

PA 20228

UG 35739087

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Prof. Dr. Zoran Tadić
Redovni profesor
Hemijski Fakultet
Univerzitet u Beogradu

Dr. med. Sandra Radulović
Ime: **Sandra S. Arandjelović**

ANALIZA MODALITETA CITOTOKSIČNOG DELOVANJA KOMPLEKSA
NA BAZI PLATINE(II), RUTENIJUMA(III), HROMA(III) I RODIJUMA(III)
ISPITIVANJEM NA TUMORSKIM ĆELIJAMA U KULTURI



Dr. med. Sandra Radulović
Redovni profesor
Ime: **-Doktorska disertacija-**

Prof. Dr. Marija Arvišković
Redovni profesor
Hemijski Fakultet
Univerzitet u Beogradu

Prof. Dr. Biljana Štebić
Redovni profesor
Ime: **Beograd, 2006.**
Univerzitet u Beogradu

УНИВЕРЗИТЕТСКА БИБЛИОТЕКА
"СВЕТОЗАР МАРКОВИЋ" - БЕОГРАД
Br. 15207

UNIVERSITET U BEOGRADU

HEMISKA FAKULTET

Štampa S. Anđelićević

ANALIZA MODALITETA CITOKINSKOG DELOVANJA KOMPLEKSA

NA BAZI PLATINIBI, RUTENIJUMIBI, HRONIJIBI I RODIJUMIBI(III)

ISPIVANJEN NA TUMORSKIM KULJURAMA U KULTURI



Beograd, 2008.

Beograd, 2008.

DOKTORSKA DISERTACIJA BIOHEMIJSKIH NAUKA

Mentori

Prof. Dr Živoslav Tešić
Redovni profesor
Hemijski Fakultet
Univerzitet u Beogradu

Dr sci. med. Siniša Radulović
Naučni savetnik
Direktor istraživačkog sektora
Institut za Onkologiju i Radiologiju Srbije

Članovi komisije

1. Prof. Dr Živoslav Tešić
Redovni profesor
Hemijski Fakultet
Univerzitet u Beogradu
2. Dr sci. med. Siniša Radulović
Naučni savetnik
Direktor istraživačkog sektora
Institut za Onkologiju i Radiologiju Srbije
3. Prof. Dr Katarina Anđelković
Redovni profesor
Hemijski Fakultet
Univerzitet u Beogradu
4. Prof. Dr Dušan Sladić
Redovni profesor
Hemijski Fakultet
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:



INSTITUTE OF ONCOLOGY
AND RADIOLOGY OF SERBIA
NATIONAL CANCER RESEARCH CENTER

Najveću zahvalnost za nastanak ovog rada dugujem Prof. Dr Živoslavu Tešiću, kao i Dr sci. med. Siniši Raduloviću koji su rukovodili eksperimentalnim delom ovog rada i svojim znanjem stavovima i iskustvom doprineli njegovoj uspešnoj realizaciji.

Zahvaljujem se Prof. Dr Katarini Andjelković i Prof. Dr Dušanu Sladiću na saradnji i korisnim sugestijama, čime su doprineli kvalitetu ove teze.

Eksperimentalni prikazi ovog rada su uradjeni u laboratoriji za farmakologiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije (IORS). Jedan deo eksperimentalnog rada, izveden je na Nacionalnom onkološkom institutu u Milanu, u laboratoriji za farmakologiju, pod mentorstvom Dr. Paole Perego, kojoj takodje dugujem veliku zahvalnost za savete i velikodušnu pomoć.

Zahvaljujem se svim naučnim, stručnim i tehničkim saradnicima IORS-a i Hemijskog Fakulteta u Beogradu, koji su pomogli u nastajanju ovog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem i svojoj porodici, Leni, Peđi i Miroljubu koji su mi pružili podršku, strpljenje i motivaciju za rad.

ANALIZA EFIKASITETA CITOTOKSIČNOG DELOVANJA KOMPLEKSA NA BAZI
PLATINE(II), RUTENIJA(III), HRONIJA(III) I RODIUMA(II) ISPITIVANJE NA TUMORSKIM
ĆELIJAMA U KULTURI

ABSTRAKT

Ova studija obuhvata je ispitivanje potencijala antitumorskog dejstva kompleksa metala kao što su rutenij(III), hrom(III) i rodum(II), sa bidentatnim 2- diketonatnim ligandima (furoil-acetonatni ligand, diacil-trifluoroacetatni ligand). Takođe je poređena aktivnost ovih kompleksa sa aktivnošću kompleksa pirridin-2- / triaza-4- karbena derivat (transplatin(II)/cis-triaz(4-Py)Cl₂/Py-derivat) i cisplatin. Antiproliferativna aktivnost kompleksa ispitivana je na paradižni ćeliji A2780, HeLa, Jurok, K562, uključujući cisplatin-otporna i -osetljiva ćelija (cisplatin-otporna (U2-OS) i cisplatin-osetljiva (U2-OS/PI)). Uloga citotoksičnog glikozida (OSG) na citotoksičnu aktivnost ispitivanih kompleksa proučena je u kolonizacionoj studiji sa biokemikalijama (BSO). Poređena efikasnost je upoređena sa ispitivanjem specifičnih inhibitora Anexin V-PICT/PI bjezina kao i za ispitivanje aktivnosti kaspaze-3. Apoptoza je dodatno proučena morfološkim analizom jezgri kao što je HeLa ćelija nakon bujenja za AD/ER. Potencijal ispitivanih kompleksa da interaguju sa DNK analiziran je korišćenjem metiltransferaznog (CP-Me) dok je indukcija sinteze nukleinskih kiselina proučena na nivou inkompleksa (radioaktivno obeleženi) nukleotida ³H- timidin / ³H- uridin u DNA / RNA. Antimetastatska aktivnost kompleksa proučena je na nivou indukcije aktivnosti metaloproteinaze MMP-2 i MMP-9 pomoću ELISA-ja.

Rezultati studije citotoksičnosti ukazuju da je aktivnost Ru(II)akc), ispitivana kao IC₅₀ vrednost na ćeliji A2780, cisplatin-otporna, cisplatin-senzitivnom soju (U2-OS) IC₅₀ = 34.25 ± 10.45 μM i cisplatin-otpornoj ćeliji (U2-OS/PI) 37.75 ± 13.55 μM, približno aktivnošću na A2780-ćelije. Cisplatin-otporni Ru(II)akc) se kreće u opsegu između 100 μM, dok kompleksa hroma i roduma nemaju antitumorsku aktivnost. Trans-[Pt(Py)₂Cl₂] je pokazao antiproliferativnu aktivnost značajno veću u poređenju sa cis-izomerom i skoro jednaku efikasnost na ispitivanim ćelijama linijama. Analiza ćelijskog ciklusa i apoptoze otkriva da Ru(II)akc) indukuje apoptozu na A2780 ćelije na 40% i uzrokuje značajnu S fazi ćelijskog ciklusa kao i povećanje broja ćelija u G1 i G2. Ru(II)akc), takođe indukuje apoptozu na 10³ na nivou ćelijskim linijama A2780 (45 h dejstva) i HeLa (72 h dejstva) iada je indukcija aktivnosti kaspaze-3 (na HeLa) veća u poređenju sa cisplatinom. Trans-[Pt(Py)₂Cl₂] poseduje kapacitet indukcije kaspaze-3 zavisan od stepena efikasnosti cisplatin i većari od svog cis-izomera. Ispitivanja interakcije ne-otimuliranih kompleksa sa DNK/RNK otkrivaju da se jedno Cr(III) direktno vezuje za DNK, dok derivat Ru(III) i Cr(III), posebno Ru(III)akc), poseduju snažan potencijal inhibicije sinteze DNK i RNK. Ru(II)akc), pokazuje kapacitet inhibicije metaloproteinaze MMP-2 i MMP-9. Na osnovu dobijenih rezultata, kompleksa rutenijuma(II) poseduju antitumorsko potencijal i osobinu indukcije apoptoze što predstavlja značajnu osnovu za dalja ispitivanja antitumorskog dejstva jedinjenja na bazi rutenija.

Posvećeno

Leni i Pedji

KLJUČNE REČI: trans-platina(II), rutenij(III), hrom(III), 2-diketonatni
DNK-vezivanje, metaloproteinaze (MMP-2, MMP-9)

ANALIZA MODALITETA CITOTOKSIČNOG DELOVANJA KOMPLEKSA NA BAZI PLATINE(II), RUTENIJUMA(III), HROMA(III) I RODIJUMA(III) ISPITIVANJEM NA TUMORSKIM ČELIJAMA U KULTURI

ABSTRAKT

Cilj ove studije bio je ispitivanje potencijala antitumorskog dejstva kompleksa metala kao što su rutenijum(III), hrom(III) i rodijum(III), sa bidentatnim β -diketonato ligandima [(acac)-acetilacetonat ligand, (tfac)-trifluoroacetilacetonat ligand]. Takodje je poredjena aktivnosti ovih kompleksa sa aktivnošću kompleksa platine *cis-* / *trans-* izomera dipiridindihloroplatine(II)(*cis-trans*-[Pt(Py)₂Cl₂], Py=piridin) i cisplatine. Antiproliferativna aktivnost kompleksa ispitivana je na panelu šest ćelijskih linija: A2780, HeLa, Jurkat, K652, uključujući cisplatina-senzitivne i -rezistentne ćelije osteosarkoma (U2-OS and U2-OS/Pt). Uticaj unutarćelijskog glutationa (GSH) na citotoksičnu aktivnost ispitivanih kompleksa praćen je u koinkubacionoj studiji sa butioninsulfoksiminom (BSO). Protočna citometrija je upotrebljena za ispitivanje apoptoze nakon Anexin V-FITC/PI bojenja kao i za ispitivanje aktivnosti kaspaze-3. Apoptoza je dodatno praćena morfološkom analizom ćelijske smrti na HeLa ćelijama nakon bojenja sa AO/ EtBr. Potencijal ispitivanih agenasa da interaguju sa DNK analiziran je korišćenjem masene spektrometrije (ICP-MS), dok je inhibicija sinteze nukleinskih kiselina praćena na osnovu inkorporacije radioaktivno obeleženih nukleotida ¹³C-timidin / ³H-uridin u DNA / RNA. Antimetastatska aktivnost kompleksa praćena je na osnovu inhibicije aktivnosti metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9, pomoću ELISA kita. Rezultati studije citotoksičnosti ukazuju da je aktivnost Ru(tfac)₃ izražena kao IC₅₀ vrednost, na ćelijama osteosarkoma, cisplatina-senzitivnom soju (U2-OS) IC₅₀ = 39,25 ± 10,45 μ M i cisplatina -rezistentnom soju (U2-OS/Pt) 37,75 ± 13,65 μ M, približna aktivnosti na A2780 ćelijama. Citotoksičnost Ru(acac)₃ se kreće u opsegu iznad 100 μ M, dok kompleksi hroma i rodijuma nemaju antitumorsku aktivnost. *Trans*-[Pt(Py)₂Cl₂] je pokazao antiproliferativnu aktivnost značajno veću u poredjenju sa *cis-* izomerom i skoro približnu cisplatini na ispitivanim ćelijskim linijama. Analiza ćelijskog ciklusa i apoptoze otkriva da Ru(tfac)₃ indukuje apoptozu na A2780 ćelijama do 40% i uzrokuje zastoj u S fazi ćelijskog ciklusa kao i opadanje broja ćelija u G1 i G2. Ru(acac)₃ takodje indukuje apoptozu do 10% na dvema ćelijskim linijama A2780 (48 h dejstva) i HeLa (72 h dejstva) mada je indukcija aktivnosti kaspaze-3 (na HeLa) slaba u poredjenju sa cisplatinom. *Trans*-[Pt(Py)₂Cl₂] poseduje kapacitet indukcije kaspaza-3-zavisne apoptoze, u stepenu sličnom cisplatini i većem od svog *cis-* izomera. Ispitivanja interakcije ne-platinskih kompleksa sa DNK/RNK otkrivaju da se jedino Cr(III) direktno vezuje za DNK, dok derivati Ru(III) i Cr(III), posebno Ru(tfac)₃ poseduju snažan potencijal inhibicije sinteze DNK i RNK. Ru(acac)₃ pokazuje kapacitet inhibicije metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9. Na osnovu dobijenih rezultata, kompleksi rutenijuma(III) poseduju antimetastatski potencijal i osobinu indukcije apoptoze što predstavlja značajnu racionalnu osnovu za dalja ispitivanja antitumorskog dejstva jedinjenja na bazi rutenijuma(III).

Ključne reči: *trans*-platina(II), rutenijum(III), hrom(III), β -diketonato, piridin, apoptoza, kaspaza-3, DNK-vezivanje, metaloproteinaze (MMP-2, MMP-9).

MECHANISMS OF ANTITUMOR ACTION OF NOVEL METAL COMPLEXES OF Ru(III), Cr(III), Rh(III) AND Pt(II) ON SEVERAL CELL LINES INCLUDING CISPLATIN-SENSITIVE /-RESISTANT VARIANT

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate cellular response to several ruthenium(III), chromium(III) and rhodium(III) compounds carrying bidentate β -diketonato ligands: [(acac)-acetylacetonato ligand, (tfac)-trifluoroacetylacetonato ligand]. In addition activity of *cis*-/*trans*- isomer pair of dipyridinedichloroplatinum(II), was analyzed in comparison to cisplatin.

Cell sensitivity study was performed on a panel of several cell lines: A2780, cisplatin-sensitive and -resistant osteosarcoma U2-OS and U2-OS/Pt, human cervix carcinoma (HeLa) and mouse melanoma (B16), K562 and Jurkat, using growth inhibition assay. Effect of intracellular GSH depletion on cell sensitivity to the agent's action was analyzed in co-incubation study with buthionine sulfoximine (BSO). Flow cytometry was used to assess apoptosis by Annexin V-FITC/PI double staining, and to analyze induction of caspase-3 activity using anti-active caspase-3 staining. In addition, apoptosis was monitored by fluorescence microscopy after AO/ EtBr staining. Agent DNA binding/damaging affinity was determined by inductively coupled mass spectrometry, while inhibition of incorporation of radioactively labeled nucleotides ^{13}C -thymidine / ^3H -uridine into DNA / RNA was analyzed using Liquid Scintillation Counter. Antimetastatic potential of ruthenium(III) compounds was tested using ELISA kit for detection of metalloproteinases, MMP-2 and MMP-9.

Results of the cytotoxicity study showed that the pattern of sensitivity to $\text{Ru}(\text{tfac})_3$ complex of the two CDDP -sensitive/-resistant osteosarcoma cell lines was similar to that of A2780 cells (72 h exposure), with IC_{50} being $39,25 \pm 10,45 \mu\text{M}$ (in U2-OS) and $37,75 \pm 13,65 \mu\text{M}$ (in U2-OS/Pt). Cytotoxicity of $\text{Ru}(\text{acac})_3$ ranged over $100 \mu\text{M}$, while Cr(III) and Rh(III) complexes were completely devoid of antitumor action *in vitro*. *Trans*- $[\text{Pt}(\text{Py})_2\text{Cl}_2]$ showed activity profile similar to cisplatin and four-fold better in comparison to its *cis*- isomer on all tested cell lines. However, *trans*- compound did not overcome cisplatin resistance in U2-OS/Pt cells. $\text{Ru}(\text{tfac})_3$ exhibited strong potential for apoptosis induction as tested on A2780 cells, up to 40%, for 48 h of drug exposure and caused decrease of the percent of G1 and G2 cells. $\text{Ru}(\text{acac})_3$ induced apoptosis higher than 10% on two cell lines A2780 (48 h action) and HeLa (72 h action) whereas content of active caspase-3 was moderate in comparison to those induced by CDDP. *Trans*- $[\text{Pt}(\text{Py})_2\text{Cl}_2]$ possess higher capacity for caspase-3-dependent apoptosis induction in comparison to *cis*- isomer.

DNA binding study revealed that only $\text{Cr}(\text{acac})_3$ was capable of binding DNA, while Cr(III) and Ru(III) compounds, especially $\text{Ru}(\text{tfac})_3$ possess potential to inhibit RNA and DNA synthesis at $100 \mu\text{M}$. $\text{Ru}(\text{acac})_3$ showed slight ability to inhibit MMP-2 and MMP-9 activity.

Among the non-platinum compounds, only Ru(III) complexes showed potential for antitumor action and differed in their mode of cytotoxic activity according to the different nature of their β -diketonato ligands. Capability of $\text{Ru}(\text{tfac})_3$ to induce apoptosis, as well as antimetastatic potential of $\text{Ru}(\text{acac})_3$, provide a rationale to investigate ruthenium based compounds as a sensitizer of tumor cells in combination therapy. These findings support the interest of Ru(III) complexes among the novel tested metal-complexes as promising compounds endowed with potential antitumor action.

Key words: *trans*-platinum(II), ruthenium(III), chromium(III), β -diketonato, pyridine, apoptosis, caspase-3, DNA-binding, metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9).

SKRAĆENICE

BBR3464-	trinuklearni <i>trans</i> -kompleks platine(II)
HMGB1-	protein iz familijeHMG proteina, koji poseduju (eng. <i>High Mobility Group</i>)-domen
NER -	(eng. <i>Nucleotide Excision Repair</i>) proteini sistema nukleotidne reparacije DNK
MMR -	(eng. <i>Mismatch Repair</i>) proteini sistema za reparaciju pogrešno sparenih baza DNK
SOS-	proteini SOS sistema (aktiviraju se u slučaju velikih lezija na DNK)
ECM-	(eng. <i>Extra Cellular Matrix</i>) vanćelijski matriks.
MMPs-	(eng. <i>Matrix Metalloproteinases</i>) metaloproteinaze vanćelijskog matriksa
HER2-	receptor za epidermalni faktor rasta
IL-2 -	Interleukin-2
NIH-3T3-	ćelijska linija mišjeg karcinoma
L1210-	ćelijska linija miše leukemije limfocita
AIF-	(eng. <i>Apoptosis inducing factor</i>) faktor aktivacije apoptoze
PARP-	(eng. <i>Poly ADP-ribose polymerase</i>) enzim poliadenil-dinukleotidfosfat-ribozo polimeraza
RPMI-1640-	(eng. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>) hranljivi medijum
McCoy's -	hranljivi medijum
DMSO-	dimetilsulfoksid
PE-	(eng. <i>Phycoerythrin</i>) Fikoeritrin
PBS-	(eng. <i>Phosphate buffer saline</i>) fosfatni pufer koji sadrži NaCl, pH 7.2.
FCS-	(eng. <i>Fetal calf serum</i>) fetalni govedji serum
FBS-	(eng. <i>Fetal bovine serum</i>) fetalni govedji serum
BA -	(eng. <i>Bovine Albumine</i>) govedji albumin
CI -	(eng. <i>Combination index</i>) kombinacioni indeks
GSH-	glutation (<i>Glutamil-cisteinil-glicin</i>)
BSO-	butionin-sulfoksimin
ICP-MS -	(eng. <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>) induktivna kuplovana masena spektrometrija)
AAS-	atomska apsorpciona spektrometrija
Triton-X-100	polietilen-glikol-mono [4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil]etar
PI -	propidijum-jodid
FITC-	(eng. <i>Fluorescein isothiocyanate</i>) fluoresceinizotiocijanat
AO -	akridin-oranž
EtBr-	etidijum-bromid

SADRŽAJ

1. <u>UVOD</u>	1
2. <u>TEORIJSKI DEO</u>	4
2. 1. ANTITUMORSKI POTENCIJAL TRANS-KOMPLEKSA PLATINE(II)	5
2. 1. 1. <i>DNK-interakcija biološki neaktivne transplatine u poređenju sa cisplatinom</i>	5
2. 1. 2. <i>Prevazilaženje dogme o biološkoj inertnosti transplatinskih kompleksa</i>	8
2. 1. 3. <i>Trans-platina(II) kompleksi sa planarnim amino ligandima</i>	10
2. 1. 4. <i>Mehanizam citotoksičnog dejstva trans-platinskih kompleksa</i>	15
2. 1. 4. 1. <i>Trans-platina(II)-DNK-lezije i p53</i>	15
2. 1. 4. 2. <i>Ćelijski mehanizmi za reparaciju trans-platina-DNK adukata</i>	16
2.1.4.2.1. <i>Familija HMG-domen proteina (High Mobility Group)</i>	17
2.1.4.2.2. <i>Uloga sistema nukleotidna reparacija- NER(Nucleotide Excision Repair) u popravci cis-/trans-Pt(II)-DNA adukata</i>	18
2.1.4.2.3. <i>Uloga MMR sistema (MMR-Mismatch repair) u popravci cis-/trans-platina-DNA adukata</i>	18
2. 2. ANTITUMORSKI POTENCIJAL KOMPLEKSA NA BAZI RUTENIJUMA(III), HROMA(III) I RODIJUMA(III)	19
2. 2. 1. <i>Kompleksi Rutenijuma: primena u medicini</i>	19
2. 2. 2. <i>Kompleksi rutenijuma - potencijal antitumorskog dejstva</i>	20
2. 2. 2. 1. <i>Kompleksi Rutenijuma(II)</i>	24
2. 2. 2. 2. <i>Kompleksi Rutenijuma(III)</i>	26
2. 2. 2. 3. <i>Kompleksi Ru(III) sa antimetastatskim potencijalom: NAMI I NAMI-A</i>	27
2. 3. MEHANIZAM METASTAZIRANJA I INVAZIJE TUMORA	29
2. 3. 1. <i>Migracija tumorskih ćelija</i>	30
2. 3. 2. <i>Proces invazije tumorskih ćelija</i>	31
2. 3. 3. <i>Metaloproteinaze matriksa (MMPs- matrix metalloproteinases)</i>	31
2. 3. 4. <i>Genetska regulacija procesa metastaziranja</i>	34
2. 4. KASPAZE - ULOGA U APOPTOZI	34

3. MATERIJAL I METODE	37
3. 1. HEMIJSKA STRUKTURA ISPITIVANIH KOMPLEKSA	38
3. 2. SASTAV HRANLJIVOG MEDIJUMA RPMI 1640	40
3. 2. 1. <i>Neorganske soli</i>	40
3. 2. 2. <i>Aminokiseline</i>	40
3. 2. 3. <i>Vitamini</i>	41
3. 2. 4. <i>Ostale komponente</i>	41
3. 3. SASTAV McCOY'S 5A MEDIJUMA (MODIFIKOVANOG)	42
3. 3. 1. <i>Neorganske soli</i>	42
3. 3. 2. <i>Aminokiseline</i>	42
3. 3. 3. <i>Vitamini</i>	43
3. 3. 4. <i>Ostale komponente</i>	43
3. 4. PRIPREMA HRANLJIVOG MEDIJUMA	44
3. 5. KULTURE ČELIJA	44
3. 5. 1. <i>Čelije tumora epitela grlića materice (HeLa)</i>	44
3. 5. 2. <i>Čelije humanog karcinoma ovarijuma (A2780)</i>	45
3. 5. 3. <i>Čelije mišjeg melanoma (B16-V)</i>	45
3. 5. 4. <i>Maligne čelije hronične mijeloidne leukemije (K562)</i>	45
3. 5. 5. <i>Čelije leukemije humanih T limfoblata (Jurkat)</i>	45
3. 5. 6. <i>Čelije humanog osteosarkoma (U2-OS)</i>	46
3. 5. 7. <i>Cisplatina rezistentni soj čelija humanog osteosarkoma (U2-OS / Pt)</i>	46
3. 6. POSTUPAK ODRŽAVANJA ČELIJA U KULTURI	46
3. 6. 1. <i>Postupak pasažiranja čelija</i>	47
3. 6. 2. <i>Kinetika rasta čelija</i>	47
3. 6. 3. <i>Hemocitometar</i>	47
3. 6. 4. <i>Protokol za određivanje broja čelija</i>	47
3. 6. 5. <i>Određivanje viabilnosti HeLa čelija</i>	48
3. 7. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI TESTIRANIH KOMPLEKSA	49
3. 7. 1. <i>Postupak izvođenja MTT testa</i>	49
3. 7. 1. 1. <i>Formiranje kalibracione krive za MTT</i>	50
3. 7. 1. 2. <i>Obrada podataka</i>	50
3. 7. 2. <i>Test inhibicije rasta</i>	52
3. 7. 3. <i>Ispitivanje kombinovanog citotoksičnog dejstva kompleksa $Ru(acac)_3$ i cisplatine ili oksaliplatine, na HeLa čelijama</i>	52
3. 7. 3. 1. <i>Postupak koinkubacije $Ru(acac)_3$ sa cisplatinom odnosno oksaliplatinom</i>	52
3. 7. 3. 2. <i>Statistička obrada podataka</i>	53
3. 8. AFINITET INTERAKCIJE NEPLATINSKIH KOMPLEKSA SA GLUTATIONOM	54
3. 8. 1. <i>Postupak određivanja glutaciona metodom po Tietz-u</i>	54
3. 8. 1. 1. <i>Standardna kriva</i>	55
3. 8. 2. <i>Postupak ispitivanje uticaja butioninsulfoksimina (BSO) na citotoksično dejstvo agenasa</i>	56
3. 9. ODREĐIVANJE INKORPORACIJE RADIOAKTIVNO OBELEŽENIH NUKLEOTIDA U DNK/RNK	56
3. 9. 1. <i>Priprema uzoraka</i>	56
3. 10. ANALIZA INTERAKCIJE ISPITIVANIH AGENASA SA DNK	57
3. 10. 1. <i>Izolacija čelijske DNK metodom po Maniatis-u</i>	58
3. 10. 2. <i>Ispitivanje interakcije testiranih kompleksa sa DNK in vitro</i>	60
3. 10. 2. 1. <i>Procedura za izolaciju plazmidne DNK</i>	60

3. 11. ODREĐIVANJE UNUTARĆELIJSKE AKUMULACIJE PLATINE METODOM ATOMSKE APSORPCIONE SPEKTROFOTOMETRIJE (AAS).....	61
3. 11. 1. <i>Postupak izlaganja HeLa ćelija citotoksičnim platina(II) agensima</i>	<i>61</i>
3. 11. 2. <i>Priprema kalibracione krive za AAS.....</i>	<i>62</i>
3. 11. 3. <i>Postupak analize intraćelijskog sadržaja platine metodom AAS.....</i>	<i>62</i>
3. 11. 4. <i>Kvantitativno određivanje proteina u ispitivanim uzorcima.....</i>	<i>63</i>
3. 12. KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA MATRIKS METALOPROTEINAZA (MMP-2 I MMP-9)	64
3. 12. 1. <i>Priprema uzoraka</i>	<i>64</i>
3. 12. 2. <i>Procedura za određivanje humanih metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9 u supernatantu ćelija.....</i>	<i>64</i>
3. 12. 3. <i>Sadržaj kita za određivanje humanih metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9</i>	<i>65</i>
3. 13. ANALIZA ĆELIJSKOG CIKLUSA I APOPTOZE METODOM NA PROTOČNOM CITOMETRU	66
3. 13. 1. <i>Postupak inkubacije A2780 ćelija sa ispitivanim kompleksima metala rutenijuma(III), hroma(III) i rodijuma(III)</i>	<i>66</i>
3. 13. 1. 1. <i>Postupak bojenja A2780 ćelija sa propidijum-jodidom (PI) za analizu apoptoze.....</i>	<i>66</i>
3. 13. 1. 2. <i>Postupak bojenja A2780 ćelija sa propidijum-jodidom (PI) za analizu ćelijskog ciklusa.....</i>	<i>67</i>
3. 13. 2. <i>Postupak inkubacije HeLa ćelija sa ispitivanim kompleksima platine(II) i rutenijuma(III)</i>	<i>67</i>
3. 13. 1. 1. <i>Postupak bojenja HeLa ćelija sa propidijum-jodidom (PI) za analizu ćelijskog ciklusa.....</i>	<i>68</i>
3. 13. 3. <i>Statistička obrada podataka.....</i>	<i>68</i>
3. 14. ANALIZA APOPTOZE METODOM NA PROTOČNOM CITOMETRU PRIMENOM BOJENJA SA ANEKSIN V-FITC/PI	69
3. 14. 1. <i>Sadržaj kita za određivanje apoptoze bojenjem ćelija sa Anexin V-FITC/PI</i>	<i>69</i>
3. 14. 2. <i>Postupak inkubacije ćelija sa ispitivanim kompleksima platine(II) i rutenijuma(III).</i>	<i>70</i>
3. 14. 3. <i>Protokol za bojenje ćelija</i>	<i>70</i>
3. 15. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA KASPAZA-3 NA HELA ĆELIJAMA PRIMENOM PROTOČNE CITOMETRIJE	71
3. 15. 1. <i>Sadržaj kita za određivanje apoptoze detekcijom aktivne kaspaze-3</i>	<i>71</i>
3. 15. 2. <i>Postupak inkubacije ćelija sa ispitivanim kompleksima platine(II) i rutenijuma(III)</i>	<i>72</i>
3. 15. 3. <i>Protokol za bojenje ćelija</i>	<i>72</i>
3. 16. MORFOLOŠKA ANALIZA ĆELIJSKE SMRTI POMOĆU FLUORESCENTNE MIKROSKOPIJE	73
3. 16. 1. <i>Postupak pripreme preparata ćelija, za analizu fluorescentnim mikroskopom</i>	<i>73</i>
3. 17. LABORATORIJSKI INSTRUMENTI I HEMIKALIJE	75
3. 17. 1. <i>Laboratorijski aparati korišćeni u ovom radu.....</i>	<i>75</i>
3. 17. 2. <i>Hemikalije korišćene u ovom radu.....</i>	<i>76</i>

4. <u>REZULTATI</u>	78
4. 1. CITOTOKSIČNOST TESTIRANIH KOMPLEKSA	79
4. 1. 1. Aktivnost neplatinskih kompleksa	79
4. 1. 2. Aktivnost platinskih kompleksa	81
4. 1. 3. Određivanje glutaciona metodom po Tietz-u.....	86
4. 1. 4. Efekat smanjenja koncentracije intraćelijskog glutaciona (GSH) na citotoksičnost testiranih kompleksa	87
4. 1. 5. Koinkubacija Ru(acac) ₃ sa cisplatinom i oksaliplatinom	91
4. 2. REZULTATI ANALIZE APOPTOZE I ĆELIJSKOG CIKLUSA KORIŠĆENJEM PROTOČNOG CITOMETRA	94
4. 2. 1. Rezultati analize apoptoze i ćelijskog ciklusa kompleksa rutenijuma(III), hroma (III) i rodijuma(III).....	94
4. 2. 2. Rezultati analize apoptoze i ćelijskog ciklusa kompleksa platine(II).....	97
4. 3. INTERAKCIJA KOMPLEKSA Ru(III), Cr (III) i Rh(III) SA DNK	99
4. 3. 1. Direktno vezivanje kompleksa metala za DNK	99
4. 3. 2. Uticaj kompleksa rutenijuma(III), hroma (III) i rodijuma(III) na inhibiciju sinteze DNK i RNK.	100
4. 3. 2. 1. Inhibicija sinteze DNK	100
4. 3. 2. 2. Inhibicija sinteze RNK.....	101
4. 3. 3. Unutarćelijska akumulacija kompleksa platine(II).....	103
4. 4. METALOPROTEINAZA (MMP-2 I MMP-9) IMUNOTEST	103
4. 5. ISPITIVANJE APOTOZE PRIMENOM ANEKSIN V-FITC/PI KONJUGOVANOG ANTITELA	104
4. 6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3 PRIMENOM PROTOČNE CITOMETRIJE	109
4. 7. REZULTATI MORFOLOŠKE ANALIZE ĆELIJSKE SMRTI	113
5. <u>DISKUSIJA</u>	116
6. <u>ZAKLJUČAK</u>	125
REFERENCE	127

1. UVOD

Neutralni platinski koordinacioni kompleks *cis*-diammindihloroplatina(II), *cis*-DDP (CDDP), je prvo neorgansko jedinjenje primenjeno u hemioterapiji tumora. Antitumorska aktivnost ovog kompleksa otkrivena je slučajno 1960, zahvaljujući istraživanjima Barnet Rosenberg-a, profesora biofizike na državnom univerzitetu u Mičigenu, SAD (1, 2). Od 1972. godine cisplatina se primenjuje u kliničkoj praksi, i jedan je od najefektivnijih hemioterapijskih agenasa u lečenju tumora testisa, jajnika, pluća, glave, vrata i bešike. Otkriće antitumorske aktivnosti cisplatine, podstaklo je sintezu i ispitivanja antitumorskog potencijala hiljada analoga cisplatine, u potrazi za agensom koji bi imao jače antitumorsko dejstvo i manje izražene toksične efekte. Poznato je da hemioterapija cisplatinom nije potpuno zadovoljavajuća, usled više faktora, kao što su: neselektivno dejstvo agensa, toksičnost za zdrava tkiva, mutageno dejstvo agensa i pre svega rezistencije tumorskih ćelija na citotoksično delovanje. Direktni strukturni analozi, sintetisani izmenom odlazećih liganada (hlorida) ili statičnih liganada (amina) nisu imali bitno izmenjen aspekt antitumorske aktivnosti u poređenju sa cisplatinom. Karboplatina, *cis*-diammin-(1,1-ciklobutandikarboksilato)platina(II), pripada drugoj generaciji platinskih antitumorskih agenasa koji nalaze primenu u kliničkoj praksi (3). Karboplatina je po hemijskoj strukturi analog cisplatine i spektar antitumorskog dejstva se ne razlikuje bitno u poređenju sa cisplatinom. Karboplatina pokazuje unakrsnu rezistenciju sa cisplatinom, ali ima manje izraženu toksičnost na bubrege i nervni sistem.

Oksaliplatina, (SP-4-2)-[(1R,2R)-cikloheksan-1,2-diamin-*kN*, *kN'*] [etandioato(2-)-*kO*¹, *kO*²] platina(II), (Eloxatin^R), gde su za atom platine(II) vezane bidentatne grupe 1,2-diaminocikloheksan (DACH) kao i oksalatna grupa u *cis*- orijentaciji, pripada trećoj generaciji analoga cisplatine (4). Pokazano je da *in vitro* i *in vivo* oksaliplatina ima sinergističko dejstvo u kombinaciji sa 5-fluorouracilom, pa se od 90-tih godina u kombinaciji sa 5-fluorouracilom primenjuje u hemioterapiji humanog karcinoma kolona (5). Oksaliplatin pokazuje *in vitro* i *in vivo* aktivnost prema cisplatina-rezistentnim ćelijama (6).



Međutim i u slučaju oksaliplatine postoje limitirajući faktori za primenu u hemioterapiji tumora, koji se ogledaju pre svega u toksičnosti na nervni sistem.

Ograničenja koja su se javila pri hemioterapeutskoj primeni cisplatine i analoga, ali 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. U poglavlju 2. 1. detaljnije je opisan istorijat sinteze *trans*-platinskih kompleksa, kao i mehanizam dejstva do sada poznatih analoga transplatine sa potencijalom antitumorskog dejstva. Posebno je razmatrana aktivnost *trans*-Pt(II) derivata sa planarnim aromatičnim ligandima. U protekle dve dekade, sintetisan je i ispitan veliki broja kompleksa prelaznih metala kao što su: rutenijum (Ru), hrom (Cr), rodijum (Rh) itd. U poglavlju 2. 2. dat je prikaz potencijala antitumorske aktivnosti kompleksa ovih metala, sa posebnim naglaskom na jedinjenjima rutenijuma sa antimetastatskim dejstvom, kao što su NAMI i NAMI-A (7).

Uloga matriksnih metaloproteinaza kao terapijskih markera u kontroli procesa invazije i metastaze tumorskih ćelija, opisana je u poglavlju 2. 3. Kako je glavni cilj delovanja antitumorskih agenasa zapravo uvođenje maligne ćelije u apoptozu, učešće kaspaza u mehanizmu aktivacije apoptoze opisano je u poglavlju 2. 4. S obzirom na postojanje širokog potencijala antitumorskog dejstva nestandardnih kompleksa metala kao što su *trans*- izomeri platine i derivati prelaznih metala, cilj ovog rada bio je poređenje aktivnosti cisplatine sa aktivnošću *cis-trans*-geometrijskih izomera dipiridindihloroplatine(II), $[Pt(Py)_2Cl_2]$ i β -diketonato kompleksa prelaznih metala: rutenijuma(III), hroma(III) i rodijuma(III).

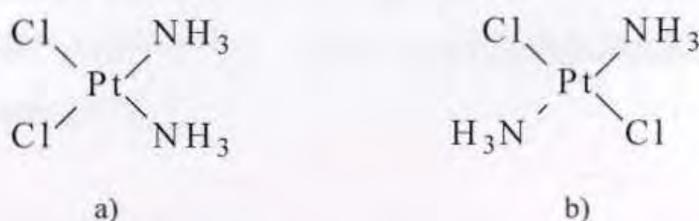
Sinteza i struktura β -diketonato kompleksa ispitivanih u ovom radu, već je opisana u literaturi (8). Na osnovu postojećih literaturnih podataka koji ukazuju da neki bidentatni β -diketonato kompleksi Ru(II)/Ru(III) mogu posedovati veću antiproliferativnu aktivnost od monohelata (9), preduzeli smo uporednu analizu bidentatnih β -diketonato kompleksa, tako da se izmenom strukture liganda: (tfac), (acac); ili centralnog metalnog jona: Ru(III), Cr(III), Rh(III) i uporednom analizom citotoksične aktivnosti kompleksa može steći bolji uvid u mehanizam njihovog antitumorskog dejstva.

Poseban naglasak bio je na ispitivanju aktivnosti ovih jedinjenja na cisplatina-rezistentnim ćelijama humanog osteosarkoma U2-OS/Pt. Alternativni kompleksi metala sa drugačijim modalitetima vezivanja za ćelijsku DNK ili različitim mehanizmima indukcije apoptoze, u poređenju sa cisplatinom, pružaju mogućnost prevazilaženja rezistencije tumorskih ćelija na *cis*-DDP i postavljanja novih racionalnih principa u dizajniranju efikasnog antitumorskog agensa.

2. 1. ANTITUMORSKI POTENCIJAL TRANS-KOMPLEKSA PLATINE(II)

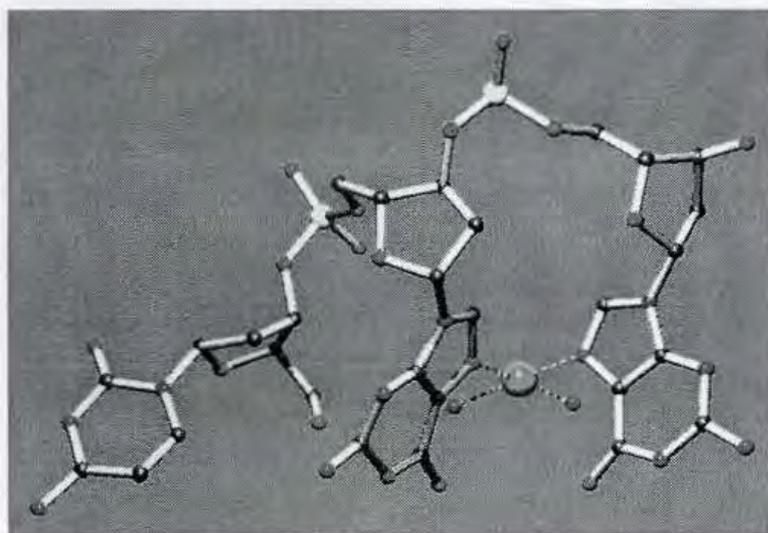
2. 1. 1. DNK-INTERAKCIJA BIOLOŠKI NEAKTIVNE TRANSPLATINE U POREĐENJU SA CISPLATINOM

Kako je DNK molekul glavna "meta" citotoksičnog dejstva platinskih kompleksa (10, 11), razlika u biološkoj aktivnosti dva izomera, cisplatine i transplatine (Sl. 2. 1.1.a.) je posledica različitih lezija koje formiraju na DNK, tj. različitih DNK-adukata (12).



Sl. 2.1.1.a. Strukture kompleksa a) cisplatine; b) transplatine.

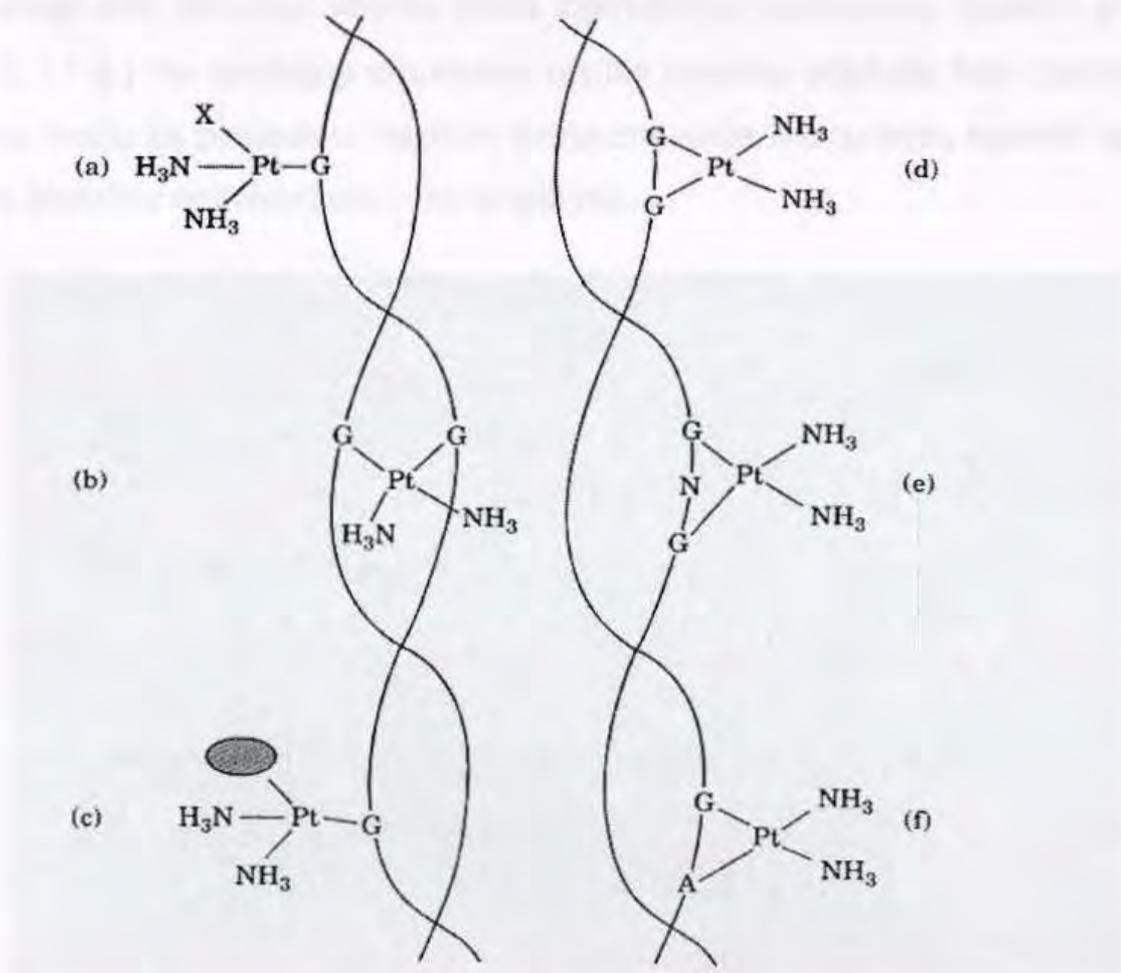
Oba izomera se vezuju za DNK u dva koraka, formirajući najpre vezu sa N-7 položajem guanina (13), a zatim sledi zatvaranje adukta formiranjem veze sa susednom bazom (što je najčešće guanin ili adenin) na istom lancu ili naspramnom lancu DNK (Sl. 2.1.1.b.).



Sl. 2.1.1.b. 1,2-intralančani adukt cisplatine sa susednim guanin bazama 1, 2-d(GpG); jon platine(II) (zelena kuglica) formira vezu sa azotom (plava kuglica) u položaju N-7 na ostacima susednih guanina, na d(CpGpG) sekvenciji (1).

Kinetika ove reakcije zavisi od prirode "statičnog" i "odlazećeg" liganda kompleksa platine, kao i od prisustva molekula koji ulaze u kompeticiju za interakciju sa N-7 položajem guanina (npr. unutarćelijski glutation) (14). Najbrojniji DNK-adukti koje formira cisplatina su 1,2-intralančani adukti između susednih baza guanina 1, 2-d(GpG), koji čine 70% svih lezija na DNK indukovanih cisplatinom (Sl. 2.1.1.c.) (15); 20% čine intralančani adukti d(ApG), a svega 5% čine interlančani adukti (Sl. 2.1.1.c.). Još uvek nije poznato koji tip adukata je najviše odgovoran za citotoksično dejstvo cisplatine (16).

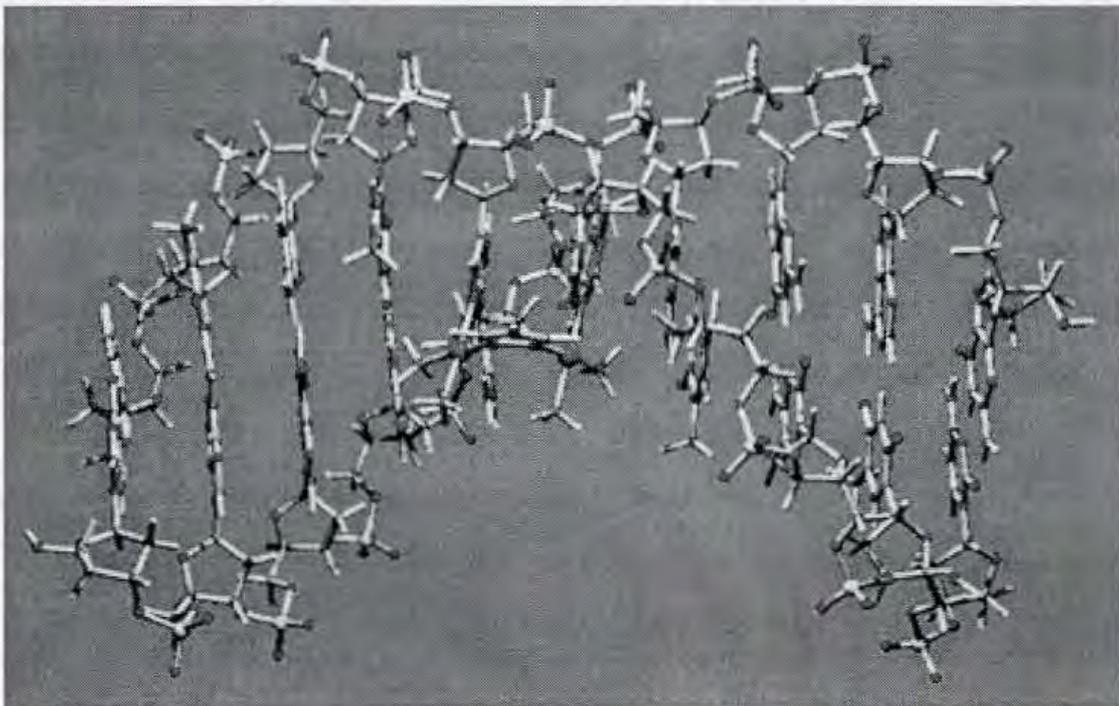
trans-izomer, međutim, ne može da formira 1,2- intralančane adukate zbog sternih smetnji usled geometrije kompleksa. Učestalost *trans*-Pt-DNK-adukata je sledeća: **50%** *trans*-[Pt(NH₃)₂{d(GMP)}-d(CMP)}], **40%** *trans*-[Pt(NH₃)₂{d(GMP)₂}] i **10%** *trans*-[Pt(NH₃)₂{d(GMP)}-d(AMP)}] (17).



Slika 2.1.1.c. Cisplatina-DNK adukti: a) monodentantna veza sa guaninom (ligand X može biti hlorid ili hidroksilna grupa); b) interlančana veza; c) cisplatina-guanin protein veza; d) 1,2-(GpG)-intralančana veza; e) 1,3-(GpG)-intralančana veza (N-predstavlja bazu); f) 1,2-d(ApG)-intralančana veza.

Tako su najbrojniji adukti koje formira *trans*-platina zapravo 1,3-intralančani i interlančani adukti između komplementarnih baza guanin (Gua) i citozin (Cyt). *Trans*platina formira uglavnom monodentatne adukate, interagujući uglavnom sa N-7 položajem guanina, a nastali adukti se veoma sporo (zbog sternih smetnji usled *trans*- izomerije) prevode u bidentatne, za vreme $t_{1/2} > 11$ h.

Kao posledica formiranja adukata javlja se konformacioni poremećaj DNK heliksa, pri čemu *cis*- i *trans*- izomeri indukuju različite promena konformacije tj. različite promene entalpije i entropije sistema (18). Tako 1,2-intralančani *cis*-DDP-DNK adukt, indukuje zakrivljenje dvostrukog heliksa prema velikoj brazdi, za 60° u odnosu na osu heliksa i narušava steking interakcije baza kao i komplementarno vezivanje dva lanca DNK na mestu formiranja adukta (17). Nasuprot tome, adukti koje formira *trans*platina, 1,3-intralančani d(GpTpG) indukuju veoma slabo zakrivljenje dvostrukog heliksa, za svega 20° - 24° (Sl. 2.1.1.d.) Te značajne strukturne razlike između adukata koje formiraju dva stereoizomera, imaju za posledicu i različito prepoznavanje ili popravku nastalih lezija, pa tako i različitu biološku aktivnost *cis*- i *trans*- platine.



Sl. 2.1.1.d. Trodimenzionalna struktura DNK-Pt(II)-1,3-intralančanog adukta. Uočava se blago zakrivljenje DNK heliksa u odnosu na osu heliksa, uzrokovano vezivanjem *trans*-dinuklearnog kompleksa platine(II) (platina(II) -zelene kuglice; fosfor-DNK -žute kuglice). *trans*-Pt(II) kompleks formira vezu između ostataka guanina na sekvenci d(GpTpG) (1).

2. 1. 2. PREVAZILAŽENJE DOGME O BIOLOŠKOJ INERTNOSTI TRANS-PLATINSKIH KOMPLEKSA

Za razliku od cisplatine, *trans*- strukturni izomer, transplatina, ne pokazuje biološku aktivnost. Od otkrića cisplatine, veliki broj studija imao je za cilj da ustanovi vezu između strukture kompleksa i antitumorskog potencijala kompleksa platine. Na osnovu prvih studija poređenja strukture i aktivnosti došlo se do sledećih postavki koje su smatrane bitnim za racionalno dizajniranje citotoksičnih kompleksa platine (19):

- kompleks mora biti električni neutralan,
- *trans*- izomeri kompleksa platine su biološki neaktivni.

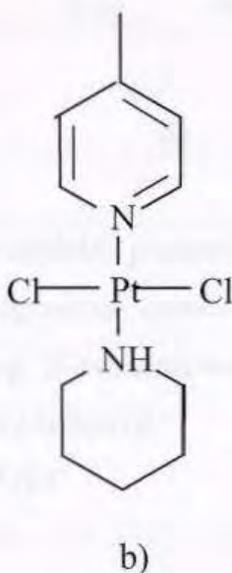
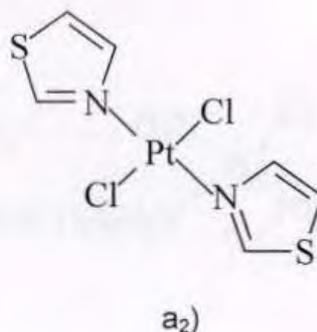
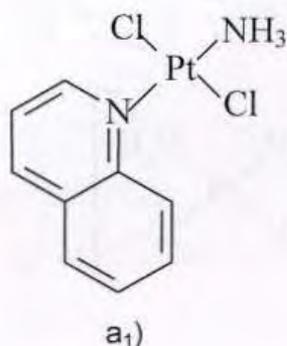
Ove postavke ispostavile su se kao netačne.

Dugo se verovalo da *trans*- izomeri kompleksa platine generalno ne mogu imati biološku aktivnost.

1980, godine Farel i kolege (Farrel *et al.*) (20, 21) su pokazali da *trans*- izomeri kompleksa platine sa planarnim aromatičnim ligandom, mogu imati *in vivo* antitumorsku aktivnost i veću *in vitro* citotoksičnost u odnosu na postojeće *cis*- izomere. Zatim su usledili rezultati Kolučijine grupe (Collucia *et al.*), kojim je potvrđena antitumorska aktivnost *trans*- izomera platine sa statičnim iminoetarskim ligandom (22). U skorije vreme Navaro-Runinger i saradnici (Navarro-Runinger *et al.*) pokazali su da *trans*-platinski kompleksi sa asimetričnim alifatičnim amino ligandima mogu imati citotoksičnu aktivnost na cisplatina-rezistentnim tumorima (23). Farel i kolege su sintetisali katjonski polinuklearni *trans*-kompleks platine BBR3464, $trans\text{-}[\{PtCl(NH_3)_2\}_2(H_2N-R-NH_2)]^{2+}$, sa naelektrisanjem +4, koji je takođe pokazao aktivnost na cisplatina-rezistentnim ćelijama i tumorima sa p53 mutacijom (24-26). To otkriće dovelo je u pitanje i dotadašnje tvrđenje da je elektroneutralnost kompleksa uslov antitumorske aktivnosti.

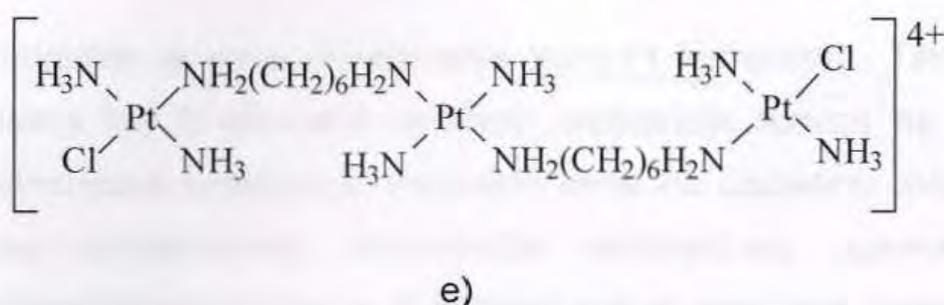
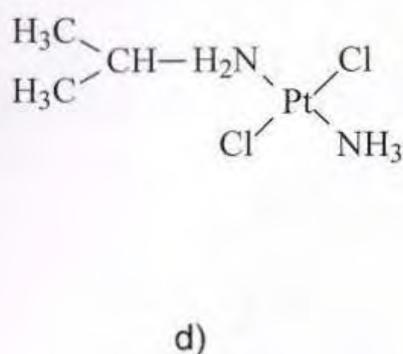
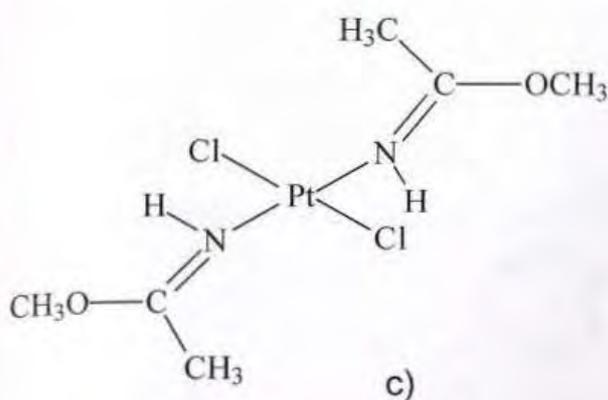
Na osnovu strukture kompleksa, odnosno prirode statičnog liganda, transplatinski kompleksi koji su do danas sintetisani i pokazali antitumorski potencijal mogu se klasifikovati u nekoliko grupa (27, 28):

- 1) *trans*-ammino(amino) platina(IV) kompleksi (Sl. 2.1.3.b.);
- 2) *trans*-platina(II) kompleksi sa planarnim amino ligandima (Sl. 2.1.2.);
- 3) *trans*-platina(II) kompleksi sa heterocikličnim amino ligandima (Sl. 2.1.2.);
- 4) *trans*-platina(II) kompleksi sa iminoetarskim ligandima (Sl. 2.1.2.);
- 5) *trans*-platina(II) kompleksi sa asimetričnim alifatičnim ligandima (Sl. 2.1. 2.);
- 6) binuklearni i trinuklearni *trans*-platina(II) kompleksi (Sl. 2.1.2.).



Sl. 2.1.2. *Struktura trans-izomera kompleksa platine sa planarnim amino ligandima:*

- a₁) *trans*-amminodihloro(hinolin)platina(II);
- a₂) *trans*-ditiazoldihloroplatina(II);
- b) *trans*-dihloro(4-metilpiridin)piperidin platina(II);



Sl. 2.1.2. Struktura *trans*-izomera kompleksa platine(II):

c) *trans*-kompleks sa iminoetarskim ligandom, izomer *trans-EE*

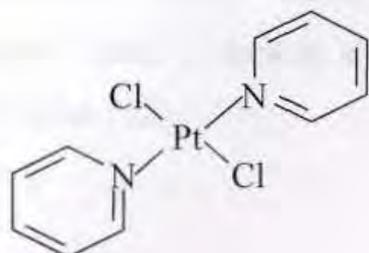
(*EE* se odnosi na stereohemiju samog *N*-substituenta oko dvostruke *C=N* veze;

d) *trans*-amminodihloroizopropilamin platina(II);

e) trinuklearni *trans*-kompleks BBR3464.

2. 1. 3. *TRANS*-PLATINA(II) KOMPEKSI SA PLANARNIM AMINO LIGANDIMA

Farel (Farrell *et al.*) i kolege su prvi demonstrirali da *trans*-platinski kompleksi opšte formule *trans*- [PtCl₂L₂], gde je L planarni amino ligand: γ -pikolin (4-metilpiridin, 4-MePy), ili piridin (Py), (Sl. 2.1.3.a.) poseduju znatno veću citotoksičnu aktivnost u poređenju sa svojim *cis*- izomerima, u studiji na ćelijama leukemije L1210 (20, 21). U našim ispitivanjima na HeLa ćelijama, *trans*-[Pt(Py)₂Cl₂] je pokazao četiri puta veću citotoksičnost (29), i veći potencijl indukcije apoptoze u poređenju sa svojim *cis*-izomerom.



Sl. 2.1.3.a. Struktura kompleksa *trans*-dipiridindihloroplatina(II).

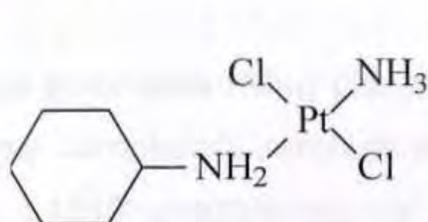
Otkriće Farela podstaklo je nova istražovanja *trans*-Pt kompleksa. Takođe se javila potreba za agensima koji bi prevazišli problem rezistencije tumora na hemioterapiju cisplatinom. U mehanizam rezistencije tumorskih ćelija na cisplatinu uključeno je više faktora: smanjena unutarćelijska akumulacija citotoksičnog agensa, povećanje koncentracija unutarćelijskog glutationa ili metalotioneina, pojačana popravka lezija na DNK, odnosno povećana tolerancija lezija na DNK (30).

U saradnji farmaceutske firme *Johnson Matthey Technology Centre, Bristol Myers Squibb* (UK) i instituta za ispitivanje lekova *CRC Centre for Cancer Therapeutics* (Sutton, UK), tokom 1990-ih godina izvršena je sinteza velikog broja *cis- /trans-* Pt kompleksa, i spoveden "skrining" (*screening*) njihove antitumorske aktivnosti. Tako se došlo do dva *trans-* kompleksa platine koji su pokazali antitumorski potencijal sličan cisplatinu/karboplatinu, a ispoljili manje sporednih toksičnih efekata na zdravo tkivo i, što je još važnije, pokazali se aktivnim na cisplatinu-rezistentnim (*cis-R*) ćelijama tumora.

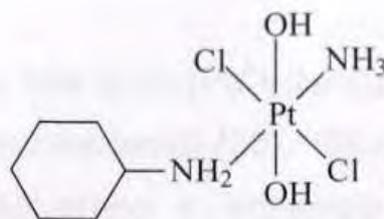
U *in vitro* eksperimentima *trans*-[ammine (cikloheksilamindihlorodihidroksoplatina(IV)] JM335 (Sl.2.1.3.b.) pokazao je citotoksičnost uporedivu sa cisplatinom i indukovao ćelijsku smrt putem apoptoze (31). JM335 kao i njegov Pt(II)dihloro homolog JM334 (Sl. 2.1.3.b.) pokazali su aktivnost na cisplatinu-rezistentnim ćelijskim linijama (CH *cisR* i SKOV-3), dok odgovarajući *cis-* izomeri oba homologa nisu bili aktivni na *cis-R* ćelijama (32).



JM335 je istovremeno i prvi *trans*- platinski kompleks koji je pokazao značajnu antitumorsku aktivnost *in vivo*, mada manju od cisplatine što je objašnjeno dezaktivacijom ovog jedinjenja u ćeliji u reakciji sa glutationom, pa tako kliničke studije ovog kompleksa nisu sprovedene (33).



JM334



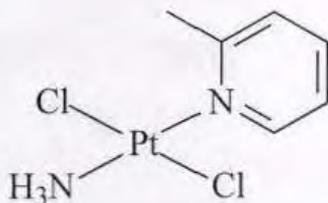
JM335

Sl. 2.1.3.b. *Struktura trans-izomera kompleksa platine:*

JM334, trans- ammin(cikloheksilamin)dihloro platina(II);

JM335, trans-ammin(cikloheksilamin)dihlorodihidroksoplatina(IV).

Sledeći uspešan primer dizajniranja citotoksičog kompleksa platine, kojim je jednostavnom strukturnom izmenom jedinjenja platine dobijen kompleks sa većom citotoksičnošću, kao i aktivnošću na *cis*-R, bila je sinteza *cis*-ammindihloro(2-metilpiridin)platine(II), AMD 473 (JM-473, ZD 0473) (Sl. 2.1.3.c.) (34).

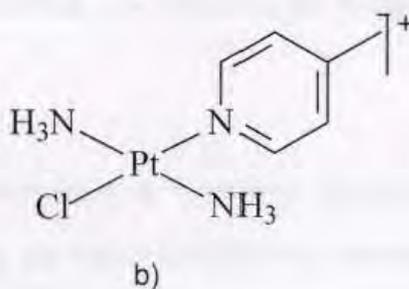
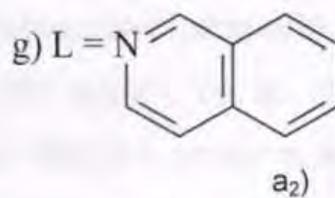
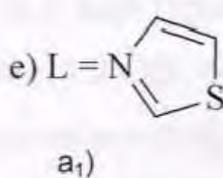
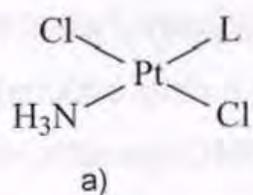


Sl. 2.1.3.c. *Struktura kompleksa trans-amminodihloro(2-metilpiridin)platina(II), ZD 0473.*

Zamena amina u cisplatini planarnim aromatičim prstenom 2-metilpiridina (ZD 0473), rezultovala je kompleksom sa aktivnošću na CDDP-rezistentnom mišjem sarkomu 180, ZD 0473 je u kasnijoj fazi istraživanja ušao i u kliničke studije.

Aromatični planarni ligand usporava reakciju supstitucije jona hlora sulfhidrilnim grupama glutationa ili polipeptida, odnosno povećava verovatnoću interakcije kompleksa sa ćelijskom DNK. Ovaj monofunkcionalni kompleks platine nema sposobnost formiranja interlančanih DNK mostova. Aktivnost na CDDP rezistentnim ćelijama je posledica drugačijeg modaliteta DNK-vezivanja u poređenju sa cisplatinom ili smanjene sposobnosti ćelija da popravi DNK-lezije ovog monofunkcionalnog agensa.

Supstitucija amonijaka (NH_3) planarnim piridinom, bilo u *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ (Sl. 2.1.3.d.), bilo u *trans*-kompleksu, rezultuje povećanjem citotoksičnosti (35). Studije na ćelijama leukemije L1210 ukazale su da zamena (NH_3) grupe u transplatini, aromatičnim planarnim aminom, (čime se dobijaju kompleksi generalne strukturne formule *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)\text{L}]$; L=planarni N-ligand: tiazol, hinolin, benzotiazol, izohinolin, piridin, 4-metilpiridin) (Sl.2.1.3.d.) rezultuje takozvanom aktivacijom *trans*-kompleksa, odnosno *trans*-izomerije (29, 36, 37). Postiže se veća aktivnost *trans*-Pt-kompleksa u poređenju sa postojećim *cis*-izomerom, na cisplatina-senzitivnim i još značajnije rezistentnim ćelijama.



Sl. 2.1.3.d. Struktura kompleksa a) *trans*-ammindihloro(L)platina(II); L=a₁) tiazol; a₂) hinolin; b) *trans*-diamminhloro(4-metilpiridin)platina(II).

Strukturalna modifikacija *trans*-Pt-izomera menja modalitet interakcije *trans*-Pt-kompleksa sa DNK u poređenju sa transplatinom. Aromatični planarni ligand zapravo formira drugačije sterno okruženje oko centralnog jona Pt(II), što utiče na modalitet interakcije celokupnog *trans*-kompleksa sa DNK molekulom.

Bierbach *et al.* (38), je ukazao da planarni piridinski ligand (Py), podstiče odvijanje heliksa prilikom vezivanja *trans*-Pt- kompleksa.

Brabec i saradnici (39), su pokazali da planarni aromatični amino ligandi kao što su hinolin i tiazol, imaju uticaja na formiranje većeg broja interlančanih *trans*-Pt-DNK mostova (sa učestalošću 30%, za $t_{1/2} > 11$ h) u poređenju sa transplatinom. Pt-DNK mostovi se uglavnom formiraju između guaninskih baza, pretežno na sekvencama 5'-GC-3'/5'GC-3" dvostrukog heliksa DNK. Uvođenjem planarnog hinolina u *trans*-Pt kompleks se ne menja kinetika formiranja monoadukta *trans*-Pt-kompleksa sa DNK, niti kinetika preuređenja monodentatnog adukta u bidentatni (40). Adukti koje formira *trans*-[PtCl₂(NH₃)(hinolin)] indukuju konformacionu promenu DNK heliksa nalik onoj koju indukuje cisplatina, pa su tako prepoznati od strane cisplatina-specifičnih antitela. Pretpostavlja se, da zahvaljujući prirodni 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 veće aktivnosti *trans*-[PtCl₂(NH₃)(hinolin)] (Sl. 2.1.3.d.) u odnosu na *cis*- isomer. Slično je i sa kompleksom *trans*-[PtCl₂(NH₃)(tiazol)] (Sl. 2.1.3.d.), koji indukuje konformacione promene na DNK, skoro identične onima koje formiraju 1,2-GG cisplatina-DNK adukti, pa su tako *trans*-[PtCl₂(NH₃)(tiazol)]-DNK lezije prepoznate u ćeliji od strane HMGB1 proteina, kao i NER (*nucleotide excision repair*) sistema za reparaciju lezija, uključenih takođe u popravku cisplatina-DNK lezija (41).

Medjutim, ima primera kada strukturne izmene transplatine ne rezultuju povećanjem citotoksičnosti, kao što je slučaj sa novosintetisnim kompleksom [Pt(NH₃)₂AmCl]⁺, gde je Am voluminozni heterociklični planarni amin, 4-metil-piridin. *Cis*-izomer ovog katjonskog kompleksa platine(II) pokazuje značajnu aktivnost na nekoliko ćelijskih linija (S180, P338, L1210) (42), dok *trans*-izomer nije aktivan. U ovom slučaju veća aktivnost *cis*-isomera objašnjava se bržom kinetikom formiranja DNK adukata, u poređenju sa *trans*-izomerom, kao i odgovarajućom konformacionom promenom dvostrukog DNK heliksa.

Najznačajnija zajednička osobina analoga transplatine je što se jednostavnim strukturnom izmenom transplatine postiže aktivacija tog biološki inertnog kompleksa, odnosno dobijaju se *trans*-Pt- kompleksi koji imaju aktivnosti veće od postojećih *cis*-izomera na cisplatina-senzitivnim i, još značajnije, -rezistentnim linijama.

Kako su neki *trans*-Pt-kompleksi pokazali potencijal u prevazilaženju rezistencije tumorskih ćelija na tretman cisplatinom, pretpostavlja se da se mehanizam njihovog citotoksičnog delovanja razlikuje od mehanizma dejstva cisplatine, pa tako pobuđuju interesovanje za dalje istraživanje.

2. 1. 4. MEHANIZAM CITOTOKSIČNOG DEJSTVA TRANS-PLATINSKIH KOMPLEKSA

Cis- i *trans*- kompleksi platine formiraju lezije na ćelijskoj DNK, ali se ne može reći da postoji direktna korelacija između sposobnosti platinskih kompleksa da inhibišu DNK replikaciju i njihove antitumorske aktivnosti (43, 44). Ćelijski odgovor na oštećenja izazvana citotoksičnim agensom, odigrava se prenošenjem signala u složenoj mreži koordinovanih signalnih puteva u ćeliji u koje su uključeni proteini mehanizma za reparaciju DNK lezija, kao i p53 protein (45).

2. 1. 4. 1. *Trans*-platina(II)-DNK-lezije i p53

Oštećenje na DNK nastalo citotoksičnim agensom je najčešće početni signal za aktivaciju proteina p53, koji deluje kao transkripcioni aktivator i pokreće kaskadu reakcija u ćeliji (46, 47). p53 Pokreće transkripciju mnogobrojnih gen, kao što su: MDM-2, kodira za protein-inhibitor p53; BAX, kodira za Bax apoptotski protein; GADD-45, kodira za protein uključen u DNK reparaciju i zastoj ćelijskog ciklusa u G2 fazi; kao i gen p21 proteina koji indukuje zastoj u G1/S i G2 fazi ćelijskog ciklusa i aktivaciju NER tj. popravku nastalih lezija na DNK. p53 Takodje interaguje direktno sa nekim proteinima u ćeliji, transkripcionim faktorima, uključenim u reparaciju DNK lezija, a takođe je uključen u negativnu regulaciju Bcl-2, koji funkcioniše kao inhibitor apoptoze (48).

Tako od funkcionalnog statusa p53 u ćeliji zavisi da li će u odgovoru na oštećenje citotoksičnim agensom ćelija preživeti odnosno pokrenuti popravku DNK i zastoj ćelijskog ciklusa ili će ući u apoptozu. U slučaju nepopravljivih lezija na DNK p53 indukuje apoptozu.

Dosadašnji literaturni podaci o značaju p53 u citotoksičnom dejstvu platinskih kompleksa su kontradiktorni (49). Neka istraživanja ukazuju da p53 nije direktno uključen u ćelijski odgovor na citotoksično dejstvo kompleksa platine, i da čak CDDP- indukovana apoptoza može ići putevima nezavisnim od p53 (50, 51).

Istraživanja na ćelijama tumora ovarijuma A2780 pokazale su da status p53 nema uticaja na senzitivnost ćelije na citotoksično dejstvo *trans*-kompleksa JM335 (31). Efikasnost polinuklearnog *trans*-Pt kompleksa BBR3464 na tumorima sa mutacijom na p53 ukazuje da DNK-adukti ovog kompleksa mogu pokrenuti ćelijsku smrt putevima nezavisnim od funkcionalnog statusa p53 (51, 52). Moguće objašnjenje mehanizma ćelijske smrti jeste da ćelija ulazi u apoptozu usled višestrukih neuspelih pokušaja sistema za reparaciju DNK da prepoznaju i poprave neobične DNK-lezije nastale dejstvom ovog kompleksa. Neka ispitivanja na mutantu kvasca *Schizosaccharomyces pombe Rad*-mutant, ukazuju na učešće MMR (*mismatch repair*) gena i proteina za reparaciju DNK lezija u regulaciji hemosenzitivnosti ćelije na BBR 3464, dok proteini NER imaju marginalnu ulogu (53, 54). Kako je gubitak funkcije proteina p53 najčešća mutacija koja se sreće u tumorskim ćelijama i kako je to istovremeno glavni uzrok smanjene senzitivnost ili čak rezistencije nekih tumorskih ćelija na hemiterapeutske agense, razvoj agensa koji bi bio efikasan nezavisno od p53 statusa je u centru daljih ispitivanja.

2. 1. 4. 2. Ćelijski mehanizmi za reparaciju *trans*-platina-DNK adukata

DNK je primarna meta citotoksičnog delovanja cisplatine, pa tako proteini koji igraju ulogu u prepoznavanju DNK lezija predstavljaju početnu kariku u lancu ćelijskih reakcija na CDDP. Postoji nekoliko proteina koji bi mogli da budu odgovorni za specifično prepoznavanje CDDP-DNK intra-lančanih adukata, inter-lančanih adukata i monoadukata, a to su: 1) HMG-domen proteini (*high mobility group*) 2) proteini sistema za reparaciju lezija na DNK kao što su NER (*nucleotide excision repair*) i MMR (*mismatch repair*).

2. 1. 4. 2. 1. Familija HMG-domen proteina (High Mobility Group)

HMG-domen proteini, koji pripadaju familiji nehistonskih DNK vezujućih proteina, imaju malu molekulska masu i neobično visoko pozitivno naelektrisanje, zbog čega pokazuju veliku elektroforetsku pokretljivost na agaroznom gelu. HMG-domen je DNK vezujući domen, a proteini koji ga sadrže imaju osobinu da se specifično vezuju za DNK-lezije (55). Ima dokaza da se HMG proteini vezuju specifično za DNK-cisplatina-adukte tipa: *cis*-GG, *cis*-AG ali ne i za *cis*-GNG (gde je N ma koja baza) i ne za DNK adukte koje formira transplatina (56, 57). Poznato je da HMG proteini učestvuju u prenošenju citotoksičnog signala od mesta formiranja cisplatina-DNK-adukta na druge signalne proteine u ćeliji, ali tačan mehanizam ovog procesa nije do kraja razjašnjen. Jedna teorija je da vezivanjem za *cis*-Pt-DNK adukt, HMG proteini štite DNK-leziju od pristupa ostalih proteina odgovornih za prepoznavanje i popravku lezija na DNK, kao što su proteini NER ili MMR (58). HMG proteini imaju funkciju transkripcionih faktora. Moguće je da se usled vezivanja HMG proteina za cisplatina-DNK-adukte sa većom specifičnošću u poređenju sa vezivanjem za njihove ciljane promotorske ili supresorske sekvence na DNK, ozbiljno narušavaju unutarćelijske funkcije.

HMG proteini nisu u stanju da prepoznaju lezije nastale aduktima koje formira transplatina, niti neobične interlančane DNK lezije nastale vezivanjem polinuklearnog *trans*-kompleksa BBR3464 (59). Dok antitela specifična za *trans*-DDP adukte vezuju specifično i DNK-adukte koje formira BBR3464 (43). Moguće je da *trans*-Pt kompleksi indukuju konformacionu promenu DNK veoma različitu u poređenju sa *cis*-Pt kompleksima, pa su tako ćelijski mehanizmi koji su uključeni u prepoznavanje i uklanjanje nastalih lezija različiti. *Cis*- i *trans*-Pt kompleksi se bitno razlikuju u mehanizmu citotoksičnog dejstva što stoji u osnovi aktivnosti nekih *trans*-platina kompleksa, kao što je BBR3464, na cisplatina-rezistentnim ćelijama tumora.

2. 1. 4. 2. 2. Uloga sistema nukleotidna reparacija- NER(Nucleotide Excision Repair) u popravci *cis-/trans*-Pt(II)-DNA adukata

Ima dokaza da NER sistem za reparaciju ima dominantnu ulogu u prepoznavanju i popravci cisplatina-DNK adukata (60). Intralančani *cis*-GTG adukti se uklanjaju sa većom efikasnošću od *cis*-AG adukata ili *cis*-GG adukata. Preliminarne studije na ćelijama kvasca ukazuju da NER ima marginalnu ulogu u popravci DNK-lezija nastalih *trans*-platina kompleksima kao što su JM335 ili BBR3464 (54).

2. 1. 4. 2. 3. Uloga MMR sistema (MMR-Mismatch repair) u popravci *cis-/trans*-platina-DNA adukata

Sem proteina NER sistema, i proteini MMR sistema za popravku pogrešno sparenih baza, imaju ulogu u prepoznavanju DNK-lezija nastalih vezivanjem *cis*-platinskih kompleksa (61). Primećeno je da tumorske ćelije sa funkcionalnim MMR statusom odgovaraju pozitivno na tretman alkilujućim agensima (62). Prekomerna ekspresija proteina MMR sistema kao što je hMSH2, postoji u ćelijama tumora ovarijuma i testisa, na kojima hemioteraija cisplatinom daje posebno dobre rezultate. Pretpostavlja se da proteini MMR sistema, imaju bitnu ulogu u daljem prenošenju citotoksičnog signala od mesta formiranja DNK-adukta na ćelijske komponente u složenom lancu reakcija, odgovornom za uvođenje ćelije u apoptozu (63).

Zastojem ćelijskog ciklusa u G₁ i G₂ fazi nakon dejstva cisplatine javlja se u ćelijama sa funkcionalnim proteinima MMR, dok se kod ćelija deficitarnih u komponentama MMR sistema javlja zastoj samo u G₁ fazi ćelijskog ciklusa.

Ovo jasno indicira interakciju sa G₂ tačkom kontrole ćelijskog ciklusa, 'G2-checkpoint', dok je zastoj u G₁ fazi naizgled nezavisan od funkcije MMR proteina (62). Tako se zastoj u G₂ fazi ćelijskog ciklusa, koji je karakteristična pojava nakon tretmana tumorskih ćelija cisplatinom može pripisati delovanju MMR-a.

Međutim, ima indicija da MMR ne mora biti determinanta ćelijske senzitivnosti na citotoksično dejstvo *trans*-platinskih kompleksa. Polinuklearni *trans*-kompleks BBR3464 pokazuje citotoksičnu aktivnost i na cisplatina-rezistentnim ćelijama osteosarkoma U2-OS/Pt, okarakterisanim nedostatkom pojedinih komponenti MMR sistema (64).

2.2. ANTITUMORSKI POTENCIJAL KOMPLEKSA NA BAZI RUTENIJUMA(III), HROMA(III) I RODIJUMA(III)

Aktivnost cisplatine u lečenju tumora, kao i ograničenja koja su se javila pri hemioterapeutskoj primeni cisplatine (toksičnost za zdrava tkiva, rezistencija tumorskih ćelija na tretman cisplatinom) podstakli su dalja istraživanja kompleksa platine i proširili potragu za efikasnim antitumorskim agensom na široko polje kompleksa metala. U protekle dve decenije, sintetisano je i ispitana biološka aktivnost nekoliko hiljada kompleksa platine i velikog broja kompleksa drugih metala kao što su: zlato (Au), titan (Ti), gvožđa (Fe), paladijum (Pd), rutenijum (Ru), hrom (Cr), rodijum (Rh), galijum (Ga) i td (65, 66, 67). Veliki broj kompleksa hroma(III) i rodijuma(III) je sintetisan i ispitivan na ćelijama tumora (68). Hrom je normalno prisutan u ćelijama kao mikroelement i igra ulogu u insulin-zavisnom unutarćelijskom transportu glukoze (69). U velikim koncentracijama u ćeliji hrom(III) se vezuje sa DNK, koncentraciono zavisno, formirajući DNK-interlančane i DNK intralančane mostove, čime ometa replikaciju (70). Rodijum takođe interaguje sa DNK (71), pri čemu ispoljava mutageno svojstvo. Na ćelijama mikroba indukuje SOS reparaciju (72). Među testiranim kompleksima različitih metala izdvajaju se kompleksi rutenijuma na osnovu svojih antitumorskih i antimetastatskih osobina.

2.2.1. KOMPLEKSI RUTENIJUMA: PRIMENA U BIOMEDICINI

Kompleksi rutenijuma poseduju veliki potencijal za primenu u biomedicini kao alternativni hemioterapeutski agensi (72). Poznata je *antimikrobna* aktivnost pojedinih kompleksa rutenijuma na parazite tipa *Plasmodium* ili *Trypanosoma cruzi*. Komplex $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_3)(\text{hlorohinon})]^{2+}$ je 2-5 puta aktivniji naspram parazita *Plazmodium* u poređenju sa samim ligandom hlorohinon (73). Tiosemikarbazonski derivati Ru(III) poseduju *antibiotsku* aktivnost na Gram negativne bakterije tipa *Salmonella typhi* i *Enterobacterium faecalis*. Osobina Ru(III) jona da efikasno vezuje NO, može biti iskorišćena u terapiji fizioloških stanja karakterisanih visokim nivoom azotmonoksida, NO (npr. toksičnišok-sindrom koji nastaje tokom teških bakterijskih infekcija, kao posledica prekomerne sinteze NO od strane makrofaga, tj. NO indukovano kolapsa

kardiovaskularnog sistema) (74). Jedinjenje rutenijum-crveno poznato je kao efikasan *imunosupresivan* agens, odnosno ima osobinu da smanjenjem nivoa Ca^{2+} suprimira antigen-indukovanu proliferaciju T limfocita. Citotoksično dejstvo rutenijum-crveno ostvaruje tako što se vezuje za Ca^{2+} kanale na površini mitohondrija i blokira efluks Ca^{2+} , tako da zapravo ima *antimitohondrijalnu* aktivnost (73).

2. 2. 2. KOMPLEKSI RUTENIJUMA - POTENCIJAL ANTITUMORSKOG DEJSTVA

Karakteristike kompleksa rutenijuma koje ih čine toliko pogodnim za primenu u biomedicini i terapiji tumora su pre svega:

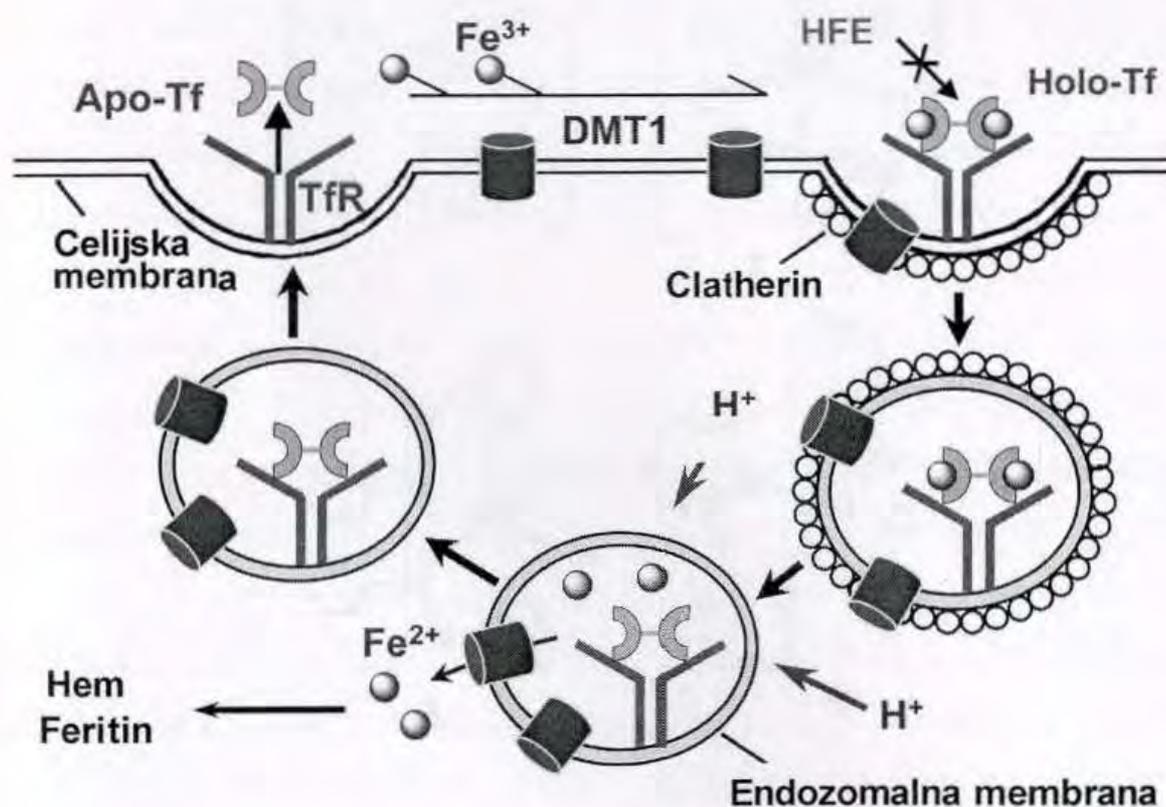
- sposobnost da se u krvi transportuje netoksično, korišćenjem sistema za transport gvožđa Fe(III),
- kinetika izmene liganada,
- širok opseg redoks-potencijala.

Pojedini kompleksi rutenijuma $[\text{Ru}[\text{Cl}_2(\text{DMSO})_2(4\text{-NO}_2\text{Im})_2]$, Im=imidazol, koriste se kao pomoćni agensi u radioterapiji tumora, odnosno povećavaju senzitivnost tumorskih ćelija na terapiju zračenjem, zahvaljujući osobini da poseduju veliki redoks-potencijal i da se vezuju za ćelijsku DNK (73).

Kada dospeju u krv, derivati rutenijuma se vezuju za transferin krvne plazme, čija je prevashodna uloga u transportu gvožđa(III) do receptora za transferin na površini ciljnih ćelija (Sl. 2.2.2.a.) Osobina malignih ćelija da imaju povećanu ekspresiju receptora za transferin u odnosu na ćelije zdravih tkiva (75, 76), otvara mogućnost da kompleksi rutenijuma budu specifično i u većoj meri dopremljeni do ćelija tumora korišćenjem transportnog sistema gvožđa(III), čime bi mogla da se prevaziđe nespecifičnost dejstva agensa, kao negativna odlika svih do sada poznatih hemioterapeutskih agenasa koji se primenjuju u lečenju tumora. Transferin je 80 kD glikoprotein, koji čini jedan polipeptidni lanac organizovan u dva domena, od kojih svaki ima vezivno mesto za Fe(III) (77). Joni gvožđa se vezuju preko dva ostatka tirozina (Tyr) i histidina (His) i asparaginske kiseline (Asp) u prisustvu karbonatnih jona CO_3^{2-} .

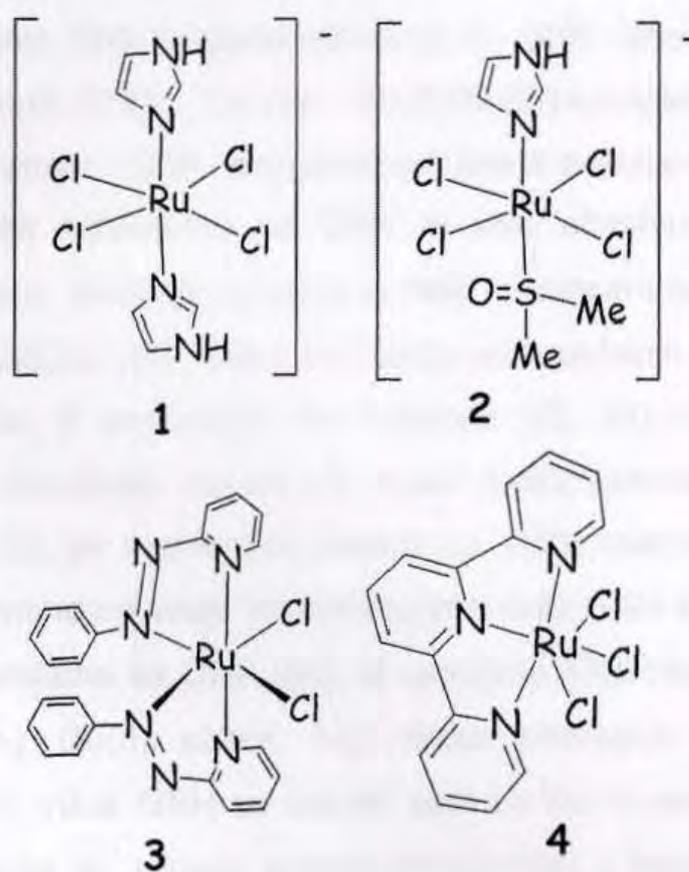
U uslovima niže pH vrednosti sredine dolazi do protonovanja ostatka histidina ili konformacione promene proteina usled izmene vodoničnih veza, što pogoduje oslobađanju jona Fe(III) iz kompleksa sa proteinom (78).

Za razliku od cisplatine koje se deaktivira u krvnoj plazmi, u interakciji sa proteinima plazme kompleksi rutenijuma se reverzibilno vezuju za transferin plazme, a oslobađaju se iz kompleksa sa proteinima u uslovima niže pH vrednosti sredine, u prisustvu ATP ili citrata. Takođe, za razliku od jona Fe(III) koji gube svoje ligande vezivanjem za apotransferin, u kompleksima Ru(III) N-heterociklični ligandi ostaju vezani za metal, što omogućuje transport celokupnog kompleksa do ćelija (79). Vezivanje antitumorskog agensa $\text{trans-[Ru(Im)}_2\text{Cl}_4\text{]}^-$ (Im=imidazol) (Sl. 2.2.2.b.) za apotransferin zahteva nekoliko sati, dok se vezivanje $\text{trans-[Ru(Ind)}_2\text{Cl}_4\text{]}^-$ (Ind=indazol) odvija za nekoliko minuta.



Sl. 2.2.2.a. Prikaz mehanizma usvajanja jona Fe(III) , odnosno jedinjenja Ru(III) , putem receptora za transferin.

Iako kompleksi rutenijuma dele sličnost sa kompleksima platine(II) u smislu kinetike izmene liganada, oktaedarska struktura kompleksa Ru(II) i Ru(III) za razliku od planarne strukture platinskih kompleksa, ukazuje da bi derivati rutenijuma mogli da imaju drugačiji mehanizam antitumorskog dejstva (79). U vodenim rastvorima oktaedarski antitumorski kompleks $trans-[Ru(Im)_2Cl_4]^-$, čija je struktura prikazana na Slici 2.2.2.b.1., podleže stepnjevitom disocijaciji hloridnih jona tj. hidrolizi. (80). Promena opsega apsorpcije kompleksa, ka plavo-zelenom delu vidljivog spektra ($\lambda = 585 \text{ nm}$), ukazuje na reakciju hidrolizovane forme kompleksa rutenijuma sa karbonatnim ili karboksilatnim jonima. Nakon hidrolize u unutarćelijskoj sredini, kompleks rutenijuma se aktivira za interakciju sa DNK.



Sl. 2.2.2.b. Strukturna formula kompleksa rutenijuma(III): 1) $trans-[Ru(Im)_2Cl_4]^-$, 2) $trans-[Ru(DMSO)(Im)_2Cl_4]^-$ (NAMI); 3, 4) kompleksa Ru(II) sa bidentatnim i tridentatnim piridinskim ligandima (1).

Ru(III) kompleksi sa N-koordinovanim ligandima (amonijak, imidazol, piridin) poseduju širok redoks-potencijal, u opsegu od 50-400 mV. Dovoljno su mali da priđu katalitičkom centru enzima, pa tako mogu efikasno da učestvuju u elektron-transfer reakcijama u ćeliji, odnosno prenosu elektrona od jednog molekula na drugi (81).

Pretpostavlja se da se *in vivo* dešava redukcija Ru(III) do Ru(II), kao reaktivnije forme rutenijuma sa većim afinitetom interakcije sa ćelijskom DNK, što je takozvana aktivacija kompleksa (82). Dosadašnja istraživanja ukazuju da kompleksi Ru(III) i Ru(II) mogu reagovati sa molekulom DNK i to uglavnom sa N-7 položajem guanina, na GC bogatim sekvencama (83). Do danas je sintetisan veliki broj kompleksa Ru(II) i Ru(III) sa ligandima tipa amina (84), dimetil-sulfoksida (85, 86), N-heterocikličnim amino ligandima (87, 88), koji pokazuju citotoksičnost na ćelijama tumora, kao i afinitet za interakciju sa DNK u smislu formiranja DNK-adukata, preloma na DNK lancu (89, 90) i indukovanja konformacionih promena DNK. Takođe, Ru(II)/Ru(III)-kompleksi mogu da formiraju interlančane mostove između DNK i ostataka histidina ili imidazola na proteinima (91).

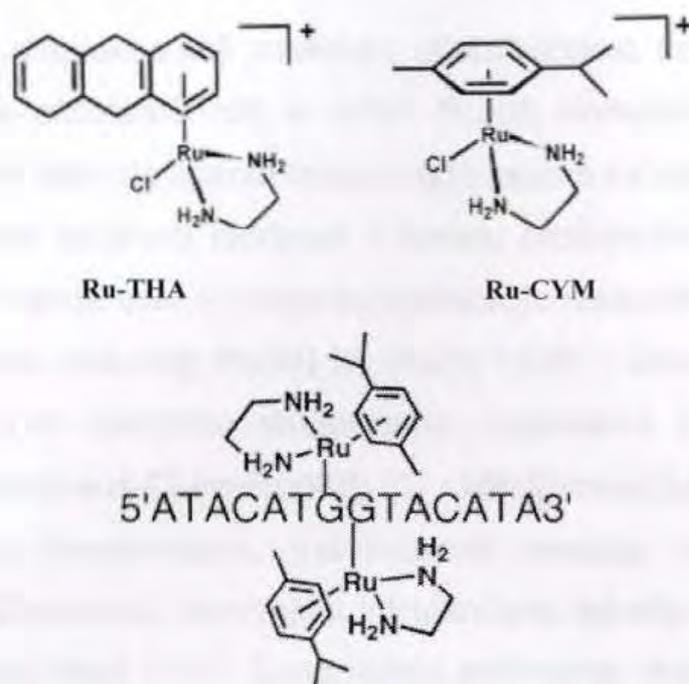
U modulaciji interakcije rutenijuma sa DNK *in vivo* učestvuje i glutation. Glutation (γ -glutamil-cisteinil-glicin), GSH, je prisutan u ćeliji u koncentraciji 0,1-10 mM i lako se oksiduje do disulfida GSSG (92). GSH štiti ćeliju od reaktivnih intermedijera kiseonika, toksičnih teških metala, ili produkata UV zračenja (93, 94). Povećanje koncentracije unutarćelijskog GSH doprinosi rezistenciji nekih ćelija tumora na citotoksični efekat kompleksa na bazi Pt(II), jer vezivanjem platine za GSH onemogućuje interakciju Pt(II) sa DNK. Isto tako, zavisno od svoje koncentracije u ćeliji GSH može da pojača ili umanja stepen interakcije rutenijuma sa DNK (95). U uslovima $[GSH/Ru(III)] \leq 1$ GSH redukuje Ru(III) do reaktivnijeg Ru(II) oblika, koji lakše interaguje sa DNK; u uslovima $[GSH/Ru(III)] \geq 1$ GSH, višak GSH se vezuje opet za Ru(II) jon i inhibiše interakciju sa DNK. GSH takođe može da zameni amminrutenijum(III) u kompleksu sa transferinom, ligand NH_3 u kompleksu $trans-[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ i piridin (Py) u kompleksu $[Ru(NH_3)_5 Py]^{3+}$ i formira $[GSRu(NH_3)_5]^+$, što ukazuje na aktivnu ulogu GSH u metabolizmu agenasa na bazi rutenijuma.

2. 2. 2. 1. Kompleksi Rutenijuma(II)

Citotoksičnost kompleksa rutenijuma(II) je u direktnoj korelaciji sa interakcijom sa molekulom DNK (96, 97, 98). Relativno novu klasu Ru(II) jedinjenja predstavljaju kompleksi Ru(II) sa aromatičnim ligandima tipa arena sa strukturnom formulom $[Ru^{II}(\eta^6\text{-aren})(en)X]$ ($X = Cl, I$; aren= p-kumen, bifenil; en= etilendiamin) (Sl.2.2.2.1.), koji su pokazali aktivnost uporedivu sa aktivnošću cisplatine ili karboplatine (99).

Strukturne karakteristike kompleksa koje se povezuju sa visokom citotoksičnošću su postojanje jednog stabilnog bidentatnog liganda (etilendiamin), hidrofobnog aromatičnog liganda (tetrahidroantracen), koji dozvoljava bolji pristup aromatičnom jezgru proteina (enzima) (100), kao i jednog "odlazećeg" liganda (hlorid) koji može biti meta supstitucionih reakcija. Ovaj tip kompleksa Ru(II) se odlikuje i aktivnošću na cisplatina-rezistentnim linijama: A2780*cis*, sa faktorom rezistencije na cisplatinu/karboplatinu $Fr=10$, i mehanizmom rezitencije zavisnim od smanjene ekspresije MLH1 proteina MMR sistema za reparaciju DNK.

Ispitivanja DNK interakcije ukazuju da Ru(II) kompleksi sa arena ligandima formiraju monofunkcionalne DNK adukte interagujući sa guaninom, a takođe se interkaliraju u DNK (Sl.2.2.2.1.) (101). U uklanjanju takvih lezija na DNK, NER sistem ima malu efikasnost. Kompleksi Ru(II) sa aromatičnim ligandima tipa arena ili 2-fenilazopiridina (102) pokazuju aktivnost na cisplatina rezistentnim A2780^{AD} ćelijama sa prekomernom ekspresijom P-170 glikoproteina odgovornog za sindrom *multi-drug-resistance* tj. rezistenciju na mnoge citotoksične agense.



Sl. 2.2.2.1. Kompleksi Ru(II) sa aromatičnim ligandima tipa arena sa strukturnom formulom $[Ru^{II}(\eta^6\text{-aren})(en)Cl]$ (aren= THA(tetrahidroantracen), CYM(cimen); en= etilendiamin). Prikazana je interakcija kompleksa Ru-CYM sa ostacima guanina na DNK lancu (104).

To ukazuje da mehanizmi rezistencije na citotoksično dejstvo platinskih agenasa nisu efektni i u slučaju Ru(II) agenasa. Ispitivanja mehanizma dejstva ukazuju na učešće p53 i p21/WAF1 u zastoju ćelijskog ciklusa, kao i u učešće p53 i Bax u apoptotskom odgovoru ćelije na Ru(II) agens (103).

Kompleksi Ru(II) sa aromatičnim ligandima tipa 3-aminopiridina, p-aminobenzojeve kiseline, pokazuju inhibiciju tipozomeraze II i visoku citotoksičnost na humanim ćelijama karcinoma kolona i dojke (104). Novosintetisani kompleksi Ru(II) sa ketokonazol ligandima indukuju kaspaza-3 zavisnu apoptozu na tumorskim ćelijama, nezavisno od funkcionalnog statusa p53 (105).

2. 2. 2. Kompleksi Rutenijuma(III)

Za razliku od Ru(II) kompleksa koji poseduju citotoksičnost, kompleksi Ru(III) odlikuju se odsustvom značajne citotoksičnosti *in vitro*. Ru(III) kompleksi su hemijski stabilni u unutarćelijskoj sredini, tako da ligandi ostaju dugo vezani za centralni metalni jon čime se može objasniti njihova relativna inertnost u smislu citotoksične aktivnosti. U tumorskim ćelijama uglavnom postoje uslovi manje koncentracije kiseonika kao i niže pH vrednosti, što može da pogoduje redukciji Ru(III) do Ru(II) (106) i time povećanju unutarćelijske reaktivnosti sa ciljnim ćelijskim strukturama. Ispitivanja DNK interakcije Ru(III) u kompleksima $\text{Him}[\text{trans-Cl}_4\text{Im}_2\text{Ru(III)}]$, $\text{Hind}[\text{trans-Cl}_4\text{Ind}_2\text{Ru(III)}]$, $\text{Na}[\text{trans-Cl}_4\text{Im}(\text{Me}_2\text{SO})\text{Ru(III)}]$ (Im=imidazol; Ind=indazol) ukazuju da se Ru(III) koordinuje ireverzibilno za DNK molekul, formirajući intralančane adukte koji menjaju konformaciju DNK i inhibišu sintezu RNK (107). Dosadašnja istrživanja ukazuju da iako je interakcija Ru(III) sa DNK moguća, ne mora biti u osnovi antitumorske aktivnosti kompleksa na bazi Ru(III) (108).

Pri tretmanu HeLa i Jurkat ćelija kompleksom $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2]\text{Cl}$, u koncentraciji potrebnoj za postizanje 50% inhibicije rasta ($\text{IC}_{50 \text{ HeLa}} = 3,5 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{50 \text{ Jurkat}} = 190 \mu\text{M}$) (24 sata inkubacije) postiže se neznatno veći stepen vezivanja rutenijuma za DNK HeLa ćelija u odnosu na DNK Jurkat ćelija (109). Dakle, DNK interakcija kompleksa rutenijuma nije u korelaciji sa citotoksičnošću u ovom slučaju. Razlika u citotoksičnoj aktivnosti $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2]\text{Cl}$ na dvema ćelijskim linijama se objašnjava smanjenim unutarćelijskim transportom u Jurkat ćelijama.

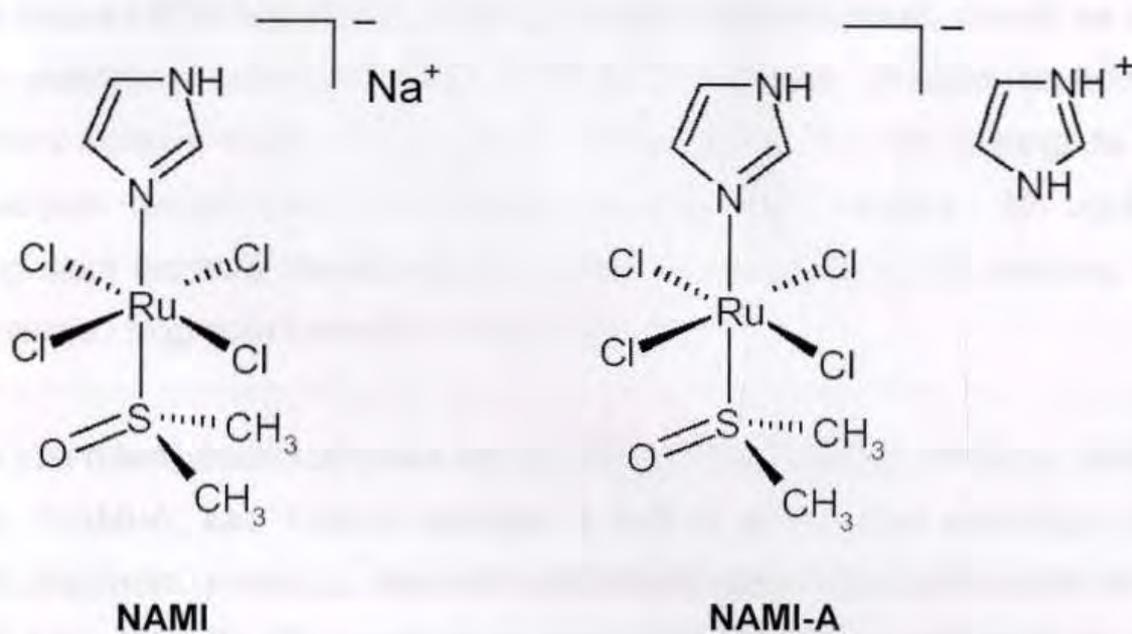
Međutim kompleks $\text{trans-}[\text{Ru}(\text{Im})_2\text{Cl}_4](\text{ImH})$ koji pokazuje sličnu citotoksičnost na dvema ćelijskim linijama ($\text{IC}_{50 \text{ HeLa}} = 2,0 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{50 \text{ Jurkat}} = 1,3 \mu\text{M}$), ima i dalje mali stepen Jurkat/DNK interakcije kao i kompleks sa manjom citotoksičnošću.

Derivati rutenijuma(III) retko poseduju citotoksično dejstvo i njihov antitumorski efekat ne proizilazi iz citotoksičnosti. Tačan mehanizam antitumorskog dejstva kompleksa na bazi Ru(III) još uvek nije razjašnjen, ali je pretpostavka da Ru(III) kompleks utiče na ekspresiju proteina u ćeliji, u interakciji sa RNK ili proteinima u ćeliji ili na ćelijskoj membrani. Neka istrživanja sa NAMI ili polinuklearnim kompleksima rutenijuma potvrđuju postojanje interlančanih DNK-Ru(III)-protein kompleksa u ćeliji (110).

Takođe je moguće da kompleksi Ru(III) izazivaju zadebljanje (ugušćenje) proteinskog sloja bazalne membrane oko ćelija tumora i time inhibišu proces invazije i metastaze (111).

2. 2. 2. 3. Kompleksi Ru(III) sa antimetastatskim potencijalom: NAMI I NAMI-A

Kompleksi rutenijuma(III) sa dimetil-sulfoksidom (DMSO) kao što su *cis*-/ *trans*-[Ru(Me₂SO)₄Cl₂] su među prvim kompleksima Ru(III) ispitivanim na ćelijama tumora (112, 113). Oba kompleksa odlikuju se odsustvom značajne citotoksičnosti *in vitro*, (IC₅₀ >100 μM). Oba kompleksa se vezuju za DNK indukujući konformacione promene B → Z. Za razliku od *cis*- izomera koji nema antitumorsku aktivnost, *trans*- izomer naročito *trans*-[Ru(Me₂SO)(Im)Cl₄]Na (NAMI) se odlikuje potencijalom inhibicije mikrometastaza (114, 115).



Sl. 2.2.2.3. Strukturne formule kompleksa NAMI i NAMI-A. Molekulska težina kompleksa NAMI-A = 458,18 g/mol. Molekulska formula, C₈H₁₅Cl₄N₄ORu(III)S. NAMI-A je a kompleks rutenijuma izveden iz kompleksa NAMI, tako što je jon Na⁺ zamenjen imidazolnim jezgrom (ImH).

Natrijum-*trans*-imidazoldimetil-sulfoksid-tetrahlrorutenat(III), Na[*trans*-RuCl₄Me₂SO(imidazol)] (NAMI) i imidazolijum-*trans*-imidazoldimetil-sulfoksid tetrahlrorutenat(III) (ImH[*trans*-RuCl₄(DMSO)Im]) (NAMI-A) (Sl.2.2.2.3.) pripadaju novoj generaciji kompleksa okarakterisanih odsustvom citotoksičnosti *in vitro* (116, 117), ali postojanjem *in vivo* apoptotskog i antimetastatskog dejstva (118, 119).

Poređenjem sa cisplatinom, NAMI-A je 1053 puta manje citotoksičan, ispitivanjem na nekoliko tumorskih ćelijskih linija: Igrov-1, 2008, MCF-7, T47D (120). Istovremeno, unutarćelijska akumulacija i *in vivo* DNK- vezivanje za NAMI-A je 42 puta manje, iako pokazuje afinitet za GC bogate regione DNK, slično cisplatinu. Smanjena citotoksičnost kompleksa NAMI-A je rezultat smanjenog vezivanja za DNK. NAMI formira DNK-protein interlančane mostove i neznatan broj DNK interlančanih mostova (< 1%); indukuje konformacione promene B → Z dvostrukog heliksa i inhibiše aktivnost DNK- i RNK-polimeraza (114). Antimetastatski potencijal NAMI nije posledica citotoksičnog efekta ovog kompleksa i ispoljen je na modelima tumora: mišjeg Lewis carcinoma pluća, MCa carcinoma sisara i B16 melanoma. Antimetastaska aktivnost NAMI dovodi se u vezu sa inhibicijom matriksne metaloproteinaze-2 (MMP-2) i *in vivo* uticajem na koncentraciju TIMP-2 (tkivni inhibitor MMP-2 koga luči sam organizam), Takođe je moguće da NAMI, premošćivanjem proteinskih komponenti vanćelijskog matriksa, tj. ugušćivanjem proteinskog sloja bazalne membrane oko tumora i tumorskih krvnih sudova, posredno otežava invaziju i migraciju tumorskih ćelija (120, 121).

NAMI-A je prvi rutenijumski kompleks koji je ušao u I fazu kliničkih studija u Amsterdamu (Holandija). NAMI-A, kao i serija analoga u kojima je imidazol zamenjen pirazolom, tiazolom ili pirazinom, pokazuju odsustvo citotoksičnosti *in vitro* ispitivanjem na ćelijama TS/A, B16-F10, MCF-7), ali poseduje *in vivo* antimetastatsku aktivnost na modelima tumora: mišjeg Lewis carcinoma pluća, MCa carcinoma sisara i B16 melanoma. NAMI-A i analozi redukuju formiranje metastaza, indukuju smanjenje rasta primarnog tumora i povećanje preživljavanja životinja (122). NAMI-A, primenjen intraperitonealno se izbacuje iz organizma veoma brzo preko bubrega: u roku od 5 min. svega 10% prvobitne koncentracije agensa postoji u krvi (114).

U *in vivo* ispitivanjima na modelima MCa carcinoma sisara, dinuklearni kompleks Ru(III), u kome su dva centralna jona Ru(III) premošćena bpiridinom ili etilen-bpiridinom, pokazuje antimetastatske osobine, slične kompleksu NAMI-A (123).

Tačan mehanizam antimetastatskog dejstva NAMI-A nije do kraja razjašnjen. Poznato je da NAMI-A inhibiše funkciju MMP-2, na nivou genske ekspresije ili posredstvom TIMP-2 (119). Takođe, kao i NAMI, ima uticaja na ugušćenje proteinskog sloja koji inkapsulira tumorsko tkivo i okružuje krvne sudove, tako da posredno umanjuje verovatnoću migracije i invazije tumorskih ćelija. Ćelije tretirane ovim kompleksom, pokazuju redukciju proliferacije, povećanu ekspresiju receptora CD8+ i CD4+, kao i karakterističan zastoj ćelijskog ciklusa u G2/M fazi (124).

Dokazi o antimetastatskom dejstvu kompleksa rutenijuma predstavljaju osnovu daljih ispitivanja i postavljanja racionalnih principa u dizajniranju efikasnog antimetastatskog agensa.

2. 3. MEHANIZAM METASTAZIRANJA I INVAZIJE TUMORA

Invazivnost i metastatski potencijal tumora su najopasniji aspekti bolesti koji najviše ugrožavaju život pacijenta (125-127). Kada tumor postane invazivan, rasipanje tumorskih ćelija u organizmu odvija se putem limfnih kanala ili krvnih sudova. Lokalnom invazijom tumorskog tkiva u zdravo tkivo/organ tumor dovodi do kompresije zdravih tkiva, njihovog oštećenja ili ometanja normalne funkcije organa, čime ugrožava život domaćina. Najopasniji momenat u razvoju bolesti je upravo uspostavljanje metastaze, kada pacijent ne može više biti lečen primenom lokalnih terapija.

Tumori slične veličine i histologije mogu imati potpuno različit metastatski potencijal (*m_{sp}*), zahvaljujući genetskim faktorima i uticajima sredine. Faktori koji određuju *m_{sp}* ćelije su:

- Mikrosredina i citokini lokalnog tkiva;
- Faktori angiogeneze;
- Genetska osnova tumorske ćelije, odnosno molekularni fenotip ćelije.

2. 3. 1. MIGRACIJA TUMORSKIH ĆELIJA

Migracija tumorskih ćelija je neophodan inicijalni korak u metastazi tumora, najpre u trenutku kada ćelija tumora napušta primarni tumor i dospeva u cirkulaciju, kao i na kraju invazije kada se prikači na drugo mesto u organizmu, gde će nastaviti da se umnožava i formirati sekundarni tumor. Tumorska ćelija odgovara na gomilu signala koji aktiviraju pokretljivost i rast ćelije, odnosno signala koje luče same tumorske ćelije, zdrava tkiva i vanćelijski matriks (ECM-*extra cellular matrix*) (128, 129). Kao odgovor na delovanje hemoatraktanata, na tumorskim ćelijama javljaju se pseudopodije koje mogu imati višestruku funkciju: kao senzorni elementi za usmeravanje migracije ćelije, u sekreciji faktora za mobilnost, u indukciji procesa proteolize matriksa tokom kretanja tumorske ćelije kroz ECM, kao i u trasiranju kretanja tumorskih ćelija (130).

U procesu metastaze tumor se "oslanja" na domaćina, u smislu da su za migraciju tumorskih ćelija neophodni neki faktori hemotaksije koje luče zdrava tkiva; ali proces metastaze se ne može odvijati bez autokrinih hemoatraktanata iz samih tumorskih ćelija (AMF- *autocrine motility factor*) (131).

Prvi takav faktor koji je izolovan je autotaksin (AXT), membranska protein-kinaza (132, 133), locirana na površini ćelije (134). Novija istraživanja ukazuju na njenu fosfodiesteraznu aktivnost.

U regulaciji procesa proliferacije tumorskih ćelija, migracije, prikačinjanja ćelije za podlogu, proteolize ECM, uključeni su i mnogi faktori rasta koji se vezuju za tirozin-kinaza-povezane receptore (135), kao što su: **EGF** (*epidermal growth factor*) epidermalni faktor rasta; **PDGF** (*platelet derived growth factor*) faktor rasta krvnih pločica; **VEGF** (*vascular endothelial growth factor*) vaskularni endotelijalni faktor rasta; **HGF/SF**, parakrini faktor pokretljivosti koji luče epitelijalne i endotelijalne ćelije; **HGS/SF**, vezuje se za receptor produkt protoonkogeno *c-met*; **TGF- β** , faktor rasta tumorskih ćelija.

2. 3. 2. PROCES INVAZIJE TUMORSKIH ČELIJA

Dosadašnja istraživanja ukazuju da su *angiogeneza* tj. tumorom indukovana neovaskularizacija tumorskog tkiva i *invazija* obavezni rani događaji u razvoju tumora. *Invazija* je mnogo efikasniji proces od metastaze, sa milionima ćelija rasutih u cirkulaciji dnevno, ali samo nekoliko ćelija uspeva da uspostavi nove kolonije na manje ili više udaljenim mestima od primarnog tumora. Proces invazije, nije statičan proces koji se odvija zahvaljujući pritisku sredine usled prekomerne proliferacije tumorskih ćelija, već je aktivan, dinamičan proces koji zahteva proteinsku sintezu i degradaciju (136). Tumorske ćelije moraju da sintetišu i luče enzime koji razgrađuju vanćelijski matriks u cilju invazije u peritonealnu šupljinu ili krvotok. Primarni događaj u invazivnoj kaskadi ćelija tumora je proteoliza kolagena bazalne membrane, koju katalizuju enzimi metaloproteinaze matriksa (MMP).

2. 3. 3. METALOPROTEINAZE MATRIKSA (MMPs-" MATRIX METALLOPROTEINASES")

Matriksne metaloproteinaze (MMP-"matrix metalloproteinase") su familija od oko 28 metaloenzima (137), koji katalizuju razgradnju čitavog niza proteina vanćelijskog matriksa kao što su: laminin, kolagen (IV), fibrin, fibronektin, vitronektin. Prvobitna podela enzima familije MMP bila je na osnovu specifičnosti za pojedine komponente ECM na: kolagenaze, želatinaze, stromelizini, matrelizini.

Danas je prihvaćena podela MMP na osnovu strukture na osam klasa, od kojih su pet sekretorne metalproteinaze a tri su membranski vezane MMPs (MT-MMPs) (138). Sekretorne metaloproteinaze takodje ostaju locirane blizu ćelijske membrane, interakcijom sa receptornim proteinima ćelije kao što su integrin (α , β , χ) ili receptor CD44.

MMP se luče u formi neaktivnog-proenzima, tj, da bi se aktivirale neophodno je katalitičko cepanje N-terminalnog domena enzima, u prisustvu neophodnih kofaktora tj. jona bakra, Cu^{2+} i cinka, Zn^{2+} (139). Postoje takozvani plazminogen aktivatori, odnosno serin-proteaze koje prevode plazminogen u aktivnu formu enzima.

Osnovna gradivna komponenta bazalne membrane je kolagen tipa (IV), na koga se oslanjaju laminin, heparan-sulfat, proteoglikani i još neki sporedni elementi. Kolagen tipa (IV) razgradjuju, dve želatinaze, različite po svojoj katalitičkoj aktivnosti: želatinaza MMP-2 (92 KD) i MMP-9 (72 KD) (140). Želatinaza MMP-2 je locirana na površini ćelija melanoma i površini krvnih sudova koji prožimaju tumor, prezentovana u vidu katalitički aktivne forme, čime se ubrzava degradacija kolagena. Enzimi MMP familije takodje imaju ulogu u: oslobadjanju faktora rasta TGF- β nakon katalitičkog cepanja prekursorskih formi; proteolizi receptora za faktore rasta EGF familije: HER2 i HER4; proteolizi ćelijskih receptora za adheziju; integrin, E-kadherin i CD44, što rezultuje povećanjem invazivnog ponašanja ćelije. MMP enzimi imaju ulogu u regulaciji angiogeneze i indukciji apoptoze ćelija (141). MMP-9 proteolizom interleukina-2 inhibiše IL-2 indukovanu proliferaciju T limfocita.

Degradacija bazalne membrane ne zavisi samo o količini prisutnih aktiviranih proteaza, već se radi o ravnoteži sa prirodno postojećim inhibitorima. Postoje endogeni faktori koje luči zdravo tkivo, takozvani TIMP faktori (*TIMP-tissue inhibitor of metalloproteinase family*), koji imaju funkciju u inhibiciji metaloproteinaza (142, 143)

Ravnoteža izmedju faktora vanćelijske sredine: MT-MMPs, MMPs i TIMP određuje da li će doći do degradacije matriksa. TIMP- faktori deluju kao specifični ali i kao nespecifični inhibitori. Funkcija TIMP-1 i TIMP-2 nije samo u inhibiciji metaloproteinaza (144). One mogu delovati i kao citokini kao i u prepoznaju nekih recepta na površini ćelija, što indicira da oni imaju mnogo značajniju i širu ulogu. Takodje, inhibitor metaloproteinaza je i makroglobulin- α krvne plazme.

Uočena je pozitivna korelacija izmedju MMP-aktivnosti tumorskih ćelija i invazivnog potencijala tumora, u studijama na širokom spektru tumora kao što su tumor ovarijuma, pankreasa, pluća i dojke. Tako je razvijen veliki broj agenasa koji ostvaruju svoje dejstvo inhibicijom enzima familije MMP ili na nivou genske ekspresije, ili inhibicijom signalnih puteva koji indukuju MMP transkripciju, ili inhibicijom interakcije MMP sa drugim proteinima (141).

Direktni inhibitori MMP- enzima se mogu podeliti u četiri grupe: kolagen-peptidomimetici, kolagen ne-peptidomimetici, tetraciklini i kratki peptidi. Kratak prikaz sintetskih inhibitora MMP-enzima dat je u Tabeli 2. 3. Veliki broj ovakvih agenasa je stigao do faze III kliničkih studija.

Tabela 2. 3. Prikaz sintetskih inhibitora metaloproteinaza (141).

INHIBITORI MATRIKSNIH METALOPROTEINAZA		
Kategorije	Karakteristike	Naziv agensa
Kolagen(IV) peptidomimetici	Organska jedinjenja analozi supstrata za MMP	Batimastat Marimastat
Kolagen(IV) ne-peptidomimetici	Organska jedinjenja konformaciono komplementarna vezivnom mestu enzima MMP	BAY-12-9566 Prinomastat/AG3340 BMS 275291 CGS 27023/MMI270
Tetraciklini	Analozi tetraciklina bez antibiotske aktivnosti inhibišu aktivnost i sintezu MMP	Metastat
Kratki peptidi	Peptidi visoko specifični za vezivno mesto MMP	
Nekonvencionalni	Ekstrakt iz hrskavice ajkula Inhibitor angiogeneze	Neovastat
	Komponente zelenog čaja Inhibitori MMP-2 i -9	
	Inhibitor MMP-2	Acetilsalicilna kiselina

2. 3. 4. GENETSKA REGULACIJA PROCESA METASTAZIRANJA

Metastatski fenotip zahteva dodatne genetske promene sem onih koje su odgovorne sa nekontrolisanu proliferaciju. Identifikovan je veliki broj onkogeni koji samostalno ili u kombinaciji indukuju takozvani "anchorage-independent" rast ćelija u koloniji (145). Ima indikacija da postoje onkogeni koji samostalno regulišu invazivni i metastatski potencijal ćelije. Jedan od najbolje izučenih onkogeni je H-ras koji, transfektovan u ćelije NIH-3T3, dovodi do pojava metastaza *in vivo*. Otkriveni su, takodje, *nm23* i *KISS-1* geni (146). *nm23* kodira za nukleotid-difosfa-kinazu.

Kada se govori o regulaciji metastatskog potencijala ćelije, još uvek nije razjašnjeno da li je ta osobina nezavisno determinisana i kontrolisana u ćelijama tumora ili je to završni korak u kaskadi ćelijske transformacije.

2. 4. KASPAZE - ULOGA U APOPTOZI

Apoptoza, "programirana ćelijska smrt", je aktivni, genetički kontrolisani proces uklanjanja suvišnih ili oštećenih ćelija. Ovaj tip ćelijske smrti podrazumeva prirodnu degeneraciju ćelija, ali nađeno je da se javlja i pod fiziološkim, kao i uslovima koji su patološki za ćeliju.

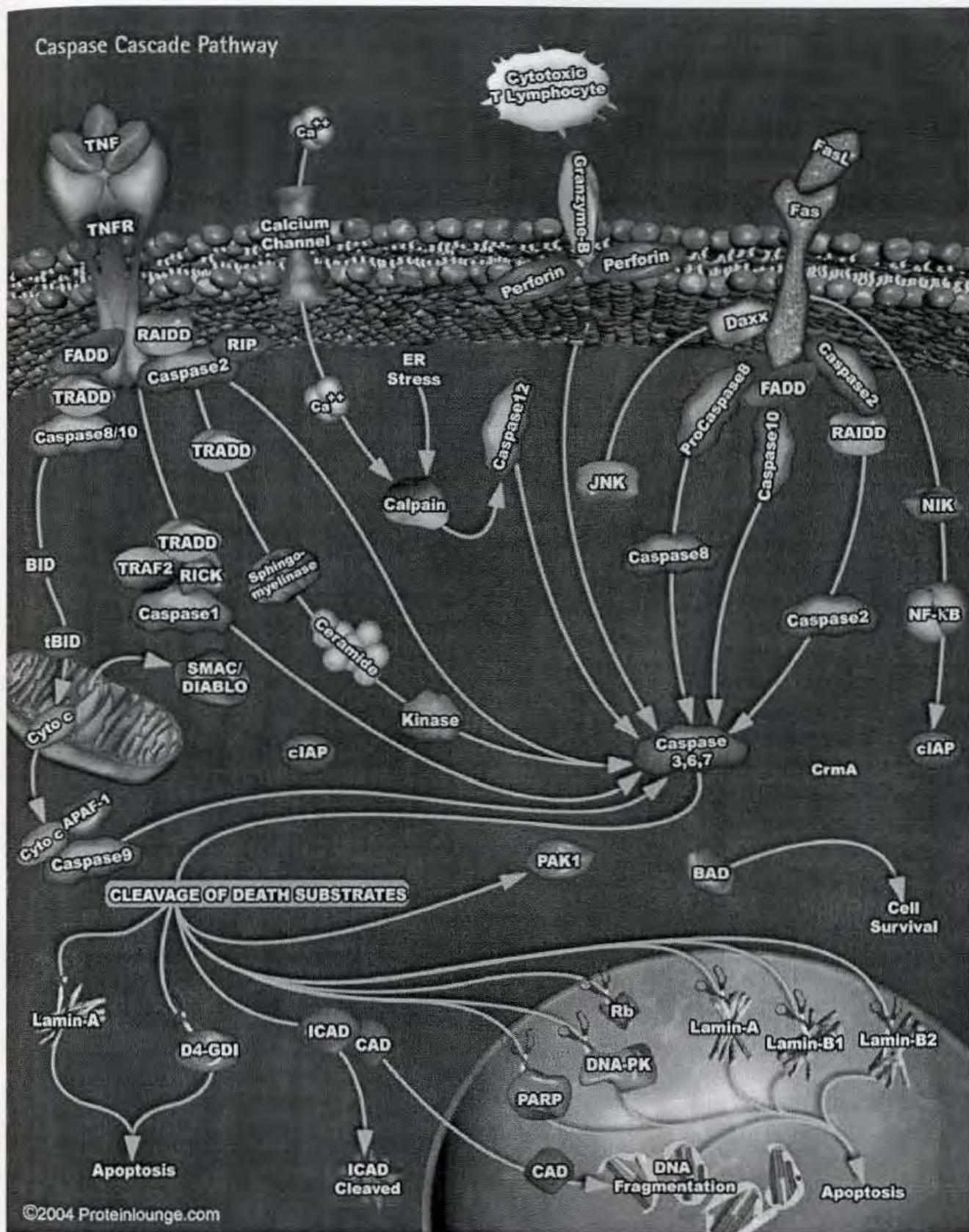
Apoptoza je okarakterisana serijom morfoloških i biohemijskih karakteristika uočljivih na nivou ćelijske plazma membrane, jedarnog materijala i ćelijskih organela (146). Tokom apoptoze dolazi do fragmentacije DNK, kondenzacije hromatina, skupljanja ćelije, pupljenja membrane i formiranja membranom ovičenih ostataka ćelijskog materijala, takozvanih apoptotskih tela. Ove promene mogu se odigrati u roku od 30-60 minuta i rezultat su proteolitičkog dejstva enzima iz familije cistein-proteaza. Pored Bcl-familije proteina od čije funkcije/disfunkcije zavisi ulazak ćelije u apoptozu, kaspaze predstavljaju glavne izvršioce mehanizma apoptoze (147, 148). Kaspaze se sintetišu u vidu neaktivnog proenzima (zimogena), a aktiviraju se (auto)katalitičkim cepanjem polipeptidnog lanca, čime nastaju dve subjedinice heterodimera.

U ćelijama zdravih tkiva kaspaze su blokirane u neaktivnoj formi zahvaljujući IAP-proteinima, takozvanim inhibitorima apoptoze (149). Kaspaze se po svojoj funkciji mogu podeliti na: *inicijatorne*, kao što su kaspaza-8 i-9, (učestvuju u aktivaciji ostalih kaspaza); *efektorne*: kao što je kaspaza-3 (učestvuju u proteolitičkoj degradaciji ciljnih enzima (148, 150). Složeni mehanizam propagacije apoptoze u kome učestvuju kaspaze je prikazan na slici 2. 4. (151). Supstrat za delovanje ovih enzima su signalni proteini koji održavaju strukturni integritet ćelije kao i proteini–negativni regulatori koji štite ćeliju od ulaska u apoptozu, kao što su: protein I^{CAD}, inhibitor DNK- nukleaze; protein Bcl-2, negativni regulator apoptoze; *lamin*-gradivni protein, koji u vidu polimera oblaže nuklearnu membranu, a takođe učestvuje u organizaciji hromatina; PARP (*PolyADP-ribose polymerase*), nuklearni enzim koji katalizuje polimerizaciju ADP-riboze u oligonukleotidni lanac. Smatra se da PARP ima ulogu u popravci lezija DNK. Polimer ADP-riboze, vezivanjem DNK templata, uklanja histonske proteine i omogućuje pristup DNK-reparacionih enzima.

Postoji nekoliko puteva aktivacije apoptoze:

- Preko ćelijskih receptora iz familije TMF (*tumor-necrosis faktor*) kao što je Fas/CD95, koji nakon vezivanja citotoksičnog liganda (FAS) prenose signal na kaspazu-8, i često pro-kaspazu 10, Kaspaza-8 zatim aktivira efektorne kaspaze (-3, -6, -7) (152).
- Oslobađanjem u citosol proteina mitohondrija kao što su: citohrom c, faktor indukcije apoptoze (*AIF-apoptosis inducing factor*), endonukleaza-G. Citohrom c učestvuje dalje u propagaciji signala na kaspazu-9.
- Putevi pokretanja apoptoze nezavisno od kaspaza, npr. aktivacijom AIF.

Tumorske ćelije imaju pojačanu ekspresiju kaspaza ali, takođe, i odgovarajućih inhibitora. Skorija istraživanja ukazuju da se pojedini derivati polifeniluree vezuju za inhibitore kaspaza -3, -7 i -9, (XIAP) (153). Takozvani XIAP antagonisti, nemaju bitnih efekata na zdravo tkivo *in vivo*, a mogu podstaći apoptozu tumorskih ćelija direktno, premošćenjem brojnih elemenata kaskade. Kaspaze i njihovi inhibitori/aktivatori predstavljaju značajne terapijske markere u dizajniranju antitumorskih agenasa.

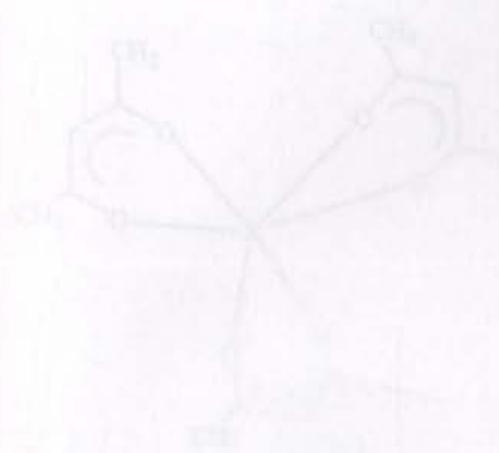


Slika 2.4. Prikaz mehanizma apoptoze putem aktivacije kaspaza (<http://www.calbiochem.apoptosis.com>)

3. 1. KEMIJSKA STRUKTURA ISPITIVANIH KOMPLEKSA

3. MATERIJAL I METODE

Kemijska struktura kompleksa platina(II), rhenijuma(III), rroma(II) i ruzijuma(III); čija je antitumorska aktivnost ispitivana u ovom radu, prikazana je na slikama (Sl. 3.1.a i 3.b.). Svi navedeni kompleksi su strukturalno na osnovu prirode ligandnih podjela (5, 354). Čistoća kompleksa određena je metodom NMR analizom.

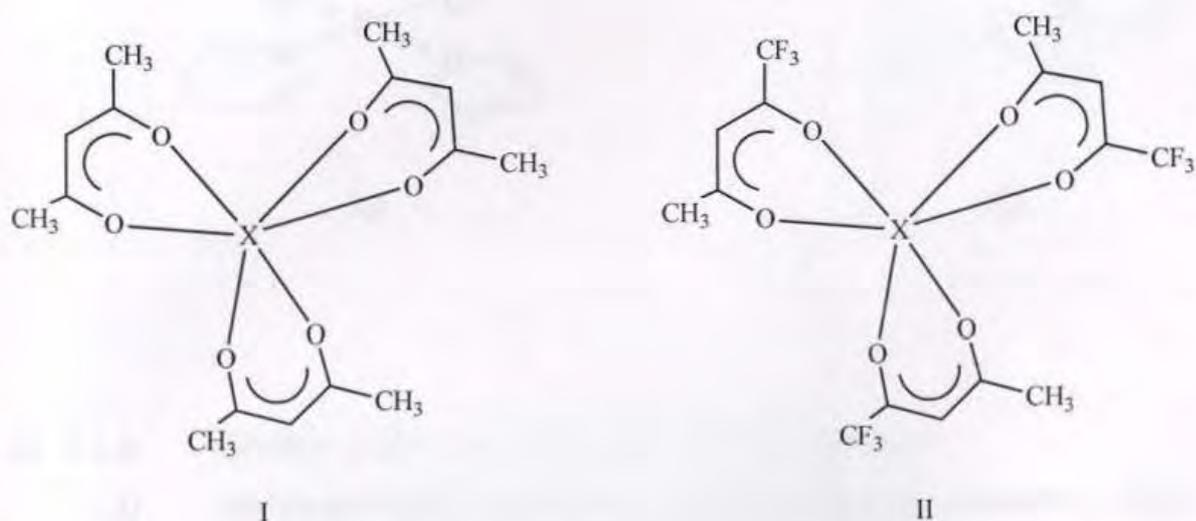


Sl. 3.1.a. Strukturna formula kompleksa platina(II) sa bidentatnim ligandima 2,6-dimetilpiridinom i bidentatnim β -dikloropiridinom.

- I* Kompleks sa bidentatnim 2,6-dimetilpiridinom i bidentatnim β -dikloropiridinom
 $\text{Cr(III)}, \text{Rh(III)}$
- II* Kompleks sa bidentatnim 2,6-dimetilpiridinom i bidentatnim β -dikloropiridinom
 $\text{X}=\text{Ru(III)}$

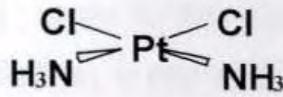
3. 1. HEMIJSKA STRUKTURA ISPITIVANIH KOMPLEKSA

Hemijska struktura kompleksa platine(II), rutenijuma(III), hroma(III) i rodijuma(III), čija je antitumorska aktivnost ispitivana u ovom radu, prikazana je na slikama (Sl. 3.1.a. i b.). Svi navedeni kompleksi su sintetisani na osnovu poznatih literaturnih podataka (8, 154). Čistoća kompleksa određena je mikroanalizom i NMR analizom.

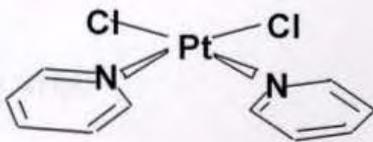


Sl. 3.1.a. Strukturne formule kompleksa Ru(III), Cr(III) i Rh(III) koji sadrže bidentatne β -diketonato ligande:

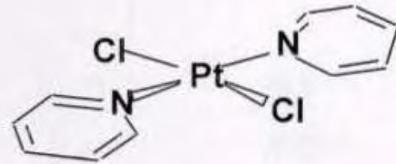
- I) Kompleks sa bidentatnim acetilacetonaat ligandom (acac); X=Ru(III), Cr(III), Rh(III);
- II) Kompleks sa bidentatnim trifluoroacetilacetonaat ligandom (tfac); X=Ru(III).



I)



II)



III)

Sl. 3.1.b. Strukturne formule ispitivanih Pt(II) kompleksa:

- I) *cis*-diamminodihloroplatina(II), *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], cisplatina, CDDP;
- II) *cis*-dipiridindihloroplatina(II), *cis*-[Pt(Py)₂Cl₂], (Py=piridin);
- III) *trans*-dipiridindihloroplatina(II), *trans*-[Pt(Py)₂Cl₂], (Py=piridin).

3. 2. SASTAV HRANLJIVOG MEDIJUMA RPMI 1640

RPMI-1640 medium je primarno firmulisan i namenjen za gajenje humanih ćelija u kulturi koje rastu u monosloju ili u suspenziji. RPMI 1640 podloga je proizvod istraživača Moore *et al.* (155), sa instituta "Roswell Park Memorial Institute", po čemu joj je i dat naziv RPMI. Osnovni sadržaj podloge je fosfatni pufer (PBS-Phosphate Buffer Saline), u koji se dodaju amino kiseline i vitamini.

Hemijski sastav RPMI 1640 podloge je sledeći (g/l):

3. 2. 1. NEORGANSKE SOLI

Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	0,1
KCl	4,0
MgSO ₄	0,048
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,10
NaCl	5,960
NaHCO ₃	2,0
Na ₂ HPO ₄	0,80

3. 2. 2. AMINOKISELINE

L-glutamin	0,3
L-Glicin	0,01
L-Histidin	0,015
L-Hidroksiprolin	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 x 2H ₂ O	0,029
L-Valin	0,02

3. 2. 3. VITAMINI

D-Biotin	0,0002
Holin-hlorid	0,003
Folna kiselina	0,001
Mioinozitol	0,035
Niacinamid	0,001
p-Aminobenzoeva kis.	0,001
D-Pantotenska kis.	0,00025
Piridoksin x HCl	0,001
Riboflavin	0,002
Tiamin x Hcl	0,001
Vitamin B12	0,000005

3. 2. 4. OSTALE KOMPONENTE

D-Glukoza	2
Glutation	0,001
HEPES	5,958
Fenol crveno (Na-so)	0,0053

3. 3. SASTAV McCOY'S 5A MEDIJUMA (MODIFIKOVANOG)

McCoy-ev medium je prvobitno formulisan i primenjen za gajenje humanih limfocita (155). Modifikovani McCoy-ev 5A medijum je baziran na prvobitnoj formuli i modifikovan od strane istraživača Hsu i Kellog (157), a kasnije dodatno modifikovan od strane Iwakata i Grace (157a). Osnovni sadržaj podloge je fosfatni pufer, u koji se dodaju neorganske soli, amino-kiseline, vitamini i ostale komponente.

Hemijski sastav McCoy-eve 5A podloge je sledeći (g/l):

3. 3. 1. NEORGANSKE SOLI

CaCl ₂ (anhyd.)	1,0
CaCl ₂ x H ₂ O	1,32
KCl	4,0
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,0
NaCl	5,960
NaHCO ₃	2,20
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,58
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	0,655

3. 3. 2. AMINOKISELINE

L-glutamin	0,3
L-Glicin	0,01
L-Histidin	0,015
L-Hidroksiprolin	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 x 2H ₂ O	0,029
L-Valin	0,02

3. 3. 3. VITAMINI

Vitamin C	0,0005
D-Biotin	0,0002
Holin-hlorid	0,005
Folna kiselina	0,0098
i-Inozitol	0,036
Nikotinamid	0,0005
Nikotinska kis.	0,0005
p-Aminobenzoeva kis.	0,001
D-kalcijumpantotenat	0,0002
Piridoksin x HCl	0,0005
Piridoksal x HCl	0,0005
Riboflavin	0,0002
Tiamin x HCl	0,0002
Vitamin B12	0,002

3. 3. 4. OSTALE KOMPONENTE

Bakto-pepton	0,6
D-Gluukoza	3,0
Glutation	0,0005
HEPES	5,960
Fenol crveno(Na-so)	0,01

3. 4. PRIPREMA HRANLJIVOG MEDIJUMA

Prašasta podloga; RPMI 1640; McCoy's 5A (Sigma Chem. Co, St. Louis. SAD) je rastvorena u sterilnoj destilovanoj H₂O (102 g/ l), uz mešanje na 15-20 °C. U rastvor je dodato 2 g NaHCO₃. Tokom pripreme podloge pH vrednost medijuma je podešavana na 0,1-0,2 jedinica ispod željene pH vrednosti, koja iznosi 6,7-7,0. Podešavanje pH je vršeno rastvorima 1M HCl i 1M NaOH, a provera pH je vršena lakmus papirom. Podloga je sterilisana takozvanom "hladnom sterilizacijom", korišćenjem membranskog filtra poroznosti 0,22 mikrona.

U podlogu je dodato 10% toplotom inaktivisanog fetalnog goveđeg seruma (FCS- "fetal calf serum"). Pripremljena podloga je čuvana u frižideru, a pre upotrebe, tj. rada sa ćelijama zagrejana je do 37°C u vodenom kupatilu.

3. 5. KULTURE ĆELIJA

U radu je upotrebljen panel od 7 ćelijskih linija tumora, od kojih su ćelije HeLa, B16, K562, Jurkat ćelijske linije iz kolekcije Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije; A2780, U2-OS, U2-OS/Pt su poklon Nacionalnog instituta za onkologiju u Milanu (Ist. Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano, Italia).

3. 5. 1. ĆELIJE TUMORA EPITELA GRLIĆA MATERICE (HELA)

Ćelije tumora epitela grlića materice (HeLa) (158) su poreklom humanog adenokarcinoma. Poseduju morfologiju nalik fibroblastima i diploidni broj hromozoma (2n=46). Rastu u monosloju u hranljivoj podlozi RPMI 1640, pH 7,2, sa dodatkom 2 mM glutamina i 10% FCS. Optimalna gustina sađenja ćelija u kulturi je 2-5 x 10⁵ ćelija /cm², a prilikom pasažiranja održavaju se na gustini 70-80% od početne. Optimalan broj pasaža je 276 .

3. 5. 2. ČELIJE HUMANOG KARCINOMA OVARIJUMA (A2780)

Ćelije humanog karcinoma ovarijuma (A2780) (Ist. Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano) rastu u monosloju u hranljivoj podlozi RPMI 1640, pH 7,2, sa dodatkom 2 mM glutamina i 10% FCS. Optimalna gustina sađenja ćelija u kulturi je $3-6 \times 10^5$ ćelija /cm², a prilikom pasažiranja održavaju se na gustini 70-80 % od početne (159).

3. 5. 3. ČELIJE MIŠJEG MELANOMA (B16-V)

Ćelije mišjeg melanoma (B16-V) poseduju morfologije fibroblasta i osobinu produkcije melanina. Rastu u monosloju u hranljivoj podlozi RPMI 1640, pH 7,2, sa dodatkom 2 mM glutamina i 10% FCS. Optimalna gustina sađenja ćelija u kulturi je $3-6 \times 10^5$ ćelija /cm², a prilikom pasažiranja održavaju se na gustini 70-80 % od početne. Optimalan broj pasaža je 45 (160).

3. 5. 4. MALIGNNE ČELIJE HRONIČNE MIJELOIDNE LEUKEMIJE (K562)

Maligne ćelije hronične mijeloidne leukemije (K562) su multipotentne hematopoetske ćelije. Odlikuju se diploidnom garniturom hromozoma ($2n=46$). Rastu u suspenziji u hranljivoj podlozi RPMI 1640, pH 7,2, sa dodatkom 2 mM glutamina i 10% FCS. Optimalna gustina održavanja ćelija u kulturi je 10^5-10^6 ćelija /ml (161).

3. 5. 5. ČELIJE LEUKEMIJE HUMANIH T LIMFOBLASTA (JURKAT)

Ćelije leukemije humanih T limfoblasta (Jurkat) odlikuju se produkcijom interleukina-2 (IL-2) i pseudoploidnom garniturom hromozoma. Rastu u suspenziji u hranljivoj podlozi RPMI 1640, pH 7,2, sa dodatkom 2 mM glutamina i 10% FCS. Optimalna gustina održavanja ćelija u kulturi je $3-9 \times 10^5$ ćelija /ml (162).

3. 5. 6. ĆELIJE HUMANOG OSTEOSARKOMA (U2-OS)

Ćelije humanog osteosarkoma (U2-OS) su epitelijalne morfologije. Gaje se u monosloju u modifikovanom McCoy-evom 5A medijumu, opskrbljenom sa 10% FCS-a i dodatkom 75 ml, 200 mM L-glutamina (163).

3. 5. 7. CISPLATINA-REZISTENTNI SOJ ĆELIJA HUMANOG OSTEOSARKOMA (U2-OS / Pt)

Cisplatina-rezistentni soj ćelija humanog osteosarkoma (U2-OS / Pt), je izveden iz U2-OS ćelijske linije a gaji se pod istim uslovima kao i U2-OS ćelijska linija. Obe linije poklon su Nacionalnog instituta za onkologiju u Milanu, Italia.

3. 6. POSTUPAK ODRŽAVANJA ĆELIJA U KULTURI

Kulture tumorskih ćelija su održavane u hranljivoj podlozi: RPMI 1640; McCoy 5A (Sigma Chem. Co, St. Louis) pH 7,2, sa 10% inaktivisanog fetalnog goveđeg seruma (FCS-fetal calf serum) (164). Kulture su gajene u inkubatoru (CO₂ inkubator 220, Flow laboratories, UK) na temp. 37°C, u uslovima visokog nivoa vlage, sa 5% CO₂. Za gajenje adherentnih ćelija korišćeni su polietilenski sudovi-falkoni, 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 nošenjem zaštitne laboratorijeke opreme. Pasažiranje se vrši kada ćelije potpuno prekriju dno suda, ili kada se istroše nutrijenti podloge, na šta ukazuje indikator promene pH podloge.

3. 6. 1. POSTUPAK PASAŽIRANJA ČELIJA

Kada su nutrijenti podloge istrošeni (na to ukazuje promena boje podloge), medijum je odliven iz falkona sa HeLa ćelijama, a dno suda ($P=25\text{cm}^2$) (na kome su zalepljene ćelije) je isprano sa 3 ml, 0,25% rastvora tripsina, zagrejanog do 37°C , u vodenom kupatilu. Ćelije u falkonu su zatim inkubirane u rastvoru tripsina ($5\text{ml}/V_{\text{falkona}}=50\text{ ml}$), na temp. 37°C , 1-5 min. Promena morfologije ćelija je praćena pod svetlosnim mikroskopom na uvećanju 20/0,40. Kada su ćelije počele da menjaju morfologiju (dobijaju okrugao oblik), rastvor tripsina je prenešen iz falkona u epruvetu. Ćelije koje su ostale zalepljene za dno falkona su prikupljene špricem, resuspenzijom u podlozi 2-3 puta. Jedna zapremina suspenzije ćelija je vraćena u falkon, dopunjena svežim medijumom do zapremine $V=15\text{ ml}$ i falkon je vraćen u inkubator. Preostala suspenzija ćelija je korišćena za eksperimente *in vitro*.

3. 6. 2. KINETIKA RASTA ČELIJA

Analiza ponašanja ćelija *in vitro* zasniva se na razumevanju procesa rasta i proliferacije, što podrazumeva i pravilno određivanje broja ćelija (164). Procena rasta kulture ćelija može se vršiti posmatranjem ćelija pod svetlosnim mikroskopom, ali kvantitativni ekperimenti na ćelijama zahtevaju određivanje tačnog broja ćelija na kojima se vrši eksperiment.

3. 6. 3. HEMOCITOMETAR

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 *ml* suspenzije tj. hranjivog medijuma, određuje se na osnovu formule.

3. 6. 4. PROTOKOL ZA ODREĐIVANJE BROJA ČELIJA

1) Priprema komore za brojanje: nečistoće na komori se uklanjaju ispiranjem površine sa 70% alkoholom. Na komoru se postavlja pokrovno staklo, koje takođe mora biti čisto.

2) Priprema ćelija za brojanje vrši se prethodnim prikupljanjem ćelija gajenih u kulturi. Ukoliko su ćelije adherentne neophodno je tripsinizirati ih korišćenjem 0,25% tripsina (1-2 ml tripsina/falkon 75 cm²). Nakon 1-2 min. delovanja tripsina ćelije menjaju morfologiju (zaokrugljuju se) i odlepljuju se sa podloge. Ćelije se prikupe korišćenjem pasterove pipete ili šprica i prenesu u epruvetu. Minimalan broj ćelija koji se može odrediti brojanjem pod mikroskopom je 10⁵ ćelija/ml, a povećanje koncentracije ćelija za postupak brojanja postiže se taloženjem ćelija centrifugiranjem (10 000 rpm, 10 min). Nakon taloženja ćelije se resuspenduju u maloj zapremini hranljivog medijuma (1-2 ml).

3. 6. 5. ODREĐIVANJE VIJABILNOSTI HELA ĆELIJA

Vijabilnost se definiše kao broj živih ćelija u ukupno 100 izbrojanih ćelija. Vijabilnost HeLa ćelija, određena je metodom bojenja sa tripan-plavim, i zasniva se na osobini živih ćelija da izbacuju boju tripan-plavo i ostaju bezbojne, dok mrtve ćelije akumuliraju boju i postaju plavo obojene (165). U 50 µl suspenzije ćelija u hranljivom medijumu, dodato je 450 µl rastvora boje tripan-plavo (R_{II}):

Rastvori za bojenje ćelija:

R_I: 0,2% rastvor boje tripan plavo u destilovanoj H₂O

R_{II}: R_I razblažen 5 x u 4,5% rastvoru NaCl (0,04% rasvor boje tripan plavo)

Obojena suspenzija ćelija je dobro promešana na vorteksu i 50 µl ove suspenzije je prenešeno automatskom pipetom na komoru za brojanje (Neubauer). Prosečan broj živih ćelija po polju komore, određen je brojanjem ćelija pod mikroskopom na uveličanju 20/0,40. Svako polje na komori za brojanje zauzima zapreminu od 10⁻⁴ cm³. Kako 1cm³ odgovara zapremini od 1 ml, broj ćelija po ml početne suspenzije ćelija u hranljivom medijumu 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

3. 7. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI TESTIRANIH KOMPLEKSA

Citotoksičnost ispitivanih kompleksa Ru(III), Cr(III), Rh(III) i Pt(III) analizirana je na panelu 7 ćelijskih linija tumora: HeLa, B16, K562, Jurkat, A2789, U2-OS, U2-OS/Pt, korišćenjem dva različita testa inhibicije rasta: metodom brojanja ćelija (166) i MTT testom (167, 168). MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolijum bromid) je žuta tetrazolijumska boja koja u ćeliji podleže redukciji do tamno-crvene boje. U MTT testu, vijabilnost ćelja se određuje na osnovu metaboličke aktivnosti ćelija.

3. 7. 1. POSTUPAK IZVOĐENJA MTT TESTA.

Citotoksičnost izazvana kompleksima platine(II) i Ru(III), ispitivana je kolorimetrijski MTT testom (167, 168), na panelu 5 ćelijskih linija: HeLa, K562, Jurkat, U2-OS, U2-OS/Pt. Analizirani su *cis/trans*- konfiguracioni izomeri kompleksa platine(II) [Pt(Py)₂Cl₂], kao i neplatinski kompleks Ru(acac)₃ u poređenju sa cisplatinom.

U središnje bunarčice mikrotitar ploče sa 96 sudića sa ravnim dnom, zasejano je 1000 ćelija u 50 µl hranljivog medijuma RPMI 1640. Na svaka tri bunarčica sa HeLa ćelijama, ostavljena su tri bunarčica u koje je sipan samo hranljivi medijum (slepa proba). Ćelije su gajene u inkubatoru na 37°C, u atmosferi vazduha zasićenog parom, sa 5%CO₂.

Neposredno pre dodatka pojedinačnog kompleksa platine(II) napravljen je osnovni rastvor ispitivanog kompleksa u DMSO ili u fiziološkom rastvoru, u koncentraciji 1-10 mM. Merenja su vršena na analitičkoj vagi sa tačnošću merenja na 4-toj decimali. Polazeći od pripremljenog osnovnog rastvora, formirana je serija razblaženja Pt(II) kompleksa u hranljivoj podlozi. 20-24 h nakon zasejavanja ćelija u bunarčice, u bunarčice sa ćelijama, kao i u bunarčice samo sa podlogom (slepa proba), sipano je u triplikatu 50 µl svakog razblaženja ispitivanog agensa, korišćenjem automatske pipete. Razblaženja kompleksa platine(II) u podlozi su formirana tako da finalne koncentracije kompleksa u sudiću ploča budu redom: 6,25; 12,5; 25; 50; 100 (µM).

Ćelije su gajene sa ispitivanim agensom u CO₂ -inkubatoru na 37°C, tokom 48h. Nakon inkubacije, 20 µl MTT rastvora (5 mg MTT/ml PBS)(PBS-fosfatni pufer, pH 7,2) je dodato u svaki sudić, a 4 h kasnije je dodato 100 µl rastvora (10% SDS u 0,01 M HCl).

Nakon 20 h ploče su prenešene na čitač mikrotitar ploča sa 96 sudića, radi merenja apsorbance na 570 nm.

3. 7. 1. 1. Formiranje kalibracione krive za MTT

Polazeći od suspenzije HeLa ćelija u hranljivoj podlozi (10⁶/ml), formirana je serija razblaženja ove suspenzije, tako da broj ćelija/ml bude redom: 12.500, 25.000, 50.000, 100.000, 200.000, 400.000. U 6 X 6 središnjih bunarčića mikrotitar ploče sa 96 sudića sa ravnim dnom, zasejano je 100 µL pripremljenih razblaženja (suspenzija HeLa ćelija).

U preostale bunarčiće mikrotitar ploča sipano je samo po 100 µl hranljive podloge, kao slepa proba. Na ovaj način "zasejane" su dve ploče i prenešene u inkubator sa 5% CO₂, na 37°C. U jednu ploču je nakon 4 h sipan reagens MTT (5mg/ml PBS), odnosno u svaki pojedinačni sudić sa ćelijama kao i u sudiće sa slepim probama, naneto je 20 µl reagensa. Ploča je vraćena u inkubator, a nakon 4h je u svaki sudić sipano 100 µl 10% rastvora SDS u 0,01M HCl. Sutradan je ploča prenešena na ELISA čitač radi merenja apsorbance na 570 nm.

U drugu ploču je, nakon 20 h inkubacije na 37°C u inkubator sa 5% CO₂, sipano 20 µl reagensa MTT u svaki sudić. Ploča je vraćena u inkubator i nakon 4 h je u svaki sudić ploče naneto 100 µl rastvora koji sadrži 10% SDS u 0,01M HCl. Sutradan je ploča prenešena na ELISA čitač radi merenja apsorbancije na 570 nm. Na osnovu dobijenih apsorbancija 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. 7. 1. 2. Obrada podataka

Izračunavanja parametara koji karakterišu intenzitet citotoksičnog, odnosno citostatskog dejstva ispitivanog agensa uradjena su prema Monks *et al.* (169). Sa kalibracione krive za MTT je određeno u kom opsegu broja ćelija postoji linearna zavisnost apsorbance na 570 nm od broja zasejanih ćelija po sudiću. 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 apsorbancija uzoraka. Ako je **A_k** srednja vrednost apsorbancije uzoraka ćelija gajenih u hranljivoj podlozi, **A** srednja vrednost apsorbancije uzoraka ćelija gajenih u prisustvu različitih koncentracija ispitivanog agensa, i ako se kao probe koriste apsorbancije hranljivog medijuma bez ćelija, sa odgovarajućim koncentracijama ispitivanog agensa, tada je:

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

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

3. 7. 2. TEST INHIBICIJE RASTA

Preliminarne studije citotoksičnog dejstva neplatinskih kompleksa Ru(III), Cr(III) i Rh(III) radjene su na A2780 ćelijama, korišćenjem testa inhibicije rasta (166).

U tu svrhu ćelije su sadjene u mikrotitar ploče sa 6 rupica, 2×10^4 ćelija/ml, u hranljivoj podlozi RPMI 1640, pH 7,2, sa dodatkom 2 mM glutamina i 10% toplotom inaktivisanog goveđeg seruma (FCS). ćelije su, 24 h kasnije izložene dejstvu ispitivanih kompleksa u koncentraciji 3, 10, 30, 100 (μ M). Nakon 24 sata kontinualnog dejstva agensa, hranljivi medijum je zamenjen medijumom bez agensa, i inkubacija nastavljena još 72 h u inkubatoru na 37°C. Supernatant je odbačen a adherentne ćelije prikupljene tripsinizacijom, sa 200 μ l 0,25% tripsina. Suspenziji ćelija je dodato 5 ml pufera za brojanje ćelija i broj ćelija određen na brojaču ćelija ("cell counter").

3. 7. 3. ISPITIVANJE KOMBINOVANOG CITOTOKSIČNOG DEJSTVA KOMPLEKSA $Ru(ACAC)_3$ I CISPLATINE ILI OKSALIPLATINE, NA HeLa ĆELIJAMA.

U cilju ispitivanja uticaja neplatinskog kompleksa $Ru(acac)_3$ na efekat dejstva cisplatine i oksaliplatine (kompleksa platine sa izraženim citotoksičnim dejstvom) na HeLa ćelijama, izvršena je studija kombinovanog dejstva agenasa, korišćenjem MTT testa (167, 170).

3. 7. 3. 1. Postupak koinkubacije $Ru(acac)_3$ sa cisplatinom odnosno oksaliplatinom

HeLa ćelije (3000 ćelija/ml) su zasadjene u sudiće 96-mikrotitar ploče u hranljivoj podlozi RPMI 1640, pH 7,2, sa dodatkom 2 mM glutamina i 10% FCS. Nakon 24 h rasta ćelija, dodat je RPMI 1640 medijum sa sadržajem ispitivanih supstanci u različitim kombinacijama: $Ru(acac)_3$ u koncentraciji ($0,5 \times IC_{50}$; $1 \times IC_{50}$; $1,5 \times IC_{50}$) u kombinaciji sa cisplatinom /ili oksaliplatinom u koncentraciji ($0,5 \times IC_{50}$; $1 \times IC_{50}$; $1,5 \times IC_{50}$). Vrednosti IC_{50} određene su za 72 sata dejstva supstance korišćenjem MTT testa (poglavlje 3.7.1.).

Nakon 72 h kontinualne koinkubacije ispitivanih agenasa, preživljavanje ćelija određeno je kolorimetrijski korišćenjem MTT metode. Optička gustina merena je na $\lambda=570$ nm.

Na osnovu dobijenih vrednosti apsorpcije, formirana je kriva preživljavanja ćelija. Sa krive preživljavanja određen je udeo mrtvih ćelija F_a ("cells affected"). Na osnovu te vrednosti (F_a) izračunat je udeo ćelija koje su preživele F_u ("cells unaffected") ($F_u = 1 - F_a$). Dobijeni podaci su statistički obrađeni po metodi Shou and Talalay (171, 172) korišćenjem softvera (Calcy Syn, Biosoft) (173), za izračunavanje i grafičko prikazivanje kombinacionog indeksa CI (eng.: *Combination Index*). Svaka koncentracija supstanci, tj. njihova kombinacija, primenjena je u tri ponavljanja. Rezultujuće CI vrednosti su dobijene na osnovu 2-3 nezavisna eksperimenta.

3. 7. 3. 2. Statistička obrada podataka

CI indeks ukazuje na modalitet međusobnog dejstva supstanci, pri kombinovanom dejstvu (172). Efekat kombinovanog dejstva supstanci može biti umanjen u odnosu na efekat dejstva pojedinačnih supstanci, kada se govori o antagonizmu ($CI < 1$); pojačan u odnosu na efekat dejstva pojedinačnih supstanci, kada se govori o sinergizmu (u međusobnoj interakciji jedan lek pojačava dejstvo drugog leka $CI > 1$); ili jednak zbiru efekata pojedinačnog dejstva, kada se govori o aditivnom dejstvu ($CI = 1$).

Softver Calcy Syn (173) korišćen je u ovom radu za obradu i grafičko prikazivanje kombinacionih indeksa (CI) na osnovu sledeće funkcije (jednačine):

$$CI = F_a / F_u + (D / D_m) \times m$$

F_a -("fraction affected") udeo ćelija koje su podlegle dejstvu supstance (određeno sa krive preživljavanj ćelija, poglavlje 3.7.)

F_u - ("fraction unaffected") udeo ćelija koje su žive.

D - ("dose")—doza supstance

D_m -(" median effect dose")

m =koeficijent koji ukazuje na oblik krive preživljavanje ćelija ($m=1$ hiperbola; $m > 1$ sigmoidan oblik; $m < 1$ negativno sigmoidan oblik).

Indeks CI moguće je dobiti računskim putem na osnovu jednačine (172):

$$CI = (D)1/(Dx)1 + (D)2/(Dx)2 + \alpha(D)1(D)2/(Dx)1(Dx)2$$

(D)1, (D)2- koncentracije supstanci primenjenih u kombinaciji potrebnih da se proizvede (efekat) preživljavanje X.

(Dx)1, (Dx)2- koncentracije supstanci primenjenih individualno potrebnih da se proizvede (efekat) preživljavanje X.

Deo jednačine $\alpha(D)1(D)2/(Dx)1(Dx)2$ potreban je kada lekovi (supstance) imaju potpuno drugačije mehanizme delovanja.

Treba naglasiti da CI može da varira sa promenom opsega koncentracija lekova, tako da jedna kombinacija koncentracija lekova može da daje antagonističan efekat, druga kombinacija aditivan a treća kombinacija sinergističan efekat (171).

3. 8. AFINITET INTERAKCIJE NE PLATINSKIH KOMPLEKSA SA GLUTATIONOM

Afinitet kompleksa metala na bazi Ru(III), Cr(III) i Rh(III) da interaguju sa glutationom (GSH), ispitivan je korišćenjem dveju *in vitro* metoda: Tietz-e esej (174) i koinkubacioni esej sa butionin sulfoksiminom (BSO) (174). GSH tripeptidni tiol, γ -glutamilcisteinilglicin, najzastupljenije sulfhidrilno jedinjenje u ćeliji, prisutan u koncentraciji 0,5-10 mM. Reakcijom sa nukleofilima, kao što su kompleksi metala npr. Pt(II), u odnosu 2:1, formira kompleks GS-Pt-GS, koji može biti izbačen iz ćelije preko posebne ATP zavisne pumpe. Tako GSH štiti ćeliju od citotoksičnog dejstva cisplatine, čime je uključen u neke mehanizme rezistencije na cisplatinu.

2. 8. 1. POSTUPAK ODREĐIVANJA GLUTATIONA METODOM PO TIETZ-U

Ovim postupkom analizirana je kinetika interakcije kompleksa Ru(III), Cr(III) i Rh(III) za glutationom *in vitro* (174). Detektuje se zapravo preostala količina neodreagovanog glutationa na osnovu aktivnosti enzima glutation-reduktaze. Pripremljeni su rastvori ispitivanih kompleksa u fiziološkom rastvoru ekvimolarne koncentracije: 3.2 mM. U 300 μ l rastvora GSH koncentracije 300 μ g/ml dodato je 100 μ l odnosno 200 μ l rastvora ispitivanih supstanci i dopunjeno sa 450 μ l - 350 μ l pufera A, do zapremine 850 μ l. Reakciona smeša je inkubirana preko noći. Sutradan je merena apsorbancija pojedinačnih rastvora na $\lambda=412$ nm. Kao slepa proba korišćena je smeša rastvarača (DMSO: fiziološki rastvor : pufer A) u procentnom odnosu (2% :10% : 88%). Postojanje neizreagovanog GSH u rastvoru određeno je kvantitativno sa standardne krive, na osnovu smanjenja apsorbancije na $\lambda=412$ nm.

Pufer A

- Fosfatni pufer 0,1M, pH 7,2.
- DTNB (3,95 mg / ml PBS)
- Glutation-reduktaza, 1mg/ml, (razblaženje 1:10)
- NADPH (8.33 mg/ml PBS)

3. 8. 1. 1. Standardna kriva

Radi formiranja standardne krive za GSH napravljena je serija standardnih rastvora GSH (u PBS 0,1 M) koncentracije 100, 150, 200, 250, 300 μ g/ml. U 300 μ l rastvora GSH dodat je pufer A do zapremine 850 μ l. Apsorbancija je merena na $\lambda=412$ nm.

3. 8. 2. POSTUPAK ISPITIVANJA UTICAJA BUTIONIN-SULFOKSIMINA (BSO) NA CITOTOKSIČNO DEJSTVO AGENASA

Butionin sulfoksimin je sintetska aminokiselina koja deluje kao inhibitor enzima γ -glutamil-cistein-sintetaze, odgovornog za početni korak sinteze GSH. Ireverzibilna inhibicija ključnog enzima u sintezi GSH, rezultuje smanjenjem koncentracija GSH u ćeliji, što može imati uticaja na citotoksični efekat agenasa.

Preliminarne studije uticaja butionin-sulfoksimina (BSO) na citotoksično dejstvo kompleksa Ru(III) i Cr(III) radjene su na A2780 ćelijama (174). U tu svrhu ćelije su sadjene u mikrotitar ploče sa 6 rupica, 2×10^4 ćelija/ml. 24 h kasnije ćelije su tretirane sa BSO u koncentraciji 1 $\mu\text{g/ml}$ i istovremeno tretirane ispitivanim agensom u koncentraciji 3, 10, 30, 100 (μM). Nakon 24 sata kontinualnog dejstva BSO i ispitivanog agensa istovremeno, podloga je zamenjena medijumom bez agensa, i inkubacija u termostatu nastavljena još 72 h. Citotoksični efekat određen je testom inhibicije rasta.

3. 9. ODREĐIVANJE INKORPORACIJE RADIOAKTIVNO OBELEŽENIH NUKLEOTIDA U DNA/RNK

Ovaj test se zasniva na merenju inhibicije ugradnje radioaktivno obeleženih nukleotida u nukleinske kiseline (DNK i RNK) pod dejstvom antitumorskih agenasa (175). Inhibicija inkorporacije radioaktivnih prekursora ^{13}C -timidina i ^3H -uridina u makromolekule (DNK i RNK) se uzima kao mera *in vitro* osetljivosti tumora na dati lek. Nedostatak ovog testa je slabija inkorporacija prekursora u ćelijama koje imaju dugo vreme udvajanja. Takodje je teško interpretirati razlike između ćelijske smrti uzrokovane lekom i smrti izazvane smanjenim transportom nukleotida u ćeliji.

3. 9. 1. PRIPREMA UZORAKA

A2780 ćelije (7×10^4 ćelija/ml) zasejane su u bunarčiče mikrotitar ploče sa 96 rupica, u hranljivoj podlozi RPMI 1640, pH 7,2, sa dodatkom 2 mM glutamina i 10% FCS, 100 μ l/rupici. Nakon 24 sata rasta ćelije su izložene dejstvu ispitivanih kompleksa: $\text{Ru}(\text{acac})_3$, $\text{Cr}(\text{acac})_3$ i $\text{Rh}(\text{acac})_3$, tako da konačne koncentracije u sudićima ploče budu 10 i 30 (μM). Neposredno nakon dodavanja kompleksa u bunarčiče ploče dodato je 10 μ l rastvora ^{13}C -timidina (50 $\mu\text{Ci/ml}$), odnosno 10 μ l rastvora ^3H -uridina (1 $\mu\text{Ci/ml}$). Inhibitorno dejstvo kompleksa na ugradnju radioaktivnih nukleotida ispitivano je u dva vremenska intervala: za 6 sata i za 24 sata. Inkubacija je vršena na temp. 37°C u inkubatoru sa 5% CO_2 . Nakon 6 h odnosno 24 h inkubacije ploče su smeštene u uređaj za prikupljanje ćelija (*Harvester 96-Tomptec*), gde su ćelije prenešene na papirnu podlogu i isprane 5 x sa dest. H_2O . Uzorci na papirnoj podlozi inkubirani su na 30°C , 2 h, a nakon toga radioaktivnost uzoraka je merena korišćenjem aparata *Liquid Scintillation Counter* (1205 Betaplate, Perkin Elmer, SAD).

3. 10. ANALIZA INTERAKCIJE ISPITIVANIH AGENASA SA DNK

Postojanje interakcije neplatinskih kompleksa sa ćelijskim DNK molekulom tj. vezivanje za DNK, analizirano je korišćenjem masene spektrometrije ICP-MS (ICP-MS, *inductively coupled plasma mass spectrometry*) (176). U tu svrhu A2780 ćelije ($1,5 \times 10^6$ ćelija / 10 ml) zasejane su u hranljivoj podlozi RPMI 1640, pH 7,2, sa dodatkom 2 mM glutamina i 10% FCS, u falkonima površine 75 cm^2 . U eksponencijalnoj fazi rasta, kada su ćelije dostigle broj od 3,5 miliona po uzorku, izložene su dejstvu ispitivanih kompleksa u ekvimolarnoj koncentraciji, 100 μM . Dejstvo kompleksa ispitivano je za dva vremenska intervala: 2 sata i 24 sata. Dejstvo kompleksa prekinuto je nakon 2 h odnosno 24 h, ispiranjem ćelija u hladnom (4°C) fosfatnom puferu, pH 7,2. Ćelije su prikupljene tripsinizacijom, a suspenzija ćelija (uključujući plutajuće i adherentne ćelije), istaložena je centrifugiranjem na 2000 rpm, 5 min. Talog ćelija je ispran hladnim PBS-om, dva puta, resuspendovan u 1 ml PBS-a, i prenešen u ependorf kivetu.

3. 10. 1. IZOLOVANJE ĆELIJSKE DNK METODOM PO MANIATIS-U (177)

- 1) Ćelije u suspenziji su istaložene, centrifugiranjem u minifugi, (10 min, 14.000,rpm);
- 2) Supernatant je uklonjen a pelet resuspendovan u 500 μ l TNE pufera (27);
- 3) Dodato je 50 μ l 10% rastvora Triton-X-100;
- 4) Dodato je 10 μ l proteinaze K (10 mg/ml);
- 5) Inkubacija je izvršena preko noći na 37°C;
- 6) Dodat je rastvor RNA-ze (1 mg/ml) do finalne koncentracije 50 μ g/ml;
- 7) Dodata je jedna zapremina (500 μ l) PC9 pufera i promešano na vorteksu;
- 8) Uzorak je centrifugiran na minifugi 10 min, 14.000 rp.;
- 9) Vodena faza je prenešena u novu ependorf kivetu, a koraci 7, 8, 9, ponovljeni još jednom;
- 10) Dodata je jedna zapremina hloroforma;
- 11) Uzorak je centrifugiran na minifugi 10 min., 14.000 rpm.;
- 12) Izdvojena je vodena faza i dodat 0,3 M natrijum acetatni pufer pH 5.
- 13) Dodata je jedna zapremina hladnog (4°C) etanola. Precipitat DNK se javlja u roku od 1 h, na -20°C;
- 14) Uzorak je centrifugiran 1 h na 17.000 rpm, na 4°C;
- 15) Pelet je ispran etanolom i centrifugiranje ponovljeno 15 min, na 17,000 na 4°C;
- 16) Suprenatant je uklonjen a pelet osušen na vazduhu, 20 min;
- 17) Pelet je resuspendovan u 200 μ l TE pufera;
- 18) Za kvantitativnu detekciju DNK u uzorku, merena je apsorbancija na talasnoj dužini $\lambda=260/280$, tako što je 2,5 μ l DNK rastvora razblaženo sa 495 μ l H₂O, a apsorbancija (OD) uzorka merena na spektrofotometru, za razblaženja 200 x i 50 x;
- 19) Koncentracija DNK izražena je u jedinicama μ g/ml;

3.13.2. Ispitivanje interakcije testiranih komponenta sa DNK in vitro

Puferi:

TNE:

- 10 mM Tris-HCl (pH 8)
- 100 mM NaCl
- 1 mM EDTA

PC9:

- 100 ml fenol
- 100 ml hloroform
- 10 mM Tris-HCl (pH 9)

TE:

- 10 mM Tris-HCl (pH 8)
- 1 mM EDTA (pH 8)

PBS: pH 7,8

- 1) Dodatak etanola (100%) obavlja se na 4°C u vodenoj suspenziji. Takav dodatak obavlja se nakon 30 min. na -20°C.
- 2) Centrifugiranje na 17 000 rpm, 1 h, na 4°C.
- 3) Precipitacija je ponovljena u prisutnosti CH₃COOH (100%) u dodatku etanola (100%) u zapreminskom odnosu (2 : 5).
- 4) Centrifugiranje na 17 000 rpm, 20 min., na 4°C.
- 5) Supernatant je odličen, a talog očišćen etanolom (100%), centrifugiranjem na 17000 rpm, 20 min., na 4°C.
- 6) Supernatant je odličen, a talog očišćen na vakuumu / membranskomu u 10 µl pufera TE, pH 8, koji sadrži Tris-HCl 10 mM i EDTA 1 mM.
- 7) Koncentracija DNK u uzorku određena je metodom spektrofotometrije na 260 nm.

3. 10. 2. ISPITIVANJE INTERAKCIJE TESTIRANIH KOMPLEKSA SA DNK IN VITRO

Radi ispitivanje afiniteta kompleksa metala, za interakciju sa DNK molekulom, sprovedeno je ispitivanje *in vitro* na fragmentu (Eng.: *ladder*) DNK dužine 123 bazna para (bp) (178). Svaki pojedinačni kompleks inkubiran je sa 5 μ l rastvora plazmidne DNK (1 μ g/ml), pri čemu je ispitivani kompleksa primenjen u koncentracijama: 0,3 μ M i 3 μ M. Konačna zapremina reakcione smeše od 50 μ l postignuta je dodatkom pufera pH 7,4, koji sadrži: Na₂HPO₄ (1 mM) i NaCl (3 mM). Reakciona smeša inkubirana je preko noći na 37°C, nakon čega je fragment DNK izolovan po proceduri opisanoj u poglavlju 3. 10. 2. 1. Nakon određivanja koncentracije DNK u uzorku, merenjem absorpcije na $\lambda=260 / 280$ nm, određena je količina vezanog metala [Ru(III), Cr(III) ili Rh(III)] u svakom DNK uzorku, primenom masene spektrometrije ICP-MS [ICP-MS, *inductively coupled plasma mass spectrometry*] (176).

3. 10. 2. 1. Procedura za izolaciju plazmidne DNK

- 1) Precipitacija reakcionog rastvora u 200 μ l pufera CH₃COONa 3M, pH 5, uz dodatak etanola (100%) ohladjenog na 4°C u zapreminskom odnos (2:1). Talog se javlja nakon 30 min., na (-20) °C;
- 2) Centrifugiranje na 17 000 rpm, 1 h, na 4°C;
- 3) Precipitacija je ponovljena u puferu CH₃COONa 0,4 M, pH 5.2, uz dodatak etanola (100%) u zapreminskom odnosu (2 : 5);
- 4) Centrifugiranje na 17 000 rpm, 20 min., na 4°C;
- 5) Supernatant je odliven a talog opran etanolom (80%), centrifugiranjem na 17000 rpm, 20 min., na 4°C;
- 6) Supernatant je odbačen, a talog osušen na vazduhu i resuspendovan u 10 μ l pufera TE, pH 8, koji sadrži Tris-HCl 10 mM i EDTA 1 mM;
- 7) Koncentracija DNK po uzorku određena je merenjem apsorbpcije na $\lambda=260/ 280$ nm.

3. 11. ODREĐIVANJE UNUTARĆELIJSKE AKUMULACIJE PLATINE METODOM ATOMSKE APSORPCIONE SPEKTROFOTOMETRIJE (AAS)

3. 11. 1. POSTUPAK IZLAGANJA HELA ĆELIJA CITOTOKSIČNIM PLATINA(II) AGENSIMA

U cilju ispitivanja unutarćelijske akumulacije platine HeLa ćelje su gajene da rastu i umnožavaju se 5-7 dana u falkonima (Polyethylene plug cap, Sarstedt) površine dna 225 cm², u zapremini od 50 ml hranljivog medijuma RPMI 1640, HeLa ćelije (25-30 miliona ćelija/falkonu) u eksponencijalnoj fazi rasta izložene su dejstvu platina(II) kompleksa, rastvorenih u 40 ml RPMI 1640 medijuma u koncentraciji od 100 μM (179).

Inkubacija je prekinuta odlivanjem medijuma koji sadrži platinu i ispiranjem dna falkona svežim medijumom. Ćelije su podvrgnute procesu tripsinizacije (opisanom u poglavlju 3.6.1.) i prikupljene sa dna falkona, resuspenzijom u medijumu pomoću šprica. Suspenzija ćelija je prenešena u epruvetu i istaložena centrifugiranjem (Megafuge 1.OR, Heraeus instruments) na 1500 x g, 10 min. Talog je resuspendovan u 10 ml hladnog fosfatnog pufera, pH 7,2, mešanjem na vorteksu (Heidolph, REAX 2000), a ćelije opet istaložene centrifugiranjem na 1500 x g, 10 min. Postupak ispiranja ćelija u fosfatnom puferu ponavljan je 2 x. Dobijeni talog ćelija je resuspendovan u 1ml 0,2% vodenog rastvora (dest. H₂O) Triton-X-100 (179).

Tako dobijeni uzorci liziranih ćelija zamrznuti su na -170°C (*Ultra low temperature freezer, Herafreze, Heraeus instruments GmbH*). Uzorci su zatim podvrgnuti liofilizaciji, a kao takvi su čuvani u zamrzivaču na -20°C .

3. 11. 2. PRIPREMA KALIBRACIONE KRIVE ZA AAS

Za određivanje koncentracije platine u ispitivanim rastvorima neophodno je prethodno konstruisati kalibracioni grafik zavisnosti intenziteta apsorpcije od koncentracije platine.

Za izradu kalibracione krive korišćena je serija standardnih rastvora platine poznate koncentracije ($\mu\text{g/ml}$): 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 7; 8. Standardni rastvori platine su pravljene polazeći od sledećih rastvora:

(1): Osnovni rastvor cisplatine (China) u fiziološkom rastvoru, 1 mg/ml.

(2): Standardni rastvor BA (govedji albumin) 5 mg/ml u 0,2% vodenom rastvoru Triton-X-100 (*Sigma Chem Co., St Louis*).

Za pravljenje osnovnog rastvora platine ($40 \mu\text{g/ml}$), 0,615 ml rastvora (1) preneto je u normalni sud od 10 ml i dopunjeno do crte, rastvorom. Serija standardnih rastvora platine formirana je razblaživanjem osnovnog rastvora platine ($40 \mu\text{g/ml}$) pomoću rastvora. Merenja mase potrebnih supstanci vršena su na analitičkoj vagi, sa tačnošću merenja na 4 decimale (0,0001g).

3. 11. 3. POSTUPAK ANALIZE UNUTARĆELIJSKOG SADRŽAJA PLATINE METODOM AAS

Neposredno pre spektrofotometrijske analize na AAS-u, liofilizovani uzorci ćelija iz prethodnog koraka su resuspendovani u $500 \mu\text{l}$ dest. H_2O .

Analiza unutarćelijskog sadržaja platine vršena je na besplamenom atomskom apsorptionom spektrofotometru (Perkin Elmer 5000) uz korišćenje grafitne kivete HGA 500 i deuterijumskog korektora D_2 . Praćena je emisija na 265,9 nm uz upotrebu proreza dimenzije 0,7 nm (180).

3. 11. 4. KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE PROTEINA U ISPITIVANIM UZORCIMA

Kvantitativno određivanje proteina u uzorcima liziranih ćelija, prethodno podvrgnutim AAS analizi, vršeno je kolorimetrijski, metodom po Lowry-ju. Princip metode se zasniva na merenju intenziteta boje rastvora proteina u kome se vrši bojena reakcija između Folinovog reagensa i proteina s tirozinskim i cisteinskim ostacima (181).

Rastvori:

A: ispitivani rastvor proteina

B: sveže pripremljen alkalni rastvor bakra (50 ml 2% rastvora Na_2CO_3 u 0,1 mol/l rastvora NaOH, pomešano je sa 1 ml 0,5% rastvora kalijum-natrijum-tartarata)

C: Folinov reagens

U 0,2 ml rastvora A dodato je 1 ml rastvora B. Smesa je promešana i ostavljena da stoji na sobnoj temperaturi 10 min. Zatim je brzo unešana u 0,8 ml rastvora C i promešana. Posle 30 min rastvor se obojio plavom bojom. Intenzitet boje meren je na spektrofotometru (Beckman instruments G 2400, G.M.B.H. Munchen) na λ 750 nm.

Koncentracija proteina u ispitivanom rastvoru je određena sa kalibracione krive, konstruisane ranije pomoću rastvora BA poznate koncentracije. Za konstruisanje kalibracione krive pripremljen je rastvor BA standarda, koncentracije od 20-400 mg/ml i s njim je vršena reakcija Folina u takvim uslovima kao i pri ispitivanju rastvora proteina.

3. 12. KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ANALIZA MATRIKS METALOPROTEINAZA (MMP-2 I MMP-9)

Uticaj neplatinskih kompleksa Ru(III), na sintezu ili aktivnost humanih matriks metaloproteinaza MMP-9 i MMP-2, a time i antimetastatski potencijal kompleksa, ispitan je korišćenjem sendvič-enzim-immunoesej tehnike (182, 183). Za određivanje koncentracije i aktivnosti matriks metaloproteinaza u ispitivanim uzorcima primenjen je kit za immunoesej (Quantikine R&D Systems, SAD). Test je izveden u polistirenskoj mikrotitar ploči sa 96 rupica, čije je dno pokriveno mišjim monoklonskim antitelima specifičnim za humane enzime MMP-9 i MMP-2. Koncentracija i aktivnost metaloproteinaza merena je u supernatantu ćelija U2-OS tretiranih kompleksima Ru(III), Cr (III) i Rh(III).

3. 12. 1. PRIPREMA UZORAKA

U2-OS/Pt ćelije (5×10^5 ćelija/ml) zasejane su u bunarčice mikrotitar ploče sa 6 sudića, u 2 ml modifikovanog McCoy-evog 5A medijuma, opskrbljenog sa 10% FCS-a i 75 ml, 200 mM L-glutamina. Nakon 24 sata rasta ćelije su izložene dejstvu ispitivanih kompleksa: $\text{Ru}(\text{acac})_3$ i $\text{Ru}(\text{tfac})_3$ tako da konačne koncentracije u sudićima ploče budu 10 i 30 (μM). Nakon 24 sata dejstva agensa, supernatant ćelija je prikupljen i podvrgnut kvantitativnoj analizi humanih metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9, korišćenjem kita (Quantikine R&D Systems, SAD).

3. 12. 2. PROCEDURA ZA ODREĐIVANJE HUMANIH METALOPROTEINAZA MMP-2 I MMP-9 U SUPERNATANTU ĆELIJA

U svaku rupicu mikrotitar ploče sa 96 rupica sipa se 100 μl rastvarača RD1-334. Dodato je 100 μl standarda ili uzorka po rupici i mikrotitar ploča prekrivena adhezivnom trakom. Inkubacija je trajala 2 h na sobnoj temperaturi na šejkeru za mikrotitar ploče (500 ± 50 rpm) (*eng: horizontal orbital microplate shaker*). Aspiriran je svaki sudić mikrotitar ploče i ispran četiri puta nalivanjem pufera za ispiranje (400 μl /sudiću), a zatim odlivanjem jednostavnim naglim prevrtanjem mikrotitar ploče.

Pri konačnom ispiranju mikrotitar ploča je izvrnuta naspram čiste papirne vate. Dodato je 200 μ l MMP-9 konjugata u svaki sudić i prekriveno novom adhezivnom trakom. Inkubacija je trajala 1 h na sobnoj temperaturi na šejkeru. Ponovljen je korak aspiracije i ispiranja. Dodato je 200 μ l pastvora supstrata u svaki sudić i inkubirano 30 min. na sobnoj temperaturi zaštićeno od svetla. Dodato je 50 μ l rastvora za zaustavljanje reakcije u svaki sudić. Apsorpcija je merena na $\lambda=450$ nm korišćenjem ELISA-test čitača. Izmerena apsorbanacija na $\lambda=450$ nm korigovana je za vrednosti apsorbanace izmerene na $\lambda=540$ nm i $\lambda=570$ nm.

3. 12. 3. SADRŽAJ KITA ZA ODREĐIVANJE HUMANIH METALOPROTEINAZA MMP-2 i MMP-9

- 1) Peroksidaza- konjugovana poliklonska antitela specifična za humanu metaloproteinazu MMP-9 i MMP-2.
- 2) Standard za određivanje humane MMP-9 i MMP-2: liofilizovani rekombinantni humani protein pro-MMP-9 i pro-MMP-2 u baznom puferu proteinskog sastava.
- 3) Rastvarač RD1-334: bazni pufer sa proteinskim sadržajem.
- 4) Rastvarač za kalibraciju RD5-10: bazni pufer sa proteinskim sadržajem.
- 5) Pufer za ispiranje-koncentrat.
- 6) Reagens za bojenje A.
- 7) Reagens za bojenje B.
- 8) Rastvor za zaustavljanje reakcije: 2 M sumporna kiselina.

3.13. ANALIZA ĆELIJSKOG CIKLUSA I APOPTOZE METODOM NA PROTOČNOM CITOMETRU

Analiza ćelijskog ciklusa i tipa ćelijske smrti indukovane kompleksima Ru(III), Cr(III), Rh(III) i Pt(II) na A2780 ćelijama i HeLa ćelijama, vršena je na protočnom citometru (*Becton Dickinson, CA, SAD*), nakon bojenja tretiranih ćelija propidijum-jodidom (PI-“Propidium Iodid”) (184).

3. 13. 1. POSTUPAK INKUBACIJE A2780 ĆELIJA SA ISPITIVANIM KOMPLEKSIMA METALA RUTENIJUM(III), HROMA(III) I RODIJUM(III)

Preliminarna kvantitativna analiza apoptoze i ćelijskog ciklusa neplatinskih kompleksa: Ru(III), Cr(III), Rh(III) izvedena je na A2780 korišćenjem protočne citometrije. A2780 ćelije (6×10^5 ćelija) zasejane su u 10 ml RPMI 1640 medijumu, pH 7,2, u falkone (75 cm^2) i gajene u inkubatoru sa 5% CO_2 . Nakon 24 h rasta, ćelije su podvrgnute ispitivanim agensima u ekvimolarnoj koncentraciji ($100 \mu\text{M}$) kontinualno u trajanju od 24 h odnosno 48 h. Nakon inkubacije sa kompleksima, ćelije (adherentne kao i plivajuće) su prikupljene procesom tripsinizacije i podvrgnute postupku bojenja i pripreme za analizu na protočnom citometru, korišćenjem kompjuterskog softvera *Cell Quest* (185).

3. 13. 1. 1. Postupak bojenja A2780 ćelija sa propidijum-jodidom (PI) za analizu apoptoze

A2780 ćelije su isprane u fosfatnom puferu, pH 7,2 (PBS), dva puta nakon čega su resuspendovane u 1 ml PBS i broj ćelija određen je bojenjem sa tripan-plavim. Za ispitivanje apoptoze 6×10^5 ćelija je resuspendovano u 1 ml pufera za bojenje i inkubirano preko noći, na 4°C .

Pufer za bojenje:

- RNaza A 1 mg/ml
- PI 10 $\mu\text{g/ml}$
- Natrijumcitrat 0,1 %
- TRITON-X-100 0,1 %

Kvantitativna analiza apoptoze (sub-diploidne populacije ćelija) vršena je na protočnom citometru (Becton Dickinson, CA, SAD) korišćenjem argonskog lasera, sa λ ekscitacije na 488nm. DNK histogram analiziran je korišćenjem kompjuterskog softvera *Cell Quest* (185).

3. 13. 1. 2. Postupak bojenja A2780 ćelija sa propidijum-jodidom (PI) za analizu ćelijskog ciklusa

Za potrebe analize ćelijskog ciklusa A2780 ćelije (1×10^6) su inkubirane u mešavini Et-OH/ fiziološki rastvor (0,9%NaCl) 3:1 (v:v), preko noći, na 4°C. Nakon procesa fiksacije, ćelije su istaložene centrifugiranjem (14000 rpm, 10 min), isprane hladnim PBS-om, pH 7,2, i resuspendovane u puferu za bojenje koji sadrži: RNazu A (1mg/ml) i PI (10 μ g/ml). Ćelije su inkubirane u puferu za bojenje 30 min. na sobnoj temperaturi i odmah podvrgnute analizi na protočnom citometru, korišćenjem argonskog lasera, sa λ ekscitacije na 488 nm. Sadržaj DNK analiziran je korišćenjem kompjuterskog softvera *Cell Quest* (185).

3. 13. 2. POSTUPAK INKUBACIJE HELA ĆELIJA SA ISPITIVANIM KOMPLEKSIMA PLATINE(II) I RUTENIJUMA(III)

HeLa ćelije (4×10^5 ćelija) zasađene su u 3ml RPMI 1640 medijuma, pH 7,2, u mikrotitar ploče sa 6 bunarčića i rasle tokom 24 h, u inkubatoru sa CO₂. U ekponencijalnoj fazi rasta medijum je odliven i na ćelije nanesen svež RPMI medijum sa sadržajem ispitivanih supstanci u koncentraciji koja odgovara IC₅₀ , odnosno $1,5 \times IC_{50}$, (koncentraciji koja inhibira proliferaciju 50% odnosno 75% ćelija). Ćelije su inkubirane sa ispitivanim kompleksima 24 h, 48 h i 72 h na 37°C, u inkubatoru sa 5%CO₂. Po završetku inkubacije, ćelije su prikupljene procesom tripsinizacije i podvrgnute postupku za bojenje ćelija.

3. 13. 2. 1. Postupak bojenja HeLa ćelija sa propidijum-jodidom za analizu ćelijskog ciklusa

HeLa ćelije su isprane u fosfatnom puferu (PBS), pH 7,2, nakon čega su resuspendovane u 200 μ l PBS. U suspenziju je dodato 2 ml hladnog etanola, uz blago vorteksiranje. Ćelije su inkubirane u etanolu (EtOH) na ledu, minimalno 30 min. Nakon fiksacije u EtOH, ćelije su taložene centrifugiranjem na 2000 x g, 10 min. Supernatant je odliven a talog resuspendovan u 800 μ l PBS-a. Suspenzija je inkubirana u 100 μ l rastvora RNaze A koncentracije 1 mg/ml, na 37°C, 30 min.

Nakon tretmana RNazom, uzorcima je dodato 100 μ l rastvora PI (400 μ g/ml) i ćelije su odmah analizirane na protočnom citometru. Analiza DNK sadržaja i ćelijskog ciklusa je vršena na protočnom citometru korišćenjem argonskog lasera sa λ ekscitacije na 488 nm. DNK histogram analiziran je korišćenjem kompjuterskog softvera *Cell Quest*.

3. 13. 3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Kako u tečnosti, zbog prirode protočnog sistema citometra može doći do grupisanja ćelija, dve prilepljene ćelije u G1 fazi bi emitovale isti signal kao i ćelije u G2 fazi. Postojanje grupacija ćelija se uočava na grafiku DNK-pik= f(DNK-sadržaj) (35) kao postojanje pika u oblasti koji odgovara trostrukom DNK-sadržaju netretiranih ćelija u G1/Go fazi, koje služe kao standard. Takav pik potiče od tri slepljene ćelije u G1 fazi ili ćelije u G1 fazi slepljene sa ćelijom u G1 fazi. Da bi se prilikom izrade DNK histograma analizirane populacije ćelija izbegle greške ovog tipa, vrši se "gejtovanje"-odabir ćelija koje se nalaze u dozvoljenom regionu grafika u odnosu na standard. Prikazuje se DNK histogram samo odabranih ćelija.

3. 14. ANALIZA APOPTOZE METODOM NA PROTOČNOM CITOMETRU PRIMENOM BOJENJA SA ANEKSIN V-FITC/PI

Protein aneksin-V se koristi za kvantitativno merenje apoptoze, na bazi svog afiniteta za vezivanje fosfolipida ćelijske membrane. U prisustvu jona Ca^{2+} , aneksin-V se vezuje za negativno naelektrisane fosfolipide na površini ćelijske membrane ($K_d = 5 \times 10^2$) pri čemu pokazuje veći afinitet za fosfatidil-serin. Ćelija sa nastupanjem apoptoze gubi integritet i simetriju ćelijske membrane, u smislu da dolazi do translokacije fosfolipida sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane čime se fosfolipidi izlažu interakciji sa elementima spoljašnje sredine. Pri protočno-citometrijskom određivanju apoptoze ćelije, vrši se bojenje ćelija korišćenjem kita koji sadrži fluorescein izotiocijanat (*FITC-Fluorescein isothiocyanate*) konjugovani protein aneksin V-FITC i propidijum-jodid (PI) (*BD Bioscience, PharMingen, San Diego, SAD*) (186, 187).

PI je standardni protočno-citometrijski reagens za određivanje vijabilnost ćelija. Intaktne ćelije ne usvajaju PI, a mrtve ćelije ili one sa oštećenom ćelijskom membranom propuštaju PI. Tako da u populaciji obojenih ćelija možemo naći tri grupe ćelija.

3. 14. 1. SADRŽAJ KITA ZA ODREĐIVANJE APOPTOZE BOJENJEM ĆELIJSKIM ANEKSIN V-FITC/PI

- 1) Fluorescein izotiocijanatom-konjugovani aneksin V-FITC (*FITC-“Fluorescein isothiocyanate”*);
- 2) Propidijum-jodid (PI) 50 $\mu\text{g/ml}$ U PBS-u;
- 3) Pufer za vezivanje:
 - Hapes/NaOH, pH 7,4 10 mM,
 - NaCl 140 mM
 - CaCl_2 2.5 mM
- 4) Fosfatni pufer (PBS), pH 7,2.

3. 14. 2. POSTUPAK INKUBACIJE ČELIJA SA ISPITIVANIM KOMPLEKSIMA PLATINE(II) I RUTENIJUMA(III)

HeLa ćelije (4×10^5 ćelija) zasađene su u 3 ml RPMI 1640 medijuma, pH 7,2, u mikrotitar ploče sa 6 rupica i rasle tokom 24 h u inkubatoru sa CO₂. U eksponencijalnoj fazi rasta medijum je odliven i na ćelije nanesen svež RPMI medijum sa sadržajem ispitivanih supstanci u koncentraciji $1.5 \times IC_{50}$, (koncentraciji koja inhibira proliferaciju 75% ćelija). Ćelije su inkubirane sa ispitivanim agensima 5 h u inkubatoru sa CO₂ nakon čega su prikupljene tripsinizacijom i podvrgnute postupku za bojenje.

3. 14. 3. PROTOKOL ZA BOJENJE ČELIJA

- 1) Isprati ćelije hladnim PBS-om (2 x);
- 2) Resuspendovati ćelije u puferu (1 x) za vezivanje pri koncentraciji od 1×10^6 ćelija/ml (0,5 ml pufera);
- 3) Preneti zapreminu od 100 μ l rastvora ćelija (1×10^5 ćelija) u kivetu za protočni citometar zapremine 5 ml;
- 4) Dodati 5 μ l aneksin-V-FITC boje i 10 μ l PI;
- 5) Nežno vorteksirati ćelije i inkubirati ih na sobnoj temperaturi (20-25°C), 15 min, u mraku;
- 6) Dodati 400 μ l pufera za vezivanje (1 x) u svaki uzorak;
- 7) Analizirati na protočnom citometru što pre (ako je moguće u roku od 1h).

Pri analizi na protočnom citometru koristiti 3 vrste kontrolnih uzoraka ćelija:

- 1) ćelije koje nisu podvrgnute bojenju;
- 2) ćelije koje su podvrgnute bojenju aneksinom V-FITC;
- 3) ćelije koje su podvrgnute bojenju sa PI.

Treba napomenuti da se i u populaciji netretiranih ćelija javlja izvestan procenat apoptoze ili nekroze, što zavisi od tipa ćelijske linije i uslova održavanja.

3. 15. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA KASPAZA-3 NA HELA ĆELIJAMA PRIMENOM PROTOČNE CITOMETRIJE

Kaspaza-3 je cistein-proteaza koja se aktivira u ranim fazama apoptoze, i predstavlja ključni enzim na putu programirane ćelijske smrti. Sintetiše se u vidu neaktivnog proenzima (32 kD), a proteolizom koja je katalizovana od strane samog enzima ili od strane druge proteaze se prevodi u aktivnu formu. Aktivna forma enzima kaspaza-3 je heterodimer od 17 kD i 12 kD, i katalizuje proteolitičko cepanje proteina citoplazme kao što su D4-GDI ili Bcl-2, kao i nukleusa PARP. Kaspaza-3 je ključni enzim u kaskadi katalitičkih proces, na putu apoptoze, zbog čega se koristi kao marker ranih apoptotskih promena.

Aktivacija kaspaze-3 ispitivana je korišćenjem kita koji sadrži anti-kaspaza 3-fikoeritrimom (PE-Phycoerythrin) obeležena monoklonska antitela (*BD PharMingen, San Diego, SAD*) (188, 189).

3. 15. 1. SADRŽAJ KITA ZA ODREĐIVANJE APOPTOZE DETEKCIJOM AKTIVNE KASPAZE-3

- 1) Fikoeritrimom (PE-phycoerythrin) konjugovana poliklonska zečja antitela specifična za aktivnu kaspazu-3.
- 2) Pufer (pH 7,2) za fiksaciju ćelija/permeabilizaciju, pre bojenja (citofix).
- 3) Saponin 4%.
- 4) Paraformaldehid.
- 5) Pufer ("perm/wash") (pH 7,2) za permeabilizaciju i ispiranje ćelija, primenjuje se za permeabilizaciju ćelija za proces bojenja.
- 6) Fetalni goveđi serum (FBS-fetal bovine serum).
- 7) Natrijumazid.
- 8) Saponin.

3. 15. 2. POSTUPAK INKUBACIJE ĆELIJA SA ISPITIVANIM KOMPLEKSIMA PLATINE(II) I RUTENIJUMA(III)

HeLa ćelije (4×10^5 ćelija) zasađene su u 3ml RPMI 1640 medijuma, pH 7,2, u mikrotitar ploče sa 6 rupica i rasle su tokom 24 h, u inkubatoru sa CO₂. U eksponencijalnoj fazi rasta medijum je odliven i na ćelije nanesen svež RPMI medijum sa sadržajem ispitivanih supstanci u koncentraciji $1.5 \times IC_{50}$, (koncentraciji koja inhibira proliferaciju 75% ćelija).

Za izvođenje ovog testa, HeLa ćelije sađene su u mikrotitar ploče sa 6 rupica u RPMI podlozi, 4×10^5 ćelija/3 ml RPMI. Nakon 24 h rasta, medijum je odliven i na ćelije nanesen svež medijum sa sadržajem ispitivanih supstanci u koncentraciji $5 \times IC_{50}$, i $10 \times IC_{50}$. Ćelije su inkubirane sa ispitivanim agensima 5 h u inkubatoru sa CO₂, nakon čega su prikupljene tripsinizacijom i podvrgnute postupku za bojenje.

3. 15. 3. PROTOKOL ZA BOJENJE ĆELIJA

- 1) Isprati ćelije hladnim PBS-om (2x);
- 2) resuspendovati ćelije u citofix puferu u koncentraciji 10^6 ćelija/ 0,5 ml citofix;
- 3) Inkubirati ćelije na ledu, 20 min.;
- 4) Istaložiti ćelije (centrifugiranjem 15.000 rpm/ 10 min);
- 5) Odliti supernatant tj. preostali citofix rastvor;
- 6) Isprati ćelije "perm/wash" puferom, pri koncentraciji od 0,5 ml pufera / 10^6 ćelija, na sobnoj temperaturi;
- 7) Odrediti ukupnu količinu uzorka i odrediti količinu "perm/wash" pufera i antitela koje treba dodati uzorku(tj. ukupnom broju uzoraka), tako da svaki uzorak od 10^6 ćelija sadrži 100 µl PERM i 20 µl antitela;
- 8) Ćelije resuspendovati u "perm/wash", dodati antitela i inkubirati 30 min, na sobnoj temperaturi;
- 9) Isprati svaki uzorak u 1ml "perm/wash";
- 10) Resuspendovati ćelije u 0,5 ml "perm/wash";
- 11) Analizirati na protočnom citometru.

Analiza je vršena na protočnom citometru korišćenjem argonskog lasera sa λ ekscitacije na 488 nm. Prikupljeni podaci analizirani su u logaritamskom histogramu, korišćenjem kompjuterskog softvera *Cell Quest* (185).

3. 16. MORFOLOŠKA ANALIZA ĆELIJSKE SMRTI POMOĆU FLUORESCENTNE MIKROSKOPIJE

Morfološke karakteristike ćelijske smrti HeLa ćelija, indukovane platina(II) kompleksima, analizirane su fluorescentnom mikroskopijom nakon bojenja tretiranih ćelija akridin-oranžom (AO) i etidijum-bromidom (EtBr). AO je DNK-interkalirajuća fluorescentna boja koja fluorescira zeleno i korišćena je za vizualizaciju morfoloških promena na nivou jedra. Ćelija usvaja AO kada je membrana ćelije intaktna, tako da se boja akumulira samo u ćelijama koje su žive ili podležu apoptozi. EtBr je DNK-interkalirajuća boja koja fluorescira narandžasto. EtBr ne prolazi kroz intaktnu ćelijsku membranu i akumuliraju je samo nekrotične ćelije i korišćen je za uočavanje nekrotičnih ćelijskih promena (190).

3. 16. 1. POSTUPAK PRIPREME PREPARATA ĆELIJA ZA ANALIZU FLUORESCENTNIM MIKROSKOPOM

HeLa ćelije (10^4 ćelija) su rasle u RPMI 1640 medijumu, pH 7,2, u petri šoljama dimenzija 90 x 15 mm jedan dan. 10^5 - 10^6 ćelija u eksponencijalnoj fazi rasta, izloženo je dejstvu platina(II) kompleksa rastvorenih u medijumu, u koncentraciji koja inhibira proliferaciju 75% ćelija ($1,5 \times IC$). Ćelije su inkubirane sa ispitivanim kompleksima na $37^\circ C$, u inkubatoru sa 5% CO_2 , 24 h. Po završetku inkubacije analizirane su morfološke promene ćelija pod svetlosnim mikroskopom. Ćelije koje su se odlepile sa dna suda, odlivene su zajedno sa medijumom u epruvetu ($V=15$ ml). Ćelije koje su ostale prilepljene za dno suda prikupljene su tripsinizacijom. Suspenzije ćelija su spojene u jednoj epruveti i centrifugirane na $1500 \times g$, 10 min. Talog je resuspendovan u 10 ml svežeg medijuma, na vorteksu i ponovljeno je centrifugiranje na $1500 \times g$ 10 min.

3. 17. LABORATORIJSKI INSTRUMENTI I HEMIČKIJE

3. 17. 1. LABORATORIJSKI APARATI KORIŠĆENI U OVOM RADU

- Centrifuga (U-32, Boeca, Hemačka)
- Mikrocentrifuga (Eppendorf, Hamburg, Hemačka)
- Vorteks (REAX 2000, Heidolph Instrumeets GmbH&Co. KG, Schwabach, Hemačka)
- Frižider sa hlađenjem na -170°C (Ultra low temperature freezer, Herafreze, Heraeus Instrumnets GmbH, Hemačka)
- Frižider (TCW 115, The Electrolux Group, Stocholm, Švedska)
- Atomski apsopcioni spektrofotometar (Perkin Elmer, SAD)
- Tečni scintilacioni brojač (1205 Betaplate, Perkin Elmer, SAD)
- Maseni spekrometar (Perkin Elmer, SAD)
- Protočnom citometar (Becton Dickinson, Mountain View, CA, SAD)
- Spektrofotometar (Beckman instruments G 2400, G.M.B.H. München, Hemačka)
- Sterilna komora (Klimaoprema, Samobor, Hrvatska).
- Inkubator (CO₂ inkubator 220, Flow Laboratories, UK)
- Čitač mikrotitar ploče sa 96 sudića (Behring EL 311, Becton Dickinson, CA, SAD)
- Prikupljač radioaktivno obeleženih ćelija (Harvester 96-Tomptec, Becton Dickinson, CA, SAD)
- Svetlosni mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Hemačka)
- Analitička vaga (Mettler H43)
- Vodeno kupatilo (Sutjeska, Beograd)
- Inkubator na 37°C (Sutjeska, Beograd)
- Digitalni fotoapararat (Olympus, Camedia 4040).
- Mikrotitar ploče sa 96 i 6 sudića (NUNC, Apogent Company, Roskilde, Danska)
- Petri šolje (90 x 15 mm, Flow laboratories, Velika Britanija)
- Automatske pipete (Acura 821, Socorex, švajcarska)
- Nastavci za automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Hemačka)
- Špricevi (NIPRO Europe N.V., Belgija)
- Igle (NIPRO Europe N.V., Belgija)
- Falkoni (Corning Incorporated, SAD.)
- Membranski filter (Millex-HA, Millipore. 0,22 μm, SERSTEDT, Hemačka)
- Komorica za brojanje ćelija (Neubauer, Parmer Instrument Company, Kanada)
- Pokrovno staklo (Gold Seal, SAD)

3. 17. 2. HEMIKALIJE KORIŠĆENE U OVOM RADU

Kompleksi metala Ru(III), Cr(III), Rh(III) i Pt(II) su sintetisani na osnovu poznatih literaturnih podataka (8, 154). Čistoća kompleksa određena je mikroanalizom i spektrofotometrijskom analizom.

- Praškasta podloga RPMI 1640 (Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)
- Dimetil-sulfoksid, DMSO (Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)
- Natrijumdodecilsulfat, SDS (Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)
- 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolijumbromid (MTT) (Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)
- Fetalni goveđi serum (FCS-Fetal calf serum) (Veterinarski fakultet, Novi Sad; Invitrogen Italia, San Giuliano Milanese, Italija)
- Cisplatina (Hemijski Fakultet, Univerzitet u Beogradu)
- Etanol (Medicom, Šabac)
- Fiziološki rastvor (Hemofarm, Vršac)
- Dest. H₂O (Zavod za transfuziju krvi, Beograd)
- NaHCO₃ ("Zorka Pharma", Šabac)
- Na₂CO₃ (E. Merck, Darmstadt, Hemačka)
- NaH₂PO₄ (Alkaloid, Skoplje)
- Na₂HPO₄ (Alkaloid, Skoplje)
- NaOH ("Zorka Pharma", Šabac)
- HCl (konc.) (E. Merck, Darmstadt, Hemačka)
- Kalijum-natrijum-tartarat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Hemačka)
- L,D-butionin sulfoksimin, L,D-BSO (BD PharMingen, San Diego, CA, SAD)
- Folinov-reagens (Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)
- Tripan plavo (E. Merck, Darmstadt, Hemačka)
- Akridin-oranž (AO) (Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)
- Etidijum-bromid (EtBr) (Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)
- Propidijum-jodid (PI) (Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)
- Oktilfenoksipoli-etoksietanol, TRITON-X-100 (Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)
- Fosfatni pufer sa NaCl, pH 7,2 (PBS-Phosphate buffer saline) (Torlak, Beograd)
- Tripsin (Torlak, Beograd)
- Govedji albumin (kristal) (BA -Bovine Albumin) (Miles Laboratories, LTD, SAD)

- DNK fragment (125 bp, Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)
- RNaza A (BD PharMingen, San Diego, CA, SAD)
- Aneksin V-FITC (BD PharMingen, San Diego, CA, SAD)
- Kit za određivanje aktivne humane kaspaze-3 (BD PharMingen, San Diego, CA, SAD)
- Kit za određivanje MMP-2 i MMP-9 (Quantikine R&D Systems, SAD)
- ¹³C-Timidin (Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)
- ³H-Uridin (Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)
- Glutation, GSH (Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)
- Glutation-reduktaza (Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)
- NADPH (Sigma Chem. Co., St. Louis, SAD)

4. 1. CITOTOKSIČNOST TESTIRANIH KOMPLEKSA

4. 1. 1. AKTIVNOST NEPLATINSKIH KOMPLEKSA

U cilju poređenja antiproliferativne aktivnosti neplatinskih kompleksa rutenijuma(III), hroma(III) i rodijuma(III) sa aktivnošću cisplatine, izvedena je analiza citotoksičnosti na panelu tri ćelijske linije: ćelijama karcinoma humanog ovarijuma (A2780), ćelijama osteosarkom – cisplatina-senzitivnom (U2-OS) i cisplatina-rezistentnom soju (U2-OS/Pt), primenom testa inhibicije rasta.

Rezultati su prikazani kao IC_{50} vrednost (koncentracija agensa koja izaziva inhibiciju preživljavanja ćelija za 50 %) i dati su u Tabeli 4.1.1.

Dobijeni rezultati na A2780 ćelijama ukazuju da jedino kompleks $Ru(tfac)_3$ poseduje citotoksičnost u opsegu koncentracija do 100 μM kako pri dejstvu za 24 sata ($IC_{50} = 40,63 \pm 15,48 \mu M$) tako i pri dejstvu za 72 sata ($IC_{50} = 25,2 \pm 11,5 \mu M$) (Tabela 4.1.1). Aktivnost $Ru(tfac)_3$ na cisplatina-senzitivnim ćelijama osteosarkoma U2-OS ($IC_{50} = 39,25 \pm 10,45 \mu M$) približna je aktivnosti na cisplatina-rezistentnim ćelijama U2-OS/Pt ($IC_{50} = 37,75 \pm 13,65 \mu M$) i, takodje, uporediva sa aktivnošću na A2780 ćelijama. Kompleksi Cr(III) i Rh(III) nisu pokazali citotoksičnost tokom preliminarnog ispitivanja na A2780 ćelijama (Tabela 4.1.1).

Antiproliferativna aktivnost $Ru(acac)_3$ analizirana je dodatno korišćenjem MTT testa na panelu 6 ćelijskih linija (HeLa, B16, U2-OS, U2-OS/Pt, Jurkat, K562) u širem opsegu koncentracije idući do 300 μM . IC_{50} vrednosti su određene sa grafika preživljavanja ćelija (Sl. 4.1.a,b,c) i prikazani su u Tabeli 4.1.2.

Sve dobijene IC_{50} vrednosti kreću se u opsegu iznad 100 μM . Antiproliferativna aktivnost na ćelijama osteosarkoma U2-OS ($IC_{50} = 173,16 \pm 5,50 \mu M$) ispoljena je nakon 48 sati dejstva agensa, što ukazuje na povećanu osetljivost ovih ćelija na ispitivani kompleks, u poređenju sa drugim ćelijskim linijama. Pri tome aktivnost kompleksa je veća na cisplatina-senzitivnoj ćelijskoj liniji, u poređenju sa cisplatina-rezistentnom. Poređenje aktivnosti dva Ru(III) kompleksa na B16, Jurkat i K562 ukazuje da NAMI-A ima veću citotoksičnu aktivnost u poređenju sa $Ru(acac)_3$.

Tabela 4.1.1 Rezultati testa inhibicije rasta ćelija, određeni na trima ćelijskim linijama A2780, cisplatina -senzitivnim (U2-OS), i -rezistentnim (U2-OS/Pt) ćelijama, nakon kratkotrajnog (24 sata) kao i dugotrajnog (72 sata) dejstva agensa.

Kompleks	Vreme (h)	IC ₅₀ (μM) ^a		
		A2780	U2-OS	U2-OS/Pt
Ru(tfac)₃	24	40 ± 15	39 ± 10	37 ± 19
Ru(acac)₃	24	> 100	> 100	> 100
Cr(acac)₃	24	> 100		
Rh(acac)₃	24	> 100		

^a Rezultati citotoksičnosti testiranih kompleksa su prikazani kao IC₅₀ vrednost (koncentracija leka koja izaziva inhibiciju preživljavanja ćelija za 50 %). Prikazane IC₅₀ vrednosti (± sd) pojedinačnih kompleksa određene su sa grafika preživljavanja ćelija i predstavljaju srednju vrednost tri do četiri nezavisna eksperimenta.

4. 1. 2. AKTIVNOST PLATINSKIH KOMPLEKSA

Radi poređenja antiproliferativne aktivnosti platinskih kompleksa: cisplatine, *cis*- [Pt(Py)₂Cl₂], *trans*-[Pt(Py)₂Cl₂], sa aktivnošću kompleksa Ru(III): NAMI-A, Ru(acac)₃, izveden je MTT test na panelu šest ćelijskih linija (HeLa, B16, U2-OS, U2-OS/Pt, Jurkat, K562). IC₅₀ vrednosti određene su sa grafika preživljavanja ćelija (Sl. 4.1.a.,b.,c.) i prikazani u Tabeli 4.1.2.

Rezultati eksperimenta sugerišu da visoku antiprolifertivnu aktivnost pokazuju uglavnom platinski(II)kompleksi, pri čemu cisplatina ima najveću aktivnost. *trans*-Dipiridindihloroplatina(II), [Pt(Py)₂Cl₂], ima veću citotoksičnost u poređenju sa *cis*- izomerom, na svim ispitivanim ćelijskim linijama.

Aktivnost cisplatine na ćelijama osteosarkoma, cisplatina-senzitivnom soju U2-OS (IC₅₀ = 5,22 ± 0,5 μM) i cisplatina-rezistentnom soju U2-OS/Pt (IC₅₀ = 12,25 ± 2,48 μM) (Tabela 4.1.2) razlikuje se za faktor Fr = 2,3. *Trans*- i *cis* - Izomeri kompleksa [Pt(Py)₂Cl₂], pokazuju manju aktivnost na ćelijama osteosarkoma u poređenju sa aktivnošću na HeLa ćelijama (IC₅₀ vrednost određene za 48 sati dejstva kompleksa) i, isto tako manju aktivnost na cisplatina-rezistentnom soju (U2-OS/Pt), pri čemu je *trans*- izomer skoro duplo aktivniji (IC₅₀ = 28,99 ± 0,69 μM) u poređenju sa *cis*- izomerom (IC₅₀ = 52,50 ± 5,73 μM). Ni jedan od ispitivanih kompleksa Ru(III) ili Pt(II) ne prevazilazi rezistenciju na cisplatinu.

Tabela 4. 1. 2. Rezultati MTT testa određeni na nekoliko ćelijskih linija: HeLa, cisplatina-senzitivnim ćelijama osteosarkoma (U2-OS) i -rezistentnim ćelijama (U2-OS/Pt), K562, Jurkat, B16. Rezultati citotoksičnosti testiranih kompleksa su prikazani kao IC₅₀ vrednost (koncentracija leka koja izaziva inhibiciju preživljavanja ćelija za 50 %. Prikazane IC₅₀ vrednosti pojedinačnih kompleksa određene su sa grafika preživljavanja ćelija i predstavljaju srednju vrednost tri do četiri nezavisna eksperimenta.

Kompleks	IC ₅₀ (μM)					
	HeLa ^b	U2-OS ^a	U2-OS/Pt ^a	Jurkat ^b	K 562 ^b	B16 ^b
Ru(acac) ₃	114 ± 1	173,16 ± 5,50	>300*	115,19 ± 0,61	142,9 ± 32,5	148 ± 1
NAMI-A				70,68 ± 3,24	99 ± 34	85,88 ± N.D.
Cis-[Pt(Py) ₂ Cl ₂]	^a 32,30 ± 0,07	49,13 ± 3,29	52,50 ± 5,73	11,32 ± 0,89	22,38 ± 1,31	12,5 ± 2,6
Trans-[Pt(Py) ₂ Cl ₂]	^a 9,5 ± 0,1	23,89 ± 2,34	28,99 ± 0,69	7,84 ± 1,15	9,13 ± 1,82	7,74 ± 1,56
CDDP ^c	4,73 ± 0,53	5,22 ± 0,59	12,25 ± 2,48	4,43 ± 0,69	6,21 ± 0,24	5,68 ± 0,33
Oksaliplatina	5,53 ± 0,61					

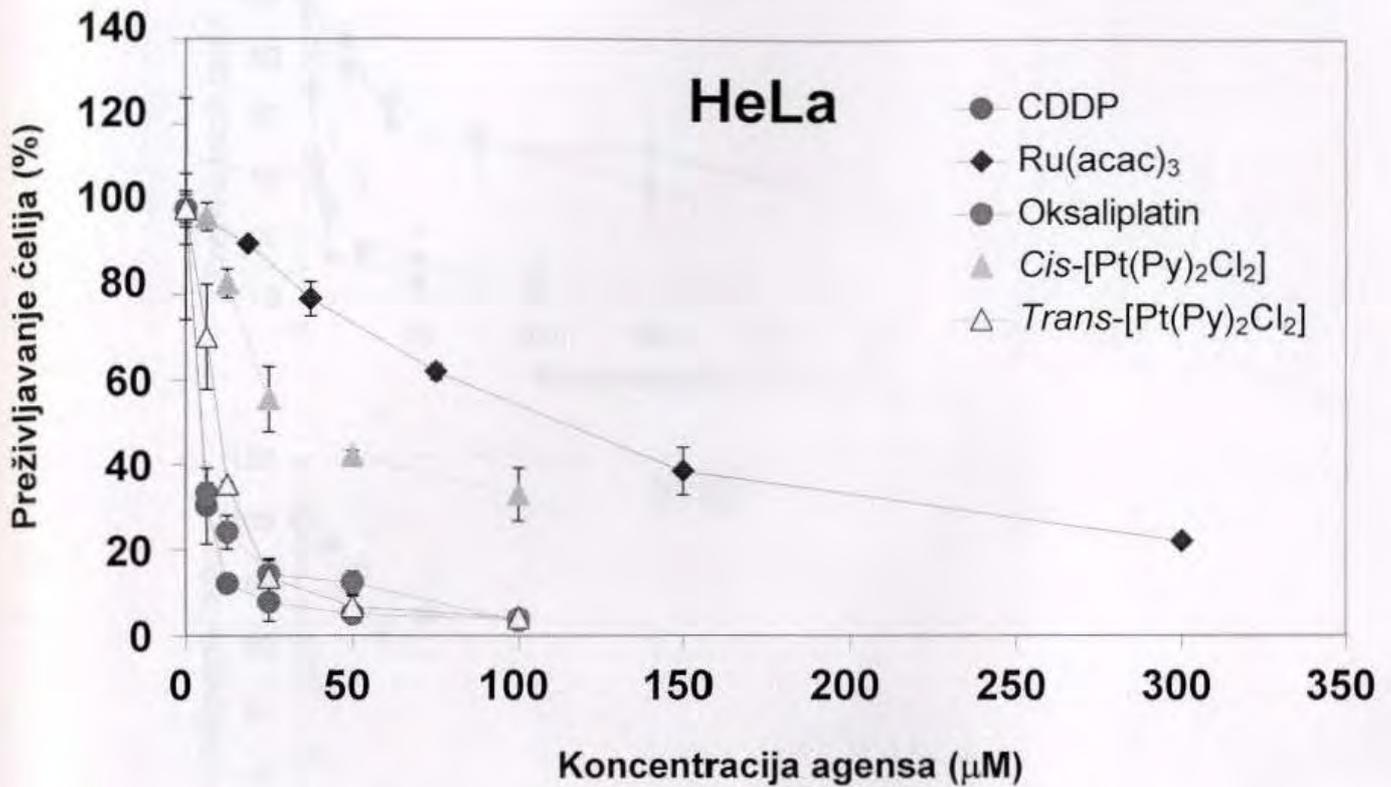
N.D: Nije određeno,

* > 300 Nije bilo antiproliferativne aktivnosti do koncentracije 300 μM.

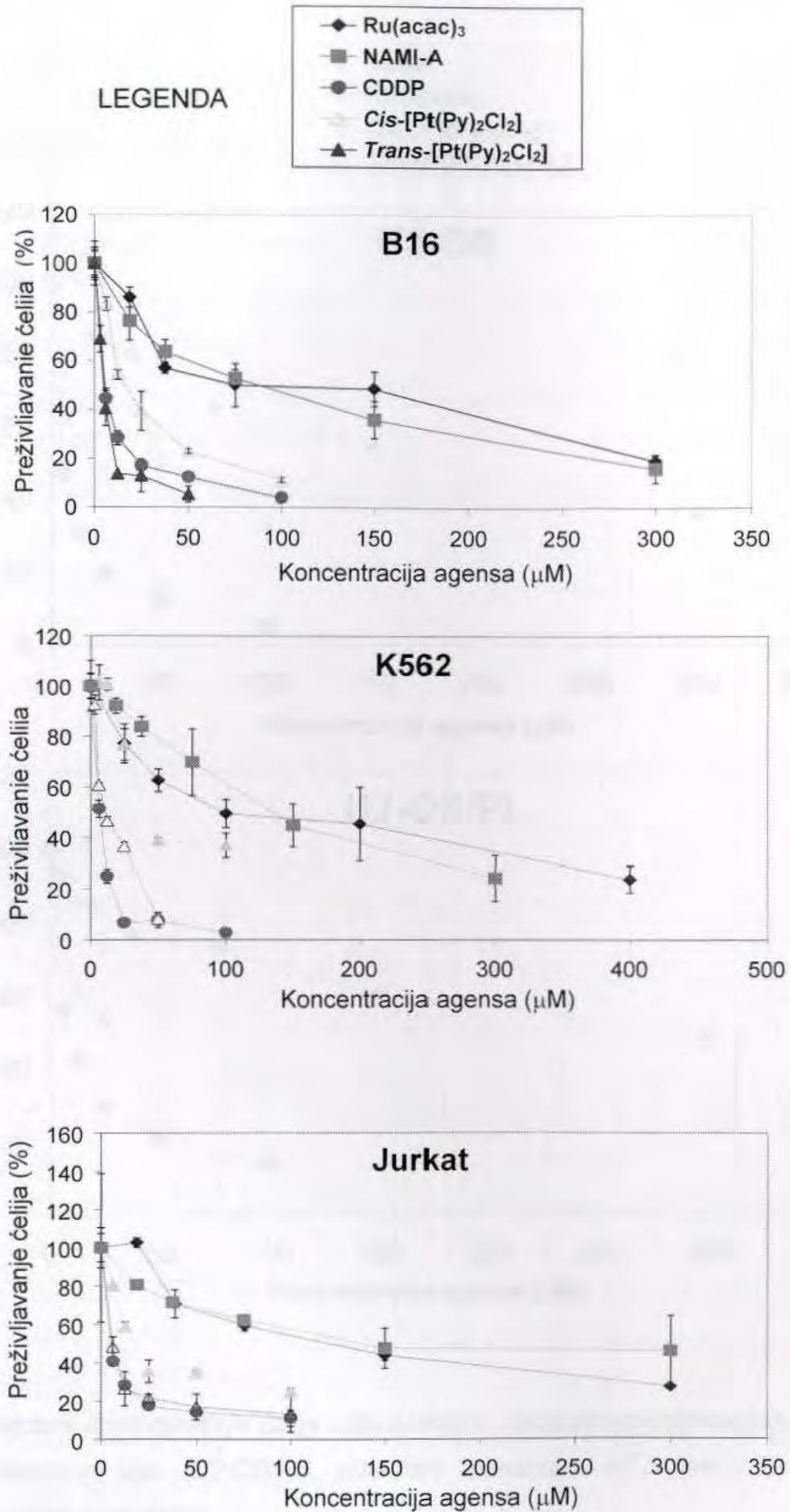
^a Prikazane IC₅₀ vrednosti određene su za 48 sati dejstva agensa.

^b Prikazane IC₅₀ vrednosti određene su za 72 sata dejstva agensa.

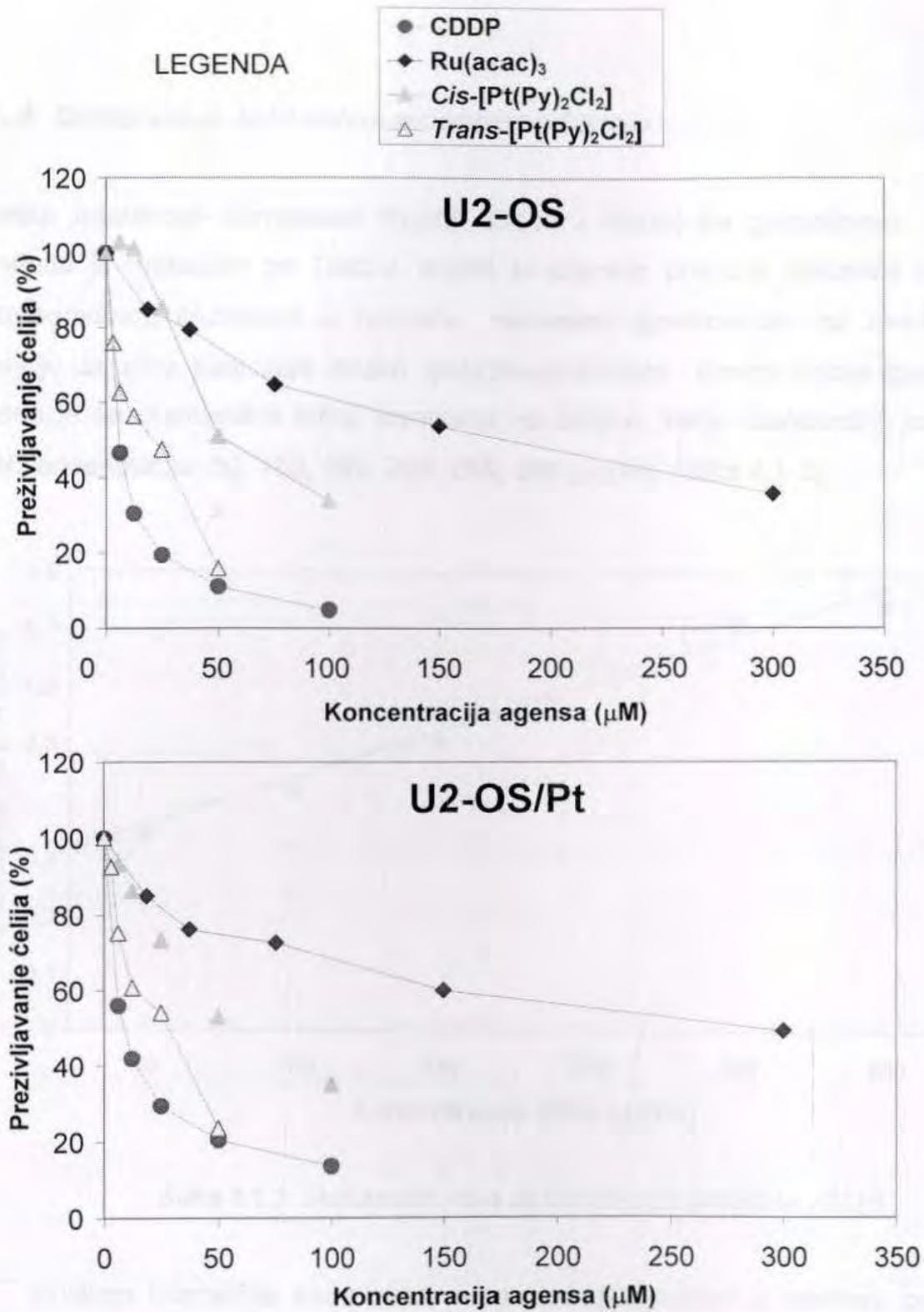
^c Cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂], cisplatina, CDDP.



Sl. 4.1.a. Dijagram preživljavanja HeLa ćelija, određen MTT testom nakon 72 sata dejstva ispitivanih kompleksa. Dijagram preživljavanja (inhibicije rasta) ćelija, prikazuje procenat preživljavanja ćelija u funkciji koncentracije ispitivanog agensa. Sa dijagrama preživljavanja ćelija određene su IC_{50} vrednosti (koncentracija agensa koja izaziva inhibiciju rasta ćelija za 50 %).



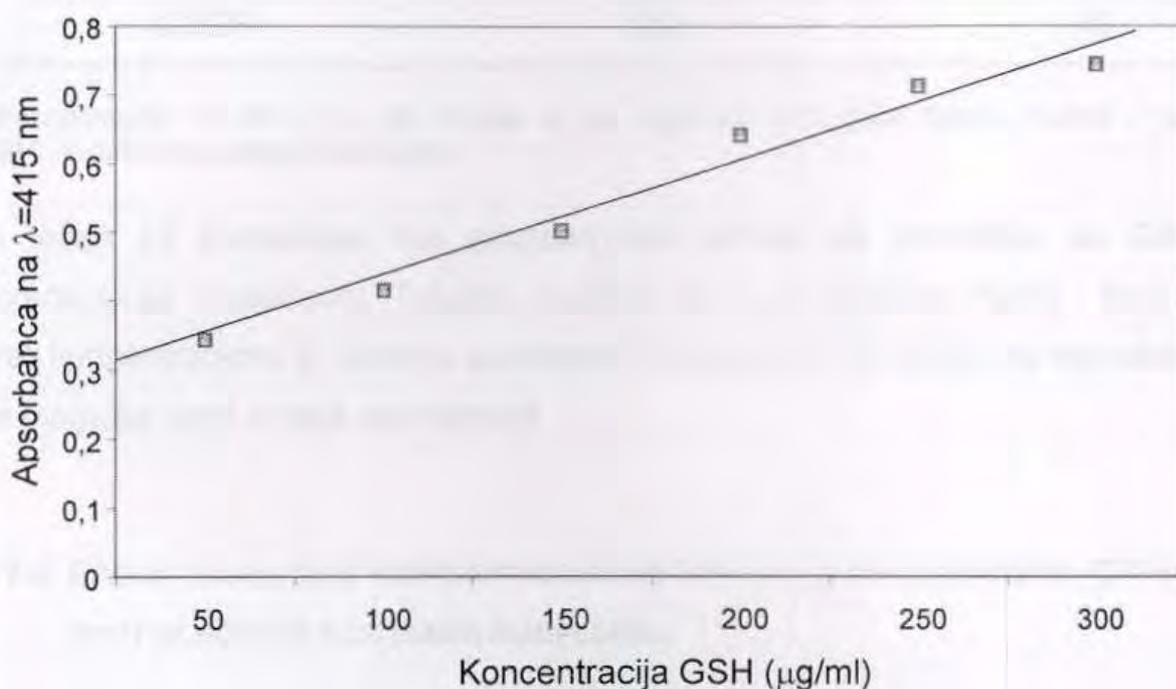
Sl. 4. 1.b. Dijagrami preživljavanja B16, K562 i Jurkat ćelija, određeni MTT testom nakon 72 sata dejstva ispitivanih kompleksa.



Sl. 4.1.c. Dijagrami preživljavanja ćelija osteosarkoma, cisplatina-senzitivnog (U2-OS) i cisplatina-rezistentnog soja (U2-OS/Pt), određeni primenom MTT testa, za 48 sati dejstva ispitivanih kompleksa.

4. 1. 3. ODREĐIVANJE GLUTATIONA METODOM PO TIETZ-U

Kinetika interakcije kompleksa Ru(III), Cr(III) i Rh(III) sa glutationom *in vitro* određena je metodom po Tietz-u, kojom je zapravo praćena preostala količina neizreagovanog glutationa u rastvoru, merenjem apsorbancije na $\lambda=415$ nm. Reakciju *in vitro* katalizuje enzim glutation-reduktaza. Koncentracija glutationa očitana je sa standardne krive, formirane na osnovu serije standardnih rastvora GSH koncentracije: 50, 100, 150, 200, 250, 300 ($\mu\text{g/ml}$) (Slika 4.1.3).



Slika 4.1.3 Standardna kriva za određivanje glutationa (GSH).

Prilikom interakcije kompleksa metala sa glutationom u rastvoru početne koncentracije (GSH) 300 ($\mu\text{g/ml}$), dolazi do formiranja kompleksa GSH-metal, što rezultuje opadanjem apsorpcije na $\lambda=415$ nm. Dobijeni rezultati ukazuju da ispitivani kompleksi metala Ru(III), Cr(III) i Rh(III) interaguju sa GSH, naročito pri većoj koncentraciji (3,2 mM)(Tabela 4.1.3).

Tabela 4.1.3 Interakcija kompleksa Ru(III), Cr(III) i Rh(III) sa glutationom in vitro, određeno metodom po Tietz-u.

Kompleksi	Koncentracija GSH (neizreagovanog) ($\mu\text{g/ml}$)	
	1,6 mM ^a	3,2 mM ^a
Ru(tfac)₃	260	0
Ru(acac)₃	280	210
Cr(acac)₃	120	60
Rh(acac)₃	240	60
NAMI-A	250	110
CDDP	160	40

^a Koncentracije 1,6 mM i 3,2 mM odnose se na ispitivane komplekse metala, dodate u rastvor GSH, početne koncentracije 300 $\mu\text{g/ml}$.

Ni jedan od kompleksa nije pokazao veći afinitet za interakciju sa GSH u poređenju sa cisplatinom. Takodje, reakcija GSH sa metalima Ru(III) i Rh(III) ne prati koncentracionu tj. linearnu zavisnost. S obzirom da rezultati nisu reproduktivni ne mogu se uzeti u dalje razmatranje.

4.1.4. EFEKAT SMANJENJA KONCENTRACIJE UNUTARĆELIJSKOG GLUTATIONA (GSH) NA CITOTOKSIČNOST TESTIRANIH KOMPLEKSA

Ovim testom praćen je efekat smanjenja koncentracije unutarćelijskog glutationa (GSH) na aktivnost ispitivanih kompleksa na ćelijama A2780, B16, K562. Butionin-sulfoksimin (BSO) je primenjen kao inhibitor sinteze glutationa, pri koncentraciji 1 $\mu\text{g/ml}$, pri kojoj sam nije imao inhibitorno dejstvo na rast ćelija. Analiza na A2780 ćelijama ukazala je da Ru(tfac)₃ ima nešto bolju citotoksičnost u koinkubaciji sa BSO ($\text{IC}_{50} = 38,73 \pm 0,32 \mu\text{M}$) u poređenju sa aktivnošću bez BSO ($\text{IC}_{50} = 40 \pm 15 \mu\text{M}$) (Tabela 4.1.4.a.). Inhibicija sinteze unutarćelijskog GSH nije imala uticaja na aktivnost kompleksa Cr(III) i Rh(III).

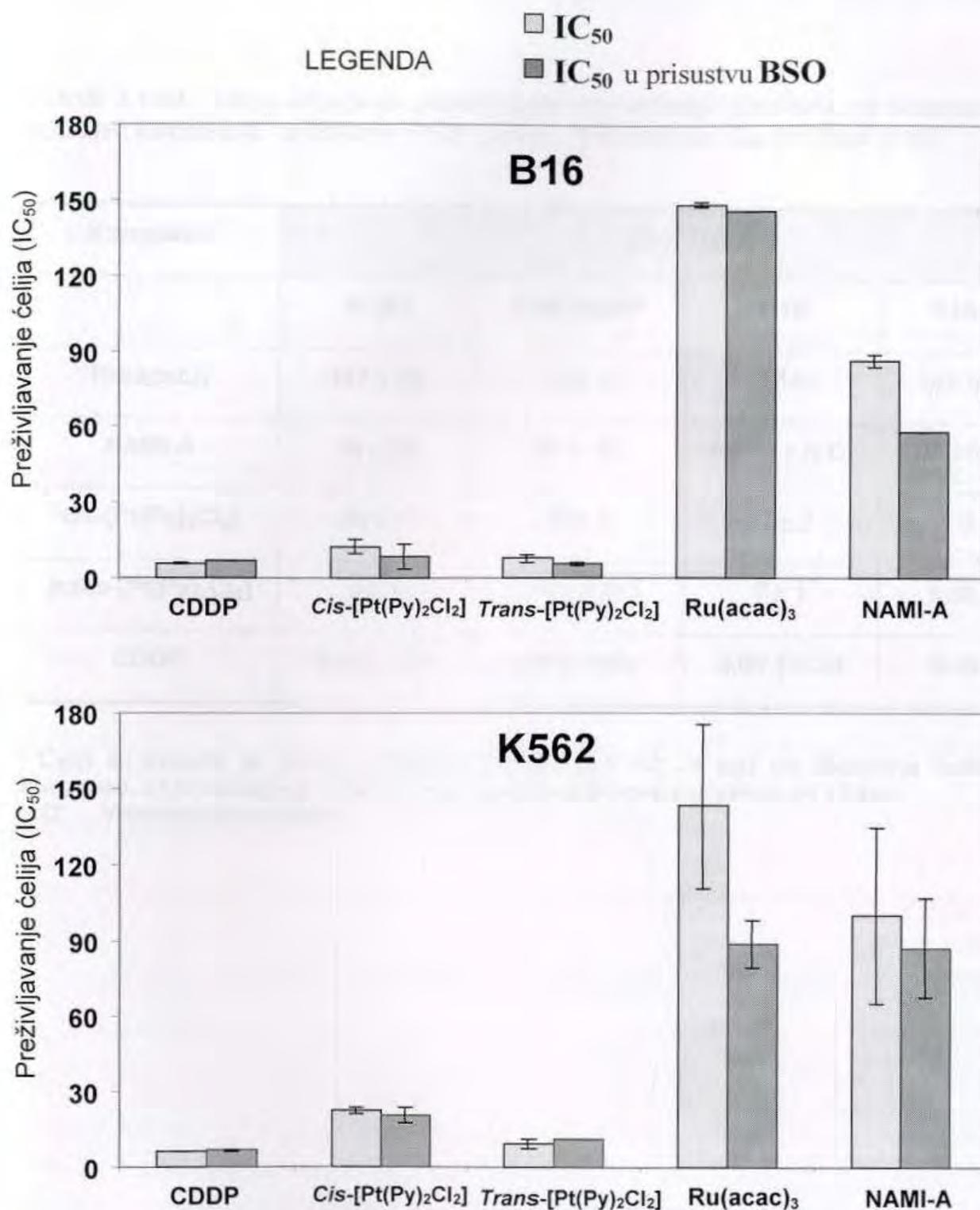
Ispitivanja na B16 i K562 ćelijama ukazala su da smanjenje unutarćelijske koncentracije GSH ima uticaja na aktivnost kompleksa Ru(acac)₃ i NAMI-A, odnosno IC₅₀ vrednost Ru(III) kompleksa opada (Sl. 4.1.4.). Taj rezultat ukazuje da Ru(III) kompleksi pokazuju afinitet za interakciju sa unutarćelijskim GSH. Kako je status unutarćelijskog glutationa različit u različitim ćelijskim linijama efekat dejstva BSO na aktivnost Ru(III) kompleksa različit je na K562 i B16 ćelijama (Tabela 4.1.4.a. i Sl. 4.1.4.). Tako u koinkubacionoj studiji na K562 ćelijama, BSO ima veći uticaj na aktivnost Ru(acac)₃, (IC₅₀ = 89 ± 9 μM), iako je senzitivnost dveju ćelijskih linija na Ru(acac)₃ približna (B16 IC₅₀ = 148 ± 1 μM); K562 IC₅₀ = 142 ± 32 μM). Kompleks NAMI-A pokazuje veću citotoksičnost u odnosu sa Ru(acac)₃ na obema ćelijskim linijama (Sl. 4.1.4.). Smanjene koncentracije GSH ima izraženiji uticaj na aktivnost NAMI-A na B16 ćelijama (IC₅₀ = 57 μM). Poređenje dejstva platinskih kompleksa u koinkubaciji sa BSO, ukazuje da smanjenje koncentracije unutarćelijskog glutationa utiče na povećanje aktivnosti *cis*-[Pt(Py)₂Cl₂] na obema ćelijskim linijama. CDDP kao i *trans*-[Pt(Py)₂Cl₂] pokazuju najveću citotoksičnu aktivnost u poređenju sa svim testiranim kompleksima, ali promena koncentracija unutarćelijskog GSH na B16 i K562 ćelijama ima slab uticaj na modulaciju aktivnosti ovih platinskih kompleksa.

Tabela 4.1.4.a. Aktivnost kompleksa Ru(III), Cr(III) i Rh(III) na ćelijama karcinoma ovarijuma (A2780) u koinkubacionoj studiji sa BSO (1 μg/ml).

Kompleksi	IC ₅₀ (μM) ^a	
	A2780	A2780 (BSO) ^b
Ru(tfac) ₃	40 ± 15	38,73 ± 0,42
Ru(acac) ₃	> 100	> 100
Cr(acac) ₃	> 200	> 200
Rh(acac) ₃	> 200	> 200

^a Citotoksičnost kompleksa je određena testom inhibicije rasta nakon 24 sati dejstva kompleksa. Vrednost IC₅₀ predstavlja koncentraciju leka koja izaziva inhibiciju preživljavanja ćelija za 50 %.

^b Ćelije tretirane ispitivanim kompleksima u koinkubaciji sa BSO (1 μg/ml).



Sl. 4.1.4. Dijagrami prikazuju citotoksično dejstvo testiranih kompleksa (IC_{50} vrednosti) na ćelijama B16 i K562 određene primenom MTT testa, u uslovima smanjene koncentracije intraćelijskog glutationa (GSH) pri koinkubacionom dejstvu sa butionin-sulfoksiminom (BSO 4,5 μ g/ml), u poređenju sa citotoksičnošću na istim ćelijama koje nisu tretirane sa BSO (ćelijama koje imaju normalan status GSH).

Tabela 4.1.4.b. Uticaj smanjenja unutarćelijske koncentracije glutationa, na citotoksičnost testiranih kompleksa, na ćelijama K562 i Jurkat. Prikazane su IC_{50} vrednosti (\pm sd).

Kompleksi	IC_{50} (μ M)			
	K 562	K562/BSO ^a	B16	B16/BSO ^a
Ru(acac)₃	142 \pm 32	89 \pm 9	148,14 \pm 1	145,6 \pm N.D.
NAMI-A	99 \pm 34	87 \pm 10	85,88 \pm N.D.	57,85 \pm N.D.
cis-[Pt(Py)₂Cl₂]	22 \pm 1	20 \pm 2	12 \pm 2	8 \pm 4
trans-[Pt(Py)₂Cl₂]	9 \pm 1	11 \pm N.D.	7 \pm 1	5,58 \pm 0,46
CDDP	6,21 \pm 0,24	6,61 \pm 0,51	5,68 \pm 0,33	6,48 \pm ND

^a Ćelije su tretirane sa butionin-sulfoksiminom BSO (4.5 μ M) 24 sata pre dodavanja testiranog kompleksa, a koinkubacija je nastavljena u prisustvu ispitivanog kompleksa još 72 sata.

N.D: Vrednost nije određena.

4. 1. 5. KOINKUBACIJA $Ru(acac)_3$ SA CISPLATINOM I OKSALIPLATINOM

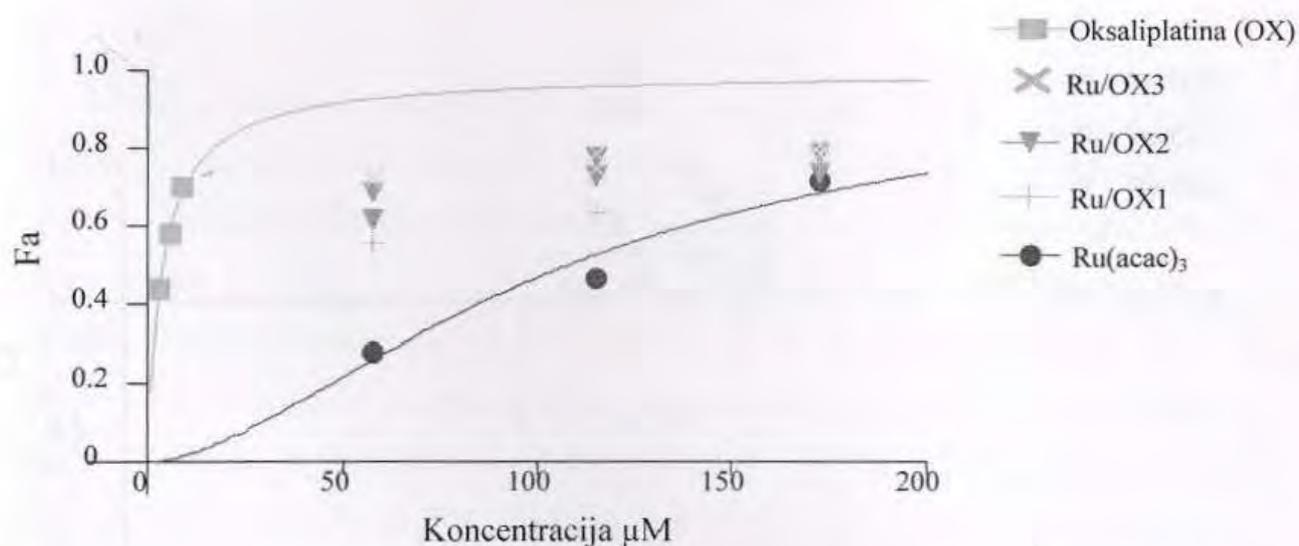
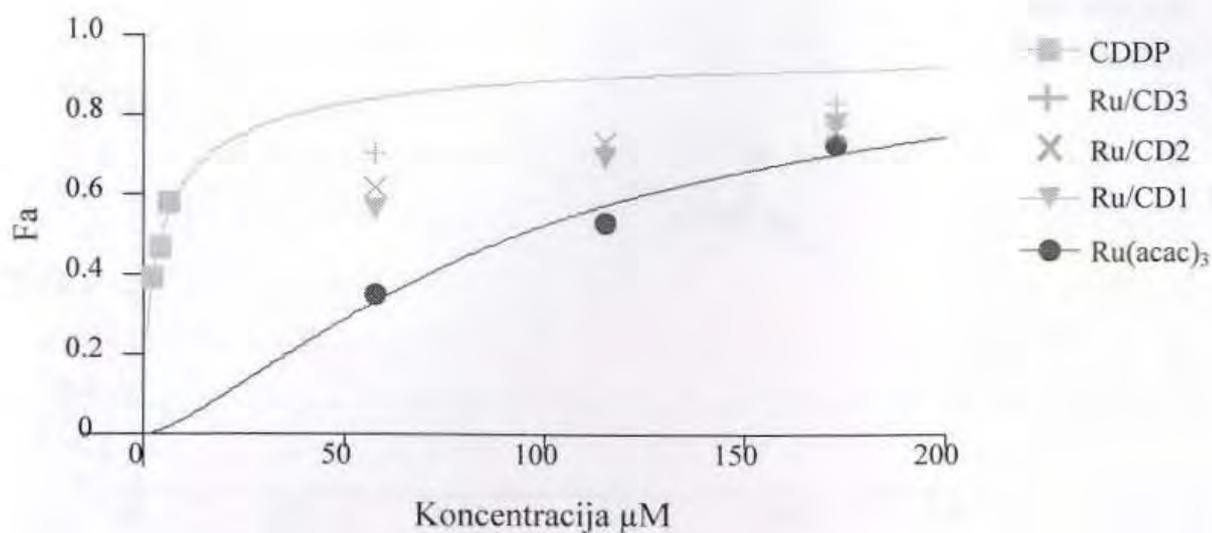
Citotoksičnost $Ru(acac)_3$ ispitivana je u koinkubacionoj studiji sa pojedinačnim kompleksima platine(II), cisplatinom i oksaliplatinom, na HeLa ćelijama. Rezultujuće vrednosti kombinacionih indeksa (CI), prikazane su u Tabeli 4.1.5. Efekat kombinovanog dejstva $Ru(III)$ se razlikuje u slučaju cisplatine i oksaliplatine (Sl. 4.1.5.a). Pri kombinovanom dejstvu sa nižim koncentracijama cisplatine ($0,5 \times IC_{50}$; IC_{50}) uočava se sinergizam ($CI < 1$), dok pri višim koncentracijama cisplatine, efekat varira sa promenom koncentracija $Ru(acac)_3$ od sinergizma ($CI < 1$) do aditivnog efekta ($CI \approx 1$) (Sl. 4.1.5.b). Oksaliplatina daje antagonističan efekat ($CI > 1$) pri svim primenjenim koncentracijama (Sl. 4. 1.5.b.).

Tabela 4. 1. 5. Rezultati kombinovanog dejstva cisplatine (CDDP) i $Ru(acac)_3$, odnosno oksaliplatine (OX) i $Ru(acac)_3$ na HeLa ćelijama, primenjenih u kombinaciji tri različite koncentracije: $0,5 \times IC_{50}$; IC_{50} ; $1,5 \times IC_{50}$. Prikazane vrednosti kombinacionih indeksa CI (CI-combination index) dobijeni su primenom MTT testa, za 72 sata dejstva agenasa i predstavljaju srednju vrednost 2 do 3 nezavisna merenja (\pm sd.).

	CDDP1 $0,5 \times IC_{50}$	CDDP2 IC_{50}	CDDP3 $1,5 \times IC_{50}$
$Ru(acac)_3$	CI (kombinacioni indeks)		
$0,5 \times IC_{50}$	$0,84 \pm 0,03$	$0,89 \pm 0,08$	$0,72 \pm 0,09$
IC_{50}	$0,84 \pm 0,11$	$0,84 \pm 0,07$	$1,07 \pm 0,41$
$1,5 \times IC_{50}$	$0,82 \pm 0,02$	$1,01 \pm 0,04$	$0,73 \pm 0,09$

	OX1 $0,5 \times IC_{50}$	OX2 IC_{50}	OX3 $1,5 \times IC_{50}$
$Ru(acac)_3$	CI (kombinacioni indeks)		
$0,5 \times IC_{50}$	$1,06 \pm$ N.D. ^a	$1,06 \pm 0,06$	$0,9 \pm 0,2$
IC_{50}	$1,18 \pm$ N.D.	$0,94 \pm 0,19$	$1,04 \pm 0,25$
$1,5 \times IC_{50}$	$1,04 \pm$ N.D.	$1,18 \pm 0,19$	$1,12 \pm 0,06$

^a \pm N.D ("not determined") nije određeno.



Sl. 4.1.5. Krive preživljavanja HeLa ćelija (Fa-fraction affected, tj. udeo mrtvih ćelija) pri simultanom dejstvu Ru(acac)₃ sa cisplatinom ili oksaliplatinom. Kombinovano dejstvo kompleksa ispitivano je za 72 sata dejstva agenasa, primenom kombinacije doza određenih na osnovu poznatih vrednosti IC₅₀. Granične doze čine 100% (2 × IC₅₀) standardnog agenasa odnosno 100% testiranog agenasa, tako da se dobija niz kombinacija doza:

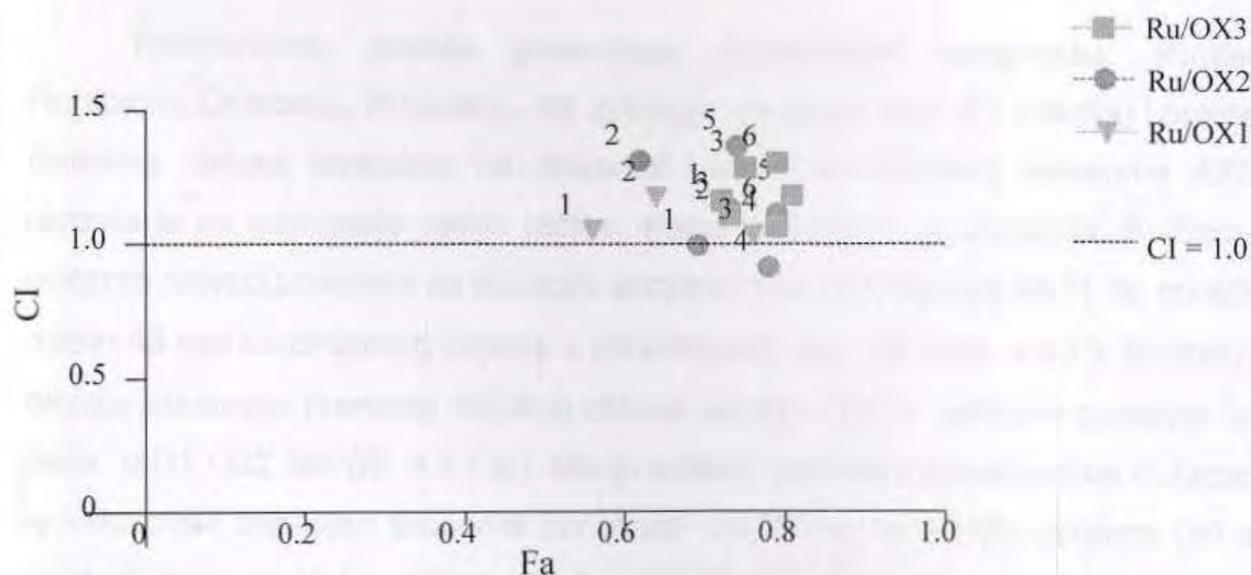
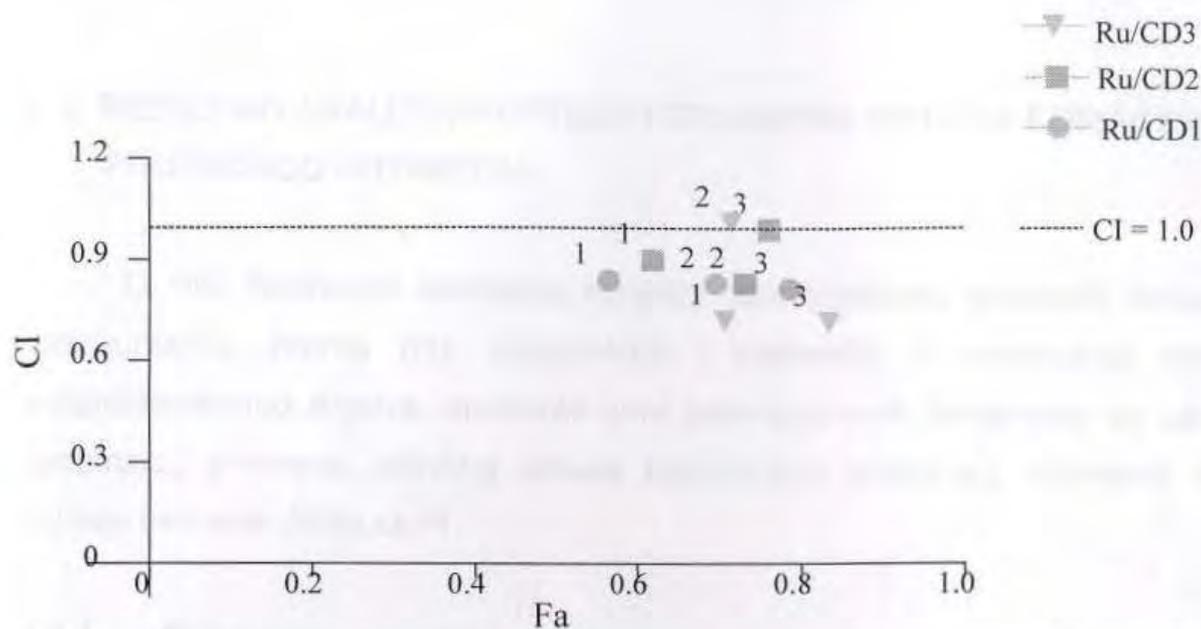
Granična doza 100:0 % (testirani agens Ru(acac)₃/standardni agens, CD ili OX)

75:25 % (testirani agens/standardni agens, CD1 ili OX1)

50:50 % (testirani agens/standardni agens, CD2 ili OX2)

25:75 % (testirani agens/standardni agens, CD3 ili OX3)

Granična doza 0:100 % (testirani agens Ru(acac)₃/standardni agens (CD ili OX))



Sl. 4.1.5. Grafički prikaz CI-kombinacionog indeksa, za simultano dejstvo $Ru(acac)_3$ sa cisplatinom ili oksaliplatinom, na Hela ćelijama. Kombinovano dejstvo kompleksa ispitivano je za 72 sata dejstva agenasa, primenom kombinacije koncentracija (doza) određenih na osnovu poznatih vrednosti IC_{50} : granična doza 100% odgovara koncentraciji $2 \times IC_{50}$.

75:25 (%) testirani agens /standardni agens (CD1 ili OX1)

50:50 (%) testirani agens/standardni agens (CD2 ili OX2)

25:75 (%) testirani agens/standardni agens (CD3 ili OX3)

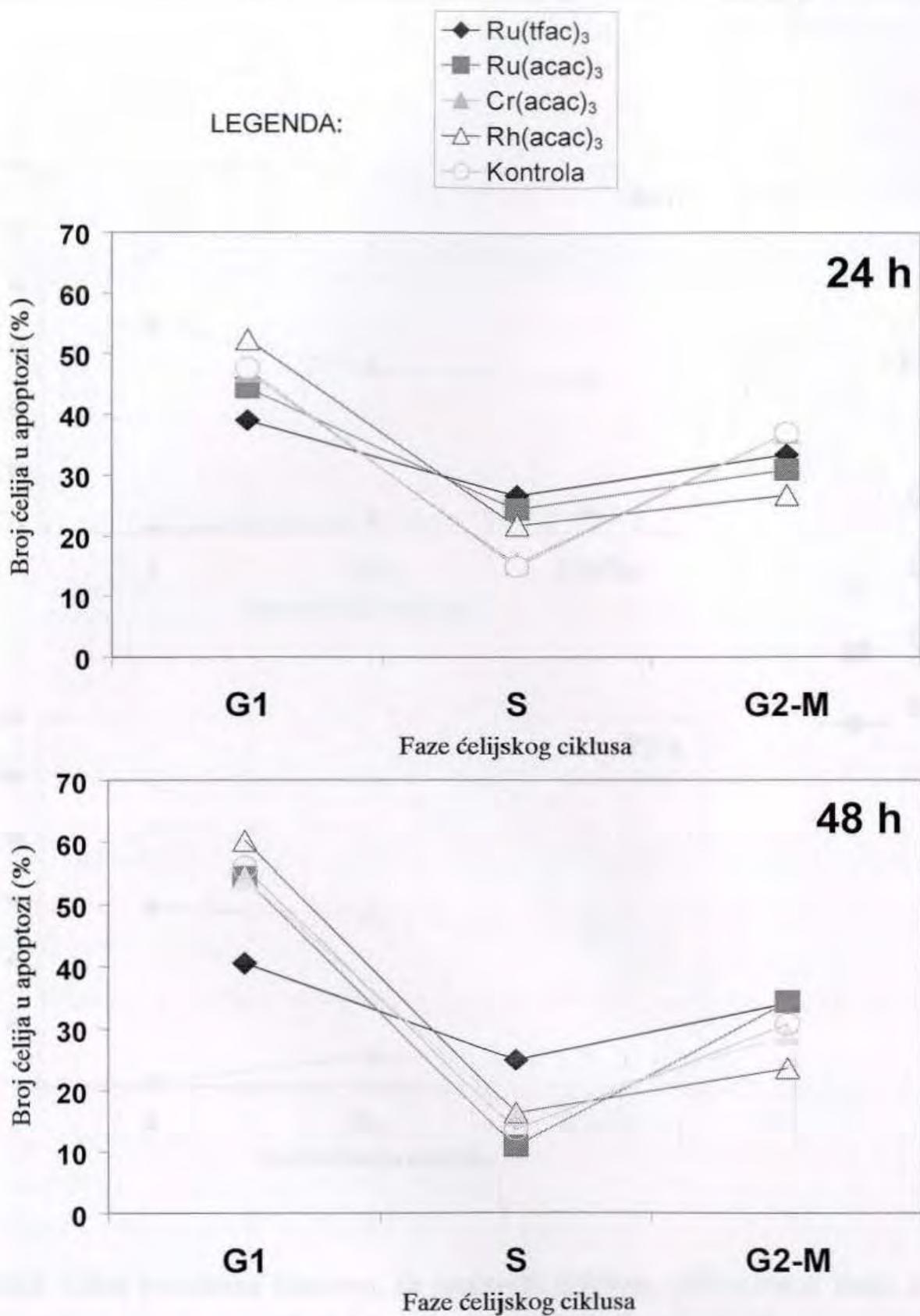
4. 2. REZULTATI ANALIZE APOPTOZE I ĆELIJSKOG CIKLUSA KORIŠĆENJEM PROTOČNOG CITOMETRA

U cilju ispitivanja korelacije između citotoksičnosti testiranih kompleksa rutenijuma(III), hroma (III), rodijuma(III) i platine(II), i mehanizma njihovog antiproliferativnog dejstva, analizirali smo potencijal ovih kompleksa da uzrokuju apoptozu i promene ćelijskog ciklusa korišćenjem protočnog citometra, nakon bojenja tretiranih ćelija sa PI.

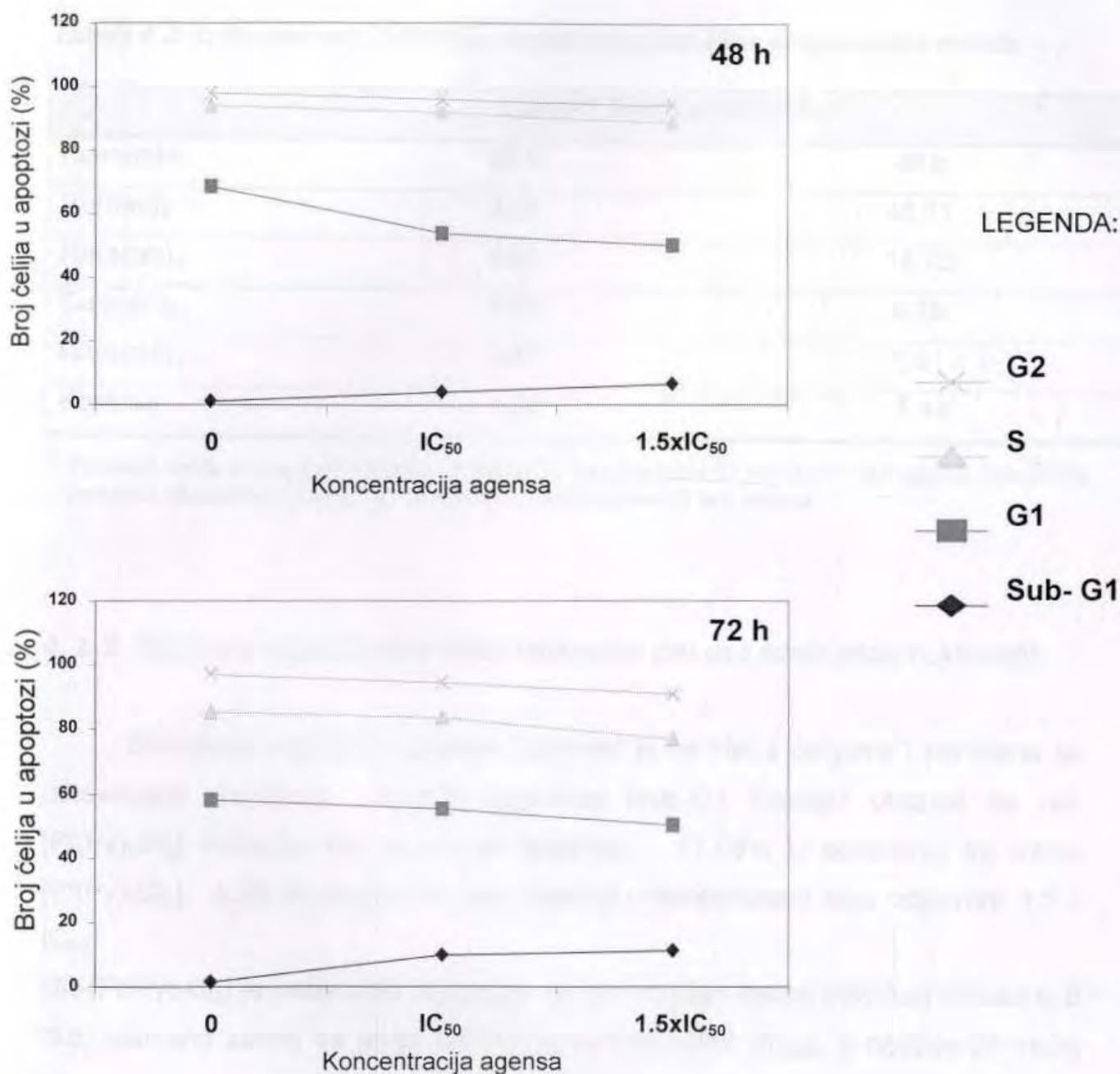
4.2.1. REZULTATI ANALIZE APOPTOZE I ĆELIJSKOG CIKLUSA KOMPLEKSA RUTENIJUMA(III), HROMA (III) I RODIJUMA(III).

Preliminarna analiza potencijala neplatinskih kompleksa: $\text{Ru}(\text{tfac})_3$, $\text{Ru}(\text{acac})_3$, $\text{Cr}(\text{acac})_3$, $\text{Rh}(\text{acac})_3$, da indukuju apoptozu (sub-G1 frakcija) i promene ćelijskog ciklusa izvedena na ćelijama karcinoma humanog ovarijuma A2780, ukazala je na postojanje velikih razlika među testiranim kompleksima. $\text{Ru}(\text{tfac})_3$ je pokazao najveći potencijal za indukciju apoptoze (sub-G1 frakcija) 46,71 %, određeno nakon 48 sati kontinualnog dejstva u koncentraciji 100 μM (Tab. 4.2.1.). $\text{Ru}(\text{tfac})_3$ je takodje indukovao promene ćelijskog ciklusa, zastoj u S fazi, odnosno opadanje broja ćelija u G1 i G2 fazi (Sl. 4.2.1.a.). Među ostalim testiranim kompleksima $\text{Ru}(\text{acac})_3$, je indukovao značajan procenat apoptoze 14,70 %, na A2780 ćelijama (48 sati dejstva), kao i na HeLa ćelijama 11,21 % (72 sati dejstva) u koncentraciji 1,5 x IC_{50} (Sl. 4.2.1.b.) pri čemu procenat ćelija u apoptozi raste u koncentracionoj i vremenskoj zavisnosti. Analiza ćelijskog ciklusa, na dvema ćelijskim linijama (A2780, HeLa), ukazala je da $\text{Ru}(\text{acac})_3$ utiče na neznatno smanjenje broja ćelija u G1, G2 fazi, kao i zastoj u S fazi ćelijskog ciklusa, koji su na A2780 ćelijama reverzibilni odnosno promene su uočljive nakon 24 sata dejstva agensa i skoro nestaju nakon 48 sati.

Kompleksi $\text{Cr}(\text{acac})_3$ i $\text{Rh}(\text{acac})_3$ nisu pokazali uticaj na progresiju ćelijskog ciklusa kao ni potencijal za indukciju apoptoze, ispitivanjem na A2780 ćelijama.



Sl. 4.2.1.a. Uticaj kompleksa Ru(III), Cr(III) i Rh(III), primenjenih u ekvimolarnoj koncentraciji (100 μ M), na progresiju ćelijskog ciklusa A2780 ćelija, nakon 24 sati, odnosno 48 sati delovanja. Dijagrami prikazuju raspored (%) tretiranih ćelija po fazama ćelijskog ciklusa (G1, S, G2; sub-G1 apoptotska frakcija nije prikazana) u poređenju sa kontrolom (netretiranim ćelijama).



Sl. 4.2.1.b. Uticaj kompleksa $Ru(acac)_3$ na progresiju ćelijskog ciklusa HeLa ćelija, primenjenog u koncentraciji koja odgovara IC_{50} i $1.5 \times IC_{50}$, nakon 48 sati, odnosno 72 sata dejstva. Dijagrami prikazuju raspored tretiranih ćelija po fazama ćelijskog ciklusa (sub-G1, G1, S, G2; sub-G1 apoptotska frakcija).

Tabela 4. 2. 1. Apoptoza A2780 ćelija, indukovana različitim kompleksima metala.

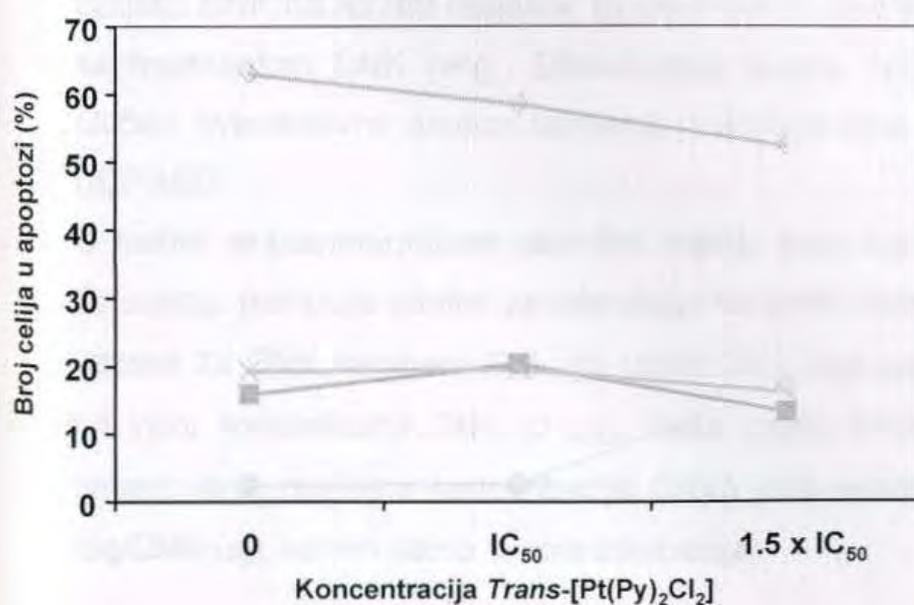
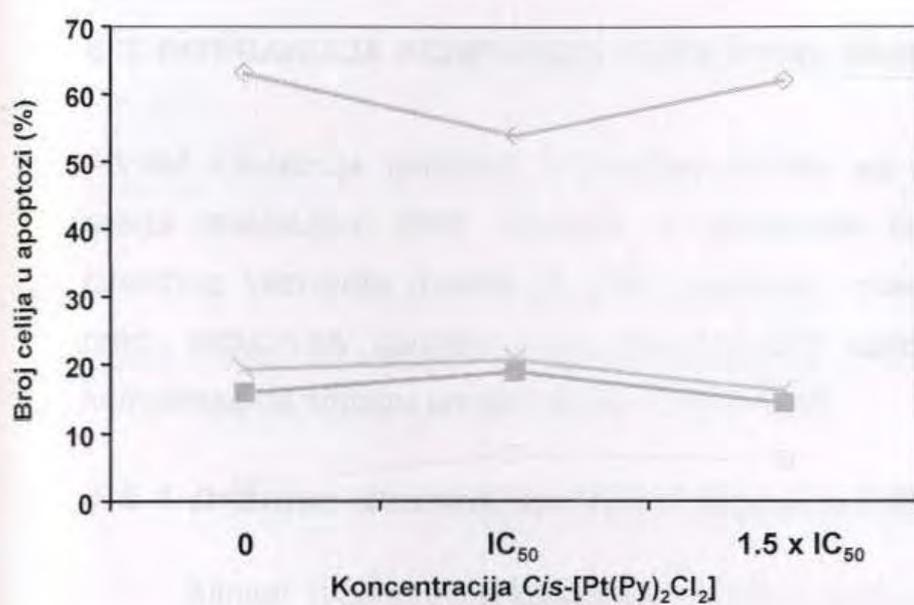
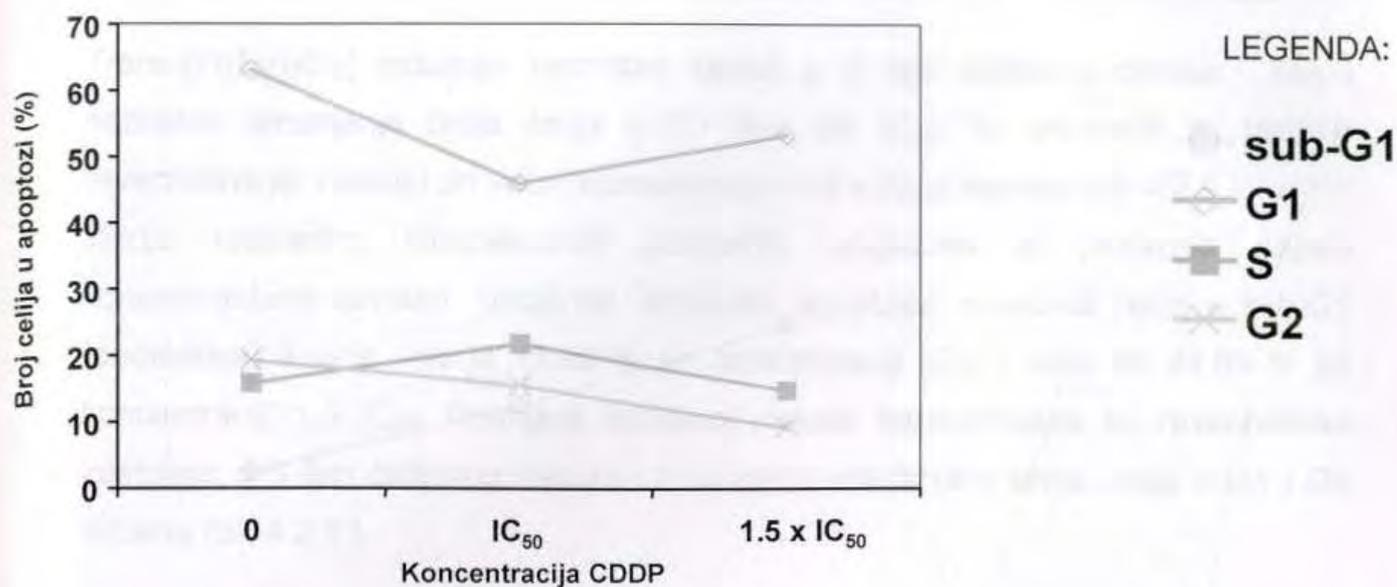
Kompleks	Sub-G1 DNK sadržaj (%) ^a	
	24 h	48 h
Ru(tfac) ₃	3,36	46,71
Ru(acac) ₃	9,93	14,70
Cr(acac) ₃	8,88	4,75
Rh(acac) ₃	9,47	1,61
Kontrola	1,26	1,14

^a Procenat ćelija u apoptozi određen je nakon 24 sata odnosno 48 sati delovanja agensa, primenom protočne citometrije i izražen je kao procenat ćelija u sub-G1 fazi ciklusa.

4. 2. 2. REZULTATI ANALIZE APOPTOZE I ĆELIJSKOG CIKLUSA KOMPLEKSA PLATINE(II).

Delovanje kompleksa platine ispitivano je na HeLa ćelijama i poređeno sa delovanjem cisplatine. Analiza apoptoze (sub-G1 frakcije) ukazuje da *cis*-[Pt(Py)₂Cl₂] indukuje veći procenat apoptoze, 17,06% u poređenju sa *trans*-[Pt(Py)₂Cl₂], 5,98 %, tokom 24 sata dejstva u koncentraciji koja odgovara 1,5 x IC₅₀.

Cis-[Pt(Py)₂Cl₂] je indukovao značajan ali reverzibilan zastoj ćelijskog ciklusa u S fazi, odnosno zastoj se javlja pri manjoj koncentraciji (IC₅₀), a nestaje pri većoj koncentraciji 1,5 IC₅₀ (Sl. 4.2.2.). Proporcionalno smanjenju broja ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa, pri koncentraciji 1,5 IC₅₀, javlja se akumulacija ćelija u sub-G1 (apoptotskoj) frakciji.



Sl. 4.2.2. Uticaj kompleksa Pt(II) na progresiju ćelijskog ciklusa HeLa ćelija, primenjenog u koncentraciji koja odgovara IC₅₀ i 1,5 x IC₅₀, nakon 48 sati, odnosno 72 sata dejstva. Dijagrami prikazuju raspored ćelija po fazama ćelijskog ciklusa (sub-G1, G1, S, G2; sub-G1 apoptotska frakcija).

Trans-[Pt(Py)₂Cl₂] indukuje neznatan zastoj u S fazi ćelijskog ciklusa, kao i neznatno smanjenje broja ćelija u G1 fazi, pri IC₅₀. Te promene su takodje reverzibilne jer nestaju pri većoj koncentraciji (1.5 x IC₅₀) agensa (Sl. 4.2.2.).

Medju testiranim kompleksima platine(II), cisplatina je pokazala najjači koncentraciono zavisani uticaj na indukciju apoptoze; procenat ćelija u sub-G1 (apoptotskoj) frakciji bio je 12,49 % pri koncentraciji IC₅₀ i raste do 24,69 % pri koncentraciji 1,5 IC₅₀. Promene ćelijskog ciklusa karakterisane su reverzibilnim zastojem u S fazi ćelijskog ciklusa i značajnim opadanjem broja ćelija u G1 i G2 fazama (Sl. 4.2.2.).

4. 3. INTERAKCIJA KOMPLEKSA Ru(III), Cr(III) i Rh(III) SA DNA

Afinitet interakcije testiranih kompleksa metala sa nukleinskim kiselinama, pre svega molekulom DNK, ispitivan je primenom različitih metoda: analizom direktnog vezivanja metala za DNK primenom masene spektrometrije ICP-MS (eng.: *inductively coupled mass spectrometry*) ispitivanjem inhibitornog dejstva kompleksa na sintezu unutarćelijske DNK ili RNK.

4. 3. 1. DIREKTNO VEZIVANJE KOMPLEKSA METALA ZA DNK

Afinitet β-diketonato kompleksa Ru(III), Cr(III) i Rh(III) da interaguju sa DNK ispitivan je: a) analizom direktnog vezivanja kompleksa (odnosno metala) za ćelijsku DNK na A2780 ćelijama; b) analizom *in vitro* interakcije kompleksa metala sa fragmentom DNK (eng.: *DNA-ladder*) dužine 123 bazna para (bp). U oba slučaja kvantitativna analiza izvršena je korišćenjem ICP-masene spektrometrije (ICP-MS).

U našim eksperimentalnim uslovima medju svim testiranim kompleksima jedino Cr(acac)₃, pokazuje afinitet za interakciju sa DNK molekulom. Koncentracija Cr(III) vezana za DNK fragment (0,3 μg), iznosi 26,7 (pg/ μg DNK) (Tab. 4.7,) i veća je pri višoj koncentraciji DNK (3 μg), kada iznosi 57,9 (pg/ μg DNK). Takođe je detektovana značajna koncentracija Cr(III) jona vezana za ćelijsku DNK, 45,13 (pg/DNK μg), nakon samo 1. sata inkubacije.

Tabela 4. 3. 1. Rezultati analize vezivanja metala Ru(III), Cr(III) i Rh(III) za DNK, ispitivanjem na ćelijskoj DNK (A2780) i in vitro analiza vezivanja metala za DNK-fragment dužine 123 bp, primenom ICP-masene spektrometrije (ICP-MS).

	Vezivanje za fragment DNK -123bp		Vezivanje za ćelijsku DNK	
	(pg/ µg DNK) ^a		(pg/ µg DNK) ^a	
	0,3 µM	3 µM	1 h	24 h
Ru(tfac) ₃	0	0	0	0
Ru(acac) ₃	0	0	0	0
Cr(acac) ₃	26,7	57,9	45,13	N.D. ^b
Rh(acac) ₃	0	0	0	0
Cisplatin	6613	N.D.	N.D. ^b	N.D. ^b

^a Rezultati su prikazani u vidu pg metala/µg DNK.

^b N.D. = nije određeno.

4. 3. 2. UTICAJ KOMPLEKSA RUTENIJUMA(III), HROMA (III) I RODIJUMA(III) NA INHIBICIJU SINTEZE DNK I RNK.

Sposobnost β-diketonato kompleksa na bazi Ru(III), Cr(III) i Rh(III) da interferiraju sa procesima sinteze nukleinskih kiselina u ćeliji, analizirana je merenjem inkorporacije radioaktivno obeleženih nukleotida, ¹³C-timidina i ³H-uridina, u makromolekule (DNK i RNK), na A2780 ćelijama.

4. 3. 2. 1. Inhibicija sinteze DNK

Uticaj Ru(tfac)₃ na inhibiciju sinteze DNK molekula, pokazuje koncentracionu i vremensku zavisnost. Najveće inhibitorno dejstvo (prikazano kao procenat inkorporacije radioaktivno obeleženog nukleotida (¹³C-timidina) iznosi 17,5 % pri najvećoj koncentraciji agensa (100 µM) i dužem vremenu dejstva (24 sata) (Sl.4.3.2.1.). Kompleks Ru(acac)₃, ima slabiji uticaj na inhibiciju DNK sinteze, koji je koncentraciono zavistan i približan za oba vremena dejstva; pri 100 µM iznosi oko 65 %. Uticaj Cr(acac)₃ na inhibiciju sinteze DNK je slabo izražen.

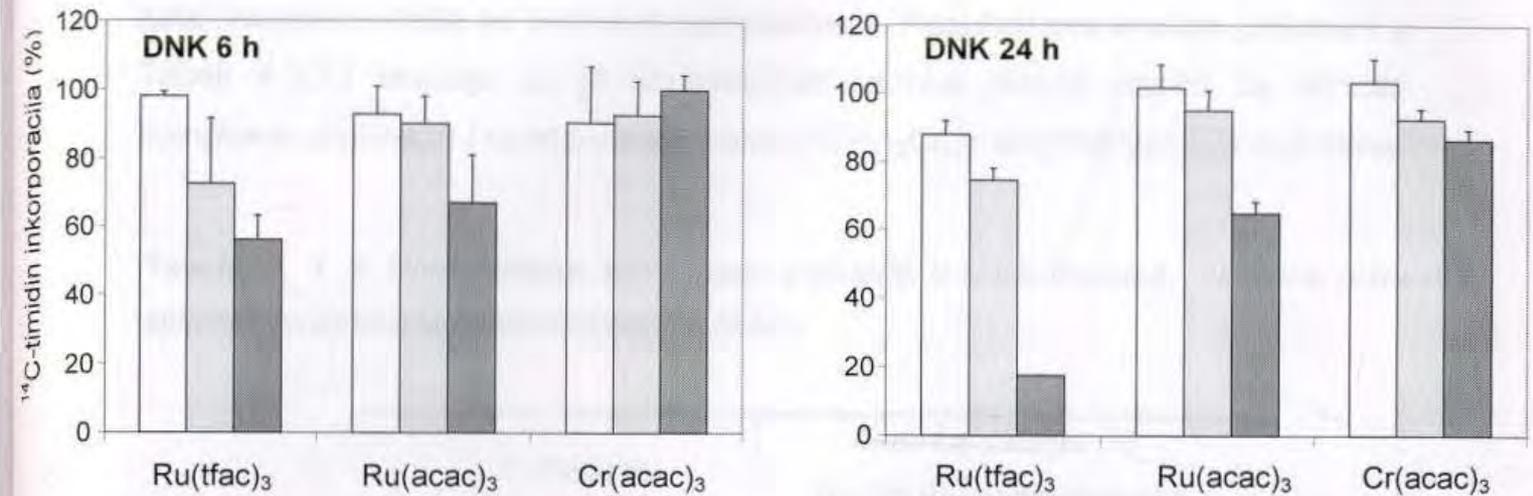
4. 3. 2. 2. Inhibicija sinteze RNK

Dobijeni podaci ukazuju da $\text{Ru}(\text{tfac})_3$, ima najveći potencijal inhibicije RNK sinteze, koji je izraženiji pri većoj koncentraciji ($100 \mu\text{M}$) tako da sinteza RNK (izražena kao procenat inkorporacije radioaktivno obeleženih nukleotida ^3H -uridina) iznosi 21,17 % (od mogućih 100%) nakon 6 sati dejstva, odnosno 5 % nakon 24 sati dejstva kompleksa (SI.4.3.2.2.). Efekat $\text{Ru}(\text{tfac})_3$ pri nižim koncentracijama ($10 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$) jeste reverzibilan, jer se uočava nakon 6 sati dejstva, i nestaje nakon 24 sata.

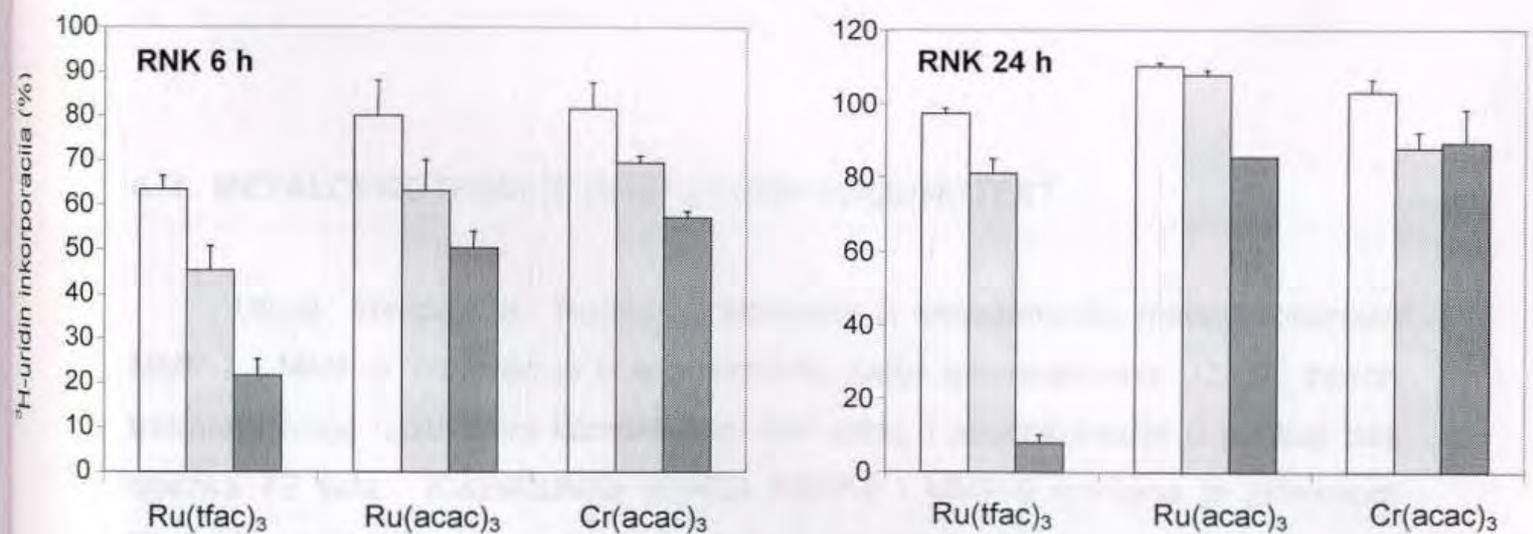
$\text{Ru}(\text{acac})_3$ i $\text{Cr}(\text{acac})_3$ takodje pokazuju inhibitorno dejstvo na proces sinteze RNK (inkorporacije ^3H -uridina), mada u manjem stepenu i iznosi 50,2 % za $\text{Ru}(\text{acac})_3$ i 57,1 % za $\text{Cr}(\text{acac})_3$, pri koncentraciji $100 \mu\text{M}$ (6 h). Efekat ova dva kompleksa uočen nakon 6 sati dejstva je skoro potpuno reverzibilan i u slučaju svih primenjenih koncentracija agensa nestaje nakon 24 sata.

LEGENDA:

□ 10 μM
 ◻ 30 μM
 ◼ 100 μM



Sl. 4.3.2.1. Inhibitorno dejstvo kompleksa Ru(acac)₃, Cr(acac)₃ i Ru(tfac)₃ na proces sinteze DNK (inkorporacije ¹⁴C-timidina) nakon 6 sati, odnosno 24 sata dejstva u koncentraciji 10, 30, 100 (μM).



Sl. 4.3.2.2. Inhibitorno dejstvo kompleksa Ru(acac)₃, Cr(acac)₃ i Ru(tfac)₃ na proces sinteze RNK (inkorporacije ³H-uridina) nakon 6 sati, odnosno 24 sata dejstva u koncentraciji 10, 30, 100 (μM).

4. 3. 3. UNUTARĆELIJSKA AKUMULACIJA KOMPLEKSA PLATINE(II)

Unutarćelijska akumulacija platine ispitivana je na HeLa ćelijama, nakon 2 sata inkubacije ćelija sa platina(II) kompleksima. Rezultati ove analize (prikazani u Tabeli 4.3.3.) ukazuju da je unutarćelijski sadržaj platine različit za različite komplekse platine(II) i opada u nizu: *trans*-[Pt(Py)₂Cl₂] > *cis*-[Pt(Py)₂Cl₂] > cisplatina.

Tabela. 4. 3. 3. Unutarćelijska akumulacija platine(II) u HeLa ćelijama, određena primenom atomske apsorbcione spektrofotometrije (AAS).

Kompleks	Sadržaj platine (II) ($\mu\text{g Pt(II)} / \text{mg proteina}$) ^a
CDDP	0,760
<i>cis</i>-[Pt(Py)₂Cl₂]	1,076
<i>trans</i>-[Pt(Py)₂Cl₂]	1,533

^a Rezultati su prikazani u vidu μg metala/ mg proteina.

4. 4. METALOPROTEINAZE (MMP-2 I MMP-9) IMUNOTEST

Uticaj kompleksa Ru(III) na aktivnost ili koncentraciju metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9, ispitivan je u supernatantu ćelija osteosarkoma U2-OS, nakon tretmana ćelija ispitivanim kompleksom (24 sata), i postinkubacije u podlozi bez agensa 72 sata. Kvantitativna analiza MMP-2 i MMP-9 izvršena je primenom ELISA-imunotest kita (*Quantikine System, R&D, SAD*). Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 4. 4. Za ova ispitivanja odabrane su U2-OS ćelije, jer se one odlikuju visokim sadržajem enzima MMP-2 i MMP-9 u ćelijskom supernatantu. Na osnovu preliminarnih analiza Ru(acac)₃, pri koncentraciji 30 μM , ispoljava očigledan inhibički uticaj na MMP-2 i MMP-9.

Tabela 4. 4. Sadržaj enzima MMP-2 i MMP-9 (ng/ml), određen u supernatantu U2-OS^a ćelija, nakon izlaganja (24 sata) testiranom kompleksu Ru(III) u koncentraciji od 10 μ M i 30 μ M.

Kompleksi	MMP koncentracija (ng/ml), 24 sata dejstva	
	10 μ M	30 μ M
Ru(acac) ₃	4,88	3,82
Ru(tfac) ₃	5,74	5,2
Kontrola	4,18	

^a Ćelije osteosarkoma U2-OS se odlikuju visokom produkcijom enzima MMP-2 and MMP-9, čiji je sadržaj u supernatantu ćelija iznad granice detekcije (0,156 ng/ml) za Quantikine System-ELISA test.

4. 5. ISPITIVANJE APOTOZE PRIMENOM ANEKSIN V-FITC/PI KONJUGOVANOG ANTITELA

Potencijal kompleksa platine(II) da indukuju apoptozu na HeLa ćelijama ispitivan je dodatno u poređenju sa kompleksom Ru(acac)₃, korišćenjem protočnog citometra, nakon obeležavanja ćelija fluorescentno konjugovanim proteinom aneksinV-FITC (FITC-*fluorescein isothiocyanate*; fluoresceinizotiocijanat) i Propidijum-jodidom (PI).

Kompleks Ru(acac)₃ je podvrgnut ovoj analizi s obzirom na to da je u prethodnim testovima pokazao potencijal za indukciju apoptoze (videti poglavlje 4.2.1.), iako poseduje slab citotoksični efekat. Dobijeni rezultati prikazani su u vidu dot-plot grafikona i histograma, na Slici 4.5. Na "dot-plot" grafikonima (Sl. 4.5.b.) u populaciji ćelija obojenih kombinacijom boja aneksin-V-FITC/PI mogu se naći tri grupe ćelija, Tabela 4.5.

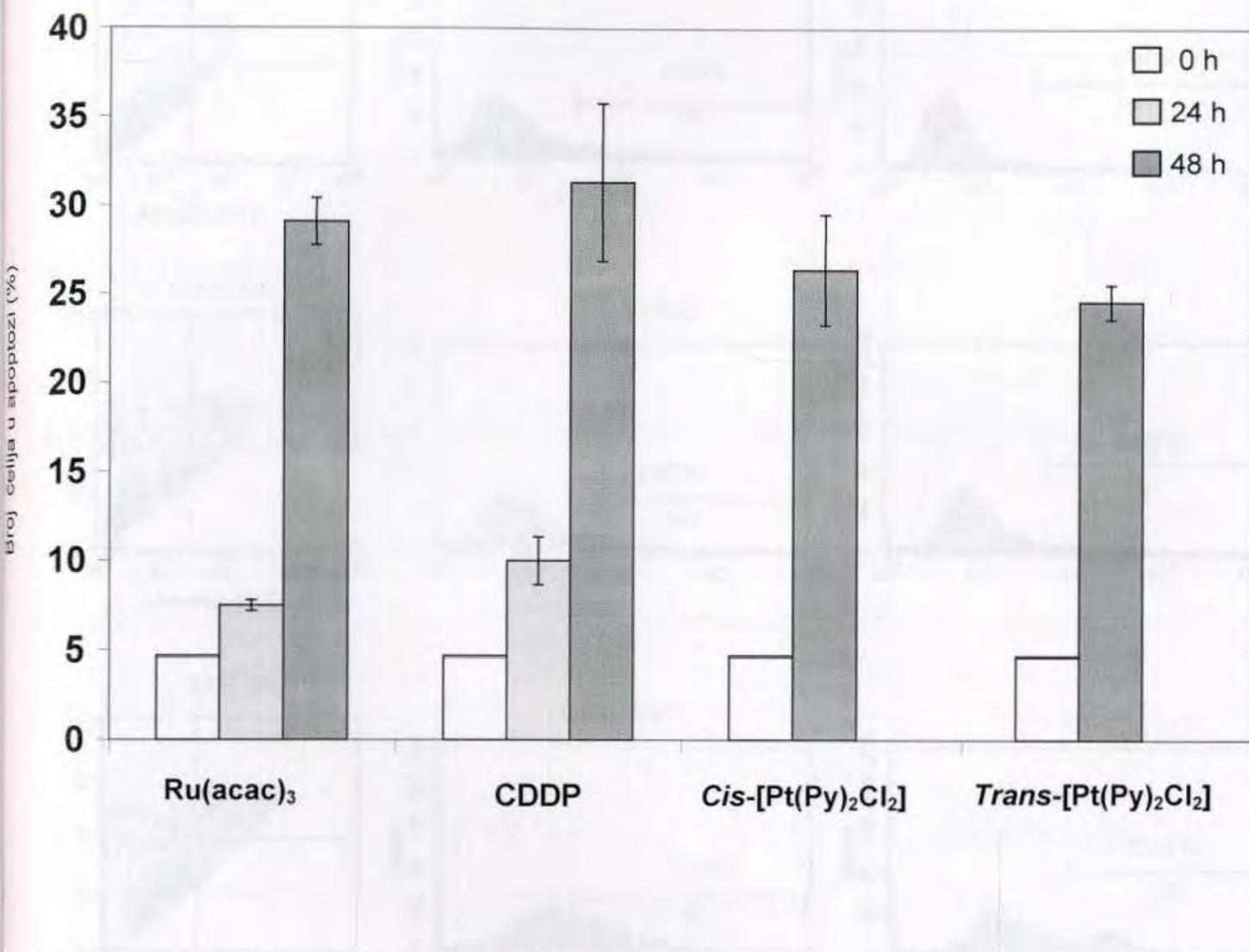
Tabela 4. 5. Šematski prikaz mogućeg bojenja ćelija kombinacijom boja aneksin-V-FITC/PI

Bojenje ćelija		
Aneksin V-FITC	PI	Faza ćelijske smrti
—	—	Zdrave ćelije
+	—	Početna faza apoptoze
+	+	Završna faza apoptoze; sekundarna nekroza; prava nekroza.

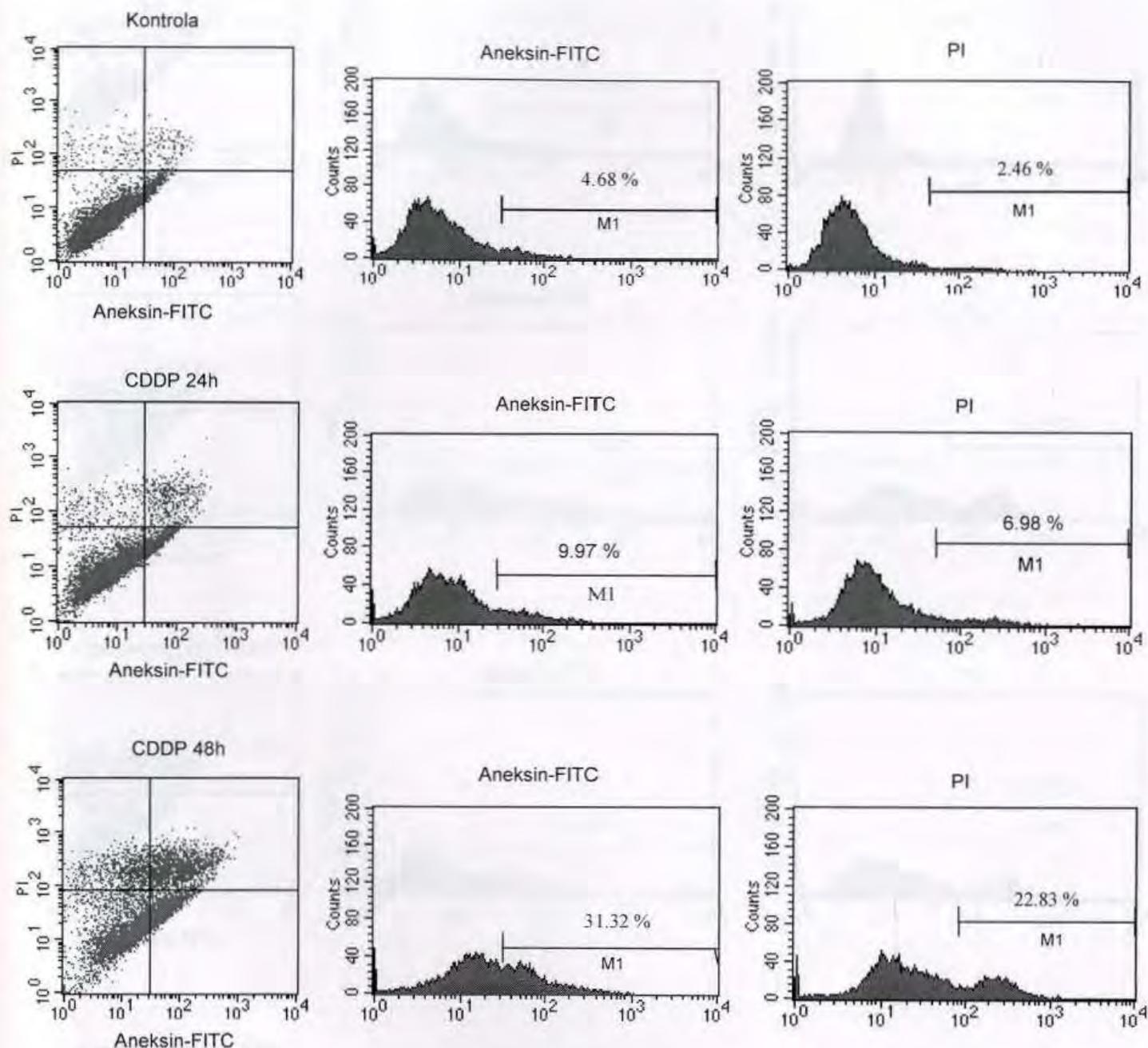
+ Intraćelijska inkorporacija, tj. vezivanje boje.

– Odsustvo intraćelijske inkorporacije, tj. vezivanja boje.

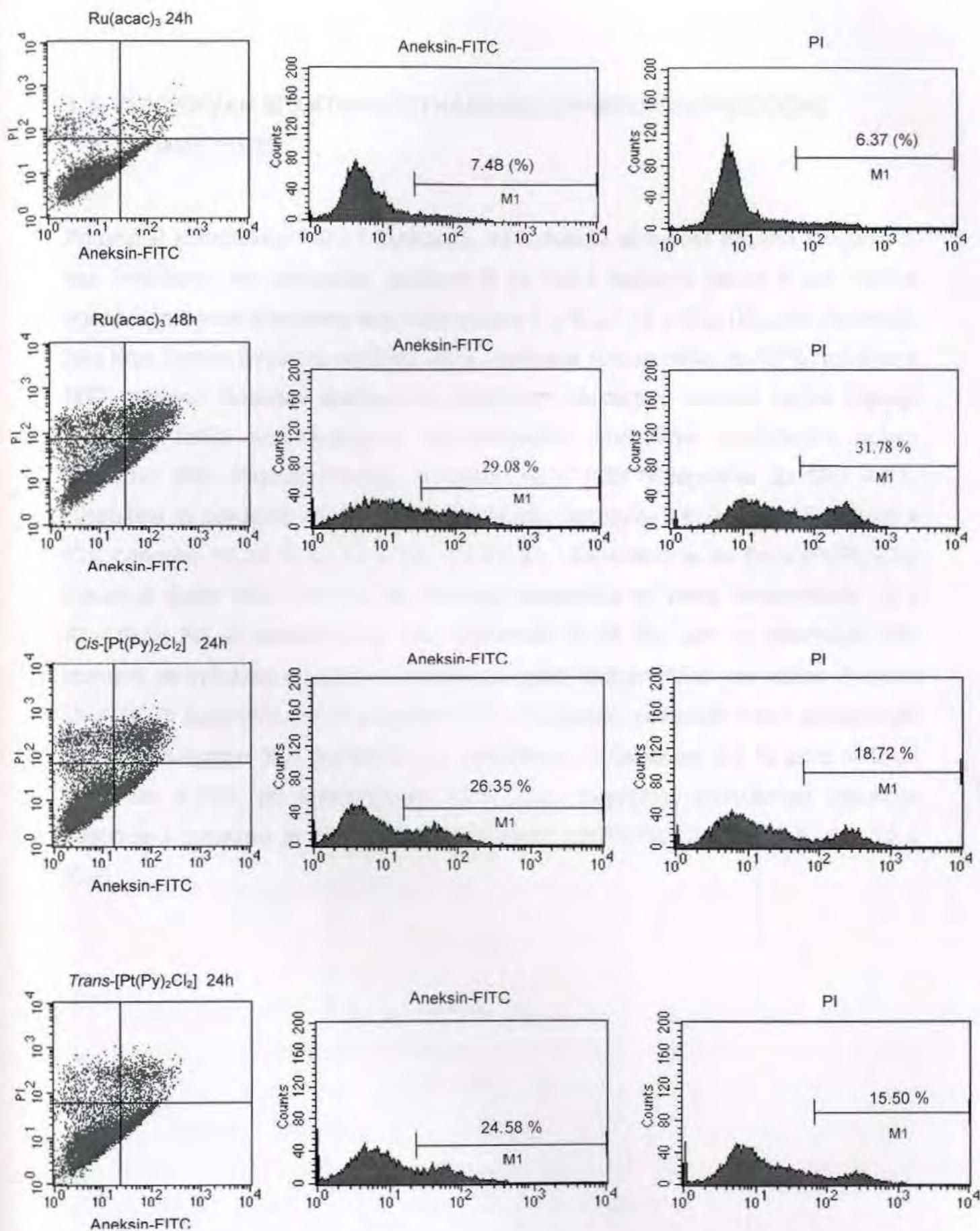
Poređenje potencijala za indukciju apoptoze kompleksa Pt(II) međusobno, ukazuje da *cis-/trans-* [Pt(Py)₂Cl₂] imaju sličan efekat indukcije apoptoze, tokom 24 sata dejstva agensa i iznose za *cis-* izomer: 26,35 ± 3,12 %; za *trans-* izomer: 24,58 ± 0,98 % (Sl. 4.5.a; 4.5.b.). Kompleks Ru(acac)₃, indukovao je značajan procenat apoptoze 29,09 ± 1,32 % (Sl. 4.5.a. i 4.5.b.) (**A+PI-** populacija ćelija), tek nakon 48 sati kontinualnog dejstva. Mada procenat ćelija obojenih propidijum-jodidom (**A-PI+**), koji iznosi 31,78 % (Sl. 4. 5b.) ukazuje na pojavu sekundarnih nekrotičnih promena tokom ćelijske smrti.



Sl. 4.5.a. Dijagram prikazuje uporedni potencijal ispitivanih kompleksa Pt(II) i Ru(acac)₃ za indukciju apoptoze HeLa ćelija, nakon dejstva u koncentraciji $1.5 \times IC_{50}$, tokom 0, 24 i 48 sati. Procenat ćelija u apoptozi određen je primenom protočne citometrije, nakon bojenja tretiranih ćelija kombinacijom boja aneksin-V-FITC/PI.

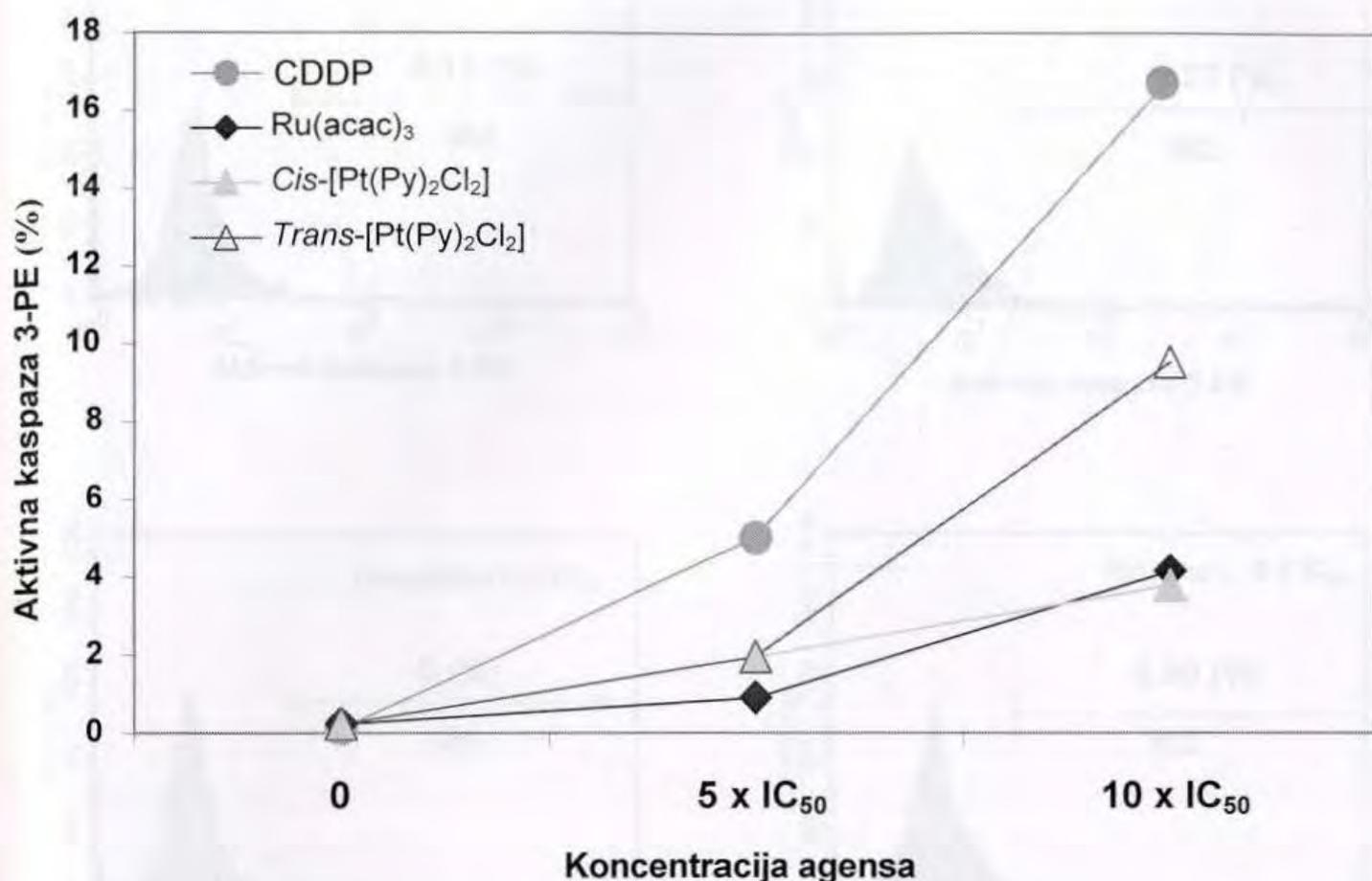
'Dot-plot'
dijagramiAneksin-FITC
histogramDNK-PI
histogram

Sl. 4.5.b. Dijagrami prikazuju procenat apoptoze indukovane dejstvom cisplatine, cis-/trans-izomerima platine(II) i $Ru(acac)_3$ na HeLa ćelijama, nakon 24 i 48 sati dejstva u koncentraciji $1,5 IC_{50}$; analizirano primenom protočne citometrije. 'Dot-plot' dijagram, prikazuje zastupljenost ćelija u zavisnosti od obojenja sa aneksin-V-FITC (A) i PI i razlikujemo tri grupe ćelija: levi gornji kvadrant (A-PI+), nekrotične ćelije; desni donji kvadrant (A+PI-), ćelije u ranoj apoptozi; desni gornji kvadrant (A+PI+), ćelije koje ulaze u nekrozu (sekundarna nekroza). Aneksin-FITC histogram prikazuje procentualnu zastupljenost ćelija obojenih pozitivno samo na Aneksin-V-FITC (rana apoptoza). DNK-PI histogrami, prikazuju zastupljenost ćelija obojenih pozitivno samo na PI (nekroza).



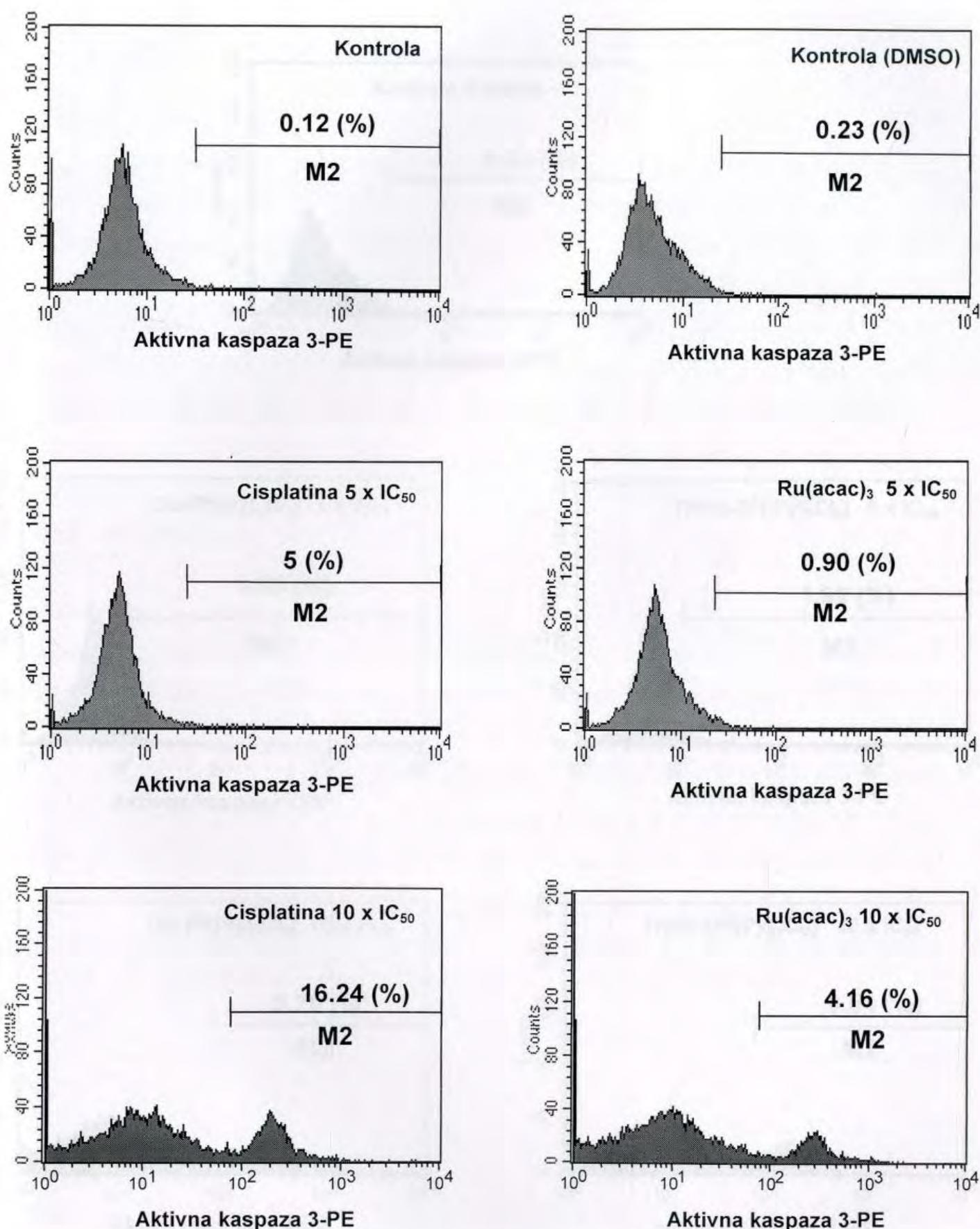
4. 6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3 PRIMENOM PROTOČNE CITOMETRIJE

Potencijal kompleksa Pt(II) i Ru(acac)₃ da indukuju aktivnost enzima kaspaze-3, kao markera rane apoptoze, ispitan je na HeLa ćelijama nakon 5 sati dejstva agensa pri koncentracijama koje odgovaraju 5 x IC₅₀ i 10 x IC₅₀ (IC₅₀ koncentracija leka koja izaziva inhibiciju preživljavanja ispitivane kulture ćelija za 50 %, određena MTT testom). Rezultati analiza na protočnom citometru, dobijeni nakon bojenja tretiranih ćelija anti-kaspaza-3 monoklonskim antitelima obeleženim bojom fikoeritrin (PE- PhycoErythrine), prikazani su u vidu histograma na Slici 4.6.b. Cisplatina je pokazala dozno zavisnu indukciju kaspaze-3 koja iznosi 5 % pri 5 x IC₅₀ odnosno 16,24 % pri 10 x IC₅₀ (Sl.4.6.a.). Zanimljivo je da *trans*-[Pt(Py)₂Cl₂] pokazuje duplo veći kapacitet za indukciju kaspaze-3 pri većoj koncentraciji 10 x IC₅₀ (9,54 %) u poređenju sa *cis*- izomerom (3,79 %), iako je potencijal ovih izomera za indukciju apoptoze na HeLa ćelijskoj liniji približan (određeno Aneksin V- FITC/PI bojenjem, videti poglavlje 4.5.). Ru(acac)₃ pokazuje slabu sposobnost indukcije kaspaze-3, u poređenju sa cisplatinom, koja iznosi 0,9 % pri 5 x IC₅₀ i raste do 4,16% pri koncentraciji 10 x IC₅₀. Najmanju sposobnost indukcije kaspaze-3 pokazao je *cis*- platinski kompleks *cis*-[Pt(Py)₂Cl₂] (3,79 % pri 10 x IC₅₀).

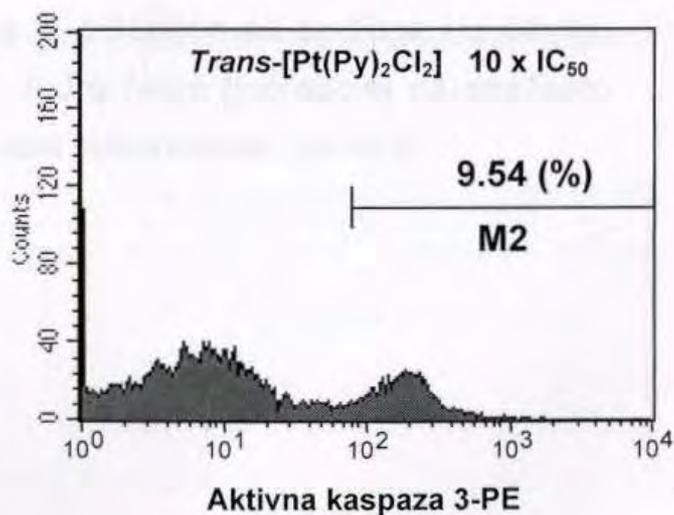
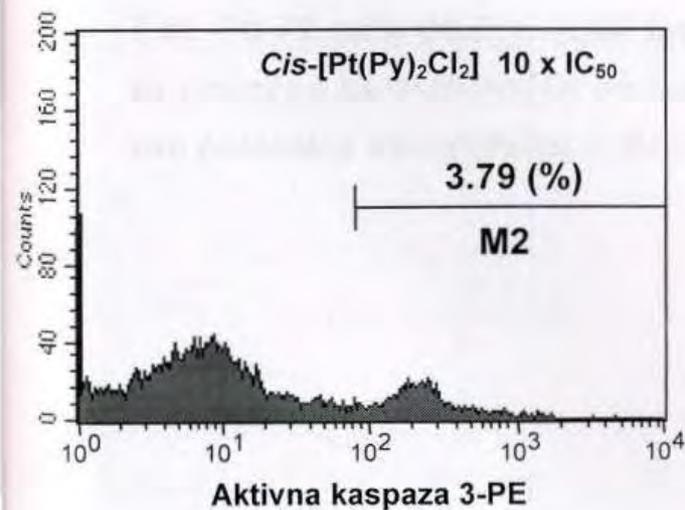
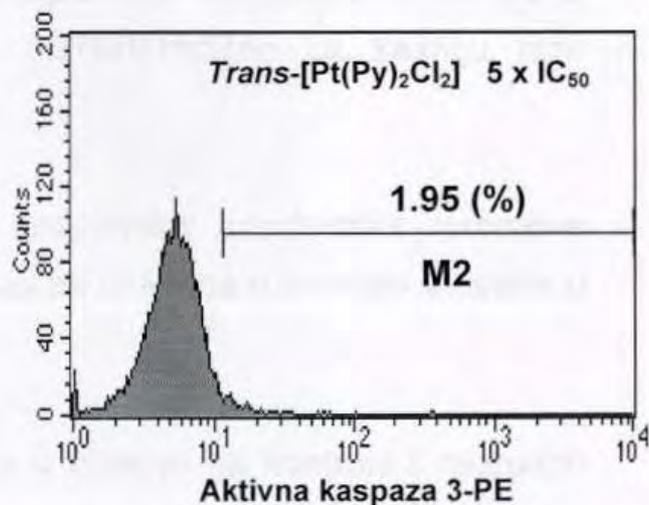
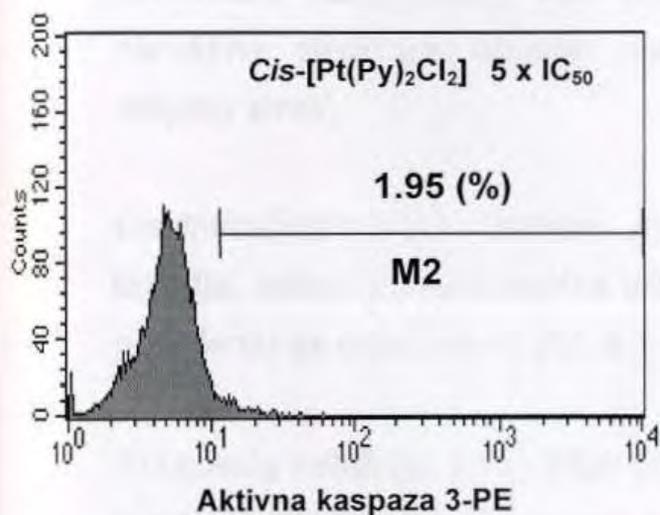
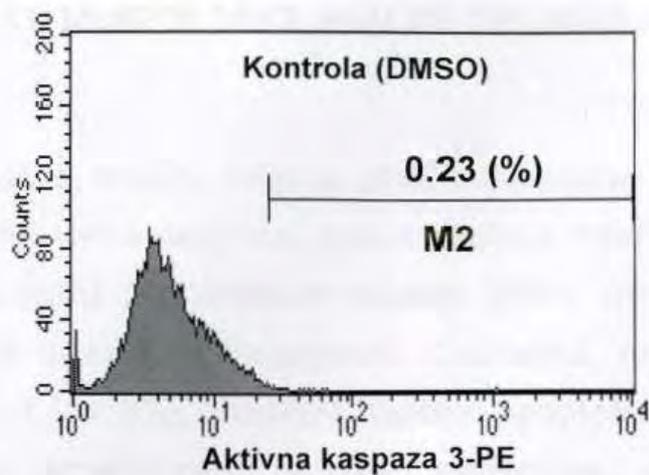


Sl. 4.6.a. Dijagram prikazuje uporedni kapacitet kompleksa $Ru(acac)_3$, CDDP i cis-/trans- $[Pt(Py)_2Cl_2]$, da indukuju aktivnost enzima kaspaza-3, na HeLa ćelijama nakon dejstva u koncentraciji od $5 \times IC_{50}$ ili $10 \times IC_{50}$, tokom 5 sati.

Sl. 4.6.b. Rezultati analize aktivnog enzima kaspaza-3, na HeLa ćelijama, prikazani u vidu histograma. Histogrami prikazuju procentualno nalaženje aktivne kaspaze-3 u populaciji analiziranih ćelija, nakon dejstva $Ru(acac)_3$ ili CDDP ili cis-/trans- $[Pt(Py)_2Cl_2]$, u koncentraciji od $5 \times IC_{50}$ ili $10 \times IC_{50}$, tokom 5 sati. Analiza je izvršena primenom protočne citometrije, nakon bojenja ćelija fikoeritrin (PE-PhycoEritrine) obeleženim antitelima specifičnim za aktivnu kaspazu-3.



Slika 4.6.b.



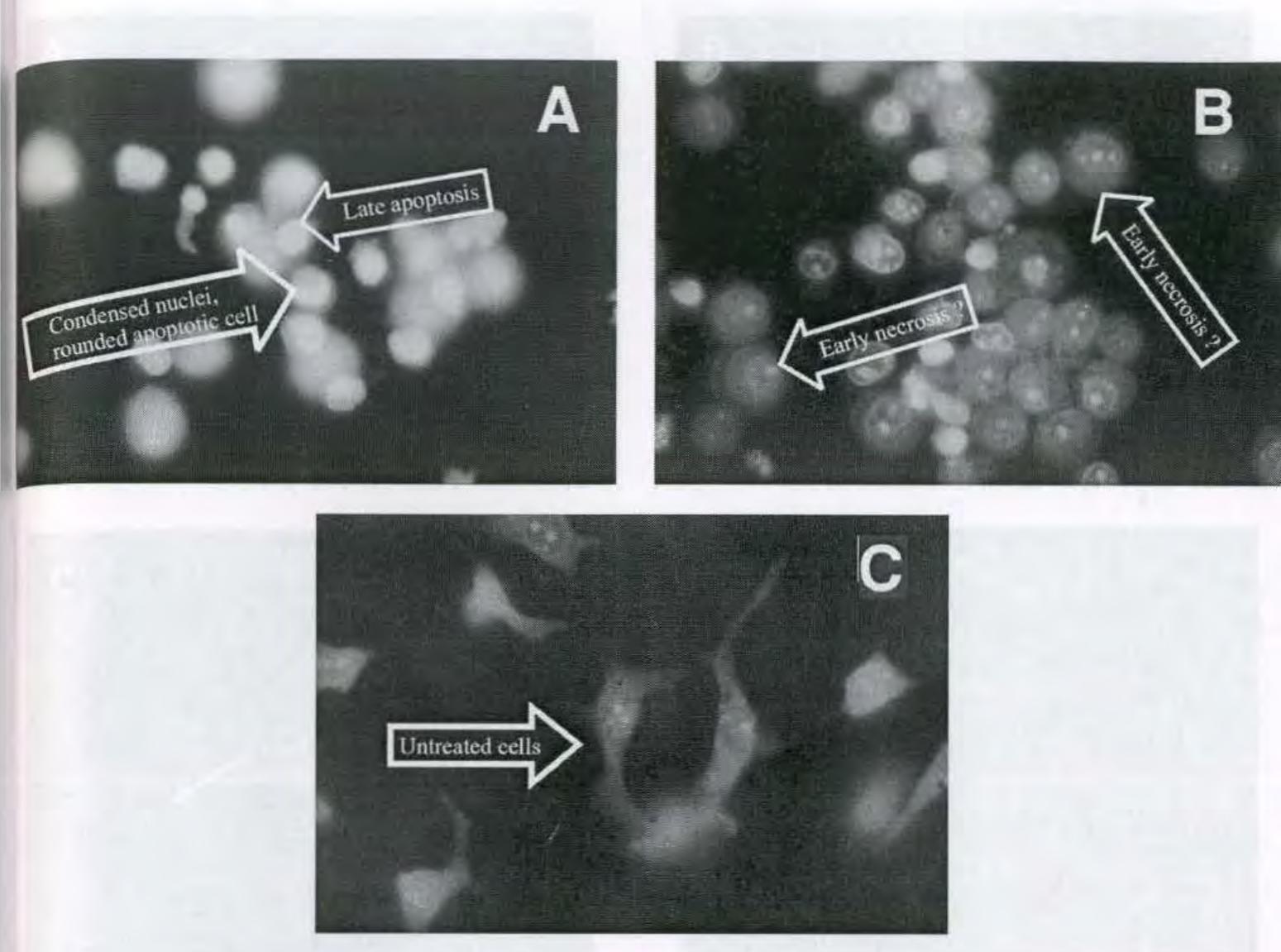
Slika 4.6.b.

4. 7. REZULTATI MORFOLOŠKE ANALIZE ĆELIJSKE SMRTI

Morfološka analiza ćelijske smrti indukovane kompleksima platine kao i $\text{Ru}(\text{acac})_3$ na HeLa ćelijama, nakon bojenja tretiranih ćelija kombinacijom boja akridin-oranž (AO)/etidijum-bromid (EtBr), otkrila je brojne morfološke promene koje ukazuju na apoptozu. Cisplatina, nakon 24 sata dejstva pri koncentraciji $1,5 \times \text{IC}_{50}$, indukuje tipične apoptotske morfološke promene karakterisane smanjenjem ćelijske zapremine, srpastim i ekscentrično postavljenim jedrom, kao i pupljenjem ćelijske membrane. Veliki broj ćelija fluorescira narandžasto kao rezultat inkorporacije etidijum-bromida usled narušene strukture ćelijske membrane (karakteristično za kasniju fazu ćelijske smrti).

Cis-trans- $[\text{Pt}(\text{Py})_2\text{Cl}_2]$ izomeri indukuju apoptotske morfološke promene takodje, nakon 24 sati dejstva pri $1,5 \times \text{IC}_{50}$, ali izražene u manjem stepenu u poređenju sa cisplatinom (Sl. 4.7.a.).

$\text{Ru}(\text{acac})_3$ indukuje smanjenje broja ćelija u odnosu na kontrolu i neznatnu promenu morfologije ćelija već pri 24 sata dejstva u koncentraciji $1,5 \times \text{IC}_{50}$. Pri dužem vremenu dejstva (48 sati), uočava se pojava srpastog jedra (Sl. 4.7.b). Pri 72 sata dejstva veliki broj ćelija je odlepljen od podloge i uočavaju se promene karakteristične za nekrozu. Jedro ćelija fluorescira narandžasto kao posledica inkorporacije EtBr (takozvana sekundarna nekroza).

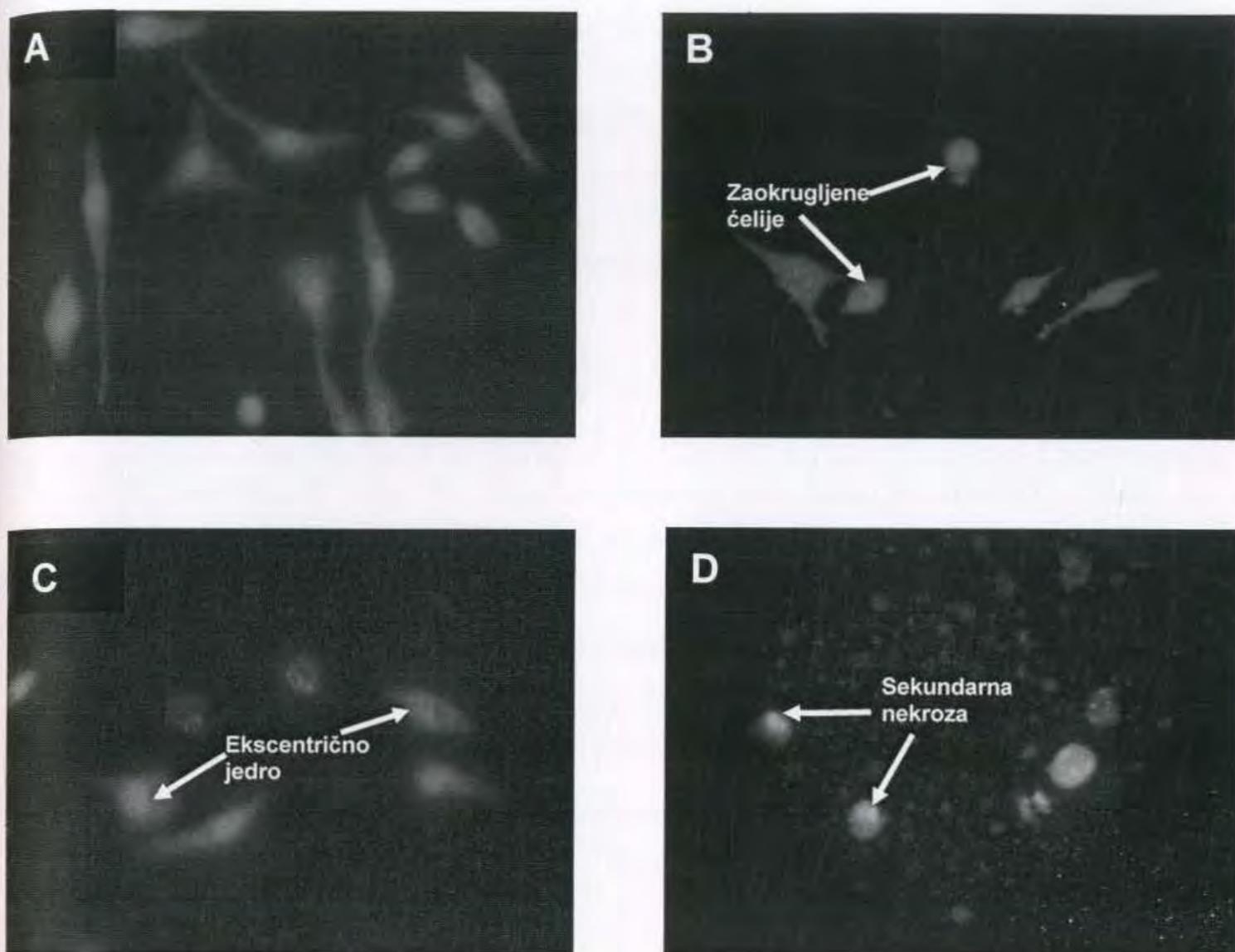


Sl. 4.7.a. Fluorescentne fotomikrografije HeLa ćelije nakon tretmana ispitivanim agensima platine(II):

A) *cis*-[Pt(Py)₂Cl₂] indukuje apoptotske promene u vidu smanjenja ćelijske zapremine, pojave kondenzovanog jedra. Ćelije su u fazi kasne apoptoze kada je integritet ćelijske membrane narušen i ćelije inkorporiraju EtBr, usled čega jedro fluorescira narand`asto.

B) *trans*-[Pt(Py)₂Cl₂] indukuje promene nalik apoptozi, u vidu ekscentrično postavljenog jedra. Međutim uočljive su i nekrotične promene tipa uvećanja jedra i ćelijske zapremine, kao i obojenja jedra sa EtBr.

C) Kontrola, netretirane HeLa ćelije.



Sl. 4.7.b. Fluorescentne fotomikrografije HeLa ćelija nakon tretmana sa $Ru(acac)_3$ pri koncentracijama koje odgovaraju $1,5 \times IC_{50}$ u trajanju od 24 h, 48 h ili 72 h.

A) Kontrola, netretirane ćelije;

B) Morfološke promene nakon 24 h delovanja $Ru(acac)_3$: uočava se smanjenje zapremine ćelija, kao i smanjenje ukupnog broja ćelija u odnosu na kontrolu.;

C) Nakon 48 h delovanja $Ru(acac)_3$, javljaju se jasne apoptotske promene u vidu smanjenja zapremine ćelija, zaokrugljenja ćelija i ekscentrično postavljenog jedra. Ćelije fluoresciraju zeleno jer usvajaju samo AO.

D) Nakon 72 h delovanja $Ru(acac)_3$, jedro inkorporira EtBr, (usled čega fluorescira narandžasto), kao posledica narušavanja strukture ćelijske membrane u kasnoj fazi apoptoze ili takozvanoj sekundarnoj nekrozi.

Cilj ovog rada bio je ispitivanje antiproliferativne aktivnosti kompleksa sintetisanih na bazi rutenijuma(III), hroma(III) i rodijuma(III), sa bidentatnim β -diketonato ligandima: trifluoroacetilacetat (tfac) i acetilacetat (acac). Takodje je poredjena aktivnost ovih nekonvencionanih kompleksa metala sa antitumorskom aktivnošću kompleksa na bazi platine, pre svega cisplatine, koja nalazi veliku primenu u kliničkoj praksi (2), i aktivnošću *cis/trans* geometrijskih izomera dipiridindihloroplatine(II) [Pt(Py)₂Cl₂].

Sinteza i hemijska struktura β -diketonato kompleksa ispitivanih u ovom radu, već su opisani u literaturi (8, 9, 153). Na osnovu postojećih literaturnih podataka koji ukazuju da neki bidentatni β -diketonato kompleksi Ru(II)/Ru(III) mogu posedovati veću antiproliferativnu aktivnost od monohelata (9), preduzeli smo uporednu analizu bidentatnih β -diketonato kompleksa metala, tako da se izmenom strukture liganda: (tfac), (acac); ili centralnog metalnog jona: Ru(III), Cr(III), Rh(III), i uporednom analizom antitumorske aktivnosti kompleksa, može steći bolji uvid u mehanizam njihovog citotoksičnog dejstva.

Na osnovu studije citotoksičnosti β -diketonato kompleksa metala na panelu tri ćelijske linije: ćelijama karcinoma humanog ovarijuma (A2780) i ćelijama osteosarkoma cisplatina-senzitivnom (U2-OS) i cisplatina-rezistentnom soju (U2-OS/Pt), jedino kompleks Ru(tfac)₃ poseduje citotoksičnost u opsegu koncentracija do 100 μ M (Tabela 4.1.1.). Aktivnost Ru(tfac)₃ na cisplatina-senzitivnim ćelijama osteosarkoma (U2-OS) $IC_{50} = 39 \pm 10 \mu$ M je približna aktivnosti na cisplatina-rezistentnim ćelijama (U2-OS/Pt) $IC_{50} = 37 \pm 19 \mu$ M i takodje, uporediva sa aktivnošću na A2780 ćelijama (IC_{50} vrednost je koncentracija leka koja izaziva inhibiciju preživljavanja ćelija za 50 %).

Antiproliferativna aktivnost Ru(acac)₃ analizirana je na sedam ćelijskih linija (A2780, HeLa, B16, U2-OS, U2-OS/Pt, Jurkat, K562) i sve dobijene IC_{50} vrednosti kreću se u opsegu iznad 100 μ M (HeLa $IC_{50} = 114 \pm 1 \mu$ M), (B16 $IC_{50} = 148 \pm 1 \mu$ M).

Kompleksi Cr(III) i Rh(III) nisu pokazali citotoksičnu aktivnost u *in vitro* uslovima. Odsustvo značajne citotoksične aktivnosti kompleksa rutenijuma u ovom slučaju Ru(acac)₃ bilo je očekivano, s obzirom na postojeće literaturne podatke (103, 191).

Struktura liganda –tfac-, doprinosi većoj citotoksičnoj aktivnosti kompleksa $\text{Ru}(\text{tfac})_3$. Citotoksičnost $\text{Ru}(\text{tfac})_3$ može se objasniti mogućom unutarćelijskom redukcijom $\text{Ru}(\text{III})$ do $\text{Ru}(\text{II})$ koji poseduje veći afinitet za interakciju sa nukleofilima u ćeliji (192). Kompleksi $\text{Ru}(\text{II})$ obično poseduju citotoksičnu aktivnost (102, 193).

Ispitivanje uticaja smanjenja koncentracije unutarćelijskog glutationa (GSH), na aktivnost kompleksa metala na ćelijama A2780, B16, K562, primenom butionin sulfoksimin (BSO) kao inhibitora sinteze glutationa, ukazala je da $\text{Ru}(\text{tfac})_3$ ima nešto veću citotoksičnost na A2780 u koinkubaciji sa BSO ($\text{IC}_{50} = 38,73 \pm 0,42 \mu\text{M}$) u poređenju sa aktivnošću bez BSO ($\text{IC}_{50} = 40 \pm 15 \mu\text{M}$) (Tabela 4.1.4.a) Ispitivanja na B16 i K562 ćelijama ukazala su da smanjenje unutarćelijske koncentracije GSH indukuje povećanje aktivnosti kompleksa $\text{Ru}(\text{acac})_3$ i NAMI-A (IC_{50} vrednost $\text{Ru}(\text{III})$ kompleksa opada). Kako je status unutarćelijskog glutationa različit u različitim ćelijskim linijama (92), efekat dejstva BSO na aktivnost $\text{Ru}(\text{III})$ kompleksa različit je na K562 i B16 ćelijama (Sl. 4.1.4.) Tako na K562 ćelijama, BSO ima veći uticaj na aktivnost $\text{Ru}(\text{acac})_3$, ($\text{IC}_{50(\text{BSO})} = 89 \pm 9 \mu\text{M}$), iako je senzitivnost dveju ćelijskih linija na $\text{Ru}(\text{acac})_3$ približna (B16 $\text{IC}_{50} = 148 \pm 1 \mu\text{M}$; K562 $\text{IC}_{50} = 143 \pm 32 \mu\text{M}$). Inhibicija sinteze unutarćelijskog GSH nije imala uticaja na aktivnost kompleksa $\text{Cr}(\text{III})$ i $\text{Rh}(\text{III})$.

Ovakav rezultat ukazuje da $\text{Ru}(\text{III})$ kompleksi pokazuju afinitet za interakciju sa unutarćelijskim GSH, odnosno GSH ima učešća u mehanizmu ćelijske odbrane od antiproliferativnog dejstva ispitivanih β -diketonato kompleksa $\text{Ru}(\text{III})$.

Rezultati studija citotoksičnosti $\text{Ru}(\text{acac})_3$ u kombinaciji (koinkubaciji) sa pojedinačnim kompleksima platine(II), cisplatinom i oksaliplatinom, na HeLa ćelijama, odnosno rezultujuće vrednosti kombinacionih indeksa (CI) (Tabela 4.1.5.) razlikuju se u slučaju cisplatine i oksaliplatine. Takođe CI varira u zavisnosti od primenjenih koncentracija (odnosno kombinacije koncentracija) kompleksa. Pri kombinovanom dejstvu sa nižim koncentracijama cisplatine ($\text{IC}_{50}; 0,5 \times \text{IC}_{50}$) javlja se sinergizam ($\text{CI} < 1$), dok pri višim koncentracijama cisplatine, efekat teži aditivnom ($\text{CI} \cong 1$) (Sl. 4.1.5.b.).

Oksaliplatina, pri svim primenjenim koncentracijama daje antagonističan efekat ($CI > 1$); (Sl. 4.1.5.b.). Kako CDDP i oksaliplatina formiraju različite lezije na DNK (194), i kako su i ćelijski reparacioni mehanizmi uključeni u popravku tih lezija razlikuju (195), moguće je objasniti zašto je efekat koinkubacije ovi kompleksa sa Ru(III) različit. S obzirom na to da preovladava sinergizam kao rezultat koinkubacionog dejstva kompleksa Ru(III) i CDDP, to ukazuje da bi mehanizmi antiproliferativnog dejstva $Ru(acac)_3$ mogli biti različiti u poredjenju sa mehanizmima delovanja cisplatine.

Afinitet β -diketonato kompleksa na bazi Ru(III), Cr(III) i Rh(III) da interaguju sa DNK i eventualno postojanja/nepostojanja moguće DNK interakcije koja bi mogla biti odgovorna za prisustvo/odsustvo citotoksične aktivnosti ispitivanih kompleksa, ispitivani su: a) analizom direktnog vezivanja kompleksa (odnosno metala) za ćelijsku DNK na A2780 ćelijama, ili analizom *in vitro* interakcije kompleksa metala sa DNK fragmentom 123 bp, korišćenjem ICP-masene spektrometrije (ICP-MS). Moguća posredna interferencija sa procesima sinteze DNK ili RNK u ćeliji ispitivana je merenjem inkorporacije radioaktivno obeleženih nukleotida ^{13}C -timidina i 3H -uridina u makromolekule DNK i RNK, na A2780 ćelijama.

U našim eksperimentalnim uslovima, medju svim testiranim kompleksima, jedino $Cr(acac)_3$ pokazuje afinitet za direktnu interakciju sa molekulom DNK, što ukazuje da vezivanje za DNK nije u korelaciji sa citotoksičnom aktivnošću β -diketonato kompleksa ispitivanih u ovom radu.

Ispitivanje potencijala za inhibiciju sinteze DNK (prikazan kao procenat inhibicije inkorporacije radioaktivno obeleženog nukleotida ^{13}C -timidina), ukazuje da $Ru(tfac)_3$ ima najveće inhibitorno dejstvo koje prati koncentracionu i vremensku zavisnost (Sl. 4.3.2.1.). Kompleksi $Ru(acac)_3$ i $Cr(acac)_3$ takodje imaju uticaja, ali slabijeg, na inhibiciju DNK sinteze. Inhibitorno dejstvo kompleksa Cr(III) na sintezu DNK, može se objasniti formiranjem lezija na DNK na osnovu prethodnih rezultata, koji potvrđuju interakciju Cr(III) jona i DNK. Kompleksi Ru(III) očigledno imaju uticaja na proliferaciju ćelija, ali nema dokaza da bi direktna DNK interakcija mogla biti odgovorna (108).

Efekat delovanja $\text{Ru}(\text{tfac})_3$ na inhibiciju sinteze RNK (inkorporacija ^3H -uridina) je izraženiji pri većoj koncentraciji (100 μM), a pri nižim koncentracijama je reverzibilan, jer se uočava nakon 6 sati dejstva i nestaje nakon 24 sata. $\text{Ru}(\text{acac})_3$ i $\text{Cr}(\text{acac})_3$ takodje pokazuju slabije inhibitorno dejstvo na proces sinteze RNK. Reverzibilno inhibitorno dejstvo ukazuje na moguću interakciju sa molekulima RNK, tj. formiranje oštećenja na RNK, koje indukuje zastoj sinteze RNK tj. aktivira ćelijske sisteme za reparaciju (1).

U cilju ispitivanja korelacije izmedju citotoksičnosti testiranih kompleksa rutenijuma(III), hroma(III), rodijuma(III) i platine(II) i mehanizma njihovog antiproliferativnog dejstva, analizirali smo potencijal ovih kompleksa da uzrokuju apoptozu i promene ćelijskog ciklusa korišćenjem protočnog citometra, nakon bojenja tretiranih ćelija sa PI, kao i primenom aneksin-V-FITC/PI dvostrukog bojenja.

Analiza potencijala neplatinskih kompleksa: $\text{Ru}(\text{tfac})_3$, $\text{Ru}(\text{acac})_3$, $\text{Cr}(\text{acac})_3$, $\text{Rh}(\text{acac})_3$, da indukuju apoptozu (sub-G1 frakcija) i promene ćelijskog ciklusa izvedena na ćelijama karcinoma humanog ovarijuma A2780, ukazala je da $\text{Ru}(\text{tfac})_3$ pokazuje najveći potencijal za indukciju apoptoze (sub-G1 frakcija 46,71 %) nakon 48 sati delovanja u koncentraciji 100 μM . $\text{Ru}(\text{tfac})_3$ je, takodje, indukovao promene ćelijskog ciklusa, zastoj u S fazi, odnosno opadanje broja ćelija u G1 i G2 fazi. Među ostalim testiranim kompleksima, $\text{Ru}(\text{acac})_3$ je indukovao značajan procenat apoptoze 14,70 % (na A2780 ćelijama), kao i zastoj u S fazi ćelijskog ciklusa, koji je na A2780 ćelijama reverzibilan, odnosno promene su uočljive nakon 24 sata dejstva agensa i skoro nestaju nakon 48 sati. Rezultati analize ćelijskog ciklusa ukazuju još jednom na mogućnost interakcije kompleksa $\text{Ru}(\text{III})$ sa procesima sinteze DNK ili učešća ćelijskih sistema za reparaciju (MMR, NER) u popravci eventualnih DNK oštećenja (62, 96), što je u saglasnosti sa rezultatima inhibicije DNK-sinteze. U slučaju $\text{Ru}(\text{tfac})_3$, moguće je da neuspeli pokušaji popravke oštećenja na DNK rezultuju trajnim tj. dužim zastojem u S fazi, a shodno tome značajnom povećanju broja ćelija u sub-G1, apoptotskoj frakciji; ćelije koje ne uspevaju da prođu kroz S fazu, podležu apoptozi (46).

Zastoj ćelijskog ciklusa u S fazi indukovani kompleksom $\text{Ru}(\text{acac})_3$ je reverzibilne prirode, što ukazuje da su oštećenja u ćeliji izazvana ovim kompleksom različita u odnosu na oštećenja izazvana sa $\text{Ru}(\text{tfac})_3$. $\text{Ru}(\text{acac})_3$ indukovao je značajan procenat apoptoze na HeLa ćelijama, $29,09 \pm 1,32 \%$, (Sl. 4.5.a. i 4.5.b.), potvrđeno primenom aneksin V-FITC/PI bojenja, nakon 48 sati dejstva. Mada procenat ćelija obojenih propidijum-jodidom (A-PI+), koji ukazuje na pojavu sekundarnih nekrotičnih promena tokom ćelijske smrti, iznosi 31.78 % (Sl. 4.5.b.) Rezultat morfološke analize ćelijske smrti takodje otkriva prisustvo sekundarnu nekrotičnih promena u kasnoj fazi ćelijske smrti (nakon 72 sata dejstva $\text{Ru}(\text{acac})_3$ pri koncentraciji $1,5 \times \text{IC}_{50}$), takozvana sekundarna nekroza (190).

Kompleksi $\text{Cr}(\text{acac})_3$ i $\text{Rh}(\text{acac})_3$ nemaju antiproliferativnu aktivnost, nisu pokazali uticaj na progresiju ćelijskog ciklusa kao ni potencijal za indukciju apoptoze, ispitivanjem na A2780 ćelijama. Struktura liganda -acac- očigledno ne doprinosi aktivnosti kompleksa na bazi Cr(III), Rh(III).

Postoje brojni literaturni podaci koji ukazuju da kompleksi na bazi Ru(III), mogu imati potencijal antitumorskog dejstva čak i u slučaju kada ne poseduju citotoksičnost (196, 197). Kao glavni predstavnik takve grupe kompleksa metala je $\text{Ru}(\text{III}) \text{Na}[\text{trans-RuCl}_4\text{Me}_2\text{SO}(\text{imidazol})]$ (NAMI) kao i kompleks novije generacije imidazolijum *trans*-imidazoldimetilsulfoksid-tetrahlrorutenat(III) ($\text{ImH}[\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})\text{Im}]$) (NAMI-A), koji su potpuno lišeni citotoksične aktivnosti *in vitro* ali poseduju *in vivo* antimetastatsko dejstvo i snažan potencijal indukcije apoptoze (116, 117, 122). β -diketonato kompleks $\text{Ru}(\text{acac})_3$ ispitivan u ovom radu može se svrstati u istu grupu Ru(III) jedinjenja, na osnovu sposobnosti indukcije apoptoze i vrlo slabe citotoksičnosti. Tako smo smatrali potrebnim da se mehanizam dejstva ovog kompleksa dalje istraži bez obzira na ne postojanje značajne direktne citotoksičnosti. U tom smislu ispitan je antimetastatski potencijal kompleksa Ru(III): $\text{Ru}(\text{acac})_3$, $\text{Ru}(\text{tfac})_3$ na U2-OS ćelijama, na osnovu kvantitativne analize metaloproteinaza (MMP) MMP-2 i MMP-9, primenom ELISA-imunotest kita (*Quantikine System, R&D, SAD*).

Dobijeni rezultati ukazali su da $\text{Ru}(\text{acac})_3$ ispoljava očigledan uticaj na inhibiciju sinteze / aktivnosti MMP-2 i MMP-9 pri koncentraciji $30 \mu\text{M}$, pri čemu sadržaj MMP-9 i MMP-2 u supernatantu ćelija opada na $3,82 \text{ ng/ml}$, dok je vrednost u netretiranim U2-OS ćelijama (kontrola) $4,18 \text{ ng/ml}$. Kako je citotoksičnost $\text{Ru}(\text{acac})_3$ na U2-OS ćelijama mala, $\text{IC}_{50}(\text{U2-OS}) > 100 \mu\text{M}$, smanjenje koncentracija MMP-9 i MMP-2, se ne može objasniti citotoksičnim efektom ovog kompleksa, pri dejstvu $\text{Ru}(\text{acac})_3$ u koncentraciji $30 \mu\text{M}$ znatno manjoj od IC_{50} .

Mehanizam ćelijske smrti, tj. apoptoze indukovane dejstvom $\text{Ru}(\text{acac})_3$ na HeLa ćelijama, ispitan je praćenjem aktivnosti kaspaze-3, enzima koji igra ključnu i inicijalnu ulogu u kaskadi procesa u ćeliji, na putu programirane ćelijske smrti. Analiza je vršena primenom kita (BD Bioscience) nakon pet sati dejstva $\text{Ru}(\text{acac})_3$ u koncentraciji koja odgovara vrednostima: $5 \times \text{IC}_{50}$ i $10 \times \text{IC}_{50}$. Na osnovu dobijenih rezultata, $\text{Ru}(\text{acac})_3$ pokazuje slabu sposobnost indukcije kaspaze-3, u vrednosti od $4,16\%$ pri koncentraciji $10 \times \text{IC}_{50}$. Poređenjem sa cisplatinom, koja je pokazala dozno zavisnu indukciju kaspaze-3 (5% pri $5 \times \text{IC}_{50}$; odnosno $16,24\%$ pri $10 \times \text{IC}_{50}$) kao i *trans*- $[\text{Pt}(\text{Py})_2\text{Cl}_2]$ kompleksom platine(II) ispitivanim u ovom radu, koji pokreću apoptozu indukcijom kaspaze-3 može se zaključiti da $\text{Ru}(\text{acac})_3$ nema isti mehanizam dejstva, kao ispitivani kompleksi platine(II).

Moguće je da $\text{Ru}(\text{acac})_3$ pokreće apoptozu posredno, putem interakcije sa proteinima ili molekulima RNK u ćeliji (91). Naše studije potvrđuju potencijal ispitivanih kompleksa $\text{Ru}(\text{III})$ za interakciju sa procesima sinteze RNK i DNK, kao i inhibitorno dejstvo $\text{Ru}(\text{acac})_3$ na procese sinteze/aktivnosti metaloptoteinaza MMP-2 i MMP-9. Analizirani kompleksi $\text{Ru}(\text{III})$, različiti po strukturi bidentatnih β -diketonato liganada, očigledno se međusobno razlikuju po mehanizmu antiproliferativnog dejstva. Struktura liganda -tfac-, doprinosi većoj citotoksičnoj aktivnosti kompleksa $\text{Ru}(\text{tfac})_3$.

CDDP kao i *trans*- $[\text{Py}(\text{Py})_2\text{Cl}_2]$ poseduju najveću citotoksičnu aktivnost u poređenju sa svim testiranim kompleksima metala na primenjenim ćelijskim linijama. Smanjenje koncentracije unutarćelijskog GSH, nije imalo značajan uticaj na modulaciju aktivnosti platinskih kompleksa, ispitivanjem na B16 i K562 ćelijama.

Kada se poredi aktivnost samo platinskih kompleksa ispitivanih u ovom radu, *cis*- izomer $[\text{Pt}(\text{Py})_2\text{Cl}_2]$ ima najmanju sposobnost indukcije kaspaze-3. Ovaj rezultat u saglasnosti sa odnosom citotoksične aktivnosti *cis*- i *trans*- izomera na HeLa ćelijama tj. odnosom odgovarajućih IC_{50} vrednosti, koje iznose $\text{IC}_{50(\text{CIS})} = 32,30 \pm 0,07 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{50(\text{TRANS})} = 9,50 \pm 0,10 \mu\text{M}$. *Trans*- $[\text{Pt}(\text{Py})_2\text{Cl}_2]$ pokazuje tri puta veću citotoksičnost u poređenju sa *cis*- isomerom, i slično tome, pokazuje dva puta veći kapacitet za indukciju kaspaze-3 pri koncentraciji $10 \times \text{IC}_{50}$ (9,54 %) u poređenju sa *cis*- izomerom (3,79 %). Zanimljivo je da je potencijal ovih izomera za indukciju apoptoze na HeLa ćelijskoj liniji približan. Aneksin V-FITC/PI bojenje na HeLa ćelijama, ukazuje da *cis*-/ *trans*- $[\text{Pt}(\text{Py})_2\text{Cl}_2]$ imaju sličan efekat indukcije apoptoze, tokom 24 sata dejstva agensa, koji iznose za *cis*- izomer: $26,35 \pm 3,12 \%$; za *trans*-izomer: $24,58 \pm 0,98 \%$. (Sl. 4.5.a. i 4.5.b.) Cisplatina je pokazala najači koncentraciono zavistan uticaj na indukciju apoptoze, kako na osnovu sadržaja (%) ćelija u sub-G1 prilikom analize ćelijskog ciklusa (24,69 % pri koncentraciji $1,5 \text{IC}_{50}$), tako i na osnovu Aneksin V-FITC analize (31,32 % za 48 sati dejstva).

Ispitivanje potencijala *trans*- $[\text{Pt}(\text{Py})_2\text{Cl}_2]$ da prevaziđe rezistenciju na cisplatinu, vršeno je na cisplatina-rezistentnom soju (U2-OS/Pt) pri čemu je *trans*- izomer pokazao dvostruko veću citotoksičnu aktivnost [$\text{IC}_{50} 28,99 \pm 0,69 (\mu\text{M})$] u poređenju sa *cis*- izomerom [$\text{IC}_{50} = 52,50 \pm 5,73 (\mu\text{M})$]. Dobijeni rezultati se ne razlikuju mnogo u poređenju sa aktivnošću tj. odnosom aktivnosti, [$\text{IC}_{50(\text{CIS})} : \text{IC}_{50(\text{TRANS})} = (1,5:1) \text{ do } (3:1)$] ovih izomera na drugim ćelijskim linijama korišćenim u ovom radu: HeLa, B16, U2-OS, U2-OS/Pt, Jurkat, K562. Takodje, oba izomera su ispoljila veću aktivnost na U2-OS ($\text{IC}_{50(\text{TRANS})} 23,89 \pm 2,34 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{50(\text{CIS})} = 49,13 \pm 3,29 \mu\text{M}$) u poređenju sa cisplatina-rezistentnim sojem.

Poređenje strukture i aktivnosti kompleksa platine ispitivanih u ovom radu otkriva da *cis*-/*trans*- izomerija ima vrlo bitan uticaj na aktivnost platinskih kompleksa, odnosno samo promenom konfiguracije, u ovom slučaju uvođenjem *trans*-konfiguracije, može se postići takozvana aktivacija kompleksa platine (40, 198) 199), što je u saglasnosti sa dosadašnjim literaturnim podacima.

6. ZAKLJUČAK

- Analizirani kompleksi Ru(II) ($\text{Ru}(\text{fac})_2$, $\text{Ru}(\text{acac})_2$), različit po strukturi liganada, očigledno se međusobno razlikuju po mehanizmu antiproliferativnog dejstva; struktura liganada –*fac* doprinosi značajno većoj citotoksičnoj aktivnosti kompleksa $\text{Ru}(\text{fac})_2$.
- Ispitivajući mehanizma dejstva kompleksa Ru(II) ukazuje izak:
 - kompleks Ru(II) – na svoga $\text{Ru}(\text{fac})_2$, utiču na inhibiciju sinteze-DNK i DNK, iako naše studije nisu pobrdile direktno vezivanje Ru(II) za DNK.
 - $\text{Ru}(\text{acac})_2$ poreduje inhibično dejstvo na sintezu i aktivnost metaloproteinaze MMP-2 i MMP-9, tj. poseduje potencijal antimetastatskog dejstva.
 - $\text{Ru}(\text{acac})_2$ i $\text{Ru}(\text{fac})_2$ pokreću apoptozu u stepenu sličnom cisplatinu, mada $\text{Ru}(\text{acac})_2$ ima slabiji potencijal indukcije kaspaze-3, poređujući sa cisplatinom kao i *trans*- $[\text{Pt}(\text{Py})_2\text{Cl}_2]$.
 - $\text{Ru}(\text{acac})_2$ ne poseduje direktan citotoksičan efekat in vitro, ali u konkubacionom dejstvu sa cisplatinom pokazuje sinergizam što daje racionalnu osnovu za njihovo ispitivanje antitumorskog potencijala kompleksa rutenijuma u kombinaciji sa citotoksičnim agensima.
- Kompleksi $\text{Cr}(\text{fac})_2$ i $\text{Rh}(\text{acac})_2$ nemaju antiproliferativnu aktivnost, nisu pokazali uticaj na progresu daljnjeg ciklusa kao ni potencijal za indukciju apoptoze, što ukazuje da struktura liganada –*fac* očigledno ne doprinosi aktivnosti kompleksa na bazi Cr(III) i Rh(III) .
- Među svim testiranim kompleksima jedino $\text{Cr}(\text{fac})_2$, koji ne poseduje citotoksičnost, pokazuje afinitet za direktno vezivanje za DNK molekule. Što ukazuje da DNK-interakcija ne mora biti u korelaciji sa antiproliferativnom aktivnošću kompleksa rutenija.

- Analizirani kompleksi Ru(III): Ru(tfac)₃, Ru(acac)₃, različiti po strukturi bidentatnih β-diketonato liganada, očigledno se međusobno razlikuju po mehanizmu antiproliferativnog dejstva; struktura liganda –tfac- doprinosi značajno većoj citotoksičnoj aktivnosti kompleksa Ru(tfac)₃.

- Ispitivanje mehanizma dejstva kompleksa Ru(III) ukazuje da:
 - kompleksi Ru(III), pre svega Ru(tfac)₃ utiču na inhibiciju sinteze RNK i DNK, iako naše studije nisu potvrdile direktno vezivanje Ru(III) za DNK.
 - Ru(acac)₃ poseduje inhibitorno dejstvo na procese sinteze/aktivnosti metaloptoteinaza MMP-2 i MMP-9, tj. poseduje potencijal antimetastatskog dejstva.
 - Ru(acac)₃ i Ru(tfac)₃ pokreću apoptozu u stepenu sličnom cisplatinu, mada Ru(acac)₃ ima slabiji potencijal indukcije kaspaze-3, poređenjem sa cisplatinom kao i *trans*-[Pt(Py)₂Cl₂].
 - Ru(acac)₃ ne poseduje direktan citotoksičan efekat *in vitro*, ali u koinkubacionom dejstvu sa cisplatinom pokazuje sinergizam što daje racionalnu osnovu za dalje ispitivanje antitumorskog potencijala kompleksa rutenijuma u kombinaciji sa citotoksičnim agensima.

- Kompleksi Cr(acac)₃ i Rh(acac)₃ nemaju antiproliferativnu aktivnost, nisu pokazali uticaj na progresiju ćelijskog ciklusa kao ni potencijal za indukciju apoptoze, što ukazuje da struktura liganda -acac- očigledno ne doprinosi aktivnosti kompleksa na bazi Cr(III) i Rh(III).

- Među svim testiranim kompleksima jedino Cr(acac)₃, koji ne poseduje citotoksičnost, pokazuje afinitet za direktno vezivanje za DNK molekul, što ukazuje da DNK-interakcija ne mora biti u korelaciji sa antiproliferativnom aktivnošću kompleksa metala.

REFERENCJE

- Kompleksi platine(II), cisplatinu kao i $trans-[Py(Py)_2Cl_2]$ poseduju najveću citoksičnu aktivnost od svih testiranih jedinjenja na primenjenim ćelijskim linijama.

- Poređenje strukture i aktivnosti kompleksa platine ispitivanih u ovom radu otkriva da *cis-trans*- izomerija ima vrlo bitan uticaj na aktivnost platinskih kompleksa, odnosno samo promenom konfiguracije, u ovom slučaju uvođenjem *trans*- konfiguracije, može se postići takozvana aktivacija kompleksa platine, što je u saglasnosti sa dosadašnjim literaturnim podacima.

1. L. J. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Angew. Chem.*, **70** (1958), 67.
2. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
3. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
4. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
5. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
6. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
7. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
8. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
9. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
10. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
11. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
12. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
13. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
14. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
15. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
16. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
17. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
18. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
19. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
20. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
21. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
22. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
23. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
24. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
25. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
26. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
27. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
28. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
29. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
30. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
31. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
32. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
33. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
34. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
35. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
36. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
37. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
38. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
39. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
40. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
41. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
42. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
43. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
44. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
45. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
46. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
47. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
48. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
49. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.
50. R. W. Murray, J. J. Murray, R. J. Murray, *Chem. Rev.*, **48** (1961), 193.

REFERENCE

1. J. Reedijk, Proc. Natl. Acad. Sci. SAD, 100 (2003) 3611.
2. R. Rosenberg, Cisplatin, Current Status and Future Development, Ed. A. W. Prestakyo, S. T. Crooke. S. K. Carter. Academic Press, New York, 1987, str. 11.
3. G. Giaccone, Drugs, 59 (2000) 9.
4. E. Raymond, S. G. Chaney, A. Taamma, E. Cvitkovic, Annals of Oncology, 9 (1998) 1053.
5. D. Machover, E. Diaz-Rubio, A. de Gramont, A. Schilf, J. J. Gastiaburu, S. Brienza, 7 (1996) 95.
6. E. Raymond, S. Faivre, J. M. Woynarowski, S. G. Chaney, Seminars in Oncology, 25 (1998) 4.
7. K. Keppler, W. Rupp, J. Cancer Res. Clin. Oncol., 111 (1986) 166
8. L. Wolf, E. Butter, H. J. Weinelt, Annorg. Allg. Chem., 306 (1960) 87,
9. F. Bregant, S. Pacor, S. Ghosh, S.K. Chattopadhyay, G. Sava, Anticancer Res., 13 (1993) 1011.
10. A. Eastman, Pharmacol. Ther. 34 (1987), 155.
11. E.B. Double, Pharmacol. Ther., 25 (1984), 297,
12. J.M. Malinge, M. Leng, Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anti-cancer Drug, Ed: B. Lippert, Ed. Wiley-VCH: Zurich, Switzerland, 1999, str.159.
13. A. Eastman, M.A. Barry, Biochemistry, 26 (1987), 3303.
14. V. Brabec, M. Leng, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90 (1993) 5345.
15. K.M. Comess, L. Chassot, C.E. Costello, S.J. Lippard, Biochemistry, 29 (1990) 811.
16. M.J.P. Walters, B.J.M. Braakhuis, A.J. Jacobs-Bergmans, A. Kegel, R.A. Baan, W.J.F. van der Vijgh, A.M.J. Fichtinger-Schepman, Annals of Oncol, 10 (1999), 97,
17. E. R. Jamieson, S. J. Lippard, Chem. Rev., 99 (1999), 2467,
18. C. Hofr, V. Brabec, J. Biol. Chem., 276 (2001) 9655.
19. R. Rosenberg, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anti-cancer Drug, Ed: B. Lippert, Wiley-VCH:Cirih, 1999, pp. 4-27,
20. N. Farrell, T.T.B. Ha, J.P. Souchard, F.L.Wimmer, S. Cros, N.P. Johnson, J. Med. Chem., 32 (1989), 2240,
21. N. Farrell, L. R. Kelland, J. D. Roberts, M. Van Beusichem, Cancer Res., 52 (1992), 5065.
22. M. Leng, D. Locker, M. J. Giraud-Panis, A. Schwart, F. P. Intini, G. Natile, C. Pisano, A. Boccarelli, D. Giordano, M. Coluccia, Mol. Pharmacol., 58 (2000), 1525.

23. E.I. Montero, S.D. Diaz, A.M. Gonzales-Vadillo, J.M. Perez, C. Alonso, Navarro-Raninger, *J. Med. Chem.*, **42** (1999), 4264.
24. L.S. Hollis, W.I. Sunquist, J.N. Burstyn, W.J. Heiger-Bernays, S.F. Bellon, K.J. Ahmed, A.R. Amundsen, E.W. Stern, S.J. Lippard, *Cancer Res.*, **51** (1991) 1866.
25. A.P. Silverman, W. Bu, S.M. Cohen, S.J. Lippard, *J. Biol. Chem.*, **277** (2002) 49743.
26. N. Farrell, Y. Qu, U. Bierbach, M. Valsecchi, E. Menta, *Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, B. Lippert, Ed. Wiley-VCH: Zürich, 1999, str. 479.
27. Y. Najajreh, J.M. Perez, C. Navarro-Rannineger, D. Gibson, *J. Med. Chem.*, **45** (2002), 5189.
28. L.R. Kelland, *J. Inorg. Biochem.*, **77** (1999) 121.
29. S. Arandjelović S, Ž. Tešić, Z. Juranić, S. Radulović, M. Vrvić, B. Potkonjak, Z. Ilić, *J. Exp&Clin. Canc. Res.*, **4** (2002) 51-526.
30. R. P. Perez, *Eur. J. Cancer*, **43** (1998) 1535.
31. L.R. Kelland, S.Y. Sharp, C.F. O'Neill, F.I. Raynaud, P.J. Beale, I.R. Judson, *J. Inorg. Biochem.* **77** (1999) 111.
32. L.R. Kelland, C.F.J. Barnard, K.J. Mellish, M. Jones, P.M. Goddard, M. Vallenti, *Cancer Res.*, **54** (1994) 5618.
33. L.R. Kelland, C.F.J. Barnard, I.G. Evans, B.A. Murrer, B.R.C. Theobald, S.B. Wyer, P.M. Goddard, M. Jones, M. Vallenti, K.J. Mellish, A. M. Bryant, P.M. Rogers, K.R. Harrap, *J. Med. Chem.*, **38** (1995) 3016.
34. J. Holford, P.J. Beale, F.E. Boxall, S.Y. Sharp, L.R. Kelland, *Eur. J. Cancer*, **36** (2000) 1984.
35. N. Farrell, *Cancer Invest.* **11** (1993) 578.
36. Y. Zou, B. van Houten, N. Farrell, *Biochemistry*, **32** (1993) 9632.
37. S. Manić, Ž. Tešić, Z. Juranić, S. Radulović, *J. BUON.*, **6** (2001) 279.
38. U. Bierbach, Y. Qu, T.W. Hambley, J. Peroutka, H.L. Nguyen, M. Doedee, N. Farrell, *Inorg. Chem.*, **38** (1999) 3535.
39. V. Brabec, K. Nepelchova, J. Kasparkova, N. Farrell, *JBIC*, **5** (2000) 364.
40. A. Zakovska, O. Novakova, Z. Balcarova, U. Bierbach, N. Farrell, V. Brabec, *Eur. J. Biochem.*, **254** (1998) 547,
41. J. Kasparkova, O. Novakova, N. Farrell, V. Brabec, *Biochemistry*, **42** (2003) 792.
42. E. Khazanov, Y. Berenholz, D. Gibson, Y. Najajreh, *J Med. Chem.*, **45** (2002) 5196.

43. V. Brabec, J. Kasparkova, O. Vrana, O. Novakova, J. W. Cox, Y. Qu, N. Farrell, *Biochemistry*, 38 (1999) 6781.
44. V. Murray, J. Whittaker, M. D. Temple, W.D. McFadyen, *Biochem. Biophys. Acta*, 261 (1997) 1354.
45. G. Pratese, P. Perego, F. Zunino, *Biochem. Pharmacol.* 61 (2001)381.
46. S.A. Amundson, T.G. Myers, A.J. Fornace, *Oncogene*, 17 (1998) 3287,
47. S. Manić, L. Gatti, N. Carenini, G. Fumagalli, F. Zunino, P. Perego, *Current Cancer Drug Target*, 3 (2003) 21.
48. J.A. Houghton, *Curr. Opin. Oncol.* 11 (1999) 475.
49. V. M. Gonzalez, M.A. Fuertes, C. Alonso, J. M. Perez, *Mol. Pharmacol.*, 59 (2001) 657,
50. A.W.M. Boersma, K. Nooter, H. Burger, C.J. Kortlan, G. Stoter, *Cytometry*, 27 (1997) 275.
51. K.E. Pestell, S.M. Hobbs, J.C. Titley, L.R. Kelland, M. I. Walton, *Mol. Pharmacol.* 57 (2000) 503.
52. C.F. O'Neill, M.G. Ormerod, D. Robertson, J.C. Titley, Y. Cumber-Walseer, v L.R. Kelland, *Br. J. Cancer*, 74 (1996)1037,
53. P. Perego, S. J. Gretchen, L. Gatti, S. B. Howell, F. Zunino, *Pharmacological Reviews*, 52 (2000) 477,.
54. P. Perego, F. Zunino, N. Carenini, F. Giuliani, S. Spinelli, S.B. Howell, *Mol. Pharmacol.* 54 (1998) 213.
55. J. D. Watson, N. H. Hoplins, J. W. Robertson. J. A. Steiz, A. M.Weiner, *Molecular Biology of the Gene*, Ed: Menlo Park, California, 1992, 147,
56. U.M. Ohndorf, M.A. Rould, Q. He, C.O. Pabo, S.J. Lippard, *Nature*, 399 (1999)707,
57. J. Zlatanova, J. Yeneva, S.H. Leuba, *FASEB J.*, 12 (1998) 791.
58. Y. Sedletska, M. J. Giruad-Panis, J. M. Malinge, *Curr. Med. Chem.-Anti Cancer Agents*, 5 (2005) 251.
59. J. Kasparkova, N. Farrell, V. Brabec, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 15789.
60. E. Reed, *Cancer Treatment Rev.*, 24 (1998) 331.
61. J. Zehnulova, J. Kasparkova, N. Farrell, V. J. Brabec, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 22191.
62. M. Crul, M. J. H. Schellens, H. J. Beijnen, *Canc.Treat. Rev.*, 23 (1997) 341.
63. M. Yamada, E. O'Regan, R. Brown, P.Karran, *Nucleic Acid Res.*, 25 (1997) 491.
64. Q. Li, K.Gardner, L. Zhang, B.Tsang, F. Bostic-Bruton, E. Reed, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 23419.

65. J. Reedijk, *Current Opinion in Chemical Biology*, 3 (1999) 236-240,
66. T. Kopf-Maier, *Eur. J. Clin Pharmacol.*, 47 (1994) 1.
67. G. Sava, T. Giraldi, G. Mestroni, G. Zassinovich, *Chem. Biol. Interact.*, 45 (1983) 1.
68. H. Hirohumi, A. R. Rohana, M. Naoui, H.A.Tajmir-Riahi, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 10150,
69. H. Wang, A. Kruszewski, D. L. Brautigan, *Biochemistry*, 44 (2005) 8167
70. H.Y. Shrivastava, T. Ravikumar, N. Shanmugasundaram, M. Babu., N. B. Unni., *Free Radic. Biol. Med.*, 38 (2005) 58.
71. N. Katsaros, A. Anagnostopolou, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 42 (2002) 297,
72. L.D. Dale, D.J. Edwards, *Lett. App. Microb.*, 9 (1989) 53.
73. S. S. Allardyce, P. J. Dyson, *Platinum Metals Reviews*, 45 (2001) 62.
74. S. P. Fricker, *Met. Ions. Biol. Syst.* 36 (1999) 665.
75. H. Depenbrock, S. Schmelcher, R. Peter, B. K. Keppler, Weirich, T. G. Block, J. Rastetter, J. Hanausker, *Eur. J. Cancer*, 33 (1997) 2404.
76. A. Bergamo, L. messori, F. Piccioli, M. Cocchiatti, G. Sava, *Investigational New Drug*, 21 (2003) 401.
77. W. R. Harris, *Struct. Bond.* 92 (1998) 121.
78. F. Kratz, M. T. Schutte, *Cancer J.*, 11 (1998) 60.
79. K. Keppler, *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, B. K. Keppler Ed: VCH, Wienheim, Geramny, 1993, str. 187-220.
80. M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.*, 232 (2002) 69.
81. O. M. Dhubghaill, W Hagen, B. K. Keppler, K. G. Lipponer, J. Sadler, *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.*, 25 (1994) 3305.
82. M. Bastos, K. A. Gordon, T. A. Ocain, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8 (1998) 147,
83. S.R. Grguric-Sipka, R.A. Vilaplana, J.M. Perez, M.A. Fuertes, Alonso, C. Y. Alvarez, T.H. Sabo, F. Gonzalez-Vilxhez, *J. Inorg. Biochem.* 97 (2003) 215.
84. E. Alessio; W. Attia; M. Calligaris; S. Cauci, L. Dolzani, G. Mastroni, C. Monti-Bragadin, G. Nardin, F. Quadrifoglio, G. Sava, M. Tamaro, S. Zorzet, *Proceedings of the Fifth International Symposium on Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*, M. Nicolini, Ed: Martinus Nijhoff: Boston, 1988, str. 617-633.
85. L.D. Dale, J.H. Tocher, T.M. Dyson, D.I. Edwards, D.A. Tocher, *Anti-Cancer Drug Design*, 7 (1992) 3.
86. M. Coluccia, G. Sava, F. Loseto, A. Nassi, A. Boccareli, D. Giordano, E. Alessio, G. Mestroni, *Eur. J. Cancer*, 13 (1993) 1873.

87. B.K. Keppler, W. Rupp, *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **111** (1986) 166.
88. O. Novakova, J. Kasparkova, O. Vrana, P.M. van Vilet, J. Reedijk, V. Brabec, *Biochemistry*, **34** (1995) 12369.
89. J. Malina, O. Novakova, B.K. Keppler, E. Alessio, V. Brabec, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **6** (2001) 435.
90. B. Van Houten, S. Illenye, Y. Qu, N. Farrell, *Biochemistry*, **32** (1993) 11794.
91. P.K. Chan, K.A. Skov, B.R. James, N. Farrell, *Chem. Biol. Interact.*, **59** (1986) 247,
92. M. Hartmann, K. G. Lipponer, B. K. Keppler, *Inorg. Chim. Acta.*, **267** (1998) 137,
93. L. Rabenstein, K. K. Millis, K. H. Weaver, *J. Org. Chem.*, **58** (1993) 4144.
94. T. M. Buttke, P. A. Sandstrom, *Immunol. Today*, **15** (1994) 7,
95. K. Lemma, J. Berglund, N. Farrell, L. I. Elding, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5** (2000) 300,
96. D. Frasca, M. J. Clarke, *J. Am. Chem. Soc.*, **121** (1999) 8523.
97. D. Pluim, R. C. van Waardenburg, J. H. Beijnen, J. H. Schellens, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **54** (2004) 71.
98. A.C. Hotze, M. Bacac, A.H. Velders, B.A. Jansen, H. Kooijman, A.L. Spek, J.G. Haasnoot, J. Reedijk, *J. Med. Chem.*, **46** (2003) 1743.
99. H.L. Chan, H.Q. Liu, B.C. Tzeng, Y.S. You, S.M. Peng, M. Yang, C.M. Che, *Inorg. Chem.*, **41** (2002) 3161.
100. R.E. Aird, J. Cummings, A. A. Ritchie, M. Muir, R. E. Morris, H. Chen, P. J. Sadler, D. I. Jodrell, *Br. J. Cancer*, **86** (2002) 1652.
101. D. Cummins, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.*, **99** (1977) 5158.
102. O. Novakova, J. Kasparkova, V. Bursova, C. Hofr, M. Vojtiskova, H. Chen, P. J. Sadler, V. Brabec, *Chem. Biol.*, **12** (2005) 121.
103. A.C. Hotze, M. Bacac, A.H. Velders, B.A. Jansen, H. Kooijman, A.L. Spek, J.G. Haasnoot, J. Reedijk, *J. Med. Chem.*, **46** (2003) 1743.
104. R.L. Hayward, Q.C. Schornagel, R. Tente, J.S. Macpherson, R.E. Aird, S. Guichard, A. Habtemariam, P. Sadler, D. I. Jodrell, *Cancer. Chemother. Pharmacol.*, **55** (2005) 577.
105. Y. N. V. Gopal, A. K. Konuru, A. K. Konodapi, *Arch. Biochem. Biophys.* **401** (2002) 53.
106. M. Strasberg-Reiber, A. Anzellotti, R. A. Sanchez-Delado, M. Reibe, *Int. J. Cancer*, **112** (2004) 376.
107. K. A. Marx, C. Seery, P. Malloy, *Mol. Cell Biochem.*, **90** (1989) 37,
108. J. Malina, O. Novakova, B. K. Keppler, E. Alessio, V. Brabec, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **6** (2001) 435.

109. V. Brabec, *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.*, 71 (2002) 1.
110. R. Frasca, L. E. Gehrig, M. J. Clarke, *J. Inorg. Biochem.*, 83 (2001) 139.
111. A. Barca, B. Pani, M. Tamaro, E. Russo, *Mutant. Res.*, 423 (1999) 171.
112. S. Zorzet, A. Bergamo, M. Cocchietto, A. Sorc, B. Gava, E. Alessio, E. Iengo, G. Sava, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 295 (2000) 927,
113. E. Alessio, G. Mastroni, G. A. Nardi, M. Waihib, M. Calligaria, G. Sava, S. Zorzet, *Inorg. Chem.*, 27 (1988) 4099.
114. E. Alessio; W. Attia; M. Calligaris; S. Cauci, L. Dolzani, G. Mastroni, C. Monti-Bragadin, G. Nardin, F. Quadrifoglio, G. Sava, *Dev. Oncol.*, 54 (1988) 617,
115. G. Sava, E. Alessio, E. Bergamo, G. Mastroni, *Top. Biol. Inorg. Chem.*, 1 (1999) 143.
116. G. Sava, S. Pacor, M. Coluccia, M. Mariggio, M. Cocchietto, E. Alessio, G. Mastroni, *Drug. Invest.*, 8 (1994) 150,
117. G. Sava, R. Gagliardi, A. Bergamo, E. Alessio, G. Mestroni, *Anticancer Res.*, 19 (1999) 969.
118. G. Sava, S. Pacor, G. Mestroni, E. Alessio, *Clin. Exp. Metastasis.*, 10 (1992) 273.
119. E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo, G. Sava, *Curr. Top. Med. Chem.*, 4 (2004) 1525.
120. A. Bergamo, B. Gava, E. Alessio, G. Mestroni, B. Serli, M. Cocchietto, S. Zorzet, G. Sava, *Int. J. Oncol.*, 21 (2002) 1331.
121. E. Morgunova, A. Tuuttila, U. Bergmann, M. Isupov, Y. Lindqvist, G. Schneider, K. Tryggvason, *Science*, 284 (1999) 1667,
122. M. Whittaker, C. D. Floyd, P. D. Brown, J. H. Gearing, *Chem. Rev.*, 99 (1999) 2735.
123. M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Plum, J. H. Beijnen, J. H. M. Schellens, *Clin. Canc. Res.*, 10 (2004) 3717,
124. E. Alessio, E. Iengo, S. Zorzet, A. Bergamo, M. Coluccia, A. Boccarelli, G. Sava G, *J. Inorgan. Biochem.* 79 (2000) 173.
125. A. Bergamo, R. Gagliardi, V. Scarzia, A. Furlani, E. Alessio, G. Mastroni, G. Sava, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 289 (1999) 559
126. E. C. Kohn, L. A. Liotta, *Cancer Res.*, 51 (1995) 1865.
127. L. A. Liotta, W. G. Stetler-Stevenson, *Cancer Res.*, 51 (1991) 5054.
128. M. J. Duffy, *Biotherapy*, 4 (1992) 45.
129. S. Aznavorian, M. L. Stracke, H. C. Krutzsch, *J. Cell. Biol.*, 110 (1990)1427,
130. L. A. Liotta, R. Mandler, G. Murano, *Proc. Natl. Acad. Sci. SAD*, 83 (1986) 3302.
131. S. Rong, S. Segal, M. Anver, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91 (1994) 4731.

132. Lapis, S. Paku, L. A. Liotta, Clin. Exp. Metast., 6 (1988) 73.
133. S. A. Aaronson, Clin. Exp. Metast., 254 (1991) 1146.
134. L. A. Liotta, Murata, Clin. Exp. Metast., 12 (1994) 3.
135. M. L. Stracke, H.C. E.J. Krutzsch, J. Biol. Chem., 267 (1991) 2524.
136. T. Clair, H.Y. Lee, L.A. Liotta, M.L. Stracke, J. Biol. Chem., 272 (1997) 996.
137. M. Coussens, Z. Werb, J. Chem. Biol., 3 (1996) 895.
138. N. Nagase, J. F. Woessner, J. Biol. Chem., 274 (1999) 21491.
139. M. Preston, Oncogene, 2 (2002).
140. A. F. Chambers, L. M. Matrisian, J. Natl. Cancer Inst., 89 (1997) 1260,
141. L. A. Liotta, K. Tryggvason, S. Garbisa, Nature, 248 (1980) 67,
142. M. Egeblad, Z. Werb, Nature Rev. Cancer, 2 (2002) 161.
143. W. G. Stetler-Stevenson, H. C. Krutzsch, L. A. Liotta, J. Biol. Chem., 264 (1989) 17374.
144. D. E. Gomez, D. F. Alonso, H. Yoshiji, U. P. Thorgeirsson, Eur. J. Cell. Biol., 74 (1997) 111.
145. J. J. Reynolds, Oral. Dis., 2 (1996) 70,
146. P.S. Steeg, G. Bevilacqua, L. Kopper, J. Natl. Cancer. Inst., 80 (1988) 200,
147. Weigelt, J. L. Peterse, L. J. van't Veer, Nature Rev. Cancer, 5 (2005) 591.
148. T. Patel, G. J. Gores, S. H. Kaufmann, FASEB J., 10 (1996) 587,
149. Y. Zhang¹, N. Fujita¹ T. Tsuruo, Oncogene, 18 (1999) 1131.
150. S. Salvesen, C. S. Duckett, Nature Rev. Moll. Cell Bioll. 3 (2002) 401.
151. N. A. Thornberry, Y. Lazebnik, Science, 281 (1998) 1312.
152. R. E. Bachelder, M. A. Wendt, N. Fujita, T. Tsuruo, A. M. Mercurio, J. Biol. Chem., 276 (2001) 34702.
153. D. Schimmer, Cancer Cell, 5 (2004) 25.
154. N. Juranic, Inorganica Acta, 87 (1984) 37,
155. G. E. Moore, R. E. Gerner, H. A. Franklin, A.M.A., 199 (1967) 519.
156. T. A. McCoy, M. Maxwell, P. F. Kruse, Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 100 (1959) 115.
157. T. C. Hsu, D. S. Kellogg, J. Nat. Cancer Inst., 25 (1960) 221. 157 a. Iwakata, J. T. Grace, J. N.Y.J.Med., 64 (1964) 2279. 158a.
158. A. Manniello, B. Parodi, O. Aresu, P. Romano, Animal cell lines catalogue, (1990)
159. Semin. Oncol. (1984).
160. N.Y. Ann. Acad. Sci. (1963).
161. In. J. Cancer. (1979).

162. P. Perego, C. Caserini, L. Gatti, N. Carenini, S. Romanelli, R. Supino, D. Colangelo, I. Viano, R. Leone, S. Spinelli, G. Pezzoni, C. Manzotti, N. Farrell, F. Zunino, 55 (1999) 528.
163. Freshney IR, Liss AR, in: Culture of Animal cells, a manual of basic technique, NY(1983) 199.
164. Sigma, Chem. Co. Biochemicals and reagents for life science research, (1997)1752.
165. P. Perego, G.L. Beretta, L. Gatti, u Handbook of Proteomic Methods, Ed: P.M. Conn, Humana Press: New Jersey, (2003).
166. R. Supino, u Methods in Molecular Biology, Ed: S. O'Hare, C.K. Atterwill, Humana Press: New Jersey, 1995, str. 137-149.
167. N. J. Marshall, C. J. Goodwin, Growth Regulation 5 (1995) 69.
168. Monks *et al.* J. Natl. Cancer Inst., 83 (1991)757.
169. J. Edelman, H. Quam, B. Mullins, Cancer Chemother. Pharmacol. 48 (2001) 141.
170. A. Bergman, V.W.T. Haperen, G. Verman, Clin. Cancer. Res., 2 (1996) 521.
171. C. Chou, P. Talalay, Trends in Pharmacological Sciences, 4 (1983) 450,
172. Internet adresa: [www. Biosoft Software for Science.htm](http://www.Biosoft Software for Science.htm)
173. P. Pratesi, P. Perego, D. Polizzi, S.C. Righetti, R. Supino, C. Caserini, C. Manzotti, F. C. Giuliani, G. Pezzoni, S. Tognella, S. Spinelli, N. Farrell, F. Zunino, Br. J. Cancer, 80 (1999) 1912.
174. Ciusani, E, Perego, P. Carenini, N. Corna, E. Facchinetti, F. Boiardi, A. Salmaggi, A. Zunino, F. Biochem. Pharmacol. 63 (2002) 881.
175. A. Bonetti, P. Apostoli, M. Zannineli, F. Pavanel, M. Colombatti, G.L. Cetto, T. Franceschi, L. Spperetto, R. Leone, Clin. Cancer. Res., 2 (1996) 1829.
176. T. Maniatis, E. F. Fritsh, J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor: New York, 1982.
177. D. Fink, S. Nebel, S. Aebi, Cancer Res., 56 (1996) 4881.
178. L. Burger, K. Nooter, Int. J. Cancer, 73 (1997) 592.
179. I. Oyama, D. Eagle, 91 (1956) 305.
180. O. H. Lowry, N. J. Rosenbergh, J. Biol. Chem., 193 (1951) 265.
181. M. Matrisian, BioAssays, 14 (1992) 455.
182. W. Guerin, P.C. Holland, Dev. Dyn., 202 (1995) 91.
183. E. Spinozzi, E. Agea, Scand. J. Immunol., 41 (1995) 504.
184. M.G. Ormerod, Flow cytometry, a practical approach, Ed: M.G. Ormerod, Oxford University Press: New York, 1994, str. 119-125.

185. P. Raynal, H.B. Pollard, *Biochem. Biophys. Acta*, 1197 (1994) 63.
186. I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken, C. Reutelingsperger, J. Immunol. Meth. 184 (1995) 39.
187. N. Fujita, T. Tsuruo, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 246 (1998) 484.
188. T. Patel, G.J. Gores, S.H. Kaufmann, *FASEB J.*, 10 (1996) 5877,
189. N.K. Banada, W.C. Satterfield, A. Dunlap, K.S. Steimer, R. Kurrle, T.H. Finkel, *Apoptosis*, 1 (1996) 49.
190. Sava, S. Pacor, A. Bergamo, M. Cocchietto, G. Mestroni, E. Alessio, *Chem. Biol. Interact.*, 95 (1995) 109.
191. M. Strasberg, A. Anzellotti, R.A. Sanchez-Delgado, M. Rieber, *Int. J. Cancer*, 112 (2004) 376.
192. M. Mura, M. Camalli, L. Messori, F. Piccioli, P. Zanello, M. Corsini, *Inorg. Chem.*, 43 (2004) 3863.
193. K.A. Marx, R. Kruger, M.J. Clarke, *Mol. Cell. Biochem.*, 86 (1989)155.
194. J.R. Rubin, M. Sabat, M. Sundaralingam, *Nucleic Acid. Res.*, 11 (1983) 6571
195. A. Bergamo, S. Zorzet, B. Gava, A. Sorc, E. Alessio, E. Iengo, G. Sava, *Anticancer Drugs*, 11 (2000) 665.
196. A. Bergamo, S. Zorzet, M. Cocchietto, M.E. Carotenuto, M. Magnarin, G. Sava, *Anticancer Res.*, 21 (2001) 1893.
197. S. Arandjelović, Ž. Tesić, S. Radulović, *Med. Chem. Reviews-Online*, 2 (2005) 415.
198. S. Radulović, Ž. Tešić, S. Manić, *Curr. Med. Chem.*, 9 (2002)1611.



CURRICULUM VITA

SANDRA S. ARANDJELOVIĆ

Institut za Onkologiju i Radiologiju Srbije (IORS)

Pasterova 14, 11 000 Belgrade

Tel: 381 11 2067289

Fax: 381 11 685 300

e-mail: manics@ncrc.ac.yu

Sandra S. Arandjelović, rođena je u Francuskoj u gradu Tours, 20. 04. 1971. Osnovnu i srednju školu završila je u Beogradu. Diplomirala je na odseku *Biohemija*, Hemisjski Fakultet u Beogradu, 1996 godine. 1996 godine upisala je *poslediplomske studije na odseku za Biohemiju*, Hemijski Fakultet, Univerzitet u Beogradu, kao stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju Srbije. 1997 godine počela je rad na Institutu za Onkologiju i Radiologiju Srbije (IORS) u laboratoriji za eksperimentalnu farmakologiju.

2000 odbranila je *Magistarsku tezu* pod nazivom "Mehanizam citotoksičnog dejstva nekih kompleksa platine(II) na HeLa celijama". Doktorske studije upisala je na Hemijskom fakultetu u Beogradu, pod mentorstvom Prof. Dr Živoslava Tešića i Dr sci. med. Siniše Radulovića. 2001 god., dobila je stipendiju UICC (*Internacional Union Against Cancer*) za stručno usavršavanje na Nacionalnom onkološkom institutu u Milanu (Istituto Nazionale Tumori) pod mentorstvom Dr. Paola Perego - laboratorija za eksperimentalnu farmakologiju.

Član je Evroske organizacije za borbu protiv raka (EACR), asocijacije stipendista UICC (AUF) i Društva biohemičara Srbije. Zaposlena je na IORS-u, u laboratoriji za eksperimentalnu farmakologiju, u zvanju istraživač-saradnik.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Analiza modaliteta citotoksičnog delovanja kompleksa na bazi platine (II), rutenijuma (III), hroma (III) i rodijuma (III) ispitivanjem na tumorskim ćelijama u kulturi

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

Brande Lonc Jandric

У Београду, ___9.12.2013_____

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Sandra S. Arandelović

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Analiza modaliteta citotoksičnog delovanja kompleksa na bazi platine (II),
rutenijuma (III), hroma (III) i rodijuma (III) ispitivanjem na tumorskim ćelijama u
kulturi**

- 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

У Београду, _____9.12.2013._____

Arandelović Sandra

Одбрањено

25 Мај 2006