP-1 inhibitor ($\text{IC}_{50} = 40,4 \pm 6,4 \mu\text{M}$) u odnosu na kompleks sa toluenom, **RA1** ($\text{IC}_{50} = 321,9 \pm 92,6 \mu\text{M}$).

Tabela 8. PARP-1 inhibitorna aktivnost ispitivanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa (**K8-K11**), polaznih rutenijum(II)-arena (**RA1**, **RA2**), benzamidnih liganada (**L4**, **L5**), kao i 3-AB nakon 60 minuta inkubacije *in vitro*

Agens	PARP-1 inhibicija (%)				PARP-1 inhibicija (μM)
	1 μM	10 μM	100 μM	1000 μM	IC_{50} ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$)
K8	1	2,6	82,5	100	$50,2 \pm 3,9$
K9	8,5	21,8	85,9	100	$25,5 \pm 0,2$
K10	-0,2	1,4	12,7	58,5	$709,7 \pm 92,2$
K11	5,3	27,2	74,8	100	$29,4 \pm 5,9$
RA1	2,4	5,8	24,2	75	$321,9 \pm 92,6$
RA2	17,8	34,7	56	86,3	$40,4 \pm 6,4$
L4	3,1	10,9	13,9	23,6	>1000
L5	8,2	10,2	19,3	25,5	>1000
3-AB	20,5	26,1	64,3	98,5	$33,8 \pm 2,2$

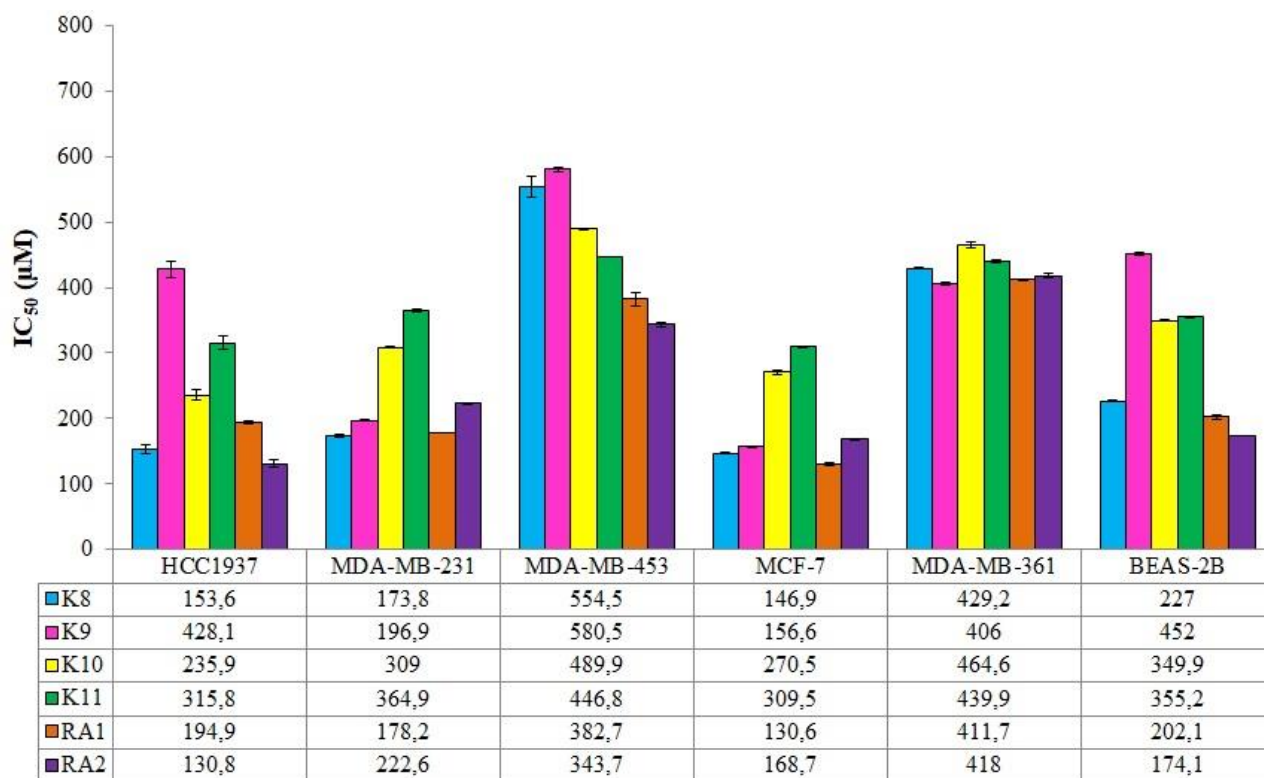
*>1000 – IC_{50} vrednost nije dostignuta u ispitivanom opsegu koncentracija do $1000 \mu\text{M}$



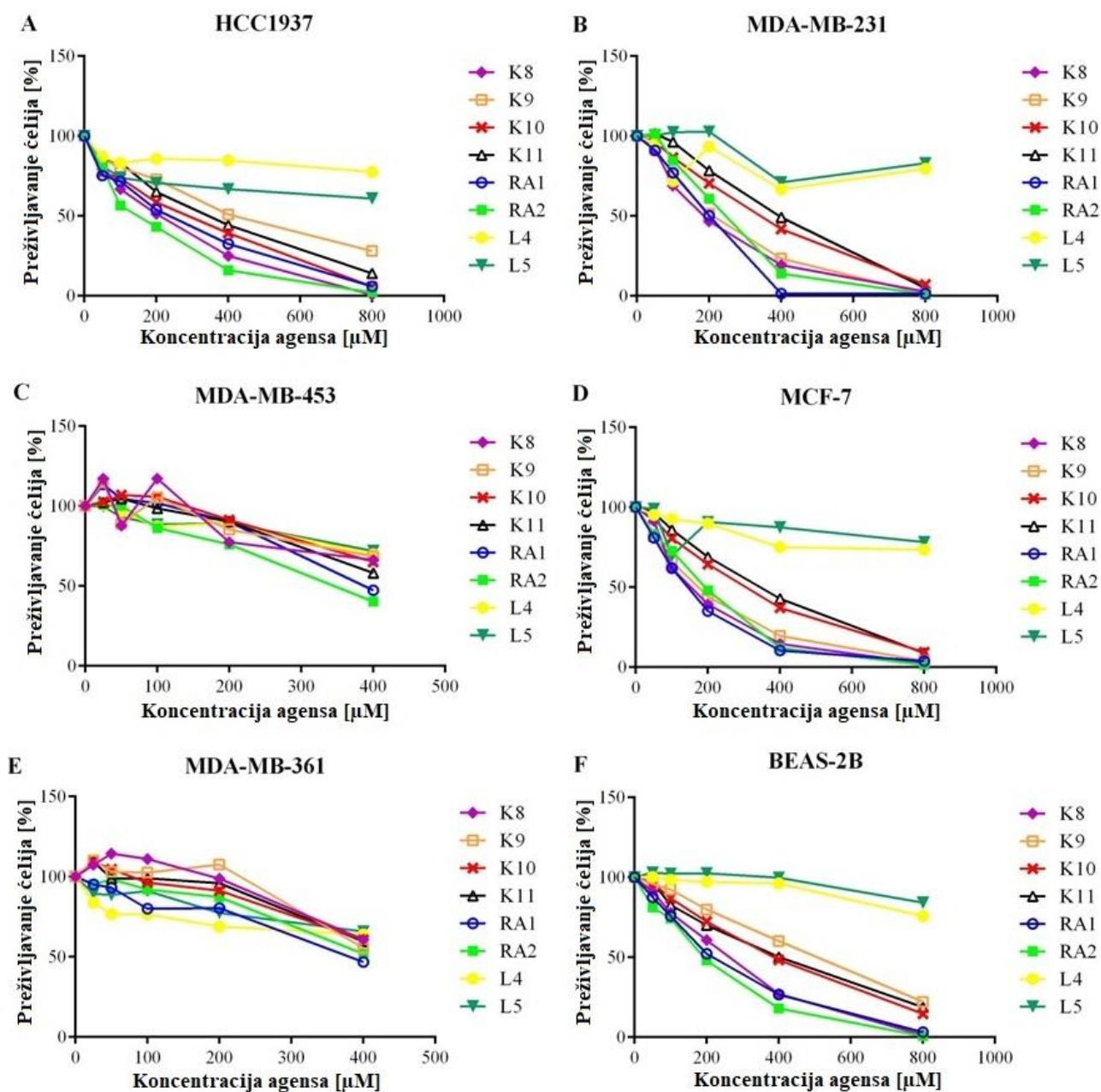
Slika 35. Reprezentativne krive inhibicije PARP-1 enzimске aktivnosti nakon tretmana kompleksima (**K8-K11**), rutenijum(II)-arenima (**RA1, RA2**), benzamidnim ligandima (**L4, L5**) ili 3-AB

4.3.2. Antiproliferativni potencijal kompleksa **K8-K11**

Rezultati MTT testa su pokazali vrlo slabu antiproliferativnu aktivnost 2-amino-4-metilbenzamida (**L4**) i 3-amino-N-metilbenzamida (**L5**), u ispitivanom opsegu koncentracija (do 800 µM), na svim testiranim ćelijskim linijama ($IC_{50} > 800$ µM, rezultati nisu prikazani). Međutim, nakon koordinacije **L4** ili **L5** liganada za rutenijum(II)-arenski deo (toluen, **RA1** ili cimen, **RA2**), rezultujući kompleksi **K8-K11** su pokazali sposobnost da inhibiraju rast ćelija u kulturi, sa IC_{50} vrednostima u opsegu od 146,9-580,5 µM (Slika 36). Polazni rutenijum(II)-areni, **RA1** i **RA2**, su ispoljili IC_{50} vrednosti u opsegu od 130,6-418 µM. Generalno, veću senzitivnost, kao i sličan obrazac osetljivosti na dejstvo kompleksa **K8-K11** su ispoljile HCC1937, MDA-MB-231 i MCF-7 ćelije karcinoma dojke, što se može uočiti iz kriva preživljavanja (Slika 37). Suprotno, trostruko-negativne ćelije karcinoma dojke (MDA-MB-453) i hormon-zavisne ćelije karcinoma dojke (MDA-MB-361) su ispoljile vrlo slabu senzitivnost na ispitivane komplekse ($IC_{50} > 400$ µM). Kompleksi sa bidentatno-vezanim ligandom (**K8** i **K9**) su pokazali veći antiproliferativni potencijal u poređenju sa kompleksima sa monodentatno-vezanim ligandom (**K10** i **K11**), izuzev u slučaju HCC1937 ćelija, gde je kompleks **K9** pokazao najnižu aktivnost ($IC_{50} = 428,1 \pm 12,5$ µM). Kompleks **K8** je ispoljio najveći antiproliferativni potencijal u HCC1937, MDA-MB-231 i MCF-7 ćelijama karcinoma dojke, sa IC_{50} vrednostima redom: $153,6 \pm 7,2$ µM, $173,8 \pm 2,4$ µM i $146,9 \pm 0,5$ µM. U odnosu na normalne ćelije epitela bronhija BEAS-2B, određena je selektivnost u dejstvu ispitivanog kompleksa **K8**, i na pomenutim ćelijama indeks selektivnosti je bio redom: 1,48, 1,3 i 1,55. Kompleks **K9** je ispoljio 2,3 i 2,88 puta veću selektivnost prema MDA-MB-231 i MCF-7 ćelijama (Tabela 9). IC_{50} vrednosti dobijene za cisplatinu su bile u opsegu od 5,6-26 µM, pri čemu su se kao najsenzitivnije pokazale MCF-7 ćelije ($IC_{50} = 5,6 \pm 0,5$ µM), a kao najrezistentnije MDA-MB-361 ćelije ($IC_{50} = 26 \pm 2,1$ µM). Trostruko-negativne ćelije karcinoma dojke iz testiranog panela ćelijskih linija su pokazale približno sličnu senzitivnost na cisplatinu ($IC_{50} \sim 10$ µM).



Slika 36. Antiproliferativni potencijal ispitivanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa (**K8-K11**) i rutenijum(II)-arena (**RA1, RA2**), na panelu ćelijskih linija, iskazan u obliku IC_{50} vrednosti ($\mu M \pm SD$) dobijenih MTT testom nakon 72 h kontinuiranog tretmana



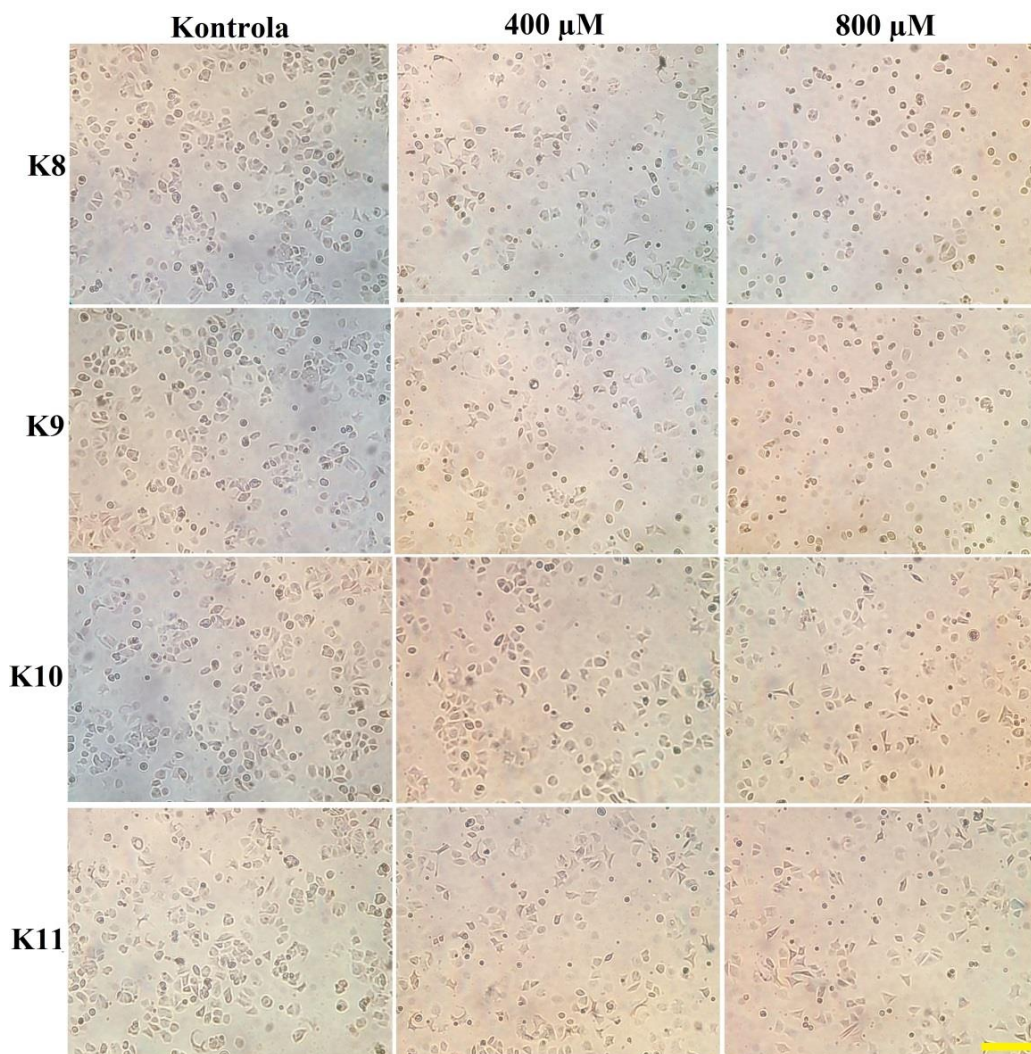
Slika 37. Reprezentativne krive preživljavanja (A) HCC1937, (B) MDA-MB-231, (C) MDA-MB-453, (D) MCF-7, (E) MDA-MB-361 i (F) BEAS-2B ćelija nakon tretmana kompleksima (K8-K11), rutenijum(II)-arenima (RA1, RA2) ili ligandima (L4, L5)

Tabela 9. Selektivnost ispitivanih kompleksa (K8-K11), rutenijum(II)-arena (RA1, RA2), liganada (L4, L5), kao i cisplatine u antiproliferativnom dejstvu prema HCC1937, MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7 i MDA-MB-361 ćelijama u odnosu na normalne ćelije – epitel bronhija BEAS-2B, prikazana u obliku indeksa selektivnosti (SI)

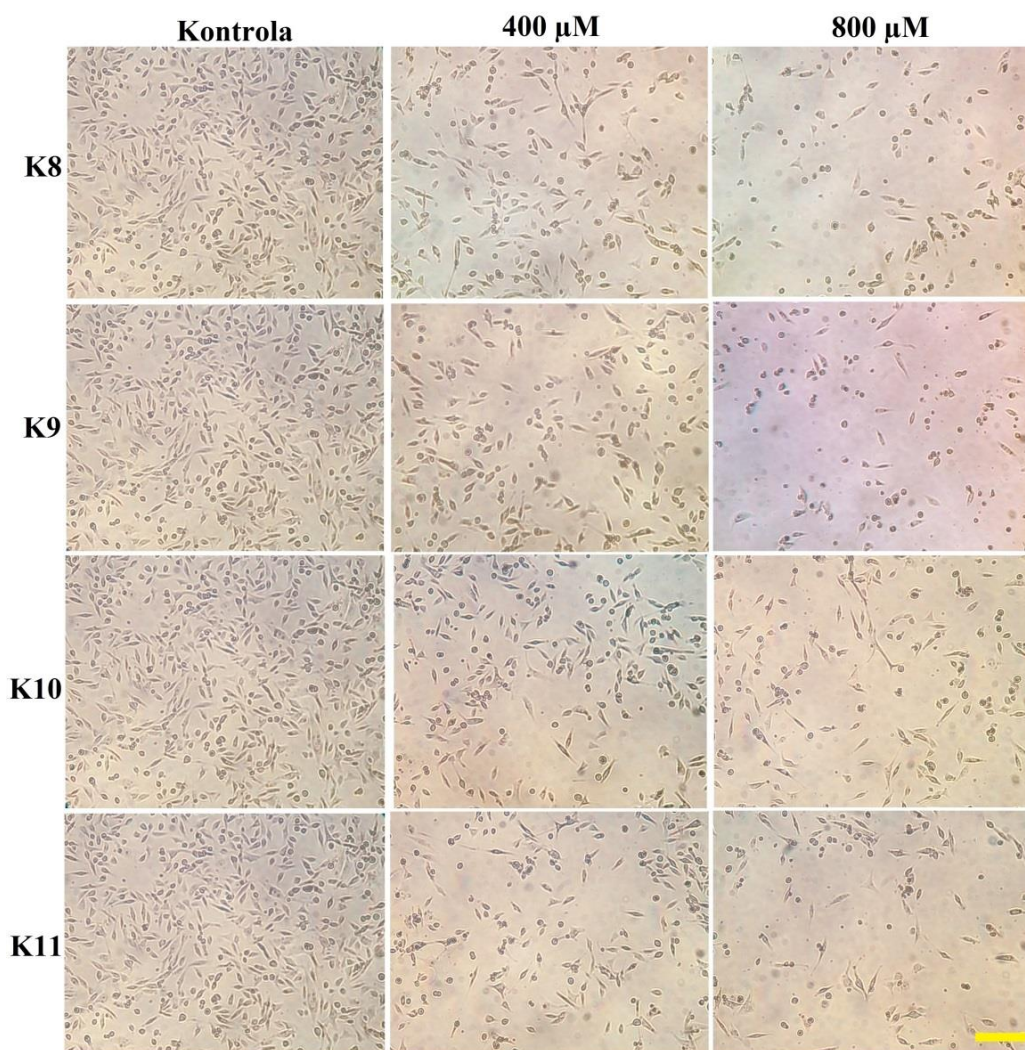
Agens	*SI _{HCC1937}	*SI _{MDA-MB-231}	*SI _{MDA-MB-453}	*SI _{MCF-7}	*SI _{MDA-MB-361}
K8	1,48	1,3	0,41	1,55	0,53
K9	1,06	2,3	0,78	2,88	1,11
K10	1,48	1,13	0,71	1,29	0,75
K11	1,12	0,97	0,79	1,15	0,81

RA1	1,04	1,13	0,53	1,55	0,49
RA2	1,33	0,78	0,51	1,03	0,42
L4	-	-	-	-	-
L5	-	-	-	-	-
cisplatina	0,45	0,62	0,48	0,85	0,18

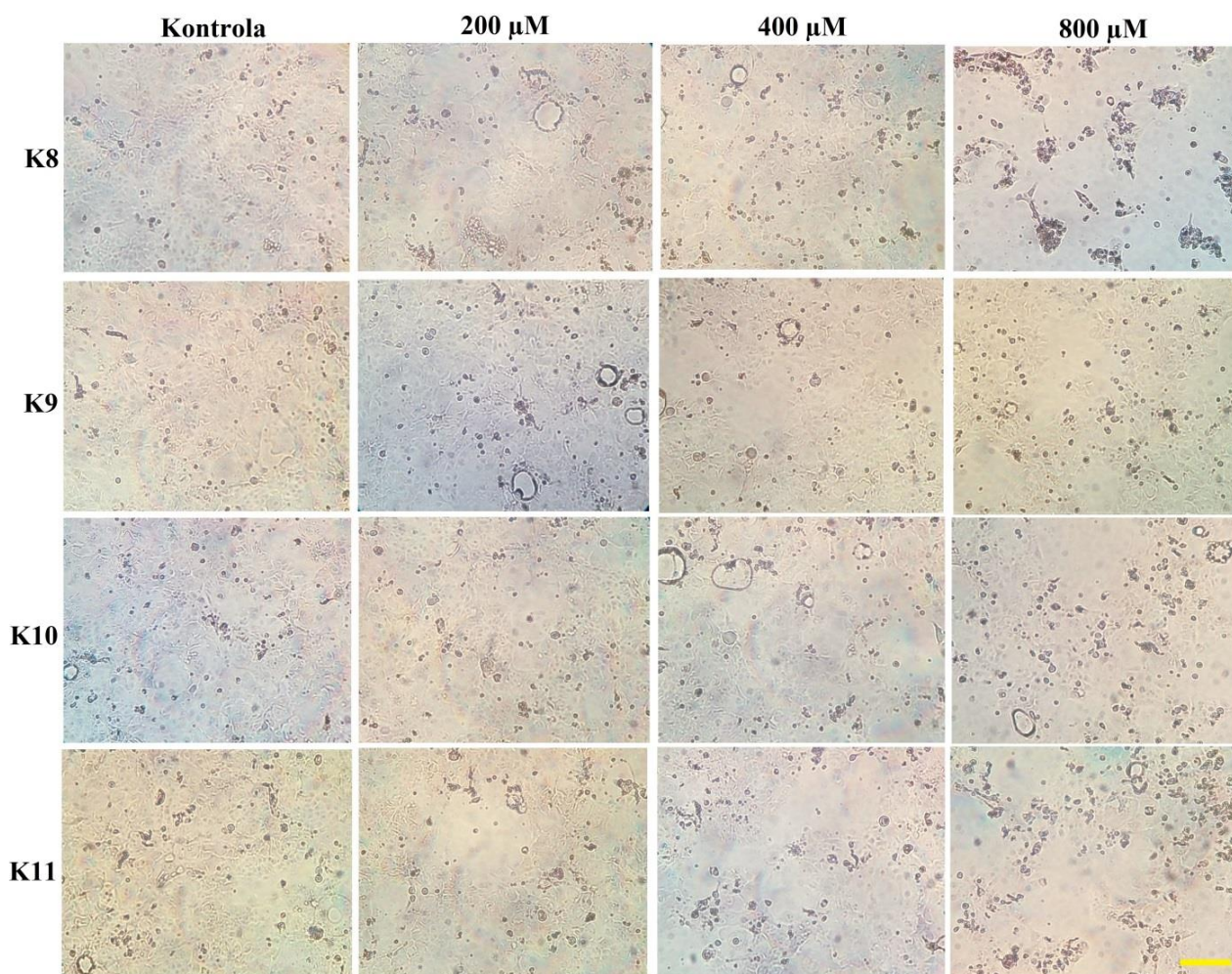
Mikroskopska analiza HCC1937, MDA-MB-231 i MCF-7 ćelija ukazuje da nakon tretmana kompleksima **K8-K11** (72 h) dolazi do koncentraciono-zavisnog smanjenja broja ćelija. Tretman MCF-7 ćelija ovim kompleksima (400 μ M) uzrokovao je pojavu mešovite ćelijske populacije od ćelija sfernog oblika i ćelija sa očuvanom morfologijom (Slika 38). Povišenje koncentracije kompleksa (800 μ M), posebno **K8** i **K9**, dovelo je do još izraženije redukcije broja ćelija i predominantne pojave ćelija sfernog oblika (ćelije koje su u procesu ćelijske smrti ili su već mrtve). Tretirane MDA-MB-231 ćelije su pokazale sličan obrazac morfoloških promena pod dejstvom kompleksa **K8-K11** (Slika 39). Kompleksi **K8-K11** su kod tretiranih HCC1937 ćelija doveli do koncentraciono-zavisnog smanjenja broja ćelija, pojave sitnijih ćelija sfernog oblika, kao i ćelija organizovanih u klastere (Slika 40). Izražene promene u ćelijskoj morfologiji, primetna redukcija broja ćelija, kao i intenzivno organizovanje ćelija u klastere su posebno uočljivi nakon tretmana ćelija višom koncentracijom kompleksa **K8** (800 μ M).



Slika 38. Mikrografije MCF-7 kontrolnih ćelija i ćelija tretiranih kompleksima **K8-K11** tokom 72 h. Uveličanje: 6,3x, skala: 100 μ m



Slika 39. Mikrografije MDA-MB-231 kontrolnih ćelija i ćelija tretiranih kompleksima **K8-K11** tokom 72 h. Uveličanje: 6,3x, skala: 100 μm



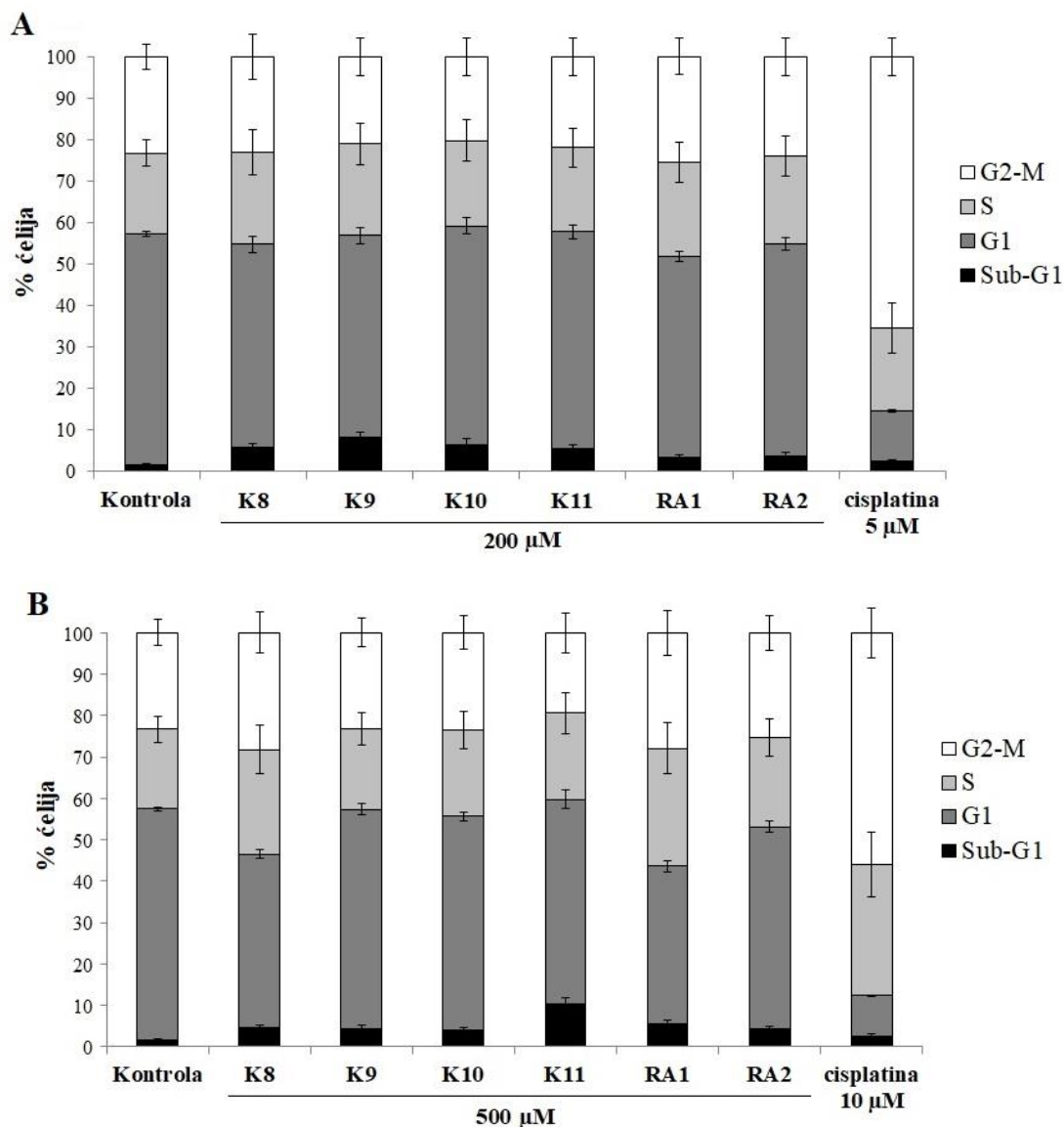
Slika 40. Mikrografije HCC1937 kontrolnih ćelija i ćelija tretiranih kompleksima **K8-K11** tokom 72 h. Uveličanje: 6,3x, skala: 100 μm

Rezultati MTT i PARP testa, kao i mikroskopske analize ćelija ukazuju na to da se iz ispitivane serije novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa analozima 3-AB po svojoj aktivnosti na ispitanim ćelijskim linijama karcinoma dojke izdvajaju bidentatni kompleksi u odnosu na monodentatne. Analizom povezanosti strukture i aktivnosti kompleksa, uočava se veća aktivnost kompleksa sa toluenom kao arenskim ligandom. Može se zaključiti da se kompleks **K8** izdvaja kao najaktivniji kompleks iz serije, odnosno kao vodeće jedinjenje. Najveću senzitivnost na dejstvo kompleksa **K8** su ispoljile MCF-7, HCC1937 i MDA-MB-231 ćelije. Usled specifičnosti dizajnirane serije kompleksa sa derivatima PARP inhibitora i očekivanog antitumorskog potencijala kompleksa **K8**, dalje istraživanje je usmereno na izučavanje molekulskih mehanizama dejstva kompleksa **K8-K11** na *BRC1*-mutiranim ćelijama karcinoma dojke HCC1937.

4.3.3. Uticaj kompleksa **K8-K11** na distribuciju HCC1937 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

Uticaj kompleksa **K8-K11** na distribuciju HCC1937 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa je ispitan analizom sadržaja DNK na protočnom citofluorimetru nakon bojenja ćelija PI. Nakon 72 h tretmana ćelija ispitivanim kompleksima **K8-K11** i **RA1-RA2** (200 μM), uočava se da ne dolazi do većih promena u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa, u poređenju sa netretiranim ćelijama, izuzev blagog porasta u procentu Sub-G1 populacije ćelija (najviše do 8,87% sa kompleksom **K9**, u poređenju sa 1,75% u kontroli) (Slika 41A). Povišenje koncentracije kompleksa na 500 μM dovelo je i do zaustavljanja ćelija u S fazi, što je posebno izraženo sa kompleksima **K8** (28,45%) i **RA1** (32,10%), u poređenju sa kontrolnim ćelijama (21,32%), i do pratećeg smanjenja procenta ćelija zaustavljenih u G1 fazi ćelijskog ciklusa (Slika 41B). Tretman cisplatinom (5 μM) je doveo do primetnog povećanja udela

ćelija zaustavljenih u G2-M kontrolnoj tački (do 54,27%, u poređenju sa 20,81% u kontroli) (Slika 41A). Povišenje koncentracije cisplatine na 10 μM dovelo je do akumulacije HCC1937 ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa do 34,54%, u poređenju sa 21,32% u kontroli (Slika 41B).

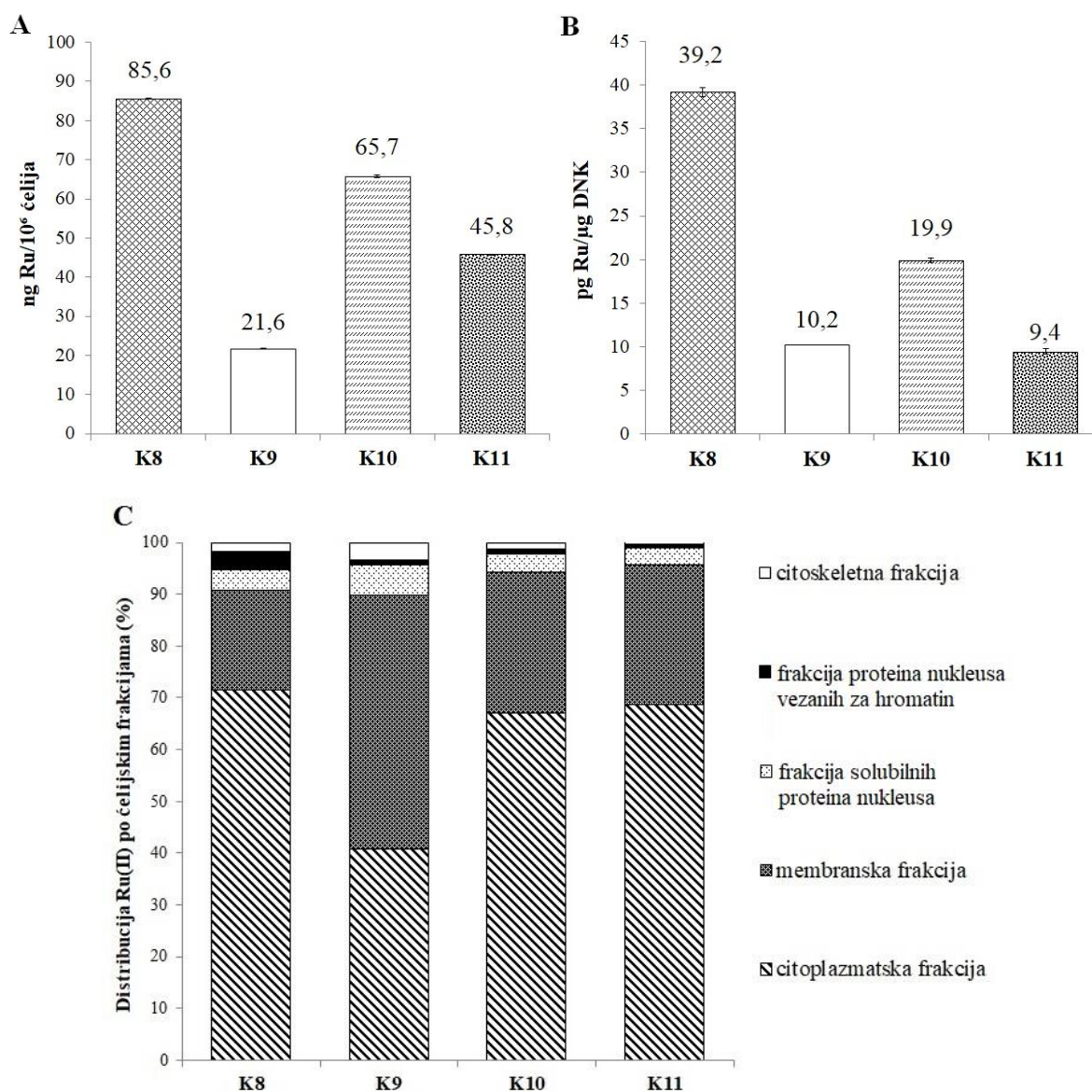


Slika 41. Sortiranje HCC1937 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon 72 h kontinuiranog tretmana kompleksima **K8-K11**, **RA1-RA2** ili cisplatinom u koncentracijama jednakim (A) 200 μM (rutenijumski kompleksi) i 5 μM (cisplatina) i (B) 500 μM (rutenijumski kompleksi) i 10 μM (cisplatina). Prikazane su srednje vrednosti $\pm\text{SD}$ dobijene izvođenjem dva nezavisna eksperimenta

4.3.4. Unutarćelijska akumulacija i lokalizacija kompleksa **K8-K11** u HCC1937 ćelijama

Rezultati ICP-MS analize nakon 24 h tretmana HCC1937 ćelija kompleksima **K8-K11** u koncentraciji od 200 μM pokazuju da su se sva četiri kompleksa akumulirala u ćelijama u različitoj meri. Akumulacija kompleksa, odnosno unutarćelijski sadržaj (ng Ru/ 10^6 ćelija) Ru(II) poreklom iz kompleksa je detektovan u sledećem odnosu: **K8** > **K10** > **K11** > **K9** (Slika 42A). Kompleks **K8** je detektovan u ćelijama u najvišoj koncentraciji od $85,56 \pm 0,2$ ng Ru/ 10^6 ćelija, što je skoro četiri puta više od kompleksa **K9** ($21,63 \pm 0,1$ ng Ru/ 10^6 ćelija). Sličan trend je uočen i u afinitetu kompleksa za vezivanje za DNK. Rezultati su pokazali 3,8 puta višu koncentraciju kompleksa **K8** ($39,17 \pm 0,6$ pg Ru/ μg DNK) u odnosu na kompleks **K9** ($10,22 \pm 0,1$ pg Ru/ μg DNK) u DNK frakciji tretiranih HCC1937 ćelija (Slika 42B). Kompleksi **K8**, **K10** i **K11** su pokazali sličan obrazac unutarćelijske lokalizacije (Slika 42C). Sva tri kompleksa su se akumulirala u najvišoj koncentraciji u citoplazmatskoj

proteinskoj frakciji, i u manjoj meri u membranskoj proteinskoj frakciji. Suprotno, kompleks **K9** je u skoro podjednakoj meri detektovan u membranskoj i citoplazmatskoj proteinskoj frakciji. Izvestan nivo Ru(II) je pronađen i u frakciji proteina nukleusa (frakcija proteina nukleusa vezanih za hromatin i frakcija solubilnih proteina nukleusa), pri čemu je kompleks **K8** pokazao najveću sposobnost da se akumulira u nukleusu u poređenju sa ostala tri kompleksa (Tabela 10).



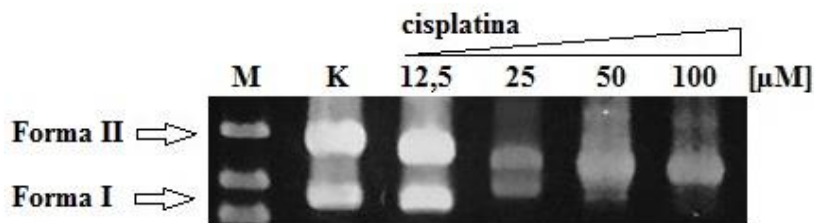
Slika 42. Kvantitativni prikaz (A) ukupne unutarćelijske akumulacije (ng Ru/10⁶ ćelija), (B) akumulacije u DNK frakciji (pg Ru/μg DNK), kao i (C) distribucije po ćelijskim kompartmentima (iskazano u % raspodele po proteinskim frakcijama) Ru(II) nakon tretmana HCC1937 ćelija kompleksima **K8-K11**

Tabela 10. Distribucija Ru(II) po unutarćelijskim proteinskim frakcijama nakon tretmana HCC1937 ćelija kompleksima **K8-K11**

Unutarćelijska proteinska frakcija (%)	K8	K9	K10	K11
Citoplazmatska frakcija	71,5	40,8	67,1	68,6
Membranska frakcija	19,3	49,1	27,2	27,1
Frakcija solubilnih proteina nukleusa	3,8	5,6	3,6	3,2
Frakcija proteina nukleusa vezanih za hromatin	3,7	1,2	0,9	0,9
Citoskeletna frakcija	1,7	3,3	1,2	0,2

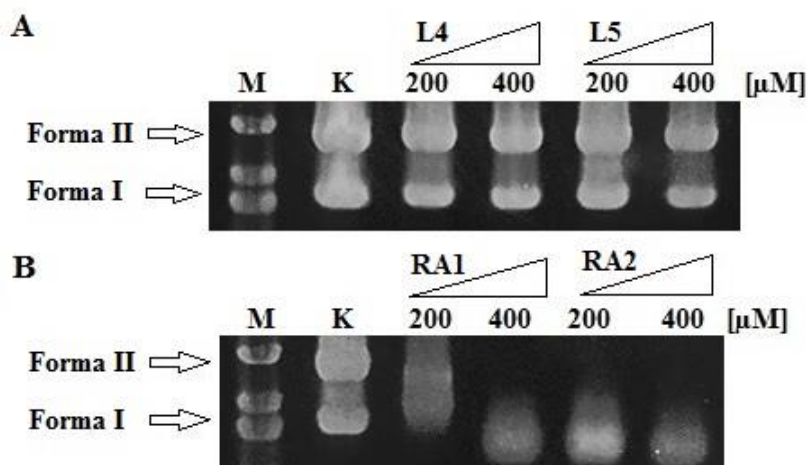
4.3.5. Interakcija kompleksa K8-K11 sa DNK pHOT-1 plazmida

Sposobnost rutenijum(II)-arenskih kompleksa **K8-K11**, kao i polaznih rutenijum(II)-arena (**RA1**, **RA2**) i benzamidnih liganada (**L4**, **L5**) da interaguju sa DNK je dalje ispitana i u vanćelijskom sistemu, upotrebom DNK pHOT-1 plazmida i elektroforeze na agaroznom gelu. Nakon tretmana plazmidne DNK sa cisplatinom, uočava se da sa povišenjem koncentracije cisplatine dolazi do postepenog iščezavanja dve jasno razdvojene trake DNK na gelu (superspiralizovana forma I i relaksirana forma II) i formiranja jedne trake pozicionirane u regionu između forme I i forme II (100 μM cisplatina) (Slika 43). Rezultat ukazuje da tretman cisplatinom dovodi do koncentraciono-zavisnog smanjenja stepena migracije forme I i istovremenog povećanja migracije forme II, potvrđujući sposobnost cisplatine da uzrokuje promene u tercijarnoj strukturi plazmidne DNK.



Slika 43. Analiza interakcije cisplatine sa DNK pHOT-1 plazmida elektroforezom na agaroznom gelu. M: marker; K: kontrola, DNK pHOT-1 plazmida

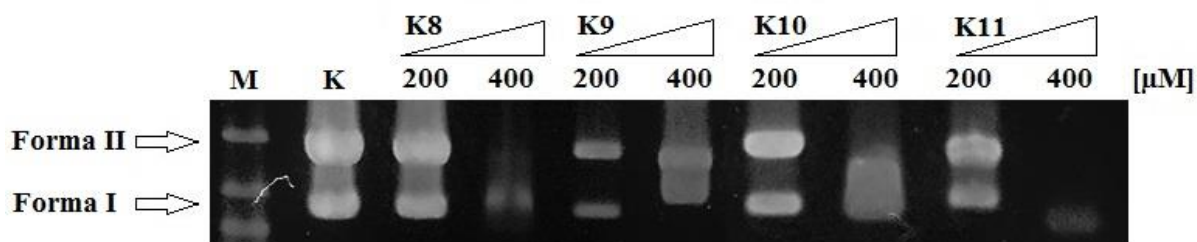
Inkubacija plazmidne DNK sa benzamidnim ligandima **L4** i **L5**, pri koncentracijama od 200 μM i 400 μM , nije dovela do značajnijih promena u tercijarnoj strukturi plazmidne DNK u poređenju sa kontrolom (Slika 44A). Nakon tretmana ligandima, uočavaju se dve jasno definisane trake plazmidne DNK u obliku forme I i forme II. Sa druge strane, polazni rutenijum(II)-areni (**RA1** i **RA2**) su uzrokovali vidljive promene u mobilnosti plazmidne DNK (Slika 44B). Kompleks **RA1** je pokazao sposobnost interakcije sa plazmidnom DNK, pri čemu je 200 μM tretman doveo do odmotavanja superspiralizovane forme I i formiranja „razvučene” trake. Tretmani **RA1** (400 μM) i **RA2** (200 μM i 400 μM) su uzrokovali iščezavanje forme I i forme II. Na gelu se uočava po jedna traka čija mobilnost premašuje mobilnost forme I. Ovakav rezultat ukazuje da polazni rutenijum(II)-areni uzrokuju formiranje kompaktnije strukture plazmidne DNK.



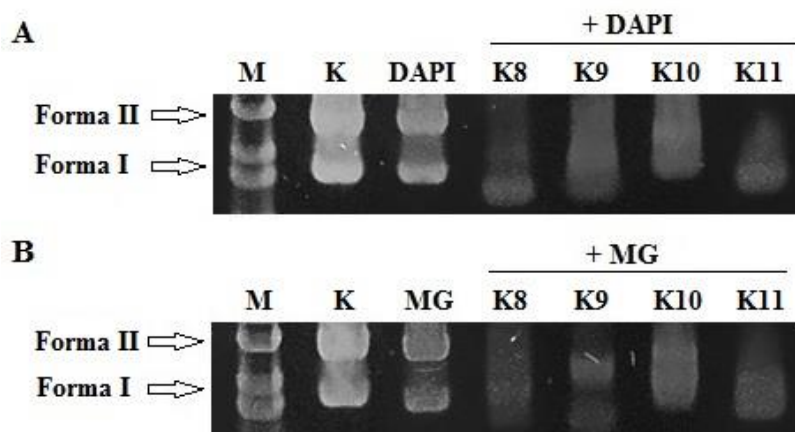
Slika 44. Analiza interakcije (A) benzamidnih liganada (**L4**, **L5**) i (B) rutenijum(II)-arena (**RA1**, **RA2**) sa DNK pHOT-1 plazmida elektroforezom na agaroznom gelu. M: marker; K: kontrola, DNK pHOT-1 plazmida

Rezultati inkubacije kompleksa **K8-K11** sa plazmidnom DNK su pokazali da pri koncentraciji od 200 μM , kompleksi ne dovode do promena u elektroforetskoj pokretljivosti plazmidne DNK. Međutim, viša koncentracija kompleksa (400 μM) uzrokuje pojavu različitih kompleks-specifičnih

promena u mobilnosti DNK traka (Slika 45). Kompleks **K8** dovodi do formiranja „razvučene” trake, slabo definisanih ivica i slabog intenziteta, koja se uočava nešto iznad superspiralizovane forme I. Kompleksi **K9** i **K10** uzrokuju relaksaciju i odmotavanje superspiralizovane forme I, što dovodi do pomeraja ove trake bliže formi II i formiranja jedne trake od spojenih formi I i II, u vidu „razvučene” trake. Suprotno, kompleks **K11** uzrokuje pojavu jedne trake, izuzetno slabog intenziteta, koja premašuje mobilnost forme I, što ukazuje na dodatnu spiralizaciju i kondenzaciju plazmidne DNK, a u skladu je sa istim ponašanjem polaznog kompleksa **RA2**. Ispitivanje interakcije kompleksa **K8-K11** (400 μ M) sa plazmidnom DNK prethodno inkubiranom u prisustvu DNK-vezujućih agenasa DAPI i MG je pokazalo da kompleksi ne dovode do uočljivih promena u pokretljivosti DNK traka (Slika 46A i B), u odnosu na promene zabeležene na Slici 45, izuzev pojave traka slabijeg intenziteta.



Slika 45. Analiza interakcije rutenijum(II)-arenskih kompleksa (**K8-K11**) sa DNK pHOT-1 plazmida elektroforezom na agaroznom gelu. M: marker; K: kontrola, DNK pHOT-1 plazmida



Slika 46. Analiza interakcije rutenijum(II)-arenskih kompleksa (**K8-K11**) sa DNK pHOT-1 plazmida u prisustvu (A) DAPI ili (B) MG (metil zeleno) elektroforezom na agaroznom gelu. M: marker; K: kontrola, DNK pHOT-1 plazmida

5. DISKUSIJA

Veliki uspeh platinskih kompleksa, posebno cisplatine, u lečenju tumora je pokrenuo istraživanja kompleksa drugih metala koji pokazuju manju opštu toksičnost i veću antitumorsku aktivnost, uključujući selektivnu citotoksičnost za ćelije kancera. Iako su se mnoga neorganska jedinjenja pokazala kao veoma uspešni dijagnostički i terapijski agensi, široka upotreba jona teških metala i njihovih kompleksa je generalno ograničena toksičnim efektima (Reedijk, 1999). Jedinjenja na bazi rutenijuma su se pokazala kao najperspektivnija u potrazi za novim potencijalnim hemioterapeutskim agensima, upravo zbog specifične hemijske prirode jona rutenijuma koja omogućava: formiranje koordinacionih jedinjenja sa oktaedarskom geometrijom, postojanje više stabilnih oksidacionih stanja u fiziološkim uslovima, sporu kinetiku izmene liganada i sposobnost vezivanja za različite biološke molekule unutar i van ćelije (DNK, RNK, proteini) (Levina, Mitra and Lay, 2009). U prethodne četiri decenije, veliki broj strukturno različitih familija rutenijumskih kompleksa je sintetisan i hemijski okarakterisan, pri čemu su mnogi kompleksi ispoljili znatnu citotoksičnu/antiproliferativnu aktivnost prema različitim tipovima tumorskih ćelija *in vitro*, aktivnost prema tumorskim ćelijama rezistentnim na cisplatinu, kao i sposobnost da inhibiraju rast primarnog tumora i/ili tumorskih metastaza *in vivo* (Poynton *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2017; Alessio and Messori, 2019). Do danas su svega tri rutenijumska kompleksa ušla u kliničke studije: NAMI-A, KP1019/KP1339 i TLD1433. NAMI-A i KP1019/KP1339 pripadaju familiji Ru(III) kompleksa, koji i pored sličnosti u strukturi ispoljavaju različit antitumorski potencijal (antimetastatska aktivnost (NAMI-A) ili aktivnost prema primarnom tumoru (KP1019/KP1339)). TLD1433 pripada familiji Ru(II)-polipiridinskih kompleksa sa velikim potencijalom u PDT tumora kao foto-osetljivi agens (Thota *et al.*, 2018). Posebno zanimljivu potklasu jedinjenja baziranih na rutenijumu čine kompleksi sa arenima, koji ih čine lipofilnim, olakšavajući ulazak u ćeliju. Ovakvi rutenijum(II)-arenski „polu-sendvič“ kompleksi pružaju višestruke mogućnosti za strukturne modifikacije i optimizacije koje bi doprinele povećanju antitumorske aktivnosti i specifičnosti za određenu biološku metu (Biersack, 2016).

S obzirom da je kancer kompleksno oboljenje, lekovi koji istovremeno deluju na više puteva prenosa signala povezanih sa kancerom, odnosno na dve ili više ćelijskih meta, mogu pokazati veću efikasnost i smanjiti mogućnost pojave rezistencije u poređenju sa lekovima koji ciljaju jednu biološku metu. Terapija lekovima koji ciljaju više ćelijskih meta istovremeno se već dugo koristi u kliničkoj praksi u formi koktela ili u formi više-komponentnih lekova koji sadrže dva ili više pojedinačnih lekova inkapsuliranih u jednu tabletu. Međutim, kombinovana terapija može da dovede do neželjenih efekata zbog kompleksne farmakokinetike, poteškoća u definisanju parametara biodistribucije i nepredvidivih interakcija među samim lekovima koje mogu uzrokovati loš odgovor pacijenta na terapiju. U tom smislu, s obzirom na kompleksnost bolesti, smatra se da bi primena lekova koji predstavljaju jedinstveni hemijski entitet sa polifarmakološkim svojstvima i sadrže jednu ili više bioaktivnih farmakofora koje interaguju sa više ciljnih molekula, mogla pokazati brojne prednosti u hemioterapiji kancera u odnosu na monoterapiju i terapiju kombinacijom lekova (Proschak, Stark and Merk, 2019). Prednosti se ogledaju pre svega u nižem riziku od nepovoljnih interakcija između pojedinačnih komponenti kombinovane terapije, zatim u pojednostavljenom metabolizmu, olakšanom transportu, kao i u smanjenim troškovima istraživanja i razvoja ovakvog tipa kandidata za antitumorske lekove. Ovakvi pojedinačni agensi sa više meta (eng. *Single-molecule-multiple-target*) (Zheng *et al.*, 2017), označeni i kao hibridni molekuli, su privukli dosta pažnje i pokazuju veliki potencijal za buduća istraživanja i razvoj nove generacije efikasnih antitumorskih lekova. Uvođenjem bioaktivnog liganda sa poznatom ili bar željenom biološkom metom u kompleks sa jonom nekog metala može se poboljšati potencijal obe komponente i povećati specifičnost, a samim tim i efikasnost kompleksa, a ujedno i smanjiti mogućnost *off-target* aktivnosti. Očekuje se da postojeće farmakofore unutar hibridnog molekula zadržavaju svoje individualne aktivnosti i da deluju sinergistički u ostvarivanju jačeg efekta, dok je moguće da hibridni kompleks pokaže aktivnost i prema nekoj drugoj, nezavisnoj ćelijskoj meti. Dizajniranje različitih kombinovanih molekula sa bioaktivnim ligandima vezanim za stabilizovani rutenijum(II)-aren pruža mogućnost postizanja veće aktivnosti i selektivnosti prema tumorskim ćelijama. Obećavajući potencijal ove klase jedinjenja je pokazan na primeru nekoliko racionalno dizajniranih hibridnih rutenijumskih kompleksa koji sadrže vezane biološki aktivne ligande, poput inhibitora enzima P450, inhibitora

glutation-S-transferaze ili ligande koji ciljaju specifično steroidne receptore, kao i receptore za epidermalni faktor rasta (Golbaghi and Castonguay, 2020). Rutenijum(II)-polipiridinski kompleksi su tokom godina privukli dosta pažnje, kao posebna grupa kompleksa rutenijuma, upravo zbog sposobnosti da ostvaruju različite tipove interakcija sa DNK i specifičnih mehanizama antitumorskog dejstva, kao i mogućnosti da se koriste za vizualizaciju i bojenje ćelija.

Prethodno je u Laboratoriji za farmakologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije ispitan antitumorski potencijal više različitih serija rutenijum(II)-arenskih kompleksa koji sadrže strukturno različite ligande *in vitro*, pri čemu su se mnogi kompleksi izdvojili po značajnom antiproliferativnom, antimetastatskom i antiangiogenom potencijalu, kao i po sposobnosti da se vežu za DNK i dovedu do zaustavljanja ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa i apoptoze (Ivanović *et al.*, 2011; Gligorijević *et al.*, 2012; Nikolić *et al.*, 2015, 2016; Jovanović *et al.*, 2016; Savić *et al.*, 2020). Stoga su dalja istraživanja nastavljena u pravcu razvoja sličnih struktura sa Ru(II)-arenskom osnovom i ispitivanja mehanizma dejstva *in vitro*.

Ispitivanje aktivnosti ukupno jedanaest novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa (**K1-K11**), razvrstanih u tri grupe (na osnovu tipa bioaktivnog liganda i arenskog dela kompleksa) sprovedeno u ovoj disertaciji na modelu *in vitro*, je pokazalo značajan antitumorski potencijal pojedinačnih predstavnika ove tri grupe, ali i specifičnost kada je mehanizam delovanja i tip kancerskih ćelija u pitanju.

5.1. Antitumorski potencijal rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa NSAIL (kompleksi **K1-K4**)

Antiproliferativna aktivnost prve grupe rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa vezanim NSAIL (**K1**=K[Ru(η^6 -*p*-cimen)(**L1**)Cl₂]; **K2**=(NH₄)[Ru(η^6 -*p*-cimen)(**L2**)Cl₂]; **K3**=K[Ru(η^6 -toluen)(**L1**)Cl₂]; **K4**=(NH₄)[Ru(η^6 -toluen)(**L2**)Cl₂]) je ispitana na humanim tumorskim ćelijama K562, A549 i MDA-MB-231 i na normalnim (netumorskim) ćelijama MRC-5. Rezultati kolorimetrijskog MTT testa su pokazali da sva četiri kompleksa ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost na svim testiranim ćelijskim linijama u ispitanom opsegu koncentracija do 300 μ M. Uprkos što su sami ligandi, indometacin (**L1**) i mefenaminska kiselina (**L2**), pokazali slabiju antiproliferativnu aktivnost (najniža IC₅₀=143,9 μ M (**L2**, K562)), uvođenje NSAIL u strukturu rutenijum(II)-arenskog kompleksa je povoljna strukturna promena koja dovodi do znatnog povećanja antiproliferativne aktivnosti rezultujućih kompleksa, što se posebno uočava na primeru kompleksa **K1** (IC₅₀=22 \pm 3,6 μ M) i **K3** (IC₅₀=26 \pm 1,7 μ M) sa indometacinom kao ligandom. Ovaj efekat je primećen i na primeru drugih hibridnih Ru-NSAIL kompleksa, koji su ispoljili primetnu aktivnost u humanim ćelijskim linijama kancera dojke i ovarijuma (Păunescu *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2020). Mandal i saradnici su na primeru serije rutenijum(II)-cimenskih kompleksa sa vezanim NSAIL ligandima različite strukture (diklofenak, ibuprofen, naproksen i aspirin) pokazali da izuzev Ru-aspirin kompleksa, ostala tri kombinovana molekula ispoljavaju veći antiproliferativni potencijal u odnosu na njihove polazne slobodne NSAIL ligande (Mandal *et al.*, 2018). Važno je naglasiti da su sva četiri tipa konstruisanih hibridnih molekula u pomenutoj studiji ispoljila veću sposobnost inhibicije enzima COX-2 *in vitro*, u odnosu na slobodne NSAIL. Autori su ovu pojavu objasnili većim afinitetom Ru-NSAIL kompleksa za vezivanje za COX-2, kao i formiranjem dodatnih interakcija sa aminokiselinskim ostacima enzima preko rutenijuma, što je ukazalo na potencijalnu sposobnost ovako kombinovanih molekula da deluju na više ćelijskih ciljeva. Poznato je da mnogi NSAIL različite hemijske strukture, poput indometacina, ibuprofena i aspirina, ispoljavaju antitumorsko dejstvo tek pri relativno visokim koncentracijama (u milimolima), što znatno ograničava njihovu farmakološku upotrebu kao antitumorskih lekova (Tsuji *et al.*, 1998; Ogino and Minoura, 2001; Neumann *et al.*, 2014). Jedno od objašnjenja za slabu antitumorsku aktivnost pojedinih NSAIL se odnosi na činjenicu da su pri neutralnom (fiziološkom) pH ovi lekovi prisutni u monoanjonskoj formi koja onemogućava efikasnu akumulaciju u tumorskim ćelijama. Stoga, konstruisanje Ru-NSAIL konjugata je bazirano na premisi da će vezivanje NSAIL za polazni rutenijum(II)-arenski kompleks rezultovati u simultanom oslobađanju unutar ćelije dva antiproliferativna agensa koja deluju različitim mehanizmima na različite ćelijske mete (Pathak *et al.*, 2014). Pokazano je da hibridni metal-NSAIL kompleksi poseduju molekulska svojstva različita od

polaznih NSAIL liganada, kao i niz bioloških aktivnosti koje ne ispoljavaju individualne komponente kompleksa. Stoga, ukoliko ovakav kombinovani molekul ostane nepromenjen u biološkom medijumu (odnosno ne podlegne hidrolizi na sastavne komponente), velika je verovatnoća da će biološka meta metal-NSAIL kompleksa biti drugačija od mete polaznog NSAIL liganda. Predrasude prema kompleksima na bazi metala najviše potiču od ideje da se ovakva jedinjenja ponašaju na isti način kao i individualni jon metala koji gradi kompleks i koji, kada se primeni kao nezavisni entitet pokazuje biološku toksičnost bez osvrtnja na činjenicu da koordinacija jona metala može potpuno promeniti hemijska svojstva kompleksa, a stoga i njegove biološke efekte i toksičnost (Banti and Hadjidakou, 2016).

Na osnovu dobijenih IC_{50} vrednosti za ispitivane komplekse **K1-K4** i uvidom u vezu između strukture i aktivnosti kompleksa, uočava se da veći doprinos antiproliferativnim efektima ima tip pridruženog NSAIL molekula (bioaktivnog liganda) u odnosu na tip pridruženog arenskog liganda (cimen ili toluen). Kompleksi su generalno pokazali veću selektivnost prema testiranim tumorskim ćelijama u odnosu na MRC-5 ćelije, što predstavlja dobar preduslov za dalje ispitivanje molekulskih mehanizama dejstva novog potencijalnog antitumorskog agensa. Kao najsenzitivnije su se pokazale ćelije hronične mijeloidne leukemije, K562, čija je senzitivnost na komplekse **K1** i **K3** u nivou senzitivnosti na cisplatinu. Od interesa, ćelije trostruko-negativnog karcinoma dojke, MDA-MB-231, su se pokazale senzitivnijim na dejstvo kompleksa **K1** i **K3** u odnosu na cisplatina-rezistentne A549 ćelije nesitnoćelijskog karcinoma pluća. Vezivanje indometacina za rutenijum(II)-arenski deo doprinosi približno deset puta većoj aktivnosti kompleksa **K1** i **K3** u MDA-MB-231 ćelijama, dok je aktivnost kompleksa **K2** i **K4** svega dva puta veća u odnosu na aktivnost koju ispoljava mefenaminska kiselina kao individualni agens. Trostruko-negativne ćelije karcinoma dojke, kao što su MDA-MB-231 ćelije, karakteriše visoki metastatski potencijal i složena genetička i fenotipska priroda, poput prisustva mutacije u genu za tumor supresorski protein p53 i odsustva ER, PR i HER2/neu receptora. Približno 10-20% svih dijagnostikovanih karcinoma dojke pripada trostruko-negativnom podtipu (Al-Mahmood *et al.*, 2018). Odsustvo efikasnosti hormonske terapije i terapije koja specifično cilja HER2 biomarker, kao i nedostatak drugih specifičnih molekulskih meta za efektivnu terapiju zahteva razvoj različitih terapijskih pristupa u lečenju trostruko-negativnog karcinoma dojke (Bianchini *et al.*, 2016; Al-Mahmood *et al.*, 2018). Uprkos kratkoročnim i dugoročnim rizicima povezanim sa hemioterapijom, ovaj vid antitumorske terapije je esencijalan u lečenju karcinoma dojke, posebno karcinoma dojke u kasnom stadijumu, metastatskog ili trostruko-negativnog karcinoma dojke. Iako pacijenti sa hormon-pozitivnim karcinomom dojke imaju veliki benefit od hormonske terapije, pokazano je da upotreba kombinovane hemioterapije i hormonske terapije može značajno povećati preživljavanje pacijenata sa ER(+) karcinomom dojke (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2005). Mnogi rutenijumski kompleksi su pokazali značajnu aktivnost u različitim modelima karcinoma dojke *in vitro*, što je otvorilo vrata za novo polje istraživanja, a tiče se dizajniranja novih kompleksa na bazi rutenijuma kao potencijalnih hemioterapijskih agenasa za tretman različitih tipova karcinoma dojke (Bergamo *et al.*, 2008; Nhukeaw *et al.*, 2014, 2019; Golbaghi and Castonguay, 2020). Nekoliko studija je pokazalo da je povišena ekspresija COX-2 enzima povezana sa parametrima agresivnog karcinoma dojke, poput porasta u veličini tumora, prisustva metastaza u aksilarnim limfnim čvorovima, kao i pozitivnog HER2 statusa. Ovakve COX-2-zavisne tumore dojke karakteriše odsustvo sposobnosti pokretanja apoptotske ćelijske smrti, kao i povećana angiogeneza i invazivnost tumorskih ćelija, što sve doprinosi rastu tumora. Istraživanja su pokazala da NSAIL pored uloge u lečenju kancera dojke, mogu imati i značajnu ulogu u njegovoj prevenciji (Howe *et al.*, 2001; Arun and Goss, 2004).

Za dalja ispitivanja molekulskih mehanizama antiproliferativnog dejstva su kao vodeći kompleksi odabrani **K1** i **K3**, sa zajedničkim bioaktivnim ligandom (indometacin), na modelu trostruko-negativnih ćelija karcinoma dojke MDA-MB-231, koje su ispoljile značajnu senzitivnost. Dodatni razlog za odabir kompleksa **K1** i **K3**, koji se razlikuju u tipu pridruženog arenskog liganda (cimen u **K1** i toluen u **K3**), je u tome što su u MTT testu kompleksi pokazali vrlo slične IC_{50} vrednosti (22 μ M odnosno 26 μ M), što je od interesa za dalje ispitivanje povezanosti strukture sa aktivnošću i uticaja malih varijacija u strukturi na biološku aktivnost kompleksa.

Dobro je poznato da je progresija ćelija kroz faze ćelijskog ciklusa strogo uređen i regulisan proces koji uključuje više kontrolnih tačaka. Ove kontrolne tačke reaguju na različite faktore rasta i signalne molekule u ćelijama. U odgovoru na oštećenje DNK, kontrolne tačke uzrokuju odlaganje ili zaustavljanje ćelijskog ciklusa, u kritičnim momentima pre ili tokom replikacije DNK (G1-S kontrolna tačka i S kontrolna tačka) i pre mitoze (G2-M kontrolna tačka) (Nhukeaw *et al.*, 2014). Rezultati sortiranja ćelija na osnovu faza ćelijskog ciklusa, nakon 24 h tretmana, su pokazali da kompleksi **K1** i **K3** dovode do drugačijih koncentraciono-zavisnih promena u ćelijskom ciklusu MDA-MB-231 ćelija u odnosu na cisplatinu, dok razlike među samim kompleksima nisu od većeg značaja. Pri nižim, subtoksičnim koncentracijama ($0,5 \times IC_{50}$), cisplatinu i kompleksi pokazuju jedva приметnu interferenciju sa ćelijskim ciklusom; cisplatinu uzrokuje neznatno nakupljanje ćelija zaustavljenih u G1 fazi, dok kompleksi uzrokuju neznatno nakupljanje ćelija sa zastojem u G2-M kontrolnoj tački. Međutim, viša koncentracija kompleksa (IC_{50}) dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u S fazi i nakupljanja tzv. Sub-G1 populacije ćelija. Drugačiji profil raspodele ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana nižom i višom koncentracijom kompleksa **K1** i **K3** je posledica toga što pri višoj koncentraciji kompleksa dolazi do intenzivnog oštećenja DNK koje uzrokuje zaustavljanje ćelijskog ciklusa u S fazi, čime se obustavlja replikacija DNK i progresija ćelija kroz naredne faze ćelijskog ciklusa, dok se nastala oštećenja DNK ne poprave mehanizmom isecanja nukleotida. Formiranje Sub-G1 ili hipodiploidnog pika se smatra „zaštitnim znakom“ ćelija sa fragmentisanom DNK koje su podlegle apoptozi (Huang *et al.*, 2005). Masovno nakupljanje ćelija u hipodiploidnom regionu ukazuje da kompleksi dovode do DNK lezija koje se nagomilavaju i čiju popravku ćelija ne može da izvrši, što za posledicu ima aktivaciju apoptotske ćelijske smrti. Za cisplatinu je i ranije pokazano da 1,2-d(GpG) adukti koje formira sa DNK uzrokuju DNK lezije koje dovode do zaustavljanja ćelija ne samo u S fazi i inhibiciju replikacije DNK, već i do zaustavljanja ćelija u G1 i G2-M kontrolnim tačkama, zavisno od doze i trajanja tretmana (Ormerod, Orr and Peacock, 1994; Wang and Lippard, 2005; Todd and Lippard, 2009). Potencijal različitih jona metala koordinisanih sa NSAIL da oštećuju DNK i dovode do promena u ćelijskom ciklusu tumorskih ćelija je već ranije pokazan (Intini *et al.*, 2017). Intini i saradnici su uspešno sintetisali konjugate Pt(II) sa diklofenakom koji su pokazali potencijal da deluju kao hibridni molekuli koji kombinuju DNK-vezujuća svojstva metalnog centra i antitumorska svojstva NSAIL liganda, što je doprinelo citotoksičnoj aktivnosti kombinovanog molekula na modelu različitih tumorskih ćelijskih linija, senzitivnih i rezistentnih na cisplatinu (Intini *et al.*, 2017). Rezultati ispitivanja uticaja kompleksa **K1** i **K3** na distribuciju MDA-MB-231 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa ukazuju na jasnu sposobnost ova dva kompleksa da uzrokuju oštećenje DNK i zaustave replikaciju, ili putem direktnog vezivanja za DNK ili indirektnim mehanizmima.

Analiza apoptotskog potencijala je pokazala da kompleksi **K1** i **K3** dovode do koncentraciono-zavisnog povećanja udela rano- i kasno-apoptotskih/nekrotskih ćelija. Niža koncentracija kompleksa ($0,5 \times IC_{50}$) preferencijalno uvodi ćelije u apoptozu, u sličnom procentu kao cisplatinu. Međutim, pri višoj koncentraciji (IC_{50}), razlike u sposobnosti cisplatine i kompleksa **K1** i **K3** da pokrenu apoptotsku ćelijsku smrt su izraženije. Dok cisplatinu uzrokuje blagi porast u procentu rano-apoptotskih ćelija, što je potencijalno posledica nemogućnosti ćelija da prevaziđu blok u G2-M kontrolnoj tački ćelijskog ciklusa, kompleksi pokazuju izražen potencijal da indukuju apoptozu MDA-MB-231 ćelija, što se uočava kao pomeraj u raspodeli ćelija na tačkastim dijagramima u pravcu povećanja udela ćelija u Aneksin V-FITC(+)/PI(-) i Aneksin V-FITC(+)/PI(+) kvadrantima. Ukupan procenat rano-apoptotskih i kasno-apoptotskih/nekrotskih ćelija je nakon tretmana kompleksima iznosio $39,21 \pm 0,64\%$ (**K1**) i $31,32 \pm 0,62\%$ (**K3**), što je u saglasnosti sa efektima kompleksa na ćelijski ciklus (nakupljanje Sub-G1 populacije ćelija). Znatno procenat ćelija (preko 20%) je detektovan i u Aneksin V-FITC(-)/PI(+) regionu, karakterističnom za mrtve odnosno potpuno oštećene ćelije sa degradovanim biomolekulima. Ovakvi rezultati ukazuju da kompleksi u kratkom vremenskom periodu nakon tretmana ćelija počinju da ispoljavaju svoje dejstvo i citotoksični potencijal, na koncentraciono-zavisni način.

Prilikom proučavanja molekularnih mehanizama dejstva novih potencijalnih antitumorskih agenasa od velikog je značaja utvrditi koja su ključna mesta njihovog delovanja u ćeliji, odnosno ispitati njihove potencijalne ćelijske mete. Još na primeru cisplatine je postalo jasno da, iako se DNK smatra najvažnijom metom ovog hemioterapeutskega agenasa, svega 1% aplikovane cisplatine interaguje sa

DNK i formira adukte (Jamieson and Lippard, 1999). Antitumorsko dejstvo cisplatine je posledica kompleksnih i višestrukih molekulskih mehanizama pokrenutih interakcijom kako sa nukleusnom DNK, tako i sa mitohondrijalnom DNK, RNK, proteinima, fosfolipidima ćelijske membrane, kao i sa aktinskim filamentima (Gonzalez *et al.*, 2001; Cepeda *et al.*, 2007). Osim toga, sama internalizacija agensa je podatak od velikog značaja prilikom istraživanja novih potencijalnih antitumorskih agenasa, s obzirom da je pored povećanog izbacivanja hemioterapeutika iz ćelije, smanjena internalizacija jedan od čestih mehanizama rezistencije na hemioterapiju. ICP-MS analiza ukupne unutarćelijske akumulacije rutenijuma(II), kao i akumulacije rutenijuma(II) u DNK frakciji i proteinskim frakcijama poreklom iz različitih ćelijskih kompartmenata, nakon 24 h inkubacije MDA-MB-231 ćelija sa kompleksima **K1** i **K3** aplikovanim u subtoksičnim koncentracijama, je pokazala da oba kompleksa uspešno ulaze u ćelije. U odnosu na kompleks **K1**, kompleks **K3** je detektovan u višoj koncentraciji u DNK frakciji, što ukazuje na veću sposobnost ovog jedinjenja za vezivanje za DNK, i u direktnoj je vezi sa većom ukupnom akumulacijom **K3** unutar MDA-MB-231 ćelija. Rezultati ICP-MS analize potvrđuju da kompleksi **K1** i **K3** ispoljavaju određeni afinitet prema izolovanoj genomskoj DNK, potencijalno formirajući DNK lezije ili adukte koje je teže ukloniti, što može biti jedan od razloga koji leži u osnovi antiproliferativnog i citotoksičnog dejstva ovih kompleksa. Potencijalna antitumorska svojstva NSAIL i njihovih kompleksa sa metalima su često povezana sa sposobnosti ovih jedinjenja da se vezuju za DNK (Banti and Hadjikakou, 2016). S obzirom da je većina NSAIL u monoanjonskoj formi pri fiziološkom pH, što sprečava pristup polianjonskoj okosnici DNK, prisustvo jona metala može drastično uticati na pristupačnost metal-NSAIL hibridnog molekula DNK. Dalje, naši rezultati su pokazali da kompleksi **K1** i **K3** generalno ispoljavaju ujednačen afinitet prema proteinima poreklom iz različitih unutarćelijskih frakcija. Nakon ulaska i akumulacije u ćelijama, najviša koncentracija kompleksa **K1** i **K3** (čak više od 56%) je pronađena u frakciji proteina poreklom iz citoplazme, dok je oko 30% kompleksa pronađeno u frakciji proteina poreklom iz ćelijske membrane i membrana organela. Sa druge strane, kompleksi **K1** i **K3** su detektovani u niskom procentu u frakciji proteina koji grade citoskelet (oko 8%), kao i u frakciji solubilnih proteina nukleusa (oko 3%) i proteina nukleusa vezanih za hromatin (oko 1%). Bergamo i saradnici su pokazali da se rutenijum(II)-arenski kompleks RAPTA-T akumulira u znatnoj meri u ćelijskoj membrani MDA-MB-231 ćelija, što omogućava interakciju kompleksa sa adhezivnim proteinima poreklom iz vanćelijskog matriksa i doprinosi ujedno i njegovoj antimetastatskoj aktivnosti (Bergamo *et al.*, 2008). Istraživanja Lee i saradnika su pokazala razliku u distribuciji RAPTA-T u neinvazivnim MCF-7 ćelijama i invazivnim MDA-MB-231 ćelijama, koja je u korelaciji sa antiinvazivnim i antimetastatskim efektima ovog kompleksa (Lee *et al.*, 2017). Za RAPTA-T je, kao i za rutenijum(III) kompleks NAMI-A, otkriveno da može ciljano interagovati sa integrinima, stoga bi modulacija integrina i drugih proteina ćelijske membrane mogla predstavljati atraktivan pristup u selektivnoj kontroli tumora sa agensima na bazi metala. Dodatno, Sonkar i saradnici su sintetisali nekoliko kombinovanih Ru(II)-cimen-NSAIL kompleksa, za koje su pokazali da ispoljavaju znatan antimigratorni potencijal prema MCF-7 ćelijama (Sonkar *et al.*, 2020). Ovi podaci ukazuju na značaj ciljanja molekula u ćelijskoj membrani prilikom dizajniranja novih kompleksa metala sa potencijalnim antimetastatskim efektima. Osim toga, podaci iz literature govore u prilog činjenici da farmakokinetička svojstva NSAIL mogu biti usko povezana sa sposobnosti ovih lekova da interaguju sa fosfolipidima u biološkim membranama i na taj način utiču na promenu propustljivosti membrana (Pereira-leite, Nunes and Reis, 2013), što ukazuje da efekti na nivou ćelijske membrane mogu predstavljati dodatni mehanizam aktivnosti i citotoksičnosti ispitivanih Ru-NSAIL kompleksa **K1** i **K3**. Na primeru Ru(II)-cimenskih kompleksa sa derivatima oksikama je pokazano da je citotoksičnost kompleksa na MDA-MB-231 ćelijama u direktnoj vezi sa lipofilnošću kompleksa (Aman *et al.*, 2014). Alves Rico i saradnici su razvili efikasan sistem koji pospešuje internalizaciju agensa i povećava antitumorski potencijal *in vitro* i *in vivo*, dizajniranjem dirutenijumskih kompleksa konjugovanih sa NSAIL i inkapsuliranih u lipidne nanočestice, koje omogućavaju primenu u vidu intravenozne injekcije (Alves Rico *et al.*, 2017). Uprkos visokim IC₅₀ vrednostima (>200 μM), inkapsulacija Ru-NSAIL kompleksa je dovela do znatnog povećanja citotoksične aktivnosti u MDA-MB-231 ćelijama, u poređenju sa polaznim komponentama i nekapsuliranim Ru-NSAIL kompleksom, što ukazuje na izvestan doprinos jona rutenijuma antitumorskoj aktivnosti NSAIL. *In vivo* studija na ortotopnom modelu mišjeg tumora dojke je pokazala

visoku akumulaciju Ru-NSAIL nanopartikula u tumorskom tkivu, što opravdava razvoj ovakvog tipa hibridnih molekula u svrhu tretmana trostruko-negativnog karcinoma dojke (Alves Rico *et al.*, 2017).

Rezultati naših ispitivanja ukazuju da kompleksi **K1** i **K3** ispoljavaju afinitet ka različitim ćelijskim metama, ne samo DNK, već i ka proteinima, poreklom pre svega iz citoplazme i ćelijske membrane i membrana organela MDA-MB-231 ćelija. Rezultati ICP-MS analize su u saglasnosti sa rezultatima MTT testa – antiproliferativna aktivnost kompleksa je u pozitivnoj korelaciji sa ukupnom koncentracijom kompleksa prisutnih unutar ćelija nakon tretmana, kao i sa nivoom kompleksa vezanih za DNK i proteine u ćelijskim kompartmentima. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima ispitivanja aktivnosti drugih rutenijum(II)-arenskih kompleksa u ćelijama hormon-pozitivnog i trostruko-negativnog karcinoma dojke (Golbaghi *et al.*, 2019; Nhukeaw *et al.*, 2019). Može se zaključiti da kompleksi **K1** i **K3** ispoljavaju isti molekulski mehanizam dejstva u MDA-MB-231 ćelijama, pri čemu male razlike u strukturi ovih kompleksa (cimenski ili toluenski ligand) ne doprinose u primetnoj meri razlikama u antitumorskoj aktivnosti ova dva kompleksa. Očigledno je da je za antitumorsku aktivnost kompleksa **K1** i **K3** na trostruko-negativnim ćelijama karcinoma dojke prvenstveno zaslužan indometacin kao bioaktivni ligand dok rutenijum(II)-arenski deo dodatno doprinosi lipofilnosti kompleksa i transportu kompleksa u ćelije.

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem antitumorske aktivnosti kompleksa **K1** i **K3** *in vitro*, može se zaključiti da NSAIL konjugovani za rutenijum(II)-arene predstavljaju perspektivnu klasu hibridnih molekula sa jedinstvenim antitumorskim potencijalom prema humanim ćelijama trostruko-negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231, koji je rezultat kombinacije efekata NSAIL i rutenijum(II)-arenskog dela.

5.2. Antitumorski potencijal rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa polipiridinom (kompleksi **K5-K7**)

Druga grupa rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa polipiridinskim ligandom (**K5**= $[\text{Ru}(\eta^6\text{-benzen})(\text{L3})\text{Cl}]\text{PF}_6$; **K6**= $[\text{Ru}(\eta^6\text{-toluen})(\text{L3})\text{Cl}]\text{PF}_6$; **K7**= $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}i\text{-cimen})(\text{L3})\text{Cl}]\text{PF}_6$) je dizajnirana tako da svaki od tri kompleksa predstavlja kombinovani molekul sa zajedničkim aromatičnim ligandom na bazi polipiridina (**L3**=pirido[2',3':5,6]pirazin[2,3-f][1,10]fenantrolin), dok se kompleksi međusobno razlikuju u tipu pridruženog arenskog liganda (benzen, toluen ili cimen). Kako bi se ispitalo uticaj malih varijacija u strukturi kompleksa na njihovu aktivnost i dobio bliži uvid u mehanizam dejstva kompleksa, antiproliferativna aktivnost kompleksa **K5-K7** je ispitana na humanim tumorskim ćelijama A549, A375, LS 174T, MCF-7 i MDA-MB-453 i na normalnim (netumorskim) ćelijama MRC-5. Rezultati MTT testa su pokazali da kompleksi ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost prema testiranim ćelijskim linijama u mikromolarnom opsegu koncentracija (do 196,9 μM), pri čemu je aktivnost kompleksa između ćelijskih linija (izuzev MCF-7 ćelija) konzistentna – kompleks **K7** je pokazao veću aktivnost u odnosu na komplekse **K5** i **K6**. Može se zaključiti da aktivnost ovog tipa rutenijum(II)-arenskih kompleksa zavisi od tipa pridruženog arenskog liganda, i da je u sledećem odnosu: cimen > toluen > benzen, što je pokazano i na primeru drugih rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa ligandima na bazi polipiridina (Nikolić *et al.*, 2016). Poznato je da upravo priroda arenskog liganda može imati veliki uticaj na internalizaciju kompleksa, kao i na interakcije sa potencijalnim ćelijskim metama (Yan *et al.*, 2005). Sa druge strane, sam polipiridinski ligand (**L3**) je ispoljio ujednačenu aktivnost prema svim testiranim ćelijskim linijama, koja je veća od aktivnosti rezultujućih rutenijumskih kompleksa i cisplatine, ukazujući na odsustvo selektivnosti u dejstvu liganda i prisustvu izuzetne citotoksične aktivnosti ovog jedinjenja. Istraživanja Valladolid i saradnika su pokazala da pojedini interkalirajući ligandi na bazi fenantrolina mogu ispoljiti veću citotoksičnu aktivnost prema tumorskim ćelijskim linijama u odnosu na to kada su koordinisani za rutenijum(II)-aren (Valladolid *et al.*, 2014). Međutim, naši rezultati su pokazali da uvođenje liganda **L3** u kompleks sa Ru(II)-arenom, doprinosi selektivnosti rezultujućih kompleksa **K5-K7** prema tumorskim ćelijama u odnosu na MRC-5 ćelije. Najveću selektivnost u antiproliferativnom dejstvu je ispoljio kompleks **K7** prema ćelijama humanog malignog melanoma A375 ($\text{IC}_{50}=15,8\pm 2,7 \mu\text{M}$), koje su se pokazale više od četiri puta senzitivnijim na dejstvo **K7** u odnosu na MRC-5 ćelije. S obzirom da su najveće razlike u aktivnosti kompleksa uočene upravo na primeru A375 ćelija (kompleks

K7 aktivniji od kompleksa **K5** i **K6** čak više od šest puta), može se zaključiti da je prisustvo *p*-cimena u strukturi kombinovanog molekula povoljna strukturna promena koja doprinosi selektivnoj aktivnosti **K7** na A375 ćelijama. Dodatno, na osnovu rezultata MTT testa uočava se i postojanje razlika u senzitivnosti dve ćelijske linije kancera dojke, MCF-7 i MDA-MB-453, na dejstvo kompleksa **K5-K7**. Trostruko-negativne MDA-MB-453 ćelije su pokazale ujednačenu senzitivnost na sva tri kompleksa, sa IC₅₀ vrednostima oko 20 μM. Sa druge strane, hormon-zavisne MCF-7 ćelije su pokazale generalno tri puta manju senzitivnost na komplekse u odnosu na MDA-MB-453 ćelije. Očigledno je da osim strukture, aktivnost kompleksa zavisi kako od genetičkih, tako i fenotipskih karakteristika testiranih tumorskih ćelijskih linija. U skladu sa ovakvim rezultatima, za dalja ispitivanja molekulskih mehanizama dejstva na A375 ćelijama je odabran kompleks **K7** kao vodeće jedinjenje. A375 ćelije karakteriše specifičan genetički profil koji podrazumeva prisustvo mutacije u *BRAF* genu (B-Raf proto-onkogen, serin/treonin kinaza) (Sapkota, Hill and Pollack, 2013). Većina *BRAF*-mutiranih melanoma inicijalno pokazuje dobar odgovor na terapiju klinički odobrenim BRAF V600 inhibitorima, koji prvenstveno ciljaju ovaj mutirani gen i obezbeđuju produženo preživljavanje pacijenata bez progresije bolesti (Sosman *et al.*, 2012). Međutim, dugoročna efikasnost BRAF inhibitora je ograničena usled pojave rezistencije, što ukazuje na potrebu za dodatnim terapijskim pristupima (Acquaviva *et al.*, 2014).

Mikroskopska analiza je pokazala da A375 ćelije zadržavaju vijabilitet i sposobnost deobe tokom 72 h u prisustvu **K7**, pri čemu je vreme potrebno za dupliranje broja ćelija produženo pod tretmanom. Imajući u vidu rezultate MTT testa i nisku IC₅₀ vrednost kompleksa **K7** na A375 ćelijama, može se pretpostaviti da ovaj rutenijum(II)-arenski kompleks utiče na mitohondrije i da ispoljava određene efekte na metabolizam A375 ćelija. Analizom A375 ćelija na protočnom citofluorimetru nakon bojenja PI uočava se da kompleks **K7** ne interferira sa ćelijskim ciklusom, s obzirom da ni povišenje koncentracije **K7** ni produženje inkubacije ćelija sa **K7** nisu doveli do uočljivih promena u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Istovremeno, pod istim eksperimentalnim uslovima, cisplatina je ispoljila sposobnost da utiče na progresiju A375 ćelija kroz faze ćelijskog ciklusa na koncentraciono- i vremenski-zavisan način. Kratko vreme (24 h) inkubacije ćelija sa cisplatinom uzrokuje koncentraciono-zavisno zaustavljanje ćelija u replikativnoj fazi (S faza) ćelijskog ciklusa, koje je prolaznog karaktera, i ćelije koje uspeju da prevaziđu oštećenje DNK, nastavljaju u narednu fazu ćelijskog ciklusa (Wang and Lippard, 2005). Duže izlaganje ćelija dejstvu cisplatine (48 h) dovodi do zaustavljanja ćelija u G2-M kontrolnoj tački ćelijskog ciklusa. Ćelije koje ne uspeju da izvrše reparaciju DNK tokom S ili G2 faze ćelijskog ciklusa, odnosno pre mitoze, podležu procesu ćelijskog umiranja, i uočavaju se u vidu hipodiploidnog ili Sub-G1 pika. Smatra se da je zaustavljanje ćelija u G2 fazi ćelijskog ciklusa u korelaciji sa citotoksičnošću cisplatine i da prethodi pokretanju procesa ćelijske smrti nakon tretmana cisplatinom (Sorenson and Eastman, 1988). Ispitivanja aktivnosti rutenijum(II)-cimenskih kompleksa sa aromatičnim ligandom na bazi dipiridofenazina na panelu od nekoliko tumorskih ćelijskih linija različitog porekla su pokazala da uprkos visokoj citotoksičnosti, ovi rutenijumski kompleksi ne dovode do očekivanih promena u ćelijskom ciklusu, poput zaustavljanja ćelija u S fazi ili nakupljanja Sub-G1 populacije ćelija, koji bi ukazali na fragmentaciju DNK, potvrđujući potpuno drugačiji mehanizam dejstva u odnosu na cisplatinu (Savić *et al.*, 2020).

Dalje je pokazano da kompleks **K7** ne dovodi do stimulacije smrti A375 ćelija po tipu apoptoze ili nekroze u ispitivanom opsegu koncentracija i vremena inkubacije (preko 90% ćelija detektovano u Aneksin V-FITC(-)/PI(-) regionu), što ukazuje na odsustvo citotoksičnog potencijala ovog kompleksa u A375 ćelijama malignog melanoma. Nakon 24 h tretmana cisplatinom, kod većine ćelija je zabeležen očuvan integritet ćelijske membrane, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima o efektima cisplatine u A375 ćelijama nakon kratkoročnog tretmana ovim agensom (Radisavljević *et al.*, 2018). Duže vreme inkubacije A375 ćelija sa cisplatinom (48 h), dovelo je do koncentraciono-zavisnog povećanja procenta rano-apoptotskih i kasno-apoptotskih/nekrotskih ćelija, što je u saglasnosti sa rezultatima ćelijskog ciklusa i predstavlja direktnu posledicu nemogućnosti ćelija da prevaziđu blokadu u G2-M kontrolnoj tački i nastave u mitozu. Ovakav rezultat je u saglasnosti i sa ranije pomenutom činjenicom da cisplatina može uzrokovati različite tipove ćelijske smrti u zavisnosti od primenjene doze (Sancho-Martínez *et al.*, 2012). Mikroskopska analiza (svetlosna i fluorescentna mikroskopija) tipova ćelijske smrti dvojnim bojenjem AO/EtBr je dodatno ukazala na slab citotoksični potencijal **K7** u A375 ćelijama – osim

blagog koncentraciono-zavisnog smanjenja gustine ćelija i pojave pojedinačnih apoptotskih ćelija sa očuvanom ćelijskom membranom i kondenzovanim hromatinom (AO(+)/EtBr(-)), kao i pojedinačnih ćelija sa EtBr u nukleusima (tek pri višoj koncentraciji kompleksa), drugi morfološki markeri apoptoze su odsutni. Nakon tretmana cisplatinom, uočeno je koncentraciono-zavisno smanjenje gustine ćelija, pri čemu je većina ćelija izmenjenog morfološkog izgleda. U morfološki mešovitoj populaciji ćelija uočavaju se i ćelije koje su u ranoj i kasnoj fazi apoptoze, kao i već mrtve ćelije, što još jednom potvrđuje rezultate protočne citofluorimetrije i ukazuje na razlike u mehanizmu dejstva između kompleksa **K7** i cisplatine u A375 ćelijama.

Rutenijum(II)-polipiridinski kompleksi ispoljavaju širok spektar aktivnosti, sa IC₅₀ vrednostima u nano- do milimolarnom opsegu, pri čemu većina uzrokuje apoptozu ćelija, dok je za manji broj kompleksa pokazano da indukuju neki od ostalih tipova ćelijske smrti (Zava *et al.*, 2009; Poynton *et al.*, 2017). Imajući u vidu ogromnu raznolikost u molekulskim strukturama rutenijum(II)-polipiridinskih kompleksa sintetisanih do danas, kao i postojanje razlika u unutarćelijskoj lokalizaciji, opisano je više različitih mehanizama dejstva ovakvog tipa kompleksa: narušavanje vezivanja transkripcionih faktora za DNK, zaustavljanje replikacione viljuške, pokretanje ER-stresa i uzrokovanje promena u funkciji mitohondrija, kao najčešći mehanizam (Poynton *et al.*, 2017). Uprkos navedenom, molekulske mete brojnih rutenijum(II)-polipiridinskih kompleksa su i dalje nepoznate. Identifikacija ciljnih biomolekula je jedan od najvažnijih koraka prilikom razvoja novih lekova i pruža važnu informaciju o tome da li će određeni tip kancera odgovoriti na lek, koje doze leka bi bile efikasne i koji bi se potencijalni neželjeni efekti mogli razviti *in vivo*.

Primetno niža unutarćelijska koncentracija **K7** u odnosu na cisplatinu detektovana u tretiranim A375 ćelijama može biti posledica kontinuirane proliferacije A375 ćelija u prisustvu **K7**, sniženog unosa **K7** u ćelije ili povećanog izbacivanja kompleksa iz ćelije. **K7** i cisplatina su pokazali različit afinitet prema proteinima iz specifičnih ćelijskih kompartmenata, pri čemu je cisplatina u najvećoj meri detektovana u membranskoj proteinskoj frakciji, dok je **K7** u približno podjednakoj meri pokazao afinitet prema proteinima poreklom iz membrana i citoplazme. Ovakav rezultat može biti direktna posledica različite reaktivnosti **K7** i cisplatine sa proteinima i drugim unutarćelijskim komponentama. Ispitivani rutenijum(II)-arenski kompleks **K7** poseduje pozitivno naelektrisanje, koje dodatno uz **L3** ligand (pirido[2',3':5,6]pirazin[2,3-f][1,10]fenantrolin) sa interkalirajućim i lipofilnim karakteristikama, može objasniti uočenu unutarćelijsku distribuciju **K7**. Negativno naelektrisane, dvolančana DNK i jednolančana RNK (prisutne u nukleusu i u citoplazmi), kao i membrane ćelijskih organela bogatih lipidima (poput mitohondrija), omogućavaju kompleksu **K7** da ciljano deluje na ove biomolekule ili organele. Zava i saradnici su na primeru serije rutenijum(II)-tris(bipiridil) kompleksa pokazali da promena u bočnim grupama na bipiridinskom ligandu doprinosi razlikama u lipofilnosti kompleksa *in vitro*, pri čemu je najlipofilniji kompleks ujedno pokazao i najveću citotoksičnost i lokalizaciju u regionu ćelijske membrane, dok su ostali kompleksi iz serije koji pokazuju manju lipofilnost i nižu citotoksičnost detektovani predominantno u citoplazmi i organelama. Od interesa, ni jedan od kompleksa iz ove serije nije detektovan u nukleusu tretiranih ćelija (Zava *et al.*, 2009). Akumulacija cisplatine u membranskoj proteinskoj frakciji A375 ćelija je očekivana, s obzirom da je pokazano da cisplatina može interagovati sa proteinima i fosfolipidima ćelijske membrane, redukujući na taj način aktivnost pojedinih jonskih kanala i transportera, kao i sa molekulima u membranama nukleusa i mitohondrija ili sa citoskeletom, sprečavajući polimerizaciju aktina (Sancho-Martínez *et al.*, 2012).

Mitohondrije su ključne organele uključene u regulaciju ćelijskog metabolizma i odgovorne za produkciju energije. Stoga, tumorske ćelije moraju da reprogramiraju metabolizam promenom aktivnosti mitohondrija kako bi zadovoljile povećanu potrebu za energijom i gradivnim blokovima neophodnim za kontinuiranu proliferaciju. Sve veći broj dokaza ukazuje na značaj reprogramiranja mitohondrija za preživljavanje i proliferaciju ćelija melanoma koje sadrže mutaciju u *BRAF* genu, kao što je slučaj sa A375 ćelijama (Corazao-Rozas *et al.*, 2016), što baca novo svetlo na mitohondrije kao ključne ćelijske mete prilikom razvoja potencijalnih terapijskih agenasa sposobnih da efikasno suprimiraju *BRAF*-mutirane ćelije malignog melanoma (Hong *et al.*, 2017). Chen i saradnici su ispitali citotoksičnost serije -OCH₃ ili -NO₂-supstituisanih rutenijum(II)-polipiridinskih kompleksa, pri čemu

su pokazali da upravo pozicija ovih funkcionalnih grupa može uticati na citotoksičnost celog kompleksa (Chen *et al.*, 2010). Autori su pokazali da kompleks koji sadrži ligand na bazi fenantrolina pokazuje citotoksičnost u nivou citotoksičnosti cisplatine i ima sposobnost da direktno cilja mitohondrije, dovodeći do fragmentacije i gubitka mitohondrijalnog membranskog potencijala, i posledično apoptoze A375 ćelija (Chen *et al.*, 2010). Analizom povezanosti strukture kompleksa sa aktivnošću, 1,10-fenantrolin je identifikovan kao farmakofora koja omogućava usmereno dejstvo kompleksa prema mitohondrijama tumorskih ćelija. Ovaj rad predstavlja dobar primer kako suptilna hemijska modifikacija aktivnog liganda može uticati na citotoksična svojstva kompleksa, ukazujući na važnost odnosa između strukture i aktivnosti kompleksa.

Puckett i Barton su ispitivali internalizaciju, kao i lokalizaciju unutar ćelija kancera grlića materice (HeLa) serije rutenijum(II) kompleksa sa različitim polipiridinskim interkalirajućim ligandima, pri čemu su pokazali postojanje korelacije između lipofilnosti kompleksa i njegove akumulacije unutar ćelija – kompleks sa ligandom najveće aromatične površine, $[\text{Ru}(4,7\text{-difenil-1,10-fenantrolin})_2\text{dppz}]^{2+}$, je detektovan u najvišoj koncentraciji unutar ćelija, pri čemu su autori pokazali da se internalizacija kompleksa odvija putem energetski-nezavisnog mehanizma, odnosno pasivnom difuzijom (Puckett and Barton, 2009). Dodatno, pokazano je da uprkos tome što promene u veličini i tipu aromatičnog liganda mogu povećati internalizaciju kompleksa, povećanje hidrofobnosti kompleksa može, takođe, promeniti prirodu interakcija sa ciljnim biomolekulima i lokalizaciju kompleksa unutar ćelije. Uočeno je da se hidrofobniji kompleksi predominantno lokalizuju unutar hidrofobnih membranskih struktura (ćelijske organele), čime se smanjuje verovatnoća da kompleks stigne do nukleusa kao krajnje željene ćelijske mete (Zava *et al.*, 2009; Gill and Thomas, 2012; Gill *et al.*, 2013). Istraživanje antitumorske aktivnosti serije rutenijum(II) kompleksa sa bidentatnim polipiridinskim ligandima ($[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{N}-\text{N})]\text{Cl}_2$, $\text{N}-\text{N}=\text{bpy}$, phen , dppz i dppn) je pokazalo da su internalizacija kompleksa, kao i aktivnost kompleksa u pozitivnoj korelaciji sa aromatičnom površinom koju formiraju bidentatni ligandi, s obzirom da je najveću citotoksičnost prema ćelijskim linijama humanog kancera debelog creva i dojke ispoljio $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppn})]\text{Cl}_2$ kompleks, i da je ta citotoksičnost u nivou citotoksičnosti cisplatine (Schatzschneider *et al.*, 2008). Od posebnog interesa je činjenica da je $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ kompleks iz ispitivane grupe rutenijumskih kompleksa pokazao drastične razlike u aktivnosti u tumorskim ćelijama različitog porekla, uprkos podjednakom nivou akumulacije unutar ispitivanih ćelija. Luo i saradnici su u svojim istraživanjima biološke aktivnosti serije rutenijum(II)-polipiridinskih kompleksa sa diiminskim ligandima pokazali da je planarna površina liganda u korelaciji sa citotoksičnom aktivnošću kompleksa, kao i sposobnosti kompleksa da u A375 ćelijama inhibiraju aktivnost enzima tioredoksin reduktaze, prisutne u mitohondrijama i citoplazmi ćelija, sa važnom ulogom u zaštiti ćelija od oksidativnog stresa i održavanju redoks balansa unutar ćelija (Luo *et al.*, 2014). Autori su došli do zaključka da uočene razlike u senzitivnosti testiranih tumorskih ćelijskih linija na ispitivane rutenijumske komplekse potiču od razlika u profilima ekspresije ćelijskih proteina (Luo *et al.*, 2014). Od interesa je istaći da za KP1019 i KP1339, dva rutenijum(III) kompleksa koja su dospela u kliničke studije, nije pokazano postojanje korelacije između ukupne količine internalizovanog rutenijuma i citotoksičnosti kompleksa (Heffeter *et al.*, 2012).

Ispitivanje mehanizma dejstva kompleksa $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(11,12\text{-dimetildipirido}[3,2\text{-}a:2',3'\text{-}c]\text{fenazin})\text{Cl}]\text{PF}_6$ je pokazalo da ovaj „polu-sendvič“ rutenijum(II)-arenski kompleks ispoljava visoku citotoksičnu aktivnost koja je posledica efikasne akumulacije unutar HeLa ćelija i vezivanja za nukleusnu DNK (Nikolić *et al.*, 2016). Uprkos visokoj citotoksičnosti, pomenuti rutenijum(II)-arenski kompleks nije pokazao sposobnost da dovede do eksternalizacije fosfatidilserina na membrani HeLa ćelija tokom 48 h tretmana, što ukazuje da apoptoza nije osnovni mehanizam kojim ovaj kompleks ispoljava antitumorsko dejstvo na ispitivanom ćelijskom modelu.

Dodatne razlike u dejstvu kompleksa **K7** i cisplatine se uočavaju posmatranjem uticaja ova dva agensa na vijabilitet i rast A375 ćelija organizovanih u 3D strukturu – viševićijski tumorski sferoid. Za razliku od sferoida tretiranih nižom koncentracijom ($3\times\text{IC}_{50}$) kompleksa **K7**, koje tokom četvorodnevno tretmana zadržavaju sposobnost rasta usled očuvanog vijabiliteta ćelija i kontinuirane ćelijske proliferacije, povišenje koncentracije **K7** ($10\times\text{IC}_{50}$) uzrokuje zaustavljanje rasta sferoida,

smanjenje vijabiliteta ćelija, uz pojavu intenzivnog umiranja ćelija lokalizovanih u centralnom regionu sferoida. Ispitivanje vijabiliteta ćelija poreklom iz tretiranih sferoida je potvrdilo slabiju aktivnost kompleksa **K7** u sferoidima u poređenju sa aktivnošću na A375 ćelijama u monosloju (kada se uporede IC₅₀ vrednosti). Ovakav odnos aktivnosti u 2D i 3D model sistemima je primećen i na primeru drugih rutenijum(II) kompleksa sa ligandima na bazi polipiridina, pri čemu je pokazano da se aktivnost rutenijumskog kompleksa na modelu sferoida može znatno poboljšati optimizacijom strukture kompleksa putem uvođenja aromatičnog liganda veće površine (Huang, Zhang, *et al.*, 2015). Drugačija organizacija ćelija i međućelijske veze, kao i razlike u fiziološkim i metaboličkim potrebama ćelija i u dostupnosti hranljivih materija i gasova iz podloge, dodatno doprinose manjoj senzitivnosti sferoida na dejstvo kompleksa **K7**, u odnosu na ćelije u monosloju. Rezultati ukazuju da rutenijum(II)-arenski kompleks **K7** ispoljava ograničenu antiproliferativnu i citotoksičnu aktivnost na 3D modelu A375 sferoida, s obzirom da je pokazao sposobnost da zaustavi rast/redukuje veličinu sferoida tek pri visokim koncentracijama (10xIC₅₀), bez uticaja na kompaktnost sferoida. S obzirom na kompleksnost 3D model sistema i imajući u vidu naše rezultate, dalja istraživanja aktivnosti kompleksa **K7** na modelu A375 sferoida su neophodna, uključujući promenu eksperimentalnih uslova, variranje u koncentraciji i trajanju tretmana, kako bi se preciznije ispitala aktivnost odabranog rutenijum(II)-arenskog kompleksa sa polipiridinskim ligandom. Suprotno, tretman sferoida nižom koncentracijom cisplatine je pokazao da ovaj agens dovodi do zaustavljanja rasta sferoida već nakon 24 h, pri čemu je integritet sferoida očuvan. Međutim, nakon bojenja tretiranih sferoida kalcein-AM/PI, uočeno je da dolazi do dezintegracije sferoida i rasipanja pojedinačnih ćelija ili manjih grupacija od po nekoliko ćelija sa njihove periferije. Ovako dezintegrisani sferoid se sastoji od mešovite populacije živih (kalcein-AM(+)) i mrtvih (PI(+)) ćelija. Može se zaključiti da cisplatina uzrokuje raskidanje međućelijskih veza (i među vijabilnim (kalcein-AM(+)) ćelijama), čime se omogućava dezintegracija sferoida i smanjenje njegove kompaktnosti, što za posledicu ima odvajanje pojedinačnih ćelija ili manjih ćelijskih agregata. Mehanički stimulus u vidu dodavanja fluorescentnih boja je korak koji je samo doprineo uočavanju navedenih efekata cisplatine. Ovaj rezultat ukazuje da osim što cisplatina ispoljava snažne antiproliferativne efekte, koji se ogledaju u sprečavanju daljeg povećanja veličine sferoida nakon tretmana, i očiglednih citotoksičnih efekata (mrtve ćelije obojene PI), cisplatina ispoljava antitumorski efekat na modelu humanih ćelija malignog melanoma destabilišući međućelijske veze.

Bazična istraživanja aktivnosti novih potencijalnih antitumorskih agenasa se najčešće vrše na 2D ćelijskom modelu, odnosno na ćelijskim linijama kultivisanim u vidu monosloja. U poređenju sa 2D ćelijskim modelima, 3D ćelijski modeli mogu obezbediti mikrosredinu koja je sličnija mikrosredini u tumorskom tkivu, što je ključno prilikom ispitivanja novih agenasa, s obzirom da sredinski faktori mogu znatno promeniti ponašanje i osobine tumorskih ćelija, što za uzvrat može uticati na odgovor ćelija na ispitivani agens. Dodatno, veliki broj eksperimentalnih agenasa koji pokažu izvesnu aktivnost na 2D ćelijskim modelima, nisu efikasni u suzbijanju solidnih tumora. 3D ćelijski modeli daju precizniji uvid u funkcionalnu organizaciju ćelija unutar solidnog tumora i međućelijske interakcije, ekspresiju gena, metabolički profil ćelija, razlike u potrošnji nutrijenata i dostupnosti kiseonika i signalnih molekula, kao i uvid u strukturu i sastav vanćelijskog matriksa, aktivaciju određenih puteva prenosa signala kroz ćeliju i mehanizama transporta lekova (Wen *et al.*, 2013). Višećelijski tumorski sferoidi su najčešće korišćeni 3D ćelijski model prilikom ispitivanja novih potencijalnih antitumorskih agenasa. Takođe, sferoidi su našli primenu i kao adekvatan model sistem za praćenje odgovora onkoloških pacijenata na terapiju (Friedrich, Ebner and Kunz-Schughart, 2007). Stanje sferoida zavisi i od njegove veličine, i od specifičnog ponašanja tumorskih ćelija kada su u 3D prostornoj organizaciji, zatim od gustine ćelija i vremena inkubacije u ćelijskoj kulturi (Edmondson *et al.*, 2014). Ćelijska populacija koja gradi sferoid je organizovana u tri koncentrične zone usled postojanja gradijenta hranljivih materija i kiseonika. Ćelije u spoljašnjoj zoni sferoida (100-300 µm) se odlikuju visokom stopom proliferacije i migracije usled konstantnog priliva adekvatne količine kiseonika i nutrijenata iz ćelijskog medijuma. Ćelije u središnjoj zoni sferoida imaju ograničen pristup nutrijentima, što ih forsira da uđu u G0 fazu ćelijskog ciklusa, odnosno u fazu mirovanja. U centralnom regionu sferoida je česta pojava formiranja nekrotskog jezgra (posebno izraženo kod sferoida većih od 600 µm) koje nastaje kao posledica sniženja koncentracije dostupnog kiseonika (hipoksični region) i nutrijenata, kao i akumulacije otpadnih

produkata metabolizma, što dodatno uzrokuje sniženje pH (Pinto *et al.*, 2020). Stoga, veličina sferoida je jedan od važnih činilaca u istraživanjima na višćelijskim tumorskim sferoidima, s obzirom da je u direktnoj korelaciji kako sa funkcijom/aktivnošću ćelija, tako i sa dostupnosti leka svim ćelijama koje čine sferoid (Hamilton and Rath, 2018). Brojne studije sa različitim hemioterapeutskim agensima koji dovode do oštećenja DNK ili interaguju sa mikrotubulama su pokazale manju senzitivnost tumorskih ćelija organizovanih u vidu sferoida na antitumorske lekove (Friedrich, Ebner and Kunz-Schughart, 2007; Fayad *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2013). Wen i saradnici su pokazali da pojava rezistencije sferoida formiranih od ćelija adenokarcinoma pankreasa (PANC-1 i MIA PaCa-2) na primenjene hemioterapeutike (5-fluorouracil i gemcitabin) zavisi od dužine izloženosti sferoida tretmanu, kao i da rezistencija sferoida najverovatnije nije posledica razvoja rezistencije ćelija na lekove već posledica nedovoljne ili odložene raspodele lekova unutar sferoida, što uzrokuje smanjenje sveukupne efikasnosti leka (Wen *et al.*, 2013). Istraživanja su pokazala da je rezistencija na hemioterapeutike veća kod kompaktnih sferoida u odnosu na odgovarajuće ćelije u 2D kulturi, pri čemu verodostojno oslikava rezistenciju koja se javlja u solidnim tumorima, za razliku od ćelijskih linija koje formiraju sferoide male kompaktnosti kod kojih je senzitivnost na hemioterapeutike slična u 2D i 3D kulturi (Wen *et al.*, 2013; Hamilton and Rath, 2018). Fayad i saradnici su pokazali da visoke koncentracije cisplatine dovode do apoptoze ograničene subpopulacije ćelija humanog karcinoma debelog creva HCT116 u spoljašnjoj zoni sferoida, dok većina preživelih ćelija pokazuje prisustvo markera senescencije (Fayad *et al.*, 2009). Ovakva prostorno-ograničena apoptoza može biti posledica ograničenog prodiranja cisplatine u sferoid ili snižene senzitivnosti neproliferišućih, mirujućih ćelija unutar sferoida koje pokazuju generalno manju osetljivost na mnoge hemioteraputske agense, pa su stoga autori zaključili da je apoptoza samo ograničenog broja ćelija od manjeg značaja za ukupan odgovor tumorskih ćelija na tretman cisplatinom (Fayad *et al.*, 2009).

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem antitumorske aktivnosti kompleksa **K7** *in vitro*, može se zaključiti da ovaj tip rutenijum(II)-arenskog kompleksa sa koordinisanim ligandom tipa pirido[2',3':5,6]pirazin[2,3-f][1,10]fenantrolin ispoljava slabu antiproliferativnu i citotoksičnu aktivnost i drugačiji mehanizam dejstva prema ćelijama humanog malignog melanoma A375 u odnosu na cisplatinu. Stoga, ovakav tip hibridnog kompleksa može dati odgovarajuće smernice za buduće strukturne modifikacije, u smislu dodavanja određenih bočnih grupa na postojeći ligand, zamena liganda planarnim ligandima veće površine, inkapsulacije kompleksa u lipidne nanočestice ili kombinovanja kompleksa sa drugim hemioterapeutskim agensom, radi konstruisanja potentnijeg agensa koji bi ispoljio efikasnost u agresivnim i metastatskim tumorima rezistentnim na cisplatinu, kao što je melanom.

5.3. Antitumorski potencijal rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa analozima PARP inhibitora 3-AB (kompleksi K8-K11)

Kompleksi **K8-K11**, koji pripadaju trećoj grupi rutenijum(II)-arenskih kompleksa čija je antitumorska aktivnost *in vitro* ispitana u okviru ove doktorske teze, su dizajnirani tako da predstavljaju kombinovane molekule za koje je pretpostavljeno da poseduju multifunkcijska svojstva. Kompleksi su konstruisani tako da sadrže dva različita liganda vezana za jezgro rutenijuma – arenski ligand (toluen ili cimen) i ligand na bazi 3-AB, kao predstavnika inhibitora DNK-vezujućeg enzima PARP-1. Rezultati kolorimetrijskog PARP testa su pokazali da ispitivani kompleksi (**K8**=[Ru(η^6 -toluen)(**L4**)Cl]PF₆; **K9**=[Ru(η^6 -*p*-cimen)(**L4**)Cl]PF₆; **K10**=[Ru(η^6 -toluen)(**L5**)Cl]PF₆; **K11**=[Ru(η^6 -*p*-cimen)(**L5**)Cl]PF₆) poseduju sposobnost da inhibiraju aktivnost enzima PARP-1 u mikromolarnim koncentracijama, u sledećem odnosu: **K9** > **K11** > 3-AB > **K8** > **K10**. Ligandi **L4** (2-amino-4-metilbenzamid) i **L5** (3-amino-N-metilbenzamid) su pokazali praktično odsustvo PARP inhibitorne sposobnosti (koncentracija liganda koja inhibira 50% aktivnosti enzima (IC₅₀ vrednost) > 1000 μ M). Ovakav rezultat ukazuje da minimalne varijacije u strukturi 3-AB, u vidu dodatne metil grupe vezane za aminogrupu farmakofore ili promena pozicije bočne aminogrupe, uzrokuju sniženje inhibitorne sposobnosti 3-AB za nekoliko redova veličine (sposobnost liganada da inhibiraju aktivnost PARP-1 pri koncentraciji od 1000 μ M je tek nešto više od 20%, dok 3-AB pri istoj koncentraciji postiže skoro 100% inhibicije PARP-1). Uprkos slaboj inhibitornoj sposobnosti liganada, vezivanje za rutenijum(II)-arenski deo predstavlja povoljnu

strukturnu promenu koja doprinosi PARP-1 inhibitornoj aktivnosti rezultujućih kompleksa **K8-K11**. Kompleksi koji u svojoj strukturi sadrže η^6 -*p*-cimen kao arenski ligand (**K9** i **K11**) su se pokazali kao potentniji PARP-1 inhibitori od svog polaznog kompleksa **RA2**, kao i od referentnog inhibitora 3-AB, pri čemu je kompleks **K9** (sa bidentatno-vezanim ligandom) pokazao malo bolji PARP-1 inhibicioni potencijal u odnosu na **K11** (sa monodentatno-vezanim ligandom). Na osnovu ovakvog rezultata se može pretpostaviti da kompleksi **K9** i **K11** narušavaju aktivnost PARP-1 enzima usled interakcije sa katalitičkim domenom enzima ili sa DNK-vezujućim domenom koji sadrži tri *Zn finger* motiva (ZnFI-ZnFIII). Sposobnost prekursorskog binuklearnog kompleksa **RA2** da inhibira PARP-1 dodatno ukazuje na izraženi afinitet rutenijum(II)-cimena (a verovatno u najvećoj meri jona rutenijuma), kao individualne strukture, prema PARP-1 enzimu. Sa druge strane, kompleksi koji u svojoj strukturi sadrže η^6 -toluen kao arenski ligand (**K8** i **K10**) su se pokazali kao slabiji PARP-1 inhibitori u odnosu na prethodno pomenute komplekse, i uprkos zajedničkoj strukturalnoj komponenti (toluen) pokazuju višestruke razlike u PARP-1 inhibitornoj aktivnosti (**K8**, sa bidentatno-vezanim ligandom, se pokazao barem četrnaest puta aktivniji u odnosu na **K10**, sa monodentatno-vezanim ligandom, na osnovu IC₅₀ vrednosti). Dodatno, polazni toluenski kompleks **RA1** se pokazao kao potentniji PARP-1 inhibitor u odnosu na kompleks **K10**. Ovakvi rezultati ukazuju da se varijacijama u strukturi (tip pridruženog liganda, prisustvo bočnih grupa, položaj bočnih grupa i način vezivanja) može znatno uticati na specifičnost i potentnost kompleksa, u smislu modulacije aktivnosti PARP-1 enzima. U studiji koju su sprovedli Casini i saradnici pokazano je da se NAMI-A vezuje za karboanhidrazu preko jona rutenijuma koji interaguje sa aktivnim centrom enzima i preko imidazolskog liganda koji se vezuje za cink(II) na aktivnom mestu (Casini *et al.*, 2010). Dodatno, Mendes i saradnici su pokazali da neki kompleksi na bazi platine, rutenijuma ili zlata ispoljavaju visoku sposobnost inhibicije PARP-1 enzimske aktivnosti, podržavajući model po kome joni metala dovode do uklanjanja cinka iz *Zn finger* motiva PARP-1 enzima, smanjujući njegovu aktivnost (Mendes *et al.*, 2011). Na primeru NAMI-A i RM175 kompleksa je pokazano da jon rutenijuma igra važnu ulogu u aktivnosti ovih kompleksa, s obzirom da zamenom rutenijuma u strukturi kompleksa nekim drugim metalom, poput rodijuma ili osmijuma dolazi do znatnog smanjenja biološke aktivnosti kompleksa, usled promena u njihovom hemijskom ponašanju, poput brzine supstitucije odlazećih grupa i hemijske stabilnosti kompleksa u rastvoru (Bergamo *et al.*, 2010). Generalno, rezultati ispitivanja kompleksa **K8-K11** su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima o PARP-1 inhibitornom potencijalu rutenijum(II)-arena (RAPTA-T kompleksa koji sadrži toluen (Mendes *et al.*, 2011) i serije kompleksa sa vezanim cimenom (Wang *et al.*, 2014)). Od interesa je napomenuti da, uprkos sličnom PARP-1 inhibitornom potencijalu NAMI-A i RAPTA-T kompleksa pokazanom u kolorimetrijskom testu sa bunarčićima obloženim histonskim proteinima, ispitivanje proteinskog ekstrakta MCF-7 ćelija nakon tretmana kompleksima je pokazalo da RAPTA-T ispoljava znatno nižu sposobnost inhibicije PARP-1 u odnosu na NAMI-A, što ukazuje da RAPTA-T predominantno interaguje sa drugim proteinima, uključujući i proteaze (Casini *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2011).

Rezultati dosadašnjih ispitivanja rutenijum(II)-arenskih kompleksa različite strukture ukazuju na evidentnu sposobnost ulaska ovakvog tipa kompleksa u tumorske ćelije, efikasnu akumulaciju unutar ćelija i izražen afinitet za vezivanje za DNK (Wang *et al.*, 2014; Jovanović *et al.*, 2016; Nikolić *et al.*, 2016). Imajući to u vidu, kao i podatke iz prethodnih istraživanja koji su pokazali da PARP-1 može uspešno prepoznati i vezati se za DNK lezije indukovane antitumorskim lekovima na bazi platine (Guggenheim *et al.*, 2009; Zhu, Chang and Lippard, 2010), rutenijumski kompleksi bi se mogli konstruisati tako da istovremeno ciljaju DNK i PARP-1 enzim kako bi se ostvario snažniji i specifičniji antitumorski efekat. Velika efikasnost koju su do danas PARP inhibitori pokazali u ciljanoj terapiji različitih tipova kancera, poput trostruko-negativnog kancera dojke i kancera ovarijuma, koji poseduju mutacije u nekim od gena uključenih u popravku dvolančanih oštećenja DNK putem homologne rekombinacije, opravdavaju dalja istraživanja agenasa koji pokazuju sposobnost da narušavaju funkciju PARP enzima na pomenutim tumorskim modelima (Anders *et al.*, 2010). U skladu sa navedenim, ispitivanje antiproliferativnog potencijala kompleksa **K8-K11** je vršeno na panelu od pet humanih ćelijskih linija kancera dojke i na normalnim (netumorskim) ćelijama BEAS-2B. Za razliku od liganada **L4** i **L5**, koji nisu ispoljili aktivnost čak ni pri koncentraciji od 800 μ M, kompleksi **K8-K11** su pokazali

umerenu sposobnost da inhibiraju rast ćelija kancera dojke, u mikromolarnom opsegu. Ćelije trostruko-negativnog karcinoma dojke (HCC1937 i MDA-MB-231) i ER(+)/PR(+)/HER2/neu(-) karcinoma dojke (MCF-7) su pokazale približno dva puta veću senzitivnost na ispitivane komplekse u odnosu na MDA-MB-453 i MDA-MB-361 ćelije. Rutenijum(II)-toluenski kompleks **K8** sa bidentatno-vezanim 2-amino-4-metilbenzamidom je ispoljio najveći antiproliferativni potencijal, sa sličnim IC₅₀ vrednostima na tri navedene ćelijske linije. Poređenjem strukture sa aktivnošću kompleksa može se zaključiti da bidentatno vezivanje liganda preko dve amino grupe doprinosi stabilizaciji hibridnih rutenijum(II)-arenskih kompleksa, i pozitivno utiče na biološku aktivnost, s obzirom da su kompleksi **K8** i **K9** ispoljili generalno veću aktivnost u odnosu na monodentatno-vezane komplekse **K10** i **K11**. Na osnovu rezultata MTT i PARP testa se može zaključiti da senzitivnost ćelijskih linija kancera dojke na ispitivane komplekse nije isključiva posledica inhibicije PARP-1 enzima, već odgovor ćelija zavisi i od njihovih specifičnih genetičkih i fenotipskih karakteristika, kao i od verovatne interakcije kompleksa sa drugim ćelijskim biomolekulima, što se i uočava u slučaju **K9** i **K11** kompleksa koji pokazuju bolji PARP-1 inhibicioni potencijal, ali generalno nižu sposobnost inhibicije rasta ćelija u kulturi. Opseg antiproliferativnog dejstva (opseg IC₅₀ vrednosti) kompleksa **K8-K11** je u rangu aktivnosti nekih od dobro istraženih rutenijumskih kompleksa, poput kompleksa iz RAPTA serije ili NAMI-A kompleksa, koji, takođe, pokazuju nisku citotoksičnost *in vitro*, čak i pri koncentracijama višim od 500 µM (Mendes *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014). U slučaju NAMI-A je utvrđeno da visoka citotoksičnost *in vitro* nije jedini i isključivi preduslov za dalji razvoj neke supstance kao potencijalnog kandidata za antitumorsku terapiju. Iako se NAMI-A pokazao kao netoksičan prema primarnim tumorskim ćelijama, ovaj rutenijumski kompleks ispoljava znatnu antimetastatsku aktivnost *in vivo* (Sava *et al.*, 1999). Sekvenciranje RNK i analiza celokupnog transkriptoma MDA-MB-231 ćelija karcinoma dojke (sa metastatskim potencijalom) tretiranih NAMI-A kompleksom, u poređenju sa netumorskim ćelijama mlečnih žlezda, su pokazali da nastale promene u profilu ekspresije transkripcionih faktora ranog odgovora predstavljaju specifičan „farmakološki potpis“ NAMI-A kao inhibitora metastaza, a odnose se na regulaciju ćelijskog ciklusa i remodelovanje vanćelijskog matriksa, potvrđujući selektivnu aktivnost NAMI-A prema ćelijskoj populaciji sa metastatskim osobinama (Bergamo, Gerdol, *et al.*, 2015).

Dalje ispitivanje povezanosti strukture sa aktivnošću kompleksa **K8-K11** je sprovedeno kako bismo otkrili da li postoje drugi mehanizmi delovanja na modelu HCC1937 ćelija trostruko-negativnog karcinoma dojke. Ova ćelijska linija je bila posebno interesantna za dalja istraživanja upravo zbog svojih ranije spomenutih osobina (gubitka funkcije BRCA1 proteina), što doprinosi pretpostavci o specifičnom i visokoefikasnom odgovoru na inhibitore PARP enzima, mehanizmom sintetičke letalnosti, koji objašnjava činjenicu da inhibicija PARP enzima u ćelijama koje poseduju kancer-relevantne mutacije, poput mutacije *BRCA1* gena, dovodi do ciljane smrti tumorske ćelije bez uticaja na normalne ćelije (Kaelin, 2005; Yuan *et al.*, 2017). Bhute i saradnici su pokazali da PARP inhibitor veliparib dovodi do metaboličkih promena u HCC1937, MDA-MB-231 i MCF-7 ćelijama koje su zavisne od tipa ćelijske linije i povezane su sa statusom *BRCA1* gena (mutirani ili WT) (Bhute *et al.*, 2016). Razlike u odgovoru *BRCA1*-mutiranih i *BRCA1* WT ćelija na PARP inhibitore mogu delimično biti objašnjene i činjenicom da ćelije koje poseduju defekte u mašineriji za popravku DNK homolognom rekombinacijom pokazuju trend prekomerne aktivacije PARP enzima (Gottipati *et al.*, 2010). Rezultati skorašnjih studija pokazuju da može doći do akumulacije dodatnih genetičkih alteracija, poput gubitka ekspresije gena *PTEN* (Peng *et al.*, 2014), koji je često mutiran u *BRCA1*-asociranim naslednim karcinomima dojke (Saal *et al.*, 2008), što za uzvrat može dovesti do ponovnog uspostavljanja efikasne homologne rekombinacije. Dodatno, MDA-MB-231 i MCF-7 ćelije, uprkos tome što su *BRCA1* WT, mogu ispoljiti HRD fenotip (Frizzell and Kraus, 2009; Curtin, Drew and Sharma-Saha, 2019), što ih čini senzitivnim na dejstvo PARP inhibitora. Mikroskopskom analizom je uočeno da pri višim koncentracijama, upravo kompleks **K8** ispoljava izraženije efekte u odnosu na ostale komplekse iz grupe, u vidu redukcije broja HCC1937 ćelija, pojave brojnije populacije ćelija sfernog izgleda, organizovanih u klastere. Dalja ispitivanja mehanizma dejstva kompleksa **K8-K11** u HCC1937 ćelijama su pokazala direktnu povezanost između sposobnosti kompleksa da inhibiraju rast tretiranih ćelija i nivoa akumulacije kompleksa unutar ćelija. Rezultati ICP-MS analize su pokazali da kompleksi uspešno ulaze u HCC1937 ćelije, pri čemu je ukupna akumulacija kompleksa u ćelijama

(iskazana kao ng Ru/10⁶ tretiranih ćelija) u sledećem odnosu: **K8** > **K10** > **K11** > **K9**. Niži sadržaj kompleksa **K9**, **K10** i **K11** detektovan u ćelijama govori o njihovoj nižoj antiproliferativnoj aktivnosti i može se objasniti ili smanjenom internalizacijom ili povećanim izbacivanjem kompleksa iz ćelija. Kompleksi **K8**, **K10** i **K11** pokazuju sličan obrazac unutarćelijske lokalizacije, pri čemu su se u najvećoj meri (približno 70% od ukupne količine akumuliranog Ru unutar ćelija) kompleksi akumulirali u citoplazmatskoj proteinskoj frakciji HCC1937 ćelija, što im omogućava da ostvare interakciju sa različitim unutarćelijskim biomolekulima. Predominantna akumulacija kompleksa **K9** u membranskoj frakciji može biti posledica zadržavanja kompleksa na nivou ćelijske membrane, što bi objasnilo i nižu ukupnu unutarćelijsku akumulaciju kompleksa, kao i slabiji potencijal kompleksa da inhibira rast HCC1937 ćelija. Dodatno, afinitet kompleksa **K9** prema membranskim proteinima, a imajući u vidu i veću aktivnost ovog kompleksa u MDA-MB-231 ćelijama u odnosu na ostala tri kompleksa, može ukazivati i na potencijalnu antimetastatsku aktivnost **K9** prema MDA-MB-231 ćelijama, što je potrebno dalje ispitati. Ukupna količina kompleksa **K8** detektovana unutar HCC1937 ćelija, kao i u DNK frakciji, je u saglasnosti sa najvećom sposobnosti ovog kompleksa među ispitivanim kompleksima iz grupe da dovede do zaustavljanja rasta ćelija u kulturi. Kada se uporedi sa ostala tri kompleksa iz grupe, **K8** je pokazao najveći afinitet prema nukleusu i prema DNK, kao i sposobnost da interferira sa replikacijom DNK i dovede do zaustavljanja ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa. Sposobnost kompleksa **K8** da zaustavi HCC1937 ćelije u replikativnoj fazi ćelijskog ciklusa proističe najverovatnije iz aktivnosti polaznog rutenijum(II)-toluenskog kompleksa, **RA1**, što se može zaključiti iz istog profila distribucije HCC1937 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana kompleksima **K8** i **RA1**. Lokalizacija određenog rutenijumskog kompleksa u specifičnom ćelijskom kompartmentu, a stoga i interakcija sa biomolekulima, nije samo zavisna od strukture, već i od koncentracije kompleksa, kao i od trajanja tretmana (Nhukeaw *et al.*, 2014, 2019). Akumulacija kompleksa **K8** u proteinskoj frakciji nukleusa (solubilni proteini nukleusa i proteini nukleusa vezani za hromatin) HCC1937 ćelija može ukazati na tendenciju ovakvog tipa kombinovanih molekula da ostvaruju interakcije sa proteinima asociranim sa DNK, kao što je PARP-1, što je u saglasnosti sa ovde pokazanim PARP-1 inhibitornim potencijalom **K8**, kao i sa rezultatima prethodnih studija na pojedinim rutenijum(II)-arenskim kompleksima sa ligandima na bazi fenantridina (Wang *et al.*, 2014). Ranije je pomenuto da se rutenijumski kompleks RAPTA-C predominantno vezuje za histonske proteine u jezgri nukleozoma u odnosu na DNK (Adhireksan *et al.*, 2014). Dodatno, pokazano je da vezivanje lekova kandidata za histonske proteine direktno narušava vezivanje transkripcionih faktora za hromatin koji modulišu ekspresiju gena u ćelijama kancera, što je ukazalo na mogućnost razvoja novih antitumorskih terapeutika koji ostvaruju aktivnost na epigenetičkom nivou (Palermo *et al.*, 2016). Dalje, ispitivanjem pokretljivosti DNK pHOT-1 plazmida elektroforezom na agaroznom gelu uočeno je da kompleks **K8** ispoljava afinitet da se vezuje za plazmidnu DNK i formira DNK adukte. Rezultati su pokazali da je stepen superspiralizovanosti plazmidne DNK izmenjen u različitom nivou pod dejstvom kompleksa **K8-K11** i **RA1-RA2**, ukazujući na razlike u afinitetu za vezivanje za DNK između kompleksa, što je u saglasnosti sa podacima iz literature o uticaju različitih rutenijum(II)-arenskih kompleksa na tercijarnu strukturu DNK plazmida (Richter *et al.*, 2016). S obzirom da odmotavanje dvolančanog DNK heliksa može biti posledica formiranja monofunkcionalnih ili interkalirajućih adukata (Hartinger *et al.*, 2006), dobijeni rezultati ukazuju da kompleksi **K8-K11** ispoljavaju aktivnost, barem delimično, putem interakcije sa DNK. Kompleksi nisu pokazali kompetitivnu aktivnost u prisustvu boja DAPI i MG, što ukazuje da kompleksi najverovatnije ne ostvaruju interakciju sa DNK putem vezivanja za mali ili veliki žljeb DNK, odnosno da ovo nije dominantni način vezivanja za DNK. Međutim, uočava se da nakon tretmana DAPI- ili MG-vezane plazmidne DNK sa kompleksima **K8-K11** dolazi do pojave DNK traka na gelu koje su slabijeg intenziteta u odnosu na trake koje se vide nakon tretmana kompleksima bez dodataka ovih DNK-vezujućih agenasa. Ovaj rezultat ukazuje na zasićenost mesta na DNK za vezivanje interkalirajuće GelRed boje i izraženi interkalirajući potencijal ispitivanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa (što se posebno uočava za komplekse **K8** i **K11**), te je stoga bojenje gela u svrhu vizualizacije DNK traka prividno manje efikasno.

Poslednjih godina je postalo jasno da mnogi dostupni PARP-1 inhibitori (uključujući i one odobrene za kliničku upotrebu) ispoljavaju aktivnost/afinitet ka udaljenim i nepovezanim ćelijskim

metama, odnosno ka drugim proteinima iz PARP familije, ne samo ka PARP-1 i PARP-2, kao i prema brojnim drugim familijama ciljnih molekula, ukazujući na postojanje unutar- i među-familijarne polifarmakologije PARP inhibitora (Knezevic *et al.*, 2016; Passeri *et al.*, 2016; Antolin *et al.*, 2020). Polifarmakologija je termin koji objašnjava osobinu lekova da interaguju i sa nekoliko različitih proteina pored njihove predviđene ćelijske mete, što može uticati kako na terapijsku efikasnost, tako i na moguće neželjene efekte (Antolin *et al.*, 2020). Za supstancu PJ-34, koja je potentni PARP inhibitor (IC_{50} vrednosti za inhibiciju PARP-1 i PARP-2 su u nanomolarnim koncentracijama), je dodatno otkriveno da pokazuje i sposobnost inhibicije aktivnosti MMP-2 (u visokim mikromolarnim vrednostima), kao i da indukuje zaustavljanje ćelija u G2-M kontrolnoj tački ćelijskog ciklusa putem p53-nezavisnog povišenja ekspresije *p21* gena, što ukazuje na potencijalnu mogućnost za primenu PARP inhibitorne terapije kod metastatskih karcinoma kojima nedostaje funkcionalni p53, kao što je slučaj sa MDA-MB-231 ćelijama trostruko-negativnog karcinoma dojke (Madison, Stauffer and Lundblad, 2011; Passeri *et al.*, 2016). Razlike u hemijskoj strukturi PARP inhibitora su u velikoj meri odgovorne za postojanje razlika u pre-kliničkoj i kliničkoj potentnosti ovih agenasa. Osim toga, razlike u profilima polifarmakologije dostupnih PARP-1 inhibitora mogu delimično objasniti različitu senzitivnost i/ili pojavu rezistencije tumorskih ćelija na tretman, i dodatno se mogu korelisati sa različitim terapijskim potencijalom specifičnih PARP inhibitora sa sličnim inhibitornim potencijalom (Antolin *et al.*, 2020). Na primeru klinički odobrenih PARP inhibitora se uočava da iako su koncentracije PARP inhibitora neophodne za inhibiciju PARP aktivacije u niskom nanomolarnom opsegu, koncentracije potrebne za redukciju vijabilnosti ćelija su čak nekoliko redova veličine veće (Murai *et al.*, 2014).

Wang i saradnici su razvili seriju rutenijum(II)-arenskih kompleksa koji sadrže ligande na bazi nikotinamida, kinazolina ili fenantridina (kao predstavnicima prve, druge i treće generacije PARP inhibitora), i uporedili su njihovu citotoksičnost, vezivanje za DNK i PARP inhibitornu sposobnost u odnosu na kompleks RAPTA-C (Wang *et al.*, 2014). Hibridni kompleksi su pokazali različit stepen citotoksičnosti prema testiranim tumorskim ćelijskim linijama različitog porekla (IC_{50} vrednosti su u opsegu od 38-500 μ M), za razliku od RAPTA-C koji nije doveo do znatne promene u vijabilitetu testiranih ćelija pri koncentracijama do 500 μ M (Wang *et al.*, 2014). Značajno, HCC1937 ćelije su pokazale najmanju senzitivnost prema ispitivanim kompleksima u testiranom panelu tumorskih ćelija. Kompleksi su ispoljili nešto bolju PARP inhibitornu aktivnost u odnosu na slobodne ligande, kao i sposobnost da se vezuju za DNK, iako u nižoj meri u odnosu na RAPTA-C, što ukazuje da ovakav tip kombinovanih molekula ispoljava svoju aktivnost delovanjem na različite ciljne ćelijske strukture. Autori su predložili da bi upravo oštećenje DNK izazvano rutenijumskim kompleksom koje ostaje nepopravljeno moglo potencijalno povećati efikasnost Ru-PARP hibridnog molekula, što bi omogućilo prevazilaženje razvoja rezistencije tumorskih ćelija. Uprkos činjenici da su autori odabrali ligande sa slabijom PARP inhibitornom sposobnošću za konstruisanje hibridnih kompleksa, rezultati njihove studije opravdavaju strategiju konjugacije PARP inhibitora sa rutenijum(II)-arenima, kako bi se pojačala citotoksičnost i dobili novi efikasni antitumorski agensi. Keung i saradnici su na panelu genetički i fenotipski različitih ćelijskih linija kancera dojke ispitali aktivnost nekoliko eksperimentalnih i klinički odobrenih PARP inhibitora i njihovi rezultati su potvrdili da senzitivnost ćelija na PARP inhibitore nije isključivo zavisna od statusa *BRC1* gena, kao i da drugi tipovi tumora dojke sa različitim ER/PR/HER2 i *BRC1* statusom (poput metastatskog trostruko-negativnog ili HER2(+) *BRC1* WT karcinoma dojke), takođe, mogu odgovoriti na terapiju PARP inhibitorima (Keung *et al.*, 2020). Istraživanje koje su sproveli Yusoh i saradnici je pokazalo postojanje sinergizma između PARP inhibitora NU 1025 ili olapariba i rutenijum(II)-polipiridinskog kompleksa u uticaju na preživljavanje *BRC1* WT MDA-MB-231 i MCF-7 ćelija, pri čemu je otkriveno da rutenijumski kompleks znatno doprinosi senzitivnosti ćelija na dejstvo olapariba (potentnost olapariba trista puta veća u prisustvu rutenijumskog kompleksa) (Yusoh, Ahmad and Gill, 2020). Autori su dodatno pokazali i da kombinovani tretman olaparibom i rutenijumskim kompleksom povećava antimigratorni potencijal olapariba.

Do danas su identifikovane velike izmene u broju kopija DNK označene kao „ožiljci genoma“ (eng. *Genome scars*) i različiti obrasci mutacija asocirani sa HRD fenotipom koji omogućavaju definisanje

šire populacije koja bi imala benefit od PARP inhibitorne terapije (Watkins *et al.*, 2014). Takođe, razvijene su brojne metode za identifikaciju pacijenata koji bi mogli imati korist od terapije PARP inhibitorima (Lim and Ngeow, 2016). HRD se mogu meriti funkcijskim analizama, poput merenja formiranja γ H2AX (fosforilisani histon H2AX) i RAD51 fokusa u nukleusu na nivou imunofluorescencije (Mukhopadhyay *et al.*, 2010). Kompleksna povezanost različitih sistema za popravku oštećenja DNK ukazuje da pojedinačni biomarker nije dovoljan za predikciju benefita PARP inhibitorne terapije. Stoga, kvantitativna lančana reakcija polimeraze reverznom transkripcijom u realnom vremenu (eng. *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR), DNK i proteinski mikročipovi, masena spektrometrija, imunohistohemija i imunofluorescencija predstavljaju važne alate prilikom identifikacije prediktivnih biomarkera merenih na bazalnom nivou ili u toku terapije onkoloških pacijenata uključenih u kliničke studije sa PARP inhibitorima. S obzirom da se aktivnost PARP enzima ogleda u nivou PAR polimera, nizak nivo PAR polimera bi mogao ukazati na nisku aktivnost PARP enzima, što može uzrokovati ograničenu efikasnost PARP inhibitora (Turner and Ashworth, 2011). Shodno tome, predikcija senzitivnosti na PARP inhibitore bi se upravo mogla procenjivati metodama koje kvantifikuju nivo PAR polimera u tumorskim ćelijama i perifernoj krvi, poput ELISA (eng. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) testa (Liu *et al.*, 2008).

Na osnovu svih rezultata i uvida u korelaciju između strukture i aktivnosti kompleksa **K8-K11**, može se zaključiti da kompleks **K8** ispoljava prednost u odnosu na ostala tri kompleksa iz ove grupe rutenijumskih kompleksa, koja se ogleda u većem potencijalu da narušava replikaciju DNK, putem vezivanja za dvolančanu zavojnicu DNK ili putem interferencije sa enzimskom aktivnošću PARP-1, ili kombinacijom oba, što ga izdvaja kao vodeće jedinjenje. Preferencijalna internalizacija kompleksa **K8** u HCC1937 ćelije naglašava da razlike u strukturi ispitivanih rutenijumskih kompleksa znatno utiču na afinitet i stabilnost interakcija sa nukleusnom DNK i unutarćelijskim proteinima. Na primeru mnogih rutenijumskih kompleksa je pokazano da korelacija između strukture kompleksa (prisustvo različitih arena, helirajućih liganada i monodentatnih odlazećih grupa) i aktivnosti kompleksa u tumorskoj ćeliji koja pripada određenom tipu, nije tako jednostavna, već da jedinstvena kombinacija liganada određuje i jedinstveni mehanizam aktivacije i citotoksične/antiproliferativne aktivnosti kompleksa. Sveukupno, rezultati podržavaju hipotezu o afinitetu rutenijuma (kao pojedinačnog agensa) za više ciljeva u ćeliji i opravdavaju strategiju zasnovanu na racionalnom dizajniranju kombinovanih molekula, sa bioaktivnim ligandima koordinisanim za jone metala. Ova strategija može omogućiti razvoj nove kategorije potentnijih kandidata za antitumorske lekove, sa širim spektrom farmakoloških aktivnosti u tumorima koji sadrže mutaciju u *BRCA1* genu.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ispitivanja antitumorskog potencijala novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa **K1-K11** sa različitim bioaktivnim ligandima *in vitro*, zaključujemo da rutenijum(II)-aren, kao osnovna gradivna komponenta kompleksa, predstavlja dobar osnov za dalji dizajn novih kompleksa uz variranje tipa bioaktivnog liganda, čime se postižu fine promene u farmakološkim karakteristikama kompleksa.

Rezultati ispitivanja antitumorskog potencijala prve grupe novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa **K1-K4** sa bioaktivnim ligandima tipa NSAIL (indometacin (**L1**) ili mefanaminska kiselina (**L2**)) na humanim tumorskim ćelijama K562, A549 i MDA-MB-231 i normalnim ćelijama MRC-5, su pokazali da:

- Testirane ćelijske linije pokazuju razlike u senzitivnosti na ispitivane komplekse nakon 72 h kontinuiranog tretmana, pri čemu je senzitivnost svih ćelijskih linija na komplekse veća u poređenju sa senzitivnosti na ligande; kompleksi ispoljavaju antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskim linijama u mikromolarnom opsegu koncentracija sa IC₅₀ vrednostima do 275,7 μM;
- Uvođenje indometacina (**L1**) kao bioaktivnog liganda u strukturu kombinovanog molekula doprinosi deset puta većoj antiproliferativnoj aktivnosti rezultujućih kompleksa **K1** i **K3** u odnosu na sam ligand, dok uvođenje mefenaminske kiseline (**L2**) kao bioaktivnog liganda doprinosi svega dva puta većoj antiproliferativnoj aktivnosti rezultujućih kompleksa **K2** i **K4** u odnosu na sam ligand;
- Kompleksi **K1** i **K3** pokazuju izraženu selektivnost prema humanim ćelijama hronične mijeloidne leukemije (K562) i trostruko-negativnog karcinoma dojke (MDA-MB-231), koja je veća od selektivnosti cisplatine prema istim ćelijama;
- Veći doprinos antiproliferativnom efektu ima tip pridruženog NSAIL molekula u odnosu na tip pridruženog arenskog liganda, s obzirom da su razlike u antiproliferativnom potencijalu **K1** (sa cimenom) i **K3** (sa toluenom) praktično zanemarljive;
- Kompleksi **K1** i **K3** koji su se izdvojili kao vodeća jedinjenja u odnosu na ostale komplekse iz ispitivane grupe dovode do drugačijih koncentraciono-zavisnih promena u ćelijskom ciklusu MDA-MB-231 ćelija nakon 24 h tretmana u odnosu na cisplatinu, u vidu intenzivnog oštećenja DNK koje uzrokuje zaustavljanje ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa i nakupljanje Sub-G1 populacije ćelija sa fragmentisanom DNK, dok razlike među samim kompleksima nisu od većeg značaja;
- Kompleksi **K1** i **K3** ispoljavaju izražen potencijal da indukuju apoptozu MDA-MB-231 ćelija nakon 24 h tretmana, u tri puta većoj meri u odnosu na cisplatinu;
- Kompleksi **K1** i **K3** pokazuju najveći afinitet prema citoplazmatskoj i membranskoj proteinskoj frakciji MDA-MB-231 ćelija, pri čemu je kompleks **K3** detektovan u višoj koncentraciji u DNK frakciji u odnosu na kompleks **K1**, što ukazuje na veću sposobnost ovog jedinjenja za vezivanje za DNK, i direktna je posledica veće ukupne akumulacije **K3** unutar MDA-MB-231 ćelija;
- **Zaključujemo da NSAIL, a naročito indometacin, kao bioaktivni ligandi vezani za rutenijum(II)-arene predstavljaju perspektivnu klasu kombinovanih molekula sa jedinstvenim antitumorskim potencijalom prema humanim ćelijama trostruko-negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231, koji je rezultat kombinovanih osobina NSAIL i rutenijum(II)-arenskog dela.**

Rezultati ispitivanja antitumorskog potencijala grupe novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa **K5-K7** sa bioaktivnim ligandom tipa polipiridina (pirido[2',3':5,6]pirazino[2,3-f][1,10]fenantrolin (**L3**)) na humanim tumorskim ćelijama A549, A375, LS 174T, MCF-7 i MDA-MB-453 i normalnim ćelijama MRC-5, u poređenju sa cisplatinom, su pokazali da:

- Testirane ćelijske linije pokazuju razlike u senzitivnosti na ispitivane komplekse nakon 72 h kontinuiranog tretmana, pri čemu je antiproliferativna aktivnost kompleksa prema ćelijskim linijama u mikromolarnom opsegu koncentracija sa IC_{50} vrednostima do 196,9 μ M;
- Polipiridinski ligand (**L3**) pokazuje odsustvo selektivnosti i prisustvo izuzetne i ujednačene citotoksične aktivnosti prema svim testiranim ćelijskim linijama, koja je veća od aktivnosti rezultujućih kompleksa i cisplatine;
- Veći doprinos antiproliferativnim efektima kompleksa (u pogledu selektivnosti) ima tip pridruženog arenskog liganda u odnosu na prisustvo polipiridinskog liganda, koji doprinosi visokoj aktivnosti rezultujućih kompleksa;
- Kompleks **K7** (sa cimenom) se izdvaja kao vodeće jedinjenje u odnosu na komplekse **K5** (sa benzenom) i **K6** (sa toluenom); kompleks **K7** pokazuje izraženu selektivnost za A375 ćelije humanog malignog melanoma;
- A375 ćelije zadržavaju sposobnost proliferacije u prisustvu **K7**, ali je vreme potrebno za dupliranje broja ćelija produženo;
- Kompleks **K7** ne interferira sa ćelijskim ciklusom A375 ćelija za razliku od cisplatine koja utiče na progresiju ćelija kroz faze ćelijskog ciklusa na koncentraciono- i vremenski-zavisani način;
- Kompleks **K7** ne dovodi do pokretanja programirane ćelijske smrti u A375 ćelijama u ispitivanom opsegu koncentracija (do $2 \times IC_{50}$) i trajanja tretmana (48 h);
- Kompleks **K7** se akumulira u znatno manjoj meri u A375 ćelijama u odnosu na cisplatinu, pri čemu se cisplatina lokalizuje u najvećoj meri u membranskoj frakciji, dok je kompleks **K7** pokazao podjednaku reaktivnost sa proteinima citoplazme i proteinima membrana; afinitet kompleksa **K7** i cisplatine prema proteinima nukleusa je približno isti;
- 3D model A375 višećelijskih tumorskih sferoida pokazuje sedam puta manju senzitivnost na kompleks **K7** od A375 ćelija u monosloju;
- Kompleks **K7** i cisplatina pokazuju različit efekat na rast sferoida – očuvana struktura i kompaktnost sferoida pod tretmanom kompleksom **K7** i dezintegracija sferoida uz rasipanje ćelija sa periferije sferoida na pojedinačne ćelije ili klastere ćelija pod cisplatinom usled raskidanja međućelijskih veza;
- **Zaključujemo da vodeće jedinjenje iz ispitivane serije, rutenijum(II)-cimenski kompleks K7 sa koordinisanim interkalirajućim ligandom tipa polipiridina, pokazuje drugačiji mehanizam dejstva prema A375 ćelijama humanog malignog melanoma u odnosu na cisplatinu; uočena aktivnost kompleksa K7 nije posledica citotoksičnog niti antiproliferativnog dejstva u 2D kulturi A375 ćelija melanoma, dok u 3D kulturi, kompleks K7 pokazuje izvesni nivo citotoksičnog dejstva, zbog čega su neophodne dodatne analize; stoga, daljom optimizacijom strukture ovog tipa kombinovanog molekula dodavanjem određenih bočnih grupa na postojeći ligand, zamenom liganda sa planarnim ligandima veće površine, inkapsulacijom kompleksa u lipidne nanočestice ili kombinovanjem kompleksa sa drugim hemioterapeutskim agensom, može se konstruisati potentniji agens veće efikasnosti u metastatskim tumorima rezistentnim na cisplatinu, kao što je melanom.**

Ispitivanje antitumorskog potencijala grupe novisintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa **K8-K11** sa 2-amino-4-metilbenzamidom (**L4**) i 3-amino-N-metilbenzamidom (**L5**) kao analogima 3-AB, inhibitora PARP-1 enzima, kao i polaznih rutenijum(II)-arena (**RA1, RA2**), na humanim ćelijama kancera dojke HCC1937, MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7 i MDA-MB-361 i normalnim ćelijama BEAS-2B, je pokazalo da:

- Kompleksi **K8-K11** pokazuju znatno bolju PARP-1 inhibitornu aktivnost u odnosu na ligande **L4** i **L5**; može se zaključiti da je vezivanje liganada za rutenijum(II)-arenski deo povoljna strukturna promena koja doprinosi PARP-1 inhibitornoj aktivnosti rezultujućih kompleksa **K8-K11**;
- Kompleksi **K9** i **K11** (sa cimenom) su potentniji PARP-1 inhibitori od svog polaznog kompleksa **RA2**, 3-AB i kompleksa **K8** i **K10** (sa toluenom), pri čemu je **K9** (sa bidentatno-vezanim ligandom) za nijansu potentniji PARP-1 inhibitor u odnosu na **K11** (sa monodentatno-vezanim ligandom);
- Kompleksi **K8** i **K10** uprkos zajedničkoj strukturnoj komponenti (toluen) pokazuju višestruke razlike u PARP-1 inhibitornoj aktivnosti, pri čemu je **K8** (sa bidentatno-vezanim ligandom) čak četrnaest puta potentniji PARP-1 inhibitor u odnosu na **K10** (sa monodentatno-vezanim ligandom);
- Varijacijama u strukturi (tip pridruženog liganda, prisustvo bočnih grupa, položaj bočnih grupa i način vezivanja) može se značajno uticati na specifičnost i potentnost kompleksa, u smislu modulacije aktivnosti PARP-1 enzima;
- Kompleksi **K8-K11** ostvaruju svoju aktivnost putem interakcije sa DNK;
- Kompleksi **K8-K11** pokazuju umerenu sposobnost da inhibiraju rast ćelija kancera dojke, u mikromolarnom opsegu sa IC_{50} vrednostima do 580,5 μ M;
- Trostruko-negativne ćelije karcinoma dojke (HCC1937 i MDA-MB-231) i ER(+)/PR(+), HER2/neu(-) ćelije (MCF-7) su dva puta senzitivnije na komplekse od MDA-MB-453 i MDA-MB-361 ćelija; senzitivnost ćelijskih linija kancera dojke na ispitivane komplekse nije isključiva posledica inhibicije PARP-1 enzima, već odgovor ćelija zavisi i od njihovih specifičnih genetičkih i fenotipskih karakteristika, kao i od verovatne interakcije kompleksa sa drugim ćelijskim biomolekulima;
- Vodeći kompleks iz ove grupe, **K8**, pokazuje najveći antiproliferativni potencijal na HCC1937, MDA-MB-231 i MCF-7 ćelijama, kao i najveći potencijal uticaja na ćelijski ciklus HCC1937 ćelija uzrokujući zastoje u S fazi;
- Kompleks **K8** pokazuje najveću sposobnost akumulacije unutar HCC1937 ćelija, u DNK frakciji i frakciji nukleusa, u odnosu na ostala tri kompleksa iz grupe;
- **Zaključujemo da je bidentatno vezivanje analoga 3-AB povoljna strukturna promena koja doprinosi stabilnosti i aktivnosti kompleksa K8 u HCC1937 ćelijama, što je izdvojilo kompleks K8 kao vodeće jedinjenje iz grupe, sa više-targetnim potencijalom u BRCA-mutiranim trostruko-negativnim ćelijama kancera dojke HCC1937; dodatno, kompleks K8 može biti dobar kandidat za dalja ispitivanja u BRCA WT ćelijskim linijama;**
- Kompleks **K9** iako slabo aktivan u HCC1937 ćelijama, pokazuje afinitet prema proteinima membrana, kao i znatnu antiproliferativnu aktivnost u MDA-MB-231 ćelijama, što ukazuje da ovaj tip kombinovanog molekula može biti potencijalni kandidat za dalja ispitivanja antimetastatskog efekta *in vitro*;

Iako su rutenijum(II)-arenski kompleksi dugi niz godina u razvoju kao potencijalni antitumorski lekovi, i ispitivanje mehanizama dejstva ovog tipa jedinjenja neprekidno dobija nove dimenzije sve intenzivnijim proučavanjem (između ostalog praćenjem njihove lokalizacije u ćeliji kao i aktivnosti na 3D modelima), mnoga pitanja ostaju nerazjašnjena.

Rezultati ove doktorske teze su pokazali da male razlike u strukturi ispitivane serije rutenijum(II)-arenskih kompleksa K1-K11 (kao što je tip arenskog liganda ili način vezivanja bioaktivnog liganda) značajno utiču na afinitet i stabilnost interakcija sa nukleusnom DNK i unutarćelijskim proteinima, i samim tim i na mehanizam dejstva kompleksa. Kompleksi koji su se izdvojili kao vodeća jedinjenja su pokazali značajan antitumorski potencijal *in vitro*, ali i specifičnost kada je mehanizam delovanja i tip tumorskih ćelija u pitanju. Za detaljniji uvid u antitumorski potencijal i molekulske mehanizme dejstva K1-K11 u humanim ćelijskim linijama trostruko-negativnog karcinoma dojke (*BRCA*-mutirane i *BRCA* WT) i malignog melanoma, potrebno je dodatno ispitati afinitet kompleksa ka DNK, drugim enzimima, različitim biomolekulima i ćelijskim konstituentima koji nisu bili predmet istraživanja ove disertacije. Dodatno, od velikog interesa bi bilo ispitati i antimetastatsku aktivnost ovih kompleksa *in vitro*. Uprkos slabom antiproliferativnom/citotoksičnom potencijalu pojedinih kompleksa iz ispitivane serije *in vitro*, literaturni podaci o širokom spektru aktivnosti različitih rutenijumskih kompleksa i postojanju značajnih razlika u aktivnosti istih kompleksa *in vitro* i *in vivo*, sugerišu da kompleksi ispitani u okviru ove doktorske teze mogu biti dobri kandidati za uključivanje u istraživanja *in vivo*.

Može se zaključiti da rutenijum(II)-arenski kompleksi kao najveća grupa kompleksa rutenijuma i dalje predstavljaju jednu od najinteresantnijih i najperspektivnijih osnova za dalje sinteze novih jedinjenja, upravo sa bioaktivnim ligandima različitog tipa, čija se aktivnost ciljanim dizajnom može specifično usmeravati radi postizanja drugačijeg mehanizma antitumorskog delovanja od cisplatine, a time i prevazilaženja rezistencije, a ujedno, i postizanja manje toksičnosti.

7. LITERATURA

- Acquaviva, J. *et al.* (2014) 'Overcoming acquired BRAF inhibitor resistance in melanoma via targeted inhibition of hsp90 with ganetespib', *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(2), pp. 353–363. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0481.
- Adams, J. M. and Cory, S. (2007) 'The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy', *Oncogene*, 26(9), pp. 1324–1337. doi: 10.1038/sj.onc.1210220.
- Adhireksan, Z. *et al.* (2014) 'Ligand substitutions between ruthenium-cymene compounds can control protein versus DNA targeting and anticancer activity', *Nature Communications*, 5, p. 3462. doi: 10.1038/ncomms4462.
- Aird, R. E. *et al.* (2002) 'In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer', *British Journal of Cancer*, 86(10), pp. 1652–1657. doi: 10.1038/sj/bjc/6600290.
- Al-Mahmood, S. *et al.* (2018) 'Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options', *Drug Delivery and Translational Research*, 8, pp. 1483–1507. doi: 10.1007/s13346-018-0551-3.
- Alessio, E. (2017) 'Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective', *Eur. J. Inorg. Chem.*, pp. 1549–1560. doi: 10.1002/ejic.201600986.
- Alessio, E. and Messori, L. (2019) 'NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry', *Molecules*, 24(10), pp. 1–20. doi: 10.3390/molecules24101995.
- Allardyce, C. S. *et al.* (2001) '[Ru(h6-p-cymene)Cl₂(pta)] (pta = 1,3,5-triaza-7-phosphatricyclo-[3.3.1.1]decane): a water soluble compound that exhibits pH dependent DNA binding providing selectivity for diseased cells', *Chemical Communications*, (15), pp. 1396–1397. doi: 10.1039/B104021A.
- Alsop, K. *et al.* (2012) 'BRCA Mutation Frequency and Patterns of Treatment Response in BRCA Mutation-Positive Women With Ovarian Cancer: A Report From the Australian Ovarian Cancer Study Group', *Journal of Clinical Oncology*, 30(21), pp. 2654–2663. doi: 10.1200/JCO.2011.39.8545.
- Alves Rico, S. R. *et al.* (2017) 'Diruthenium(II,III) metallodrugs of ibuprofen and naproxen encapsulated in intravenously injectable polymer-lipid nanoparticles exhibit enhanced activity against breast and prostate cancer cells', *Nanoscale*, 9(30), pp. 10701–10714. doi: 10.1039/C7NR01582H.
- Aman, F. *et al.* (2014) 'Anticancer Ruthenium(η^6 -p-cymene) Complexes of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Derivatives', *Organometallics*, 33(19), pp. 5546–5553. doi: 10.1021/om500825h.
- Amé, J. C., Spenlehauer, C. and De Murcia, G. (2004) 'The PARP superfamily', *BioEssays*, 26(8), pp. 882–893. doi: 10.1002/bies.20085.
- Anders, C. K. *et al.* (2010) 'Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibition: "Targeted" Therapy for Triple-Negative Breast Cancer', *Clinical Cancer Research*, 16(19), pp. 4702–4711. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0939.
- Ang, W. H. (2007) 'Development of Organometallic Ruthenium (II) Anticancer (RAPTA) Drugs', *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 61(4), pp. 140–142. doi: 10.2533/chimia.2007.140.
- Anighoro, A., Bajorath, J. and Rastelli, G. (2014) 'Polypharmacology: Challenges and Opportunities in Drug Discovery', *J Med Chem*, 57(19), pp. 7874–7887.
- Anjomshoa, M. and Torkzadeh-Mahani, M. (2016) 'Competitive DNA-Binding Studies between Metal

- Complexes and GelRed as a New and Safe Fluorescent DNA Dye', *Journal of Fluorescence*, 26(4), pp. 1505–1510. doi: 10.1007/s10895-016-1850-z.
- Antolin, A. A. *et al.* (2020) 'The kinase polypharmacology landscape of clinical PARP inhibitors', *Scientific Reports*, 10, pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-020-59074-4.
- Arruebo, M. *et al.* (2011) 'Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies', *Cancers*, 3(3), pp. 3279–3330. doi: 10.3390/cancers3033279.
- Arun, B. and Goss, P. (2004) 'The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention', *Seminars in Oncology*, 31(SUPPL. 7), pp. 22–29. doi: 10.1016/j.seminoncol.2004.03.042.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V. M. (1998) 'Death Receptors: Signaling and Modulation', *Science*, 281(5381), pp. 1305–1308. doi: 10.1126/science.281.5381.1305.
- Ashworth, A., Lord, C. J. and Reis-Filho, J. S. (2011) 'Genetic Interactions in Cancer Progression and Treatment', *Cell*, 145(1), pp. 30–38. doi: 10.1016/j.cell.2011.03.020.
- Atale, N. *et al.* (2014) 'Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques', *Journal of Microscopy*, 255(1), pp. 7–19. doi: 10.1111/jmi.12133.
- Babak, M. V. *et al.* (2015) 'Target profiling of an antimetastatic RAPTA agent by chemical proteomics : relevance to the mode of action', *Chemical Science*, 6, pp. 2449–2456. doi: 10.1039/C4SC03905J.
- Bai, P. (2015) 'Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance', *Molecular Cell*, 58(6), pp. 947–958. doi: 10.1016/j.molcel.2015.01.034.
- Banasik, M. *et al.* (1992) 'Specific Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Synthetase and Mono(ADP-Ribosyl)transferase', *Journal of Biological Chemistry*, 267(3), pp. 1569–1575. doi: 10.11501/3086414.
- Banerjee, S. *et al.* (2015) 'Remarkable enhancement in photocytotoxicity and hydrolytic stability of curcumin on binding to an oxovanadium(IV) moiety', *Dalton Transactions*, 44(9), pp. 4108–4122. doi: 10.1039/C4DT02165G.
- Banti, C. N. and Hadjikakou, S. K. (2016) 'Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in Metal Complexes and Their Effect at the Cellular Level', *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2016(19), pp. 3048–3071. doi: DOI: 10.1002/ejic.201501480.
- Barber, L. J. *et al.* (2013) 'Secondary mutations in BRCA2 associated with clinical resistance to a PARP inhibitor', *Journal of Pathology*, 229(3), pp. 422–429. doi: 10.1002/path.4140.
- Barnhart, B. C., Alappat, E. C. and Peter, M. E. (2003) 'The CD95 Type I/Type II model', *Seminars in Immunology*, 15(3), pp. 185–193. doi: 10.1016/S1044-5323(03)00031-9.
- Basourakos, S. P. *et al.* (2017) 'Combination Platinum-based and DNA Damage Response-targeting Cancer Therapy: Evolution and Future Directions', *Curr. Med. Chem.*, 24(15), pp. 1586–1606. doi: 10.2174/0929867323666161214114948.
- Basu, A. and Krishnamurthy, S. (2010) 'Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage', *Journal of Nucleic Acids*, 2010, pp. 1–16. doi: 10.4061/2010/201367.
- Benadiba, M. *et al.* (2010) 'Inhibition of C6 rat glioma proliferation by [Ru2Cl(Ibp)4] depends on changes in p21, p27, Bax/Bcl2 ratio and mitochondrial membrane potential', *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(9), pp. 928–935. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2010.04.011.
- Benadiba, M. *et al.* (2014) 'Growth inhibitory effects of the Diruthenium-Ibuprofen compound, [Ru2Cl(Ibp)4], in human glioma cells in vitro and in the rat C6 orthotopic glioma in vivo', *Journal of*

- Biological Inorganic Chemistry*, 19(6), pp. 1025–1035. doi: 10.1007/s00775-014-1143-4.
- Benafif, S. and Hall, M. (2015) ‘An update on PARP inhibitors for the treatment of cancer’, *Oncotargets and Therapy*, 8, pp. 519–528. doi: 10.2147/OTT.S30793.
- Bergamo, A. *et al.* (2008) ‘Modulation of the metastatic progression of breast cancer with an organometallic ruthenium compound’, *Int. J. Oncol.*, 33(6), pp. 1281–1289.
- Bergamo, A. *et al.* (2010) ‘In vivo tumour and metastasis reduction and in vitro effects on invasion assays of the ruthenium RM175 and osmium AFAP51 organometallics in the mammary cancer model’, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(1), pp. 79–86. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2009.10.005.
- Bergamo, A. *et al.* (2012) ‘Approaching tumour therapy beyond platinum drugs Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates’, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 106(1), pp. 90–99. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.09.030.
- Bergamo, A., Riedel, T., *et al.* (2015) ‘Preclinical combination therapy of the investigational drug NAMI-A+ with doxorubicin for mammary cancer’, *Invest. New Drugs*, 33(1), pp. 53–63. doi: 10.1007/s10637-014-0175-5.
- Bergamo, A., Gerdol, M., *et al.* (2015) ‘RNA-seq analysis of the whole transcriptome of MDA-MB-231 mammary carcinoma cells exposed to the antimetastatic drug NAMI-A’, *Metallomics*, 7(10), pp. 1439–1450. doi: 10.1039/C5MT00081E.
- Bergamo, A. and Sava, G. (2007) ‘Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy’, *Dalton Transactions*, (13), pp. 1267–1272. doi: 10.1039/B617769G.
- Bergamo, A. and Sava, G. (2011) ‘Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs’, *Dalton Transactions*, 40, pp. 7817–7823. doi: 10.1039/c0dt01816c.
- Bernal-Méndez, E. *et al.* (1997) ‘Chemical Versatility of Transplatin Monofunctional Adducts within Multiple Site-Specifically Platinated DNA’, *Biochemistry*, 36(24), pp. 7281–7287. doi: 10.1021/bi9703148.
- Berners-Price, S. J. and Sadler, P. J. (1996) ‘Coordination chemistry of metallodrugs: insights into biological speciation from NMR spectroscopy’, *Coordination Chemistry Reviews*, 151, pp. 1–40. doi: 10.1016/s0010-8545(96)90191-5.
- Bhute, V. J. *et al.* (2016) ‘The Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor Veliparib and Radiation Cause Significant Cell Line Dependent Metabolic Changes in Breast Cancer Cells’, *Sci. Rep.*, 6, p. 36061. doi: 10.1038/srep36061.
- Bianchini, G. *et al.* (2016) ‘Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease’, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13(11), pp. 674–690. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.66.
- Biersack, B. (2016) ‘Anticancer Activity and Modes of Action of (arene) ruthenium(II) Complexes Coordinated to C-, N-, and O-ligands’, *Mini Rev. Med. Chem.*, 16(10), pp. 804–814. doi: 10.2174/138955751610160503004623.
- Bock, F. J. and Chang, P. (2016) ‘New directions in poly(ADP-ribose) polymerase biology’, *FEBS Journal*, 283(22), pp. 4017–4031. doi: 10.1111/febs.13737.
- Brabec, V. and Nováková, O. (2006) ‘DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity’, *Drug Resist. Updat.*, 9(3), pp. 111–122. doi: 10.1016/j.drug.2006.05.002.
- Bratsos, I. *et al.* (2007) ‘Ruthenium Anticancer Compounds: Challenges and Expectations’, *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 61(11), pp. 692–697. doi: 10.2533/chimia.2007.692.

- Brown, J. S. *et al.* (2017) 'Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors', *Cancer Discov.*, 7(1), pp. 20–37. doi: 10.1158/2159-8290.Cd-16-0860.
- Bruno, P. M. *et al.* (2017) 'A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress', *Nature Medicine*, 23(4), pp. 461–471. doi: 10.1038/nm.4291.
- Bryant, H. E. *et al.* (2005) 'Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase', *Nature*, 434(7035), pp. 913–917. doi: 10.1038/nature03443.
- Bunting, S. F. *et al.* (2010) '53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks', *Cell*, 141(2), pp. 243–254. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.012.
- Burris, H. A. *et al.* (2016) 'Safety and activity of IT-139, a ruthenium-based compound, in patients with advanced solid tumours: a first-in-human, open-label, dose-escalation phase I study with expansion cohort', *ESMO Open*, 1(6), p. e000154. doi: 10.1136/esmoopen-2016-000154.
- Byers, L. A. *et al.* (2012) 'Proteomic Profiling Identifies Dysregulated Pathways in Small Cell Lung Cancer and Novel Therapeutic Targets Including PARP1', *Cancer Discovery*, 2(9), pp. 798–811. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0112.
- Bytzek, A. K. *et al.* (2016) 'Biodistribution of the novel anticancer drug sodium trans-[tetrachloridobis(1H-indazole)ruthenate(III)] KP-1339/IT139 in nude BALB/c mice and implications on its mode of action', *Journal of Inorganic Biochemistry*, 160, pp. 250–255. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.02.037.
- Cahill, D. P. *et al.* (1999) 'Genetic instability and darwinian selection in tumours', *Trends in Biochemical Sciences*, 24(12), pp. 57–60. doi: 10.1016/S0968-0004(99)01466-8.
- de Camargo, M. S. *et al.* (2016) 'Inhibition of human DNA topoisomerase IB by nonmutagenic ruthenium(II)-based compounds with antitumoral activity', *Metallomics*, 8(2), pp. 179–192. doi: 10.1039/C5MT00227C.
- Caruso, D. *et al.* (2017) 'Niraparib in ovarian cancer: results to date and clinical potential', *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 9(9), pp. 579–588. doi: 10.1177/1758834017718775.
- Casini, A. *et al.* (2008) 'Emerging Protein Targets for Anticancer Metallodrugs: Inhibition of Thioredoxin Reductase and Cathepsin B by Antitumor Ruthenium(II)-Arene Compounds', *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(21), pp. 6773–6781. doi: 10.1021/jm8006678.
- Casini, A. *et al.* (2010) 'The X-ray Structure of the Adduct between NAMI-A and Carbonic Anhydrase Provides Insights into the Reactivity of this Metallodrug with Proteins', *ChemMedChem*, 5(12), pp. 1989–1994. doi: 10.1002/cmdc.201000331.
- Caulfield, S. E., Davis, C. C. and Byers, K. F. (2019) 'Olaparib: A Novel Therapy for Metastatic Breast Cancer in Patients With a BRCA1/2 Mutation', *J Adv Pract Oncol*, 10(2), pp. 167–174.
- Cepeda, V. *et al.* (2006) 'Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors in Cancer Chemotherapy', *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 1(1), pp. 39–53. doi: 10.2174/157489206775246430.
- Cepeda, V. *et al.* (2007) 'Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity', *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 7(1), pp. 3–18. doi: 10.2174/18715200779314044.
- Cerrato, A., Morra, F. and Celetti, A. (2016) 'Use of poly ADP-ribose polymerase [PARP] inhibitors in cancer cells bearing DDR defects: The rationale for their inclusion in the clinic', *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s13046-016-0456-2.

- Chambon, P., Weill, J. D. and Mandel, P. (1963) 'Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme', *Biochemical and biophysical research communications*, 11(1), pp. 39–43.
- Chaney, S. G. and Sancar, A. (1996) 'DNA Repair: Enzymatic Mechanisms and Relevance to Drug Response', *Journal of the National Cancer Institute*, 88(19), pp. 1346–1360. doi: 10.1093/jnci/88.19.1346.
- Chatterjee, S. *et al.* (2008) 'The ruthenium (II) – arene compound RAPTA-C induces apoptosis in EAC cells through mitochondrial and p53 – JNK pathways', *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13(7), pp. 1149–1155. doi: 10.1007/s00775-008-0400-9.
- Chatterjee, S. *et al.* (2011) 'A bifunctional organometallic ruthenium drug with multiple modes of inducing apoptosis', *Journal of Biological Chemistry*, 16(5), pp. 715–724. doi: 10.1007/s00775-011-0772-0.
- Chaudhuri, A. R. and Nussenzweig, A. (2017) 'The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(10), pp. 610–621. doi: 10.1038/nrm.2017.53.
- Chen, H. *et al.* (2003) 'Highly Selective Binding of Organometallic Ruthenium Ethylenediamine Complexes to Nucleic Acids: Novel Recognition Mechanisms', *J. Am. Chem. Soc.*, 125(1), pp. 173–186. doi: 10.1021/ja027719m.
- Chen, H. *et al.* (2018) 'Association Between BRCA Status and Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis', *Frontiers in Pharmacology*, 9, pp. 1–8. doi: 10.3389/fphar.2018.00909.
- Chen, T. *et al.* (2010) 'Ruthenium Polypyridyl Complexes That Induce Mitochondria-Mediated Apoptosis in Cancer Cells', *Inorganic Chemistry*, 49(14), pp. 6366–6368. doi: 10.1021/ic100277w.
- Cheng, Q. *et al.* (2014) 'The ligation of aspirin to cisplatin demonstrates significant synergistic effects on tumor cells', *Chemical Communications*, 50(56), pp. 7427–7430. doi: 10.1039/C4CC00419A.
- Choy, H., Park, C. and Yao, M. (2008) 'Current Status and Future Prospects for Satraplatin, an Oral Platinum Analogue', *Clin Cancer Res*, 14(6), pp. 1633–1638. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-2176.
- Ciccia, A. and Elledge, S. J. (2011) 'The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives', *Molecular Cell*, 40(2), pp. 179–204. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.019.
- Clarke, M. J. (2003) 'Ruthenium metallopharmaceuticals', *Coordination Chemistry Reviews*, 236, pp. 209–233.
- Clarke, M. J., Zhu, F. and Frasca, D. R. (1999) 'Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals', *Chemical Reviews*, 99(9), pp. 2511–2533. doi: 10.1021/cr9804238.
- Corazao-Rozas, P. *et al.* (2016) 'Mitochondrial oxidative phosphorylation controls cancer cell's life and death decisions upon exposure to MAPK inhibitors', *Oncotarget*, 7(26), pp. 39473–39485. doi: 10.18632/oncotarget.7790.
- Coverdale, J. P. C., Laroia-McCarron, T. and Romero-Canelon, I. (2019) 'Designing Ruthenium Anticancer Drugs: What Have We Learnt from the Key Drug Candidates?', *Inorganics*, 7(31), pp. 1–15. doi: 10.3390/inorganics7030031.
- Curtin, N. J. (2005) 'PARP inhibitors for cancer therapy', *Expert Rev. Mol. Med.*, 7(4), pp. 1–20. doi: 10.1017/s146239940500904x.
- Curtin, N. J., Drew, Y. and Sharma-Saha, S. (2019) 'Why BRCA mutations are not tumour-agnostic biomarkers for PARP inhibitor therapy', *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2019/10/05, 16(12), pp. 725–726. doi: 10.1038/s41571-019-0285-2.

- Czabotar, P. E. *et al.* (2014) 'Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(1), pp. 49–63. doi: 10.1038/nrm3722.
- Dale, L. D. *et al.* (1992) 'Studies on DNA damage and induction of SOS repair by novel multifunctional bio-reducible compounds. II. A metronidazole adduct of a ruthenium-arene compound', *Anticancer Drug Des*, 7(1), pp. 3–14.
- Dasari, S. and Tchounwou, P. B. (2014) 'Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action', *European Journal of Pharmacology*, 740, pp. 364–378. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.Cisplatin.
- Delaney, C. A. *et al.* (2000) 'Potentiation of Temozolomide and Topotecan Growth Inhibition and Cytotoxicity by Novel Poly(adenosine Diphosphoribose) Polymerase Inhibitors in a Panel of Human Tumor Cell Lines', *Clinical Cancer Research*, 6(7), pp. 2860–2867.
- Dickson, N. R. *et al.* (2011) 'A phase I dose-escalation study of NKP-1339 in patients with advanced solid tumors refractory to treatment', *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), p. 2607. doi: 10.1200/jco.2011.29.15_suppl.2607.
- Dougan, S. J. and Sadler, P. J. (2007) 'The Design of Organometallic Ruthenium Arene Anticancer Agents', *Chimia*, 61(11), pp. 704–715. doi: 10.2533/chimia.2007.704.
- Drean, A., Lord, C. J. and Ashworth, A. (2016) 'PARP inhibitor combination therapy', *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 108, pp. 73–85. doi: 10.1016/j.critrevonc.2016.10.010.
- Duffy, C. P. *et al.* (1998) 'Enhancement of Chemotherapeutic Drug Toxicity to Human Tumour Cells In Vitro by a Subset of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs)', *European Journal of Cancer*, 34(8), pp. 1250–1259. doi: 10.1016/S0959-8049(98)00045-8.
- Durig, J. R. *et al.* (1976) 'The induction of filamentous growth in Escherichia coli by ruthenium and palladium complexes', *Chemico-Biological Interactions*, 13(3–4), pp. 287–294. doi: 10.1016/0009-2797(76)90081-8.
- Durkacz, B. W. *et al.* (1980) '(ADP-Ribose)_n participates in DNA excision repair', *Nature*, 283(5747), pp. 593–596. doi: 10.1038/283593a0.
- Dwyer, F. *et al.* (1952) 'Biological activity of complex ions', *Nature*, 170, pp. 190–191. doi: 10.1038/170190a0.
- Dyson, P. J. (2007) 'Systematic Design of a Targeted Organometallic Antitumour Drug in Pre-clinical Development', *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 61(11), pp. 698–703. doi: 10.2533/chimia.2007.698.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005) 'Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials', *Lancet*, 365, pp. 1687–1717. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66544-0.
- Eckelman, B. P., Salvesen, G. S. and Scott, F. L. (2006) 'Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family', *EMBO Reports*, 7(10), pp. 988–994. doi: 10.1038/sj.embor.7400795.
- Edmondson, R. *et al.* (2014) 'Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors', *Assay and Drug Development Technologies*, 12(4), pp. 207–218. doi: 10.1089/adt.2014.573.
- El-Khamisy, S. F. *et al.* (2003) 'A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage', *Nucleic Acids Research*, 31(19), pp. 5526–5533. doi: 10.1093/nar/gkg761.

- Van Engeland, M. *et al.* (1998) 'Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure', *Cytometry*, 31(1), pp. 1–9. doi: 10.1002/(SICI)1097-0320(19980101)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R.
- Esteller, M. *et al.* (2000) 'Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors', *Journal of the National Cancer Institute*, 92, pp. 564–569. doi: 10.1093/jnci/92.7.564.
- Exman, P., Barroso-Sousa, R. and Tolaney, S. M. (2019) 'Evidence to date: talazoparib in the treatment of breast cancer', *OncoTargets and Therapy*, 12, pp. 5177–5187. doi: 10.2147/OTT.S184971.
- Farmer, H. *et al.* (2005) 'Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy', *Nature*, 434(7035), pp. 917–921. doi: 10.1038/nature03445.
- Fayad, W. *et al.* (2009) 'Restriction of cisplatin induction of acute apoptosis to a subpopulation of cells in a three-dimensional carcinoma culture model', *Int J Cancer*, 125(10), pp. 2450–2455. doi: 10.1002/ijc.24627.
- Feldman, D. R. *et al.* (2008) 'Medical Treatment of Advanced Testicular Cancer', *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 299(6), pp. 672–684.
- Ferraris, D. (2015) 'Overview of PARP Inhibitor Design and Optimization', in Curtin, N. J. and Sharma, R. A. (eds) *Cancer Drug Discovery and Development*. Springer International Publishing Switzerland, pp. 183–203. doi: 10.1007/978-3-319-14151-0_7.
- Flocke, L. S. *et al.* (2016) 'Molecular mode of action of NKP-1339 – a clinically investigated ruthenium-based drug – involves ER- and ROS-related effects in colon carcinoma cell lines', *Investigational New Drugs*, 34, pp. 261–268. doi: 10.1007/s10637-016-0337-8.
- Fong, J. *et al.* (2015) 'A novel class of ruthenium-based photosensitizers effectively kills in vitro cancer cells and in vivo tumors', *Photochem Photobiol Sci*, 14(11), pp. 2014–2023. doi: 10.1039/c4pp00438h.
- Fong, P. C. *et al.* (2009) 'Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers', *The New England Journal of Medicine*, 361(2), pp. 123–134. doi: 10.1056/NEJMoa0900212.
- Fong, P. C. *et al.* (2010) 'Poly(ADP)-ribose polymerase inhibition: Frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval', *Journal of Clinical Oncology*, 28(15), pp. 2512–2519. doi: 10.1200/JCO.2009.26.9589.
- Freshney, I. R. (2010) 'Subculture and Cell Lines', in *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6th ed. Wiley, pp. 187–206. doi: 10.1002/9780470649367.ch12.
- Frezza, M. *et al.* (2010) 'Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy', *Current Pharmaceutical Design*, 16(16), pp. 1813–1825. doi: 10.2174/138161210791209009.
- Friedrich, J., Ebner, R. and Kunz-Schughart, L. A. (2007) 'Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge?', *Int. J. Radiat. Biol.*, 83, pp. 849–871. doi: 10.1080/09553000701727531.
- Frizzell, K. M. and Kraus, W. L. (2009) 'PARP inhibitors and the treatment of breast cancer: beyond BRCA1/2?', *Breast Cancer Res.* 2009/12/19, 11(6), p. 111. doi: 10.1186/bcr2451.
- Fu, R. *et al.* (2017) 'Designing multi-targeted agents: An emerging anticancer drug discovery paradigm', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 136, pp. 195–211. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.05.016.
- Furuta, T. *et al.* (2002) 'Transcription-coupled Nucleotide Excision Repair as a Determinant of Cisplatin Sensitivity of Human Cells', *Cancer Research*, 62(17), pp. 4899–4902.

- Gaiddon, C. *et al.* (2005) 'Ruthenium (II)-Derived Organometallic Compounds Induce Cytostatic and Cytotoxic Effects on Mammalian Cancer Cell Lines through p53-Dependent and p53-Independent Mechanisms', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(3), pp. 1403–1411. doi: 10.1124/jpet.105.089342.
- Galluzzi, L. *et al.* (2007) 'Cell death modalities: classification and pathophysiological implications', *Cell Death and Differentiation*, 14, pp. 1237–1243. doi: 10.1038/sj.cdd.4402148.
- Galluzzi, L. *et al.* (2012) 'Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012', *Cell death and differentiation*, 19(1), pp. 107–120. doi: 10.1038/cdd.2011.96.
- Galluzzi, L. *et al.* (2012) 'Molecular mechanisms of cisplatin resistance', *Oncogene*, 31(15), pp. 1869–1883. doi: 10.1038/onc.2011.384.
- Galluzzi, L. *et al.* (2014) 'Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future', *Cell Death and Disease*, 5(5), pp. e1257-18. doi: 10.1038/cddis.2013.428.
- Galluzzi, L. and Vitale, I. (2018) 'Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018', *Cell death and differentiation*, 25, pp. 486–541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
- Garg, A. D. *et al.* (2017) 'Trial watch: Immunogenic cell death induction by anticancer chemotherapeutics', *OncoImmunology*, 6(12), p. e1386829. doi: 10.1080/2162402X.2017.1386829.
- Gava, B. *et al.* (2006) 'Inhibition of B16 Melanoma Metastases with the Ruthenium Complex Imidazolium trans -Imidazoledimethylsulfoxide- tetrachlororuthenate and Down-Regulation of Tumor Cell Invasion', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(1), pp. 284–291. doi: 10.1124/jpet.105.095141.
- Ghobrial, I. M., Witzig, T. E. and Adjei, A. A. (2005) 'Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy', *Ca-Cancer J. Clin.*, 55, pp. 178–194. doi: 10.3322/canjclin.55.3.178.
- Gill, M. R. *et al.* (2013) 'Targeting the endoplasmic reticulum with a membrane- interactive luminescent ruthenium(II) polypyridyl complex', *Chemical Science*, 4(12), pp. 4512–4519. doi: 10.1039/C3SC51725J.
- Gill, M. R. and Thomas, J. A. (2012) 'Ruthenium(II) polypyridyl complexes and DNA — from structural probes to cellular imaging and therapeutics', *Chem. Soc. Rev.*, 41, pp. 3179–3192. doi: 10.1039/c2cs15299a.
- Gligorijević, N. *et al.* (2012) 'Picolinate ruthenium(II)-arene complex with in vitro antiproliferative and antimetastatic properties: comparison to a series of ruthenium(II)-arene complexes with similar structure', *J. Inorg. Biochem.*, 108, pp. 53–61. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.12.002.
- Golan, T. *et al.* (2019) 'Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer', *New England Journal of Medicine*, 381(4), pp. 317–327. doi: 10.1056/NEJMoa1903387.
- Golbaghi, G. *et al.* (2019) 'Organoruthenium(II) Complexes Bearing an Aromatase Inhibitor: Synthesis, Characterization, in Vitro Biological Activity and in Vivo Toxicity in Zebrafish Embryos', *Organometallics*, 38(3), pp. 702–711. doi: 10.1021/acs.organomet.8b00897.
- Golbaghi, G. and Castonguay, A. (2020) 'Rationally Designed Ruthenium Complexes for Breast Cancer Therapy', *Molecules*, 25(2), pp. 265–290. doi: 10.3390/molecules25020265.
- Golstein, P. and Kroemer, G. (2007) 'Cell death by necrosis: towards a molecular definition', *Trends Biochem Sci*, 32(1), pp. 37–43. doi: 10.1016/j.tibs.2006.11.001.

- Gómez-Ruiz, S. *et al.* (2012) 'On the Discovery, Biological Effects, and Use of Cisplatin and Metallocenes in Anticancer Chemotherapy', *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2012, pp. 1–15. doi: 10.1155/2012/140284.
- Gonzalez, V. M. *et al.* (2001) 'Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?', *Molecular Pharmacology*, 59(4), pp. 657–663. doi: 10.1124/mol.59.4.657.
- Gottipati, P. *et al.* (2010) 'Poly (ADP-Ribose) Polymerase Is Hyperactivated in Homologous Recombination – Defective Cells', *Molecular and Cellular Pathobiology*, 70(13), pp. 5389–5398. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4716.
- de Gramont, A. *et al.* (2000) 'Leucovorin and Fluorouracil With or Without Oxaliplatin as First-Line Treatment in Advanced Colorectal Cancer', *Journal of Clinical Oncology*, 18(16), pp. 2938–2947. doi: 10.1200/JCO.2000.18.16.2938.
- Guggenheim, E. R. *et al.* (2009) 'Photoaffinity isolation and identification of proteins in cancer cell extracts that bind to platinum-modified DNA', *ChemBioChem*, 10(1), pp. 141–157. doi: 10.1002/cbic.200800471.
- Guo, Z. and Sadler, P. J. (1999) 'Metals in Medicine', *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38(11), pp. 1512–1531. doi: 10.1002/(SICI)1521-3773(19990601)38:11<1512::AID-ANIE1512>3.0.CO;2-Y.
- Hall, M. D. *et al.* (2008) 'The Role of Cellular Accumulation in Determining Sensitivity to Platinum-Based Chemotherapy', *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48, pp. 495–535. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.080907.180426.
- Hall, M. D. *et al.* (2014) 'Say No to DMSO: Dimethylsulfoxide Inactivates Cisplatin, Carboplatin and Other Platinum Complexes', *Cancer Research*, 74(14), pp. 3913–3922. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0247.
- Hamilton, G. and Rath, B. (2018) 'Applicability of tumor spheroids for in vitro chemosensitivity assays', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 15(1), pp. 15–23. doi: 10.1080/17425255.2019.1554055.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of Cancer: The Next Generation', *Cell*, 144(5), pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Harrap, K. R. (1985) 'Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative', *Cancer Treatment Reviews*, 12(Supplement A), pp. 21–33. doi: 10.1016/0305-7372(85)90015-5.
- Hartinger, C. G. *et al.* (2006) 'From bench to bedside--preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A)', *J. Inorg. Biochem.*, 100(5–6), pp. 891–904. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2006.02.013.
- Hartinger, C. G. *et al.* (2008) 'KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent--Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients', *Chem. Biodivers.*, 5(10), pp. 2140–2155. doi: 10.1002/cbdv.200890195.
- Hayward, R. L. *et al.* (2005) 'Investigation of the role of Bax, p21/Waf1 and p53 as determinants of cellular responses in HCT116 colorectal cancer cells exposed to the novel cytotoxic ruthenium (II) organometallic agent, RM175', *Cancer Chemother Pharmacol*, 55(6), pp. 577–583. doi: 10.1007/s00280-004-0932-9.
- Heffeter, P. *et al.* (2012) 'Intracellular protein binding patterns of the anticancer ruthenium drugs KP1019 and KP1339', *J Biol Inorg Chem*, 15(5), pp. 737–748. doi: 10.1007/s00775-010-0642-1.
- Heffeter, P. *et al.* (2013) 'The ruthenium compound KP1339 potentiates the anticancer activity of

- sorafenib in vitro and in vivo', *European Journal of Cancer*, 49(15), pp. 3366–3375. doi: 10.1016/j.ejca.2013.05.018.
- Hennessy, B. T. J. *et al.* (2010) 'Somatic Mutations in BRCA1 and BRCA2 Could Expand the Number of Patients That Benefit From Poly (ADP Ribose) Polymerase Inhibitors in Ovarian Cancer', *Journal of Clinical Oncology*, 28(22), pp. 3570–3576. doi: 10.1200/JCO.2009.27.2997.
- Hoeijmakers, J. H. J. (2001) 'Genome maintenance mechanisms for preventing cancer', *Nature*, 411(6835), pp. 366–374. doi: 10.1038/35077232.
- Hong, S.-K. *et al.* (2017) 'Suppression of B-Raf V600E melanoma cell survival by targeting mitochondria using triphenyl-phosphonium-conjugated nitroxide or ubiquinone', *Cancer Biology & Therapy*, 18(2), pp. 106–114. doi: 10.1080/15384047.2016.1250987.
- Howe, L. R. *et al.* (2001) 'Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer', *Endocrine-Related Cancer*, 8(2), pp. 97–114. doi: 10.1677/erc.0.0080097.
- Hoy, S. M. (2018) 'Talazoparib: First Global Approval', *Drugs*, 78(18), pp. 1939–1946. doi: 10.1007/s40265-018-1026-z.
- Hu, W. *et al.* (2017) 'Biotin-Pt (IV)-indomethacin hybrid: A targeting anticancer prodrug providing enhanced cancer cellular uptake and reversing cisplatin resistance', *Journal of Inorganic Biochemistry*, 175, pp. 47–57. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2017.07.002.
- Huang, H., Yu, B., *et al.* (2015) 'Highly Charged Ruthenium (II) Polypyridyl Complexes as Lysosome-Localized Photosensitizers for Two-Photon Photodynamic Therapy', *Angewandte Chemie International Edition*, 54(47), pp. 14049–14052. doi: 10.1002/anie.201507800.
- Huang, H., Zhang, P., *et al.* (2015) 'Labile ruthenium(II) complexes with extended phenyl-substituted terpyridyl ligands: synthesis, aquation and anticancer evaluation', *Dalton Transactions*, 44(35), pp. 15602–15610. doi: 10.1039/C5DT02446C.
- Huang, X. *et al.* (2005) 'Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis', *Cell Prolif.*, 38(4), pp. 223–243. doi: 10.1111/j.1365-2184.2005.00344.x.
- Hussain, T., Gupta, S. and Mukhtar, H. (2003) 'Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis', *Cancer Letters*, 191(2), pp. 125–135. doi: 10.1016/s0304-3835(02)00524-4.
- Intini, F. P. *et al.* (2017) 'Novel Antitumor Platinum(II) Conjugates Containing the Nonsteroidal Anti-inflammatory Agent Diclofenac: Synthesis and Dual Mechanisms of Antiproliferative Effects', *Inorganic Chemistry*, 56(3), pp. 1483–1497. doi: 10.1021/acs.inorgchem.6b02553.
- Ivanović, I. *et al.* (2011) 'X-Ray structure and cytotoxic activity of a picolinate ruthenium (II)–arene complex', *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76(1), pp. 53–61. doi: 10.2298/JSC100517017I.
- Jain, P. G. and Patel, B. D. (2019) 'Medicinal chemistry approaches of poly ADP-Ribose polymerase 1 (PARP1) inhibitors as anticancer agents - A recent update', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 165, pp. 198–215. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.01.024.
- Jakupec, M. A. *et al.* (2008) 'Antitumour metal compounds: more than theme and variations', *Dalton Transactions*, (2), pp. 183–194. doi: 10.1039/b712656p.
- Jamieson, E. R. and Lippard, S. J. (1999) 'Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts', *Chemical Reviews*, 99(9), pp. 2467–2498. doi: 10.1021/cr980421n.
- Jänne, P. A. and Mayer, R. J. (2000) 'Chemoprevention of Colorectal Cancer', *The New England Journal of Medicine*, 342(26), pp. 1960–1968. doi: 10.1056/NEJM200006293422606.

- Jiang, X. *et al.* (2019) 'Current status and future prospects of PARP inhibitor clinical trials in ovarian cancer', *Cancer Management and Research*, 11, pp. 4371–4390. doi: 10.2147/CMAR.S200524.
- Johnstone, T. C., Park, G. Y. and Lippard, S. J. (2014) 'Understanding and Improving Platinum Anticancer Drugs - Phenanthriplatin', *Anticancer Research*, 34(1), pp. 471–476.
- Jovanović, K. K. *et al.* (2016) 'Cell cycle, apoptosis, cellular uptake and whole-transcriptome microarray gene expression analysis of HeLa cells treated with a ruthenium(II)-arene complex with an isoquinoline-3-carboxylic acid ligand', *Journal of Inorganic Biochemistry*, 163, pp. 362–373. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.04.011.
- Julien, O. and Wells, J. A. (2017) 'Caspases and their substrates', *Cell death and differentiation*, 24, pp. 1380–1389. doi: 10.1038/cdd.2017.44.
- Kaelin, W. G. (2005) 'The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy', *Nature Reviews Cancer*, 5(9), pp. 689–698. doi: 10.1038/nrc1691.
- Kapitza, S. *et al.* (2005) 'Heterocyclic complexes of ruthenium (III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells', *J Cancer Res Clin Oncol*, 131(2), pp. 101–110. doi: 10.1007/s00432-004-0617-0.
- Kenny, R. G. and Marmion, C. J. (2019) 'Toward Multi-Targeted Platinum and Ruthenium Drugs-A New Paradigm in Cancer Drug Treatment Regimens?', *Chem. Rev.*, 119(2), pp. 1058–1137. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00271.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972) 'Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics', *Br. J. Cancer*, 26(4), pp. 239–257. doi: 10.1038/bjc.1972.33.
- Keung, M. Y. *et al.* (2020) 'Response of Breast Cancer Cells to PARP Inhibitors Is Independent of BRCA Status', *Journal of Clinical Medicine*, 9(4), p. 940. doi: 10.3390/jcm9040940.
- Kilpin, K. J. and Dyson, P. J. (2013) 'Enzyme inhibition by metal complexes: concepts, strategies and applications', *Chem. Sci.*, 4(4), pp. 1410–1419. doi: 10.1039/c3sc22349c.
- Kim, G. *et al.* (2015) 'FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy', *Clin. Cancer Res.*, 21(19), pp. 4257–4261. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-15-0887.
- Kim, S. K. and Nordén, B. (1993) 'Methyl green. A DNA major-groove binding drug', *FEBS Letters*, 315(1), pp. 61–64. doi: 10.1016/0014-5793(93)81133-K.
- Knezevic, C. E. *et al.* (2016) 'Proteome-wide profiling of clinical PARP inhibitors reveals compound-specific secondary targets', *Cell Chem Biol*, 23(12), pp. 1490–1503. doi: 10.1016/j.chembiol.2016.10.011.
- Koczkowska, M. *et al.* (2016) 'Detection of somatic BRCA1/2 mutations in ovarian cancer – next-generation sequencing analysis of 100 cases', *Cancer Medicine*, 5(7), pp. 1640–1646. doi: 10.1002/cam4.748.
- Kosiha, A., Parthiban, C. and Elango, K. P. (2018) 'Metal(II) complexes of bioactive aminonaphthoquinone-based ligand: synthesis, characterization and BSA binding, DNA binding/cleavage, and cytotoxicity studies', *Journal of Coordination Chemistry*, 71(10), pp. 1560–1574. doi: 10.1080/00958972.2018.1461846.
- Kostova, I. (2006) 'Platinum Complexes as Anticancer Agents', *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 1(1), pp. 1–22. doi: 10.2174/157489206775246458.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C. (2007) 'Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell

- Death', *Physiological Reviews*, 87(1), pp. 99–163. doi: 10.1152/physrev.00013.2006.
- Kuchenbaecker, K. B. *et al.* (2017) 'Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers', *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 317(23), pp. 2402–2416. doi: 10.1001/jama.2017.7112.
- Laliberté, J.-F. *et al.* (1987) 'Ruthenium Ammine Complexes as Electron Acceptors for Growth Stimulation by Plasma Membrane Electron Transport', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 19(1), pp. 69–81. doi: 10.1007/BF00769733.
- Lee, P. Y. *et al.* (2012) 'Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments', *Journal of Visualized Experiments*, (62), p. e3923. doi: 10.3791/3923.
- Lee, R. F. S. *et al.* (2017) 'The Differential Distribution of RAPTA-T in Non-Invasive and Invasive Breast Cancer Cells Correlates with Its Anti-Invasive and Anti-Metastatic Effects', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), p. 1869. doi: 10.3390/ijms18091869.
- Lee, Y.-R. *et al.* (2013) 'New Approaches of PARP-1 Inhibitors in Human Lung Cancer Cells and Cancer Stem-Like Cells by Some Selected Anthraquinone-Derived Small Molecules', *PloS One*, 8(2), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0056284.
- Leijen, S. *et al.* (2015) 'Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy', *Invest. New Drugs*. 2014/10/26, 33(1), pp. 201–214. doi: 10.1007/s10637-014-0179-1.
- de Lera, A. R. and Ganesan, A. (2016) 'Epigenetic polypharmacology: from combination therapy to multitargeted drugs', *Clinical Epigenetics*, 8(1), pp. 1–21. doi: 10.1186/s13148-016-0271-9.
- Levina, A., Mitra, A. and Lay, P. A. (2009) 'Recent developments in ruthenium anticancer drugs', *Metallomics*, 1(6), pp. 458–470. doi: 10.1039/b904071d.
- Li, G. *et al.* (2016) 'Ruthenium(II) complexes with dppz: From molecular photoswitch to biological applications', *Dalton Transactions*, 46(34), pp. 13261–13276. doi: 10.1039/C6DT01624C.
- Li, L. *et al.* (2012) 'Ruthenium complexes containing bis-benzimidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers', *Dalton Transactions*, 41, pp. 1138–1141. doi: 10.1039/c1dt11950h.
- Li, P. *et al.* (1997) 'Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade', *Cell*, 91(4), pp. 479–489. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80434-1.
- Li, X., Liu, Y. and Tian, H. (2018) 'Current Developments in Pt (IV) Prodrugs Conjugated with Bioactive Ligands', *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018, pp. 1–18. doi: 10.1155/2018/8276139.
- Licona, C. *et al.* (2017) 'A ruthenium anticancer compound interacts with histones and impacts differently on epigenetic and death pathways compared to cisplatin', *Oncotarget*, 8(2), pp. 2568–2584. doi: 10.18632/oncotarget.13711.
- Lim, D. and Ngeow, J. (2016) 'Evaluation of the methods to identify patients who may benefit from PARP inhibitor use', *Endocrine-Related Cancer*, 23(6), pp. R267–R285. doi: 10.1530/ERC-16-0116.
- Lin, K. *et al.* (2018) 'Applications of Ruthenium Complex in Tumor Diagnosis and Therapy', *Frontiers in Pharmacology*, 9, pp. 1–10. doi: 10.3389/fphar.2018.01323.
- Liu, X. *et al.* (2008) 'An enzyme-linked immunosorbent poly(ADP-ribose) polymerase biomarker assay for clinical trials of PARP inhibitors', *Analytical Biochemistry*, 381(2), pp. 240–247. doi: 10.1016/j.ab.2008.07.007.

- Lopes, J. C. S. *et al.* (2015) 'Ruthenium(II) Complexes Containing Anti-Inflammatory Drugs as Ligands: Synthesis, Characterization and in vitro Cytotoxicity Activities on Cancer Cell Lines', *J. Braz. Chem. Soc.*, 26(9), pp. 1838–1847. doi: 10.5935/0103-5053.20150161.
- Lord, C. J. and Ashworth, A. (2013) 'Mechanisms of resistance to therapies targeting BRCA-mutant cancers', *Nature Medicine*, 19(11), pp. 1381–1388. doi: 10.1038/nm.3369.
- Lord, C. J. and Ashworth, A. (2016) 'BRCAness revisited', *Nat. Rev. Cancer*, 16(2), pp. 110–120. doi: 10.1038/nrc.2015.21.
- Lord, C. J. and Ashworth, A. (2017) 'PARP Inhibitors: The First Synthetic Lethal Targeted Therapy', *Science*, 355(6330), pp. 1152–1158. doi: 10.1126/science.aam7344.
- Luna-Vargas, M. P. A. and Chipuk, J. E. (2016) 'Physiological and Pharmacological Control of BAK, BAX, and Beyond', *Trends in Cell Biology*, 26(12), pp. 906–917. doi: 10.1016/j.tcb.2016.07.002.
- Luo, Z. *et al.* (2014) 'Ruthenium polypyridyl complexes as inducer of ROS-mediated apoptosis in cancer cells by targeting thioredoxin reductase', *Metallomics*, 6(8), pp. 1480–1490. doi: 10.1039/c4mt00044g.
- Madison, D. L., Stauffer, D. and Lundblad, J. R. (2011) 'The PARP inhibitor PJ34 causes a PARP1-independent, p21 dependent mitotic arrest', *DNA Repair*, 10(10), pp. 1003–1013. doi: 10.1016/j.dnarep.2011.07.006.
- Malone, K. E. *et al.* (2006) 'Prevalence and Predictors of BRCA1 and BRCA2 Mutations in a Population-Based Study of Breast Cancer in White and Black American Women Ages 35 to 64 Years', *Cancer Research*, 66(16), pp. 8297–8308. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0503.
- Mandal, P. *et al.* (2018) 'Ruthenium(II) Arene NSAID Complexes: Inhibition of Cyclooxygenase and Antiproliferative Activity Against Cancer Cell Lines', *Dalton Transactions*, 47(2), pp. 517–527. doi: 10.1039/C7DT03637J.
- Mari, C. *et al.* (2015) 'Combination of Ru(II) complexes and light: new frontiers in cancer therapy', *Chemical Science*, 6, pp. 2660–2686. doi: 10.1039/C4SC03759F.
- Matulonis, U. A. and Monk, B. J. (2017) 'PARP inhibitor and chemotherapy combination trials for the treatment of advanced malignancies: does a development pathway forward exist?', *Annals of Oncology*, 28(3), pp. 443–447. doi: 10.1093/annonc/mdw697.
- McCabe, N. *et al.* (2006) 'Deficiency in the Repair of DNA Damage by Homologous Recombination and Sensitivity to Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition', *Cancer Res.*, 66(16), pp. 8109–8115. doi: 10.1158/0008-5472.Can-06-0140.
- Medici, Serenella, Peana, M. F. and Zoroddu, M. A. (2018) 'Noble Metals in Pharmaceuticals: Applications and Limitations', in Rai, M., Ingle, A., and Medici, S (eds) *Biomedical Applications of Metals*. Springer International Publishing AG, pp. 3–48. doi: 10.1007/978-3-319-74814-6_1.
- Mendes-Pereira, A. M. *et al.* (2009) 'Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors', *EMBO Molecular Medicine*, 1(6–7), pp. 315–322. doi: 10.1002/emmm.200900041.
- Mendes, F. *et al.* (2011) 'Metal-Based Inhibition of Poly(ADP-ribose) Polymerase--The Guardian Angel of DNA', *J. Med. Chem.*, 54(7), pp. 2196–2206. doi: 10.1021/jm2000135.
- Meng, X. *et al.* (2009) 'A Ruthenium-Containing Organometallic Compound Reduces Tumor Growth through Induction of the Endoplasmic Reticulum Stress Gene CHOP', *Cancer Research*, 69(13), pp. 5458–5466. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4408.
- Merlino, A. (2016) 'Interactions between proteins and Ru compounds of medicinal interest: A

- structural perspective', *Coordination Chemistry Reviews*, 326, pp. 111–134. doi: 10.1016/j.ccr.2016.08.001.
- Mestroni, G. *et al.* (1994) 'Water-Soluble Ruthenium(III)-Dimethyl Sulfoxide Complexes: Chemical Behaviour and Pharmaceutical Properties', *Metal-Based Drugs*, 1(1), pp. 41–63. doi: 10.1155/MBD.1994.41.
- Milacic, V. *et al.* (2006) 'A Novel Anticancer Gold (III) Dithiocarbamate Compound Inhibits the Activity of a Purified 20S Proteasome and 26S Proteasome in Human Breast Cancer Cell Cultures and Xenografts', *Cancer Research*, 66(21), pp. 10478–10487. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3017.
- Milacic, V. *et al.* (2008) 'Pyrrolidine dithiocarbamate-zinc (II) and -copper (II) complexes induce apoptosis in tumor cells by inhibiting the proteasomal activity', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231, pp. 24–33. doi: 10.1016/j.taap.2008.03.009.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F. (1988) 'A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells', *Nucleic Acids Research*, 16(3), p. 1215.
- Min, A. and Im, S. A. (2020) 'PARP Inhibitors as Therapeutics: Beyond Modulation of PARylation', *Cancers*, 12(394), pp. 1–16. doi: 10.3390/cancers12020394.
- Mokesch, S. *et al.* (2015) '1,3-Dioxindan-2-carboxamides as Bioactive Ligand Scaffolds for the Development of Novel Organometallic Anticancer Drugs', *Organometallics*, 34(5), pp. 848–857. doi: 10.1021/om501032s.
- Monks, A. *et al.* (1991) 'Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines', *Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), pp. 757–766. doi: 10.1093/jnci/83.11.757.
- Monro, S. *et al.* (2019) 'Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433', *Chemical Reviews*, 119(797–828). doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00211.
- Morris, R. E. *et al.* (2001) 'Inhibition of Cancer Cell Growth by Ruthenium (II) Arene Complexes', *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(22), pp. 3616–3621. doi: 10.1021/jm010051m.
- Moucheron, C. (2009) 'From cisplatin to photoreactive Ru complexes: targeting DNA for biomedical applications', *New Journal of Chemistry*, 33(2), pp. 235–245. doi: 10.1039/b817016a.
- Muggia, F. M. *et al.* (2015) 'Platinum Antitumor Complexes: 50 Years Since Barnett Rosenberg's Discovery', *Journal of Clinical Oncology*, 33(35), pp. 4219–4226. doi: 10.1200/JCO.2015.60.7481.
- Mukhopadhyay, A. *et al.* (2010) 'Development of a functional assay for homologous recombination status in primary cultures of epithelial ovarian tumor and correlation with sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors', *Clinical Cancer Research*, 16(8), pp. 2344–2351. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2758.
- Murai, J. *et al.* (2012) 'Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors', *Cancer Res.*, 72(21), pp. 5588–5599. doi: 10.1158/0008-5472.Can-12-2753.
- Murai, J. *et al.* (2014) 'Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib', *Mol. Cancer Ther.*, 13(2), pp. 433–443. doi: 10.1158/1535-7163.Mct-13-0803.
- Murray, B. S. *et al.* (2016) 'The development of RAPTA compounds for the treatment of tumors', *Coord. Chem. Rev.*, 306, pp. 86–114. doi: 10.1016/j.ccr.2015.06.014.
- Nagata, S. (2005) 'DNA Degradation in Development and Programmed Cell Death', *Annu. Rev. Immunol.*, 23, pp. 853–875. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115811.

- Neumann, W. *et al.* (2014) ‘Conjugates of Cisplatin and Cyclooxygenase Inhibitors as Potent Antitumor Agents Overcoming Cisplatin Resistance’, *ChemMedChem*, 9(6), pp. 1150–1153. doi: 10.1002/cmdc.201402074.
- Neumann, W. *et al.* (2015) ‘Conjugation of Cisplatin Analogues and Cyclooxygenase Inhibitors to Overcome Cisplatin Resistance’, *ChemMedChem*, 10(1), pp. 183–192. doi: 10.1002/cmdc.201402353.
- Nhukeaw, T. *et al.* (2014) ‘Cellular responses of BRCA1-defective and triple-negative breast cancer cells and in vitro BRCA1 interactions induced by metallo-intercalator ruthenium(II) complexes containing chloro-substituted phenylazopyridine’, *BMC Cancer*, 14, p. 73. doi: 10.1186/1471-2407-14-73.
- Nhukeaw, T. *et al.* (2019) ‘Cellular responses of BRCA1-defective HCC1937 breast cancer cells induced by the antimetastasis ruthenium(II) arene compound RAPTA-T’, *Apoptosis*, 24(7–8), pp. 612–622. doi: 10.1007/s10495-019-01544-w.
- Nikolić, S. *et al.* (2015) ‘Strong in Vitro Cytotoxic Potential of New Ruthenium–Cymene Complexes’, *Organometallics*, 34(14), pp. 3464–3473. doi: 10.1021/acs.organomet.5b00041.
- Nikolić, S. *et al.* (2016) ‘Synthesis, characterization and biological evaluation of novel Ru(II)-arene complexes containing intercalating ligands’, *J. Inorg. Biochem.*, 160, pp. 156–165. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.01.005.
- Noordermeer, S. M. and van Attikum, H. (2019) ‘PARP Inhibitor Resistance: A Tug-of-War in BRCA-Mutated Cells’, *Trends in Cell Biology*, 29(10), pp. 820–834. doi: 10.1016/j.tcb.2019.07.008.
- Norquist, B. *et al.* (2011) ‘Secondary Somatic Mutations Restoring BRCA1/2 Predict Chemotherapy Resistance in Hereditary Ovarian Carcinomas’, *Journal of Clinical Oncology*, 29(22), pp. 3008–3015. doi: 10.1200/JCO.2010.34.2980.
- O’Sullivan, C. C. *et al.* (2014) ‘Beyond breast and ovarian cancers: PARP inhibitors for BRCA mutation-associated and BRCA-like solid tumors’, *Frontiers in Oncology*, 4(42), pp. 1–13. doi: 10.3389/fonc.2014.00042.
- Ogino, M. and Minoura, S. (2001) ‘Indomethacin increases the cytotoxicity of cis-platinum and 5-fluorouracil in the human uterine cervical cancer cell lines SKG-2 and HKUS by increasing the intracellular uptake of the agents’, *International Journal of Clinical Oncology*, 6(2), pp. 84–89. doi: 10.1007/PL00012088.
- Ohmoto, A. and Yachida, S. (2017) ‘Current status of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and future directions’, *OncoTargets Ther.*, 10, pp. 5195–5208. doi: 10.2147/ott.S139336.
- Oliveira, K. M. *et al.* (2020) ‘Ru(II)/diclofenac-based complexes: DNA, BSA interaction and their anticancer evaluation against lung and breast tumor cells’, *Dalton Transactions*, 49(36), pp. 12643–12652. doi: 10.1039/D0DT01591A.
- Ormerod, M. G. (1994) ‘Analysis of DNA - general methods’, in *Flow cytometry: a practical approach*. 2nd ed. Oxford University Press, pp. 119–125.
- Ormerod, M. G., Orr, R. M. and Peacock, J. H. (1994) ‘The role of apoptosis in cell killing by cisplatin: a flow cytometric study’, *Br. J. Cancer*, 69, pp. 93–100. doi: 10.1038/bjc.1994.14.
- Orvig, C. and Abrams, M. J. (1999) ‘Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction’, *Chemical Reviews*, 99(9), pp. 2201–2203. doi: 10.1021/cr980419w.
- Ott, I., Biot, C. and Hartinger, C. G. (2014) ‘AAS, XRF, and MS Methods in Chemical Biology of Metal Complexes’, in Gasser, G. (ed.) *Inorganic Chemical Biology: Principles, Techniques and Applications*. New York: John Wiley & Sons Inc, pp. 63–97.

- Pal, M., Nandi, U. and Mukherjee, D. (2018) 'Detailed account on activation mechanisms of ruthenium coordination complexes and their role as antineoplastic agents', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 150, pp. 419–445. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.03.015.
- Pal, T. *et al.* (2005) 'BRCA1 and BRCA2 Mutations Account for a Large Proportion of Ovarian Carcinoma Cases', *Cancer*, 104(12), pp. 2807–2816. doi: 10.1002/cncr.21536.
- Palermo, G. *et al.* (2016) 'Fighting Cancer with Transition Metal Complexes: From Naked DNA to Protein and Chromatin Targeting Strategies', *ChemMedChem*, 11(12), pp. 1199–1210. doi: 10.1002/cmdc.201500478.
- Paoli, P., Giannoni, E. and Chiarugi, P. (2013) 'Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833(12), pp. 3481–3498. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.026.
- Passeri, D. *et al.* (2016) 'Concepts and Molecular Aspects in the Polypharmacology of PARP-1 Inhibitors', *ChemMedChem*, 11(12), pp. 1219–1226. doi: 10.1002/cmdc.201500391.
- Pathak, R. K. *et al.* (2014) 'The Prodrug Platin- A: Simultaneous Release of Cisplatin and Aspirin', *Angew Chem Int Ed Engl*, 53(7), pp. 1963–1967. doi: 10.1002/anie.201308899.
- Patra, M. *et al.* (2013) 'DMSO-Mediated Ligand Dissociation: Renaissance for Biological Activity of N-Heterocyclic-[Ru(η 6-arene)Cl₂] Drug Candidates', *Chemistry - A European Journal*, 19(44), pp. 14768–14772. doi: 10.1002/chem.201303341.
- Paul, M. *et al.* (2017) 'Hand-Ground Nanoscale Zn II -Based Coordination Polymers Derived from NSAIDs: Cell Migration Inhibition of Human Breast Cancer Cells', *Chemistry - A European Journal*, 23(24), pp. 5736–5747. doi: 10.1002/chem.201605674.
- Păunescu, E. *et al.* (2016) 'Nonsteroidal Anti-inflammatory - Organometallic Anticancer Compounds', *Inorganic Chemistry*, 55(4), pp. 1788–1808. doi: 10.1021/acs.inorgchem.5b02690.
- Pavlović, M. *et al.* (2019) 'New organoruthenium compounds with pyrido[2,3':5,6]pyrazino[2,3-f][1,10]phenanthroline: synthesis, characterization, cytotoxicity, and investigation of mechanism of action', *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 24(2), pp. 297–310. doi: 10.1007/s00775-019-01647-4.
- Pavlović, M. *et al.* (2020) 'Synthesis, chemical characterization, PARP inhibition, DNA binding and cellular uptake of novel ruthenium(II)-arene complexes bearing benzamide derivatives in human breast cancer cells', *Journal of Inorganic Biochemistry*, 210(111155). doi: 10.1016/j.jinorgbio.2020.111155.
- Pearl, L. H. *et al.* (2015) 'Therapeutic opportunities within the DNA damage response', *Nature Reviews Cancer*, 15(3), pp. 166–180. doi: 10.1038/nrc3891.
- Peng, G. *et al.* (2014) 'Genome-wide transcriptome profiling of homologous recombination DNA repair', *Nature Communications*, 5, pp. 1–11. doi: 10.1038/ncomms4361.
- Pereira-leite, C., Nunes, C. and Reis, S. (2013) 'Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with membranes: In vitro assessment and relevance for their biological actions', *Progress in Lipid Research*, 52(4), pp. 571–584. doi: 10.1016/j.plipres.2013.08.003.
- Petrucelli, N., Daly, M. B. and Feldman, G. L. (2010) 'Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2', *Genetics in Medicine*, 12(5), pp. 245–259. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181d38f2f.
- Pinto, B. *et al.* (2020) 'Three-Dimensional Spheroids as In Vitro Preclinical Models for Cancer Research', *Pharmaceutics*, 12(12), p. 1186. doi: 10.3390/pharmaceutics12121186.
- Pisani, M. J. *et al.* (2010) 'Selective mitochondrial accumulation of cytotoxic dinuclear polypyridyl

- ruthenium(II) complexes', *Metalomics*, 2, pp. 393–396. doi: 10.1039/c004922k.
- Pizarro, A. M., Habtemariam, A. and Sadler, P. J. (2010) 'Activation Mechanisms for Organometallic Anticancer Complexes', *Topics in Organometallic Chemistry*, 32, pp. 21–56. doi: 10.1007/978-3-642-13185-1_2.
- Plano, D. *et al.* (2016) 'Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Selenium (Se- NSAID) Molecules as Anticancer Agents', *Journal of Medicinal Chemistry*, 59, pp. 1946–1959. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01503.
- Pommier, Y., O'Connor, M. J. and de Bono, J. (2016) 'Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action', *Science Translational Medicine*, 8(362), pp. 1–7. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf9246.
- Poynton, F. E. *et al.* (2017) 'The development of ruthenium(II) polypyridyl complexes and conjugates for in vitro cellular and in vivo applications', *Chemical Society Reviews*, 46, pp. 7706–7756. doi: 10.1039/C7CS00680B.
- Proschak, E., Stark, H. and Merk, D. (2019) 'Polypharmacology by Design: A Medicinal Chemist's Perspective on Multitargeting Compounds', *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(2), pp. 420–444. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00760.
- Psomas, G. and Kessissoglou, D. P. (2013) 'Quinolones and non-steroidal anti-inflammatory drugs interacting with copper(II), nickel(II), cobalt(II) and zinc(II): structural features, biological evaluation and perspectives', *Dalton Transactions*, 42, pp. 6252–6276. doi: 10.1039/c3dt50268f.
- Pu, H. *et al.* (2014) 'PARP-1 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate tumorigenesis', *Carcinogenesis*, 35(11), pp. 2592–2601. doi: 10.1093/carcin/bgu183.
- Puckett, C. A. and Barton, J. K. (2009) 'Methods to Explore Cellular Uptake of Ruthenium Complexes Cindy', *J Am Chem Soc*, 129(1), pp. 46–47. doi: 10.1021/ja0677564.
- Purnell, M. R. and Whish, W. J. (1980) 'Novel Inhibitors of Poly(ADP-ribose) Synthetase', *Biochem. J.*, 185(3), pp. 775–777. doi: 10.1042/bj1850775.
- Rademaker-Lakhai, J. M. *et al.* (2004) 'A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent', *Clin. Cancer Res.*, 10(11), pp. 3717–3727. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-03-0746.
- Radisavljević, S. *et al.* (2018) 'New gold pincer-type complexes: synthesis, characterization, DNA binding studies and cytotoxicity', *Dalton Transactions*, 47(38), pp. 13696–13712. doi: 10.1039/C8DT02903B.
- Raymond, E. *et al.* (1998) 'Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity', *Semin Oncol*, 25, pp. 4–12.
- Reedijk, J. (1999) 'Medicinal applications of heavy-metal compounds', *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(2), pp. 236–240. doi: 10.1016/S1367-5931(99)80037-4.
- Renfrew, A. K., Bryce, N. S. and Hambley, T. W. (2013) 'Delivery and release of curcumin by a hypoxia-activated cobalt chaperone: a XANES and FLIM study', *Chemical Science*, 4(9), pp. 3731–3739. doi: 10.1039/C3SC51530C.
- Richter, S. *et al.* (2016) 'Antiproliferative activity of ruthenium(II) arene complexes with mono- and bidentate pyridine-based ligands', *Dalton Trans.*, 45(33), pp. 13114–13125. doi: 10.1039/c6dt01782g.
- Riley, T. *et al.* (2008) 'Transcriptional control of human p53-regulated genes', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(5),

pp. 402–412. doi: 10.1038/nrm2395.

Rodríguez, M. I. *et al.* (2011) 'Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of Snail1 protein stability', *Oncogene*, 30(42), pp. 4365–4372. doi: 10.1038/onc.2011.153.

Rosenberg, B. *et al.* (1969) 'Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumor Agents', *Nature*, 222, pp. 385–386. doi: 10.1038/222385a0.

Rosenberg, B. (1971) 'Some Biological Effects of Platinum Compounds - New Agents for the Control of Tumours', *Plat. Met. Rev.*, 15(2), pp. 42–51.

Rosenberg, B. (1999) 'Platinum Complexes for the Treatment of Cancer: Why the Search Goes On', in Lippert, B. (ed.) *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. Zürich: Wiley-VCH, pp. 1–27. doi: 10.1002/9783906390420.ch1.

Rousalova, I. and Krepela, E. (2010) 'Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (Review)', *International Journal of Oncology*, 37(6), pp. 1361–1378. doi: 10.3892/ijco_00000788.

Roy, R., Chun, J. and Powell, S. N. (2012) 'BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection', *Nature Reviews Cancer*, 12(1), pp. 68–78. doi: 10.1038/nrc3181.

Ruf, A. *et al.* (1998) 'The Mechanism of the Elongation and Branching Reaction of Poly(ADP-ribose) Polymerase as Derived From Crystal Structures and Mutagenesis', *Journal of Molecular Biology*, 278(1), pp. 57–65. doi: 10.1006/jmbi.1998.1673.

Saal, L. H. *et al.* (2008) 'Recurrent gross mutations of the PTEN tumor suppressor gene in breast cancers with deficient DSB repair', *Nature Genetics*, 40(1), pp. 102–107. doi: 10.1038/ng.2007.39.

Sachdev, E. *et al.* (2019) 'PARP Inhibition in Cancer: An Update on Clinical Development', *Targeted Oncology*, 14(6), pp. 657–679. doi: 10.1007/s11523-019-00680-2.

Sadler, P. J. (1991) 'Inorganic Chemistry and Drug Design', *Advances in Inorganic Chemistry*, 36, pp. 1–48. doi: 10.1016/S0898-8838(08)60035-5.

Sakai, W. *et al.* (2008) 'Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers', *Nature*, 451(7182), pp. 1116–1120. doi: 10.1038/nature06633.

Sancho-Martínez, S. M. *et al.* (2012) 'Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: An integrated view', *Pharmacology and Therapeutics*, 136(1), pp. 35–55. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.07.003.

Sapkota, B., Hill, C. E. and Pollack, B. P. (2013) 'Vemurafenib enhances MHC induction in BRAF V600E homozygous melanoma cells', *OncImmunology*, 2(1), p. e22890. doi: 10.4161/onci.22890.

Satoh, M. S. and Lindahl, T. (1992) 'Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair', *Nature*, 356(6367), pp. 356–358. doi: 10.1038/356356a0.

Sava, G. *et al.* (1992) 'Na[trans-RuCl₄(DMSO)Im], a metal complex of ruthenium with antimetastatic properties', *Clin. Exp. Metastasis*, 10(4), pp. 273–280. doi: 10.1007/bf00133563.

Sava, G. *et al.* (1999) 'Treatment of metastases of solid mouse tumours by NAMI-A: comparison with cisplatin, cyclophosphamide and dacarbazine', *Anticancer Research*, 19(2A), pp. 969–972.

Sava, G., Bergamo, A. and Dyson, P. J. (2011) 'Metal-based antitumour drugs in the post-genomic era: what comes next?', *Dalton Trans.*, 40(36), pp. 9069–9075. doi: 10.1039/c1dt10522a.

Savić, A. *et al.* (2020) 'Antitumor activity of organoruthenium complexes with chelate aromatic ligands, derived from 1, 10-phenantroline: Synthesis and biological activity', *Journal of Inorganic Biochemistry*, 202, p. 110869. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110869.

- Schatzschneider, U. *et al.* (2008) 'Cellular Uptake, Cytotoxicity, and Metabolic Profiling of Human Cancer Cells Treated with Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes [Ru (bpy)₂(N-N)]Cl₂ with N-N=bpy, phen, dpq, dppz, and dppn', *ChemMedChem*, 3, pp. 1104–1109. doi: 10.1002/cmdc.200800039.
- Schreiber, V. *et al.* (2006) 'Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7), pp. 517–528. doi: 10.1038/nrm1963.
- Scolaro, C. *et al.* (2005) 'In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes', *J. Med. Chem.*, 48(12), pp. 4161–4171. doi: 10.1021/jm050015d.
- Selby, M. *et al.* (2017) '3D Models of the NCI60 Cell Lines for Screening Oncology Compounds', *SLAS Discovery*, 22(5), pp. 473–483. doi: 10.1177/2472555217697434.
- Shen, Y., Aoyagi-Scharber, M. and Wang, B. (2015) 'Trapping Poly(ADP-Ribose) Polymerase', *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 353, pp. 446–457. doi: 10.1124/jpet.114.222448.
- Shi, G. *et al.* (2015) 'Ru(II) Dyads Derived from α -Oligothiophenes: a New Class of Potent and Versatile Photosensitizers for PDT', *Coordination Chemistry Reviews*, 282–283, pp. 127–138. doi: 10.1016/j.ccr.2014.04.012.
- Smith, M.-L., Hawcroft, G. and Hull, M. A. (2000) 'The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human colorectal cancer cells: evidence of different mechanisms of action', *European Journal of Cancer*, 36, pp. 664–674. doi: 10.1016/S0959-8049(99)00333-0.
- Sonkar, C. *et al.* (2020) 'Mechanistic Insight for Targeting Biomolecules by Ruthenium(II) NSAID Complexes', *ACS Applied Bio Materials*, 3(7), pp. 4600–4612. doi: 10.1021/acsbm.0c00501.
- Sorenson, C. M. and Eastman, A. (1988) 'Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells', *Cancer Research*, 48(23), pp. 6703–6707.
- Sosman, J. A. *et al.* (2012) 'Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib', *New England Journal of Medicine*, 366(8), pp. 707–714. doi: 10.1056/NEJMoa1112302.
- Southan, G. J. and Szabó, C. (2003) 'Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors', *Current Medicinal Chemistry*, 10(4), pp. 321–340. doi: 10.2174/0929867033368376.
- Stanbury, D. M., Haas, O. and Taube, H. (1980) 'Reduction of Oxygen by Ruthenium (II) Ammines', *Inorg. Chem.*, 19(2), pp. 518–524. doi: 10.1021/ic50204a048.
- Štarha, P. and Trávníček, Z. (2019) 'Non-platinum complexes containing releasable biologically active ligands', *Coordination Chemistry Reviews*, 395, pp. 130–145. doi: 10.1016/j.ccr.2019.06.001.
- Strober, W. (2001) 'Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability', *Current Protocols in Immunology*, p. Appendix 3:Appendix 3B. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
- Sung, H. *et al.* (2021) 'Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries', *CA Cancer J Clin*, 71(3), pp. 209–249. doi: 10.3322/caac.21660.
- Supino, R. (1995) 'Methods in Molecular Biology', in O'Hare, S. and Atterwill, C. K. (eds) *In Vitro Toxicity Testing Protocols*. New Jersey: Humana Press, pp. 137–149.
- Suss-Fink, G. (2010) 'Arene ruthenium complexes as anticancer agents', *Dalton Trans.*, 39(7), pp. 1673–1688. doi: 10.1039/b916860p.
- Syed, Y. Y. (2017) 'Rucaparib: First Global Approval', *Drugs*, 77(5), pp. 585–592. doi: 10.1007/s40265-

017-0716-2.

Tadić, A. *et al.* (2018) 'Ruthenium-arene complexes with NSAIDs: Synthesis, characterization and bioactivity', *New Journal of Chemistry*, 42(4), pp. 3001–3009. doi: 10.1039/c7nj04416j.

Tanious, F. A. *et al.* (1992) 'DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) Binds Differently to DNA and RNA: Minor-Groove Binding at AT Sites and Intercalation at AU Sites', *Biochemistry*, 31(12), pp. 3103–3112. doi: 10.1021/bi00127a010.

Tao, Z., Gao, P. and Liu, H. W. (2009) 'Identification of the ADP-Ribosylation Sites in the PARP-1 Automodification Domain: Analysis and Implications', *J. Am. Chem. Soc.*, 131(40), pp. 14258–14260. doi: 10.1021/ja906135d.

Tentori, L. *et al.* (2001) 'Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor increases apoptosis and reduces necrosis induced by a DNA minor groove binding methyl sulfonate ester', *Cell Death and Differentiation*, 8(8), pp. 817–828. doi: 10.1038/sj.cdd.4400863.

Tentori, L., Portarena, I. and Graziani, G. (2002) 'Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors', *Pharmacological Research*, 45(2), pp. 73–85. doi: 10.1006/phrs.2001.0935.

Thomas, C. *et al.* (2019) 'Hit and run versus long-term activation of PARP-1 by its different domains fine-tunes nuclear processes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(20), pp. 9941–9946. doi: 10.1073/pnas.1901183116.

Thota, S. *et al.* (2018) 'Ru (II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics?', *Journal of Medicinal Chemistry*, 61, pp. 5805–5821. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b01689.

Thun, M. J., Henley, S. J. and Patrono, C. (2002) 'Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Anticancer Agents: Mechanistic, Pharmacologic, and Clinical Issues', *Journal of the National Cancer Institute*, 94(4), pp. 252–266. doi: 10.1093/jnci/94.4.252.

Todd, R. C. and Lippard, S. J. (2009) 'Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds', *Metallomics*, 1(4), pp. 280–291. doi: 10.1039/b907567d.

Tomlinson, G. E. *et al.* (1998) 'Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1 mutation carrier', *Cancer Res.*, 58(15), pp. 3237–3242.

Trondl, R. *et al.* (2014) 'NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application', *Chemical Science*, 5, pp. 2925–2932. doi: 10.1039/c3sc53243g.

Trudu, F. *et al.* (2015) 'Coordination compounds in cancer: Past, present and perspectives', *Journal of Applied Biomedicine*, 13(2), pp. 79–103. doi: 10.1016/j.jab.2015.03.003.

Tsujii, M. *et al.* (1998) 'Cyclooxygenase Regulates Angiogenesis Induced by Colon Cancer Cells', *Cell*, 93(5), pp. 705–716. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81433-6.

Turner, N. C. and Ashworth, A. (2011) 'Biomarkers of PARP inhibitor sensitivity', *Breast Cancer Research and Treatment*, 127(1), pp. 283–286. doi: 10.1007/s10549-011-1375-8.

Turner, N., Tutt, A. and Ashworth, A. (2004) 'Hallmarks of "BRCAness" in sporadic cancers', *Nature Reviews Cancer*, 4, pp. 814–819. doi: 10.1038/nrc1457.

Valladolid, J. *et al.* (2014) 'Phenanthroline ligands are biologically more active than their corresponding ruthenium(II) arene complexes', *Dalton Transactions*, 43(6), pp. 2629–2645. doi: 10.1039/C3DT52743C.

De Vos, M., Schreiber, V. and Dantzer, F. (2012) 'The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art', *Biochem. Pharmacol.* 2012/04/04, 84(2), pp. 137–146. doi:

10.1016/j.bcp.2012.03.018.

Wajant, H. (2002) 'The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm', *Science*, 296(5573), pp. 1635–1636. doi: 10.1126/science.1071553.

Wang, D. and Lippard, S. J. (2005) 'Cellular processing of platinum anticancer drugs', *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(4), pp. 307–320. doi: 10.1038/nrd1691.

Wang, Z. *et al.* (2014) 'Multi-targeted organometallic ruthenium(II)-arene anticancer complexes bearing inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1: A strategy to improve cytotoxicity', *J. Inorg. Biochem.*, 131, pp. 47–55. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2013.10.017.

Watkins, J. A. *et al.* (2014) 'Genomic scars as biomarkers of homologous recombination deficiency and drug response in breast and ovarian cancers', *Breast Cancer Research*, 16(3), p. 211. doi: 10.1186/bcr3670.

Weder, J. E. *et al.* (2002) 'Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized', *Coordination Chemistry Reviews*, 232, pp. 95–126. doi: 10.1016/S0010-8545(02)00086-3.

Weinberg, R. A. (2014) *The Biology of Cancer*. 2nd ed. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.

Weiss, A. *et al.* (2015) 'Rapid optimization of drug combinations for the optimal angiostatic treatment of cancer', *Angiogenesis*, 18(3), pp. 233–244. doi: 10.1007/s10456-015-9462-9.

Wen, Z. *et al.* (2013) 'A spheroid-based 3-D culture model for pancreatic cancer drug testing, using the acid phosphatase assay', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46, pp. 634–642. doi: 10.1590/1414-431X20132647.

Wheate, N. J. *et al.* (2007) 'DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and Inorganic Drugs and Their Spectroscopic Tools of Analysis', *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 7, pp. 627–648. doi: 10.2174/138955707780859413.

Willoughby, D. A., Moore, A. R. and Colville-Nash, P. R. (2000) 'COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease', *Lancet*, 355(9204), pp. 646–648. doi: 10.1016/S0140-6736(99)12031-2.

Winter, C. *et al.* (2016) 'Targeted sequencing of BRCA1 and BRCA2 across a large unselected breast cancer cohort suggests that one-third of mutations are somatic', *Annals of Oncology*, 27(8), pp. 1532–1538. doi: 10.1093/annonc/mdw209.

Xu, X., Lai, Y. and Hua, Z.-C. (2019) 'Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials', *Bioscience Reports*, 39(1), pp. 1–17. doi: 10.1042/BSR20180992.

Yan, Y. K. *et al.* (2005) 'Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes', *Chem. Commun.*, (38), pp. 4764–4776. doi: 10.1039/b508531b.

Yu, Q. *et al.* (2014) 'Ruthenium(II) polypyridyl complexes: Cellular uptake, cell image and apoptosis of HeLa cancer cells induced by double targets', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 82, pp. 82–95. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.05.040.

Yuan, Z. *et al.* (2017) 'Olaparib hydroxamic acid derivatives as dual PARP and HDAC inhibitors for cancer therapy', *Bioorg. Med. Chem.*, 25(15), pp. 4100–4109. doi: 10.1016/j.bmc.2017.05.058.

Yusoh, N. A., Ahmad, H. and Gill, M. R. (2020) 'Combining PARP Inhibition with Platinum, Ruthenium or Gold Complexes for Cancer Therapy', *ChemMedChem*, 15, pp. 1–16. doi: 10.1002/cmdc.202000391.

Zaremba, T. and Curtin, N. J. (2007) 'PARP Inhibitor Development for Systemic Cancer Targeting',

- Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 7(5), pp. 515–523. doi: 10.2174/187152007781668715.
- Zava, O. *et al.* (2009) ‘A Cytotoxic Ruthenium Tris (Bipyridyl) Complex that Accumulates at Plasma Membranes’, *ChemBioChem*, 10, pp. 1796–1800. doi: 10.1002/cbic.200900013.
- Zeng, L. *et al.* (2017) ‘The development of anticancer ruthenium(II) complexes: from single molecule compounds to nanomaterials’, *Chemical Society Reviews*, 46(19), pp. 5771–5804. doi: 10.1039/c7cs00195a.
- Zhang, L., Carroll, P. and Meggers, E. (2004) ‘Ruthenium Complexes as Protein Kinase Inhibitors’, *Organic Letters*, 6(4), pp. 521–523. doi: 10.1021/ol036283s.
- Zhang, S. *et al.* (2006) ‘Organic Cation Transporters Are Determinants of Oxaliplatin Cytotoxicity’, *Cancer Research*, 66(17), pp. 8847–8857. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0769.
- Zhao, Y. *et al.* (2020) ‘The ups and downs of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 inhibitors in cancer therapy—Current progress and future direction’, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 203, p. 112570. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112570.
- Zheng, W. *et al.* (2017) ‘Multi-Targeted Anticancer Agents’, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(28), pp. 3084–3098. doi: 10.2174/1568026617666170707124126.
- Zhu, G., Chang, P. and Lippard, S. J. (2010) ‘Recognition of platinum-DNA damage by poly(ADP-ribose) polymerase-1’, *Biochemistry*, 49(29), pp. 6177–6183. doi: 10.1021/bi100775t.
- Zimmermann, G. R., Lehár, J. and Keith, C. T. (2007) ‘Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts’, *Drug Discovery Today*, 12(1–2), pp. 34–42. doi: 10.1016/j.drudis.2006.11.008.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Marijana Pavlović (devojačko Kajzerberger) je rođena 02.03.1991. u Beogradu. Završila je XV beogradsku gimnaziju u Beogradu, prirodno-matematički smer, a potom 2010. godine upisala Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je 2014. godine sa prosečnom ocenom 8,95 i potom upisala master studije na modulu Imunobiologija. Master studije je završila 2015. godine sa prosečnom ocenom 10,00 i odbranila master tezu sa ocenom 10. Doktorske studije je upisala na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2016. godine na smeru Biologija, modul Molekularna onkologija. Od juna 2016. godine je zaposlena na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, kao istraživač pripravnik u Laboratoriji za molekularnu genetiku Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, kroz angažovanje na projektu MPNTR pod nazivom „Farmakodinamska i farmakogenomska ispitivanja novijih lekova u lečenju solidnih tumora“. U junu 2020. godine, Marijana je stekla zvanje istraživač saradnik. Od septembra 2020. godine je angažovana na projektu Fonda za nauku, u okviru poziva PROMIS, pod nazivom „Drug repurposing in pancreatic ductal adenocarcinoma“, akronim REPANCAN. Do danas je publikovala 7 naučnih radova u međunarodnim časopisima, od kojih su 3 rada neposredno vezana za temu doktorske disertacije. Autor je i većeg broja saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja, štampanih u celini i u izvodu, kao i jednog predavanja po pozivu na skupu od nacionalnog značaja. Član je Srpskog društva istraživača raka (SDIR), Evropskog udruženja za istraživanje raka (EACR), Biohemijskog društva Srbije (BDS), Srpskog društva za mitohondrijalnu i slobodno-radikalnu fiziologiju (SDMSRF) i Američkog udruženja za istraživanje raka (AACR). Od 2019. godine je učesnik COST akcija (CA17104 i CA15135).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани/а Маријана С. Павловић

број индекса Б3006/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Антитуморски потенцијал новосинтетисаних рутенијум(II)-аренских комплекса са биоактивним лигандима *in vitro*

- 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, _____



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Маријана С. Павловић

Број индекса Б3006/2016

Студијски програм Биологија, Молекуларна онкологија

Наслов рада Антитуморски потенцијал новосинтетисаних рутенијум(II)-аренских комплекса са биоактивним лигандима *in vitro*

Ментори др Невенка Глигоријевић, виши научни сарадник и др Милица Маркелић, доцент

Потписани/а Маријана С. Павловић

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, _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Антитуморски потенцијал новосинтетисаних рутенијум(II)-аренских комплекса са биоактивним лигандима *in vitro*

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).

Потпис докторанда

У Београду, _____



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.