



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Петар Чановић

**Антитуморски ефекат новосинтетисаних комплекса  
рутенијума(II) на туморске ћелије *in vitro***

докторска дисертација

ментор: др сци. мед. Иванка Зелен, ванредни професор

Крагујевац, 2017.

## ИНДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I Аутор</i></b>
Име и презиме: Петар Чановић
Датум и место рођења: 02.11.1989. Крагујевац
Садашње запослење: асистент на предмету Биохемија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
<b><i>II Докторска дисертација</i></b>
Наслов: Антитуморски ефекат новосинтетисаних комплекса рутенијума(II) на туморске ћелије <i>in vitro</i>
Број страница: 136
Број слика: 3 слике, 26 графикана, 4 табеле
Број библиографских података: 164
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): медицина, клиничка и експериментална биохемија
Ментор: проф. др Иванка Зелен, ванредни професор
<b><i>III Оцена и одбрана</i></b>
Датум пријаве теме: 29.12.2016.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: бр. IV-03-456/12 од 03.05.2017.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none"><li>1. проф. др Марина Митровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Биохемија</i>, председник;</li><li>2. проф. др Живадин Бугарчић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Неорганска хемија</i>, члан;</li><li>3. доц. др Соња Мисирлић Денчић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област <i>Медицинска и клиничка биохемија</i>, члан.</li></ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: <ol style="list-style-type: none"><li>1. проф. др Марина Митровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Биохемија</i>, председник;</li><li>2. проф. др Владислав Воларевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Микробиологија и имунологија</i>, члан;</li><li>3. проф. др Марија Миловановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Микробиологија и имунологија</i>, члан;</li><li>4. доц. др Соња Мисирлић Денчић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област <i>Медицинска и клиничка биохемија</i>, члан;</li><li>5. доц. др Маријана Станојевић Пирковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Биохемија</i>, члан.</li></ol>
Датум одбране дисертације:

## САЖЕТАК

**Увод:** Упркос успеху у лечењу различитих врста тумора, клиничка ефикасност цисплатине је веома ограничена развијањем резистенције тумора на лек. Комплекси рутенијума као антитуморски агенси највише обећавају, показујући цитотоксичну активност код тумора резистентних на цисплатину. Сматра се да ове особине једињења рутенијума потичу од њихове способности да имитирају начин везивања гвожђа за биомолекуле као што су хумани серум албумин и трансферин. Будући да туморске ћелије на својим мембранама повећано експримирају трансферинске рецепторе због повећане потребе за гвожђем, допремање комплекса рутенијума до канцерских ћелија је ефикасније у односу на друге комплексе метала.

**Циљ:** Студија се бави испитивањем потенцијалне цитотоксичности два новосинтетисана комплекса рутенијума: *Ru-1*, [Ru(Cl-Ph-tpy)(*o*-pda)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, *o*-pda = *o*-fenilendiamin) и *Ru-2*, [Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, phen = 1,10-fenantrolin) на следећим туморским ћелијама: *A549* – аденокарцином плућа, *MCF7* – карцином дојке, *HeLa* – карцином цервикса, *Hs 294T* – малигни меланом и на ћелијској линији здравих фибробласта *MRC-5* (контрола).

**Материјал и метод:** Цитотоксичност комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* на туморским и контролним, здравим ћелијама је одређивана МТТ методом. Тип ћелијске смрти као и релативни однос некротичне и апоптотичне смрти туморских ћелија изазване тестирањем комплекса испитиван је методом проточне цитометрије ћелија бојених *Annexin-ом V* и 7-аминоактиномицином *D*. Фазе ћелијског циклуса су одређиване методом бојења пропиридијум-јодидом. Активација и локализација кључних протеина укључених у процес апоптозе је одређена проточном цитометријом бојењем специфичним антителима.

**Резултати:** Цитотоксичност комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* је испитана на четири туморске ћелијске линије (*A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs294T*) и на здравим фибробластима (*MRC-5*). Наши резултати јасно показују значајно смањење вијабилности туморских ћелија. Такође, оба комплекса рутенијума су снажно индуковала апоптозу третираних ћелија са високим процентом апоптотских ћелија и занемарљивим процентом некротичних ћелија.

**Закључак:** Комплекси рутенијума(II) показују селективну антитуморску активност која је, у неким случајевима, и већа него цитотоксична активност цисплатине. Комплекси *Ru-1* и *Ru-2* готово да нису имали дејство на вијабилност фибробласта. Прецизни механизам деловања комплекса рутенијума(II) није у потпуности разјашњен. Међутим, показано је да оба комплекса смањују вијабилност туморских ћелија индукцијом апоптозе и заустављањем ћелијског циклуса у одређеној фази.

**Кључне речи:** комплекси рутенијума (II), антитуморски ефекат, цитотоксичност, апоптоза.

## ABSTRACT

**Introduction:** Ruthenium complexes might be very promising candidates as antitumor agents, showing activity in tumors which had developed resistance to cisplatin or in which cisplatin is inactive. This is believed to be due to the ability of ruthenium to mimic iron in binding to biomolecules, such as human serum albumin and transferrin. As cancer cells overexpress transferrin receptors, to satisfy their increased demand for iron, ruthenium-based drugs may be delivered more efficiently to cancer cells compared to other metal-based drugs.

**Objective:** The aim of our study was to investigate antitumor effect and the mechanism of action of two newly synthesized ruthenium complexes: Ru-1, [Ru(Cl-Ph-tpy)(*o*-pda)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-chlorophenyl)-2,2',6',2''-terpyridin, *o*-pda = *o*-phenylenediamine) and Ru-2, [Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-chlorophenyl)-2,2',6',2''-terpyridin, phen = 1,10-phenanthroline) against human cancer cell lines: A549 - lung cancer, MCF-7 - breast cancer, HeLa - cervical cancer, Hs 294T - melanoma and one non-cancerous cell line MRC-5 - healthy fibroblasts (control).

**Material and Methods:** The cytotoxicity of two newly synthesized Ru(II) polypyridyl complexes Ru-1 and Ru-2 on experimental and control group of cells was determined by the MTT assay. Apoptosis of both control and experimental group of tumor cells was estimated by annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/7-amino-actinomycin D (7-AAD) staining. The cell cycle distribution was determined using propidium iodide staining. The localization and activation of key apoptotic proteins (bax, bcl-2, cytochrome c and caspase-3) was determined by flow-cytometry.

**Results:** The cytotoxicity of two ruthenium(II) complexes 1 and 2 was evaluated in four human cancer cell lines (A549, MCF7, HeLa and Hs294T) and in one non-cancer cell line (MRC-5). Our results clearly showed significant decrease of cancer cells' viability compared to the viability of control, non-cancerous cells, with specific individual cell lines sensitivities. Both ruthenium complexes strongly induced apoptosis of treated cancer cells via intrinsic or mitochondrial pathway, with high percentages of apoptotic cells and negligible percentage of necrotic cells making these compounds suitable for further anticancer evaluation.

**Conclusion:** The newly synthesized ruthenium(II) complexes 1 and 2 showed selective anticancer activity against different types of cancer cells. In some cases, their activity is even higher than that of cisplatin in the same cells. Moreover, it is very important to delineate that these complexes had almost no effect in tested concentrations on viability of healthy cells *in vitro*. The precise mechanism of action of investigated ruthenium(II) complexes is not fully understood. However, our results showed that both complexes decreased viability of cancer cells by induction of apoptosis and/or by cell cycle arrest which implies their different mechanism of action on different types of cancer cells.

**Key words:** ruthenium(II) complexes, antitumour effects, cytotoxicity, apoptosis.

*Мојој мајци, бака Ради и стрицу Живадину*

*"Оно што води и вуче свет,  
нису локомотиве него идеје"*

*Виктор Иго*

*Велику захвалност дугујем свом ментору, проф. др **Иванки Зелен** на указаном поверењу, саветима и несебичној помоћи у успешној изради докторске дисертације.*

*Захвалност дугујем доц. др **Милану Зарићу** на смерницама, несебичној стручној помоћи и моралној подршци током реализације тезе.*

*За велику помоћ у изради докторске дисертације захвалност дугујем проф. др **Марини Митровић** као и свим колегама са катедре за Биохемију Факултета медицинских наука у Крагујевцу.*

# Садржај

1. Увод.....	1
1.1. Канцерогенеза .....	2
1.2. Учесталост тумора .....	5
1.2.1. КАРЦИНОМ ПЛУЋА .....	6
1.2.2. КАРЦИНОМ ДОЈКЕ .....	7
1.2.3. КАРЦИНОМ ГРЛИЋА (ЦЕРВИКСА) МАТЕРИЦЕ.....	9
1.2.4. МАЛИГНИ МЕЛАНОМ .....	10
1.3. Ћелијске линије .....	11
1.4. Програмирана ћелијска смрт.....	13
1.4.1. Типови програмиране ћелијске смрти.....	13
1.4.2. Апоптоза .....	13
1.4.3. Механизам апоптозе.....	14
1.5. Ћелијски циклус .....	20
1.5.1. $G_1/S$ ФАЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА .....	21
1.5.2. $G_2/M$ ФАЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА .....	22
1.6. Лекови у хемиотерапији малигнитета .....	23
1.7. Комплекси метала у медицини .....	25
1.8. Комплекси метала у терапији малигнух тумора.....	26
1.9. Комплекси платине .....	26
1.10. Комплекси рутенијума .....	29
2. Циљеви и хипотезе студије .....	32
3. Материјал и методе.....	33
3.1. Врста студије.....	33
3.2. Култивација ћелија.....	33
3.3. Варијабле истраживања.....	33
3.4. <i>MTT</i> тест.....	34
3.5. ANNEXIN V-FITC тест апоптотичности.....	36
3.6. Анализа ћелијског циклуса.....	36

3.7. Имуноцитохемијска бојења специфичним антителима за <i>Bax</i> , <i>Bcl-2</i> , цитохром <i>c</i> и активну каспазу-3 .....	37
3.8. Евалуација проточном цитометријом .....	38
4. Резултати.....	39
4.1. Комплекси рутенијума(II) и цисплатина смањују вијабилност туморских ћелија .....	39
4.1.1. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија епителног аденокарцинома плућа <i>A549</i> .....	39
4.1.2. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија карцинома дојке <i>MCF7</i> .....	47
4.1.3. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија карцинома цервикса <i>HeLa</i> .....	56
4.1.4. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија малигног меланома <i>Hs 294T</i> .....	65
4.2. Комплекси рутенијума(II) смањују вијабилност туморских ћелија индукцијом апоптозе.....	74
4.2.1. Комплекси рутенијума и цисплатина индукују апоптозу ћелија епителног аденокарцинома плућа <i>A549</i> .....	75
4.2.2. Комплекси рутенијума и цисплатина индукују апоптозу ћелија карцинома дојке <i>MCF7</i> .....	77
4.2.3. Комплекси рутенијума и цисплатина индукују апоптозу ћелија карцинома цервикса <i>HeLa</i> .....	79
4.2.4. Комплекси рутенијума и цисплатина индукују апоптозу ћелија малигног меланома <i>Hs 294T</i> .....	81
4.3. Комплекси рутенијума(II) утичу на ћелијски циклус туморских ћелија .....	84
4.3.1. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус <i>A549</i> ћелија епителног аденокарцинома плућа.....	84
4.3.2. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус <i>MCF7</i> ћелија карцинома дојке.....	87
4.3.3. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус <i>HeLa</i> ћелија карцинома цервикса .....	89
4.3.4. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус <i>Hs 294T</i> ћелија малигног меланома.....	91
4.4. Комплекси рутенијума индукују апоптозу туморских ћелија активацијом унутрашњег, митохондријалног сигналног пута апоптозе.....	94



5. Дискусија .....	100
6. Закључци.....	123
7. Литература.....	124

## 1. Увод

Термин „тумор“ се у медицини користи да означи увећање ткива које не мора увек бити неопластично, као што је случај код гранулома. Неопластични процес подразумева нови и неконтролисан раст ћелија који није регулисан физиолошким механизмима. Неоплазме су промене које су класификоване као бенигне или малигне на основу морфологије, степена диференцијације, инвазивности и функционалних карактеристика ћелија које их изграђују. Сам термин „карцином“ означава малигну лезију са абнормалним растом ћелија које имају тенденцију да се прошире на остале делове тела (1).

Упркос великом напретку у дијагностици и терапији малигну болести последњих година, карцином је водећи узрок смрти у развијеним земљама, док је у земљама у развоју други водећи узрок смрти, одмах након кардиоваскуларних болести. У свету је 2012. године дијагностиковано 14 милиона нових пацијената који болују од малигнитета. Такође, малигне болести су у свету узроковале 8,2 милиона смрти током 2012. године, при чему је за 25% већа инциденца оболелих од карцинома код мушког пола у односу на жене (2). Према подацима Националног института за канцер (енг. *NCI, National Cancer Institute*) од 20. марта 2017. године, само у Сједињеним Америчким Државама је у 2016. години дијагностиковано око 1,7 милиона нових пацијената оболелих од малигну тумора, а скоро 600.000 људи је преминуло. Инциденца, односно број новооткривених пацијената који болују од малигну тумора у Сједињеним Америчким Државама је 454,8 на 100.000 одраслих особа годишње, према подацима од 2008-2012. године. Такође, број пацијената који премину од малигнитета у Сједињеним Америчким Државама је 171,2 на 100.000 одраслих особа према подацима из истог периода. Током 2014. године је дијагностиковано 15.780 нових случајева малигну тумора код деце и адолесцената до 19 година, а 1960 особа до 19 година је преминуло током 2014. године у Сједињеним Америчким Државама. Поред тога, поражавајуће делује процена Националног института за канцер, да ће се код 39,6% одраслих особа током живота појавити малигни тумор (3).

У Србији је од 1999. до 2009. године, забележен значајан пораст инциденце и mortalитета оболелих од малигну тумора, а забележене су и алармантно високе стопе mortalитета оболелих од различитих типова малигнитета у односу на остатак Европе. У 2008. години, Србија је, у односу на остале земље Европе, имала највећи mortalитет

оболелих од малигнитета дојке, док је по инциденци цервикалног карцинома била на другом месту, одмах иза Румуније. Код мушкараца, у Србији, су забележене стопе морталитета за малигни тумор плућа и колоне знатно изнад просека у Европи, док је једино инциденца карцинома простате била испод европског просека за 2008. годину (4).

Јасно је да малигни тумори представљају озбиљан здравствени проблем у целом свету, нарочито ако се у обзир узме процена да ће до 2030. године број особа које премину од малигнитета, порастати на 13 милиона годишње (3). Услед тога је важно разумети факторе који узрокују процес настанка малигнух тумора, односно процес канцерогенезе, како бисмо ефикасније покушали да пронађемо начин за њихово лечење.

## **1.1. Канцерогенеза**

Канцерогенеза представља процес трансформације здравих ћелија у канцерогене, услед акумулације генских грешака у молекулу ДНК, чиме се ремети механизам пролиферације ћелије и репарације грешака у структури ДНК. Највећа оштећења ДНК молекула током репликације су мутације, односно промене у секвенцама нуклеотида ДНК (5, 6). Мутације у молекулу ДНК могу бити последица случајних грешака током процеса репликације, као и изложености ДНК карциногенима и/или могу настати услед неефикасних механизма репарације молекула ДНК (5). За малигну трансформацију ћелије није довољна лезија једног појединачног гена, већ је потребно да се догоди неколико сукцесивних мутација које ћелија није у могућности да поправи механизмима репарације (7, 8). Услед малигне трансформације, долази до сталне, патолошке и неконтролисане пролиферације ћелија (9).

За настанак малигне трансформације ћелије кључни су поремећаји у грађи и функцији гена који регулишу пролиферацију ћелије. Гени, чији су протеински производи одговорни за промоцију физиолошког раста ћелија називају се протоонкогени. Мутацијом протоонкогена настају онкогени, а молекули протеина који се синтетишу на основу информације забележене у онкогенима, називају се онкопротеини. Онкогени су први гени који су повезивани са малигном трансформацијом ћелија (10). Онкопротеини стимулишу деобу ћелија, инхибирају диференцијацију ћелија и спречавају ћелијску смрт. Сви ови процеси су важни за физиолошки раст и развој ткива и органа. Транскрипција онкогена међутим, доводи до повећане синтезе онкопротеина што има за последицу убрзање

ћелијске деобе, смањење диференцијације ћелија и инхибицију ћелијске смрти. Овако измењена ћелија поседује карактеричан фенотип малигне ћелије. Стога су онкогени кључни молекули који се данас узимају у разматрање приликом дизајна нових лекова у терапији против малигнитета. Неки од лекова који су синтетисани тако да делују инхибирајуће на транскрипцију онкогена су трастузумаб који делује на *HER-2* онкоген код карцинома дојке и иматиниб који делује на *BCR/ABL* онкоген код хроничне мијелоидне леукемије (11).

Насупрот онкогенима, постоје и тумор-супресорски гени који заустављају ћелијски циклус и на тај начин омогућавају поправку грешака у грађи молекула ДНК. Губитак функције тумор-супресор гена је веома битан у процесу малигне трансформације ћелија, јер уколико се јави губитак функције ових гена то за последицу има неконтролисани ћелијски раст (10). Тумор-супресор гени се активирају услед оштећења молекула ДНК, хетероплоидије или повећане активности онкогена и руководе ћелијским одговорима на стрес као што су процеси заустављања ћелијског циклуса и процес апоптозе. Неки од тумор-супресор гена су *TP53* и *RB1* (ретинобластома 1 ген) (12, 13). Ген *TP53* и његов протеински продукт *p53*, су битни за одговор ћелије на различите стресогене факторе почев од рибозомалних до метаболичких фактора (13). Соматске мутације гена *TP53* се јављају код већине канцера, па се стога ген *TP53* назива и „чуваром” генома. У здравим ћелијама, експресија протеина *p53* је значајно ниска захваљујући *p53*-интерагујућем протеину *MDM2* (енг. *Mouse double minute 2 homolog*). Протеин *MDM2* је убиквитинска лигаза која стимулише убиквитинизацију и протеозомалну деградацију протеина *p53*. Протеин *p53* се везује за молекулу ДНК, што доводи до активације контролних тачака ћелијског циклуса (енг. *checkpoint activation*). Активацијом контролних тачака ћелијског циклуса под дејством протеина *p53*, може доћи или до заустављања ћелијског циклуса и активације протеина који репарирају молекулу ДНК или до иницијације апоптозе, уколико је оштећење ДНК молекула непоправљиво (12).

Тумор-супресор ген *RB1* и припадајући му протеин *pRB*, регулишу прелазак ћелије из *G<sub>1</sub>* у *S*-фазу ћелијског циклуса репресијом *E2F* транскрипционих фактора који стимулишу експресију гена одговорних за прогресију ћелијског циклуса (12, 14). *E2F* транскрипциони фактори активирају циклин *D1* механизмом позитивне повратне спреге, што резултује проласком ћелије кроз *S*-фазу ћелијског циклуса (12). Ген *RB1* је први

тумор-супресор ген чија је молекулска структура потпуно разјашњена. Мутације овог гена се јављају код скоро свих фамилијарних и спорадичних форми ретинобластома, а различите мутације овог гена су присутне и код других хуманих карцинома што указује на његов значај у процесу канцерогенезе (14).

Промене на молекулу ДНК, такође, могу настати и услед дејства различитих вируса који се повезују са настанком различитих типова канцера. Експериментално је показано да ретровируси, који припадају РНК вирусима, могу да изазову туморе код животиња, али није утврђена њихова значајнија улога у малигној трансформацији хуманих ћелија (15). Изузетак је Хумани-Т ћелијски вирус (енг. *Human T-lymphotropic virus, HTLV*), ретровирус који је главни узрок настанка хуманог Т-ћелијског лимфома. За разлику од РНК вируса, ДНК вируси су много више заступљени у патогенези хуманих малигнитета. Хумани папилома вируси (енг. *human papillomavirus, HPV*) представљају главни узрок настанка карцинома грлића материце, док вируси хепатитиса *B* и *C* имају кључну улогу у етиопатогенези хепатоцелуларног карцинома (16).

Осим поремећаја у грађи и функцији гена који регулишу пролиферацију ћелије, постоји још један битан фактор који утиче на раст укупне туморске масе. Туморске ћелије су метаболички изразито активне и за своју активност захтевају велику количину кисеоника и хранљивих материја. Стога, ангиогенеза као сложен процес у коме долази до развоја нових крвних судова, представља кључни фактор за раст туморске масе. Развој нових крвних судова, настаје као одговор на повећане потребе туморских ћелија за хранљивим материјама и кисеоником у односу на здраве, малигно неизмењене ћелије. Осим што има кључну улогу везану за раст туморске масе, ангиогенеза је такође веома битан процес који омогућава малигним ћелијама да метастазирају у друга ткива (17).

Метаболизам малигних ћелија је такође измењен у односу на метаболизам здравих ћелија. Неконтролисана пролиферација малигно трансформисаних ћелија доводи до убрзаног енергетског метаболизма, како би малигне ћелије могле несметано да расту и неконтролисано да се деле. У аеробним условима, здраве ћелије метаболишу глукозу до пирувата процесом гликолизе који се одвија у цитосолу. Затим се тако настали молекули пирувата пребацују у матрикс митохондрија и у присуству молекула кисеоника, процесом оксидативне декарбоксилације конвертују до ацетил-коензима А, који се метаболише до угљен-диоксида циклусом трикарбоксилних киселина. Ото Варбург је 1930. године први

приметио разлику између метаболизма здравих ћелија и метаболизма малигнућих ћелија. Први је доказао да и у присуству кисеоника, малигнуће ћелије „репрограмирају” метаболизам глукозе у анаеробну гликолизу, што се назива "Варбургов ефекат" (18). Доказано је да је Варбургов ефекат присутан и у многим брзорастућим ембрионалним ткивима, у којима се јавља интензивна пролиферација (19). Аеробним метаболизмом глукозе у митохондријама се производи 15 пута већа количина енергије у односу на анаеробну гликолизу, тако да малигнуће ћелије овај дефицит енергије компензују повећавајући експресију транспортера за молекулу глукозе, првенствено *GLUT1* транспортних протеина, који омогућава улазак глукозе у цитоплазму (20). На тај начин, малигнућо измењене ћелије троше велику количину глукозе и других хранљивих материја које су потребне и осталим, малигнућо неизмењеним ћелијама за функционисање. Стога, малигнућо неизмењене ћелије, са растом туморске масе, добијају све мање хранљивих материја (18, 20). Додатни чинилац који доприноси „гладовању“ здравих ћелија и ткива је и настанак секундарних, удаљених тумора, односно метастаза (20).

Метастазе представљају секундарне туморе, који су настали од иницијалног или примарног тумора на неком удаљеном месту у односу на примарни тумор. Малигнуће ћелије се могу одвојити од примарног тумора и тако доспевају на неко друго место у организму путем крвотока, лимфотока или одвајањем у телесне шупљине. Заправо, основни узрок морталитета и морбидитета људи оболелих од канцера су метастазе које и представљају највећи проблем у терапији малигнитета (20).

## 1.2. Учесталост тумора

Према локализацији, најчешћи малигнитет који се јавља и код мушкараца и код жена је карцином плућа. Око 15% мушкараца и 14% жена од укупног броја новооткривених пацијената који болују од малигнућих тумора сваке године оболели од карцинома плућа (21). Код жена се најчешће дијагностикује и карцином дојке, од кога оболели свака осма жена, затим карцином цервикса, који је четврти најчешћи тумор код жена у Сједињеним Америчким Државама (21, 22). Један од типова малигнитета који се релативно често јавља и који има изузетно високу стопу морталитета пацијената је меланом. Око 2% Американаца ће оболети од меланома током живота, што ће резултовати бројем од 65% преминулих особа који оболели од тумора коже (21).

### 1.2.1. КАРЦИНОМ ПЛУЋА

Карцином плућа је водећи узрок смрти у свету међу оболелима од малигнух болести, јер око 1,4 милиона људи у свету умире од овог тумора сваке године (23). У Сједињеним Америчким Државама карцином плућа је најчешћи облик малигнитета, са преко 219.000 дијагностикованих нових случајева и преко 159.000 смртних случајева забележених током 2009. године (24). Током последњих четрдесет година, стопа преживљавања је незнатно повећана, а главни разлог је касно постављање дијагнозе карцинома плућа у одмаклој фази болести када терапија није ефикасна (23, 25). У тренутку постављања дијагнозе, 80% оболелих са карциномом плућа има метастазе на костима, јетри, лимфним чворовима и мозгу (25).

Тачан узрочник карцинома плућа није познат. Разни респираторни иританси, пушење, аерозагађење, експозиција хемијским агенсима и зрачењима, повећавају ризик обољевања од карцинома плућа (26, 27). Код пушача ризик за настанак карцинома плућа је 5 до 10 пута већи него код непушача, 80% оболелих од немикроцелуларног карцинома плућа и чак 98% оболелих од микроцелуларног карцинома плућа су пушачи (26, 28).

Симптоматологија карцинома плућа зависи од локализације тумора, начина интраторакалног раста, хематогених метастаза и паранеопластичног синдрома. Уколико је тумор централно локализован симптоми су везани за опструкцију бронха, а код периферно локализованих тумора симптоми су везани за плеуру и торакални зид. Рани и најчешћи симптом болести је кашаљ, који може бити сув, иритативан или продуктиван са пурулентном експекторацијом због опструкције бронха тумором и дисталне инфламације. Такође, хемоптизије су чест симптом код тумора локализованих у већим бронхиима (24, 26). Диспнеја је један од главних симптома и јавља се углавном код тумора који су локализовани у главним и лобарним бронхиима. Уколико се јављају понављане хемоптизије и рецидивирајуће пнеумоније код пушача, такође можемо посумњати на карцином плућа. Због афекције плеуре и инвазије коштане структура тумором, као чест симптом јавља се бол. Код пацијената са карциномом плућа, могу се јавити и општи симптоми као што су губитак апетита, губитак телесне масе, замор и повишена температура (23, 29). Хематогене метастазе карцинома плућа се најчешће налазе у костима (33%), мозгу (28,4%), надбубрежној жлезди (16,7%) и јетри (13,4 %) (26, 30, 31).

У циљу постављања поуздане и тачне дијагнозе карцинома плућа као и због планирања терапије неопходна је хистолошка или цитолошка потврда дијагнозе карцинома. Најважнији дијагностички поступак за детекцију канцерогених лезија у плућима и дијагнозу карцинома је бронхоскопија (32). Дијагностиковање карцинома плућа се може заснивати и на цитолошком прегледу испљувка и плеуралног излива, али без услова за диференцирање типа тумора (26).

Могућности за лечење карцинома плућа су релативно ограничене јер већина пацијената оболелих од карцинома плућа у тренутку постављања дијагнозе има системске метастазе. Услове за хирушко лечење има свега 15% до 20% болесника, а постопетративно лечење се може наставити радиотерапијом или цитостатицима. Основни вид лечења иноперабилних карцинома је радиотерапија. С друге стране, системском хемотерапијом се може постићи привремена потпуна регресија тумора. Цитостатици који су показали највећи успех у терапији карцинома плућа су циклофосфамид, доксорубицин, етопозид и цисплатина. Ипак, најбоље резултате у терапији карцинома плућа показује комбинација хемотерапије и радиотерапије (26).

### 1.2.2. КАРЦИНОМ ДОЈКЕ

Карцином дојке представља малигну пролиферацију епителних ћелија које облажу каналиће (дуктусе) и режњиће (лобусе) дојке. Епителне неоплазме дојке су најчешће дијагностиковани малигни тумори код жена и чине приближно једну трећину свих врста дијагностикованих малигнух тумора код жена (33, 34). Број оболелих од карцинома дојке је удвостручен у временском периоду од 1975. до 2000. године, што се може приписати повећању животног века жена као и повећаној изложености факторима ризика (33, 35). Око 1,38 милиона новооболелих са карциномом дојке дијагностиковано је у 2008. години, а чак 60% смртних случајева код жена оболелих од овог малигнитета је забележено у слабије развијеним земљама (36).

Герминативне мутације постоје код око 10% жена са карциномом дојке. Тумор-супресор ген *BRCA 1* је идентификован на хромозомском локусу *17q21* и протеински продукт овог гена има главну улогу у контроли ћелијског циклуса и поправци оштећеног ДНК молекула (37). Уколико жена наследи мутирани алел *BRCA 1* гена, имаће 40% до 80% већи ризик да оболи од карцинома дојке до 70. године живота (38). Такође, мутација гена *BRCA 2* који је локализован на хромозому *13q12*, се везује за повећану инциденцу



карцинома дојке и код жена и код мушкараца (36, 37, 38). Ген *BRCA 2* има сличну функцију коју има и *BRCA 1* ген (37).

Осим генских, фактори ризика за настанак карцинома дојке могу бити и хормонске природе. Мањи ризик од настанка карцинома дојке имају жене које су прву менструацију имале у 16. години у односу на оне које су прву менструацију добиле са 12 година (36, 39). Такође, свако одлагање, односно каснија појава менопаузе за годину дана за 3% повећава ризик од настанка карцинома дојке, док каснија појава менопаузе за 5 година за 17% повећава ризик од настајања карцинома дојке у односу на жене код којих менопауза наступа у физиолошком оквиру од 48. до 55. године. Код жена које изнесу трудноћу пре 18. године смањен је ризик за настанак карцинома дојке за 30% до 40% у односу на жене које нису рађале (39, 40).

Улога исхране, као једног од узрочника за настанак карцинома дојке, је јасно показана на анималним моделима болести (41, 42). Гојазност изазвана прекомерним уносом масти код животиња повећава ризик за настанак неколико врста карцинома, укључујући и карцином дојке (42). Показано је да је код жена које су у постменопаузи и имају повећан индекс телесне масе (енг. *Body Mass Index BMI*), ризик од настанка карцинома дојке већи у односу на жене са индексом телесне масе који указује на физиолошку ухрањеност (41, 43). Такође, показано је, да егзогена примена хормона, нарочито код жена које користе оралне контрацептиве и постменопаузалну супституциону хормонску терапију, може да допринесе настанку карцинома дојке (енг. *Hormone Replacement Therapy, HRT*). Жене које су користиле *HRT* имају већи ризик од настанка карцинома дојке од жена које нису узимале ову терапију (44). Насупрот томе, примена оралних контрацептива не доприноси настанку карцинома оваријума, а ови лекови пружају и значајну заштиту од епителијалних тумора јајника и ендометријалног карцинома код жена које их користе у односу на жене које не узимају оралне контрацептиве (16).

Дијагностички поступци за карцином дојке обухватају клинички преглед, мамографију код жена после четрдесете године живота и ултрасонографију пре четрдесете године живота (36, 45). Лечење карцинома дојке обухвата радиотерапију, хормонску терапију и хемотерапију. Од хемотерапеутика који се користе у терапији карцинома

дојке, треба споменути доксорубицин, циклофосфамид, паклитаксел, флуороурацил, метотрексат и цисплатину.

### 1.2.3. КАРЦИНОМ ГРЛИЋА (ЦЕРВИКСА) МАТЕРИЦЕ

Карцином грлића материце је други по учесталости узрок смрти код жена. Сваке године се дијагностикује просечно око 500.000 нових случајева жена оболелих од карцинома грлића материце, а морталитет износи око 280.000 годишње (46).

Важну етиолошку улогу код настанка карцинома грлића материце има венерична трансмисија хуманог папилома вируса (енг. *human papillomavirus*, *HPV*) (46, 47). Хумани папилома вируси спадају у групу ДНК вируса и изоловани су код 95% пацијенткиња са дијагностикованим карциномом грлића материце (48). Укупно, преко 66 типова *HPV* вируса је изоловано и многи од њих су значајни за патогенезу гениталних папилома. Онкогени типови *HPV* вируса који имају улогу у настанку карцинома грлића материце су 16, 18, 31, 45, 51, 52 и 53 (48). Хумани папилома вируси кодирају 8 до 10 протеина који имају улогу у регулацији транскрипције и транслације у зараженим ћелијама (49). Протеински продукти *HPV-16* и *HPV-18* вируса, *E6* и *E7* ремете ћелијски циклус домаћина, везивањем и инактивирањем тумор-супресор гена и циклин-зависних киназа (48, 49). Протеин *E7* у својој структури има око 100 аминокиселина, везује и инактивира тумор-супресор ген *RB* и на тај начин омогућава неконтролисано дељење ћелија (50). Продукт *HPV-18* вируса, протеин *E6* у својој структури садржи 150 аминокиселина и има способност да веже и инактивира тумор-супресор ген *p53* (48, 49, 51). Протеини *E6* и *E7* су неопходни и довољни да изазову малигну трансформацију ћелије *in vitro*. Некомпликована *HPV* инфекција доњег гениталног тракта и кондилوماتозна атипичја грлића материце могу прогредирати у карцином грлића материце.

Симптоми карцинома цервикса код жена су најчешће неуобичајено или посткоитално тачкасто крварење, које се може развити у обилна крварења између менструација или током њих (54).

Карцином грлића материце *in situ* успешно се лечи конизацијом или абдоминалном хистеректомијом. Код пацијенткиња са локално одмаклом болешћу, хемиотерапија на бази платинских препарата (цисплатина), примењена истовремено са зрачном терапијом, доводи до дужег преживљавања у поређењу са терапијском процедуром која обухвата само зрачење. Као терапија најчешће се примењује 5-флуороурацил у комбинацији са

цисплатином од првог до петог дана зрачне терапије. Овом процедуром се смањује ризик од релапса од 30% до 50% (54).

#### **1.2.4. МАЛИГНИ МЕЛАНОМ**

Меланом представља малигни тумор који настаје из меланоцита, пигментних ћелија коже (55). Број пацијената оболелих од малигног меланома се сваке године повећава више него број пацијената оболелих од било ког другог облика карцинома (55, 56). Највећа стопа обољевања од малигног меланома је у Аустралији и Новом Зеланду, где је забележено 40 до 60 случајева оболелих на 100.000 становника (57). Меланом се може дијагностиковати код особа било које старости, врло често и код тинејџера, што није тако чест случај са другим карциномима. У последњих неколико година стопа преживљавања код пацијената код којих је дијагностикован малигни меланом је повећана, јер су клиничке карактеристике овог тумора јасно дефинисане, тако да се може детектовати и третирати на време, пре него што болест значајно унапредује (57).

Сматра се да је један од главних разлога повећане инциденце малигног меланома последњих година, повећано излагање сунчевом зрачењу посебно у млађем животном добу. Повећан ризик од појаве малигног меланома имају особе светле пути чија кожа теже потамни и које лако добијају опекотине приликом сунчања (58). Такође, особе са повећаним бројем „гигантских” конгениталних невуса и атипичних, диспластичних невуса имају повећан ризик да оболе од малигног меланома у односу на особе које немају овакве промене (58, 59). Мањи ризик да оболе од малигног меланома имају тамнопуте особе и припадници оријенталне расе од особа светле пути (55, 60).

Постоје четири типа меланома коже: акрални лентиринозни меланом, лентиго малигни меланом, суперфицијално ширећи меланом и нодуларни меланом (55, 58).

Акрални лентиринозни меланом настаје услед малигне трансформације меланоцита који су локализовани у базалном слоју епидерма коже. Термин „акрални” се односи на локализацију овог типа меланома који захвата најчешће шаке, стопала, прсте и нокте. Овај тип меланома среће се претежно код старијих особа, односно особа које имају преко 60 година, а промене које се јављају на кожи су у виду полицикличких браон флека (58, 61).

Лентиго малигни меланом се јавља на деловима тела који су експонирани сунцу. Овај облик малигног меланома представља површинску преинвазивну форму из које се у каснијој фази може развити инвазивни лентиго малигни меланом. Промене на кожи су у

облику тамнобраон флека које могу бити величине неколико милиметара до неколико центиметара (58).

Суперфицијално ширећи меланом је облик који се најчешће јавља код особа са дијагнозом малигног меланома. Туморске ћелије се углавном налазе у граничној (јункционој) зони између епидермиса и дермиса, делимично изнад и испод базалне мембране, али је такође присутна и дифузна инвазија епидермиса. Суперфицијално ширећи меланом је најчешће локализован на дорзуму стопала (62).

Нодуларни меланом за разлику од прва три облика меланома, нема радијалну фазу ширења и представља дубоки инвазивни тумор, са способношћу стварања метастаза. Овај облик меланома не расте хоризонтално већ вертикално што доводи до инвазије дубљих слојева коже (16).

Симптоматологија код појаве малигног меланома је врло дискретна и карактеристична. У око 70% случајева, пацијенти уочавају повећање или промене у боји посматране лезије на кожи. Може се јавити и промена облика лезије и појава нових промена око малигно измењене промене на кожи. Касни знаци малигног меланома су крварење, улцерација и бол (63).

Код узнапредовалог облика малигног меланома, који није хирушки решив, корист од терапије лековима се мери степеном регресије тумора, односно временом које прође до прогресије болести и трајањем преживљавања без симптома. Системска терапија узнапредовалог меланома је испробана са свим агенсима за лечење канцера током последњих 50. година. До недавно, није било забележено значајно продужење живота ни са једним од хемиотерапијских лекова јер су меланоми веома резистентни на хемиотерапеутике који су се до скоро примењивали. Свеобухватна национална мрежа за канцер (енг. *National Comprehensive Cancer Network*) тренутно препоручује ипилумумаб, вемурафениб, дабрафениб и високе дозе интрелеукина-2 (*IL-2*) као прву терапијску опцију код пацијената оболелих од меланома градуса 4 (64). Стога је потрага за новим агенсима који могу да делују терапијски на ћелије меланома и даље веома актуелна.

### 1.3. Ћелијске линије

Претклинички модели, као што су ћелијске линије, су веома корисни у предвиђању одговора туморског и здравог ткива на тестирану супстанцу. Примена ћелијских линија тј. гајених туморских ћелија *in vitro* да би се проучиле варијације у одговору туморских

ћелија на лек има велики број предности. Ћелијске линије су обновљив ресурс и кроз доступне јавне базе података имамо увид у особине ћелијских линија. Стога је први корак у испитивању антитуморског потенцијала нових супстанци, тестирање дејства тих супстанци на туморске ћелије *in vitro* (65). Прва туморска ћелијска линија која је пропагирана је била *HeLa*, изолована из карцинома цервикса пацијенткиње Хенријете Лакс, 1951. године. Након тога је успостављено и пропагирано више стотина туморских ћелијских линија. Неке од туморских ћелијских линија које се користе у испитивању антитуморског потенцијала нових агенаса су *A549* ћелије аденокарцинома плућа, *MCF7* ћелије карцинома дојке и *Hs 294T* ћелије малигног меланома. Ћелије *A549* воде порекло из базалних алвеоларних епителних ћелија хуманог аденокарцинома плућа који је хируршким путем одстрањен из 58-годишњег пацијента. Ћелије *MCF7* (енг. *Michigan Cancer Foundation-7*) су изоловане из плеуралног пунктата 69-годишње пацијенткиње оболеле од инвазивног дукталног карцинома дојке. Ћелије *Hs 294T* су изоловане из метастазе у лимфном чвору 56-годишњег пацијента оболелог од меланома (66).

Истраживачи који испитују *in vitro* антитуморску активност неке супстанце често превиђају оно што је оболелима заиста потребно. Оболелима су потребни лекови који убијају туморске ћелије, а при терапијским концентрацијама не утичу на здраве ћелије. Стога се, осим туморских ћелијских линија, за испитивање антитуморског потенцијала неке супстанце користе и ћелије здравог ткива као што је *MRC-5* ћелијска линија фибробласта. Да би нека супстанца која је кандидат за лек, била укључена у претклиничке *in vivo* студије, потребно је да током претклиничких *in vitro* студија делује селективније од лека који се стандардно примењује у терапији малигнитета. Односно, потребно је да антитуморски агенс делује цитотоксично на туморске ћелије, а да при истим тестираним концентрацијама делује значајно слабије на здраве ћелије. Тек након тога, за одређену супстанцу можемо да кажемо да поседује антитуморски потенцијал који је вредан даљег истраживања (67).

Поремећаји на нивоу експресије тумор-супресор гена и повишена експресија онкогена доводе до канцерогенезе. Услед промене у експресији тумор-супресор гена, као и појаве онкогена ремети се нормално функционисање ћелија односно ремете се два битна и уско повезана физиолошка процеса у ћелији. То су процеси програмиране ћелијске смрти и ћелијски циклус (68).

## **1.4. Програмирана ћелијска смрт**

Термин програмирана ћелијска смрт се искључиво користи као синоним за процес апоптозе, а сада је познато да програмирана ћелијска смрт подразумева и типове смрти као што су аутофагија и програмирана некроза. Апоптоза, аутофагија и програмирана некроза су контролисани процеси од стране генски кодираних сигнала или унутрашњих биохемијских процеса у ћелији (69).

### **1.4.1. Типови програмиране ћелијске смрти**

Први аутори који су описали апоптозу или тип 1 програмиране ћелијске смрти су били Кар и сарадници (70). Код типа 1 програмиране ћелијске смрти је уочено да процес карактеришу специфичне морфолошке и биохемијске промене као што су скупљање ћелије, кондензација и фрагментација једра, стварање протрузија на ћелијској мембрани и одвајање апоптотичних ћелија од суседних ћелија и екстрацелуларног матрикса (70, 71). Процес апоптозе карактеришу одређени биохемијски догађаји који обухватају разлагање једарног хроматина на фрагменте, излагање фосфатидилсерина на спољашњу страну ћелијске мембране и протеолизу специфичних ћелијских протеина у унутрашњости ћелије под дејством специфичних протеаза (72, 73).

Аутофагију или тип 2 програмиране ћелијске смрти карактерише формирање аутофагозома који се састоје из двослојне мембране која окружује цитоплазматске макромолекуле и органеле предодређене за рециклирање (74). Током периода недостатка хранљивих материја и одсуства фактора раста, процес аутофагије има кључну улогу у преживљавању ћелија.

Тип 3 програмиране ћелијске смрти је програмирана некроза, током које долази до бубрења ћелија, поремећаја функције ћелијских органела и лизе ћелија (74).

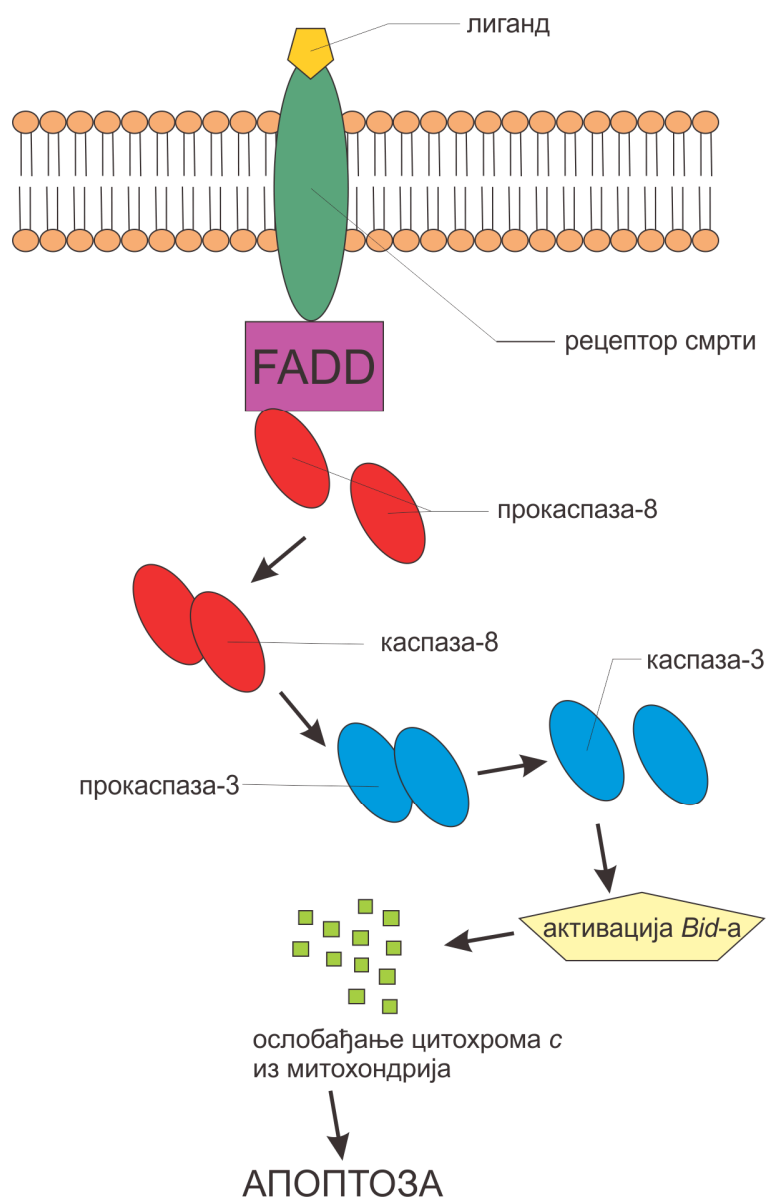
### **1.4.2. Апоптоза**

Апоптоза представља облик програмиране ћелијске смрти, у коме кључну улогу имају унутарћелијске каспазе које делујући на своје унутарћелијске супstrate активирају процес апоптозе у ћелији. Услед активације процеса апоптозе долази до кондензације цитоплазме и једра, раздвајања хроматина, формирања апоптотичних телашаца при чему је очуван интегритет ћелијске мембране, али долази до формирања протрузија. У процесу апоптозе не долази до имунског одговора (75). Карактеристике ћелије у апоптози се

разликују у зависности да ли се ћелија налази у раном или касном стадијуму апоптозе. Уколико се ћелија налази у раном стадијуму апоптозе, активираће се механизми који могу поправити настала оштећења. Када се ћелија налази у стадијуму касне апоптозе она подлеже смрти због немогућности поправке насталих оштећења (76-78). Ћелија у почетној фази апоптозе губи контакт са околним ћелијама, смањује се и долази до формирања протрузија на ћелијској мембрани (76, 78). Као последица кондензације хроматина настаје пикноза, која представља најкарактеристичнију промену у апоптози. Затим, на ћелијској мембрани долази до формирања протрузија и до цепања једра и раздвајања ћелијских фрагмената чиме се формирају апоптотска телашца. У својој структури апоптотска телашца садрже делове цитоплазме у којој се налазе спаковане органеле са или без делова једра. Комплетна структура органела је очувана и сав садржај је обавијен ћелијском мембраном. Ћелије које фагоцитују апоптотска телашца не продукују инфламаторне цитокине, садржај апоптотских телашца се не ослобађа у спољашњу средину, из тог разлога не долази до инфламаторне реакције (79).

### **1.4.3. Механизам апоптозе**

Да би се процес апоптозе у ћелији покренуо, неопходна је активација једног од два основна сигнална пута, или активација сигналног пута рецептора смрти или унутрашњег митохондријалног пута. Познато је да су оба сигнална апоптотска пута у ћелији узајамно повезана преко митохондрија. Приликом активације било спољашњег било унутрашњег сигналног пута апоптозе долази до промене у експресији кључних регулаторних протеина апоптозе као што су антиапоптотски *Bcl-2* протеин и проапоптотски *Bax* протеин што последично доводи до промене у пермеабилност митохондријалне мембране, а као крајњи резултат долази до активације каспазе-3 и последичне фрагментације молекула ДНК, деградације цитоскелета и једарних протеина, формирања апоптотских телашца и финално њихове фагоцитозе од стране макрофага (79).



Слика 1. Спољашњи пут апоптозе (74).

#### 1.4.3.1. СПОЉАШЊИ ПУТ АПОПТОЗЕ

Активацијом спољашњих трансмембранских ћелијских протеина који припадају суперфамилији протеина рецептора смрти покреће се спољашњи сигнални пут апоптозе (слика 1). У протеине рецепторе смрти спадају, рецептор 1 фактора некрозе тумора (енг.

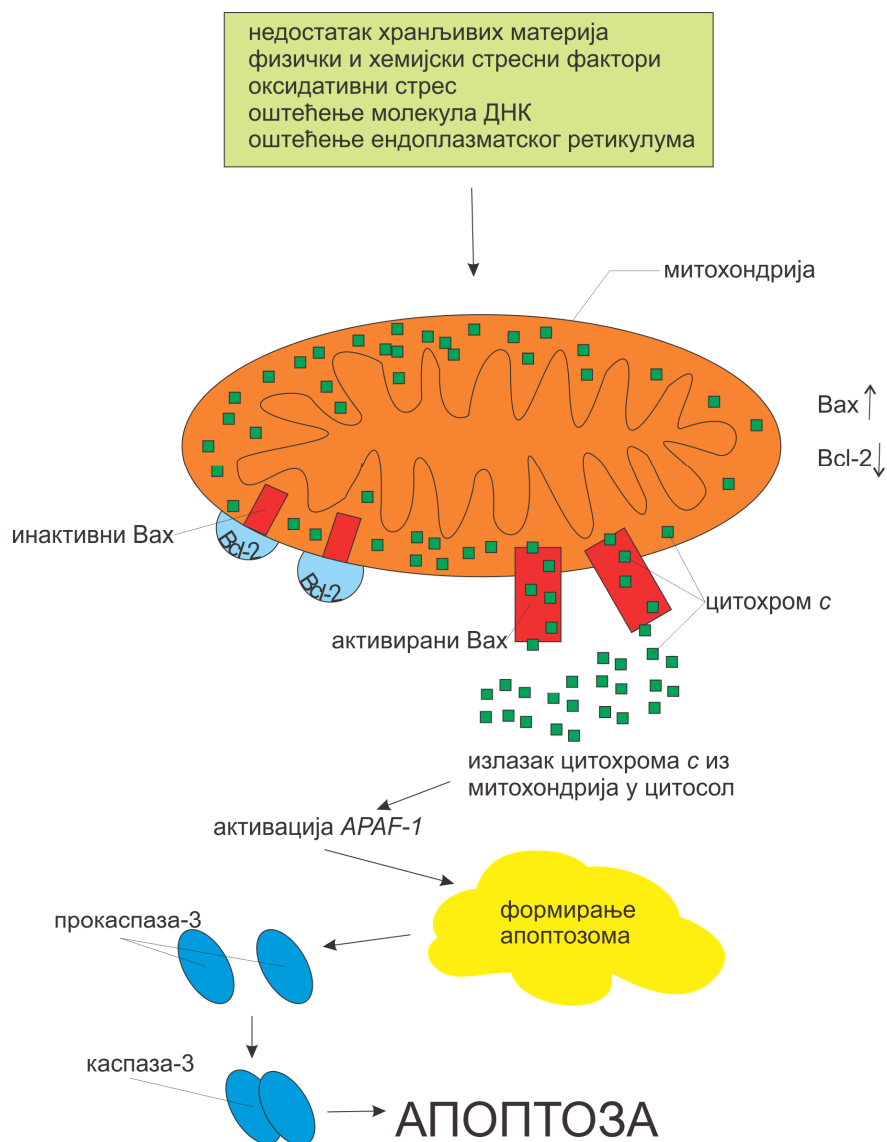


*TNF-R1*, *tumor necrosis factor receptor 1*), *Fas*, *DR3*, *TRAIL-R1/2 (DR4/5)* и *DR6*. Сви чланови суперфамилије рецептора смрти су протеини којима је заједничко да имају интрацитоплазматски део који се назива домен смрти. Након везивања лиганда за рецептор смрти, активирају се домени смрти и привлаче интраћелијске адапторне протеине *FADD* (енг. *FADD, Fas associated death domain*). У следећем кораку следи везивање *FADD* за прокаспазу-8. Као крајњи резултат активације рецептора долази до везивања прокаспазе-8 у *DISC* (енг. *death inducing signaling complex*). У овом комплексу долази до димеризације и активације прокаспазе-8 у иницијаторску каспазу-8. Активирана каспаза-8 доводи до цепања прокаспазе-3 у активну каспазу-3 и активира *Bid*. Протеин *Bid* спада у групу проапоптотских протеина *Bcl-2* фамилије, а када се активира узрокује ослобађање цитохрома *c* из митохондрија и активацију каспазе-9 (74).

#### **1.4.3.2. УНУТРАШЊИ ПУТ АПОПТОЗЕ**

Унутрашњи пут апоптозе може бити покренут дејством различитих унутарћелијских и ванћелијских фактора (слика 2). Фактори ван ћелије који покрећу унутрашњи пут апоптозе су недостатак хранљивих материја неопходних за физиолошко функциоанање ћелије, различити други физички и хемијски стресни фактори. До активације унутрашњег пута апоптозе могу довести и унутарћелијски фактори као што су оксидативни стрес, оштећење молекула ДНК и оштећење ендоплазматског ретикулума. Сви наведени фактори изазивају промене у пермеабилности митохондријалне мембране, услед чега долази до отварања пора у спољашњој мембрани митохондрија, губитка митохондријалног трансмембранског потенцијала и касније до транслокације апоптотичних протеина из митохондријалног међумембранског простора у цитоплазму укључујући цитохром *c*, што активира *APAF-1* и последично доводи до формирања апоптозома, активације каспазе-3 и индукције апоптозе (79, 80).

Кључни регулаторни протеини унутрашњег пута апоптозе су протеини *Bcl-2* фамилије (81). Улога ових протеина је управљање пермеабилитетом митохондријалне мембране, односно регулација изласка апоптогених молекула из митохондрија, на пример цитохрома *c*. Фамилија *Bcl-2* протеина је класификована у три групе: антиапоптотични протеини (*Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Bcl-w*, *Mcl-1*, *A1* и други), проапоптотични протеини са неколико *Bcl-2* хомологих (*BH*) домена означених *BH1-4* (*Bax*, *Bak* итд.) и протеини који садрже само *BH3* домене (*Bad*, *Bid*, *Bim*, *Puma*, *Noxa* итд.) (81, 82).



Слика 2. Унутрашњи пут апоптозе (79-86).

Чланови *Bcl-2* фамилије протеина захваљујући постојању *BH* домена могу међусобно да формирају хомодимере и хетеродимере, чиме настају њихове конформационе промене које су одговорне за активност ових протеина. Антиапоптотични протеини имају улогу у секвестрацији и инхибицији проапоптотичних протеина као што су *Bax* и *Bak*. Секвестрацију *Bax*-а могу извршити сви антиапоптотични протеини, а једино *Bcl-xL* и *Mcl-1* могу да се вежу за *Bak* (82).

Начин на који протеини *Bcl-2* фамилије регулишу апоптозу још увек није потпуно јасан. Једна од теорија је да се *Bax* и *Bak* налазе у неактивном стању, због директних интеракција са *Bcl-2* антиапоптотичним протеинима. Активацијом проапоптотичних протеина који садрже само *BH3* домене, долази до њиховог везивања за антиапоптотичне протеине, а као последица тога долази до одвајања *Bax* и *Bak* од њихових антиапоптотичних лиганата (74, 82). Протеини који садрже само *BH3* домене селективно се везују за антиапоптотичне протеине, на пример *Noxa* се везује само за *Mcl-1* и *A1*, *Bad* се везује само за *Bcl-2*, *Bcl-w* и *Bcl-xL*, док се *Bim* и *Puma* могу везати за све наведене антиапоптотичне протеине (81, 83). Овај податак нам указује да је неопходна активација већег броја проапоптотичних протеина који садрже само *BH3* домене да би се одвијао процес апоптозе. Да би се процес апоптозе активирао неопходно је повећање експресије и протеина *Bad* и протеина *Noxa* како би дошло до ослобађања *Bak*-а од *Bcl-xL* и *Mcl-1* и његове активације. Када би дошло до повећања експресије само једног протеина, или протеина *Bad* или протеина *Noxa*, не би дошло до довољно снажне активације *Bak*-а да се индукује процес апоптозе, већ би за активацију апоптозе био потребан додатни други апоптотични сигнал. Насупрот томе, одређени протеини који у својој структури садрже само *BH3* домене могу да интерагују са проапоптотичним протеинима инхибирајући њихову интеракцију са антиапоптотичним протеинима и на тај начин да индукују апоптозу везивањем директно за протеине *Bax* и *Bak* (84).

Приликом активације процеса апоптозе долази до активације *Bax* протеина тј. ослобађања његовог амино краја од антиапоптотичних протеина *Bcl-2*, транслокације из цитоплазме у спољашњу мембрану митохондрија и олигомеризације у активни *Bax*. Олигомерни облик активног *Bax*-а проузрокује стварање пора у спољашњој митохондријалној мембрани, при чему долази до повећања њене пермеабилности и ослобађања цитохрома *c* из међумембранског простора митохондрија у цитоплазму. Цитохром *c* је хемопротин који је везан за кардиолипине митохондријалне мембране и на тај начин је повезан са спољашњом страном унутрашње митохондријалне мембранане. За разлику од осталих цитохрома, цитохром *c* је хидросолубилан због изразито позитивног наелектрисања. Због присуства хем групе и хидросолубилности, цитохром *c* има физиолошку улогу у процесу оксидативне фосфорилације и током овог процеса цитохром *c* преноси по један електрон између комплекса III и IV респираторног ланца. У процесу

апоптозе, долази до повећане продукције реактивних кисеоничних врста у митохондријама, што за последицу има оксидацију кардиолипина и одвајање цитохрома *c* од унутрашње митохондријалне мембране. На тај начин, цитохром *c* може напустити митохондријални међумембрански простор кроз формиране *Bax/Bak* поре у спољашњој мембрани митохондрија и ући у цитоплазму (85). У цитоплазми цитохром *c* интерагује са молекулом *Apaf-1*, при чему долази до активације неактивне прокаспаза-9 у активну каспазу-9. Затим, активирана каспаза-9 активира прокаспазу-3 у каспазу-3, последично активирајући нисходну каскаду каспаза које извршавају процес апоптозе до краја што се завршава смрћу ћелије (86).

### **1.4.3.3. КАСПАЗЕ**

Кључну улогу у процесу апоптозе има група цистеин зависних специфичних протеаза за аспартат које се називају каспазе (енг. *cysteine-aspartic proteases* или енг. *cysteine-dependent aspartate-directed proteases*). Каспазе представљају ендопептидазе које врше хидролизу пептидних веза које формирају резидуе аспарагинске киселине супстрата (87). Каспазе имају улогу у стварању активних сигналних молекула који учествују у процесима као што су апоптоза и инфламација.

Каспазе су класификоване као каспазе које учествују у процесу апоптозе (каспаза-2, -3, -6, -7, -8, -9 и -10) и као каспазе које учествују у процесу инфламације (каспаза-1, -4, -5, -11 и -12). Каспазе које учествују у процесу апоптозе су класификоване према функцији на каспазе које иницирају апоптозу, иницијаторске (каспаза-8 и -9) и на каспазе које спроводе процес апоптозе или ефекторне односно егзекуторне каспазе (каспаза-3, -6 и -7) (88).

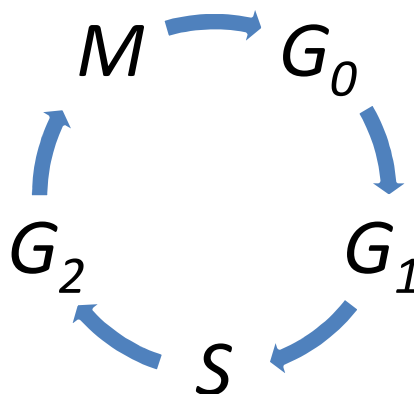
Примарно, каспазе се синтетишу као неактивни мономерни молекули који се називају прокаспазе. У циљу активације прокаспаза, неопходна је њихова димеризација и ограничена протеолиза. Формирање активних димера каспаза, односно спајање прокаспаза је олакшано адапторним протеинима, који имају могућност да се вежу за специфична места која се налазе у продоменима прокаспаза. Тачан механизам спајања прокаспаза у активне димере се разликује и зависи од протеина који су укључени у овај процес. У процесу апоптозе контролисано је „разлагање“ унутарћелијских компонената, и том приликом не долази до инфламације и оштећења околних ћелија. Иницијаторске каспазе имају улогу у активацији каспаза које спроводе процес апоптозе, а њиховом даљом

активношћу се разграђују структурни протеини у ћелији и активирају други ензими који даље спроводе апоптозу. Иницијаторске каспазе, каспаза-8 и каспаза-9, се физиолошки налазе у ћелији у облику неактивних мономера као прокаспаза-8 и прокаспаза-9. Ове каспазе се активирају димеризацијом, а не ограниченом протеолизом (89).

Егзекуторне, односно извршилачке каспазе се синтетишу у неактивном облику, такође у облику прокаспаза (90). Неопходно је да иницијаторске каспазе поделе егзекуторне каспазе на малу и велику субјединицу како би дошло до активације извршилачких каспаза. Сама подела егзекуторских каспаза на малу и велику подјединицу омогућава њихову конформациону промену и стварање функционалних протеаза (87).

### 1.5. Ћелијски циклус

Ћелијски циклус обухвата низ комплексних биолошких, генски програмираних процеса кроз које једна ћелија пролази док се не подели на две нове „ћерке“ ћелије. У еукариотској ћелији, ћелијски циклус је подељен на четири фазе (слика 3):  $G_1$  (енг. *Gap phase 1*),  $S$  (енг. *Synthesis*),  $G_2$  (енг. *Gap phase 2*) и  $M$  (енг. *Mitosis*). Између две деобе постоји период који се назива интерфаза и обухвата  $G_1$ ,  $S$  и  $G_2$  фазу. Након деобе већина ћелија прави „паузу“ током  $G_1$  фазе и ова фаза се тада назива  $G_0$  фаза или фаза мировања. У  $G_0$  фази ћелија може остати и функционисати месецима, данима или годинама; након уласка у  $G_0$  фазу ћелије могу у њој остати трајно или привремено. Лимфоцити се налазе у  $G_0$  фази све док на њих не почну да делују цитокини, специфични антигени, односно фактори који стимулишу пролиферацију лимфоцита. За разлику од лимфоцита неутрофили трајно остају у  $G_0$  фази (91).



Слика 3. Фазе ћелијског циклуса (91).

Ћелијски циклус представља строго контролисан физиолошки процес, а главну улогу у контроли имају контролне тачке (енг. "checkpoints") као и координирана активност циклина, циклин зависних киназа и инхибитора циклин зависних киназа. Контролне тачке ћелијског циклуса су међусобно условљени процеси које ћелија треба да превлада да би прешла из једне у другу фазу ћелијског циклуса. Циклини представљају групу протеина који имају међусобно сличну структуру и који се синтетишу циклично током различитих фаза ћелијског циклуса. Циклин зависне киназе (енг. *cyclin dependent kinases, Cdks*) су чланови фамилије серин-треонин киназа и учествују у контроли ћелијског циклуса. Постоји преко 20 група циклин зависних киназа, а њихова улога се огледа у фосфорилацији сопствених супстрата и на тај начин регулацији кључних фаза у ћелијском циклусу, односно ћелијској деоби. Киназна активност *Cdks* је регулисана инхибиторима циклин зависних киназа (енг. *cyclin dependent kinase inhibitors, CDIs*), а сврха инхибиције *Cdks* је у спречавању преласка ћелије из тренутне у наредну фазу ћелијског циклуса уколико су услови средине неповољни по ћелију. На основу структурне сличности инхибитори циклин зависних киназа су подељени у две класе: *Ink4* фамилија којој припадају  $p16^{INK4a}$  (*Cdkn2a*),  $p15^{INK4b}$  (*Cdkn2b*),  $p18^{INK4c}$  (*Cdkn2c*) и  $p19^{INK4d}$  (*Cdkn2d*), и фамилија *CIP/Kip* инхибитора којој припадају  $p21^{Cip1}$  (*Cdkn1a*),  $p27^{Kip1}$  (*Cdkn1b*) и  $p57^{Kip2}$  (*Cdkn1c*) (91, 92).

Да би се механизам ћелијског циклуса покренуо, неопходно је везивање фактора раста за своје рецепторе. Фактори раста се могу везивати за трансмембранске рецепторе, сигнал се преноси на протеине локализоване у цитоплазми, а то узрокује ослобађање транскрипционих фактора унутар једра и покретање ћелијског циклуса (92).

### 1.5.1. $G_1/S$ ФАЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА

У  $G_1$  фази ћелијског циклуса ћелија се „увећава“ односно повећава се маса ћелије. Ова фаза ћелијског циклуса временски траје најдуже, на пример код ћелија које се интензивно деле ова фаза траје и неколико сати. У овој фази ћелија није доступна за деловање сигнала из спољашње средине. У  $G_1$  фази ћелијског циклуса дешава се интензивна синтеза протеина који ће имати градивну улогу у ћелији, као и ензима и рецептора. Након везивања фактора раста и започињања ћелијског циклуса, прво долази до синтезе циклина  $D$ , а како  $G_1$  фаза одмиче тако расте и количина овог циклина, да би свој максимум достигао на крају  $G_1$  фазе (93, 94). Циклин  $D$  обухвата три типа циклина,

циклин *D1*, циклин *D2* и циклин *D3* који граде комплексе са *Cdk4* и *Cdk6*, који даље узрокују фосфорилацију протеина ретинобластома (*pRb*) (95, 96). У нефосфорилисаном стању, *pRb* везује и инхибира *E2F-1*, транскрипциони фактор. Циљни гени *E2F-1*, транскрипционог фактора су регулатори ћелијског циклуса, циклин *A* и циклин *E*, као и ензими неопходни за репликацију ДНК (97, 98).

Фосфорилацијом *pRb* долази до конформационих промена у структури протеина и последичног ослобађања *E2F-1* транскрипционог фактора. Након синтезе циклина *E* долази до додатне фосфорилације *pRb* и ово представља рестрикциону тачку од које зависи да ли ће ћелија прећи у *S* фазу ћелијског циклуса (99). Уколико су испуњени сви физиолошки услови, ћелија прелази у *S* фазу. У *S* фази ћелијског циклуса долази до репликације ДНК молекула, тако да диплоидна ( $2n$ ) ћелија постаје тетраплоидна ( $4n$ ) ћелија (99, 100). Када нису испуњени услови за деобу ћелије, доћи ће до заустављања циклуса, као и активације контролних механизма (*G<sub>1</sub> checkpoint*) (100).

Физички, хемијски агенси или оксидативни стрес током *G<sub>1</sub>* фазе могу довести до оштећења молекула ДНК (101). Током *G<sub>1</sub>* фазе ћелијског циклуса, уколико дође до оштећења ДНК, повећаће се активност транскрипционог фактора *p53* (102). Активацијом транскрипционог фактора *p53*, долази до повећане синтезе *p21* који инхибира комплексе циклина и циклин зависних киназа формираних током *G<sub>1</sub>* фазе ћелијског циклуса, и на тај начин долази до застоја у овој фази ћелијског циклуса. Такође, *p21* учествује у процесима репарације оштећеног ДНК молекула (103). Уколико је оштећење ћелије неповратно, транскрипциони фактор *p53* ће повећати експресију гена за синтезу протеина који ће индуковати процес апоптозе (104).

### 1.5.2. *G<sub>2</sub>/M* ФАЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА

*G<sub>2</sub>* фаза претходи митози, подели ћелије. Број хромозома у *G<sub>2</sub>* фази је дуплиран, такође, у овој фази ћелијског циклуса долази до дуплирања осталих компоненти ћелије како би настале две ћерке ћелије. Током *G<sub>2</sub>* фазе активан је комплекс циклина *A* и *Cdk2*, као и комплекс циклина *B* и *Cdk1* и ови комплекси узрокују кондензацију хромозома и „распад“ једарне мембране па су значајни за надвладавање друге рестрикционе тачке и улазак у *M* фазу (105). Повећање активности комплекса циклина и одговарајуће *Cdk* узрокује формирање деобног вретена у ћелији као и причвршћивање центромера за нити деобног вретена. Ензимски комплекс *APC* (енг. *Anaphase-promoting complex*), узрокује

раздвајање хроматида и поделу ћелије, затим долази до разградње циклина, што за последицу има дефосфорилацију циљних протеина и тиме се процес митозе завршава (106).

Уколико дође до заустављања ћелијског циклуса у  $G_2$  фази, узрок је најчешће дефект на нивоу хромозома и последично долази до супресије активности циклин *B/Cdk1*. Показано је да у  $G_2$  фази, приликом оштећења хромозом, *p53* активира транскрипцију *p21*, чиме се зауставља ћелијски циклус у  $G_2$  фази и зауставља се синтеза циклина *B* и *Cdk1* (107).

Када дође до оштећења молекула ДНК из било ког разлога, ћелијски циклус се зауставља у било којој фази циклуса; уколико се активирају контролни механизми да дође до исправљања оштећења на молекулу ДНК и тиме се омогући да се настави ћелијски циклус, ћелија преживи или, у мање повољном сценарију, ако су оштећења сувише велика, ћелија ће активирати апоптотске механизме што последично води до смрти ћелије. Који је од ова два пута реалнији, зависиће искључиво од степена оштећења на молекулу ДНК (68). Уколико су оштећења на молекулу ДНК значајнија и обимнија, ћелија ће неминовно ући у процес апоптозе (68, 108).

Код туморских ћелија, механизам који руководи ћелијским циклусом представља алтернативну „мету“ за циљану антитуморску терапију и туморску дијагностику. Прецизнија анализа иницијације репликације молекула ДНК и синтезе протеина који су укључени у процес митозе води ка идентификацији нових биомаркера за детекцију и прогнозу малигнитета. Такође, боље разумевање функције молекула који су битни за физиолошко функционисање ћелијског циклуса или оних молекула који су структурно или функционално промењени код малигнућих ћелија ствара могућности за нове терапијске опције и лекове чији је механизам деловања усмерен ка ћелијском циклусу (108).

## **1.6. Лекови у хемиотерапији малигнитета**

Лекове који се користе у терапији малигнитета, тзв. хемиотерапеутике, можемо поделити у неколико категорија зависно од механизма деловања:

1. Антиметаболити; њихов механизам деловања се заснива на блокади метаболичких путева који су укључени у синтезу молекула ДНК (метотрексат, флуороацил).



2. Цитотоксични антибиотици; они представљају супстанце пореклом из микроорганизама и спречавају деобу ћелија (идарубицин, епирубицин, митокстантрон).
3. Хормони; у овој групи су најважнији стероиди односно гликокортикоиди, естрогени и андрогени и
4. Алкилирајући агенси и сличне супстанце; у ову групу лекова спадају комплекси који у својој структури садрже метале (на пр. платину, као што је цисплатина).

Антиметаболити свој механизам деловања заснивају на конкуренцији са физиолошким молекулама који учествују у синтези молекула ДНК и РНК, односно то су њихови структурни аналози. Антиметаболити или замењују физиолошке молекуле или се такмиче са њима око активних места на ензимима. Стога је њихова активност највише изражена у S-фази ћелијског циклуса, тј. они практично не утичу на вијабилност туморских ћелија које се налазе у фази мировања. У антиметаболите спадају пурински аналози (меркаптопурин, флударабин), аналози фолата (метотрексат), аналози урее (хидроксиуреа) и аналози пиримидина (цитарабин, 5-флуороурацил) (109).

Цитотоксични антибиотици као заједничку особину имају способност да прекину деобу ћелија (110). Најзначајнији представници ових лекова су антрациклини (доксорубицин и даунорубицин) и блеомицин. Механизам дејства антитуморских антибиотика се заснива на интерпонирању, односно интеркалирању, ових лекова између две суседне азотне базе у молекулу ДНК. Цитотоксични антибиотици нарочито имају способност да се интеркалирају између цитозина и гуанина, односно између тимина и гуанина, што онемогућава даљу репликацију. Поред тога, доказано је да цитотоксични антибиотици могу да инхибирају ензиме ДНК топоизомеразу I и II (109).

Хормонска терапија се користи углавном у терапији карцинома дојке и простате. Код ова два типа канцера, малигне ћелије су осетљиве на високе концентрације хормона у крви, тј. да би даље расли, ови тумори захтевају присуство високе концентрације полних хормона у крви (111, 112). Код 2/3 пацијенткиња које болују од малигног тумора дојке, ћелије које формирају туморско ткиво поседују хормонске рецепторе. Ти рецептори могу бити естрогенски и/или прогестеронски. Стога је код малигнитета дојке висока концентрација естрогена неопходна за раст малигних ћелија и даље ширење тумора (111).

С друге стране, код карцинома простате се примењује терапија којом се врши супресија лучења мушких полних хормона, односно андрогена, чиме се смањује стимулација ћелија карцинома простате за даљи раст (112).

Алкилирајући агенси поседују алкил-радикале који се лако везују за атоме азота у пуринским и пиримидинским азотним базама молекула ДНК и РНК. Ови антитуморски агенси се најчешће везују за азот у положају 7 пуринских азотних база. Стога, током репликације молекула ДНК долази до грешака у спаривању азотних база или немогућности спаривања азотних база у новим молекулима ДНК и због тога до смрти ћелије. Алкилирајући агенси делују у свим фазама ћелијског циклуса малигних ћелија, па се могу користити и у терапији брзорастућих тумора којима најчешће припадају хематолошки малигнитети, као и у терапији солидних тумора који садрже велики проценат ћелија у фази мировања (113). У групу алкилирајућих агенаса спадају пливавци (циклофосфамид, хлорамбуцил), препарати нитрозоуреае и препарати платине и слична једињења (цисплатина, карбоплатина, прокарбазин, дакарбазин) (109).

Поред препарата платине, последњих година се све више испитују антитуморске терапијске могућности других метала попут злата, паладијума, бакра и рутенијума.

## **1.7. Комплекси метала у медицини**

Метали су своју примену у медицини имали чак неколико стотина година пре нове ере. Током овог периода, древни Асирци, Египћани и Кинези су користили метале у лечењу разних тегоба. Цинк се апликовао локално са циљем да дође до бржег зарастања рана, а као антибактеријско средство коришћено је сребро. Традиционални кинески лекари су арсен-триоксид користили као антисептик у лечењу псоријазе, као и у лечењу реуматоидних обољења и сифилиса. Третман овим металима је тада више био заснован на искуствима и народном веровању него на рационалном коришћењу ових метала (114).

Данас је познато да комплекси метала поседују антибактеријско, антитуморско и антифунгицидно дејство, па се користе у модерној медицини у третману инфекција и карцинома (115).

Револуција у терапији лековима који садрже метале тј. металне јоне почиње шездесетих година двадесетог века открићем цисплатине. Цисплатину је први синтетисао Мишел Пероне 1844. године, а хемијску структуру цисплатине је први објаснио Алфред Венер 1883. године. Биофизичар Барнет Розенберг са Државног Универзитета у Мичигену

је први открио да цисплатина поседује и антитуморска својства (116). Цисплатина је данас најупотребљивији хемиотерапеутик који садржи метал и који се користи у лечењу различитих типова малигнитета попут неоплазми плућа, дојке, цервикса, тестиса, мокраћне бешике, мозга и у терапији меланома (117-120).

Да би тешки метали ушли у клиничку примену, био је потребан дуг временски период, јер поједини метали у организму немају биолошку функцију. Посебно је интересантно да цисплатина као један од најчешће коришћених лекова у терапији различитих типова карцинома у својој структури садржи платину која у нашем организму нема биолошку улогу.

## **1.8. Комплекси метала у терапији малигнух тумора**

Терапијски потенцијал комплекса метала и њихова примена у лечењу малигнитета је привукла велико интересовање због тога што метали показују јединствене карактеристике као што је редокс активност и реактивност према одређеним органским супстратима битним за ћелијско преживљавање. Ове особине јона метала омогућиле су синтезу великог броја комплекса који у својој структури садрже метале и могу се везати за важне биомолекуле и на тај начин ометати механизме ћелијске пролиферације (114, 121).

Цисплатина, карбоплатина и оксалплатина је одобрена од стране Америчке Администрације за храну и лекове (енг. *Food and Drug Administration, FDA*), а у поједним земљама се користи и хептаплатина (Јужна Кореја), недаплатина (Јапан) и лобоплатина (Кина) (122).

Осим комплекса који у својој структури садрже метал платину, од потенцијалних хемиотерапеутика, комплекси који у својој структури садрже рутенијум *NAMI-A* и *KP1019* су ушли у први фазу клиничког истраживања (123).

## **1.9. Комплекси платине**

Иако је неколико хиљада комплекса платине синтетисано, само су цисплатина, карбоплатина и оксалплатина ушли у клиничку употребу (124). Цисплатина и карбоплатина се користе у терапији истих типова карцинома, али се карбоплатина користи у већим терапијским дозама због мање цитотоксичности у односу на цисплатину. Приликом терапије карцинома, оксалплатина показује мање нежељених ефеката од цисплатине и веома често се користи у лечењу колоректалног карцинома (125).

Цисплатина је хидросолубилни комплекс који у својој структури, у центру, садржи атом платине који је окружен са два атома хлора и две амонијум групе (125, 126). Цисплатина се примењује спором интравенском инјекцијом или инфузијом. Када се нађе у циркулацији цисплатина се везује за протеине плазме као што су трансферин и албумини (127). Сматра се да је сам улазак цисплатине у ћелију омогућен пасивном дифузијом или посредством транспортних протеина на ћелијској мембрани (124). Велики број ћелијских компоненти као што су цитоскелетни микрофиламенти, молекул РНК и пептиди који садрже тиол групе као што је глутатион, могу инактивирати цисплатину и као резултат ових интеракција ћелија може постати резистентна на терапију цисплатином. Након уласка у ћелију, хлор дисоцира од цисплатине остављајући реактиван комплекс који у присуству воде везује молекул ДНК. Цисплатина се везује за азот у положају 7 молекула пуринских азотних база, пре свих гуанина. Такође, у мањој мери, се цисплатина може везати за аденин и при томе се формира ковалентно координативна веза између платине и азотовог атома у положају 7 пуринског прстена. Везивање цисплатине за молекул ДНК доводи до дисторзије молекула ДНК и тиме су онемогућени процеси репликације и транскрипције. Са овако измењеним и оштећеним молекулом ДНК ћелија не може да преживи и покреће се процес апоптозе (128).

Иако се широко примењује у лечењу малигнитета, терапијску примену цисплатине ограничава велики број нежељених дејстава. Нефротоксичност је најизраженији нежељени ефекат цисплатине, па се често дешава да оболели коме се цисплатина апликује развије акутну бубрежну инсуфицијенцију (128). Да би се пратила бубрежна функција, оболелима који примају цисплатину одређује се клиренс креатинина. Адекватна хидратација и одржавање диурезе се користе да би се превенирао настанак оштећења бубрежне функције. Патогенеза акутне бубрежне инсуфицијенције чији је узрок цисплатина укључује 4 главна механизма:

1. оштећење проксималних тубула,
2. оксидативни стрес,
3. инфламацију и
4. васкуларна оштећења бубрега (129).

Друго озбиљно нежељено дејство цисплатине је неуротоксичност и она се може пратити извођењем тестова спроводљивости нерава (118, 119). Поремећаји вида и слуха су

учестала неуролошка нежељена дејства која се јављају одмах након започињања третмана цисплатином (119).

Мука, гађење и повраћање као симптоми од стране дигестивног тракта, се често јављају као нежељена дејства у терапији цисплатином. Цисплатина је један од хемотерапеутика који имају најснажније еметогено дејство (118). Ипак, профилактичком применом антиеметика (ондансетрон, гранисетрон) је могуће неутралисати или бар ублажити мучнину и повраћање узроковану применом цисплатине (119).

Услед ототоксичности цисплатине, може доћи до губитка слуха током континуиране примене овог лека. Након дуже терапије цисплатином, због њеног неселективног деловања долази и до оштећења ћелија костне сржи, првенствено прекурсора еритропоезе, што резултује хемолитичком анемијом (118, 119).

Још једна група нежељених дејстава због администрације цисплатине је појава хипомагнезијемije и хипокалцемије. Хипомагнезијемija се јавља код више од половине оболелих који користе цисплатину, а као последицу има поремећаје у функционисању ЦНС-а, срца и скелетних мишића (119).

Други тип нежељених ефеката цисплатине је развој ћелијске резистенције на дејство овог лека. Прецизан механизам развоја резистенције није познат, али се претпоставља да више фактора утиче на развој резистентности ћелије на цисплатину. Смањена апсорпција лека у туморским ћелијама и инактивација цисплатине биомолекулима који поседују тиолне групе повећавају резистенцију малигне ћелије на лек (130).

Упркос успеху у лечењу различитих врста тумора, клиничка ефикасност цисплатине је веома ограничена развијањем резистенције тумора на лек и појавом изражених нежељених ефеката. Из тог разлога постоји потреба за проналажењем нових једињења која садрже метале и која су мање токсична и боље се подносе *in vivo*. Нове генерације хемотерапеутика који садрже метале, пружају могућност за савладавање резистенције канцера према цисплатини. Поред тога што могу деловати на молекул ДНК, комплекси метала утичу и на *redox*-баланс у туморским ћелијама што може бити јако ефикасна стратегија у борби против малигнитета. Неки од таквих комплекса су комплекси иридијума(III), осмијума(II) и рутенијума(II) (131).

## 1.10. Комплекси рутенијума

Комплекси рутенијума су веома добри кандидати за терапију малигнитета иако имају мало заједничких структурних особина са већ постојећим комплексима који садрже платину (119). Антитуморски ефекат комплекса рутенијума је установљен пре више од две деценије, али је интерес за истраживања дејства ових комплекса био релативно мали јер се показало да они немају исти начин деловања као цисплатина. У физиолошким условима рутенијум је стабилан у оксидационим стањима  $Ru(II)$ ,  $Ru(III)$  и  $Ru(IV)$  (132).

Предност комплекса рутенијума над цисплатином је способност комплекса рутенијума да се за хумани серум албумин и трансферин везују на исти начин као гвожђе. Туморске ћелије, због убрзаног метаболизма, имају повећане потребе за гвожђем, те на својим мембранама повећано експримирају трансферинске рецепторе. Због тога је допремање комплекса рутенијума до туморских ћелија ефикасније у односу на једињења платине (133). Након везивања за трансферински рецептор на ћелијским мембранама, инертни комплекс  $Ru(III)$  у туморским ћелијама може да се активира, односно редукује се у реактивнији  $Ru(II)$  комплекс. Заправо, сам редокс потенцијал комплекса рутенијума омогућава ефикаснију антитуморску терапију. Глутатион, аскорбат и протеини имају могућност да редукују, док молекулски кисеоник и цитохроми оксидују  $Ru(II)$ . У малигним ћелијама се налази мања концентрација кисеоника и повећана концентрација глутатиона, што за последицу има редукацију  $Ru(III)$  комплекса у реактивнији  $Ru(II)$  комплекс (134). Такође, показано је да од хемијске структуре комплекса рутенијума тј. од природе лиганда који је координативно везан за јон рутенијума зависи начин везивања комплекса за протеине, липофилност односно могућност уласка комплекса у ћелију, хидросолубилност односно начин транспорта до ћелија, као и сам начин везивања за ДНК молекула (123).

Први комплекс рутенијума чија су антитуморска дејства испитивана био је структурни аналог цисплатине, хлоро-амино комплекс  $Ru(III)$ . Резултате о антитуморској активности комплекса  $fac[RuCl_3(NH_3)_3]$  први је објавио Кларк са својим сарадницима (135).

Због доказаног антитуморског ефекта  $Ru(II)$ , истраживања су се фокусирала на синтезу антиканцерогених „*half sandwich*“  $Ru(II)$  структура. У овој структури рутенијум је везан координативним везама за позиције  $X$ ,  $Y$  и  $Z$ . На позицијама  $X$ ,  $Y$  и  $Z$  могу се везати

различити лиганди што за последицу има и промену степена активности овог комплекса (136).

Међу првим синтетисаним  $Ru(II)$  комплексима био је комплекс  $[Ru(\eta^6-C_6H_6)(DMSO)Cl_2]$ , а истраживање је показало да овај комплекс  $Ru(II)$  инхибира активност топоизомеразе II која је значајна током процеса ћелијске репликације (133). Заменом  $DMSO$  лиганда са 1,3,5-триаза-7-фосфа-адамантан ( $PTA$ ) лигандом добијени су  $RAPTA-C$  комплекси. Присуство  $PTA$  лиганда у комплексу рутенијума је обезбедило бољу растворљивост комплекса у води и антимастистатско дејство комплекса (123).

Синтезом два нова комплекса рутенијума(III), која су означена као  $ICR$  и  $KP1019$  односно  $[ImH]trans-[RuCl_4(Im)_2]$  и  $[IndH]trans-[RuCl_4(Ind)_2]$ , направљен је крупан корак у даљем истраживању антитуморског ефекта комплекса који садрже рутенијум. Наиме, ови комплекси су испољили снажан цитотоксични ефекат према различитим типовима тумора, а посебну активност су показали према туморима који су резистентни на цитотоксични ефекат цисплатине. Комплекс  $KP1019$  је тренутно у другој фази клиничког испитивања а досадашњи резултати указују да овај комплекс испољава значајну антитуморску активност нарочито према колоректалним карциномима (137).

Осим комплекса рутенијума који имају карактеристичну „half sandwich“  $Ru(II)$  структуру, проучавани су и комплекси рутенијума са полипиридинским лигандима. Полипиридински лиганди нису „лако одлазеће групе“, односно хемијске групе које је могуће лако „истиснути“ из металног комплекса. Из тог разлога се полипиридински комплекси рутенијума везују за молекуле ДНК, чиме заустављају процес репликације. Полипиридински комплекси рутенијума су испољили снажан цитотоксични ефекат на шири спектар туморских ћелијских у односу на једињења платине (131, 138).

Последњих година, полипиридински комплекси рутенијума(II) буде велико интересовање научника због могућности да се користе као алтернатива класичној хемиотерапији цисплатином. Показано је да полипиридински комплекси рутенијума(II), могу да интеркалирају у молекуле ДНК, али и да, попут цисплатине, делују као алкилирајући агенси. Неки од комплекса рутенијума(II) имају снажно антитуморско дејство *in vitro*. На пример, комплекси означени као 78 и 79 смањују вијабилност туморских ћелија на 50% при врло ниским микромоларним концентрацијама. Резултати  $MTT$  теста су показали да ови комплекси делују цитотоксично на ћелије аденокарцинома

плућа *A549* и ћелије карцинома колона *HCT116*. Други полипиридински комплекси рутенијума(II) означени као 83-85 делују цитотоксично на *HeLa* ћелије карцинома цервикса и ћелије аденокарцинома плућа *A549*. Комплекс рутенијума(II) 86 је показао снажну антипролиферативну активност на *MCF-7* ћелије карцинома дојке и *HT-29* ћелије карцинома колона. Такође, комплекси означени као 90-93 су деловали цитотоксично на ћелије хепатоцелуларног карцинома *BEL-7402*, при чему су комплекси 90-92 изазвали застој у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса, а комплекс 93 у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса. Поред тога, комплекси 90-93 су индуковали апоптозу *BEL-7402* ћелија митохондријалним сигналним путем делујући на протеине из *Bcl-2* фамилије протеина апоптозе (139).

Комплекси рутенијума(II) се разликују по концентрацији потребној да смање вијабилност туморских ћелија на 50%. Разлике у јачини антитуморске активности комплекса рутенијума потичу од њихове липофилности. Што је неки комплекс липофилнији, то ће његова антитуморска активност *in vitro* бити снажнија, али ће истовремено комплекс бити мање селективан, односно снажније ће смањивати вијабилност и туморских и здравих ћелија (139). Стога се континуирано синтетишу нови комплекси рутенијума(II) и испитују њихова антитуморска својства, да би се дошло до најидеалнијег комплекса као најбољег кандидата за примену у антитуморској терапији.



## 2. Циљеви и хипотезе студије

А. Основни циљеви овог истраживања су:

1. Испитивање потенцијалне цитотоксичности комплекса рутенијума:
  - а)  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(o\text{-pda})\text{Cl}]\text{Cl}$  (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, o-pda = o-fenilendiamin) (у даљем тексту: комплекс *Ru-1*)
  - б)  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{phen})\text{Cl}]\text{Cl}$  (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, phen = 1,10-fenantrolin) (у даљем тексту: комплекс *Ru-2*) на следећим туморским ћелијама:
    - 1) *A549* – аденокарцином плућа,
    - 2) *MCF7* – карцином дојке,
    - 3) *HeLa* – карцином цервикса,
    - 4) *Hs 294T* – малигни меланом,
    - 5) *MRC-5* – фибробласти (контрола).
2. Одређивање релативног односа некротичне и апоптотске смрти туморских ћелија изазване испитиваним супстанцама.
3. Утврђивање утицаја испитиваних супстанци на релативни однос проапоптотичног *Bax* и антиапоптотичног *Bcl-2* протеина.
4. Одређивање ефекта испитиваних супстанци на локализацију цитохрома *c* и активацију *Bax-a* и каспазе-3.
5. Утврђивање да ли испитивани комплекси рутенијума заустављају раст туморских ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса.

Б. Сходно досадашњим сазнањима и постављеним циљевима, радне хипотезе студије су следеће:

1. Комплекс *Ru-1* и комплекс *Ru-2* делују цитотоксично на туморске ћелије, док је ефикасност на здравим фибробластима слабија.
2. Наведене супстанце индукују апоптозу туморских ћелија, повећавајући релативни однос *Bax/Bcl-2*, што доводи до транслокације цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму и активације *Bax-a* и каспазе-3.
3. Испитивани комплекси рутенијума заустављају раст туморских ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса.

## 3. Материјал и методе

### 3.1. Врста студије

Студија је дизајнирана као експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*. У истраживању су коришћене четири хумане туморске ћелијске линије: ћелијска линија аденокарцинома плућа *A549* (ATCC<sup>®</sup> CCL-185<sup>™</sup>), аденокарцинома дојке *MCF7* (ATCC<sup>®</sup> HTB-22<sup>™</sup>), аденокарцинома цервикса *HeLa* (ATCC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>), малигног меланома *Hs 294T* (ATCC<sup>®</sup> HTB-140<sup>™</sup>) и здрава ћелијска линија хуманих фибробласта *MRC-5* (ATCC<sup>®</sup> CCL-171<sup>™</sup>) на којима су испитивани антитуморски ефекти комплекса рутенијума.

### 3.2. Култивација ћелија

Истраживање је обухватило четири врсте туморских ћелија: *A549* (карцином плућа), *MCF7* (карцином дојке), *HeLa* (карцином цервикса), *Hs 294T* (малигни меланом) и контролну ћелијску линију *MRC-5* (здрави фибробласти). Ћелијске линије су култивисане на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> у комплетном медијуму за раст ћелија кога чине: *DMEM* са високом концентрацијом глукозе од 4500 mg/L (енг. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium – High Glucose, Sigma, Germany*) коме је додато 2 mM глутамина, 100 IU пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина и 10% топлотом инактивисаног феталног телећег серума (енг. *FBS, fetal bovine serum, Capricorn Scientific, Germany*). Медијум је стерилисан филтрирањем кроз нитроцелулозне филтере са порама које су дијаметра 0,22 µm и чуван је на температури од 4°C до извођења експеримента.

### 3.3. Варијабле истраживања

Примењени новосинтетисани комплекси рутенијума *Ru-1* [Ru(Cl-Ph-tpy)(*o*-pda)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2"-terpiridin, *o*-pda = *o*-fenilendiamin) и комплекса *Ru-2* [Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2"-terpiridin, phen = 1,10-fenantrolin) представљали су независне варијабле студије (узрок), а вредности мерених параметара вијабилности и апоптозе ћелија представљали су зависне варијабле (исход).

У експериментима смо користили различите концентрације комплекса рутенијума растворене у диметил-сулфоксиду (енг. *DMSO, dimethyl sulfoxide*) и разблажене у

медијуму при чему финална концентрација диметил-сулфооксида није прелазила 0,5% v/v. Новосинтетисани комплекси рутенијума су добијени као поклон од стране проф. др Живадина Бугарчића и његовог истраживачког тима (Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу).

У узорцима који су укључени у студију одређивана је вијабилност ћелија 24, 48 и 72 часа након третмана испитиваним комплексима рутенијума у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  до 100  $\mu\text{M}$  (0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) у односу на вијабилност нетретираних ћелија применом *MTT* теста (140). Као позитивна контрола, односно супстанца са доказаним цитотоксичним ефектом, коришћена је цисплатина. У даља истраживања су биле укључене концентрације комплекса рутенијума које нису утицале на вијабилност здравих фибробласта, а у испитиваним концентрацијама су деловали цитотоксично на бар једну од четири испитиване врсте туморских ћелија *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T*. Тип ћелијске смрти као и релативни однос некротичне и апоптотичне смрти туморских ћелија изазване тестирањем комплексима испитиван је методом проточне цитометрије ћелија бојених *Annexin-ом V* и 7-аминоактиномицином *D* (141).

За испитивање механизма апоптозе индуковане комплексима рутенијума користили смо проточну цитометрију бојења третираних ћелија специфичним антителима за регулаторне апоптотичне протеине као што су *Bax*, *Bcl-2*, цитохром *c* и активна каспаза-3. Одређивали смо релативни однос експресије проапоптотичног протеина *Bax* и антиапоптотичног *Bcl-2* протеина. Такође, одређивали смо проценат ћелија код којих је дошло до транслокације цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму и активације *Bax*-а и каспазе-3 у групи третираних у односу на нетретиране туморске ћелије.

### **3.4. *MTT* тест**

*MTT* тест се користи за одређивање вијабилности или пролиферације ћелија (140). Квантификација цитотоксичног ефекта комплекса рутенијума на испитиваним ћелијама *in vitro* извршена је применом *MTT* теста (*Sigma*, Немачка).

Принцип теста: Жуто обојену со тетразолијум бромида, *MTT* (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум бромид), редукују митохондријални ензими дехидрогеназе метаболички активних ћелија и стварају редуковане еквиваленте као што су  $\text{NADH} + \text{H}^+$  и  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . Љубичасто обојени формазан који се добија при овој реакцији и који је локализован интрацелуларно у живим, метаболички активним ћелијама,

може бити растворен и квантификован спектрофотометријски. *MTT* тест пролиферације ћелија мери брзину ћелијске пролиферације, а уколико дође до апоптозе или некрозе ћелија, овај тест мери смањење вијабилности ћелија. На *ELISA* читачу (*Zenyth 3100*, *Anthos Labtec Instruments*) мерен је интензитет боје, читавањем на таласној дужини од 595 nm.

Тест се изводи у микротитар плочи са 96 бунара. Вијабилност ћелија приликом третмана комплексима рутенијума је испитивана у трипликату и у три независна експеримента.

Концентрације комплекса рутенијума у микротитар плочима су биле у опсегу од 0,3  $\mu\text{M}$  до 100  $\mu\text{M}$  (0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ). Комплекси рутенијума су прво растворени у диметил-сулфоксиду (у концентрацији која је била бар 400 пута већа од највеће испитиване концентрације биоактивне супстанце), тако да финална концентрација *DMSO*-а у медијуму није била већа од 0,5% v/v.

Ћелијска вијабилност је одређивана након 24, 48 и 72 часа инкубације ћелија са тестираним комплексима или само у комплетном медијуму (контрола). У сваком бунару укупна запремина суспензије ћелија и тестираних биоактивних супстанци је била 200  $\mu\text{l}$ , а број ћелија по бунару је био  $5 \times 10^4$ .

Радни раствор *MTT*-а се добијао из штока *MTT*-а (5 mg/ml PBS-а (енг. *Phosphate Buffer Saline*, фосфатни пуфер)) разблаживањем са медијумом у односу 1:10.

Након постављања 100  $\mu\text{l}$  суспензије ћелија од  $5 \times 10^4$  ћелија по бунару у микротитар плочу и инкубације са комплексима или у самом медијуму у временском периоду од 24, 48 и 72 часа, у сваки бунар је додавано 100  $\mu\text{l}$  радног раствора *MTT*-а и ћелије су инкубиране још 4 часа на 37° C у атмосфери са 5%  $\text{CO}_2$ . Затим је супернатант пажљиво извлачен, а у сваки бунарчић је додавано по 150  $\mu\text{l}$  чистог *DMSO*-а. Након тога, плоча је постављена на мешалицу у трајању од 30 минута, а онда је читавана апсорбанца на 595 nm. Вредности апсорбанце у бунарчићима са третираним ћелијама су поређене са вредностима апсорбанце у бунарчићима са нетретираним ћелијама и на основу тога је израчунато смањење или повећање вијабилности ћелија услед дејства комплекса рутенијума. Процент цитотоксичних ћелија је израчунат по формули: Цитотоксичност (%) =  $[1 - (\text{експериментална група (OD)}) / (\text{контролна група (OD)})] \times 100$ .

### 3.5. ANNEXIN V-FITC тест апоптотичности

Применом *ANNEXIN V-FITC* теста апоптотичности испитиван је апоптотични ефекат комплекса рутенијума на туморске ћелије. Помоћу сета *ANNEXIN V-FITC/7-AAD* (енг. *Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/7-amino-actinomycin D (7-AAD) Apoptosis Kit, BD Biosciences*), израчунат је проценат апоптотичних ћелија у групи третираних ћелија након 24-часовне инкубације са тестираним комплексима (141).

Интегритет ћелијске мембране у раној апоптотичној фази је очуван, али долази до губитка асиметрије мембранских фосфолипида. Фосфатидил-серин је негативно наелектрисан трансмембрански фосфолипид чија је физиолошка локализација са унутрашње стране плазма мембране, а у раној фази апоптозе бива изложен на спољашњу страну ћелијске мембране. Протеин *Annexin V* има способност да се везује за калцијум, фосфолипиде и фосфатидил-серин. Губитак интегритета ћелијске мембране јавља се у касној фази апоптозе и у некрози, што омогућава вијабилним бојама као што су *FITC* (флуоресцеин изотиоцијанат) и *7-AAD* (7 аминок-актиномицин Д) да се вежу за молекуле ДНК. Комплет реагенса који је коришћен у нашим експериментима садржи *7-AAD* који се везује директно за молекуле ДНК. Из тог разлога се претпоставља да су *Annexin V (-)/7-AAD (-)* ћелије вијабилне, *Annexin V (+)/7-AAD (-)* ћелије у раној фази апоптозе, *Annexin V (+)/7-AAD (+)* ћелије у касној фази апоптозе, а да су некротичне ћелије *Annexin V (-)/7-AAD (+)*.

Након 24-часовног третмана комплексима рутенијума, ћелије су опране у *PBS*-у и ресуспендоване у епрувете са ледено хладним везујућим пуфером (енг. *binding buffer*) до финалне концентрације ћелија  $1 \times 10^6/\text{ml}$ . Након тога, у 100  $\mu\text{l}$  суспензије ћелија додато је 10  $\mu\text{l}$  *Annexin V-FITC*-а и 20  $\mu\text{l}$  *7-AAD*. Затим су ћелије инкубиране 15 минута у мраку на 4° C. Потом је садржај епрувета ресуспендован у 400  $\mu\text{l}$  везујућег пуфера и анализиран на проточном цитометру (*The Cytomics FC 500 Series, Beckman Coulter*). Процент третираних ћелија у раној апоптози, касној апоптози као и проценат некротичних ћелија су одређивани коришћењем софтвера *CXP Cytometer, FlowJo* и *Flowing software v2.5*.

### 3.6. Анализа ћелијског циклуса

Бојење ћелија пропидијум-јодидом (*PI*) је коришћено за анализу процентуалне заступљености ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса (142, 143). Пропидијум-јодид интеркалира у молекуле нуклеинских киселина, а на основу интензитета флуоресценције

може се одредити количина молекула ДНК у анализираним туморским ћелијама које се налазе у одређеној фази ћелијског циклуса. Диплоидне ћелије ( $2n$ ) се налазе у  $G_0/G_1$  фази, ћелије са хаплоидним садржајем молекула ДНК ( $<2n$ ) одговарају ћелијама које се налазе у процесу апоптозе, ћелије у  $S$  фази имају већи садржај молекула ДНК од диплоидног (између  $2n$  и  $4n$ ), док ћелије у  $G_2/M$  фази имају двоструко већи садржај ДНК од диплоидног ( $4n$ ).

Туморске ћелије *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T* су третиране током 24 часа комплексима рутенијума и цисплатином, концентрацијама које одговарају вредностима  $IC_{50}$  концентрације за сваку ћелијску линију као и са свежим медијумом (контрола) на  $37^\circ C$  у атмосфери са 5%  $CO_2$  и апсолутном влажношћу. Након 24-часовног третмана покупљене су како залепљене тако и ћелије у суспензији које су се одлепиле током третмана, затим су опране у *PBS*-у и фиксирани у 70% хладном етанолу преко ноћи на  $4^\circ C$ . Тако фиксирани ћелије су ресуспендоване у 1ml *PBS*-а са *RNA*-зом А (500  $\mu g/ml$ , Sigma, Немачка) и инкубирани 30 минута на  $37^\circ C$ . Додавањем *RNA*-зе А у испитиваном узорку се разлаже постојећа РНК, јер пропидијум-јодид има могућност неселективног везивања и за молекуле ДНК и за РНК. Након додавања 5  $\mu l$  раствора за бојење (10mg PI/ml *PBS*-а) ћелије су инкубирани 15 минута у мраку на  $4^\circ C$ . Анализа је извршена помоћу проточног цитометра *Cytomics FC500* (*Beckman Coulter*). Одређиван је садржај ДНК помоћу *Flowing Software*-а и *FlowJo*-а, а дистрибуција ћелијског циклуса је приказана хистограмски.

### **3.7. Имуноцитохемијска бојења специфичним антителима за *Bax*, *Bcl-2*, цитохром *c* и активну каспазу-3**

У циљу испитивања механизма апоптозе одређивана је експресија и активација проапоптотичног протеина *Bax*, експресија антиапоптотичног протеина *Bcl-2*, цитохрома *c* и активне каспазе-3 на *HeLa* туморским ћелијама које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума и цисплатине након 24 часа инкубације (144-146).

Након третмана комплексима рутенијума ћелије су опране три пута ледено хладним *PBS*-ом и потом ресуспендоване у концентрацији  $2 \times 10^6$  ћелија/ml, фиксирани и пермеабилисани (*Fixation and Permeabilization Kit*, *eBioscience*). Потом је уследила инкубација у временском периоду од 20 минута раствором који садржи 0,2 М глицина, 20  $\mu l$  козјег серума и 30  $\mu l$  *PBS*-а да би се блокирало неспецифично везивање антитела. Затим

су ћелије опране три пута у *PBS*-у додавањем 4 ml *PBS*-а, центрифугирањем 5 минута на 400xg и одливањем супернатанта као и у претходним прањима.

Ћелије су бојене на два различита начина. Антитело за *Bcl-2* (*Bcl-2 fluorescein isothiocyanate primary antibody, mhbc101, Life technologies*) је примарно антитело које је већ обележено флуорохромом (*FITC*), па су пермеабилисане ћелије инкубиране 15 минута на собној температури са антителом за *Bcl-2* у разблажењу 1:800. Преостале три групе ћелија (ћелије припремљене за бојење антителима за *Bax*, цитохром *c* и активну каспазу-3) су прво инкубиране 30 минута на собној температури са примарним антителима за *Bax* (*N20, sc-493, Santa Cruz Biotech. Inc*), цитохром *c* (*G7421, Promega*) и активну каспазу-3 (*#9661, Cell signaling Technology*). Након тога ове ћелије су опране *PBS*-ом и инкубиране са одговарајућим секундарним антителима 30 минута у мраку на собној температури. Секундарна антитела су коришћена у разблажењу 1:2000 и то *Alexa 488 goat anti-mouse IgG (H+L) antibody (A-11001, Life Technologies)* за цитохром *c* и *goat to rabbit IgG FITC (Ab6717-1, Abcam)* за *Bax* и активну каспазу-3. Потом су све четири групе ћелија опране и ресуспендоване у *PBS*-у и анализиране на проточном цитометру.

### **3.8. Евалуација проточном цитометријом**

Методом проточне цитометрије експресија протеина активног *Bax*-а, *Bcl-2*, цитохрома *c* и активне каспазе-3 је квантификована у третираним и нетретираним *HeLa* ћелијама након периода инкубације од 24 часа. Коришћењем проточног цитометра (*The Cytomics FC 500 Series, Beckman Coulter*) бројањем до 20 000 догађаја мерен је интензитет флуоресценције испитиваних протеина на популацији *HeLa* ћелија. Интензитет флуоресценције је стандардизован коришћењем антитела за негативну изотипску контролу. Просечан интензитет флуоресценције испитиваних ћелија (енг. *MFI, mean fluorescence intensity*) за *Bax* и *Bcl-2* је израчунат као однос интензитета флуоресценције одговарајућег протеина (*raw mean channel fluorescence*) и флуоресценције изотипске контроле. Квантификација експресије цитохрома *c* и активне каспазе-3 у третираним и нетретираним туморским ћелијама је извршена анализом процента ћелија које испољавају флуоресценцију.

## 4. Резултати

### 4.1. Комплекси рутенијума(II) и цисплатина смањују вијабилност туморских ћелија

У циљу одређивања цитотоксичних ефеката комплекса рутенијума(II) на туморске ћелије и ћелије здравих фибробласта, испитиван је ефекат два комплекса, комплекса *Ru-1* [Ru(Cl-Ph-tpy)(*o*-pda)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2"-terpiridin, *o*-pda = *o*-fenilendiamin) и комплекса *Ru-2* [Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2"-terpiridin, phen = 1,10-fenantrolin).

У циљу поређења цитотоксичног ефекта комплекса рутенијума, такође је испитиван и ефекат цисплатине на вијабилност туморских ћелија и фибробласта. Ефекат комплекса рутенијума(II) и цисплатине на вијабилност туморских ћелија и фибробласта одређиван је након култивације ћелија различитим концентрацијама комплекса рутенијума и цисплатине у временском периоду од 24, 48 и 72 часа, применом *MTT* теста вијабилности ћелија.

#### 4.1.1. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија епителног аденокарцинома плућа *A549*

Резултати нашег истраживања су показали да је применом комплекса *Ru-1* дошло до статистички значајног смањења вијабилности *A549* ћелија након 24 часа инкубације у концентрацијама већим од 10  $\mu\text{M}$  (за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је износила  $67,9 \pm 2,8\%$ , за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  је износила  $54,7 \pm 2,3\%$ , а за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  је била  $47,1 \pm 2,4\%$ ) у односу на вијабилност контролних нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 1). Након култивације *A549* ћелија у трајању од 24 часа комплексом *Ru-1* у концентрацијама нижим од 10  $\mu\text{M}$  (0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ ) није дошло до статистички значајне промене вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 1).

Такође, примена комплекса *Ru-2* довела је до статистички значајног смањења вијабилности *A549* ћелија након 24 часа инкубације у концентрацијама вишим од 10  $\mu\text{M}$  и то: за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је била  $79,7 \pm 2,8\%$ ; за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност је била  $54,8 \pm 4,6\%$ ; за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је износила  $47,1 \pm 2,7\%$  у односу на вијабилност



нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 1). Приликом третмана *A549* ћелија комплексом *Ru-2* у концентрацијама нижим од 10  $\mu\text{M}$  тј. применом концентрација од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 1).

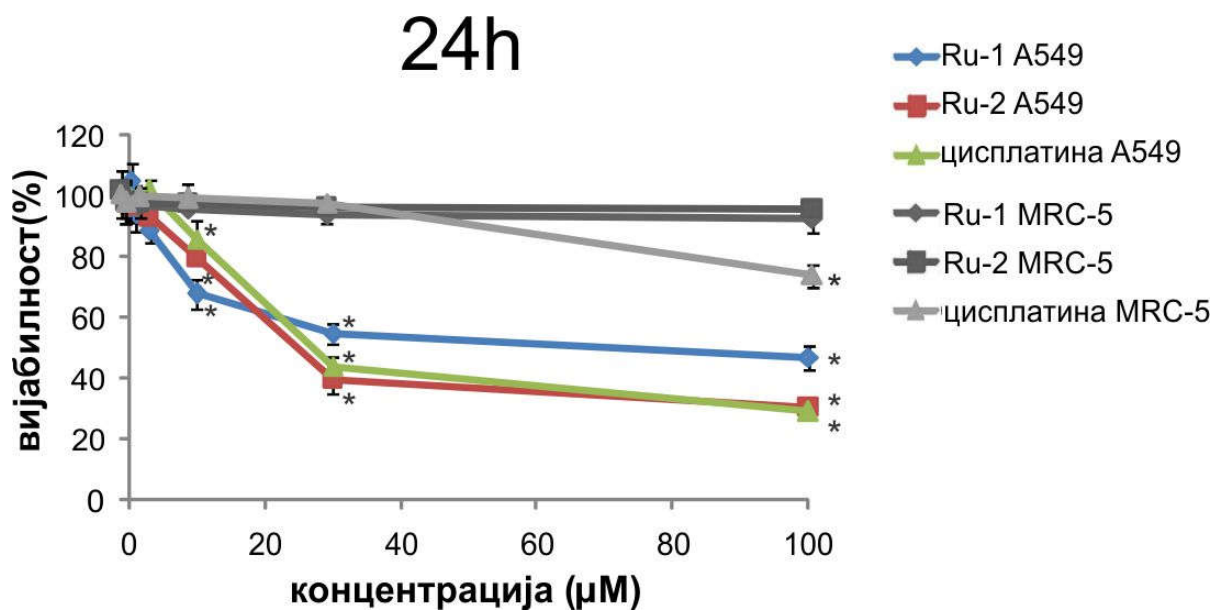
Исто тако и након 24-часовног третмана испитиваних ћелија цисплатином у концентрацијама од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  је дошло до статистички значајног смањења вијабилности *A549* ћелија (за 10  $\mu\text{M}$  вијабилност је била  $85,8 \pm 2,2\%$ ; за 30  $\mu\text{M}$  је износила  $43,8 \pm 3,6\%$  и за 100  $\mu\text{M}$  измерена вијабилност је била  $29,2 \pm 3,9\%$ ) у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 1). Након култивације *A549* ћелија цисплатином у трајању од 24 часа, при концентрацијама нижим од 10  $\mu\text{M}$  (0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ ) није дошло до статистички значајне промене вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 1).

Да бисмо у потпуности испитали цитоксични ефекат комплекса рутенијума и цисплатине у истим временским интервалима (24, 48 и 72 часа), истовремено са испитивањем вијабилности ћелија аденокарцинома плућа, *A549* ћелија, испитивали смо и вијабилност здравих фибробласта, тј. *MRC-5* ћелија које смо користили као контролу.

Током испитивања комплекса *Ru-1* у свим тестираним концентрацијима (0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) након 24 часа култивације није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 1).

Након култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 24 часа, у присуству растућих концентрација комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , није долазило до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 1).

Цисплатина је статистички значајно смањивала вијабилност *MRC-5* ћелија након 24 часа инкубације, само при максималној испитиваној концентрацији од 100  $\mu\text{M}$  на  $71,0 \pm 3,6\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 1). При концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  и 30  $\mu\text{M}$ , након 24 часа инкубације, није долазило до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 1).



**Графикон 1.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *A549* и *MRC-5* ћелија након 24-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Показали смо да испитивани комплекси рутенијума нису доводили до промене вијабилности тј. нису имали дејство на здраве ћелије а деловали су на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *A549* туморских ћелија после 24 часа.

Након 48-часовне инкубације испитиваних ћелија са комплексом *Ru-1*, до статистички значајног смањења вијабилности *A549* ћелија је дошло приликом примене комплекса *Ru-1* у концентрацији од 3 µM, при чему је вијабилност ћелија била смањена на  $70,2 \pm 7,3\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 2). Смањење вијабилности *A549* ћелија након примене комплекса *Ru-1* након 48 часова инкубације, такође је било статистички значајно и у концентрацијама од 10 µM, 30 µM и 100 µM и износило је  $46,7 \pm 10,8\%$ ,  $30,5 \pm 1,4\%$  и  $31,3 \pm 7,9\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 2). Приметно је да је, са продужењем трајања третмана (са 24 на 48 часова), до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних *A549* ћелија дошло приликом примене нижих концентрација испитиваних супстанци. За третман од 24 часа та концентрација је била 10 µM а за третман од 48 часова до статистички значајног смањења вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија је дошло при концентрацији комплекса *Ru-1* од 3 µM. При

концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ , након култивације *A549* ћелија у трајању од 48 часова, није долазило до статистички значајне промене вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 2).

Исти тренд примећујемо и приликом испитивања цитотоксичног ефекта комплекса *Ru-2* у трајању од 48 часова. До статистички значајног смањења вијабилности *A549* испитиваних ћелија је дошло при концентрацији од 3  $\mu\text{M}$ ; измерено је смањење вијабилности на  $78,3 \pm 0,4\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 2). Такође, забележено је статистички значајно смањење вијабилности *A549* ћелија након 48 часова инкубације са комплексом *Ru-2*, у концентрацијама од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , које је износило  $62,1 \pm 2,6\%$ ,  $43,9 \pm 4,6\%$  и  $30,6 \pm 3,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 2). Приликом примене комплекса *Ru-2* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  током третмана од 48 часова није долазило до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 2).

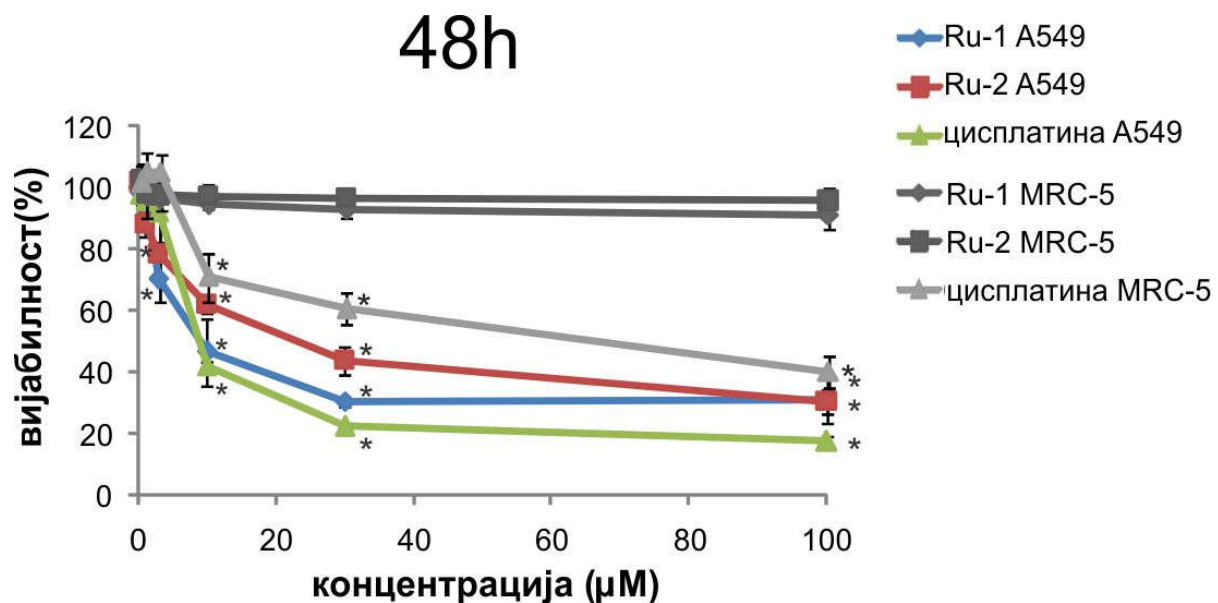
Испитивањем цитотоксичног ефекта цисплатине током третмана у трајању од 48 часова уочили смо да је при концентрацији цисплатине од 10  $\mu\text{M}$  дошло до статистички значајног смањења вијабилности *A549* ћелија и да је оно износило  $41,9 \pm 1,3\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 2). При концентрацијама цисплатине од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , то смањење вијабилности *A549* ћелија које је статистички значајно износило је  $22,3 \pm 1,2\%$  и  $17,5 \pm 1,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 2). Након култивације *A549* ћелија цисплатином у трајању од 48 часова, при концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , није било статистички значајне промене вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 2).

Након 48 сати култивације *MRC-5* ћелија при концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 2).

Применом комплекса *Ru-2* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  након 48 часова култивације није дошло до статистички значајне промене

вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 2).

Приликом култивације *MRC-5* ћелија цисплатином у концентрацији од 10  $\mu\text{M}$  и у трајању од 48 сати, дошло је до статистички значајног смањења вијабилности на  $66,8 \pm 7,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 2). При вишим концентрацијама цисплатине долазило је до даљег смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, тако да је најмања вијабилност испитиваних ћелија измерена при концентрацији цисплатине од 100  $\mu\text{M}$ , када је износила  $35,9 \pm 5,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија, а при концентрацији цисплатине од 30  $\mu\text{M}$  је износила  $56,3 \pm 5,0\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија ( $p<0,05$ , графикон 2). Није било уочено статистички значајно смањење вијабилности *MRC-5* ћелија након 48 часова инкубације, при концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 2).



**Графикон 2.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *A549* и *MRC-5* ћелија након 48-часовног третмана. \*  $p<0,05$

Показали смо да испитивани комплекси нису доводили до промене вијабилности тј. показано је да немају дејство на здраве ћелије, а деловање на туморске ћелије огледало се

у чињеници да смо показали да је постојало статистички значајно смањење вијабилности *A549* туморских ћелија после 48 часова.

Када смо испитивали ефекат комплекса *Ru-1* на *A549* ћелије аденокарцинома плућа након 72-часовне инкубације уочили смо да није било статистички значајног смањења вијабилности *A549* ћелија приликом примене комплекса *Ru-1* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 3). Међутим, када се комплекс *Ru-1* примени под истим условима (инкубација у трајању од 72 часа) у концентрацијама од 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $59,6 \pm 5,3\%$ ,  $35,4 \pm 2,9\%$ ,  $30,2 \pm 2,4\%$  и  $20,9 \pm 2,6\%$ ) забележено је статистички значајно смањење вијабилности третираних *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3).

Приликом 72-часовног третмана комплексом *Ru-2* у концентрацији од 3  $\mu\text{M}$  измерено је статистички значајно смањење вијабилности *A549* ћелија које је износило  $84,2 \pm 3,6\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). Применом виших концентрација комплекса *Ru-2* (10,  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) након инкубације од 72 часа такође смо измерили смањење вијабилности *A549* ћелија ( $69,5 \pm 7,1\%$ ,  $34,3 \pm 2,1\%$  и  $33,1 \pm 2,3\%$ ) у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). При нижим концентрацијама комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  након култивације *A549* ћелија у трајању од 72 часа, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 3).

Након култивације *A549* ћелија цисплатином у трајању од 72 часа, при концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 3). Применом цисплатине у концентрацији од 10  $\mu\text{M}$ , измерили смо статистички значајно смањење вијабилности *A549* ћелија које је износило  $43,4 \pm 1,9\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). Даље повећање концентрације цисплатине, за третман који траје 72 часа, довело је до још значајнијег смањења вијабилности *A549* туморских ћелија; за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  измерена вијабилност је била  $20,0 \pm 1,3\%$ , а за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  је износила  $17,5 \pm 0,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија. Смањење вијабилности третираних

A549 ћелија је било статистички значајно за обе испитиване концентрације ( $p < 0,05$ , графикон 3).

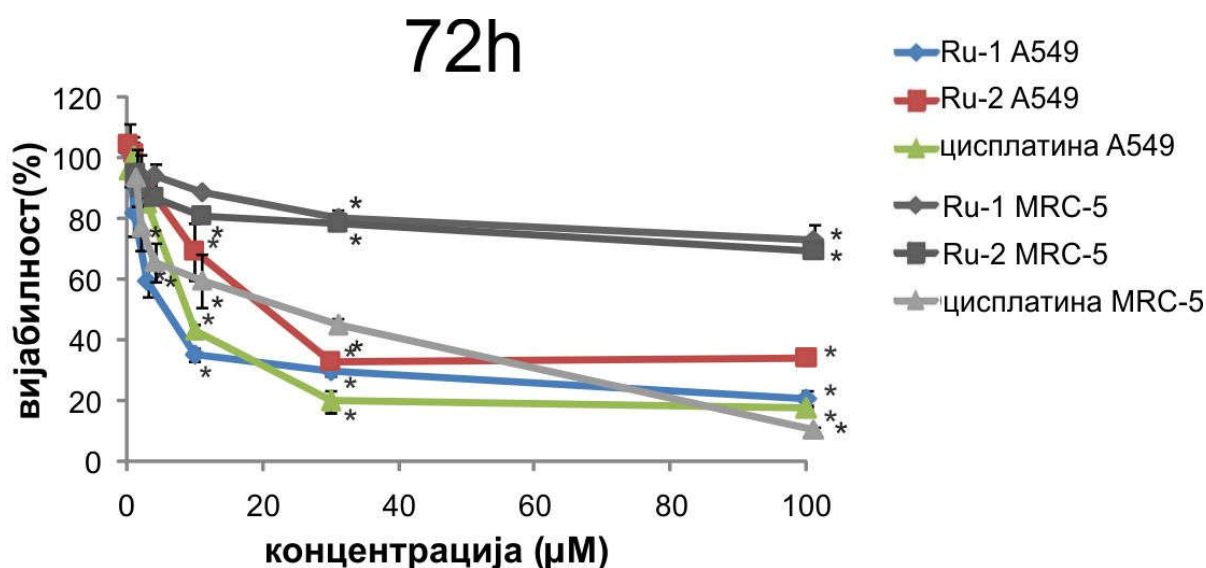
При култивацији *MRC-5* ћелија у трајању од 72 часа до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија, је дошло применом концентрације комплекса *Ru-1* од 10  $\mu\text{M}$ , када је вијабилност износила  $87,6 \pm 1,3 \%$  у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). При концентрацији комплекса *Ru-1* од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације такође је дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија на  $79,2 \pm 3,8\%$  и  $71,9 \pm 3,7\%$  у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). При концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 3).

Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија у присуству комплекса *Ru-2* концентрације од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  су доводиле до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). При концентрацији комплекса *Ru-2* од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је била смањена на  $79,5 \pm 4,8\%$ , при концентрацији комплекса *Ru-2* од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је била смањена на  $77,1 \pm 3,3\%$ , а при максималној испитиваној концентрацији од 100  $\mu\text{M}$ , вијабилност *MRC-5* ћелија је износила  $68,2 \pm 1,4\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). Након 72 часа инкубације *MRC-5* ћелија, при концентрацији комплекса *Ru-2* од 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , није долазило до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 3).

Након 72 часовне култивације *MRC-5* ћелија у присуству растућих концентрација цисплатине, дошло је до смањења вијабилности *MRC-5* ћелија при концентрацијама цисплатине од 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ , графикон 3). Највеће смањење вијабилности *MRC-5* ћелија било је при концентрацији цисплатине од 100  $\mu\text{M}$  када је вијабилност *MRC-5* ћелија износила  $9,2 \pm 1,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). Није дошло до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, након 72 часа инкубације, при концентрацијама цисплатине

од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 3).

Показали смо да су испитивани комплекси деловали токсично на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *A549* туморских ћелија после 72 часа док су за фибробласте токсичне концентрације 10 пута веће него за *A549* ћелије.



**Графикон 3.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *A549* и *MRC-5* ћелија након 72-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

У табели 1 су приказане израчунате вредности  $IC_{50}$  концентрације за комплексе рутенијума, *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину за *A549* и *MRC-5* ћелије. Након 24 часа култивације *A549* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $55,3 \pm 9,3 \mu\text{M}$ ,  $25,1 \pm 3,3 \mu\text{M}$  и  $27,2 \pm 4,1 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне култивације *A549* ћелија са тестираним једињењима,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $9,5 \pm 3,2 \mu\text{M}$ ,  $23,8 \pm 3,8 \mu\text{M}$  и  $9,5 \pm 1,8 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *A549* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $4,6 \pm 2,1 \mu\text{M}$ ,  $21,7 \pm 4,3 \mu\text{M}$  и  $8,8 \pm 2,7 \mu\text{M}$  (Табела 1).

Након 24 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300  $\mu\text{M}$ , а за цисплатину  $183,7 \pm 16,2 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне инкубације *MRC-5* ћелија са тестираним једињењима,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300  $\mu\text{M}$ , а за цисплатину  $43,1 \pm 8,8 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $192,6 \pm 17,2 \mu\text{M}$ ,  $238,1 \pm 19,3 \mu\text{M}$  и  $19,7 \pm 6,7 \mu\text{M}$  (Табела 1).

Добијене вредности  $IC_{50}$  концентрација нам јасно показују да испитивани комплекси нису доводили до значајне промене вијабилности тј. да немају дејство на здраве ћелије а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *A549* туморских ћелија.

<b>A549</b>			
<b><math>IC_{50}(\mu\text{M})</math></b>	<b>Ru-1</b>	<b>Ru-2</b>	<b>цисплатина</b>
<b>72h</b>	$4,6 \pm 2,1$	$21,7 \pm 4,3$	$8,8 \pm 2,7$
<b>48h</b>	$9,5 \pm 3,2$	$23,8 \pm 3,8$	$9,5 \pm 1,8$
<b>24h</b>	$55,3 \pm 9,3$	$25,1 \pm 3,3$	$27,2 \pm 4,1$
<b>MRC-5</b>			
<b><math>IC_{50}(\mu\text{M})</math></b>	<b>Ru-1</b>	<b>Ru-2</b>	<b>цисплатина</b>
<b>72h</b>	$192,6 \pm 17,2$	$238,1 \pm 19,3$	$19,7 \pm 6,7$
<b>48h</b>	>300	>300	$43,1 \pm 8,8$
<b>24h</b>	>300	>300	$183,7 \pm 16,2$

Табела 1. Вредности  $IC_{50}$  концентрација комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине за *A549* и *MRC-5* ћелије.

#### 4.1.2. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија карцинома дојке *MCF7*

Када смо испитивали ефекат комплекса *Ru-1* на *MCF7* ћелије карцинома дојке након 24-часовне инкубације уочили смо да није било статистички значајног смањења



вијабилности *MCF7* ћелија приликом примене комплекса *Ru-1* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 4). Међутим, када се комплекс *Ru-1* примени под истим условима (инкубација у трајању од 24 часа) у концентрацијама од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $71,2 \pm 2,4\%$  и  $53,6 \pm 1,7\%$ ) дошло је до статистички значајног смањења вијабилности третираних *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 4).

Приликом 24-часовног третмана комплексом *Ru-2* у концентрацији од 3  $\mu\text{M}$  измерено је статистички значајно смањење вијабилности *MCF7* ћелија које је износило  $76,1 \pm 2,2\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 4). Применом виших концентрација комплекса *Ru-2* (10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) након инкубације од 24 часа такође смо забележили смањење вијабилности *MCF7* ћелија ( $55,7 \pm 1,4\%$ ,  $13,6 \pm 0,9\%$  и  $10,8 \pm 2,9\%$ ) у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 4). При нижим концентрацијама комплекса *Ru-2* које су износиле 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  након култивације *MCF7* ћелија у трајању од 24 часа, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 4).

Након култивације *MCF7* ћелија цисплатином у трајању од 24 часа, при концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 4). Применом цисплатине у концентрацији од 3  $\mu\text{M}$ , мерили смо статистички значајно смањење вијабилности *MCF7* ћелија које је износило  $77,8 \pm 2,9\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 4). Даље повећање концентрације цисплатине, за третман који траје 24 часа, довело је до још значајнијег смањења вијабилности *MCF7* туморских ћелија; за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност је износила  $78,9 \pm 2,9\%$ , за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  износила је  $63,6 \pm 3,1\%$ , а за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$ , износила је  $51,4 \pm 1,4\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија. Смањење вијабилности третираних *MCF7* ћелија је било статистички значајно за испитиване концентрације од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $p<0,05$ , графикон 4).

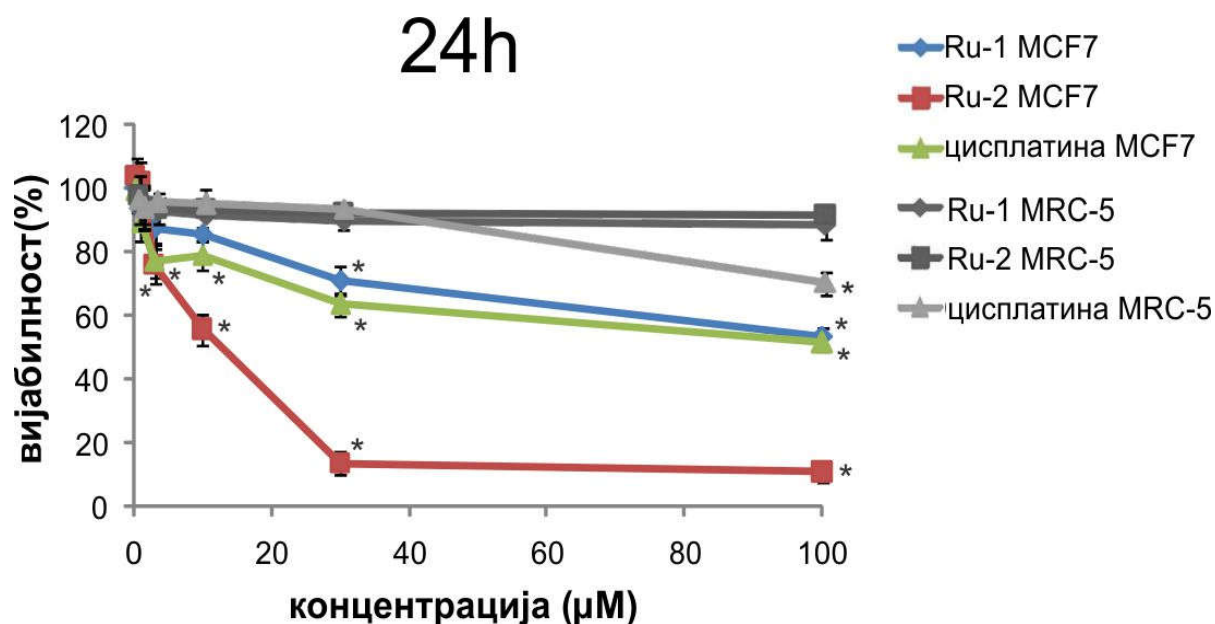
Да бисмо у потпуности испитали цитоксични ефекат комплекса рутенијума и цисплатине у истим временским интервалима (24, 48 и 72 часа), истовремено са

испитивањем вијабилности ћелија карцинома дојке, *MCF7* ћелија, испитивали смо и вијабилност здравих фибробласта, тј. *MRC-5* ћелија које смо користили као контролу.

Током испитивања комплекса *Ru-1* у свим испитиваним концентрацијима (0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) након 24 часа култивације није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност *MRC-5* ћелија које нису биле подвргнуте третману комплексом *Ru-2* ( $p > 0,05$ , графикон 4).

Након култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 24 часа, у присуству растућих концентрација комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 4).

Цисплатина је статистички значајно смањивала вијабилност *MRC-5* ћелија након 24 часа инкубације, само при максималној испитиваној концентрацији од 100  $\mu\text{M}$  на  $71,0 \pm 3,6\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 4). При концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  и 30  $\mu\text{M}$ , након 24 часа инкубације, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 4).



**Графикон 4.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *MCF7* и *MRC-5* ћелија након 24-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Показали смо да испитивани комплекси нису доводили до промене вијабилности тј. нису деловали на здраве ћелије, а деловали су на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* туморских ћелија после 24 часа.

Наше истраживање је показало да је примена комплекса *Ru-1* статистички значајно смањила вијабилност *MCF7* ћелија након 48 часова инкубације у концентрацијама већим од 3  $\mu\text{M}$  (за концентрацију од 3  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је износила  $79,6 \pm 2,12\%$ , за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  је износила  $65,2 \pm 1,8\%$ , за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  је износила  $42,8 \pm 2,0\%$ , а за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  је износила  $13,7 \pm 2,4\%$ ) у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 5). Приметно је да се са продужењем трајања третмана (са 24 на 48 часова) статистички значајно смањење вијабилности испитиваних *MCF7* ћелија јавља при нижој концентрацији испитиваних супстанци. За третман од 24 часа та концентрација је 30  $\mu\text{M}$  а за третман од 48 часова до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* ћелија је дошло при концентрацији комплекса *Ru-1* од 3  $\mu\text{M}$ . Након култивације *MCF7* ћелија у трајању од 48 часова комплексом *Ru-1* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 5).

Такође, примена комплекса *Ru-2* је статистички значајно смањивала вијабилност *MCF7* ћелија након 48 часова инкубације у концентрацијама вишим од 3  $\mu\text{M}$  и то: за концентрацију од 3  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је износила  $75,7 \pm 4,1\%$  за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је износила  $25,0 \pm 2,2\%$ ; за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност је износила  $8,9 \pm 1,6\%$ ; за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је износила  $5,6 \pm 3,4\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 5). Приликом третмана *MCF7* ћелија комплексом *Ru-2* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MCF7* ћелија у односу на вијабилност *MCF7* ћелија које нису подвргнуте третману комплексом *Ru-2* ( $p > 0,05$ , графикон 5).

Исто тако, и након 48-часовног третмана испитиваних ћелија цисплатином у концентрацијама од 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , дошло је до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* ћелија (за концентрацију од 3  $\mu\text{M}$  вијабилност је износила  $88,2 \pm 2,3\%$ ; за 10  $\mu\text{M}$  вијабилност је износила  $65,1 \pm 1,1\%$ ; за 30  $\mu\text{M}$  је износила  $43,3 \pm$

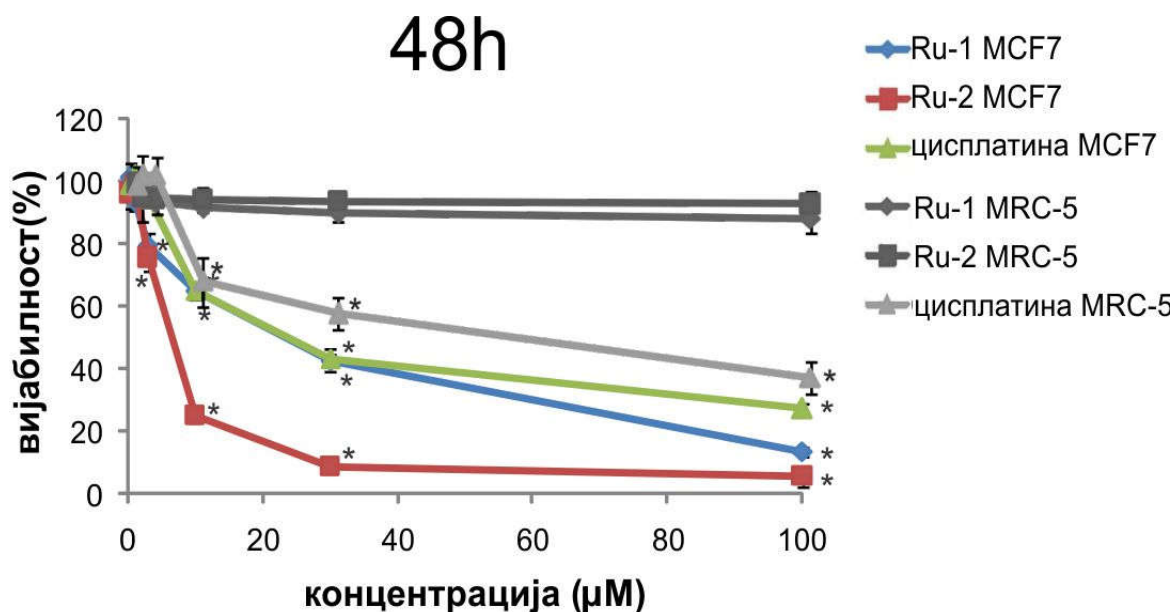
3,1% и за 100  $\mu\text{M}$  измерена је вијабилност од  $27,2 \pm 2,1\%$ ) у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 5). Након култивације *MCF7* ћелија цисплатином у трајању од 48 часова, при концентрацијама нижим од 3  $\mu\text{M}$  (0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ ) није дошло до статистички значајне промене вијабилности третираних *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 5).

Након 48 сати култивације *MRC-5* ћелија при концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 5).

При концентрацијама комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  након 48 часова култивације није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 5).

Приликом култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 48 сати, цисплатина примењена у концентрацији од 10  $\mu\text{M}$  је статистички значајно смањивала вијабилност третираних ћелија на  $66,8 \pm 7,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 5). При вишим концентрацијама цисплатине долазило је до даљег смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, тако да је најмања вијабилност испитиваних ћелија била при концентрацији цисплатине од 100  $\mu\text{M}$ , када је износила  $35,9 \pm 5,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија, а при концентрацији цисплатине од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност третираних ћелија је износила  $56,3 \pm 5,0\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 5). Није уочено статистички значајно смањење вијабилности *MRC-5* ћелија, након 48 часова инкубације, при концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 5).

Показали смо да испитивани комплекси нису доводили до промене вијабилности тј. нису имали дејство на здраве ћелије, а деловали су на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* туморских ћелија после 48 часова.



**Графикон 5.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *MCF7* и *MRC-5* ћелија након 48-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Након 72-часовне инкубације испитиваних ћелија са комплексом *Ru-1*, до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* ћелија долазило је приликом примене комплекса *Ru-1* у концентрацији од 3 µM, при којој је вијабилност ћелија смањена на  $84,2 \pm 4,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). Смањење вијабилности *MCF7* ћелија након примене комплекса *Ru-1* после 72 часа инкубације, такође је било статистички значајно и у концентрацијама од 10 µM, 30 µM и 100 µM и износило је  $59,9 \pm 7,7\%$ ,  $17,2 \pm 6,1\%$  и  $1,84 \pm 3,3\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). При концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3 µM, 1 µM и 3µM, након култивације *MCF7* ћелија у трајању од 72 часа, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 6).

Исти тренд смо приметили и приликом испитивања цитотоксичног ефекта комплекса *Ru-2* у трајању од 72 часа. До статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* испитиваних ћелија долазило је при концентрацији од 3 µM; измерено је смањење вијабилности на  $58,1 \pm 7,6\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). Такође, примећено је статистички значајно смањење вијабилности *MCF7* ћелија након 72 часа инкубације са комплексом *Ru-2*, у концентрацијама од 10 µM, 30 µM

и 100  $\mu\text{M}$ , на  $11,0 \pm 2,6\%$ ,  $3,4 \pm 1,6\%$  и  $2,7 \pm 1,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). Приликом примене комплекса *Ru-2* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  током третмана од 72 часа није дошло до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 6).

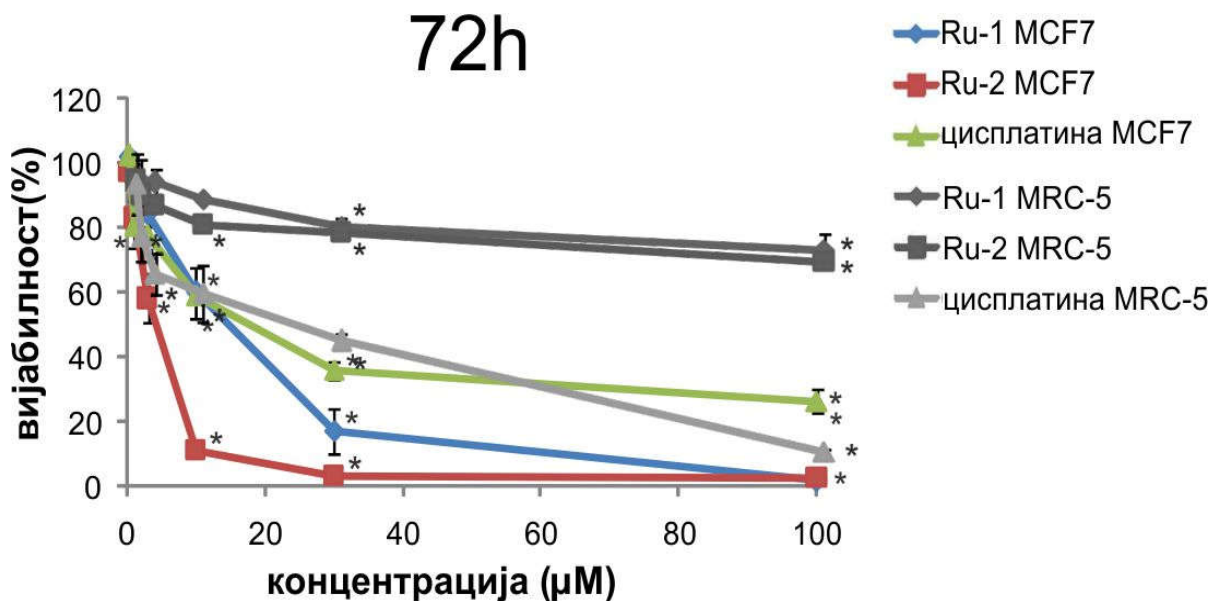
Испитивањем цитотоксичног ефекта цисплатине током третмана у трајању од 72 часа уочено је да при концентрацији цисплатине од 1  $\mu\text{M}$  долази до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* ћелија и да је вијабилност тада износила  $80,0 \pm 1,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). При концентрацијама цисплатине од 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , то смањење вијабилности *MCF7* ћелија које је статистички значајно износило је  $77,8 \pm 2,8\%$ ,  $59,0 \pm 6,1\%$ ,  $36,1 \pm 2,4\%$  и  $26,4 \pm 3,5\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). Након култивације *MCF7* ћелија цисплатином у трајању од 72 часа, при концентрацији од 0,3  $\mu\text{M}$ , није уочена статистички значајна промена вијабилности *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 6).

При култивацији *MRC-5* ћелија у трајању од 72 часа до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија, долазило је при концентрацији комплекса *Ru-1* од 10  $\mu\text{M}$ , када је вијабилност износила  $87,6 \pm 1,3\%$  у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). При концентрацији комплекса *Ru-1* од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације такође је долазило до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија на  $79,2 \pm 3,8\%$  и  $71,9 \pm 3,7\%$  у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). При концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 6).

Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија у присуству комплекса *Ru-2* концентрације од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  дошло је до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). При концентрацији комплекса *Ru-2* од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је била смањена на  $79,5 \pm 4,8\%$ , при концентрацији комплекса *Ru-2* од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је била смањена на  $77,1 \pm 3,3\%$ , а при максималној испитиваној

концентрацији од 100  $\mu\text{M}$ , вијабилност *MRC-5* ћелија је износила  $68,2 \pm 1,4\%$  у односу на вијабилност *MRC-5* ћелија које нису биле подвргнуте третману комплексом *Ru-2* ( $p < 0,05$ , графикон 6). Након 72 часа инкубације *MRC-5* ћелија, при концентрацији комплекса *Ru-2* од 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 6).

Након 72 часовне култивације *MRC-5* ћелија у присуству растућих концентрација цисплатине, дошло је до смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија при концентрацијама цисплатине од 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ , графикон 6). Највеће смањење вијабилности *MRC-5* ћелија било је при концентрацији цисплатине од 100  $\mu\text{M}$  када је вијабилност *MRC-5* ћелија износила  $9,2 \pm 1,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). Није дошло до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, након 72 часа инкубације, при концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 6).



**Графикон 6.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *MCF7* и *MRC-5* ћелија након 72-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Можемо да закључимо да су испитивани комплекси деловали токсично на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* туморских ћелија после 72 часа, а да су доводили до промене вијабилности здравих ћелија при значајно већим концентрацијама.

У табели 2 су приказане израчунате  $IC_{50}$  концентрације за комплексе рутенијума, *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину на *MCF7* и *MRC-5* ћелијама. Након 24 часа култивације *MCF7* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $102,4 \pm 12,6 \mu\text{M}$ ,  $13,9 \pm 3,4 \mu\text{M}$  и  $94,1 \pm 11,7 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне култивације *MCF7* ћелија са тестираним једињењима,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $22,9 \pm 1,7 \mu\text{M}$ ,  $7,2 \pm 1,3 \mu\text{M}$  и  $24,5 \pm 3,3 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *MCF7* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $13,8 \pm 1,8 \mu\text{M}$ ,  $4,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$  и  $17,0 \pm 1,9 \mu\text{M}$  (Табела 2).

Након 24 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300  $\mu\text{M}$ , а за цисплатину  $183,7 \pm 16,2 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне инкубације *MRC-5* ћелија са тестираним једињењима,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300  $\mu\text{M}$ , а за цисплатину  $43,1 \pm 8,8 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $192,6 \pm 17,2 \mu\text{M}$ ,  $238,1 \pm 19,3 \mu\text{M}$  и  $19,7 \pm 6,7 \mu\text{M}$  (Табела 2).

Добијене вредности  $IC_{50}$  концентрација нам јасно показују да испитивани комплекси нису доводили до значајне промене вијабилности тј. нису имали дејство на здраве ћелије а деловали су на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* туморских ћелија.



IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	MCF7		
	Ru-1	Ru-2	цисплатина
72h	13,8 $\pm$ 1,8	4,6 $\pm$ 0,9	17,0 $\pm$ 1,9
48h	22,9 $\pm$ 1,7	7,2 $\pm$ 1,3	24,5 $\pm$ 3,3
24h	102,4 $\pm$ 12,6	13,9 $\pm$ 3,4	94,1 $\pm$ 11,7
IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	MRC-5		
	Ru-1	Ru-2	цисплатина
72h	192,6 $\pm$ 17,2	238,1 $\pm$ 19,3	19,7 $\pm$ 6,7
48h	>300	>300	43,1 $\pm$ 8,8
24h	>300	>300	183,7 $\pm$ 16,2

Табела 2. Вредности IC<sub>50</sub> концентрација комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине за *MCF7* и *MRC-5* ћелије.

#### 4.1.3. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија карцинома цервикса *HeLa*

Након 24-часовне инкубације испитиваних ћелија са комплексом *Ru-1*, до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* ћелија је дошло приликом примене комплекса *Ru-1* у концентрацији од 100  $\mu$ M, при чему је вијабилност ћелија смањена на 75,6  $\pm$  0,1% у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 7). При концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M и 30  $\mu$ M након култивације *HeLa* ћелија у трајању од 24 часа, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *HeLa* ћелија у односу на вијабилност *HeLa* ћелија које нису биле подвргнуте третману комплексом *Ru-1* ( $p > 0,05$ , графикон 7).

Исти тренд смо приметили и приликом испитивања цитотоксичног ефекта комплекса *Ru-2* у трајању од 24 часа. До статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* испитиваних ћелија је дошло при концентрацији од 10  $\mu$ M; измерено је смањење вијабилности на 30,4  $\pm$  3,1% у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 7). Такође, примећено је статистички значајно смањење вијабилности *HeLa*

ћелија након 24 часа инкубације са комплексом *Ru-2*, у концентрацијама од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , на  $12,2 \pm 3,6\%$  и  $6,7 \pm 0,5\%$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 7). Приликом примене комплекса *Ru-2* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  током третмана од 24 часа није дошло до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 7).

Испитивањем цитотоксичног ефекта цисплатине током третмана у трајању од 24 часа уочава се да је при концентрацији цисплатине од 30  $\mu\text{M}$  дошло до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* ћелија и да измерена вијабилност износила  $44,7 \pm 1,6\%$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 7). При концентрацији цисплатине од 100  $\mu\text{M}$ , то смањење вијабилности *HeLa* ћелија које је статистички значајно износило је  $23,1 \pm 2,3\%$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 7). Након култивације *HeLa* ћелија цисплатином у трајању од 24 часа, при концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  нису измерене статистички значајне промене вијабилности *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 7).

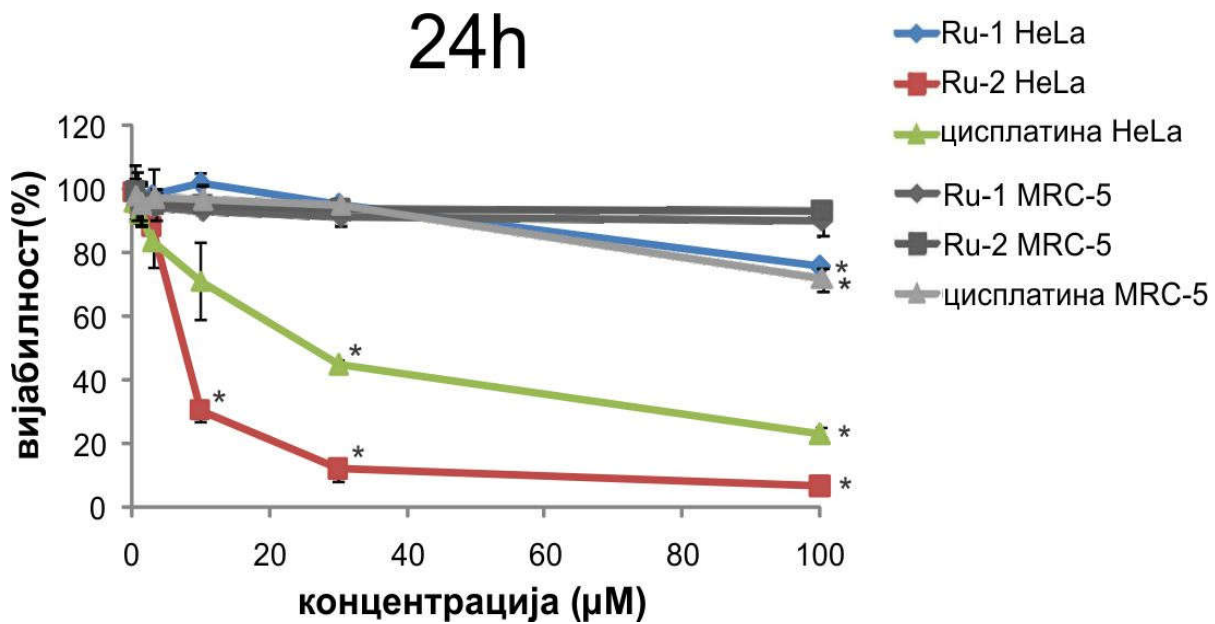
Да бисмо у потпуности испитали цитотоксични ефекат комплекса рутенијума и цисплатине у истим временским интервалима (24, 48 и 72 часа), истовремено са испитивањем вијабилности ћелија карцинома цервикса, односно *HeLa* ћелија, испитивали смо и вијабилност здравих фибробласта, тј. *MRC-5* ћелија које смо користили као контролу.

Током испитивања комплекса *Ru-1* у свим испитиваним концентрацијама (0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) након 24 часа култивације није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 7).

Након култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 24 часа, у присуству растућих концентрација комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 7).

Цисплатина је статистички значајно смањивала вијабилност *MRC-5* ћелија након 24 часа инкубације, само при максималној испитиваној концентрацији од 100  $\mu\text{M}$  на  $71,0 \pm$

3,6 % у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ ). При концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  и 30  $\mu\text{M}$ , након 24 часа инкубације, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 7).



**Графикон 7.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *HeLa* и *MRC-5* ћелија након 24-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Показали смо да испитивани комплекси не доводе до промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије, а од испитиваних комплекса рутенијума само је комплекс *Ru-2* деловао на туморске *HeLa* ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* туморских ћелија после 24 часа.

Када смо испитивали ефекат комплекса *Ru-1* на *HeLa* ћелије карцинома цервикса након 48-часовне инкубације уочили смо да није било статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* ћелија приликом примене комплекса *Ru-1* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 8). Међутим, када се комплекс *Ru-1* применио под истим условима (инкубација у трајању од 24 часа) у концентрацији од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $86,3 \pm 0,8\%$  и  $57,3 \pm 5,4\%$ ) дошло је до статистички значајног смањења вијабилности третираних *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 8). Приметно је да је

са продужењем трајања третмана (са 24 на 48 часова) статистички значајно смањење вијабилности испитиваних *HeLa* ћелија уочено при нижој концентрацији. За третман од 24 часа та концентрација је 100  $\mu\text{M}$  а за третман од 48 часова до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* ћелија дошло је при концентрацији комплекса *Ru-1* од 30  $\mu\text{M}$ .

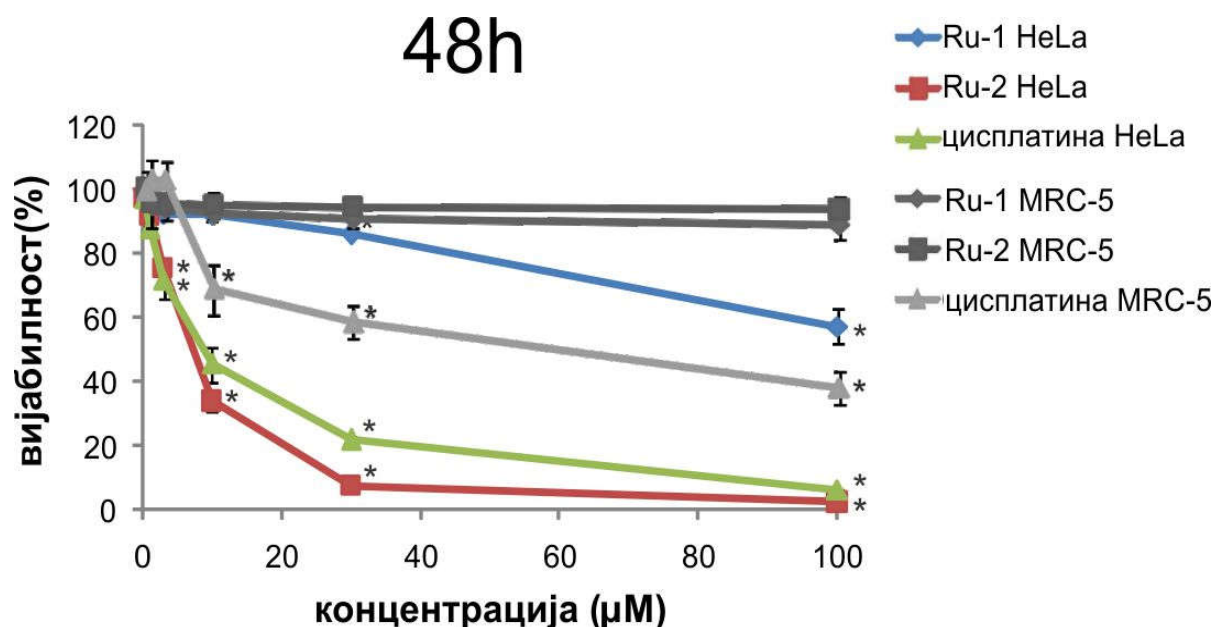
Приликом 48-часовног третмана комплексом *Ru-2* у концентрацији од 3  $\mu\text{M}$  измерено је статистички значајно смањење вијабилности *HeLa* ћелија које је износило  $75,6 \pm 2,2\%$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 8). Применом виших концентрација комплекса *Ru-2* (10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) након инкубације од 48 часова такође смо забележили статистички значајно смањење вијабилности *HeLa* ћелија ( $34,0 \pm 3,2\%$ ,  $7,6 \pm 0,4\%$  и  $2,3 \pm 0,4\%$ ) у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 8). При нижим концентрацијама комплекса *Ru-2* које су износиле 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  након култивације *HeLa* ћелија у трајању од 48 часова, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 8).

Након култивације *HeLa* ћелија цисплатином у трајању од 48 часова, при концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 8). Применом цисплатине у концентрацији од 3  $\mu\text{M}$ , измерено је статистички значајно смањење вијабилности *HeLa* ћелија које је износило  $71,8 \pm 4,7\%$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 8). Даље повећање концентрације цисплатине, за третман који траје 48 часова, довело је до још значајнијег смањења вијабилности *HeLa* туморских ћелија, за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  износило је  $45,6 \pm 5,4\%$ , за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  износило је  $21,8 \pm 1,3\%$  а за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$ , износило је  $6,4 \pm 0,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија. Смањење вијабилности третираних *HeLa* ћелија је било статистички значајно за испитиване концентрације од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ , графикон 8).

Након 48 сати култивације *MRC-5* ћелија при концентрацији комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 8).

Применом комплекса комплекса *Ru-2* у концентрацији од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  након 48 часова култивације није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 8).

Приликом култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 48 сати, концентрација цисплатине од 10  $\mu\text{M}$  је довела до статистички значајног смањења вијабилности на  $66,8 \pm 7,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 8). При вишим концентрацијама цисплатине дошло је до даљег смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, тако да је најмања вијабилност испитиваних ћелија измерена при концентрацији цисплатине од 100  $\mu\text{M}$ , када је износила  $35,9 \pm 5,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија, а при концентрацији цисплатине од 30  $\mu\text{M}$  је износила  $56,3 \pm 5,0\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија ( $p<0,05$ , графикон 8). Није уочено статистички значајно смањење вијабилности *MRC-5* ћелија након 48 часова инкубације, при концентрацији цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 8).



**Графикон 8.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *HeLa* и *MRC-5* ћелија након 48-часовног третмана. \*  $p<0,05$

Испитивани комплекси нису доводили до промене вијабилности тј. нису испољили дејство на здраве ћелије, а од испитиваних комплекса рутенијума посебно је комплекс *Ru-2* деловао на ћелије аденокарцинома цервикса доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* туморских ћелија после 48 часова.

Наше истраживање је показало да је примена комплекса *Ru-1* статистички значајно смањила вијабилност *HeLa* ћелија након 72 часа инкубације у концентрацијама већим од 3  $\mu\text{M}$  (за концентрацију од 3  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је износила  $75,1 \pm 2,1\%$ , за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  је износила  $65,2 \pm 6,0\%$ , за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  је износила  $60,5 \pm 4,1\%$ , а за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  је износила  $43,5 \pm 6,8\%$ ) у односу на вијабилност контролних нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 9). Након култивације *HeLa* ћелија у трајању од 72 часа комплексом *Ru-1* у концентрацији од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 9).

Такође, примена комплекса *Ru-2* је статистички значајно смањила вијабилност *HeLa* ћелија након 72 часа инкубације у концентрацијама вишим од 1  $\mu\text{M}$  и то: за концентрацију од 1  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је била  $81,6 \pm 1,7\%$ ; за концентрацију од 3  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је била  $69,9 \pm 4,1\%$ ; за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је износила  $27,8 \pm 1,1\%$ ; за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност је била  $6,4 \pm 0,6\%$ ; за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је износила  $3,4 \pm 0,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 9). Приликом третмана *HeLa* ћелија комплексом *Ru-2* у концентрацији од 0,3  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 9).

Исто тако и након 72-часовног третмана испитиваних ћелија цисплатином у концентрацијама од 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , дошло је до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* ћелија (за концентрацију цисплатине од 3  $\mu\text{M}$  вијабилност је била  $71,3 \pm 2,0\%$ ; за 10  $\mu\text{M}$  вијабилност је износила  $37,4 \pm 6,8\%$ ; за 30  $\mu\text{M}$  је износила  $19,3 \pm 2,2\%$  и за 100  $\mu\text{M}$  измерена је вијабилност од  $5,5 \pm 0,1\%$ ) у односу на вијабилност *HeLa* ћелија које нису биле изложене дејству цисплатине ( $p < 0,05$ , графикон 9). Након култивације *HeLa* ћелија цисплатином у трајању од 72 часа, при концентрацијама нижим

од 3  $\mu\text{M}$  (0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ ) није дошло до статистички значајне промене вијабилности третираних *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 9).

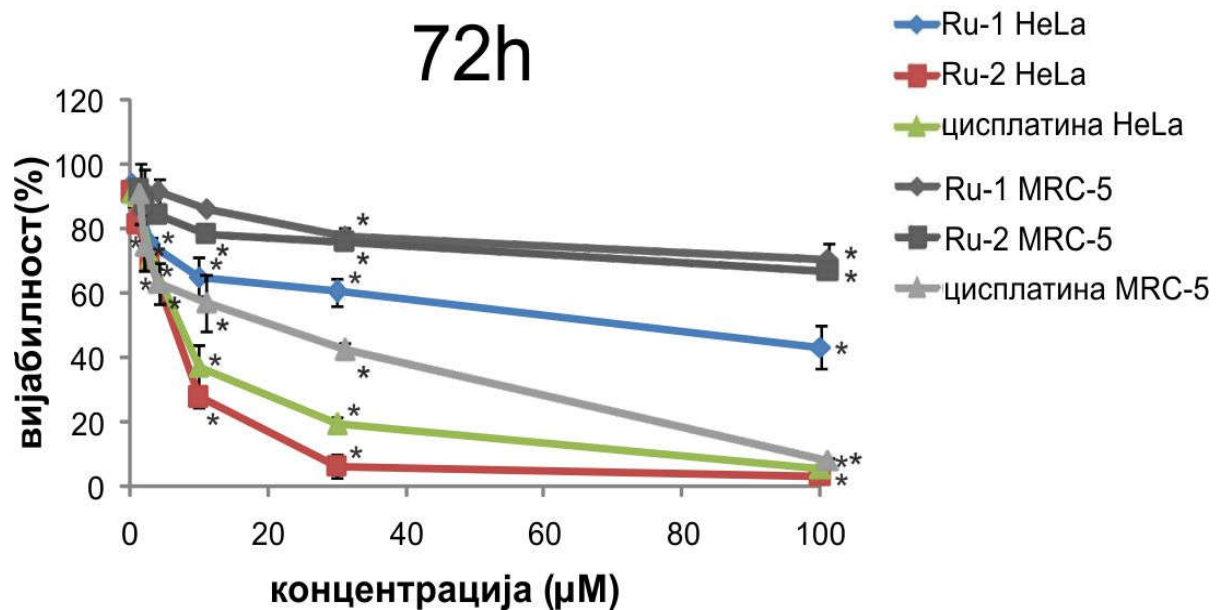
При култивацији *MRC-5* ћелија у трајању од 72 часа до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија, је дошло при концентрацији комплекса *Ru-1* од 10  $\mu\text{M}$ , када је вијабилност износила  $87,6 \pm 1,3$  % у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 9). При концентрацији комплекса *Ru-1* од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације је такође дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија на  $79,2 \pm 3,8\%$  и  $71,9 \pm 3,7\%$  у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 9). При концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 9).

Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија у присуству комплекса *Ru-2* у концентрацијама од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  је дошло до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 9). При концентрацији комплекса *Ru-2* од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је смањена на  $79,5 \pm 4,8\%$ , при концентрацији комплекса *Ru-2* од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је смањена на  $77,1 \pm 3,3\%$ , а при максималној испитиваној концентрацији од 100  $\mu\text{M}$ , вијабилност *MRC-5* ћелија је износила  $68,2 \pm 1,4\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 9). Након 72 часа инкубације *MRC-5* ћелија, при концентрацији комплекса *Ru-2* од 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 9).

Након 72 часовне култивације *MRC-5* ћелија у присуству растућих концентрација цисплатине, дошло је до смањења вијабилности *MRC-5* ћелија при концентрацијама цисплатине од 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $p<0,05$ , графикон 9). Највеће смањење вијабилности *MRC-5* ћелија било је при концентрацији цисплатине од 100  $\mu\text{M}$  када је вијабилност *MRC-5* ћелија износила  $9,2 \pm 1,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 9). Није дошло до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, након 72 часа инкубације, при концентрацијама цисплатине

од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 9).

Показали смо да испитивани комплекси делују на ћелије аденокарцинома цервикса доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* туморских ћелија после 72 часа, а да доводе до промене вијабилности здравих ћелија при многоструко вишим концентрацијама у односу на *HeLa* ћелије.



**Графикон 9.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *HeLa* и *MRC-5* ћелија након 72-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

У табели 3 су приказане израчунате вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе рутенијума, *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину за *HeLa* и *MRC-5* ћелије. Након 24 часа култивације *HeLa* ћелија са испитиваним супстанцама, вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $212,4 \pm 36,4 \mu\text{M}$ ,  $7,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$  и  $25,7 \pm 2,9 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне култивације *HeLa* ћелија са тестираним једињењима, израчунате вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $120,2 \pm 13,5 \mu\text{M}$ ,  $7,4 \pm 1,6 \mu\text{M}$  и  $8,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *HeLa* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе



*Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $75,5 \pm 10,4 \mu\text{M}$ ,  $6,4 \pm 1,3 \mu\text{M}$  и  $7,6 \pm 1,7 \mu\text{M}$  (Табела 3).

Након 24 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама, вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300  $\mu\text{M}$ , а за цисплатину  $183,7 \pm 16,2 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне инкубације *MRC-5* ћелија са тестираним једињењима,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300  $\mu\text{M}$ , а за цисплатину  $43,1 \pm 8,8 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама, вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $192,6 \pm 17,2\mu\text{M}$ ,  $238,1 \pm 19,3\mu\text{M}$  и  $19,7 \pm 6,7\mu\text{M}$  (Табела 3).

Добијене вредности  $IC_{50}$  концентрација нам јасно показују да испитивани комплекси не доводе до значајне промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије а делују на ћелије аденокарцинома цервикса доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* туморских ћелија.

<b>HeLa</b>			
<b><math>IC_{50}(\mu\text{M})</math></b>	<b>Ru-1</b>	<b>Ru-2</b>	<b>цисплатина</b>
<b>72h</b>	$75,5 \pm 10,4$	$6,4 \pm 1,3$	$7,6 \pm 1,7$
<b>48h</b>	$120,2 \pm 13,5$	$7,4 \pm 1,6$	$8,7 \pm 1,3$
<b>24h</b>	$212,4 \pm 36,4$	$7,5 \pm 1,4$	$25,7 \pm 2,9$
<b>MRC-5</b>			
<b><math>IC_{50}(\mu\text{M})</math></b>	<b>Ru-1</b>	<b>Ru-2</b>	<b>цисплатина</b>
<b>72h</b>	$192,6 \pm 17,2$	$238,1 \pm 19,3$	$19,7 \pm 6,7$
<b>48h</b>	>300	>300	$43,1 \pm 8,8$
<b>24h</b>	>300	>300	$183,7 \pm 16,2$

**Табела 3.** Вредности  $IC_{50}$  концентрација комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине за *HeLa* и *MRC-5* ћелије.

#### 4.1.4. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија малигног меланома *Hs 294T*

Примена комплекса рутенијума *Ru-1* је доводила до незнатног смањења вијабилности *Hs 294T* ћелија након култивације ћелија од 24 часа. При концентрацијима комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , након 24 часа култивације, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 10).

Након култивације *Hs 294T* ћелија малигног меланома у присуству растућих концентрација комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  у трајању од 24 часа, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност контролних *Hs 294T* ћелија које нису биле третиране комплексом *Ru-2* ( $p>0,05$ , графикон 10).

Цисплатина је статистички значајно смањивала вијабилност *Hs 294T* ћелија након 24 часа инкубације, само при максималној концентрацији од 100  $\mu\text{M}$  на  $70,1 \pm 0,2\%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 10). При концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  и 30  $\mu\text{M}$ , након 24 часа инкубације, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност нетретираних, контролних *Hs 294T* ћелија ( $p>0,05$ ).

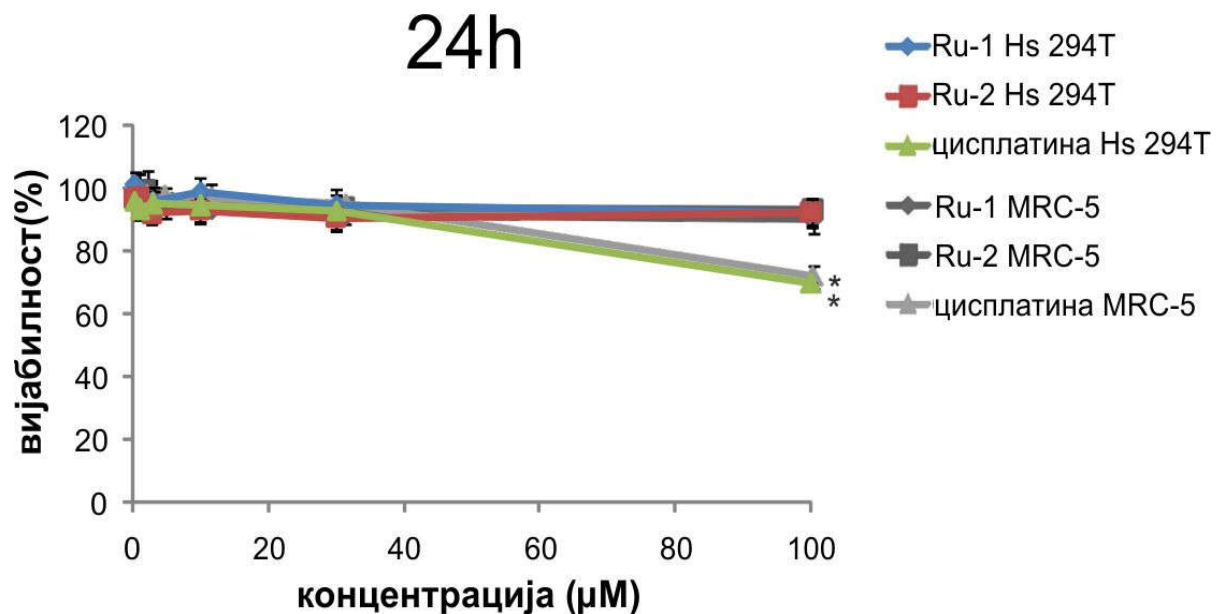
Да бисмо у потпуности испитали цитоксични ефекат комплекса рутенијума и цисплатине у истим временским интервалима (24, 48 и 72 часа), истовремено са испитивањем вијабилности ћелија малигног меланома, *Hs 294T* ћелија, испитивали смо и вијабилност здравих фибробласта, тј. *MRC-5* ћелија, које смо користили као контролу.

Током испитивања комплекса *Ru-1* у свим тестираним концентрацијима (0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) након 24 часа култивације није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 10).

Након култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 24 часа, у присуству растућих концентрација комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 10).

Цисплатина је статистички значајно смањивала вијабилност *MRC-5* ћелија након 24 часа инкубације, само при максималној испитиваној концентрацији од 100  $\mu\text{M}$  на  $71,0 \pm 3,6 \%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 10). При концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  и 30  $\mu\text{M}$ , након 24 часа инкубације, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 10).

Можемо да закључимо да испитивани комплекси нису довели до промене вијабилности тј. да нису деловали на здраве ћелије али да нису деловали ни на туморске ћелије односно да није дошло до статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* туморских ћелија после 24 часа.



**Графикон 10.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *Hs 294T* и *MRC-5* ћелија након 24-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Након култивације од 48 часова *Hs 294T* ћелија са *Ru-1* комплексом, до статистички значајног смањења вијабилности је дошло при концентрацији комплекса *Ru-1* од 10  $\mu\text{M}$ , где је измерена вијабилност *Hs 294T* ћелија била  $83,0 \pm 0,1 \%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 11). То смањење вијабилности је било дозно зависно, јер је при концентрацијама комплекса *Ru-1* од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност била  $77,0 \pm 2,7\%$ , а при концентрацији од 100  $\mu\text{M}$  је вијабилност била  $72,3 \pm$

3,6% у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 11). Приметно је да се са продужењем трајања третмана (са 24 на 48 часова) статистички значајно смањење вијабилности испитиваних *Hs 294T* ћелија јавља при нижој концентрацији испитиваних супстанци. За третман у трајању од 24 часа ни концентрација комплекса *Ru-1* од 100  $\mu\text{M}$  није доводила до смањења вијабилности испитиваних ћелија, а за третман од 48 часова до статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* ћелија је дошло при концентрацији комплекса *Ru-1* од 10  $\mu\text{M}$ . При концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  након култивације *Hs 294T* ћелија у трајању од 48 часова, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 11).

Исти тренд примећујемо и приликом испитивања цитотоксичног ефекта комплекса *Ru-2* у трајању од 48 часова. До статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* испитиваних ћелија је дошло при концентрацији од 30  $\mu\text{M}$ ; измерено је смањење вијабилности на  $82,2 \pm 2,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 11). Такође, примећено је статистички значајно смањење вијабилности *Hs 294T* ћелија након 48 часова инкубације са комплексом *Ru-2*, у концентрацији од 100  $\mu\text{M}$  на  $74,2 \pm 1,6\%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 11). Приликом примене комплекса *Ru-2* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  током третмана од 48 часова није дошло до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 11).

Испитивањем цитотоксичног ефекта цисплатине током третмана у трајању од 48 часова уочава се да је при концентрацији цисплатине од 10  $\mu\text{M}$  дошло до статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* ћелија малигног меланома и да је оно износило  $53,5 \pm 1,2\%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 11). При концентрацијама цисплатине од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , то смањење вијабилности *Hs 294T* ћелија које је статистички значајно је износило  $47,4 \pm 1,1\%$  и  $22,3 \pm 1,7\%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 11). Након култивације *Hs 294T* ћелија цисплатином у трајању од 48 часова, при концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , није било статистички значајне промене вијабилности *Hs 294T* ћелија у односу на

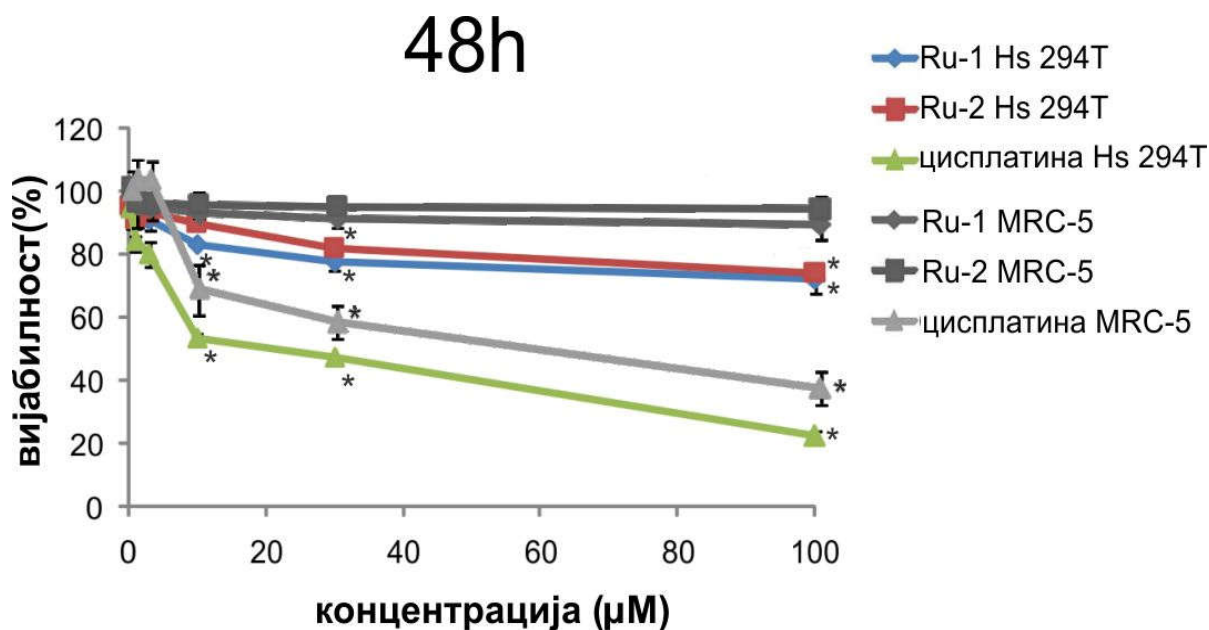
вијабилност *Hs 294T* ћелија које нису биле изложене дејству цисплатине ( $p>0,05$ , графикон 11).

Након 48 сати култивације *MRC-5* ћелија применом комплекса *Ru-1* у концентрацији од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 11).

Применом комплекса *Ru-2* у концентрацији од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  након 48 часова култивације није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 11).

Приликом култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 48 сати, концентрација цисплатине од 10  $\mu\text{M}$  доводила је до статистички значајног смањења вијабилности на  $66,8 \pm 7,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 11). При вишим концентрацијама цисплатине дошло је до даљег смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, тако да је најмања измерена вијабилност испитиваних ћелија забележена применом цисплатине у концентрацији од 100  $\mu\text{M}$ , када је вијабилност износила  $35,9 \pm 5,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија, а при концентрацији цисплатине од 30  $\mu\text{M}$  је износила  $56,3 \pm 5,0\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија ( $p<0,05$ , графикон 11). Није уочено статистички значајно смањење вијабилности *MRC-5* ћелија након 48 часова инкубације, при концентрацији цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 11).

Испитивани комплекси нису доводили до промене вијабилности тј. нису имали цитотоксично дејство на здраве ћелије, а у концентрацији од 10  $\mu\text{M}$  за комплекс *Ru-1* и у концентрацији од 30  $\mu\text{M}$  за комплекс *Ru-2*, деловали су на ћелије малигног меланома доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* туморских ћелија после 48 часова.



**Графикон 11.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *Hs 294T* и *MRC-5* ћелија након 48-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Када смо испитивали ефекат комплекса *Ru-1* на *Hs 294T* ћелије малигног меланома након 72-часовне инкубације уочили смо да није било статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* ћелија приликом примене комплекса *Ru-1* у концентрацији од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 12). Међутим, када се комплекс *Ru-1* применио под истим условима (инкубација у трајању од 72 часа) у концентрацијама од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $80,2 \pm 8,3\%$ ,  $70,5 \pm 4,4\%$  и  $61,9 \pm 3,2\%$ ) дошло је до статистички значајног смањења вијабилности третираних *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 12).

Приликом 72-часовног третмана комплексом *Ru-2* концентрације 10  $\mu\text{M}$  измерено је статистички значајно смањење вијабилности *Hs 294T* ћелија које је износило  $82,3 \pm 2,0\%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 12). Применом виших концентрација комплекса *Ru-2* (30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) након инкубације од 72 часа такође смо забележили смањење вијабилности *Hs 294T* ћелија ( $71,9 \pm 4,3\%$  и  $67,0 \pm 9,0\%$ ) у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 12). При нижим концентрацијама комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  након култивације *Hs 294T* ћелија у трајању од 72 часа, није дошло до статистички значајне промене

вијабилности *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 12).

Након култивације *Hs 294T* ћелија цисплатином у трајању од 72 часа, при концентрацији од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ , није дошло до статистички значајне промене вијабилности *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 12). Применом цисплатине у концентрацији од 3  $\mu\text{M}$ , измерено је статистички значајно смањење вијабилности *Hs 294T* ћелија које је износило  $63,4 \pm 4,2\%$  у односу на вијабилност *Hs 294T* ћелија које нису биле подвргнуте дејству цисплатине ( $p<0,05$ , графикон 12). Даље повећање концентрације цисплатине, за третман који траје 72 часа, доводио је до још значајнијег смањења вијабилности *Hs 294T* туморских ћелија; за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  је износило  $54,8 \pm 1,3\%$ , за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  је износило  $34,6 \pm 1,7\%$ , а за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$ , је износило  $15,9 \pm 1,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија. Смањење вијабилности третираних *Hs 294T* ћелија било је статистички значајно за све три испитиване концентрације ( $p<0,05$ , графикон 12).

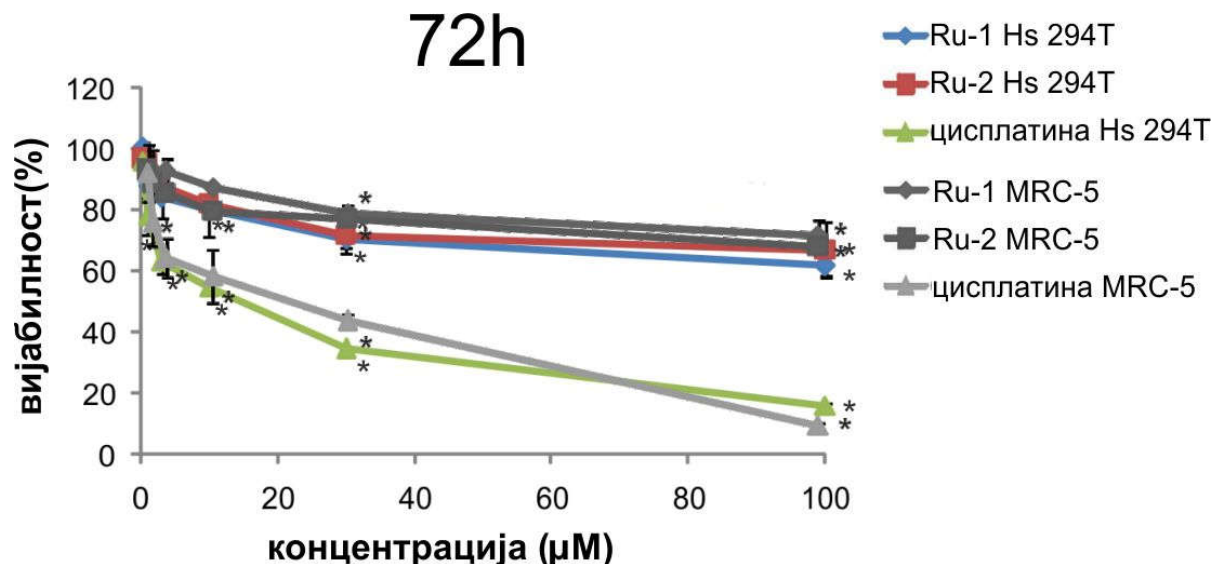
При култивацији *MRC-5* ћелија у трајању од 72 часа до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија, је дошло при концентрацији комплекса *Ru-1* од 10  $\mu\text{M}$ , када је вијабилност третираних ћелија износила  $87,6 \pm 1,3\%$  у односу на контролну групу нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 12). При концентрацији комплекса *Ru-1* од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације је дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија на  $79,2 \pm 3,8\%$  и  $71,9 \pm 3,7\%$  у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 12). При концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације, није дошло до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 12).

Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија у присуству комплекса *Ru-2* концентрације од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  је долазило до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 12). При концентрацији комплекса *Ru-2* од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је смањена на  $79,5 \pm 4,8\%$ , при концентрацији комплекса *Ru-2* од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је смањена на  $77,1 \pm 3,3\%$ , а при максималној испитиваној концентрацији од 100

$\mu\text{M}$ , вијабилност *MRC-5* ћелија је износила  $68,2 \pm 1,4\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 12). Након 72 часа инкубације *MRC-5* ћелија, при концентрацији комплекса *Ru-2* од  $0,1 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$  и  $3 \mu\text{M}$ , није долазило до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 12).

Након 72 часовне култивације *MRC-5* ћелија у присуству растућих концентрација цисплатине, дошло је до смањења вијабилности *MRC-5* ћелија при концентрацијама цисплатине од  $3 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$  и  $100 \mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ , графикон 12). Највеће смањење вијабилности *MRC-5* ћелија било је при највишој испитиваној концентрацији цисплатине од  $100 \mu\text{M}$  када је вијабилност *MRC-5* ћелија износила  $9,2 \pm 1,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 12). Није дошло до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, након 72 часа инкубације, приликом примене цисплатине у концентрацијама од  $0,3 \mu\text{M}$  и  $1 \mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 12).

Испитивани комплекси су деловали токсично на ћелије меланома у концентрацији од  $10 \mu\text{M}$  и вишим доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* туморских ћелија после 72 часа, а смањивали су вијабилност здравих ћелија при многоструко вишим концентрацијама комплекса у односу на *Hs 294T* ћелије



**Графикон 12.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *Hs 294T* и *MRC-5* ћелија након 72-часовног третмана. \*  $p < 0,05$



У табели 4 су приказане израчунате вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе рутенијума, *Ru-1* и *Ru-2*, као и за цисплатину, за *Hs 294T* и *MRC-5* ћелије. Након 24 часа култивације *Hs 294T* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300  $\mu\text{M}$ , а за цисплатину та концентрација је износила  $124,2 \pm 14,6 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне култивације *Hs 294T* ћелија са тестираним једињењима,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $247,8 \pm 21,0 \mu\text{M}$ ,  $231,6 \pm 33,8 \mu\text{M}$  и  $21,3 \pm 5,5 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *Hs 294T* ћелија са испитиваним супстанцама, вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $179,6 \pm 27,9 \mu\text{M}$ ,  $183,1 \pm 17,1 \mu\text{M}$  и  $13,8 \pm 6,2 \mu\text{M}$  (Табела 4).

Након 24 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама, вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300  $\mu\text{M}$ , а за цисплатину је та концентрација била  $183,7 \pm 16,2 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне инкубације *MRC-5* ћелија са тестираним једињењима, вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300  $\mu\text{M}$ , а за цисплатину  $43,1 \pm 8,8 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $192,6 \pm 17,2 \mu\text{M}$ ,  $238,1 \pm 19,3 \mu\text{M}$  и  $19,7 \pm 6,7 \mu\text{M}$  (Табела 4).

Добијене вредности  $IC_{50}$  концентрација јасно показују да испитивани комплекси нису доводили до значајне промене вијабилности тј. да нису имали дејство на здраве ћелије а да су деловали на туморске ћелије малигног меланома доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* туморских ћелија. Ипак, испитивани комплекси смањују вијабилност туморских *Hs 294T* ћелија при знатно вишим вредностима  $IC_{50}$  концентрација него што је то случај код претходно испитиваних *A549*, *MCF7* и *HeLa* туморских ћелија (Табеле 1-4).

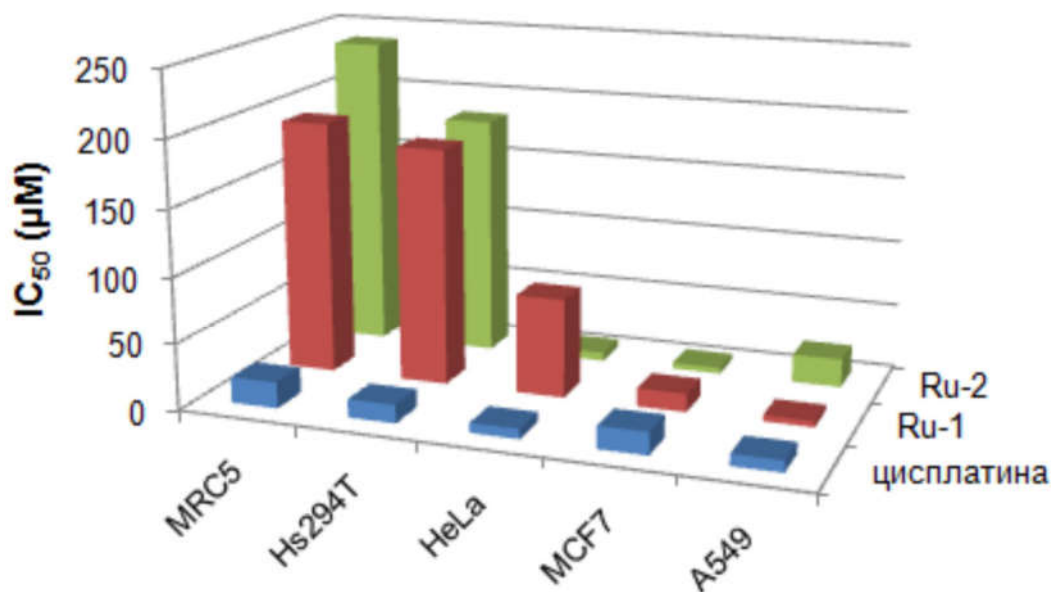
<b>Hs 294T</b>			
<b>IC<sub>50</sub>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>Ru-1</b>	<b>Ru-2</b>	<b>цисплатина</b>
<b>72h</b>	179,6 $\pm$ 27,9	183,1 $\pm$ 17,1	13,8 $\pm$ 6,2
<b>48h</b>	247,8 $\pm$ 21,0	231,6 $\pm$ 33,8	21,3 $\pm$ 5,5
<b>24h</b>	>300	>300	124,2 $\pm$ 14,6

<b>MRC-5</b>			
<b>IC<sub>50</sub>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>Ru-1</b>	<b>Ru-2</b>	<b>цисплатина</b>
<b>72h</b>	192,6 $\pm$ 17,2	238,1 $\pm$ 19,3	19,7 $\pm$ 6,7
<b>48h</b>	>300	>300	43,1 $\pm$ 8,8
<b>24h</b>	>300	>300	183,7 $\pm$ 16,2

**Табела 4.** Вредности  $IC_{50}$  концентрација комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине за *Hs 294T* и *MRC-5* ћелије.

Сумарно, вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине су израчунате коришћењем резултата МТТ теста. Вредности  $IC_{50}$  концентрација након 72 часа култивације *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T* туморских ћелија, као и здравих фибробласта *MRC-5* су приказане на графикону 13.



**Графикон 13.** Вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатину примењених на ћелијској линији малигно неизмењених фибробласта *MRC-5* и туморским ћелијама *Hs 294T*, *HeLa*, *MCF7* и *A549*.

## 4.2. Комплекси рутенијума(II) смањују вијабилност туморских ћелија индукцијом апоптозе

Резултати *MTT* теста у нашем истраживању су показали да комплекси рутенијума(II) смањују вијабилност одређених туморских ћелија и стога је следећи корак у нашем истраживању био да се испита којим типом ћелијске смрти се индукује смрт туморских ћелија третираних испитиваним комплексима. Туморске ћелије су третиране концентрацијом одговарајућих рутенијум(II) комплекса која смањује вијабилност туморских ћелија за 50% ( $IC_{50}$ ) после 24-часовног третмана и на тој популацији ћелија је анализиран доминантан тип ћелијске смрти индукован рутенијум(II) комплексима, користећи методу *Annexin V/7AAD* бојења ћелија и мерећи проценат апоптотичних и некротичних ћелија у популацији третираних ћелија проточном цитометријом. Узрок смањења вијабилности туморских ћелија је испитиван и применом цисплатине на

туморске ћелије, која је коришћена као референтни лек, односно као позитивна контрола јер се цисплатина користи као хемиотерапеутик у терапији великог броја карцинома (116-118). Након три независна експеримента, добили смо следеће резултате.

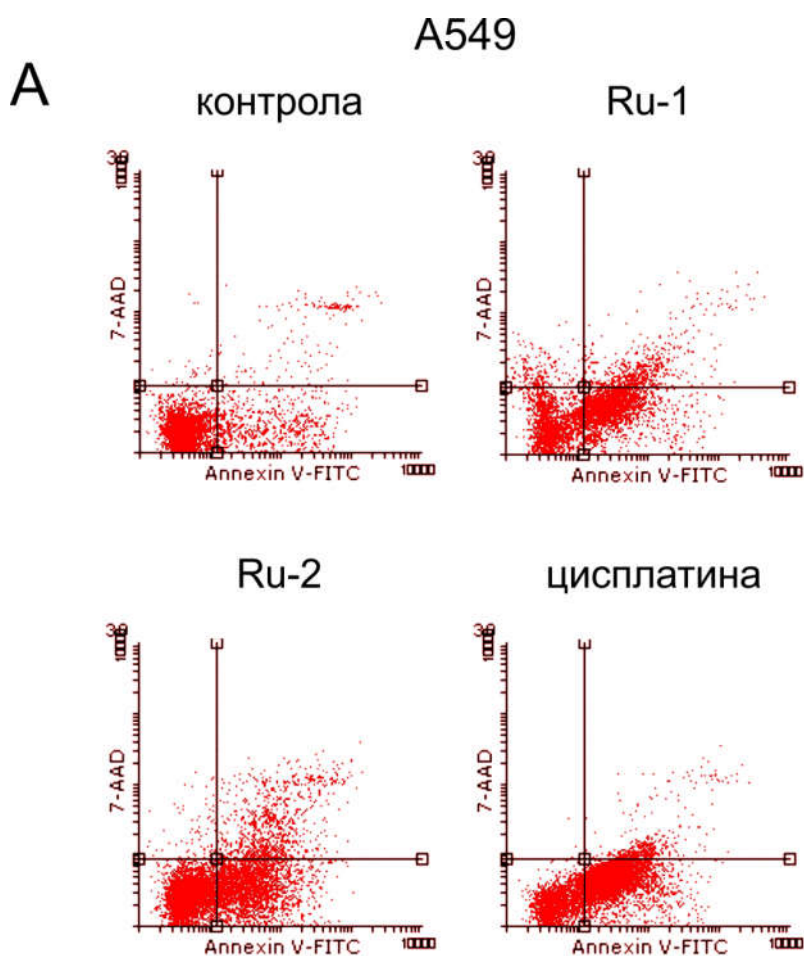
#### **4.2.1. Комплекси рутенијума и цисплатина индукују апоптозу ћелија епителног аденокарцинома плућа A549**

Контролне нетретиране ћелије епителног аденокарцинома плућа A549, као и ћелије третиране  $IC_{50}$  вредностима Ru-1, Ru-2 и цисплатином, су након 24 часа инкубације са испитиваним супстанцама бојене Annexin V-FITC-ом и 7AAD-ом и FACS анализом је одређен проценат апоптотичних ћелија у односу на укупну популацију третираних ћелија.

У контролној популацији нетретираних ћелија епителног аденокарцинома плућа A549, 11,44% од укупне популације ћелија је било у стадијуму ране апоптозе, 4,41% ћелија је било у стадијуму касне апоптозе, а незнатан проценат ћелија, односно 0,28% ћелија, је било некротично. Очекивано, највећи проценат ћелија и то 83,87% је било вијабилно.

Наше истраживање је показало да примена комплекса Ru-1 статистички значајно смањује вијабилност и индукује апоптозу A549 ћелија. Комплекс Ru-1 у концентрацији од 55,3  $\mu$ M која представља  $IC_{50}$  концентрацију за Ru-1 је после 24-часовног третмана смањио вијабилност A549 ћелија на 37,97%, од чега је било 56,29% апоптотичних ћелија, а 5,74% некротичних ћелија. Од укупне популације ћелија третираних Ru-1 комплексом, 44,46% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 11,83% у фази касне апоптозе.

Након третмана A549 ћелија концентрацијом комплекса Ru-2 од 25,1  $\mu$ M која представља  $IC_{50}$  концентрацију за Ru-2 после 24 часа третмана, 51,14% ћелија је било вијабилно. Детектовано је 47,37% апоптотичних ћелија и то 35,12% ћелија је било у фази ране апоптозе и 12,25% ћелија у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је било 1,49% некротичних ћелија (графикон 14).



**Б**

	% A549 ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
Рана апоптоза	11,44	44,46	35,12	61,86
Некроза	0,28	5,74	1,49	0,16
Касна апоптоза	4,41	11,83	12,25	6,15

**Графикон 14.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на тип смрти ћелија епителног аденокарцинома плућа *A549* након 24-часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине у поређењу са контролном популацијом нетретираних ћелија. **А.** Горњи леви квадрант - некротичне ћелије, горњи десни квадрант - ћелије у фази касне апоптозе, доњи леви квадрант - вијабилне ћелије, доњи десни квадрант - ћелије у фази ране апоптозе. **Б.** Процент ћелија у одређеној фази ћелијске смрти. Вредности у табели представљају аритметичку средину три независна експеримента и исказане су у процентима (%).

Примена цисплатине у концентрацији од 27,2  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  концентрацију за цисплатину након 24 часа инкубације *A549* ћелија, смањивала је вијабилност испитиваних ћелија на 31,84%. У овој концентрацији, цисплатина је индуковала апоптозу 68% ћелија при чему је 61,86% ћелија било у стадијуму ране апоптозе, а 6,15% ћелија у стадијуму касне апоптозе. Такође, било је 0,16% некротичних ћелија од укупне популације испитиваних ћелија (графикон 14).

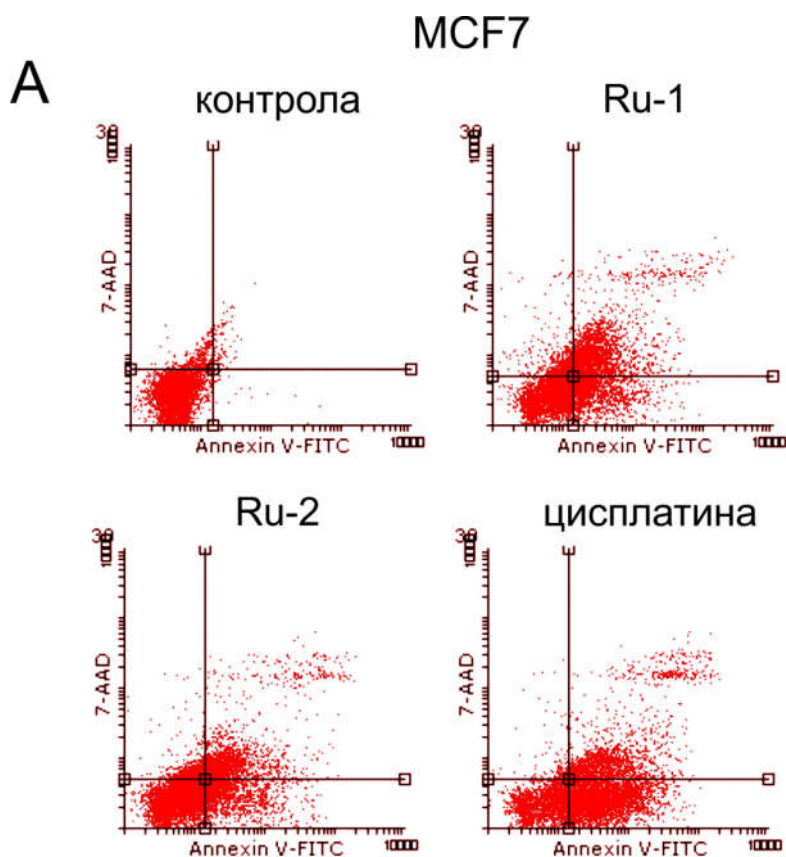
#### **4.2.2. Комплекси рутенијума и цисплатина индукују апоптозу ћелија карцинома дојке *MCF7***

Код контролне популације нетретираних ћелија карцинома дојке *MCF7*, након 24 часа инкубације у медијуму за раст ћелијске културе, проценат вијабилних ћелија је износио 92,66%, апоптотичних ћелија је било 2,33%, а некротичних ћелија је било 5,01%. Од укупног броја ћелија, 0,72% је било у стадијуму ране апоптозе, а 1,62% у стадијуму касне апоптозе.

Наше истраживање је показало да је примена комплекса *Ru-1* статистички значајно смањивала вијабилност ћелија карцинома дојке, односно *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија. Комплекс *Ru-1* у концентрацији од 102,4  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  концентрацију за *Ru-1* је после 24-часовног третмана смањио вијабилност *MCF7* ћелија на 40,61%, од чега је било 49,11% апоптотичних ћелија, а 10,27% некротичних ћелија. Од укупне популације ћелија, 19,22% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 29,88% ћелија у фази касне апоптозе.

Након третмана *MCF7* ћелија у концентрацији комплекса *Ru-2* од 13,9  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  концентрацију за *Ru-2* после инкубације од 24 часа, 53,78% ћелија је било вијабилно. Детектовано је 37,19% апоптотичних ћелија и то 17,29% ћелија у фази ране апоптозе и 19,89% ћелија у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је детектовано и 9,03% некротичних ћелија.

Примена цисплатине у концентрацији од 94,11  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  концентрацију за цисплатину након 24 часа инкубације *MCF7* ћелија, смањивала је вијабилност испитиваних ћелија на 26,46%. У овој концентрацији, цисплатина је индуковала апоптозу 71,11% ћелија при чему је 49,38% ћелија било у стадијуму ране апоптозе, а 21,74% ћелија у стадијуму касне апоптозе. Такође, било је 2,42% некротичних ћелија од укупне популације испитиваних ћелија (графикон 15).



**Б**

	% MCF7 ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
Рана апоптоза	0,72	19,22	17,29	49,38
Некроза	5,01	10,28	9,03	2,42
Касна апоптоза	1,62	29,88	19,89	21,74

**Графикон 15.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на тип смрти ћелија карцинома дојке *MCF7* након 24-часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине у поређењу са контролном популацијом нетретираних ћелија. **А.** Горњи леви квадрант - некротичне ћелије, горњи десни квадрант - ћелије у фази касне апоптозе, доњи леви квадрант - вијабилне ћелије, доњи десни квадрант - ћелије у фази ране апоптозе. **Б.** Процент ћелија у одређеној фази ћелијске смрти. Вредности у табели представљају аритметичку средину три независна експеримента и исказане су у процентима (%).

### 4.2.3. Комплекси рутенијума и цисплатина индукују апоптозу ћелија карцинома цервикса *HeLa*

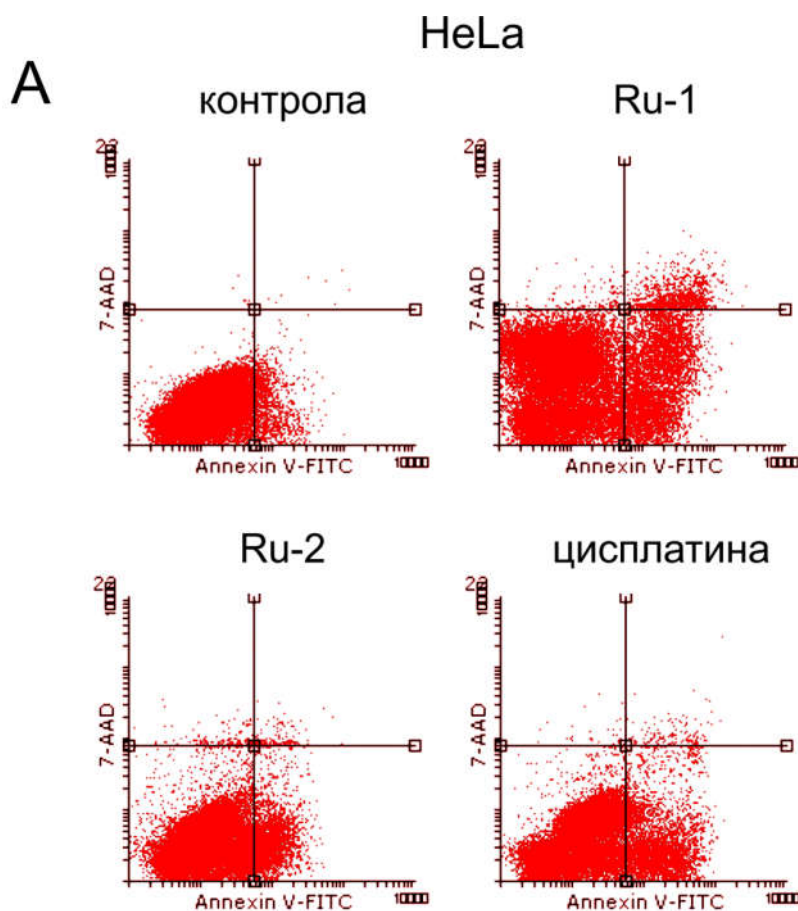
Код контролне популације нетретираних ћелија карцинома цервикса *HeLa*, након 24 часа инкубације у медијуму за раст ћелијске културе, проценат вијабилних ћелија је износио 95,24%, апоптотичних ћелија је било 4,73%, а некротичних ћелија је било 0,03% ћелија. Од укупног броја ћелија, 4,70% ћелија је било у стадијуму ране апоптозе, а 0,03% ћелија у стадијуму касне апоптозе.

Резултати нашег истраживања су показали да је примена комплекса *Ru-1*, као и комплекса *Ru-2* и цисплатине статистички значајно смањивала вијабилност ћелија карцинома цервикса, односно *HeLa* ћелија. Комплекс *Ru-1* у концентрацији од 212,4  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  концентрацију за *Ru-1*, је после 24 часа смањио вијабилност *HeLa* ћелија на 51,71%, од чега је било 46,87% апоптотичних ћелија, а 1,41% некротичних ћелија. Од укупне популације ћелија, 43,76% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 3,11% ћелија у фази касне апоптозе.

Након третмана *HeLa* ћелија у концентрацији комплекса *Ru-2* од 7,5  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  концентрацију за *Ru-2* после 24 часа, 61,92% ћелија је било вијабилно. Детектовано је 37,34% апоптотичних ћелија и то 36,85% ћелија у фази ране апоптозе и 0,5% ћелија у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је детектовано и 0,74% некротичних ћелија.

Примена цисплатине у концентрацији од 25,7  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  концентрацију за цисплатину након 24 часа инкубације *HeLa* ћелија, је смањила вијабилност испитиваних ћелија на 58,09%. У овој концентрацији, цисплатина је индуковала апоптозу 41,73% ћелија при чему је 41,24% ћелија било у стадијуму ране апоптозе, а 0,5% ћелија у стадијуму касне апоптозе. Такође, било је 0,18% некротичних ћелија од укупне популације испитиваних ћелија (графикон 16).





**Б**

	% HeLa ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
Рана апоптоза	4,70	43,76	36,85	41,24
Некроза	0,03	1,41	0,74	0,18
Касна апоптоза	0,03	3,11	0,50	0,50

**Графикон 16.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на тип смрти ћелија карцинома цервикса *HeLa* након 24-часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине у поређењу са контролном популацијом нетретираних ћелија. **А.** Горњи леви квадрант - некротичне ћелије, горњи десни квадрант - ћелије у фази касне апоптозе, доњи леви квадрант - вијабилне ћелије, доњи десни квадрант - ћелије у фази ране апоптозе. **Б.** Процент ћелија у одређеној фази ћелијске смрти. Вредности у табели представљају аритметичку средину три независна експеримента и исказане су у процентима (%).

#### 4.2.4. Комплекси рутенијума и цисплатина индукују апоптозу ћелија малигног меланома *Hs 294T*

Код контролне популације нетретираних ћелија малигног меланома *Hs 294T*, након 24 часа инкубације у медијуму за раст ћелијске културе, проценат вијабилних ћелија је износио 95,86%, апоптотичних ћелија је било 5,02%, а некротичних ћелија је било 0,12%. Од укупног броја ћелија, 4,28% је било у стадијуму ране апоптозе, а 0,74% у стадијуму касне апоптозе.

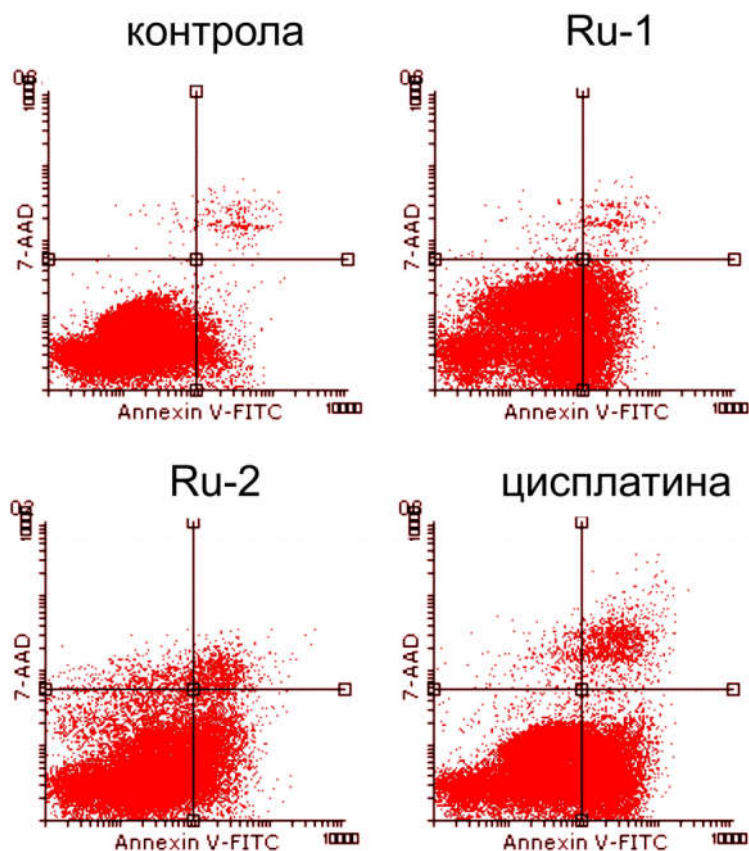
Комплекс *Ru-1* у концентрацији од 300  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  концентрацију за *Ru-1* је после 24 часа смањио вијабилност *Hs 294T* ћелија малигног меланома на 63,57%, од чега је било 35,93% апоптотичних ћелија, а 0,5% некротичних ћелија. Од укупне популације *Hs 294T* ћелија, 35,18% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 0,75% ћелија у фази касне апоптозе.

Након третмана *Hs 294T* ћелија у концентрацији комплекса *Ru-2* од 300  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  концентрацију за *Ru-2* после 24 часа, 67,88% *Hs 294T* ћелија је било вијабилно. Детектовано је 29,87% апоптотичних ћелија и то 27,59% у фази ране апоптозе и 2,28% у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је детектовано и 2,25% некротичних ћелија.

Примена цисплатине у концентрацији од 124,2  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  концентрацију за цисплатину након 24 часа инкубације *Hs 294T* ћелија, је смањила вијабилност испитиваних ћелија малигног меланома *Hs 294T* на 63%. У овој концентрацији, цисплатина је индуковала апоптозу 35,89% ћелија при чему је 32,02% ћелија било у стадијуму ране апоптозе, а 3,87% ћелија у стадијуму касне апоптозе. Такође, било је 1,1% некротичних ћелија од укупне популације испитиваних *Hs 294T* ћелија (графикон 17).

## Hs 294T

**A**

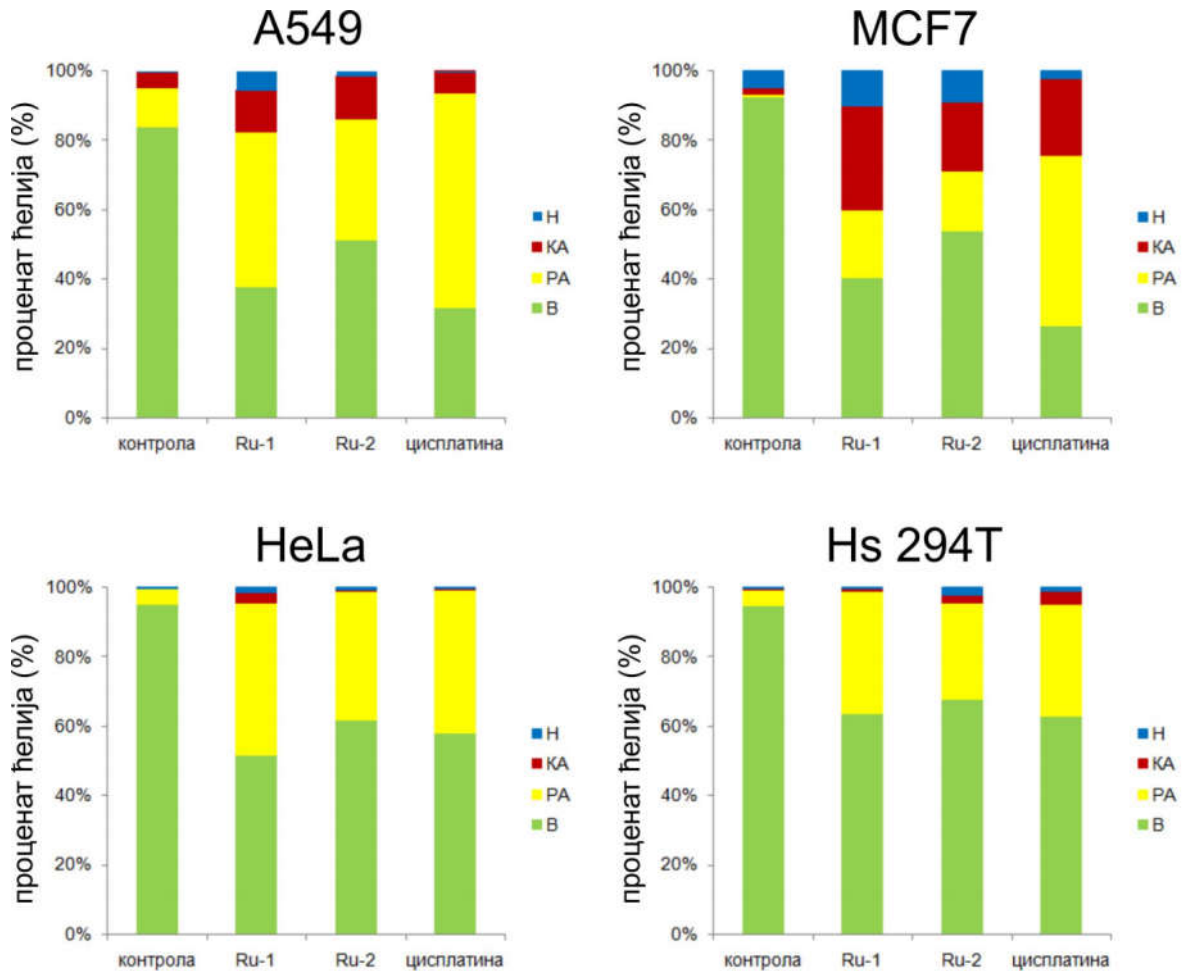


**Б**

	% Hs294T ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
Рана апоптоза	4,28	35,18	27,59	32,02
Некроза	0,12	0,50	2,25	1,10
Касна апоптоза	0,74	0,75	2,28	3,87

**Графикон 17.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на тип смрти ћелија малигног меланома *Hs 294T* након 24-часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине у поређењу са контролном популацијом нетретираних ћелија. **А.** Горњи леви квадрант - некротичне ћелије, горњи десни квадрант - ћелије у фази касне апоптозе, доњи леви квадрант - вијабилне ћелије, доњи десни квадрант - ћелије у фази ране апоптозе. **Б.** Процент ћелија у одређеној фази ћелијске смрти. Вредности у табели представљају аритметичку средину три независна експеримента и исказане су у процентима (%).

Графички приказ процента вијабилних, апоптотичних и некротичних ћелија након третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине на *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T* туморским ћелијама је приказан на графикану 18.



**Графикон 18.** Процент вијабилних, апоптотичних и некротичних туморских ћелија *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T* након 24-часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине у поређењу са контролном популацијом нетретираних ћелија. B - вијабилне ћелије, PA - ћелије у фази ране апоптозе, KA - ћелије у фази касне апоптозе, H - некротичне ћелије.

Резултати нашег истраживања су показали да је након 24-часовног третмана туморских ћелија *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T*  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, дошло до индукције апоптозе у туморским ћелијама.

### **4.3. Комплекси рутенијума(II) утичу на ћелијски циклус туморских ћелија**

До смањења вијабилности туморских ћелија третираних одређеним антитуморским агенсима може доћи услед активације апоптозе у туморским ћелијама, услед застоја у некој од фаза ћелијског циклуса, или услед оба наведена механизма (147). Резултати *MTT* теста нашег истраживања су показали да комплекси рутенијума(II) смањују вијабилност испитиваних туморских ћелија индукцијом апоптозе. Наредни корак у нашем истраживању је био да се испита да ли и на који начин комплекси рутенијума(II) утичу на проценат ћелија које се налазе у различитим фазама ћелијског циклуса, односно да ли долази до заустављања раста ћелија у некој од фаза ћелијског циклуса. Контролна група ћелија су биле нетретиране туморске ћелије. Све испитиване туморске ћелије смо третирали одговарајућим рутенијум(II) комплексима у концентрацији која смањује вијабилност туморских ћелија за 50% ( $IC_{50}$  концентрација) током третмана који траје 24 часа. У третираној популацији ћелија, као и у популацији нетретираних ћелија (контрола) смо анализирали проценат ћелија које се налазе у  $G_0/G_1$ ,  $S$  и  $G_2/M$  фази користећи проточну цитометрију методом бојења ћелија пропидијум јодидом. Такође, испитивали смо ефекат цисплатине на ћелијски циклус третираних туморских ћелија. Цисплатина је и у овом случају била референтни лек, односно позитивна контрола. Након три независна експеримента, добили смо следеће резултате.

#### **4.3.1. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус *A549* ћелија епителног аденокарцинома плућа**

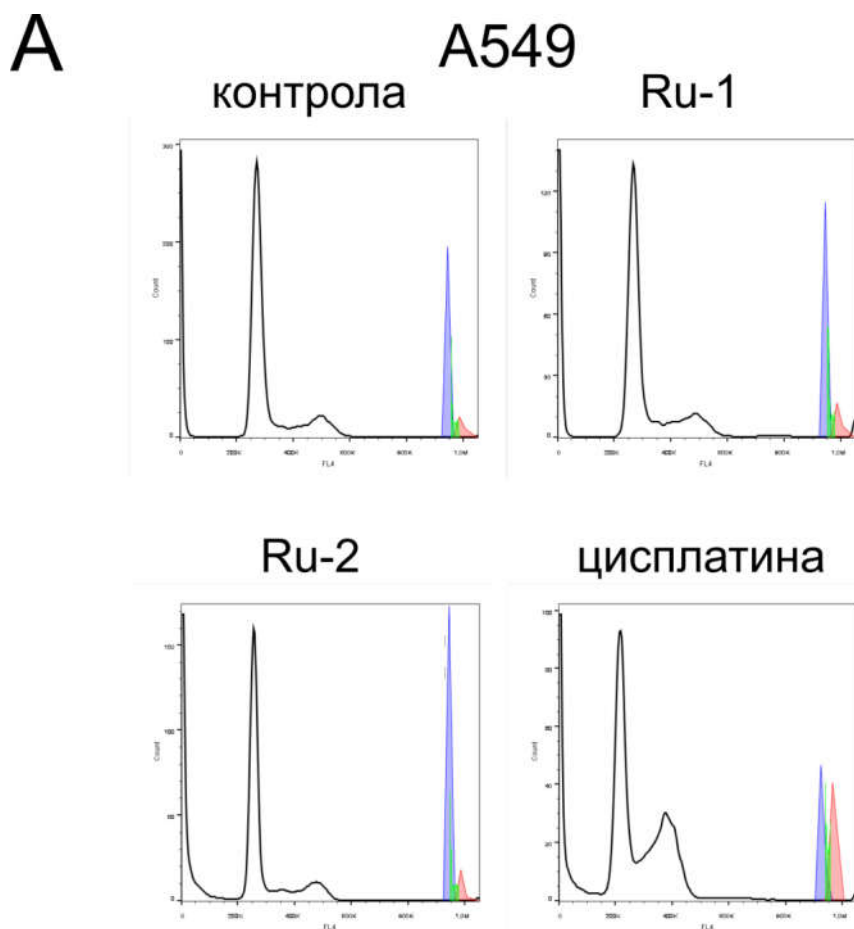
У контролној популацији нетретираних *A549* ћелија, након 24 часа се 68,49% ћелија налазило у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса, 15,06% ћелија је било у  $S$ -фази а 16,44% ћелија је било у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса.

Комплекс *Ru-1* у концентрацији од 55,3  $\mu$ M је после 24 часа довео до застоја у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса код *A549* ћелија епителног аденокарцинома плућа што је за последицу имало статистички значајно повећање процента ћелија које су се налазиле у  $G_2/M$  фази у односу на нетретиране ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 19). Процент *A549* ћелија третираних *Ru-1* комплексом које су биле у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса је износио 25,6%, у  $S$ -фази их је било 13,44%, а у  $G_0/G_1$  фази је било 60,96% ћелија након 24 часа култивације (Графикон 19).

Након третмана *A549* ћелија *Ru-2* комплексом у концентрацији од 25,1  $\mu\text{M}$  после 24 часа такође је дошло до акумулације ћелија у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса, што је проузроковало статистички значајно повећање процента ћелија које су се налазиле у  $G_2/M$  фази у односу на проценат нетретираних туморских ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 19). Процент *A549* ћелија након 24-часовног третмана комплексом *Ru-2* у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса је износио 28,19%, у *S*-фази је било 14,63%, а у  $G_0/G_1$  фази је било 57,17% ћелија.

Примена цисплатине у концентрацији од 27,2  $\mu\text{M}$  након 24 часа инкубације код *A549* третираних ћелија је изазвала застој у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса и проузроковала статистички значајно повећање процента ћелија које су се налазиле у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса у односу на нетретираних туморске ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 19). Процент *A549* ћелија у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса након третмана цисплатином је износио 37,9%, у *S*-фази је било 23,43%, а у  $G_0/G_1$  фази је било 38,67% ћелија након 24 часа култивације (графикон 19).

Наше истраживање је показало да су комплекси као и цисплатина проузроковали повећање процента ћелија у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса код *A549* третираних ћелија у односу на процентат ћелија код нетретираних туморских ћелија.



**Б**

	% A549 ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
<b>G0/G1</b>	68,49	60,96	57,17	38,67
<b>S</b>	15,06	13,44	14,63	23,43
<b>G2/M</b>	16,44	25,60	28,19	37,90

**Графикон 19.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на фазе ћелијског циклуса ћелија аденокарцинома плућа *A549* после 24-часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине. **А.** Хистограми репрезентују проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса контролне популације ћелија и ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине. Плавом бојом су означене ћелије у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса, зеленом бојом у  $S$ -фази, а црвеном бојом су означене ћелије у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса. **Б.** Процент ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса (%).

### 4.3.2. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус *MCF7* ћелија карцинома дојке

У контролној популацији нетретираних *MCF7* ћелија, након 24 часа инкубације у медијуму се 56,95% ћелија налазило у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса, 18,29% ћелија је било у *S*-фази а 24,76% ћелија је било у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса.

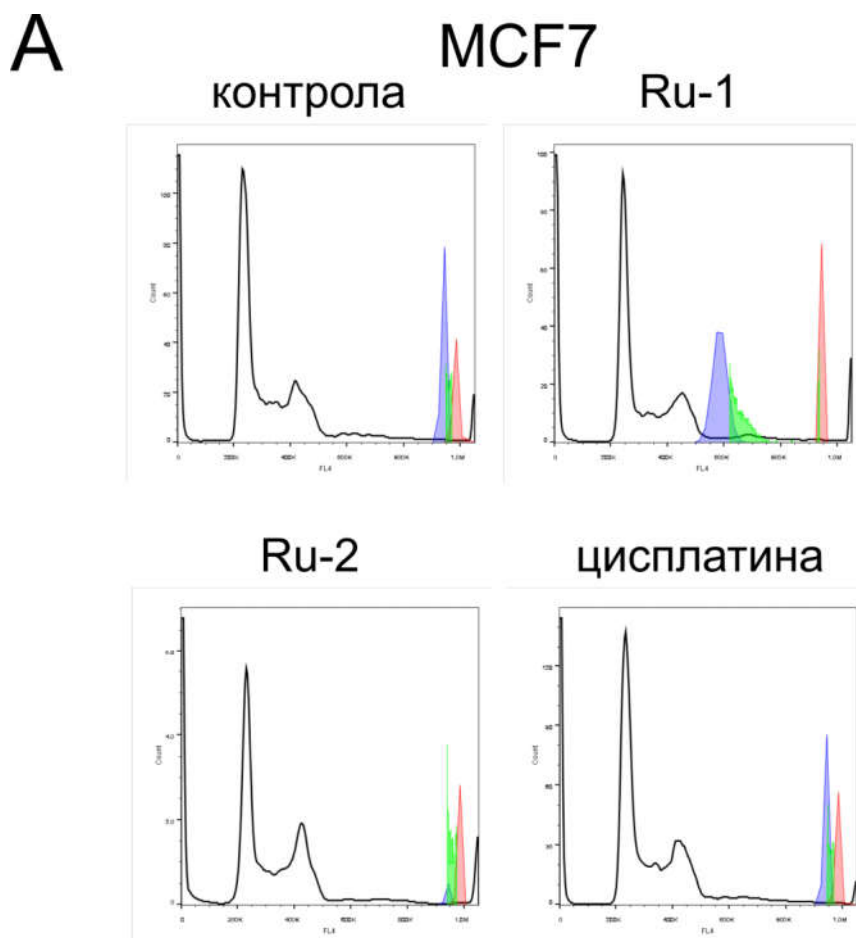
Третман *MCF7* ћелија карцинома дојке комплексом *Ru-1* у концентрацији од 102,4  $\mu\text{M}$  је после 24 часа доводио до застоја у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса и до статистички значајног повећања процента ћелија које се налазе у  $G_0/G_1$  фази у односу на нетретирание ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 20). Процент ћелија у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса *MCF7* ћелија је износио 62,98%, у *S*-фази их је било 17,5%, а у  $G_2/M$  фази је било 19,51% ћелија након 24 часа култивације.

Након дејства комплекса *Ru-2* на *MCF7* ћелије у концентрацији од 13,9  $\mu\text{M}$  после 24 часа није дошло до статистички значајне промене процента ћелија које су се налазиле у различитим фазама ћелијског циклуса у односу на нетретирание ћелије ( $p > 0,05$ , графикон 20). Процент *MCF7* ћелија у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса након третмана комплексом *Ru-2* је износио 52,59%, у *S*-фази их је било 22,11%, а у  $G_2/M$  фази је било 25,29% ћелија након 24 часа култивације.

Примена цисплатине у концентрацији од 94,11  $\mu\text{M}$  након 24 часа инкубације *MCF7* ћелија карцинома дојке је узроковала застој у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса третираних ћелија и довела до статистички значајног повећања процента ћелија које су се налазиле у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса у односу на нетретирание *MCF7* ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 20). Процент *MCF7* ћелија у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса након третмана цисплатином је износио 32%, у *S*-фази их је било 24,24%, а у  $G_0/G_1$  фази је било 43,76% ћелија након 24 часа култивације (графикон 20).

Наше истраживање је показало да су примењени комплекси рутенијума проузроковали повећање процента ћелија у  $G_0/G_1$  фази, а цисплатина у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса код *MCF7* третираних ћелија у односу на процентат нетретираних туморских ћелија.





**Б**

	% MCF7 ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
<b>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub></b>	56,95	62,98	52,59	43,76
<b>S</b>	18,29	17,50	22,11	24,24
<b>G<sub>2</sub>/M</b>	24,76	19,51	25,29	32,00

**Графикон 20.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на фазе ћелијског циклуса ћелија карцинома дојке *MCF7* после третмана од 24 часа  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине. **A.** Хистограми репрезентују проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса контролне популације ћелија и ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине. Плавом бојом су означене ћелије у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса, зеленом бојом у  $S$ -фази, а црвеном бојом су означене ћелије у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса. **Б.** Процент ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса (%).

### 4.3.3. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус *HeLa* ћелија карцинома цервикса

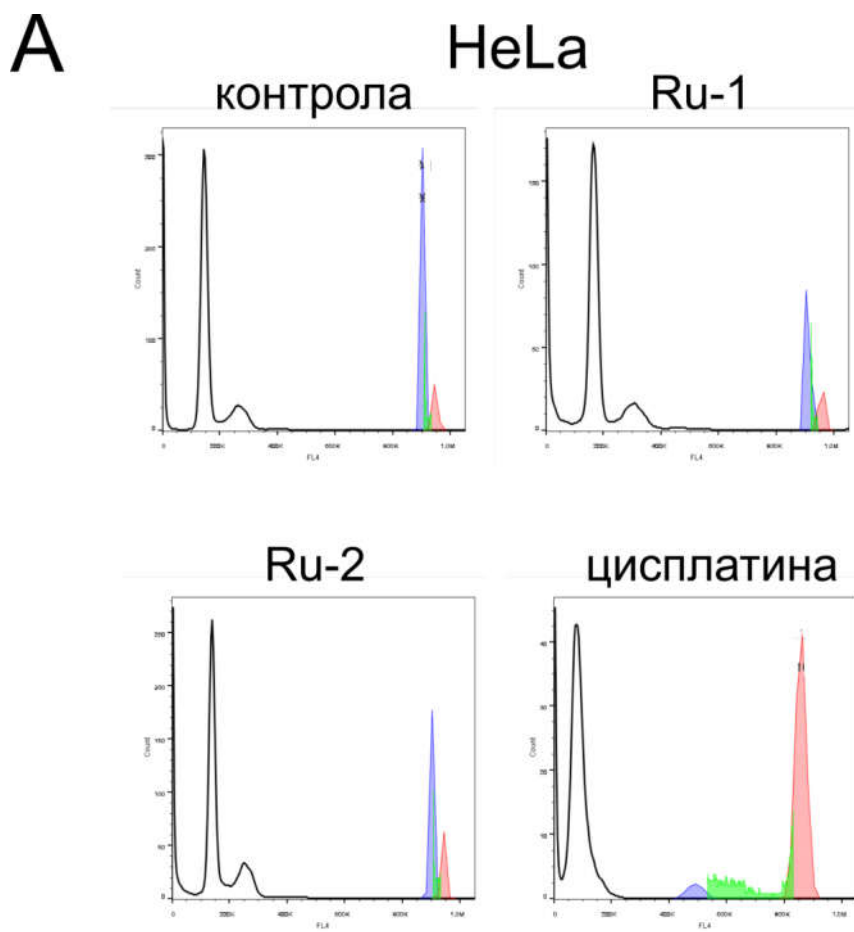
У контролној популацији нетретираних *HeLa* ћелија, након 24 часа инкубације се 71,49% ћелија налазило у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса, 10,44% ћелија је било у  $S$ -фази а 18,07% ћелија је било у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса.

Након третмана *HeLa* ћелија комплексом *Ru-1* у концентрацији 212,4  $\mu\text{M}$  после 24 часа није дошло до статистички значајне промене процента ћелија које су се налазиле у различитим фазама ћелијског циклуса у односу на нетретираних *HeLa* ћелије ( $p > 0,05$ , графикон 21). Процент *HeLa* ћелија у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса након третмана комплексом *Ru-1* је износио 73,26%, у  $S$ -фази их је било 8,84%, а у  $G_2/M$  фази је било 17,9% ћелија након 24-часовног третмана.

Дејство комплекса *Ru-2* концентрације 7,5  $\mu\text{M}$  на *HeLa* ћелије карцинома цервикса је после 24 часа узроковало застој у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса и услед тога до статистички значајног повећања процента ћелија које се налазе у  $G_2/M$  фази у односу на нетретираних ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 21). Процент *HeLa* ћелија у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса је износио 22,13%, у  $S$ -фази их је било 12,96%, а у  $G_0/G_1$  фази је било 64,9% ћелија након 24 часа култивације.

Примена цисплатине у концентрацији од 25,7  $\mu\text{M}$  након 24 часа инкубације *HeLa* ћелија узроковало је застој у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса што је за последицу имало статистички значајно повећање процента ћелија које се налазе у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса у односу на нетретираних *HeLa* ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 21). Процент ћелија у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса *HeLa* ћелија након третмана цисплатином је износио 64,95%, у  $S$ -фази је било 26,14%, а у  $G_0/G_1$  фази је било 8,9% ћелија након 24 часа култивације (графикон 21).

Наше истраживање је показало да комплекс *Ru-1* није проузроковао повећање процента ћелија у некој од фаза ћелијског циклуса, а комплекс *Ru-2* и цисплатина су проузроковали повећање процента ћелија у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса код *HeLa* третираних ћелија у односу на процентат нетретираних туморских ћелија.



**B**

	% HeLa ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	71,49	73,26	64,90	8,90
S	10,44	8,84	12,96	26,14
G <sub>2</sub> /M	18,07	17,90	22,13	64,95

**Графикон 21.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на фазе ћелијског циклуса ћелија карцинома цервикса *HeLa* после третмана од 24 часа  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине. **A.** Хистограми репрезентују проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса контролне популације ћелија и ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине. Плавом бојом су означене ћелије у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса, зеленом бојом у  $S$ -фази, а црвеном бојом су означене ћелије у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса. **B.** Процент ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса (%).

#### 4.3.4. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус *Hs 294T* ћелија малигног меланома

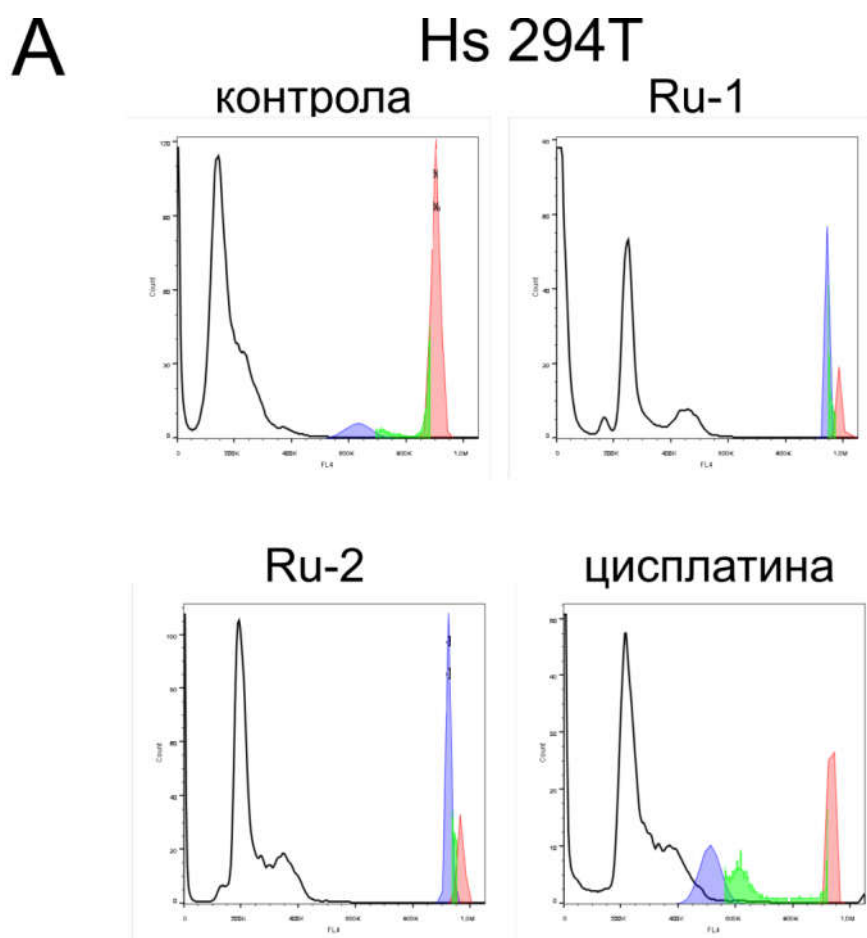
У контролној популацији нетретираних *Hs 294T* ћелија, након 24 часа 12,48% ћелија се налазило у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса, 14,54% ћелија је било у *S*-фази а 72,98% ћелија је било у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса.

Примена комплекса *Ru-1* у концентрацији од 300  $\mu\text{M}$  је после 24 часа довела до застоја у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса код *Hs 294T* ћелија малигног меланома и до статистички значајног повећања процента ћелија које се налазе у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса у односу на нетретираних ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 22). Процент *Hs 294T* ћелија у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса је износио 57,77%, у *S*-фази их је било 19,81%, а у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса је било 22,42% ћелија након третмана *Ru-1* комплексом током 24 часа култивације.

Након третмана *Hs 294T* ћелија комплексом *Ru-2* од 300  $\mu\text{M}$ , после 24 часа, такође је дошло до акумулације ћелија у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса код *Hs 294T* ћелија малигног меланома и то је уочено у статистички значајном повећању процента ћелија које су се налазиле у  $G_0/G_1$  фази у односу на нетретираних туморске ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 22). Процент *Hs 294T* ћелија у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса након третмана комплексом *Ru-2* је износио 62,16%, у *S*-фази их је било 12,1%, а у  $G_2/M$  фази је било 25,75% ћелија након 24 часа култивације.

Примена цисплатине у концентрацији од 124,2  $\mu\text{M}$  након 24 часа инкубације *Hs 294T* ћелија је узроковала застој у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса код *Hs 294T* ћелија малигног меланома и довела до статистички значајног повећања процента ћелија које се налазе у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса у односу на нетретираних ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 22). Процент *Hs 294T* ћелија у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса након третмана цисплатином је износио 31,97%, у *S*-фази их је било 31,99%, а у  $G_2/M$  фази је било 36,03% ћелија након 24 часа култивације (Графикон 22).

Наше истраживање је показало да и комплекси рутенијума као и цисплатина проузрокују повећање процента ћелија у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса код *A549* третираних ћелија у односу на процентат нетретираних туморских ћелија.

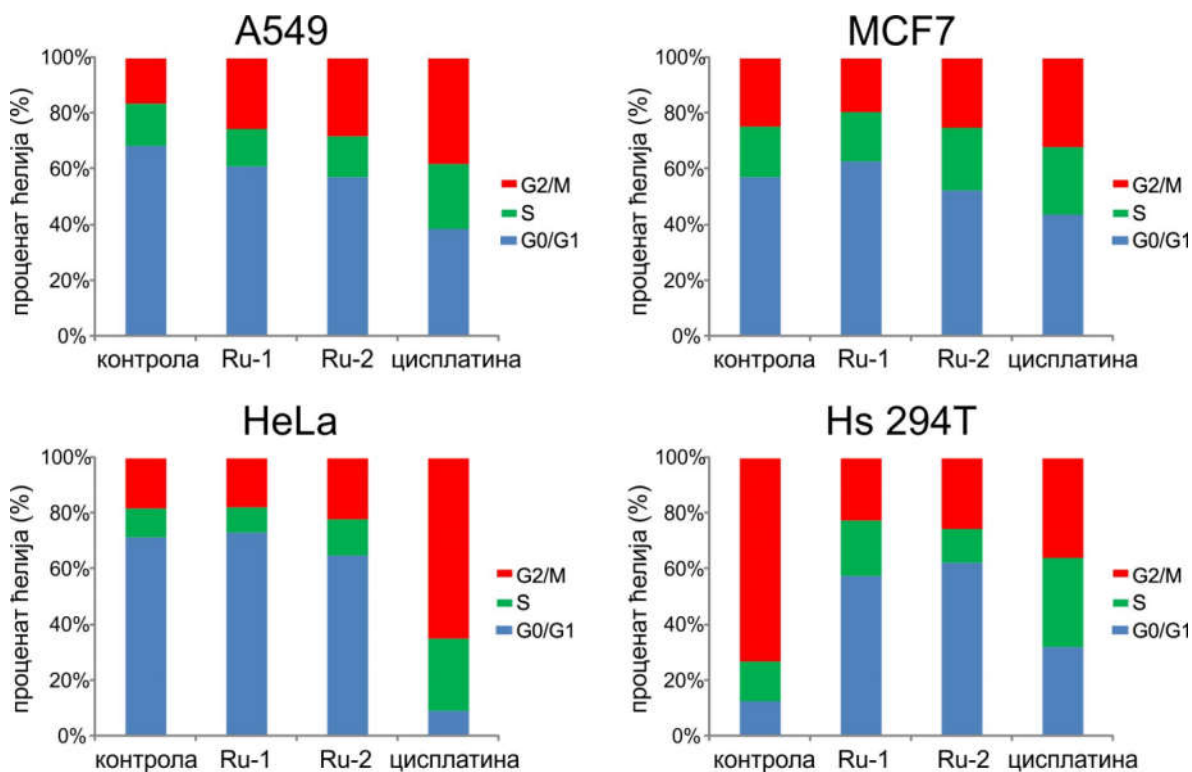


**Б**

	% Hs 294T ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	12,48	57,77	62,16	31,98
S	14,54	19,81	12,10	31,98
G <sub>2</sub> /M	72,98	22,42	25,75	36,03

**Графикон 22.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на фазе ћелијског циклуса ћелија малигног меланома *Hs 294T* после третмана од 24 часа  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине. **А.** Хистограми репрезентују проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса контролне популације ћелија и ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине. Плавом бојом су означене ћелије у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса, зеленом бојом у  $S$ -фази, а црвеном бојом су означене ћелије у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса. **Б.** Процент ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса (%).

Графички приказ процента ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса након 24-часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине на *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T* туморским ћелијама се види на графикону 23.



**Графикон 23.** Процент туморских ћелија *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T* у различитим фазама ћелијског циклуса након 24-часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине у поређењу са контролном популацијом нетретираних ћелија.

Смањење вијабилности туморских ћелија под дејством супстанци које делују цитотоксично може настати услед индукције апоптозе туморских ћелија, инхибиције пролиферације туморских ћелија због заустављања ћелијског циклуса, или може настати због комбинације ова два механизма (148). Резултати нашег истраживања су показали да је након 24-часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине у поређењу са контролном популацијом нетретираних ћелија дошло до застоја у некој од фаза ћелијског циклуса, што је један од механизма деловања антитуморских лекова. Из тога разлога, у следећој фази наших експеримената испитивали смо утицај комплекса рутенијума и цисплатине на параметре апоптозе тј. на експресију, локализацију

и активацију кључних проапоптогенних и антиапоптогенних протеина (*Bax*, *Bcl-2*, цитохрома *c* и каспазе 3) код третираних *HeLa* ћелија.

#### **4.4. Комплекси рутенијума индукују апоптозу туморских ћелија активацијом унутрашњег, митохондријалног сигналног пута апоптозе**

Досадашња истраживања су показала да постоје два главна сигнална пута апоптозе (80). Спољашњи пут апоптозе укључује активацију „рецептора смрти“ (енг. *death receptor*) и иницијаторске каспазе-8. Унутрашњи или митохондријални сигнални пут апоптозе може да се, између осталог, активира различитим апоптотичним стимулусима што доводи до поремећаја равнотеже у експресији између проапоптотичних протеина као што је *Bax* и антиапоптотичних протеина као што је *Bcl-2* у корист проапоптотичних протеина. Када се јави, дисбаланс у експресији ових протеина доводи до транслокације *Bax* из цитоплазме у спољашњу митохондријалну мембрану, што доводи до повећања пропустљивости митохондријалне мембране, ослобађања цитохрома *c* из међумембранског простора митохондрија у цитоплазму, активације каспаза 9 и 3 и последичне индукције апоптозе (149, 150). Пошто су *HeLa* ћелије најчешће тестиране туморске ћелије у *in vitro* студијама које испитују антитуморске агенсе (65, 66), у нашем истраживању је испитиван ефекат  $IC_{50}$  концентрација комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа инкубације *HeLa* ћелија, на експресију и активацију кључних протеина укључених у регулацију процеса апоптозе: *Bax*, *Bcl-2*, цитохром *c* и каспазу-3. Механизам апоптозе смо испитивали бојењем *HeLa* ћелија третираних  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине и нетретираних *HeLa* ћелија специфичним примарним и секундарним антителима за *Bax*, *Bcl-2*, цитохром *c* и каспазу-3. Ниво експресије и активације ових протеина одређиван је мерењем просечног интензитета флуоресценције (енг. *MFI - mean fluorescence intensity*) као и одређивањем процента ћелија које емитују флуоресценцију за одговарајуће специфично антитело коришћењем проточне цитометрије.

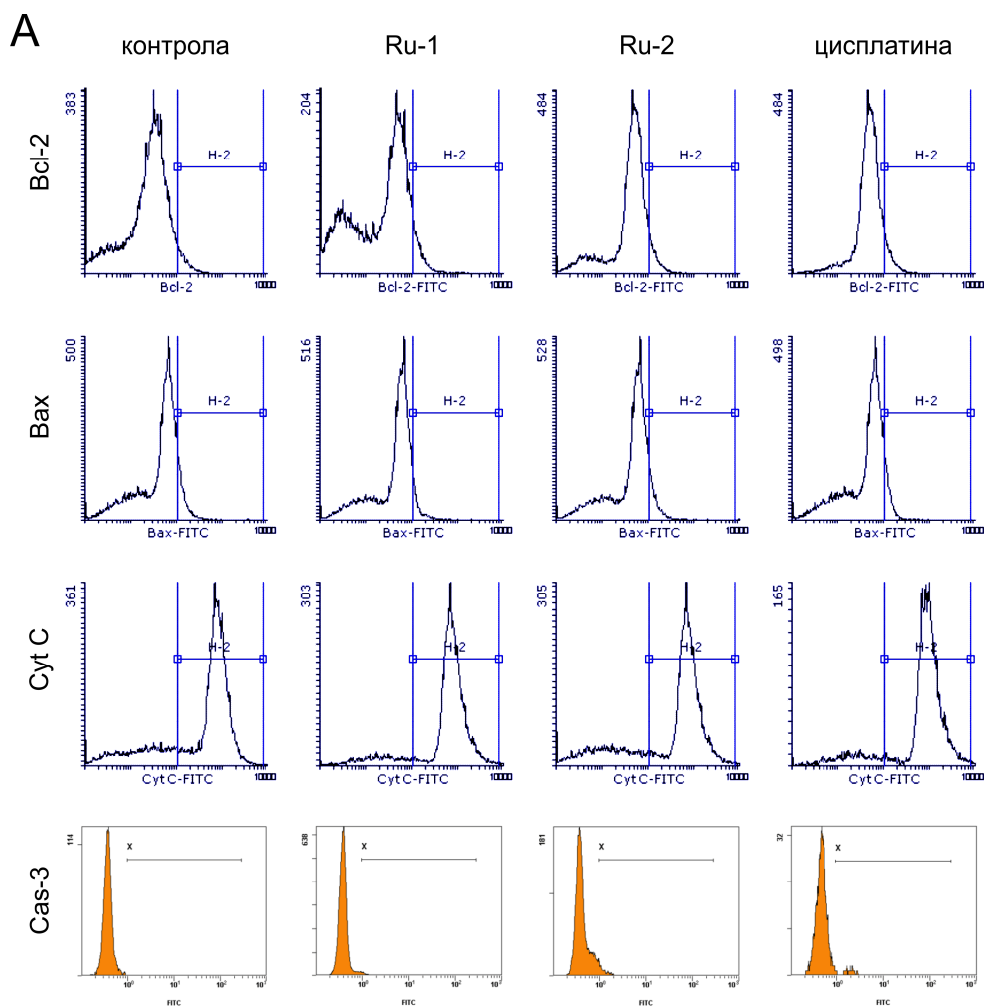
Наши резултати су показали да комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатина доводе до статистички значајног повећања просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) тј. експресије активног проапоптотичног протеина *Bax* код третираних у односу на нетретиране ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 24). Просечан интензитет

флуоресценције за активни *Bax* је износио 188,4 у контролној популацији нетретираних *HeLa* ћелија, док је код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа износио 227,9, 207,1 и 377,6. Тачније, код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине је после 24 часа дошло до повећања експресије за активни проапоптотични протеин *Bax* за 20,9%, 9,9% и 100,4% у односу на ниво експресије *Bax*-а у нетретираним ћелијама.

Поред тога, примена комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине на *HeLa* ћелије је доводила до статистички значајног смањења просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за антиапоптотични протеин *Bcl-2* код третираних у односу на нетретираних ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 24). Просечан интензитет флуоресценције за антиапоптотични протеин *Bcl-2* је износио 196 у контролној популацији нетретираних *HeLa* ћелија, док је код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа износио 189,8, 165,4 и 165,8. Прецизније, код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа је дошло до смањења експресије за антиапоптотични протеин *Bcl-2* за 3,2%, 15,6% и 15,4% у односу на ниво експресије за *Bcl-2* код нетретираних ћелија.

Пораст просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за проапоптотични протеин *Bax* и смањење просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за антиапоптотични протеин *Bcl-2* код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа је доводио и до статистички значајног смањења односа *Bcl-2/Bax* у поређењу са контролном популацијом нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 24). Овај однос *Bcl-2/Bax* је код контролне популације нетретираних *HeLa* ћелија износио 1,04, а код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа износио 0,83, 0,8 и 0,44. Прецизније, код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине је после 24 часа дошло до смањења односа *Bcl-2/Bax* за 20,2%, 23,1% и 57,6% у односу на нетретираних ћелије.





**B**

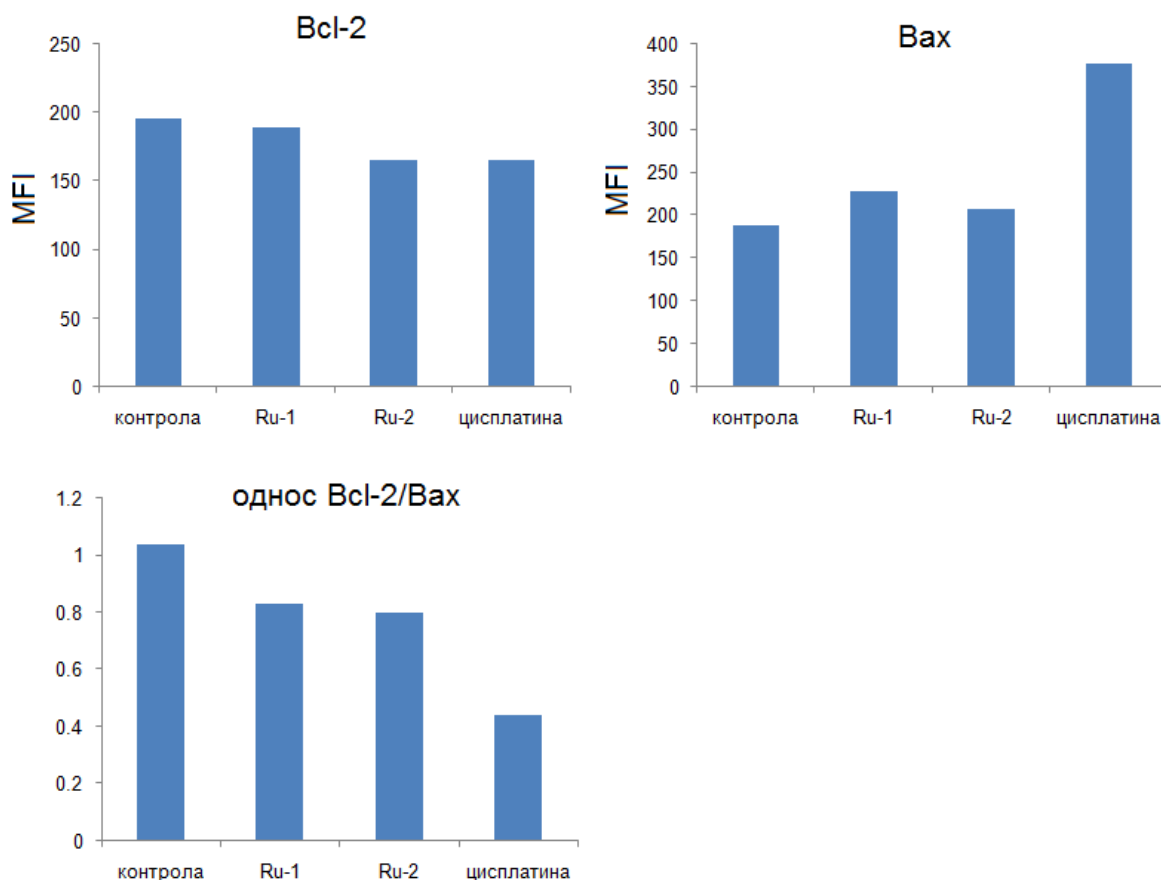
HeLa	Bcl-2	Bax	Bcl2/Bax однос	Cyt C	Cas-3
	MFI	MFI		MFI	%
контрoла	196,0	188,4	1,04	897,5	1,9
Ru-1	189,8	227,9	0,83	994,2	9,1
Ru-2	165,4	207,1	0,80	971,8	15,7
цисплатина	165,8	377,6	0,44	1214,5	11,3

**Графикон 24.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на експресију и активацију кључних молекула укључених у регулацију процеса апоптозе *HeLa* туморских ћелија после 24-часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине. **A.** Репрезентативни хистограми који показују *MFI* вредности протеина *Bax*, *Bcl-2* и цитохрома *c* и процене ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3. **B.** Измерене *MFI* вредности за протеине *Bax*, *Bcl-2* и цитохром *c*, *Bcl-2/Bax* количник, као и проценат ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3.

Дејство комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на туморске ћелије доводило је до статистички значајног повећања просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за цитохром *c* код третираних *HeLa* ћелија у односу на нетретиране *HeLa* ћелије после 24 часа третмана ( $p < 0,05$ , графикон 24). Просечан интензитет флуоресценције за цитохром *c* је износио 897,5 у контролној популацији нетретираних *HeLa* ћелија, док је код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа износио 994,2, 971,8 и 1214,5.

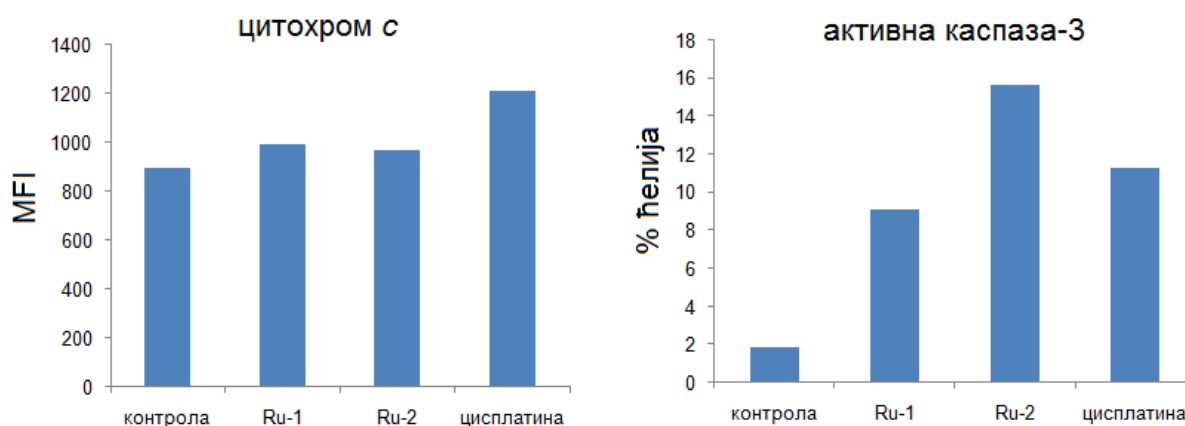
Смањење односа *Bcl-2/Bax* и повећање просечног интензитета флуоресценције за цитохром *c* су јасан показатељ индукције апоптозе туморских ћелија третираним комплексима рутенијума и то специфично активацијом унутрашњег, митохондријалног апоптотичног пута. Стога смо желели да испитамо да ли је у процес апоптозе туморских ћелија индукованом комплексима рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* укључена и активна ефекторска каспаза-3. Примена комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на туморске *HeLa* ћелије доводила је до статистички значајног повећања процента ћелија које емитују флуоресценцију, тј. код којих је долазило до повећања експресије активне каспазе-3, код третираних у односу на нетретиране ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 24). Процент ћелија које су емитовале флуоресценцију за активну каспазу-3 је износио 1,9% у контролној популацији нетретираних *HeLa* ћелија, док је код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* и цисплатине после 24 часа он износио 9,1%, 15,7% и 11,3% (графикон 24).

Графички приказ експресије кључних протеина укључених у процес апоптозе у третираним и нетретираним *HeLa* ћелијама је приказан на графиконима 25 и 26. На графикону 25 се јасно уочава смањење експресије за протеин *Bcl-2* и повећање експресије за протеин *Bax* код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* и цисплатином у односу на експресију ових протеина код контролне популације нетретираних *HeLa* ћелија након 24-часовног третмана. Такође се уочава смањење количника *Bcl-2/Bax* код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* и цисплатином у односу на овај количник код контролне популације нетретираних *HeLa* ћелија након 24-часовног третмана (графикон 25).



**Графикон 25.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на експресију и активацију кључних молекула укључених у процес апоптозе *HeLa* туморских ћелија. Репрезентативни дијаграми који показују *MFI* вредности протеина *Bax* и *Bcl-2* као и *Bcl-2/Bax* количник после 24 часовног третмана *HeLa* туморских ћелија  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине.

На графикону 26 се уочава повећање експресије за цитохром *c* и повећање процента ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3 код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* и цисплатине у односу на експресију, односно проценат ћелија код контролне популације нетретираних *HeLa* ћелија након 24-часовног третмана.



**Графикон 26.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на експресију и активацију кључних молекула укључених у процес апоптозе *HeLa* туморских ћелија. Репрезентативни дијаграми који показују *MFI* вредности цитохрома *c* и процене ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3, после 24 часа третмана *HeLa* туморских ћелија  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине.

Резултати нашег истраживања су показали да су комплекси *Ru-1* и *Ru-2* ефикасније смањивали вијабилност туморских ћелија у односу на цисплатину, односно да су деловали при нижим  $IC_{50}$  концентрацијама у односу на цисплатину. Комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* немају ниске вредности  $IC_{50}$  концентрација за малигно неизмењене фибробласте *MRC-5*, односно показано је да на здраве ћелије делују токсично при многоструко већим концентрацијама и тек након дужег третмана, чиме се штете ћелије здравог ткива. Стога би требало да, у клиничкој примени, наши испитивани новосинтетисани комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* испоље мање нежељених дејстава у односу на цисплатину. Такође, комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* селективно смањују вијабилност туморских ћелија индукцијом унутрашњег, митохондријалног пута апоптозе и деловањем на ћелијски циклус туморских ћелија. На тај начин, комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* смањују вијабилност туморских ћелија и непосредно након третмана индукцијом апоптозе, али и спречавањем брзог одвијања ћелијског циклуса и његовим успоравањем, успоравају и бујање туморског ткива и спречавају повећање апсолутног броја туморских ћелија.

## 5. Дискусија

Тумори представљају један од највећих здравствених проблема, како у свету тако и у нашој земљи. Познато је да су малигне болести водећи узрок смрти у развијеним земљама, док се у земљама у развоју налазе на другом месту, одмах иза кардиоваскуларних болести (2). Такође, и у Србији је последњих година забележен значајан пораст инциденце и морталитета оболелих од канцера, као и алармантно високе стопе морталитета оболелих од различитих типова малигнух тумора у односу на остатак Европе (4). Претпоставља се да молекуларни механизми који доводе до процеса канцерогенезе захтевају присуство неколико сукцесивних мутација на молекулу ДНК са којима ћелије не могу да се изборе (2). Услед таквих мутација на молекулу ДНК, долази до поремећаја експресије, локализације и активности регулаторних молекула у ћелији одговорних за физиолошко-одвијање програмиране ћелијске смрти или ћелијског циклуса (4, 5).

Неки од регулаторних молекула чија је експресија, локализација и активност веома значајна у процесу програмиране ћелијске смрти су проапоптотични протеин *Bax* и антиапоптотични протеин *Bcl-2*. Код малигнух тумора, најчешће долази до убрзане деобе ћелија и спречавања апоптозе код малигно измењених ћелија услед смањене активности проапоптотичног протеина *Bax* и повећања цитоплазматске експресије антиапоптотичног протеина *Bcl-2*. Један од циљева антитуморске терапије је, између осталог, и да се изазове процес програмиране ћелијске смрти код малигно измењених ћелија, чиме би се смањила популација малигно измењених ћелија. Повећање активације проапоптотичног протеина *Bax* и смањење цитоплазматске количине антиапоптотичног протеина *Bcl-2* услед дејства антитуморских агенаса би довело до отпуштања цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму, последично активирајући нисходну каскаду каспаза које доводе до активације каспазе-3 и уводе туморске ћелије у апоптозу (82). Такође, након деобе већина ћелија прави „паузу“ или су у фази мировања у којој ћелија физиолошки може функционисати у различитом временском периоду, месецима, данима или годинама. Код туморских ћелија, фаза мировања је или скраћена или практично не постоји (1).

Актуелна антитуморска терапија највећег броја малигнух тумора укључује примену лекова који изазивају озбиљна нежељена дејства код оболелих којима се ти лекови апликују. Поред тога, код великог броја оболелих долази до појаве резистенције

тумора на примењене цитостатике (15). Такође, оболели који користе платинске металокомплексе у терапији примарног малигнитета могу, услед овакве терапије, оболети и од леукемије (151, 152). Стога је проналажење нових антитуморских агенаса који могу ефикасније и са мање нежељених дејстава да доведу до ремисије малигнитета, један од императива савремене медицине (15). Први корак у проналажењу оваквих агенаса је испитивање њиховог *in vitro* ефекта на туморске ћелије применом *MTT* теста вијабилности ћелија.

У овом истраживању је прво испитиван ефекат два новосинтетисана рутенијум(II) комплекса, комплекса *Ru-1* [Ru(Cl-Ph-tpy)(*o*-pda)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, *o*-pda = *o*-fenilendiamin) и комплекса *Ru-2* [Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, phen = 1,10-fenantrolin) на вијабилност различитих туморских ћелија као што су *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T* као и на вијабилност здравих *MRC-5* фибробласта применом *MTT* теста. Оба новосинтетисана рутенијум (II) комплекса припадају групи терпиридинских комплекса рутенијума.

Карцином плућа је карцином са највећим степеном морталитета од свих малигних тумора (5), па смо стога прво испитивали цитотоксични ефекат комплекса рутенијума на ћелије карцинома плућа *A549*. Резултати нашег истраживања су показали да примена новосинтетисаних терпиридинских рутенијум(II) комплекса *Ru-1* и *Ru-2*, као и примена цисплатине, статистички значајно смањује вијабилност ћелија аденокарцинома плућа *A549* у односу на вијабилност нетретираних ћелија након 24, 48 и 72 часа култивације. Концентрација комплекса *Ru-1* потребна да смањи вијабилност *A549* ћелија за 50% је после 24, 48 и 72 часа износила  $55,3 \pm 9,3 \mu\text{M}$ ,  $9,5 \pm 3,2 \mu\text{M}$  и  $4,6 \pm 2,1 \mu\text{M}$ . Концентрација комплекса *Ru-2* потребна да смањи вијабилност *A549* ћелија за 50% је после 24, 48 и 72 часа износила  $25,1 \pm 3,3 \mu\text{M}$ ,  $23,8 \pm 3,8 \mu\text{M}$  и  $21,7 \pm 4,3 \mu\text{M}$ , а концентрација цисплатине потребна да смањи вијабилност *A549* ћелија за 50% је после 24, 48 и 72 часа износила  $27,2 \pm 4,1 \mu\text{M}$ ,  $9,5 \pm 1,8 \mu\text{M}$  и  $8,8 \pm 2,7 \mu\text{M}$ . На основу добијених  $IC_{50}$  вредности испитиваних једињења на туморским ћелијама аденокарцинома плућа *A549*, можемо да закључимо да је ефекат рутенијум(II) комплекса следећи: комплекс *Ru-1* са повећањем трајања периода инкубације има ефикаснији цитотоксични ефекат на *A549* ћелије; потребне су значајно мање концентрације овог комплекса да смање вијабилност *A549* ћелија на 50% у односу на контролу након 72 часа, у поређењу са концентрацијама истог комплекса које су потребне

да смање вијабилност *A549* ћелија на 50% у односу на контролу после 24 и 48 часова инкубације. Поред тога, потребна је два пута мања концентрација комплекса *Ru-1* у односу на концентрацију цисплатине да би дошло до смањења вијабилности *A549* ћелија за 50% у односу на контролну популацију нетретираних ћелија након 72 часа инкубације. Овај комплекс има најефикаснији цитотоксични ефекат на *A549* ћелије од сва три испитивана једињења. Израчунате  $IC_{50}$  концентрације за комплекс *Ru-1* су ниже од  $IC_{50}$  концентрације цисплатине и од  $IC_{50}$  концентрације за комплекс *Ru-2* при истим дужинама трајања третмана. Концентрације комплекса *Ru-2* које смањују вијабилност *A549* ћелија за 50% у односу на контролу нису статистички значајно различите после свих испитиваних временских интервала. Такође, комплекс *Ru-2* има статистички значајно слабији цитотоксични ефекат на *A549* ћелије након 72 часа у поређењу са цисплатином, јер је потребна два пута већа концентрација комплекса *Ru-2* да смањи вијабилност испитиваних ћелија за 50% у односу на контролу. У поређењу са комплексом *Ru-1*, потребна је четири пута већа концентрација комплекса *Ru-2* да изазове смањење вијабилности за 50% у односу на контролу.

Насупрот резултатима нашег истраживања, бензенски комплекси рутенијума(II) који садрже ароилтиоуреу нису имали значајан цитотоксичан ефекат на *A549* ћелије (153). Од четири оваква комплекса које су синтетисали *Jeyalakshmi* и сарадници (153), три комплекса означена као комплекс 2, комплекс 3 и комплекс 4, су имала  $IC_{50}$  концентрације које су биле преко 250  $\mu\text{M}$ . Само је за комплекс 1 израчуната  $IC_{50}$  концентрација за *A549* ћелије била 95,6  $\mu\text{M}$ , што је значајно виша концентрација од  $IC_{50}$  концентрација које смо израчунали за комплексе рутенијума које смо испитивали у нашем истраживању. Да би резултати нашег и претходно наведеног истраживања могли да се пореде, потребно је било упоредити  $IC_{50}$  концентрације за цисплатину. У истраживању *Jeyalakshmi* и сарадника,  $IC_{50}$  концентрација за цисплатину је износила 18  $\mu\text{M}$ , што је у истом рангу са вредностима које смо израчунали у нашем истраживању и што нам и омогућава да поредимо резултате ова два истраживања.

С друге стране, у истраживању које су спровели *Luo* и сарадници испитивано је дејство полипиридинских комплекса рутенијума на *A549* ћелије. За комплекс рутенијума означен бројем 2 израчуната  $IC_{50}$  концентрација после 48 часова је износила 157,2  $\mu\text{M}$ , а за комплекс 4 је преко 400  $\mu\text{M}$  што су значајно више вредности концентрација

у поређењу са вредностима  $IC_{50}$  концентрација које смо израчунали за наше испитиване комплексе (за *Ru-1* 9,5  $\mu\text{M}$  и за *Ru-2* 23,8  $\mu\text{M}$ ) (154). Наравно, потребно је истаћи, да би уопште поредили резултате ових истраживања, претходно смо упоредили  $IC_{50}$  концентрације за цисплатину које су биле у устом рангу (*Luo* и сарадници 18,8  $\mu\text{M}$ , код нас 9,5  $\mu\text{M}$ ).

У истраживању *Lai*-а и сарадника, који су користили по структури и хемијском саставу другачије полипиридинске рутенијум(II) комплексе него ми, израчунате  $IC_{50}$  концентрације за *A549* ћелије су упоредиве са  $IC_{50}$  концентрацијама за исте туморске ћелије у нашем истраживању (148). Четири новосинтетисана рутенијум(II) комплекса ових аутора имају  $IC_{50}$  вредности које су износиле 3,8  $\mu\text{M}$  и 5  $\mu\text{M}$  за комплексе 4 и 1, односно 10  $\mu\text{M}$  и 45  $\mu\text{M}$  за комплексе 2 и 3. Измерена  $IC_{50}$  концентрација за цисплатину ових аутора је износила 6,3  $\mu\text{M}$  и била је упоредива и у истом рангу са  $IC_{50}$  концентрацијом за цисплатину на *A549* ћелијама у нашем истраживању. Резултати *Lai*-ја и сарадника су показали да је само комплекс 4 имао нижу  $IC_{50}$  вредност за *A549* ћелије од  $IC_{50}$  вредности нашег комплекса *Ru-1* (*Lai* и сарадници 3,8  $\mu\text{M}$ , код нас 9,5  $\mu\text{M}$ ). Сви други комплекси ових аутора су након 72 часа имали слабији цитотоксични ефекат према *A549* ћелијама у односу на наш новосинтетисани терпиридински рутенијум(II) комплекс *Ru-1* (*Lai* и сарадници 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  и 45  $\mu\text{M}$ , код нас 9,5  $\mu\text{M}$ ).

Полипиридински рутенијум(II) комплекси које су синтетисали *Han* и сарадници 2014. године су имали сличне  $IC_{50}$  вредности на *A549* ћелијама у поређењу са  $IC_{50}$  концентрацијама наших испитиваних рутенијум(II) комплекса (155). После 72 часа инкубације, у студији ових аутора, измерена  $IC_{50}$  концентрација за цисплатину је била  $7,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$ , док је у нашој студији та вредност износила  $8,8 \pm 2,7 \mu\text{M}$ . Три рутенијум(II) полипиридинска комплекса ових аутора, означени као комплекси 1-3 су имали значајно ниже  $IC_{50}$  концентрације за *A549* ћелије после 72 сата инкубације од 7,3 до 13,3  $\mu\text{M}$ , у односу на наш *Ru-2* комплекс који је имао  $IC_{50}$  концентрацију од 21,7  $\mu\text{M}$ . Ипак, за разлику од *Ru-2* комплекса, наш *Ru-1* комплекс је имао статистички значајно јачи цитотоксични ефекат у поређењу са комплексима *Han*-а и сарадника на *A549* ћелијама. Наш новосинтетисани терпиридински рутенијум(II) комплекс *Ru-1* је био скоро два пута цитотоксично ефикаснији на *A549* ћелијама од комплекса *Han*-а и сарадника, јер је била потребна скоро два пута мања концентрација комплекса *Ru-1* од 4,6  $\mu\text{M}$ , у односу на



концентрације комплекса 1-3 које су износиле од 7,3 до 13,3  $\mu\text{M}$ , да смањи вијабилност *A549* ћелија на 50% у односу на контролу после 72 сата.

Лазић и сарадници су 2016. године испитивали цитотоксични ефекат рутенијум(II) терпиридинских комплекса који се по хемијској структури незнатно разликују од наших испитиваних комплекса (156). Да бисмо поредили резултате ова два истраживања, прво смо упоредили  $IC_{50}$  концентрације за цисплатину у нашем и истраживању Лазића и сарадника. Код Лазића и сарадника вредност која је смањивала вијабилност *A549* ћелија за 50% у односу на контролу после 72 часа за цисплатину је износила 33  $\mu\text{M}$ , а у нашем истраживању 27,2  $\mu\text{M}$ . Израчунате  $IC_{50}$  вредности за сва четири комплекса ових аутора су значајно више у односу на  $IC_{50}$  вредности терпиридинских рутенијум(II) комплекса које смо ми истраживали. Те вредности за туморске *A549* ћелије после инкубације од 72 часа, за комплексе 3 и 4 ових аутора износе преко 250  $\mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  вредност комплекса 2 је 110  $\mu\text{M}$ , док је измерена  $IC_{50}$  вредност за комплекс 1, износила 58,4  $\mu\text{M}$ . Оба наша терпиридинска рутенијум(II) комплекса су имала снажнији цитотоксични ефекат на *A549* ћелије у поређењу са комплексима ових аутора поредећи  $IC_{50}$  вредности за исте ћелије и исти временски интервал инкубације. Све ово до сада изнесено дозвољава нам да закључимо да су наши испитивани рутенијум(II) комплекси ефикаснији као антитуморски агенси у односу на комплексе рутенијума које су користили други истраживачи у својим испитивањима.

Антитуморски ефекат комплекса рутенијума(II) у нашем истраживању је затим испитиван и на туморским ћелијама аденокарцинома дојке, *MCF7*. Резултати истраживања су показали да примена новосинтетисаних терпиридинских рутенијум(II) комплекса *Ru-1* и *Ru-2*, као и примена цисплатине, статистички значајно смањује вијабилност ћелија карцинома дојке, *MCF7*, након 24, 48 и 72 часа култивације. Показали смо да су након 24 часа култивације *MCF7* ћелија,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину износиле  $102,4 \pm 12,6 \mu\text{M}$ ,  $13,9 \pm 3,4 \mu\text{M}$  и  $94,1 \pm 11,7 \mu\text{M}$ . Поред тога, након 48 часова инкубације *MCF7* ћелија,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $22,9 \pm 1,7 \mu\text{M}$ ,  $7,2 \pm 1,3 \mu\text{M}$  и  $24,5 \pm 3,3 \mu\text{M}$ , а након 72 часа култивације *MCF7* ћелија,  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $13,8 \pm 1,8 \mu\text{M}$ ,  $4,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$  и  $17 \pm 1,9 \mu\text{M}$ .

На основу добијених  $IC_{50}$  концентрација испитиваних једињења на туморским ћелијама карцинома дојке, *MCF7* можемо да закључимо да рутенијум(II) комплекси имају следеће ефекте: оба новосинтетисана терпиридинска рутенијум(II) комплекса, *Ru-1* и *Ru-2*, са повећањем трајања периода инкубације имају статистички значајно већи цитотоксични ефекат на испитиване ћелије; потребне су значајно мање концентрације ових комплекса да смање вијабилност *MCF7* ћелија на 50% у односу на контролу после 72 часа, у поређењу са концентрацијама које су потребне да смање вијабилност *MCF7* ћелија на 50% у односу на контролу после 24 и 48 часова инкубације. Такође, оба комплекса рутенијума имају значајно мање  $IC_{50}$  вредности после 48 часова у односу на  $IC_{50}$  вредности после 24 часа инкубације *MCF7* ћелија. Оба комплекса рутенијума и *Ru-1* и *Ru-2*, доводе до временски зависног смањења вијабилности *MCF7* ћелија. Концентрације комплекса *Ru-1* које смањују вијабилност *MCF7* ћелија за 50% у односу на контролу су сличне као вредности за цисплатину после 24 и 48 часова, али су ниже од концентрација за цисплатину после 72 сата. Такође, показали смо да комплекс *Ru-2* испољава најснажнији цитотоксични ефекат од сва три испитивана једињења на *MCF7* ћелије после 72 сата инкубације. Важно је нагласити и да је потребна више од три пута мања концентрација комплекса *Ru-2* у односу на концентрацију цисплатине да би дошло до смањења вијабилности *MCF7* ћелија за 50% у односу на контролну популацију нетретираних ћелија након 72 часа инкубације. Комплекс *Ru-2* има вредности  $IC_{50}$  концентрација које су ниже од ових вредности и за цисплатину и за комплекс *Ru-1* у свим испитиваним временским интервалима. Прецизније, комплекс *Ru-2* врло брзо остварује свој цитотоксични ефекат на *MCF7* ћелије, већ после 24 часа. Наиме, после 24 часа инкубације, комплекс *Ru-2* смањује вијабилност *MCF7* ћелија на 50% у односу на контролу при концентрацији од 13,9  $\mu\text{M}$ .

За разлику од резултата нашег истраживања, бензенски комплекси рутенијума(II) који садрже ароилтиоуреу нису имали значајан цитотоксичан ефекат на *MCF7* ћелије (153). Од четири оваква комплекса које су синтетисали *Jeyalakshmi* и сарадници 2017. године, сва четири комплекса означена као комплекс 1, комплекс 2, комплекс 3 и комплекс 4, су имала вредности  $IC_{50}$  концентрација које су биле преко 150  $\mu\text{M}$ . Комплекс 1 ових аутора је имао најнижу  $IC_{50}$  вредност од 151,29  $\mu\text{M}$  на *MCF7* ћелијама, што је знатно виша концентрација од оних које су добијене за наше рутенијум(II) комплексе *Ru-1* и *Ru-2* и које су износиле 13,8  $\mu\text{M}$  и 4,6  $\mu\text{M}$ . Оно што нам омогућава да поредимо

резултате ова два истраживања је чињеница да су вредности  $IC_{50}$  за цисплатину на испитиваним туморским ћелијама у истом вредносном рангу;  $IC_{50}$  вредност за цисплатину на *MCF7* ћелијама у истраживању *Jeyalakshmi* и сарадника је 21,5  $\mu\text{M}$ , што је слична вредност за  $IC_{50}$  концентрацију за цисплатину на *MCF7* ћелијама коју смо ми добили од 17  $\mu\text{M}$ .

*Luo* и сарадници су у свом истраживању, такође, испитивали антитуморски ефекат полипиридинских комплекса рутенијума на *MCF7* ћелијама. Да бисмо поредили резултате ова два истраживања, прво смо поредили вредности  $IC_{50}$  концентрација за цисплатину после 48 сати култивације (код ових аутора за *MCF7* ћелије та концентрација је износила 29,7  $\mu\text{M}$ , што је слично вредности коју смо ми добили и која је износила 24,5  $\mu\text{M}$ ). Поређењем  $IC_{50}$  вредности концентрација за *MCF7* туморске ћелије за период инкубације од 48 сати показало се да су  $IC_{50}$  концентрације *Luo*-а и сарадника значајно више у поређењу са  $IC_{50}$  концентрацијама наших испитиваних комплекса (154). Резултати истраживања ових аутора показују да  $IC_{50}$  вредности за *MCF7* ћелије за 4 полипиридинска комплекса рутенијума варирају од 66,0  $\mu\text{M}$  за комплекс 4 до 341,5  $\mu\text{M}$  колико износи  $IC_{50}$  вредност за комплекс 1 док су те вредности за комплекс *Ru-1* у нашем истраживању 22,9  $\mu\text{M}$  а за комплекс *Ru-2* 7,2  $\mu\text{M}$ . На основу добијених резултата, можемо закључити да су комплекси рутенијума које смо испитивали имали потенцијално ефикасније антитуморско дејство на *MCF7* ћелије, ћелије аденокарцинома дојке у односу на комплексе које су синтетисали и *Jeyalakshmi* и сарадници и *Luo* и сарадници.

*Lida* и сарадници (157) су, 2016. године синтетисали рутенијум-аренске комплексе за које се показало да нису имали тако снажан цитотоксичан ефекат на *MCF7* ћелије попут наших терпиридинских рутенијум(II) комплекса;  $IC_{50}$  концентрација за *Ru-2* комплекс за 72-часовну инкубацију у нашем истраживању износила 4,6  $\mu\text{M}$  у поређењу са истом вредношћу страних истраживача која је износила 50  $\mu\text{M}$ .

Да бисмо видели да ли хемијска структура комплекса рутенијума игра улогу у цитотоксичном ефекту поредили смо резултате истраживања *Deng*-а и сарадника из 2017. године са нашим резултатима (158). Они су, такође, испитивали ефекат терпиридинских рутенијум(II) комплекса, као и ми, за које се показало да су имали снажан цитотоксични ефекат на *MCF7* ћелије као и наши рутенијум(II) комплекси. Поредили смо вредности  $IC_{50}$  концентрација за *MCF7* ћелије после 72 часа инкубације (за наш *Ru-1* та вредност је

износила 13,8  $\mu\text{M}$  и за *Ru-2* 4,6  $\mu\text{M}$ ). У истраживању *Deng-a* и сарадника концентрација која смањује вијабилност *MCF7* ћелија после 72 часа инкубације на 50% у односу на контролу за комплекс обележен као *2c* је износила 30,2  $\mu\text{M}$ . *Deng* и сарадници су испитивали и друге терпиридинске комплексе рутенијума чија прецизна  $IC_{50}$  вредност није могла бити одређена због ниске растворљивости комплекса у медијуму, али се сматра да је износила преко 20  $\mu\text{M}$ . Тако, и у овом случају резултати показују да наши новосинтетисани рутенијум(II) комплекси делују ефикасније на смањење вијабилности *MCF7* ћелија и имају ниже  $IC_{50}$  вредности и у поређењу са комплексима ових аутора после 72 часа инкубације. Наравно, да бисмо могли да поредимо резултате ова два истраживања потребно је нагласити да је  $IC_{50}$  вредност за цисплатину на *MCF7* ћелијама код ових аутора износила 29,7  $\mu\text{M}$  што је истог ранга вредности за цисплатину на *MCF7* ћелијама које смо ми измерили и која је у нашем истраживању износила 17  $\mu\text{M}$  после 72 сата. Дакле, наведени резултати истраживања у поређењу са нашим резултатима, нам дозвољавају да закључимо да су комплекси рутенијума које смо ми испитивали потенцијално ефикаснији антитуморски агенси за лечење карцинома дојке у односу на све остале до сада испитиване агенсе.

Будући да је карцином грлића материце други по учесталости узрок смрти код жена, у наше истраживање смо укључили и испитивање туморских ћелија аденокарцинома грлића материце, *HeLa* (1). Резултати нашег истраживања су показали да примена новосинтетисаних терпиридинских рутенијум(II) комплекса *Ru-1* и *Ru-2*, као и примена цисплатине, статистички значајно смањује вијабилност ћелија карцинома грлића материце, *HeLa* ћелија, након 24, 48 и 72 часа култивације у односу на вијабилност нетретираних ћелија. Показали смо да су, након третмана од 24 часа *HeLa* ћелија,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину износиле  $212,4 \pm 36,4 \mu\text{M}$ ,  $7,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$  и  $25,7 \pm 2,9 \mu\text{M}$ . Након 48 часова инкубације *HeLa* ћелија са испитиваним комплексима,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $120,2 \pm 13,5 \mu\text{M}$ ,  $7,4 \pm 1,6 \mu\text{M}$  и  $8,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$ , а након 72 часа култивације *HeLa* ћелија, те вредности у истим временским интервалима испитивања за наведене комплексе и цисплатину су износиле  $75,5 \pm 10,4 \mu\text{M}$ ,  $6,4 \pm 1,3 \mu\text{M}$  и  $7,6 \pm 1,7 \mu\text{M}$ . На основу поређења добијених  $IC_{50}$  вредности за испитивана једињења на туморским ћелијама аденокарцинома грлића материце *HeLa*, можемо да закључимо да комплекс *Ru-2* има најснажније

цитотоксично дејство од свих испитиваних једињења, поготово поредећи цитотоксични ефекат комплекса *Ru-1* и *Ru-2* јер је за третман у трајању од 24 часа  $IC_{50}$  концентрација за комплекс *Ru-2* 28 пута нижа него  $IC_{50}$  концентрација за комплекс *Ru-1* (за *Ru-1*  $IC_{50}$  концентрација је 212,4 $\mu$ M а за *Ru-2* та вредност је 7,5 $\mu$ M); за време инкубације у трајању од 48 часова показало се да је комплекс *Ru-2* ефикаснији 16 пута (за *Ru-1*  $IC_{50}$  концентрација је 120,2  $\mu$ M а за *Ru-2* та вредност је 7,4  $\mu$ M) а да за период инкубације од 72 часа има 12 пута ефикасније цитотоксично дејство у односу на комплекс *Ru-1* (за *Ru-2*  $IC_{50}$  концентрација је 6,4  $\mu$ M а за *Ru-1* та вредност је 75,5  $\mu$ M). Поредећи  $IC_{50}$  концентрације за комплекс *Ru-2* и цисплатину истичу се само вредности за период инкубације од 24 часа; *Ru-2* има три пута израженије цитотоксично дејство јер је  $IC_{50}$  концентрација за *Ru-2* од 7,5 $\mu$ M три пута нижа од исте вредности за цисплатину која је износила 25,7 $\mu$ M; за временске интервале инкубације од 48 и 72 часа  $IC_{50}$  концентрације за комплекс *Ru-2* и цисплатину су у истом рангу вредности. Приликом испитивања цитотоксичног ефекта комплекса *Ru-1* показало се да са повећањем трајања периода инкубације ћелија долази до смањења  $IC_{50}$  концентрација, односно да долази до повећања испољавања цитотоксичног ефекта комплекса *Ru-1* на *HeLa* ћелије у односу на нетретирание ћелије. После третмана који је трајао 72 часа потребне су три пута мање концентрације овог комплекса да смање вијабилност *HeLa* ћелија на 50% у односу на контролу, у поређењу са концентрацијама које су потребне да смање вијабилност *HeLa* ћелија на 50% у односу на контролу после 24 и 48 часова инкубације. Поред тога, комплекс *Ru-1* делује скоро десет пута слабије на вијабилност *HeLa* ћелија у односу на цисплатину, као и у односу на комплекс *Ru-2* јер је потребна је десет пута већа концентрација комплекса *Ru-1* у односу на цисплатину и комплекс *Ru-2* да би дошло до смањења вијабилности *HeLa* ћелија за 50% у односу на контролну популацију нетретираних ћелија након 72 часа инкубације. Према томе, комплекс *Ru-1* има најслабији цитотоксични ефекат од сва три испитивана једињења.

У истраживању из 2016. године *Subarkhan*-а и сарадника (159), испитиван је цитотоксичан ефекат шест арениских бензхидразонских комплекса рутенијума(II) и показано је да они имају сличан цитотоксичан ефекат као и наши рутенијум(II) терпиридински комплекси на *HeLa* ћелије карцинома грлића материце. Да би поредили резултате ова два истраживања, прво смо упоредили  $IC_{50}$  вредности за цисплатину за

период култивације ћелија од 24 часа: концентрација цисплатине која је била потребна да смањи вијабилност *HeLa* ћелија на 50% после 24 часа у односу на контролу је, по овим ауторима, износила  $19,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$ , што је било упоредиво и у истом рангу вредности са вредности коју смо ми израчунали за цисплатину од  $25,7 \pm 2,9 \mu\text{M}$ . Након тога, поредили смо  $IC_{50}$  вредности за комплексе рутенијума у оба истраживања за исти период инкубације (24 часа): у истраживању *Subarkhan*-а и сарадника  $IC_{50}$  концентрација за комплекс рутенијума, у њиховом истраживању, означен као 6 је износила  $11,4 \pm 0,7 \mu\text{M}$  а за комплекс означен бројем 2 та вредност је била  $25,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$ .  $IC_{50}$  концентрација за наш комплекс *Ru-2* је  $7,5 \mu\text{M}$ , те стога, поредеће ове вредности, можемо да истакнемо, да комплекс *Ru-2* који смо ми испитивали има три пута већу цитотоксичну активност него комплекс 2 *Subarkhan*-а и сарадника. Наравно, не би било поштено да не истакнемо, да су сви комплекси рутенијума у истраживању *Subarkhan*-а и сарадника значајно цитотоксично активнији у односу на комплекс *Ru-1* који смо ми испитивали ( $IC_{50}$  концентрација за наш комплекс *Ru-1* је  $212,4 \mu\text{M}$  за период инкубације од 24 часа).

*Liao* и сарадници (160) су 2015. године испитивали три рутенијум(II) полипиридинска комплекса, који су по структури слични комплексима рутенијума које смо ми испитивали. Поредили смо резултате два истраживања за временски период од 48 сати инкубације за *HeLa* ћелије. Као што је и уобичајено, да бисмо могли да поредимо резултате ова два истраживања, прво смо упоредили вредности  $IC_{50}$  концентрација за цисплатину за период инкубације од 48 часова за *HeLa* ћелије: *Liao* и сарадници  $16,75 \mu\text{M}$ , ми  $8,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$ , концентрације су поредљиве. Концентрације које смањују вијабилност *HeLa* ћелија на 50% у односу на контролу након 48 часова, тј.  $IC_{50}$  концентрације за комплексе 1, 2 и 3 у истраживању *Liao* и сарадника биле су  $37,45 \mu\text{M}$ ,  $21,37 \mu\text{M}$  и  $23,85 \mu\text{M}$ . Упоређујући  $IC_{50}$  концентрацију за комплекс *Ru-2* која је у нашем испитивању износила  $7,4 \mu\text{M}$  можемо да тврдимо да комплекс *Ru-2* који смо испитивали има седам пута боље изражен цитотоксични ефекат на *HeLa* ћелије него комплекс 1 из истраживања *Liao* и сарадника и два пута боље изражен цитотоксични ефекат на *HeLa* ћелије него комплекси 2 и 3 из истраживања *Liao* и сарадника. Поредећи  $IC_{50}$  концентрације за *HeLa* ћелије у истом временском интервалу од 48 часова за комплексе *Liao* и сарадника и наш испитивани комплекс *Ru-1*, ситуација је обрнута: комплекс 1 *Liao* и сарадника има три пута боље изражен цитотоксични ефекат на *HeLa* ћелије него наш комплекс *Ru-1* а комплекси 2 и 3

шест пута боље изражен цитотоксични ефекат на *HeLa* ћелије него наш испитивани комплекс *Ru-1*. Можемо закључити да комплекс *Ru-2*, седам пута ефикасније делује на смањење вијабилности *HeLa* ћелија од комплекса *Liao*-а и сарадника. Наш комплекс *Ru-2* је имао снажан цитотоксични ефекат на *HeLa* ћелије аденокарцинома грлића материце. Тачније, *Ru-2* комплекс је смањивао вијабилност *HeLa* ћелија ефикасније и од комплекса *Subarkhan*-а и сарадника (159) и од комплекса *Liao*-а и сарадника (160).

Још једно истраживање, истраживање *Jiang* и сарадника из 2014. године потврђује да је полипиридинска структура комплекса рутенијума важна за испољавање њиховог цитотоксичног ефекта на туморске *HeLa* ћелије. Наиме, они су, исто као и ми, испитивали цитотоксични ефекат, по структури врло сличних, полипиридинских рутенијум(II) комплекса на ћелијама аденокарцинома грлића материце са периодом инкубације од 48 сати. Прво смо, да би проверили поредљивост резултата, упоредили  $IC_{50}$  вредности за цисплатину за период култивације ћелија од 48 часова; код *Jiang* и сарадника та вредност је  $7,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$ , у нашем истраживању  $IC_{50}$  концентрација за инкубацију од 48 часова за цисплатину је  $8,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$ . Након тога, поредећи вредности за  $IC_{50}$  концентрације испитиваних комплекса рутенијума у оба истраживања поредили смо и њихов цитотоксични ефекат на туморске *HeLa* ћелије: наш комплекс *Ru-2* има исти цитотоксични ефекат као и рутенијумски комплекс 1 који су испитивали *Jiang* и сарадници ( $IC_{50}$  концентрација за *Ru-2* је била  $7,4 \mu\text{M}$ , а код *Jiang* и сарадника за комплекс 1 та вредност је  $9,0 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ). Ипак, такође поредећи вредности за  $IC_{50}$  концентрације комплекса 1 *Jiang* и сарадника и нашег испитиваног комплекса *Ru-1* можемо да кажемо да комплекс 1 *Jiang* и сарадника има тринаест пута боље изражен цитотоксични ефекат у односу на испитивани комплекс *Ru-1* у нашем истраживању.

Малигни меланом је тип тумора који је веома резистентан на хемиотерапеутике. До недавно је његова терапија била ограничена искључиво на комбинацију хируршке и зрачне терапије, да би се применом лекова као што су ипилумумаб, вемурафениб, дабрафениб и високе дозе интерлеукина-2 (*IL-2*) ситуација изменила у смислу да данас ипак постоје неки хемиотерапеутици који се користе у терапији малигног меланома (2). Управо из разлога што је малигни меланом резистентан на највећи број хемиотерапеутика који се данас примењују, испитивали смо утицај новосинтетисаних терпиридинских комплекса рутенијума, *Ru-1* и *Ru-2*, на вијабилност *Hs 294T* ћелија малигног меланома.

Резултати нашег истраживања су показали да рутенијум(II) комплекси имају слаб цитотоксични ефекат на *Hs 294T* ћелије малигног меланома након 24, 48 и 72 часа инкубације. За разлику од испитиваних комплекса рутенијума, цисплатина је знатно ефикасније смањивала вијабилност *Hs 294T* ћелија после третмана који је трајао 24, 48 и 72 часа. Прецизније, након 24 часа култивације *Hs 294T* ћелија, вредности за  $IC_{50}$  концентрације за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300  $\mu\text{M}$ , док је за цисплатину  $IC_{50}$  концентрацију износила  $124,2 \pm 14,6 \mu\text{M}$ . Након 48 часова култивације *Hs 294T* ћелија, вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $247,8 \pm 21,0 \mu\text{M}$ ,  $231,6 \pm 33,8 \mu\text{M}$  и  $21,3 \pm 5,5 \mu\text{M}$ , а након 72 часа култивације *Hs 294T* ћелија, вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $179,6 \pm 27,9 \mu\text{M}$ ,  $183,1 \pm 17,1 \mu\text{M}$  и  $13,8 \pm 6,2 \mu\text{M}$ . Сва три испитивана једињења, комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатина, су са продужењем времена инкубације *Hs 294T* ћелија имали све снажнији цитотоксични ефекат. За сва три једињења је била потребна статистички значајно нижа концентрација да изазове смањење вијабилности *Hs 294T* ћелија за 50% у односу на контролу после 48 и 72 сата инкубације, у односу на концентрације ових једињења које су биле потребне да изазову исти ефекат на *Hs 294T* ћелијама после 24 часа. Такође, важно је напоменути да је након 72 сата инкубације једино цисплатина имала снажан цитотоксични ефекат на *Hs 294T* ћелије, док је испитиваним новосинтетисаним терпиридинским комплексима рутенијума била потребна око 13 пута већа концентрација да изазове исти ефекат.

Према до сада прегледаној литератури, активност комплекса рутенијума није испитивана на *Hs 294T* ћелијама малигног меланома. Наши резултати су недвосмислено показали да комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* имају слаб цитотоксичан ефекат на *Hs 294T* ћелије са вредностима  $IC_{50}$  концентрација које су преко 150  $\mu\text{M}$  после 72 сата инкубације. Могуће је да су и други аутори добили сличне резултате, па да услед тога и нема публикација који би потврдиле нашу претпоставку да комплекси рутенијума не делују цитотоксично на *Hs 294T* ћелије малигног меланома. Ипак, да би се оваква тврдња прихватила, потребно је спровести још истраживања.

С друге стране, испитиван је утицај комплекса рутенијума на *A375* ћелије малигног меланома. У овим истраживањима су други аутори добили резултате који су обећавајући за нека будућа детаљнија истраживања терапије малигног меланома. Комплекси



рутенијума које су синтетисали *Zhao* и сарадници (162) су смањивали вијабилност *A375* ћелија малигног меланома на 50% у односу на контролу при концентрацијама од 30  $\mu\text{M}$  до 78  $\mu\text{M}$  након 72 сата, што су 2,5 до 6 пута мање од концентрације које су биле потребне нашим испитиваним комплексима да изазову исти ефекат на *Hs 294T* ћелије.

Такође, у истраживању *Deng*-а и сарадника из 2017. године који су испитивали терпиридински комплекс рутенијума који су означили као комплекс *2c*, показано је да, за разлику од комплекса рутенијума које смо ми испитивали на *Hs 294T* ћелијама, он има цитотоксично дејство на *A375* ћелије малигног меланома (158). Комплекс *2c* је при концентрацији од  $16,9 \pm 3,1 \mu\text{M}$  смањивао вијабилност *A375* ћелија на 50% после 72 сата инкубације и тиме је потврђен његов јак цитотоксични ефекат.

Да би нека супстанца била кандидат за будући хемиотерапеутик, потребно је да задовољи одређене критеријуме. Једна од битних карактеристика коју таква супстанца мора да поседује је потпуно одсуство или присуство врло слабе цитотоксичности ка ћелијама здравог, малигно неизмењеног ткива. Стога смо испитивали утицај комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и на здравим ћелијама, односно на ћелијској линији фибробласта изолованих из ткива плућа, *MRC-5*. Резултати нашег истраживања су показали да наши новосинтетисани терпиридински рутенијум(II) комплекси готово да немају цитотоксични ефекат на *MRC-5* фибробласте након 24, 48 и 72 часа инкубације. За разлику од испитиваних комплекса рутенијума, цисплатина је знатно ефикасније смањивала вијабилност *MRC-5* ћелија после 24, 48 и 72 часа. Након 24 и 48 часова култивације *MRC-5* ћелија, вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300  $\mu\text{M}$ , док је после 72 сата култивације  $IC_{50}$  концентрација за комплекс *Ru-1* износила  $192,6 \pm 17,2 \mu\text{M}$ , а за комплекс *Ru-2*,  $238,1 \pm 19,3 \mu\text{M}$ . Концентрације цисплатине потребне да смање вијабилност *MRC-5* ћелија за 50% у односу на контролу су биле  $183,7 \pm 16,2 \mu\text{M}$  после 24 часа,  $43,1 \pm 8,8 \mu\text{M}$  после 48 часова и  $19,7 \pm 6,7 \mu\text{M}$  после 72 часа инкубације. Сва три испитивана једињења, комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатина, су са продужењем времена инкубације *MRC-5* ћелија имали све снажнији цитотоксични ефекат. Била је потребна статистички значајно нижа концентрација сва три једињења да изазове смањење вијабилности *MRC-5* ћелија за 50% у односу на контролу после 72 сата инкубације, у односу на концентрације ових једињења које су биле потребне да изазову исти ефекат на *MRC-5* ћелије после 24 и после 48 часова. Такође, након 72 сата инкубације

једино је цисплатина имала снажан цитотоксични ефекат на *MRC-5* ћелије, док је испитиваним новосинтетисаним терпиридинским комплексима рутенијума била потребна бар десет пута већа концентрација да изазове исти ефекат.

Милутиновић и сарадници су 2017. године добили резултате сличне нашим на *MRC-5* ћелијама (163). Терпиридински рутенијум(II) комплекси које су ови аутори синтетисали су, као и у нашој студији, имали веома слаб цитотоксичан ефекат на *MRC-5* ћелије. Од 6 синтетисаних рутенијум(II) комплекса ових аутора, само су комплекси 3 и 4 имали  $IC_{50}$  вредности на *MRC-5* ћелијама које су биле мање од 100 $\mu$ М после 72 сата инкубације. Комплекс 3 је за временски период од 72 сата инкубације при концентрацији од  $97,67 \pm 6,93 \mu\text{M}$  смањивао вијабилност *MRC-5* ћелија на 50% у односу на контролу, а комплекс 4 је исти ефекат постигао при концентрацији од  $86,66 \pm 2,62 \mu\text{M}$ . Наши рутенијум(II) комплекси *Ru-1* и *Ru-2* су деловали још слабије на *MRC-5* ћелије, јер су њихове вредности  $IC_{50}$  концентрација после 72 сата за *MRC-5* ћелије биле  $192,6 \pm 17,2 \mu\text{M}$  за комплекс *Ru-1* и  $238,1 \pm 19,3 \mu\text{M}$  за комплекс *Ru-2*.

На основу добијених вредности  $IC_{50}$  концентрација за комплексе рутенијума, *Ru-1* и *Ru-2*, и цисплатину на туморским ћелијама *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T*, као и на основу резултата које смо добили на здравим контролним фибробластима тј. *MRC-5* ћелијама, можемо закључити да комплекси рутенијума делују селективно према различитим типовима ћелија. Првенствено, оба комплекса рутенијума, *Ru-1* и *Ru-2*, практично немају, односно имају врло слаб цитотоксични ефекат на популацију здравих ћелија, тј. *MRC-5* фибробласта. Такође, и према туморским ћелијама ови комплекси делују селективно. Оба комплекса имају врло слаб цитотоксични ефекат на *Hs 294T* ћелије малигног меланома, али с друге стране, имају снажно цитотоксично дејство на ћелије карцинома плућа *A549* и карцинома дојке *MCF7*. Интересантно је да комплекс *Ru-1* има снажније цитотоксично дејство на ћелије карцинома плућа *A549* од комплекса *Ru-2*, док са друге стране, комплекс *Ru-2* има снажније цитотоксично дејство на ћелије карцинома дојке *MCF7* од комплекса *Ru-1*. Селективност ових комплекса према различитим типовима ћелија још више долази до изражаја код испитивања цитотоксичног ефекта на *HeLa* ћелије аденокарцинома грлића материце. Комплекс *Ru-1* готово да нема цитотоксично дејство на *HeLa* ћелије, док је комплекс *Ru-2* значајно ефикаснији. Показали смо да је потребна је скоро дванаест пута

мања концентрација комплекса *Ru-2* од комплекса *Ru-1* да смањи вијабилност *HeLa* ћелија за 50% у односу на контролу после 72 сата и та вредност је износила само  $6,4 \pm 1,3 \mu\text{M}$ .

Пошто су резултати нашег истраживања показали да комплекси *Ru-1* и *Ru-2* имају селективно цитотоксично дејство на различите врсте туморских ћелија, а истовремено практично не делују цитотоксично на здраве ћелије, следећи корак у нашем истраживању је био да се утврди и бар делимично објасни механизам деловања терпиридинских комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*.

Хомеостаза сваког сложеног организма се одржава захваљујући деловању три високо регулисана процеса у које спадају ћелијска пролиферација, диференцијација и смрт. Иако је дуго година пажња научника била усмерена ка пролиферацији и диференцијацији ћелија, средином XX века је ситуација почела да се мења, када је уведен термин „програмирана ћелијска смрт“. „Програмирана ћелијска смрт“ је означавала смрт ћелије током процеса њене диференцијације. Нешто касније, 1972. године, Кер, Вајли и Кари (*Kerr, Wyllie и Currie*), су увели нов термин „апоптоза“, који је означавао „механизам контролисане делеције ћелија који има комплементарну, али супротну улогу у односу на митозу у регулацији популације ћелија код животиња“ (100). Данас је познато да је поремећај регулације апоптозе повезан са развојем отпорности тумора на цитостатике, као и да је у основи канцерогенезе заправо присутан поремећај апоптозе ћелија. Тачније, кључни корак у канцерогенези је способност ћелија да избегну апоптозу у комбинацији са потенцијално штетним генским мутацијама. Стога је коначни циљ у терапији малигних тумора да се селективно изазове смрт туморских ћелија као и да се превазиђе проблем везан за појаву резистенције туморских ћелија на цитостатике (100).

Суштински, није важно на који начин ћемо потпуно елиминисати туморске ћелије у организму, да ли хируршком терапијом, радиотерапијом или неким од агенаса који изазивају мање или више селективну смрт малигних ћелија. Међутим, показано је да ће, уколико индукујемо процес апоптозе туморских ћелија, уследити бржа регресија тумора у односу на оне туморе код којих индукција апоптозе није могућа. Код тумора код којих се процес апоптозе не може изазвати, процес некрозе има важну улогу у регресији тумора стимулацијом нативног имунског одговора. Оно што ипак можемо претпоставити је да специфична индукција апоптозе, дакле индукција апоптозе искључиво туморских ћелија, односно оних ћелија код којих је дошло до поремећаја у апоптози, представља једну од

метода у терапији малигнух тумора која обећава. Управо из тог разлога смо желели да утврдимо којим типом ћелијске смрти долази до смањења вијабилности испитиваних туморских ћелија *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs294T* након третирања ових ћелија комплексима рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* у концентрацији која смањује вијабилност туморских ћелија за 50% ( $IC_{50}$ ) после 24 часа.

Резултати нашег истраживања су показали да је комплекс *Ru-1* који смо користили у концентрацији која смањује вијабилност *A549* туморских ћелија за 50% ( $IC_{50}$  концентрација) после 24 часа смањено вијабилност *A549* ћелија на 37,97%, од чега је било 56,29% апоптотичних ћелија, а 5,74% некротичних ћелија. Од укупне популације ћелија, 44,46% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 5,74% у фази касне апоптозе. Такође, након третмана *A549* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса *Ru-2* од 25,1 $\mu$ М после 24 часа, 51,14% ћелија је било вијабилно. Показано је да је од укупне популације ћелија, 47,37% апоптотичних ћелија и то 35,12% у фази ране апоптозе и 12,25% у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је било 1,49% некротичних ћелија.

Сличне резултате као код *A549* туморских ћелија смо добили и испитивањем других ћелијских линија, односно испитивањем на туморским ћелијама карцинома дојке *MCF7*, аденокарцинома грлића материце *HeLa* и *Hs294T* ћелијама малигног меланома након третирања ових ћелија комплексима рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* у  $IC_{50}$  концентрацији после 24 часа. Тако је примена комплекса *Ru-1* статистички значајно смањила вијабилност туморских ћелија карцинома дојке, односно *MCF7* ћелија индукцијом апоптозе. Комплекс *Ru-1* у концентрацији од 102,4  $\mu$ М је после 24 часа смањено вијабилност *MCF7* ћелија на 40,61%, од чега је било 49,11% апоптотичних ћелија, а 10,28% некротичних ћелија. Од укупне популације ћелија, 19,22% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 29,88% у фази касне апоптозе. Након третмана *MCF7* туморских ћелија  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса *Ru-2* од 13,9  $\mu$ М после 24 часа, 53,78% ћелија је било вијабилно. Детектовано је 37,19% апоптотичних ћелија и то 17,29% у фази ране апоптозе и 19,89% у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је детектовано и 9,03% некротичних ћелија.

Испитивањем туморских *HeLa* ћелија добили смо следеће резултате: Комплекс *Ru-1* у концентрацији од 212,4  $\mu$ М је после 24 часа смањено вијабилност *HeLa* ћелија на 51,71%, од чега је било 46,87% апоптотичних ћелија, а 1,41% некротичних ћелија. Од укупне популације ћелија, 43,76% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 3,11% у фази

касне апоптозе. Након третмана *HeLa* ћелија комплексом *Ru-2* у концентрацији од 7,5  $\mu\text{M}$  после 24 часа, 61,92% ћелија је било вијабилно. Детектовано је 37,34% апоптотичних ћелија и то 36,85% у фази ране апоптозе и 0,5% у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је детектовано и 0,74% некротичних ћелија.

Испитијући вијабилност *Hs 294T* ћелија малигног меланома, наши резултати показују да је комплекс *Ru-1* примењен у концентрацији од 300  $\mu\text{M}$  после 24 часа смањио вијабилност ових ћелија на 63,57%, од чега је било 35,93% апоптотичних ћелија, а 0,5% некротичних ћелија. Од укупне популације *Hs 294T* ћелија, 35,18% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 0,75% у фази касне апоптозе. Након третмана *Hs 294T* ћелија у трајању од 24 часа комплексом *Ru-2* у концентрацији од 300  $\mu\text{M}$ , 67,88% *Hs 294T* ћелија је било вијабилно. Детектовано је 29,87% апоптотичних ћелија и то 27,59% у фази ране апоптозе и 2,28% у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је детектовано и 2,25% некротичних ћелија.

Резултати нашег истраживања јасно показују да оба терпиридинска рутенијум(II) комплекса смањују вијабилност испитиваних туморских ћелија *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs294T* после 24 часа инкубације, тако што доминантно индукују апоптозу ових ћелија. Само минимални проценат испитиваних ћелија умире услед индукције некрозе дејством наших новосинтетисаних терпиридинских рутенијум(II) комплекса *Ru-1* и *Ru-2*. Суштински, нема битних разлика у проценту ћелија које се налазе у различитим фазама апоптозе, односно у некрози између различитих типова туморских ћелија. Оба комплекса рутенијума, и *Ru-1* и *Ru-2* врло мало мењају вијабилност испитиваних ћелија индукцијом некрозе. Комплекси *Ru-1* и *Ru-2* једино индукују некрозу око 10% *MCF7* ћелија при концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  концентрацијама за ове комплексе, али је и то ипак значајно мање у односу на проценат апоптотичних *MCF7* ћелија.

Слично резултатима наше студије, смањење вијабилности туморских ћелија индукцијом апоптозе услед деловања рутенијум(II) комплекса, је показано и у студијама других аутора. Полипиридински рутенијум(II) комплекси које су синтетисали *Lai* и сарадници (148), *Mazuryk* и сарадници (164) и *Han* и сарадници (155) су слично као и наши терпиридински рутенијум(II) комплекси, смањивали вијабилност *A549* ћелија тако што су индуковали њихову апоптозу. Такође, *Liao* и сарадници су показали да њихови полипиридински рутенијум(II) комплекси смањују вијабилност *HeLa* ћелија индукујући

апоптозу *HeLa* ћелија, што је идентично резултатима нашег истраживања за рутенијум(II) комплексе *Ru-1* и *Ru-2* (160). Резултате који су у сагласности са резултатима нашег истраживања су добили и други аутори, који су показали да рутенијум(II) комплекси смањују вијабилност туморских ћелија тако што индукују њихову апоптозу (153, 154, 158, 161, 162).

Смањење вијабилности туморских ћелија под дејством супстанци које делују цитотоксично може настати услед индукције апоптозе туморских ћелија, инхибиције пролиферације туморских ћелија због заустављања ћелијског циклуса, или може настати због комбинације ова два механизма (148). Стога смо анализирали проценат ћелија које се налазе у различитим фазама ћелијског циклуса у популацији ћелија које смо третирали испитиваним терпиридинским рутенијум(II) комплексима *Ru-1* и *Ru-2*. Исти експеримент је изведен и код контролне популације нетретираних туморских ћелија.

Резултати нашег истраживања су показали да је комплекс *Ru-1* у концентрацији од 55,3  $\mu\text{M}$  после 24 часа довео до застоја у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса код *A549* ћелија епителног аденокарцинома плућа јер је довео до повећања процента ћелија које се налазе у  $G_2/M$  фази у односу на нетретирани туморске ћелије. Сличан ефекат имамо и након третмана *A549* ћелија комплексом *Ru-2* у концентрацији од 25,1  $\mu\text{M}$  после 24 часа: такође је дошло до акумулације ћелија у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса код *A549* ћелија епителног аденокарцинома плућа јер је дошло до статистички значајног повећања процента ћелија које се налазе у  $G_2/M$  фази у односу на нетретирани туморске ћелије. Слично као што чине оба наша рутенијум(II) комплекса *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатина такође узрокује застој *A549* ћелија у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса.

Испитујући ћелијски циклус на туморским ћелијама карцинома дојке, *MCF7* ћелијама, наше истраживање је показало да је комплекс *Ru-1* у концентрацији од 102,4  $\mu\text{M}$  после 24 часа доводио до застоја у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса код *MCF7* ћелија карцинома дојке јер је индуковао повећање процента ћелија које се налазе у  $G_0/G_1$  фази у односу на нетретирани туморске ћелије. За разлику од комплекса *Ru-1*, комплекс *Ru-2* примењен у концентрацији од 13,9  $\mu\text{M}$  после 24 часа није утицао на проценте ћелија које су се налазиле у различитим фазама ћелијског циклуса у односу на нетретирани туморске ћелије. Поред тога, за разлику од комплекса *Ru-1* и *Ru-2*, примена цисплатине у

концентрацији од 94,11  $\mu\text{M}$  након 24 часа инкубације *MCF7* ћелија узрокује застој у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса код *MCF7* ћелија карцинома дојке.

Такође, испитујући ћелијски циклус на туморским ћелијама аденокарцинома грлића материце, показали смо да после третмана *HeLa* ћелија комплексом *Ru-1* у концентрацији од 212,4  $\mu\text{M}$  после 24 часа, није дошло до статистички значајне промене процента ћелија које су се налазиле у различитим фазама ћелијског циклуса у односу на нетретирани туморске ћелије. За разлику од резултата које смо добили на *HeLa* ћелијама деловањем комплекса *Ru-1*, комплекс *Ru-2* и цисплатина су на *HeLa* ћелијама доводили до застоја у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса.

Иако смо већ утврдили да рутенијум(II) комплекси *Ru-1* и *Ru-2* готово да немају цитотоксично дејство на *Hs 294T* ћелије малигног меланома, ипак смо испитали утицај комплекса *Ru-1* и *Ru-2* на ћелијски циклус *Hs 294T* ћелија. Резултати нашег истраживања су показали да оба наша терпиридинска рутенијум(II) комплекса *Ru-1* и *Ru-2* доводе до акумулације ћелија у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса код *Hs 294T* ћелија малигног меланома, јер су довели до повећања процента ћелија које се налазе у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса у односу на нетретирани туморске ћелије. Сличан ефекат на ћелијски циклус *Hs 294T* ћелија малигног меланома је показан и применом цисплатине која је, као и комплекси *Ru-1* и *Ru-2*, доводила до акумулације *Hs 294T* ћелија у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса.

На основу резултата које смо добили испитујући утицај комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* на ћелијски циклус туморских ћелија, можемо закључити да и овде постоје разлике у крајњем ефекту комплекса на ћелијски циклус туморских ћелија. Тако, оба комплекса које смо испитивали могу да доведу до застоја у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса,  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса или да уопште не утичу на ћелијски циклус, зависно од тога о ком типу туморских ћелија се ради. Јасно је да су потребна даља истраживања како би се прецизније утврдио и разјаснио механизам којим терпиридински рутенијум(II) комплекси утичу на ћелијски циклус туморских ћелија.

Други аутори су такође испитивали утицај комплекса рутенијума на ћелијски циклус туморских ћелија. Међутим, за разлику од резултата нашег истраживања где смо показали да комплекси *Ru-1* и *Ru-2* индукују застој у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса код *A549* туморских ћелија, *Lai* и сарадници су добили другачије резултате (148). Наиме, *Lai* и

сарадници су показали да четири њихова рутенијум(II) полипиридинска комплекса доводе до застоја у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса код истих испитиваних ћелија што је потпуно супротно резултатима нашег истраживања. Такође, и *Han* и сарадници (155) су закључили да њихова три рутенијум(II) полипиридинска комплекса доводе до застоја у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса код *A549* ћелија што је опет, потпуно супротно резултатима нашег истраживања. Ипак, *Mazuryk* и сарадници (164) су показали да полипридински комплекси рутенијума могу довести и до застоја ћелија у *S* фази ћелијског циклуса што је у складу са резултатима нашег истраживања да комплекси рутенијума не заустављају ћелијски циклус увек у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса. Поред тога, приликом испитивања ефекта три полипиридинска комплекса рутенијума које су синтетисали *Liao* и сарадници (160) на ћелијски циклус *HeLa* туморских ћелија показано је да они могу да зауставе ћелијски циклус у различитим фазама. Наиме, од три комплекса које су *Liao* и сарадници испитивали, један комплекс зауставља ћелијски циклус *HeLa* ћелија у  $G_2/M$  фази, други у  $G_0/G_1$  и  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса, а трећи комплекс рутенијума(II) ових аутора доводи до застоја у *S* фази ћелијског циклуса. Резултати нашег истраживања су показали да комплекс *Ru-2* доводи до застоја у  $G_2/M$  фази ћелијског циклуса на *HeLa* туморским ћелијама што је идентично дејству комплекса 1 који су добили *Liao* и сарадници на овој ћелијској линији.

Да бисмо прецизније утврдили којим механизмом комплекси рутенијума(II) *Ru-1* и *Ru-2* индукују апоптозу *HeLa* ћелија, наредни корак у нашем истраживању је био да испитамо локализацију и концентрацију тј. количину интрацитоплазматских кључних протеина (*Bax*, *Bcl-2*, цитохрома *c* и активне каспазе-3) који су укључени у процес програмиране ћелијске смрти, односно процеса апоптозе.

Резултати нашег истраживања су показали да комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатина доводе до статистички значајног повећања просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за активни проапоптотични протеин *Bax* код третираних у односу на нетретиране *HeLa* ћелије. Поред тога, показали смо да под дејством комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* долази и до статистички значајног смањења просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за антиапоптотични протеин *Bcl-2* код третираних у односу на нетретиране *HeLa* туморске ћелије. Исти, као и комплекси рутенијума и у још већој мери изражен ефекат на *HeLa* туморске ћелије је показала и цисплатина, која је као и



наши комплекси рутенијума, такође, доводила до смањења просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за антиапоптоични протеин *Bcl-2* код третираних у односу на нетретиране *HeLa* туморске ћелије. Промењени однос антиапоптоичног *Bcl-2* протеина и проапоптоичног *Bax* протеина се огледа и у смањењу *Bcl-2/Bax* количника који је изазван дејством комплекса рутенијума у мањој и цисплатине у већој мери у односу на нетретиране *HeLa* туморске ћелије. Услед оваквог дејства комплекса *Ru-1* и *Ru-2* на проапоптоични протеин *Bax* и антиапоптоични протеин *Bcl-2* код третираних *HeLa* туморских ћелија дошло је до активације унутрашњег, митохондријалног пута апоптозе (84), што је у нашој студији и показано. Укратко, наши резултати су показали да услед дејства комплекса *Ru-1* и *Ru-2*, долази до повећања количине активног проапоптоичног протеина *Bax* и смањења количине антиапоптоичног протеина *Bcl-2* код третираних *HeLa* ћелија. Као последица овог дисбаланса, дошло је до отпуштања цитохрома *c* из матрикса митохондрија у цитоплазму и активације каспазе-3 и последичне апоптозе код *HeLa* ћелија које су третиране комплексима *Ru-1* и *Ru-2*. Наиме, резултати нашег истраживања су показали да комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатина доводе до статистички значајног повећања просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за цитохром *c* код третираних *HeLa* ћелија у односу на нетретиране *HeLa* ћелије после 24 часа култивације. Услед ослобађања цитохрома *c* из међумембранског митохондријалног простора у цитоплазму, код третираних *HeLa* туморских ћелија, је дошло и до активације каскаде каспаза и последичне активације и егзекуторне каспазе-3 (87). Резултати нашег истраживања су и показали да се то дешава код *HeLa* ћелија услед деловања комплекса *Ru-1* и *Ru-2*. Наиме, показали смо да примена комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине доводе до статистички значајног повећања процента ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3 код третираних у односу на нетретиране *HeLa* ћелије.

Резултате који су у сагласности са нашим резултатима, су добили други аутори на рутенијум(II) комплексима. Тако су *Luo* и сарадници (154) показали да због дејства њиховог полипиридинског рутенијум(II) комплекса 4 долази до повећања количине активног проапоптоичног протеина *Bax* и смањења количине антиапоптоичног протеина *Bcl-2* код третираних *A375* ћелија у односу на контролу. Такође су закључили да услед дејства комплекса рутенијума 4 долази до активације каспазе-3 и индукције апоптозе

третирањих *A375* ћелија што је у сагласности са нашим резултатима добијеним испитивањем комплекса *Ru-1* и *Ru-2* на *HeLa* ћелијама. Поред тога, и *Lai* и сарадници (148) су показали да применом њихових рутенијум(II) полипиридинских комплекса долази до повећања експресије *Bax* протеина и смањења експресије *Bcl-2* протеина, што доводи до активације егзекуторне каспазе-7 код третирањих *A549* ћелија. То нам дозвољава да закључимо да су резултати ове две студије у сагласности са резултатима нашег истраживања.

У сагласности са резултатима нашег истраживања су и резултати које су добили *Han* и сарадници (155) на *A549* туморским ћелијама које су третирали полипиридинским рутенијум(II) комплексом. И ови аутори су закључили да применом рутенијум(II) комплекса, конкретно у овом случају њиховог комплекса 3, долази до активације апоптозе која је зависна од деловања каспаза и то каспазе-3, -7 и -9. Међутим, за разлику од резултата који су добијени у нашем истраживању, *Han* и сарадници нису показали да долази до промене експресије за *Bcl-2* протеин због дејства рутенијум(II) комплекса. Код њих је експресија *Bcl-2* протеина била идентична код третирањих и контролне популације нетретирањих туморских ћелија. Ипак, и овде је, као и у нашем истраживању, показано да рутенијум(II) комплекси доводе до повећања експресије проапоптотичног *Bax* протеина.

Терпиридински комплекси које су синтетисали *Deng* и сарадници (158) су имали веома добар цитотоксични ефекат на *A375* ћелије малигног меланома. Детаљнијом анализом, ови аутори су закључили да њихов терпиридински комплекс 2c индукује апоптозу *A375* ћелија активацијом каспаза. За разлику од резултата нашег истраживања, где је показано да каспаза-3 има веома битну улогу у активацији апоптозе узроковане дејством комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* на испитиване *HeLa* туморске ћелије, у студији *Deng*-а и сарадника је утврђено да кључну улогу у активацији апоптозе услед дејства рутенијум(II) комплекса, и то у овом случају комплекса 2c, има каспаза-8. Стога су, ови аутори сугерисали да терпиридински комплекс рутенијума 2c индукује апоптозу *A375* ћелија активацијом спољашњег сигналног пута апоптозе путем рецептора смрти, што се не слаже са резултатима нашег истраживања, где смо показали да је апоптоза изазвана дејством комплекса рутенијума које смо ми испитивали индукована унутрашњим, митохондријалним сигналним путем.

Управо ове разлике у начинима изазивања апоптозе туморских ћелија дејством комплекса рутенијума су највероватније последица суптилних варијација на молекуларном нивоу код различитих типова тумора. Због тога су потребна даља истраживања како бисмо прецизно разјаснили све механизме деловања комплекса рутенијума на туморске ћелије, а истовремено и разјаснили варијације које постоје на молекуларном нивоу између различитих типова тумора.

## 6. Закључци

На основу комплетне анализе добијених резултата можемо закључити следеће:

1. Новосинтетисани комплекси рутенијума(II) показују временски и дозно-зависно повећање цитотоксичности на свим испитиваним туморским ћелијама (*A549* – карцином плућа, *MCF7* – карцином дојке, *HeLa* – карцином цервикса, *Hs 294T* – меланом), уз повећану селективност према туморским ћелијама у односу на здраве малигно нетрансформисане фибробласте (*MRC-5*).
2. Након третмана комплексима рутенијума(II) туморских ћелија (*A549* – карцином плућа, *MCF7* – карцином дојке, *HeLa* – карцином цервикса, *Hs 294T* – меланом) показано је да новосинтетисани комплекси рутенијума(II) смањују вијабилност третираних туморских ћелија индукцијом апоптозе.
3. У третираним туморским ћелијама комплекси рутенијума(II) доводе до застоја у различитим фазама ћелијског циклуса, што може бити још један од разлога смањења вијабилности третираних туморских ћелија у односу на контролну популацију нетретираних ћелија, јер ћелије које не превазиђу застој у ћелијском циклусу нужно умиру.
4. Показано је да новосинтетисани комплекси рутенијума(II) у третираним туморским ћелијама повећавају релативни однос *Bcl-2/Bax*, што последично доводи до транслокације цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму, активације каспазе-3 и индукције апоптозе *HeLa* туморских ћелија.

## 7. Литература

1. Katić V, Kutlešević C, Stojanović D. Opšta patologija: udžbenik za studente medicine i stomatologije. Prosveta, Niš. 1997.
2. <http://globocan.iarc.fr/>
3. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>
4. Mihajlović J, Pechlivanoglou P, Miladinov-Mikov M, Zivković S, Postma MJ. Cancer incidence and mortality in Serbia 1999-2009. BMC Cancer. 2013;13:18.
5. Bertram JS. The molecular biology of cancer. Mol Aspects Med. 2000;21(6):167-223.
6. Mahdieh N, Rabbani B. An Overview of Mutation Detection Methods in Genetic Disorders. Iranian Journal of Pediatrics. 2013;23(4):375-388.
7. Sonoda K. Molecular biology of gynecological cancer. Oncology Letters. 2016; 11(1):16-22.
8. Croce CM. Oncogenes and cancer. N Engl J Med. 2008;358(5):502-11.
9. Kalyanaraman B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. Redox Biol. 2017;12:833-842.
10. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. Data status, Beograd. 2005.
11. Chial, H. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. Nature Education. 2008;1(1):33.
12. Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(10):a003236.
13. Muñoz-Fontela C, Mandinova A, Aaronson SA, Lee SW. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. Nat Rev Immunol. 2016;16(12):741-750.
14. Dyson NJ. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. Genes Dev. 2016;30(13):1492-502.
15. Živančević-Simonović S, Đukić A, Đurđević P, Jurišić V, Mijatović Lj. Opšta patološka fiziologija. Medicinski fakultet Kragujevac, Kragujevac. 2002.
16. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. Harisonova načela interne medicine. Bard-Fin, Romanov. 2004.

17. Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*. 2015;9(6):XE01-XE05.
18. Warburg OH. *The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology*, Arnold Constable, London UK. 1930.
19. Hanahan D, Weinberg A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144:646-674.
20. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev*. 2009; 23:537–548.
21. Voltaggio L, Cimino-Mathews A, Bishop JA, Argani P, Cuda JD, Epstein JI, Hruban RH, Netto GJ, Stoler MH, Taube JM, Vang R, Westra WH, Montgomery EA. Current concepts in the diagnosis and pathobiology of intraepithelial neoplasia: A review by organ system. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(5):408-36.
22. Waldum HL, Sandvik AK, Brenna E, Fossmark R, Qvigstad G, Soga J. Classification of tumours. *J Exp Clin Cancer Res*. 2008;27:70.
23. Shim J, Brindle L, Simon M, George S. A systematic review of symptomatic diagnosis of lung cancer. *Fam Pract*. 2014;31(2):137-48.
24. Polanski J, Jankowska-Polanska B, Rosinczuk J, Chabowski M, Szymanska-Chabowska A. Quality of life of patients with lung cancer. *Onco Targets Ther*. 2016;29;9:1023-8.
25. Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer*. 2003;41(3):245-58.
26. Manojlović D. *Interna medicina*. Zavod za udžbenike, Beograd. 1998.
27. Miller YE. Pathogenesis of Lung Cancer: 100 Year Report. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;33(3):216-23.
28. Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signaling pathways: roadmap for therapies. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2009; 33(6): 1485-1497.
29. Hamilton W, Peters TJ, Round A, Sharp D. What are the clinical features of lung cancer before the diagnosis is made? A population based case control study. *Thorax*. 2005;60(12):1059-65.

30. Popper HH. Progression and metastasis of lung cancer. *Cancer Metastasis Reviews*. 2016;35:75-91.
31. Tamura T, Kurishima K, Nakazawa K, et al. Specific organ metastases and survival in metastatic non-small-cell lung cancer. *Molecular and Clinical Oncology*. 2015;3(1): 217-221.
32. Andolfi M, Potenza R, Capozzi R, Liparulo V, Puma F, Yasufuku K. The role of bronchoscopy in the diagnosis of early lung cancer: a review. *Journal of Thoracic Disease*. 2016;8(11):3329-37.
33. Assi HA, Khoury KE, Dbouk H, Khalil LE, Mouhieddine TH, El Saghir NS. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. *Journal of Thoracic Disease*. 2013;5(Suppl 1):S2-S8.
34. DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(6):409-18.
35. Boyle P, Howell A. The globalisation of breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*. 2010;12(Suppl 4):S7.
36. Shah R, Rosso K, Nathanson SD. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3): 283-98.
37. Teng L, Zheng Y, Wang H. BRCA1/2 associated hereditary breast cancer. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2008;9(2): 85-89.
38. Lukong KE. Understanding breast cancer - The long and winding road. *BBA Clin*. 2017;7:64-77.
39. Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer*. 1990;46(5): 796-800.
40. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev*. 1993;15(1):36-47.
41. Ferrini K, Ghelfi F, Mannucci R, Titta L. Lifestyle, nutrition and breast cancer: facts and presumptions for consideration. *ecancermedicalsecience*. 2015;9:557.
42. Chlebowski RT. Nutrition and physical activity influence on breast cancer incidence and outcome. *Breast*. 2013;22 Suppl 2:S30-7.

43. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau ME, Koo J, Madarnas Y, Hartwick W, Hoffman B, Hood N. Fasting insulin and outcome in early-stage breast cancer: results of a prospective cohort study. *J Clin Oncol.* 2002;20(1):42-51.
44. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, van Gils CH, Khaw KT, et al. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 2004;111(5):762-71.
45. Maksimović Z. Hirurgija za studente medicine i lekare. Medicinski fakultet Beograd, Beograd. 2008.
46. Peralta-Zaragoza O, Bermúdez-Morales VH, Pérez-Plasencia C, Salazar-León J, Gómez-Cerón C, Madrid-Marina V. Targeted treatments for cervical cancer: a review. *OncoTargets and therapy.* 2012;5:315-328.
47. zur Hausen H. Papillomaviruses. To vaccination and beyond. *Biochemistry (Moscow).* 2008;73(5):498-503.
48. Ibeanu OA. Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biol Ther.* 2011;11(3):295-306.
49. Burd EM. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews.* 2003;16(1):1-17.
50. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology.* 2009;384(2):335-44.
51. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology.* 2009;384(2):324-34.
52. Papanicolaou GN. A survey of the actualities and potentialities of exfoliative cytology in cancer diagnosis. *Ann Intern Med.* 1949;31(4):661-74.
53. <https://www.cancer.gov/types/cervical/pap-hpv-testing-fact-sheet>
54. Plećaš D, Stanimirović B, Stanković A, Vasiljević M. Ginekologija i akušerstvo: udžbenik za studente medicine. CIBID, Beograd. 2014.
55. Bristow IR, de Berker DA, Acland KM, Turner RJ, Bowling J. Clinical guidelines for the recognition of melanoma of the foot and nail unit. *J Foot Ankle Res.* 2010;3:25.
56. Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol.* 2004;150(2):179-85.



57. Brandão FV, Pereira AF, Gontijo B, Bittencourt FV. Epidemiological aspects of melanoma at a university hospital dermatology center over a period of 20 years. *An Bras Dermatol.* 2013;88(3):344-53.
58. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, Grob JJ, et al.; European Dermatology Forum (EDF).; European Association of Dermato-Oncology (EADO).; European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. *Eur J Cancer.* 2016; 63: 201-17.
59. Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res.* 2003;16(3):297-306.
60. Chang JW, Yeh KY, Wang CH, Yang TS, Chiang HF, Wei FC, Kuo TT, Yang CH. Malignant melanoma in Taiwan: a prognostic study of 181 cases. *Melanoma Res.* 2004;14(6):537-41.
61. Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment cell & melanoma research.* 2011;24(5): 879-897.
62. Barnes BC, Seigler HF, Saxby TS, Kocher MS, Harrelson JM. Melanoma of the foot. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76(6):892-8.
63. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(6):345-58.
64. Maverakis E, Cornelius LA, Bowen GM, Phan T, Patel FB, Fitzmaurice S, et al. Metastatic melanoma - a review of current and future treatment options. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(5):516-24.
65. Niu N, Wang L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics.* 2015;16(3):273-285.
66. Gillet JP, Varma S, Gottesman M. The Clinical Relevance of Cancer Cell Lines. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(7):452-458.
67. López-Lázaro M. Two preclinical tests to evaluate anticancer activity and to help validate drug candidates for clinical trials. *Oncoscience.* 2015;2(2):91-98.

68. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.* 2003;36(3):165-75.
69. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukariotic cells; *Infection and Immunity* 2005;73(4):1907-1916.
70. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
71. Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K. Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circ Res.* 2008;103(4):343-51.
72. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell.* 1995;82(3):349-52.
73. Cohen GM, Sun XM, Fearnhead H, MacFarlane M, Brown DG, Snowden RT, Dinsdale D. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J Immunol.* 1994;153(2):507-16.
74. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 2012;45(6):487-98
75. Wang A, Dean D. Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases: Molecular Mechanisms. *JAMA.* 2007;298(18):2203-04
76. Lawen A. Apoptosis-an introduction. *Bioessays.* 2003;25(9):888-96.
77. Chamond RR, Añón JC, Aguilar CM, Pasadas FG. Apoptosis and disease. *Alergol Inmunol Clin.* 1999;14(6):367-374.
78. Singh N. Apoptosis in health and disease and modulation of apoptosis for therapy: An overview. *Indian J Clin Biochem.* 2007;22(2):6-16.
79. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
80. Zhao H. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review in "Apoptosis and Medicine". InTech, Rijeka, Croatia. 2012.
81. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 2007;26(9):1324-37.
82. Billard C. Design of novel BH3 mimetics for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2012;26(9):2032-8.

83. Hussain SR, Cheney CM, Johnson AJ, Lin TS, Grever MR, Caligiuri MA, Lucas DM, Byrd JC. Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2007;13(7):2144-50.
84. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C45-51.
85. Orrenius S, Zhivotovsky B. Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free. *Nat Chem Biol.* 2005;1(4):188-9.
86. Wen X, Lin ZQ, Liu B, Wei YQ. Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2012;45(3):217-24.
87. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a008656.
88. Si Ming M, Thirumala-Devi K. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nature Reviews Immunology.* 2016;16:7–21.
89. Reimann M, Schmitt CA. Molecular Basis in Disease Therapy in “Apoptosis, Cell Signaling and Human Diseases: Molecular Mechanisms. Volume 1”. Humana Press Inc., New York, USA. 2007.
90. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006;25(34):4798-811.
91. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:295-312.
92. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* 2013;140(15): 3079-93.
93. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003;36(3):131-49.
94. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RAM. Control of cell cycle transcription during  $G_1$  and S phases. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2013;14(8):518-28.
95. Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(5):297-306.
96. Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(11):785-97.

97. Dowdy S, Kaulich M. Cyclin D: Cdk4/6 activates RB by mono-phosphorylation during early *G<sub>1</sub>* phase. *Cancer Research*. 2014;74(19):1304-1304.
98. Jung H, Hsiung B, Pestal K, Procyk E, Raulet D. RAE-1 ligands for the NKG<sub>2</sub>D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(13):2409-22.
99. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*. 2003;36(3):165-75.
100. Foster DA, Yellen P, Xu L, Saqcena M. Regulation of *G<sub>1</sub>* Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). Gelman IH, Sudol M, eds. *Genes & Cancer*. 2010;1(11):1124-1131.
101. Greinert R, Volkmer B, Henning S, Breitbart EW, Greulich KO, Cardoso MC, Rapp A. UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic acids research*. 2012;40(20):10263-73.
102. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(3):a026104.
103. Chen A, Huang X, Xue Z, et al. The Role of p21 in Apoptosis, Proliferation, Cell Cycle Arrest, and Antioxidant Activity in UVB-Irradiated Human HaCaT Keratinocytes. *Medical Science Monitor Basic Research*. 2015;21:86-95.
104. Lu M, Boschetti C, Tunnacliffe A. Long term aggresome accumulation leads to dna damage, p53-dependent cell cycle arrest, and steric interference in mitosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(46):27986-28000.
105. Petrović M, Todorović D. Apoptoza i ćelijski ciklus. *Racionalna terapija*. 2014;6(1):21-32.
106. Yhang J, Wan L, North B, Inuzuka H, Wei W. The role od APC E3 Ubiquitin ligase complex in tumorigenesis. Springer, New York, USA. 2014.
107. Porter LA, Donoghue DJ. Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Prog Cell Cycle Res*. 2003;5:335-47.
108. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol*. 2012;226(2):352-64.
109. Janković S. Farmakologija i toksikologija. Medicinski Fakultet Kragujevac, Kragujevac. 2003.

110. Masui K, Gini B, Wykosky J, et al. A tale of two approaches: complementary mechanisms of cytotoxic and targeted therapy resistance may inform next-generation cancer treatments. *Carcinogenesis*. 2013;34(4):725-738.
111. Abdulkareem IH, Zurmi IB. Review of hormonal treatment of breast cancer. *Niger J Clin Pract*. 2012;15(1):9-14.
112. Recine F, Sternberg CN. Hormonal therapy and chemotherapy in hormone-naive and castration resistant prostate cancer. *Transl Androl Urol*. 2015 Jun;4(3):355-64.
113. Oronsky BT, Reid T, Knox SJ, Scicinski JJ. The Scarlet Letter of Alkylation: A Mini Review of Selective Alkylating Agents. *Translational Oncology*. 2012;5(4):226-229.
114. Ndagi U, Mhlongo N, Soliman ME. Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:599-616.
115. Chohan ZH, Arif M, Akhtar MA, Supuran CT. Metal-Based Antibacterial and Antifungal Agents: Synthesis, Characterization, and In Vitro Biological Evaluation of Co(II), Cu(II), Ni(II), and Zn(II) Complexes With Amino Acid-Derived Compounds. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2006;2006:83131.
116. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*. 2014;0:364-378.
117. Lippert B. *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA. 2006.
118. <https://www.drugs.com/monograph/cisplatin.html>
119. Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol*. 2008;6(1):1-18.
120. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park)*. 2009;23(6):488-96.
121. Frezza M, Hindo S, Chen D, Davenport A, Schmitt S, Tomco D, Dou QP. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr Pharm Des*. 2010;16(16):1813-25.
122. Monneret C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. *Ann Pharm Fr*. 2011;69(6):286-95.
123. Motswainyana M, Ajibade P. Anticancer activities of mononuclear ruthenium (II) coordination complexes. *Advances in Chemistry*. 2015;(2015):859730.

124. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs. *Chem Rev.* 2016;116(5):3436-86
125. Mehmood RK. Review of Cisplatin and oxaliplatin in current immunogenic and monoclonal antibody treatments. *Oncol Rev.* 2014 23;8(2):256.
126. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids.* 2010;(2010):201367.
127. Nagai N, Okuda R, Kinoshita M, Ogata H. Decomposition kinetics of cisplatin in human biological fluids. *J Pharm Pharmacol.* 1996;48:918-24.
128. Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol.* 2008;6(1):1-18.
129. Ozkok A, Edelstein CL. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biomed Res Int.* 2014;2014:967826.
130. Shen D-W, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. Sibley DR, ed. *Pharmacological Reviews.* 2012;64(3):706-721.
131. Lazić D, Arsenijević A, Puchta R, Bugarčić ŽD, Rilak A. DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium (II) terpyridine complexes. *Dalton Trans.* 2016;45(11):4633-46.
132. Jakupec MA, Galanski M, Arion VB, Hartinger CG, Keppler BK. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Trans.* 2008;(2):183-94.
133. Griffith D, Cecco S, Zangrando E, Bergamo A, Sava G, Marmion JC. Ruthenium (III) dimethyl sulfoxide pyridinehydroxamic acid complexes as potential antimetastatic agents: synthesis, characterisation and in vitro pharmacological evaluation. *J Biol Inorg Chem.* 2008;13(4):511–20.
134. Antonarakis ES, Emadi A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;66(1):1-9.
135. Bratsos I, Jedner S, Gianferrara T, Alessio E. Ruthenium Anticancer Compounds: Challenges and Expectations. *CHIMIA International Journal for Chemistry.* 2007;61(11):692–697.

136. Kumar P, Gupta RK, Pandey DS. Half-sandwich arene ruthenium complexes: synthetic strategies and relevance in catalysis. *Chem Soc Rev.* 2014;43(2):707-33.
137. Gopal YN, Jayaraju D, Kondapi AK. Inhibition of topoisomerase II catalytic activity by two ruthenium compounds: a ligand-dependent mode of action. *Biochemistry.* 1999;38(14):4382-8.
138. Silvestru C. *Metal complexes in cancer chemotherapy.* John Wiley and Sons, Ltd. Hoboken, USA. 1994.
139. Lazarević T, Rilak A, Bugarčić ŽD. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur J Med Chem.* 2017. pii: S0223-5234(17)30262-3.
140. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63.
141. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995; 184(1): 39-51.
142. Shirali S, Aghaei M, Shabani M, Fathi M, Sohrabi M, Moeinifard M. Adenosine induces cell cycle arrest and apoptosis via cyclinD1/Cdk4 and Bcl-2/Bax pathways in human ovarian cancer cell line OVCAR-3. *Tumor Biology.* 2013; 34(2):1085-1095.
143. Loos C, Syrovets T, Mysyanovych A, Mailänder V, Landfester K, Simmet T. Amino-functionalized nanoparticles as inhibitors of mTOR and inducers of cell cycle arrest in leukemia cells. *Biomaterials.* 2014; 35(6):1944-1953
144. Cicala C, Arthos J, Rubbert A, Selig S, Wildt K, Cohen OJ, Fauci AS. HIV-1 envelope induces activation of caspase-3 and cleavage of focal adhesion kinase in primary human CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(3):1178-83.
145. Waterhouse NJ, Trapani JA. A new quantitative assay for cytochrome c release in apoptotic cells. *Cell Death Differ.* 2003;10(7):853-5.
146. Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, Maurillo L, Buccisano F, Tamburini A, et al., Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood.* 2003;101(6):2125-31.
147. Liu SH, Zhao JH, Deng KK, Wu Y, Zhu JW, Liu QH, Xu HH, Wu HF, Li XY, Wang JW, Guo QF. Effect of radiation on cytotoxicity, apoptosis and cell cycle arrest of human

- osteosarcoma MG-63 induced by a ruthenium (II) complex. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015;140:202-9.
148. Lai SH, Li W, Wang XZ, Zhang C, Zeng CC, Tang B, Wan D, Liu YJ. Apoptosis, autophagy, cell cycle arrest, cell invasion and BSA-binding studies in vitro of ruthenium (II) polypyridyl complexes. *RSC Advances*. 2016;6(68):63143-55.
149. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2006;1757(5):639-47.
150. Gogvadze V, Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chemico-biological interactions*. 2006;163(1):4-14.
151. Sprance HE, Hempling RE, Piver MS. Leukemia following cisplatin-based chemotherapy for ovarian carcinoma at Roswell Park. *European journal of gynaecological oncology*. 1991;13(2):131-7.
152. Shimura K, Shimazaki C, Okano A, Hatsuse M, Okamoto A, Takahashi R, Hirai H, Sumikuma T, Ashihara E, Inaba T, Fujita N. Therapy-related myeloid leukemia following platinum-based chemotherapy for ovarian cancer. [*Rinsho ketsueki*] *The Japanese journal of clinical hematology*. 2001;42(2):99-103.
153. Jeyalakshmi K, Haribabu J, Balachandran C, Bhuvanesh NS, Emi N, Karvembu R. Synthesis of Ru (ii)-benzene complexes containing aroylthiourea ligands, and their binding with biomolecules and in vitro cytotoxicity through apoptosis. *New Journal of Chemistry*. 2017;41(7):2672-86.
154. Luo Z, Yu L, Yang F, Zhao Z, Yu B, Lai H, Wong KH, Ngai SM, Zheng W, Chen T. Ruthenium polypyridyl complexes as inducer of ROS-mediated apoptosis in cancer cells by targeting thioredoxin reductase. *Metallomics*. 2014;6(8):1480-90.
155. Han BJ, Jiang GB, Wang J, Li W, Huang HL, Liu YJ. The studies on bioactivity in vitro of ruthenium (II) polypyridyl complexes towards human lung carcinoma A549 cells. *RSC Advances*. 2014;4(77):40899-906.
156. Lazić D, Arsenijević A, Puchta R, Bugarčić ŽD, Rilak A. DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium (II) terpyridine complexes. *Dalton Transactions*. 2016;45(11):4633-46.



157. Iida J, Bell-Loncella ET, Purazo ML, Lu Y, Dorchak J, Clancy R, Slavik J, Cutler ML, Shriver CD. Inhibition of cancer cell growth by ruthenium complexes. *Journal of translational medicine*. 2016;14(1):48.
158. Deng Z, Gao P, Yu L, Ma B, You Y, Chan L, Mei C, Chen T. Ruthenium complexes with phenylterpyridine derivatives target cell membrane and trigger death receptors-mediated apoptosis in cancer cells. *Biomaterials*. 2017;129:111-26.
159. Subarkhan MK, Ramesh R, Liu Y. Synthesis and molecular structure of arene ruthenium (II) benzhydrazone complexes: impact of substitution at the chelating ligand and arene moiety on antiproliferative activity. *New Journal of Chemistry*. 2016;40(11):9813-23.
160. Liao G, Chen X, Wu J, Qian C, Wang Y, Ji L, Chao H. Ruthenium (ii) polypyridyl complexes as dual inhibitors of telomerase and topoisomerase. *Dalton Transactions*. 2015;44(34):15145-56.
161. Jiang GB, Yao JH, Wang J, Li W, Han BJ, Xie YY, Lin GJ, Huang HL, Liu YJ. The induction of apoptosis in BEL-7402 cells through the ROS-mediated mitochondrial pathway by a ruthenium (II) polypyridyl complex. *New Journal of Chemistry*. 2014;38(6):2554-63.
162. Zhao Z, Luo Z, Wu Q, Zheng W, Feng Y, Chen T. Mixed-ligand ruthenium polypyridyl complexes as apoptosis inducers in cancer cells, the cellular translocation and the important role of ROS-mediated signaling. *Dalton Transactions*. 2014;43(45):17017-28.
163. Milutinović MM, Rilak A, Bratsos I, Klisurić O, Vraneš M, Gligorijević N, Radulović S, Bugarčić ŽD. New 4'-(4-chlorophenyl)-2, 2': 6', 2''-terpyridine ruthenium (II) complexes: synthesis, characterization, interaction with DNA/BSA and cytotoxicity studies. *Journal of inorganic biochemistry*. 2017;169:1-2.
164. Mazuryk O, Suzenet F, Kieda C, Brindell M. The biological effect of the nitroimidazole derivative of a polypyridyl ruthenium complex on cancer and endothelial cells. *Metallomics*. 2015;7(3):553-66.

## 8. Прилог

### 8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ**

**Редни број:**  
РБ

**Идентификациони број:**  
ИБР

**Тип документације:** Монографска публикација  
ТД

**Тип записа:** Текстуални штампани материјал  
ТЗ

**Врста рада:** Докторска дисертација  
ВР

**Аутор:** Петар Чановић  
АУ

**Ментор/коментор:** др сци. мед. Иванка Зелен, ванредни професор  
МН

**Наслов рада:** Антитуморски ефекат новосинтетисаних  
НР комплекса рутенијума(II) на туморске  
ћелије *in vitro*

**Језик публикације:** српски/ћирилица  
**ЈП**

**Језик извода:** српски/енглески  
**ЈИ**

**Земља публиковања:** Србија  
**ЗП**

**Уже географско подручје:** Централна Србија  
**УГП**

**Година:** 2017.  
**ГО**

**Издавач:** Ауторски репринт  
**ИЗ**

**Место и адреса:** 34000 Крагујевац, Светозара Марковића 69  
**МС**

**Физичи опис рада:** 136 страна, 3 слике, 26 графикана, 4  
**ФО** табеле

**Научна област:** Медицина

**Научна дисциплина:** Клиничка и експериментална биохемија  
**ДИ**

**Предметна одредница/ кључне речи:** комплекси рутенијума (II), антитуморски  
**ПО** ефекат, цитотоксичност, апоптоза

**УДК**

**Чува се:** У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу  
**ЧУ**

## Важна напомена:

МН

## Извод:

### ИД

Упркос успеху у лечењу различитих врста тумора, клиничка ефикасност цисплатине је веома ограничена развијањем резистенције тумора на лек. Комплекси рутенијума као антитуморски агенси највише обећавају, показујући цитотоксичну активност код тумора резистентних на цисплатину. Сматра се да ове особине једињења рутенијума потичу од њихове способности да имитирају начин везивања гвожђа за биомолекуле као што су хумани серум албумин и трансферин. Будући да туморске ћелије на својим мембранама повећано експримирају трансферинске рецепторе због повећане потребе за гвожђем, допремање комплекса рутенијума до канцерских ћелија је ефикасније у односу на друге комплексе метала.

Студија се бавила испитивањем потенцијалне цитотоксичности два новосинтетисана комплекса рутенијума: *Ru-1*, [Ru(Cl-Ph-tpy)(*o*-pda)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, *o*-pda = *o*-fenilendiamin) и *Ru-2*, [Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)Cl]Cl(Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, phen = 1,10-fenantrolin) на следећим туморским ћелијама: *A549* – аденокарцином плућа, *MCF7* – карцином дојке, *HeLa* – карцином цервикса, *Hs 294T* – малигни меланом и на ћелијској линији здравих фибробласта *MRC-5* (контрола).

Цитотоксичност комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* на туморским и контролним, здравим ћелијама је одређивана МТТ методом. Тип ћелијске смрти као и релативни однос некротичне и апоптотичне смрти туморских ћелија изазване тестирањем комплексима испитиван је методом проточне цитометрије ћелија бојених *Annexin-ом V* и 7-аминоактиномицином *D*. Фазе ћелијског циклуса су одређиване методом бојења пропидијум-јодидом. Активација и локализација кључних протеина укључених у процес апоптозе је одређена проточном цитометријом бојењем специфичним антителима.

Цитотоксичност комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* је испитана на четири туморске ћелијске линије (*A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs294T*) и на здравим фибробластима (*MRC-5*). Наши резултати су јасно показали значајно смањење вијабилности туморских ћелија. Такође, оба комплекса рутенијума снажно индуковала апоптозу третираних ћелија са високим процентом апоптотских ћелија и занемарљивим процентом некротичних ћелија.

Комплекси рутенијума(II) показују селективну антитуморску активност која је, у неким случајевима, и већа него цитотоксична активност цисплатине. Комплекси *Ru-1* и *Ru-2* готово да нису имали ефекта на вијабилност фибробласта. Прецизни механизам деловања комплекса рутенијума(II) није у потпуности разјашњен. Међутим, показано је да оба комплекса смањују вијабилност туморских ћелија индукцијом апоптозе и заустављањем ћелијског циклуса у одређеној фази.

**Датум прихватања теме од стране ННВ:**

29.12.2016.

**ДП**

**Датум одбране:**

**ДО**

**Чланови комисије:**

**КО**

1. **проф. др Марина Митровић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Биохемија*, председник;
2. **проф. др Владислав Воларевић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, члан;
3. **проф. др Марија Миловановић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, члан;
4. **доц. др Соња Мисирлић Денчић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Медицинска и клиничка биохемија*, члан;
5. **доц. др Маријана Станојевић Пирковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Биохемија*, члан.

## 8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

**Accession number:**

ANO

**Identification number:**

INO

**Documentation type:**

DT

Monographic publication

**Type of record:**

TR

Printed textual material

**Contents code:**

CC

PhD Thesis

**Author:**

AU

Petar Čanović

**Menthor/co-mentor**

MN

prof. dr Ivanka Zelen, MD, PhD

**Title:**

TI

Antitumor effects of newly synthesized ruthenium(II)  
complexes against cancer cells *in vitro*

**Language of text:**

LT

Serbian (cyrilic)

**Language of abstract:**

**Country of publication:**

CP

Serbian/English  
Republic of Serbia

**Locality of publication:**

LP

Central Serbia

**Publication year:** 2017.  
**PY**

**Publisher:** Author's reprint  
**PU**

**Publication place:** Faculty of Medical Sciences, University  
of Kragujevac, Street Svetozara  
Markovica 69, 34000 Kragujevac  
**PP**

**Physical description:** 136 pages, 3 images, 26 figures, 4 tables  
**PD**

**Scientific field:** Medicine  
**SF**

**Scientific discipline:** Clinical and Experimental Biochemistry  
**SD**

**Subject/key words:** ruthenium(II) complexes, antitumor effects, citotoxicity, apoptosis  
**SKW**

**UDC**

**Holding data:** Library of Faculty of Medical Sciences,  
University of Kragujevac, Republic of Serbia

**Note:**  
**N**

**Abstract:****AB**

Ruthenium complexes might be very promising candidates as antitumor agents, showing activity in tumors which had developed resistance to cisplatin or in which cisplatin is inactive. This is believed to be due to the ability of ruthenium to mimic iron in binding to biomolecules, such as human serum albumin and transferrin. As cancer cells overexpress transferrin receptors, to satisfy their increased demand for iron, ruthenium-based drugs may be delivered more efficiently to cancer cells compared to other metal-based drugs.

The aim of our study was to investigate antitumor effect and the mechanism of action of two newly synthesized ruthenium complexes: Ru-1, [Ru(Cl-Ph-tpy)(*o*-pda)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-chlorophenyl)-2,2',6',2''-terpyridin, *o*-pda = *o*-phenylenediamin) and Ru-2, [Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-chlorophenyl)-2,2',6',2''-terpyridin, phen = 1,10-phenanthroline) against human cancer cell lines: A549 - lung cancer, MCF-7 - breast cancer, HeLa - cervical cancer, Hs 294T- melanoma and one non-cancerous cell line MRC-5 - healthy fibroblasts (control).

The cytotoxicity of two newly synthesized Ru(II) polypyridyl complexes Ru-1 and Ru-2 on experimental and control group of cells was determined by the MTT assay. Apoptosis of both control and experimental group of tumor cells was estimated by annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/7-amino-actinomycin D (7-AAD) staining. The cell cycle distribution was determined using propidium iodide staining. The localization and activation of key apoptotic proteins (bax, bcl-2, cytochrome c and caspase-3) was determined by flow-cytometry.

The cytotoxicity of two ruthenium(II) complexes 1 and 2 was evaluated in four human cancer cell lines (A549, MCF7, HeLa and Hs294T) and in one non-cancer cell line (MRC-5). Our results clearly showed significant decrease of cancer cells' viability compared to the viability of control, non-cancerous cells, with specific individual cell lines sensitivities. Both ruthenium complexes strongly induced apoptosis of treated cancer cells via intrinsic or mitochondrial pathway, with high percentages of apoptotic cells and negligible percentage of necrotic cells making these compounds suitable for further anticancer evaluation.

The newly synthesized ruthenium(II) complexes 1 and 2 showed selective anticancer activity against different types of cancer cells. In some cases, their activity is even higher than that of cisplatin in the same cells. Moreover, it is very important to delineate that these complexes had almost no effect in tested concentrations on viability of healthy cells *in vitro*. The precise mechanism of action of investigated ruthenium(II) complexes is not fully understood. However, our results showed that both complexes decreased viability of cancer cells by induction of apoptosis and/or by cell cycle arrest which implies their different mechanism of action on different types of cancer cells.



**Accepted by the Scientific Board on:**  
**ASB**

29.12.2016.

**Defended on:**  
**DE**

**Thesis defended board**  
**(Degree/name/surname/title/faculty)**  
**DB**

1. **Associate Professor, Marina Mitrović**, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, Chairman;
2. **Associate Professor, Vladislav Volarević**, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, member;
3. **Associate Professor, Marija Milovanović**, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, member;
4. **Assistant professor, Sonja Misirlić Denčić**, Medical Faculty, University of Belgrade, member;
5. **Assistant professor, Marijana Stanojević Pirković**, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, member.

## БИОГРАФИЈА

Др Петар Чановић је рођен 02.11.1989. године у Крагујевцу. Завршио је основну школу „21. Октобар“ 2004. године. Средњу медицинску школу „Сестре Нинковић“ завршио је 2008. године. Дипломирао је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу у јулу 2014. године са просечном оценом 9,46. Од новембра 2014. године изабран је у звање сарадник у настави за ужу научну област Биохемија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Школске 2014/15. године уписао је Академске докторске студије, смер Клиничка и експериментална биохемија, на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Усмени докторски испит положио је 2016. године са оценом 10. Од 7.09.2016. године је изабран у звање асистента за ужу научну област Биохемија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

## БИБЛИОГРАФИЈА

### **M20: M21 (1), M22 (1), M23 (1) - 3 рада**

1. **Čanović P**, Simović AR, Radisavljević S, Bratsos I, Demitri N, Mitrović M, Zelen I, Bugarčić ŽD. Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes: synthesis, structure, DNA/protein binding, lipophilicity and anticancer activity. *J Biol Inorg Chem*. 2017 Jul 10. doi:10.1007/s00775-017-1479-7. **(ПОТРЕБАН УСЛОВ). M21, IF=2,894**
2. Nikolic I, Andjelkovic M, Zaric M, Zelen I, Canovic P, Milosavljevic Z, Mitrovic M. Induction of mitochondrial apoptotic pathway by raloxifene and estrogen in human endometrial stromal ThESC cell line. *Arch Med Sci*. doi: 10.5114/aoms.2016.59874. **M22, IF=1,812**
3. Andjelkovic M, Jankovic S, Mitrovic M, Mladenovic V, Nikolic I, Zelen I, Zaric M, **Canovic P**, Folic M. Effects of cardiovascular drugs on TSH serum levels in patients on replacement therapy after thyroidectomy. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2016; 54(8): 628-33. doi: 10.5414/CP202606. **M23, IF=1,129**

### **M50: M51 (2), M52 (1), M53 (1) - 4 рада**

1. Rakovic I, Popovska Jovicic B, Bukonjic A, Petrovic S, Canovic P, Hamzagic N. The analysis of risk factors and clinical-demographic characteristics of patients with clostridium difficile infection as well as the outcome of their treatment. *Ser J Exp Clin Res* 2016; 17 (2): 139-43. **M51**
2. Canović P, Vranic A, Petrovic S, Rakovic I, Popovska Jovicic B, Hamzagic N. Analysis of clinical, haematological and biochemical parameters in patients with infectious mononucleosis. *Ser j exp clin res* 2015; 16 (4): 291-95. **M51**
3. Petrović D, Čanović P, Mijailović Ž, Popovska Jovičić B, Jačović S. Hemolitičko-uremijski sindrom: etiopatogeneza, dijagnostika i osnovni principi lečenja. *Med J (Krag)* 2015; 49(2): 59-65. **M52**
4. Petrović D, Čanović P, Mijailović Ž, Popovski Jovičić B. Hepatitis C i bolesti bubrega, etiopatogeneza, dijagnostika i lečenje. *Apollineum Medicum et esculapium*. 2015; 2: 43 – 51. **M53**

**Образац 1**

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Петар Чановић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Антигуморски ефекат новосинтетисаних комплекса рутенијума(II) на туморске ћелије in vitro

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

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

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

У Крагујевцу, 14.11.2017. године,

\_\_\_\_\_

потпис аутора

Образац 2

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Петар Чановић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Антитуморски ефекат новосинтетисаних комплекса рутенијума(II) на  
туморске ћелије in vitro

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

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

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

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 14.11.2017. године,

---

потпис аутора

---

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

Рад "*Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes: synthesis, structure, DNA/protein binding, lipophilicity and anticancer activity*", услов за пријаву завршене докторске дисертације - рад из теме докторске дисертације, у којем сам први аутор, објављен је у часопису *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, на *SCI* листи, импакт фактор  $IF(2016)= 2,894$ .

## Impact of aromaticity on anticancer activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes: synthesis, structure, DNA/protein binding, lipophilicity and anticancer activity

Petar Čanović<sup>1</sup> · Ana Rilak Simović<sup>2</sup> · Snežana Radsavljević<sup>2</sup> · Ioannis Bratsos<sup>3</sup> · Nicola Demitri<sup>4</sup> · Marina Mitrović<sup>1</sup> · Ivanka Zelen<sup>1</sup> · Živadín D. Bugarčić<sup>2</sup>

Received: 9 May 2017 / Accepted: 24 June 2017 / Published online: 10 July 2017  
© SBIC 2017

**Abstract** With the aim of assessing how the aromaticity of the inert chelating ligand can influence the activity of ruthenium(II) polypyridyl complexes, two new monofunctional ruthenium(II) complexes, [Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)Cl]Cl (**1**) and [Ru(Cl-Ph-tpy)(*o*-bqdi)Cl]Cl (**2**) (where Cl-Ph-tpy = 4'-(4-chlorophenyl)-2,2':6',2''-terpyridine, phen = 1,10-phenanthroline, *o*-bqdi = *o*-benzoquinonediimine), were synthesized. All complexes were fully characterized by elemental analysis and spectroscopic techniques (IR, UV-Vis, 1D and 2D NMR, XRD). Their chemical behavior in aqueous solution was studied by UV-Vis and NMR spectroscopy showing that both compounds are relatively labile leading to the formation of the corresponding aqua species **1a** and **2a**. <sup>1</sup>H NMR spectroscopy studies performed on complexes **1** and **2** demonstrated that after the hydrolysis of the Cl ligand, they are capable to interact with

guanine derivatives (i.e., 9-methylguanine (9MeG) and 5'-GMP) through the N7, forming monofunctional adduct. The kinetics and the mechanism of the reaction of complexes **1** and **2** with the biologically more relevant 5'-GMP ligand were studied by UV-Vis spectroscopy. DNA/protein interactions of the complexes have been examined by photophysical studies, which demonstrated a bifunctional binding mode of the complexes with DNA and the complexes strongly quench the fluorescence intensity of bovine serum albumin (BSA) through the mechanism of both static and dynamic quenching. Complexes **1** and **2** strongly induced apoptosis of treated cancer cells with high percentages of apoptotic cells and negligible percentage of necrotic cells. In addition, both ruthenium complexes decreased Bcl-2/Bax ratio causing cytochrome c mitochondrial release, the activation of caspase-3 and induction of apoptosis.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00775-017-1479-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ana Rilak Simović  
anarilak@kg.ac.rs

✉ Živadín D. Bugarčić  
bugarcic@kg.ac.rs

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

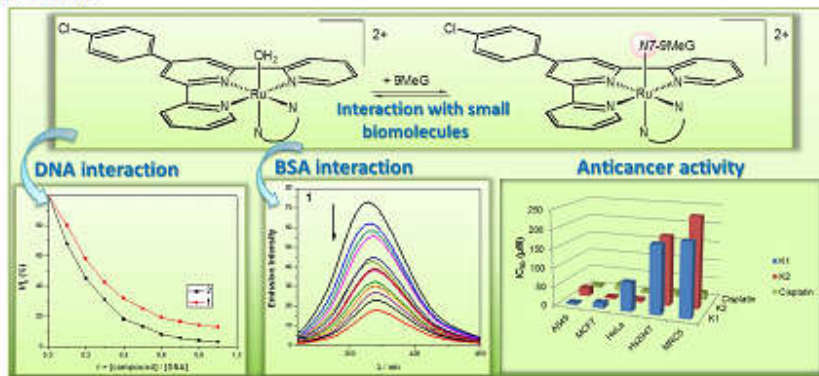
<sup>2</sup> Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, P. O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>3</sup> Department of Physical Chemistry, NCSR "Demokritos", I.N.N., 15310 Ag. Paraskevi, Athens, Greece

<sup>4</sup> Elettra, Sincrotrone Trieste, S.S. 14 km 163.5 in Area Science Park, 34149 Basovizza, Trieste, Italy



## Graphical Abstract



**Keywords** Ru complexes · DNA binding · Albumin binding · Anticancer activity · Apoptosis

## Abbreviations

Cl-Ph-tpy	4'-(4-chlorophenyl)-2,2':6',2''-terpyridine
Phen	1,10-phenanthroline
<i>o</i> -bqdi	<i>o</i> -benzoquinonediimine
9MeG	9-methylguanine
5'-GMP	guanosine-5'-monophosphate
BSA	Bovine serum albumin
en	1,2-diaminoethane
dach	1,2-diaminocyclohexane
bpy	2,2'-bipyridine
DNA	Deoxyribonucleic acid
tpy	2,2':6',2''-terpyridine
Cl-tpy	4'-chloro-2,2':6',2''-terpyridine
Cl-Ph-tpy	4'-(4-chlorophenyl)-2,2':6',2''-terpyridine
CT DNA	Calf thymus DNA
HT DNA	Herring testes DNA
HSA	Human serum albumin
Tf	Serum transferrin
dmpda	4,5-dimethyl- <i>o</i> -phenylenediamine
<i>s</i> -bqdi	Semi- <i>o</i> -benzoquinonediimine
EB	Ethidium bromide
A549	Human lung carcinoma
MCF-7	Breast carcinoma
HeLa	Epithelial cervical carcinoma
Hs294T	Melanoma
MRC-5	Human fetal lung fibroblast cells
PI	Propidium iodide
Et <sub>3</sub> N	Triethylamine
PBS	Phosphate buffered saline
FITC	V-fluorescein isothiocyanate
7-AAD	7-amino-actinomycin D

RNA	Ribonucleic acid
Bax	Active proapoptotic protein
Bcl-2	Antiapoptotic protein
Guo	Guanosine
Tu	Thiourea
L-Cys	L-Cysteine
L-Met	L-Methionine
Pz	Pyrazole
Tz	1,2,4-triazole
Py	Pyridine
SAR	Structure–activity relationship
QSAR	Quantitative structure–activity relationship

## Introduction

Ruthenium complexes as antitumor agents are very promising in the field of non-platinum complexes, showing activity in tumors which had developed resistance to cisplatin or in which cisplatin is inactive [1–5]. The unique properties of ruthenium-based drugs such as rich synthetic chemistry, range of oxidation states (Ru<sup>II</sup>, Ru<sup>III</sup> and Ru<sup>IV</sup>), slow ligand exchange rates, favourable water solubility and less toxicity than that of conventional platinum drugs justify the great expectations posed for ruthenium compounds [6–8].

Ruthenium compounds with polypyridyl ligands have emerged as leading candidates for use as anticancer agents [6, 9]. Considered as classical anticancer drugs, a large number of Ru(II) polypyridyl compounds have been screened for anticancer activity [6] and studied for their DNA-/protein-binding ability [10–12]. This research has provided confirmation that ruthenium complexes have multiple targets, and a combination of their actions contributes to their observed beneficial properties [11].

Recently, we reported the synthesis of a series of Ru(II) terpyridine compounds, with the general formula  $mer-[Ru(L_3)(N-N)(X)]Y_n$ , in which  $L_3$  is either 2,2':6',2''-terpyridine (tpy), 4'-chloro-2,2':6',2''-terpyridine (Cl-tpy) or 4'-(4-chlorophenyl)-2,2':6',2''-terpyridine (Cl-Ph-tpy);  $N-N$  is a bidentate chelating ligand (1,2-diaminoethane (en), 1,2-diaminocyclohexane (dach), 2,2'-bipyridine (bpy));  $X$  is a monodentate ligand (Cl or dmsO-S);  $Y$  is the counter anion ( $Cl^-$ ,  $PF_6^-$  or  $CF_3SO_3^-$ ), and  $n$  depends on the nature of chel and  $X$  [13–15]. These compounds, after the hydrolysis of the Cl ligand, form monofunctional adducts with N7 of guanine derivatives (i.e. 9-methylguanine (9MeG) or guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP)) with rates and extents that depended strongly on the nature of the chelating ligand [13–15]. We have studied their interactions with oligonucleotides, such as fully complementary 15-mer and 22-mer duplexes with a centrally located GG-binding site for DNA, and fully complementary 13-mer duplexes with centrally located GG-binding site for RNA, with calf thymus (CT) and herring testes (HT) DNA [16]. They bind strongly to DNA ( $K_b = 10^4$ – $10^5 M^{-1}$ ), both covalently and noncovalently, intercalating between base pairs [15]. We have demonstrated that the reactivity of these complexes to DNA and their efficiency to unwind closed, negatively supercoiled DNA are not in line with their biological activity [16]. These differences may play very important roles in their antitumor activity and could contribute to different mechanism for cytotoxicity compared to cisplatin. In addition, we have shown that there is a direct correlation between the lipophilicity of the aromatic ligand(s) and cytotoxicity [14–16].

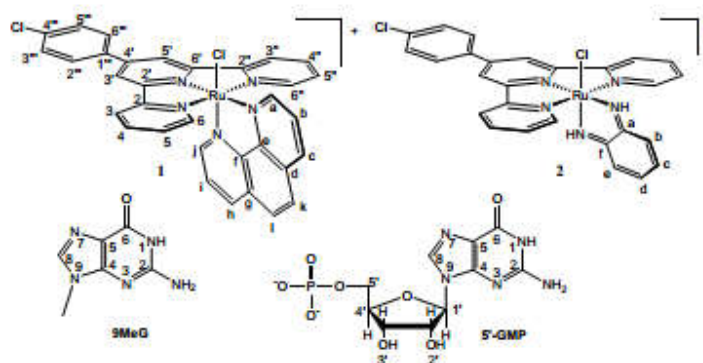
We have also examined whether these complexes bind to major metal-transporting proteins from human blood such as human serum albumin (HSA) and serum transferrin (Tf) [17]. Compared to Tf, HSA appears to be a more favourable binding partner for the studied ruthenium compounds.

The binding of the compounds to HSA and Tf did not affect secondary structures of the proteins much, whilst their tertiary structures showed some alterations. This finding is important, knowing that the native conformation of a transport protein should not be markedly altered upon binding a drug, because of the prevention of the protein to perform its normal actions (i.e., bind to cellular receptors and deliver the drug). Overall, our previous studies implied that both DNA and proteins are biological targets of the Ru(II) polypyridyl complexes.

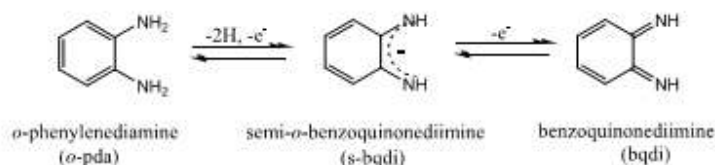
Perhaps, the most important finding from these works was how the nature of tridentate and bidentate ligands govern the mechanism of action of such complexes and as a consequence their activity. Among the Ru complex bearing either tpy or Cl-tpy (i.e., a tridentate ligand with three aromatic rings), the most potent were those that dissociate the monodentate ligand at a reasonable rate and the chelating ligand is able to form strong hydrogen bonds with guanine derivatives (e.g., en, dach), implying that the predominant mode of action of such complexes is the covalent binding to DNA. Conversely, when the tridentate ligand contained more aromatic rings (e.g., Cl-Ph-tpy), the complex with bpy as chelating ligand was found to be the most active, indicating that intercalation to DNA is the main mechanism of action.

In this study, we have investigated complexes in which the chelating ligand is either 1,10-phenanthroline (phen) or the redox active aromatic diamine ligand *o*-phenylenediamine (*o*-pda). Phen is a N donor chelating ligand—similar to bpy but with one more aromatic ring—unable to form hydrogen bonds, whereas *o*-pda, which is the aromatic counterpart of dach (i.e., phenyl instead of cyclohexane), is capable of making hydrogen bonds. Recent studies have confirmed that Ru(II) complexes containing phenanthroline-type ligands exhibit high antitumor activity [18–21], as a result of noncovalent interaction with DNA

**Fig. 1** Structures of complexes 1, 2, 9MeG and 5'-GMP, with the numbering scheme used for the NMR characterization



by intercalation through  $\pi$ - $\pi$  stacking and electrostatic interaction [22–24]. Phenanthrolines are polyheterocyclic organic compounds with some interesting biological features such as anticancer activity [25, 26] antibacterial, antifungal and antiviral potential [27]. Similarly, complexes with redox active aromatic diamine ligands (e.g., *o*-pda) also showed good antitumor activity [28–30]. Sadler et al. synthesized a series of Ru(II) arene complexes of the general formula  $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{XY})\text{Cl}]^+$  (XY = *o*-pda, *o*-benzoquinonediimine (*o*-bqdi), or 4,5-dimethyl-*o*-phenylenediamine (dmpda)), and studied for their anticancer activity [31]. The complex containing *o*-pda as chelating ligand showed the highest activity against A2780 human ovarian cells ( $\text{IC}_{50} = 11 \mu\text{M}$ ) [31]. Transition metal complexes with *o*-pda as chelating ligand are of particular interest because of their redox properties. Depending upon the conditions of the reaction, *o*-pda can complex in the following ways:



To gain more insight into the influence of chelating ligand's aromaticity on the anticancer activity of Ru(II) polypyridyl complexes, we synthesized two new Ru(II) complexes  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{phen})\text{Cl}]\text{Cl}$  (**1**) and  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{o-bqdi})\text{Cl}]\text{Cl}$  (**2**) (where phen = 1,10-phenanthroline and *o*-bqdi = *o*-benzoquinonediimine) (Fig. 1). The new complexes were fully characterized by elemental analysis and various spectroscopic techniques, such as IR, UV-Vis and (1D and 2D) NMR, whereas their molecular structure in solid state was determined by single crystal X-ray diffraction analysis. The interaction of complexes **1** and **2** with CT DNA was studied, and a competitive study of the intercalative agent ethidium bromide (EB) was performed. Furthermore, the affinity toward bovine serum albumin (BSA) was investigated, and their binding constants were determined. We report also the results of *in vitro* cytotoxicity tests performed on complexes **1** and **2** against four human cancer cell lines (human lung carcinoma (A549), breast carcinoma (MCF-7), epithelial cervical carcinoma (HeLa) and melanoma (Hs294T)), and one normal cell line (human fetal lung fibroblast cells (MRC-5)) in comparison with cisplatin. The apoptosis of studied cancer cells induced by Ru(II) complexes was studied. The cell cycle of A549, MCF-7, HeLa and Hs294T cells was determined by flow

cytometry in PI (propidium iodide) stained cells. In addition, the apoptotic mechanism of HeLa cells was studied by Annexin V/7AAD staining assay. Their biological activities have been compared with that of appropriate Cl-Ph-tpy complexes  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{en})\text{Cl}]\text{Cl}$ ,  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{dach})\text{Cl}]\text{Cl}$  and  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$ .

## Experiment

### Materials and methods

4'--(4-Chlorophenyl)-2,2':6',2''-terpyridine (Cl-Ph-tpy), 1,10-phenanthroline (phen), *o*-phenylenediamine (*o*-pda), 9-methylguanine (9MeG), guanosine-5'-monophosphate disodium salt hydrate (5'-GMP-Na<sub>2</sub>) and bovine serum albumin (BSA) are commercially available and were used as received. The complex  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})\text{Cl}_3]$  was

synthesized as reported previously [15]. All other chemicals were used as purchased without further purification. Doubly distilled water was used as the solvent throughout the experiments. The stock solution of CT DNA was prepared in 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl buffer at pH = 7.4, which gave a ratio of UV absorbances at 260 nm and 280 nm (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>) of ca. 1.8–1.9, indicating that the DNA was sufficiently free of protein and the concentration was determined by UV absorbance at 260 nm ( $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [32]. The stock solution of BSA was prepared by dissolving the solid BSA in 5 mM Tris-HCl/50 mM NaCl buffer at pH = 7.4, and the concentration was kept fixed at 2  $\mu\text{M}$ . All stock solutions were stored at 4 °C and used within 5 days.

Mono- (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C 500 MHz) and bi-dimensional (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC) NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 500 MHz spectrometer. <sup>1</sup>H chemical shifts in D<sub>2</sub>O were referenced to the internal standard 2,2-dimethyl-2,2-silapentane-5-sulfonate (DSS) at  $\delta = 0.00$  or to external 1,4-dioxane ( $\delta = 3.75$ ), whereas in other solvents were referenced to the peak of residual non-deuterated solvent ( $\delta = 2.50$  for DMSO-d<sub>6</sub>; 3.31 for CD<sub>3</sub>OD). <sup>13</sup>C chemical shifts were referenced to the peak of residual non-deuterated solvent ( $\delta = 39.52$  for DMSO-d<sub>6</sub>; 49.00 for CD<sub>3</sub>OD).

All NMR spectra were run at 298 K. The UV–Vis spectra were obtained on a Perkin-Elmer Lambda 35 double beam spectrophotometer, using 1.0 cm path-length quartz cuvettes (3.0 mL). Infrared spectra were recorded on a Perkin-Elmer 983G spectrometer. Fluorescence measurements were carried out on a RF-1501 PC spectrofluorometer (Shimadzu, Japan). The excitation and emission bandwidths were both 10 nm.

## Synthesis

### General synthetic procedure for [Ru(Cl-Ph-tpy)(N-N)Cl]Cl (1 and 2)

A weighed amount of [Ru(Cl-Ph-tpy)Cl<sub>3</sub>] was suspended in an ethanol/H<sub>2</sub>O (3:1) mixture containing 10 eq. of LiCl and 3 eq. of triethylamine (Et<sub>3</sub>N). The chelating ligand *N-N* (1.2 eq.; *N-N* = phen, *o*-pda) was then added and the mixture was refluxed under argon for ca. 6 h with vigorous stirring. The orange-red (for 1) and reddish-pink (for 2) solutions were filtered while hot to remove any undissolved material. Rotary concentration under reduced pressure to ca. ¼ of the initial volume and storage at 4.0 °C for 24 h induced the formation of the product as a dark solid. It was collected by filtration, washed with ice cold H<sub>2</sub>O, cold acetone and diethyl ether and vacuum dried.

**[Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)Cl]Cl (1)** 100.0 mg (0.181 mmol) of [Ru(Cl-Ph-tpy)Cl<sub>3</sub>], 35.96 mg (0.218 mmol) of phen, 76.9 mg (1.814 mmol) of LiCl and 75.9 µL (0.544 mmol) of Et<sub>3</sub>N in 20 mL of ethanol/H<sub>2</sub>O afforded 1 as a dark solid. Yield: 105.3 mg (83.50%). Anal Calcd for C<sub>35</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>5</sub>Ru (726.06): C, 57.90; H, 3.89; N, 9.65. Found: C, 57.84; H, 3.92; N, 9.60. Complex 1 is soluble in ethanol, methanol, acetonitrile and DMSO, partially soluble in water (ca. 2 mg/mL), acetone, chloroform and dichloromethane. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 10.47 (dd, *J* = 5.2, 1.5 Hz, 1H, CaH), 8.96 (s, 2H, C<sup>3</sup>H/C<sup>5</sup>H), 8.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, CcH), 8.67 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, C<sup>3</sup>H/C<sup>3</sup>H), 8.40 (dd, *J* = 8.3, 5.2 Hz, 1H, CbH), 8.37 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, CkH), 8.30 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, ChH), 8.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, C<sup>2</sup>H/C<sup>6</sup>H), 8.15 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, ClH), 7.87 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, C<sup>4</sup>H/C<sup>4</sup>H), 7.78 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, CjH), 7.66 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, C<sup>3</sup>H/C<sup>5</sup>H), 7.56 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, C<sup>6</sup>H/C<sup>6</sup>H), 7.38 (dd, *J* = 8.1, 5.4 Hz, 1H, CiH), 7.20 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, C<sup>5</sup>H/C<sup>5</sup>H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 160.3 (C<sup>2</sup>/C<sup>2</sup>), 160.0 (C<sup>2</sup>/C<sup>6</sup>), 154.4 (CaH), 153.6 (CjH), 153.5 (C<sup>6</sup>H/C<sup>6</sup>H), 150.4 (Cl), 148.6 (Ce), 146.9 (C<sup>4</sup>), 138.3 (C<sup>4</sup>H/C<sup>4</sup>H), 137.3 (C<sup>4</sup>), 137.0 (CcH), 136.9 (C<sup>1</sup>), 135.9 (C<sup>6</sup>H), 132.3 (Cd), 131.8 (Cg), 130.7 (C<sup>3</sup>H/C<sup>5</sup>H), 130.3 (C<sup>2</sup>H/C<sup>6</sup>H), 129.3 (CkH), 128.7 (ChH), 128.5 (C<sup>5</sup>H/C<sup>5</sup>H), 127.1 (CbH), 126.2 (CiH), 125.1 (C<sup>3</sup>H/C<sup>3</sup>H), 121.3 (C<sup>3</sup>H/C<sup>5</sup>H). Selected IR (KBr,

cm<sup>-1</sup>): ν<sub>pp</sub> 3008 (m), 2921 (m), 1602 (m), 1426 (s), 1405 (s), 1089 (vs), 831 (s), 798 (w). UV/visible spectrum (H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 265 (73378), 285 (59403), 316 (45694), 490 (17867).

**[Ru(Cl-Ph-tpy)(o-bqdi)Cl]Cl (2)** 100.0 mg (0.181 mmol) of [Ru(Cl-Ph-tpy)Cl<sub>3</sub>], 23.54 mg (0.218 mmol) of *o*-pda, 76.9 mg (1.814 mmol) of LiCl and 75.9 µL (0.544 mmol) of Et<sub>3</sub>N in 20 mL of ethanol/H<sub>2</sub>O afforded 2 as a brown solid. Yield: 53.8 mg (47.7%). Anal Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>5</sub>Ru (619.89): C, 52.31; H, 2.93; N, 11.30. Found: C, 52.03; H, 2.86; N, 11.35. Complex 2 is soluble in methanol and DMSO, and slightly soluble in water (ca. 1 mg/mL), ethanol, acetone, chloroform, dichloromethane and acetonitrile. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 9.02 (s, 2H, C<sup>3</sup>H/C<sup>5</sup>H), 8.69 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, C<sup>3</sup>H/C<sup>3</sup>H), 8.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, C<sup>2</sup>H/C<sup>6</sup>H), 8.00 (td, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 2H, C<sup>4</sup>H/C<sup>4</sup>H), 7.73 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, CbH), 7.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, C<sup>3</sup>H/C<sup>5</sup>H), 7.51 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, C<sup>6</sup>H/C<sup>6</sup>H), 7.37 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, C<sup>5</sup>H/C<sup>5</sup>H), 7.11 (td, *J* = 6.7, 3.5 Hz, 1H, CcH), 6.99–6.90 (m, 2H, C<sup>6</sup>H/C<sup>6</sup>H). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sup>6</sup>) δ 14.38 (s, 1H, N1H), 12.03 (s, 1H, N2H), 9.29 (s, 2H, C<sup>3</sup>H/C<sup>5</sup>H), 8.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, C<sup>3</sup>H/C<sup>3</sup>H), 8.37 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, C<sup>2</sup>H/C<sup>6</sup>H), 8.10 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, C<sup>4</sup>H/C<sup>4</sup>H), 7.80 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, C<sup>3</sup>H/C<sup>5</sup>H), 7.77 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, CbH), 7.46 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, C<sup>5</sup>H/C<sup>5</sup>H), 7.40 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H, C<sup>6</sup>H/C<sup>6</sup>H), 7.07 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, CcH), 7.00–6.85 (m, 2H, C<sup>6</sup>H/C<sup>6</sup>H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 173.6 (Cl), 168.0 (Ca), 159.3 (C<sup>2</sup>/C<sup>2</sup>), 156.5 (C<sup>6</sup>H/C<sup>6</sup>H), 156.1 (C<sup>2</sup>/C<sup>6</sup>), 149.9 (C<sup>4</sup>), 139.7 (C<sup>4</sup>H/C<sup>4</sup>H), 137.8 (C<sup>4</sup>), 136.4 (C<sup>1</sup>), 130.8 (C<sup>3</sup>H/C<sup>5</sup>H), 130.4 (C<sup>2</sup>H/C<sup>6</sup>H), 128.7 (C<sup>5</sup>H/C<sup>5</sup>H), 128.3 (CdH), 128.2 (CcH), 125.0 (C<sup>3</sup>H/C<sup>3</sup>H), 122.5 (CbH), 121.7 (C<sup>3</sup>H/C<sup>5</sup>H), 120.3 (CeH). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-d<sup>6</sup>) δ 171.1 (Cl), 166.0 (Ca), 157.5 (C<sup>2</sup>/C<sup>2</sup>), 154.9 (C<sup>6</sup>H/C<sup>6</sup>H), 154.2 (C<sup>2</sup>/C<sup>6</sup>), 146.7 (C<sup>4</sup>), 138.3 (C<sup>4</sup>H/C<sup>4</sup>H), 135.3 (C<sup>4</sup>), 134.7 (C<sup>1</sup>), 129.5 (C<sup>3</sup>H/C<sup>5</sup>H), 129.3 (C<sup>2</sup>H/C<sup>6</sup>H), 127.7 (C<sup>5</sup>H/C<sup>5</sup>H), 126.5 (CdH), 126.2 (CcH), 124.1 (C<sup>3</sup>H/C<sup>3</sup>H), 121.5 (CbH), 120.3 (C<sup>3</sup>H/C<sup>5</sup>H), 119.1 (CeH). Selected IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): ν<sub>SH</sub> 3479 (s), 3361 (s); ν<sub>pp</sub> 3056 (m), 1601 (m), 1452 (m), 1377 (s), 1093 (vs), 837 (m), 788 (s). UV/visible spectrum (H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub>, nm (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 284 (35184), 320 (22000), 501 (24588).

## X-ray diffraction studies

Small dark red crystals of [Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)Cl]Cl (1) suitable for single crystal X-ray analysis were grown from its methanol solution by slow diffusion of diethyl ether at room temperature. Crystals suitable for X-ray analysis of

the corresponding  $\text{PF}_6^-$  salt, i.e.,  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{phen})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  (**1-PF<sub>6</sub>**), were unintentionally obtained from the NMR sample of the interaction of **1** with 9MeG (in  $\text{D}_2\text{O}$ ) after the establishment of equilibrium, upon addition of  $\text{KPF}_6$  and saturation with 1,4-dioxane at room temperature. Contrary to **1**, crystals suitable for X-ray analysis of the cationic complex  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{o-bqdi})\text{Cl}]^+$  (**2**) were obtained only when the  $\text{Cl}^-$  counter ion was replaced by the more bulky  $\text{NO}_3^-$  ion, i.e., as  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{o-bqdi})\text{Cl}](\text{NO}_3)$  (**2-NO<sub>3</sub>**), upon addition of  $\text{NaNO}_3$  to a methanol solution of **2** and slow diffusion of diethyl ether at room temperature.

Diffraction data were collected at 100 K at the XRD1 beamline of the Elettra Synchrotron, Trieste (Italy) [33]. The data sets were indexed and integrated with the XDS package [34] and scaled using CCP4-Aimless code [35]. The structures were solved by direct methods using SHELXT program [36] and refined using full-matrix least-squares methods based on  $F^2$  implemented in SHELXL (Version 2016/6) [37]. All ordered atoms with occupancy greater than 50% have been treated anisotropically and hydrogens have been included on calculated positions, riding on their carrier atoms. Hydrogen atoms for water molecules have not been included in the refined models of **1-PF<sub>6</sub>** and **2-NO<sub>3</sub>** since it was not possible to locate them unambiguously in electron density peaks of Fourier difference maps (contributions of these missing H atoms is still included in the properties reported in Table S1). Thermal and geometric restraints on bond lengths and angles (DELU, FLAT, DFIX, DANG) have been used for disordered fragments in **2-NO<sub>3</sub>**. The Coot program was used for structure building [38]. Pictures were prepared using Ortep3 [39] and Pymol [40] software. Essential crystal and refinement data are given in Table S1.

Crystallographic data have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre and deposition numbers CCDC 1554028–1554030 have been allocated for crystalline structures of **1**, **1-PF<sub>6</sub>** and **2-NO<sub>3</sub>**, respectively. These data can be obtained free of charge via <https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures>.

#### Aquation studies

NMR samples of complexes **1** and **2** (1 mM) were prepared in  $\text{D}_2\text{O}$ .  $^1\text{H}$  NMR spectra (at 298 K) were obtained at various time intervals until no more spectral changes were observed. For long intervals, the samples were stored at ambient temperature. When the aquation process (i.e., hydrolysis of the  $\text{Cl}^-$  ligand) was completed, 2D NMR experiments performed for the full characterization of the products. The aqua species are labelled with the same number of the parent compound followed by “a”. Their NMR assignments are reported in the Supporting Information (Table S2).

#### Interactions with nucleobases

NMR samples of complexes **1** and **2** (4 mM for 9MeG; 10 mM for 5'-GMP) were prepared in  $\text{D}_2\text{O}$ . When the hydrolysis of the complex was completed, 1.3 equiv of solid of the corresponding nucleobase was added.  $^1\text{H}$  NMR spectra (at 298 K) were obtained at various time intervals until no more spectral changes were observed. For prolonged intervals, the samples were stored at ambient temperature. The NMR assignments of the products are reported in the Supporting Information (Table S2).

#### Kinetic analysis

The kinetics of the substitution reactions of complexes **1a** and **2a** with 5'-GMP were studied spectrophotometrically. All kinetic measurements were performed under *pseudo*-first-order conditions (i.e., the concentration of the nucleophile was at least tenfold that of the complex). The reactions were initiated by mixing a solution of each complex (0.3 mL, 1.00 mM) with 2.7 mL of a thermally equilibrated nucleophile solution (5.56 mM) in the UV-Vis cuvette. The observed *pseudo*-first-order rate constants,  $k_{\text{obs}}$ , represent an average value of two to three independent kinetic runs for each experimental condition. Reactions were studied at three different temperatures (15, 25 and 37 °C). The first-order rate constants,  $k_2$ , for the substitution reactions with 5'-GMP were obtained directly from the slopes of  $k_{\text{obs}}$  plots versus the concentration of the nucleophile. All kinetic data were computer-fitted to the appropriate equation using the programs Microsoft Excel 2007 and Origin 8.

#### Absorption spectroscopic studies

The interaction of complexes **1** and **2** with CT DNA was studied, using UV-Vis spectroscopy, to investigate the possible binding modes to CT DNA and to calculate the binding constants ( $K_b$ ). The DNA-binding experiments were performed at 37 °C. The absorption titration of the ruthenium(II) complex in buffer (5 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7.4) was performed by a fixed complex concentration (12.5  $\mu\text{M}$ ) to which increments of the DNA stock solution were added (2.0 mM).

#### Fluorescence quenching measurements

The binding interaction of the complexes with DNA was also studied by fluorescence spectroscopy. The fluorescence intensities were measured with the excitation wavelength set at 527 nm and the fluorescence emission at 612 nm. The excitation and emission slit widths (each 10 nm) and scan rate were maintained constant for all the experiments. Stock solutions of DNA (2.0 mM) and

complexes (0.1 mM) were prepared in 5 mM Tris–HCl buffer (pH = 7.4, 50 mM NaCl). A series of complex–DNA solutions were prepared by mixing DNA solutions with different concentration of complexes. For fluorescence determination, the final DNA concentration was 80.0  $\mu$ M, and the complex concentrations varied from 8.0  $\mu$ M to 80.0  $\mu$ M. Before measurements, the system was shook and incubated at room temperature for 5 min. The emission was recorded at 550–750 nm.

#### Albumin-binding studies

The protein-binding study was performed by tryptophan fluorescence quenching experiments using bovine serum albumin (BSA, 2  $\mu$ M) in buffered solutions (containing 5 mM Tris and 50 mM NaCl at pH 7.4). Quenching of the emission intensity of tryptophan residues of BSA at 364 nm was monitored using the complexes **1** and **2** as quenchers with increasing concentration (up to  $3.0 \times 10^{-5}$  M) [41]. Fluorescence spectra were recorded in the range 300–500 nm at an excitation wavelength of 295 nm. The fluorescence spectra of the compounds in buffered solutions were recorded under the same experimental conditions, and no fluorescence emission was detected. The Stern–Volmer and Scatchard equations (Supporting Information, Eqs. S4–S7) and graphs have been used to study the interaction of the complexes with serum albumin and to calculate the corresponding constants [41].

#### Lipophilicity assay

Log  $P_{ow}$  is the partition coefficient between octanol and water which is determined using the flask-shaking method [42]. An aliquot of a stock solution of complexes **1** and **2** in 100 mM aqueous NaCl (0.9% w/v to prevent aqueous interaction and remain saturated with octanol) was added to an equal volume of octanol (saturated with 0.9% NaCl w/v). The mixture was shaken overnight at 60 rpm at 298 K to allow partitioning. After standing, the aqueous layer was carefully separated from the octanol layer for ruthenium analysis. The ruthenium concentration in the aqueous phase was determined using UV–Vis spectrophotometry and used to calculate the  $[Ru]_o/[Ru]_w$  ratio.

#### Cell cultures

An experimental group of cancer cells included human lung carcinoma (A549), breast carcinoma (MCF-7), epithelial cervical carcinoma (HeLa) and melanoma (Hs294T) cell lines, while a control group of cells were non-cancerous human fibroblast (MRC-5) cell line. All

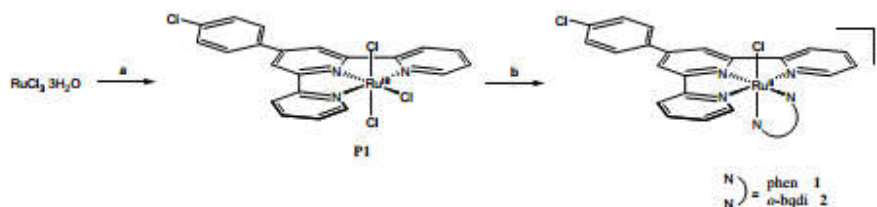
cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The cells were maintained in DMEM or RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 200 mM L-glutamine 10,000 units/ml penicillin and 10 mg/ml streptomycin (all from Sigma, Germany). The cells were cultivated at 37 °C in absolute humidity in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

#### Preparation of complex solution

Stock solution of ruthenium complexes were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Germany) at a concentration of 40 mM, filtered through a 0.22  $\mu$ m Millipore filter before use, and diluted by a nutrient cell medium (DMEM, Sigma-Aldrich, Germany) to various working concentrations of 0.3, 1, 3, 10, 30, and 100  $\mu$ M, so the final concentration of DMSO in cell culture medium never exceeded 0.5% (v/v). All solutions were prepared at the day of the treatment of the cells.

#### MTT assay

The cytotoxicity of two new synthesized Ru(II) polypyridyl complexes **1** and **2** on both experimental and control group of cells was determined by the MTT assay [43]. Due to its clinical use as an anticancer agent, the cytotoxicity of cisplatin on same cell lines was also examined. The cells were harvested from the culture flasks during the exponential growth phase, counted and  $5 \times 10^3$  cells/well were seeded into 96-well culture plates. Afterwards, the cells were treated with different concentrations of ruthenium complexes and cisplatin (0.3, 1, 3, 10, 30 and 100  $\mu$ M), and with fresh complete medium as a control. All cells were incubated at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and at absolute humidity for 24, 48 and 72 h. After incubation, the culture medium was removed from each well and MTT solution (final concentration of 0.5 mg/mL) was added to each well and cells were incubated 4 h under culture conditions. Afterward, MTT solution was gently removed and the formazan crystals were dissolved in DMSO. Plates were shaken for 10 min and absorbance was measured at 595 nm with a multiplate reader (Zenyth 3100, Anthos Labtec Instruments, Austria). Experiments were performed in triplicates and repeated in three independent series. Results were presented in ratio to the control value (untreated cells). Also, using Microsoft Office Excel 2010, IC<sub>50</sub> values were calculated. The percentage of cytotoxicity was calculated using the formula: % of viable cells =  $((TS - BG0) - E) / (TS - BG0) \times 100$ , where BG0 is for the background of the medium alone, TS is for the total viability/spontaneous death of untreated target cells, and E is for the experimental well.



**Scheme 1** Synthetic pathway for the preparation of complexes **1** and **2**. Reagents and conditions: **a** Cl-Ph-tpy, EtOH, reflux; **b** *N=N* (1.2 eq.; *N=N* = phen, *o*-bqdi), EtOH/H<sub>2</sub>O (3:1), Et<sub>3</sub>N (3.0 eq.), LiCl (10.0 eq.), reflux

### Detection of apoptosis

Apoptosis of both control and experimental group of tumor cells was estimated by annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/7-amino-actinomycin D (7-AAD) Apoptosis Kit (BD Biosciences). A549, MCF-7, HeLa and Hs294T cells, were incubated with the appropriate IC<sub>50</sub> concentrations (calculated previously by obtained MTT assay results) of ruthenium complex **1**, **2** and cisplatin, or with media alone (control) for 24 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and at the absolute humidity. Following the incubation, all cells were trypsinized, washed in PBS, centrifuged and resuspended in 100 μL of ice cold binding buffer. Cells were then stained with both 10 μL of Annexin V-FITC and 20 μL of 7-AAD, incubated for 15 min in the dark at room temperature, and then 400 μL of binding buffer was added to each tube. Samples were analyzed by a flow cytometer Cytomics FC500 (Beckman Coulter). Data were analyzed using Flowing Software (<http://www.flowingsoftware.com/>). Measurements were presented as density plots of Annexin V-FITC and 7AAD stainings.

### Cell cycle analysis by flow cytometry

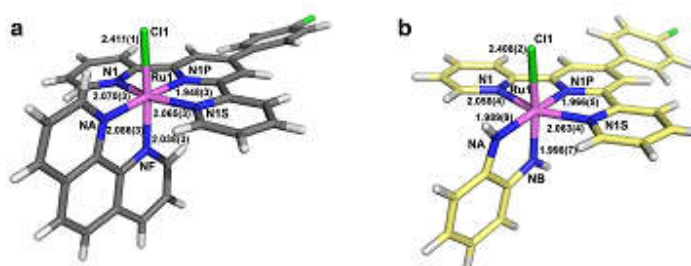
To examine the potential effects of ruthenium complexes on cell cycle progression of A549, MCF-7, HeLa and Hs294T cells, all cells were incubated with the appropriate

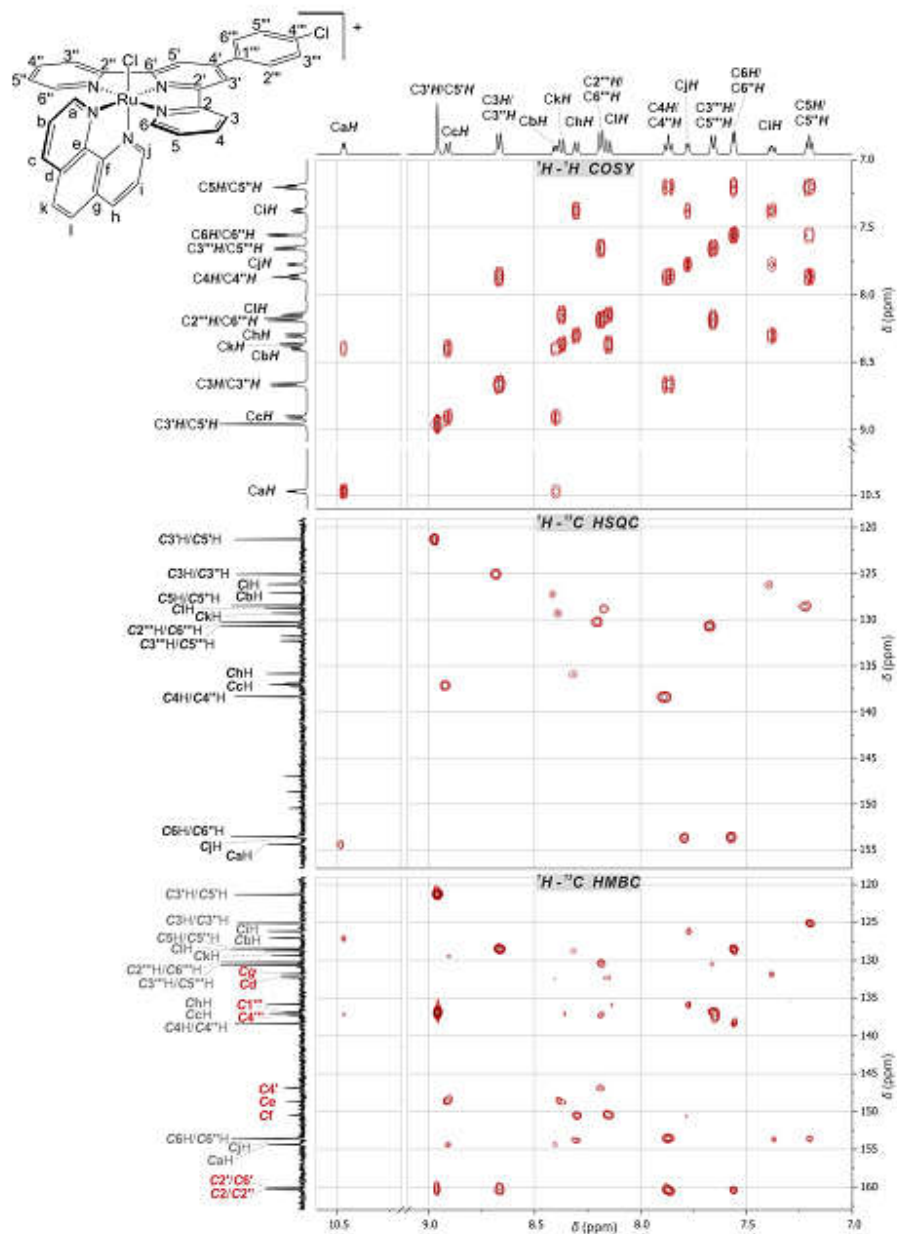
IC<sub>50</sub> concentrations of ruthenium complexes and cisplatin or with media alone (control) for 24 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and at the absolute humidity. Briefly, cells were harvested, washed with PBS and fixed with 70% ethanol at +4 °C. Fixed cells were pelleted and finally resuspended in 1 mL PBS containing RNase A (500 μg/mL). After an incubation period of 30 min at 37 °C, cells were stained with 5 μL PI (10 mg/mL PBS). After 15 min of incubation in the dark, the samples were analyzed by a flow cytometer Cytomics FC500 (Beckman Coulter). The cell cycle distribution was determined using FlowJo Software and the results were presented as histograms.

### Assessment of apoptosis

The aim of our research was also to investigate the mechanism of apoptosis induced by ruthenium complexes **1** and **2** in HeLa cancer cells. We examined the expressions of an active proapoptotic protein Bax, antiapoptotic protein Bcl-2, cytochrome *c* and the percentage of cells containing active caspase-3. HeLa cells were incubated for 24 h with IC<sub>50</sub> concentration of complexes **1** and **2**, cisplatin or in culture medium alone (control) (212.4, 7.5 and 25.7 μM, respectively). Additionally, cells were washed three times with ice cold PBS, resuspended, fixed and permeabilized (Fixation and Permeabilization Kit, eBioscience). Four types of staining of cells with various specific antibodies

**Fig. 2** Stick representation of molecular structures found for: **a** **1** and **b** **2**-NO<sub>2</sub>. Labels show ruthenium coordination spheres with average bond lengths (Å)





**Fig. 3** The 2D homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (top) and heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (middle) and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (bottom) NMR spectra of  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{phen})\text{Cl}]\text{Cl}$  (1) in  $\text{CD}_2\text{OD}$  at 298 K. Red fonts indicate quaternary carbons



were separately completed afterward. For the purpose of Bcl-2 staining, the permeabilized cells were then incubated with 1:1000 Bcl-2 fluorescein isothiocyanate primary antibody (mhbcl01, Life technologies) for 15 min at room temperature. Another three types of staining had included incubation of permeabilized HeLa cells for 30 min with 1:1000 of primary antibodies for active—Bax (N20, sc-493; Santa Cruz Biotech, Inc), cytochrome c (G7421, Promega) and active caspase-3 (#9661, Cell signaling Technology). Next, cells had been washed with PBS and then incubated with the 1:2000 of appropriate secondary antibodies for 30 min. For cytochrome c staining, we used Alexa 488 goat anti-mouse IgG (H + L) antibody (A-11001, Life Technologies), and goat anti-rabbit IgG FITC (Ab6717-1, Abcam) for Bax and caspase-3. Treated cells were washed with PBS and analyzed by flow cytometry. Fluorescence of at least 15,000 events/samples had been measured using FC 500 (Beckman Coulter). Fluorescence intensity was standardized using isotype-matched negative control antibodies. The mean fluorescence intensities of Bax, Bcl-2 and cytochrome c (MFIs) were calculated as the ratio of raw mean channel fluorescence to isotype control levels, respectively, and represent the level of expression of these proteins. The cleaved caspase-3 concentrations were evaluated as percentage of cells displaying the fluorescence [44].

## Results and discussion

### Synthesis and characterization

We have prepared two new Ru(II) polypyridyl complexes of general formula  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{N-N})\text{Cl}]\text{Cl}$  ( $\text{N-N} = \text{phen}$  (**1**) and  $o\text{-bqdi}$  (**2**)). The synthesis of the complexes is outlined in Scheme 1. The preparation of the chloride salts of complexes **1** and **2** was performed by reacting the neutral Ru(III) precursor  $\text{mer-}[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})\text{Cl}_3]$  with the respective aromatic chelating ligand under reflux. Both complexes were obtained in moderate yields (48–83%) as air- and moisture-stable solids. Complex **2** with the oxidized diimine ligand ( $o\text{-bqdi}$ ) was formed as a product of the reaction of the Ru(III) precursor with the redox active diamine ligand  $o\text{-pda}$  upon its oxidation to an imine species. The new complexes were characterized by elemental analysis and various spectroscopies such as IR, UV–Vis, 1D ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ) and 2D ( $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HSQC, and  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  HMBC) NMR, and also in the solid state by X-ray crystallography.

The crystals analyzed show monoclinic unit cells containing one ruthenium complex in the asymmetric unit (ASU) for **1** and **1-PF<sub>6</sub>** and two independent molecules for **2-NO<sub>3</sub>** (ASUs contents are shown in Fig. S1). Coordination spheres of ruthenium are summarized in Fig. 2 (complete

bond and angles values are reported in Table S3) and are in agreement with literature data for similar complexes. Geometric properties of N donor atoms in 1,10-phenanthroline and  $o\text{-benzoquinonediimine}$  ligands are very similar and therefore the geometric parameters of the metal coordination spheres are almost identical. **1** conformations between  $\text{Cl}^-$  and  $\text{PF}_6^-$  structures and between the **2-NO<sub>3</sub>** crystallographically independent molecules are superimposable (coordinates R.M.S.D. 1.20 and 0.22 Å, respectively). The conformation adopted by the terpyridine ligand is also equivalent among the three structures (coordinates R.M.S.D. 0.55 Å).

Crystal packing shows partial  $\pi$ – $\pi$  overlaps of terpyridine of neighbour molecules. Solvent molecules are trapped in all the three crystalline systems. Crystal packing for **1-PF<sub>6</sub>** and **2-NO<sub>3</sub>** shows wide channels filled with water molecules aligned with crystallographic  $c$  axis, for both models.

NMR spectroscopy reveals that both complexes **1** and **2** have a  $C_s$  symmetry confirming the proposed octahedral geometry with Cl-Ph-tpy acting as tridentate and  $N\text{-N}$  (phen in **1**;  $o\text{-bqdi}$  in **2**) as chelating ligand. The  $^1\text{H}$  NMR spectra of both complexes display similar pattern of resonances for the symmetric Cl-Ph-tpy ligand: four multiplets, one singlet and two doublets—integrating for two protons each—assigned to the protons of the terminal pyridine rings, central pyridine ring and phenyl ring, respectively. The resonances of the terminal aromatic rings of Cl-Ph-tpy experience a remarkable upfield shift as a consequence of the aromatic shielding region of the bidentate ligand (phen or  $o\text{-bqdi}$ ), in particular the resonance of the  $\text{C6H/C6'H}$  protons that is particularly upfield-shifted ( $\Delta\delta > 1.00$  ppm)—significant enough to be attributed to the different solvents—compare to those of similar complexes bearing an aliphatic  $N\text{-N}$  chelating ligand (e.g., en, dach) [15]. This pattern of resonances is typical for Ru(II)-tpy complexes bearing a chelating ligand with aromatic ring(s), such as bpy [13, 15].

The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **1** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  displays, beside the seven resonances of the Cl-Ph-tpy ligand, eight multiplets attributed to the inequivalent aromatic rings of phen (Fig. 3). Connectivity within the aromatic rings was established using 2D  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  COSY NMR experiments (Fig. 3). The most downfield shifted doublet—typical for a pyridine H6 located *cis* to, and oriented toward, a coordinated chloride—corresponds to the H6 of the equatorial pyridine moiety of the phen ligand (viz.,  $\text{CaH}$ ). Interestingly, the protons of the axial pyridine moiety of phen are remarkably shifted upfield compared to those on the other pyridine moiety (e.g.,  $\delta(\text{CiH})$  7.38 vs  $\delta(\text{CbH})$  8.40) due to the shielding effect of Cl-Ph-tpy. The  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum, consistent with the symmetry of the complex, displays two sets of resolved resonances in the downfield region: twelve for the aromatic carbon atoms of the symmetric Cl-Ph-tpy ligand

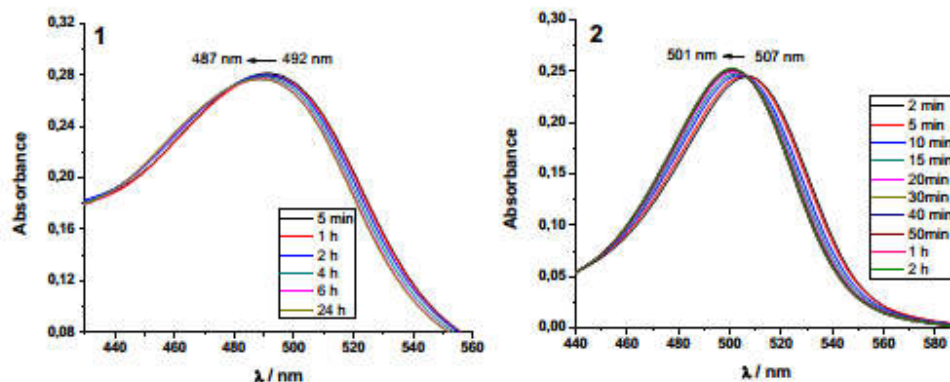


Fig. 4 Typical UV-Vis spectral changes observed during the aquation of complexes **1** and **2** in water.  $[Ru(II)] = 1 \times 10^{-5}$  M,  $T = 25$  °C

and twelve for the carbon atoms of the asymmetric phen. The full assignment of the carbon atoms was achieved by the 2D heteronuclear ( $^1H$ - $^{13}C$  HSQC and  $^1H$ - $^{13}C$  HMBC) NMR experiments (Fig. 3).

The downfield region of the  $^1H$  NMR spectrum of **2** in  $CD_3OD$  shows four aromatic multiplets, which are attributed to the protons of *o*-bqdi, together with those of Cl-Ph-tpy. The highly acidic NH protons of the chelating ligand are not detectable in  $CD_3OD$  due to their fast exchange with deuterium, but they are evident, as two singlets quite far apart from one another, in  $DMSO-d_6$  solution (Figure S2). These two peaks, integrating for 1H each, resonate at considerably high frequencies, typical for imine protons, confirming the nature of the chelating ligand (i.e., diimine). Similar to **1**, the protons on the half of the *o*-bqdi ligand pointing towards the axial coordination site are affected by the shielding cone of the Cl-Ph-tpy, and thus they are remarkably shifted upfield relative to their symmetric protons on the other half (e.g.,  $\delta(N1H)$  14.38 vs  $\delta(N2H)$  12.03). As expected, the  $^{13}C$  NMR spectrum of **2**, either in  $CD_3OD$  or  $DMSO-d_6$ , exhibits the 12 resolved resonances for the symmetric Cl-Ph-tpy ligand and six signals for the inequivalent carbon atoms of *o*-bqdi. The  $^1H$  and  $^{13}C$  spectra of **2**, in either solvent, were fully assigned by 2D NMR ( $^1H$ - $^1H$  COSY,  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC and  $^1H$ - $^{13}C$  HMBC) experiments (Figure S2; Table S2).

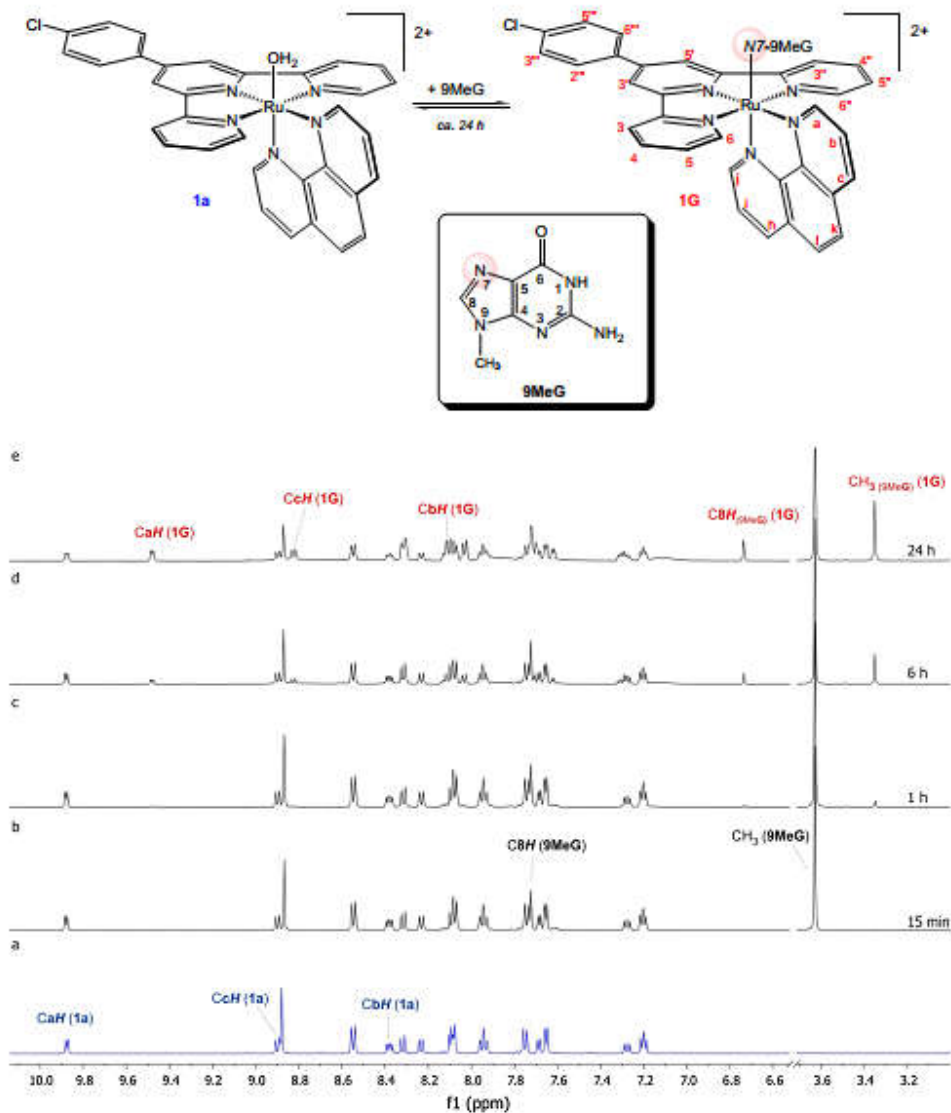
The solid state IR spectra of complexes **1** and **2** show the typical bands of the terpyridine ligands: the aromatic C–H stretching in the region  $3056$ – $2921$   $cm^{-1}$ , and the most characteristic strong band in the region  $1377$ – $1644$   $cm^{-1}$  assigned to  $\nu(C=N)$  and  $\nu(C=C)$  stretching [45, 46]. The IR spectrum of complex **2** shows a strong band at  $3361$   $cm^{-1}$  assigned to N–H stretching of bqdi ligand. The band at  $1011$   $cm^{-1}$ , present in the spectra of both

complexes, results from the ring breathing modes of the individual pyridine rings [47, 48].

The solution electronic absorption spectra of complexes **1** and **2** are very similar displaying intense bands both in the UV (**1**: 265, 285 and 316 nm; **2**: 284 and 320 nm) and visible (**1**: 490 nm; **2**: 501 nm) region attributed to intra-ligand ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) charge transfer and to metal to ligand  $d\pi(Ru) \rightarrow \pi^*(\text{polypyridyl})$  charge transfer (MLCT) transitions, respectively [45, 47, 49–52].

#### Chemical behavior in aqueous solution

Given that the new complexes would be tested for their anticancer properties, preliminary experiments to investigate their stability in aqueous solution were carried out. Their chemical behaviour was primarily studied by  $^1H$  NMR spectroscopy in  $D_2O$  at room temperature. Even though cationic, complexes **1** and **2**, as the most of the polypyridyl ruthenium terpyridine compounds, are partially soluble in aqueous solution. However, both complexes proved to be unstable once dissolved in water. After dissolution in  $D_2O$ , the  $^1H$  NMR spectrum of **1** changed relatively slowly in time due to the replacement of the chloride by a water molecule. The formation of the aqua species  $[Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)(H_2O)]^{2+}$  (**1a**) induced observable changes in the resonances of Cl-Ph-tpy and phen: the initial broad resonances were observed to diminish and replaced by new distinguishable resonances characteristic of **1a** (Figure S3). The pattern of the new resonances is very similar to that of **1**, indicating that the coordination mode of the multidentate ligands was unaffected by the aquation process and that **1a** retained the  $C_s$  symmetry. The quantitative formation of **1a** was completed after ca.10 h, and no



**Fig. 5** <sup>1</sup>H NMR spectrum of **1a** (4 mM) **a** and at various time intervals **b–e** after addition of 9MeG (1.3 eq. r.t.)

further changes were (including the release of any of the multidentate ligands) observed afterward. A remarkably similar behavior, although faster, was observed for **2** in aqueous solution (Figure S4). Immediately after dissolution

in D<sub>2</sub>O, a new set of resonances, assigned to the aqua species [Ru(Cl-Ph-tpy)(*o*-bqdi)(H<sub>2</sub>O)]<sup>2+</sup> (**2a**), was observed to grow at the expense of those of the parent compound. Quantitative formation of **2a** occurred within ca. 3 h, and

no spectral changes were detected for longer observation times. Addition of excess of NaCl (ca. 100 mM) in the solution of either **1a** or **2a** induced rapid precipitation of the respective chlorido derivative, (i.e., **1** or **2**, respectively).

#### UV–Vis investigation

The solution chemistry of **1** and **2** was also studied using UV–Vis spectrophotometry. Complexes **1** and **2** were dissolved in a minimum amount of methanol, and then an aliquot of this solution of each compound was dissolved in water to make a final ruthenium concentration of  $1 \times 10^{-5}$  M. These solutions were immediately analyzed and spectra were collected over a 24-h period. As seen in Fig. 4, there was a decrease in the absorption maxima of the ruthenium complexes that is ascribed to hydrolysis of Ru(II)-bound chloride ion. On moving from the chlorido complexes **1** and **2** to corresponding aqua species **1a** and **2a**, the MLCT bands undergo blue shifts from 492 and 507 to 487 and 501 nm, respectively, due to stabilization of  $d\pi$  orbitals of ruthenium [53, 54].

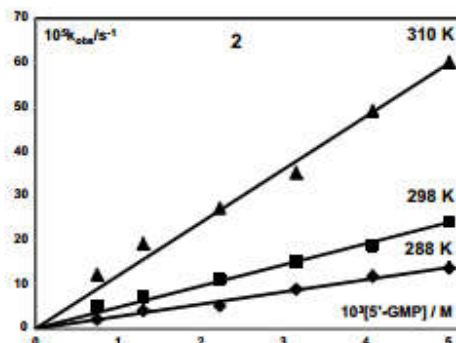
The stability of complexes **1** and **2** in more biologically relevant solutions, like 10 mM phosphate buffer (137 mM NaCl, pH = 7.4) or 5 mM Tris buffer solution (50 mM NaCl, pH = 7.4), was also investigated (Figure S5). In both solutions, the stability of complexes **1** and **2** was poor after 24 h, showing a decrease in the intensity of the bands and a hypsochromic shift of the MLCT transition band in the spectrum. We suggest that hydrolysis of the complexes is probably taking place both in phosphate and Tris buffer solutions by replacement of the chloride ligand by water molecule.

#### Interaction of complexes **1** and **2** with small biomolecules

Aiming to investigate the effect of the aromaticity of bidentate chelating ligands on the binding mode of Ru(II)-polypyridyl complexes to DNA and to relate this to the differences in their anticancer activity, the reactivity of the aqua complexes **1a** and **2a** toward two guanine derivatives, i.e., 9MeG and 5'-GMP, as model DNA bases, was

**Table 1** Rate constants and activation parameters for the substitution reactions between complexes **1a** and **2a** with 5'-GMP

	$t$ (°C)	$k_2$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$\Delta H_2^\ddagger$ ( $kJmol^{-1}$ )	$\Delta S_2^\ddagger$ ( $JK^{-1}mol^{-1}$ )
<b>1</b> (phen)	37	$0.87 \pm 0.05$		
<b>2</b> (bqdi)	15	$0.28 \pm 0.02$	$48 \pm 4$	$-108 \pm 12$
	25	$0.48 \pm 0.02$		
	37	$1.20 \pm 0.06$		



**Fig. 6** Pseudo-first-order rate constants,  $k_{obs}$ , plotted as a function of ligand concentration and temperature for the substitution reaction of complex **2** with 5'-GMP in water

qualitatively studied by  $^1H$  NMR spectroscopy in  $D_2O$  at ambient temperature (for the numbering scheme of 9MeG and 5'-GMP, see Fig. 1). The assignment of the products is reported in Table S2 in the SI.

The  $^1H$  NMR spectrum of **1a** in  $D_2O$  (4 mM) showed no rapid changes after the addition of excess of 9MeG (1.3 equiv) (Fig. 5). A new set of resonances, attributed to the product  $[Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)(9MeG-N7)]^{2+}$  (**1G**), gradually replaced those of **1a** and free 9MeG. The new  $CH_{(9MeG)}$  and  $CH_{3(9MeG)}$  resonances ( $\delta = 6.74$  and 3.35, respectively) are remarkably shifted upfield compared to those of the free 9MeG ( $\delta = 7.72$  and 3.63, respectively) because of the shielding effect of the adjacent Cl-Ph-tpy. Similarly, the  $CaH$  of phen on **1G**, i.e., the proton pointing towards the N7-bonded 9MeG, experiences also more shielding due to the aromatic rings of the 9MeG, and therefore its resonance shifts more upfield compared to that of **1a** ( $\delta$  9.48 vs 9.88). Similar behavior, although less pronounced, was also observed for the other protons of the same pyridine moiety, whereas the opposite effect detected to the protons of the equatorial pyridine moiety (i.e. *trans* to N7-bonded 9MeG). The protons of the Cl-Ph-tpy remained almost unaffected by the replacement of the water molecule by 9MeG. Equilibrium was reached after ca. 24 h, with a ratio between **1G** and **1a** of almost 1:1 (56% of **1G**), and no spectral changes were observed afterwards.

Addition of excess of 5'-GMP (1.3 eq) to a solution of **1a** in  $D_2O$  (10 mM) led to the formation and eventual precipitation of the neutral compound  $[Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)(5'-GMP-N7)]$  (**1GM**), as evidenced by  $^1H$  NMR spectroscopy (Figure S6). At relatively early times after mixing (e.g., within 3 h), the new set of resonances assigned

to **1GM** started to grow slowly with time. As expected, the new  $C8H_{(GMP)}$  and  $CaH$  resonances of **1GM** ( $\delta$  6.83 and 9.47, respectively) are sifted at considerable lower frequencies compared to those of free 5'-GMP and **1a** ( $\delta$  8.13 and 9.91, respectively). The full assignment of **1GM** was not attempted.

Similar results were obtained when **2a** interacted with either 9MeG or 5'-GMP, although at different rates and extends. The reaction of **2a** with 9MeG (1:1.3, 4 mM) is slightly faster compared to that of **1a**. More specifically, 4 min after the addition of 9MeG to a solution of **2a** the growth of a new set of resonances, assignable to  $[Ru(Cl-Ph-tpy)(o-bqdi)(9MeG-N7)]^{2+}$  (**2G**), was observed in the  $^1H$  NMR spectrum (Figure S7). The system reached equilibrium after ca. 12 h, with ca. 90% of **2G**, and no changes were observed afterwards.

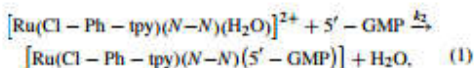
Addition of 5'-GMP (1.3 eq.) to a solution of **2a**q (10 mM) induced the rapid precipitation of a red solid, which was insoluble in  $D_2O$  (only the signals of free 5'-GMP were detected in the  $^1H$  NMR spectrum of the mixture). Presumably, without hard evidence though, the red product is the neutral compound  $[Ru(Cl-Ph-tpy)(o-bqdi)(5'-GMP-N7)]$  (**2GM**).

The above NMR evidences show that both complexes **1** and **2** are able to react with guanine derivatives after their activation, i.e., after the quantitative dissociation of the  $Cl^-$  ligand, forming monofunctional adducts. Complex **2** reacts faster and to larger extent with 9MeG than **1**. Reaction of either **1** or **2** with 5'-GMP induces the spontaneous precipitation of a red solid, most likely the *N7*-bonded neutral species  $[Ru(Cl-Ph-tpy)(N-N)(5'-GMP-N7)]$  (*N-N* = phen (**1GM**) or *o-bqdi* (**2GM**)). Such precipitation was not detected in the case of their reaction with 9MeG. Similar observations had been detected for the reaction of  $[Ru(Cl-Ph-tpy)(bpy)Cl]Cl$  with 5'-GMP [16].

#### Kinetic studies of complexes **1** and **2** with 5'-GMP

The substitution kinetics of coordinated water with 5'-GMP in complexes **1a** and **2a** were also investigated UV-Vis spectrophotometrically (at much lower concentrations than in the NMR experiments) by following the change in absorbance at selected wavelengths, corresponding to the maximum change, as a function of time (Figures S8 and S9). All kinetic experiments were performed under *pseudo*-first-order conditions, for which the concentration of entering nucleophile was always in at least a tenfold excess.

The substitution process of the complexes **1a** and **2a** with 5'-GMP were represented by Eq. (1):



where *N-N* = phen or *bqdi*.

The rate constants for the substitution were determined, under *pseudo*-first-order conditions, from the plot of the linear dependence of  $k_{obs}$  versus total nucleophile concentration, according to the Eq 2. Each *pseudo*-first-order rate constant,  $k_{obs}$ , was calculated as the average value of two or three independent runs and are given in Tables S4 and S5.

$$k_{obs} = k_2 [5' - GMP] \quad (2)$$

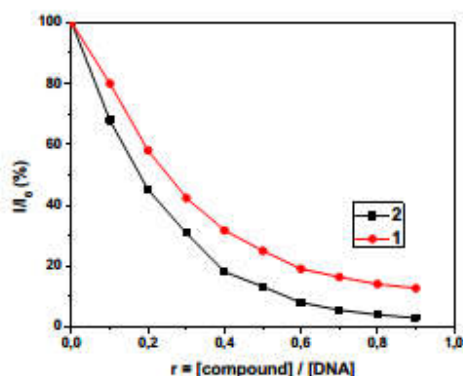
The direct nucleophilic attack is characterized by the rate constants  $k_2$ . The first-order rate constant  $k_2$ , characterizing the formation of the product, can be evaluated from the slope of a plot  $k_{obs}$  vs. the concentration of entering nucleophile. Their values are listed in Table 1. The experimental results for the displacement of water molecule from complexes **1a** and **2a** are shown in Fig. 6 and Figure S10, respectively. A linear dependence on the nucleophile concentration was observed for all reactions.

The activation parameters ( $\Delta H^\ddagger = 48 \pm 4 \text{ kJmol}^{-1}$  and  $\Delta S^\ddagger = -108 \pm 12 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) were obtained from Eyring plot, which is presented in Figure S11. The negative  $\Delta S^\ddagger$  value suggests that the activation process is strongly dominated by bond-making. The small value of  $\Delta H^\ddagger$  and the negative value of  $\Delta S^\ddagger$  clearly support the associative mechanism for the substitution process. Similar mechanisms have been proposed for the substitution reactions of organometallic Ru(II)-arene complexes, half sandwich Ru(II)-[9]aneS3 coordination compounds and of Ru(II)-tpy complexes investigated in previous studies with biologically relevant nucleophiles, e.g., 9MeG, guanosine (Guo), 5'-GMP, L-His, thiourea (Tu), L-cysteine (L-Cys), L-methionine (L-Met), pyrazole (Pz), 1,2,4-triazole (Tz) and pyridine (Py) [13, 14, 16, 55–57].

It can be seen that the rate constants depend on the size of the inert chelating ligand: compound **2** that has the aromatic diimine as chelating ligand reacts faster than the phen complex **1**. This could be due to the steric hindrance caused by the bulky phen chelator on the Ru(II) center during the associative bond formation process which occurs through the transition state that has a seven coordinate character. It can be seen that the nature of the bidentate ligand *N-N* is very relevant in affecting the reactivity of the meridional complexes, since it is *trans* to the unique reactive coordination position. The steric requirements of the metal complex itself directly influence the rate of nucleobase binding.

**Table 2** The DNA-binding constants ( $K_b$ ) and Stern-Volmer constants ( $V$ ,  $K_{sv}$ ) from EB-DNA fluorescence for **1** and **2**

Complex	$K_b$ ( $M^{-1}$ )	$K_{sv}$ ( $M^{-1}$ )	$V$ ( $M^{-1}$ )
<b>1</b> (phen)	$1.97 (\pm 0.2) \times 10^4$	$3.67 (\pm 0.1) \times 10^4$	$1.20 (\pm 0.1) \times 10^4$
<b>2</b> ( <i>bqdi</i> )	$3.0 (\pm 0.1) \times 10^4$	$2.96 (\pm 0.1) \times 10^4$	$3.30 (\pm 0.3) \times 10^4$



**Fig. 7** Plot of % EB relative fluorescence intensity at  $\lambda_{\text{em}} = 612$  nm (%) vs  $r$  ( $r = [\text{compound}]/[\text{DNA}]$ ) for the complexes 1 and 2 (13% of the initial fluorescence intensity for 1 and 3% for 2) in buffer solution (5 mM Tris and 50 mM NaCl at pH = 7.4)

For comparison, the Ru(II) tpy compounds with an aliphatic diamine as chelating ligands of the general formula  $[\text{Ru}(\text{L}_3)(\text{N}-\text{N})\text{Cl}]\text{Cl}$  ( $\text{L}_3 = \text{Cl-tpy}$  or  $\text{Cl-Ph-tpy}$ ;  $\text{N}-\text{N} = \text{en}$  or  $\text{dach}$ ) have  $k_2$  values (0.15–0.75  $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) [13, 16] that are from 2 to 8 times smaller than those of complex 2 with the aromatic diimine ligand for the reaction with 5'-GMP, respectively, implying that the aromaticity has a significant effect on the substitution behavior of the Ru(II) complexes. In addition, comparing the reactivity of the complexes  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$  and  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{phen})\text{Cl}]\text{Cl}$  (1), it can be seen that the phen complex 1 reacts ca. 2.5 times faster than the bpy complex. This can be explained by the increasing number of  $\pi$ -acceptors in the coordination sphere of the phen complex 1, more specifically by the increasing number of aromatic rings [58]. The introduction of an additional aromatic ring into phen complex significantly increases the  $\pi$ -acceptor abilities of the chelate, which in turn causes a decrease in electron density on the Ru(II) center, an increase in the ability of the complex to stabilize further incoming electron density on the Ru(II) center. This results in an increase in the substitution rate of coordinated water [58].

#### DNA-binding studies

As known, metal complexes bind to double-stranded DNA via covalent or noncovalent interactions. In our previous work, we revealed that Ru-(Cl-tpy) and Ru-(Cl-Ph-tpy) complexes both intercalate and covalently bind

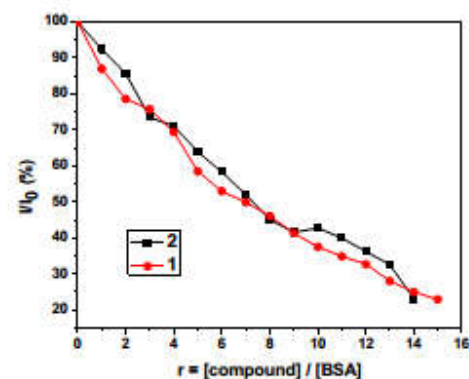
to CT DNA [14–16]. The combination of these modes of interaction can be utilized to improve the binding affinity and selectivity of ruthenium polypyridyl complexes.

#### Absorption spectroscopic studies

The existence and the possible mode of interaction between each complex and CT DNA may be revealed by the changes observed on the MLCT bands of complexes 1 and 2 upon addition of CT DNA in diverse  $[\text{complex}]/[\text{DNA}]$  mixing ratio ( $r$ ) values. In general, the changes observed in the UV spectra upon titration reveal the existence of interaction between each complex and CT DNA and may usually give information on the interaction mode.

The UV-Vis spectra of complexes 1 and 2 in the absence and presence of CT DNA are given in Figure S12. In the UV-Vis spectrum of complex 1, the band at 492 nm, presents a hypochromism upon addition of increasing amounts of CT DNA, suggesting the tight binding to CT DNA through intercalation. Additionally, the band at 492 nm presents a red shift (bathochromism) of 2 nm (up to 494 nm), suggesting the stabilization of the CT DNA duplex [17, 53]. The behavior of complex 2 was quite similar, the band centered at 501 nm presents a hypochromism accompanied by a 7 nm red shift (to 508 nm) upon addition of increasing amounts of CT DNA.

The above results suggest that both complexes can bind to CT DNA and stabilize the CT DNA duplex, although the exact mode of binding cannot be reliably proposed on the basis of UV-Vis spectroscopic studies [41, 59]. It is important to emphasize that the studied



**Fig. 8** Plot of % relative fluorescence intensity at  $\lambda_{\text{em}} = 364$  nm (%) vs  $r$  ( $r = [\text{complex}]/[\text{BSA}]$ ) for the complexes 1 and 2 (22.9% of the initial fluorescence intensity for 1 and 23% for 2) in buffer solution (5 mM Tris and 50 mM NaCl at pH = 7.4)

complexes contain both a leaving group and a DNA intercalating ligand, and hence, they could interact with DNA in a bifunctional mode, including covalent binding to the nucleobases and non-covalent intercalation.

The intrinsic binding constants  $K_b$  of complexes **1** and **2**, calculated by the equation (S1) and the plots (Figure S13) were  $(1.97 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  and  $(3.0 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , respectively (Table 2). The  $K_b$  values suggest a strong binding of the complexes to CT DNA, with complex **2** exhibiting higher  $K_b$  values compared to complex **1**. For comparison, the polypyridyl compounds of the general formula  $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{N-N})\text{Cl}](\text{N-N} = \text{en or dach})$  that are believed to bind to DNA in a bifunctional manner (covalently and noncovalently), have  $K_b$  values  $(2.1\text{--}10.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1})$  [14] that are the same order of magnitude with those of complexes **1** and **2**.

### Fluorescence quenching measurements

Ethidium bromide (EB = 3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide) is an intercalator to CT DNA through the planar EB phenanthridine ring in between adjacent DNA base pairs. This intercalation results in the appearance of intense fluorescence emission band at 612 nm, when excited at 527 nm, due to the formation of the EB–DNA compound. Changes in the spectra obtained with ethidium bromide when bound to DNA are frequently used for the study of metal complexes binding to the DNA, since the addition of the complex, which is capable to intercalate DNA with the same or greater affinity than EB, may lead to a decrease in fluorescence emission of DNA–EB compounds. Compounds **1** and **2** do not show any significant fluorescence at room temperature in solution or in the presence of CT DNA, when excited at 527 nm. Furthermore, the addition of complexes **1** and **2** to a solution containing EB does not provoke quenching of free EB fluorescence, and no new peaks appear in the spectra.

The addition of increasing amounts (up to  $r = 1.0$ ) of complexes **1** and **2** resulted in significant decrease of the intensity of the emission band at 612 nm, indicating competition of the compounds with EB in binding to DNA (Fig. 7 and Figure S14). The fluorescence quenching curves of EB bound to DNA in the absence and presence of the complexes are shown in Figure S14. The observed quenching of DNA–EB fluorescence suggests that they can displace EB from the DNA–EB complex, thus revealing the interaction with CT DNA by intercalative mode [59–61].

Quenching mechanism can be predicted from Stern–Volmer plots. In the case of complexes **1** and **2**, the simple

Stern–Volmer plots ( $I_0/I$  versus  $[Q]$ ) showed an upward curvature (Eq. S2 and Figure S15) which is obtained when both static and dynamic quenching occur. The static quenching constant  $V$  was obtained from the modified form of the Stern–Volmer equation (Eq. S3) by plotting  $I_0/I_c^{[Q]}$  versus  $[Q]$  by varying  $V$  until a linear plot was obtained. The highest value of correlation coefficient was used as criterion for linearity of the plot to obtain a precise value of  $V$ . The (dynamic) collisional quenching constant,  $K_{sv}$  was then obtained from the slope of the linear plots (inset Figure S15). The  $V$  and  $K_{sv}$  values so obtained are given in Table 2. Complexes **1** and **2** showed high values of the quenching constant indicating their great efficiency to replace EB and bind strongly to DNA, which is in agreement with the high values of their DNA-binding constant ( $K_b$ ). These additional interactions could contribute to the unique binding modes to duplex DNA and induce different structural distortions in DNA compared to cisplatin.

### Albumin-binding studies

It is important to consider the interactions of drugs with plasma proteins particularly with serum albumin, which is the most abundant protein in plasma. Binding to these proteins may lead to loss or enhancement of the biological properties of the original drug, or provide paths for drug transportation. In this study, the interactions of complexes **1** and **2** with BSA were studied by fluorescence spectroscopy as this method allows a quantitative assessment of the binding strength. BSA is chosen as the model protein because it shares a high degree of homology with human serum albumin. The changes and the quenching observed in the fluorescence emission spectra of tryptophan in BSA upon addition of complexes are primarily due to changes in protein conformation, subunit association, substrate binding, or denaturation.

Addition of the complexes **1** and **2** to a BSA solution (up to  $r$  values of 15) results in a significant quenching of BSA fluorescence at  $\lambda = 364 \text{ nm}$  for both complexes (Fig. 8 and Figure S16). The observed quenching may be attributed to changes in protein tertiary structure leading to changes in tryptophan environment of BSA, and thus indicating the binding of each complex to the albumin [62, 63]. Furthermore, the maximum of the bands was slightly shifted from 364 to 370 nm, for both complexes (Figure S16). The red shift implies the formation of ruthenated BSA adducts, which altered the polarity of microenvironment in the vicinity of tryptophan.

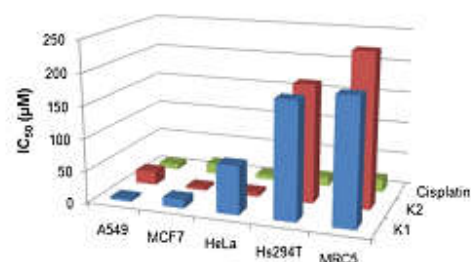
**Table 3** BSA constants and parameters ( $K_{sv}$ ,  $k_q$ ,  $K$ ,  $n$  and  $V$ ) derived for complexes **1** and **2**

Complex	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	$k_q (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K (\text{M}^{-1})$	$n$	$V (\text{M}^{-1})$
<b>1</b> (phen)	$4.43 (\pm 0.5) \times 10^4$	$4.43 (\pm 0.5) \times 10^{12}$	$4.3 \times 10^4$	1.35	$2.03 (\pm 0.4) \times 10^4$
<b>2</b> (bqdi)	$4.91 (\pm 0.4) \times 10^4$	$4.91 (\pm 0.4) \times 10^{12}$	$2.7 \times 10^4$	1.40	$1.0 (\pm 0.3) \times 10^4$

**Table 4** IC<sub>50</sub> values for complexes **1**, **2** and cisplatin obtained by MTT assay results after 24, 48 and 72 h drug exposure

IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	1	2	Cisplatin
<b>A549 (h)</b>			
72	4.6 $\pm$ 2.1	21.7 $\pm$ 4.3	8.8 $\pm$ 2.7
48	9.5 $\pm$ 3.2	23.8 $\pm$ 3.8	9.5 $\pm$ 1.8
24	55.3 $\pm$ 9.3	25.1 $\pm$ 3.3	27.2 $\pm$ 4.1
<b>MCF7 (h)</b>			
72	13.8 $\pm$ 1.8	4.6 $\pm$ 0.9	17.0 $\pm$ 1.9
48	22.9 $\pm$ 1.7	7.2 $\pm$ 1.3	24.5 $\pm$ 3.3
24	102.4 $\pm$ 12.6	13.9 $\pm$ 3.4	94.1 $\pm$ 11.7
<b>HeLa (h)</b>			
72	75.5 $\pm$ 10.4	6.4 $\pm$ 1.3	7.6 $\pm$ 1.7
48	120.2 $\pm$ 13.5	7.4 $\pm$ 1.6	8.7 $\pm$ 1.3
24	212.4 $\pm$ 36.4	7.5 $\pm$ 1.4	25.7 $\pm$ 2.9
<b>Hs294T (h)</b>			
72	179.6 $\pm$ 27.9	183.1 $\pm$ 17.1	13.8 $\pm$ 6.2
48	247.8 $\pm$ 21.0	231.6 $\pm$ 33.8	21.3 $\pm$ 5.5
24	>300	>300	124.2 $\pm$ 14.6
<b>MRC5 (h)</b>			
72	192.6 $\pm$ 17.2	238.1 $\pm$ 19.3	19.7 $\pm$ 6.7
48	>300	>300	43.1 $\pm$ 8.8
24	>300	>300	183.7 $\pm$ 16.2

Results are presented as mean  $\pm$  SD. B: IC<sub>50</sub> values for complexes **1**, **2** and cisplatin after cultivation of diverse cell lines for 72 h

**Fig. 9** IC<sub>50</sub> values for complexes **1**, **2** and cisplatin after cultivation of diverse cell lines for 72 h

In the case of both complexes **1** and **2**, the simple Stern–Volmer plots ( $I_0/I$  versus  $[Q]$ ) showed an upward curvature (Eqs. S4, S5 and Figure S17). The static quenching constant  $V$  was obtained from the modified form of the Stern–Volmer equation (Eq. S6) by plotting  $I_0/Ie^{V[Q]}$  versus  $[Q]$  by varying  $V$  until a linear plot was obtained. The highest value of correlation coefficient was used as criterion for linearity of the plot to obtain a precise value of  $V$ . The (dynamic) collisional quenching constant,  $K_{sv}$ , was then obtained from the slope of the linear plots (inset

Figure S17). The  $V$  and  $K_{sv}$  values so obtained are given in Table 3. The magnitude of static quenching constant was smaller than the collisional quenching constant, but both were of the order of  $10^4$ .

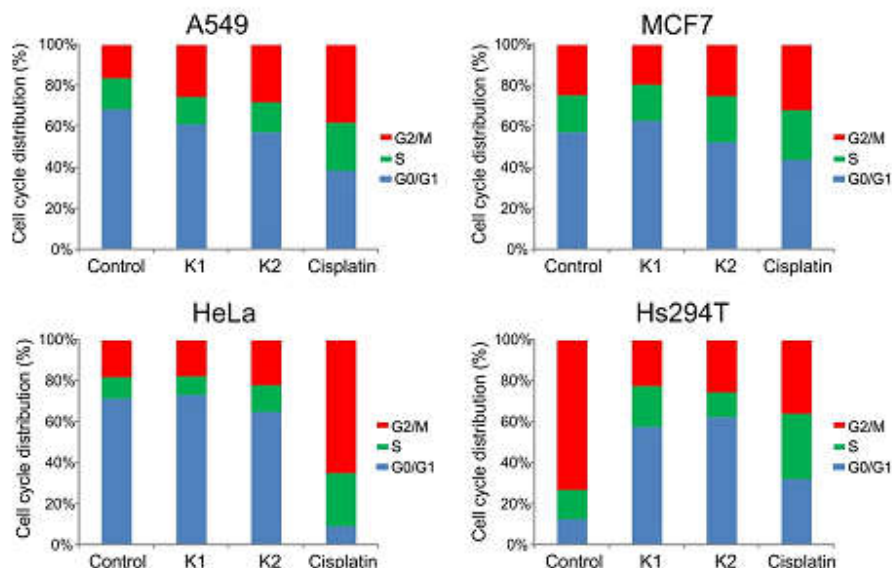
The quenching rate constant ( $k_q$ ) depends on the probability of a collision between fluorophore and quencher and is a measure of the exposure of tryptophan residues to the drug. The  $k_q$  values are also given in Table 3 and indicate good quenching ability of the BSA fluorescence, with **2** exhibiting higher  $k_q$  value ( $k_q = 4.91 \pm (0.4) \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). The upper limit of  $k_q$  expected for a diffusion-controlled bimolecular process is  $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . The high magnitude of  $k_q$  in the present study ( $10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) shows that the process is not entirely diffusion-controlled, specific drug–protein interactions are also involved which make  $k_q$  larger [60, 61]. The values of quenching constant are within the range found for a series of ruthenium complexes with *tpy* as ligand [14, 15].

The values of the BSA-binding constant ( $K$ ) and the number of binding sites per albumin ( $n$ ), as calculated from the Scatchard equation (Eq. S7) and Scatchard plot (Figure S18) for all compounds are given in Table 3. It can be seen that complex **1** has higher binding constant compare to complex **2**. The  $n$  values for the complexes **1** and **2** average out to be 1 which suggests that there is only one binding site available on the protein [60]. In general, the values of the binding constants ( $K$ ) of the complexes to BSA are in the range of  $2.7 \times 10^4$ – $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  and could be considered high enough to suggest their binding to BSA and possible transfer and not too high, since they are quite below the value of the association constant ( $K = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) of the strongest known noncovalent interactions between avadin and diverse ligands, so they can get released from BSA upon arrival at the target cells [64, 65].

#### Hydrophobicity measurements

Lipophilicity is one of the most important factors in pharmaceutical research and can be considered a key determinant of the pharmacokinetic properties of a drug and its interaction with macromolecular targets. Octanol–water partition coefficients ( $\log P_{ow}$ ) provide a measure of drug lipophilicity, which indicates the ability of a molecule to pass through cell membranes [66]. Knowledge of the partition coefficient is valuable, and it is frequently used in structure–activity relationship (SAR) and quantitative structure–activity relationship (QSAR) studies. The lipophilicity of complexes **1** and **2** was determined by measuring the concentration ratio of the corresponding complex in the aqueous phase at equilibrium state. After mixing with octanol and water, complex **1** was distributed mostly in the octanol phase, while complex **2** in the water phase.





**Fig. 10** Effects of complexes 1, 2 and cisplatin on cell cycle distribution

Complex 1 gave positive  $\log P_{ow}$  values (1.13), showing it to be hydrophobic in nature. On the other hand, complex 2 gave negative  $\log P_{ow}$  values (−1.14) showing it to be hydrophilic in nature.

#### Cytotoxicity of complexes 1 and 2

The cytotoxicity of two ruthenium(II) complexes 1 and 2 was evaluated in four human cancer cell lines (A549, MCF7, HeLa and Hs294T) and in one non-cancer cell line (MRC-5) by MTT assay after 24, 48 and 72 h of treatment. The cells viability of treated cells is presented in Figure S19. For comparison purposes, the cytotoxicity of cisplatin has also been examined. Our results clearly show significant decrease of cancer cell viability compared to the viability of control treated cells with specific individual cell lines sensitivities. The calculated  $IC_{50}$  values of ruthenium complexes and cisplatin are presented in Table 4. Ruthenium complex 1 displayed high cytotoxic activity after 72 h against A549 and MCF7 cell lines with  $IC_{50}$  values of  $4.6 \pm 2.1$  and  $13.8 \pm 1.8 \mu\text{M}$ , respectively. The cytotoxicity of ruthenium complex 1 was about 2 times higher compared to the cytotoxicity of cisplatin under the same conditions (Table 4). The complex 1 affected moderately the viability of HeLa cells (Fig. 9). Ruthenium complex 2

significantly decreased viability after 72 h of treatment of A549 and especially MCF7 and HeLa cells, with  $IC_{50}$  values of  $21.7 \pm 4.3$ ,  $4.6 \pm 0.9$  and  $6.4 \pm 1.3 \mu\text{M}$ , respectively. Furthermore, ruthenium complex 2 showed higher cytotoxic activity against MCF7 and HeLa cells compared to the cytotoxicity of cisplatin under the same conditions (Fig. 9). Also, both ruthenium complexes displayed an insignificant effect on viabilities of Hs294T cells and healthy fibroblast cell line (MRC-5) suggesting their cytotoxic selectivity against various types of cancer cells and toward the cancer cells only (Fig. 9). In addition, complexes 1 and 2 showed higher activity against A549 and HeLa cells in comparison with their Cl-tpy [14] and Cl-Ph-tpy [15] analogues of the general formula  $[\text{Ru}(\text{L}_3)(\text{N}-\text{N})\text{Cl}]\text{Cl}$  ( $\text{L}_3 = \text{Cl-tpy}$  or  $\text{Cl-Ph-tpy}$ ;  $\text{N}-\text{N} = \text{en}$ ,  $\text{dach}$  or  $\text{bpy}$ ), implying that the aromaticity has a significant effect on the anticancer activity of the Ru(II) complexes.

#### Effects of ruthenium complexes on apoptosis

Apoptosis or programmed cell death is highly regulated process limited to individual cells that cause no damage to surrounding cells. In contrast to apoptosis, necrosis may cause inflammation and consequently damage local healthy tissue [67]. Therefore, induction of apoptosis is the most

appropriate strategy for the treatment of cancer. To investigate the dominant type of cell death induced by complexes **1** and **2**, Annexin V/TAAD staining assay has been performed (Figure S20). All cancer cells were cultivated in media containing ruthenium complexes or cisplatin at  $IC_{50}$  concentrations or in media alone (control). After 24-h treatment of A549 tumor cells with  $IC_{50}$  values of complex **1** (55.3  $\mu$ M), our results showed that 44.6% of cells were in early apoptosis, while 11.9% of cells were in late apoptosis. After 24-h treatment of the same cell line with  $IC_{50}$  values of complex **2** (25.1  $\mu$ M), 35% of cells undergo early apoptosis while 12.2% cell were in the stage of late apoptosis. Similar results were obtained in other cell lines (Table S6). Our results clearly showed that both ruthenium complexes strongly induced apoptosis of treated cancer cells with high percentages of apoptotic cells and negligible percentage of necrotic cells which makes them suitable for further anticancer evaluation.

#### Effects of ruthenium complexes on cell cycle

Both, induction of apoptosis and/or cell cycle arrest may decrease the viability of cancer cells [68]. Unlike normal cells, cancer cells are more relied on DNA damage repair and G2 checkpoint abrogation. Regarding the tight connection between apoptosis and cell cycle [69], G2/M cell cycle phase arrest can be a possible mechanism for induction of apoptosis, while the G0/G1 phase arrest generally prevents the cells from proliferation, but gives them the opportunity to fix the damage caused by anticancer agent(s) [67, 70]. Various ruthenium complexes induce apoptosis by different antiproliferative mechanisms [68]. The effect of our ruthenium complexes on cell cycle was investigated 24 h after the cells treatment with  $IC_{50}$  concentrations of complexes by flow cytometry in PI stained cancer cells (Fig. 10; Figure S21). Our results showed that ruthenium complex **1** induced G2/M phase arrest in A549 cells and G0/G1 phase arrest in MCF7 and Hs294T cells (Fig. 10). Complex **1** had no effect on cell cycle of HeLa cells. Complex **2** induced G2/M cell cycle arrest on A549 and HeLa cells, G0/G1 cell cycle arrest on Hs294T cells and had no effect on MCF7 cells (Fig. 10). These data showed that there were variations in the mechanism of action of tested ruthenium complexes among different types of cancer cells.

#### Ruthenium complexes induce apoptosis by mitochondrial pathway

There are two main apoptotic pathways. Extrinsic apoptotic pathway is mainly executed via death receptors and activation of caspase-3. Intrinsic or mitochondrial apoptotic pathway is caused by disbalance between proapoptotic proteins such as Bax and antiapoptotic proteins such as Bcl-2

in favor of proapoptotic proteins. This disbalance affects the permeability of mitochondrial membrane, causes cytochrome c release from mitochondria, activation of caspase 3 and consequently leads to apoptosis [71]. We examined the effects of our ruthenium complexes on apoptosis after 24 h of treatment of HeLa cells by Annexin V/TAAD staining assay (Figure S22). Our results showed that after the treatment of cells with  $IC_{50}$  concentrations of ruthenium complexes and cisplatin, there has been a significant increase in expression of active Bax and decrease in expression of Bcl-2 compared to their expressions in untreated (control) cells (Table S7). A significant increase of released cytochrome c was also noted in the group of treated cells compared to control (Table S7). Also, the percentages of cells expressing active caspase-3 were increased by approximately four times in tumor cells treated by both ruthenium complexes compared to the control cells (Table S7). Therefore, both ruthenium complexes decreased Bcl-2/Bax ratio causing cytochrome c mitochondrial release, the activation of caspase-3 and induction of apoptosis.

#### Conclusion

We described the preparation and structural characterization, mainly by NMR spectroscopy in solution, of two new Ru-(Cl-Ph-tpy) complexes of the type  $[Ru(Cl-Ph-tpy)(N-N)Cl]Cl$  (where  $N-N = 1,10$ -phenanthroline (phen) or *o*-benzoquinonediimine (*o*-bqdi)). These polypyridyl complexes undergo release of the chlorido ligand forming the corresponding  $[Ru(Cl-Ph-tpy)(N-N)(H_2O)]^{2+}$  species **1a** and **2a**, respectively.

The kinetic data for the reaction of compounds **1** and **2** with 5'-GMP clearly showed that the rate of the reaction depends on the size of the chelating ligand: complex **2** binds 5'-GMP faster than **1**. This order of reactivity can be explained by the bulky phen chelator that causes steric hindrance during the associative bond formation process compared to the more compact *o*-bqdi ligand. On the other hand, we have also shown that the reactivity of the associative substitution reaction on Ru(II) can be increased by the addition of  $\pi$ -acceptor aromatic rings. This is because of the ability to withdraw  $\pi$ -electron density more strongly from metal center as found in the case of the phen complex **1** compared to the less reactive bpy complex  $[Ru(Cl-Ph-tpy)(bpy)Cl]Cl$  [16].

The study of the interactions of the complexes with 5'-GMP and DNA provides supportive evidence for a multiple binding mode including the covalent and intercalation interactions. Both complexes show good binding affinity to BSA, with relatively high binding constants. Overall, our study implies that biomolecules such as DNA/BSA are biological targets of the Ru-(Cl-Ph-tpy) compounds that

contain bidentate diimine and heterocycles such as *o*-bqdi or phen.

The pharmacological target of antitumor ruthenium complexes, as well as the exact mechanism of action, has not been unequivocally identified, but it is generally accepted that their activity is related to their ability to bind biomolecules, such as amino acids, proteins and DNA [72, 73]. For example, DNA is believed to be the main biological target of the ruthenium(II) arene complexes [74, 75]. On the other hand, protein targets seem to play a more important role than DNA in the activity of the two most potent ruthenium compounds, namely NAMI-A and KP1019 [7]. Their overall mechanisms differ in that NAMI-A interferes with the regulation of the cell cycle and the extracellular matrix, preventing further tumor metastasis [76], while KP1019 causes direct cell apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway and the formation of reactive oxygen species [77].

The newly synthesized ruthenium(II) complexes **1** and **2** show selective anticancer activity against different types of cancer cells. In some cases, their activity is even higher than that of cisplatin in the same cells. Moreover, it is very important to delineate that these complexes had almost no effect in tested concentrations on viability of healthy cells *in vitro*. The precise mechanism of action of investigated ruthenium(II) complexes is not fully understood. However, our results showed that both complexes decrease viability of cancer cells by induction of apoptosis and/or by cell cycle arrest which implies their different mechanism of action on different types of cancer cells. Moreover, when they induce apoptosis of cancer cells, mitochondrial apoptotic pathway is activated.

The above-said pharmacological investigations support the fact that there exists a strong influence of aromaticity on anticancer activity. The significant outcome of the present investigation regarding the abilities of new ruthenium polypyridyl complexes toward various biological evaluations is that aromaticity notably increased the cytotoxicity.

**Acknowledgements** The authors gratefully acknowledge financial support from the Ministry of Education and Science of the Republic of Serbia (Project Number No. 172011). I.B. wishes to thank Dr. Dionisios Vourloumis for hosting him at his lab (Chemical Biology Lab, I.N.N., NCSR “Demokritos”) and providing access to the NMR facilities.

## References

- Alessio E (2011) *Bioinorganic Medicinal Chemistry*. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim
- Barry PEN, Sadler PJ (2013) Exploration of the medical periodic table: towards new targets. *Chem Commun* 49:5106–5131
- Bruijninx PC, Sadler PJ (2008) New trends for metal complexes with anticancer activity. *J Curr Opin Chem Biol* 12:197–206
- Yan YK, Melchart M, Habtemariam A, Sadler PJ (2005) Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. *Chem Commun* 4764–4776
- Trondl R, Heffeter P, Kowol CR, Jakupec MA, Berger W, Keppler BK (2014) NKP-1339, The first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. *Chem Sci* 5:2925–2932
- Ang WH, Dyson PJ (2006) Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards targeted chemotherapy. *Eur J Inorg Chem* 4003–4018
- Bergamo A, Gaiddon C, Schellens JHM, Beijnen JH, Sava G (2012) Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. *J Inorg Biochem* 106:90–99
- Motswainyana WM, Ajibade PA (2015) Anticancer activities of mononuclear ruthenium(II) coordination complexes. *Adv Chem* 1–21
- Zhao Z, Luo Z, Wu Q, Zheng W, Feng Y, Chen T (2014) Mixed-ligand ruthenium polypyridyl complexes as apoptosis inducers in cancer cells, the cellular translocation and the important role of ROS-mediated signaling. *Dalton Trans* 43:17017–17028
- Kilpin KJ, Dyson PJ (2013) Enzyme inhibition by metal complexes: concepts, strategies and applications. *Chem Sci* 4:1410–1419
- Ang WH, Casini A, Sava G, Dyson PJ (2011) Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action. *J Organomet Chem* 696:989–998
- Sava G, Bergamo A, Dyson PJ (2011) Metal-based antitumor drugs in the post-genomic era: what comes next? *Dalton Trans* 40:9069–9075
- Rilak A, Bratsos I, Zangrando E, Kljun J, Turel I, Bugarić ŽD, Alessio E (2014) New water-soluble ruthenium(II) terpyridine complexes for anticancer activity: synthesis, characterization, activation kinetics, and interaction with guanine derivatives. *Inorg Chem* 53:6113–6126
- Lazić D, Arsenijević A, Puchta R, Bugarić ŽD, Rilak A (2016) DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium(II) terpyridine complexes. *Dalton Trans* 45:4633–4646
- Milutinović MM, Rilak A, Bratsos I, Klisurić O, Vraneš M, Gligorijević N, Radulović S, Bugarić ŽD (2017) New 4′-(4-chlorophenyl)-2,2′:6′,2″-terpyridine ruthenium(II) complexes: synthesis, characterization, interaction with DNA/BSA and cytotoxicity studies. *J Inorg Biochem* 169:1–12
- Milutinović MM, Elmroth SKC, Davidović G, Rilak A, Klisurić O, Bratsos I, Bugarić ŽD (2017) Kinetic and mechanistic study on the reactions of ruthenium(II) chlorophenyl terpyridine complexes with nucleobases, oligonucleotides and DNA. *Dalton Trans* 46:2360–2369
- Nišavić M, Stoiljković M, Cmolatac I, Milošević M, Rilak A, Masnikosa R (2016) Highly water-soluble ruthenium(II) terpyridine coordination compounds form stable adducts with blood-borne metal transporting proteins. *Arab J Chem*. doi:10.1016/j.arabjc.2016.07.021
- Habtemariam A, Melchart M, Fernandez R, Parsons S, Oswald IDH, Parkin A, Fabbiani FPA, Davidson JE, Dawson A, Aird RE, Jodrell DI, Sadler PJ (2006) Structure-activity relationships for cytotoxic ruthenium(II) arene complexes containing N-, N-, N-, O-, and O, O-chelating ligands. *J Med Chem* 49:6858–6868
- Valladolid J, Hortigüela C, Busto N, Espino G, Rodríguez AM, Leal JM, Jalón FA, Manzano BR, Carbayo A, García B (2014) Phenanthroline ligands are biologically more active than their corresponding ruthenium(II) arene complexes. *Dalton Trans* 43:2629–2645

20. Liu Y-J, Zeng C-H, Liang Z-H, Yao J-H, Huang H-L, Li Z-Z, Wu F-H (2010) Synthesis of ruthenium(II) complexes and characterization of their cytotoxicity in vitro, apoptosis, DNA-binding and antioxidant activity. *Eur J Med Chem* 45:3087–3095
21. Du K-J, Wang J-Q, Kou J-F, Li G-Y, Wang L-L, Chao H, Ji L-N (2011) Synthesis, DNA-binding and topoisomerase inhibitory activity of ruthenium(II) polypyridyl complexes. *Eur J Med Chem* 46:1056–1065
22. Navarro-Ranninger C, López-Solera I, González VM, Pérez JM, Alvarez-Valdés A, Martín A, Raithby PR, Masaguer JR, Alonso C (1996) Cyclometalated complexes of platinum and palladium with *N*-(4-chlorophenyl)- $\alpha$ -benzoylbenzylideneamine. In vitro cytostatic activity, DNA modification, and interstrand cross-link studies. *Inorg Chem* 35:5181–5187
23. Erkkila KE, Odom DT, Barton JK (1999) Recognition and reaction of metallointercalators with DNA. *Chem Rev* 99:2777–2796
24. Pérez-Cabré M, Cervantes G, Moreno V, Prieto MJ, Pérez JM, Font-Bardia M, Solans X (2004) Pd(II) and Pt(II) complexes with aromatic diamines: study of their interaction with DNA. *J Inorg Biochem* 98:510–521
25. Delfourne E, Kiss R, Corre LL, Dujols F, Bastide J, Collignon FO, Lesur B, Frydman A, Darro F (2003) Synthesis and in vitro antitumor activity of phenanthroline-7-one derivatives, analogues of the marine pyridoacridine alkaloids ascididemin and meridine: structure-activity relationship. *J Med Chem* 46:3536–3545
26. Delfourne E, Kiss R, Corre LL, Dujols F, Bastide J, Collignon FO, Lesur B, Frydman A, Darro F (2004) Synthesis and in vitro antitumor activity of ring C and D-substituted phenanthroline-7-one derivatives, analogues of the marine pyridoacridine alkaloids ascididemin and meridine. *Bioorg Med Chem* 12:3987–3994
27. Roy S, Hagen KD, Maheswari PU, Lutz M, Spek AL, Reedijk J, van Wezel GP (2008) Phenanthroline derivatives with improved selectivity as DNA-targeting anticancer or antimicrobial drugs. *ChemMedChem* 3:1427–1434
28. Connors TA, Jones M, Ross WC, Braddock PD, Khokhar AR, Tope ML (1972) New platinum complexes with antitumor activity. *Chem Biol Interact* 5:415–424
29. Gale GR, Atkins LM, Walker EM, Smith AB, Meischen SJ (1973) Antitumor action of dichloro(4,5-dimethyl-0-phenylenediamine-*N'*, *N'*)platinum(II). *Proc Soc Exp Biol Med* 142:1349–1354
30. Meischen SJ, Gale GR, Lake LM, Frangakis CJ, Rosenblum MG, Walker EM, Atkins LM, Smith AB (1976) Antileukemic properties of organoplatinum complexes. *J Natl Cancer Inst* 57:841–845
31. Bugarcic T, Habtemariam A, Deeth RJ, Fabbiani FPA, Parsons S, Sadler PJ (2009) Ruthenium(II) arene anticancer complexes with redox-active diamine ligands. *Inorg Chem* 48:9444–9453
32. Meadows KA, Liu F, Sou J, Hudson BP, McMillin DR (1993) Spectroscopic and photophysical studies of the binding interactions between copper phenanthroline complexes and RNA. *Inorg Chem* 32:2919–2923
33. Lausi A, Polentarutti M, Onesti S, Plaisier JR, Busetto E, Bais G, Barba L, Cassetta A, Campi G, Lamba D, Pifferi A, Mande SC, Sarma DD, Sharma SM, Paolucci G (2015) Status of the crystallography beamlines at Elettra. *Eur Phys J Plus* 43:1–8
34. Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallographica Section D* 2:125–132
35. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AGW, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A & Wilson KS (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica Section D* 235:242–; Evans PR and Murshudov GN (2013) How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallographica Section D* 1204–1214
36. Sheldrick GM (2015) SHELXT: Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallographica Section A* 3–8
37. Sheldrick GM (2015) Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica Section C* 3–8
38. Emsley P, Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D* 12:2126–2132
39. Farrugia L (2012) WinGX and ORTEP for Windows: an update. *J Appl Crystallogr* 4:849–854
40. Schrodinger L (2015) The PyMOL Molecular Graphics System. Schrodinger LLC. <http://www.pymol.org>
41. Tarushi A, Polatoglou E, Kijun J, Turel I, Psomas G, Kessissoglou DP (2011) Interaction of Zn(II) with quinolone drugs: structure and biological evaluation. *Dalton Trans* 40:9461–9473
42. Puckett CA, Barton JK (2007) Methods to explore cellular uptake of ruthenium complexes. *J Am Chem Soc* 129:46–47
43. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
44. Zarić M, Mitrović M, Nikolić I, Baskić D, Popović S, Đurđević P, Milosavljević Z, Zelen I (2015) Chrysin induces apoptosis in peripheral blood lymphocytes isolated from human chronic lymphocytic leukemia. *Anticancer Agents Med Chem* 15:189–195
45. Chatterjee D, Sengupta A, Mitra A (2007) Synthesis, characterization and reactivity of a novel ruthenium(II) complex containing polypyridyl ligand. *Polyhedron* 26:178–183
46. Papaefstathiou GS, Sofetis A, Raptopoulou CP, Terzis A, Spyroulias GA, Zafiroopoulos TF (2007) 2,2'-Bipyridine, 1,10-phenanthroline and 2,2':6',2''-terpyridine in gallium(III) chemistry: complexes containing the [GaIII(μ-OH)2]4+ core. *J Mol Struct* 837:5–14
47. Patel MN, Gandhi DS, Parmar PA, Joshi HN (2012) DNA-binding and cleavage activity of polypyridyl ruthenium(II) complexes. *J Coord Chem* 65:1926–1936
48. Jeitler JR, Turnbull MM, Wikaira JL (2003) Synthesis, characterization and structure of transition metal complexes of 4'-methylthio-2,2':6',2''-terpyridyl. *Inorg Chim Acta* 351:331–344
49. Gupta N, Grover N, Neyhart GA, Singh P, Thorp HH (1993) Synthesis and properties of new DNA cleavage agents based on oxoruthenium(IV). *Inorg Chem* 32:310–316
50. Takeuchi KJ, Thompson MS, Pipes DW, Meyer TJ (1984) Redox and spectral properties of monooxo polypyridyl complexes of ruthenium and osmium in aqueous media. *Inorg Chem* 23:1845–1851
51. Dovletoglou A, Adeyemi SA, Meyer TJ (1996) Coordination and redox chemistry of substituted-polypyridyl complexes of ruthenium. *Inorg Chem* 35:4120–4127
52. Root MJ, Deutsch E (1985) Synthesis and characterization of (bipyridine)(terpyridine)(chalcogenoether)ruthenium(II) complexes. Kinetics and mechanism of the hydrogen peroxide oxidation of [(bpy)(tpy)RuS(CH3)2]2+ to [(bpy)(tpy)RuS(O)(CH3)2]2+. Kinetics of the aquation of [(bpy)(tpy)RuS(O)(CH3)2]2+. *Inorg Chem* 24:1464–1471
53. Mondal B, Walawalkar MG, Lahiri GK (2000) Ruthenium terpyridine complexes incorporating azo-imine based ancillary ligands. Synthesis, crystal structure, spectroelectrochemical properties and solution reactivities. *J Chem Soc, Dalton Trans* 4209–4217
54. Mondal B, Paul H, Puranik VG, Lahiri GK (2001) Far-red luminescent ruthenium pyridylimine complexes. *J Chem Soc, Dalton Trans* 481

55. Rilak A, Petrović B, Grgurić-Šipka S, Tešić Ž, Bugarić ŽD (2011) Kinetics and mechanism of the reactions of Ru(II)-arene complex with some biologically relevant ligands. *Polyhedron* 30:2339–2344
56. Rilak A, Bratsos I, Zangrando E, Kljun J, Turel I, Bugarić ŽD, Alessio E (2012) Factors that influence the antiproliferative activity of half sandwich Ru(II)-[9]aneS3 coordination compounds: activation kinetics and interaction with guanine derivatives. *Dalton Trans* 41:11608–11618
57. Rilak A, Pushta R, Bugarić ŽD (2015) Mechanism of the reactions of ruthenium(II) polypyridyl complexes with thiourea, sulfur-containing amino acids and nitrogen-containing heterocycles. *Polyhedron* 91:73–83
58. Hofmann A, Jaganyi D, Munro OQ, Leibr G, van Eldik R (2003) Electronic tuning of the lability of Pt(II) complexes through  $\pi$ -acceptor effects. Correlations between thermodynamic, kinetic, and theoretical parameters. *Inorg Chem* 42:1688–1700
59. Tarushi A, Lafazanis K, Kljun J, Turel I, Pantazaki AA, Psomas G, Kessissoglou DP (2013) First- and second-generation quinolone antibacterial drugs interacting with zinc(II): structure and biological perspectives. *J Inorg Biochem* 121:53–65
60. Tarushi A, Psomas G, Raptopoulou CP, Kessissoglou DP (2009) Zinc complexes of the antibacterial drug oxolinic acid: structure and DNA-binding properties. *J Inorg Biochem* 103:898–905
61. Koumoussi ES, Zampakou M, Raptopoulou CP, Psycharis V, Beavers CM, Teat SJ, Psomas G, Stamatatos TC (2012) First palladium(II) and platinum(II) complexes from employment of 2,6-diacetylpyridine dioxime: synthesis, structural and spectroscopic characterization, and biological evaluation. *Inorg Chem* 51:7699–7710
62. Wang Y, Zhang H, Zhang G, Tao W, Tang S (2007) Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *J Lumin* 126:211–218
63. Deepa S, Mishra AK (2005) Fluorescence spectroscopic study of serum albumin-bromadiolone interaction: fluorimetric determination of bromadiolone. *J Pharm Biomed Anal* 38:556–563
64. Psomas G, Kessissoglou DP (2013) Quinolones and non-steroidal anti-inflammatory drugs interacting with copper(II), nickel(II), cobalt(II) and zinc(II): structural features, biological evaluation and perspectives. *Dalton Trans* 42:6252–6276
65. Wu S, Yuan W, Wang H, Zhang Q, Liu M, Yu K (2008) Synthesis, crystal structure and interaction with DNA and HSA of (*N,N'*-dibenzylethane-1,2-diamine) transition metal complexes. *J Inorg Biochem* 102:2026–2034
66. Fetzer L, Boff B, Ali M, Meng X, Collin JP, Sirlin C, Gaiddon C, Pfeffer M (2011) Library of second-generation cycloruthenated compounds and evaluation of their biological properties as potential anticancer drugs: passing the nanomolar barrier. *Dalton Trans* 40:8869–8878
67. Deljanin M, Nikolić M, Baskić D, Todorović D, Dunlević P, Zarić M, Stanković M, Todorović M, Avramović D, Popović S (2016) Chelidonium majus crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines. *J Ethnopharmacol* 190:362–371
68. Liu SH, Zhao JH, Deng KK, Wu Y, Zhu JW, Liu QH, Xu HH, Wu HF, Li XY, Wang JW, Guo QF (2015) Effect of radiation on cytotoxicity, apoptosis and cell cycle arrest of human osteosarcoma MG-63 induced by a ruthenium(II) complex. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 140:202–209
69. Pucci B, Kasten M, Giordano A (2000) Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia* 2:291–299
70. Hsiao CJ, Hsiao G, Chen WL, Wang SW, Chiang CP, Liu LY, Guh JH, Lee TH, Chung CL (2014) Cephalochromin induces  $G_0/G_1$  cell cycle arrest and apoptosis in A549 human non-small-cell lung cancer cells by inflicting mitochondrial disruption. *J Nat Prod* 77:758–765
71. Gogvadze V, Orrenius S (2006) Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chem Biol Interact* 163:4–14
72. Gallori E, Vettori C, Alessio E, Gonzalez Vilchez F, Vilaplana R, Orioli P, Casini A, Messori L (2000) DNA as a possible target for antitumor ruthenium(III) complexes: a spectroscopic and molecular biology study of the interactions of two representative antineoplastic ruthenium(III) complexes with DNA. *Arhiv Biochem Biophys* 376:156–162
73. Brabec V, Novakova O (2006) DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resist Updates* 9:111–122
74. Peacock AFA, Sadler PJ (2008) Medicinal organometallic chemistry: designing metal arene complexes as anticancer agents. *Chem-Asian J* 3:1890–1899
75. Dougan SJ, Sadler PJ (2007) The design of organometallic ruthenium arene anticancer agents. *Chimia* 61:704–715
76. Antonarakis E, Emadi A (2010) Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer Chemother Pharmacol* 66:1–9
77. Hartinger CG, Zorbas-Seifried S, Jakupec MA, Kynast B, Zorbas H, Keppler BK (2006) From bench to bedside: preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J Inorg Biochem* 100:891–904