

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Lana M. Filipović

**MOLEKULSKI MEHANIZMI
CITOTOKSIČNOG DELOVANJA
TRANS-KOMPLEKSA PLATINE(II) I
PLATINE(IV) SA PIRIDINSKIM
DERIVATIMA KAO LIGANDIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Lana M. Filipović

**MOLECULAR MECHANISMS
OF THE CYTOTOXICITY
OF *TRANS*-PLATINUM(II) AND
TRANS-PLATINUM(IV) COMPLEXES
WITH PYRIDINE LIGANDS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

INFORMACIJE O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

Mentori:

dr Aleksandra Korać, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Sandra Arandelović, naučni saradnik

Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Članovi komisije:

dr Siniša Radulović, naučni savetnik

Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

dr Živoslav Tešić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za eksperimentalnu farmakologiju i Laboratoriji za molekularnu genetiku, Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, u periodu od 2009. do 2014. godine. Rad je realizovan u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (brojevi projekata 145035 i 41026, odnosno 142062 i 72017), a pod rukovodstvom dr Siniše Radulovića, odnosno prof dr Živoslava Tešića.

Veliku zahvalnost za nastanak ovog rada dugujem svojim mentorkama: dr Sandri Aranđelović na pomoći koju mi je pružila tokom višegodišnjeg eksperimentalnog i naučnog rada, kao i razumevanju, korisnim savetima i sugestijama kako u svakodnevnom radu, tako i tokom izrade i pisanja doktorske disertacije; i dr Aleksandri Korać, kojoj se zahvaljujem na ukazanom poverenju, podršci i korisnim sugestijama.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Siniši Raduloviću, na ukazanom poverenju, razumevanju i podršci, ali i na pomoći i korisnim sugestijama kako svakodnevno, tako i tokom same izrade ove doktorske teze.

Zahvaljujem se članu komisije, dr Živoslavu Tešiću na višegodišnjoj uspešnoj saradnji, ukazanom poverenju, kao i uvek korisnim savetima.

Takođe, veliku zahvalnost dugujem mr Gordani Rakić, koja je sintetisala komplekse koji su bili glavni predmet mojih istraživanja, a koja je uvek bila tu da svojim savetima i sugestijama pruži pomoć i podršku; kao i dr Nevenki Gligorijević na neizmernom strpljenju, savetima i pomoći u prvim koracima mog eksperimentalnog i naučnog rada.

Deo doktorske disertacije je realizovan u Laboratoriji za molekularnu genetiku, pa se stoga zahvaljujem i svim članovima Laboratorije za molekularnu genetiku, kao i šefu te laboratorije dr Radmili Janković, a posebno Ani Krivokući koja je učestvovala u realizaciji jednog segmenta eksperimentalnog dela teze. Ani, kao i Mileni Čavić, hvala na savetima, uvek nesebičnoj pomoći i podršci, kao i prijateljstvu, za koje nekada možda nisu ni bile svesne koliko mi znače.

Hvala svim laboratorijskim tehničarima Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, a naročito onima koji su direktno učestvovali u izvođenju eksperimentalnog dela disertacije na pomoći, strpljenju i savetima - pre svega Maji, Suadi, i Biljani, kao i Tanji i Jasni.

Zahvaljujem se i svim ostalim kolegama Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju na moralnoj podršci i prijateljstvu, a neretko i na pomoći i savetima vezanim za naučni rad. Jelena, Emina, Ksenija, Zaki, Branka, Ivana, Goco, Verka... i mnogi drugi, da ne nabrajam, pronaći ćete se gde treba... hvala vam na svemu!

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima i dragim ljudima - oni znaju ko su, a znaju i zašto...

*Iznad svega, od srca se zahvaljujem svojoj porodici na beskrajnom razumevanju, strpljenju, pruženoj podršci i neizmernoj ljubavi. Stoga, ovu tezu posvećujem upravo mojim najbližima, **tati, mami i Maji**, koji su bili moj pokretač, moja snaga sve ove godine... moje sve.*

Molekulski mehanizmi citotoksičnog delovanja *trans*-kompleksa platine(II) i platine(IV) sa piridinskim derivatima kao ligandima

Rezime

Uvod: Hemioterapija koja se zasniva na platinskim agensima je ključna u lečenju solidnih tumora, a jedan od vodećih citostatika koji se koristi je cisplatina. Međutim, i pored visoke efikasnosti cisplatine, toksičnost i razvoj rezistentnosti ograničili su njenu upotrebu. Stoga su pokrenuta brojna istraživanja sa ciljem pronalaska novih kompleksa koji bi bili kancer-selektivniji, koji bi posedovali drugačije mete delovanja od cisplatine, a ujedno bi bili manje toksični i ne bi dovodili do pojave rezistentnosti. Mnogi kompleksi metala, među kojima su brojni *trans*-platinski kompleksi, za koje se dugo smatralo da su neaktivni, pokazali su se kao dobri kandidati, što utiče na stalan razvoj novih jedinjenja kao potencijalnih antikancerskih agenasa.

Cilj: Ispitivanje citotoksičnog potencijala novosintetisanih *trans*-kompleksa platine(II) i platine(IV) sa piridinskim derivatima kao ligandima na nekoliko ćelijskih linija (kompleks 1 - *trans*-[PtCl₂(3-acpy)₂]; kompleks 2 - *trans*-[PtCl₂(4-acpy)₂]; kompleks 3 - *trans*-[Pt(3-acpy)₂Cl₄]; kompleks 4 - *trans*-[Pt(4-acpy)₂Cl₄]). *In vitro* ispitivanje molekularnih mehanizama antikancerske aktivnosti *trans*-platinskih kompleksa na odabranim ćelijskim linijama na kojima su ispoljili značajno citotoksično delovanje. Ispitivanje korelacije strukture i aktivnosti kompleksa: uticaj (*cis*-/*trans*-) geometrije kompleksa na citotoksičnu aktivnost i mehanizam delovanja – poređenje *trans*-platinskih kompleksa sa cisplatinom; korelacija u odnosu na oksidaciono stanje platine – poređenje *trans*-platina(II) i *trans*-platina(IV) kompleksa; uticaj strukture liganada na citotoksičnu aktivnost i mehanizam delovanja.

Materijal i metode: Antiproliferativna aktivnost ispitivanih kompleksa nakon 48 h delovanja ispitana je MTT i SRB testovima na šest tumorskih ćelijskih linija (HeLa, MDA-MB-453, B16, FemX, A549, LS-174), dve transformisane endotelijalne linije humanog (EA.hy 926) i mišjeg (MS1) porekla, i jednoj normalnoj, zdravoj ćelijskoj

liniji fetalnih humanih fibroblasta pluća (MRC-5). Potencijal ispitivanih kompleksa da indukuju promene na nivou ćelijskog ciklusa određen je protočnom citometrijom nakon bojenja tretiranih HeLa i EA.hy 926 ćelija propidijum-jodidom. Dvokolornim bojenjem ćelija aneksinom i propidijum-jodidom i analizom na protočnom citometru ispitan je potencijal kompleksa da indukuju apoptozu. Unutarćelijska akumulacija i distribucija platine(II) u proteinskoj i DNK frakciji HeLa i EA.hy 926 ćelija tretiranih ispitivanim kompleksima utvrđena je korišćenjem metoda ICP-OES i ICP-MS. Kako bismo utvrdili da li ispitivani kompleksi indukuju odgovor ćelija zavisano od DNK reparacije kao rezultat interakcija sa DNK, ispitivali smo iRNK i proteinski nivo ekspresije ERCC1 metodama qRT-PCR i Western blot. *In vitro* antimetastatski potencijal ispitivanih kompleksa na HeLa i EA.hy 926 linijama ispitan je praćenjem iRNK i proteinskog nivoa ekspresije matriksnih metaloproteinaza (MMP-2 i MMP-9) metodama qRT-PCR i želatinske zimografije. *In vitro* antiangiogeni potencijal kompleksa ispitan je testom *in vitro* formiranja tubula ("*tube formation assay*") na MS1 i EA.hy 926 ćelijskim linijama. Uticaj kompleksa na morfološke karakteristike ćelijske smrti EA.hy 926 ćelija i ekspresiju markera apoptoze (bax i kaspaza 3 proteina) ispitan je fluorescentnom mikroskopijom, odnosno Western blot metodom. Cisplatina je korišćena u svim analizama radi poređenja.

Rezultati: Ispitivani *trans*-platinski kompleksi su pokazali značajan antiproliferativni potencijal na svim tumorskim ćelijskim linijama, naročito na HeLa i EA.hy 926 ćelijama, koji u nekim slučajevima prevazilazi aktivnost cisplatine, a jači je od onoga koji kompleksi imaju na normalnim MRC-5 ćelijama. Pokazano je da postoje razlike u ćelijskom odgovoru na delovanje kompleksa u HeLa, odnosno EA.hy 926 ćelijama, kako u mehanizmima indukcije ćelijske smrti tako i u procesima angiogeneze i metastaziranja *in vitro*. Utvrđeno je da *trans*-platina(II) kompleksi poseduju značajniju citotoksičnu i antitumorsku aktivnost *in vitro*, pokazuju bolju unutarćelijsku akumulaciju i reaktivnost sa ćelijskim proteinima i DNK, u poređenju sa *trans*-platina(IV) kompleksima. Kompleks 2 poseduje najveću citotoksičnu aktivnost i ispoljava značajne efekte u smislu antitumorskog dejstva *in vitro*: indukuje značajnu unutarćelijsku akumulaciju platine i značajnu platinaciju DNK i proteina; poseduje antiangiogeni potencijal; indukuje smanjenje genske i proteinske ekspresije ERCC1; indukuje apoptozu.

Zaključak: Upoređivanjem aktivnosti ispitivanih *trans*-platinskih kompleksa sa cisplatinom utvrđeno je da geometrija kompleksa (*cis*-/*trans*-) utiče na aktivnost, odnosno citotoksični potencijal i generalno mehanizam delovanja – biološku aktivnost *in vitro*. Pokazano je da male razlike u strukturi ispitivanih kompleksa, kao što je pozicija acetil-supstituenta u piridinskom ligandu, mogu značajno uticati na razlike u molekulskom mehanizmu citotoksičnog delovanja kompleksa. *Trans*-platinski kompleksi sa piridinskim derivatima kao ligandima su dobri potencijalni antikancerski agensi, pri čemu se kompleks 2 (*trans*-[PtCl₂(4-acpy)₂]) pokazao kao najbolji kandidat za dalja ispitivanja.

Ključne reči: *trans*-platina(II), *trans*-platina(IV), antiproliferativna aktivnost, apoptoza, antimetastatska aktivnost, MMP, antiangiogeneza.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna onkologija

UDK broj: [615.277:546.92]:616-006.04(043.3)

Molecular mechanisms of the cytotoxicity of *trans*-platinum(II) and *trans*-platinum(IV) complexes with pyridine ligands

Abstract

Introduction: Platinum-based anticancer chemotherapy constitutes a cornerstone for the treatment of various solid tumors. Cisplatin was one of the first chemotherapeutic agents to exhibit broad efficacy and it remains among the most widely used agents in the treatment of cancer. Its introduction inspired great efforts to design similarly effective platinum agents with different molecular targets and with the ability to overcome main limitations of cisplatin - toxicity and tumor resistance. This has provided the motivation for developing novel metal complexes as anticancer agents with different mechanisms of action, including numerous *trans*-platinum complexes that were considered inactive for a long time.

Aim: Investigation of the cytotoxic potential of novel *trans*-platinum(II) and *trans*-platinum(IV) complexes with pyridine ligands in several cell lines (complex 1 - *trans*-[PtCl₂(3-acpy)₂]; complex 2 - *trans*-[PtCl₂(4-acpy)₂]; complex 3 - *trans*-[Pt(3-acpy)₂Cl₄]; complex 4 - *trans*-[Pt(4-acpy)₂Cl₄]). *In vitro* investigation of molecular mechanisms of their anticancer action. Analyzing the structure-activity relationship of the complexes: investigating if *cis*-/*trans*- geometry affects the cytotoxicity and mechanism of action – comparison of *trans*-platinum complexes to cisplatin; correlation in terms of oxidation states of platinum – comparison of *trans*-platinum(II) with *trans*-platinum(IV) complexes; investigating if structure of the ligands affects the anticancer activity of the complexes *in vitro*.

Material and methods: The cytotoxic activity of the complexes was investigated by SRB and MTT assays for 48 h of continual action on six tumor cell lines (HeLa, MDA-MB-453, B16, FemX, A549, LS-174), two transformed endothelial cell lines (EA.hy 926 and MS1), and one normal lung fibroblast cell line (MRC-5). Potential of the investigated complexes to induce cell cycle perturbations was determined after staining of treated HeLa and EA.hy 926 cells with propidium iodide (PI) and analysis on flow

cytometer. Potential of the complexes to induce apoptotic changes was analyzed using flow cytometry after two-color staining with Annexin V-FITC and PI. Total intracellular platinum accumulation and platinum(II) distribution among the DNA and protein fractions in HeLa and EA.hy 926 cells were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Affinity for the interaction with DNA and expression of ERCC1 mRNA and protein levels in HeLa cells were also analyzed by qRT-PCR and Western blot and compared to cisplatin. The inhibitory activity of the complexes on matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9) was investigated by gelatin zymography and qRT-PCR in HeLa and EA.hy 926 cell lines. *In vitro* antimetastatic potential of the *trans*-platinum complexes at subtoxic concentrations was examined in MS1 and EA.hy 926 cells using tube-formation assay. Morphological changes and expression of bax and caspase 3 proteins in EA.hy 926 treated cells were analyzed by fluorescent microscopy and Western blot. All the analyses were performed with cisplatin as a reference compound.

Results: The tested complexes showed significant cytotoxic activity in all used tumor cell lines, with the greatest effects in HeLa and EA.hy 926 cells. Their antiproliferative activity *in vitro* overcame the activity of cisplatin in some cell lines, and also the activity in MRC-5 normal cell line. Cytotoxicity differences in HeLa and EA.hy 926 cells may be attributed to the ability of the complexes to produce different cellular effects related to damage-processing and signal activation pathways, including cell death mechanisms and angiogenesis and metastasis *in vitro*, and to induce multiple cellular responses. In comparison to *trans*-platinum(IV) complexes, *trans*-platinum(II) complexes showed significant cytotoxic and antitumor activity *in vitro*, better intracellular platinum accumulation and binding to cellular DNA and proteins. Complex 2 showed the highest cytotoxic potential, as well as significant antitumor activity *in vitro*: it induced significant intracellular platinum accumulation and DNA and protein platination; showed antiangiogenic potential; inhibited mRNA and protein expression of ERCC1; induced apoptosis.

Conclusion: The obtained results suggest that structural settings play a fundamental role, since they are responsible for the interaction between *trans*-platinum drugs and cellular DNA and proteins that led to the observed biological effects. Biological activity

in vitro and molecular mechanism of action depend on *cis-/trans-* geometry of the complexes, and different positioning of the acetyl substituent on the pyridine ring. Altogether, properties of substituted *trans*-platinum pyridines, especially complex 2, encourage further investigations in search for compounds with different modalities of action toward cancer cells in comparison to CDDP.

Keywords: *trans*-platinum(II), *trans*-platinum(IV), antiproliferative activity, apoptosis, antimetastatic activity, MMP, antiangiogenesis.

Academic expertise: Biology

Field of academic expertise: Molecular oncology

UDK number: [615.277:546.92]:616-006.04(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kompleksi metala sa antitumorskim dejstvom	1
1.2. Kompleksi platine i cisplatina	3
1.3. Antitumorski potencijal <i>trans</i>-platinskih kompleksa	5
1.3.1. DNK-interakcija biološki neaktivne <i>trans</i> -platine u poređenju sa cisplatinom.....	5
1.3.2. Dogma o biološkoj inertnosti <i>trans</i> -platinskih kompleksa	8
1.3.3. Mehanizam citotoksičnog dejstva <i>trans</i> -platinskih kompleksa	13
1.3.3.1. Prepoznavanje i reparacija DNK oštećenja	13
1.3.3.2. Ćelijski ciklus	14
1.3.3.3. Apoptoza.....	16
1.3.3.3.1. Kaspaze	19
1.3.3.3.2. Bcl-2 familija gena	20
1.3.3.4. Molekulski aspekti invazivnosti i metastaziranja tumorskih ćelija	22
1.3.3.4.1. Trostepena teorija invazivnosti	25
1.3.3.4.2. Uloga matriksnih metaloproteinaza u metastaziranju	25
1.3.3.4.3. Uloga tumorskih ćelija u procesu metastaziranja.....	29
1.3.3.4.4. Angiogeneza (uloga angiogeneze u procesu metastaziranja)	31
2. CILJ RADA	36
3. MATERIJAL I METODE	37
3.1. Hemijska struktura ispitivanih kompleksa	37
3.2. Kulture ćelija	38
3.2.1. Sastav hranljivog medijuma RPMI 1640	39
3.2.2. Priprema RPMI 1640 hranljive podloge	40
3.2.3. Sastav hranljivog medijuma DMEM	41
3.2.4. Priprema DMEM hranljive podloge	42
3.2.5. Postupak održavanja kulture ćelija	43
3.2.6. Postupak pasažiranja kultura ćelija	43
3.3. Postupak ispitivanja antiproliferativnog potencijala platinskih kompleksa	44
3.3.1. Postupak određivanja viabilnosti ćelija	44

3.3.2. Postupak ispitivanja antiproliferativnog potencijala <i>trans</i> -kompleksa platine(II) i platine(IV) MTT i SRB testovima.....	45
3.3.2.1. Postupak određivanja preživljavanja ćelija MTT testom	46
3.3.2.1.1. Konstrukcija kalibracione krive za MTT	46
3.3.2.1.2. Postupak određivanja preživljavanja ćelija MTT testom..	47
3.3.2.1.3. Obrada podataka.....	48
3.3.2.2. Postupak određivanja preživljavanja ćelija SRB testom	49
3.3.2.2.1. Fiksacija	49
3.3.2.2.2. Bojenje	49
3.3.2.2.3. Rastvaranje i čitanje	50
3.4. Analiza promena distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa pod dejstvom ispitivanih kompleksa metodom na protočnom citometru	50
3.5. Analiza apoptoze bojenjem aneksin V-FITC i propidijum-jodidom na protočnom citometru.....	51
3.6. Analiza ukupne unutarćelijske akumulacije i unutarćelijske distribucije platine (u proteinskoj i DNK frakciji) metodom ICP-OES ili ICP-MS	53
3.6.1. Priprema uzoraka	54
3.6.2. Razdvajanje faza	54
3.6.3. Izolovanje RNK	54
3.6.4. Izolovanje DNK.....	55
3.6.5. Izolovanje proteina.....	55
3.6.6. Priprema ćelijskog taloga.....	55
3.7. Želatinska zimografija	56
3.8. Analiza uticaja ispitivanih kompleksa na migraciju tumorskih ćelija <i>in vitro</i> („Scratch assay“)	58
3.9. Uticaj ispitivanih kompleksa platine na angiogenezu <i>in vitro</i> („Tube formation assay“)	59
3.10. Određivanje efekta kompleksa na ekspresiju MMP-2, MMP-9 i ERCC1 na nivou iRNK korišćenjem kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu („Quantitative Real-Time PCR“ - qRT-PCR)	61
3.10.1. Izolovanje RNK i sinteza cDNK.....	62
3.10.2. qRT-PCR.....	62
3.11. Određivanje efekta ispitivanih kompleksa na ekspresiju proteina (Western blot)	63
3.12. Određivanje koncentracije proteina (Bradfordova metoda)	66
3.13. Fluorescentna mikroskopija.....	67
4. REZULTATI	69
4.1. Citotoksičnost testiranih kompleksa	69

4.2. Mehanizmi citotoksičnog delovanja <i>trans</i>-platina(II) kompleksa na HeLa ćelijskoj liniji i na angiogenezu na MS1 ćelijama.....	72
4.2.1. Rezultati analize ćelijskog ciklusa	72
4.2.2. Rezultati analize apoptoze	74
4.2.3. Rezultati analize unutarćelijske distribucije Pt(II) (u proteinskoj i DNK frakciji).....	76
4.2.4. <i>In vitro</i> antimetastatski potencijal ispitivanih kompleksa.....	78
4.2.4.1. Želatinska zimografija	78
4.2.4.2. Rezultati qRT-PCR metode – efekat ispitivanih kompleksa na iRNK MMP-2 i MMP-9 ekspresiju	80
4.2.4.3. Uticaj kompleksa Pt(II) na angiogenezu <i>in vitro</i> („Tube formation assay“)	81
4.2.5. Rezultati analize uticaja ispitivanih kompleksa na nivo ekspresije ERCC1	82
4.3. Mehanizmi citotoksičnog delovanja <i>trans</i>-platina(II) i <i>trans</i>-platina(IV) kompleksa na EA.hy 926 ćelijskoj liniji	84
4.3.1. Rezultati analize ćelijskog ciklusa	84
4.3.2. Rezultati analize apoptoze	86
4.3.3. Rezultati analize ukupne unutarćelijske akumulacije i distribucije platine (u proteinskoj i DNK frakciji).....	88
4.3.4. <i>In vitro</i> antimetastatski potencijal ispitivanih kompleksa.....	90
4.3.4.1. Rezultati uticaja ispitivanih kompleksa na migraciju tumorskih ćelija <i>in vitro</i> („Scratch assay“)	90
4.3.4.2. Želatinska zimografija	91
4.3.4.3. Rezultati qRT-PCR metode – efekat ispitivanih kompleksa na iRNK MMP-2 ekspresiju.....	93
4.3.4.4. Uticaj platinskih kompleksa na angiogenezu <i>in vitro</i> („Tube formation assay“).....	94
4.3.5. Rezultati Western blot metode - efekat ispitivanih kompleksa na ekspresiju kaspaza 3 i Bax proteina	96
4.3.6. Rezultati morfološke analize ćelijske smrti na fluorescentnom mikroskopu	98
5. DISKUSIJA	101
5.1. Citotoksičnost testiranih kompleksa	103
5.2. Uticaj ispitivanih kompleksa na promene u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa i na apoptozu ispitan metodom na protočnom citometru ...	108

5.3. Uticaj kompleksa na unutarćelijsku akumulaciju i distribuciju platine	111
5.4. <i>In vitro</i> antimetastatski i antiangiogeni potencijal ispitivanih kompleksa	115
5.5. Uticaj ispitivanih kompleksa na nivo ekspresije ERCC1	119
5.6. Uticaj ispitivanih kompleksa na apoptozu tumorskih ćelija <i>in vitro</i>	122
5.7. Poređenje struktura i aktivnosti ispitivanih kompleksa	127
6. ZAKLJUČCI	130
7. LITERATURA	132
8. BIOGRAFIJA AUTORA	147

1. UVOD

Svetska populacija će do 2020. godine porasti sa 6 na 8 milijardi, broj novih slučajeva kancera će se udvostručiti (sa 10 na 20 miliona), a samim tim i broj ljudi koji će od ove bolesti umreti (sa 6 na 12 miliona), sa prognozom da će 2030. godine 13,1 miliona ljudi umreti od raka (World Health Report, 1998).

Tumor ili neoplazma predstavlja nekontrolisan rast grupe ćelija, uzrokovane promenama koje dovode do narušavanju balansa između proliferacije ćelija i programirane ćelijske smrti, apoptoze. Osnovno načelo svih do sada poznatih načina lečenja raka je da je potrebno tumorsko tkivo odstraniti ili uništiti. Metode lečenja koje se primenjuju zavise od vrste tumora, proširenosti bolesti i stanja organizma, a najčešći načini lečenja su: hirurško otklanjanje tumora, radioterapija, i hemioterapija.

Hirurško otklanjanje tumora i radioterapija su lokalni načini lečenja malignih tumora, a lekovi koji se primenjuju u hemioterapiji deluju na ceo organizam i stoga je ovo sistemski način lečenja tumora. Iako se u lečenju malignih bolesti hemioterapija, odnosno terapija citostaticima, primenjuje više decenija, stručnjaci je smatraju nedovoljno istraženom oblašću (Baba et al., 2007). Hemioterapija, zbog svog sistemskog efekta ostvaruje niz neželjnih efekata tokom primene, zbog čega se traga za idealnim citostatikom koji bi selektivno i specifično delovao na maligne ćelije bez oštećivanja zdravih (Yap et al., 2012).

1.1. Kompleksi metala sa antitumorskim dejstvom

Važna uloga kompleksa metala u medicini datira još od 16. veka kada su metali i jedinjenja sa metalima korišćeni za lečenje kancera. U današnje vreme, lista terapeutika koji sadrže metale uključuje platinu (koja ima antikancersko dejstvo), srebro (antimikrobno dejstvo), zlato (antiartritično), vanadijum (antidijabetično), gvožđe (antimalarično dejstvo) (Desoize, 2002). Iako su mnogi lekovi zapravo organska jedinjenja, za komplekse metala je, pored važne kliničke upotrebe, karakteristična i raznovrsnija hemija (Storr et al., 2006).

Zahvaljujući obimnom znanju iz oblasti neorganske hemije o koordinaciji i redoks svojstvima jona metala, danas je omogućen razvoj savremene medicinske hemije. Podstaknuti otkrićem antitumorskog dejstva cisplatine, stručnjaci širom sveta nastoje da dizajniraju i sintetišu kompleksna jedinjenja koja bi imala bolje antitumorsko dejstvo, veću selektivnost za tumorske ćelije i manje negativnih efekata (Thompson et al., 2006; Jung et al., 2007).

S obzirom da je prisustvo metala neophodno za odvijanje mnogih procesa u ćeliji, u zavisnosti od dostupnosti i biohemijskih uloga, izvršena je njihova selekcija. Dok metali imaju specifične karakteristike koje uključuju redoks potencijal, reaktivnost prema organskim supstratima i slično, njihova unutarćelijska koncentracija je usko regulisana. Stoga je neuobičajena koncentracija jona metala povezana sa brojnim patološkim stanjima, kao što je kancer, pa su kompleksi metala nesumnjivo potencijalni antikancerski agensi (Frezza et al., 2010).

Centralni atom u kompleksima metala je pozitivno naelektrisan jon metala, za koji se neposredno vezuju grupe jona ili molekula koji se nazivaju ligandi. Najveći broj kompleksa, kako sa neorganskim, tako i sa organskim biološkim ligandima, grade joni prelaznih metala (Minić et al., 2005). Metali, koji čine centralne delove kompleksa, se favorizovano vezuju za negativno naelektrisane biomolekule, aminokiseline i nukleinske kiseline i na taj način ostvaruju svoje dejstvo. U fokusu medicinskih istraživanja je i projektovanje liganda koji će interagovati sa jonima metala (Zhang et al., 2003). Od liganda zavisi lipofilnost, hidrofilnost, reaktivnost kompleksa, kao i mogućnost supstitucije. Ligandi bi trebalo da budu lako odlazeće grupe kako bi obezbedile dostupnost aktivnih mesta za interakciju sa biomolekulima (Quiroga, 2012).

Dizajniranje kompleksa metala sa antitumorskim dejstvom, međutim, nije lak zadatak. Jedan od velikih problema je akumulacija jona metala u telu koja za posledicu može imati štetne efekte. Razumevanje molekulskih i ćelijskih mehanizama, kojima kompleksi metala ostvaruju svoje aktivnosti, je od ključnog značaja kako za njihov klinički uspeh, tako i za racionalno projektovanje novih jedinjenja sa boljim antitumorskim dejstvom (Zhang et al., 2003).

Fiziološke reakcije potencijalnih lekova je potrebno proveriti *in vitro*, kao i *in vivo* studijama pre nego što uđu u klinička ispitivanja. U prvom planu istraživanja hemioterapijskih agenasa su bili kompleksi na bazi platine, ali se interesi u ovoj oblasti

preusmeravaju i na ne-platinske agense kako bi se pronašli različiti kompleksi metala sa manjim neželjenim efektima i sa sličnom, ili čak boljom, citotoksičnošću. Veliki broj jedinjenja koja su ušla u klinička ispitivanja uključuju galijumove soli, jedinjenja germanijuma, titanijuma i rutenijuma (Keppler et al., 1996). Nasuprot ovima, postoji veliki broj jedinjenja koja nisu dostigla nivo kliničkih ispitivanja, ali su ispitivana *in vitro* i *in vivo*, a najvažnija među njima su različita jedinjenja rutenijuma, rodijuma, zlata, bakra, ciklooktadienski kompleksi, paladijumski kompleksi slični platinskim, kao i mnogi drugi (Keppler et al., 1996).

1.2. Kompleksi platine i cisplatina

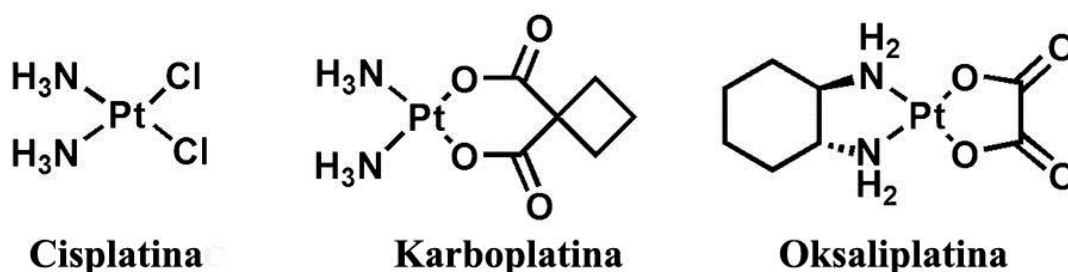
Cisplatina (cis-diamindihloroplatina(II), cis-DDP, CDDP) je kvadratno-planaran, neutralni kompleks (Slika 1). Prvi put se pominje u radu Michele Peyrone 1844. godine, pa otuda prvobitni naziv Pejronov hlorid (Peyrone, 1844), a 1893. godine Alfred Werner izveo je strukturu cisplatine (Desoize, 2002). Antitumorska aktivnost cisplatine ostaje neprimećena do 1965. godine kada su Rosenberg i saradnici identifikovali ovo jedinjenje i njegov platina(IV) analog, cis-diamintetrahlороplatinu(IV), kao jake inhibitore proliferacije bakterijskih ćelija (Rosenberg, 1965; Rosenberg, 1980). Odmah potom je ispitana i potvrđena njihova citostatička aktivnost na tumorskim ćelijama miša (Rosenberg, 1987).

Otkriće CDDP kao antikancerskog agensa 1960-tih godina započelo je novu eru u lečenju kancera, a od prvog kliničkog ispitivanja 1972. godine, antitumorska i toksična svojstva cisplatine su i kod čoveka u potpunosti potvrđena (Lippert, 1999; Chen et al., 2009). Tačnije, 1971. godine cisplatina je upotrebljena u lečenju pacijenta po prvi put (Lebwohl et al., 1998.), a u kliničku praksu je ušla 1978. godine kao Platinol® (Bristol-Myers Squibb Company).

Sve do danas, cisplatina se pokazala kao najefikasniji antikancerski agens, a naročito je efikasna u lečenju tumora testisa, sa uspehom izlečenja od skoro 100 % ukoliko je kancer rano otkriven (Lippard et al., 1994; Reedijk, 1996; Lippert, 1999; Roberts et al., 1999; Guo et al., 2000). Veoma je efikasna i u terapiji tumora jajnika, a takođe se široko primenjuje u lečenju tumora bešike, grlića materice, pluća, glave, vrata,

tumora jednaka i malignih bolesti krvi. Međutim, s obzirom na brojne neželjene sporedne efekte koje ima (nefrotoksičnost, neurotoksičnost, hepatotoksičnost, ototoksičnost, mijelosupresija, itd), upotreba cisplatine je veoma ograničena (Tassinari et al., 1977; Jung et al., 2007). Pored ove sistemske toksičnosti, drugi problem koji se javlja vezan za cisplatinu jeste inherentna ili stečena rezistentnost, koja takođe bitno utiče na ograničenja pri kliničkoj upotrebi. Stoga je puno napora uloženo radi pronalaženja, sintetisanja novih platinskih jedinjenja koja bi bila podjednako efikasna, a koja bi prevazišla ograničenja cisplatine, u smislu smanjene toksičnosti i rezistentnosti, kao i poboljšanja farmakoloških karakteristika u poređenju sa cisplatinom (Lebwohl et al., 1998; Desoize, 2002; Zutphen et al., 2005; Jung et al., 2007; Ott et al., 2007; Bruijninx et al., 2008; van Chen et al., 2009; Che et al., 2010; Frezza et al., 2010; Olszewski et al., 2010; Wang, 2010). Ovi problemi i ograničenja pokrenuli su pronalaženje alternativnih strategija zasnovanih na otkrivanju različitih kompleksa metala koji bi trebalo da budu kancer-selektivniji, ali i da poseduju drugačije mete delovanja od cisplatine, a obuhvatale su izučavanje molekulskih i ćelijskih mehanizama koji leže u osnovi delovanja cisplatine i drugih platinskih agenasa (Raaphorst et al., 1998; Quiroga, 2012).

Platinski lekovi su među najefikasnijim antikancerskim agensima i imaju širok spektar upotrebe (Lippert, 1999; Hambley, 2001; Fuertes et al., 2003; Ho et al., 2003; Wong et al., 2005; Pasetto et al., 2006; Jung et al., 2007; Zhang et al., 2010), a njihov razvoj tekao je od otkrića karboplatine i oksaliplatine do satraplatine, pikoplatine i multinuklearnih kompleksa BBR3464 (triplatina) (Desoize, 2002; Shah et al., 2009; Olszewski et al., 2010).



Slika 1. Strukture platinskih kompleksa.

Od velikog broja platinskih kompleksa sa kojima su započeta klinička ispitivanja samo su karboplatina i oksaliplatina ušle u kliničku upotrebu (Jakupec et al., 2003), dok nedaplatina, lobaplatina, i heptaplatina imaju ograničenu upotrebu. Strukture platinskih kompleksa koji se koriste u lečenju kancera prikazani su na Slici 1. Karboplatina ima sličan spektar aktivnosti kao cisplatina, ali smanjenu toksičnost, i efikasna je u lečenju solidnih tumora kao što su tumori testisa, jajnika, glave i vrata, i nesitnoćelijski karcinom pluća (Wong et al., 1999; Pasetto et al., 2006). Oksaliplatina je naročito efikasna u lečenju primarnog uznapredovalog kolorektalnog kancera i kancera jajnika rezistentnih na cisplatinu (Silva et al., 2005; Pasetto et al., 2006).

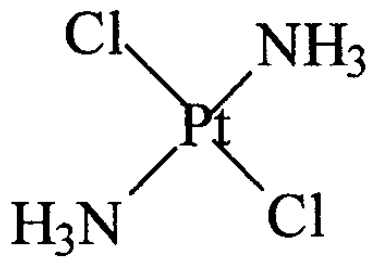
Važna uloga platinskih analoga koji su ušli u upotrebu je zasnovana na činjenici da se skoro svaka kombinovana hemioterapija bazira na cisplatinu ili nekom drugom platinskom leku. Odnosno, sve česte vrste kancera, izuzev kancera dojke i prostate, kao i sve veći broj manje čestih maligniteta, leče se lekovima na bazi platine u kombinaciji sa drugim hemioterapeutcima. Platinski lekovi koriste se za lečenje oko 50-70 % pacijenata (Dyson et al., 2006).

Međutim, ograničenja koja se javljaju pri hemioterapeutskoj primeni cisplatine i analoga, a isto tako i mogućnost da se strukturnim izmenama kompleksa platine utiče na profil antitumorske aktivnosti, podstakli su dalja istraživanja i proširili potragu za efikasnim antitumorskim agensom na široko polje kompleksa metala. Rezultat je bio sinteza hiljade platinskih kompleksa i njihova evaluacija kao antitumorskih agenasa, među kojima su bili i brojni kompleksi *trans*-platine.

1.3. Antitumorski potencijal *trans*-platinskih kompleksa

1.3.1. DNK-interakcija biološki neaktivne *trans*-platine u poređenju sa cisplatinom

Glavna meta citotoksičnog delovanja platinskih kompleksa je DNK molekul, pri čemu je razlika u biološkoj aktivnosti dva izomera, cisplatine i transplatine, posledica stvaranja različitih DNK-adukata (Double, 1984; Eastman, 1987; Malinge et al., 1999).



Slika 2. Struktura transplatine - *trans*-diamindihloro-platina(II) kompleks.

Vezivanje *cis*-/*trans*- izomera za DNK odvija se u dva koraka, pri čemu se prvo formira veza sa N-7 položajem guanina, a zatim se formira veza sa susednom bazom na istom ili naspramnom lancu DNK čime se adukt zatvara (Eastman, 1987).

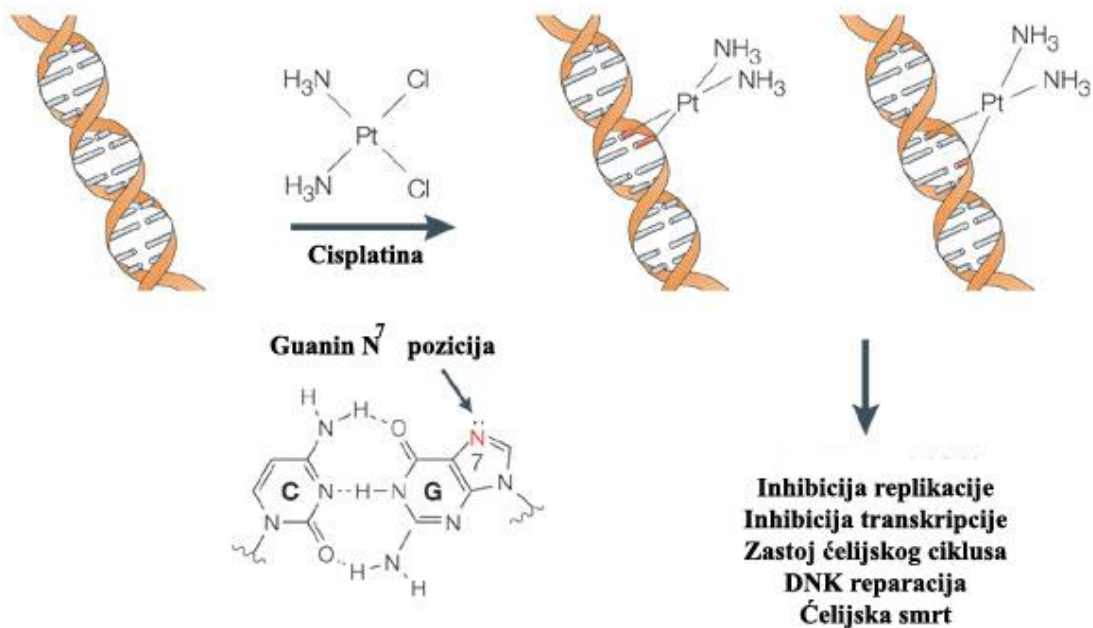
Najbrojniji DNK-adukti koji nastaju delovanjem cisplatine na DNK jesu:

- 1,2-intralančani adukti između susednih baza guanina 1,2-d(GpG) (koji čine 70 % nastalih lezija),
- 1,2-intralančani d(ApG) adukti (20 % svih lezija), i
- interlančani adukti (čine 5 % svih lezija) (Jamieson et al., 1999).

Dakle, formiranjem različitih intralančanih i interlančanih veza i stvaranjem DNK-adukata dolazi do značajnih distorzija DNK heliksa, koje prepoznaju specifični proteini i dalji tok ide ka apoptozi. Iako cisplatina može da indukuje apoptozu u kancerskoj ćeliji preko vezivanja za DNK, dolazi i do brojnih neselektivnih reakcija sa različitim biomolekulima u ćeliji, koji smanjuju terapijsku koncentraciju leka (Reedijk, 1999; van Zutphen et al., 2005). Brojnim metodama može se odrediti količina platine, kako u ćeliji, tako i količina platine vezane za unutarćelijske komponente: različite vrste masene spektrometrije (ICP-MS, ICP-OES, ICP-AAS), kao i metode tačne hromatografije (Krachler et al., 1998; Fan et al., 2004).

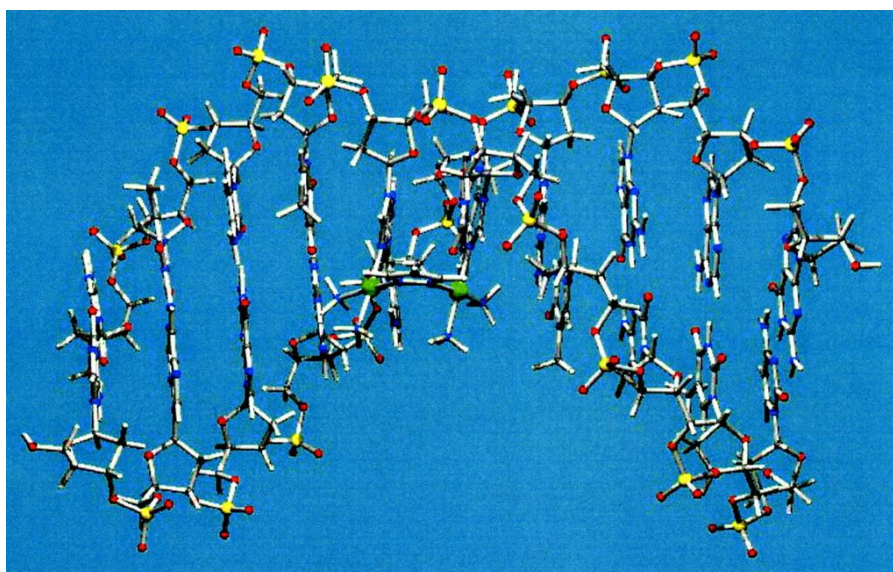
Nasuprot cisplatini, transplatina nema mogućnost formiranja 1,2-intralančanih adukata zbog drugačije geometrije kompleksa i pojave sternih smetnji koje nastaju tokom procesa vezivanja. Najbrojniji adukti nastali delovanjem transplatine na DNK su 1,3-intralančani i interlančani adukti nastali između komplementarnih baza guanina i citozina, pri čemu su najčešći adukti upravo *trans*-[Pt(NH₃)₂{d(GMP)}-d(CMP)] i

trans-[Pt(NH₃)₂{d(GMP)}₂] (Jamieson et al., 1999). Transplatina formira uglavnom monodentatne adukate, koji se usled pojave sternih smetnji sporo prevode u bidentatne.



Slika 3. Formiranje cisplatinjskih adukata, koji utiču na različite procese u ćeliji: inhibicija replikacije, inhibicija transkripcije, zastoj ćelijskog ciklusa, DNK reparacija, ćelijska smrt (modifikovano prema Wand et al., 2005).

Formiranje adukata ima različite posledice jer *cis*- i *trans*- izomeri utiču na stvaranje različitih konformacija DNK heliksa, pa tako npr. 1,2-intralančani adukt nastao delovanjem cisplatine na DNK dovodi do zakrivljenja dvostrukog heliksa prema velikoj brazdi čime se narušava steking interakcija baza, kao i komplementarno vezivanje dva lanca unutar DNK heliksa. Suprotno cisplatini, transplatina indukuje slabije zakrivljenje heliksa (Jamieson et al., 1999; Welters et al., 1999). Dakle, adukti nastali delovanjem *cis*- i *trans*- izomera se strukturno razlikuju, pa dolazi i do različitog prepoznavanja i popravki nastalih lezija, što utiče na razlike u biološkoj aktivnosti stereoizomera.



Slika 4. Trodimenzionalna struktura 1,3-intralančanog adukta nastalog delovanjem transplatine na DNK pri čemu *trans*-platina(II) kompleks formira vezu između ostataka guanina na sekvenci d(GpTpG) (platina(II) – zelene kuglice, fosfor-DNK – žute kuglice) (preuzeto iz Reedijk, 2003).

1.3.2. Dogma o biološkoj inertnosti *trans*-platinskih kompleksa

Intenzivno se sprovodio veliki broj istraživanja u kojima su se sintetisali kompleksi raznih metala u potrazi za agansom koji će pokazati jaču aktivnost od cisplatine, manje negativnih efekata i prevazići rezistenciju. Postoje tri principa za sintezu novog kompleksa metala koji će inhibirati tumor: sinteza klasičnih i neklasičnih derivata cisplatine, sinteza antitumorskih kompleksa koji sadrže neki drugi metal, i sinteza platinskih kompleksa vezanih za sistem nosača koji je sposoban da akumulira citotoksični lek u određenom organu i tkivu (Keppler et al., 1996).

Studije na velikom broju kompleksa platine(II) i platine(IV) su dovele do definisanja SAR pravila (eng. Structure-Activity Relationship), tj. pravila povezanosti

strukture i aktivnosti, po kojima jedinjenja platine za antitumorsku aktivnost treba da ispune sledeće zahteve po pitanju strukture (Reedijk, 1987):

- Da kompleks bude elektroneutralan i da odgovara formuli:
 $cis\text{-Pt}(\text{am})_2\text{X}_2$ za Pt(II) komplekse, sa am=amin i X=anjonski ligand (dobre odlazeće grupe).
- Ligandi (X), najčešće anjoni, treba da se sastoje iz grupa koje imaju srednju jačinu vezivanja za platinu, ili da su lako odlazeći („tvrde“ baze), npr. Cl^- , SO_4^{2-} , ostaci dikarboksilnih kiselina.
- Amino ligandi monodentatni ili bidentatni treba da imaju bar jednu N-H grupu, koja ima mogućnost građenja vodonične veze. Uglavnom je uočeno da su se ligandi koji ne poseduju grupu pogodnu za građenje vodonične veze pokazali neaktivni, mada se mogu vezati za DNK. Mada uloga ove N-H grupe u biološkoj aktivnosti nije razjašnjena može biti kinetičke prirode (npr. da igra ulogu u prilazu ka DNK), ili termodinamičke prirode (npr. da pospešuje dodatnu (de)stabilizaciju nakon vezivanja za biološku metu DNK). Mada takođe sterni efekti i/ili uloga u transportu kroz ćelijsku membranu ne moraju biti isključeni.

Treba naglasiti da gore navedena pravila nisu univerzalna i da za neka jedinjenja platine(II) koja su pokazala antitumorsku aktivnost ne važe. Pa se tako pokazalo da stereoizomer cisplatine - transplatina ne pokazuje biološku aktivnost, iako se isto vezuje za DNK.

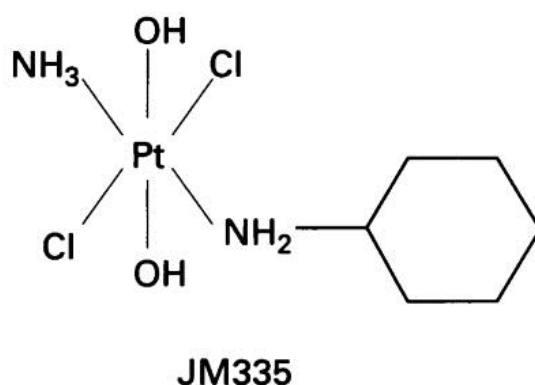
Zbog navedenih prvobitnih SAR pravila i neaktivnosti transplatine dugo se smatralo da generalno *trans*-izomeri platine ne poseduju biološku aktivnost. Izuzeci od ovih pravila uočeni su osamdesetih godina kada su Farrell i saradnici prijavili *trans*-platinske komplekse sa *in vitro* potencijalom inhibicije rasta i *in vivo* antitumorskim karakteristikama (Farrell, 1989; Farrell, 1992), a to su u novije vreme potvrdili Collucia i saradnici koji su otkrili *trans*-Pt(II) komplekse sa iminoetarskim ligandima koji poseduju antitumorsku aktivnost (Leng et al., 2000). Danas je velikim brojem studija povezanosti strukture i aktivnosti potvrđeno da *trans*-Pt(II) i *trans*-Pt(IV) kompleksi najčešće pokazuju povećanu aktivnost na cisplatina rezistentnim ćelijskim linijama u poređenju sa njihovim *cis*- analogima (Hollis et al., 1991; Farrell et al., 1999; Montero et al., 1999; Silverman et al., 2002). Navedeno može da ukaže da *trans*-izomeri imaju

drugačiji mehanizam dejstva na tumorske ćelije u poređenju sa svojim *cis*-izomerima (Arandjelovic et al., 2005).

Trans-platinski kompleksi koji su sintetisani do danas, a pokazali su antitumorski potencijal, mogu se svrstati u nekoliko grupa (u zavisnosti od strukture kompleksa, tj. prirode statičnog liganda) (Kelland, 1999; Najajreh et al., 2002):

- *trans*-amino platina(IV) kompleksi
- *trans*-platina(II) kompleksi sa planarnim amino ligandima
- *trans*-platina(II) kompleksi sa heterocikličnim amino ligandima
- *trans*-platina(II) kompleksi sa iminoetarskim ligandima
- *trans*-platina(II) kompleksi sa asimetričnim alifatičnim ligandima
- binuklearni i trinuklearni *trans*-platina(II) kompleksi.

Jedna farmaceutska kuća (Johnson Matthey Technology Centre, Bristol Myers Squibb, UK) je u saradnji sa Institutom za ispitivanje lekova CRC (Centre for Cancer Therapeutics, Sutton, UK) 1990-tih godina sproveda ispitivanje antitumorske aktivnosti velikog broja *cis*- i *trans*- kompleksa. Rezultati su pokazali da dva *trans*-platinska kompleksa imaju značajan antitumorski potencijal, sličan cisplatini i karboplatini, ali da izazivaju manje sporednih toksičnih efekata, kao i da pokazuju aktivnost na cisplatina-rezistentnim tumorskim ćelijskim linijama. Kompleks *trans*-platine(IV) JM335 (*trans*-amin(cikloheksilamin)dihlorodihidroksoplatina(IV)) i njegov platina(II) homolog, JM334 (*trans*-amin(cikloheksilamin)dihloroplatina(II)), pokazali su aktivnost na cisplatina-rezistentnim linijama, dok odgovarajući izomeri nisu bili aktivni na tim linijama (Slika 5). Kompleks JM335 je pokazao citotoksičnost u rangu cisplatine, a mehanizam delovanja išao je preko apoptoze (Kelland et al., 1994; Kelland et al., 1999). Takođe, ovaj kompleks je prvi *trans*-platinski kompleks koji je pokazao značajnu antitumorsku aktivnost u *in vivo* eksperimentima, ali nije ušao u kliničke studije s obzirom da se deaktivirao pri ulasku u ćeliju i da je bio manje aktivan od cisplatine (Kelland et al., 1995). Daljim izmenama jedinjenja platine dobijeni su drugi kompleksi sa većom citotoksičnošću, i/ili aktivnošću na cisplatina-rezistentnim linijama, od kojih su neki ušli i u kliničke studije, a čija aktivnost je bila posledica drugačije interakcije sa DNK (Holford et al., 2000).



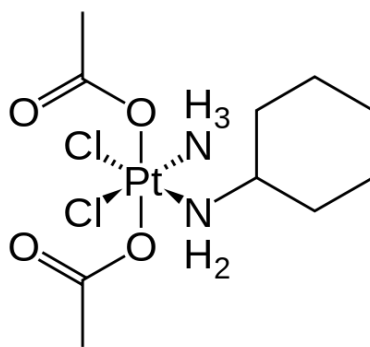
Slika 5. Struktura JM335 - *trans*-amin(cikloheksilamin)dihlorodihidroksoplatina(IV)

Zamena amino grupe planarnim piridinom povećava citotoksičnost *cis*-/*trans*-kompleksa, pa je tako pokazano da zamenom NH₃ grupe aromatičnim planarnim aminom u transplatini i dobijanjem kompleksa generalne formule *trans*-[PtCl₂(NH₃)L] (L=planarni N-ligand; tiazol, hinolin, benzotiazol, izohinolin, piridin, itd) dolazi do aktivacije *trans*-izomerije, odnosno povećanja aktivnosti *trans*-platinskih kompleksa u poređenju sa postojećim *cis*-izomerima (Farrell, 1993; Zou et al., 1993; Manic et al., 2001). Objašnjenje vezano za povećanu antitumorsku aktivnost *trans*-platinskih izomera transplatine leži u izmenjenoj strukturi, čime se menja modalitet interakcije sa DNK jer aromatični planarni ligand formira drugačije sterno okruženje oko centralnog jona platine.

Mehanizam putem koga *trans*-platinski izomeri deluju može ići preko delovanja planarnog piridinskog liganda koji podstiče odvijanje DNK heliksa, odnosno preko delovanja planarnih aromatičnih amino liganada na formiranje velikog broja interlančanih mostova sa DNK. Na primer, pokazano je da *trans*-[PtCl₂(NH₃)L] (L=hinolin) ima veću antitumorsku aktivnost od svog *cis*-izomera jer stvara steking interakcije sa bazama DNK lanca narušavajući njegovu konformaciju, a to mu omogućava priroda njegovog aromatičnog prstena i njegova geometrijska lokacija u kompleksu (*trans*-položaj) (Zákovská et al., 1998; Bierbach et al., 1999; Brabec et al., 2000).

Platina(IV) kompleksi su se takođe pokazali kao dobri kandidati kada su u pitanju neorganski hemioterapeutici, pa je tako jedan od njih – satraplatin, čija je struktura prikazana na Slici 6, dospelo do treće faze kliničkih ispitivanja (Hall et al., 2002; Hall et al., 2007; Choy et al., 2008). Nesumnjivo je prednost platina(IV) kompleksa u odnosu na platina(II) komplekse oktaedralna geometrija koju odlikuju dva aksijalna liganda i kinetička inertnost koja smanjuje reaktivnost i omogućava funkcionisanje perifernih grupa. Različite studije dokazale su značajnu antitumorsku aktivnost kako *trans*-kompleksa platine(II), tako i *trans*-kompleksa platine(IV) sa različitim mehanizmima delovanja (Farrell et al., 1992; Kelland et al., 1994; Kelland et al., 1995; Perez et al., 2003; Martinez et al., 2005; Ramos-Lima et al., 2010).

Dakle, jednostavnom strukturnom izmenom dolazi do aktivacije *trans*-kompleksa, odnosno *trans*-izomerije, pri čemu se dobijaju *trans*-platinski kompleksi sa većom aktivnošću od odgovarajućih *cis*-izomera. Ovako dobijeni *trans*-izomeri iskazuju antitumorsku aktivnost ne samo na cisplatinu senzitivnim, već i na cisplatinu rezistentnim ćelijskim linijama, pa se predpostavlja da se mehanizam njihovog delovanja razlikuje od mehanizma cisplatine (drugačije vezivanje za DNK, razlike u procesima stvaranja oštećenja i procesima reparacije DNK, itd) (Collucia et al., 2007; Quiroga et al., 2012).



Slika 6. Struktura satraplatine.

1.3.3. Mehanizam citotoksičnog dejstva *trans*-platinskih kompleksa

Kao što je ranije istaknuto, jedan od glavnih problema koji se javlja u hemioterapiji kancera jeste rezistencija tumorskih ćelija, a ona može biti izazvana smanjenom akumulacijom leka, unutarćelijskom detoksifikacijom leka, povećanom DNK reparacijom, neuspešnom apoptozom, itd (Cepeda et al., 2007).

Dakle, mehanizam dejstva platinskih agenasa je kompleksan proces koji uključuje direktno oštećenje DNK, blokadu ćelija u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa, proces apoptoze, aktivnosti unutarćelijskih proteina kinazne kaskade i ekspresionog nivoa pro- i anti-apoptotskih članova Bcl-2 familije, remodelovanje vanćelijskog matriksa, kao i brojne druge promene.

1.3.3.1. Prepoznavanje i reparacija DNK oštećenja

Nakon stvaranja DNK adukata do ulaska ćelije u apoptozu, dešava se niz složenih događaja, koji započinju prepoznavanjem oštećenja. Postoji oko 20 različitih proteina koji učestvuju u prepoznavanju oštećenja na DNK, i tu spadaju komponente MMR kompleksa (eng. MisMatch Repair complex – kompleks reparacije pogrešno sparenih baza), nehistsonska HMG1 i HMG2 grupa proteina (eng. High-Mobility Group – grupa lako pokretljivih proteina), humana RNK-polimeraza I, TBP (eng. transcriptional factor TATA Binding Protein – transkripcioni faktor TATA vezujući protein) (Cepeda et al., 2007). Ovi proteini mogu delovati u kombinaciji i njihova glavna uloga je da signal o oštećenju prenesu dalje do efektoru, mada to nije njihov jedini biološki značaj, jer zapravo svaki od njih može da indukuje nekoliko specifičnih događaja tako da rezultat DNK oštećenja bude nekoliko različitih bioloških efekata. To je u skladu sa činjenicom da su pro- i anti- apoptotski signali aktivirani simultano pri delovanju citostatika, i njihovo trajanje i intenzitet su integrisani dalje, što određuje konačnu sudbinu ćelije.

Postoje dva glavna mehanizma koji učestvuju u reparaciji DNK lezija indukovanih cisplatinom, a odgovorna su za pojavu rezistencije, i to su reparacija

isećanjem nukleotida (eng. Nucleotide Excision Repair, NER) i reparacija pogrešno sparenih baza (Mismatch Excision Repair, MMR) (Cepeda et al., 2007).

NER mehanizam je veoma važan mehanizam koji popravlja DNK oštećenja tako što uklanja male jednolančane segmente DNK koji sadrže lezije, a neke studije pokazale su da NER zapravo ima ključnu ulogu u popravci lezija DNK nastalih delovanjem *trans*-platinskih kompleksa. Najpre se prepoznaju oštećenja od strane proteina XPC (eng. Xeroderma pigmentosum group C) i HR23B, zatim transkripcioni faktor dolazi na to mesto čime se DNK lanac odvija na mestu lezije, a zatim kompleksi endonukleaza XPG i ERCC1/HPF (eng. Excision Repair Cross Complementing) prave 3' i 5' prekide. Regioni sa oštećenjem bivaju isećeni i reparacija isećenog dela dalje teče uz pomoć DNK polimeraze, i PCNA i DNK ligaze koji udruženim delovanjem vraćaju DNK lanac u prvobitno stanje (Cepeda et al., 2007; Chaney et al., 1996; Reed, 1998). Izmene i defekti NER sistema mogu rezultovati u hipersenzitivnosti ili rezistenciji na cisplatinu (Chaney et al., 1996), a pokazano je i da upravo ERCC1 ima ulogu u pojavi rezistencije (Martin et al., 2002).

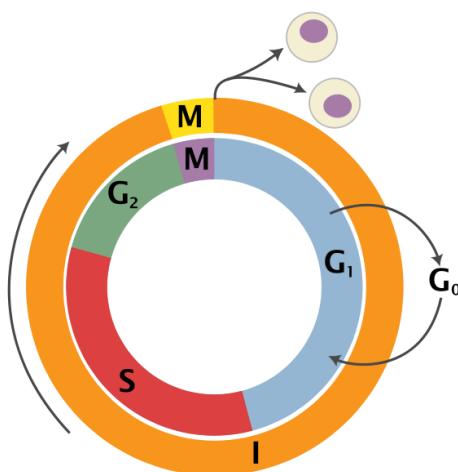
MMR reparacija je mehanizam kojim se post-replikaciono ispravljaju nesporeni ili pogrešno sporeni nukleotidi, i kod sisara obuhvata bar pet proteina (MLH-1, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1) koji zahtevaju ATP da bi funkcionisali. Pretpostavlja se da proteini MMR sistema imaju važnu ulogu u prenošenju citotoksičnog signala od mesta stvaranja DNK lezije do ćelijskih komponenti koje složenim reakcijama uvode ćelije u apoptozu (Yamada, et al 1997). Odnos između prepoznavanja oštećenja DNK od strane MMR proteina i citotoksičnosti još nije tačno razjašnjena, ali je neophodna u toksičnosti nekih antikancerskih agenasa. Ustanovljeno je da su defekti MMR sistema povezani sa rezistencijom na neke antikancerske agense, među kojima je i cisplatin (Karran et al., 1982).

1.3.3.2. Ćelijski ciklus

Ćelijski ciklus obuhvata promene koje se odigravaju u ćeliji od momenta njenog nastanka do njene deobe na dve nove ćelije. Sve ćelije, i normalne i kancerske, u okviru ćelijskog ciklusa prolaze kroz niz promena koje su grupisane u četiri faze (Slika 7):

- G1 faza – presintetička faza (faza u kojoj se povećava veličina ćelije i vrši se priprema za sintezu DNK, sintetišu se RNK i proteini; kada ćelija miruje i pauzira sa deobom tada je ona u G0 fazi – fazi mirovanja);
- S faza – sintetička faza (faza u kojoj se odvija sinteza DNK);
- G2 faza – postsintetička faza (odvija se sinteza proteina neohodnih za mitozu);
- M faza – mitozna (deoba ćelije) (Jančić-Zguricas et al., 1995).

U zavisnosti koliko dugo je ćelija izložena dejstvu cisplatine, dolazi do promena različitog intenziteta i trajanja, tj. dolazi do prolaznog zastoja S faze kao i zastoja u G2 fazi ćelijskog ciklusa (Siddik, 2003). Pri blokadi, odnosno zastoju ćelijskog ciklusa, dolazi do aktiviranja NER sistema za reparaciju, što omogućava uklanjanje nastalih adukata i dalje normalno odvijanje ćelijskog ciklusa, ali ukoliko do toga ne dođe, ćelije podležu apoptozi. Odnos između ćelijskog ciklusa i citotoksičnosti je složen i nije u potpunosti razjašnjen, ali pretpostavlja se da zastoj ćelijskog ciklusa utiče kao inhibitor citotoksičnog procesa, jer je pokazano da farmakološko ukidanje kontrolne G2/M tačke povećava ćelijsku osetljivost na cisplatinu (Siddik, 2003). Reparacija je usko povezana sa aktivacijom kontrolnih tačaka ćelijskog ciklusa i procesom apoptoze, i sva tri procesa su zajedno povezana sa tumor supresor proteinom p53, koji izgleda ima ulogu u pokretanju fosforilacione kaskade kojom se signal prenosi na kontrolne proteine ćelijskog ciklusa (Bullock et al., 2001; Siddik, 2003).



Slika 7. Šematski prikaz ćelijskog ciklusa (preuzeto iz Cooper, 2000).

1.3.3.3. Apoptoza

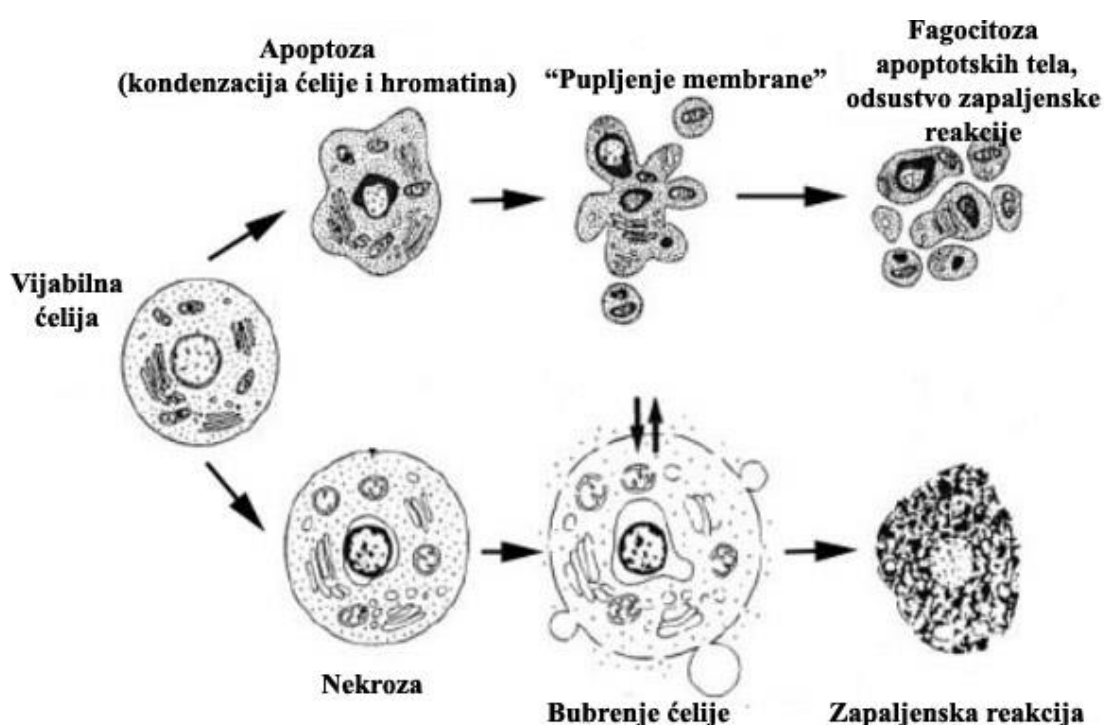
Smrt ćelija može da nastane delovanjem patoloških činilaca, kao što su različiti fizički i hemijski agensi, mikroorganizmi, ili u situacijama nedostatka neophodnih životnih materija. Međutim, u toku embrionalnog razvoja i tokom obnove tkiva i organa odraslih jedinki dolazi do tzv. fiziološke smrti ćelija. Na osnovu morfoloških karakteristika smrt ćelija može se podeliti na nekrozu, apoptozu i autofagiju (Alberts et al., 2002).

Nekroza je pasivan tip ćelijske smrti i ispoljava se u nefiziološkim uslovima, odnosno kada su ćelije izložene ekstremnim varijacijama fizioloških uslova (npr. hipotermija, hipoksija), koje mogu da rezultuju u promenama permeabilnosti plazmine membrane. Zbog toga je ovaj tip ćelijske smrti analogan „ubistvu ćelije“, i odvija se tako što ćelije bubre, plazmina membrana se raspada, a citoplazmatski sadržaj se zajedno sa lizozomskim enzimima oslobađa u vanćelijsku tečnost. Oslobođeni sadržaj privlači inflamatorne ćelije i dolazi do destrukcije tkiva, odnosno dolazi do zapaljenske reakcije (Thatte et al., 1997).

Apoptoza i autofagija javljaju se pod normalnim fiziološkim i patološkim uslovima, i to su procesi u kojima ćelija aktivno učestvuje. Zbog toga se za apoptozu i autofagiju koristi termin „programirana ćelijska smrt“ ili „ćelijsko samoubistvo“. Apoptoza predstavlja aktivan, uređen i genski regulisan proces, u kome ćelija prolazi kroz karakterističan sled morfoloških promena, koje uključuju kondenzaciju hromatina u jedru i smanjenje volumena čitave ćelije, kompakciju organela bez vidljivih morfoloških promena, promena na nivou plazma membrane – pri čemu se na membrani javljaju izbočenja, nestaju mikrovili i ćelija gubi kontakte sa okolnim ćelijama, i konačno fragmentaciju ćelije na apoptotska tela, koje okolne ćelije i makrofagi brzo fagocituju. S obzirom da ne dolazi do razgradnje membrane, nema osobađanja ćelijskog sadržaja u okolinu, tako da se ne javlja zapaljenski odgovor, kao u procesu nekroze, niti dolazi do stvaranja ožiljka (Thatte et al., 1997; Alberts et al., 2002).

Jedna od prvih promena na plazma membrani je translokacija membranskog fosfolipida fosfatidil-serina (eng. Phosphatidylserine, PS), sa unutrašnje strane membrane gde se nalazi u normalnim uslovima, na spoljašnju stranu. Eksternalizacija fosfatidil-serina kod ćelija limfocita predstavlja signal koji makrofage prepoznaju i

otpočinju fagocitozu apoptoznih limfocita (Kiechle et al., 1998). Takođe, dolazi i do drugih bitnijih biohemijskih događaja kao što je fragmentacija genomske DNK, ireverzibilni događaj koji se odigrava pre promena u permeabilnosti plazma membrane. Fragmentacija DNK nastaje usled aktivacije kalcijum- i magnezijum-zavisnih jedarnih endonukleaza, kojima se selektivno seče DNK na mestima između nukleozomalnih jedinica (internukleozomalna fragmentacija) linker-DNK, čime nastaju mono- i oligonukleozomalni fragmenti DNK dužine 180-200 bp (Thatte et al., 1997).

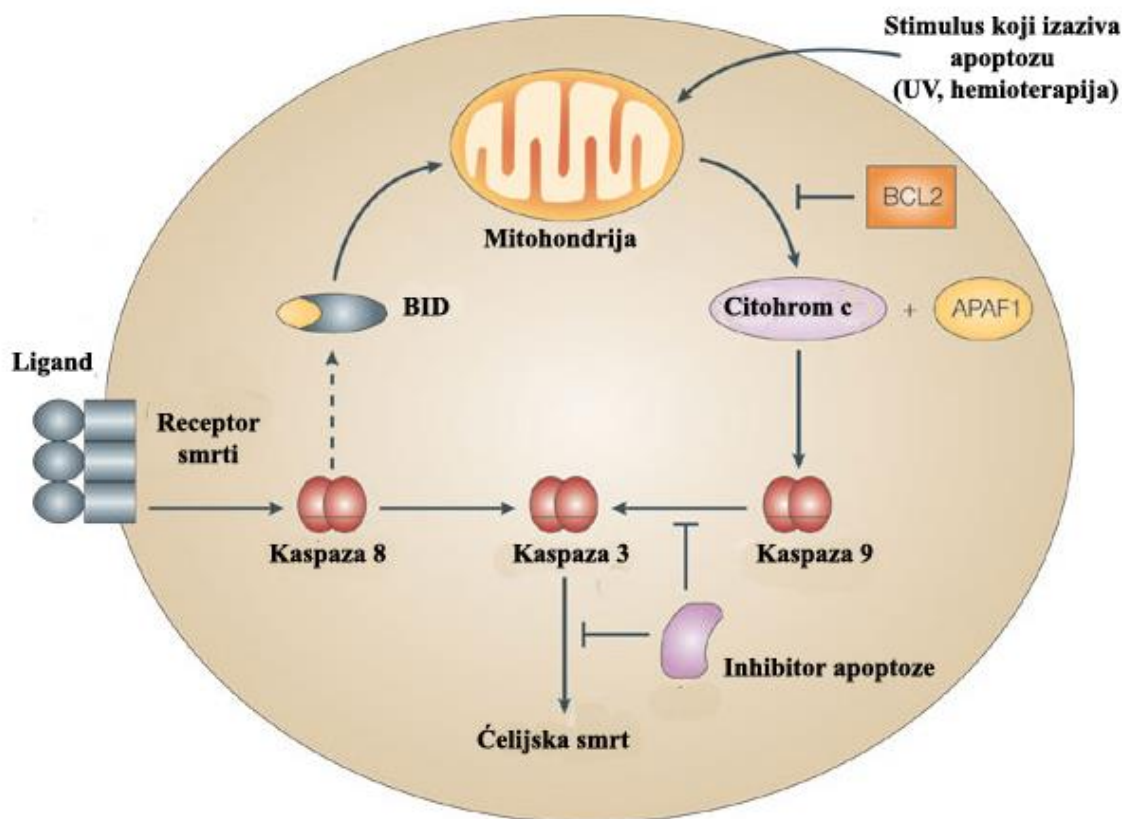


Slika 8. Procesi apoptoze i nekroze (modifikovano prema Van Cruchten, 2002).

Postoji nekoliko puteva aktivacije apoptoze:

1. Preko receptora iz familije TNFR (eng. Tumor Necrosis Factor Receptors) kao što je FAS/CD95 koji nakon vezivanja liganda prenose signal na kaspazu 8 i

- često pro-kaspazu 10. Dalje sledi aktivacija efektornih kaspaza (kaspaza 3, kaspaza 6, kaspaza 7).
2. Oslobađanjem mitohondrijskih proteina u citoplazmu: citohrom *c*, faktor indukcije apoptoze (eng. Apoptosis Induction Factor, AIF) i endonukleaza G. Citohrom *c* prenosi dalje signal na kaspazu 8.
 3. Putevi nezavisni od aktivnosti kaspaza.



Slika 9. Putevi aktivacije apoptoze: BID – stimuliše oslobađanje citohroma *c*, BCL2 – inhibira oslobađanje citohroma *c*, APAF1 – faktor aktivacije apoptoze (modifikovano prema Andersen et al., 2005).

1.3.3.3.1. Kaspaze

Kao što je navedeno, u procesu apoptoze ključnu ulogu ima porodica cistein-proteaza (eng. Cysteine-Aspartic-Acid-Proteases), nazvanih kaspaze, i u ćelijama sisara je identifikovano najmanje 11 različitih članova porodice kaspaza. Kaspaze koriste cisteinski ostatak kao katalitički nukleofil koji specifično seče targetne proteine iza asparaginske kiseline, pri čemu je za efikasnu katalizu neophodno prepoznavanje bar četiri amino kiseline na N-terminusu od mesta sečenja. Tetrapeptidni motivi koje prepoznaju se razlikuju značajno među kaspazama i objašnjavaju diverzitet njihovih bioloških funkcija. Kaspaze se dele na inicijatorske – učestvuju u aktivaciji ostalih kaspaza (kaspaze -1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -14), ili egzekucione/efektorne – učestvuju u proteolitičkoj degradaciji ciljnih enzima (kaspaze -3, -6, -7), a nazive su dobile zavisno od mesta u apoptotskoj kaskadi (Earnshaw et al., 1999; Alberts et al., 2002).

Kaspaze se u ćelijama nalaze u vidu neaktivnih formi – zimogena, a čijom aktivacijom dolazi do izvršenja apoptotskog programa. Pro-kaspaze se sastoje od N-terminalnog prodomena praćenog velikom (~20 kDa) i malom subjedinicom (~10 kDa). Velika subjedinica sadrži katalitički cisteinski ostatak u okviru konzerviranog QACYG motiva, i prilikom procesovanja zimogen se prvo seče između velike i male subjedinice, a zatim se uklanja prodomen. Aktivna heterotetramerna kaspaza je formirana povezivanjem dva procesovana zimogena i sastoji se iz dve velike i dve male subjedinice. Svaki heterodimer sadrži aktivno mesto koje je izgrađeno od ostataka i male i velike subjedinice (Earnshaw et al., 1999).

Signali za aktivaciju kaspaza mogu ići spoljašnjim putem, odnosno doći od okolnih ćelija, putem molekula koji se vezuju za membranske receptore (tzv. receptori smrti), nakon čega dolazi do aktivacije kaspaza. Drugi, unutrašnji put aktivacije, uključuje signale koji potiču iz unutrašnjosti ćelije, a koji nastaju usled različitih oštećenja, odnosno stresa u pojedinim organelama (jedro, endoplazmin retikulum, Goldžijev kompleks). Centralno mesto u ovom putu imaju mitohondrije, kod kojih dolazi do prolazne promene potencijala membrane, odnosno povećane propustljivosti za male molekule, koji izlaskom iz mitohondrija mogu da aktiviraju kaspaze i izazovu smrt ćelije. Ova dva puta međusobno interaguju s obzirom da prvi navedeni put preko receptora smrti može biti amplifikovan preko oštećenja mitohondrija. Supstrat za

delovanje kaspaza su signalni proteini koji održavaju strukturni integritet ćelije kao i proteini koji štite ćeliju od ulaska u apoptozu, kao što su npr. inhibitor DNK-nukleaze, Bcl-2, lamin-degradivni protein koji oblaže unutrašnju jedarnu membranu, i mnogi drugi (Earnshaw et al., 1999; Alberts et al., 2002).

Kaspaza 3 je ključna proteaza koja se aktivira tokom rane faze apoptoze, i kao i drugi članovi familije kaspaza, sintetisana je kao neaktivni proenzim i podleže autoproteolizi ili sečenju od strane drugih proteaza. Aktivna kaspaza 3, marker za ćelije koje podležu apoptozi, je tetramer i sastoji se iz dva heterodimera od 17 i 12 kDa subjedinica dobijenih iz proenzima od 32 kDa, a ima dva katalitička mesta koja funkcionišu nezavisno. U svakom katalitičkom domenu, velika i mala subjedinica su blisko povezane, pri čemu obe doprinose ostacima neophodnim za vezivanje supstrata i katalizu. Aktivna kaspaza 3 proteolitički seče i aktivira druge kaspaze, kao i relevantne mete u jedru. Kaspaza 3 je neophodna za normalan razvoj mozga, a ključnu ulogu ima u procesu apoptoze gde utiče na kondenzaciju hromatina i DNK fragmentaciju (Porter et al., 1999).

1.3.3.3.2. Bcl-2 familija gena

Bcl-2 familija gena kodira heterogenu grupu proteina koji predstavljaju ključne unutarćelijske modulatore apoptoze, i nakon otkrića Bcl-2 gena, familija proteina Bcl-2 postaje posebno istraživana oblast zbog izuzetnog značaja za razumevanje molekulsko-bioloških mehanizama koji leže u osnovi procesa apoptoze. Poslednjih godina naročito se istražuju antiapoptotični članovi Bcl-2 familije koji predstavljaju osnovu za razvoj nove generacije bioloških agenasa sa antikancerskim osobinama (Thompson, 1995; Rutledge et al., 2002).

Prvootkriveni član ove familije je antiapoptotični protoonkogen Bcl-2 (eng. B-cell leukemia/lymphoma 2), lokalizovan u membranama mitohondrija, endoplazminog retikuluma i u spoljašnjoj membrani jedarnog ovoja. Nakon Bcl-2 proteina otkrivena je familija homologih proteina od kojih neki imaju stimulatorni, a neki inhibitorni efekat na proces apoptoze, a u humanim ćelijama je do sada otkriveno 19 članova Bcl-2 familije (Krajewski et al., 1993). Bax (Bcl-2 associated X) je prvi otkriveni

proapoptozni homolog, koimunoprecipitat Bcl-2 proteina, težak 21 kDa, i pretežno se nalazi u citoplazmi.

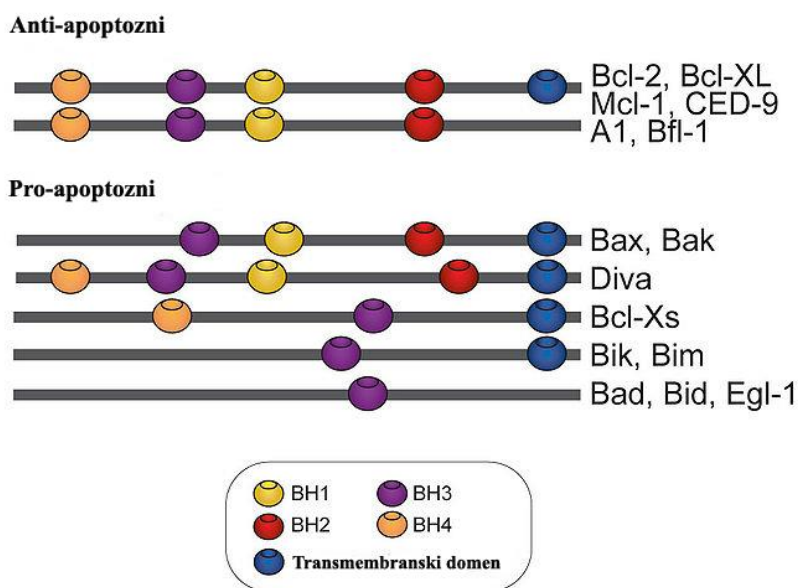
Svi članovi familije Bcl-2 sadrže najmanje jedan od četiri visoko konzervisana Bcl-2 homologa (BH) domena – BH1-BH4. Na osnovu broja homologih domena, proapoptozni proteini su podeljeni u dve subfamilije:

- Bax subfamilija proteina – Bax, Bak (Bcl-2 antagonist/killer), Bok (Bcl-2 related ovarian killer) – sadrže tri BH domena.
- Bid subfamilija proteina – čine je 7 proteina koji sadrže samo BH3 domen, pa se nazivaju proteini sa BH3 domenom (eng. BH3 only proteins).

Homologi domeni odgovorni su za procese homo- i hetero- dimerizacije članova Bcl-2 familije proteina, čime se indukuje ili inhibira proces apoptoze (Adams et al., 1998). Antiapoptozno dejstvo Bcl-2 proteina zasniva se na mogućnosti da veže Bax protein (u formi heterodimera) i tako onemogući stvaranje proapoptoznih Bax/Bax homodimera. Stvaranjem homodimera, utiče se na indukciju apoptoze tako što dolazi do formiranja kanala na membranama mitohondrija, kroz koje izlazi citohrom *c*, jedan od ključnih aktivatora apoptoze. Dakle, kojim će putem krenuti ćelija zavisi od odnosa hetero- i homo- dimera, odnosno anti- i pro- apoptoznih dimera/signala (Korsmeyer, 1999). Međutim, postoje i studije koje pokazuju da Bcl-2 i Bax mogu delovati nezavisno prilikom regulisanja procesa apoptoze (Knudson et al., 1997).

Poslednjih godina preovladava mišljenje da svaki antiapoptozni član Bcl-2 familije predstavlja onkogen koji može biti uključen u razvoj maligne bolesti, a svaki proapoptozni član ove familije proteina može svoje biološko dejstvo u ćeliji ostvariti kao supresor tumora (Müllauer et al., 2001; Zimmermann et al., 2011).

Bcl-2 familija



Slika 10. Bcl-2 familija (modifikovano prema Chao et al., 1998).

1.3.3.4. Molekulski aspekti invazivnosti i metastaziranja tumorskih ćelija

Invazivnost i metastatski potencijal tumora su najopasniji aspekti bolesti u smislu ugrožavanja života pacijenata. Metastaziranje označava prenošenje malignih ćelija sa primarnog mesta neoplazme na neko drugo, često udaljeno mesto - u drugi organ. Metastatski tumori su karakteristični za kasnije faze bolesti, a njihovo širenje se vrši putem limfnih i/ili krvnih sudova. Lokalnom invazijom tumorskog tkiva u zdravo, dolazi do kompresije zdravih tkiva, njihovog oštećenja ili ometanja normalne funkcije organa čime se ugrožava život domaćina. Metastaze liče na primarni tumor od koga su nastale, mada su ponekad toliko anaplastične da zamagljuju njihovo ćelijsko poreklo, a najčešća mesta na kojima se javljaju su pluća, jetra, mozak, i kosti.

Metastatsko širenje bolesti je na prvom mestu uzroka smrti kod pacijenata obolelih od kancera. Putevi kojima se metastaze šire su veoma kompleksni, i

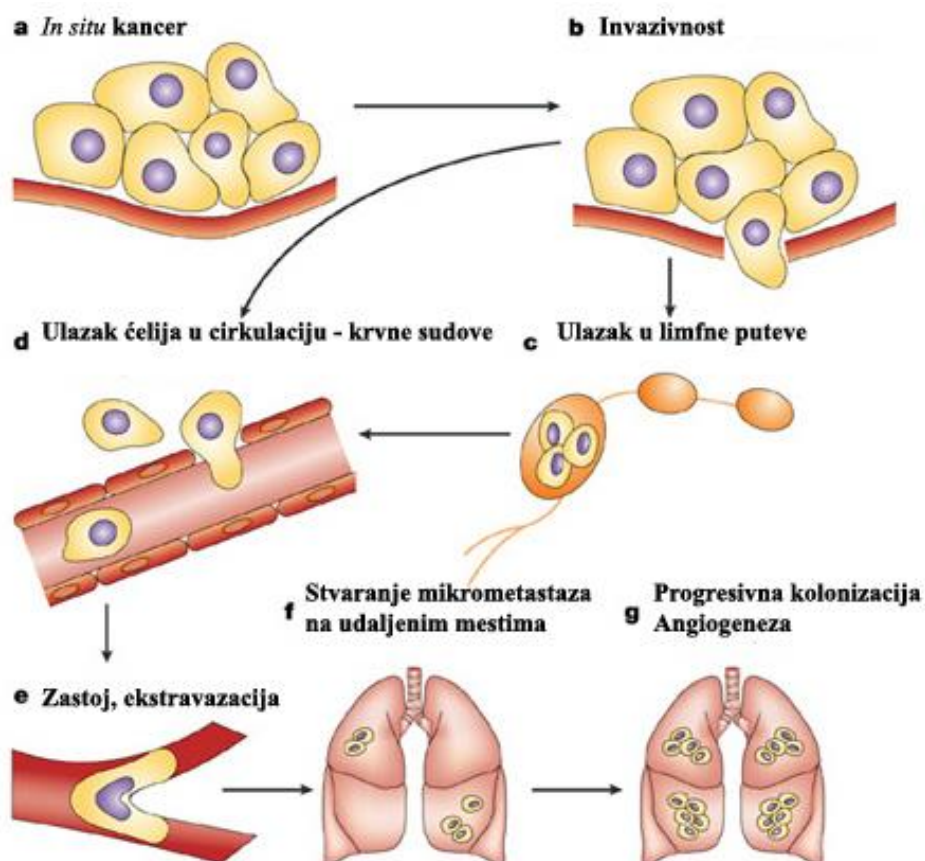
razumevanje ovih puteva i njihovih interakcija daje mogućnost pronalaženja novih molekularnih targeta za delovanje antikancerskih agenasa. Primarna progresija tumora je prilično istražena i na molekulskom i na ćelijskom nivu, mada sam mehanizam metastaziranja još uvek nije razjašnjen (Holland et al., 2000; Steeg, 2006).

U lečenju, odnosno kontroli primarnih tumora, veliki uspeh pokazali su radioterapija i hirurški put uklanjanja, ali progresija bolesti metastaziranjem daje veoma loše prognoze. Naime, nije moguće uvek utvrditi tačnu lokaciju metastaza, niti njihov sastav, pa je tako onemogućeno njihovo ciljano uklanjanje primenom lokalnih terapija. Sva ova ograničenja i problemi u lečenju ukazali su potrebu za daljim istraživanjima kojima bi se razjasnio mehanizam procesa metastaziranja korak po korak (Liotta, 1986).

Metastaziranje obuhvata kompleksan niz događaja, i da bi kancerska ćelija mogla da napusti originalno mesto nastanka i migrira u druge delove organizma, ona mora da se odvoji od primarnog tumora i da se veže i razgradi proteine vanćelijskog matriksa (eng. extracellular matrix, ECM), koji ima ulogu da odvoji tumor od susednih tkiva. Tumorske ćelije odgovaraju na delovanje hemoatraktanata, i stvaraju se pseudopodije koje imaju ulogu u usmeravanju migracije, u sekreciji faktora za mobilnost, u indukciji proteolize matriksa, kao i u usmeravanju kretanja (Liotta et al., 1986). Lokacija metastaza nije uvek nasumična, jer neke vrste kancera imaju tendenciju da se šire u pojedinim organima i tkivima češće nego u drugim, a ta specifičnost je posledica delovanja signalnih molekula – hemokina, i transformišućeg faktora rasta beta. Kancer dojke, na primer, najčešće metastazira u kosti i pluća (Nguyen et al., 2007).

Vanćelijski matriks pruža strukturnu i biohemijsku potporu ćelijama koje okružuje, a čini ga gusta mreža kolagena i elastina ugrađena u viskoznu osnovu koju čine proteoglikani i glikoproteini (Wicha et al., 1982). Uloga ECM je bitna u mitozu i diferencijaciji, jer on služi kao selektivan makromolekulski filter, i u slučaju kancera interakcije ECM i ćelija mogu biti izmenjene što može dovesti do proliferacije tumora i invazivnosti (Liott et al., 1983). Matriks čine bazalna lamina, koja podupire epitelijum i ovičava šupljine i površine organa, i intersticijalni matriks, odnosno matriks koji ispunjava prostor između ćelija. Kontinuirana bazalna lamina je gusta mrežasta struktura sačinjena od kolagena, glikoproteina i proteoglikana, koji obično ne sadrži nikakve pore dovoljno velike za pasivni prolaz tumorske ćelije. Smatra se da je bazalna

lamina ključna tokom progresije invazivnih tumora, odnosno defekti bazalne lamine rezultuju invazivnošću ćelija svih vrsta kancera (Vracko, 1974).



Slika 11. Šematski prikaz metastaziranja: a) *in situ* kancer okružen intaktnom bazalnom laminom; b) invazivnost koja zahteva promene veza između samih ćelija, ćelija i vanćelijskog matriksa, kao i uništavanje matriksa; c) metastatske ćelije ulaze u limfne puteve ili u d) krvotok; e) preživljavanje i zastoj tumorskih ćelija; f) metastaziranje na udaljenom mestu; g) progresivan rast angiogene metastaze (preuzeto is Steeg, 2003).

1.3.3.4.1. Trostepena teorija invazivnosti

Bazalna lamina je kontinuirana ali fleksibilna struktura koja nema mogućnost da propušta velike proteine, ali vanćelijski matriks biva propustljiv za ćelije tokom procesa zarastanja i remodelovanja, zapaljenskih reakcija i u slučaju neoplazija. Prolaz ćelija kroz matriks zavisi od brojnih faktora, pa je predložena tzv. trostepena teorija invazivnosti koja objašnjava po koracima biohemijske događaje tokom invazije tumorskih ćelija u vanćelijski matriks (Liotta, 1986).

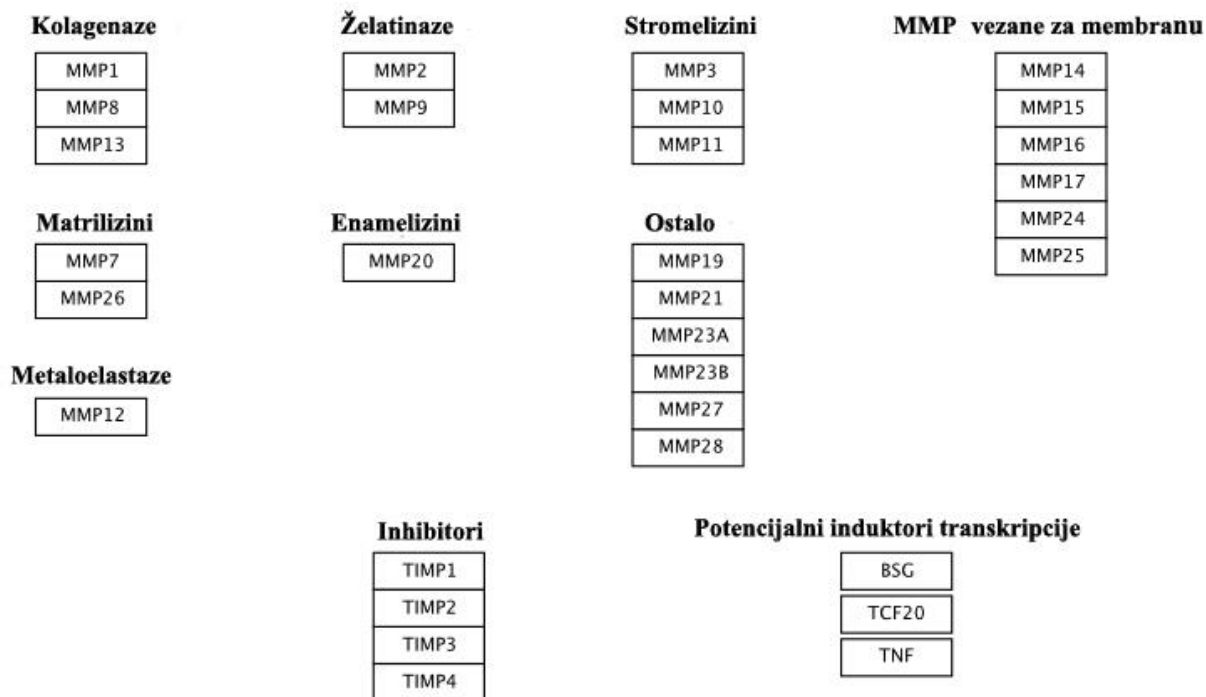
Prvi korak obuhvata povezivanje tumorske ćelije i ćelijskih receptora koji se nalaze na površini matriksa (laminin u bazalnoj membrani i fibronektin u stromi). Sledi korak dva, odnosno lučenje hidrolitičkih enzima od strane usidrenih tumorskih ćelija, koji lokalno razgrađuju matriks i komponente koje su imale ulogu u inicijalnom povezivanju. Liziranje matriksa se odigrava u usko lokalizovanom regionu koji se nalazi blizu površine tumorske ćelije. Treći korak je pomeranje tumorske ćelije u region matriksa koji je razgrađen proteolizom, a kontinuirana invazija matriksa podrazumeva ciklično ponavljanje ova tri koraka.

1.3.3.4.2. Uloga matriksnih metaloproteinaza u metastaziranju

Matriksne metaloproteinaze (eng. matrix metalloproteinases, MMP) su familija cink-zavisnih endopeptidaza koje imaju ulogu u procesovanju mnogih bioaktivnih molekula, u apoptozi, ćelijskoj proliferaciji, migraciji, diferencijaciji, angiogenezi, imunom odgovoru, itd. Najpre su opisane kod kičmenjaka (1962. godine) uključujući vrstu *Homo sapiens*, a zatim su i kod beskičmenjaka i biljaka (Gross et al., 1962; Coussens, 1996).

Trenutno je opisano više od 20 matriksnih metaloproteinaza koje su slične po strukturi i funkcijama, ali se razlikuju u supstratnoj specifičnosti. Stoga, klasifikacija MMP se najčešće vrši na osnovu supstratne specifičnosti i na osnovu ćelijske lokalizacije. Glavni supstrati za MMP su proteinske komponente ECM, i to kolagen, fibronektin, laminin, proteoglikan; zatim proteinaze, latentni faktori rasta, receptori na

površini ćelije, adhezivni molekuli. Tako razlikujemo kolagenaze, želatinaze, stromelizine, membranske MMP, itd.



Slika 12. Klasifikacija matriksnih metaloproteinaza
(modifikovano prema Vu et al., 2000).

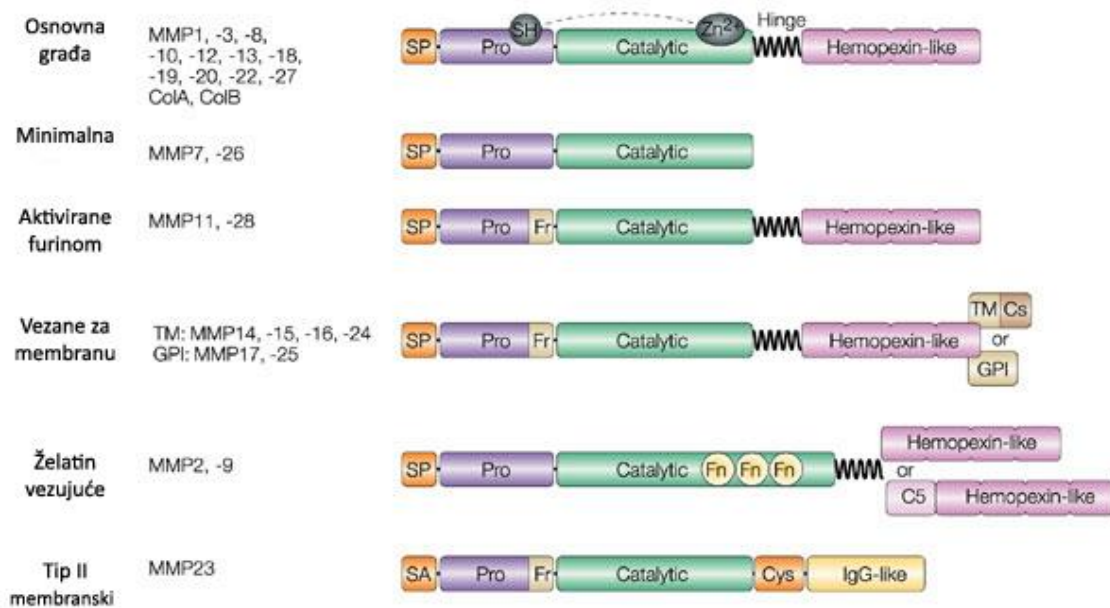
Na osnovu strukture tj. domena koje sadrže, postoji podela na 8 klasa matriksnih metaloproteinaza. Sve MMP sadrže N-terminalni predomen (Slika 13), koji je neophodan za ispravnu sekreciju ovih enzima. Predomen je praćen prodomenom, koji formira esencijalan kontakt sa cinkom iz katalitičkog centra i održava latentnost MMP. Prodomen je praćen katalitičkim domenom, koji ima karakteristične odlike cink-zavisnih metaloenzima i sadrži cink vezujući motiv. Pored cinka, metaloproteinaze sadrže i kalcijumove jone, pa su tako na primer, u strukturi pro-MMP-2, dva jona

kalcijuma lokalizovana u katalitičkom domenu, a treći je smešten u C-terminalnom domenu i ima ulogu da održava odgovarajuću arhitekturu katalitičkog domena i da stabilizuje enzim. Sve MMP osim MMP-7, MMP-23 i MMP-26 sadrže hemopeksin/vitronektin-sličan domen koji je vezan za katalitički domen kratkim linker regionom ili regionom zgloba. MMP-9 dodatno sadrži jedinstven kolagenu V sličan region (insert) između katalitičkog i C-terminalnog domena. Hemopeksin/vitronektin-sličan domen je odgovoran za mnoge protein-protein interakcije, jer veže tkivne inhibitore MMP (eng. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases, TIMP), ali i neke supstrate i uključen je u aktivaciju matriksnih metaloproteinaza.

Drugi dodatni domeni koji nisu karakteristični za sve članove MMP uključuju kolagen-vezujući domen (eng. Collagen Binding Domen, CBD) kod želatinaza i transmembranski domen MT-MMP. Kolagen vezujući domen se sastoji iz tri ponovka slična fibronektinu-tip II i uključen je u vezivanje kolagenih supstrata i elastina, masnih kiselina i trombispondina. Mada se većina matriksnih metaloproteinaza sekretuje, šest MMP sadrži transmembranski domen koji im omogućava vezivanje za površinu ćelije (Björklund et al., 2005).

Matriksne metaloproteinaze se sintetišu i sekretuju kao neaktivni proenzimi i zahtevaju aktivaciju proteinazama ili hemijskim agensima. MMP funkcionišu na neutralnom pH i zahtevaju jone kalcijuma za potpunu aktivnost, a postaju katalitički aktivne tako što dolazi do sečenja propeptida i narušavanja njegove konformacije, nakon čega dolazi do oslobađanja cink-vezujućeg aktivnog mesta. Ceo proces je zasnovan na principu „cisteinskog okidača“, odnosno cisteinski ostatak je u kontaktu sa katalitičkim cinkom i onemogućava ulazak molekula vode do aktivnog mesta, pa ulazak molekula vode u katalitičko mesto rezultuje u formiranju aktivnog katalitičkog mesta. (Nguyen et al., 2001).

Pošto je uočena pozitivna korelacija između aktivnosti MMP tumorskih ćelija i invazivnog potencijala kod velikog broja različitih vrsta kancera (kancer ovarijuma, pankreasa, dojke, pluća), razvijen je veliki broj antikancerskih agenasa koji deluju upravo putem MMP, ili tako što inhibiraju njihovu proteinsku ili gensku ekspresiju, ili tako što deluju na signalne puteve koji indukuju njihovu transkripciju (Liotta et al., 1980).



Slika 13. Raspored domena u strukturi MMP: SA – terminalno signalno sidro, SP – signalni peptid (predomen); Pro – propeptid (prodomen); Catalytic – katalitički domen; Zn – cink u aktivnom mestu; Hemopexin-like – hemopeksin domen; Fn – fibronektin domen; TM – transmembranski domen, GPI – glikozilfosfatidilinozitol; Cs – citoplazmatski domen; Cys – region vezivanja cisteina; C5 – domen za vezivanje kolagena V; Fr – mesto za sečenja furina; IgG-like – domen sličan IgG (modifikovano prema Parks et al., 2004).

Specifičnu grupu matriksnih metaloproteinaza čine želatinaze, matriksne metaloproteinaze 2 i 9 (MMP-2 i MMP-9) – odnosno, želatinaza A i želatinaza B. One su dosta proučavane kod kancera i drugih bolesti, pa je utvrđeno da je MMP-2 eksprimirana u velikoj meri kod normalnih fibroblasta, endotelijalnih i epitelijalnih ćelija kao i kod mnogih transformisanih ćelija, dok se MMP-9 može naći kod normalnih leukocita i transformisanih ćelija.

Želatinaze kao supstrat koriste želatin i kolagen tipa IV, i kao što je već pomenuto za njih je karakteristično da poseduju dodatni domen koji se nalazi u okviru katalitičkog domena, odnosno želatin-vezujući/ kolagen-vezujući domen, koji se nalazi

odmah ispred cink-vezujućeg motiva, i formira odvojenu savitljivu jedinicu koja ne narušava strukturu katalitičkog domena.

Matriksne metaloproteinaze 2 i 9 pripadaju istoj grupi MMP, te su izuzetno slični enzimi, ali postoje i izvesne razlike i to u regulaciji ekspresije, glikozilaciji, aktivaciji proenzima, kao i supstratnoj specifičnosti. Npr. proforma želatinaza - pro-MMP-2 je neglikozilovan protein molekulske mase 72 kDa, dok je pro-MMP-9 protein molekulske mase 92 kDa i sadrži dva N-glikozilovana mesta u prodomenu i katalitičkom domenu i brojne vezane glikane. Takođe, MMP-9 se može naći u plazmi u formi monomera ili dimera, dok je MMP-2 striktno u formi monomera. Kao fiziološki aktivatori MMP-2 pojavljuju se MT1-MMP, kolagen tip I, lipopolisaharid, faktor rasta hepatocita, dok MMP-9 aktiviraju serin proteaze (Nguyen et al., 2001).

Želatinaze imaju uticaj na rast primarnog tumora, angiogenezu, migraciju i invaziju metastatskih ćelija u sekundarne organe, a utiču i na rast sekundarnih tumora, metastaza. Povećana ekspresija MMP-2 i MMP-9 uočena je kod kancera dojke, kože, debelog creva, pluća, ovarijuma i prostate. Odnosno, pokazano je da je povećan nivo aktivnosti MMP-2 i MMP-9 povezan sa povećanjem metastatskog potencijala tumorskih ćelija, što ukazuje na ključnu ulogu ovih proteaza u procesu metastaziranja (Mook et al., 2004). Tačnije, MMP-2 i MMP-9 degraduju komponente bazalne lamine i na taj način učestvuju u procesima metastaziranja i invazivnosti malignih tumora (Vincenti, 2001; Zucker et al., 2004). MMP mogu da inhibiraju ili indukuju progresiju tumora sečenjem različitih bioaktivnih supstrata, te je stoga neophodna modifikacija MMP aktivnosti, u cilju zaustavljanja razvoja i širenja tumora i njegovih metastaza (Boehm et al., 1977; O'Reilly et al., 1977).

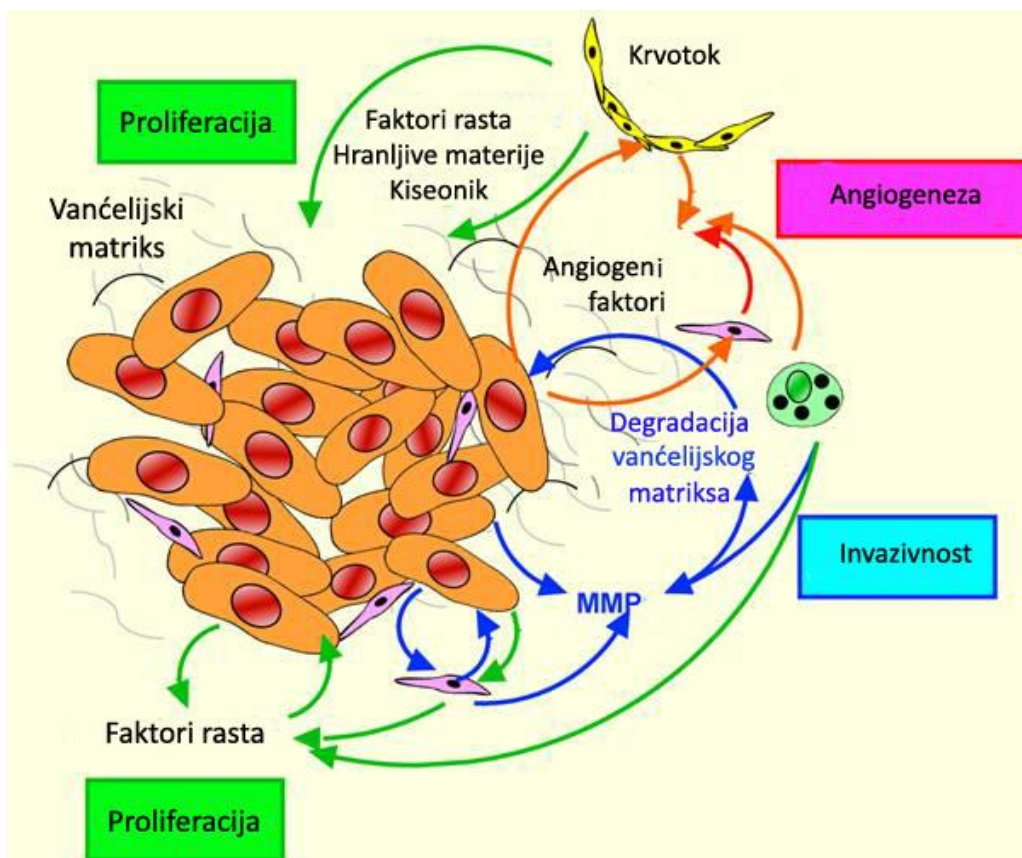
1.3.3.4.3. Uloga tumorskih ćelija u procesu metastaziranja

Ćelije u normalnom tkivu podležu deobi ako bivaju stimulisane faktorima rasta od strane drugih ćelija. Faktore rasta u vanćelijskom matriksu detektuju receptori kao što su npr. vaskularni endotelijalni faktora rasta (eng. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, VEGFR) ili epidermalni faktor rasta (eng. Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR). Kada EGFR veže neki od liganda, aktiviraju se određeni putevi

signalne kaskade, čime može doći do propagiranja proliferacije ćelija i inhibicije apoptoze. Suprotno tome, tumorske ćelije ne zavise od spoljašnjih faktora rasta, već one izbegavaju ovu zavisnost endogenom produkcijom svojih mitogenih faktora, koje sekretuju u ECM. Ovakva autokrina signalizacija indukuje proliferaciju ćelija i njihovo širenje (Lynch, et al. 2004). Dalje kretanje tumorskih ćelija i nastajanje invazivnog karcinoma, odnosno stvaranje sekundarnih tumora, zavisi od proteolize matriksa što uključuje prolazak kroz bazalnu laminu i stromu, kao i usmereno kretanje kroz krvne sudove (Aznavoorian et al, 1993). Različiti faktori utiču na stimulisanje kretanja tumorskih ćelija: faktori rasta, komponente ECM, hijaluronan, kao i faktori koje stimulišu sami tumori. Ukoliko se tumorske ćelije kreću nasumično, kretanje se naziva hemokineza, a ukoliko je usmereno, hemotaksija. Hemotaksija kancerskih ćelija podrazumeva usmereno kretanje ćelija ka nerastvornim proteinima matriksa u odsustvu rastvorenih atraktanata (Stetler-Stevenson et al. 1993; Roussos et al., 2011).

S obzirom da nekontrolisan rast tumora zavisi od autokrinih faktora rasta, moguće je i da su drugi aspekti ponašanja malignih ćelija takođe regulisani autokrinim mehanizmima. Tako je otkrivena grupa citokina koja utiče na kretanje tumorskih ćelija, a proizvode je same ćelije, i članovi te grupe nazvani su autokrini faktori kretanja (eng. Autocrine Motility Factors, AMF). Proces teče preko vezivanja AMF za receptore, što je početni signal za enzime koji deluju na prekidanje međućelijskih veza, kao i na razlaganje brojnih bioloških barijera što omogućava dalje kretanje ćelija. Ćelije se mogu kretati korišćenjem pseudopodija pa se takvo kretanje označava kao ameboidno ili mezenhimalno, odnosno mogu se kretati zajedno, u vidu klastera, a takav tip se označava kao kolektivni tip migracije (Aznavoorian et al, 1993; Jamieson et al., 2003).

Dosta studija bavilo se istraživanjima invazivnosti tumorskih ćelija i njihovom ulogom u procesu metastaziranja, jer bi razumevanje tih procesa omogućilo razvoj novih terapeutika koji bi imali drugačije mete delovanja od već postojećih. Bitno je istražiti vezivanje ćelija, matriksnu proteolizu, i migraciju ćelija, i razumeti kako su ti procesi kontrolisani i povezani međusobno (Stetler-Stevenson et al., 1993).



Slika 14. Uticaj autokrinih i parakrinih faktora na regulaciju invazivnosti i metastaziranja tumorskih ćelija. Interakcije tumora i strome dovode do prekomerne ekspresije faktora rasta koji indukuju rast tumora, angiogenih faktora koji indukuju angiogenezu, i pojačavaju delovanje proteolitičkih enzima na razgradnju matriksa (modifikovano prema Koontongkaew, 2013).

1.3.3.4.4. Angiogeneza (uloga angiogeneze u procesu metastaziranja)

Angiogeneza je fiziološki proces formiranja krvnih sudova od endotelijuma postojećih krvnih sudova, i razlikuje se od procesa vaskulogeneze koja podrazumeva formiranje novih endotelinih ćelija od mezodermalnih ćelijskih prekursora. Dakle, prvi sudovi u embrionalnom razvoju formiraju se tokom vaskulogeneze, nakon čega

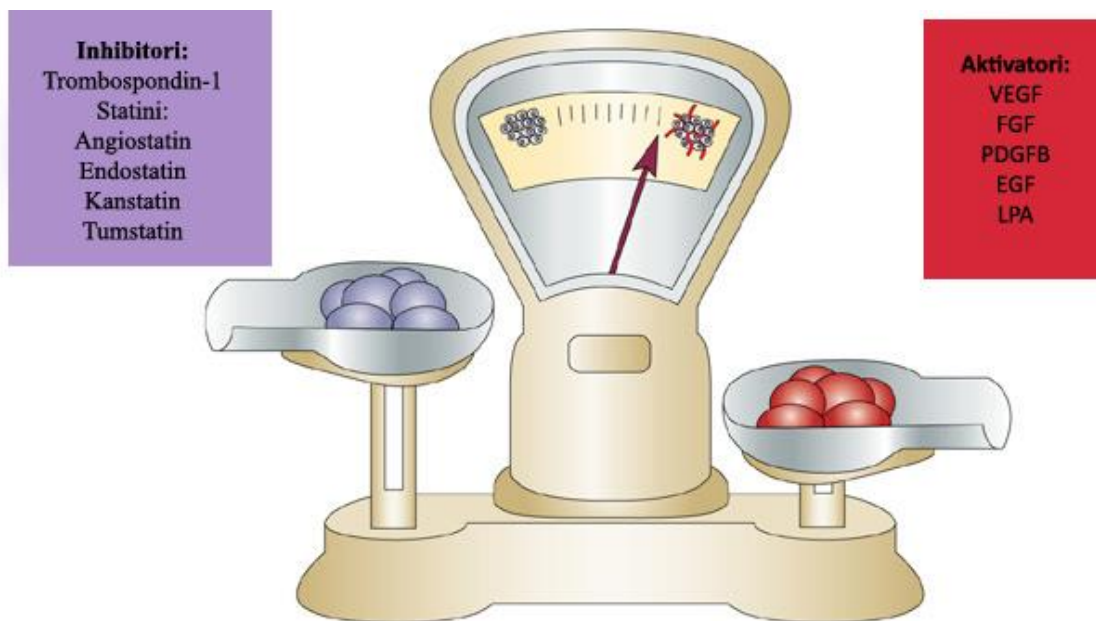
procesom angiogeneze krvni sudovi rastu i račvaju se iz već postojećih (prethodno vaskulogenezom) formiranih krvnih sudova. Angiogeneza je integralni deo kako normalnih razvojnih procesa u organizmu, tako i brojnih patoloških stanja, kao što su tumorski rast i metastaziranje, inflamatorne i vaskularne bolesti, povrede, rane (Risau et al., 1995; Flamme et al., 1997).

Iako se znalo da rast i širenje većine solidnih tumora zavisi od velikog broja visoko propustljivih krvnih sudova, tome se u početku nije pridavala velika važnost. Savremena era istraživanja angiogeneze započela je kada je Folkman izložio određene principe 1970-tih godina, predpostavljajući da nastajanje novih sudova u okolini tumora nije nevažno, već da oni imaju ulogu u širenju tumora veličine preko 1-2 mm u prečniku, jer preko te veličine razmena nutrijenata i otpadnih produkata postaje ograničavajući faktor u razvoju tumora. Folkman je postavio hipotezu da ako su novi krvni sudovi zaista bitni za rast tumora, onda bi inhibiranjem angiogeneze dolazilo do inhibicije širenja tumora, odnosno ukoliko se stopira snabdevanje hranom i formiranje krvnih sudova, to može dovesti do zaustavljanja rasta tumora, ili čak njegovog smanjenja (Ide et al., 1939; Folkman, 1971).

Prvi molekul koji je definitivno bio identifikovan kao angiogeni faktor bio je osnovni faktor rasta fibroblasta (eng. basic Fibroblast Growth Factor, bFGF), a zatim je identifikovan i veliki broj ostalih angiogenih faktora koje proizvode tumorske ćelije, ali i pomoćne ćelije domaćina – makrofage, mastociti i limfociti (Sidky et al., 1976; Shing et al., 1984; Folkman et al., 1987). Iako su mnogi od ovih faktora učestvovali u procesu angiogeneze tumora, najviše su istraživani članovi FGF i VGF (eng. Vascular Endothelial Growth Factor – vaskularni endotelni faktor rasta) familije, međutim u poslednje vreme dosta pažnje je posvećeno izolaciji i karakterizaciji angiogenih inhibitora kao potencijalnih antikancerskih agenasa. Takođe, pored brojnih antiangiogenih molekula, identifikovani su i njihovi ligandi, i unutarćelijski signalni putevi (Folkman, 1977; Auerbach et al., 1994; Claffey et al., 1996). Ranije pomenute matriksne metaloproteinaze takođe doprinose procesu angiogeneze, jer MMP degraduju proteine koje zidove sudova čine čvrstim, što omogućava endotelnim ćelijama da dospeju u region intersticijalnog matriksa. Inhibicija MMP zaustavlja formiranje novih kapilara (Haas et al., 2000).

Iako su dobijeni obećavajući rezultati u predkliničkim modelima, klasični antiangiogeni agensi nisu dali ubedljive rezultate za efikasnu terapiju tumora. To je pokrenulo razvoj novih angiogenih jedinjenja i kombinacija inhibitora angiogeneze sa klasičnim citotoksičnim agensima i radioterapijom – 2004. godine prvi put je od strane Savezne administracije za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih Država (eng. Food and Drug Administration, FDA) odobren antiangiogeni agens Bevacizumab (Avastin) kao prva linija terapije u kombinaciji sa 5-fluorouracilom za lečenje uznapredovalog kolorektalnog kancera (Los, et al., 2007).

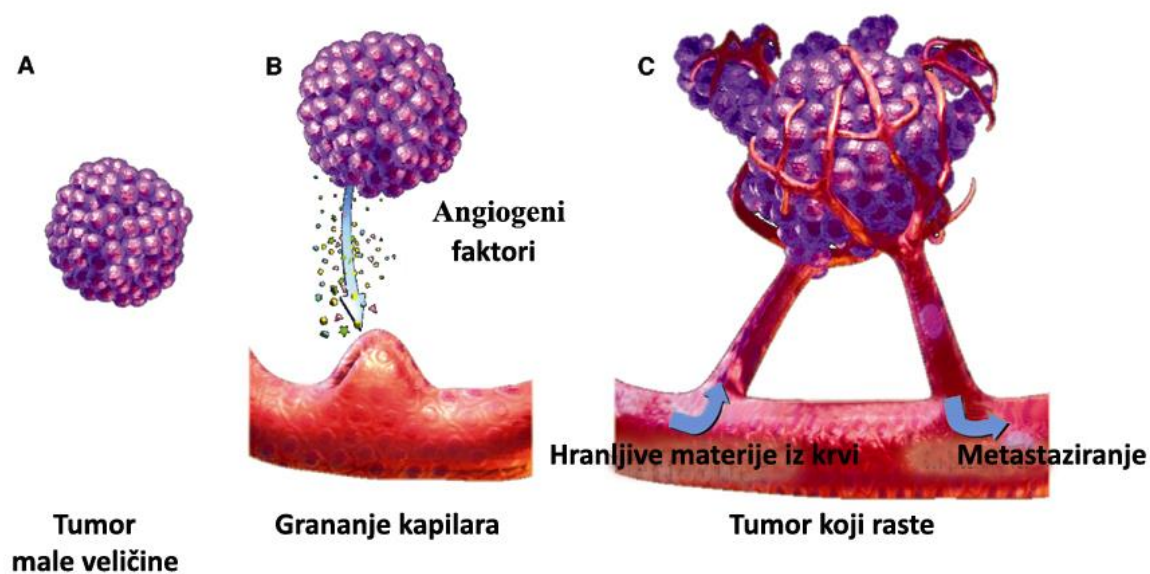
Kancerske ćelije karakteriše sposobnost da se nekontrolisano dele i rastu, a i da razvijaju rezistentnost pri terapiji. Nakon što tumor dostigne veličinu od 1-2 mm³, on više ne može da raste jer mu nedostaju neophodni nutrijenti i kiseonik, i da bi prevazišao ta ograničenja i probleme, on stimuliše angiogenezu lučenjem različitih faktora. Proces je objašnjen i prihvaćen kao tzv. teorija angiogenog okidača, po kojoj je početak angiogeneze kontrolisan ravnotežom između pro- i anti-angiogenih molekula u mikrosredini solidnog tumora, što uključuje čitavu mrežu pozitivnih i negativnih regulatora prikazanih na Slici 15. (Bergers et al., 2003).



Slika 15. Primeri pro- i anti-angiogenih molekula koji balansiraju angiogeni prekidač. Aktivatori angiogeneze su: vaskularni endotelijalni faktor rasta (VEGF), faktor rasta fibroblasta (FGF), epidermalni faktor rasta (EGF), trombocitni faktor rasta (PDGF), lizofosfatidna kiselina (LPA); dok kao inhibitori angiogeneze funkcionišu: trombospondin-1, angiostatin, endostatin, tumstatin, itd (modifikovano prema Bergers et al., 2003).

Sam proces angiogeneze kod tumora se sastoji od nekoliko koraka. Angiogeni faktori koje proizvode tumorske ćelije vezuju se za receptore endotelijalnih ćelija i iniciraju angiogenezu, odnosno čitavu seriju molekulskih i ćelijskih događaja, koji dovode do migracije, proliferacije i diferencijacije endotelijalnih ćelija u novoformirane kapilare, koji potom mogu da se razviju u još zrelije krvne sudove. Kada su endotelijalne ćelije stimulisane da rastu, one sekretuju digestivne enzime koji degraduju bazalnu laminu koja okružuje krvne sudove, a razlaganje vanćelijskog matriksa omogućava oslobađanje proangiogenih faktora iz matriksa. Na taj način veze između endotelijalnih ćelija postaju propustljive, a novoformirani sudovi rastu ka izvoru stimulusa. Poslednji korak podrazumeva sazrevanje i stabilizaciju novoformirane mikrovaskulature, rekonstrukciju bazalne lamine i formiranje veza, ali ovaj korak je

nepotpun u tumorskom tkivu pa su su sudovi nepravilni, a bazalna lamina fragmentisana i propustljiva (Bergers et al., 2003).



Slika 16. Razvoj novih sudova u angiogenezi i rast tumora (modifikovano prema Siemann, 2002).

2. CILJ RADA

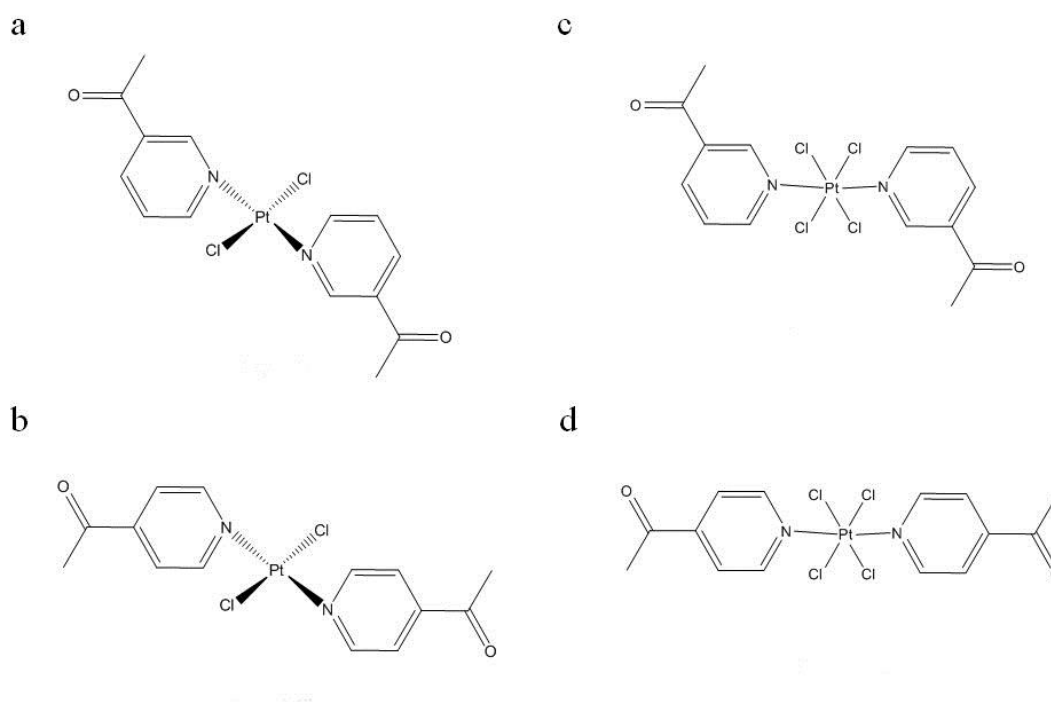
Iako je cisplatina visoko efikasna u terapiji kancera, toksičnost i razvoj rezistentnosti ograničili su njenu upotrebu. Stoga su pokrenuta brojna istraživanja sa ciljem pronalaska novih kompleksa koji bi bili kancer-selektivniji, koji bi posedovali drugačije mete delovanja od cisplatine, a ujedno bi bili manje toksični i ne bi imali uticaja na pojavu rezistentnosti. Mnogi kompleksi metala, među kojima su brojni *trans*-platinski kompleksi pokazali su se kao dobri kandidati, što utiče na stalan razvoj novih jedinjenja kao potencijalnih antikancerskih agenasa, tako da su ciljevi ove doktorske disertacije bili:

- Ispitivanje citotoksičnog potencijala novosintetisanih *trans*-kompleksa platine(II) i platine(IV) sa piridinskim derivatima kao ligandima na nekoliko ćelijskih linija.
- *In vitro* ispitivanje molekulskih mehanizama antikancerske aktivnosti *trans*-platinskih kompleksa na odabranim ćelijskim linijama na kojima su ispoljili značajno citotoksično delovanje:
 - a) Mehanizam indukcije ćelijske smrti, uticaj na ekspresiju proteina – markera apoptoze, uticaj na faze ćelijskog ciklusa, uticaj na unutarćelijsku akumulaciju i distribuciju platine – afinitet vezivanja za proteine i DNK.
 - b) Mehanizam *in vitro* antimetastatskog i antiangiogenog delovanja.
- Ispitivanje korelacije strukture i aktivnosti kompleksa:
 - a) Uticaj (*cis*-/*trans*-) geometrije kompleksa na citotoksičnu aktivnost i mehanizam delovanja – poređenje *trans*-platinskih kompleksa sa cisplatinom.
 - b) Korelacija u odnosu na oksidaciono stanje platine – prema broju liganada vezanih za centralni atom platine (platina(IV) / platina(II) kompleksi).
 - c) Uticaj strukture liganada na citotoksičnu aktivnost i mehanizam delovanja.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Hemijska struktura ispitivanih kompleksa

Hemijske strukture kompleksa platine(II) i platine(IV), čiji su antitumorska aktivnost i molekularni mehanizmi citotoksičnog delovanja ispitivani u ovom radu, prikazani su na Slici 17. Kompleksi su sintetisani i okarakterisani na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, zahvaljujući ljubaznosti profesora dr Živoslava Tešića i mr Gordane Rakić. U pitanju su kompleksi Pt(II) i Pt(IV) sa acetilpiridinskim (monodentatnim) derivatima piridina kao ligandima, i u istraživačkom radu je izvršena karakterizacija nagrađenih jedinjenja metodama elementarne analize, IC i NMR (^1H i ^{13}C) spektroskopije kao i rendgenske strukturne analize za jedinjenja dobijena u kristalnom obliku (Rakić et al., 2009; Rakić et al., 2012).



Slika 17. Strukturne formule ispitivanih *trans*-platina(II) i *trans*-platina(IV) kompleksa:

a) kompleks **1** - *trans*-[PtCl₂(3-acpy)₂] b) kompleks **2** - *trans*-[PtCl₂(4-acpy)₂]

c) kompleks **3** - *trans*-[Pt(3-acpy)₂Cl₄] d) kompleks **4** - *trans*-[Pt(4-acpy)₂Cl₄]

(acpy =acetilpiridin)

3.2. Kulture ćelija

Kulture ćelija upotrebljene u ovom radu su:

- tumorske ćelije: ćelije humanog karcinoma grlića materice (**HeLa**), ćelije mišjeg melanoma (**B16**), ćelije karcinoma dojke (**MDA-MB-453**), ćelije kolorektalnog karcinoma (**LS-174**), ćelije humanog melanoma (**FemX**), ćelije adenokarcinoma pluća (**A549**);
- dve transformisane endotelijalne linije humanog (**EA.hy 926**) i mišjeg (**MS1**) porekla;
- i jedna normalna zdrava ćelijska linija fetalnih humanih fibroblasta pluća (**MRC-5**).

Navedene kulture ćelija su iz kolekcije ćelijskih linija Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, Odsek za eksperimentalna istraživanja u onkologiji, osim EA.hy 926 i MS1 ćelijske linije, koje su poklon Instituta za medicinska istraživanja, Beograd, Srbija. Karakteristike ćelijskih linija, korišćenih u ovom radu, prikazane su u Tabeli 1.

Ćelije su gajene u hranljivim medijumima, koji su čuvani u frižideru, a pre upotrebe bili zagrejani do temperature od 37 °C. Ćelijske linije HeLa, MDA-MB-453, A549, LS-174, FemX, B16 i MRC-5 se održavaju kao monosloj u hranljivoj podlozi RPMI 1640, pH 7,2, koja sadrži 10 % fetalnog govedeg seruma (eng. Fetal Calf Serum, FCS), termički inaktivisanog na 56 °C, 30 minuta. RPMI 1640 je obogaćena penicilinom 192 IU/ml i streptomycinom 200 µl/ml, L-glutationom (3 mM), HEPES (25 mM). Linije EA.hy 926 i MS1 se održavaju kao monosloj u hranljivoj podlozi DMEM, pH 6,9, koja sadrži 10 % fetalnog govedeg seruma, termički inaktivisanog, sa dodatkom penicilina 192 IU/ml, streptomicina 200 µl/ml i L-glutaciona (3 mM).

Tabela 1. Karakteristike ćelijskih linija korišćenih u ovom radu.

ćelijska linija	morfologija	vrsta	tkivo/organ	tumor
HeLa	epitelijalna	humane	cerviks	adenokarcinom
B16	vretenasta	mišje	koža	melanom
MDA-MB-453	epitelijalna	humane	dojka	metastatski karcinom
LS-174	epitelijalna	humane	kolon	adenokarcinom
A549	epitelijalna	humane	pluća	adenokarcinom
EA.hy 926	endotelijalna	humane	hibrid somatskih ćelija	/
MS1	endotelijalna	mišje	hibrid	/
FemX	epitelijalna	humane	koža	melanom
MRC-5	vretenasta	humane	pluća	/

3.2.1. Sastav hranljivog medijuma RPMI 1640

RPMI 1640 podloga je proizvod istraživača Moore i saradnika sa instituta "Roswell Park Memorial Institute", odakle i potiče njen naziv RPMI. RPMI 1640 je primarno formulisan za gajenje humanih ćelijskih kultura koje rastu u monosloju ili suspenziji (Moore et al., 1967). Osnovni sadržaj podloge je fosfatno puferisani fiziološki rastvor (eng. Phosphate Buffer Saline, PBS), u koji se dodaju amino kiseline i vitamini, a sastav je sledeći (g/l):

L-Glutamin	0,3
Glicin	0,01
L-Histidin	0,015
Hidroksi-L-prolin	0,02
L-Izoleucin	0,05
L-Leucin	0,05

L-Lizin-HCl	0,04
L-Metionin	0,015
L-Prolin	0,02
L-Fenilalanin	0,015
L-Serin	0,03
L-Treonin	0,02
L-Triptofan	0,005
L-Tirozin x 2Na x2H ₂ O	0,029
L-Valin	0,02
D-Biotin	0,0002
Holin-hlorid	0,003
Folna kiselina	0,001
Mioinozitol	0,035
Niacinamid	0,001
p-Aminobenzoeva kiselina	0,001
D-Pantotenska kiselina	0,00025
Piridoksin x HCl	0,001
Riboflavin	0,002
Tiamin x HCl	0,001
Vitamin B12	0,000005
D-glukoza	2
Glutation	0,001
HEPES	5,958
Fenol crveno (Na-so)	0,0053

3.2.2. Priprema RPMI 1640 hranljive podloge

Praškasta RPMI 1640 podloga se rastvara u sterilnoj destilovanoj vodi (102 g/l), uz mešanje na temperaturi 15-20 °C. U rastvor je dodato 2 g NaHCO₃. Tokom pripreme podloge, pH vrednost podloge je podešavana na 0,1 – 0,2 jedinica ispod željene pH

vrednosti, koja iznosi 6,7 – 7,0. Podešavanje pH je vršeno rastvorima 1 M HCl i 1 M NaOH. Podloga je sterilisana takozvanom „hladnom sterilizacijom“, upotrebom membranskog filtra poroznosti 0,22 mikrona. U podlogu je dodato 10 % fetalnog goveđeg seruma termički inaktivisanog na 56 °C, 30 minuta. Podloga je opskrbljena i penicilinom 192 IU/ml i streptomycinom 200 µl/ml, L-glutationom (3 mM), HEPES (25 mM) (Moore et al., 1967).

3.2.3. Sastav hranljivog medijuma DMEM

DMEM (eng. Dulbecco's Modified Eagles Medium) je modifikacija BME (eng. Basal Medium Eagle). Originalna formula je sadržala 1 g/l glukoze i korišćena je za kulture mišjih embrionalnih ćelija, a od tada je modifikovana na više načina da bi bila pogodna za primarne kulture mišjih i kokošijih ćelija, kao i za normalne i transformisane ćelije. Hemijski sastav DMEM podloge je sledeći (g/l) (Dulbecco et al., 1959):

Kalcijum-hlorid, anhidrovani	0,20000
Holin-hlorid	0,00400
D-Kalcijum-pantotenat	0,00400
D-Glukoza, anhidrovana	4,50000
Gvožđe(III)-nitratnonahidrat	0,00010
Folna kiselina	0,00400
Glicin	0,03000
HEPES	5,95800
L-Arginin	0,08400
L-Cistin-dihidrohlid	0,06300
L-Glutamin	0,58400
L-Histidin-hidrohlidmonohidrat	0,04200
L-Izoleucin	0,10500
L-Leucin	0,10500
L-Lizin-hidrohlid	0,14600

L-Metionin	0,03000
L-Fenilalanin	0,06600
L-Serin	0,04200
L-Treonin	0,09500
L-Triptofan	0,01600
L-Dinatrijum-tirozinhidrat	0,10400
L-Valin	0,09400
Magnezijum-sulfat, anhidrovan	0,09767
Mio-Inozitol	0,00720
Niacinamid	0,00400
Fenol-crveno, natrijumova so	0,01500
Kalijum-hlorid	0,40000
Piridoksinhidrohlorid	0,00400
Riboflavin	0,00040
Natrijum-bikarbonat	3,70000
Natrijum-hlorid	4,75000
Dinatrijumhidrogen-fosfatmonohidrat	0,12500
Tiamin-hidrohlorid	0,00400

3.2.4. Priprema DMEM hranljive podloge

Praškasta DMEM podloga se rastvara u sterilnoj destilovanoj vodi uz mešanje na temperaturi 15-20 °C. Tokom pripreme podloge, pH vrednost podloge je podešavana na 0,1 – 0,3 jedinice ispod željene pH vrednosti, koja iznosi 6,9, a podešavanje pH je vršeno rastvorima 1 M HCl i 1 M NaOH. Podloga je sterilisana takozvanom „hladnom sterilizacijom“, upotrebom membranskog filtra poroznosti 0,22 mikrona. U podlogu je dodato 10 % fetalnog goveđeg seruma termički inaktivisanog na 56 °C, 30 minuta. Podloga je opskrbljena i penicilinom 192 IU/ml, streptomycinom 200 µl/ml, L-glutationom (3 mM), i HEPES (25 mM) (Dulbecco et al., 1959).

3.2.5. Postupak održavanja kulture ćelija

Kultura ćelija se održava kao monosloj u odgovarajućoj hranljivoj podlozi. Kultura ćelija se gaji u inkubatoru na temperaturi 37 °C, u atmosferi vazduha sa 5 % CO₂, zasićenog vodenom parom. Za gajenje ćelija korišćeni su polietilenski sudovi, zapremine od 50 – 450 ml, odnosno površine dna 25-225 cm². Održavanje ćelija u monosloju postignuto je presejavanjem ćelija u svežu podlogu, tj. „pasažiranjem“, svakih 4-5 dana.

Pasažiranje ćelija je obavljano u sterilnoj komori, uz korišćenje sterilnih laboratorijskih sudova i nošenje zaštitne laboratorijske opreme. Pasažiranje se vrši kada ćelije potpuno prekriju dno suda, ili kada se istroše nutrijenti podloge, na šta ukazuje indikator promene pH podloge (Biochemical and reagents for life science research, 1997).

3.2.6. Postupak pasažiranja kultura ćelija

Kada je dno suda potpuno prekriveno monoslojem ćelija ili kada su nutritivne materije iz podloge potpuno potrošene, na šta može da nam ukaže boja podloge, podloga se odliva iz falkona. Dno falkona na kome su zalepljene ćelije (V = 50 ml) je isprano sa 3 ml 0,25 % rastvora tripsina zagrejanog do 37 °C u vodenom kupatilu. Zatim se naliže 5 ml 0,25 % rastvora tripsina i inkubira na 37 °C, 1-5 minuta. Promena morfologije ćelija je praćena pod svetlosnim mikroskopom, na uveličanju 20/0,40 (50 puta). Kada su ćelije počele da se zaokrugljuju, sadržaj iz bočice je špricom prenesen u epruvetu u kojoj se već nalazi 2 ml hranljive podloge. Antitripsin prisutan u podlozi neutrališe dalje dejstvo tripsina na prenete ćelije. Ćelije stoje još 3-5 minuta u termostatu na 37 °C i resuspenduju se u toj podlozi pomoću šprica. Jedna zapremina suspenzije ćelija je vraćena u sud za gajenje ćelija, dopunjena svežom podlogom do zapremine V = 15 ml i sud je vraćen u inkubator na 37 °C. Preostala suspenzija ćelija je korišćena za eksperimente *in vitro* (Biochemical and reagents for life science research, 1997).

3.3. Postupak ispitivanja antiproliferativnog potencijala platinskih kompleksa

3.3.1. Postupak određivanja viabilnosti ćelija

Analiza ponašanja ćelija *in vitro* zasniva se na razumevanju procesa rasta i proliferacije, što podrazumeva i pravilno određivanje broja ćelija (Biochemical and reagents for life science research, 1997). Procena rasta kulture ćelija može se vršiti osmatranjem ćelija pod svetlosnim mikroskopom, ali kvantitativni eksperimenti na ćelijama zahtevaju određivanje tačnog broja ćelija na kojima se vrši eksperiment. Koncentracija ćelija u suspenziji može biti određena korišćenjem hemocitometra – optički ravna komora za posmatranje ćelija pod mikroskopom. Ćelije se broje unutar obeleženih zona na komori, a broj ćelija po mililitru suspenzije, hranljivog medijuma, određuje se na osnovu formule.

Viabilnost se definiše kao broj živih ćelija u ukupno 100 izabranih ćelija. Viabilnost ćelija u ovom radu je određena metodom bojenja sa tripan-plavim (eng. tripan blue) i zasniva se na osobini živih ćelija da izbacuju boju tripan-plavo i ostaju bezbojne, dok mrtve ćelije akumuliraju boju i postaju plavo obojene (Biochemical and reagents for life science research, 1997).

Rastvori:

1. Rastvor 1: 0,2 % rastvor boje tripan-plavo u destilovanoj vodi
2. Rastvor 2: rastvor 1 razblažen 5x u 4,5 % rastvoru NaCl (0,04 % rastvor boje tripan plavo)

Aparati:

1. Svetlosni mikroskop (Carl Zeiss)
2. Vorteks (Heidolph, REAX 2000)
3. Komorica za brojanje ćelija (Neubauer, Fife Depth Profounder; 0,100 mm; 0,0025 mm²)

U 50 µl suspenzije ćelija u hranljivoj podlozi, dodato je 450 µl rastvora boje tripan-plavo (Rastvor 2), tako da je finalna koncentracija boje 0,004 %. Obojena suspenzija ćelija je dobro promešana na vorteksu i 50 µl ove suspenzije je preneseno automatskom pipetom na komoru za bojenje (Neubauer).

Prosečan broj živih ćelija po polju komore, određen je brojanjem ćelija pod mikroskopom na uveličanju 20/0,4. Svako polje na komori za brojanje zauzima zapreminu od 10^{-4} cm³. Kako 1 cm³ odgovara zapremini od 1 ml, broj ćelija po mililitru početne suspenzije ćelija u hranljivoj podlozi je dobijen po formuli:

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

N_s =prosečan broj ćelija po polju komore

R =faktor razblaženja ćelija u rastvoru za bojenje (u ovom slučaju iznosi 10).

3.3.2. Postupak ispitivanja antiproliferativnog potencijala *trans*-kompleksa platine(II) i platine(IV) MTT i SRB testovima

Antiproliferativni potencijal ispitivanih kompleksa *trans*-platine(II) i *trans*-platine(IV), kao i cisplatine, utvrđen je kolorimetrijskim SBR i MTT testovima, na ukupno 9 ćelijskih linija, koje su pomenute ranije (Poglavlje 3.2.) (Skehan et al., 1990; Supino et al., 1995). U testovima su korišćeni 30 mM štokovi kompleksa 1 i 2 u DMSO, odnosno 10 mM štokovi kompleksa 3 i 4 u DMSO. Ispitivani kompleksi su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2. Ispitivani kompleksi.

1	<i>trans</i> -[PtCl ₂ (3-acetilpiridin) ₂]
2	<i>trans</i> -[PtCl ₂ (4-acetilpiridin) ₂]
3	<i>trans</i> -[Pt(3-acetilpiridin) ₂ Cl ₄]
4	<i>trans</i> -[Pt(4-acetilpiridin) ₂ Cl ₄]
CDDP	<i>cis</i> -[Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂]

3.3.2.1. Postupak određivanja preživljavanja ćelija MTT testom

MTT test je kolorimetrijski test kojim se određuje sposobnost živih ćelija da konvertuju tetrazolijum so (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid (MTT), žute boje, u formazanski precipitat tamno crvene boje (Monks, 1991; Supino et al., 1995). MTT u ćeliji zapravo preuzima ulogu koenzima, odnosno elektron akceptora u oksidoredukcionim reakcijama koje katalizuje enzim (na putu razgradnje glukoze) ciklusa glikolize sukcinat-dehidrogenaza. Tako se reakcija redukcije MTT odvija samo u metabolički aktivnim ćelijama. Nastali formazan apsorbuje u vidljivom delu spektra sa maksimumom apsorpcije oko 570 nm.

Reagensi:

1. Dimetil-sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis)
2. (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid (MTT) rastvor (5 mg MTT/ml u fosfatnom puferu)
3. Natrijum-dodecil-sulfat 10 % (SDS) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis)

Aparati:

1. Inkubator (Flow Laboratories, CO₂ inkubator 220)
2. Centrifuga (BOECO U-32, Germany)
3. Vorteks (Heidolph, REAX 2000)
4. Analitička vaga (Mettler H43)
5. Inkubator na 37 °C (Sutjeska, Beograd)
6. ELISA čitač (Microplate reader, Behring EL 311)
7. Svetlosni mikroskop (Carl Zeiss)
8. Sterilna komora (Klimaoprema, Samobor)

3.3.2.1.1. Konstrukcija kalibracione krive za MTT

Polazeći od suspenzije ćelija (za svaku ispitivanu ćelijsku liniju) u hranljivoj podlozi (10^6 /ml), formirana je serija razblaženja ove suspenzije, tako da broj ćelija/ml bude redom: 12500, 25000, 50000, 100000, 200000, 400000. U središnje bunarčiće plastične ploče (eng. cell culture plate, NUNC) sa 96 bunarčića sa ravnim dnom,

zasejano je 100 μ l pripremljenog razblaženja. U preostale bunarčiče ploče sipana je samo hranljiva podloga po 100 μ l, kao slepa proba.

Na ovaj način zasejane su dve ploče i ostavljene u inkubatoru na 37 °C, u atmosferi vazduha zasićenog parom, sa 5 % CO₂. U jednu ploču je nakon 4 h sipano u svaki bunarčić po 20 μ l MTT rastvora (5 mg MTT/ml u fiziološkom rastvoru). Nakon 4 h inkubacije dodato je 100 μ l rastvora (10 % SDS). Nakon 24 h izmerena je absorbanca na 570 nm na ELISA čitaču. Na drugu ploču je nakon 20 h inkubacije sipano u svaki bunarčić po 20 μ l MTT rastvora (5 mg MTT/ml u fiziološkom rastvoru). Nakon 4 h inkubacije dodato je 100 μ l rastvora 10 % SDS. Nakon 24 h izmerena je absorbanca na 570 nm na ELISA čitaču. Na osnovu dobijenih absorbanca formiran je grafik zavisnosti apsorbancije MTT reagensa u funkciji broja ćelija, za vreme inkubacije ćelija t=0 h (T0) i t=20 h (T20).

3.3.2.1.2. Postupak određivanja preživljavanja ćelija MTT testom

U središnje bunarčiče plastične ploče sa 96 bunarčića sa ravnim dnom, zasejano je 2000 ćelija/bunarčiću u 100 μ l hranljive podloge (za HeLa) ili 3000 ćelija/bunarčiću u 100 μ l hranljive podloge (MDA-MB-453, B16), 4000 ćelija/bunarčiću (FemX), 5000 ćelija/bunarčiću (EA.hy 926, MRC-5), 7000 ćelija/bunarčiću (LS-174, A549, MS1). Sve je rađeno u triplikatu, tj. na tri bunarčića ćelija ostavljena su tri bunarčića u koje je sipana samo hranljiva podloga (slepa proba). Ćelije su gajene 24 h u inkubatoru na 37°C, u atmosferi vazduha zasićenog parom, sa 5 % CO₂.

Neposredno pre dodatka pojedinačnog kompleksa za svaki ispitivani kompleks napravljeni su štokovi u DMSO, zbog njihove slabe rastvorljivosti u fiziološkom rastvoru. Merenja su vršena na analitičkoj vagi sa tačnošću merenja na 4 decimale. Napravljeni su 30 mM štokovi kompleksa 1 i 2 u DMSO, odnosno 10 mM štokovi kompleksa 3 i 4 u DMSO. Za svaki kompleks je polazeći od štoka ispitivanog kompleksa, formirana serija razblaženja u odgovarajućoj hranljivoj podlozi. Nakon 24 h od zasejavanja ćelija u bunarčiče, pošto su se ćelija zalepile za dno suda, u bunarčiče sa ćelijama, kao i u bunarčiče samo sa podlogom (slepa proba), sipano je u triplikatu 50 μ l svakog razblaženja ispitivanog kompleksa. Razblaženja kompleksa u odgovarajućoj

podlozi su formirana tako da finalne koncentracije kompleksa u bunarčiću ploče budu redom: 6,25; 12,5; 25; 50; 100 μ M ili 18,75; 37,5; 75; 150; 300 μ M, u zavisnosti od kompleksa koji je ispitivan (tako da procenat DMSO po bunarčiću ne bude veći od 1 %).

Ćelije se zatim inkubiraju sa ispitivanim agensima u inkubatoru sa 5 % CO₂ na 37 °C, tokom 48 h. Nakon inkubacije 20 μ l MTT rastvora (5 mg MTT/ml u fiziološkom rastvoru) je dodato u svaki bunarčić. Nakon 4 h dodato je 100 μ l rastvora 10 % SDS, a nakon 24 h očitana je absorbanca na 570 nm.

3.3.2.1.3. Obrada podataka

Izračunavanja parametara koji karakterišu intenzitet citotoksičnog, odnosno citostatičkog dejstva ispitivanog agensa urađena su prema Monksu (Monks et al, 1991). Sa kalibracione krive za MTT je određeno u kom opsegu broja ćelija postoji linearna zavisnost absorbance na 570 nm od broja zasejanih ćelija po bunarčiću. Kasniji eksperimenti su rađeni u tom opsegu broja ćelija.

Nakon inkubacije i gajenja ćelija sa različitim koncentracijama ispitivanog agensa i nakon tretmana bojom MTT i rastvaranjem formazana, određena je absorbanca uzoraka. Ako je A_k srednja vrednost absorbance uzoraka ćelija gajenih u hranljivoj podlozi, A srednja vrednost absorbance uzoraka ćelija gajenih u prisustvu različitih koncentracija ispitivanog agensa, i ako se kao probe koriste absorbance hranljivog medijuma bez ćelija, sa odgovarajućim koncentracijama ispitivanog agensa, tada je:

$$\text{Preživljavanje ćelija (\%)} = \frac{A}{A_k} \times 100$$

Konstruisan je dijagram preživljavanja ćelija (%) = f (koncentracija agensa) i iz navedene krive dobijen je podatak o koncentraciji agensa koji izaziva smanjenje preživljavanja ćelija za 50 % – IC₅₀.

3.3.2.2. Postupak određivanja preživljavanja ćelija SRB testom

Citotoksičnost ispitivanih kompleksa određivali smo i korišćenjem SRB testa. Sulforodamin B (SRB) spada u grupu proteinskih boja, odnosno vezuje se za pozitivno naelektrisane proteinske ostatke. Princip na kome se zasniva izvođenje ovog eseja jeste osobina ćelija da se na samom početku procesa programiranog umiranja (apoptoze) odlepljuju od podloge posude i ostaju u suspenziji iznad monosloja koji formiraju vitalne ćelije. Nakon procesa sađenja i tretiranja ćelija u pločama sa 96 bunarića (kao i za MTT test), vrše se procesi fiksacije, bojenja i očitavanja apsorbanci, nakon čega se kontruišu krive preživljavanja za svako od ispitivanih jedinjenja.

3.3.2.2.1. Fiksacija

Da bi se izvršila selekcija između zdravih ćelija i ćelija u apoptozi pre nanošenja boje (SRB) izvodi se fiksacija trihlorsirćetnom kiselinom (TCA). Svrha procesa fiksacije jeste trajno „lepljenje“ ćelija iz monolejera za podlogu bunarčića, dok se ćelije u suspenziji (apoptoza) tokom postupka ispiranja odstranjuju. TCA se rastvara u vodi do odgovarajuće koncentracije, tako da finalna koncentracija u bunarčiću mikrotitar ploče bude 10 %. Po nanošenju TCA, mikrotitar ploča se inkubira na +4 °C narednih sat vremena. Ispiranjem mikrotitar ploče vodom odstranjuju se TCA i ćelije u procesu apoptoze. Ploča se zatim suši na sobnoj temperaturi. Ovako obrađene ćelije predstavljaju trajan preparat.

3.3.2.2.2. Bojenje

SRB je prah sivomaslinaste boje, izrazito hidrofilan i fotosenzitivan. Čuva se na sobnoj temperaturi, zaštićen od vlage i svetlosti. SRB se rastvara u 1 % sirćetnoj kiselini i kao 4 % rastvor se nanosi na prethodno fiksirane ćelije u mikrotitar ploči. Inkubacija sa bojom traje najmanje pola sata na sobnoj temperaturi. Svako dalje produžavanje vremena inkubacije nema uticaja na količinu vezane boje. Mikrotitar ploča se potom

ispira sa 1 % sirćetnom kiselinom. Postupak sušenja je isti kao i u postupku fiksiranja. Ovako obojene ćelije nisu trajan preparat, obzirom da se boja razgrađuje stajanjem, naročito ako se pri tom izlaže svetlosti.

3.3.2.2.3. Rastvaranje i čitanje

Kako SRB predstavlja kolorimetrijski esej, očitana absorbanca nalazi se u direktnoj proporciji sa količinom vezane boje tj. sa brojem vitalnih ćelija po bunarčiću mikrotitar ploče. Kao rastvarač koristi se 10 mM vodeni rastvor Tris baze (pH > 10). Rastvarač se sipa u zapremini od 100 µl po bunarčiću. Iako je rastvaranje gotovo trenutno, ploču je potrebno ostaviti 15-20 minuta na sobnoj temperaturi da bi se boja što bolje homogenizovala. Intenzitet boje (absorbanca), očitava se na ELISA čitaču (Thermo Labsystems Multiskan EX 200-240V, Ascent Software Version 2.6), pri talasnoj dužini od 570 nm. Na osnovu dobijenih absorbanci, konstruiše se dijagram preživljavanja i iz navedene krive dobijen je podatak o koncentraciji agensa koji izaziva smanjenje preživljavanja ćelija za 50 % – IC₅₀ vrednost.

3.4. Analiza promena distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa pod dejstvom ispitivanih kompleksa metodom na protočnom citometru

Analiza ćelijskog ciklusa nakon inkubacije ćelija sa ispitivanim kompleksima, vršena je na protočnom citometru (Becton Dickinson, CA, SAD) nakon bojenja tretiranih ćelija propidijum-jodidom (eng. Propidium-Iodide, PI) (Ormerod, 1944; Yount et al., 1998). Metoda se zasniva na određivanju sadržaja DNK po ćeliji, a koji je u funkciji faze ćelijskog ciklusa u kome se ćelija nalazi.

Rastvori:

- Rastvor RNaze A (1 mg/ml)
- Rastvor propidijum-jodida (400 µg/ml)

Ćelije (EA.hy 926 i HeLa) u ekponencijalnoj fazi rasta izložene su dejstvu ispitivanih kompleksa rastvorenih u odgovarajućoj podlozi, u koncentracijama IC₅₀ i

1,5xIC₅₀ u slučaju HeLa (1, 2, CDDP), odnosno IC₅₀ u slučaju EA.hy 926 ćelija (1, 2, 3, 4, CDDP). Nakon inkubacije u trajanju od 24 h sa ispitivanim kompleksima ćelije su isprane u fosfatnom puferu (PBS, pH 7,2) dva puta, nakon čega su resuspendovane u 200 µl PBS-a. U suspenziju je dodato 2 ml ledenog 70 % etanola, uz blago vorteksovanje. Ćelije su inkubirane u etanolu na ledu, minimum 30 minuta. Nakon fiksacije u etanolu, ćelije su taložene centrifugiranjem na 2000 rpm/10 min. Supernatant je odliven, a talog resuspendovan u 800 µl PBS. Suspenzija je inkubirana sa 100 µl rastvora RNaze A koncentracije 1 mg/ml, na 37 °C, 30 minuta.

Nakon tretmana Rnazom A, uzorcima je dodato 100 µl rastvora PI (100 µg/ml) i ćelije su odmah analizirane na protočnom citometru. Analiza sadržaja DNK i ćelijskog ciklusa je vršena na FASC (eng. Fluorescence Activated Sorting Cells) Calibur Becton Dickinson protočnom citometru, korišćenjem lasera argona sa λ ekscitacije na 488 nm. DNK histogram je analiziran korišćenjem kompjuterskog softvera Cell Quest Pro.

3.5. Analiza apoptoze bojenjem aneksin V-FITC i propidijum-jodidom na protočnom citometru

Apoptoza je forma programirane ćelijske smrti koju karakterišu razne morfološke promene, uključujući promene u ćelijskoj membrani kao što je gubitak asimetrije membrane, skupljanje ćelije, kondenzacija hromatina i internukleozomalno sečenje DNK. Promene na plazminoj membrani su jedne od ranih promena na ćelijama koje podležu apoptozi. Jedna od prvih karakteristika je translokacija membranskog fosfolipida fosfatidil-serina (eng. Phosphatidylserine, PS), sa unutrašnje strane membrane na spoljašnju. Aneksin-V je 35-36 kDa Ca²⁺-zavisan fosfolipid-vezujući protein koji ima visoki afinitet za PS. Aneksin-V može biti vezan za fluorohrome kao što je fluorescein-izotiocijanat (eng. Fluorescein Isothiocyanate, FITC). U toj formi aneksin V-FITC može poslužiti za analizu apoptoze na protočnom citometru.

Aneksin V-FITC se koristi u testu u kombinaciji sa propidijum-jodidom koji boji samo nežive ćelije. S obzirom na to da se tokom ovog eseja ispituju ćelije koje nisu prethodno fiksirane, PI će obeležiti samo one kojima je oštećena membrana, a to su ćelije u ranoj nekrozi i kasnim fazama apoptoze.

Ovakvo dvokolorno bojenje omogućava razlikovanje:

- živih ćelija (ne vezuju ni aneksin V-FITC ni PI);
- ćelija u ranoj fazi apoptoze (boje se aneksin V-FITC, ali ne i PI);
- ćelije u kasnim fazama apoptoze (boje se i aneksin V-FITC i PI);
- nekrotičnih ćelija (boje se samo PI).

Apoptoza HeLa i EA.hy 926 ćelija tretiranih sa ispitivanim kompleksima i cisplatinom, kao referentnim jedinjenjem, određena je korišćenjem aneksin V-FITC apoptotskog kita (BD Biosciences Cat. No. 65874x, Pharmingen San Diego, CA, USA).

Reagensi:

1. Aneksin V-FITC (puferisan u 50 mM Tris-u pH 8,0 sa 80 mM NaCl, 0,2 % BSA, 1 mM EDTA i 0,09 % NaN₃)
2. Rastvor propidijum-jodida (rastvor propidijum-jodida za bojenje u PBS-u pH 7,4)
3. Pufer za vezivanje aneksina, (10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4), 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂)
4. Fosfatni pufer (PBS), pH 7,2 (Torlak, Beograd)

Aparati:

1. Inkubator (Flow Laboratories, CO₂ inkubator 220)
2. Centrifuga (BOECO U-32, Germany)
3. Vorteks (Heidolph, REAX 2000)
4. Protočni citometar (FASC Calibur Becton Dickinson)

HeLa ćelije tretirane su ispitivanim kompleksima 1, 2, CDDP (IC₅₀) u trajanju 4 i 24 h, a EA.hy 926 kompleksima 1, 2, 3, 4, i CDDP (0,5xIC₅₀) tokom 24 h, a nakon inkubacije su fiksirane, obojene aneksin V-FITC i PI i analizirane na protočnom citometru.

Nakon isteka vremena inkubacije ćelije se pripremaju za analizu na protočnom citometru na sledeći način:

1. Ćelije se isperu dva puta sa hladnim PBS.
2. Isprane ćelije se resuspenduju u puferu za vezivanje aneksina i prebaci se 100 µl rastvora u epruvetu za protočni citometar (zapremine 5 ml).
4. Zatim se doda 5 µl aneksin V-FITC i 5 µl PI.

5. Čelije se blago vorteksiraju i inkubiraju 15 min na sobnoj temperaturi (25 °C) u mraku.
6. Nakon inkubacije u svaku epruvetu se dodaje 400 µl pufera za vezivanje aneksina nakon blagog vorteksiranja pripremljeni rastvor se analizira korišćenjem FASC Calibur Becton Dickinson protočnog citometra i Cell Quest kompjuterskog softvera u toku narednog sata.

Za analizu, tačnije za podešavanje parametara za rad, koriste se tri vrste kontrolnih uzoraka ćelija:

- ćelije koje nisu podvrgnute bojenju,
- ćelije podvrgnute bojenju samo aneksinom i
- ćelije podvrgnute bojenju samo propidijum-jodidom.

3.6. Analiza ukupne unutarćelijske akumulacije i unutarćelijske distribucije platine (u proteinskoj i DNK frakciji) metodom ICP-OES ili ICP-MS

Nivo platine(II) u ukupnoj ćelijskoj frakciji, odnosno proteinskoj i DNK frakciji, određen je korišćenjem ICP-OES (eng. Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry) za HeLa ćelije, i ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) za uzorke EA.hy 926 ćelija. DNK i proteini su izolovani korišćenjem TRI Reagent[®] (Sigma-Aldrich Co) prema proceduri proizvođača i koncentracije su određene sprektrofotometrijski merenjem absorbanci na 260 i 280 nm respektivno (Eppendorf BioPhotometer 6131). Nivo platine je određen u izolovanim DNK i proteinskim frakcijama, nakon što su uzorci pripremljeni za ICP-OES prema standardnoj proceduri, korišćenjem Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, UK), odnosno prema standardnoj proceduri za ICP-MS korišćenjem aparata Thermo Scientific iCAP Qc ICP-MS (Thermo Scientific, Bremen, Germany) (Heitland et al., 2006).

3.6.1. Priprema uzoraka

6×10^6 ćelija (HeLa, EA.hy 926) je zasađeno, a nakon 24 h kada su se stabilizovale, tretirane su sa ispitivanim kompleksima 6 i 24 h u koncentracijama jednakim $0,5 \times IC_{50}$ vrednostima. HeLa ćelije su tretirane kompleksima 1 i 2, a EA.hy 926 su tretirane kompleksima 1, 2, 3 i 4. U oba slučaja imali smo i kontrolne netretirane ćelije, kao i ćelije tretirane cisplatinom, koja je korišćena kao referentno jedinjenje. Nakon tretmana ćelije su isprane ledeno hladnim PBS i sakupljene guljenjem. Nakon centrifugiranja na 2000 rpm, 10 minuta, na 4 °C, talog ćelija je zamrznut na -80 °C.

3.6.2. Razdvajanje faza

DNK i proteini su izolovani korišćenjem TRI Reagent[®] (Sigma-Aldrich Co.) prema proceduri proizvođača. Na $5-10 \times 10^6$ ćelija dodali smo 1 ml TRI reagenta i lizirali ih mehanički pipetiranjem. Uzorke smo ostavili 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim smo dodali po 0,2 ml hloroforma na 1 ml početnog reagenta. Ependorfica se izmućka nekoliko puta. Nakon stajanja 7 minuta na sobnoj temperaturi uzorci su centrifugirani 15 minuta na 11000 rpm na 4 °C. Centrifugiranjem se dobijaju tri faze, donja – organska u kojoj se nalaze proteini, interfaza – u kojoj je DNK, i gornja – vodena faza u kojoj je RNK.

3.6.3. Izolovanje RNK

Prebacili smo vodenu fazu u novu ependorficu, dodali 0,5 ml izopropanola (na 1 ml početnog TRI reagenta) i izmućkali. Ostavili smo uzorke 5-10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja 10 minuta na 11000 rpm osušili smo talog RNK na vazduhu. Nakon sušenja od 30 minuta, talog je rastvoren u 50 μ l ampulirane vode i čuvan u zamrzivaču na -80 °C. Talog RNK dobijen iz HeLa ćelija je je sačuvan za qRT-PCR analizu iRNK nivoa ERCC1, MMP-2, MMP-9, dok je u slučaju EA.hy 926 analizirana ekspresija MMP-2 gena.

3.6.4. Izolovanje DNK

Na interfazu u kojoj je DNK dodali smo 0,3 ml 100 % etanola, promućkali i ostavili 2-3 min na sobnoj temperaturi. Uzorci su centrifugirani na 4500 rpm 5 minuta na 2-8 °C. Supernatant sačuvan za izolovanje proteina na 2-8 °C u frižideru. DNK talog je resuspendovan u 75 % etanolu i ostavljen da stoji 20-30 minuta na sobnoj temperaturi.

3.6.5. Izolovanje proteina

Proteini su precipitirani iz fenol-etanolskog supernatanta (izolovanje DNK) sa 1,5 ml izopropanola. Uzorci su stajali 10 minuta na sobnoj temperaturi. Centrifugirani su 10 minuta na 11000 rpm i 2-8 °C. Talog proteina smo rastvorili u 1 % SDS.

Koncentracije DNK i proteina su određene spektrofotometrijski merenjem absorbanci na 260 i 280 nm, respektivno (Eppendorf BioPhotometer 6131).

Nivo platine je određen u izolovanim DNK i proteinskim frakcijama, nakon što su uzorci pripremljeni za ICP-OES/ICP-MS prema standardnoj proceduri korišćenjem Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, UK), odnosno Thermo Scientific iCAP Qc ICP-MS (Thermo Scientific, Bremen, Germany).

3.6.6. Priprema ćelijskog taloga

Nakon tretmana, EA.hy 926 ćelije su pokupljene i spremljene za brojanje, jer je bitno odrediti koliko ćelija ima u svakom od uzoraka. Zatim se ćelije isprane u PBS i centrifugirane na 2000 rpm, 10 minuta, na 4 °C, nakon čega je talog ćelija je zamrznut na -80 °C. Nivo platine je određen u ukupnom ćelijskom talogu, nakon što su uzorci pripremljeni za ICP-MS prema standardnoj proceduri korišćenjem Thermo Scientific iCAP Qc ICP-MS (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Rezultati su izraženi prema broju ćelija u svakom od uzoraka.

3.7. Želatinska zimografija

Želatinska zimografija je jednostavna i visoko osetljiva metoda, koja omogućava relativno specifičnu detekciju matriksnih metaloproteinaza, tačnije jedne grupe želatinaza (MMP-9 i MMP-2), i njihov status aktivnosti u biološkim uzorcima.

Metoda se zasniva na sposobnosti želatinaza da razlažu želatin. Uzorci koji sadrže MMP su podvrgnuti razdvajanju proteina natrijum-dodecil-sulfat-poliakrilamidnom gel elektroforezom (eng. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) u gelu koji sadrži ko-polimerizovan supstrat za proteaze kao što je želatin (0,1 %). Nakon razdvajanja u gelu, proteaze se renaturišu i hidrolizuju supstrat u gelu. Prisustvo i relativna aktivnost MMP u uzorku se tako određuje usled smanjenja bojenja sa komazi plavim (eng. Coomassie Brilliant Blue, CBB) razloženog želatina na mestima aktivnosti MMP.

Reagensi:

1. Želatin (1 mg/ml)

Želatin5 mg

Dodati 2,5 ml destilovane vode na 5 mg želatina i kuvati na 70 °C nekoliko minuta. Nakon toga dodati još 2,5 ml hladne vode da bi se želatin ohladio.

2. Akrilamid/bisakrilamid

Akrilamid..... 29,2 g

Bisakrilamid.....0,8 g

Dopuniti do 100 ml destilovanom vodom.

3. Akrilamidni gel za razdvajanje 10 %

Akrilamid/bisakrilamid3,3 ml

1,875 M Tris-HCl (pH 8,8).....2 ml

SDS 10 %..... 0,1 ml

Želatin (1 mg/ml).....1 ml

TEMED (N,N,N,N-tetrametil-etilendiamin)..... 50 µl

Dopuniti do 10 ml destilovanom vodom i dodati 200 µl 10 % APS (amonijum-persulfat).

4. Akrilamid gel za koncentrovanje 4 %

Akrilamid/bisakrilamid.....1,5 ml

1,25 M Tris-HCl, pH 6,8.....	1 ml
SDS 10%.....	100 µl
TEMED.....	15 µl

Dopuniti do 10 ml destilovanom vodom i dodati 200 µl 10% APS (amonijum persulfat).

5. Pufer za uзорak (PUZ)

1,25 M Tris-HCl, pH 6,8.....	500 µl (0,125 M)
100 % glicerol.....	1 ml (20%)
SDS 10 %.....	1 ml (2%)
1 % Brom-fenol plavo.....	1,25 ml (0,25 %)
Destilovana voda.....	1,25 ml

6. Renaturišući pufer (10X) 25 %

Triton X-100	62,5 ml
--------------------	---------

Dopuniti destilovanom vodom do 250 ml.

7. Pufer za razvijanje (10X)

Tris-baza.....	12,1 g (50 mM)
Tris-HCl.....	63,0 g (50 mM)
NaCl	117 g (0,2 M)
CaCl ₂	7,4 g(5 mM)
NaN ₃	0,5 % (0,05 %)
Destilovana voda do.....	100 ml

8. Pufer za bojenje

Coomassie Brilliant Blue G-250.....	0,5 g
Metanol.....	25 ml
Sirćetna kiselina.....	10 ml
Destilovana voda.....	65 ml

Odnos metanol:sirćetna kiselina: destilovana voda = 2,5:1:6,5

9. Obezbojivač

Metanol.....	4 ml (4 %)
96 % Sirćetna kiselina.....	8,3 ml (8 %)
Destilovana voda.....	do 100 ml

Aparati:

1. Analitička vaga (Mettler H43)

2. Inkubator na 37 °C (Sutjeska, Beograd)
3. Aparat za elektroforezu (Mini-Protean 3 Cell, BIO RAD)
4. Platforma za mućkanje (Ultra Rocker, BIO RAD)
5. Power supply (Power Pac HC TM, BIO RAD)
6. Densitometar (GS-710 Calibrated Imaging Densitometer, BIO RAD)

Kolagenolitička aktivnost netretiranih i tretiranih HeLa i EA.hy 926 ćelija je analizirana i identifikovana želatin zimografijom na 10 % natrijum-dodecil-sulfat-poliakrilamidnom gelu sa 0,1 % želatina.

2×10^6 ćelija/uzorku su tretirane štok rastvorima 1, 2, 3, 4 i CDDP u slučaju EA.hy 926 ćelija, odnosno 1, 2 i CDDP u slučaju HeLa ćelija, u koncentracijama jednakim $0,5 \times IC_{50}$ vrednostima. Ćelije su tretirane sa ispitivanim kompleksima 6 h u medijumu bez FCS, kontrola su bile netretirane ćelije. Uzorci supernatanta (medijuma u koji su ćelije ispustile matriksne metaloproteinaze) i lizirane ćelije (pufer za liziranje: 37,5 mM Tris-HCl pH 7,5; 75 mM NaCl i 0,5 % Triton X-100) su pomešani sa puferom za nalivanje (za uzorak) i podvrgnuti elektroforezi (20 μ l po bunarčiću). Posle elektroforeze na 125 V gelovi su isprani 3 puta po 20 minuta u renaturišućem puferu, a zatim inkubirani 48 h na 37 °C u puferu za razvijanje (pufer za razvijanje traka enzimske aktivnosti). Nakon inkubacije gelovi su bojeni sa 0,05 % CBB G-250 bojom u smesi metanola:sirćetne kiseline:vode (2,5:1:6,5) i obezbojeni u 4 % metanolu sa 8 % sirćetne kiseline. Za bolju senzitivnost gelovi su dalje obezbojeni u rastvoru 1 % Triton X-100 u trajanju 1-2 h (Chintala et al., 1997; Fernandez-Patron et al., 2002). Sposobnost matriksnih metaloproteinaza da razlože želatin je detektovana kao svetle trake nasuprot tamne pozadine gela obojenog bojom.

3.8. Analiza uticaja ispitivanih kompleksa na migraciju tumorskih ćelija *in vitro* („Scratch assay“)

Aktivno kretanje tumorskih ćelija, u kombinaciji sa proteolizom, je neophodno za prolazak kroz epitelijsku laminu i intestinalnu stromu tokom invazivnosti karcinoma.

Tumorske ćelije takođe pokazuju usmereno kretanje tokom ulaska i izlaska iz krvnih sudova.

In vitro „scratch“ test je jednostavan, ekonomičan i dobro razvijen test za analizu migracije ćelija (Liang et al., 2007). Test podrazumeva stvaranje ogrebotine ili proreza u monosloju ćelija, zatim fotografisanje na početku i u regularnim intervalima tokom migracije ćelija do zatvaranja proreza i na kraju poređenje fotografija. Jedna od glavnih prednosti ovog testa je da imitira do izvesnog nivoa migraciju ćelija *in vivo*.

In vitro „scratch“ test nam je poslužio za ispitivanje inhibicije migracije EA.hy 926 ćelija pod uticajem ispitivanih kompleksa.

4×10^5 EA.hy 926 ćelija je zasađeno po bunaru u plastičnoj ploči za ćelijske kulture sa 6 bunarčića (eng. 6-well plate) i gajeno 24 h, nakon čega je sterilnim nastavkom za pipete (p200) napravljen prorez. Ćelije koje su se odlepile guljenjem su blago isprane u PBS i napravljene su početne slike na Olympus digitalnom fotoaparatu povezanom sa invertnim mikroskopom (Carl Zeiss, Jena, Germany, objective 6.3/0.20). Ćelije su dalje inkubirane 24 h i 48 h u svežem medijumu – za kontrolu, odnosno u slučaju tretmana ispitivanim kompleksima (1, 2, 3, 4, CDDP) u koncentracijama koje su subtoksične, a u ovom slučaju jednake $0,1 \times IC_{50}$ i $0,3 \times IC_{50}$. Napravljene su fotografije nakon 24 i 48 h kako bi kvalitativno odredili uticaj ispitivanih kompleksa na migraciju ćelija. Fotografije inicijalog proreza na monosoju ćelija su upoređene sa odgovarajućim fotografijama netretiranih (kontrolnih) i tretiranih ćelija.

3.9. Uticaj ispitivanih kompleksa platine na angiogenezu *in vitro* („Tube formation assay“)

Angiogeneza uključuje proliferaciju endotelijalnih ćelija, migraciju i formiranje novih krvnih sudova. Uticaj ispitivanih kompleksa na angiogenezu *in vitro* je analiziran korišćenjem „Tube formation assay“ kod endotelijalnih ćelija MS1 ili EA.hy 926.

MS1 i EA.hy 926 ćelije kada se zasade na gel koji sadrži epiteljske lamine, počinju da se reorganizuju i izdužuju, stvarajući produžetke kojima formiraju kontakte ćelija-ćelija i strukture nalik poligonu (nalik tubulama, krvnim sudovima) (Aranda et al., 2009). U navedenom eksperimentu endotelijalne ćelije su tretirane sub-toksičnim

koncentracijama ispitivanih kompleksa platine i cisplatine, kako bi se odredili njihovi potencijali da smanjuju sposobnost ovih ćelija da se izdužuju i diferenciraju u strukture nalik tubulama.

Reagensi:

- Rastvor za 5 ml gela:
 - 1 ml DMEM bez NaHCO_3
 - 0,5 ml FCS
 - 0,5 ml NaHCO_3 (0,26 mol/l)
 - 0,02 ml NaOH (1 mol/l)
 - 0,1 ml H_2O
- Kolagen (3,5 mg/ml) – kolagen je izolovan iz mišjeg repa i poklon je Instituta za medicinska istraživanja u Beogradu

Ploča za ćelijske kulture sa 24 bunarčića presvučena je gelom. Gel je napravljen tako što je rastvoru koji sadrži 1 ml DMEM podloge bez NaHCO_3 ; 0,5 ml FCS; 0,5 ml NaHCO_3 (0,26 mol/l); 0,02 ml NaOH (1 mol/l) i 0,1 ml H_2O dodato 2 ml kolagena (3,5 mg/ml), a zatim je rastvor nežno promešan i dodato je još 0,88 ml DMEM pa naliveno 0,5 ml gela po bunarčiću. Gel je ostavljen 30 minuta u inkubatoru na 37 °C da očvrstne. Endotelne ćelije su zasađene u gustini 1×10^5 ćelija (MS1), odnosno 7×10^4 (EA.hy 926) i nakon 2 sata kada su se stabilizovale dodati su tretmani kompleksa 1, 2, CDDP (MS1), odnosno 1, 2, 3, 4, CDDP (EA.hy 926) u koncentracijama jednakim $0,03 \times \text{IC}_{50}$. Formiranje tubula je posmatrano periodično pod mikroskopom i urađene su reprezentativne fotografije nakon 24 h inkubacije na Olympus digitalnom aparatu povezanom sa invertnim mikroskopom (Carl Zeiss, Jena, Germany, objective 6.2/0.20).

Angiogeneza je analizirana i korišćenjem matrigela, koji predstavlja komercijalizovanu želatinoznu smešu proteina dobijenu iz tumora miša, koja ima osobine ECM. U slučaju kada se koristi matrigel, ćelije se sade na matrigel koji se nalije u plejt sa 24 bunarčića, umesto na gel koji se pravi od kolagena. Dalja procedura je ista, ali je na matrigel sađeno 4×10^4 EA.hy 926 ćelija po bunarčiću i korišćeni su kompleksi 1, 2, 3, 4, CDDP u koncentracijama jednakim $0,03 \times \text{IC}_{50}$ i $0,06 \times \text{IC}_{50}$.

3.10. Određivanje efekta kompleksa na ekspresiju MMP-2, MMP-9 i ERCC1 na nivou iRNK korišćenjem kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu („Quantitative Real-Time PCR“ - qRT-PCR)

Konstitutivno povećana ekspresija MMP se često uočava kod malignih tumora. Aktivnost MMP je regulisana na nivou transkripcije, translacije i sekrecije. MMP su inhibirane od strane specifičnih tkivnih inhibitora (TIMP) i helatora metala (Kato et al., 2002). Kod kancera cerviksa je uočena veza između iRNK nivoa ekspresije MMP-2 i invazivne sposobnosti ćelija. Sličan odnos kod MMP-9 iRNK nije uočen (Kato et al., 2002). Da bismo utvrdili da li kompleksi imaju uticaja na ekspresiju MMP-2 i MMP-9 na nivou iRNK i kako to utiče na aktivnost MMP, koristili smo metodu kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (eng. Quantitative Real-Time PCR, qRT-PCR). Ispitan je uticaj kompleksa 1, 2, i CDDP na nivo MMP-2 i MMP-9 nakon 6 h tretmana na HeLa ćelijama, kao i uticaj kompleksa 1, 2, 3, 4, CDDP na nivo MMP-2 i MMP-9 iRNK nakon 6 h tretmana na EA.hy 926 ćelijskoj liniji, a u koncentracijama jednakim $0,5 \times IC_{50}$.

Kidanje DNK je glavna odlika oštećenja DNK uzrokovanih platinom, koju prepoznaje i popravlja grupa proteina NER sistema (eng. Nucleotide Excision Repair). Odgovor ćelije na oštećenja DNK zavisi od prirode oštećenja i uključuje kompleksan sistem proteina koji prepoznaju oštećenje DNK i popravljaju ga. Glavni mehanizmi uključeni u reparaciju oštećenja DNK indukovanih cisplatinom su NER i MMR (Reed, 2005). Kako bismo odredili da li ispitivani kompleksi platine indukuju odgovor ćelije zavisen od DNK reparacije kao rezultat DNK lezija, ispitivali smo nivo ekspresije iRNK ERCC1, i proteinski nivo ekspresije ERCC1, koji može kooperativno biti uključen u odgovor ćelije na DNK vezujuće antikancerske agense. Tretirane su HeLa ćelije, kompleksima 1, 2, CDDP u koncentracijama jednakim $0,5 \times IC_{50}$ tokom 6 h. ERCC1 je važna komponenta NER koji je primarno uključen u reparaciju platina-DNK adukata, a poznato je da može imati ulogu u odgovoru ćelije na druge tipove DNK lezija.

3.10.1. Izolovanje RNK i sinteza cDNK

RNK je izolovana iz ćelija, nakon tretmana sa ispitivanim kompleksima korišćenjem TRI Reagent® (Sigma-Adrich Co) prema proceduri proizvođača koja je detaljno objašnjena u poglavlju 3.6. Ukupna RNK svakog uzorka je kvantifikovana spektrofotometrijski (Eppendorf BioPhotometer) merenjem absorbance na 260 nm. Odnos absorbanci A260/A280 je korišćen za procenu čistoće izolovane RNK. Koncentracija RNK je izražena u µg/µl. Kako bismo utvrdili kvalitet RNK, urađena je gel elektroforeza (Pharmacia Biotech) na 2 % agaroznom gelu sa etidijum bromidom. RNK uzorci su mešani sa ksilen cijanol bojom (0,25 % ksilen cijanol boje u 30 % glicerolu u vodi) i pušteni u 0,5xTBE puferu 50 minuta na 25 mA. RNK trake su vizuelizovane na UV transiluminatoru (Hofer). Kako bismo izveli qRT-PCR sa random prajmerima, 2 µg RNK je upotrebljeno kao templat za reverznu transkriptazu (MultiScribe™ Reverse Transcriptase) (50 U/µl) pri čemu je korišćen kit za reverznu transkripciju cDNK visokog kapaciteta „High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit“ (Applied Biosystems), prema preporuci proizvođača. Reakciona smeša je inkubirana u Mastercycler gradient (Eppendorf).

3.10.2. qRT-PCR

Korišćena je metoda qRT-PCR i eseji Taqman assays, koji uključuju TaqMan® Gene Expression Assays i TaqMan® Gene Expression Master Mix. TaqMan® Gene Expression Assays (Inventoried: part number 4331182, Non-inventoried: part number 4351372) se sastoji od 20X miksa neobebeženih PCR prajmera i TaqMan® MGB proba (FAM™ dye-labeled). Da bi se isključile varijacije koje nastaju, korišćeni su interni „housekeeping“ geni: gliceraldehid-3-fosfatdehidrogenaza (GAPDH) tj. korišćena je TaqMan GAPDH kontrola (Applied Biosystems) i Abl gen (sa flurescentno obebeženom Abl probom i dva para prajmera sa sekvencama TGGAGATAACACTCTAAGCAT za uzvodne i GATGTAGTTGCTTGGGACCCA za nizvodne prajmere). GAPDH je služio kao interna kontrola za HeLa ćelijsku liniju, dok je Abl služio kao interna kontrola za EA.hy 926 liniju. PCR reakcija je izvedena korišćenjem ABI Prism 7700 Sequence

Detection System (Applied Biosystems). Svi prajmeri i probe za GAPDH, Abl, MMP-2, MMP-9 i ERCC1 su Applied Biosystems. Uslovi reakcije su sledeći: inicijalna denaturacija na 95 °C, 10 minuta; 40 ciklusa koji se sastoje od denaturacije (15 sekundi na 95 °C) i ekstenzija (eng. annealing) (1 minut na 60°C) u finalnoj zapremini od 20 µl. Sve reakcije su izvedene u triplicatu i rezultati su zapravo srednje vrednosti. „Non-template“ kontrole su korišćene u svakoj od reakcija.

3.11. Određivanje efekta ispitivanih kompleksa na ekspresiju proteina (Western blot)

Western blot je metoda koja omogućava identifikaciju proteina, koji su prethodno razdvojeni prema veličini, gel elektroforezom specifičnim antitelima. Koristeći Western blot metodu, identifikovan je nivo enzima ERCC1 nakon tretmana ispitivanim kompleksima kod HeLa ćelija (kompleksi 1, 2, CDDP u koncentracijama 0,5xIC₅₀ tokom 6 h tretmana); odnosno, ispitivan je uticaj kompleksa 1, 2, 3, 4 i CDDP u koncentracijama jednakim 0,5xIC₅₀ tokom 6 i 24 h na EA.hy 926 ćelijama, na proteine Bax i kaspaza 3.

Rastvori:

1. Akrilamid/bisakrilamid (30%T/2,67%C)
2. Pufer za gel za razdvajanje (1,5 mol/l Tris HCl pH 8,8)
3. Pufer za gel za koncentrovanje (0,5 mol/l Tris HCl pH 6,8)
4. Rastvor deterdženta natrijum dodecilsulfat (10 % SDS)
5. Inicijator amonijum persulfat (10 % APS)
6. Pufer za uzorak (PUZ)
 - 0,0625 mol/l Tris-HCl (pH 6,8)
 - 2 % SDS
 - 0,002 % Brom fenol plavo (BFP)
 - 5 % β-merkapt etanol (β-ME)
7. Pufer za elektroforezu (pH 8,3)
 - 0,25 mol/l Tris
 - 0,192 mol/l Glicin

- 0,1 % SDS

8. Gel za razdvajanje (10 %)

- A/B (30 % T/2.67% C).....4 ml
- Tris-HCl (1.5 mol/l) pH 8.8.....2,5 ml
- 10 % SDS.....0,1 ml
- TEMED.....6,75 µl
- H₂O.....3,4 ml
- APS.....0,1 ml
Ukupno.....10 ml

Po nalivanju gela preko je naliven pufer. Gel je ostavljen da se stabilizuje 40 minuta.

9. Gel za koncentrovanje (4 %)

- A/B (30 % T/2.67 % C).....1,3 ml
- Tris-HCl (1.5 mol/l) pH 6.8.....2,5 ml
- 10 % SDS.....0,1 ml
- TEMED.....10 µl
- H₂O.....6,1 ml
- APS.....0,1 ml
Ukupno.....10 ml

Gel je ostavljen da se stabilizuje 30 minuta.

10. Pufer za transfer (pH 8,5)

- 25 mM Tris
- 0,2 mol/l glicin
- 20 % MetOH

11. Pufer za blokiranje

- 5 % mleko
- 0,1 % Tween-20
- TBS

12. 20 mmol/l TBS (pH 7,6) (10xTBS)

- Tris..... 24,2g
- NaCl..... 80 g
- H₂O.....do 1000 ml

13. Pufer za ispiranje TBS/T

-TBS

- 0,1 % Tween-20

13. Ponceau S

- 0,1 % Ponceau S

- 1 % sirćetna kiselina

15. Obezbojivač Ponceau S (1 % sirćetna kiselina)

16. Pufer za liziranje ćelija

- 37 mmol/l Tris-HCl

- 75 mmol/l NaCl

- 5 % Triton X-100

- koktel inhibitor proteaza (1:10) (Sigma Aldrich Co.)

HeLa i EA.hy 926 ćelije su tretirane ispitivanim kompleksima platine u navedenim koncentracijama, a kontrola su bile netretirane ćelije, održavane samo u medijumu. Nakon tretmana ćelije su isprane u PBS i ceo ćelijski lizat je pokupljen u puferu za liziranje. Uzorci su čuvani na -20 °C do dalje analize.

Koncentracija proteina u lizatima je određena metodom po M. Bradford (Bradford, 1976). Ćelijski lizat u ekvivalentnim koncentracijama proteina je pomešan sa Lemlijevim puferom i podvrgnut 1 h SDS-PAGE (10 % PAA gel) elektroforezi na 120 V. Nakon elektroforeze urađen je elektroblotting na nitroceluloznu membranu (0,45 µm) (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 1 h na 100 V. Membrana je potom blokirana 1 h sa 5 % mlekom u PBS-u na sobnoj temperaturi i zatim je inkubirana preko noći sa prečišćenim mišjim anti-humanim ERCC1 monoklonskim antitelom (1:500 razblaženje) (BD Biosciences Pharmigen), odnosno kaspaza 3 (Calbiochem) monoklonskim antitelom (1:500), ili Bax antitelom (1:1000) (Calbiochem). Nakon ispiranja membrane sa TBS puferom tri puta, membrana je inkubirana 1 h sa anti-mišjim IgG-peroksidaza konjugovanim sekundarnim atitelom (1:2000 razblaženje) (Sigma Aldrich Co). Nivo specifičnih proteina je detektovan korišćenjem sistema na bazi hemiluminescencije (eng. Enhanced chemiluminescence, ECL) (Amersham Biosciences), praćen autoradiografijom.

3.12. Određivanje koncentracije proteina (Bradfordova metoda)

Metoda se zasniva na vezivanju boje Coomasie Brilliant Blue G-250, pri čemu se maksimum absorbance pomera sa 465 nm (kada proteini nisu prisutni) na 595 nm kada se stvara kompleks protein boja (Bradford, 1976). Meri se porast absorbance na 595 nm. Boja se razvija nakon 2 minuta i stabilna je 1 sat.

Rastvori:

1. Koncentrovana boja, Coomasie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) (5x)

CBB G-250..... 100 mg

95 % EtOH..... 50 ml

H₃PO₄..... 100 ml

Voda.....do 200 ml

Boja se rastvori u etanolu, pa se dodaju redom kiselina i voda do finalne zapremine.

2. Bradfordov reagens (BR) (1x)

Rastvora 1..... 100 ml

Voda.....do 500 ml

Sveže procedeni rastvor je stabilan 2-3 nedelje na sobnoj temperaturi. Prvih nekoliko mililitara rastvora se odbaci.

3. Rastvor goveđeg seruma albumina (eng. Bovine Serum Albumin, BSA) za standardnu krivu (1 mg/ml). Napravili smo seriju razblaženja standardnog rastvora BSA finalnih koncentracija 0,1-1 mg/ml.

Postupak:

1. U kivetu za kalibraciju spektrofotometra sipati 2,5 ml Bradfordovog reagensa.
2. U kivetu sa 2,5 ml Bradfordovog reagensa dodati 50 µl uzorka.
3. Promešati okretanjem.
4. Meriti absorbancu na 595 nm nakon 5 minuta.

3.13. Fluorescentna mikroskopija

Morfološke karakteristike ćelijske smrti EA.hy 926 ćelija, indukovane ispitivanim kompleksima platine, analizirane su na fluorescentnom mikroskopu nakon bojenja tretiranih ćelija akridin-oranžom (AO) i etidijum-bromidom (EtBr) (Banada et al., 1996). Akridin-oranž je DNK-RNK-pseudointerkalirajuća boja koja fluorescira zeleno. Koristi se za uočavanje morfoloških promena na nivou jedra. Akridin-oranž prolazi kroz intaktne membrane ćelija tako da ulazi u ćelije koje su žive ili podležu apoptozi. Etidijum-bromid je DNK-interkalirajuća boja koja fluorescira narandžasto. On ne prolazi kroz intaktnu ćelijsku membranu i akumulira se u nekrotičnim ćelijama ili ćelijama u kasnoj fazi apoptoze (tako da se koristi za uočavanje nekrotičnih morfoloških promena) (Banda et al., 1996).

Reagensi:

1. Etidijum-bromid (Sigma Chem. Co, St. Louis, SAD)
2. Akridin-oranž (Sigma Chem. Co, St. Louis, SAD)
3. Tripsin (Torlak, Beograd)

Aparati:

1. Inkubator (Flow Laboratories, CO₂ inkubator 220)
2. Centrifuga (BOECO U-32, Germany)
3. Vorteks (Heidolph, REAX 2000)
4. Fluorescentni mikroskop Carl Zeiss Axio Observer.Z1
5. AxioVision imaging software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

EA.hy 926 ćelije (2×10^4 ćelija) su zasađene u DMEM medijumu, pH 7,2, u Petri šoljama dimenzija 90x15 mm (Flow laboratories, UK), u koje je ubačeno pokrovno staklo. Ćelije su ostavljene jedan dan u inkubatoru sa 5 % CO₂ i nakon toga tretirane kompleksima 1, 2, 3, 4 i cisplatinom u koncentracijama jednakim $0,5 \times IC_{50}$. Ćelije su inkubirane sa ispitivanim kompleksima na 37 °C, u inkubatoru sa 5 % CO₂ 6 i 24 h. Po završetku inkubacije pod svetlosnim mikroskopom analizirane su morfološke promene ćelija. Ćelije koje su se odlepile sa dna suda, odlivene su zajedno sa medijumom u epruvetu. Ćelije koje su ostale prilepljene za pokrovno staklo uronjene su na nekoliko sekundi u Petri šolje sa pripremljenim razblaženjem akridin-oranža (1,5

$\mu\text{g/ml}$) i etidijum-bromida (5 $\mu\text{g/ml}$) i nakon toga posmatrane su pod fluorescentnim mikroskopom (Axio Observer.Z1) i fotografije su napravljene pomoću softvera AxioVision imaging software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

4. REZULTATI

4.1. Citotoksičnost testiranih kompleksa

Citotoksični potencijal nosintetisanih *trans*-kompleksa platine(II) i platine(IV) ispitan je korišćenjem MTT i SRB testova na panelu od 9 ćelijskih linija - 6 tumorskih, 2 transformisane endotelijalne linije i 1 normalna, zdrava ćelijska linija. Pored *trans*-platinskih kompleksa 1, 2, 3 i 4, korišćena je i CDDP kao referentno jedinjenje. Rezultati su prikazani u Tabeli 3. kao IC₅₀ vrednosti (IC₅₀ vrednosti ispitivanih kompleksa određene su sa grafika koji prikazuje procenat preživljavanja ćelija u funkciji koncentracije ispitivanog kompleksa, kao ona koncentracija agensa (µM) koja smanjuje preživljavanje ispitivane kulture ćelija za 50 %). Vrednosti prikazane u tabeli predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta ± standardna devijacija, pri čemu je svaki eksperiment rađen u triplikatu.

Rezultati citotoksičnosti pokazuju da svi ispitivani *trans*-platinski kompleksi imaju značajnu antiproliferativnu aktivnost na svim korišćenim ćelijskim linijama, tačnije - dobijene IC₅₀ vrednosti ispitivanih kompleksa variraju u opsegu koncentracija do 100 µM.

Među najrezistentnijim su ćelije kancera kolona (LS-174), na kojima svi *trans*-platinski kompleksi pokazuju manju citotoksičnost od cisplatine; kao i transformisane endotelijalne MS1 ćelije, u slučaju kojih su svi *trans*-platinski kompleksi 2-4 puta slabiji od same cisplatine. Slabiju aktivnost kompleksi su pokazali pored ćelija mišjeg melanoma i na ćelijama humanog melanoma – FemX, pri čemu kompleksi 1, 3 i 4 imaju 10-15 slabiju aktivnost od CDDP, dok je kompleks 2 nešto aktivniji od njih, ali takođe manje citotoksičan u odnosu na cisplatinu (IC₅₀=9.7±1.3 µM u odnosu na 2.1±0.3 µM). Na ovim navedenim linijama nema razlike u selektivnosti testiranih kompleksa platine(II) u odnosu na komplekse platine(IV).

Rezultati na A549 ćelijskoj liniji pokazuju da su svi *trans*-platinski kompleksi slabiji 2-4 puta od CDDP, pri čemu su kompleksi platine(IV) duplo aktivniji od kompleksa platine(II), odnosno kompleksi 3 i 4 su citotoksičniji od kompleksa 1 i 2 na ovoj liniji.

Značajan rezultat je postignut na normalnoj zdravoj ćelijskoj liniji fetalnih humanih fibroblasta pluća (MRC-5), jer je utvrđeno da su ispitivani *trans*-platinski kompleksi 3-5 puta manje citotoksični od cisplatine. Ovaj rezultat je bitan jer terapijski potencijal antikancerskih jedinjenja može biti ograničen usled velike toksičnosti prema zdravim ćelijama, a zna se da cisplatina poseduje brojne neželjene toksične efekte što utiče na limitiranost njene upotrebe. Selektivna citotoksična aktivnost prema tumorskim ćelijama pruža dobru perspektivu u daljem razvoju *trans*-platinskih kompleksa kao potencijalnih antikancerskih lekova.

Na HeLa ćelijama *trans*-platina(II) kompleksi su prilično citotoksični, ali i aktivniji od *trans*-platina(IV) kompleksa, dok se kompleks 2 ističe sa IC_{50} vrednošću koja je u nivou IC_{50} vrednosti za CDDP ($7.3 \pm 2.0 \mu M$ za kompleks 2, tj. $6.9 \pm 1.7 \mu M$ za CDDP). Na B16 liniji, kompleks 2 opet pokazuje najjače antitumorsko dejstvo u odnosu na ostale *trans*-platinske komplekse, ali i u odnosu na cisplatinu. U slučaju MDA-MB-453 ćelija, kompleks 2 iskazuje najvišu aktivnost, u nivou CDDP, dok su ostali kompleksi 2-4 puta slabiji od njega.

Najveći antitumorski efekat *trans*-Pt-kompleksi pokazuju na EA.hy 926 ćelijskoj liniji, pri čemu su njihove IC_{50} vrednosti (μM) sledeće: 3.1 ± 1.4 , 2.6 ± 1.3 , 13.8 ± 5.8 i 23.4 ± 3.3 (za komplekse 1, 2, 3 i 4, redom), što je značajno manje od IC_{50} vrednosti cisplatine na istoj liniji ($27.7 \pm 1.3 \mu M$). Dakle, IC_{50} vrednosti dobijene na EA.hy 926 liniji jesu dokaz da su svi testirani *trans*-platinski kompleksi aktivniji od cisplatine, pri čemu se ističu kompleksi platine(II) koji pokazuju i do 10 puta veću citotoksičnost od CDDP.

Kompleks 2 se ističe kao kompleks sa najvećim citotoksičnim potencijalom. Kompleks 2 se pokazao kao najcitotoksičniji na nekim linijama, čak i 2-10 aktivniji od ostalih testiranih *trans*-kompleksa. S obzirom da postoje razlike u citotoksičnosti između dva testirana *trans*-platina(II) kompleksa, rezultati ukazuju da razlika u aktivnosti može da bude upravo zbog pozicije acil supstituenta na piridinskom ligandu, tako da se može očekivati da *trans*-platina(II) kompleksi sa supstituentom na para (4) položaju imaju veću aktivnost od onih sa supstituentom na meta (3) položaju.

S obzirom na rezultate citotoksičnosti, dalje istraživanje je podeljeno u dva dela koja se tiču utvrđivanja molekularnih mehanizama citotoksičnog delovanja platinskih kompleksa. Prvi deo odnosi se na analizu mehanizma delovanja *trans*-Pt(II) kompleksa

na HeLa ćelijama, jer su upravo kompleksi platine(II) pri početnom skriningu pokazali značajnu aktivnost na ovoj ćelijskoj liniji. Drugi deo istraživanja obuhvata rezultate koji se odnose na mehanizme delovanja sva četiri ispitivana *trans*-kompleksa platine na EA.hy 926 ćelijskoj liniji, s obzirom da su svi *trans*-Pt-kompleksi iskazali značajnu citotoksičnost na ovoj transformisanoj liniji, koja prevazilazi citotoksičnost cisplatine. Takođe, s obzirom da se EA.hy 426 ćelijska linija koristi kao model za ispitivanje angiogeneze, posebno smo ispitivali antimetastatski potencijal platinskih kompleksa u drugom delu istraživanja.

Tabela 3. Rezultati citotoksičnosti *trans*-platinskih kompleksa 1-4 i CDDP predstavljeni u vidu IC₅₀ vrednosti nakon 48 h inkubacije.

Kompleks	1	2	3	4	CDDP
Ćelijska linija	IC ₅₀ [μM, 48 h]				
HeLa	27.8±1.7	7.3±2.0	52.3±6.5	48.5±6.8	6.9±1.7
B16	43.0±5.1	11.6±3.7	25.7±0.5	39.7±3.7	22.4±0.4
MDA-MB-453	62.5±10.1	13.1±4.8	34.7±6.6	30.0±7.5	7.6±0.7
LS-174	53.9±6.2	36.2±4.2	35.9±9.8	70.8±0.4	9.7±1.2
A549	69.1±0.8	62.2±0.5	43.7±4.6	30.6±3.0	17.2±0.7
EA.hy 926	3.1±1.4	2.6±1.3	13.8±5.8	23.4±3.3	27.7±1.3
MS1	34.5±7.8	76.3±0.5	57.5±5.9	59.4±6.8	18.6±5.4
FemX	20.2±2.1	9.7±1.3	30.6±4.4	23.1±3.2	2.1±0.3
MRC-5	40.0±11.1	56.4±5.0	51.4±0.6	71.4±2.9	15.4±3.1

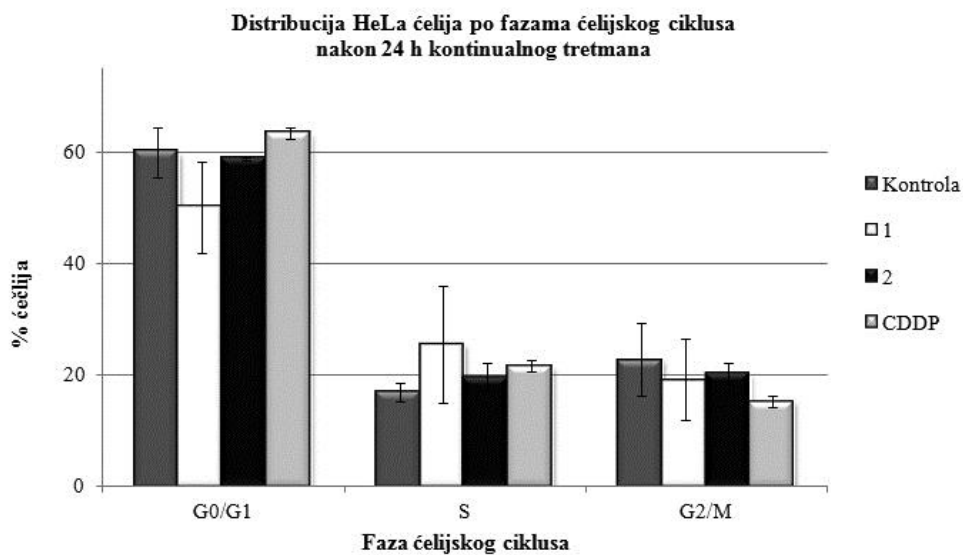
4.2. Mehanizmi citotoksičnog delovanja *trans*-platina(II) kompleksa na HeLa ćelijskoj liniji i na angiogenezu na MS1 ćelijama

4.2.1. Rezultati analize ćelijskog ciklusa

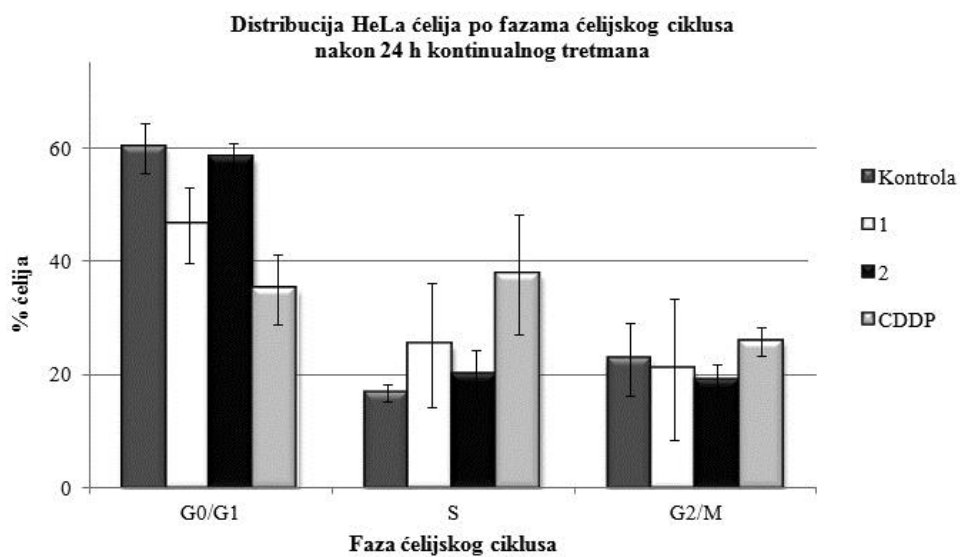
U cilju utvrđivanja mehanizma citotoksičnog delovanja ispitivanih kompleksa *trans*-platine(II) u odnosu na CDDP, analizirali smo potencijal ovih kompleksa da izazovu promene na nivou ćelijskog ciklusa HeLa ćelija korišćenjem analize sadržaja DNK na protočnom citometru. HeLa ćelije tretirane su 24 h ispitivanim kompleksima 1, 2 i CDDP. Na Slici 18a prikazan je efekat delovanja kompleksa u koncentracijama jednakim IC_{50} , dok Slika 18b prikazuje efekat delovanja kompleksa u koncentracijama jednakim $1,5xIC_{50}$.

Efekti koje kompleks 2 ima na perturbacije ćelijskog ciklusa su blagi, odnosno kompleks 2 ima vrlo zanemarljiv uticaj na faze ćelijskog ciklusa HeLa ćelija. Kompleks 1 indukuje zastoj u S fazi ćelijskog ciklusa, ali pri korišćenju koncentracije jednake $1,5xIC_{50}$ taj efekat je manji od onog koji indukuje CDDP (Slika18b). Kompleks 1 takođe izaziva smanjenje procenta ćelija u G0/G1 fazi pri čemu efekat smanjenja raste srazmerno povećanju koncentracije, u poređenju sa kontrolnim (netretiranim) ćelijama. Cisplatina deluje tako da izaziva zastoj u S fazi ciklusa, pri čemu ta promena raste sa povećanjem koncentracije, dok utiče na opadanje procenta G2/M ćelija.

a



b



Slika 18. Distribucija HeLa ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h kontinualnog tretmana kompleksima 1, 2 i CDDP u koncentracijama jednakim a) IC_{50} b) $1,5 \times IC_{50}$. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama dobijene izvođenjem tri nezavisna eksperimenta.

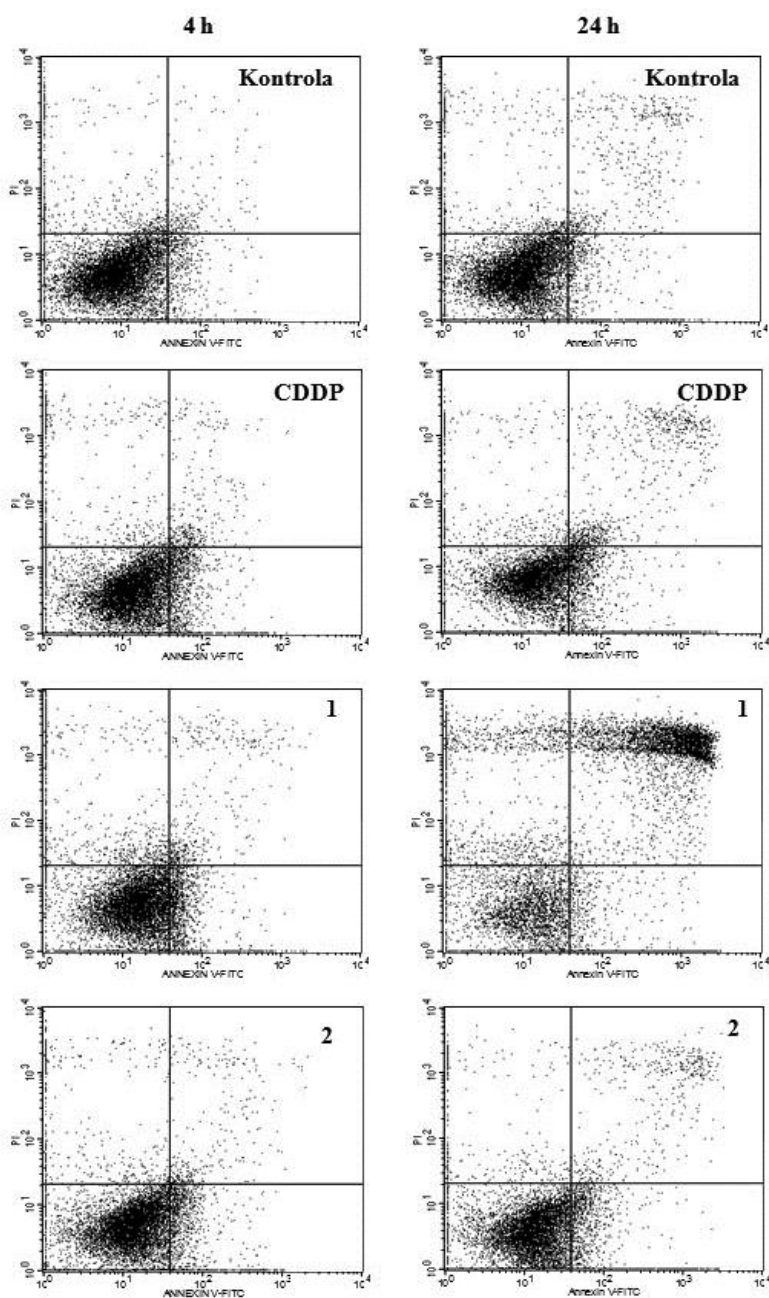
4.2.2. Rezultati analize apoptoze

Uticaj testiranih kompleksa da indukuju apoptozu HeLa ćelija ispitan je metodom protočne citometrije korišćenjem dvokolornog bojenja aneksin-V-FITC i propidijum-jodidom.

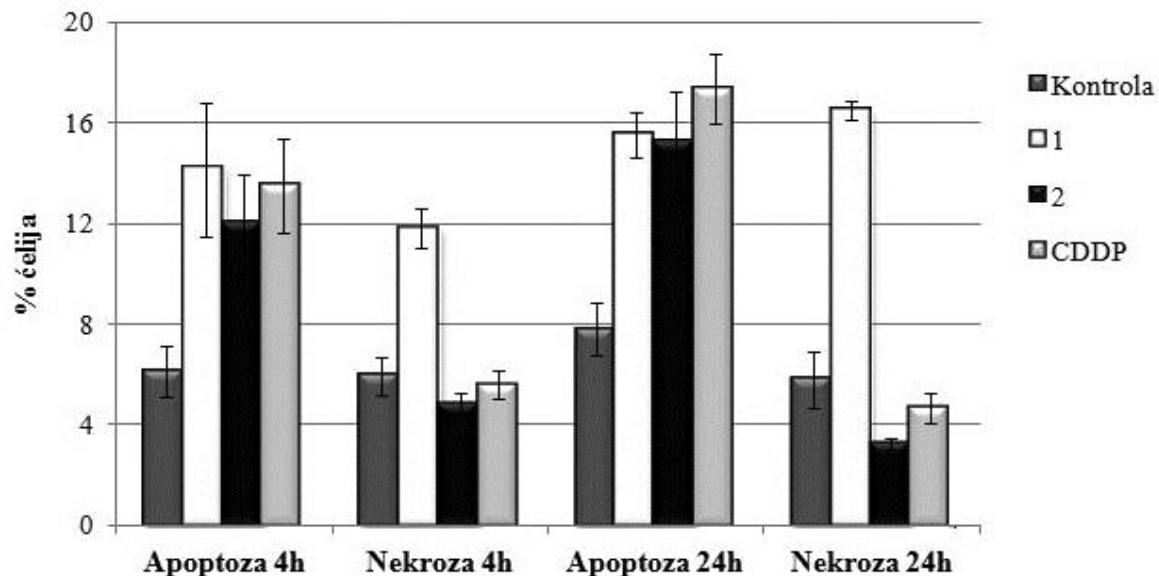
HeLa ćelije su 4 i 24 h tretirane kompleksima 1, 2, i CDDP, i rezultati, odnosno tačkasti dijagrami (eng. dot plot) prikazani su na Slici 19, pri čemu se ćelije u ranoj fazi apoptoze boje samo aneksinom i vidljive su u donjem desnom kvadrantu dijagrama, dok su žive ćelije u donjem levom kvadrantu i ne boje se ni aneksinom ni PI. Ćelije u nekrozi ili kasnoj fazi apoptoze vezuju samo PI ili PI i aneksin V-FITC i uočavaju se u gornjim kvadrantima (gornji levi, odnosno gornji desni kvadrant).

Slika 20. prikazuje rezultate u vidu procenta apoptotičnih ćelija (aneksin V-FITC pozitivnih i PI negativnih) i nekrotičnih ćelija (aneksin V-FITC negativnih i PI pozitivnih) nakon 4 i 24 h tretmana.

Dobijeni rezultati ukazuju da kompleks 2 indukuje 15,5 % apoptoze u HeLa ćelijama nakon 24 h tretmana, dok je procenat nekrotičnih ćelija zanemarljiv. Takođe, procenat apoptotičnih ćelija izazvan dejstvom kompleksa 2 raste sa vremenom inkubacije, dok su njegova kinetika delovanja i stepen indukcije apoptoze slični efektu koji ima cisplatina. Kompleks 1 u koncentraciji IC_{50} indukuje porast procenta ćelija u fazi rane apoptoze u poređenju sa kontrolnim ćelijama, odnosno kompleks 1 uvodi 14,2 % i 15,5 % ćelija u apoptozu nakon 4, odnosno 24 h, respektivno. Nakon 24 h tretmana kompleksom 1, više od 50 % ćelijske populacije podleže ćelijskoj smrti bilo putem apoptoze, bilo putem nekroze, što se može uočiti i na reprezentativnim tačkastim dijagramima.



Slika 19. Tačkasti dijagrami procenta zastupljenosti tretiranih HeLa ćelija u apoptozi, tj. nekrozi, određeni primenom protočne citometrije nakon bojenja aneksinom i propidijum-jodidom. HeLa ćelije su tretirane tokom 4 i 24 h kompleksima 1, 2, i CDDP u koncentracijama jednakim IC₅₀ vrednostima. U zavisnosti od obojenja razlikujemo sledeće grupe ćelija: levi donji kvadrant (A-PI-) – žive ćelije, levi gornji kvadrant (A-PI+) – nekrotične ćelije, desni donji kvadrant (A+PI-) – ćelije u ranoj apoptozi, desni gornji kvadrant (A+PI+) – ćelije u kasnoj apoptozi ili sekundarnoj nekrozi. Prikazani su reprezentativni ekperimenti.



Slika 20. Prikaz procenta zastupljenosti tretiranih HeLa ćelija u apoptozi i nekrozi, određen primenom protočne citometrije nakon bojenja aneksinom i propidijum-jodidom. Stubići prikazuju srednje vrednosti sa standardnim devijacijama dobijene izvođenjem tri nezavisna eksperimenta.

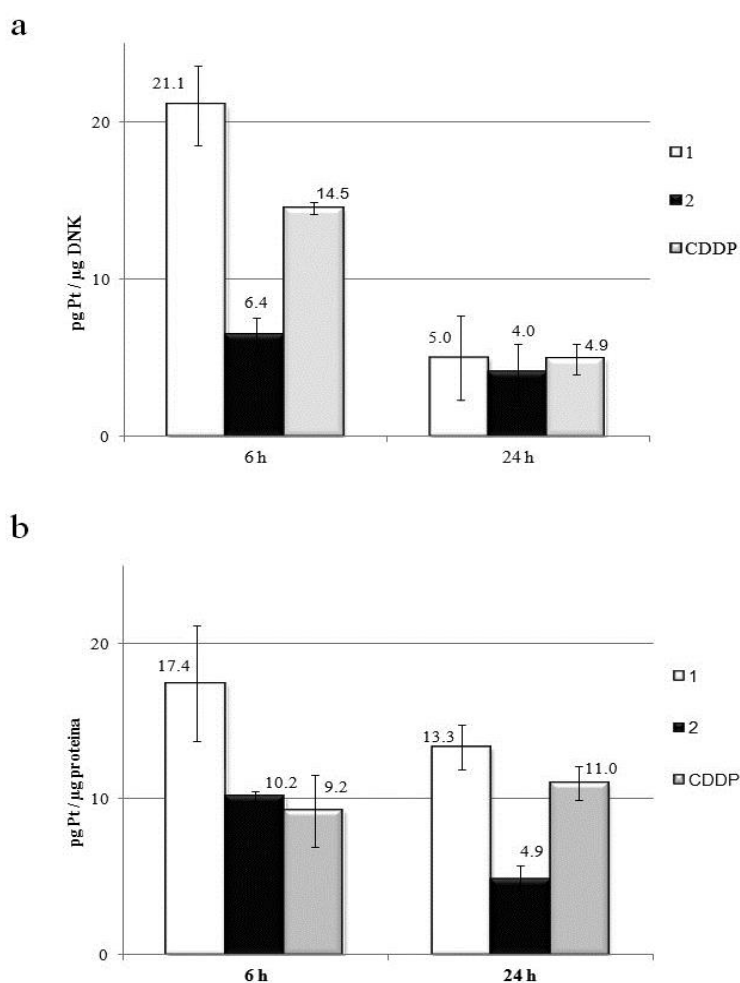
4.2.3. Rezultati analize unutarćelijske distribucije Pt(II) (u proteinskoj i DNK frakciji)

ICP-OES metodom analizirali smo distribuciju platine(II) u proteinskoj i DNK frakciji HeLa ćelija tretiranih 6 i 24 h ispitivanim kompleksima, u koncentraciji jednako $0,5 \times IC_{50}$.

Svaki ispitivani kompleks je indukovao unutarćelijsku akumulaciju platine u izvesnoj meri, a razlike u nivou DNK-vezane platine zavise od kompleksa koji je korišćen, i veće su kod tretmana od 6 h, pri čemu količina vezane platine opada sledećim redom (pg Pt/ μ g DNA): 21 ± 2.5 (kompleks 1) < 14.5 ± 0.4 (CDDP) < 6.4 ± 1.1 (kompleks 2). Kompleks 1 i cisplatina imaju veći efekat na vezivanje platine za DNK od kompleksa 2. Vezivanje platine za DNK opada sa vremenom, pa nakon 24 h

tretmana možemo uočiti da svi kompleksi imaju sličan efekat na vezivanje, odnosno indukuju vezivanje platine u približno jednakoj meri.

Rezultati ICP-OES analize vezivanja platine(II) za proteinsku frakciju ukazuju da kompleks 1 indukuje najveće vezivanje platine za proteine i posle 6 h i posle 24 h tretmana, dok kompleks 2 pokazuje najmanji afinitet za vezivanje. Tokom vremena nivo platine vezane za proteine opada u slučaju *trans*-platina(II) kompleksa, dok cisplatina ima suprotan efekat, odnosno nivo platine vezane za proteine pokazuje blagi porast sa produžavanjem tretmana.



Slika 21. Unutarćelijska distribucija platine(II) nakon 6 i 24 h tretmana HeLa ćelija kompleksima 1, 2 i CDDP pri koncentracijama jednakim njihovim $0,5 \times IC_{50}$ vrednostima: a) DNK frakcija, b) proteinska frakcija. Stubići predstavljaju srednje vrednosti sa standardnim devijacijama dobijeni izvodjenjem tri nezavisna eksperimenta.

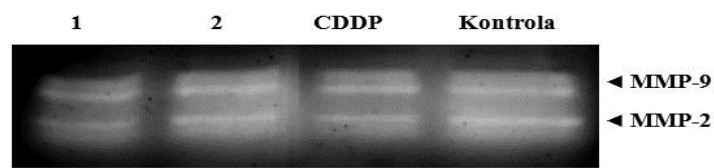
4.2.4. *In vitro* antimetastatski potencijal ispitivanih kompleksa

4.2.4.1. Želatinska zimografija

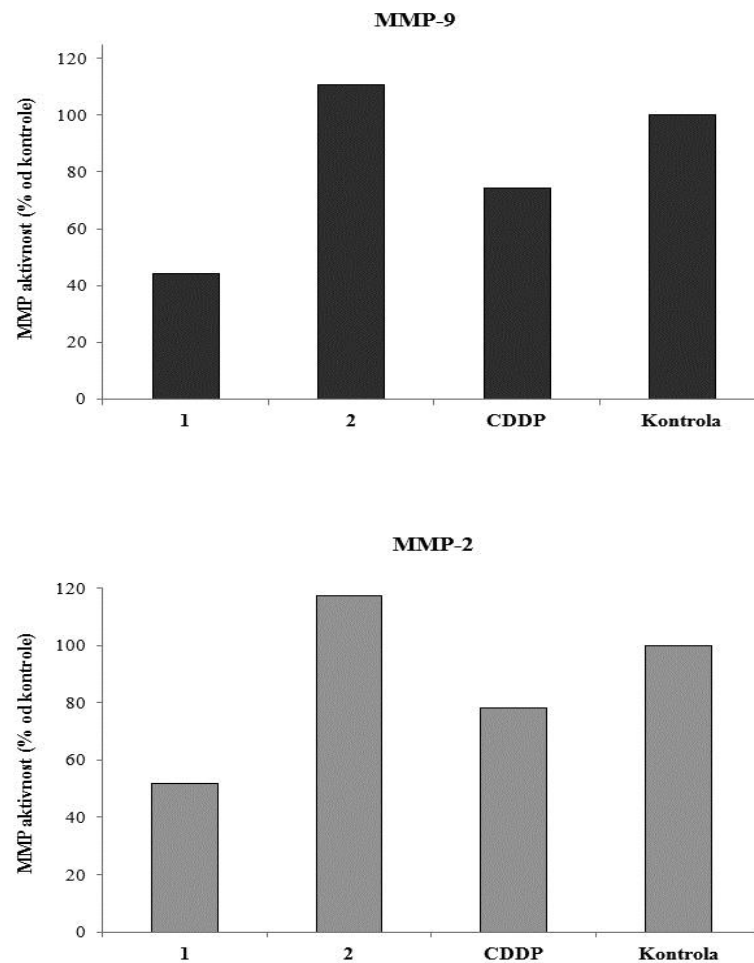
Želatinska zimografija je metoda kojom se vrši specifična detekcija matriksnih metaloproteinaza, tačnije jedne grupe želatinaza (MMP-9 i MMP-2), a pomoću koje smo ispitali uticaj platinskih kompleksa na aktivnost želatinaza *in vitro*.

Efekat kompleksa 1, 2, i cisplatine je ispitan na HeLa ćelijama nakon 6 h tretmana i reprezentativni rezultati su prikazani na Slici 22. Kvantitativna analiza reprezentativnog rezultata želatinske zimografije je izvršena korišćenjem Image J softvera, i pokazuje da kompleks 1 u koncentraciji $0,5 \times IC_{50}$ indukuje smanjenje aktivnosti MMP-2 i MMP-9 u poređenju sa kontrolnim netretiranim ćelijama (Slika 22b). Cisplatina smanjuje nivo želatinaza ali manje od kompleksa 1, dok kompleks 2 ima suprotan efekat, odnosno pojačava aktivnost matriksnih metaloproteinaza 2 i 9.

a



b

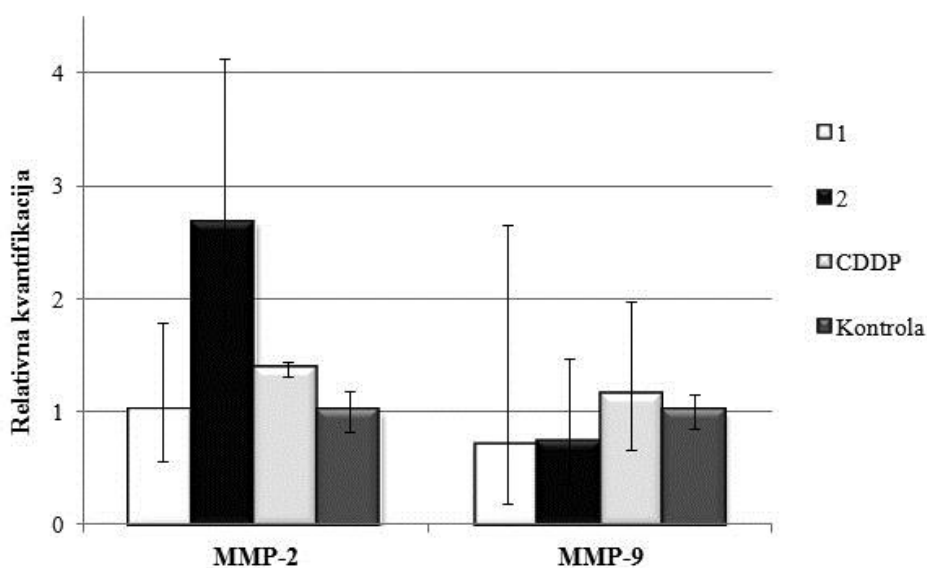


Slika 22. a) Prikaz gela - rezultati želatinske zimografije nakon 6 h tretmana HeLa ćelija kompleksima 1, 2, i CDDP u koncentracijama jednakim $0,5 \times IC_{50}$. Trake na gelu su skenirane denzitometrijski i površine ispod pika aproksimativno predstavljaju aktivnost želatinaza. Prikazan je reprezentativan eksperiment. b) Rezultati denzitometrijske analize tj. kvantitativne analize proteolitičke aktivnosti MMP-9 i MMP-2 dobijeni korišćenjem Image J softvera, a vrednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama aktivnosti MMP (% od kontrole).

4.2.4.2. Rezultati qRT-PCR metode – efekat ispitivanih kompleksa na iRNK MMP-2 i MMP-9 ekspresiju

Da bismo utvrdili da li kompleksi imaju uticaja na ekspresiju MMP-2 i MMP-9 na nivou iRNK i kako to utiče na aktivnost MMP, koristili smo metodu kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu („Quantitative Real-Time PCR - qRT-PCR“).

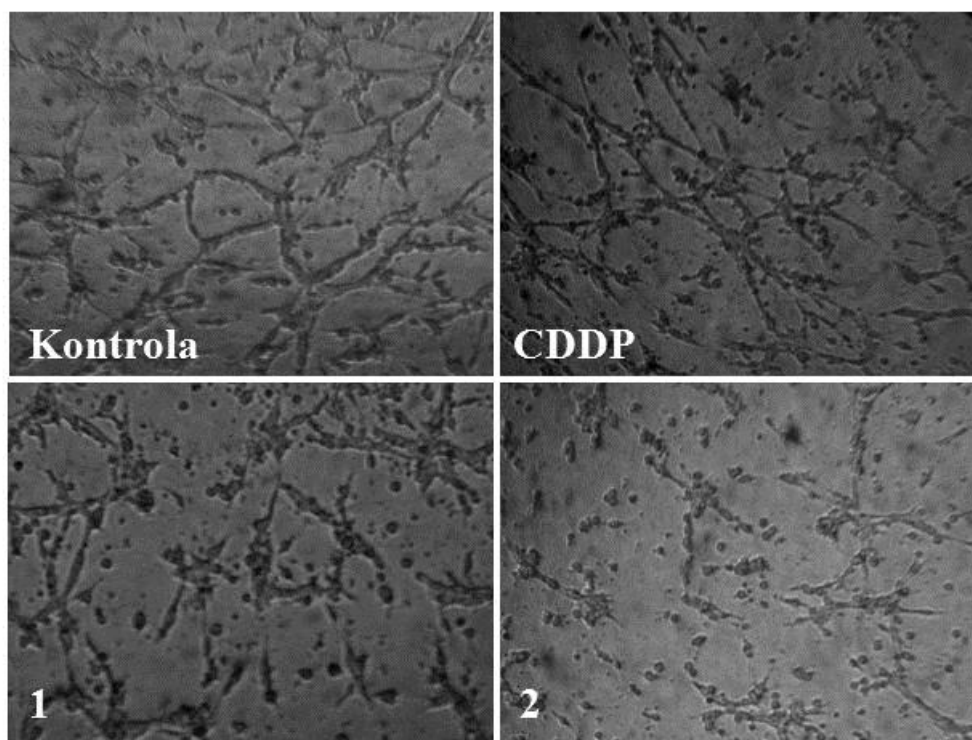
Ispitan je uticaj kompleksa 1, 2, i CDDP ($0,5 \times IC_{50}$) na nivo MMP-2 i MMP-9 nakon 6 h tretmana na HeLa ćelijama. Rezultati ukazuju da *trans*-platina(II) kompleksi smanjuju nivo MMP-9 iRNK, u poređenju sa kontrolom, a suprotno delovanju cisplatine, što je prikazano na Slici 23. Kompleks 2 i cisplatina indukuju povećanje ekspresije MMP-2 iRNK, dok kompleks 1 nema značajan uticaj na promene MMP-2 iRNK ekspresije.



Slika 23. Ekspresija MMP-2 i MMP-9 na iRNK nivou nakon 6 h tretmana HeLa ćelija kompleksima 1, 2 i CDDP, određen qRT-PCR metodom.

4.2.4.3. Uticaj kompleksa Pt(II) na angiogenezu *in vitro* („Tube formation assay“)

Da bismo utvdili da li ispitivani kompleksi imaju uticaj da inhibiraju angiogenezu kancerskih ćelija *in vitro*, koristili smo „Tube formation assay“ na MS1 ćelijama koje služe kao model za analiziranje angiogeneze. MS1 ćelije su tretirane subtoksičnim koncentracijama testiranih kompleksa i ispitan je potencijal kompleksa da smanjuju sposobnost ovih ćelija da se izdužuju i diferenciraju u strukture nalik tubulama. *Trans*-platina(II) kompleksi pokazuju potencijal da inhibiraju proces angiogeneze, pri čemu kompleks 2 izaziva veću inhibiciju od kompleksa 1. Promene koje CDDP izaziva u ovom testu su zanemarljive.



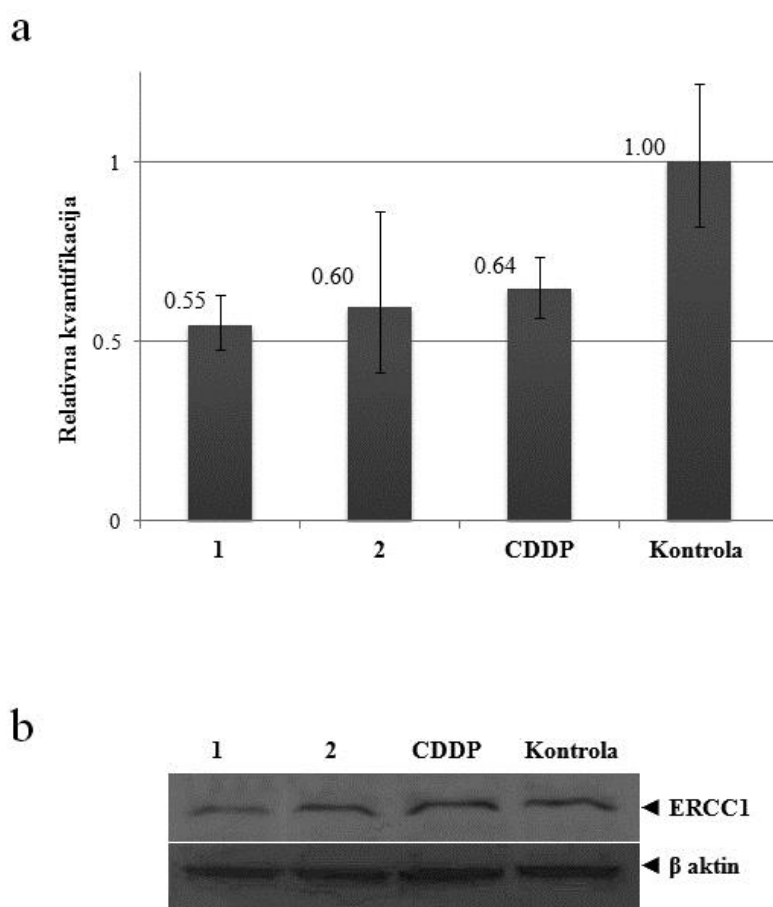
Slika 24. „Tube formation assay“ – test angiogeneze *in vitro*. Prikazane su reprezentativne mikrografije MS1 ćelija u kontroli (netretirane) i tretirane 24 h kompleksima 1, 2, i CDDP (0,03xIC₅₀). Korišćen je Olympus digitalni aparat povezan sa invertnim mikroskopom (Carl Zeiss, Jena, Germany, objective 6.2/0.20).

4.2.5. Rezultati analize uticaja ispitivanih kompleksa na nivo ekspresije ERCC1

Kako bismo utvrdili da li ispitivani kompleksi indukuju odgovor ćelija zavisano od DNK reparacije kao rezultat nastalih DNK lezija, ispitivali smo iRNK i proteinski nivo ekspresije ERCC1.

Rezultati dobijeni na HeLa ćelijama nakon 6 h tretmana kompleksima 1, 2, i CDDP ($0,5 \times IC_{50}$) ukazuju da testirani kompleksi smanjuju ekspresiju ERCC1 i na proteinskom i na iRNK nivou (Slika 25). qRT-PCR analizom je pokazano da kompleksi 1, 2, i CDDP smanjuju ERCC1 iRNK ekspresiju za 45 %, 40 %, odnosno 36 %, redom, a u poređenju sa netretiranom kontrolom (Slika 25a).

Rezultati Western blot analize (Slika 25b) pokazuju redukciju ERCC1 proteinskog nivoa nakon tretmana HeLa ćelija kompleksima 1 i 2, dok cisplatina ne indukuje vidljive promene na nivou ERCC1 proteina.



Slika 25. Ekspresija ERCC1 na a) iRNK nivou određen korišćenjem qRT-PCR metode; b) proteinskom nivou određen korišćenjem Western blot metode; kod HeLa ćelija nakon 6 h tretmana kompleksima 1, 2, i CDDP ($0,5 \times IC_{50}$). Dijagram prikazuje srednje vrednosti sa standardnim devijacijama dobijene izvođenjem tri nezavisna eksperimenta.

4.3. Mehanizmi citotoksičnog delovanja *trans*-platina(II) i *trans*-platina(IV) kompleksa na EA.hy 926 ćelijskoj liniji

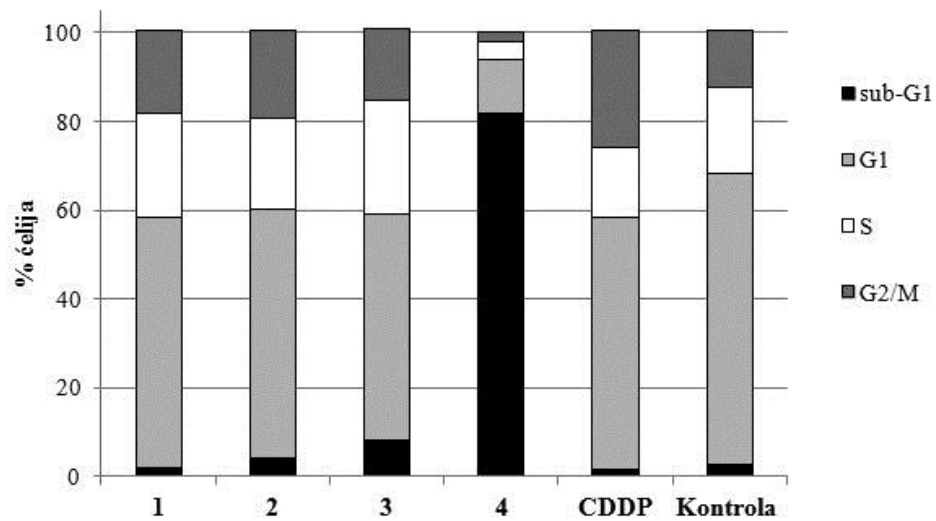
4.3.1. Rezultati analize ćelijskog ciklusa

Radi razumevanja korelacije između citotoksičnosti testiranih kompleksa platine i mehanizama njihovog antiproliferativnog dejstva, analizirali smo potencijal ovih kompleksa da uzrokuju promene ćelijskog ciklusa korišćenjem protočnog citometra. EA.hy 926 ćelije tretirane su kompleksima 1, 2, 3, 4, i CDDP u IC₅₀ koncentracijama tokom 24 h, i rezultati su prikazani na Slici 26.

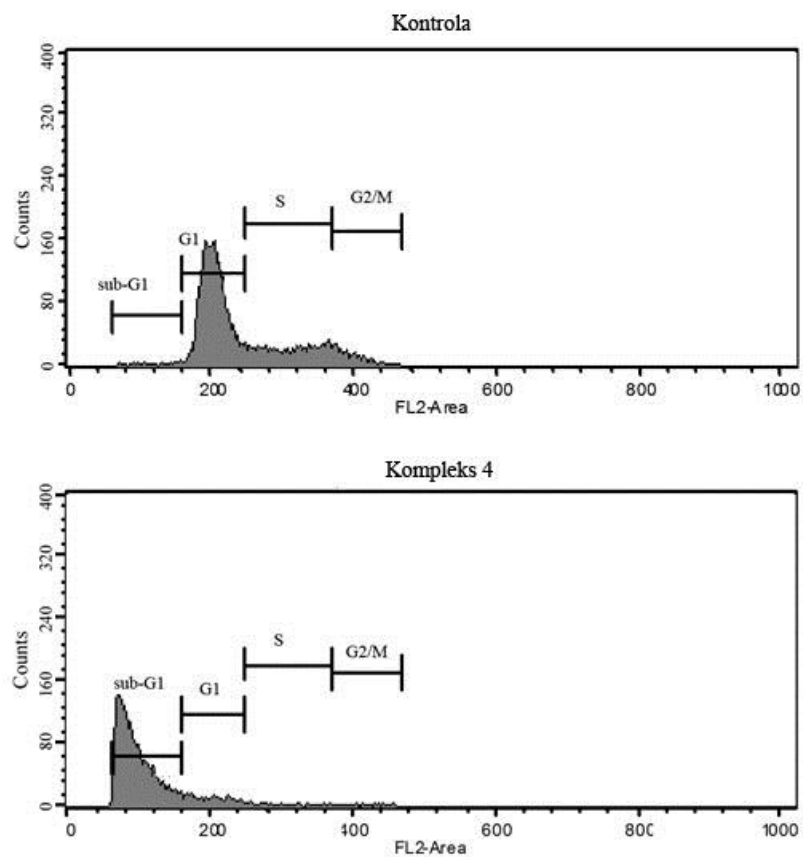
Značajne promene uočavaju se u sub-G1 fazi ćelijskog ciklusa, koje su najveće pri tretiranju EA.hy 926 ćelija kompleksom 4, odnosno sub-G1 procenat ćelija raste sa 2,6 % u kontroli na 81,9 % kod ćelija koje su tretirane kompleksom 4, tako da on u ovom testu pokazuje najveći potencijal za indukciju apoptoze.

Svi ispitivani kompleksi izazivaju smanjenje broja ćelija u G1 fazi ćelijskog ciklusa, gde se opet ističe kompleks 4 koji izaziva najveće promene (12,2 % ćelija u G1 fazi – kompleks 4; 65,6% ćelija u G1 fazi – kontrola). Kompleks 4 smanjuje i procenat ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa u odnosu na kontrolne netretirane ćelije, dok su promene koje ostali kompleksi imaju na ovu fazu ciklusa zanemarljive. *Trans*-platinski kompleksi 1, 2, 3, kao i CDDP, utiču na povećanje broja ćelija u G2/M fazi, dok kompleks 4 uzrokuje smanjenje G2/M procenta ćelija u odnosu na kontrolu.

Rezultati analize uticaja kompleksa 4 na ćelijski ciklus predstavljeni su i u vidu histograma radi jasnijeg prikaza i lakšeg komentarisanja rezultata, s obzirom da je ovaj kompleks pokazao najveći potencijal da izazove promene u fazama ćelijskog ciklusa. Na Slici 27. su rezultati prikazani kao histogrami zavisnosti broja ćelija (eng. Counts) u funkciji njihovog sadržaja DNK, što predstavlja FL2-Area (FL2-Area je mera ukupne fluorescencije PI koja je proporcionalna ukupnom sadržaju DNK).



Slika 26. Distribucija EA.hy 926 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h kontinualnog tretmana kompleksima 1, 2, 3, 4, i CDDP (IC₅₀).



Slika 27. Histogrami reprezentativnog eksperimenta analize ćelijskog ciklusa kontrolnih (netretiranih) EA.hy 926 ćelija i ćelija tretiranih kompleksom 4 u koncentraciji IC₅₀ nakon 24 h kontinualnog dejstva.

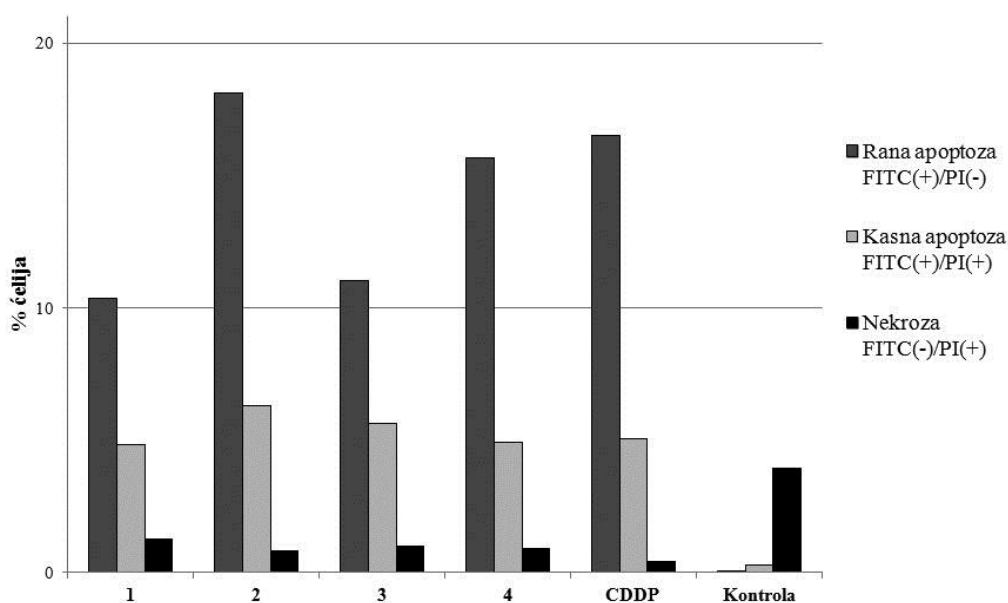
4.3.2. Rezultati analize apoptoze

Kao i u slučaju HeLa ćelija, metodom protočne citometrije korišćenjem bojenja aneksin-V-FITC i propidijum-jodidom, analiziran je efekat kompleksa na indukciju apoptoze na EA.hy 926 ćelijskoj liniji, a rezultati su prikazani na Slici 28.

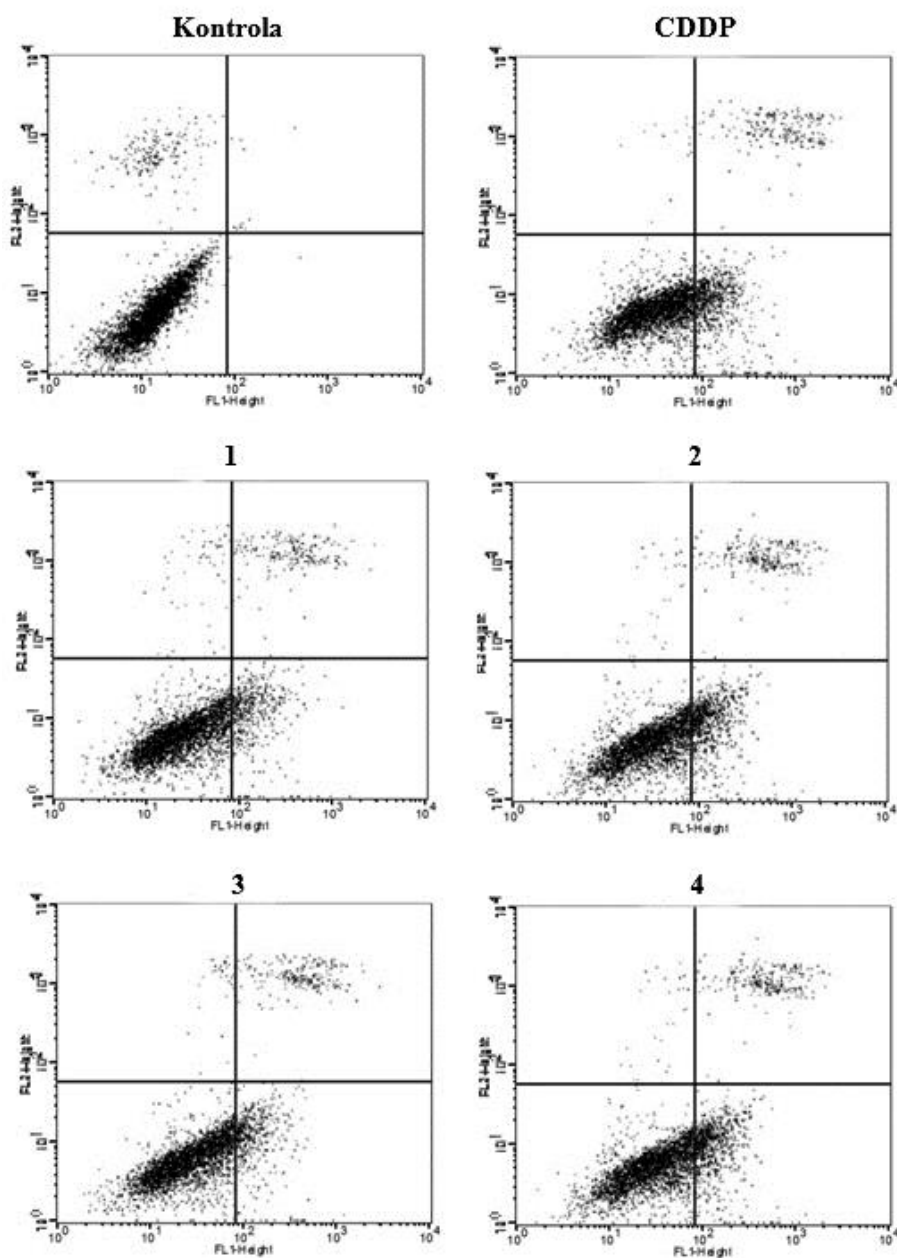
Svi ispitivani *trans*-platinski kompleksi, kao i cisplatina, indukuju značajno povećanje procenta ćelija koje ulaze u fazu rane apoptoze, u poređenju sa kontrolnim netretiranim ćelijama. Pa tako procenat ćelija u ranoj fazi apoptoze iznosi: 0,1 % – kontrola; 10,4 % – kompleks 1; 18,1 % – kompleks 2; 11,0 % – kompleks 3; 15,6 % – kompleks 4; i 16,5 % – u slučaju cisplatine.

Promena broja ćelija koje ulaze u nekrozu je zanemarljiv, dok svi testirani kompleksi utiču na povećanje broja ćelija koje se boje i aneksinom i propidijum-jodidom, odnosno, utiču na porast broja ćelija u kasnoj apoptozi (gornji desni kvadrant).

Rezultati protočne citometrije ukazuju da testirani *trans*-platinski kompleksi indukuju dominantno ćelijsku smrt EA.hy 926 ćelija putem apoptoze, i imaju efekat sličan onom koji indukuje CDDP. Tačkasti dijagrami reprezentativnog eksperimenta su prikazani na Slici 29.



Slika 28. Prikaz procenta zastupljenosti tretiranih EA.hy 926 ćelija u apoptozi i nekrozi, određen primenom protočne citometrije nakon bojenja aneksinom i propidijum-jodidom. Prikazan je reprezentativan eksperiment.



Slika 29. Tačkasti dijagrami procenta zastupljenosti tretiranih EA.hy 926 ćelija u apoptozi i nekrozi, dobijeni primenom protočne citometrije nakon bojenja aneksinom i propidijum-jodidom. EA.hy 926 ćelije su tretirane tokom 24 h kompleksima 1, 2, 3, 4, i CDDP u koncentracijama koje odgovaraju $0,5 \times IC_{50}$ vrednostima. Prikazan je reprezentativan eksperiment.

4.3.3. Rezultati analize ukupne unutarćelijske akumulacije i distribucije platine (u proteinskoj i DNK frakciji)

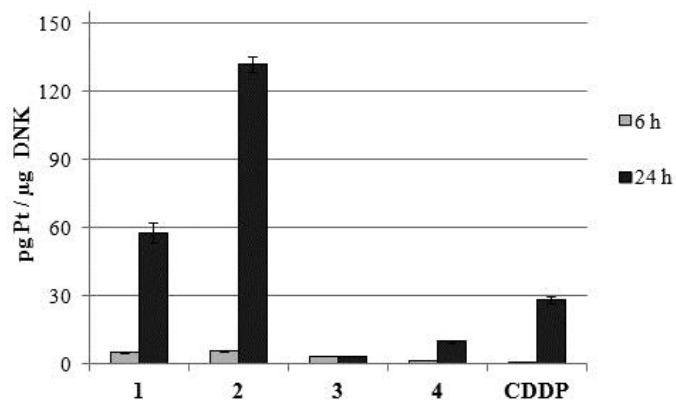
Metodom ICP-MS analizirana je ukupna unutarćelijska akumulacija, kao i unutarćelijska distribucija platine u DNK i proteinskim frakcijama EA.hy 926 ćelija, koje su tokom 6 i 24 h tretirane kompleksima 1, 2, 3, 4, i CDDP u koncentracijama koje odgovaraju njihovim $0,5 \times IC_{50}$ vrednostima, i rezultati su prikazani na Slici 30.

Analizom uticaja kompleksa na vezivanje platine za DNK frakciju, uočeno je da da kompleksi platine(II) (1, 2) imaju veći afinitet za vezivanje od platina(IV) kompleksa (3, 4), što je naročito uočljivo nakon 24 h tretmana. *Trans*-platinski kompleksi pokazuju isti trend delovanja kao CDDP. Kompleks 2 se ističe kao kompleks koji pokazuje najveći afinitet vezivanja za DNK: nakon 6 h tretmana vezuje se 5,6 pg Pt/ μ g DNK, dok nakon 24 h tretmana količina vezane platine raste na 131,8 pg Pt/ μ g DNK.

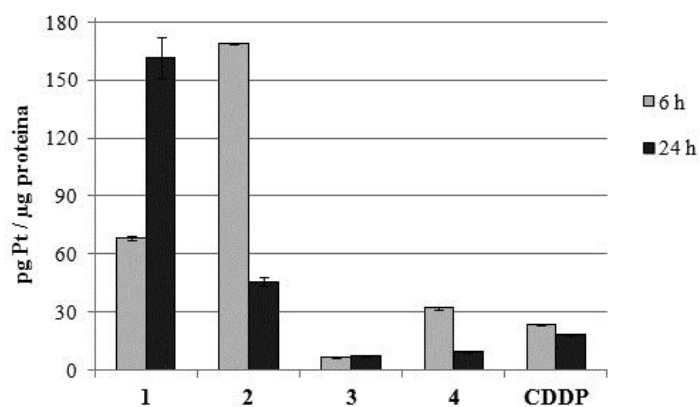
Nivo platine vezane za proteinsku frakciju u ćelijama koje su tretirane *trans*-platina(IV) kompleksima ne pokazuju značajne promene sa produžavanjem vremena inkubacije, slično kao cisplatina. Kompleks 1 izaziva povećanje nivoa platine vezane za proteine sa 68,3 pg Pt/ μ g proteina, na 161,5 pg Pt/ μ g proteina. Suprotno tome, kompleks 2 indukuje smanjenje: vezuje se 168,9 pg Pt/ μ g proteina nakon 6 h, odnosno 45,9 pg Pt/ μ g proteina nakon 24 h kontinualne inkubacije.

Rezultati merenja ukupne unutarćelijske akumulacije platine u EA.hy 926 ćelijama nakon tretmana ispitivanim kompleksima ukazuju da se nivo akumulirane platine povećava sa vremenom. Cisplatina indukuje najmanju akumulaciju platine u transformisanim endotelnim ćelijama, *trans*-platina(IV) kompleksi imaju veći uticaj, dok *trans*-platina(II) kompleksi uzrokuju maksimalnu unutarćelijsku akumulaciju platine. Kompleks 1 se ističe, odnosno izaziva najveću akumulaciju platine u EA.hy 926 ćelijama u poređenju sa ostalim testiranim agensima, što se uočava na dijagramu prikazanom na Slici 30c.

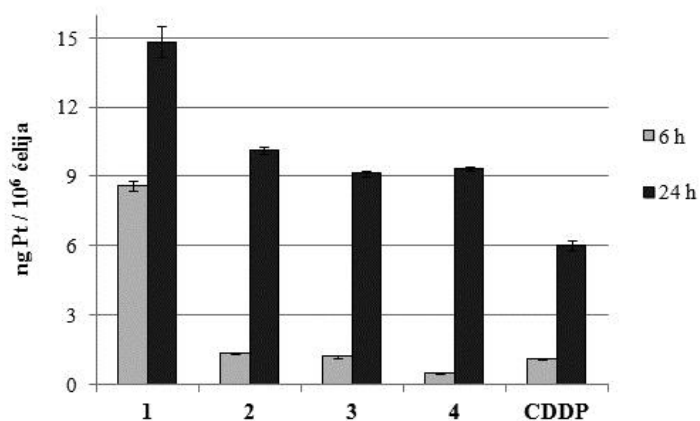
a



b



c



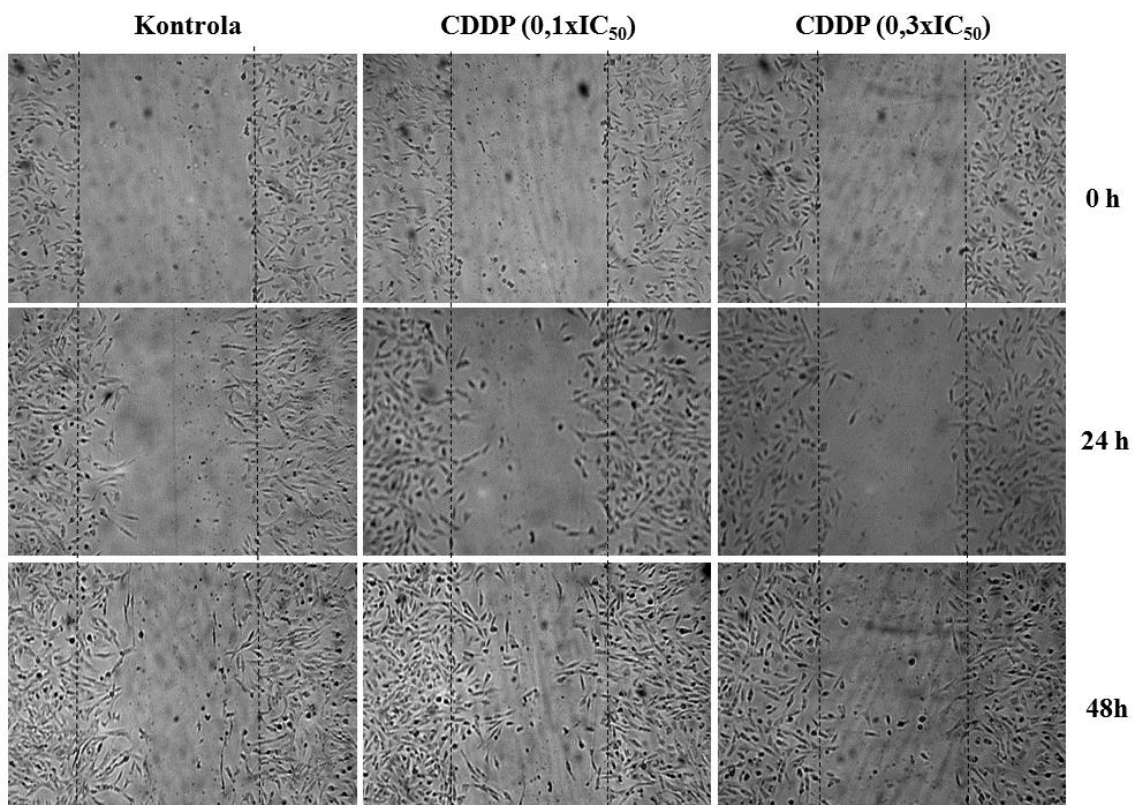
Slika 30. Rezultati ICP-MS analize EA.hy 926 ćelija nakon 6 i 24 h tretmana kompleksima 1, 2, 3, 4, i CDDP (0,5x IC₅₀): a) količina platine vezana za DNK ćelijsku frakciju; b) količina platine vezane za unutarćelijske proteine; c) ukupna unutarćelijska količina platine izražena po broju ćelija u uzorku. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama dobijene izvođenjem tri nezavisna eksperimenta.

4.3.4. *In vitro* antimetastatski potencijal ispitivanih kompleksa

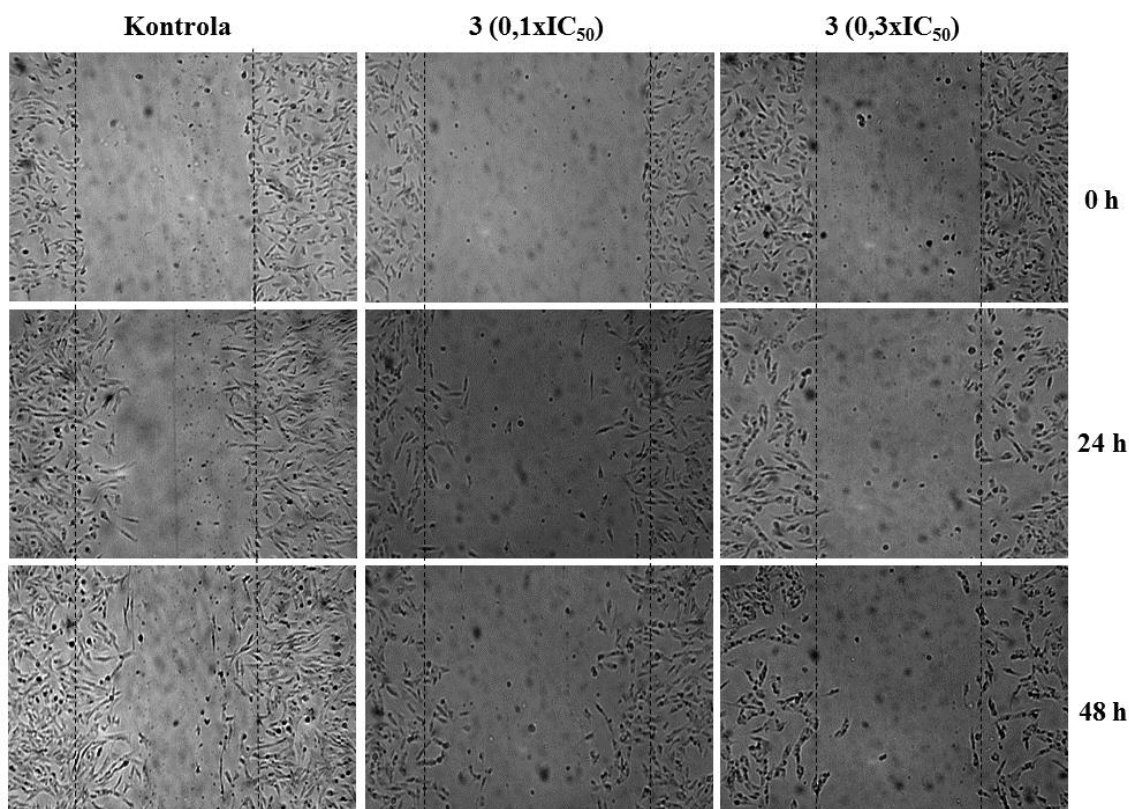
4.3.4.1. Rezultati uticaja ispitivanih kompleksa na migraciju tumorskih ćelija *in vitro* („Scratch assay“)

U cilju *in vitro* analize uticaja kompleksa na direktnu migraciju ćelija, koristili smo „Scratch assay“, odnosno test zarastanja rane (eng. wound migration assay). EA.hy 926 ćelije su tretirane kompleksima 1, 2, 3, 4 i CDDP u odgovarajućim subtoksičnim koncentracijama ($0,1 \times IC_{50}$ i $0,3 \times IC_{50}$), i praćen je njihov uticaj na migraciju nakon 24 i 48 h kontinualne inkubacije. Kao kontrola služile su netretirane ćelije.

U poređenju sa kontrolom, kompleksi 1, 2 i 4 nisu pokazali uticaj na migraciju EA.hy 926 ćelija, dok su kompleks 3 i cisplatina inhibirali migraciju, što je prikazano na Slici 31 i Slici 32.



Slika 31. Reprezentativne mikrografije efekta CDDP na migraciju EA.hy 926 ćelija u poređenju sa kontrolom.

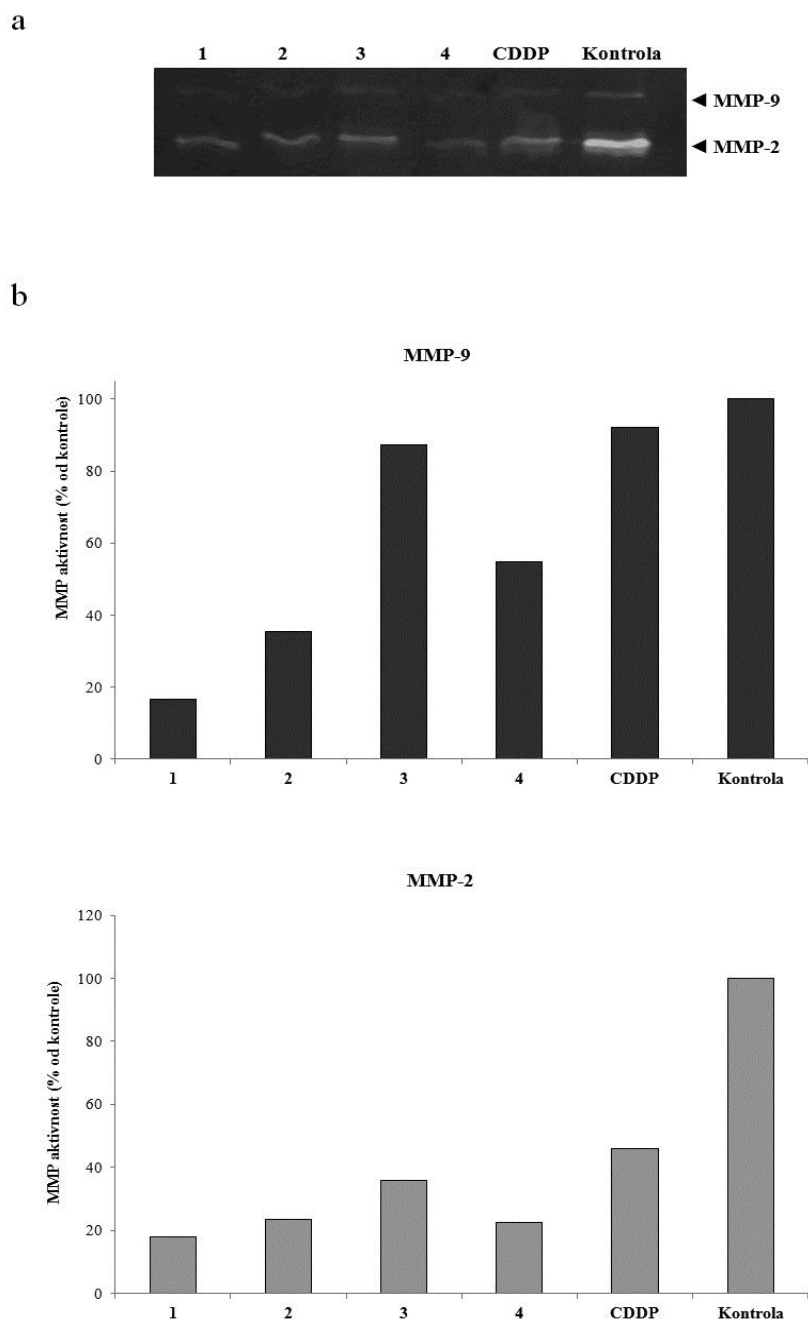


Slika 32. Reprezentativne mikrografije efekta kompleksa 3 na migraciju EA.hy 926 ćelija u poređenju sa kontrolom.

4.3.4.2. Želatinska zimografija

Metodom želatinske zimografije pratili smo uticaj ispitivanih kompleksa na aktivnost matriksnih metaloproteinaza (MMP-9 i MMP-2). EA.hy 926 ćelije smo tretirali 6 h kompleksima 1, 2, 3, 4, i CDDP u koncentraciji 0,5xIC₅₀. Rezultati su prikazani na Slici 33.

Svi ispitivani kompleksi smanjuju aktivnost želatinaza, pri čemu *trans*-kompleksi jače deluju od cisplatine. Takođe, rezultati ukazuju da *trans*-platina(II) kompleksi imaju jači inhibitorni efekat od *trans*-platina(IV) kompleksa, odnosno kompleks 1 ima najveći efekat na smanjenje MMP-2 i MMP-9 aktivnosti.



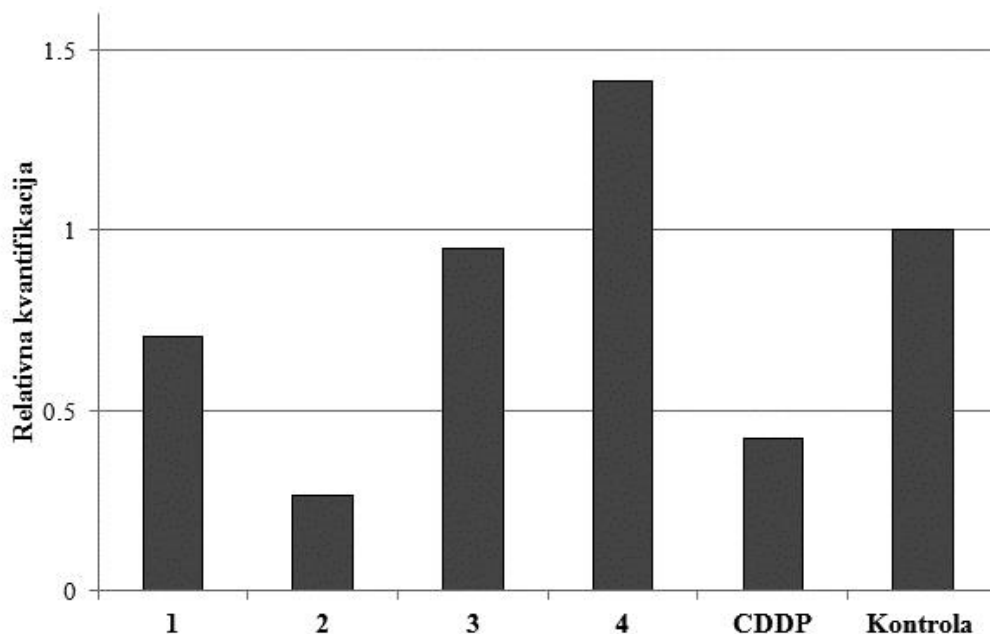
Slika 33. a) Prikaz gela - rezultati želatinske zimografije nakon 6 h tretmana EA.hy 926 ćelija kompleksima 1, 2, 3, 4, i CDDP u koncentracijama jednakim $0,5 \times IC_{50}$. Trake na gelu su skenirane denzitometrijski i površine ispod pika aproksimativno predstavljaju aktivnost želatinaza. Prikazan je reprezentativan eksperiment. b) Rezultati denzitometrijske tj. kvantitativne analize proteolitičke aktivnosti MMP-2 i MMP-9 dobijeni korišćenjem Image J softvera, a vrednosti su izražene u arbitrarnim jedinicama aktivnosti MMP (% od kontrole).

4.3.4.3. Rezultati qRT-PCR metode – efekat ispitivanih kompleksa na iRNK MMP-2 ekspresiju

Metodom kvantitativnog PCR u realnom vremenu (qRT-PCR) analizirali smo uticaj *trans*-platinskih kompleksa i cisplatine na ekspresiju MMP-2 na nivou iRNK, a rezultati reprezentativnog eksperimenta su prikazani na Slici 34.

MMP-2 ekspresija na nivou iRNK je smanjena nakon 6 h tretmana EA.hy 926 ćelija kompleksima *trans*-platine(II), slično delovanju cisplatine, pri čemu kompleks 2 ima duplo jači inhibitorski efekat od kompleksa 1. Uticaj kompleksa 3 je zanemarljiv, dok kompleks 4 utiče na povećanje ekspresije MMP-2 iRNK nivoa.

Ekspresiju MMP-9 na nivou iRNK nije bilo moguće detektovati jer na EA.hy 926 ćelijskoj liniji nije došlo do amplifikacije gena.



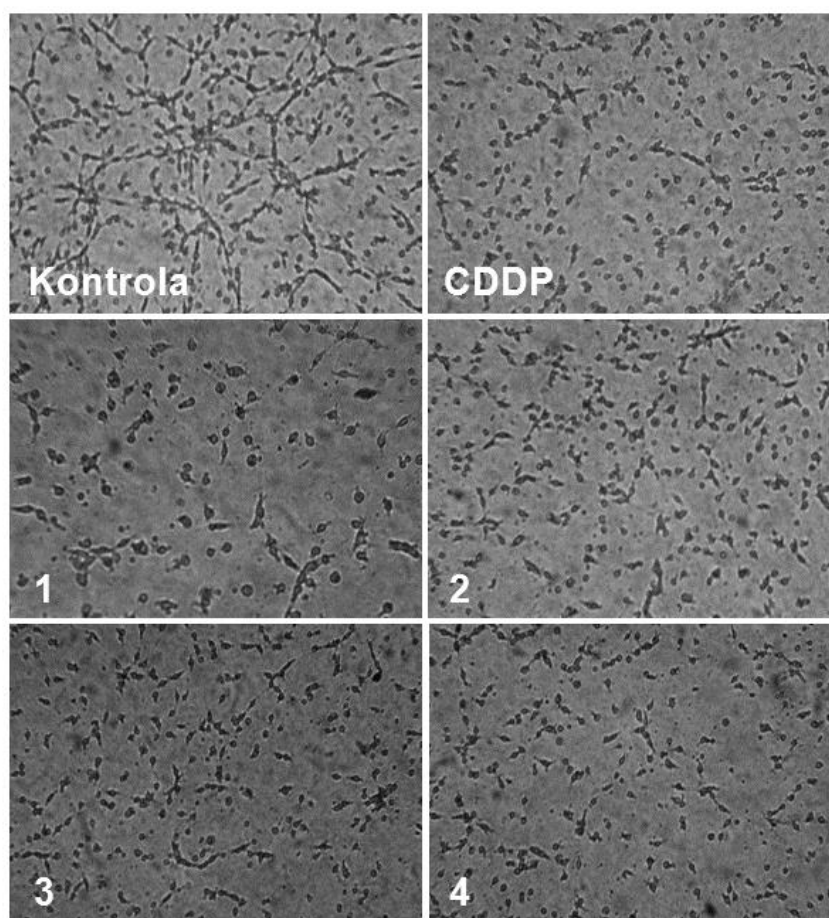
Slika 34. Ekspresija MMP-2 na iRNK nivou nakon 6 h tretmana EA.hy 926 ćelija kompleksima 1, 2, 3, 4, i CDDP ($0,5 \times IC_{50}$) određen qRT-PCR metodom. Prikazan je reprezentativan eksperiment.

4.3.4.4. Uticaj platinskih kompleksa na angiogenezu *in vitro* („Tube formation assay“)

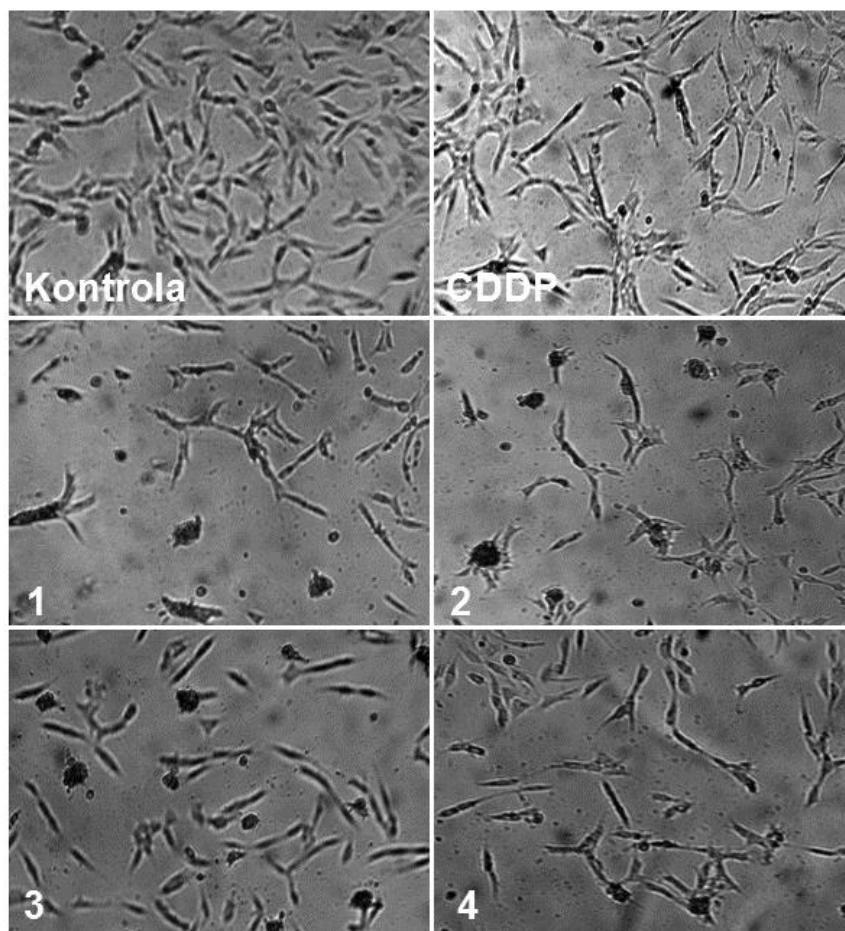
Uticaj ispitivanih kompleksa na angiogenezu *in vitro* analiziran je korišćenjem „Tube formation assay“ metode na transformisanim endotelijalnim ćelijama EA.hy 926.

Antiangiogeni efekat kompleksa je analiziran najpre upotrebom kolagena, pri čemu su ćelije tretirane ispitivanim kompleksima u subtoksičnim koncentracijama ($0,03 \times IC_{50}$) i rezultati su prikazani na Slici 35. Svi *trans*-kompleksi inhibiraju angiogeno ponašanje endotelnih ćelija, slično delovanju cisplatine.

Angiogeneza je analizirana i korišćenjem matrigela, odnosno EA.hy 926 ćelije su tretirane kompleksima 1, 2, 3, 4, i cisplatinom, i praćen je njihov uticaj na inhibiciju tubulogeneze. Nakon što kompleksi nisu pokazali nikakav efekat na inhibiciju angiogeneze u istim koncentracijama koje su upotrebljene na kolagenu ($0,03 \times IC_{50}$), upotrebljena je veća koncentracija - $0,06 \times IC_{50}$, i rezultati su prikazani na Slici 36. Cisplatina ne pokazuje značajan efekat, dok *trans*-kompleksi smanjuju angiogeni potencijal endotelnih ćelija. *Trans*-platina(II) kompleksi imaju jači inhibični efekat od *trans*-platina(IV) kompleksa.



Slika 35. „Tube formation assay“ – test angiogeneze *in vitro* (na kolagenu). Prikazane su reprezentativne mikrografije EA.hy 926 ćelija u kontroli (netretirane) i tretirane 24 h kompleksima 1, 2, 3,4, i CDDP ($0,03 \times IC_{50}$).



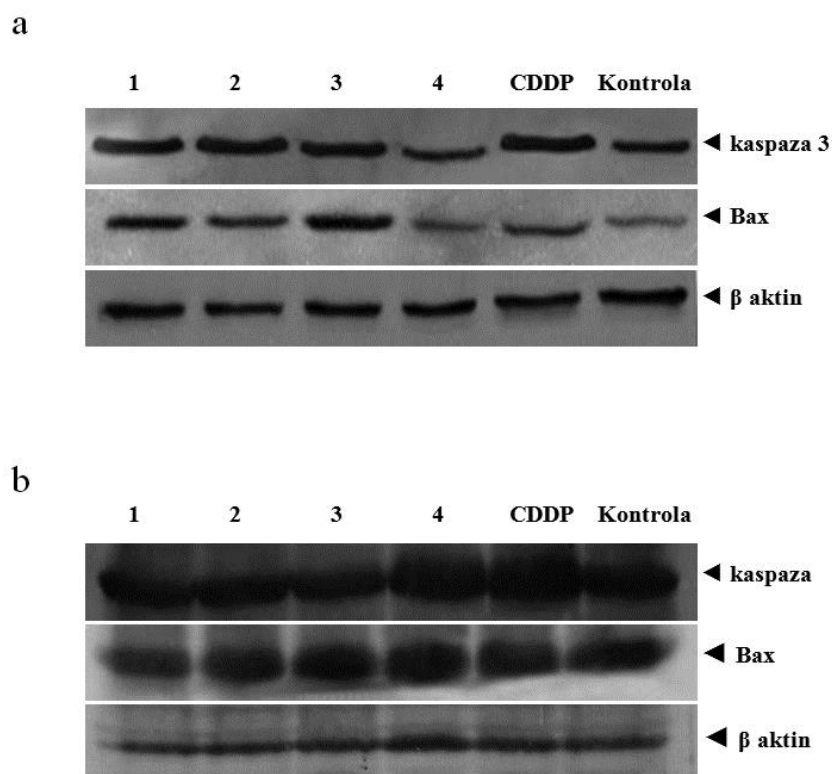
Slika 36. „Tube formation assay“ – test angiogeneze *in vitro* (na matrigelu). Prikazane su reprezentativne mikrografije EA.hy 926 ćelija u kontroli (netretirane) i tretirane 24 h kompleksima 1, 2, 3,4, i CDDP ($0,06 \times IC_{50}$).

4.3.5. Rezultati Western blot metode - efekat ispitivanih kompleksa na ekspresiju kaspaza 3 i Bax proteina

Western blot metodom ispitan je uticaj platinskih kompleksa na apoptozu EA.hy 926 ćelija, odnosno analiziran je njihov efekat na proteine Bax i kaspaza 3. Ćelije su tretirane 6 i 24 h kompleksima 1, 2, 3, 4 i CDDP u koncentraciji $0,5 \times IC_{50}$. Rezultati su prikazani na Slici 37.

Nivo ekspresije apoptotskog regulatora, Bax proteina, ne pokazuje promene nakon tretiranja EA.hy 926 ćelija ispitivanim kompleksima nakon 24 h kontinualne inkubacije. Pri smanjenoj dužini tretmana, odnosno nakon 6 h tretmana, u poređenju sa kontrolom kompleksi 1, 2 i 3 su indukovali povećanje nivoa Bax proteina, slično cispladini, dok kompleks 4 nema uticaja.

Kompleksi 1, 2 i 3 nemaju značajan uticaj na nivo proteina kaspaze 3 nakon 6 i 24 h delovanja. Kompleks 4 indukuje porast nivoc proteina kaspaze 3 nakon 24 h delovanja. Cisplatina ima efekat na povećanje nivoa kaspaze 3 i nakon 6 h, i nakon 24 h tretmana.



Slika 37. Rezultati Western blot analize nivoa ekspresije Bax i kaspaza 3 proteina nakon inkubacije od a) 6 h i b) 24 h. EA.hy 926 ćelije su tretirane kompleksima 1, 2, 3, 4, i CDDP (0,5xIC₅₀). Prikazani su reprezentativni eksperimenti.

4.3.6. Rezultati morfološke analize ćelijske smrti na fluorescentnom mikroskopu

Morfološke karakteristike ćelijske smrti EA.hy 926 ćelija, indukovane ispitivanim kompleksima platine nakon 6 i 24 h delovanja, analizirane su na fluorescentnom mikroskopu nakon bojenja tretiranih ćelija akridin-oranžom (AO) i etidijum-bromidom (EtBr) i reprezentativni rezultati su prikazani na Slici 38. i Slici 39.

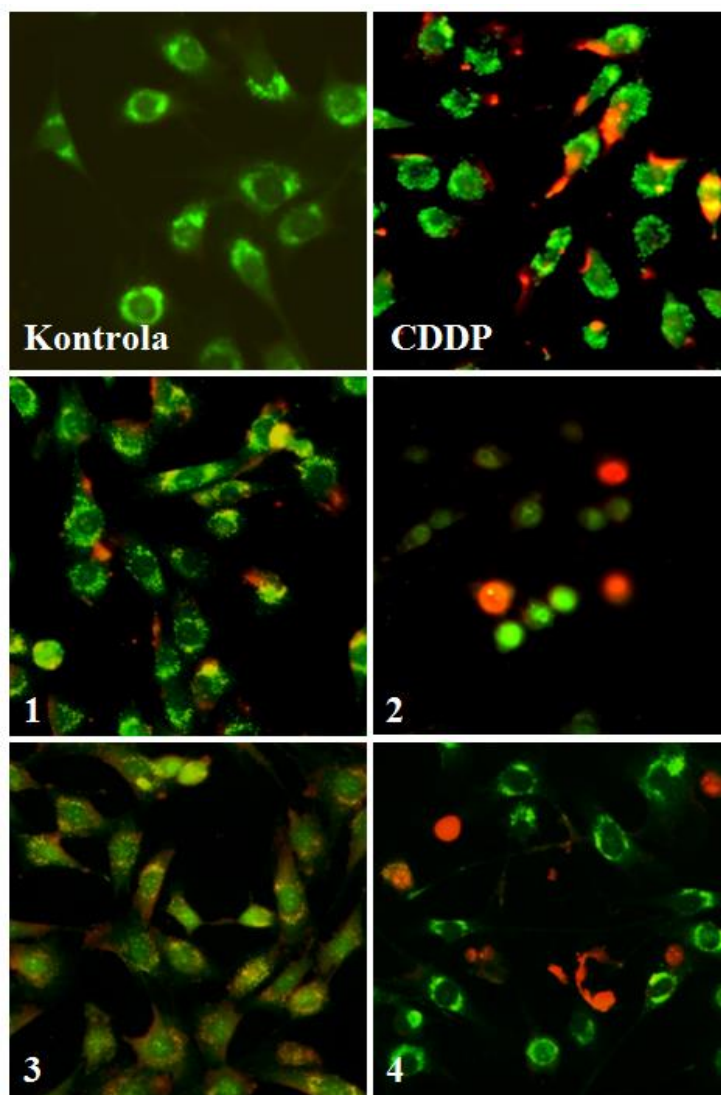
Akridin-oranž je DNK-RNK-pseudointerkalirajuća boja koja fluorescira zeleno. Koristi se za uočavanje morfoloških promena na nivou jedra. Akridin-oranž prolazi kroz intaktne membrane ćelija tako da ulazi u ćelije koje su žive ili podležu apoptozi. Etidijum-bromid je DNK-interkalirajuća boja koja fluorescira narandžasto. On ne prolazi kroz intaktnu ćelijsku membranu i akumulira se u nekrotičnim ćelijama ili ćelijama u kasnoj fazi apoptoze.

Pri dejstvu ispitivanih agenasa dolazi do smanjenja ukupnog broja ćelija u odnosu na kontrolu, smanjenja zapremine ćelije, ćelije gube svoju normalnu endotelnu morfologiju i zaokrugljuju se. Uočava se i kondenzacija jedarnog materijala, jedna od najznačajnijih karakteristika apoptoze, kao i ekscentrična postavljenost jedra, a na nekim mestima se uočava i baloniranje membrane, još jedna od značajnih karakteristika apoptoze. Veliki broj ćelija fluorescira narandžasto kao rezultat inkorporacije EtBr usled narušene strukture ćelijske membrane, što je karakteristično za kasniju fazu ćelijske smrti.

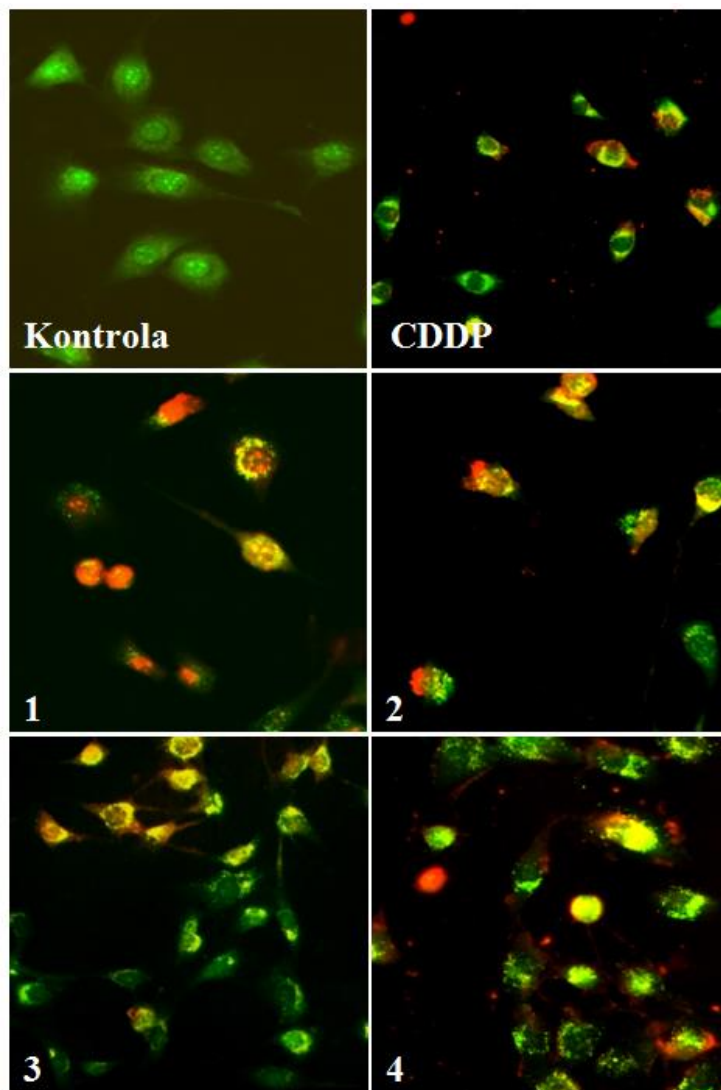
Nakon 6 h tretmana kompleksima u koncentracijama $0,5 \times IC_{50}$, dolazi do različitih promena morfologije ćelija u odnosu na intaktne kontrolne ćelije. Svi testirani kompleksi indukuju ranu i kasnu apotozu, dok kompleksi 2 i 4 imaju najjači efekat kada je smanjenje broja ćelija i promena morfologije u pitanju, odnosno izazivaju i pojavu malog broja nekrotičnih ćelija, pored indukcije apoptoze. Kompleksi 1 i 3, odnosno kompleksi sa 3-acetilpiridinskim ligandima imaju nešto slabiji efekat od kompleksa sa 4-acetilpiridinskim ligandima, i njihovo delovanje sličnije je delovanju cisplatine.

Nakon 24 h tretmana, svi kompleksi intenziviraju svoj efekat, odnosno povećan je procenat ćelija koje su u fazama rane i kasne apoptoze, odnosno nekroze, što je prikazano na Slici 39. *Trans*-platina(II) kompleksi imaju najjači efekat, i primetno je znatno smanjenje ukupnog broja ćelija u odnosu na kontrolne. Tačnije, kompleks 2 pokazuje najjače dejstvo, jer osim što utiče na drastično smanjenje broj ćelija, ne

uočavaju se zdrave ćelije, već su sve podlegle nekoj vrsti ćelijske smrti, a najveći broj ćelija je u fazama kasne apoptoze i nekroze.



Slika 38. Rezultati morfološke analize ćelijske smrti na fluorescentnom mikroskopu nakon 6 h tretmana EA.hy 926 ćelija kompleksima 1, 2, 3, 4, i CDDP. Prikazani su reprezentativni eksperimenti.



Slika 39. Rezultati morfološke analize ćelijske smrti na fluorescentnom mikroskopu nakon 24 h tretmana EA.hy 926 ćelija kompleksima 1, 2, 3, 4, i CDDP. Prikazani su reprezentativni eksperimenti.

5. DISKUSIJA

Nakon značajnog uspeha cisplatine u lečenju kancera, danas se intenzivno sprovodi veliki broj istraživanja u okviru kojih se sintetišu kompleksi raznih metala u potrazi za agensom koji bi pokazao jaču aktivnost od cisplatine, koji bi imao bolje farmakološke karakteristike, a manje negativnih efekata, i koji bi prevazišao rezistenciju karakterističnu za cisplatinu.

Radi dobijanja jedinjenja sa boljim antitumorskim dejstvom i ostalim poželjnim karakteristikama, neophodno je ispitivanje i razumevanje molekulskih i ćelijskih mehanizama koji leže u osnovi antikancerske aktivnosti kompleksa, a to je ujedno i od ključnog značaja za njihov klinički uspeh (Zhang et al., 2003). U klinička ispitivanja do sada ušli su brojni kompleksi metala i to kompleksi platine, germanijuma, titanijuma i rutenijuma (Keppler et al., 1996), dok veliki broj jedinjenja bakra, paladijuma, zlata, rutenijuma, rodijuma, nije dostigao taj nivo, već se zadržao na *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima (Keppler et al., 1996). Posebno su se istakli platinski kompleksi jer je pokazano da poseduju značajnu antitumorsku aktivnost, a odlikuje ih i širok spektar upotrebe (Lippert, 1999; Hambley, 2001; Fuertes et al., 2003; Ho et al., 2003; Wong et al., 2005; Pasetto et al., 2006; Jung et al., 2007; Zhang et al., 2010). Činjenica da se za lečenje više od 50 % pacijenata obolelih od kancera koriste platinski agensi, doprinela je da se veliki broj istraživanja posebno usmeri na razvoj istih (Dyson et al., 2006).

Takođe, dugo vremena se smatralo da *trans*-kompleksi platine ne poseduju antitumorsku aktivnost, pa su uglavnom izučavani samo platinski kompleksi sa *cis*-geometrijom. Neke studije opovrgle su dotadašnja verovanja, dokazujući da postoje *trans*-platinski kompleksi sa *in vitro* potencijalom inhibicije rasta tumorskih ćelija, kao i *trans*-platinski kompleksi sa *in vivo* antitumorskim karakteristikama (Farrell, 1989; Farrell, 1992; Leng et al., 2000). Pored toga, pokazano je i da *trans*-platina(II) i *trans*-platina(IV) kompleksi mogu imati povećanu citotoksičnu aktivnost kako na cisplatina senzitivnim tako i na cisplatina rezistentnim ćelijskim linijama, u poređenju sa njihovim *cis*-analogima, što ukazuje da *trans*-izomeri iskazuju značajan antitumorski potencijal i imaju drugačiji mehanizam delovanja na tumorske ćelije u poređenju sa svojim *cis*-izomerima (Hollis et al., 1991; Farrell et al., 1999; Montero et al., 1999; Silverman et al., 2002; Arandjelovic et al., 2005).

Glavne delove kompleksa metala čine metalni centri koji imaju afinitet da se vežu za negativno naelektrisane biomolekule, aminokiseline i nukleinske kiseline, i na taj način ostvare svoje dejstvo. Medicinska istraživanja se bave projektovanjem liganda koji će interagovati sa jonima metala (Zhang et al., 2003), jer upravo od liganda zavisi lipofilnost, hidrofилnost, reaktivnost kompleksa, kao i mogućnost supstitucije. Ligandi bi trebalo da budu lako odlazeće grupe, da bi na taj način mogla da se obezbedi dostupnost aktivnih mesta koja bi mogla da stupe u interakciju sa različitim biomolekulima (Quiroga, 2012).

Kada su ligandi u pitanju, pokazano je da supstitucija amino grupe planarnim piridinom utiče na povećanje citotoksične aktivnosti kompleksa, odnosno, pokazano je da zamenom NH_3 grupe aromatičnim planarnim aminom u transplatini (*trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$) i dobijanjem kompleksa generalne formule *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)\text{L}]$ (L=planarni N-ligand: tiazol, hinolin, benzotiazol, izohinolin, piridin, itd) dolazi do aktivacije *trans*-izomerije, tj. *trans*-platinski kompleksi tada postaju aktivniji od svojih *cis*-analoga (Farrell, 1993; Zou et al., 1993; Manic et al., 2001). Smatra se da ova strukturna izmena doprinosi povećanoj citotoksičnosti, što utiče na pojavu drugačijih interakcija sa DNK i drugačijeg mehanizma delovanja, s obzirom da aromatični planarni ligand stvara drugačije sterno okruženje oko platinskog centra.

Poznato je da su za antitumorsku aktivnost cisplatine i njenu interakciju sa DNK odgovorni hidratizirani oblici kompleksa platine(II). Kada se nađe u ćeliji na pH 7,2, cisplatina podleže reakciji hidrolize što rezultuje time da je 80 % cisplatine prisutno u vidu hidratisanog oblika *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$, 15 % je prisutno u vidu neutralnog nehidratiranog oblika *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, a 5 % je prisutno u vidu jona *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$. Kompleksi platine(II) u vodenim rastvorima zapravo podležu reakciji izmene jona, umesto halogenidnih anjona vezuju H_2O ili OH^- grupu, a dosadašnja istraživanja su pokazala da halogenidni anjoni Cl^- i Br^- u funkciji odlazećih liganada pospešuju citotoksičnost kompleksa platine(II) (Wang et al., 2001). S obzirom da su hloridni joni pokazani kao dobri odlazeći ligandi, novosintetisani kompleksi ispitivani u ovom radu imaju vezane hloridne jone za platinske centre.

Zbog svega navedenog, predmet ove disertacije bio je najpre ispitivanje citotoksičnog potencijala, a zatim i ispitivanje molekulskih mehanizama delovanja novosintetisanih *trans*-kompleksa platine sa novim ligandnim sistemima, kao i

poređenje njihovog efekta sa cisplatinom. Kompleksi *trans*-platine(II) i *trans*-platine(IV) koji su korišćeni u našim istraživanjima su prethodno sintetisani i okarakterisani (Rakić et al., 2009; Rakić et al., 2012), i to su:

- kompleks 1 - *trans*-[PtCl₂(3-acpy)₂];
- kompleks 2 - *trans*-[PtCl₂(4-acpy)₂];
- kompleks 3 - *trans*-[Pt(3-acpy)₂Cl₂];
- kompleks 4 - *trans*-[Pt(4-acpy)₂Cl₂].

Ispitivani kompleksi sadrže ligande koji su derivati piridina, odnosno sadrže 3-acetilpiridinske i 4-acetilpiridinske ligande, dok pored navedenih ligandnih sistema sadrže i hloridne jone vezane za metal, pri čemu kompleksi *trans*-platine(II) imaju vezana po dva hloridna jona, a kompleksi *trans*-platine(IV) imaju vezana po četiri hloridna jona. Sve navedeno čini ispitivane komplekse platine dobrim kandidatima za ispitivanje molekularnih mehanizama citotoksične aktivnosti, što je i bio predmet naših istraživanja.

5.1. Citotoksičnost testiranih kompleksa

Preliminarno određivanje citotoksične aktivnosti ispitivanih kompleksa SRB i MTT testovima urađeno je na panelu od 9 ćelijskih linija, među kojima su šest tumorskih, dve transformisane endotelijalne i jedna normalna ćelijska linija, a pored pomenutih *trans*-platinskih kompleksa, korišćena je i cisplatina kao referentno jedinjenje.

Citotoksična aktivnost određivana je na HeLa ćelijama zbog njihove izuzetne izdržljivosti pri različitim *in vitro* eksperimentima, a održavanje kulture HeLa ćelijske linije je relativno jednostavno i nije skupo. Aplikacija ovakve kulture ćelija za određivanje citotoksičnosti omogućava brzo i visoko reproducibilno testiranje. Zatim, korišćene su i druge humane tumorske ćelijske linije MDA-MB-453, LS-174, A549, FemX, sa ciljem utvrđivanja nivoa antitumorske aktivnosti ispitivanih kompleksa kod kancera dojke, kolona, pluća i kože, kao i utvrđivanja da li su kompleksi kancer-

selektivni ili poseduju generalni antitumorski potencijal. Takođe je citotoksična aktivnost određivana na B16 ćelijama mišjeg melanoma, zbog potencijalnog daljeg ispitivanja novih kompleksa u okviru *in vivo* istraživanja. Transformisane endotelijalne linije MS1 i EA.hy 926 korišćene su radi daljeg ispitivanja angiogeneze, ali prvobitno smo morali da utvrdimo da li kompleksi pokazuju citotoksičnost na tim linijama i u kojoj meri. Posebno je značajno korišćenje normalne zdrave ćelijske linije fetalnih humanih fibroblasta pluća (MRC-5) jer terapijski potencijal i klinička upotreba antikancerskih jedinjenja mogu biti ograničeni usled velike toksičnosti prema zdravim ćelijama, a zna se da upravo cisplatina iskazuje brojne neželjene toksične efekte što utiče na njenu ograničenu upotrebu. Za dalji razvoj određenih kompleksa kao antikancerskih agenasa bitna je selektivnost koja se odnosi na potencijal nekih kompleksa da imaju manju citotoksičnost na zdravoj, a veću na tumorskoj liniji, u poređenju sa cisplatinom.

Rezultati analize citotoksičnosti ispitivanih kompleksa pokazali su da svi testirani kompleksi poseduju značajnu antiproliferativnu aktivnost i to prema svim ćelijskim linijama na kojima je aktivnost ispitivana – o tome svedoče dobijene IC_{50} vrednosti koje variraju u opsegu koncentracija do 100 μ M.

Značajno je da su ispitivani kompleksi manje aktivni na „zdravoj“ MRC-5 liniji, pokazujući citotoksičnost 3-5 puta manju od citotoksičnosti cisplatine na istoj liniji. S obzirom da je od otkrića cisplatine dosta istraživanja sprovedeno sa ciljem pronalaska agenasa koji bi bio više toksičan po tumorske, a manje toksičan po zdrave ćelije, ovo ukazuje da su svi ispitivani *trans*-platinski kompleksi (kompleksi 1, 2, 3, i 4) u tom smislu potencijalno dobri kandidati za dalja istraživanja. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima nekih prethodno izvedenih studija, kada su kompleksi *trans*-platine(IV) sa karbamatskim ligandima takođe pokazali manju citotoksičnost na MRC-5 liniji od cisplatine (Wilson et al., 2011).

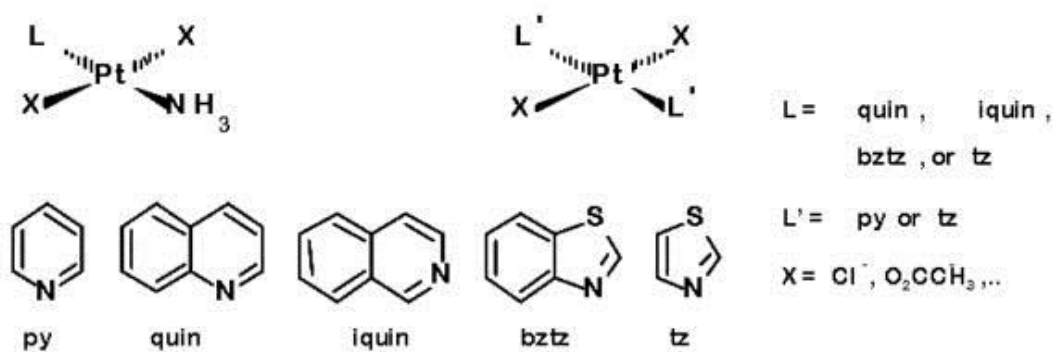
Pored značajnih rezultata dobijenih ispitivanjima na MRC-5 ćelijskoj liniji, testirani *trans*-platinski kompleksi su na transformisanoj EA.hy 926 liniji ispoljili najveći efekat, jači i do deset puta od cisplatine. Upoređujući samo komplekse sa *trans*-geometrijom, jasno je da kompleksi *trans*-platine(II) imaju jače citotoksično delovanje od kompleksa *trans*-platine(IV), i to čak 5-10 puta.

Rezultati na ćelijama kancera grlića materice (HeLa) pokazali su da su *trans*-platina(II) kompleksi veoma citotoksični, više od *trans*-platina(IV) kompleksa, pri čemu se kompleks 2 istakao, i njegova aktivnost je u nivou aktivnosti cisplatine. Ovo je u korelaciji sa rezultatima ranijih istraživanja na HeLa ćelijama koja su istakla značajnu citotoksičnu aktivnost *trans*-kompleksa platine sa aromatičnim planarnim aaminskim ligandima (*trans*-[Pt(Py)₂Cl₂]), u poređenju sa *cis*-izomerima (Arandjelovic et al., 2002; Manic et al., 2005).

Postoje podaci da razlike u reaktivnosti platina(IV) kompleksa zavise od reakcija redukcije platina(IV) do platina(II) (Raynaud et al., 1996; Cubo et al., 2011; Wilson et al., 2011). Kompleksi platine(IV) su kinetički inertniji od svojih platina(II) analoga, i smatra se da antitumorski efekat platina(IV) jedinjenja zavisi dakle od njihove biološke redukcije u citotoksičnu platina(II) formu nakon što uđu u ćeliju (Shi et al., 2012). Priroda aksijalnog liganda utiče na redukcionu potencijal kompleksa i može biti podešena da se postigne optimalno oslobađanje platine(II). Takođe i priroda ekvatorijalnih liganda ima uticaja na redukcionu potencijal kompleksa platina(IV), ali aksijalni ligandi imaju jače delovanje (Hall et al., 2002). Jedinjenja platine(IV) sa funkcionalnim ligandima mogu služiti kao pro-lekovi, s obzirom da su oni stabilni i mogu se transportovati do mete delovanja gde će preći u svoju aktivnu citotoksičnu formu platine(II) (Shi et al., 2012). Pored toga, ukoliko postoje i male razlike u strukturi platina(IV) kompleksa, npr. u zavisnosti od vrste i položaja liganda, u ovom slučaju kada su kompleksi bliski strukturni izomeri (kompleksi 3 i 4), to utiče na razlike u ispoljavanju biološke aktivnosti *in vitro*. Jedna od studija se bazirala na ispitivanju platina(IV) kompleksa sa *trans*-aminskim ligandima, koji su ispoljili visoku citotoksičnost, blisku citotoksičnosti srodnih platina(II) kompleksa. Zaključak je bio da je dolazilo do brze redukcije platina(IV) kompleksa, što može biti usled specifične „*trans*-organizacije“ liganada (Cubo et al., 2011).

Spomenuto je već da zamena nosećeg liganda NH₃ planarnim aminima kao što je piridin deluje na aktivaciju *trans*-geometrije, utičući na citotoksičnost, koja postaje bliska onoj koju ispoljava cisplatina (Farrell et al., 1989). Uopšte, transplatinski aromatični heterociklični kompleksi iskazuju citotoksičnu aktivnost sličnu onoj koju ispoljavaju njihovi *cis*-izomeri i cisplatina, dok su ujedno znatno efikasniji od transplatine (Farrell et al., 1992). Kompleksi opšte formule *trans*-[PtCl₂(Py)₂] (Py =

piridin) ispoljili su značajnu aktivnost na panelu humanih tumorskih ćelija, čak i na cisplatina rezistentnim linijama. Ova aktivacija *trans*-strukture korišćenjem planarnih amina je potvrđena i za mnoge druge kombinacije i vrste kompleksa/liganada (*trans*-[PtCl₂(NH₃)(L)], L=piridin, hinolin, kvinolin, tiazol, itd. – Slika 40) (Farrell, 1996; Aris et al., 2009). Skorašnja studija, takođe je pokazala i potvrdila značajan potencijal *trans*-kompleksa sa piridinskim ligandima, koji su ispitivani na više tumorskih ćelijskih linija: platina(II) kompleksi pokazali su se kao citotoksičniji od paladijumskih kompleksa, pri čemu je jedan od njih pokazao veću antikancersku aktivnost i od transplatine, cisplatine, karboplatine i oksaliplatine (Icsele et al., 2013).



Slika 40. Citotoksični *trans*-platinski kompleksi sa planarnim aminima (preuzeto iz Aris et al., 2009).

Svaki novi platinski agens koji ispolji značajnu antitumorsku aktivnost u poređenju sa onima koji su već u kliničkoj upotrebi smatra se dobrim kandidatom za dalja istraživanja. Tako je izvršeno ispitivanje citotoksičnosti 107 platinskih jedinjenja na NCI panelu humanih tumorskih ćelija, a rezultati su analizirani korišćenjem posebnog algoritma i brojnim numeričkim metodama (Fojo et al., 2005). Među analiziranim grupama jedinjenja posebno se istakla „piridinska“ grupa, koju su činili

samo *trans*-platinski kompleksi sa planarnim aminima, uključujući i one sa formulom *trans*-[PtCl₂(Py)₂]. Ova grupa jedinjenja istakla se novim citotoksičnim profilom i aktivnošću na cisplatina rezistentnim i oksaliplatina rezistentnim linijama. Takvi rezultati ukazali su da *trans*-kompleksi ne poseduju samo drugačiju selektivnost, već i da imaju drugačije mehanizme delovanja, uključujući mehanizme koji mogu da prevaziđu rezistenciju, za razliku od cisplatine. Utvrđeno je da se generalne osobine ovih jedinjenja razlikuju od onih koje pokazuju cisplatina i oksaliplatina, te da bi to moglo da dovede i do razlika u delovanju pri kliničkim ispitivanjima (Fojo et al., 2005). Isto tako, rezultati koje smo mi prikazali u ovom radu ukazali su na značajan antitumorski potencijal ispitivanih kompleksa, čije je mehanizme delovanja bilo bitno istraživati dalje, jer postoji mogućnost da se razlikuju od mehanizama poznatih citostatika (cisplatine), pa tako pokazuju perspektivu za dalja istraživanja, koja bi mogla uključiti *in vivo* eksperimente, a možda i klinička ispitivanja.

Rezultati citotoksičnih testova pokazuju da se jedan od kompleksa izdvaja od drugih, a to je kompleks 2, koji ima najveći citotoksični potencijal, odnosno njegove IC₅₀ vrednosti su 2-10 puta manje od vrednosti ostalih *trans*-kompleksa u zavisnosti od tipa tumorske linije koja je korišćena. S obzirom na male razlike u strukturi u odnosu na ostale komplekse, ukoliko upoređujemo samo rezultate *trans*-platina(II) kompleksa, izgleda da para- položaj acetil supstituenta na piridinskom prstenu (4-acetilpiridin, u okviru *trans*-[PtCl₂(4-acpy)₂] kompleksa) utiče na povećanje aktivnosti u odnosu na kompleks 1, kod koga je acetil supstituent u meta-položaju (3-acetilpiridin). Kada se kompleks 2 uporedi sa *trans*-platina(IV) kompleksima, može da se zaključi da promena strukture u smislu povećanja veličine samog kompleksa utiče na smanjenje njegove citotoksičnosti, što se dešava kod *trans*-platina(IV) kompleksa. Moguće je da aromatični planarni ligandi i hloridni joni stvaraju drugačije sterno okruženje oko platinskog centra nego u slučaju platina(II) kompleksa, a uticaja ima i redukciona reakcija platina(IV). Dakle, pokazali smo da promena mesta supstituenta u okviru liganda, ili dodavanje hloridnih jona može značajno da utiče na reaktivnost kompleksa i intenzitet njegove citotoksičnosti.

Poznato je da su ćelije različitog porekla različito osetljive na dejstvo istog agensa, stoga su radi boljeg poređenja razlika u intenzitetu i mehanizmu citotoksičnosti dejstva ispitivanih kompleksa detaljnije analize vršene na odabranim ćelijskim linijama.

Tačnije, nakon analize prethodno iznetih rezultata citotoksičnosti, odlučili smo da dalja istraživanja mehanizma delovanja kompleksa podelimo na dva dela, i ograničimo ih na odabrane ćelijske linije, radi boljeg utvrđivanja i razumevanja njihove biološke aktivnosti *in vitro*.

Jedan deo naših istraživanja bio je usmeren na analizu molekulskih mehanizama delovanja samo *trans*-platina(II) kompleksa na HeLa ćelijama, a drugi deo istraživanja odnosio se na ispitivanje sva četiri *trans*-platinska kompleksa na EA.hy 926 liniji, koja je poslužila, između ostalog, kao dobar model za izučavanje angiogeneze. Cisplatina je korišćena kao referentno jedinjenje u svim segmentima istraživanja, radi poređenja uticaja jedinjenja sa *cis*- i *trans*- geometrijom. Istraživali smo mehanizam *in vitro* antitumorske aktivnosti u cilju razumevanja odnosa i uticaja strukture kompleksa i mehanizma delovanja – pokušali smo da utvrdimo da li strukturne razlike, kao što je na primer pozicija acetil-supstituenta na piridinskom ligandu, imaju nekog uticaja.

5.2. Uticaj ispitivanih kompleksa na promene u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa i na apoptozu ispitan metodom na protočnom citometru

Faze ćelijskog ciklusa nisu podjednako osetljive na dejstvo citotoksičnih lekova, pa tako neki od njih mogu delovati samo na određene faze, dok drugi mogu delovati na sve faze ćelijskog ciklusa. Stoga je za razumevanje mehanizma citotoksičnog dejstva nekog agensa važno poznavanje dejstva na kinetiku ćelijskog ciklusa (Jančić-Zguricas et al., 1995). Pored toga, moderan dizajn lekova i utvrđivanje mehanizama delovanja istih, zasnovani su na ispitivanju sposobnosti nosivih jedinjenja da indukuju apoptozu kao manje agresivan tip ćelijske smrti. Smatra se da je potencijal indukcije apoptoze odgovoran za uspeh terapije, a poznato je i da je apoptoza glavni odgovor na hemioterapiju mnogih lekova koji su već u kliničkoj upotrebi, među kojima je i cisplatina (Sedletska et al., 2005).

U cilju ispitivanja korelacije antiproliferativne aktivnosti kompleksa na odabranim ćelijskim linijama HeLa i EA.hy 926 i njihovog mehanizma delovanja, analizirali smo njihov potencijal da indukuju promene na nivou ćelijskog ciklusa i apoptozu korišćenjem protočnog citometra.

Pri analizi ćelijskog ciklusa HeLa ćelija, istakao se kompleks 1, koji izaziva najznačajnije promene – zastoj S faze slično cisplatinu, ali i smanjenje G0/G1 broja ćelija u odnosu na netretirane kontrolne ćelije. Odnosno, rezultati protočne citometrije pokazali su da je antiproliferativna aktivnost kompleksa 1 povezana sa zastojem ćelijskog ciklusa u S fazi, kao i značajnom inicijacijom ćelijske smrti. Uzrok tome je nagomilavanje oštećenja DNK, pa ćelija zaustavlja ciklus u S fazi, ne dozvoljavajući dalju progresiju i sintezu – replikaciju DNK, dok se nastale DNK lezije ne poprave; ali ukoliko do toga ne dođe ćelije podležu apoptozi, što je bio logičan sled događaja pri delovanju kompleksa *trans*-[PtCl₂(3-acpy)₂]. Zastoj u S fazi i blokada dalje replikacije DNK izazvana delovanjem cisplatine je u saglasnosti sa rezultatima ranijih studija (Wang et al., 2005; Benassi et al., 2007), a naša istraživanja su ukazala na sličnost delovanja cisplatine i kompleksa 1 po pitanju dejstva na ćelijski ciklus. Cisplatina deluje i na druge faze, odnosno, ćelijski ciklus se zaustavlja u G2/M fazi, što pokreće delovanje komponenti NER sistema za popravku DNK oštećenja (Ramos-Lima et al., 2010). Kada je u pitanju indukcija ćelijske smrti, kompleks 1 u koncentraciji IC₅₀ indukuje značajan procenat ćelija u nekrozi ukoliko se uporedi sa delovanjem kompleksa 2 i cisplatine, a to se uočava već nakon 4 h trajanja tretmana. Odnosno, procenat ćelija u apoptozi i nekrozi uzrokovan delovanjem kompleksa 1 raste sa proizvodnjom tretmana sa 4 na 24 h. Kompleks 2 indukuje apoptozu u sličnom nivou kao CDDP, pri čemu je njegova kinetika delovanja slična kinetici delovanja cisplatine.

Na EA.hy 926 liniji ispitana su sva četiri *trans*-kompleksa, kao i cisplatina, i na osnovu dobijenih rezultata ističe se kompleks 4, koji ima najveći potencijal da izazove promene u fazama ciklusa EA.hy 926 ćelija, kao i najveći potencijal za indukciju njihove apoptoze:

- sub-G1 procenat ćelija raste sa 2,6 % u kontroli na 81,9 % kod ćelija koje su tretirane kompleksom 4;
- svi kompleksi smanjuju procenat G1 ćelija, pri čemu kompleks 4 ima najveći efekat (smanjuje broj G1 ćelija za oko 5 puta);
- samo kompleks 4 ima značajan efekat na S fazu ćelijskog ciklusa, izazivajući opadanje procenta ćelija u S fazi;
- kompleksi 1, 2 i 3 povećavaju G2/M procenat ćelija slično cisplatinu, dok kompleks 4 deluje suprotno – smanjuje broj ćelija u G2/M fazi;

- svi kompleksi (uključujući CDDP) indukuju povećanje procenta ćelija u ranoj i kasnoj apoptozi, dok je procenat ćelija u nekrozi zanemarljiv;
- svi *trans*-kompleksi indukuju dominantno ćelijsku smrt EA.hy 926 ćelija putem apoptoze, i imaju sličan efekat i kinetiku delovanja kao cisplatin.

Analizirajući delovanje kompleksa 4, možemo pretpostaviti da neuspeli pokušaj popravke oštećenja na DNK rezultuje apoptozom, a shodno tome i povećanjem broja ćelija u sub-G1 fazi ciklusa (apoptotskoj frakciji), jer ćelije koje ne uspevaju da prođu kroz S i G2/M faze podležu apoptozi (Amundson et al., 1998). Pretpostavljamo da kompleks 4 uzrokuje niz oštećenja DNK, koje reparacioni mehanizmi nisu u stanju da poprave, što onemogućava ćelijama odvijanje normalnog ćelijskog ciklusa i prolazak kroz faze, već se DNK oštećenja nagomilavaju i one uglavnom podležu apoptozi, što rezultati i pokazuju. Takođe, apoptoza izazvana kompleksima 1, 2, 3 i cisplatinom kreće usled zastoja G2/M faze, na šta ukazuje njihov uticaj na povećanje procenta ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa, što je u korelaciji sa ranije objavljenim rezultatima (Ormerod, 1994). Ćelije zaustavljanjem ciklusa u G2/M fazi pokušavaju da stopiraju ulazak u mitozu dok se ne obezbede svi neophodni uslovi za to, međutim ukoliko do toga ne dođe, kao što se dešava pri delovanju kompleksa 1, 2, 3 i CDDP, ćelije podležu apoptozi, što se uočava analizom na protočnom citometru, pa dolazi do povećanja broja ćelija koje se boje samo aneksin V-FITC, ili i propidijum jodidom i aneksinom.

S obzirom da smo pokazali da se *trans*-kompleksi ističu svojim delovanjem pri analizama na protočnom citometru, potvrdili smo rezultate prethodno izvedene studije (Arandjelovic et al., 2002), koja je pokazala da na ćelijama kancera cerviksa *trans*-kompleksi imaju i do četiri puta veću citotoksičnost, kao i veći potencijal indukcije apoptoze u poređenju sa *cis*-izomerima.

Rezultati protočne citometrije koje smo dobili su u korelaciji sa ranije dobijenim rezultatima vezanim za promene ćelijskog ciklusa kada je pokazano da kompleksi opšte formule *trans*-[PtCl₂(Py)₂] (Py = piridin) utiču na zastoj ćelija u S fazi, odnosno smanjenje G1 broja ćelija pri istim koncentracijama – jednakim IC₅₀ (Manic et al., 2001).

Na osnovu rezultata antiproliferativne aktivnosti i protočne citometrije, koji se odnose na apoptozu i promene ćelijskog ciklusa, nismo mogli da utvrdimo tačnu vezu između strukture i aktivnosti ispitivanih platinskih kompleksa, s obzirom da nije bilo

uočljivih pravilnosti u mehanizmima delovanja ovih agenasa. Zbog toga je bilo neophodno dalje istraživati delovanje ovih jedinjenja.

Poznato je da je apoptoza glavni odgovor na hemioterapiju mnogih lekova, uključujući i cisplatinu, te se stoga intenzitet indukcije apoptoze smatra odgovornim za uspeh terapije. To je dovelo do toga da je moderan dizajn lekova zasnovan na ispitivanju sposobnosti novosintetisanih antikancerskih agenasa da indukuju apoptozu kao manje agresivan tip ćelijske smrti, i na taj način se omogući selekcija među brojnim novim hemioterapeuticima (Sedletska et al., 2005). Imajući to u vidu, možemo na osnovu preliminarnih rezultata suditi o tome koji kompleks od svih ispitanih je dobar potencijalni antikancerski agens, ali neophodno je istražiti i druge aspekte mehanizma delovanja, među kojima značajno mesto zauzimaju interakcije kompleksa sa DNK.

5.3. Uticaj kompleksa na unutarćelijsku akumulaciju i distribuciju platine

U okviru istraživanja vezanih za proučavanje mehanizma citotoksičnog delovanja potencijalnih antikancerskih jedinjenja, značajno je utvrditi koja su njihova ključna mesta delovanja u ćeliji. Svakako, svaki od ispitivanih platinskih kompleksa utiče na izvesnu akumulaciju platine unutar ćelije, ali različito – u smislu nivoa/količine akumulirane platine, i u smislu lokacije/vezivanja platine za unutarćelijske komponente. Mehanizam antikancerskog delovanja platinskih kompleksa je povezan sa njihovim afinitetom vezivanja sa DNK. Nivo vezivanja platine za DNK pruža značajnije informacije o aktivnosti kompleksa nego ukupna ćelijska akumulacija platine, jer platina često podleže vezivanju za druge ćelijske komponente, tako da samo mali deo leka ima mogućnost da dođe do DNK i tu se veže (Zorbas et al., 2005). Međutim, iako je prihvaćeno da je DNK glavna farmakološka meta u okviru mehanizma citotoksične aktivnosti cisplatine, postoje podaci da i druge ćelijske komponente mogu biti mete, odnosno mogu biti deo citotoksičnog mehanizma delovanja lekova. Tako je pokazano da se cisplatina vezuje za mitohondrijalnu DNK, mnoge unutarćelijske proteine, interaguje sa fosfolipidima i fosfatidil-serinom u membrani, utiče na polimerzaciju aktina, itd (Jamieson et al., 1999).

Uz pomoć ICP-OES metode analizirali smo distribuciju platine(II) u proteinskoj i DNK frakciji HeLa ćelija tretiranih 6 i 24 h ispitivanim kompleksima, u koncentraciji jednakoj $0,5 \times IC_{50}$. Rezultati vezivanja platine za DNK, prikazani u formi pg Pt/mg DNK, pokazali su da kompleks 2 ima najslabiji uticaj na platinaciju DNK nakon 6 h tretmana, tako da je količina vezane platine trostruko manja od količine platine koja se veže za DNK delovanjem kompleksa 1. Međutim, nakon 24 h, nivoi vezane platine za DNK se skoro izjednačavaju za oba *trans*-kompleksa i cisplatinu.

Prikazani rezultati, koji pokazuju uticaj vezivanja platine za DNK delovanjem kompleksa 1 i 2, su u skladu sa hipotezom da manje strukturne modifikacije nosećeg liganda u *trans*-mononuklearnom platinskom kompleksu mogu da utiču na izmene u biološkoj/farmakološkoj aktivnosti ovih novih kompleksa u odnosu na cisplatinu (Ramos-Lima et al., 2006). Odnosi između strukture i aktivnosti ukazuju na mogućnost da acetil-grupa u para-položaju na planarnom piridinskom prstenu (4-acetilpiridin) u okviru kompleksa 2, može da otežava pozicioniranje neodlazećih delova u aduktima ovog analoga, što bi bilo potpuno povoljno za njegovu interakciju sa dvostrukim heliksom (Ramos-Lima et al., 2006). Trebalo bi naglasiti i da nivoi vezane platine za DNK, pod uticajem kompleksa 2, koji blago opadaju tokom 24 h tretmana u odnosu na delovanje kompleksa 1 i cisplatine, ukazuju na stabilnost platinskih DNK lezija koje su indukovane delovanjem kompleksa 2.

Kompleksi pokazuju slične efekte i pri vezivanju za unutarćelijske proteine HeLa ćelija, što je isto moguće usled malih razlika u strukturi, i to tako što kompleks 1 indukuje najveće vezivanje platine za proteine i posle 6 h i posle 24 h tretmana, dok kompleks 2 pokazuje najmanji afinitet za vezivanje. Tokom vremena nivo platine vezane za proteine opada u slučaju *trans*-platina(II) kompleksa, dok cisplatinu ima suprotan efekat, odnosno nivo platine vezane za proteine pokazuje blagi porast pod uticajem CDDP sa produžavanjem tretmana. Ranije studije ukazale su na to da platinski agensi koji se razlikuju po načini vezivanja za DNK od cisplatine, imaju izmenjena farmakološka svojstva (Vrana et al., 1986; Farrell et al., 1992). Takođe, studije sprovedene na HeLa ćelijama ukazale su na dobar potencijal unutarćelijske akumulacije *trans*- i *cis*- izomera $[Pt(Py)_2Cl_2]$ jedinjenja u smislu slične indukcije vezivanja platine za proteinsku frakciju (Arandjelovic et al., 2002), iako su pokazali različitu citotoksičnu

aktivnost. To ukazuje da unutarćelijska akumulacija platine *cis*- i *trans*- izomera nije u korelaciji sa citotoksičnom aktivnošću (Eastman et al., 1988).

Rezultati dobijeni metodom ICP-MS na EA.hy 926 ćelijskoj liniji pokazali su da svi testirani kompleksi povećavaju afinitet vezivanja platine za DNK sa produžavanjem tretmana sa 6 na 24 h, kao i da *trans*-kompleksi platine(II) imaju veći afinitet za vezivanje od platina(IV) kompleksa. *Trans*-platinski kompleksi pokazuju efekat sličan cisplatinu, dok se kompleks 2 ističe kao kompleks koji ima najveći uticaj na indukciju vezivanja platine za DNK: nakon 6 h tretmana indukuje vezivanje 5,6 pg Pt/ μ g DNK, dok nakon 24 h tretmana količina vezane platine raste na 131,8 pg Pt/ μ g DNK.

Slično kao i pri vezivanju za DNK, kompleksi *trans*-platine(II) imaju jači uticaj na vezivanje platine za unutarćelijske proteine EA.hy 926 ćelija od kompleksa *trans*-platine(IV), čiji je efekat delovanja sličniji cisplatinu. Ukupna unutarćelijska akumulacija platine raste sa produžavanjem vremena delovanja kompleksa na EA.hy 926 ćelije, sa akcentom opet na komplekse platine(II) koje uzrokuju akumulaciju platine u najvećoj količini. Ali, uočavamo da iako *trans*-platina(II) kompleksi poseduju sličnu citotoksičnu aktivnost, imaju različito delovanje na unutarćelijsku distribuciju platine, što potvrđuje rezultate ranijih studija da platinska akumulacija u ćeliji nema uticaja na citotoksičnost kompleksa i obrnuto (Lazic et al., 2010). Slabiji potencijal kompleksa platine(IV) u ovom slučaju može se objasniti time da antitumorski efekat platina(IV) kompleksa zavisi od mehanizma i kinetike reakcije njihove biološke redukcije u citotoksičnu platina(II) formu nakon što uđu u ćeliju (Shi et al., 2012). Kod kompleksa 2 je uočeno da se nakon 6 h više platine vezuje za proteine, a manje za DNK, dok produženjem tretmana na 24 h kako dolazi do povećanja ukupne unutarćelijske akumulacije tako dolazi do suprotne reakcije – raste količina DNK-vezane platine, a manje platine ostaje vezano za proteine, što svedoči o tome da se rastuća količina platine koja ulazi u ćeliju raspoređuje unutar ćelije na određen način, koji ovaj kompleks izdvaja od drugih testiranih kompleksa. To se može objasniti povećanim afinitetom platine da se veže za DNK i uzrokuje lezije koje su stabilne, pri čemu su afinitet interakcija sa DNK i stabilnost nastalih lezija dosta jači u poređenju sa interakcijama koje platina ima sa ostalim unutarćelijskim komponentama.

Uvođenje aromatičnog planarnog liganda menja modalitet interakcije *trans*-platinskog kompleksa sa DNK u poređenju sa cisplatinom i transplatinom, jer se stvara

drugačije stereo okruženje oko centralnog jona platine(II). Pokazano je da planarni piridinski ligand (py) podstiče odvijanje heliksa prilikom vezivanja *trans*-platinskih kompleksa. Odnosno, planarni aromatični ligandi kao što su hinolin i tiazol, imaju potencijal da formiraju veći broj interlančanih *trans*-platinskih-DNK mostova u poređenju sa transplatinom. Platinski-DNK mostovi se uglavnom formiraju na sekvencama 5'-GC-3'/5'-GC-3' dvostrukog heliksa DNK. Uvođenjem planarnog hinolina u *trans*-platinski kompleks se ne menja kinetika formiranja monoadukta kompleksa sa DNK, niti kinetika prevođenja monodentatnog adukta u bidentatni. Adukti koje formira *trans*-platinski kompleks sa hinolinskim ligandom indukuju konformacionu promenu DNK heliksa sličnu onoj koju uzrokuje cisplatina, pa ih prepoznaju cisplatina specifična antitela. Međutim, zahvaljujući prirodi aromatičnog prstena, kao i svojoj geometrijskoj lokaciji u kompleksu (*trans*-položaj), hinolin formira steking interakcije sa bazama DNK i tako narušava konformaciju heliksa, što je u osnovi aktivnosti ovog *trans*-kompleksa u odnosu na *cis*-izomer (Bierbach et al., 1999; Brabec et al., 2000). Sve to može uticati na drugačije interakcije sa DNK, uključujući i vezivanje i stabilnost nastalih DNK veza, kao i citotoksičnost, pa se pretpostavlja da strukture jedinjenja, odnosno sama priroda liganada vezanih za platinski centar, imaju ključni uticaj na razlike u mehanizmima delovanja naših kompleksa, na šta ukazuju i rezultati koje smo dobili i opisali.

Rezultati unutarćelijske akumulacije i distribucije platine nisu uvek u skladu sa rezultatima citotoksičnih testova, kao što je pokazano na ćelijama kancera cerviksa (HeLa), ali rezultati na EA.hy 926 ćelijskoj liniji su pokazali da su *trans*-kompleksi platina(II) citotoksičniji od kompleksa platina(IV), kao i da poseduju bolji efekat delovanja kada su u pitanju platinacija DNK i proteina. Ovaj zaključak pokrenuo je dodatna istraživanja, jer je ukazao na kompleksnost mehanizma delovanja, koji uključuje mnogo koraka koji su povezani na više načina, i čija je zavisnost mnogostruka i veoma složena.

5.4. *In vitro* antimetastatski i antiangiogeni potencijal ispitivanih kompleksa

Metastaziranje predstavlja višestepeni proces koji uključuje invazivnost, adheziju, migraciju i proteolitičku aktivnost, kao i angiogenezu, pa prema tome antimetastatski potencijal može biti ispitan na više nivoa. *In vitro* antimetastatski potencijal kompleksa ispitan je na više različitih načina korišćenjem nekoliko različitih ćelijskih linija, odabranih na osnovu njihove osetljivosti na citotoksičnost kompleksa i/ili osobine da služe kao dobri modeli za ispitivanje angiogeneze.

Najpre smo istraživali inhibitorni efekat kompleksa na aktivnost matriksnih metaloproteinaza (MMP), jer one imaju ulogu u procesima rasta primarnog tumora, angiogeneze, migracije i invazije metastatskih ćelija u sekundarne organe, kao i u procesima inicijacije i pospešivanja rasta tumora na metastatskom mestu. Matriksne metaloproteinaze mogu da inhibiraju ili indukuju progresiju tumora sečenjem različitih bioaktivnih supstrata. Matriksne metaloproteinaze 2 i 9, čiji su nivoi često povišeni u tumorskim ćelijama, igraju ključnu ulogu u modulacijama vanćelijskog matriksa, ćelijskoj migraciji, angiogenezi, pa su stoga često predmet različitih istraživanja, i predstavljaju potencijalni target za delovanje i razvoj novih antikancerskih agenasa (Kim et al., 2011). Matriksne metaloproteinaze 2 i 9 imaju povećanu ekspresiju kod kancera dojke, kože, debelog creva, pluća, ovarijuma i prostate. Odnosno, pokazano je da je povećan nivo aktivnosti MMP-2 i MMP-9 povezan sa povećanjem metastatskog potencijala tumorskih ćelija, što ukazuje na značajnu ulogu ovih matriksnih metaloproteaza u procesu metastaziranja (Mook et al., 2004). Stoga je njihova aktivnost praćena metodom želatinske zimografije, koja se zasniva na sposobnosti MMP 2 i 9 – želatinaza, da razlažu želatin kao supstrat.

Kvantitativna analiza rezultata želatinske zimografije na HeLa ćelijama pokazuje da kompleks 1 u koncentraciji $0,5 \times IC_{50}$ indukuje smanjenje aktivnosti MMP-2 i MMP-9 u poređenju sa kontrolnim, netretiranim ćelijama. Cisplatina smanjuje nivo želatinaza ali manje od kompleksa 1, dok kompleks 2 ima suprotan efekat, odnosno pojačava aktivnost matriksnih metaloproteinaza 2 i 9. Ovo ukazuje da u osnovi mehanizma delovanja ispitivanih kompleksa na HeLa ćelijama antimetastatski potencijal nije u korelaciji sa antiproliferativnim potencijalom, jer s obzirom da kompleks 2 ima jak citotoksični efekat, on pojačava metastatski potencijal, što nije

poželjna karakteristika pri razvoju novih potencijalnih hemioterapeutika. A s obzirom da je IC_{50} vrednost kompleksa 2 bliska IC_{50} vrednosti cisplatine, a da kompleksi pojazuju suprotne efekte u procesu metastaziranja, dolazimo do još jedne potvrde da promena geometrije kompleksa (*cis-* / *trans-*), kao i uvođenje aromatičnog planarnog amina umesto NH_3 grupe, ima velikog uticaja na drugačiji mehanizam dejstva.

U slučaju želatinske zimografije na EA.hy 926 liniji svi ispitivani kompleksi smanjuju aktivnost želatinaza, pri čemu *trans*-kompleksi jače deluju od cisplatine. Takodje, *trans*-platina(II) kompleksi imaju jači inhibitorski efekat od *trans*-platina(IV) kompleksa, pri čemu se ističe kompleks 1.

Rezultati pokazuju da kompleks 1 ima najveći antimetastatski potencijal na obe ćelijske linije, što ga izdvaja od drugih kompleksa. Pored toga, rezultati pokazuju da *cis-/trans-* geometrija kompleksa ne može da se dovede u vezu sa metastatskim potencijalom, te da nije presudna za ovaj tip delovanja, već da zavisi specifično od strukture samog jedinjenja.

Da bismo upotpunili rezultate i utvrdili da li kompleksi imaju uticaja na ekspresiju MMP-2 i MMP-9 na nivou iRNK i kako to utiče na aktivnost MMP, koristili smo metodu kvantitativne lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (qRT-PCR). Rezultati na HeLa ćelijskoj liniji ukazuju da *trans*-platina(II) kompleksi smanjuju ekspresiju MMP-9 iRNK nakon 6 h tretmana, a suprotno delovanju cisplatine, kao i da kompleks 2 indukuje povećanje ekspresije MMP-2 iRNK. Uticaj kompleksa na smanjenje nivoa funkcionalnih MMP-9 je u korelaciji sa smanjenjem iRNK nivoa enzima, što može biti rezultat indirektnog delovanja genotoksičnog stresa; a uticaj na MMP-2 pod uticajem kompleksa 2 ukazuje da je aktivnost MMP-2 regulisana na nivou enzima.

Analiza qRT-PCR na EA.hy 926 liniji pokazala je da se MMP-2 ekspresija na nivou iRNK smanjuje nakon 6 h tretmana kompleksima *trans*-platine(II), slično delovanju cisplatine, pri čemu kompleks 2 ima duplo jači inhibitorski efekat od kompleksa 1. Ovo potvrđuje rezultate želatinske zimografije, odnosno možemo reći da *trans*-platina(II) kompleksi imaju inhibitorski efekat na želatinaze i na genskom i na proteinskom nivou. Uticaj kompleksa 3 je zanemarljiv, dok kompleks 4 utiče na povećanje ekspresije MMP-2 iRNK nivoa. Ovo može da se protumači na dva načina, ili da platina kao metal nije odgovorna za inhibitorsku aktivnost, ne interaguje sa katalitičkim centrom, ili da interakcije, ukoliko postoje, nisu u toj meri značajne ili jake.

Treba naglasiti i da se bazalni nivoi matriksnih metaloproteinaza razlikuju kod HeLa i EA.hy 926 ćelijskih linija – kod endotelijalnih ćelija sinteza MMP-9 je inducibilna, a MMP-2 konstitutivna, i sve to može da utiče na različit rezultat delovanja kompleksa.

S obzirom da je angiogeneza, koja predstavlja fiziološki proces formiranja krvnih sudova od endotelijuma postojećih krvnih sudova, integralni deo kako normalnih razvojnih procesa u organizmu, tako i brojnih patoloških stanja, uključujući proces metastaziranja, ona je bitan faktor pri proučavanju kancera i dizajniranju agenasa sa potencijalnim antitumorskim delovanjem (Risau et al., 1995; Flamme et al., 1997). Patološka angiogeneza je važan korak u procesu metastaziranja (Arkell et al., 2003; Kiran et al., 2011), pa su brojna istraživanja su vršena sa ciljem da se pronade antikancerski agens koji bi imao mogućnost da smanji angiogenezu tumorskih ćelija. Iako su predklinički modeli dali obećavajuće rezultate, klasični antiangiogeni agensi se nisu pokazali kao ubedljivi u efikasnoj terapiji tumora. To je pokrenulo brojna istraživanja i razvoj novih angiogenih jedinjenja i kombinacija inhibitora angiogeneze sa klasičnim citotoksičnim agensima i radioterapijom, što je dovelo do toga da je FDA (eng. Food and Drug Administration) prvi put 2004. godine dala odobrenje za korišćenje antiangiogenog agensa Bevacizumab (Avastin) u kombinaciji sa 5-fluorouracilom za lečenje uznapredovalog kolorektalnog kancera (Los, et al., 2007).

S obzirom da se pri dizajnu i istraživanju novih antikancerskih agenasa dosta pažnje posvećuje ispitivanju njihovog potencijala da inhibiraju angiogenezu, mi smo u okviru ispitivanja mehanizama delovanja, pored antimetastaskog potencijala morali da istražimo i antiangiogeni potencijal kompleksa. U tu svrhu koristili smo transformisane endotelijalne ćelije mišjeg i humanog porekla MS1 i EA.hy 926, koje imaju potencijal da se reorganizuju i izdužuju, stvarajući produžetke kojima formiraju kontakte ćelija-ćelija i strukture nalik poligonu (nalik tubulama, krvnim sudovima) (Aranda et al., 2009). Stoga smo u okviru eksperimenata endotelijalne ćelije tretirali subtoksičnim koncentracijama ispitivanih kompleksa platina i cisplatine, kako bismo utvrdili da li imaju potencijal da inhibiraju specifično ponašanje ovih ćelija, odnosno sposobnost da se izdužuju i diferenciraju u strukture nalik tubulama.

Najpre smo analizirali MS1 ćelije na kolagenu, pri čemu su *trans*-platina(II) kompleksi pokazali da poseduju značajan antiangiogeni potencijal, za razliku od

cisplatine. Tačnije, kompleks 2 se pokazao kao najjači angiogeni inhibitor *in vitro* pri analizama vršenim na mišjim endotelijalnim ćelijama.

S obzirom da se potencijalni antikancerski agensi ispituju sa mogućnošću učešća u kliničkim studijama, opredelili smo se i za ispitivanje angiogeneze na humanim endotelijalnim ćelijama, pored mišjih MS1 ćelija. EA.hy 926 humana transformisana endotelijalna ćelijska linija ispoljava brojne karakteristike specifične za vaskularne endotelijalne ćelije, uključujući morfološke promene i reorganizaciju pri sađenju na materijal koji je sličan vanćelijskom matriksu, odnosno uzrokuje formiranje mreže i tubularnih struktura što ih čini dobrim modelom za ispitivanje *in vitro* angiogeneze (Bauer et al., 1992). Antiangiogeni efekat kompleksa je analiziran najpre upotrebom kolagena, pri čemu su svi *trans*-kompleksi inhibirali angiogeno ponašanje ćelija, slično delovanju cisplatine. Upotrebom komercijalnog matrigela dobili su se rezultati koji su pokazali su da cisplatina nema značajan efekat na EA.hy 926 liniji, dok su *trans*-kompleksi uticali na smanjenje angiogeneze ovih ćelija. *Trans*-platina(II) kompleksi su se pokazali kao jači angiogeni inhibitori od *trans*-platina(IV) kompleksa. S obzirom da matrigel, pored kolagena u svom sastavu sadrži i druge strukturne proteine, kao i faktore rasta, i da ima uticaja na proliferaciju i diferencijaciju ćelija, na njemu su morale biti upotrebljene veće doze sub-toksičnih koncentracija kompleksa nego na kolagenu da bi se uočio uticaj na angiogenezu. Takođe, zbog navedenih karakteristika matrigela, u istraživanjima se on najčešće koristi za skrining potencijalnih lekova, pa ćemo stoga upravo te rezultate uzeti kao najrelevantnije. Dakle, možemo zaključiti da su se kompleksi *trans*-platine(II) pokazali kao jaki angiogeni inhibitori u *in vitro* okruženju, koje oponaša *in vivo* sredinu endotelnih ćelija u organizmu, dok *trans*-platina(IV) jedinjenja poseduju nešto manji antiangiogeni potencijal, što je različito od delovanja cisplatine.

Antiangiogeni potencijal je u korelaciji sa citotoksičnom aktivnošću ispitivanih kompleksa na transformisanim endotelijalnim EA.hy 926 ćelijama u kontekstu jačine efekta, odnosno *trans*-platina(II) kompleksi su jači od *trans*-platina(IV) kompleksa, a cisplatina ima najslabiji antiproliferativni i antiangiogeni potencijal (njihove IC₅₀ vrednosti su sledeće: 3.1±1.4, 2.6±1.3, 13.8±5.8, 23.4±3.3 i 27.7±1.3 (μM) za komplekse 1, 2, 3, 4, i CDDP redom). Međutim, treba naglasiti da se test ispitivanja angiogeneze *in vitro* ne odnosi direktno na ono što se dešava pri procesu angiogeneze *in*

vivo, i da rezultati koji pokazuju da neko jedinjenje ima više ili manje antiangiogeni potencijal ne odražava njegovu apsolutnu angiogenu sposobnost, već samo doprinosi utvrđivanju kinetike njegovog delovanja (Aranda et al., 2009). Naši rezultati ukazali su na potencijal kompleksa 2 da deluje na više nivoa pri delovanju na tumorsku ćeliju, kao i da izlaganje kancerske ćelije subtoksičnim koncentracijama antikancerskih jedinjenja može da utiče na ponašanje same ćelije. Više direktno usmerenih eksperimenata potrebno je da bi se potvrdili dobijeni *in vitro* rezultati antiangiogenog potencijala kompleksa 2.

Endotelijalne ćelije formiraju strukture nalik tubulama i granaju se unutar kolagena ili matrigela, i ovakve morfološke promene nastaju pod uticajem indukcije i aktivnosti specifičnih matriksnih metaloproteinaza, među kojima su i MMP-2 i MMP-9 (Schönherr et al., 2001), pa se rezultati ispitivanja uticaja kompleksa na MMP i angiogenezu mogu međusobno porediti i dopunjavati radi dodatnog razumevanja njihovog mehanizma delovanja. Jedna od studija iz 2010. godine pokazala je da su platinski kompleksi dobri inhibitori migracije i invazivnosti tumorskih ćelija, kao i da poseduju značajan antimetastatski potencijal, što je utvrđeno između ostalog i ispitivanjem nivoa MMP 2 i 9 želatinskom zimografijom i Western blot metodom, a pri aplikaciji kompleksa u subtoksičnim koncentracijama (Muscella et al. 2010). Ovakve karakteristike, koje sudeći po rezultatima poseduju i naši platinski kompleksi, jesu poželjna svojstva novih terapijskih agenasa koji poseduju potencijal inhibicije rasta i metastaziranja tumora.

5.5. Uticaj ispitivanih kompleksa na nivo ekspresije ERCC1

Mehanizam delovanja platinskih agenasa je veoma kompleksan proces koji se sastoji iz brojnih koraka, među kojima je, između ostalih, direktno oštećenje DNK, pa je stoga važno razumeti procese prepoznavanja i reparacije DNK lezija, i uticaj ispitivanih kompleksa na njih.

Postoje dva glavna mehanizma koja imaju ulogu u popravljanju oštećenja DNK lezija nastalih delovanjem cisplatine, a odgovorna su za pojavu rezistencije, i to su reparacija isecanjem nukleotida (eng. Nucleotide Excision Repair, NER) i reparacija

pogrešno sparenih baza (Mismatch Excision Repair, MMR) (Cepeda et al., 2007). NER mehanizam je veoma važan mehanizam koji popravlja DNK oštećenja uklanjanjem malih jednolančanih delova DNK koji sadrže lezije, a neka istraživanja su pokazala da NER ima bitnu ulogu u popravci DNK oštećenja nastalih delovanjem kompleksa *trans*-platine. Takođe, izmene i defekti NER sistema mogu rezultovati u hipersenzitivnosti ili rezistenciji na cisplatinu (Chaney et al., 1996), a na pojavu rezistencije utiče komponenta NER sistema – ERCC1 protein (eng. Excision Repair Cross-Complementation group 1) (Martin et al., 2002).

ERCC1 ima dominantnu ulogu u okviru NER sistema koji popravlja DNK oštećenja, i u zavisnosti od konteksta njegova ekspresija može biti negativan ili pozitivan prognostički marker. ERCC1 je pozitivan prognostički marker u smislu prognoze bolesti kada je terapija isključena, odnosno može biti i negativni marker u kontekstu odgovora ćelija na hemioterapiju. ERCC1 je ispitivan kao potencijalan marker rezistencije na cisplatinu, i nivo iRNK ekspresije ERCC1 je u korelaciji sa osetljivošću na cisplatinu, što čini CDDP pogodnim da se koristi kao referentno jedinjenje u eksperimentima (Britten et al., 2000; Olaussen et al., 2006). ERCC1 je esencijalan za život, na šta ukazuju slučajevi smrti eksperimentalnih miševa i jedne bebe usled posedovanja nefunkcionalnog ERCC1 (Reed, 2005).

U cilju utvrđivanja uticaja kompleksa na komponente NER sistema za reparaciju, analizirali smo delovanje platinskih agenasa na nivo ekspresije ERCC1 na genskom i proteinskom nivou. Kvantitativnom PCR analizom je pokazano da kompleksi *trans*-platine(II) inhibiraju ekspresiju ERCC1 gena u HeLa ćelijama, slično cisplatinu, pri čemu je ta ekspresija smanjena za 45 % pri delovanju kompleksa 1, odnosno 40 % pri delovanju kompleksa 2. Rezultati Western blot analize na HeLa liniji potvrdili su inhibitorni uticaj kompleksa 1 i 2 na ERCC1 na proteinskom nivou. Dakle, uticaj *trans*-kompleksa platine(II) je isti i na nivou ERCC1 gena i na nivou ERCC1 proteina, što je pozitivna karakteristika u smislu hipotetičkog korišćenja ovih agenasa u kliničkoj praksi.

Reparacija isecanjem nukleotida (NER) je jedan od mehanizama DNK reparacije koji biva primarno aktiviran kao odgovor na delovanje cisplatine (Perego et al., 1996; Todd et al., 2009; Seetharam et al., 2010; Wane et al., 2011). Enzimi NER sistema prepoznaju distorzije dvostrukog heliksa, mali jednolančani segmenti se uklanjaju, i

nastalu prazninu popunjava DNK polimeraza. Delovanjem platinskih agenasa sa piridinskim ligandima, onemogućava se prilaz NER proteinima, čime se sprečava ili inhibira popravka nastalih adukata, što vodi ćelijskoj smrti u većoj meri u poređenju sa delovanjem cisplatine (Elwell et al., 2006). Različite studije idu u prilog pretpostavci da dugo-živeći DNK adukti, nastali delovanjem mononuklearnih *trans*-platina(II) kompleksa koji sadrže planarni ligand kao što je npr. hinolin na piridinskom prstenu, stvaraju potencijalne citotoksične lezije (Bierbach et al., 2000). Opisani mehanizam delovanja potvrđen je i u okviru naših istraživanja, s obzirom da je ekspresija ERCC1 proteina smanjena pod uticajem delovanja *trans*-kompleksa platine sa piridinskim ligandima, dok cisplatina ima zanemarljiv uticaj na ovu komponentu NER sistema za popravku DNK oštećenja. Veća citotoksičnost kompleksa 2 u odnosu na kompleks 1, može biti usled sposobnosti kompleksa 2 da stvara različite konformacione distorzije i lezije DNK, koje bivaju različito prepoznate i popravljene, ali i usled sposobnosti jedinjenja da indukuju različite ćelijske odgovore (Huq et al., 2004). Ukoliko se smanji broj neželjenih interakcija sa proteinima, može doći do pojačanja citotoksičnosti kompleksa 2 u odnosu na kompleks 1. Takođe, ranije je pokazano da je platinski centar ključan kada je u pitanju citotoksična aktivnost kompleksa, jer ukoliko se zameni nekim drugim, menja se (smanjuje) i sama citotoksičnost; dok sam mehanizam delovanja zavisi uglavnom od prirode liganada (Elwell et al., 2006).

Analizirajući ranije opisane rezultate a u cilju utvrđivanja mehanizma dejstva ispitivanih kompleksa, pretpostavljamo da meta-položaj acetil-supstituenta na piridinskom prstenu (3-acetilpiridin) u okviru kompleksa 1, može omogućiti reaktivnost sa unutarćelijskim proteinima i DNK, ali na reverzibilan način. Pokazali smo da kompleks 1 indukuje vezivanje platine za DNK koje opada ako se vreme tretmana produži sa 6 na 24 h, što se objašnjava time da se ćelije oporavljaju od citotoksičnog stresa, što može biti uz pomoć popravke DNK oštećenja i uklanjanja DNK lezija nastalih delovanjem platine (Wang, 2010). Analize genske i proteinske ekspresije ERCC1 pokazale su da kompleksi 1 i 2 indukuju smanjenje ERCC1 nivoa, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za cisplatinu. Moguće je da ERCC1 igra bitnu, ali ne i ključnu ulogu u mehanizmu delovanja *trans*-platinskih kompleksa, pa su potrebna dodatna istraživanja da bi se potpuno razumeo molekularni mehanizam koji je u osnovi

ekspresije ERCC1 na proteinskom i genskom nivou i njegova korelacija sa osetljivošću ćelija na delovanje *trans*-platinskih agenasa.

5.6. Uticaj ispitivanih kompleksa na apoptozu tumorskih ćelija *in vitro*

Već je istaknuto da je moderan dizajn lekova, i utvrđivanje mehanizama delovanja istih, zasnovano na istraživanju sposobnosti novosintetisanih jedinjenja da indukuju apoptozu kao manje agresivan tip ćelijske smrti, jer se smatra da je potencijal indukcije apoptoze odgovoran za uspeh terapije (Sedletska et al., 2005). Zna se da cisplatina i drugi hemioterapeutici formiraju različite lezije na DNK, koje popravljaju veoma različiti mehanizmi odgovorni za DNK reparaciju, pa to može uticati na drugačije mehanizme delovanja agenasa od citotoksičnosti do potencijala da indukuju apoptozu (Rubin et al., 1983; Bergamo et al., 2000).

Apoptoza je oblik programirane ćelijske smrti koja se javlja u fiziološkim i patološkim procesima u organizmu, i ograničena je na pojedinačne ćelije, koje same sprovode programiranu smrt – izvršavaju samoubistvo, pri čemu se ne javlja zapaljenska reakcija. Za razliku od apoptoze, nekroza predstavlja smrt velikog broja ćelija više različitih tkiva pod uticajem stranih faktora, što podrazumeva odvijanje zapaljenske reakcije. Aktivan proces, kao što je apoptoza, zahteva sintezu enzima i proteina, i može se aktivirati: dejstvom aktivišućih supstanci koje se vezuju za receptore ćelijske membrane; odustvom faktora rasta, hormona, citokina koji su neophodni za preživljavanje ćelija; ili delovanjem faktora koji izazivaju oštećenje ćelija.

U toku apoptoze dolazi do karakterističnih morfoloških promena koje su zajedničke za sve vrste ćelija, i te promene se mogu grupisati u sledeće faze:

- rana faza, koja obuhvata smanjivanje volumena ćelije (skupljanje i kondenzaciju) i njeno odvajanje od sredine u kojoj se nalazi, kondenzaciju hromatina u jedru (hiperhromatizam), fragmentaciju DNK na delove dužine 200-300 bp, kondenzaciju jedra u piknotičko jedro ili fragmentisanje jedra u grozdasto, kondenzaciju citoplazme, kondenzovanje ćelijskih organela, razgradnju citoskeleta, pri čemu jedino

mitohondrije ostaju nepromenjene (za razliku od nekroze gde bubre i prskaju);

- kasna faza, u kojoj dolazi do promena na ćelijskoj membrani formiranjem nabora membrane u formi vezikula (pupljenje membrane), kao i do fragmentisanja jedra i citoplazme čime se obrazuju apoptotska tela;
- završna faza, u kojoj dolazi do fagocitoze apoptotskih tela od strane makrofaga i/ili drugih ćelija.

S obzirom da u procesu apoptoze ne dolazi do degradacije i fragmentacije membrane, nema osobađanja ćelijskog sadržaja u okolinu, pa nema ni inflamatorne reakcije (Thatte et al., 1997; Alberts et al., 2002). Biohemijske promene koje prate apoptozu uključuju translokaciju membranskog fosfolipida fosfatidil-serina (eng. Phosphatidylserine, PS), sa unutrašnje strane membrane gde se nalazi u normalnim uslovima, na spoljašnju stranu. Zatim dolazi do fragmentacije genomske DNK, koja nastaje usled aktivacije kalcijum- i magnezijum-zavisnih jedarnih endonukleaza, kojima se selektivno seče DNK čime nastaju mono- i oligonukleozomalni fragmenti DNK dužine 180-200bp (Thatte et al., 1997).

Nezavisno od načina pokretanja ili mehanizma dešavanja apoptoze, ključni enzimi u tom procesu jesu kaspaze. Deluju na više od 100 proteina citoplazme i jedra, i u ćeliji su prisutni kao proenzimi, a do njihove aktivacije dolazi kaskadnim proteolitičkim razlaganjem. Svrstavaju se u dve podgrupe:

- pokretačke kaspaze, kojima pripadaju prokaspaze 2, 8, 9 i 10,
- kaspaze-izvršiooci, kojima pripadaju prokaspaze 3, 6 i 7.

Kaspaza 3 je ključna proteaza koja se aktivira tokom rane faze apoptoze, i ona deluje tako što proteolitički seče i aktivira druge kaspaze, kao i relevantne mete u jedru. Neophodna je za normalan razvoj mozga, a ključnu ulogu ima u procesu apoptoze gde utiče na kondenzaciju hromatina i DNK fragmentaciju (Porter et al., 1999). Smatra se da je kaspaza 3 ključna u procesu apoptoze i da je u korelaciji sa nivoom apoptoze kod kancera dojke, pa stoga može služiti kao prognostički marker u smislu odgovora ili pojave rezistentnosti pri delovanju hemioterapije (Blanc et al., 2000). Cisplatina deluje na aktivaciju kaspaze 3, odnosno deluje sekvencijalnom aktivacijom kaspaze 8, kaspaze 3 i kaspaze 6 kod ćelija humanog osteosarkoma, ali i kod drugih ćelija, kao što su ćelije

tumora ovarijuma, apoptoza uzrokovana cisplatinom ide preko kaspaza 3 nezavisnog puta (Henkels et al., 1999; Seki et al., 2000).

Naši rezultati analize uticaja kompleksa na kaspaza 3 protein Ea.hy 926 ćelija pokazali su da kompleksi 1, 2 i 3 nemaju značajan uticaj na nivo proteina kaspaze 3 nakon 6 i 24 h delovanja. Jedino kompleks 4 pokazuje efekat – smanjuje nivo kaspaze 3 nakon 6 h tretmana, dok se nivo kaspaze 3 povećava nakon 24 h delovanja. Cisplatina ima efekat na povećanje nivoa kaspaze 3 i nakon 6 h, i nakon 24 h tretmana. Upoređujući ove rezultate sa rezultatima analize apoptoze koje smo dobili protočnom citometrijom, dolazimo do zaključka da *trans*-platinski kompleksi imaju drugačiji mehanizam delovanja od cisplatine, jer kaspaza 3 ne igra ključnu ulogu u samom procesu kao što je to slučaj kod CDDP.

Kao značajni unutarćelijski modulatori apoptoze opisani su geni Bcl-2 familije, koji su predmet brojnih istraživanja zbog izuzetnog značaja za razumevanje molekularno-bioloških mehanizama koji leže u osnovi procesa apoptoze. Poslednjih godina naročito se istražuju antiapoptotski članovi Bcl-2 familije koji predstavljaju osnovu za razvoj nove generacije bioloških agenasa sa potencijalnim antikancerskim dejstvom (Rutledge et al., 2002; Thompson, 1995). Članovi Bcl-2 familije mogu se posmatrati kao antiapoptozni, odnosno mogu predstavljati onkogene koji utiču na razvoj malignih bolesti, ili kao proapoptozni koji svoje biološko dejstvo u ćeliji ostvaruju kao supresori tumora (Müllauer et al., 2001; Zimmermann et al., 2011). Bax je prvi otkriveni proapoptozni član Bcl-2 familije, i utiče na indukciju apoptoze vezivanjem za antagonizirajući Bcl-2 protein (Korsmeyer, 1999).

Western blot metodom ispitivali smo uticaj platinskih kompleksa na nivo Bax proteina na EA.hy 926 ćelijskoj liniji, pri čemu je pokazano da nakon 6 h tretmana, kompleksi 1, 2 i 3 indukuju povećanje nivoa Bax proteina, slično cisplatinu, dok kompleks 4 nema uticaja. Ranije je pokazano je da je apoptoza izazvana delovanjem cisplatine, kako u cisplatinu senzitivnim tako i u cisplatinu rezistentnim linijama, povezana sa povećanjem nivoa Bax proteina (Jones et al., 1998), ali i da delovanje drugih platinskih agenasa može ukazivati na drugačiji ćelijski odgovor od onog izazvanog cisplatinom (Servidei et al., 2011), što rezultati naših istraživanja i potvrđuju.

Rezultati Western blot analiza ukazuju na razlike u mehanizmu delovanja ispitivanih kompleksa i njihovog delovanja na proces apoptoze, tako da pored razlika

uticaja kompleksa koje zavise od geometrije jedinjenja (*trans/cis*), i specifična struktura jedinjenja može da pokaže drugačiji način delovanja, na šta ukazuje i izdvajanje kompleksa 4. Međutim, s obzirom da je apoptoza složen proces, a i delovanje nekog antikancerskog agensa veoma kompleksno, radi detaljnijeg objašnjenja načina delovanja potrebna su dodatna istraživanja, koja bi mogla da uključe inhibitore kaspaza i ispitivanje drugih komponenti Bcl-2 familije.

Kao što je već opisano, pri umiranju ćelija dolazi do značajnih karakterističnih morfoloških promena, koje se mogu uočiti analizom na fluorescentnom mikroskopu, nakon bojenja tretiranih ćelija sa akridin-oranžom (AO) i etidijum-bromidom (EtBr). Pri apoptozi značajno je smanjenje zapremine ćelije, kondenzacija jedarnog materijala, uvećavanje mitohondrija, itd. Citoplazmatski i jedarni materijal se pakuje u membranom oivičene fragmente različite veličine, apoptotska tela, tako da će se žive i ćelije u ranoj apoptozi bojiti zelenim akridin-oranžom, i moguće je uočiti kondenzaciju jedarnog materijala i apoptotska tela. Nekrotične ćelije odlikuje bubrenje ćelije, prskanje ćelijske membrane i oslobađanje ćelijskog sadržaja. Etidijum-bromid, s obzirom na to da ne prolazi kroz intaktnu ćelijsku membranu, bojiće samo ćelije u čiju unutrašnjost može da uđe, odnosno ćelije čiji je integritet spoljašnje membrane narušen i koje su ušle u nekrozu ili kasnu apoptozu (boje se narandžasto).

Dakle, ono što je prezentovano u ovom radu i što se uočava na fluorescentnim mikrofotografijama je sledeće:

- žive ćelije se boje zeleno i prepoznatljive su po svojoj strukturi karakterističnoj za endotelne ćelije;
- apoptotične ćelije sa intaktnom membranom se takođe boje zeleno, ali su nepravilnih oblika usled bubrenja membrane, a u unutrašnjosti se uočavaju brojne žuto/zelena kondenzovana jedra ćelija;
- ukoliko su, kao već prethodno opisane, ćelije očuvale integritet ćelijske membrane, one su inkorporirale akridin-oranž, ali ne i etidijum-bromid, i citoplazma im fluorescira zeleno;
- ćelije koje podležu nekrozi boje se narandžasto s obzirom da u njihovu unutrašnjost ulazi etidijum bromid, a poseduju i multipla žuto/zelena/narandžasto obojena jedra.

U cilju rasvetljavanja mehanizama delovanja ispitivanih *trans*- i *cis*- platinskih kompleksa, morfološke karakteristike ćelijske smrti EA.hy 926 ćelija analizirane su nakon tretmana od 6 i 24 h.

Rezultati dobijeni nakon 6 h delovanja kompleksa, ukazali su na pojavu brojnih izazvanih morfoloških promena u poređenju sa netretiranim kontrolnim ćelijama koje su obojene zeleno i koje odlikuje morfologija karakteristična za endotelne ćelije. Kompleksi deluju na uvođenje ćelija u apoptozu, pri čemu one u ranoj apoptozi ostaju obojene zeleno, ali se skupljaju, zaokrugljuju, membrana im postaje neravna, dolazi do blagog bubrenja/pupljenja, kao i kondenzacije jedra i hromatina unutar ćelije. Kasno apoptotične ćelije odlikuje pojava žuto/narandžastih tačkica u unutrašnjosti koje se u stvari odnose na promene jedra i hromatina karakterističnih za ovaj tip ćelijske smrti. Kompleksi *trans*-platine sa 4-acetilpirinskim ligandima (kompleksi 2 i 4) imaju najjače dejstvo, pa izazivaju i nekrozu malog broja ćelija, koje se na mikrofijama uočavaju kao fluorescentno narandžasto/crvene okrugle strukture, a kompleks 2 utiče i na očigledno smanjenje broja ćelija. Kompleksi 1 i 3, odnosno kompleksi sa 3-acetilpiridinskim ligandima imaju nešto slabiji efekat od kompleksa sa 4-acetilpiridinskim ligandima, i njihovo delovanje sličnije je delovanju cisplatine nakon 6 h tretmana.

Produžavanjem tretmana na 24 h, svi kompleksi intenziviraju svoj efekat, odnosno povećan je procenat ćelija koje su u fazama rane i kasne apoptoze, odnosno nekroze. Kompleks 2 ima najjače dejstvo, odnosno najveći efekat u smislu izazivanja smrti ćelija, jer osim što drastično smanjuje broj ćelija, ne uočava se prisustvo zdravih ćelija, već su sve podlegle nekoj vrsti ćelijske smrti, pri čemu je najveći broj ćelija u fazama kasne apoptoze i nekroze. Kompleks 1 je odmah iza kompleksa 2 u smislu jačine delovanja i indukcije ćelijske smrti. Ovo je u korelaciji sa rezultatima citotoksičnosti, koji pokazali da su na EA.hy 926 liniji kompleksi 1 i 2 najaktivniji sa IC_{50} vrednostim nižim od 5 μ M, što ih čini veoma potentnim antitumorskim agensima. Kompleksi *trans*-platine(IV) – kompleksi 3 i 4, imaju nešto slabije dejstvo od kompleksa 1 i 2, što potvrđuju i rezultati fluorescentne mikroskopije i rezultati citotoksičnih testova, dok cisplatina na EA.hy 926 ćelijama ima najslabije dejstvo, što je isto u saglasnosti sa dobijenim rezultatima. Takođe, upoređujući ove rezultate sa rezultatima protočne citometrije na EA.hy 926, dolazimo do zaključka da jedni druge

potvrđuju, jer su ćelije nakon bojenja propidijum jodidom i aneksinom posle 24 h tretmana kompleksima pokazale značajan porast rane i kasne apoptoze, kao i pojavu nekroze, pri čemu se kompleks 2 ističe svojim delovanjem.

Dakle, kada je apoptoza u pitanju, možemo reći da kompleks 2 ima najjače dejstvo, koje je potvrđeno korišćenjem nekoliko različitih *in vitro* testova, i dve ćelijske linije, te da se ovaj kompleks izdvaja, jer apoptoza predstavlja poželjniji vid smrti ćelija kao manje agresivan proces. Ovo je značajno zbog toga što je ranije pokazano da je potencijal indukcije apoptoze odgovoran za uspeh terapije, s obzirom da je poznato da je apoptoza glavni odgovor na hemioterapiju mnogih lekova koji su već u kliničkoj upotrebi. Iako se kompleks 2 malo razlikuje od ostalih *trans*-kompleksa koji su ispitivani, te male razlike evidentno su doprinele boljoj i jačoj citotoksičnoj aktivnosti i drugačijem mehanizmu delovanja karakterističnom upravo za ovaj kompleks. Sve navedeno je u saglasnosti sa brojnim studijama koje svedoče da se ćelijski odgovori razlikuju pri delovanju cisplatine i drugih platinskih agenasa, pa tako i studija iz 2011. godine koja je uključila analize na protočnom citometru, analize antiproliferativne aktivnosti i morfoloških promena, i koja je ukazala na isti zaključak, na šta ukazuju i rezultati naših istraživanja (Lin et al., 2011).

5.7. Poređenje struktura i aktivnosti ispitivanih kompleksa

Istraživanje *in vitro* biološke aktivnosti kompleksa *trans*-platina(II) i *trans*-platina(IV) kompleksa i komparacija sa cisplatinom uključila je, kao što je opisano, analize na više različitih nivoa jer je mehanizam delovanja potencijalnih antikancerskih agenasa veoma kompleksan i zavisi od brojnih činilaca.

Poređenje strukture i aktivnosti platinskih kompleksa ispitivanih u ovom radu otkriva da *cis*-/*trans*- izomerija ima značaj uticaj na aktivnost kompleksa, odnosno promenom konfiguracije (iz *cis*- u *trans*-) dolazi do aktivacije *trans*-kompleksa tj. *trans*-izomerije platine, a to je u saglasnosti sa dosadašnjim literaturnim podacima (Radulovic et al., 2002).

Ligandi mogu biti različito geometrijski pozicionirani, te drugačije uticati na DNK i stvaranje različitih konformacija i distorzija DNK lanca. Takođe, struktura i

pozicije liganada mogu uticati na drugačije odgovore ćelije, pa može doći do stvaranja različitih oštećenja DNK i aktivacije različitih ćelijskih komponenti. Hemijska modifikacija liganada može uticati i na poboljšanje antitumorske aktivnosti i selektivnosti, odnosno na pokretanje različitih signalnih puteva, što je potvrđeno i dokazano i rezultatima naše studije (Ramos-Lima et al., 2010). Prvo što se uočava jeste da se kompleksi *trans*-platine(II) koji poseduju iste piridinske ligande ali sa acetil-supstituentom na različitom mestu u okviru piridinskog prstena, značajno razlikuju u smislu antikancerske aktivnosti i načina delovanja. Iako dva ispitivana kompleksa strukturne formule *trans*-[PtCl₂(n-acetilpiridin)₂] (n=3 ili 4), predstavljaju strukturne izomere, imaju drugačiji uticaj pri interakcijama sa ćelijskim targetima i pri indukovanju ćelijskih odgovora. Dobijeni rezultati ukazuju da je specifična struktura kompleksa ključna, jer ima značajnu ulogu pri interakcijama *trans*-platinskih kompleksa sa DNK i proteinima, kao i biološkim efektima koji slede. Veća citotoksičnost kompleksa 2 u odnosu na kompleks 1, može biti usled formiranja različitih DNK lezija od strane ovih kompleksa, indukcije različitih ćelijskih odgovora vezanih za prepoznavanje i popravku oštećenja i aktivaciju signalnih puteva, kao i usled pokretanja višestrukih ćelijskih odgovora.

Razlike u delovanju platina(II) i platina(IV) kompleksa sa istim ligandima, mogu biti usled toga što aromatični planarni ligandi i hloridni joni u platina(IV) kompleksu stvaraju drugačije sterno okruženje oko platinskog centra nego u slučaju platina(II) kompleksa, a uticaja ima i redukciona reakcija platina(IV). Tačnije, kompleksi platine(IV) ulaze u ćeliju i vezuju se za DNK, ali nešto sporije od njihovih platina(II) analoga, pa se smatralo da kompleksi platine(IV) podležu oksido-redukcionim reakcijama pre nego što dođe do interakcije sa ćelijskom DNK. Redukcija do platina(II) je neophodan korak za aktivaciju i ispoljavanje antitumorske aktivnosti kompleksa platine(IV). Istraživanja su pokazala da je mehanizam delovanja ovih kompleksa drugačiji od mehanizma cisplatine, a nemaju ni takve neželjene efekte. Postoje istraživanja mehanizma njihovog delovanja na parovima platina(II) i platina(IV) kompleksa, ali je i dalje ostalo nejasno da li kompleksi platine(IV) imaju direktan uticaj ili deluju kao „pro-lekovi“, pa su neophodna dodatna ispitivanja (Hamberger et al., 2009; Pizarro et al., 2009). U okviru naših istraživanja, pokazali smo da promena mesta supstituenta u okviru liganda, ili dodavanje hloridnih jona može značajno da utiče na

reaktivnost kompleksa, intenzitet njegove citotoksičnosti, i dalji mehanizam delovanja koji uključuje vezivanje za DNK, stvaranje lezija, popravku lezija, uticaj na invazivnost i metastaziranje, izazivanje ćelijske smrti, itd.

Naša istraživanja pokazala su da je kompleks 2 naročito interesantan jer iskazuje citotoksičnost i apoptotski potencijal sličan cisplatinu na nekim ćelijskim linijama, ali sa razlikama u interakcijama sa DNK i proteinima, u citoselektivnosti prema tumorskim ćelijama i u angiogenom potencijalu. Neophodna su dalja istraživanja da bi se do detalja razjasnio mogući mehanizam delovanja i objasnio antitumorski potencijal kompleksa, ali pored *in vitro* eksperimenata, trebalo bi istraživati agense *in vivo*. Karakteristike kompleksa strukturne formule *trans*-[PtCl₂(n-acetilpiridin)₂] (n=3 ili 4) naročito ohrabruju dalji razvoj i analizu jedinjenja sa supstituisanim piridinima, a u cilju pronalaska efikasnog agensa sa različitim mehanizmima delovanja u odnosu na cisplatinu.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata *in vitro* ispitivanja antikancerskih karakteristika *trans*-platina(II) i *trans*-platina(IV) kompleksa, zaključujemo da ispitivana jedinjenja imaju veoma složen mehanizam delovanja, koji uključuje kako unutarćelijske, tako i vanćelijske procese.

- Upoređivanjem aktivnosti ispitivanih *trans*-platinskih kompleksa sa cisplatinom utvrdili smo da u zavisnosti od geometrije kompleksa (*cis*-/*trans*-) zavisi njegova aktivnost, što uključuje citotoksični potencijal i generalno mehanizam delovanja – biološku aktivnost *in vitro*.
- Ispitivani kompleksi su pokazali značajan antiproliferativni potencijal na tumorskim ćelijskim linijama, koji u nekim slučajevima prevazilazi aktivnost cisplatine, a jači je od onoga koji kompleksi imaju na normalnim ćelijama, što ih čini dobrim potencijalnim kandidatima za dalja *in vivo* i klinička ispitivanja.
- Utvrđeno je da *trans*-platina(II) kompleksi poseduju značajniju citotoksičnu i antitumorsku aktivnost *in vitro*, pokazuju bolju unutarćelijsku akumulaciju i reaktivnost sa ćelijskim proteinima i DNK, u poređenju sa *trans*-platina(IV) kompleksima.
- Rezultati *in vitro* ispitivanja molekularnih mehanizama antikancerske aktivnosti *trans*-platinskih kompleksa na odabranim ćelijskim linijama, pokazali su da postoje razlike u ćelijskom odgovoru na delovanje kompleksa u HeLa, odnosno EA.hy 926 ćelijama, kako u mehanizmima indukcije ćelijske smrti tako i u procesima angiogeneze i metastaziranja *in vitro*.
- Pokazano je da male razlike u strukturi ispitivanih kompleksa, kao što je pozicija acetil-supstituenta u piridinskom ligandu, mogu značajno uticati na razlike u molekularnom mehanizmu citotoksičnog delovanja kompleksa.
- *Trans*-platinski kompleksi sa piridinskim derivatima kao ligandima su dobri potencijalni antikancerski agensi, pri čemu se kompleks 2 (*trans*-[PtCl₂(4-acpy)₂]) pokazao kao najbolji kandidat za dalja ispitivanja. Kompleks 2 poseduje najveću citotoksičnu aktivnost i ispoljava značajne efekte u smislu antitumorskog dejstva *in vitro*: indukuje značajnu unutarćelijsku akumulaciju

platine i značajnu platinaciju DNK i proteina; poseduje antiangiogeni potencijal; indukuje smanjenje genske i proteinske ekspresije ERCC1; indukuje apoptozu.

7. LITERATURA

- Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998; 281(5381):1322-6.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell, 4th edition, Garland Science, New York, 2002.
- Amundson SA, Myers TG, Fornace AJ Jr. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene*. 1998; 17(25):3287-99.
- Andersen MH, Becker JC, Straten Pt. Regulators of apoptosis: suitable targets for immune therapy of cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4(5):399-409.
- Aranda E, Owen GI. A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biol Res*. 2009; 42(3):377-89.
- Arandjelovic S, Tesic Z, Juranic Z, Radulovic S, Vrvic M, Potkonjak B, Ilic Z. Antiproliferative activity of some cis-/trans-platinum(II) complexes on HeLa cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2002; 21(4):519-26.
- Arandjelovic S, Tesic Z, Radulovic S. Trans-platinum complexes with promising antitumor properties. *Medicinal Chemistry Reviews Online* 2005; 2(5): 415-22.
- Aris SM, Farrell NP. Towards antitumor active trans-platinum compounds. *Eur J Inorg Chem*. 2009; 2009(10):1293.
- Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol.Ther*. 1994; 63(3):265-311.
- Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer*. 1993; 71(4):1368-83.
- Baba AI, Cătoi C. Comparative Oncology, The Publishing House of the Romanian Academy, Bucharest, 2007.
- Banda NK, Satterfield WC, Dunlap A, Steimer KS, Kurrie R, Finkel TH. Lack of gp120-induced anergy and apoptosis in chimpanzees is correlated with resistance to AIDS, *Apoptosis* 1996; 1(1): 49-62.
- Bauer J, Margolis M, Schreiner C, Edgell CJ, Azizkhan J, Lazarowski E, Juliano RL. In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. *J Cell Physiol*. 1992; 153(3):437-49.
- Benassi MS, Chiechi A, Ponticelli F, Pazzaglia L, Gamberi G, Zanella L, Manara MC, Perego P, Ferrari S, Picci P. Growth inhibition and sensitization to cisplatin by zoledronic acid in osteosarcoma cells. *Cancer Lett*. 2007; 250(2):194-205.

- Bergamo A, Zorzet S, Gava B, Sorc A, Alessio E, Iengo E, Sava G. Effects of NAMI-A and some related ruthenium complexes on cell viability after short exposure of tumor cells. *Anticancer Drugs*. 2000; 11(8):665-72.
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(6):401-10.
- Bierbach U, Qu Y, Hambley TW, Peroutka J, Nguyen HL, Doedee M, Farrell N. Synthesis, structure, biological activity, and DNA binding of platinum(II) complexes of the type trans-[PtCl₂(NH₃)₂L] (L = Planar Nitrogen Base). Effect of L and cis/trans isomerism on sequence specificity and unwinding properties observed in globally platinated DNA. *Inorg Chem*. 1999; 38(15):3535-42.
- Bierbach U, Sabat M, Farrell N. Inversion of the cis geometry requirement for cytotoxicity in structurally novel platinum(II) complexes containing the bidentate N,O-donor pyridin-2-yl-acetate. *Inorg Chem*. 2000; 39(9):1882-90.
- Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1755(1):37-69.
- Blanc C, Deveraux Q L, Krajewski S, Jänicke RU, Porter AG, Reed JC, Jaggi R, Marti A. Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res*. 2000; 60(16):4386-90.
- Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997; 390(6658):404-7.
- Brabec V, Neplechova K, Kasparkova J, Farrell N. Steric control of DNA interstrand cross-link sites of trans platinum complexes: specificity can be dictated by planar nonleaving groups. *J Biol Inorg Chem*. 2000; 5(3):364-8.
- Bradford M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-254.
- Britten RA, Liu D, Tessier A, Hutchison MJ, Murray D. ERCC1 expression as a molecular marker of cisplatin resistance in human cervical tumor cells. *Int J Cancer*. 2000; 89(5):453-7.
- Bruijninx PC, Sadler PJ. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr Opin Chem Biol*. 2008; 12(2):197-206.
- Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1(1):68-76.
- Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*. 2007; 7(1):3-18.
- Chaney SG, Sancar A. DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88(19):1346-60.

- Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16: 395–419.
- Che CM, Siu FM. Metal complexes in medicine with a focus on enzyme inhibition. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2010; 14:255–61.
- Chen D, Milacic V, Frezza M, Dou QP. Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* 2009; 15:777–91.
- Chintala SK, Ali-Osman F, Mohanam S, Rayford A, Go Y, Gokaslan ZL, Gagercas E, Venkaiah B, Sawaya R, Nicolson GL, Rao JS. Effect of cisplatin and BCNU on MMP-2 levels in human glioblastoma cell lines in vitro. *Clin Exp Metastasis.* 1997; 15(4):361-7.
- Choy H, Park C, Yao M. Current status and future prospects for satraplatin, an oral platinum analogue. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 1633e1638.
- Claffey KP, Robinson GS. Regulation of VEGF/VPF expression in tumor: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1996; 15(2):165-76.
- Coluccia M, Natile G. Trans-platinum complexes in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007; 7(1):111-23.
- Cooper GM. In: *The cell: a molecular approach, The Eukaryotic Cell Cycle*, 2nd edition, Washington DC, ASM Press, 2000.
- Coussens LM, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol.* 1996; 3(11):895-904.
- Cubo L, Hambley TW, Sanz Miguel PJ, Carnero A, Navarro-Ranninger C, Quiroga AG. The preparation and characterization of trans-platinum(IV) complexes with unusually high cytotoxicity. *Dalton Trans.* 2011; 40(2):344-7.
- Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002; 42: 317–25.
- Desoize B. Cancer and metals and metal compounds. Part II. Cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 42(3):213–5.
- Douple EB. cis-Diamminedichloroplatinum(II): effects of a representative metal coordination complex on mammalian cells. *Pharmacol Ther.* 1984; 25(3):297-326.
- Dulbecco R, Freeman G. Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 1959; 8(3):396-7.
- Dyson PJ, Sava G. Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. *Dalton Trans.* 2006; (16):1929-33.
- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68:383-424.

- Eastman A, Schulte N, Sheibani N, Sorenson CM. Mechanism of resistance to platinum drugs. Platinum and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy. *Developments in Oncology* 1988; 54:178-196.
- Eastman A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther.* 1987; 34(2):155-66.
- Elwell KE, Hall C, Tharkar S, Giraud Y, Bennett B, Bae C, Carper SW. A fluorine containing bipyridine cisplatin analog is more effective than cisplatin at inducing apoptosis in cancer cell lines. *Bioorg Med Chem.* 2006; 14(24):8692-700.
- Fan ZF, Jiang ZC, Yang F, Hu B. Determination of platinum, palladium and rhodium in biological and environmental samples by low temperature electrothermal vaporization inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with diethyldithiocarbamate as chemical modifier. *Anal. Chim. Acta* 2004; 510:45-51
- Farrell N, Ha TT, Souchard JP, Wimmer FL, Cros S, Johnson NP. Cytostatic trans-platinum(II) complexes. *J Med Chem.* 1989; 32(10):2240-1.
- Farrell N, Kelland LR, Roberts JD, Van Beusichem M. Activation of the trans geometry in platinum antitumor complexes: a survey of the cytotoxicity of trans complexes containing planar ligands in murine L1210 and human tumor panels and studies on their mechanism of action. *Cancer Res.* 1992; 52(18):5065-72.
- Farrell N, Qu Y, Bierbach U, Valsecchi M, Menta E. In: Cisplatin, Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug, Wiley-VCH, Weinheim, 1999, 479-96.
- Farrell N. Current status of structure-activity relationships of platinum anticancer drugs: activation of the trans geometry. *Met Ions Biol Syst.* 1996; 32:603-39.
- Farrell N. Nonclassical platinum antitumor agents: perspectives for design and development of new drugs complementary to cisplatin. *Cancer Invest.* 1993; 11(5):578-89.
- Fernandez-Patron C, Zouki C, Whittal RM, Chan JS, Davidge ST, Filep J. Methods for Analysis of Matrix Metalloproteinase Regulation of Neutrophil-Endothelial Cell Adhesion. *Biol Proced Online.* 2002; 4:38-48.
- Flamme I, Frölich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol.* 1997; 173(2):206-10.
- Fojo T, Farrell N, Ortuzar W, Tanimura H, Weinstein J, Myers TG. Identification of non-cross-resistant platinum compounds with novel cytotoxicity profiles using the NCI anticancer drug screen and clustered image map visualizations. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005; 53(1):25-34.
- Folkman J, Klagsburn M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235 (4787):442-7.

- Folkman J. Tumor angiogenesis. In *Cancer Medicine*. Ed. Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E, Kufe DW, Weichselbaum RR. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997, 181-204.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 1971; 285(21):1182-86.
- Frezza M, Hindo S, Chen D, Davenport A, Schmitt S, Tomco D, Dou QP. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* 2010; 16: 1813–1825.
- Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev.* 2003; 103(3):645-62
- Gross J, Lapiere C. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1962; 48(6):1014–22.
- Guo ZJ, Sadler PJ. Medicinal inorganic chemistry. *Adv. Inorg. Chem* 2000; 49:183-306.
- Haas TL, Milkiewicz M, Davis SJ, Zhou AL, Egginton S, Brown MD, Madri JA, Hudlicka O. Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279(4):H1540-7.
- Hall M, Hambley T. Platinum(IV) antitumour compounds: their bioinorganic chemistry. *Coordination Chem Rev.* 2002; 232(1-2), 49-67.
- Hall MD, Mellor HR, Callaghan R, Hambley TW. Basis for design and development of platinum(IV) anticancer complexes. *J. Med. Chem.* 2007; 50: 3403e3411.
- Hamberger J, Liebeke M, Kaiser M, Bracht K, Olszewski U, Zeillinger R, Hamilton G, Braun D, Bednarski PJ. Characterization of chemosensitivity and resistance of human cancer cell lines to platinum(II) versus platinum(IV) anticancer agents. *Anticancer Drugs.* 2009; 20(7):559-72.
- Hambley TW. Platinum binding to DNA: structural controls and consequences. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 2001; 2711-18.
- Heitland P, Köster HD. Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS. *Clin Chim Acta.* 2006; 365(1-2):310-8.
- Henkels KM, Turchi JJ. Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 1999; 59(13):3077-83.
- Ho YP, Au-Yeung SC, To KK. Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives. *Med Res Rev.* 2003; 23(5):633-55.
- Holford J, Beale PJ, Boxall FE, Sharp SY, Kelland LR. Mechanisms of drug resistance to the platinum complex ZD0473 in ovarian cancer cell lines. *Eur J Cancer.* 2000; 36(15):1984-90.

- Holland JF, Frei E III, Bast RC Jr, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR. *Cancer Medicine*, 5th edition, BC Decker Inc, USA, 2000.
- Hollis LS, Sundquist WI, Burstyn JN, Heiger-Bernays WJ, Bellon SF, Ahmed KJ, Amundsen AR, Stern EW, Lippard SJ. Mechanistic studies of a novel class of trisubstituted platinum(II) antitumor agents. *Cancer Res.* 1991; 51(7):1866-75.
- Huq F, Yu JQ, Daghiri H, Beale P. Studies on activities, cell uptake and DNA binding of four trans-planar platinum(II) complexes of the form: trans-PtL(NH₃)Cl₂, where L=2-hydroxypyridine, imidazole, 3-hydroxypyridine and imidazo(1,2- α)pyridine. *J Inorg Biochem* 2004; 98(8):1261-70.
- Icel C, Yilmaz VT, Ari F, Ulukaya E, Harrison WT. Trans-Dichloridopalladium(II) and platinum(II) complexes with 2-(hydroxymethyl)pyridine and 2-(2-hydroxyethyl)pyridine: synthesis, structural characterization, DNA binding and in vitro cytotoxicity studies. *Eur J Med Chem.* 2013; 60:386-94.
- Ide AG, Baker NH, Warren SL. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am. J. Roentgenol.* 1939; 42:891-99.
- Jakupec MA, Galanski M, Keppler BK. Tumour-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003; 146:1-54.
- Jamieson AC, Miller JC, Pabo CO. Drug discovery with engineered zinc-finger proteins. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2(5):361-8.
- Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev.* 1999; 99(9):2467-98.
- Jančić-Zguricas M, Spužić I. Osnovi onkologije, Medicinski fakultet u Beogradu, Elit-Medica, 1995; 122-130.
- Jones NA, Turner J, McIlwrath AJ, Brown R, Dive C. Cisplatin- and paclitaxel-induced apoptosis of ovarian carcinoma cells and the relationship between bax and bak up-regulation and the functional status of p53. *Mol Pharmacol.* 1998; 53(5):819-26.
- Karran P, Marinus MG. Mismatch correction at O⁶-methylguanine residues in *E. coli* DNA. *Nature* 1982; 296(5860):868-9.
- Kato Y, Yamashita T, Ishikawa M. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells. *Oncol Rep.* 2002; 9(3):565-9.
- Kelland LR, Barnard CF, Evans IG, Murrer BA, Theobald BR, Wyer SB, Goddard PM, Jones M, Valenti M, Bryant A, et al. Synthesis and in vitro and in vivo antitumor activity of a series of trans platinum antitumor complexes. *J Med Chem.* 1995; 38(16):3016-24.
- Kelland LR, Barnard CF, Mellish KJ, Jones M, Goddard PM, Valenti M, Bryant A, Murrer BA, Harrap KR. A novel trans-platinum coordination complex

- possessing in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res.* 1994; 54(21):5618-22.
- Kelland LR, Sharp SY, O'Neill CF, Raynaud FI, Beale PJ, Judson IR. Mini-review: discovery and development of platinum complexes designed to circumvent cisplatin resistance. *J Inorg Biochem.* 1999; 77(1-2):111-5.
 - Kelland LR. Meeting report on 8th International Symposium on Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy. *J Inorg Biochem.* 1999; 77(1-2):121-4.
 - Keppler BK, Vogel EA, in: Platinum And Other Metal Coordination Compound in Cancer Chemotherapy II, Ed. M. H. Pinedo and H. M. Schornagel, Plenum Press, New York, 1996; 253-68.
 - Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: a brief review. *J Clin Ligand Assay* 1998; 21:58–61
 - Kim KY, Jeong SY, Won J, Ryu PD, Nam MJ. Induction of angiogenesis by expression of soluble type II transforming growth factor-beta receptor in mouse hepatoma. *J Bio Chem* 2001; 276(42): 38781-6.
 - Kiran MS, Viji RI, Kumar SV, Prabhakaran AA, Sudhakaran PR. Changes in expression of VE-cadherin and MMPs in endothelial cells: Implications for angiogenesis. *Vasc Cell* 2011; 3(1):6.
 - Knudson CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. *Nat Genet.* 1997; 16(4):358-63.
 - Koontongkaew S. The Tumor Microenvironment Contribution to Development, Growth, Invasion and Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *J Cancer* 2013; 4(1):66-83.
 - Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.* 1999; 59(7 Suppl):1693s-1700s.
 - Krachler M, Alimonti A, Petrucci F, Irgolic KJ, Forastiere F, Caroli S. Analytical problems in the determination of platinum-group metals in urine by quadrupole and magnetic-sector field inductively-coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 1998; 363(1):1-10.
 - Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1993; 53(19):4701-14
 - Jung L, Lippard SJ. Direct cellular responses to platinum induced DNA damage. *Chem Rev* 2007; 107:1387-1407.
 - Lazić JM, Vucićević L, Grgurić-Sipka S, Janjetović K, Kaluderović GN, Misirkić M, Gruden-Pavlović M, Popadić D, Paschke R, Trajković V, Sabo TJ. Synthesis and in vitro anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N,N'-diacetate-type ligands. *ChemMedChem.* 2010; 5(6):881-9.

- Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: An historical perspective and an update. *Eur. J. Cancer*. 1998; 34:1522–34.
- Leng M, Locker D, Giraud-Panis MJ, Schwartz A, Intini FP, Natile G, Pisano C, Boccarelli A, Giordano D, Coluccia M. Replacement of an NH(3) by an iminoether in transplatin makes an antitumor drug from an inactive compound. *Mol Pharmacol*. 2000; 58(6):1525-35.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007; 2(2):329-33.
- Lin M, Wang X, Zhu J, Fan D, Zhang Y, Zhang J, Guo Z. Cellular and biomolecular responses of human ovarian cancer cells to cytostatic dinuclear platinum(II) complexes. *Apoptosis*. 2011; 16(3):288-300.
- Liotta LA, Mandler R, Murano G, Katz DA, Gordon RK, Chiang PK, Schiffmann E. Tumor cell autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83(10):3302-6.
- Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest*. 1983; 49(6):636-4
- Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*. 1980; 284(5751):67-8.
- Liotta LA. Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res*. 1986;46(1):1-7.
- Lippard SJ, Berg JM. Principles of Bioinorganic Chemistry, University Science Books, Mill Valley, CA, 1994.
- Lippert B. Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich; Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
- Los M, Roodhart J ML, Voest EE. Target Practice: Lessons from Phase III Trials with Bevacizumab and Vatalanib in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer. *The Oncologist* 2007; 12(4):443–50.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004; 350(21):2129-39.
- Malinge JM, Giraud-Panis MJ, Leng M. Interstrand cross-links of cisplatin induce striking distortions in DNA. *J Inorg Biochem*. 1999; 77(1-2):23-9.
- Manic S, Tesic Z, Juranic Z, Radulovic S. The mode of cytotoxic activity of trans-Pt(Py)2Cl2 in comparison to its cis-isomer, on HeLa cell line. *Journal of BUON* 2001; 6:279-84.

- Martin A, Scharff MD. AID and mismatch repair in antibody diversification. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(8):605-14.
- Martínez A, Lorenzo J, Prieto MJ, de Llorens R, Font-Bardia M, Solans X, Avilés FX, Moreno V. Synthesis, characterization and biological activity of trans-platinum(II) and trans-platinum(IV) complexes with 4-hydroxymethylpyridine. *Chembiochem.* 2005; 6(11):2068-77.
- Minić D, Antić-Jovanović A. Fizička hemija, Fakultet za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, 2005.
- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst.* 1991; 83(11):757-66.
- Montero EI, Díaz S, González-Vadillo AM, Pérez JM, Alonso C, Navarro-Ranninger C. Preparation and characterization of novel trans-[PtCl(2)(amine)(isopropylamine)] compounds: cytotoxic activity and apoptosis induction in ras-transformed cells. *J Med Chem.* 1999; 42(20):4264-8.
- Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1705(2):69-89.
- Moore GE, Gerner RE, Franklin HA. Culture of normal human leukocytes. *J Am Med Assoc* 1967; 199(8):519-24
- Müllauer L, Gruber P, Seisinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res.* 2001; 488(3):211-31.
- Muscella A, Calabriso N, Vetrugno C, Urso L, Fanizzi FP, De Pascali SA, Marsigliante S. Sublethal concentrations of the platinum(II) complex [Pt(O,O'-acac)(gamma-acac)(DMS)] alter the motility and induce anoikis in MCF-7 cells. *Br J Pharmacol.* 2010; 160(6):1362-77.
- Najajreh Y, Perez JM, Navarro-Ranninger C, Gibson D. Novel soluble cationic trans-diaminedichloroplatinum(II) complexes that are active against cisplatin resistant ovarian cancer cell lines. *J Med Chem.* 2002; 45(24):5189-95.
- Nguyen DX, Massagué J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nature Reviews Genetics* 2007; 8:341-52.
- Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; 33(10):960-70.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88(2):277-85.
- Olausson KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC; IALT Bio Investigators. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med.* 2006; 355(10):983-91.

- Olszewski U, Hamilton G. A better platinum-based anticancer drug yet to come? *Anticancer Agents Med. Chem.* 2010; 10:293–301.
- Ormerod MG. In: *Flow Cytometry, a Practical Approach, Analysis of DNA-General Methods*, Oxford University Press, New York, 1994, 119-25.
- Ormerod MG, Orr RM, Peacock JH. The role of apoptosis in cell killing by cisplatin: a flow cytometric study. *Br J Cancer.* 1994; 69(1):93-100.
- Ott I, Gust R. Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs, *Archiv der Pharmazie Chemistry in Life Sciences* 2007; 340(3):117–126
- Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4:617-29.
- Pasetto LM, D'Andrea MR, Brandes AA, Rossi E, Monfardini S. The development of platinum compounds and their possible combination. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006; 60(1):59-75
- Pasetto LM, D'Andrea MR, Rossi E, Monfardini S. Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006; 59(2):159-68.
- Perego P, Giarola M, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Delia D, Pierotti MA, Miyashita T, Reed JC, Zunino F. Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res* 1996; 56(3): 556-62.
- Pérez JM, Kelland LR, Montero EI, Boxall FE, Fuertes MA, Alonso C, Navarro-Ranninger C. Antitumor and cellular pharmacological properties of a novel platinum(IV) complex: trans-[PtCl₂(OH)₂(dimethylamine)(isopropylamine)]. *Mol Pharmacol.* 2003; 63(4):933-44.
- Peyrone M. Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. *Ann Chemie Pharm.* 1844, 51(1):1–29.
- Pizarro AM, Sadler PJ. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie.* 2009; 91(10):1198-21
- Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999; 6 (2):99–104.
- Quiroga AG. Understanding trans platinum complexes as potential antitumor drugs beyond targeting DNA. *J Inorg Biochem.* 2012, 114:106-12.
- Raaphorst GP, Mao J, Yang H, Goel R, Niknafs B, Shirazi FH, Yazdi HM, Rippstein P, Ng CE. Evaluation of apoptosis in four human tumour cell lines with differing sensitivities to cisplatin. *Anticancer Res* 1998; 18: 2945–51.
- Radulovic S, Tesic Z, Manic S. Trans-platinum complexes as anticancer drugs: recent developments and future prospects. *Curr Med Chem.* 2002; 9(17):1611-8.
- Rakić GM, Grgurić-Sipka S, Kaluderović GN, Gómez-Ruiz S, Bjelogrić SK, Radulović SS, Tesić ZLj. Novel trans-dichloridoplatinum(II) complexes with 3- and 4-acetylpyridine: Synthesis, characterization, DFT calculations and cytotoxicity. *Eur J Med Chem.* 2009, 44(5):1921-5.

- Rakić GM, Grgurić-Šipka S, Kaluđerović GN, Bette M, Filipović L, Arandelović S, Radulović S, Tešić ZLj. The synthesis, spectroscopic, X-ray characterization and in vitro cytotoxic testing results of activity of five new trans-platinum(IV) complexes with functionalized pyridines. *Eur J Med Chem.* 2012; 55:214-9.
- Ramos-Lima FJ, Moneo V, Quiroga AG, Carnero A, Navarro-Ranninger C. The role of p53 in the cellular toxicity by active trans-platinum complexes containing isopropylamine and hydroxymethylpyridine. *Eur J Med Chem.* 2010; 45(1):134-41.
- Ramos-Lima FJ, Vrána O, Quiroga AG, Navarro-Ranninger C, Halámiková A, Rybníčková H, Hejmalová L, Brabec V. Structural characterization, DNA interactions, and cytotoxicity of new transplatin analogues containing one aliphatic and one planar heterocyclic amine ligand. *J Med Chem.* 2006; 49(8):2640-51.
- Raynaud FI, Odell DE, Kelland LR. Intracellular metabolism of the orally active platinum drug JM216: influence of glutathione levels. *Br J Cancer.* 1996; 74(3):380-6.
- Reed E. ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(17):6100-2.
- Reed E. Nucleotide excision repair and anti-cancer chemotherapy. *Cytotechnology* 1998; 27(1-3):187-201.
- Reedijk J. Improved understanding in platinum antitumor chemistry. *Chem. Commun.* 1996; 801-6.
- Reedijk J. Why does Cisplatin reach Guanine-n7 with competing s-donor ligands available in the cell? *Chem Rev.* 1999; 99(9):2499-510.
- Reedijk J. New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(7):3611-6.
- Reedijk J. The mechanism of action of platinum antitumor drugs. *Pure Appl. Chem.*, 1987; 59(2):181-192.
- Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995; 11:73-91.
- Roberts JD, Peroutka J, Farrell N. Cellular pharmacology of polynuclear platinum anti-cancer agents. *J Inorg Biochem.* 1999; 77(1-2):51-7.
- Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965; 205:698-9.
- Rosenberg R. In: Cisplatin, Current Status and New Development, Academic Press, New York, 1987.
- Rosenberg, B. Nucleic Acid-Metal Ion Interactions, John Wiley & Sons, Inc, New York, NY, USA, 1980; 1:1-29.
- Roussos ET, Condeelis JS, Patsialou A. Chemotaxis in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11(8):573-87.

- Rubin JR, Sabat M, Sundaralingam M. Similar binding of the carcinostatic drugs cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂] and [Ru(NH₃)₅Cl] Cl₂ to tRNA^{phe} and a comparison with the binding of the inactive trans-[Pt(NH₃)₂Cl₂] complex - reluctance in binding to Watson-Crick base pairs within double helix. *Nucleic Acids Res.* 1983; 11(18):6571-86.
- Rutledge SE, Chin JW, Schepartz A. A view to a kill: ligands for Bcl-2 family proteins. *Curr Opin Chem Biol.* 2002; 6(4):479-85.
- Schönherr E, Schaefer L, O'Connell BC, Kresse H. Matrix metalloproteinase expression by endothelial cells in collagen lattices changes during co-culture with fibroblasts and upon induction of decorin expression. *J Cell Physiol.* 2001; 187(1):37-47.
- Sedletska Y, Giraud-Panis MJ, Malinge JM. Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2005; 5(3):251-65.
- Seetharam RN, Sood A, Basu-Mallick A, Augenlicht LH, Mariadason JM, Goel S. Oxaliplatin resistance induced by ERCC1 up-regulation is abrogated by siRNA-mediated gene silencing in human colorectal cancer cells. *Anticancer Res.* 2010; 30(7): 2531-8.
- Seki K, Yoshikawa H, Shiiki K, Hamada Y, Akamatsu N, Tasaka K. Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3 and -6 in osteosarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000;45(3):199-206.
- Servidei T, Ferlini C, Riccardi A, Mecco D, Scambia G, Segni G, Manzotti C, Riccardi R. The novel trinuclear platinum complex BBR3464 induces a cellular response different from cisplatin. *Eur J Cancer.* 2001; 37(7):930-8.
- Shah N, Dizon DS. New-generation platinum agents for solid tumors. *Future Oncol.* 2009; 5:33-42
- Shi Y, Liu SA, Kerwood DJ, Goodisman J, Dabrowiak JC. Pt(IV) complexes as prodrugs for cisplatin. *J Inorg Biochem.* 2012; 107(1):6-14.
- Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science.* 1984; 223(4642):1296-9.
- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22(47):7265-79.
- Sidky Y, Auerbach R. Lymphocyte-induced angiogenesis in tumorbearing mice. *Science* 1976; 192(4245):1237-38.
- Siemann DW. Vascular targeting agents. *Horizons in Cancer Therapeutics: From Bench to Bedside.* 2002; 3(2):4-15.
- Sigma Chem Co. Biochemicals and reagents for life science research 1997, 1752.

- Silva MJ, Costa P, Dias A, Valente M, Louro H, Boavida MG. Comparative analysis of the mutagenic activity of oxaliplatin and cisplatin in the Hprt gene of CHO cells. *Environ Mol Mutagen*. 2005; 46(2):104-15.
- Silverman AP, Bu W, Cohen SM, Lippard SJ. 2.4-A crystal structure of the asymmetric platinum complex [Pt(ammine)(cyclohexylamine)]²⁺ bound to a dodecamer DNA duplex. *J Biol Chem*. 2002; 277(51):49743-9.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82(13):1107-12.
- Steeg PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells *Nature Reviews Cancer* 2003; 3:55-63.
- Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006; 12(8):895-904.
- Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol*. 1993; 9:541-73.
- Storr T, Thompson KH, Orvig C. Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry. *Chem Soc Rev*. 2006; 35(6):534-44.
- Supino R, In: *Methods in Molecular Biology, In Vitro Toxicity Testing Protocols*, Humana press, New Jersey, 1995; 137-49.
- Tassinari D, Sartori S, Drudi G, Panzini I, Gianni L, Pasquini E, Abbasciano V, Ravaioli A, Iorio D. Cardiac arrhythmias after cisplatin infusion: three case reports and a review of the literature. *Ann Oncol*. 1997; 8(12):1263-7.
- Thatte U, Dahanukar S. Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs*. 1997; 54(4):511-32.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267(5203):1456-62.
- Thompson KH, Orvig C: Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. *Dalton Trans*. 2006; 14(6):761-4.
- Todd RC, Lippard SJ. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* 2009; 1(4): 280-91.
- van Zutphen S, Reedijk J: Targeting platinum anti-tumour drugs: overview of strategies employed to reduce systemic toxicity. *Coord Chem Rev*. 2005; 249:2845-53.
- Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*. 2002; 31(4):214-23.
- Vincenti MP. The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. *Methods Mol Biol*. 2001; 151:121-48.

- Vracko R. Basal lamina scaffold-anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *Am J Pathol.* 1974; 77(2):314-46.
- Vrána O, Brabec V, Kleinwächter V. Polarographic studies on the conformation of some platinum complexes: relations to anti-tumour activity. *Anticancer Drug Des.* 1986; 1(2):95-109.
- Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000; 14(17):2123-33.
- Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(4):307-20.
- Wang QE, Milum K, Han C, Huang YW, Wani G, Thomale J, Wani AA. Differential contributory roles of nucleotide excision and homologous recombination repair for enhancing cisplatin sensitivity in human ovarian cancer cells. *Mol Cancer* 2011; 10:24.
- Wang X. Fresh platinum complexes with promising antitumor activity. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010; 10(5):396-411.
- Wang Y, Farrell N, Burgess JD. Direct evidence for preassociation preceding covalent binding in the reaction of cis-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺ with surface immobilized oligonucleotides. *J Am Chem Soc.* 2001; 123(23):5576-7.
- Welters MJ, Braakhuis BJ, Jacobs-Bergmans AJ, Kegel A, Baan RA, van der Vijgh WJ, Fichtinger-Schepman AM. The potential of platinum-DNA adduct determination in ex vivo treated tumor fragments for the prediction of sensitivity to cisplatin chemotherapy. *Ann Oncol.* 1999; 10(1):97-103.
- Wicha MS, Lowrie G, Kohn E, Bagavandoss P, Mahn T. Extracellular matrix promotes mammary epithelial growth and differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79(10):3213-7.
- Wilson JJ, Lippard SJ. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of platinum(IV) carbamate complexes. *Inorg Chem.* 2011, 50(7):3103-15. .
- Wong E, Giandomenico CM. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev.* 1999; 99(9):2451-66.
- World Health Report. Life in the 21st century. A vision for all. World Health Organisation, Geneva, Switzerland, 1998.
- Yamada M, O'Regan E, Brown R, Karran P. Selective recognition of a cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(3):491-6.
- Yap TA, Workman P. Exploiting the cancer genome: strategies for the discovery and clinical development of targeted molecular therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012; 52:549-73.
- Yount GL, Haas-Kogan DA, Levine KS, Aldape KD, Israel MA. Ionizing radiation inhibits chemotherapy-induced apoptosis in cultured glioma cells: implications for combined modality therapy. *Cancer Res.* 1998; 58(17):3819-25.

- Zákovská A, Nováková O, Balcarová Z, Bierbach U, Farrell N, Brabec V. DNA interactions of antitumor trans-[PtCl₂(NH₃)(quinoline)]. *Eur J Biochem.* 1998; 254(3):547-57.
- Zhang CX, Lippard SJ. New metal complexes as potential therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology* 2003; 7:481-89.
- Zhang J, Wang L, Xing Z, Liu D, Sun J, Li X., Zhang Y. Status of bi- and multi-nuclear platinum anticancer drug development. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2010; 10:272–82.
- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther.* 2001; 92(1):57-70.
- Zorbas H, Keppler BK. Cisplatin damage: are DNA repair proteins saviors or traitors to the cell? *Chembiochem.* 2005; 6(7):1157-66.
- Zou Y, Van Houten B, Farrell N. Ligand effects on platinum binding to DNA. A comparison of DNA binding properties for cis- and trans-[PtCl₂(amine)₂] (amine = NH₃, pyridine). *Biochemistry.* 1993; 32(37):9632-8.
- Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23(1-2):101-17.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Lana Filipović je rođena 22. avgusta 1982. godine u Beogradu. Pohađala je Treću beogradsku gimnaziju i srednju školu *Urbana High School* (Urbana, Ohajo, SAD). Nakon završetka srednje škole 2001. godine upisala je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je 2008. godine u okviru izborne oblasti Primenjena genetika sa prosečnom ocenom 9,14 i ocenom 10 na diplomskom radu. Doktorske studije je upisala na istom fakultetu 2009/2010. godine na studijskom programu Biologija, modul Genetika. Na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije je radila kao volonter od 2009. godine, a zatim je 2010. godine zaposlena, u okviru Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, u Laboratoriji za eksperimentalnu farmakologiju, gde je i uradila eksperimentalni deo svoje doktorske teze. Zvanje istraživača pripravnika stekla je 2009. godine, a zatim i zvanje istraživača saradnika od 2012. godine na projektima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (brojevi projekata 145035 i 142062), odnosno Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (brojevi projekata 41026 i 72017). Član je Evropske organizacije za borbu protiv raka (EACR) i Srpskog društva istraživača raka (SDIR).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Лана Филиповић

број индекса Б3504/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекулски механизми цитотоксичног деловања *trans*-комплекса платине(II) и платине(IV) са пиридинским дериватима као лигандима

- 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, _____

L. Filipović

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Лана Филиповић

Број индекса Б3504/2009

Студијски програм Биологија

Наслов рада Молекулски механизми цитотоксичног деловања *trans*-комплекса платине(II) и платине(IV) са пиридинским дериватима као лигандима

Ментор проф др Александра Кораћ

Потписани/а Лана Филиповић

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, _____

L. Filipović

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Молекулски механизми цитотоксичног деловања *trans*-комплекса платине(II) и платине(IV) са пиридинским дериватима као лигандима _____

која је моје ауторско дело.

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

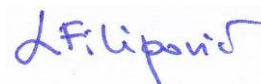
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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 - Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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.