

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Vera S. Simić

**ANTIMIKROBNA, CITOTOKSIČNA I
GENOTOKSIČNA AKTIVNOST
NOVOSINTETISANIH KOMPLEKSA
PALADIJUMA(II) I PLATINE(II) SA
2-(DIFENILFOSFINO)BENZALDEHID-1-
ADAMANTOILHIDRAZONOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Vera S. Simić

**ANTIMICROBIAL, CYTOTOXIC AND
GENOTOXIC ACTIVITY OF NEWLY
SYNTHETISED PALLADIUM(II) AND
PLATINUM(II) COMPLEXES WITH
2-(DIPHENYLPHOSPHINO)
BENZALDEHYDE
1-ADAMANTOYLHYDRAZONE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

MENTOR I ČLANOVI KOMISIJE:

Mentor:

Dr Branka Vuković-Gačić, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Ilija Brčeski, vanredni profesor, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Stoimir Kolarević, naučni saradnik, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane _____ 2016. godine

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i u Nacionalnoj kontrolnoj laboratoriji Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije.

Najveću zahvalnost dugujem prof. dr Branki Vuković-Gačić, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, mom mentoru, na stručnom vođenju eksperimentalnog rada i realizaciji ove doktorske disertacije, kao i na pruženoj podršci i poverenju tokom svih ovih godina.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Iliji Brčeskom, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta, članu komisije, na nesebičnoj stručnoj pomoći, idejama, ogromnom trudu i razumevanju.

Neizmernu zahvalnost dugujem dr Stoimiru Kolareviću, naučnom saradniku Biološkog fakulteta, članu komisije, na velikoj pomoći tokom eksperimentalnog rada, kao i na dragocenim sugestijama tokom izrade ove teze.

Prof. dr Siniši Raduloviću, iz Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije i dr Dejanu Jeremiću, sa Katedre za opštu i neorgansku hemiju, Hemijskog fakulteta, puno hvala na svim sugestijama, pomoći i saradnji.

Svim kolegama iz Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije, koji su mi na bilo koji način pomogli i pružili podršku, najtoplije zahvaljujem. Posebno sam zahvalna mojim kolegama iz Nacionalne kontrolne laboratorije mr Dragani Šmidling Koruga i dr Rajku Čebedžiću na stručnim savetima, razumevanju i prijateljskoj atmosferi, kao i mojim dragim laboratorijskim tehničarima na pomoći u svakodnevnom radu.

Zahvaljujem se mojoj dragoj Tijani na prijateljskim savetima i velikoj pomoći u tehničkoj izradi ove disertacije.

Mojoj porodici koja je uvek tu za mene, posebno mojoj majci i mom Srđanu, veliko hvala na svemu što za mene čine i što u mene bezgranično veruju.

**Antimikrobna, citotoksična i genotoksična aktivnost novosintetisanih
kompleksa paladijuma(II) i platine(II) sa
2-(difenilfosfino)benzaldehyd-1-adamantolhidrazonom**

REZIME

Klinička primena hemioterapeutskih agenasa u lečenju infektivnih bolesti i kancera sa sobom nosi brojna ograničenja, usled mogućeg neselektivnog, genotoksičnog i mutagenog dejstva, pojave rezistencije i ozbiljnih neželjenih efekata, što ukazuje na permanentnu potrebu za otkrivanjem i ispitivanjem biološki aktivnih agenasa koji bi mogli biti značajni za razvoj novih hemioterapeutskih lekova. Istraživanja sprovedena u poslednjoj deceniji otkrila su vrlo perspektivne antimikrobne i antikancerske potencijale derivata 2-(difenilfosfino)benzaldehyda i njihovih kompleksa sa prelaznim metalima.

U ovom radu je ispitivana *in vitro* antimikrobna, citotoksična i genotoksična aktivnost novosintetisanih kompleksa Pd(II) i Pt(II) sa 2-(difenilfosfino)benzaldehyd-1-adamantolhidrazonom kao ligandom. U okviru antimikrobne aktivnosti ispitana je i antimikobakterijska i antivirusna aktivnost, koje do sada nisu ispitivane na srodnim jedinjenjima. Ligand i njegovi kompleksi Pd(II) i Pt(II) ispoljili su umereno ili slabo antimikrobno dejstvo na pojedine referentne sojeve bakterija u poređenju sa poznatim antimikrobnim lekovima, a ligand je pokazao snažno bakteriostatičko i baktericidno dejstvo na atenuisanom soju *M. bovis Bacillus Calmette-Guérin*.

Ispitivana jedinjenja imaju dozno-zavisan citotoksični efekat prema normalnoj i malignim ćelijskim linijama, u opsegu aktivnosti referentnih citostatika karboplatine i oksaliplatine. Najbolja citotoksična aktivnost detektovana je na Hep-2 ćelijama poreklom iz kancera larinksa, a najslabiju aktivnost ligand i njegovi Pd(II) i Pt(II) kompleksi pokazali su na A549 ćelijama poreklom iz adenokarcinoma pluća. Zdrave ćelije pluća MRC-5 pokazale su visok stepen otpornosti na ispitivana jedinjenja. Detektovana je visoko-selektivna aktivnost svih ispitivanih supstanci prema kancerskim ćelijama Hep-2. Ostvarena je citotoksična aktivnost liganda prema A549 ćelijama, značajno bolja od karboplatine. Rezultati citotoksične aktivnosti usmerili su dalja istraživanja i na druge aspekte antikancerskog dejstva, pa je ispitan uticaj na proliferaciju ćelija i citostatsko dejstvo, ispitana je indukcija programirane ćelijske

smrti, a kao važan element antimetastatske aktivnosti ispitan je i uticaj na migratorni potencijal ciljnih ćelija. Postignuti su antiproliferativni efekti i citostatska aktivnost niskih koncentracija liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa, koji su slabiji od efekata referentnih citostatika cisplatine, karboplatine i oksaliplatine. Ispitivanje ćelijske smrti pokazalo je da ligand indukuje apoptozu u A549 ćelijama adenokarcinoma pluća. Ligand i Pt(II) kompleks značajno su redukovali potencijal direktne migracije ciljnih ćelija, u rangu ili nešto slabije od cisplatine, a najbolji antimigratorni efekat ostvario je Pt(II) kompleks prema kancerskim ćelijama Hep-2.

Genotoksični potencijal liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa ispitan je *in vitro* kao jedan od važnih aspekata bezbednosti za dalja *in vivo* istraživanja i eventualnu kliničku primenu. Pd(II) kompleks je pokazao genotoksični efekat na zdravim ćelijama pluća MRC-5, a ligand na kancerskim ćelijama Hep-2.

Ligand i Pt(II) kompleks ostvarili su slab antivirusni potencijal prema poliovirusu tip 1, pri čemu je dobijen bolji antivirusni efekat liganda na adsorpciju virusa i bolji antivirusni efekat Pt(II) kompleksa na replikaciju virusa.

Ova istraživanja su pokazala da su derivati 2-(difenilfosfino)benzaldehida sa adamantil grupom dobri kandidati za dalja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja i da se mogu razmatrati kao potencijalni hemoterapeutici, sa izraženim antimikrobnim, citotoksičnim, antiproliferativnim i antimigratornim svojstvima, i slabijim genotoksičnim potencijalom u odnosu na citostatik cisplatinu.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Mikrobiologija, Eksperimentalna onkologija, Genotoksikologija

UDK broj: [615.31:[615.28+615.277]]:[615.91+575.113.1](043.3)

Ključne reči: antimikrobna aktivnost, antitumorska aktivnost, antivirusna aktivnost, hemioterapeutici, ćelijske linije, apoptoza, oštećenja DNK, poliovirus, koordinacioni kompleksi, acilhidrazoni, fosfinski ligandi

**Antimicrobial, cytotoxic and genotoxic activity of newly synthesised
palladium(II) and platinum(II) complexes with
2-(diphenylphosphino)benzaldehyde 1-adamantoylhydrazone**

ABSTRACT

The clinical use of chemotherapeutic agents in the treatment of infectious diseases and cancers is limited due to nonselective, genotoxic and mutagenic effects, resistance development and serious side effects. There is a constant need for new biologically active agents which could be used to develop new chemotherapeutic drugs.

Research conducted in the last decade have revealed very promising antimicrobial and anticancer potential of 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde derivatives and its complexes with transition metals.

In this study, antimicrobial, cytotoxic and genotoxic activity of newly synthesised Pd(II) and Pt(II) complexes, with 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde 1-adamantoylhydrazone as a ligand, were investigated *in vitro*. The antimicrobial activity testing included antimycobacterial and antiviral activity tests, which have not yet been studied in related compounds. In comparison with well known antimicrobial agents, ligand and its Pd(II) and Pt(II) complexes exhibited a low to medium antimicrobial effect on the tested bacterial strains. The ligand had strong bacteriostatic and bactericidal effect on the attenuated *M. bovis Bacillus Calmette-Guérin* strain.

Tested compounds exhibited dose-dependent cytotoxic effects on normal and cancer cell lines, within the activity range of cytostatics carboplatin and oxaliplatin. The highest cytotoxicity of the compounds was detected in larynx cancer Hep-2 cells and the lowest in A549 lung adenocarcinoma cells. The MRC-5 cells, derived from normal lung tissue, manifested high tolerance to the tested compounds. The compounds were characterized by relatively high cytotoxicity in cancerous Hep-2 cells when compared to healthy MRC-5 cells. The results obtained from the examination of cytotoxicity in A549 cells revealed that the ligand displays cytotoxic activity which is markedly higher than that of carboplatin.

The results which showed the cytotoxic potential of the tested compound directed further research towards their other anticancer attributes, such as their influence

on cell proliferation and cytostatic activity, induction of programmed cell death, and impact on cell motility potential which is an important aspect of antimetastatic activity. Low concentrations of ligand exhibited antiproliferative and cytostatic effects, which were lower in comparison with the tested cytostatics cisplatin, carboplatin and oxaliplatin. Examination of the cell death showed that the ligand induces apoptosis in adenocarcinoma A549 cells. The ligand and Pt(II) complex significantly reduced cell migration similar to or slightly less than cisplatin. The Pt(II) complex displayed the strongest antimigratory effect in Hep-2 cells.

Palladium(II) and platinum(II) complexes with 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde 1-adamantoylhydrazones show a weaker genotoxic potential than cisplatin which decreases the risks associated with the possible *in vivo* and clinical studies, which could accelerate the development of new chemotherapeutic anti-infection and anticancer drugs, which have low toxicity and less side effects. Our results obtained *in vitro* showed that Pd(II) complex has a genotoxic effect in MRC-5 cells while the ligand induces a genotoxic effect in Hep-2 cells.

Ligand and Pt(II) complex showed low antiviral potential against poliovirus type 1. The ligand itself expressed better antiviral activity than its complex with Pt(II) due to the prevention of viral adsorption. On the other hand, the Pt(II) complex expressed higher antiviral potential through the ability to reduce viral replication in comparison to the ligand.

This research showed that the 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde derivatives with the adamantyl group represent very good candidates for further *in vitro* and *in vivo* investigation and that they should be considered as potential chemotherapeutic agents with pronounced antimicrobial, cytotoxic, antiproliferative and antimigratory characteristics and weaker genotoxic potential in comparison with cisplatin.

Keywords: antimicrobial activity, anticancer activity, antiviral activity, chemotherapeutic agents, cell lines, apoptosis, DNA damage, poliovirus, coordination complexes, acylhydrazones, phosphine ligands

Scientific Field: Biology

Specific research field: Microbiology, Experimental oncology, Genotoxicology

UDK Number: [615.31:[615.28+615.277]]:[615.91+575.113.1](043.3)

Spisak skraćenica korišćenih u tekstu

5-FU – 5-fluorouracil

A549 – epitelne ćelije adenokarcinoma pluća

AO – akridin oranž

BCG – *Bacillus Calmette-Guérin*

CFU – eng. Colony Forming Unit – broj jedinica koje formiraju kolonije

CLT – klotrimazol

CMV – Cytomegalovirus

CPE – citopatogeni efekat

DMSO – dimetil sulfoksid

Dpba – 2-(difenilfosfino)benzaldehyd

DPBS – eng. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

EB – etidijum bromid

EC₅₀ – eng. Effective concentration 50

EDQM – European Directorate for the Quality of Medicines

EDTA – eng. Ethylenediaminetetraacetic acid

EFX – enrofloksacin

EMA – eng. European Medicines Agency

FBS – eng. fetal bovine serum

GPEI – eng. Global Polio Eradication Initiative

HBV – virus hepatitisa B

HCV – virus hepatitisa C

Hep-2 – epitelne ćelije humanog karcinoma larinksa

HSV – Herpes Simplex Virus

IC₅₀ – eng. Inhibitory concentration 50

INF – interferon

IU – internacionalna jedinica

LMP – eng. Low Melting Point

LPS - lipopolisaharid

MBC – eng. Minimal Bactericidal Concentration, minimalna baktericidna koncentracija

MFC – eng. Minimal Fungicidal Concentration, minimalna fungicidna koncentracija

MIC – eng. Minimal Inhibitory Concentration, minimalna inhibitorna koncentracija

MRC-5 – ćelije fibroblasta normalnog tkiva pluća

MRSA – meticilin-rezistentni sojevi *Staphylococcus aureus*

NMP – eng. Normal Melting Point

NSCLC – Non-Small Cell Lung Cancer, nemikrocelularni karcinom pluća

OTC – oksitetraciklin

OTM – eng. Olive tail moment

PBS – eng. Phosphate Buffered Saline Solution

PDT – Population Doubling Time, vreme dupliranja populacije ćelija

Ph – fenil grupa

Ph. Eur. – eng. European Pharmacopoeia

PV – poliovirus

rpm – eng. Rounds Per Minute, broj obrtaja u minuti

RT – reverzna transkriptaza

SCGE – eng. Single Cell Gel Electrophoresis, elektroforeza pojedinačnih ćelija

SDA – Sabouraud dekstrozni agar

SDB – Sabouraud dekstrozni bujon

STM – streptomocin

TCID₅₀ – eng. Tissue Culture Infections Dose 50

THI – eng. Therapeutic Index – terapijski indeks

TI – eng. Tail Intensity – intenzitet repa

Tio – tioglikolatna podloga

TL – eng. Tail Length – dužina repa

TOP1 – topoizomeraza I

TOP2 – topoizomeraza II

TSA – tripton soja agar

TSB – tripton soja bujon

VHP – eng. Vaporized hydrogen peroxide

VSV – Vesicular Stomatitis Virus

VZV – Varicella Zoster Virus

WHO – eng. World Health Organization – Svetska zdravstvena organizacija

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Opšti principi hemioterapije; pojam selektivne toksičnosti.....	2
1.2. Antibakterijski i antigljivični agensi.....	4
1.2.1. Testovi za ispitivanje antimikrobne aktivnosti.....	7
1.3. Antivirusni agensi.....	8
1.3.1. Nivoi antivirusnog dejstva.....	8
1.3.2. Interferoni.....	9
1.3.3. Antivirusno dejstvo na različite faze virusnog infektivnog ciklusa.....	10
1.4. Antikancerski agensi.....	13
1.4.1. Antikancerski hemioterapeutici na bazi platine.....	15
1.4.2. Rezistencija na antikancerske agense.....	18
1.5. Tipovi ćelijske smrti.....	19
1.6. Migracija tumorskih ćelija.....	21
1.7. Ćelijske linije.....	21
1.8. Testovi za ispitivanje citotoksičnosti.....	23
1.9. Testovi za ispitivanje antivirusne aktivnosti.....	24
1.10. Primena resazurina u <i>in vitro</i> ispitivanjima.....	25
1.11. Značaj ispitivanja genotoksičnosti u razvoju novih lekova.....	26
1.12. Komet test.....	27
1.13. Kompleksi metala u razvoju novih hemioterapeutika.....	28
1.13.1. Izbor i uloga liganada u hemijskim i biološkim svojstvima koordinacionih kompleksa.....	29
1.14. Hidrazoni i acilhidrazoni.....	29
1.15. Derivati 2-(difenilfosfino)benzaldehyda.....	31
1.15.1. Ligand 2-(difenilfosfino)benzaldehyd-1-adamantolhidrazon i njegovi kompleksi paladijuma(II) i platine(II).....	32
1.16. Adamantan u strukturama bioaktivnih jedinjenja.....	34
2. CILJEVI.....	37
3. MATERIJAL I METODE.....	38

3.1. Materijal	38
3.1.1. Biološki materijal	38
3.1.1.1. Bakterije i gljivice	38
3.1.1.2. Referentni standard poliovirusa i neutralizaciona antitela	38
3.1.1.3. Čelijske linije	39
3.1.2. Kompleksi Pd(II) i Pt(II) sa 2-(difenilfosfino)benzaldehyd-1- adamantolhidrazonom	39
3.1.2.4. Priprema rastvora liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa	40
3.1.3. Antimikrobni lekovi	40
3.1.4. Citostatici	41
3.1.5. Rastvori	42
3.1.6. Hranljive podloge	46
3.2. Metode	53
3.2.1. Ispitivanje sterilnosti rastvora liganda, kompleksa Pd(II) i kompleksa Pt(II) metodom membranske filtracije	53
3.2.2. Priprema sojeva mikroorganizama – oživljavanje i kultivacija	54
3.2.2.1. Kultivacija referentnih sojeva bakterija i gljivica	54
3.2.2.1.1. Identifikacija referentnih sojeva bakterija i gljivica	55
3.2.2.2. Kultivacija <i>Mycobacterium bovis</i>	56
3.2.2.2.1. Identifikacija <i>Mycobacterium bovis</i>	57
3.2.2.3. Priprema suspenzije mikroorganizama	58
3.2.2.3.1. Priprema suspenzije referentnih sojeva bakterija i gljivica	58
3.2.2.3.2. Priprema suspenzije <i>Mycobacterium bovis</i>	58
3.2.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti	58
3.2.4. Čelijske kulture	59
3.2.4.1. Održavanje čelijskih kultura	59
3.2.4.2. Tripsinizacija čelijskih kultura	61
3.2.4.3. Određivanje broja ćelija pomoću hemocitometra, bojenjem tripan plavim	61
3.2.5. Test citotoksičnosti	62
3.2.6. Prolifracija ćelija i određivanje vremena dupliranja populacije ćelija	63
3.2.7. Morfološka analiza čelijske smrti bojenjem ćelija rastvorom akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB)	65

3.2.8. Ispitivanje uticaja na migratorni potencijal ćelija <i>in vitro</i> (Wound healing ili Scratch assay).....	65
3.2.9. Ispitivanje genotoksičnosti komet testom	66
3.2.10. Određivanje titra virusa referentnog standarda PV1	67
3.2.11. Priprema virusne suspenzije PV1	68
3.2.12. Ispitivanje antivirusne aktivnosti praćenjem citopatogenog efekta	69
3.2.13. UptiBlue™ test	70
3.2.14. Statističke analize.....	71
4. REZULTATI.....	73
4.1. Antimikrobna aktivnost liganda i njegovih Pd(II) i Pt(II) kompleksa.....	73
4.2. Citotoksičnost liganda i njegovih Pd(II) i Pt(II) kompleksa na ćelijskim linijama MRC-5, Hep-2 i A549	75
4.2.1. Selektivna toksičnost prema kancerskim ćelijama Hep-2 i A549	82
4.3. Efekat liganda i njegovih Pd(II) i Pt(II) kompleksa na proliferaciju i vreme dupliranja populacije ćelija MRC-5, Hep-2 i A549.....	84
4.3.1. Efekat na MRC-5 ćelije	84
4.3.2. Efekat na Hep-2 ćelije	88
4.3.3. Efekat na A549 ćelije	90
4.4. Morfološka analiza ćelijske smrti A549 ćelija tretiranih ligandom.....	94
4.5. Efekat liganda i njegovih Pd(II) i Pt(II) kompleksa na migratorni potencijal MRC-5, Hep-2 i A549 ćelija	97
4.5.1. Efekat na MRC-5 ćelije	98
4.5.2. Efekat na Hep-2 ćelije	100
4.5.3. Efekat na A549 ćelije	102
4.6. Genotoksičnost liganda i njegovih kompleksa Pd(II) i Pt(II) na MRC-5, Hep-2 i A549 ćelijama.....	103
4.7. Antivirusna aktivnost liganda i njegovih Pd(II) i Pt(II) kompleksa	106
5. DISKUSIJA.....	112
5.1. Antimikrobna aktivnost.....	112
5.2. Antikancerski potencijal.....	114
5.2.1. Citotoksična aktivnost	115
5.2.2. Antiproliferativna aktivnost.....	117

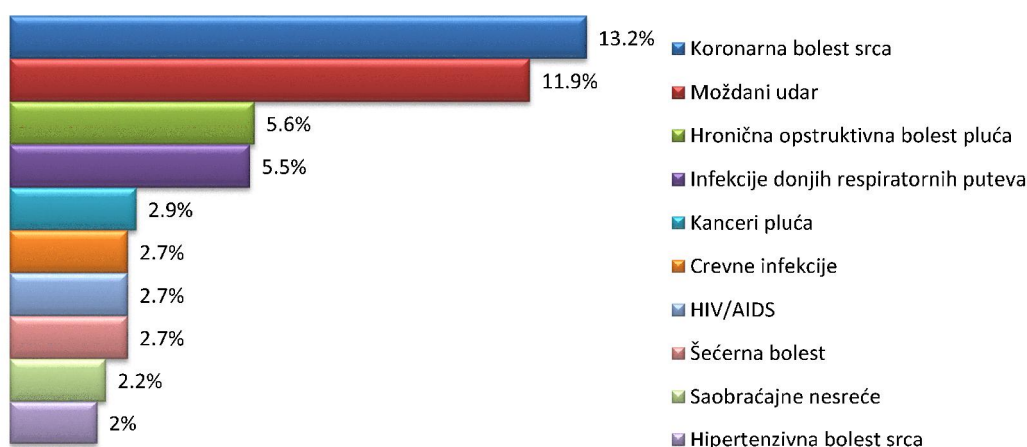
5.2.3. Antimigratorna aktivnost.....	118
5.2.4. Čelijska smrt	118
5.3. Genotoksični potencijal.....	119
5.4. Antivirusni potencijal.....	120
5.5. Biološka aktivnost liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa	121
6. ZAKLJUČCI.....	123
7. LITERATURA.....	125
PRILOG.....	148

UVOD

1. UVOD

Infektivne bolesti i kanceri ubrajaju se u vodeće uzroke smrtnosti u ljudskoj populaciji. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (World Health Organization, WHO) iz 2012. godine (WHO, 2014), među najčešćim uzrocima globalne smrtnosti (**Slika 1.1.**) su infekcije donjih respiratornih puteva (3,1 miliona, 5,5%), crevne infekcije (1,5 miliona, 2,7%) i HIV/AIDS (1,5 miliona, 2,7%). Dva dodatna vodeća uzroka smrtnosti u zemljama sa niskim dohotkom su malarija i tuberkuloza, sa 35 i 31 smrtnih ishoda na 100.000 stanovnika. Infektivne bolesti su uzroci oko 50% smrtnosti dece mlađe od 5 godina (WHO, 2013; Liu i sar., 2015). Usled ekspanzije i efikasne primene antibiotika, tokom 20. veka, u periodu 1900-1980. godine, stopa smrtnosti od infektivnih bolesti opala je 20 puta. Međutim, uglavnom zbog širenja HIV infekcija i rezistentnih bakterijskih patogena, kao što su meticilin-rezistentni sojevi *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomicin-rezistentne enterokoke, multirezistentne gramnegativne bakterije i multirezistentni sojevi *Mycobacterium tuberculosis*, stopa smrtnosti se udvostručila u periodu 1980-2000. godine (Cohen i Mitchell, 2000). Pored toga, kanceri čine veliku grupu uzroka globalne smrtnosti. Od različitih tipova kancera tokom 2012. godine umrlo je 8,2 miliona ljudi i registrovano 14,1 miliona novoobolelih (IARC, 2014; WHO, 2015). Na osnovu procena WHO moglo bi se očekivati da se u naredne dve decenije učestalost pojave kancera poveća za 70%. Najčešće dijagnostifikovani su kanceri dojke, prostate, pluća i kolona. Različiti tipovi kancera pluća u 2012. godini uzroci su 2,9% ukupne smrtnosti u ljudskoj populaciji. Vodeći problem u tretmanima kancera je pojava rezistencije na primenjene hemioterapeutske lekove, a u zavisnosti od primenjenog hemioterapeutika, 31-75% obolelih od najčešćeg oblika karcinoma pluća – nemikrocelularnog karcinoma, zbog pojave rezistencije ne odreaguje na terapiju (d'Amato i sar., 2006).

Vodeći uzroci smrtnosti u 2012. godini



Slika 1.1. Uzroci smrtnosti u svetu u 2012. godini. Preuzeto sa izmenama (WHO, 2014)

Prikazani podaci jasno pokazuju da u savremenoj medicini i farmaciji postoji stalna potreba za razvojem novih lekova za lečenje infektivnih bolesti i kancera, usled pojave rezistencije na postojeće lekove koji se koriste u kliničkoj praksi.

1.1. Opšti principi hemioterapije; pojam selektivne toksičnosti

Infektivne bolesti i kanceri imaju različitu etiologiju, a ono što ih povezuje su slični farmakološki principi koji se primenjuju u terapijama ovih bolesti. U terapijama infektivnih bolesti i kancera koriste se raznovrsni prirodni, polusintetički i sintetički hemijski agensi – hemioterapeutici, a tretmani ovih oboljenja označeni su kao hemioterapija. Prema vrsti biološkog agensa koji uzrokuje infekciju ili kancer, hemioterapeutske agensi koriste se u antimikrobnoj, antiparazitskoj i antineoplastičnoj (antikancerskoj) hemioterapiji (Golan i sar., 2011; Brenner i Stevens, 2013).

Glavni cilj primene hemioterapije je zaustavljanje vitalnih funkcija invazivnih bioloških agensa – mikroorganizama, parazita ili kancerskih ćelija i njihova eliminacija iz organizma. Cilj je takođe da se hemioterapijom ne oštete zdrave ćelije organizma, što

se u nekim slučajevima ne postiže u potpunosti, pa primena hemioterapije rezultuje i pojavom neželjenih efekata. Osnovni princip hemioterapeutskog dejstva je selektivna toksičnost, odnosno, veće toksično dejstvo na invazivni biološki agens nego na ćelije organizma. Selektivna toksičnost postiže se delovanjem na specifične osetljive mete koje ne postoje u ćelijama domaćina ili su, ukoliko postoje, ove mete nedostupne ili značajno različite. Kao osetljive mete mogu poslužiti različite ćelijske strukture, metabolički putevi, enzimi, geni i genski produkti. Veća različitost između ćelija domaćina i invazivnog biološkog agensa olakšava pronalaženje raspoloživih hemioterapeutskih meta i obezbeđuje veću selektivnu toksičnost. Međutim, delovanje hemioterapeutskih agenasa nije uvek strogo odvojeno od ćelijskog metabolizma. Povezanost metaboličkih puteva značajno umanjuje broj potencijalnih mesta dejstva, pa se tada selektivnost postiže većim afinitetom vezivanja hemioterapeutskog agensa za tačke unutar metabolizma infektivnog biološkog agensa.

Takođe je potrebno naglasiti da kancerske ćelije imaju niz specifičnih osobina koje im obezbeđuju brojne prednosti u odnosu na zdrave ćelije, posebno u pogledu preživljavanja, proliferacije i širenja u organizmu, zbog čega je antikancersko delovanje dodatno otežano. Međutim, iste ove osobine mogu biti iskorišćene kao njihove osetljive tačke. Povećana proliferativna sposobnost kancerskih ćelija čini ih podložnim uticajima antikancerskih agenasa koji najčešće deluju na ćelije u deobi ili u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa.

Uzevši u obzir prethodno opisane probleme u pronalaženju odgovarajućih meta, možemo reći da se hemioterapeutsko dejstvo u tretmanima infekcija i kancera zasniva na ciljanom delovanju na kvantitativne i kvalitativne, molekularne i biohemijske razlike između ćelija organizma i patogena, odnosno maligno izmenjenih ćelija.

Tvorac koncepta moderne hemioterapije je nemački lekar i naučnik Paul Ehrlich (1854-1915), dobitnik Nobelove nagrade za fiziologiju i medicinu 1908. godine (Thorburn, 1983). Ehrlich je je prvi postulirao princip selektivne toksičnosti koji je kasnije nazvan teorijom „magičnog metka“ (Neu i Gootz, 2001). Za otkrivanje selektivnog dejstva ključna su bila istraživanja pomoću kontrastnih boja koje su se različito vezivale unutar inficiranog tkiva. U Ehrlich-ovoj laboratoriji sintetisan je arsfenamin (Salvarsan), prvi sintetički antimikrobni lek i razvijen prvi planirani hemioterapijski postupak za lečenje sifilisa i tripanozomijaze. Takođe, ispitivanje

antikancerskog dejstva anilin boja i prvih, primitivnih alkilirajućih agenasa pokazalo se kao značajano za kasniji razvoj antikancerskih lekova.

Savremeni pristup u razvoju novih lekova zasniva se na racionalnom dizajnu prema odgovarajućoj biološkoj meti i pronalaženju aktivnog jedinjenja prema ciljnom biohemijskom procesu (Mandal i sar., 2009; Huggins i sar., 2012; Zhan i sar., 2013). Međutim, veliki broj hemioterapeutskih agenasa otkriven je nasumično, tradicionalnom trijažom, odnosno ispitivanjem potencijalnih bioloških aktivnosti, pri čemu su mehanizmi dejstva naknadno ispitivani.

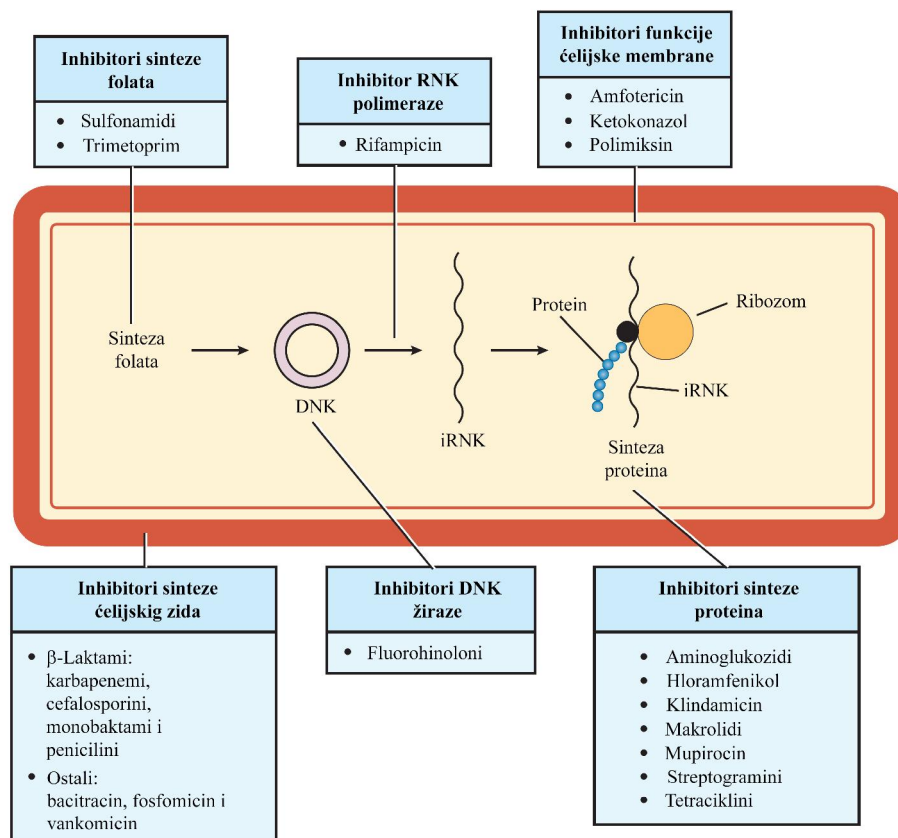
Uspešnost kliničke primene antimikrobnih agenasa ogleda se u selektivnom dejstvu na patogeni mikroorganizam. U zavisnosti od organizma koji prouzrokuje infekciju, u antimikrobne agense ubrajaju se antibakterijski, antigljivični i antivirusni agensi (Brenner i Stevens, 2013).

1.2. Antibakterijski i antigljivični agensi

Brojne specifičnosti u građi bakterija ukazuju na mnošto raspoloživih antibakterijskih meta (Brenner i Stevens, 2013). Najuspešniji antibakterijski agensi deluju na izgradnju bakterijskog ćelijskog zida, sintezu proteina ili replikaciju i transkripciju DNK. Relativno mali broj agenasa koji se koriste u kliničkoj praksi aktivan je na nivou ćelijske membrane ili utiče na specifične metaboličke procese bakterijske ćelije (Greenwood i Whitley, 2003). Mehanizmi antibakterijskog i antigljivičnog dejstva prikazani su na **slici 1.2.** i **slici 1.3.**

Biosinteza ćelijskog zida i prisustvo ove strukture kod većine vrsta bakterija predstavlja osnovu za selektivno antibakterijsko dejstvo širokog spektra. Inhibitori sinteze ćelijskog zida, kao što su β -laktami (penicilini, cefalosporini, karbapenemi i monobaktami), sprečavaju umrežavanje peptidnih lanaca peptidoglikana i formiranje rigidne strukture ćelijskog zida (Green, 2002). Jedinjenja koja su po strukturi slična D-alanil-D-alaninu ćelijskog zida – β -laktami, kovalentno se vezuju za penicilin-vezujuće proteine i tako blokiraju mehanizam transpeptidacije peptidnih lanaca. Smanjena osetljivost gramnegativnih bakterija na β -laktame posledica je strukturne specifičnosti ćelijskog zida ovih bakterija i prisustva lipopolisaharidnog kompleksa (LPS). Pojedini antigljivični agensi novije generacije, kao što su ehinokandini (kapsofungin), inhibiraju

sintezu 1,3- β -D-glukana, esencijalnog polisaharida ćelijskog zida gljiva (Georgopadaku, 2001).

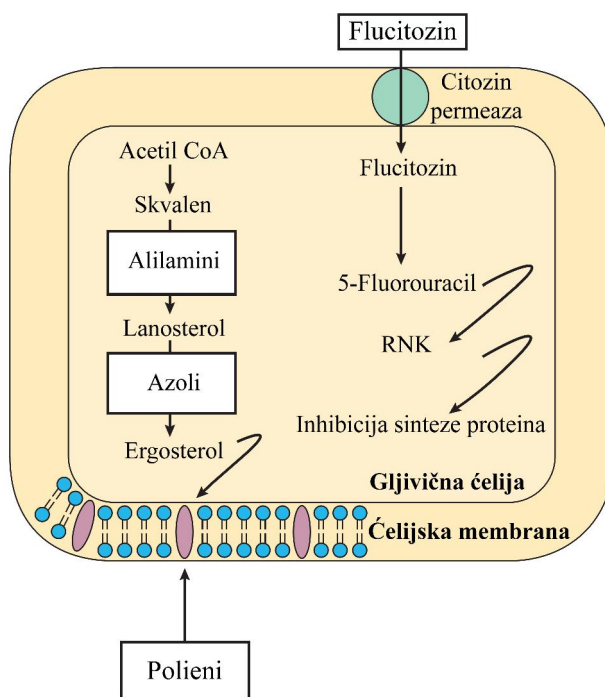


Slika 1.2. Mesta dejstva antibakterijskih agenasa. Preuzeto sa izmenama (Brenner i Stevens, 2013)

Antibakterijski efekat aminoglikozida, kojima pripada streptomycin, ostvaruje se blokiranjem sinteze proteina u početnim fazama, ireverzibilnom inhibicijom 30S subjedinice ribozoma. Tetraciklini se reverzibilno vezuju za 30S ribozomske subjedinice i sprečavaju vezivanje aminoacil-tRNK za kompleks iRNK-ribozomi, što remeti pristup novih aminokiselina rastućem peptidnom lancu. Makrolidi i linkozamidi specifično se vezuju za 23S rRNK na 50S subjedinici ribozoma. Hloramfenikol se reverzibilno vezuje za 50S subjedinicu bakterijskih ribozoma, inhibira peptidiltransferazu i tako sprečava elongaciju peptidnog lanca. Antigljivični agens flucitozin se u gljivičnoj ćeliji

konvertuje u 5-fluorouracil, koji se u RNK inkorporira umesto uracila, što rezultuje sintezom pogrešnih proteina (**Slika 1.3.**).

Inhibicija sinteze DNK postiže se delovanjem na DNK žirazu (topoizomeraza II), a ovaj mehanizam antibakterijskog dejstva karakterističan je za fluorohinolone (ciprofloksacin, enrofloksacin). Rifampicin je inhibitor RNK polimeraze, a kako ovaj enzim ćelija sisara nije osetljiv na rifampicin, omogućeno je selektivno dejstvo. Antigljivični agens flucitozin, izuzev inhibicije proteinske sinteze, deluje i na sintezu DNK inhibicijom timidilat sintetaze, ključnog enzima u biosintezi timidina.



Slika 1.3. Mesta dejstva antigljivičnih lekova. Preuzeto sa izmenama (Brenner i Stevens, 2013)

Antibakterijski agensi koji deluju inhibicijom funkcija citoplazmatične membrane - polimiksini i imidazoli, ponašaju se kao katjonski deterdženti, odnosno površinski aktivna jedinjenja koja menjaju permeabilnost membrane, reakcijom sa fosfatnim grupama molekula fosfolipidnog dvosloja (Brenner i Stevens, 2013). Ovi agensi takođe deluju i na LPS gramnegativnih bakterija. Mnogi antigljivični lekovi u najširoj upotrebi, polieni (amfotericin B, nistatin), vezuju se za ergosterol u membrani

gljivica. Azoli (klotrimazol) blokiraju sintezu prekursora ergosterola – lanosterola, a alilamini inhibiraju skvalen epoksidazu, pa se u ćeliji gljivica nakuplja toksični skvalen.

Inhibicija ćelijskog metabolizma zasniva se na zaustavljanju bakterijske sinteze folne kiseline. Za razliku od većine bakterija, sisarske ćelije ne sintetišu folnu kiselinu, čime je omogućeno selektivno dejstvo inhibitora folata. Sulfonamidi se kompetitivno vezuju za aktivno mesto dihidripteorat sintetaze, čime se inhibira sinteza dihidrofolata. Trimetoprim inhibira drugi važan enzim u biosintezi folne kiseline – dihidrofolat reduktazu, koju sintetišu i sisarske ćelije, a selektivno dejstvo omogućeno je usled većeg afiniteta trimetoprima prema bakterijskoj dihidrofolat reduktazi.

Opisanim mehanizmima antimikrobni agensi indukuju različite reverzibilne i ireverzibilne promene, pa shodno tome i efekti mogu biti privremeni (bakteriostatički i fungistatički efekat) ili trajni (baktericidni i fungicidni efekat) (Pankey i Sabath, 2004).

1.2.1. Testovi za ispitivanje antimikrobne aktivnosti

U ispitivanjima osetljivosti bakterija i gljivica na postojeće hemioterapeutike, kao i u ispitivanjima antimikrobne aktivnosti novih antimikrobnih agenasa, određuju se parametri aktivnosti: minimalna inhibitorna koncentracija (eng. Minimal Inhibitory Concentration, MIC) – najmanja koncentracija antimikrobnog agensa koja inhibira vidljivi rast mikroorganizama; i minimalna baktericidna koncentracija (eng. Minimal Bactericidal Concentration, MBC) – najmanja koncentracija koja sprečava rast $\geq 99,9\%$ mikroorganizama, nakon subkultivacije inicijalnog inokuluma u medijumu bez ispitivanog agensa. Za određivanje aktivnosti antimikrobnih agenasa primenjuju se različite kvalitativne i kvantitativne standardizovane metode – difuzione (Bauer i sar., 1966), dilucione (Wiegand i sar., 2008) i kombinovane metode (Joyce i sar., 1992), kao i visokoosetljivi automatizovani sistemi (npr. VITEK 2 sistem, bioMérieux) koji vrše identifikaciju, ispitivanje osetljivosti mikroorganizama na različite antimikrobne agense i detekciju mehanizama rezistencije. Ovi sistemi su bazirani na reakcijama mikroorganizama sa supstratima za biohemijsku detekciju njihovih karakteristika, a kinetika rasta mikroorganizama vrši se merenjem fluorescencije u kratkim intervalima tokom inkubacije sa specifičnim reagensima (Stager i Davis, 1992; Ling i sar., 2001; Ligozzi i sar., 2002).

1.3. Antivirusni agensi

Virusi kao obligatni intracelularni paraziti za razmnožavanje upotrebljavaju metaboličku mašineriju ćelije domaćina. Usled uske povezanosti virusnog i ćelijskog metabolizma i teškog postizanja selektivnosti, od velikog broja agenasa za koje je otkriveno antivirusno dejstvo, samo mali broj je onih koji su uspešno primenjeni u profilaksi i terapiji virusnih infekcija. Suprotno ostalim antimikrobnim agensima, postizanje veće selektivnosti antivirusnog agensa rezultuje užim spektrom dejstva (De Clercq, 2002). Dejstvo antivirusnih agenasa uglavnom je usmereno na različite korake u virusnoj replikaciji, što predstavlja poseban problem za tretmane latentnih infekcija koje su nedostupne za antivirusno delovanje (White i Fenner, 1994).

Novi antivirusni lekovi retko se razvijaju prema racionalnom dizajnu. Antivirusna aktivnost se otkriva slučajno, a mehanizmi delovanja naknadno ispituju. Trenutno dostupna antivirusna hemioterapija uglavnom je indikovana za tretmane infekcija uzrokovanih herpesvirusima, retrovirusima (HIV, hepatitis B i C) i ortomiksovirusima (influenza A i B). Iako se ulažu veliki naponi da se proširi opseg antivirusne hemioterapije i na viruse drugih familija, za pojedine velike grupe virusa, kao što su pikornavirusi (enterovirusi), ne postoje odobreni lekovi (De Palma i sar., 2008a; Linden i sar., 2015). Na značaj ispitivanja novih hemijskih agenasa koji deluju na polioviruse ukazuje i projekat (započet 2006. godine) razvoja lekova protiv infekcija izazvanih poliovirusom (De Palma i sar., 2008b), koji je predložila Inicijativa za globalnu eradicaciju poliovirusa (eng. Global Polio Eradication Initiative, GPEI), formirana 1988. godine (Aylward i Tangermann, 2011).

1.3.1. Nivoi antivirusnog dejstva

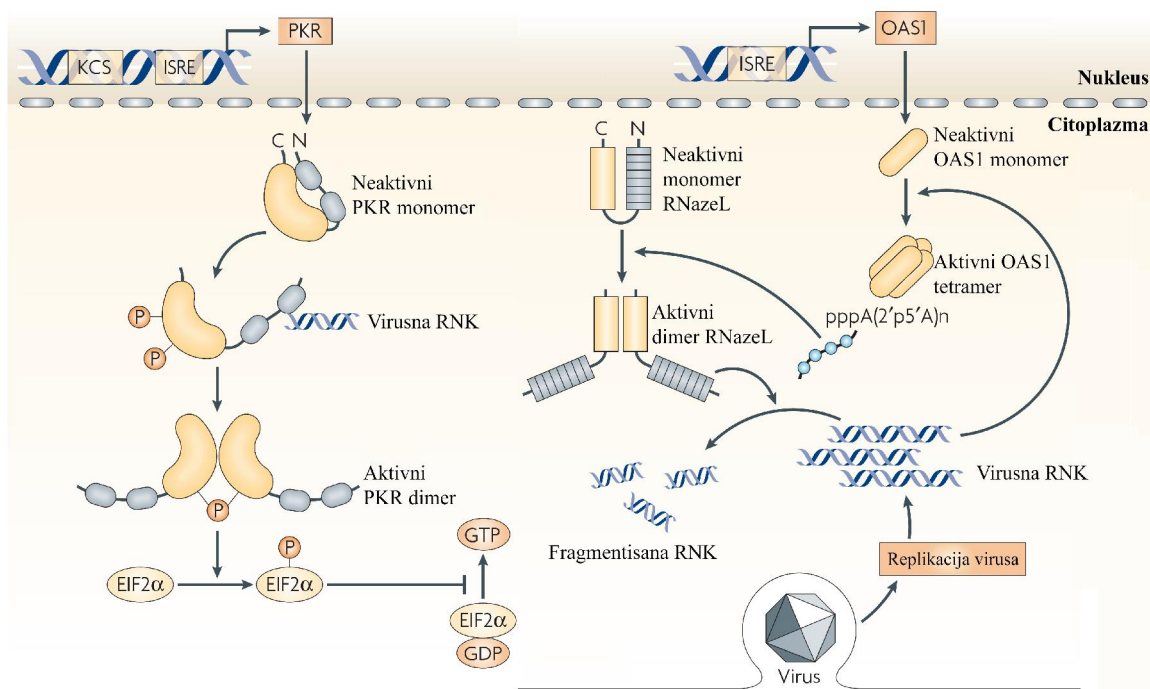
Antivirusni agensi mogu delovati na ekstracelularnom i intracelularnom nivou. Ekstracelularni nivo zasniva se na delovanju pre početka infektivnog ciklusa virusa. Ovaj nivo dejstva ogleda se u oštećenju virusnog lipoproteinskog omotača ili proteina kapsida, a nastale promene onemogućavaju adsorpciju i uzrokuju gubitak infektivnog potencijala virusa. Ovakav efekat najčešće se postiže na visokim koncentracijama antivirusnog agensa izrazito toksičnim za ćeliju, pa se agensi sa ekstracelularnim

dejstvom retko mogu primeniti u kliničkoj praksi. Antivirusni agensi koji deluju na intracelularnom nivou aktivni su u nekoj od faza virusnog infektivnog ciklusa. Na intracelularnom nivou dejstvo se postiže aktivacijom/deaktivacijom ćelijskih ili inhibicijom virusnih enzima, što dovodi do promena u biosintezi virusnih nukleinskih kiselina ili proteina. Na intracelularnom nivou efekat se može postići i u malim koncentracijama agensa, netoksičnim za ćeliju, pa je ovaj nivo antivirusnog dejstva od posebnog značaja za kliničku primenu.

Pojedini antivirusni agensi, kao što su interferoni, imaju širok spektar dejstva, zbog čega se koriste kao pozitivne kontrole u ispitivanjima antivirusnog dejstva novih antivirusnih agenasa.

1.3.2. Interferoni

Interferoni čine grupu antivirusnih agenasa prirodnog porekla koji se, zbog svoje efikasnosti, koriste kod mnogih akutnih i hroničnih virusnih infekcija. To su mali signalni proteini (citokini) koji se sintetišu u ćelijama svih vrsta kičmenjaka. Interferoni α (leukocitarni), β (fibroblastni) i γ (limfocitni), od kojih su posebno značajni α i β interferoni, deluju na viruse nespecifično i aktivni su u uspostavljanju antivirusnog stanja u organizmu. Antivirusna aktivnost interferona bazira se na izmeni interakcije između virusa i ćelije domaćina. U normalnim uslovima količine interferona u ćeliji su neznatne. Indukcija sinteze interferona dešava se samom virusnom infekcijom, a produkcija je veoma brza i intenzivna. Interferon se oslobađa iz ćelije u kojoj je sintetisan i vezuje za specifične receptore (IFNAR1 i IFNAR2) na plazma membrani susednih ćelija (Thomas i sar, 2003). Ovo pokreće složenu signalnu kaskadu kojom se aktiviraju ćelijski enzimi (**Slika 1.4.**) koji zatim ograničavaju ukupnu sintezu proteina u ćeliji putem degradacije iRNK ili inhibicije translacije, što se odražava i na umnožavanje virusa (White i Fenner, 1994; Silverman, 2007; Chung i sar., 2008; Sadler i Williams, 2008).



Slika 1.4. Indukcija antivirusnih efektor interferona (INF). U indukciji učestvuju dva enzimska sistema: protein-kinaza (PKR) i 2'5' oligoadenilat-sintetaza (OAS1). PKR i OAS1 aktiviraju se u ćeliji u kojoj je replikacija virusa već otpočela, uz prisustvo dsRNA intermedijera u replikaciji virusnog genoma. PKR inhibira proteinsku sintezu fosforilacijom faktora inicijacije translacije (EIF2α). OAS1 aktivira RNazuL koja vrši degradaciju iRNA. Preuzeto sa izmenama (Sadler i Williams, 2008).

Interferon pokreće i ćelijske apoptotske puteve i ćelija oštećena virusnom infekcijom ulazi u programiranu ćelijsku smrt (Takaoka i sar., 2003). Takođe je poznato i antiproliferativno i antitumorsko dejstvo interferona (Baron i sar., 1991).

1.3.3. Antivirusno dejstvo na različite faze virusnog infektivnog ciklusa

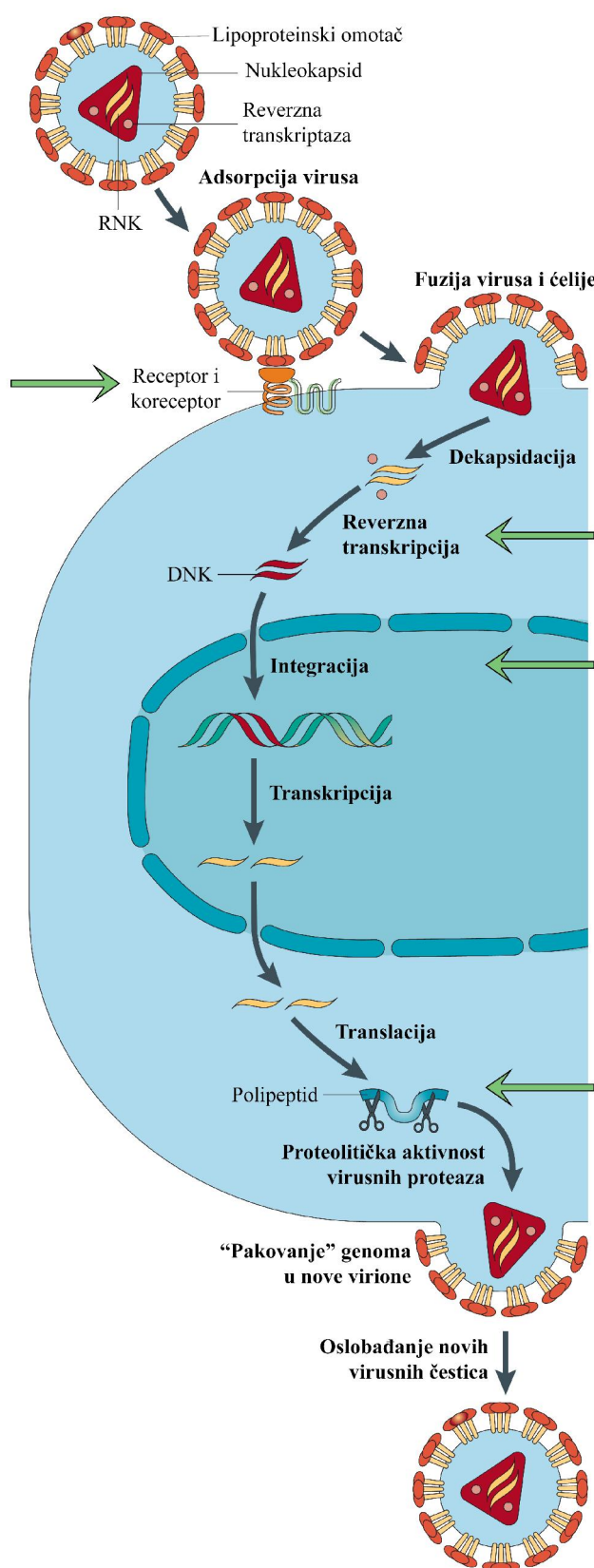
Većina poznatih antivirusnih lekova deluje specifično u određenim fazama virusnog infektivnog ciklusa. Antiviroci koji antivirusno dejstvo postižu u početnim fazama su inhibitori fuzije lipidnog omotača virusa i inhibitori M2 proteina. Inhibitori fuzije, među kojima je najznačajniji maravirok, deaktiviraju specifične CCR5 koreceptore na površini ćelija CD4+ T-limfocita, što je savremena strategija u razvoju

anti-HIV lekova (**Slika 1.5.**). Na fazu dekapcidacije virusa deluju blokatori M2 selektivnih jonskih kanala – amantadin i rimantadim, koji se koriste u infekcijama izazvanim influenza A virusima (Antonelli i Turriziani, 2012).

Kasnije faze virusnog infektivnog ciklusa karakteriše intenzivna biosinteza komponenti virusa, gde se uključuju i specifični enzimi virusa, aktivni u procesima replikacije, transkripcije i translacije virusnog genoma (DNK i RNK polimeraze, reverzne transkriptaze), ugradnje virusnog genoma u ćelijsku DNK (integrase) i formiranja funkcionalnih virusnih proteina (protease) (Safrin, 2009; Lou i sar., 2014). Ovi specifični enzimi su posebno značajna mesta za antivirusno dejstvo, jer su to tačke razdvajanja ćelijskog i virusnog metabolizma koje obezbeđuju visoku selektivnost (De Clercq, 2004).

Inhibicija DNK polimeraze je antivirusni mehanizam koji se više decenija primenjuje u borbi protiv herpesvirusa – Herpes Simplex (HSV-1 i HSV-2), Varicella Zoster virusa (VZV) i Cytomegalovirusa (CMV) (Antonelli i Turriziani, 2012). Tipičan inhibitor ovog enzima je aciklovir koji inhibira sintezu DNK virusa kompeticijom sa guanozintrifosfatom (GTP) ili inkorporacijom u viralnu DNK (Elion, 1983). Ribavirin je inhibitor RNK polimeraze koji se primarno koristi u tretmanima hepatitisa C i virusne hemoragične groznice (Paeshuyse i sar., 2011).

Inhibicija reverzne transkriptaze (RT), integrase i proteaze (**Slika 1.5.**) su mehanizmi upotrebljeni za antivirusno dejstvo protiv retrovirusnih infekcija, gde posebno mesto zauzimaju lekovi protiv HIV infekcija (Craigie, 2001; De Clercq, 2002; de Béthune, 2010). Primeri RT inhibitora su zalcitabin (Hivid[®]), stavudin (Zerit[®]), lamivudin (Epivir[®]), zidovudin, nevirapin (Viramune[®]). Raltegravir (Isentress[®]) je prvi odobreni lek sa mehanizmom inhibicije integrase (Temesgen i Siraj, 2008; Hicks i Gulick, 2009). Inhibitori proteaza – lopinavir u kombinaciji sa ritonavirom (Kaletra[®]), indinavir (Crixivan[®]), sakvinavir (Invirase[®]), darunavir (Prezista[®]), boceprevir (Victrelis[®]) vrlo su efikasni i protiv virusa hepatitisa B i C (HBV i HCV).



Slika 1.5. Infektivni ciklus HIV virusa i mesta dejstva antiretrovirusnih agenasa obeležena strelicama. Preuzeto sa izmenama (De Clercq, 2002)

Antivirusna aktivnost u poslednjoj fazi virusnog infektivnog ciklusa postiže se inhibicijom neuraminidaza, što za posledicu ima formiranje virusnih agregata na spoljašnjoj površini ćelije i smanjenje količine oslobođenih virusa (Liu i sar., 1995; Calfee i Hayden, 1998). Ova strategija se koristi za tretmane infekcija izazvanih influenza virusima, posebno u pandemiji sojeva H5N1, a najznačajniji antivirotici sa ovim mehanizom dejstva su zanamivir i oseltamivir (Moscona, 2005; Hurt i sar., 2007).

1.4. Antikancerski agensi

Tokom višestepenog razvoja kancera, kancerske ćelije stiču određene biološke karakteristike koje im obezbeđuju preživljavanje, rast i širenje po organizmu. Osnovna obeležja kancera opisali su Hanahan i Weinberg 2000. godine i to su: samostalna kontrola rasta, izbegavanje signala supresora rasta, izbegavanje programirane ćelijske smrti – apoptoze, neograničeni replikativni potencijal (imortalizacija), formiranje krvnih sudova (angiogeneza) i sposobnost invazije tkiva i metastaziranja (Hanahan i Weinberg, 2000). Kao rezultat konceptualnog progressa u poslednjoj deceniji, ovim obeležjima dodata su još dva – reprogramiranje energetskog metabolizma i izbegavanje imunološkog odgovora organizma (Hanahan i Weinberg, 2011). U osnovi svih ovih obeležja nalazi se genomska nestabilnost kancerske ćelije koja dovodi do genetičkog diverziteta i ubrzanog sticanja navedenih osobina, kao i inflamacija premalignih i malignih promena koja podstiče nastanak i propagaciju kancera.

Trenutno se na tržištu nalazi veliki broj antikancerskih lekova, prirodnog i sintetičkog porekla. Na osnovu strategije lečenja, antikancerski lekovi koriste se u citotoksičnoj, hormonskoj i ciljanoj hemioterapiji. Hormonska hemioterapija primenjuje se kod hormonski-zavisnih tipova kancera koji vode poreklo od tkiva kod kojih kortikosteroidni ili polni hormoni izazivaju velike promene u ekspresiji gena. Ciljana hemioterapija se zasniva na blokiranju specifičnih signalnih puteva neophodnih za preživljavanje ćelija kancera preko inhibicije receptora i enzima signalne kaskade, delovanjem malih molekula (do 800 Da) i monoklonskih antitela (Li i sar., 2012). Citotoksična hemioterapija obuhvata većinu postojećih antikancerskih lekova, koji usled slabe selektivne toksičnosti deluju i na kancerske i na zdrave ćelije. Citotoksični antikancerski agensi mogu delovati ciklus-specifično – samo na ćelije koje su u deobi,

ciklus-nespecifično – ukoliko dejstvo nije vezano za ćelijsku deobu, i fazno-specifično – ukoliko je dejstvo usmereno na konkretnu fazu ćelijskog ciklusa (Brenner i Stevens, 2013). Prema mehanizmima dejstva i mestu aktivnosti, citotoksični antikancerski agensi mogu se svrstati u nekoliko kategorija – antimetabolite, alkilirajuće agense, inhibitore topoizomeraza, interkalirajuće agense i inhibitore mitotičkog deobnog vretena.

Antimetaboliti inhibiraju sintezu DNK kompeticijom sa ćelijskim molekulima i deluju specifično u S fazi ćelijskog ciklusa. Prema hemijskoj strukturi, antimetaboliti mogu biti analozi purina (merkaptopurin, tioguanin, pentostatin, kladribin), pirimidina (5-fluorouracil, gemcitabin, citarabin) i folne kiseline (metotreksat) (Peters i sar., 2002; McGuire, 2003).

Alkilirajući agensi su velika grupa citotoksičnih lekova koji kovalentno vezuju alkil grupu za odgovarajuće mesto na molekulu DNK i time direktno oštećuju njegovu strukturu (Brenner i Stevens, 2013). Aktivnost ovih agenasa zavisi od ćelijske proliferacije, ali nije vezana za konkretnu fazu ćelijskog ciklusa. Alkilirajućim agensima pripadaju azotni plikavci (ifosamid, ciklofosfamid), nitrozourea (karmustin), aziridini (mitomicin C), alkil-sulfonati (busulfan) i triazini (dakarbazin, prokarbazin, temozolomid).

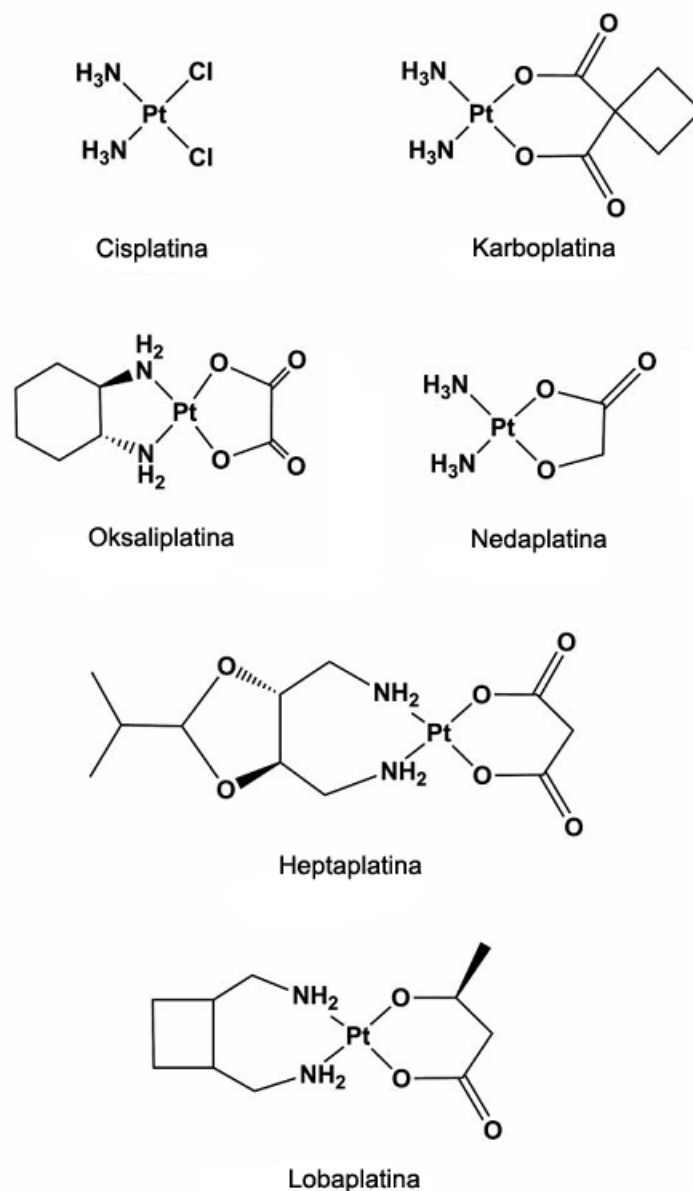
Inhibitori topoizomeraza su fazno-specifični antikancerski agensi, koji svoj efekat ostvaruju inhibicijom enzima topoizomeraze I (TOP1) ili II (TOP2) i sprečavaju ulazak ćelije u M fazu ćelijskog ciklusa. Predstavnik inhibitora TOP1 je kamptotecin, izolovan iz biljke *Camptotheca acuminata*, i njegovi polusintetički derivati – topotekan i irinotekan, a najznačajniji inhibitor TOP2 je etopozid (Li i Liu, 2001; Cheung-Ong i sar., 2013).

Interkalirajući agensi se ugrađuju između baznih parova ili u male žlebove DNK spirale, što indukuje distorziju, odmotavanje DNK i ometanje polimerazne aktivnosti tokom transkripcije i replikacije (Hortobagyi, 1997). Ovoj grupi pripadaju pojedini antikancerski antibiotici, kao što su antraciklini (epirubicin i doksorubicin), aktinomicin D, bleomicin i drugi. Za mnoge antikancerske antibiotike utvrđeno je više mehanizama dejstva. Antraciklini i bleomicin, na primer, formiraju slobodne radikale koji izazivaju fragmentaciju DNK, a antraciklini imaju dodatno snažno dejstvo preko inhibicije aktivnosti TOP2.

Inhibitori mitotičkog deobnog vretena (mitotički otrovi) deluju specifično u M fazi ćelijskog ciklusa. Ovaj mehanizam dejstva imaju vinka alkaloidi, taksani izolovani iz kore tise *Taxus brevifolia* i njihovi polusintetički derivati. Vinka alkaloidi (vinblastin, vinkristin, vindezin i vinorelbin) deluju na proces formiranja deobnog vretena zaustavljanjem polimerizacije tubulina, dok su taksani – paklitaksel (prirodni) i docetaksel (polusintetički derivat), inhibitori depolarizacije (Wang i sar., 1999; Jordan i Wilson, 2004).

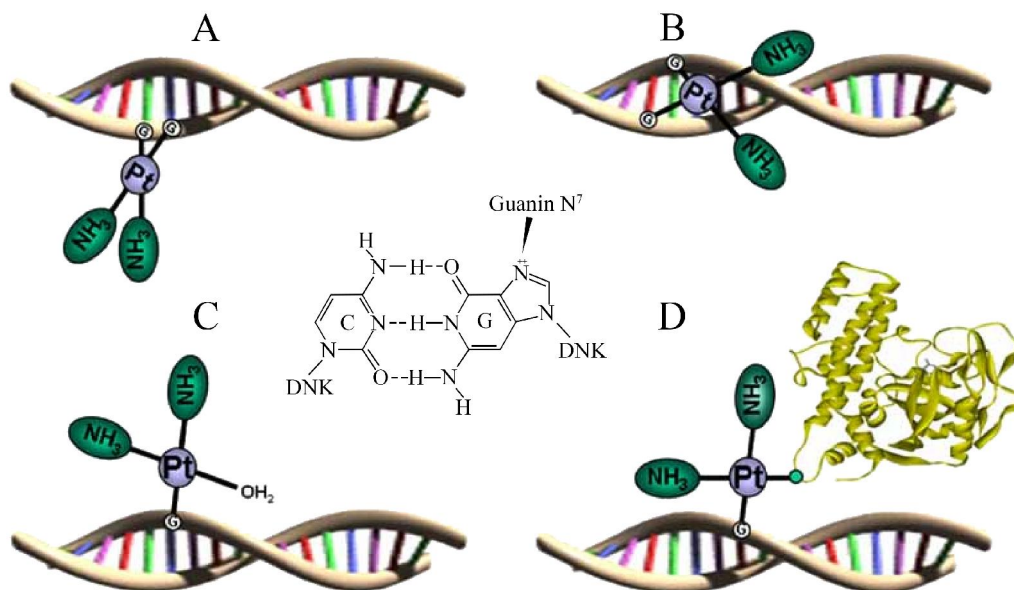
1.4.1. Antikancerski hemioterapeutici na bazi platine

Antikancerski hemioterapeutici na bazi platine su najefikasniji agensi koji se koriste u onkološkoj praksi. To je mala grupa lekova u globalnoj upotrebi koju čine cisplatina, karboplatina i oksaliplatina, i nekoliko lekova odobrenih samo u pojedinim zemljama – nedaplatina, heptaplatina i lobaplatina (**Slika 1.6.**).



Slika 1.6. Hemijska struktura onkoloških lekova na bazi platine. Preuzeto sa izmenama (Wheate i sar., 2010)

Jedinjenja platine formiraju kovalentne veze na poziciji N⁷ purinskih baza (**Slika 1.7.**), gradeći monofunkcionalne adukte, inter- i intralančane unakrsne veze ili veze između DNK i proteina (Bertini i sar., 1994; Cepeda i sar., 2007). Najčešći tip DNK oštećenja izazvan ovim agensima su intralančane unakrsne veze (crosslinkers). Oštećenja DNK praćena su odmotavanjem DNK heliksa, kao i savijanjem i prekidanjem DNK lanaca (Cepeda i sar., 2007).



Slika 1.7. Mesta dejstva cisplatine u molekulu DNK i formiranje adukata. (A) – 1,2 intralančane unakrsne veze; (B) – interlančane unakrsne veze; (C) – monofunkcionalni adukti; (D) – veze DNK i proteina. Preuzeto sa izmenama (Cepeda i sar., 2007)

Cisplatina (*cis*-diamindihloridoplatina(II)) je u širokoj upotrebi u tretmanima kancera testisa i ovarijuma, kancera mokraćne bešike, nemikrocelularnog karcinoma pluća (eng. Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) i karcinoma glave i vrata. Nefrotoksičnost i neurotoksičnost najizraženiji su neželjeni efekti primene cisplatine. Tokom transporta cisplatine do mesta dejstva, značajna količina se deaktivira u krvnoj plazmi reakcijom sa proteinima i drugim molekulima (Ivanov i sar., 1998; Arnesano i Natile, 2009).

Karboplatina i oksaliplatina su platinski antikancerski hemioterapeutici druge i treće generacije. Karboplatina u svojoj strukturi sadrži bidentatni ciklobutandikarboksilatni ligand na mestu hloridnih liganada cisplatine, čemu se pripisuju smanjena neželjena dejstva u poređenju sa cisplatinom. Karboplatina ispoljava manju citotoksičnost, pa se koristi u većim koncentracijama od cisplatine. Manje je nefro- i neurotoksična od cisplatine, ali izaziva supresiju koštane srži (leukopeniju, neutropeniju i trombocitopeniju) (Rabik i Dolan, 2007). Zbog smanjene reaktivnosti, karboplatina ima sporiju kinetiku vezivanja za DNK, sporije se izlučuje i duže zadržava u organizmu. Karboplatina je indikovana za tretmane uznapredovalih karcinoma jajnika

epitelnog porekla, mikrocelularnog karcinoma pluća i epitelioma glave i vrata. Međutim, za cisplatinu i karboplatinu ustanovljena je unakrsna rezistencija, odnosno tumori rezistentni na cisplatinu, rezistentni su i na karboplatinu (Rixe i sar., 1996; Stewart, 2007). Oksaliplatina sadrži bidentatni ligand 1,2-diaminocikloheksan na mestu dva aminska liganda karboplatine. Najizraženiji neželjeni efekat oksaliplatine je neurotoksičnost (pojava periferne senzorne neuropatije) (Rabik i Dolan, 2007). Ona je vrlo efikasna prema tumorima rezistentnim na cisplatinu, pa je indicirana za lečenje kolorektalnih tumora (Boulikas i Vougiouka, 2003; Boulikas i sar., 2007).

Nedaplatina je u kliničkoj upotrebi u Japanu, strukturno je slična karboplatini, sa istim opsegom antitumorskog dejstva. Heptaplatina je odobrena u Južnoj Koreji, za tretmane gastričnih kancera. Lobaplatina je odobrena u Kini i koristi se u tretmanima NSCLC i kancera dojke. Ograničena upotreba ovih jedinjenja rezultat je izražene mijelosupresije, a heptaplatina i lobaplatina dovode i do blage hepatotoksičnosti (Dabrowiak, 2009; Wheate i sar., 2010).

Poseban problem u primeni antikancerskih lekova na bazi platine je visoka učestalost pojave rezistencije. Poznato je da hemioterapija jedinjenima platine nije potpuno zadovoljavajuća usled dejstva na relativno uzak opseg tumora, neselektivnog dejstva, toksičnosti za zdrava tkiva i mutagenog dejstva. Osim toga, ovi lekovi primenjuju se intravenski zbog ograničene rastvorljivosti u vodi i izazivaju veoma ozbiljne neželjene efekte koji su u vezi sa izraženim toksičnim efektima.

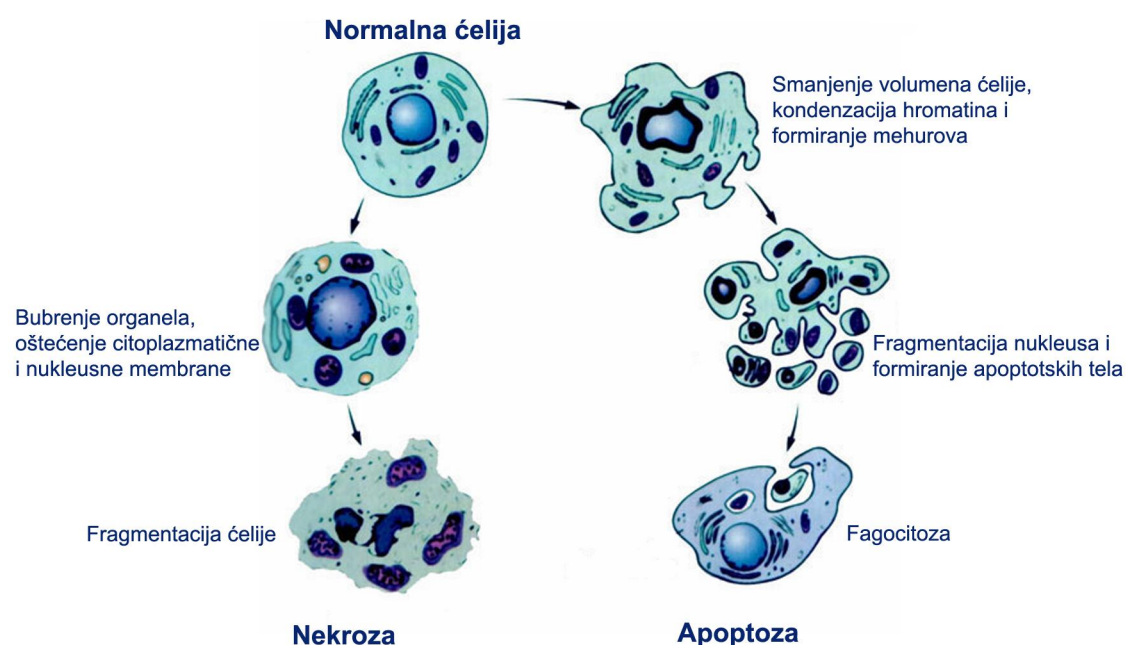
1.4.2. Rezistencija na antikancerske agense

Glavni razlog neuspeha u lečenju kancera je pojava rezistencije koja može biti prisutna i pre primene terapije (primarna ili urođena) ili se može razviti tokom terapije (sekundarna ili stečena). Rezistencija na veći broj hemioterapeutika koji su različiti po strukturi i mehanizmima dejstva, označava se kao višestruka ili multirezistencija (eng. Multi-Drug Resistance). U osnovi rezistencije leži genomska nestabilnost kancerske ćelije koja promenama u genomu stiče sposobnost adaptacije na prisustvo leka, pa daljim umnožavanjem formira dominantnu populaciju rezistentnih ćelija. Smanjena akumulacija leka u ćeliji, povećana inaktivacija i detoksifikacija, povećana reparacija oštećenja DNK, smanjena osetljivost na apoptotski odgovor i nedostaci u putevima koji

vode u ćelijsku smrt, najučestaliji su mehanizmi koji, pojedinačno ili kombinovano, dovode do pojave rezistencije (Chu, 1994; Kelland, 2000; Fuertes i sar., 2003; Rebucci i Michiels, 2013).

1.5. Tipovi ćelijske smrti

Homeostatska kontrola i ekvilibrijum broja ćelija u organizmu ostvaruje se dinamičkim balansom ćelijske deobe i ćelijske smrti. Iako se u literaturi opisuje nekoliko tipova ćelijske smrti, dva najčešća oblika su apoptoza i nekroza (**Slika 1.8.**).



Slika 1.8. Morfološke razlike između apoptoze i nekroze

Apoptoza je akivan, energetski zavisian, genski regulisan, ireverzibilni fiziološki proces, praćen autodestrukcijom ćelije i označava se kao „programirana ćelijska smrt“. (Kroemer i sar., 2009; Bortner i Cidlowski, 2014). Poremećaji u procesu apoptoze dešavaju se u brojnim patološkim stanjima organizma, kao što je kancerogeneza u kojoj su apoptotski procesi suprimirani. Apoptoza se dešava i u virusnim infekcijama i neurodegenerativnim i autoimunim stanjima u kojima je stimulisana. Apoptozu karakteriše niz sledljivih morfoloških promena, kao što su skupljanje i smanjenje volumena ćelije, kondenzacija hromatina, kompakcija organela, pojava mehurića na

ćelijskoj membrani i formiranje apoptotskih tela; i niz biohemijskih pojava, kao što su alternacije ćelijskih signalnih puteva, premeštanje fosfatidilserina na spoljašnju stranu plazma membrane, oslobađanje citohroma C iz mitohondrija, aktivacija enzima specifične familije cistein-proteaza – kapsaza, poremećaji regulacije pro-apoptotskih Bax i ekspresija anti-apoptotskih proteina Bcl-2 (Elmore, 2007). Apoptotske ćelije se iz organizma uklanjaju fagocitozom okolnih ćelija, što rezultuje odsustvom inflamatorne reakcije.

Nekroza je pasivan tip ćelijske smrti koji nastaje usled kolapsa ćelijskih homeostatskih mehanizama, a indukovana je snažnim nefiziološkim, fizičkim ili hemijskim stimulusima. Nekroza se morfološki odlikuje bubrenjem organela i čitave ćelije, ranom rupturom citoplazmatične i nukleusne membrane i lizom ćelije, što izaziva inflamatornu reakciju u okolnom tkivu (Golstein i Kroemer, 2007; Kroemer i sar., 2009).

U antikancerskoj hemioterapiji indukcija apoptoze je poželjan događaj, pa ispitivanje antikarcenske aktivnosti novih agenasa obuhvata i ispitivanje tipa ćelijske smrti. Metode zasnovane na morfološkim i ultrastukturnim razlikama apoptoze i nekroze obuhvataju primenu fluorescentne i elektronske mikroskopije (Vejselova i sar., 2014; Vejselova i Kutlu, 2015) i protočne citometrije, a ćelijska smrt se može ispitivati i preko biohemijskih karakteristika – aktivnosti kapsaza, DNK fragmentacije, mitohondrijalnih poremećaja i dr. Za isticanje morfoloških karakteristika živih neapoptotskih, apoptotskih i ćelija u nekrozi koristi se diferencijalno bojenje ćelija rastvorom boja akridin oranž i etidijum bromid (AO/EB). AO prodire u žive i rano apoptotske ćelije, kojima je integritet membrane očuvan i vezuje se za DNK u jedru, uz emisiju zelene fluorescencije. Vezivanje AO za RNK, mitohondrijalnu DNK ili lizosome u citoplazmi rezultuje crvenom fluorescencijom. EB prodire u ćelije kojima je integritet membrane narušen – kasno apoptotske i nekrotične ćelije i emituje crvenu fluorescenciju nakon interkalacije u DNK. Na osnovu emisije fluorescencije, integriteta ćelijske membrane i morfoloških karakteristika hromatina u obojenim nukleusima, sa značajnom preciznošću se može odrediti koji tip ćelijske smrti dominira u populaciji ćelija (Baškić i sar., 2006).

1.6. Migracija tumorskih ćelija

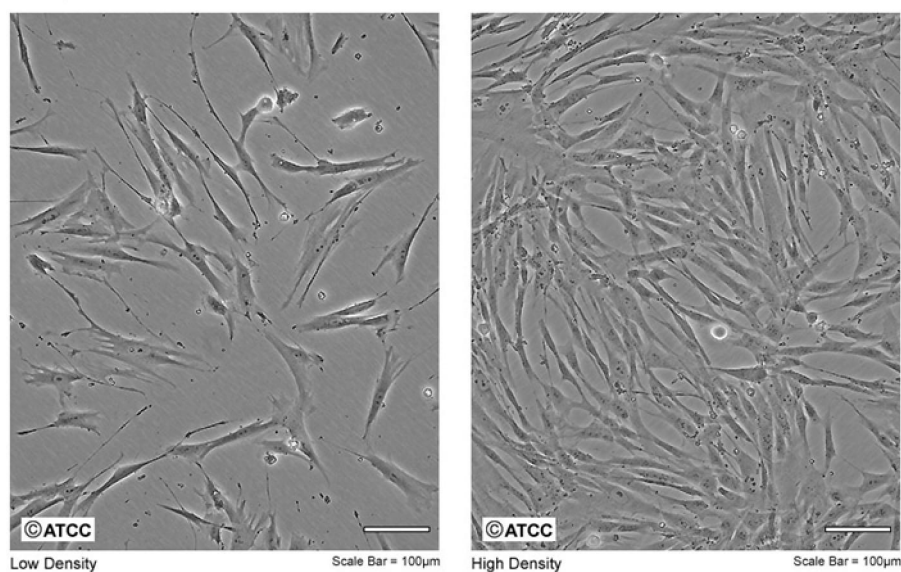
Izuzev indukcije apoptoze i inhibicije rasta malignih tumora, antikancerski hemioterapeutici mogu ispoljiti i druge tumor supresivne karakteristike uključujući uticaj na složenu invazivno-metastatsku kaskadu u kojoj aktivno kretanje tumorskih ćelija ima centralnu ulogu u procesima invazije lokalnog tkiva, intra- i ekstrasvazaciji i formiranju mikrometastaza. Kretanje tumorskih ćelija stimulirano je komponentama vanćelijskog matriksa i faktorima koje sintetišu ćelije domaćina i same tumorske ćelije (autokrini faktori kretanja), faktorima rasta i hijaluronom. Migracija tumorskih ćelija je inicijalni korak u metastazi tumora pri prelasku tumora iz *in situ* u invazivni oblik i finalni korak na mestu formiranja sekundarnog tumora (Aznavorian i sar., 1993; Hanahan i Weinberg, 2011). Literaturni podaci pokazuju da antikancerski agensi dovode do preobražaja citoskeleta maligne ćelije, rearanžmana aktinskih filamenata i gubitka ćelijskih filopodija (Yamazaki i sar., 2005; Zeidan i sar., 2008).

Uticaj na migratorni potencijal ćelija prati se u *in vitro* uslovima na različitim 2D i 3D modelima, a pomoću *Wound healing* ili *Scratch* testa prati se zatvaranje proreza u ćelijskom monosloju (Decaestecker i sar., 2007). Ovaj test u izvesnoj meri imitira migraciju ćelija *in vivo*, pa je zato jedan od prvih testova u ispitivanjima novih antikancerskih jedinjenja.

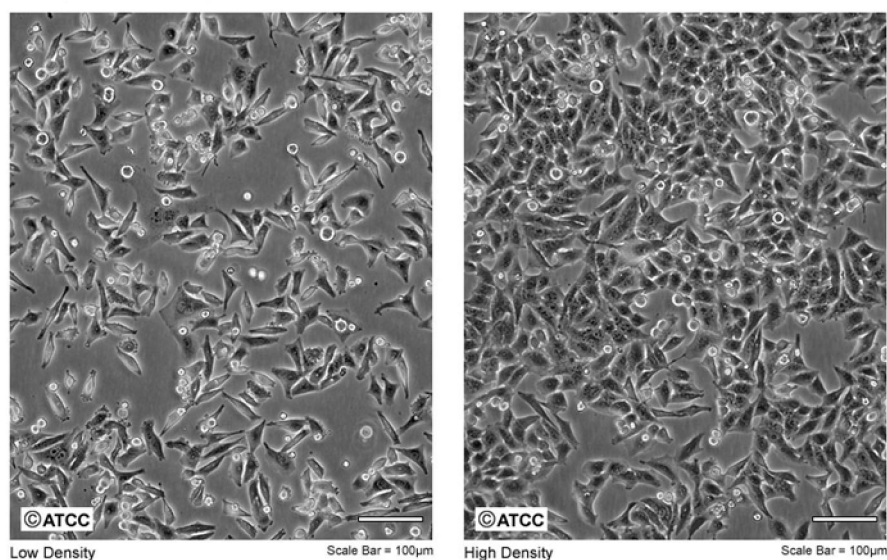
1.7. Ćelijske linije

Biološki efekti *in vitro* prate se na ćelijskim linijama koje vode poreklo iz različitih zdravih ili kancerskih tkiva.

MRC-5 ćelijska linija nastala je iz normalnog tkiva pluća muškog fetusa starog 14 nedelja (Jacobs i sar., 1970). Ova ćelijska linija se koristi za testiranje citotoksičnosti supstanci, kao i u virusologiji, jer su ćelije MRC-5 veoma osetljive na prisustvo humanog poliovirusa tip 1, Herpes Simplex virusa i Vesicular Stomatitis virusa (VSV). MRC-5 ćelije se kultivisu adherirane, a prema morfološkoj karakterizaciji slične su fibroblastima (**Slika 1.9.**). Sposobne su da prođu kroz 42 do 46 dupliranja populacije pre pojave senescencije.



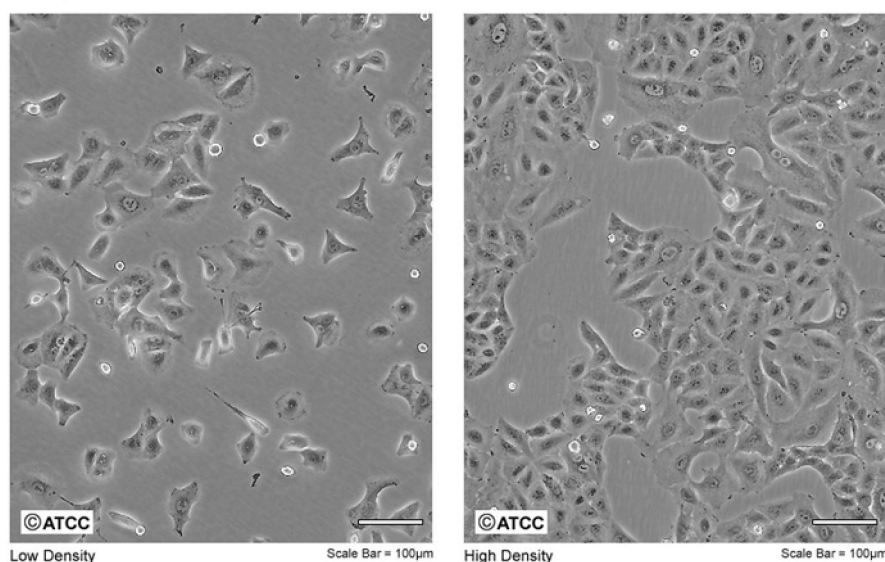
Slika 1.9. Fotomikrografije monosloja MRC-5 ćelija male (levo) i velike gustine (desno) (ATCC, 2014)



Slika 1.10. Fotomikrografije monosloja Hep-2 ćelija, male (levo) i velike gustine (desno) (ATCC, 2014)

Hep-2 ćelijska linija (**Slika 1.10.**) vodi poreklo od epitelnih ćelija humanog karcinoma larinksa 56-godišnjeg muškarca. Ova ćelijska linija dobijena je iz tumora nastalog nakon ubrizgavanja humanih kancerskih ćelija lakinksa ozračenim pacovima koji su prethodno tretirani kortizonom (Moore i sar., 1955; Fjelde, 1955). Hep-2 ćelije

se koriste u virusologiju za propagaciju poliovirusa, arbovirusa, measles virusa, adenovirusa 3 i VSV (Indiana serotip).



Slika 1.11. Fotomikrografije monosloja A549 ćelija, male (levo) i velike gustine (desno) (ATCC, 2014)

A549 ćelijska linija (**Slika 1.11.**) vodi poreklo od epitelnih ćelija adenokarcinoma pluća muškarca starog 58 godina (Giard i sar., 1972). Ove ćelije u kulturi rastu u monosloju i ne zadržavaju strukturne ni funkcionalne karakteristike tkiva iz kog su poreklom. A549 ćelije sintetišu lecitin, sadrže visok nivo nezasićenih masnih kiselina i pozitivne su na prisustvo keratina (Lieber i sar., 1976). Koriste se za ispitivanje metabolizma lekova.

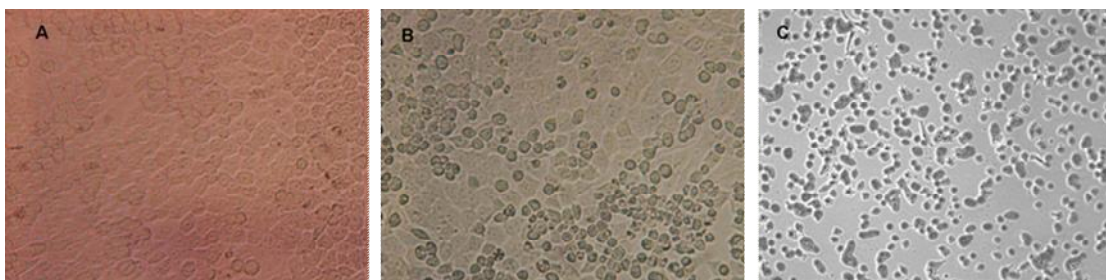
1.8. Testovi za ispitivanje citotoksičnosti

Uticaj nekog agensa na preživljavanje, proliferaciju ili metabolizam ćelija definiše se kao citotoksičnost i ona može, ali ne mora biti praćena ćelijskom smrću. Za ispitivanje citotoksičnosti dostupan je veliki broj testova od kojih se neki zasnivaju na merenju vijabilnosti ćelija na osnovu promene integriteta ćelijske membrane, dok drugi

detektuju promene ćelijskog metabolizma. Merenje vijabilnosti na osnovu metaboličke aktivnosti mitohondrija najčešća je strategija za ispitivanje citotoksičnosti. U ovim testovima se koriste različite vitalne boje koje se konvertuju pod dejstvom enzima dehidrogenaze u mitohondrijama živih ćelija, a intenzitet razvijene boje srazmeran je broju preživelih ćelija. Citotoksičnost nekog agensa izražava se u vidu IC_{50} (eng. Inhibitory concentration 50) – koncentracije koja smanjuje preživljavanje ćelija za 50%.

1.9. Testovi za ispitivanje antivirusne aktivnosti

Ispitivanje antivirusne aktivnosti izvodi se na ćelijskim kulturama. Tokom infekcije mnoge vrste virusa indukuju morfološke promene u ćelijama koje su označene kao citopatogeni efekat (CPE). Ove morfološke promene jasno su vidljive pomoću invertnog svetlosnog mikroskopa, a stepen CPE direktno je proporcionalan aktivnosti virusa (**Slika 1.12.**). Prvi korak u ispitivanju antivirusne aktivnosti je izbor odgovarajućeg osetljivog sistema virus-ćelija, u kome virus može da kompletira svoj životni ciklus. Do sada je razvijeno nekoliko kvantitativnih testova (eng. Antiviral assays) kojima se meri antivirusna aktivnost u prisustvu različitih koncentracija antivirusnog agensa (Grossberg i Sedmak, 1984; Lewis, 1987; Meager, 1987).



Slika 1.12. Citopatogeni efekat (CPE) indukovao poliovirusom. A) neinficirane Hep-2 ćelije, B) rani CPE, C) kasni CPE

Za viruse koji indukuju CPE, u ispitivanjima antivirusne aktivnosti najčešće se primenjuje test redukcije CPE. Stepenu redukcije CPE kvantifikuje se vizuelnim upoređivanjem sa potpunim CPE u kontroli infektivnosti virusa ili

spektrofotometrijskim merenjem preživljavanja ćelija nakon primene odgovarajuće vitalne boje (Meager, 2002). Antivirusno dejstvo izražava se u vidu efektivne koncentracije antivirusnog agensa (eng. Effective concentration, EC_{50}) koja inhibira virusnu aktivnost za 50%, ili u vidu terapijskog indeksa (eng. Therapeutic Index, THI) – relativnog odnosa koncentracije koja inhibira preživljavanje ćelija za 50% i koncentracije koja obezbeđuje 50% inhibicije virusne aktivnosti (IC_{50}/EC_{50}) (FDA, 2006).

1.10. Primena resazurina u *in vitro* ispitivanjima

Resazurin je vitalna boja koja se koristi kao oksidaciono-redukциони indikator za merenje metaboličkog kapaciteta ćelija i ćelijske vijabilnosti. U mitohondrijama živih ćelija, delovanjem mitohondrijalnih enzima, plavo obojeni resazurin redukuje se u crveno obojeni fluorescentni rezorufin (Slika 1.13.). Merenjem apsorbancije spektra resazurina i rezorufina na određenim talasnim dužinama ili fluorescencije ekscitacije i emisije spektra rezorufina može se odrediti stepen redukcije ovog oksido-redukcionog indikatora (O'Brien i sar., 2000).

Resazurin je inkorporiran u nekoliko komercijalno dostupnih reagenasa koji se preporučuju za ispitivanje citotoksičnosti (UptiBlue™, AlamarBlue®, CellTiter-Blue®).



Slika 1.13. Hemijska reakcija redukcije resazurina u rezorufin, u mitohondrijama živih ćelija

Resazurin se prvobitno koristio za detekciju kontaminacije mleka. Danas se primenjuje u resazurin mikrotitracionom testu za ispitivanje osetljivosti

mikroorganizama na prisustvo različitih antimikrobnih agenasa i određivanje MIC, a naročito je koristan za detekciju spororastućih mikroorganizama, kao što su vrste roda *Mycobacterium* (Palomino i sar., 2002; Taneja i Tyagi, 2007). Resazurin se koristi i u ispitivanjima antivirusne aktivnosti, za kvantifikaciju redukcije CPE.

1.11.Značaj ispitivanja genotoksičnosti u razvoju novih lekova

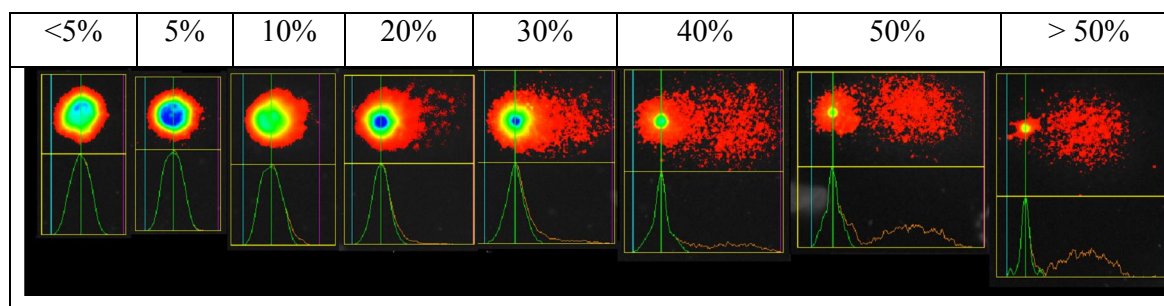
U procesu razvoja novih lekova namenjenih lečenju ljudi, pre dobijanja dozvole regulatornih autoriteta za plasman leka na tržište, sprovode se detaljne studije kojima se utvrđuje efikasnost i bezbednost primene leka. Studije bezbednosti izvode se u cilju identifikacije i evaluacije potencijalnih rizika po zdravlje ljudi, koji se mogu javiti usled upotrebe leka. U procenama bezbednosti, postignute koristi moraju biti veće od rizika upotrebe leka.

Studije bezbednosti leka, prema važećim smernicama Evropske agencije za lekove, obuhvataju i ispitivanja genotoksičnosti koja pružaju informacije o uticaju leka na genetički materijal (EMA, 2012). Upotreba genotoksičnih agenasa u terapiji može uticati na pojavu i fiksiranje oštećenja u genetičkom materijalu (Wassom, 1989). Nastala oštećenja mogu se prevesti u genske mutacije, strukturne hromozomske aberacije, rekombinacije i numeričke promene hromozoma. Ove promene zatim mogu izazvati nasledne promene u germinativnim ćelijama, pa tako predstavljaju rizik i za potomstvo. Takođe je dobro poznato da mutacije u somatskim ćelijama igraju važnu ulogu u pojavi maligniteta (Tettant i sar., 1987). Pošto su genotoksični agensi potencijalno kancerogeni i/ili mutageni, primena genotoksičnih lekova u terapiji nosi rizik od pojave tumora i ozbiljnih naslednih oboljenja (Jena i sar., 2002). Postupak razvoja leka, u svim fazama, od inicijalnih bioloških ispitivanja do registracije, zahteva velike finansijske investicije. Sprovođenje ispitivanja genotoksičnosti u ranim fazama razvoja leka može značajno smanjiti ova finansijska ulaganja. Rano otkrivanje negativnog uticaja potencijalnog hemioterapeutskog agensa na genetički materijal usmerava dalja istraživanja na hemijske modifikacije strukture ispitivanog jedinjenja.

1.12.Komet test

Direktno ili indirektno indukovana oštećenja DNK detektuju se različitim rutinskim *in vitro* i *in vivo* testovima, na mikroorganizmima, kulturama sisarskih ćelija i glodarima. Komet test je jedan od testova koji se uvode u ispitivanja genotoksičnosti novih lekova.

Komet test ili test elektroforeze pojedinačnih ćelija (eng. Single Cell Gel Electrophoresis - SCGE) je osetljiva i brza metoda za detekciju DNK oštećenja u pojedinačnim ćelijama. Ova metoda se zasniva na sposobnosti oštećene DNK, odnosno negativno naelektrisanih DNK fragmenata da se, tokom elektroforeze, kreću kroz agarozni gel ka pozitivnoj elektrodi, nakon čega oštećena jedra dobijaju oblik komete. U ovom testu, oblik, veličina i količina DNK u okviru komete imaju važnu ulogu u određivanju nivoa oštećenja DNK (**Slika 1.14.**). Modifikovana, alkalna verzija komet testa omogućava detekciju jednolančanih i dvolančanih prekida, kao i alkalno labilnih mesta (Singh i sar.,1988). Komete se analiziraju manuelno ili automatski, posle bojenja fluorescentnom bojom koja interkalira u DNK. Manuenom metodom oštećenja se klasifikuju u 5 kategorija, prema veličini oštećenja jedra ili prema dužini repa komete (Collins i sar., 1997). Za automatsko merenje koristi se odgovarajući kompjuterski program – Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK), koji automatski meri veličinu oštećenja i određuje različite parametre: intenzitet repa (eng. Tail Intensity, TI), dužina repa (eng. Tail Lenght, TL) i moment repa (eng. Olive Tail Moment, OTM), koji je izveden kombinovanjem prva dva parametra (Tice i sar., 2000; Olive i Judit, 2006; Rosenberger i sar., 2011; Collins i sar., 2014).



Slika 1.14. Ćelije sa različitim nivoom DNK oštećenja; iznad slika kometa predstavljena je vrednost TI kao parametra oštećenja DNK (Kolarević, 2014)

1.13. Kompleksi metala u razvoju novih hemioterapeutika

Primena kompleksa metala u medicini doživela je ekspanziju u drugoj polovini 20. veka, posle otkrića antikancerskih karakteristika cisplatine (Jones i Thormnak, 2007). Neželjena dejstva antitumorskih kompleksa platine koji se danas koriste u hemioterapiji, podstakla su sintezu i ispitivanje antitumorskog potencijala brojnih jedinjenja sa metalima u svojoj strukturi, u cilju pronalaženja novih agenasa koji bi imali izraženo antitumorsko dejstvo, manje izražene neželjene efekte i kojima bi se mogla izbeći rezistencija tumorskih ćelija na hemioterapiju. U potrazi za antikancerskim agensima koji sadrže neki drugi metal osim platine, kao perspektivni pokazali su se kompleksi pojedinih prelaznih metala (elementi između II_a i III_a grupe periodnog sistema) – paladijuma, rutenijuma, nikla, titanijuma, zlata, bakra i cinka (Abu-Surrah i sar., 2008; Dabrowiak, 2009). Više naučnih studija pokazalo je da kompleksi paladijuma ispoljavaju sličnu citotoksičnu aktivnost postojećim hemioterapeuticima na bazi platine (Gao i sar., 2010), a pojedini kompleksi paladijuma daju bolji inhibitory efekat na rast NSCLC u odnosu na cisplatinu (Ulukaya i sar., 2011). Ove činjenice ukazuju na značaj ispitivanja biološke aktivnosti novih jedinjenja na ćelijskim linijama koje vode poreklo od NSCLC, kao što je ćelijska linija A549.

U poslednjoj deceniji posebno su interesantni multifunkcionalni bioaktivni kompleksi, kao što su kompleksi metala sa fosfinima. Fosfinski kompleks zlata(I) – auranofin je lek koji se koristi u terapiji reumatoidnog artritisa, ali su poznata i njegova antikancerska svojstva u veoma niskim koncentracijama (Simon i sar., 1981; Kim i sar., 2013; Park i sar., 2014). Brojna istraživanja pokazala su da auranofin ima i snažnu antivirusnu aktivnost prema HIV-1 virusu, selektivnim dejstvom na glavne ćelijske rezervoare transkripciono neaktivne forme viralne DNK (centralne i tranzicione memorijske T ćelije CD4⁺) (Chomont i sar., 2009, Lewis i sar., 2011). Ispitivanja koje su sproveli Chirullo i saradnici (2013) pokazuju da auranofin indukuje apoptozu i prodiferencijaciju CD4⁺ ćelija. Uvođenje trovalentnih fosfornih jedinjenja – trifenilfosfina u strukturu koordinacionog kompleksa povećava rastvorljivost u lipidima i obezbeđuje lakši prolazak jedinjenja kroz ćelijsku membranu, što rezultuje boljim biološkim efektima koji se ostvaruju unutar ćelije (Berners-Price i Sadler, 1988; Ferreira i sar., 2012).

1.13.1. Izbor i uloga liganada u hemijskim i biološkim svojstvima koordinacionih kompleksa

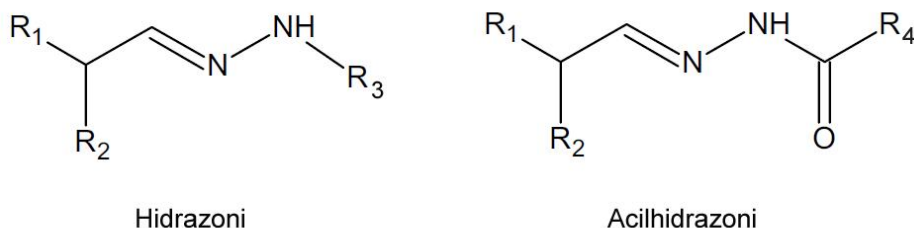
Osobine ligandnog sistema u velikoj meri određuju hemijske i biološke osobine koordinacionog kompleksa, pa je odabir odgovarajućeg ligandnog sistema ključni korak u dizajniranju novih koordinacionih jedinjenja. Značaj izbora ligandnog sistema i njegov uticaj na mehanizam delovanja koordinacionog kompleksa opisan je u studijama platinskih kompleksa sa različitim aminskim ligandima (Orri i sar., 1994). Jedan od vodećih problema u dizajniranju novih biološki aktivnih jedinjenja je lipofilnost koja ima ključnu ulogu u biološkim procesima adsorpcije, interakcije sa odgovarajućim ćelijskim receptorima, transporta kroz ćelijsku membranu i ispoljavanja citotoksičnosti molekula. Slaba lipofilnost vodi ka slaboj akumulaciji leka u ćeliji, što značajno ograničava terapijsku primenu. Pažljivim odabirom ligandnog sistema i izmenama određenih hemijskih grupa moguće je predvideti hemijska i biološka svojstva, kao što su rastvorljivost, lipofilnost, mehanizmi delovanja i rezistencija (Tetko i sar., 2008). Voluminozna struktura liganda u koordinacionom kompleksu obezbeđuje zaštitu metalnog centra od deaktivacije u fiziološkim uslovima i povoljno utiče na lipofilnost, olakšavajući prolaz kroz lipidni dvosloj ćelijske membrane (Wilson i Lippard, 2014).

Prisustvo atoma kiseonika i azota u ligandnim sistemima povećava mogućnost formiranja koordinacionih kompleksa, kao i hemijske i biološke kapacitete samog liganda. Među ligandima sa NO donorima, posebno mesto zauzimaju hidrazoni, zbog njihove široke upotrebe i interesantnih koordinacionih mogućnosti, koje mogu ispoljiti u kompleksima sa jonima prelaznih metala (Case i sar., 1984; Maurya i sar., 2006).

1.14. Hidrazoni i acilhidrazoni

Hidrazoni su klasa jedinjenja iz grupe Šifovih baza (ili azometina) koji u svojoj strukturi poseduju funkcionalnu grupu $-C=N-N-$. Od ostalih Šifovih baza hidrazoni se razlikuju po prisustvu dva međusobno povezana atoma azota. Uvođenjem karbonilne grupe ($-C=O$) u strukturu hidrazona, nastaju jedinjenja označena kao acilhidrazoni. Hemijska struktura hidrazona i acilhidrazona prikazana je na **slici 1.15**. Hidrazoni su

potencijalni multifunkcionalni ligandi. Koordinaciona mesta hidrazona mogu biti promenjena odgovarajućim supstytutentima na hidrazidnom, kao i na karbonilnom delu molekula (Despaigne i sar., 2009). Acilhidrazoni se karakterišu fleksibilnošću, dobri su helatni agensi i mogu formirati komplekse sa različitim prelaznim metalima (Cornelissen i sar., 1992).



Slika 1.15. Hemijska struktura hidrazona i acilhidrazona

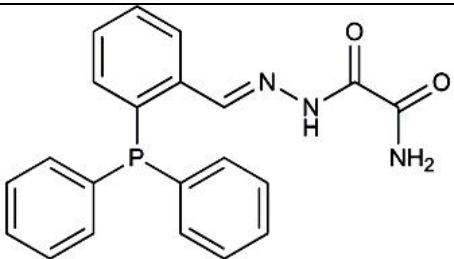
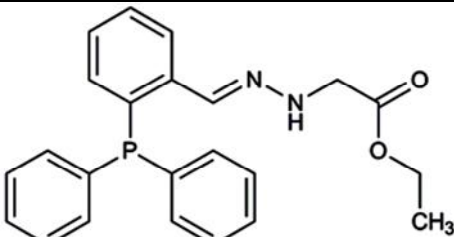
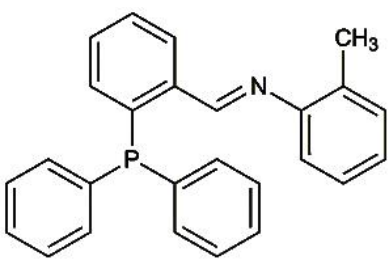
Prisustvo većeg broja koordinacionih mesta hidrazonima daje mogućnost farmakološke aktivnosti širokog spektra. Brojna istraživanja su potvrdila biološku i terapeutsku aktivnost samih hidrazonskih liganada, kao i njihovih metalnih kompleksa, posebno u pogledu antimikrobne (El-Sherif, 2009; Filipović i sar., 2009), antiinflamatorne i analgetske aktivnosti (Sondhi i sar., 2006). Ispitivanje antituberkulozne aktivnosti pokazalo je da pojedini hidrazoni ispoljavaju aktivnost koja je uporediva sa antituberkuloticima koji se koriste u kliničkoj praksi (Patole i sar., 2003). Salicilaldehid-benzoilhidrazon se pokazao kao potentni inhibitor sinteze DNK i ćelijskog rasta na više sisarskih ćelijskih linija. Bakar(II) kompleksi ovog jedinjenja ispoljavaju veću inhibitornu aktivnost u poređenju sa samim ligandom (Johnson i sar., 1982; Pickart i sar., 1983).

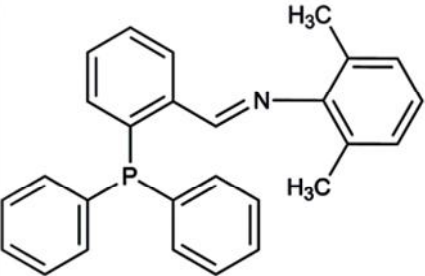
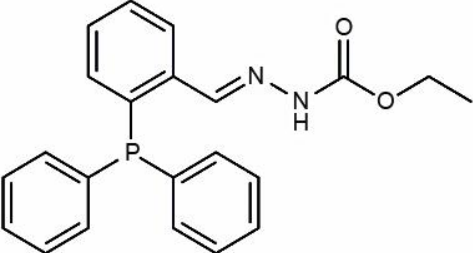
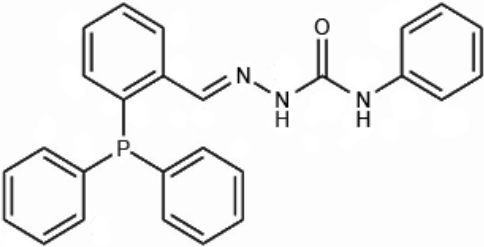
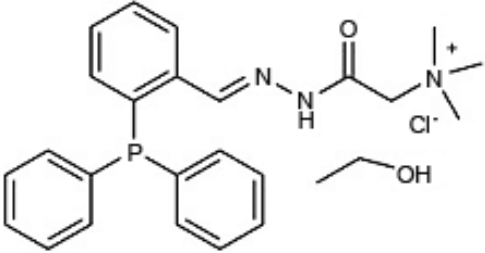
U svojim najnovijim istraživanjima Rogolino i saradnici (2015) prikazali su rezultate prema kojima ligand sa *o*-vanilin acilhidrazonskim skeletom, kao i njegovi Mg(II), Mn(II), Ni(II) i Zn(II) kompleksi ispoljavaju snažnu antivirusnu aktivnost prema Herpes Simplex virusima HSV-1, HSV-2 i aciklovir-rezistentnom HSV-1 soju, sa EC₅₀ vrednostima na niskim mikromolarnim koncentracijama. Sa izuzetkom kompleksa Zn(II), ova jedinjenja u koncentracijama manjim od 1 µM/mL postižu izraženo antivirusno dejstvo na Vaccinia virus.

1.15. Derivati 2-(difenilfosfino)benzaldehyda

Multidentatni ligandi, derivati 2-(difenilfosfino)benzaldehyda (Dpba) su mala grupa jedinjenja sintetisanih u poslednjih desetak godina, za koje vlada posebno interesovanje. Do sada je ispitana biološka aktivnost svega nekoliko ovih derivata i njihovih kompleksa platine, paladijuma, nikla, kobalta i gvožđa, a publikovani rezultati pokazali su da ova jedinjenja poseduju značajnu antimikrobnu i antitumorsku aktivnost prema više kancerskih ćelijskih linija, među kojima se posebno ističu one koje su rezistentne na postojeće antikancerske lekove (Malešević i sar., 2006; Radulović i sar., 2006; Motswainyana i sar., 2013; Čobeljić, 2015). Biološki aktivni Dpba derivati sa semioksamazidnom (HL1), etil-hidrazinoacetatnom (HL2), ortotoluidinskom (L3), 2,6-lutidinskom (L4), etil-karbazatnom (HL5), fenil-karbazatnom (HL6) i Girard-T (HL7Cl·EtOH) strukturom i njihovi Pd i Pt kompleksi prikazani su u **tabeli 1.1**.

Tabela 1.1. Biološki aktivni derivati 2-(difenilfosfino)benzaldehyda i njihovi kompleksi paladijuma(II) i platine(II)

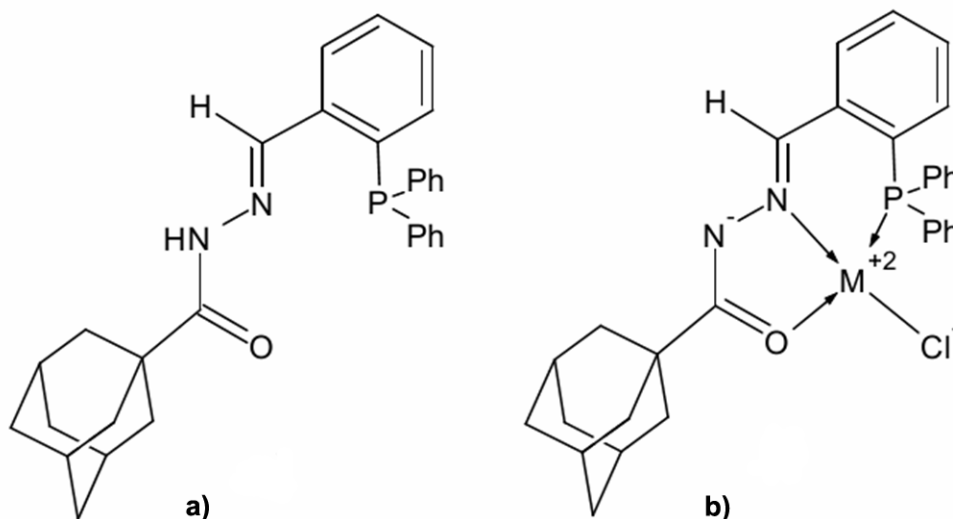
Ligand	Oznaka	Kompleks	Referenca
	HL1	[PdL1Cl] [PtL1Cl]	Radulović i sar. (2006)
	HL2	[Pd(HL2)Cl ₂]	Malešević i sar. (2006)
	L3	[PdL3Cl ₂] [PtL3Cl ₂]	Motswainyana i sar. (2013)

	L4	$[\text{PdL4Cl}_2]$ $[\text{PtL4Cl}_2]$	
	HL5	$[\text{PdL5Cl}]$	Milenković i sar. (2013a; 2013b; 2014a)
	HL6	-	Milenković i sar. (2014b)
	HL7Cl·EtOH	$[\text{PdLCl}]^+$	Adaila i sar. (2014) Milenković i sar. (2015) Čobeljić i sar. (2015)

1.15.1. Ligand 2-(difenilfosfino)benzalhid-1-adamantoilhidrazon i njegovi kompleksi paladijuma(II) i platine(II)

Ligand, 2-(difenilfosfino)benzalhid-1-adamantoilhidrazon i njegovi kompleksi paladijuma(II) i platine(II) sintetisani su na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na Katedri za opštu i neorgansku hemiju (Đorđević i sar., 2014). Jedinjenje 2-(difenilfosfino)benzalhid-1-adamantoilhidrazon proizvod je reakcije etanolne suspenzije adamantan-1-karbohidrazida i etanolnog rastvora 2-(difenilfosfino)benzalhida. Reakcijom etanolnog rastvora liganda 2-(difenilfosfino)benzalhid-1-adamantoilhidrazona sa vodenim rastvorima kalijum

tetrahloropaladata, $K_2[PdCl_4]$, odnosno kalijum tetrahloroplatinata, $K_2[PtCl_4]$, nastali su neutralni kompleksi paladijuma $[Pd(L)Cl]$ i platine $[Pt(L)Cl]$.



Slika 1.16. Hemijska struktura liganda (HL) **(a)** i kompleksa paladijuma ($M=Pd$) i kompleksa platine ($M=Pt$) **(b)**

Molekul liganda se sastoji od adamantil kaveza na jednom kraju blago uvijenog $-C(=O)-NH-N=CH-$ mosta i trifenilfosfinskog prstena na drugom kraju (**Slika 1.16.a**). Adamantil kraj je pomeren i rotiran približno 60° oko $C1-C2$ veze. Metalni joni u kompleksima smešteni su u kvadratno-planarnom okruženju, formirajući PNO tridentatnu koordinaciju monoanijona organskog liganda (HL) i jednog hloridnog jona (**Slika 1.16.b**). Metal-ligand rastojanja, $M-O$, $M-N_2$ i $M-P$, približno su ista kao i rastojanja sličnih kompleksa paladijuma, dok je $M-Cl$ rastojanje nešto kraće u odnosu na prosečne vrednosti drugih kompleksa paladijuma i platine, ali su ove vrednosti bliske strukturno sličnim kompleksima paladijuma.

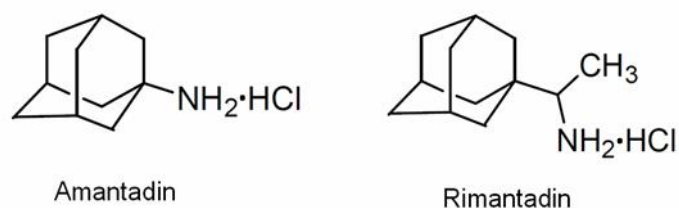
Biološka aktivnost 2-(difenilfosfino)benzalhid-1-adamantolhidrazona i njegovih kompleksa paladijuma(II) i platine(II) prvi put je ispitivana u okviru ove doktorske disertacije.

1.16. Adamantan u strukturama bioaktivnih jedinjenja

Adamantan (trciklo(3,3,1, $I^{3,7}$)dekan) je kristalno jedinjenje koje se sastoji iz tri cikloheksanska prstena, postavljena u konformaciji „stolice“. Ovo jedinjenje je najjednostavniji dijamandoid, a sintetisali su ga Prelog i Seiwert (1941). Jedna od najznačajnijih karakteristika ovog jedinjenja je izrazita lipofilnost, pa inkorporacija adamantil grupe u druge molekule povećava njihovu lipofilnost, čime se obezbeđuje lakši prolazak kroz ćelijsku membranu i bolja pristupačnost molekula ćeliji (Remo Spano i sar., 1970; Lamoureux i Artavia, 2010; Liu i sar., 2011; Wanka i sar., 2013). Molekul adamantana je krut i izrazito stabilan, pa se dobro distribuira u krvnoj plazmi (Chew i sar., 2008).

Nakon otkrića amantadina 1960. godine i njegovih antivirusnih svojstava, derivati adamantana privukli su pažnju brojnih istraživača, pa je sintetisano i ispitano hiljade jedinjenja sa adamantil grupom. Izuzev antivirusne aktivnosti ovih derivata, dokazana je i antibakterijska, antigljivična i antiinflamatorna aktivnost, kao i uticaj na centralni nervni sistem, a u poslednjih nekoliko godina sedam novih derivata adamantana uključeno je u klinička ispitivanja širom sveta (Wanka i sar., 2013).

Amantadin-hidrochlorid (Symmetrel®) i rimantadin (α -metil-1-adamantanmetilamin, Flumadine®), prikazani na **slici 1.17.**, prvi su derivati adamantana uvedeni u kliničku upotrebu, u terapiji infekcija izazvanih influenza virusom tipa A₂ (Davies i sar., 1964; Togo i sar., 1968; Hayden i sar., 1981; Monto, 2003).

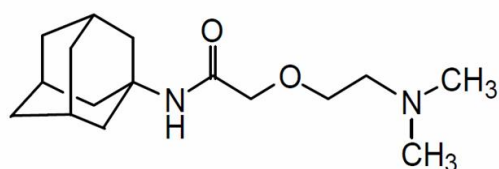


Slika 1.17. Hemijska struktura amantadina i rimantadina

Kao što je već rečeno, amantadin i rimantadin imaju isti mehanizam dejstva, odnosno inhibiraju virusnu replikaciju tokom ranih faza infekcije (faza dekapcidacije), blokirajući jonske kanale transmembranskog regiona M2 proteina (Hay, 1989, 1992).

Vrlo brzo nakon početka terapijske primene ovih jedinjenja ustanovljena je rezistencija koja je posledica pojave tačkastih mutacija i supstitucije odgovarajućih aminokiselina u transmembranskom M2 proteinu, što rezultuje gubitkom sposobnosti vezivanja ovih jedinjenja za odgovarajuće mesto M2 proteina (Hayden, 2006). Oba ova leka aplikuju se oralno i vrlo se dobro, ali sporo apsorbuju u gastrointestinalnom traktu. Ekskrecija amantadina vrši se putem urina, glomerularnom filtracijom i tubularnom sekrecijom u nepromenjenom obliku, dok rimantadin podleže metabolizmu (hidroksilaciji) u jetri, pri čemu nastaje nekoliko različitih metabolita prisutnih u urinu (Manchand i sar., 1990). Trenutno se amantadin i rimantadin koriste u profilaksi i terapiji sojeva virusa influence H5N1, u kombinaciji sa inhibitorima neuraminidaza, zanamivirom (Relenza®) i oseltamivirom (Tamiflu®).

Tromantadin (Virus-Merz®) (**Slika 1.18.**) je derivat adamantana koji se kao dermatološki antivirusni lek koristi za tretmane infekcija izazvanih aciklovir-rezistentnim sojevima HSV-1 i VZV (Sherm i Peteri, 1971; Rosenthal i sar., 1982; ALIMS, 2013). Iako je bilo pokušaja da se ovaj lek uvede u sistemsku upotrebu, za tu svrhu nije odobren, zbog brojnih neželjenih dejstava.



Tromantadin

Slika 1.18. Hemijska struktura tromantadina

Takođe je dokazano da nekoliko derivata adamantana poseduje anti-HIV aktivnost, a *N*-(1-adamantil)-4-aminoftalamid je pokazao dobar inhibitorski efekat na HIV-1 i HIV-2 virus (Van Derpoorten i sar., 1997). Poznati su i derivati adamantana sa snažnim dejstvom na viruse familije *Picornaviridae* (De Palma i sar., 2008).

Visoka lipofilnost adamantana omogućava i njegov olakšan prolazak kroz krvno-moždanu barijeru, pa je zbog toga poželjan u strukturama potencijalno neuroaktivnih jedinjenja. Adamantanski fragment vrlo efikasno blokira jonske kanale, pa njegovi derivati nalaze široku primenu u području inhibicije bioloških receptora u

mozgu. Tako se memantin (1-amino-3,5-dimetiladamantan) koristi u lečenju Parkinsonove i Alchajmerove bolesti (Henkel i Hane, 1982; McKeage, 2009). Ovo jedinjenje funkcioniše kao blokator N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora, inhibira aktivnost neurotransmitera glutamata, zatvara jonske kanale i tako sprečava preveliki dotok jona Ca^{2+} u neurone (Parsons i sar., 1999; Lipton, 2006).

U publikacijama novijeg datuma ukazano je na značaj razvoja novih anikancerskih lekova, analoga cisplatine sa inkorporiranim aminoadamantanskim ligandima (Wanka i sar., 2013). Mnogi do sada ispitani analozi ovog tipa ne ispoljavaju unakrsnu rezistenciju sa cisplatinom, a rezultati farmakokinetičkih studija potvrđuju efikasnost oralne primene jednog ovakvog kompleksa (LA12), derivata satraplatine, koji je u fazi kliničkih ispitivanja (Bouchal i sar., 2011; Sova i sar., 2011; Jelínková i sar., 2014). Ako se uzme u obzir da se postojeći antikancerski lekovi na bazi platine koriste kao intravenski preparati, oralna administracija adamantanskih derivata cisplatine bila bi svojevrsna novina u primeni lekova na bazi platine.

CILJEVI

2. CILJEVI

Glavni cilj ove teze je ispitivanje bioloških aktivnosti *in vitro* grupe od tri nova acilhidrazonska jedinjenja, liganda 2-(difenilfosfino)benzaldehyd-1-adamantoidhidrazona i njegovih kompleksa paladijuma(II) i platine(II). Ciljevi ove doktorske disertacije obuhvataju ispitivanje antimikrobne, citotoksične i genotoksične aktivnosti i uključuju sledeće:

- Ispitivanje antimikrobne aktivnosti na odabranim sojevima bakterija i gljivica.
- Ispitivanje citotoksične aktivnosti i potencijalnog selektivnog dejstva na kontinuiranim ćelijskim linijama koje vode poreklo od zdravih (MRC-5) i kancerskih tkiva (Hep-2 i A549).
- Upoređivanje citotoksične aktivnosti ovih jedinjenja sa aktivnošću poznatih citostatika – cisplatine, karboplatine i oksaliplatine.
- Ispitivanje uticaja na proliferaciju ćelija i vreme dupliranja populacije MRC-5, Hep-2 i A549 ćelija.
- Ispitivanje ćelijske smrti tretiranih malignih ćelija A549.
- Ispitivanje uticaja na migratorni potencijal MRC-5, Hep-2 i A549 ćelija.
- Ispitivanje genotoksičnog dejstva putem detekcije oštećenja molekula DNK na ćelijskim linijama MRC-5, Hep-2 i A549.
- Ispitivanje antivirusne aktivnosti prema poliovirusu tip 1, na visokoosetljivoj Hep-2 ćelijskoj liniji i upoređivanje sa aktivnošću interferona α -2a.

MATERIJAL I METODE

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Biološki materijal

3.1.1.1. Bakterije i gljivice

U eksperimentima su korišćene sledeće bakterije i gljivice:

Staphylococcus aureus ATCC 6538 „Kwik-Stik™, Microbiologics®“ (St. Cloud, MIN, USA)

Bacillus subtilis ATCC 6633 „Kwik-Stik™, Microbiologics®“ (St. Cloud, MIN, USA)

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 „Kwik-Stik™, Microbiologics®“ (St. Cloud, MIN, USA)

Escherichia coli ATCC 10536 „Kwik-Stik™, Microbiologics®“ (St. Cloud, MIN, USA)

Salmonella abony NCTC 6017 „Kwik-Stik™, Microbiologics®“ (St. Cloud, MIN, USA)

Mycobacterium bovis *Bacillus Calmette-Guérin*, BCG vakcina „Institut za virusologiju, vakcine i serume – Torlak“ (Beograd, Srbija)

Candida albicans ATCC 10231 „Kwik-Stik™, Microbiologics®“ (St. Cloud, MIN, USA)

3.1.1.2. Referentni standard poliovirusa i neutralizaciona antitela

U eksperimentima su korišćeni sledeći referentni standardi:

Referentni standard poliovirusa tipovi 1, 2 i 3 – WHO Reference Reagent, 2nd International Reference Reagent 2004 for Live Attenuated Poliovirus (Sabin), kod: 02/306 „National Institute for Biological Standards and Control NIBSC“ (Potters Bar, Hertfordshire, Velika Britanija),

Anti-poliovirus serumi – WHO International Standard, 3rd International Standard Anti-Poliovirus serum Types 1, 2 and 3, kod: 82/585 „National Institute for Biological Standards and Control NIBSC“ (Potters Bar, Hertfordshire, Velika Britanija).

Koncentrovana suspenzija poliovirusa PV1 pripremljena je razređivanjem referentnog standarda PV i neutralizacijom virusa PV2. Od 100 μL referentnog standarda poliovirusa pripremljeno je 10 mL razređenja 10^{-3} . U 9,9 mL razređenja 10^{-3} dodato je po 50 μL seruma anti-PV2 i anti-PV3 i suspenzija je inkubirana 3 h, na 37°C . Posle neutralizacije po 1 mL suspenzije raspoređeno je u kriotube koje su čuvane na -20°C , do upotrebe u eksperimentima.

3.1.1.3. Čelijske linije

U istraživanjima su korišćene sledeće čelijske linije:

MRC-5 – ćelije fibroblasta normalnog tkiva pluća, iz kolekcije čelijskih linija Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Hep-2 – epitelne ćelije humanog karcinoma larinksa, donirane od strane Nacionalne agencije za lekove Francuske, ANSM.

A549 – epitelne ćelije adenokarcinoma pluća, donirane od strane Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju.

3.1.2. Kompleksi Pd(II) i Pt(II) sa 2-(difenilfosfino)benzaldehyd-1-adamantolhidrazonom

U ovoj dokorskoj disertaciji testirana su sledeća jedinjenja:

Ligand 2-(difenilfosfino)benzaldehyd-1-adamantolhidrazon, HL

Kompleks Pd(II) sa 2-(difenilfosfino)benzaldehyd-1-adamantolhidrazonom, [Pd(L)Cl]

Kompleks Pt(II) sa 2-(difenilfosfino)benzaldehyd-1-adamantolhidrazonom, [Pt(L)Cl]

Empirijske formule i molekulske mase jedinjenja date su u **tabeli 3.1.**

Tabela 3.1. Empirijske formule i molekulske mase liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa

	Empirijska formula	Molekulska masa (g/mol)
Ligand	C ₃₀ H ₃₁ N ₂ OP	467
Pd(II) kompleks	C ₃₀ H ₃₀ ClN ₂ OPPd	607
Pt(II) kompleks	C ₃₀ H ₃₀ ClN ₂ OPPt	696

3.1.2.4. Priprema rastvora liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa

Koncentrovani rastvori liganda 2-(difenilfosfino)benzalhid-1-adamantolhidrazona i njegovih kompleksa Pd(II) i Pt(II) napravljeni su na početku istraživanja. Supstance su postepeno rastvorene u DMSO, uz tretman ultrazvukom, 30 minuta na 40°C i dobijeni su rastvori sledećih koncentracija: 43,1 mM/mL liganda, 34,3 mM/mL Pd(II) kompleksa i 19,8 mM/mL Pt(II) kompleksa. Rastvori su sterilisani membranskom filtracijom, pomoću filtera promera 0,22 µm i sterilnog šprica. Pre svakog eksperimenta, pripremljeni su sveži radni rastvori u hranljivom medijumu za kultivaciju/održavanje ćelija ili u odgovarajućoj tečnoj hranljivoj podlozi, u zavisnosti od eksperimenta.

3.1.3. Antimikrobni lekovi

U eksperimentima su korišćeni sledeći antimikrobni lekovi:

Enrofloksacin 100 mg/mL, Enroksin®-S 10% „Veterinarski zavod Subotica“ (Subotica, Srbija)

Oksitetraciklin 100 mg/mL, Engemycin 10% „Intervet International“ (Unterschleisheim, Nemačka)

Streptomycin 1 g, Streptomycinum TZF „Polfa Tarchomin S.A.“ (Varšava, Poljska)

Klotrimazol 200 mg, Canesten® 3 „Bayer Pharma AG“ (Leverkuzen, Nemačka)

Interferon α-2a, 3 × 10⁶ IU/0,5 mL, Roferon®-A „F. Hoffmann-La Roche LTD“ (Bazel, Švajcarska)

Gotovi rastvori za injekciju enrofloksacina, oksitettraciklina i interferona α -2a korišćeni su kao primarni stokovi. Primarni stok streptomicina koncentracije 1000 mg/mL pripremljen je rastvaranjem 1 g u 1 mL vode za injekciju. Primarni stok klotrimazola koncentracije 20 mg/mL pripremljen je rastvaranjem vaginalne tablete Canesten® 3 u 10 mL izopropil-miristata i mešanjem na magletnoj mešalici, 3h na 37°C.

Empirijske formule i molekulske mase antimikrobnih lekova date su u **tabeli 3.2.**

Tabela 3.2. Empirijske formule i molekulske mase antimikrobnih lekova

	Empirijska formula	Molekulska masa (g/mol)
Enrofloksacin	$C_{19}H_{22}FN_3O_3$	359
Oksitettraciklin	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	460
Streptomicin	$C_{21}H_{39}N_7O_{12}$	581
Klotrimazol	$C_{22}H_{17}ClN_2$	344
Interferon α -2a	/	19237

3.1.4. Citostatici

Citostatici cisplatina, karboplatina i oksaliplatina korišćeni su u vidu onkoloških lekova, rastvora za infuziju:

Cisplatina 0,5 mg/mL, Cisplatin „Medac“ (Wedel, Nemačka)

Karboplatina 10 mg/mL, Carboplatin-Teva „Pharmachemie B. V.“ (Haarlem, Holandija)

Oksaliplatina 5 mg/mL, Eloxatin® „Aventis Pharma Dagenham“ (Dagenham, Velika Britanija)

Empirijske formule i molekulske mase citostatika date su u **tabeli 3.3.**

Tabela 3.3. Empirijske formule i molekulske mase citostatika

	Empirijska formula	Molekulska masa (g/mol)
Cisplatina	$\text{H}_6\text{Cl}_2\text{N}_2\text{Pt}$	300
Karboplatina	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$	371
Oksaliplatina	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{Pt}$	397

3.1.5. Rastvori

Rastvor za lizu ćelija (pH 10)

NaCl „Carlo Erba Reagents” (Milano, Italy).....146,6 g
 EDTA „Sigma“ (St.Louis, MO, USA)..... 37,2 g
 Tris „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....1,21 g
 dH₂O..... 1000 mL
 Nakon podešavanja pH, dodat je 1% Triton X-100 „Sigma“ (St.Louis, MO, USA)
 i rastvor snažno promešan.

Rastvor za denaturaciju i elektroforezu (pH 13)

10 M NaOH “Superlab” (Beograd, Srbija).....30 mL
 0,2 M EDTA „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....5 mL
 dH₂O965 mL

10 M NaOH

NaOH “Superlab” (Beograd, Srbija).....200 g
 dH₂O 300 mL

0,2 M EDTA

EDTA „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....37,2 g
 dH₂O500 mL

Rastvor za neutralizaciju (pH 7,5)

Tris „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....	48,44 g
dH ₂ O.....	1000 mL

1% NMP agarozna za prvi sloj

NMP „Eurobio“ (France).....	1 g
dH ₂ O	99 mL

1% NMP agarozna za drugi sloj

NMP „Eurobio“ (France).....	1 g
1 x PBS „PAA The Cell Culture Company“ (Austria).....	99 mL

1% LMP agarozna

LMP „Bio-Rad Laboratories“ (CA, USA).....	1 g
1 x PBS „PAA The Cell Culture Company“ (Austria).....	99 mL

1 x PBS

10 x PBS „PAA The Cell Culture Company“ (Austria).....	100 mL
Sterilisana dH ₂ O.....	900 mL

Rastvor AO/EB za apoptozu

Akridin oranž 10 mg/mL „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....	10 µL
Etidijum bromid 10 mg/mL, „Sigma“ (St.Louis, MO, USA).....	10 µL
dH ₂ O.....	980 µL

Fiziološki rastvor

Natrii chloridi infundibile „Hemofarm AD Vršac“ (Vršac, Srbija), gotov rastvor

Sastav:

Natrijum-hlorid.....	9 g
Voda za injekcije.....	do 1 L

Rastvor za VITEK 2

Saline silution „bioMérieux“ (Lyon, France), gotov rastvor

Sastav:

Natrijum-hlorid.....	0,45 g
Voda za injekcije.....	do 1 L

Puferisani fiziološki rastvor

DPBS 1×, Gibco® „Life Technologies/Thermo Fisher Scientific“, gotov rastvor

Sastav:

Kalijum-hlorid (KCl).....	200,0 mg/L
Kalijum-fosfat (KH ₂ PO ₄).....	200,0 mg/L
Natrijum-hlorid (NaCl).....	8000,0 mg/L
Natrijum-fosfat, dvobazni (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O).....	2160,0 mg/L

Trypsin-EDTA

Trypsin-EDTA 0,05% Gibco® „Life technologies/Thermo Fisher Scientific“, gotov rastvor

Sastav:

Kalijum-hlorid (KCl).....	400,0 mg/L
Kalijum-fosfat (KH ₂ PO ₄).....	60,0 mg/L
Natrijum-bikarbonat (NaHCO ₃).....	350 mg/L
Natrijum-hlorid (NaCl).....	8000,0 mg/L
Natrijum-fosfat, dvobazni (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O).....	90,0 mg/L
D-glukoza.....	1000,0 mg/L
EDTA 4Na·2H ₂ O.....	380,0 mg/L
Fenol crveno.....	10,0 mg/L
Trypsin.....	500,0 mg/L

Rastvori za bojenje po Ziehl-Neelsenu, gotovi rastvori

- Ziehl-Neelsen carbofuchsin solution „Merck Millipore“

Sastav:

Karbofuksin.....	6,3 g/L
Fenol (C ₆ H ₅ OH).....	40 g/L

- Löfflers methylene blue „Merck Millipore“

Sastav:

Metilensko plavo.....	4,2 g/L
Etil-alkohol (C ₂ H ₅ OH).....	190 g/L
pH 8,0-8,6	

- Rastvor za odbojavanje „Merck Millipore“

Sastav:

Hlorovodonična kiselina (HCl).....	7,5 mL
Etil-alkohol (C ₂ H ₅ OH).....	992,5 mL

Trypan plavo

Trypan Blue 0,4% „Sigma-Aldrich“ (St.Louis, MO, USA), gotov rastvor

Sastav:

Natrijum-hlorid.....	0,81%
Kalijum-fosfat (KH ₂ PO ₄).....	0,06%
Trypan plavo.....	0,4%

UptiBlueTM „Uptima, Interchim“ (Montlucon, France)

Arkidin oranž za komet test

2 µg/mL, „Sigma-Aldrich“ (St.Louis, MO, USA)

Vodonik-peroksid 35%

Emprove[®] „Merck Millipore“

Dimetil-sulfoksid

DMSO Biotechnology Performance „Sigma-Aldrich“

Izopropil-mitistat

90% GC „Sigma-Aldrich“

3.1.6. Hranljive podlogeHranljivi medijum za kultivaciju ćelija

Minimalni esencijalni medijum MEM 1× Gibco®500 mL

Penicilin-streptomycin, Pen Strep 100×, 10,000 U/mL/10,000 U/mL Gibco®5 mL

L-glutamin 200mM 100× Gibco® 5 mL

Neesencijalne aminokiseline NEAA 100× Gibco® 5 mL

Podloga je čuvana na 2-8°C.

Neposredno pre upotrebe, u odmerenu količinu medijuma dodato je 5-10% fetalnog telećeg seruma FBS Gibco® i medijum je temperiran 30 min na 37°C.

Hranljivi medijum za održavanje ćelija

Minimalni esencijalni medijum MEM 1× Gibco®500 mL

Penicilin-streptomycin, Pen Strep 100×, 10,000 U/mL/10,000 U/mL Gibco®5 mL

L-glutamin 200mM 100× Gibco® 5 mL

Neesencijalne aminokiseline, NEAA 100× Gibco®5 mL

Fetalni teleći serum, FBS Gibco®10 mL

Podloga je čuvana na 2-8°C. Medijum je pre upotrebe temperiran 30 min na 37°C.

Minimalni esencijalni medijum, bez glutamina

MEM 1× Gibco® „Life Technologies /Thermo Fisher Scientific“, gotova podloga

Sastav:

L-arginin hidrohlorid.....126 mg/L

L-cistin 2HCl.....31 mg/L

L-histidin hidrohlorid-H₂O.....42 mg/L

L-izoleucin.....52 mg/L

L-leucin.....	52 mg/L
L-lizin hidrohlorid.....	73 mg/L
L-metionin.....	15 mg/L
L-phenilalanin.....	32 mg/L
L-treonin.....	48 mg/L
L-triptofan.....	10 mg/L
L-tirozin dinatrijumova so dihidrat.....	52 mg/L
L-valin.....	46 mg/L
Holin-hlorid.....	1 mg/L
D-kalcijum pantotemat.....	1 mg/L
Folna kiselina.....	1 mg/L
Niacinamid.....	1 mg/L
Piridoksal hidrohlorid.....	1 mg/L
Riboflavin.....	0,1 mg/L
Tiamin-hidrohlorid.....	1 mg/L
I-inositol.....	2,0 mg/L
Kalcijum-hlorid (CaCl ₂) (anhyd.).....	200 mg/L
Magnezijum-sulfat (MgSO ₄) (anhyd.).....	97,67 mg/L
Kalijum-hlorid (KCl).....	400 mg/L
Natrijum-bikarbonat (NaHCO ₃).....	2200,0 mg/L
Natrijum- hlorid (NaCl).....	6800,0 mg/L
Natrijum-fosfat monobazni (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O).....	140,0 mg/L
D-glukoza.....	1000,0 mg/L
Fenol crveno.....	10,0 mg/L

Neesencijalne aminokiseline

NEAA 100× Gibco[®] „Life Technologies/Thermo Fisher Scientific“, suplement za podlogu

Sastav:

Glicin.....	750,0 mg/L
L-alanin.....	880,0 mg/L
L-asparagin.....	1320,0 mg/L

L-aspartamska kiselina.....	1330,0 mg/L
L-glutaminska kiselina.....	1470,0 mg/L
L-prolin.....	1150,0 mg/L
L-serin.....	1150,0 mg/L

Medijum za zamrzavanje mikroorganizama

Mesni ekstrakt „Torlak“ (Beograd, Srbija).....	3,0 g
Kazein-hidrolizat „Torlak“ (Beograd, Srbija).....	5,0 g
Glicerol 85% „Merck“.....	150 mL
dH ₂ O.....	850 mL

Medijum je sterilisan u autoklavu 15 min na 121°C i 1,1 bar i čuvan na 20-25°C.

Tečna hranljiva podloga Middlebrook 7H9

Middlebrook 7H9 dehidratisana podloga Difco™ „Becton Dickinson“ (New Jersey, USA)	4,7 g
Glicerol 85% „Merck“.....	2 mL
dH ₂ O.....	898 mL
OADC BBL™ „Becton Dickinson“ (New Jersey, USA).....	100 mL

Podloga je sterilisana u autoklavu 15 minuta na 121°C i 1,1 bar.

Nakon hlađenja podloge do 50°C, u aseptičnim uslovima dodat je OADC.

Podloga je čuvana na 20-25°C.

Middlebrook 7H9 dehidratisana podloga Difco™ „Becton Dickinson“

(New Jersey, USA)

Sastav:

Amonijum-sulfat.....	0,5 g
L-glutaminska kiselina.....	0,5 g
Natrijum-citrat.....	0,1 g
Piridoksin.....	1,0 mg
Biotin.....	0,5 mg
Dinatrijum-fosfat.....	2,5 g
Kalijum-fosfat.....	1,0 g

Amonijum feri citrat.....	0,04 g
Magnezijum-sulfat.....	0,05 g
Kalcijum-hlorid.....	0,5 mg
Cink-sulfat.....	1 mg
Bakar-sulfat.....	1,0 mg
dH ₂ O.....	900 mL

OADC BBL™ „Becton Dickinson“ (New Jersey, USA), suplement za podlogu

Sastav:

Natrijum-hlorid.....	0,85 g
Goveđi albumin (frakcija V).....	5,0 g
Dekstroza.....	2,0 g
Katalaza.....	3 mg
dH ₂ O.....	100 mL

Krvni agar

Columbia agar sa 5% ovčije krvi „bioMérieux“ (Lyon, France), gotova podloga

Sastav:

Mesni i kazein pepton.....	10 mL
Hidrolizat proteina (goveđi ili svinjski).....	10 mL
Pepton govedeg srca.....	3 g
Kukuruzni skrob.....	1 g
Natrijum-hlorid.....	5 g
Agar.....	13,5 g
Ovčija krv.....	50 mL
dH ₂ O.....	1 L
pH 7,3	

Löwenstein-Jensen „bioMérieux“ (Lyon, France), gotova podloga

Sastav:

Skrob.....	30 g
Glicerol.....	7,4 mL

Jaja.....	620 mL
Kalijum-fosfat.....	2,5 g
Natrijum-hlorid.....	5 g
Magnezijum-sulfat.....	0,24 g
Magnezijum-citrat.....	0,6 g
L-asparagin.....	3,6 g
Malahit-zeleno.....	0,4 g
dH ₂ O.....	1 L
pH 7,1	

Trypton soja agar

TSA „bioMérieux“ (Lyon, France), gotova podloga

Sastav:

Kazein pepton (goveđi).....	15 g
Sojin pepton.....	5 g
Natrijum-hlorid.....	40 g
Agar.....	15 g
dH ₂ O.....	1 L
pH 7,3	

Sabouraud dekstrozni agar

SDA „bioMérieux“ (Lyon, France), gotova podloga

Sastav:

Kazein pepton.....	5 g
Mesni pepton.....	5 g
Dekstroza.....	40 g
Agar.....	15 g
dH ₂ O.....	1 L
pH 5,6	

Trypton soja bujon

TSB-ST „bioMérieux“ (Lyon, France), gotova podloga

Sastav:

Kazein pepton (goveđi).....	17 g
Sojin pepton.....	3 g
Natrijum-hlorid.....	5 g
Kalijum-fosfat.....	2,5 g
Dekstroza.....	2,5 g
dH ₂ O.....	1 L
pH 7,3	

Tioglikolatna podloga sa resazurinom

THIO-ST „bioMérieux“ (Lyon, France), gotova podloga

Kazein pepton (goveđi).....	15 g
L-cistin.....	0,5 g
Dekstroza.....	5 g
Ekstrakt kvasca.....	5 g
Natrijum-hlorid.....	2,5 g
Natrijum-tioglikolat.....	0,5 g
Tioglikolna kiselina.....	0,3 mL
Resazurin.....	0,001 g
Agar.....	0,75 g
dH ₂ O.....	1 L
pH 7,1	

Sabouraud dektrozni bujon

Sabouraud tečna podloga u prahu „Torlak “ (Beograd, Srbija).....	30 g
dH ₂ O.....	1 L

Podloga je sterilisana u autoklavu 15 minuta na 121°C i 1,1 bar.

pH je podešena na 5,7

Sabouraud tečna podloga u prahu „Torlak“ (Beograd, Srbija)

Sastav:

Pepton „Torlak“10,0 g/L

Dekstroza.....20,0 g/L

Medijum za ispiranje filter membrane

Fluid D „bioMérieux“ (Lyon, France), gotova podloga

Sastav:

Mesni pepton.....1 g

Polisorbat 80.....1 mL

dH₂O.....1 L

pH 7,1

Puferisani peptonski rastvor

PH7- F „bioMérieux“ (Lyon, France), gotova podloga

Sastav:

Kalijum-fosfat.....3,6 g

Natrijumhidrogenfosfat-dihidrat, 2H₂O.....7,2 g

Natrijum-hlorid.....4,3 g

Mesni pepton.....1 g

dH₂O.....1 L

3.2. Metode

3.2.1. Ispitivanje sterilnosti rastvora liganda, kompleksa Pd(II) i kompleksa Pt(II) metodom membranske filtracije

Sterilnost pripremljenih rastvora liganda, kompleksa Pd(II) i Pt(II) testirana je metodom membranske filtracije (Council of Europe, 2013). U testu sterilnosti korišćene su tečne hranljive podloge tripton soja bujon (TSB) i tioglikolat (Tio). U postupku membranske filtracije korišćeni su protočni kontejneri sa membranskim filterima za testiranje sterilnosti supstanci sa antimikrobnim dejstvom, sa porama veličine 0,45 μm (SteritestTM, Merck Millipore). Zatvoreni sistem transfera uzoraka i tečnih hranljivih podloga u testu obezbeđen je pomoću peristaltičke pumpe (SteritestTM Equinox). Uzorak zapremine 250 μL , propušten je kroz dva kontejnera sa membranskim filterom. Zatim su filter membrane isprane sa po 300 mL rastvora za ispiranje membrane (Fluid D), propuštanjem ovog rastvora kroz kontejnere. U jedan kontejner sa filter membranom zatim je sipano 100 mL hranljive podloge TSB, a u drugi 100 mL hranljive podloge Tio i kontejneri su zatvoreni. Navedenim postupkom uzorci su zasejani na po jednu hranljivu TSB i Tio podlogu. Test sterilnosti je postavljen u aseptičnim uslovima (ISO 14644-7:2004), u komori izolatora (Ehret) sterilisanoj parom 35% vodonik-peroksida, pomoću aparata za dekontaminaciju (VHP, Steris). U istim uslovima su postavljene i negativne kontrole – rastvor za ispiranje Fluid D i hranljive podloge TSB i Tio.

Zasejane podloge inkubirane su 14 dana. Hranljiva podloga TSB inkubirana je na temperaturi $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, za rast aerobnih bakterija i gljivica, a Tio na $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, za rast anaerobnih mikroorganizama. Po isteku perioda inkubacije izvršena je vizuelna kontrola hranljivih podloga i očitani su rezultati testa sterilnosti. Posle 14 dana inkubacije zasejane hranljive podloge ostale su bistre, čime je potvrđeno da su rastvori liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa sterilni (**Slika 3.1.**).



Slika 3.1. Odsustvo rasta mikroorganizama na tečnim podlogama TSB i Tio u testu sterilnosti (metoda membranske filtracije, u protočnim kontejnerima Steritest™)

3.2.2. Priprema sojeva mikroorganizama – oživljavanje i kultivacija

3.2.2.1. Kultivacija referentnih sojeva bakterija i gljivica

Liofilizovani mikroorganizmi su hidratirani pomoću originalnog sredstva za hidrataciju, a dobijenom suspenzijom natopljeni su brisevi kojima su zasejane odgovarajuće tečne podloge u epruvetama. Za rast bakterijskih sojeva korišćena je tečna podloga TSB, koja je inkubirana 18-24 h na $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Za rast gljivice korišćen je Sabouraud dekstrozni bujon (SDB) koji je inkubiran 48-72 h na $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Nakon porasta, kulture bakterija i gljivica presejane su na odgovarajuće čvrste podloge u petri šoljama. Kulture *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* i *S. abony* presejane su na tripton soja agar (TSA) i inkubirane 24 h na $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Kultura *C. albicans* presejana je na Sabouraud dekstrozni agar (SDA) i inkubirana 3-5 dana na $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Nakon porasta kultura na čvrstim hranljivim podlogama, kolonije su sakupljene špatulom i resuspendovane u medijumu za zamrzavanje. Ovako dobijene suspenzije su mešane na magnetnoj mešalici 60 minuta u erlenmajeru sa magnetom. Optička gustina (turbiditet) suspenzija mikroorganizama podešena je na 0,8-1,7 McF standarda, dodavanjem kolonija ili razblaživanjem suspenzija hranljivim medijumom za zamrzavanje.

Suspenzije mikroorganizama su zatim raspoređene u kriotube (po 1 mL) i zamrznute na -70°C, gde su čuvane do upotrebe u eksperimentima ispitivanja antimikrobne aktivnosti.

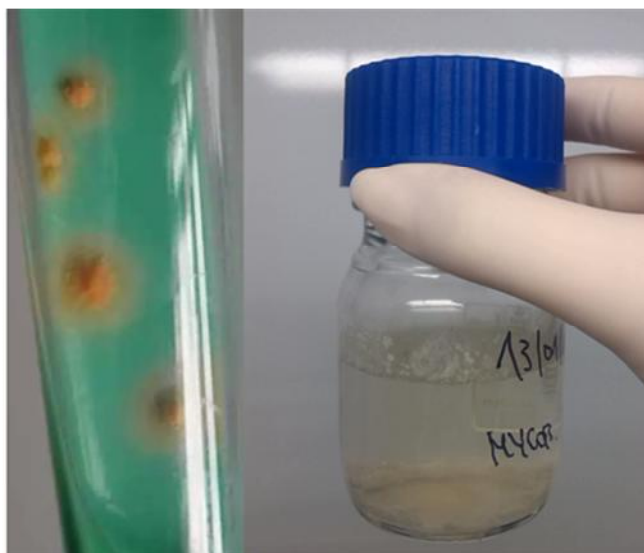
3.2.2.1.1. Identifikacija referentnih sojeva bakterija i gljivica

Identifikacija referentnih sojeva bakterija i gljivica izvršena je pomoću automatizovanog sistema VITEK® 2 (bioMérieux). Jedna kriotuba svakog referentnog soja odmrznuta je na sobnoj temperaturi. Po 1 mL suspenzije prebačen je u 10 mL puferisanog peptonskog rastvora pH 7,0 i suspenzija je dobro promešana na vorteksu. U zavisnosti od vrste mikroorganizma, 100 µL suspenzije sipano je na TSA ili SDA čvrstu hranljivu podlogu, a suspenzija je po površini podloge raspoređena sterilnim plastičnim L štapićem. Zasejane podloge su inkubirane 24 h na $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ za bakterije i 24-72 h na $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ za gljivice.

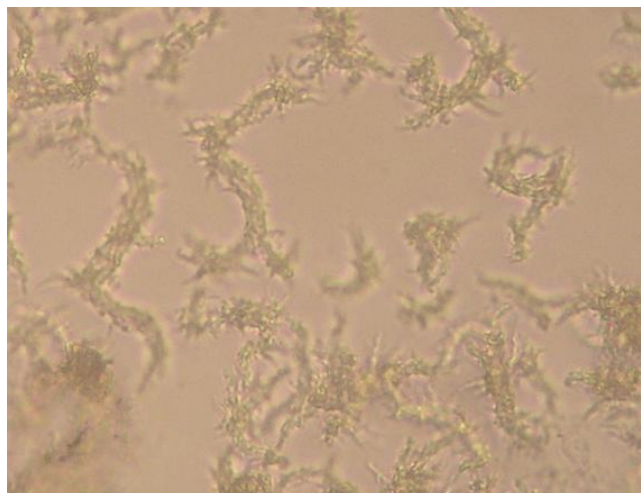
Nakon porasta specifičnih kolonija na čvrstim hranljivim podlogama, jedna kolonija je pokupljena sterilnim brisem i resuspendovana u 3 mL rastvora za VITEK® 2. Zatim je epruveta postavljena na denzitometar DensiCHEK™ (bioMérieux) i proveren je turbiditet. Turbiditet je podešen na 0,5-0,6 McF za *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* i *S. abony* i na 1,8-2,2 McF za *B. subtilis* i *C. albicans*, dodavanjem kolonija u suspenziju ili njenim razređivanjem rastvorom za VITEK® 2. Odabrane su odgovarajuće VITEK® 2 ID kartice (GN/GP/BCL/YST) sa supstratima za detekciju specifičnih biohemijskih osobina i zajedno sa pripremljenim suspenzijama postavljene su u nosač, tako da je cevčica ID kartice uronjena u odgovarajuću suspenziju. Nosač je postavljen u komoru za punjenje gde su ID kartice automatski punjene suspenzijom mikroorganizama. Nakon signala koji ukazuje da je punjenje završeno, nosač sa karticama i suspenzijama prebačen je u komoru za identifikaciju, gde je izvršena inkubacija preko noći. U periodu inkubacije, sistemom VITEK® 2 očitavane su fluorescencije tokom razgradnje supstrata, a na kraju je sistemskim softverom izvršena „fingerprint“ identifikacija do nivoa roda ili vrste, upoređivanjem rezultata sa bazom podataka.

3.2.2.2. Kultivacija *Mycobacterium bovis*

Za kultivaciju *Mycobacterium bovis* upotrebljena je liofilizovana BCG vakcina, sa živim atenuisanim bacilima *M. bovis* *Bacillus Calmette-Guérin* soja. Liofilizovana BCG vakcina rekonstituisana je u 1 mL fiziološkog rastvora i pripremljeno je razređenje 10^{-4} u tečnoj hranljivoj podlozi Middlebrook 7H9. U epruvetu sa gotovom čvrstom hranljivom podlogom Löwenstain-Jensen sipano 100 μ L razređenja. Inokulum je po podlozi ravnomerno raspoređen laganim horizontalnim pokretanjem otvorene epruvete, sve do sušenja površine podloge. Zasejana podloga je inkubirana 21-28 dana, na $37\pm 1^\circ\text{C}$. Nakon pojave beličasto-žutih kolonija *M. bovis* (**Slika 3.2.**), sterilnom ezom od 10 μ L, presejana je jedna kolonija na površinu tečne hranljive podloge Middlebrook 7H9 u bočici od 100 mL. Bočica je inkubirana 7-10 dana na $37\pm 1^\circ\text{C}$, do pojave pelikule sa kolonijama na površini hranljive podloge i taloga na dnu bočice (**Slika 3.3.**). Kultura je dalje održavana površinskim presejavanjem na svežu tečnu hranljivu podlogu Middlebrook 7H9, svakih 10-15 dana i korišćena u eksperimentima ispitivanja antimikrobne aktivnosti.



Slika 3.2. Kultura *M. bovis* na čvrstoj hranljivoj podlozi Löwenstain-Jensen (levo) i tečnoj podlozi Middlebrook 7H9 (desno)



Slika 3.3. Kolonije *M. bovis* u pelikuli na površini tečne hranljive podloge Middlebrook 7H9. Fotomikrografija snimljena na invertnom mikroskopu sa faznim kontrastom (uveličanje 400 ×)

3.2.2.2.1. Identifikacija *Mycobacterium bovis*

Identifikacija *M. bovis* izvršena je pregledom mikroskopskog preparata, nakon postupka bojenja po Ziehl-Neelsen-u (acid-fast bojenje).

Prvi deo postupka identifikacije *M. bovis* sastojao se iz pripreme preparata i bojenja. Sa čvrste podloge Löwenstein-Jensen sterilnom ezom je pokupljena jedna kolonija. Materijal je nanet na predmetno staklo i razmučen u jednoj kapi fiziološkog rastvora. Nakon sušenja nanetog materijala na sobnoj temperaturi, preparat je fiksiran prevlaćanjem iznad Bunzenovog plamenika. Zatim je naneta boja karbolfuksin na celokupnu površinu pločice i preparat je zagrejan do pojave pare pre ključanja boje. Preparat je ispran destilovanom vodom, tretiran rastvorom za odbojavanje 3-5 min i bojen metilenskim plavim u trajanju od 10 sekundi. Preparat je na kraju ispran destilovanom vodom i osušen na sobnoj temperaturi. Preparat je posmatran na svetlosnom mikroskopu pod imerzionim uveličanjem, uz upotrebu jedne kapi Kedrovog ulja za mikroskopiju. Pregledom preparata detektovano je prisustvo crvenih, acido-alkoholno rezistentnih mikobakterija.

3.2.2.3. Priprema suspenzije mikroorganizama

3.2.2.3.1. Priprema suspenzije referentnih sojeva bakterija i gljivica

Kriotube sa referentnim sojevima su odmrznute na sobnoj temperaturi, suspenzije su prebačene u 10 mL gotovog puferisanog peptonskog rastvora pH 7,0, dobro promešane na vorteksu i čuvane u frižideru na $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, najviše 5 dana. Neposredno pre upotrebe u eksperimentu, suspenzije mikroorganizama su razređene u odgovarajućoj tečnoj hranljivoj podlozi (TSB/SDB) do turbiditeta 0,5 McF standarda koji odgovara koncentraciji $1-2 \times 10^8$ CFU/mL. Zatim su od dobijene suspenzije pripremljena razređenja 1/100, približne koncentracije 1×10^6 CFU/mL. Od momenta podešavanja turbiditeta suspenzije mikroorganizama su upotrebljene u eksperimentima u roku od 30 minuta.

3.2.2.3.2. Priprema suspenzije *Mycobacterium bovis*

U erlenmajer od 200 mL sa 150 g sterilisanih metalnih perli, sipano je 10 mL sveže tečne hranljive podloge Middlebrook 7H9. U podlogu sa perlama dodavana je kultura *M. bovis* sa površine tečne hranljive podloge Middlebrook 7H9, sakupljanjem male količine materijala pomoću sterilne eze. Kultura je zatim nežno resuspendovana kružnim pokretima erlenmajera, do dobijanja homogene suspenzije. Turbiditet suspenzije je proveren na denzitometru i podešen na 1 McF standarda, dodavanjem kolonija i dodatnim mešanjem suspenzije ili dodavanjem tečne hranljive podloge. Od dobijene bakterijske suspenzije (koncentracije oko 1×10^8 CFU/mL), pripremljeno je razređenje 1/10 (koncentracije oko 1×10^7 CFU/mL) (Martin i sar., 2003). Od momenta podešavanja turbiditeta, suspenzija *M. bovis* je upotrebljena u eksperimentu u roku od 30 minuta.

3.2.3. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa ispitivana je resazurin mikrotitracionom metodom (Palomino i sar., 2002) pomoću UptiBlue™ testa. Antimikrobna aktivnost na odabrane mikroorganizme ispitivana je u opsegu

koncentracija 0,6 μ M - 5 mM, u zavisnosti od vrste mikroorganizma, a kao pozitivne kontrole korišćeni su antibiotici enrofloksacin, oksitettraciklin, streptomycin i antimikotik klotrimazol.

U mikrotitar ploče je sipano po 100 μ L odgovarajuće tečne hranljive podloge (TSB/SDB/Middlebrook 7H9). Pripremljena su dvostruka serijska razređenja jedinjenja prebacivanjem 100 μ L iz jednog u drugi bunar. U ploče je sipano po 100 μ L suspenzije mikroorganizama odgovarajućeg soja, do finalne koncentracija 5×10^5 CFU/mL za referentne sojeve i 5×10^6 CFU/mL za *M. bovis*. U pločama su postavljene i sledeće kontrole: kontrola suspenzije mikroorganizama (hranljiva podloga i suspenzija mikroorganizama), pozitivna kontrola (hranljiva podloga i antibiotik/antimikotik), kontrola rastvarača (hranljiva podloga i DMSO) i kontrola hranljive podloge. Mikrotitar ploče sa referentnim sojevima su inkubirane 24 h na $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ za bakterije i 48 h na $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ za gljivice. Ploče *M. bovis* su zatvorene u plastične kese i inkubirane na $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 7-10 dana.

Ploče sa referentnim sojevima su nakon inkubacije kontrolisane na invertnom mikroskopu radi detekcije замуćenja u kontrolama suspenzije mikroorganizama. Kontrola suspenzije mikroorganizma u pločama sa *M. bovis* proveravana je od sedmog do desetog dana, do pojave pelikule sa *M. bovis* na površini hranljive podloge. Ploče su zatim tretirane UptiBlueTM reagensom, prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.13.

Na osnovu boje suspenzija u bunarima nakon UptiBlueTM testa, određene su vrednosti MIC. Suspenzije koje su pokazale odsustvo rasta mikroorganizama, presejane su na krvni agar za bakterijske referentne sojeve, na svežu tečnu podlogu Middlebrook 7H9 za *M. bovis* i na SDA za gljivice. Posle inkubacije zasejanih hranljivih podloga, izvršena je detekcija rasta mikroorganizama i određene su vrednosti MBC i MFC.

3.2.4. Čelijske kulture

3.2.4.1. Održavanje čelijskih kultura

Održavanje čelijskih kultura, priprema suspenzija i krioprezervacija izvedeni su prema procedurama koje je opisao Freshney (2005) u laboratorijskom priručniku za

ćelijske kulture. Ćelije su gajene u monosloju u hranljivom medijumu za kultivaciju, u polietilenskim sudovima (flaskovima), površine 25-175 cm².

Ćelijske linije su čuvane u metalnom kontejneru u parnoj fazi tečnog azota, na oko -170°C, u glavnoj i radnoj banci ćelija Nacionalne kontrolne laboratorije Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije i prema planu eksperimenata su oživljavane i kultivisane. Odmrzavanje i oživljavanje ćelijske linije izvedeno je na sledeći način: kriotuba sa ćelijama izvađena je iz tečnog azota i brzo odmrznuta temperiranjem u vodenom kupatilu na 37°C, u trajanju od nekoliko minuta. Ćelije su zatim nežno resuspendovane u 20 mL hranljivog medijuma za kultivaciju i prebačene u epruvetu za centrifugiranje sa konusnim dnom, zapremine 50 mL. Ćelije su centrifugirane 7 minuta, na 1200 rpm, na 4°C, u cilju uklanjanja krioprotektanta DMSO i medijuma za krioprezervaciju. Nakon centrifugiranja, supernatant je pažljivo uklonjen mikropipetom, a ćelije su resuspendovane u 5 mL hranljivog medijuma za kultivaciju. Ćelije su potom prebačene u plastičnu posudu za kultivaciju – flask veličine 75 cm², u koji je dodato 25 mL hranljivog medijuma za kultivaciju. Ćelije su gajene u inkubatoru, na temperaturi 37°C.

Tokom rasta, ćelijske kulture su svakog dana pregledane na invertnom mikroskopu, praćen je opšti izgled kulture, morfološke karakteristike ćelija i prisustvo kontaminacije bakterijama i gljivicama. Takođe je kontrolisana boja medijuma kojom je praćena utrošenost hranljivih materija i promena pH. U slučaju pojave žute boje, hranljivi medijum je zamenjen svežim. Praćena je i zamućenost medijuma koja je pokazatelj kontaminacije, a kontaminirane ćelijske kulture isključene su iz dalje kultivacije.

Nakon formiranja konfluentnog ćelijskog monosloja u kome ćelije prekrivaju celu površinu za rast, kulture su tripsinizirane i dobijene su suspenzije pojedinačnih ćelija. Veći deo suspenzije ćelija korišćen je za eksperimente, a manji deo je zasejavan u novu posudu za rast (pasažiranje), radi dalje kultivacije ćelija. Broj zasejanih ćelija za kultivaciju sledeće pasaže zavisio je od veličine flaska i planiranih eksperimenata, a u flask od 75 cm² zasejavano je $1-5 \times 10^6$ ćelija. Na posudi za rast ćelija evidentirani su podaci o kultivaciji ćelijske linije: naziv, broj pasaže, koncentracija zasejanih ćelija i datumi promene hranljivog medijuma.

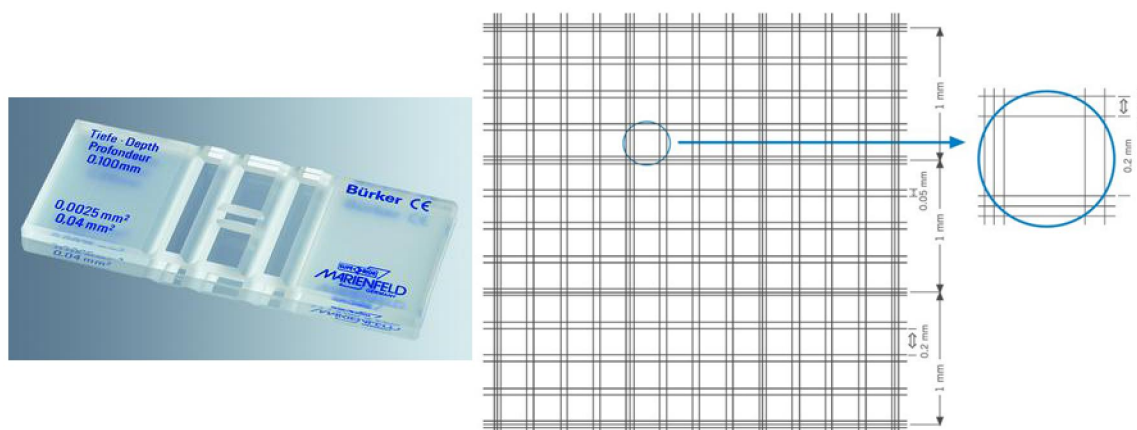
3.2.4.2. Trypsinizacija ćelijskih kultura

Trypsinizaciji se pristupalo po formiranju konfluentnog ćelijskog monosloja, kada su ćelije pokrivale čitavu površinu za rast u flasku. Iz posude sa ćelijskim monoslojem uklonjen je hranljivi medijum za kultivaciju. Ćelijski monosloj je ispran sa 5-10 mL rastvora DPBS, laganim pokretima posude – „kupanjem“, u trajanju od 1 min, radi eliminisanja ćelijskih metaboličkih produkata i serumskih proteina koji mogu da neutrališu tripsin. Nakon ispiranja monosloja rastvor DPBS je uklonjen. Ćelijski monosloj je zatim 1 min „kupan“ rastvorom 0,05% tripsin-EDTA (0,06 mL/cm² konfluentnog ćelijskog monosloja). Tripsin-EDTA je uklonjen tako da je u posudi preostalo oko 0,5 mL. Zatim su ćelije sprane sa zida posude za rast mlazom hranljivog medijuma za kultivaciju i dobro resuspendovane pomoću pipete i propipetora i dobijena je suspenzija pojedinačnih ćelija. Koncentracija ćelija u ćelijskoj suspenziji određivana je brojanjem pomoću hemocitometra.

3.2.4.3. Određivanje broja ćelija pomoću hemocitometra, bojenjem tripan plavim

Za brojanje ćelija u ćelijskoj suspenziji korišćen je hemocitometar – Bürker komora i manuelni brojač markiranih ćelija. Za razlikovanje živih i mrtvih ćelija upotrebljena je boja tripan plavo, koja ne prolazi kroz ćelijsku membranu očuvanog integriteta i boji samo mrtve ćelije (Strober, 2001).

Uzorak suspenzije ćelija od 100 µL pomešan je sa 100 µL gotovog rastvora boje tripan plavo. Nakon 5 minuta delovanja boje, Bürker komora je napunjena ćelijskom suspenzijom pomoću mikropipete, prekrivena pokrovnim staklom i ćelije su prebrojane pod svetlosnim mikroskopom. Bürker komora je sačinjena od dve komorice koje su ugraviranim linijama podeljene na 9 velikih kvadratnih polja, širine 1 mm (**Slika 3.4.**). Svaki kvadrat je podeljen na 16 malih kvadrata, širine 0,2 mm. Između malih kvadrata nalaze se duple linije, promera 0,05 mm, a dubina komore je 0,1 mm.



Slika 3.4. Hemocitometar - Bürker komora za određivanje broja ćelija u suspenziji

U svakoj komorici su prebrojane ćelije u 25 malih kvadrata, što odgovara zapremini 0,1 mL. Brojanjem su obuhvaćene ćelije pozicionirane u unutrašnjosti polja, kao i ćelije na levoj i donjoj ugraviranoj liniji. Izračunata je srednja vrednost broja ćelija po komorici, u 0,1 mL ćelijske suspenzije. Broj ćelija po mililitru suspenzije računat je prema obrascu:

$$\text{Broj ćelija / mL} = n \times 10^4 \times R$$

Gde je: n – srednja vrednost broja ćelija u dve komorice u 0,1 mL; R – faktor razblaženja u rastvoru za bojenje ($R = 2$).

Ovim postupkom određivan je broj živih (nebojene, prozračne ćelije), broj mrtvih ćelija (plavo obojene) i ukupan broj ćelija u suspenziji.

3.2.5. Test citotoksičnosti

Citotoksičnost liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa ispitivana je na MRC-5, Hep-2 i A549 ćelijama, praćenjem preživljavanja ćelija nakon tretmana od 48 sati, u resazurin mikrotitracionom UptiBlue™ testu (Simić i sar., 2016). Jedinjenja rastvorena u DMSO razređena su do najveće netoksične koncentracije ovog rastvarača za navedene ćelijske linije (0,78%), pa su testirane koncentracije liganda do 336,5 μM , Pd(II) kompleksa do 268 μM i Pt(II) kompleksa do 155,2 μM . Kao pozitivne kontrole korišćeni su citostatici cisplatina, karboplatina i oksaliplatina.

Pripremljene su ćelijske suspenzije koncentracije 1×10^5 ćel/mL u hranljivom medijumu za kultivaciju ćelija sa 5-10% FBS i zasejane u mikrotitar ploče sa 96 bunara sa ravnim dnom, 100 μ L po bunaru. Ploče su inkubirane na 37°C, u atmosferi sa 5% CO₂. Posle 24 h, kvalitet ćelijskog monosloja je proveren na invertnom mikroskopu, a hranljivi medijum za kultivaciju je uklonjen. Jedinjenja su serijski dvostruko razređena u hranljivom medijumu za kultivaciju, prebačena (po 100 μ L) u mikrotitar ploče sa ćelijskim kulturama i inkubacija je nastavljena narednih 48 h. U svakoj mikrotitar ploči postavljene su i odgovarajuće kontrole – kontrola ćelija (ćelije sa hranljivim medijumom), kontrola medijuma (hranljivi medijum – blank) i kontrola rastvarača (dvostruka serijska razređenja rastvarača DMSO u hranljivom medijumu). Nakon 48 h inkubacije, mikrotitar ploče su dalje tretirane u UptiBlue™ testu, koji je opisan u poglavlju 3.2.13.

Rezultati citotoksičnosti izraženi su kao koncentracije koje smanjuju preživljavanje ispitivane kulture ćelija za 50%, IC₅₀. Ova vrednost je očitana sa krive preživljavanja ćelija i prikazana kao srednja vrednost tri eksperimenta, sa 3-6 merenja. Indeks selektivnosti (SI) prema kancerskim ćelijama izračunat je kao odnos IC₅₀ vrednosti zdrave i kancerske ćelijske linije.

3.2.6. Proliferacija ćelija i određivanje vremena dupliranja populacije ćelija

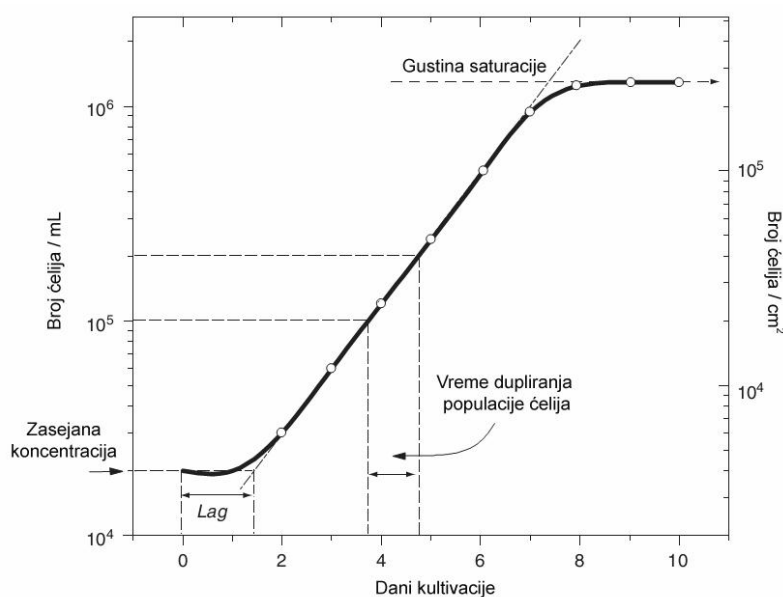
Proliferacija ćelija i vreme dupliranja populacije ćelija (eng. Population Doubling Time, PDT) izloženih različitim koncentracijama jedinjenja, praćeni su eksperimentom kratkotrajne šestodnevne proliferacije, a broj vijabilnih ćelija određivan je metodom selektivnog bojenja tripan plavim.

Ćelijske suspenzije koncentracije 2×10^4 ćel/mL, u hranljivom medijumu sa 10% FBS, zasejane su u 6 ploča za kultivaciju ćelija sa 12 bunara (1,5 mL/bunaru) i inkubirane na 37°C i 5% CO₂. Posle 5 h inkubacije, na invertnom mikroskopu je proverena adhezija ćelija za dno posude i hranljivi medijum je uklonjen. U ploče su sipane različite koncentracije jedinjenja, pripremljene u hranljivom medijumu sa 10% FBS i inkubacija je nastavljena narednih 6 dana. Na svaka 24 h uzorkovana je jedna ploča, a ćelijski monoslojevi u bunarima tripsinizirani. Nakon tripsinizacije, suspenzije su obojene tripan plavim, ćelije izbrojane na hemocitometru i određen je broj živih, broj

mrtvih i ukupan broj ćelija u bunaru. Svaki eksperiment izveden je u duplikatu ili triplikatu.

Testirane su koncentracije jedinjenja u okviru netoksičnih koncentracija $\leq IC_{20}$ (1,1-102 μM), a u zavisnosti od dobijenih rezultata i ćelijske linije, testirane su i koncentracije IC_{20} - IC_{60} (18,9-27,9 μM). U test su uključene odgovarajuće kontrole: kontrola ćelija (netretirane ćelije) i kontrola rastvarača (najveća koncentracija DMSO, ekvivalentno najvećoj koncentraciji u rastvoru primenjenog jedinjenja), a kao pozitivne kontrole korišćeni su citostatici cisplatina, karboplatina i oksaliplatina.

Rezultati proliferacije su izraženi procentom proliferacije tretiranih ćelija u odnosu na kontrolu ćelija, a koncentracija koja je dovela do 50% inhibicije proliferacije uzeta je kao značajni efekat. Vrednosti PDT su očitane u eksponencijalnoj fazi krive rasta populacije (**Slika 3.5.**), kao vreme potrebno da se broj ćelija udvostruči (Freshney, 2005).



Slika 3.5. Kriva rasta populacije ćelija i određivanje PDT u eksponencijalnoj fazi. Preuzeto sa izmenama (Freshney, 2005)

3.2.7. Morfološka analiza ćelijske smrti bojenjem ćelija rastvorom akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB)

Za analizu tipa ćelijske smrti A549 ćelija, primenjeno je dvostruko bojenje ćelija rastvorom akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB). Ćelije su tretirane IC_{50} koncentracijom liganda koja je dobijena u testu citotoksičnosti.

Pripremljena je suspenzija A549 ćelija u hranljivom medijumu sa 10% FBS koncentracije 1×10^5 ćel/mL, koja je zasejana u ploče sa 6 bunara (3 mL/bunaru). Ploče sa ćelijama su inkubirane 24 časa na temperaturi $37^{\circ}C$, u atmosferi sa 5% CO_2 . Medijum za kultivaciju ćelija je uklonjen iz bunara, ćelije su zatim isprane rastvorom DPBS. Pripremljena je IC_{50} koncentracija liganda ($168,3 \mu M$) u hranljivom medijumu za kultivaciju ćelija koja je sipana u bunare i inkubacija je nastavljena narednih 48 h. Tokom inkubacije, ćelije su opservirane pomoću invertnog mikroskopa sa faznim kontrastom i načinjene su reprezentativne fotomikrografije ćelijskog monosloja. Posle 48 h ćelije su tripsinizirane i u uzorak od 20 μL ćelijske suspenzije dodato je 2 μL AO/EB rastvora. Obojene ćelije su analizirane na fluorescentnom mikroskopu (Leica), na $400 \times$ uveličanju i fotografisane u roku od 30 minuta, pre nego što je fluorescencija počela da slabi. Na osnovu emisije fluorescencije, integriteta ćelijske membrane i morfoloških karakteristika hromatina u obojenim nukleusima, ćelije su razlikovane prema opisu Baškić i sar. (2006) i Syed Abdul Rahman i sar. (2013).

3.2.8. Ispitivanje uticaja na migratorni potencijal ćelija *in vitro* (Wound healing ili Scratch assay)

Uticaj liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa na migratorni potencijal MRC-5, Hep-2 i A549 ćelija ispitan je u *Wound healing* ili *Scratch assay*-u (Liang i sar., 2007) kojim je praćeno „zarastanja rane“ u konfluentnom ćelijskom monosloju.

Pripremljena je ćelijska suspenzija koncentracije 1×10^5 ćel/mL, u medijumu za kultivaciju ćelija sa dodatkom 10% FBS. Ćelijska suspenzija je zasejana u ploče sa 6 bunara (3 mL/bunaru), a ploče su inkubirane na $37^{\circ}C$, sa 5% CO_2 , do formiranja konfluentnog monosloja. Iz ploča je uklonjen medijum, a zatim je vrhom sterilnog nastavka za mikropipetu (p200) kroz ćelijski monosloj povučena prava linija i načinjen

prorez, tako da su u bunarima formirane prazne zone konstantne širine, ovičene konfluentnim ćelijskim monoslojem. Monosloj je ispran rastvorom DPBS. Pripremljene su koncentracije IC₂₀ u hranljivom medijumu bez dodatka FBS („serum-free“ medijum) kako bi se izbegla dalja proliferacija ćelija. U test je uključena i negativna kontrola (netretirane ćelije), a kao pozitivna kontrola poslužila je cisplatina. Neposredno posle formiranja proreza u ćelijskom monosloju, kao i posle 24 h i 48 h inkubacije, ćelije su fotografisane digitalnim fotoaparatom povezanim sa invertnim mikroskopom sa faznim kontrastom, a vidno polje je obuhvatalo napravljeni prorez i njegovu okolinu. Tokom eksperimenta, u cilju što preciznije komparacije, fotografisana su uvek ista vidna polja za odgovarajući tretman. Ispitivanje je izvedeno u triplikatu, a u svakom eksperimentu procenjena je migracija ćelija u tri vidna polja. Rezultati su prikazani serijom reprezentativnih fotomikrografija i izraženi procentima migracije ćelija, odnosno procentima „zarastanja rane“.

3.2.9. Ispitivanje genotoksičnosti komet testom

Genotoksičnost je ispitivana komet testom, a primenjena je alkalna verzija testa prema protokolu Singh i sar. (1988).

Pripremljene su ćelijske suspenzije koncentracije 1×10^5 ćel/mL u hranljivom medijumu za kultivaciju. Ćelije su zasejane u ploče sa 12 bunara koje su inkubirane na 37°C, u atmosferi obogaćenoj sa 5% CO₂. Nakon 24 h rasta ćelijske kulture, uklonjen je medijum i ćelije su isprane rastvorom DPBS. Za tretman ćelija u komet testu izabrane su subtoksične i netoksične koncentracije jedinjenja sa preživljavanjem ćelija većim od 40%. Pripremljene koncentracije jedinjenja u hranljivom medijumu za kultivaciju, sipane su u bunare sa ćelijskim monoslojem i ploče su inkubirane 48 h, na 37°C, u atmosferi obogaćenoj sa 5% CO₂. Sa ćelijskog monosloja je uklonjen medijum za kultivaciju, ćelije su isprane rastvorom DPBS, tripsinizirane i dobijene su suspenzije pojedinačnih ćelija. Kao pozitivna kontrola u komet testu korišćena je cisplatina. Kao kontrole u test su uključene i kontrola ćelija i kontrola rastvarača (DMSO).

Sve manipulacije na pojedinačnim ćelijama u postupku komet testa obavljene su pod žutim osvetljenjem. Prethodno očišćene (odmašćene) mikroskopske pločice potopljene su u 1% rastvor agaroze normalne tačke topljenja (eng. - Normal Melting

Point - NMP) i osušene na sobnoj temperaturi 24 h. Na pločice je potom, na dva mesta, nanešeno po 80 μ L 1% NMP agaroze, koja je prekrivena pokrovnim staklom, kako bi se agarozu ravnomerno rasporedila po pločici. Pločice su temperirane 5 min na 4°C, kako bi se agarozu stegla. Od pripremljene suspenzije ćelija, 30 μ L je pomešano sa 70 μ L agaroze niske tačke topljenja (eng. – Low Melting Point - LMP). Potom su pokrovnostakla uklonjena i na pločice je nanešeno 70 μ L 1% LMP agaroze sa ćelijama. Da bi se agarozu ravnomerno rasporedila, agarozu je prekrivena pokrovnim staklom. Pločice su ponovo temperirane 5 min na 4°C. Nakon skidanja pokrovnih stakala, pločice su 1 h stajale potopljene u rashlađeni rastvor za lizu. Pločice su zatim smeštene u kadicu za elektroforezu i prelivene hladnim rastvorom za denaturaciju i elektroforezu. Pločice su inkubirane 20 min na 4°C, bez struje u cilju denaturacije DNK. U sledećoj fazi izvršena je elektroforeza (0,5 - 0,75 V/cm, 300 mA) u trajanju od 20 min, u istom rastvoru koji je korišćen za denaturaciju. Nakon elektroforeze, pločice su prebačene na 15 min u hladan rastvor za neutralizaciju. Fiksacija ćelija je izvršena u hladnom metanolu u trajanju 15 min. Nakon fiksacije, pločice su osušene 24 h u mraku na 4°C. Fiksirane pločice su do analize čuvane u klasteru. Neposredno pre analize, pločice su potopljene u hladnu destilovanu vodu 15 min kako bi se agarozu rehidrirala. Pre očitavanja kometa, gelovi su obojeni, nanošenjem 20 μ L rastvora akridin-orandž (AO), koncentracije 2 μ g/mL, i prekriveni pokrovnim staklom. Pločice su analizirane na fluorescentnom mikroskopu (Leica, DMLS). Na svakoj pločici analiziran je uzorak veličine 50 kometa.

Za analizu veličine oštećenja DNK ćelija korišćen se softver Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, UK), koji automatski prepoznaje nivo oštećenja. Nivo oštećenja DNK u ovom radu praćen je preko parametara TI.

3.2.10. Određivanje titra virusa referentnog standarda PV1

Titar referentnog standarda PV1 određen je neposredno posle neutralizacije PV2 i PV3. Titar PV1 određen je mikrotitracionom metodom, praćenjem CPE na Hep-2 ćelijskoj kulturi (WHO, 2004). Ćelijska suspenzija koncentracije 1×10^5 ćel/mL u hranljivom medijumu za kultivaciju ćelija, zasejana je u mikrotitar ploče sa 96 bunara koje su inkubirane 24 h, na 37°C, u atmosferi obogaćenoj sa 5% CO₂. Posle 24 časa kultivacije ćelija i formiranja konfluentnog monosloja, hranljivi medijum je uklonjen i

ćelije su isprane rastvorom DPBS. Od 1 mL stoka virusne suspenzije 10^{-3} referentnog standarda PV1 pripremljena su razređenja od $10^{-3.5}$ do 10^{-7} , na 0,5 $\log_{10}$, u hranljivom medijumu za održavanje ćelija. U 10 bunara mikrotitar ploča sa ćelijskim monoslojem uneto je po 100 μ L razređenja od $10^{-3.5}$ do 10^{-7} . U mikrotitar ploče postavljene su i odgovarajuće kontrole: kontrola ćelija (ćelije sa hranljivim medijumom) i kontrola hranljivog medijuma. Inokulisana ćelijska kultura je inkubirana na 37°C i 5% CO_2 . Posle 7 dana, u svakom bunaru je procenjeno prisustvo/odsustvo CPE, na invertnom mikroskopu. Prilikom opservacije mikrotitar ploča, ukoliko je ćelijski monosloj oštećen, a ćelije promenjene morfologije – sitne, zaokrugljene ili plivajuće, CPE je okarakterisan kao pozitivan. Ako je ćelijski monosloj neoštećen, a ćelija normalne morfologije, CPE je procenjen kao negativan. Titar PV1 je izračunat Kärber-ovom formulom:

$$\log \text{TCID}_{50}/0,1 \text{ mL} = L - d (S - 0,5)$$

gde je: L – log najmanjeg razređenja u testu (-3,5), d – razlika između log razređenja (0,5 log), S – ukupan broj pozitivnih CPE u ploči / broj bunara po razređenju.

Titar PV1 izražen je bojem $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ (eng. Tissue Culture Infections Dose 50) koji odgovara najvećem razblaženju virusne suspenzije koje izaziva pojavu CPE u 50% inokulisanih ćelijskih kultura.

3.2.11. Priprema virusne suspenzije PV1

Neposredno pre upotrebe u eksperimentima antivirusne aktivnosti, kriotuba sa stok suspenzijom referentnog standarda PV1 (razređenje 10^{-3}) odmrznuta je na sobnoj temperaturi i razređena do koncentracije 100 $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, u hranljivom medijumu za održavanje ćelija. Finalna suspenzija PV1 je mešana 5 minuta na magnetnoj mešalici.

3.2.12. Ispitivanje antivirusne aktivnosti praćenjem citopatogenog efekta

Antivirusna aktivnost liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa ispitivana je na PV1-Hep-2 model-sistemu, praćenjem CPE nastalog aktivnošću virusa (Ferreira i sar., 1979). Za kvantifikaciju CPE upotrebljen je UptiBlue™ test (Simić i sar., 2016).

Ćelijska suspenzija koncentracije 1×10^5 ćel/mL, pripremljena u medijumu za kultivaciju ćelija, zasejana je u mikrotitar ploče sa 96 bunara (100 µL/bunaru). Ploče su zatim inkubirane 24 h na 37°C, u atmosferi obogaćenoj sa 5% CO₂, do formiranja konfluentnog monosloja. Pripremljena su dvostruka serijska razređenja jedinjenja $\leq$ IC₂₀, u 100 µL hranljivog medijuma za održavanje ćelija, počev od 19 µM liganda, 8,24 µM Pd(II) kompleksa i 17 µM Pt(II) kompleksa, serijskim prebacivanjem 100 µL razređenja iz jednog u drugi bunar. Koncentracije IC₂₀ dobijene su u testu citotoksičnosti na Hep-2 ćelijama. Kao pozitivna kontrola antivirusne aktivnosti korišćen je interferon α -2a do koncentracije 400 IU/mL. Odsustvo citotoksičnosti interferona α -2a na Hep-2 ćelijama prethodno je potvrđeno je pri koncentracijama $\leq$ 1000 IU/mL. U test su uključene odgovarajuće kontrole: kontrola ćelija (netretirane ćelije), kontrola rastvarača (ćelije sa dvostrukom serijskim razređenjima DMSO, počev od 0,1%, što odgovara koncentraciji u najmanjem razređenju test jedinjenja), kontrola infektivnosti virusa (ćelije sa virusnom suspenzijom) i kontrola medijuma (hranljivi medijum za održavanje ćelija). Ćelije su izložene delovanju supstanci u dve vrste tretmana: tretman pre i tretman posle infekcije virusom PV1 (Šmidling i sar., 2008; Enan i sar., 2012).

U tretmanu pre infekcije Hep-2 ćelija virusom, u ploče sa ćelijskim monoslojem dodate su različite koncentracije jedinjenja i odgovarajuće kontrole, a ploče su inkubirane 5 h na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂. Jedinjenja su zatim uklonjena, ćelijski monosloj je ispran sa 100 µL rastvora DPBS i u bunare je sipana suspenzija virusa PV1 (100 µL/bunaru) koncentracije 100 TCID₅₀/mL.

U tretmanu posle infekcije, Hep-2 ćelijski monosloj prvobitno je inkubiran sa PV1 suspenzijom (100 µL koncentracije 100 TCID₅₀/mL), 90 minuta na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂. Virusna suspenzija je zatim uklonjena i ćelijski monosloj je ispran

rastvorom DPBS (100 μ L). Zatim je 100 μ L različitih koncentracija jedinjenja i odgovarajućih kontrola dodato u bunare sa ćelijskim monoslojem.

Nakon 7 dana inkubacije ploča, pomoću invertnog mikroskopa provereno je prisustvo 100% CPE u kontroli infektivnosti virusa, a zatim je primenjen UptiBlue™ test, prema proceduri opisanoj u poglavlju **3.2.13**.

Rezultati preživljavanja Hep-2 ćelija u UptiBlue™ testu, prikazani su krivom redukcije CPE i očitane su vrednosti EC₅₀ (eng. Effective Concentration 50). Vrednosti EC₅₀ su definisane kao koncentracije jedinjenja koje inhibiraju 50% virusne aktivnosti, odnosno redukuju 50% CPE. Antivirusna aktivnost je izražena terapijskim indeksom (THI – eng. Therapeutic Index), koji odgovara relativnoj efikasnosti jedinjenja u inhibiciji virusne aktivnosti u poređenju sa njegovom citotoksičnošću (IC₅₀/EC₅₀) (FDA, 2006). Ukoliko nije bilo moguće očitati EC₅₀ i izračunati THI, antivirusni efekat izražen je procentom redukcije CPE.

3.2.13. UptiBlue™ test

U eksperimentima citotoksičnosti i antivirusne aktivnosti pomoću UptiBlue™ testa određivan je stepen preživljavanja ćelija tretiranih citotoksičnim ili citopatogenim agensom, pomoću resazurina UptiBlue™ (Simić i sar., 2016). Nakon tretmana ćelija, iz mikrotitar ploča uklonjen je hranljivi medijum. U bunare je sipano 100 μ L rastvora DPBS i monosloj je ispran pomoću multikanalne mikropipete, s posebnom pažnjom da se ćelijski monosloj ne ošteti. Posle ispiranja, rastvor DPBS je uklonjen. Pripremljeno je razblaženje reagensa UptiBlue™ 1/10, u hranljivom medijumu za kultivaciju ćelija, koje je dodato u sve bunare mikrotitar ploča (po 100 μ L), izuzev u blank i ploče su inkubirane 3 h, na 37°C u atmosferi obogaćenoj sa 5% CO₂. Posle inkubacije, spektrofotometrijski je izmeren intenzitet boja resazurina i rezorufina, merenjem apsorbancija na 540 nm i 600 nm, na ELISA čitaču Thermo Labsystems Multiscan Acsent. Na osnovu izmerenih apsorbancija, izračunat je procenat preživljavanja ćelija, prema sledećoj formuli:

$$P (\%) = \frac{(\epsilon_{ox})_{\lambda 2} A_{\lambda 1} - (\epsilon_{ox})_{\lambda 1} A_{\lambda 2}}{(\epsilon_{ox})_{\lambda 2} A_{\lambda 1}^0 - (\epsilon_{ox})_{\lambda 1} A_{\lambda 2}^0} \times 100$$

test jedinjenja kontrole ćelija

Gde je:

P – preživljavanje ćelija,

$A_{\lambda 1}$ – apsorbancija razređenja test jedinjenja na 570 nm,

$A_{\lambda 2}$ – apsorbancija razređenja test jedinjenja na 600 nm,

$A_{\lambda 1}^0$ – apsorbancija kontrole ćelija na 570 nm,

$A_{\lambda 2}^0$ – apsorbancija kontrole ćelija na 600 nm,

$(\epsilon_{ox})_{\lambda 1}$ – koeficijent molarne ekstinkcije za oksidovanu formu UptiBlue™ na 570 nm (80,856),

$(\epsilon_{ox})_{\lambda 2}$ – koeficijent molarne ekstinkcije za oksidovanu formu UptiBlue™ na 600 nm (117,216).

UptiBlue™ test je u ovom radu upotrebljen i u ispitivanjima antimikrobne aktivnosti, za detekciju rasta mikroorganizama. Nakon inkubacije jedinjenja sa odgovarajućim mikroorganizmima, u mikrotitar ploče je sipan reagens UptiBlue™ do finalne koncentracije 6,7% (13,4 µL nerazblaženog reagensa po bunaru). Posle 15 min inkubacije na sobnoj temperaturi za referentne sojeve i 24 h inkubacije na 37°C za *M. bovis*, na osnovu boje suspenzije u bunarima mikrotitar ploča izvršena je detekcija rasta mikroorganizama. Plava boja suspenzije ukazivala je na odsustvo rasta, dok je crvena boja suspenzije ukazivala na prisustvo rasta mikroorganizama.

3.2.14. Statističke analize

Statistička analiza rezultata u testovima ispitivanja PDT, migracije ćelija u *Wound healing* ili *Scratch* testu i redukcije CPE u ispitivanju antivirusne aktivnosti izvršena je pomoću softverskog alata Excel (Microsoft Office 2007, Cambridge Soft, SAD). Za statističku analizu značajnosti razlike između rezultata dobijenih u tretmanima i u kontroli, primenjen je Studentov *t*-test, a vrednost parametra $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

Statistička analiza rezultata komet testa izvršena je u programu Statistica 6.0 Software (StatSoft, Inc.). Pomoću Kolmogorov-Smirnov testa, proveravano je da li rezultati komet testa imaju normalnu raspodelu. Razlika između grupa testirana je primenom neparametrijskog Mann Whitney U-testa sa nivoom značajnosti $p < 0,05$.

Za obradu rezultata titra PV1 i analizu validnosti testa korišćen je program za statističku analizu bioloških dilucionih testova – CombiStats (EDQM, 2009). Analiza rezultata urađena je u skladu sa zahtevima poglavlja 5.3 Evropske farmakopeje (Council of Europe, 2013).

REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. Antimikrobna aktivnost liganda i njegovih Pd(II) i Pt(II) kompleksa

Antimikrobna aktivnost liganda, Pd(II) kompleksa i Pt(II) kompleksa praćena je mikrotitracionom metodom korišćenjem UptiBlue™ test na bazi resazurina. Antibakterijski efekat je praćen na grampozitivnim bakterijama: *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Mycobacterium bovis* BCG *Bacillus Calmette-Guérin* i gramnegativnim bakterijama: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 10536 i *Salmonella abony* NCTC 6017. U testu su korišćeni referentni antibiotici – oksitetraciklin (OTC), enrofloksacin (EFX) i streptomycin (STM). Antifungalna aktivnost praćena je na *Candida albicans* ATCC 10231, a kao referentni antimikotik upotrebljen je klotrimazol (CLT).

Antimikrobna aktivnost liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa ispitana je u opsegu 0,6-5 μM u zavisnosti od mikroorganizma. Na osnovu porasta mikroorganizama pri različitim koncentracijama test jedinjenja, određene su MIC i MBC/MFC. Dobijene vrednosti MIC i MBC/MFC liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa na odabranim sojevima mikroorganizama date su u **tabeli 4.1**.

Tabela 4.1. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne/fungicidne koncentracije (MBC/MBF) liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa na odabranim mikroorganizmima

MIC i MBC/MFC (μM)								
Soj	AB/AM		Ligand		Pd(II) kompleks		Pt(II) kompleks	
	MIC/MBC/MFC		MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	OTC	<7,86	316,2	>4000	656,7	>4000	866,2	1734,5
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	OTC	<7,86	634,5	1267,1	328,4	328,4	217,6	433,1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	EFX	<10,9	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000
<i>E. coli</i> ATCC 10536	EFX	<10,9	>5000	>5000	>5000	>5000	598,2	>5000
<i>S. abony</i> NCTC 6017	OTC	<7,86	2536,3	>5000	>5000	>5000	634,5	>5000
<i>M. bovis</i> BCG	STM	0,32/0,78	77,1	77,1	>1072	>1072	>620,8	>620,8
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	CLT	<11,3	>5000	>5000	1890,7	1890,7	2496,8	>4000

AB – antibiotik, AM – antimikotik

Antibiotik oksitetraciklin inhibirao je rast *S. aureus*, *B. subtilis* i *S. abony*, a MIC i MBC bile su < 7,86 μM . Inhibicija rasta *P. aeruginosa* i *E. coli* potvrđena je dejstvom antibiotika enrofloksacina (MIC i MBC < 10,9 μM). Za potvrdu antimikrobnog dejstva na *M. bovis* korišćen je antibiotik streptomycin, pri čemu je MIC = 0,32 μM , a MBC = 0,78 μM . MIC i MFC antimikotika klotrimazola na rast *C. albicans* dobijene su na < 11,3 μM .

Ligand je ispoljio najveću antimikrobnu aktivnost na *M. bovis*, sa MIC i MBC na 77,1 μM . Antibakterijsko dejstvo liganda detektovano je kod *S. aureus* (MIC/MBC 316,2 / > 4000 μM), *B. subtilis* (MIC/MBC 634,5/1267,1 μM) i *S. abony* (MIC 2536,3 μM). U okviru testiranih koncentracija liganda nije detektovano antimikrobno dejstvo na *P. aeruginosa*, *E. coli* i *C. albicans*, niti baktericidno dejstvo na *S. abony*.

Najveća antibakterijska aktivnost Pd(II) kompleksa dobijena je na *B. subtilis* gde su MIC i MBC iznosile 328,4 μM . Kod *S. aureus* MIC je bio na 656,7 μM , a MBC na 4

mM. U opsegu testiranih koncentracija antibakterijski efekat nije detektovan kod *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. abony* i *M. bovis*. Antifungalno i fungicidno dejstvo kod *C. albicans* detektovano je na koncentraciji 1,9 mM.

Antimikrobna aktivnost kompleksa Pt(II) utvrđena je na *S. aureus* (MIC/MBC 866,2/1734,5 μ M), *B. subtilis*, (MIC/MBC 217,6/433,1 μ M), *E. coli* (MIC 598,2 μ M), *M. bovis* > 620,8 μ M.

Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa utvrđeno je da su sve vrednosti MIC i MBC/MFC veće od vrednosti referentnih antibiotika i antimikotika, što ukazuje na manji antimikrobni potencijal testiranih jedinjenja.

Antimikrobno dejstvo tumačeno je na osnovu parametara aktivnosti MIC i MBC/MFC, prema Crevelin i sar. (2015), kao snažno (0-100 μ M), umereno (100-500 μ M) ili slabo (500-1000 μ M). Intenzitet antimikrobne aktivnosti varirao je u zavisnosti od vrste mikroorganizma i koncentracije ispitivanog jedinjenja. Snažnu bakteriostatičku i baktericidnu aktivnost ligand je pokazao na *M. bovis*, umereno bakteriostatičko dejstvo na *S. aureus* i slabo na *B. subtilis*. Kompleksi Pd(II) i Pt(II) pokazali su umereno bakteriostatičko dejstvo na *B. subtilis* i slabo na *S. aureus*, kao i umerenu baktericidno dejstvo na *B. subtilis*. Kompleks Pt(II) ostvario je slabo bakteriostatičko dejstvo prema gramnegativnim bakterijama *E. coli* i *S. abony*. Ligand, Pd(II) i Pt(II) kompleks nisu pokazali aktivnost na gljivici *C. albicans*.

4.2. Citotoksičnost liganda i njegovih Pd(II) i Pt(II) kompleksa na ćelijskim linijama MRC-5, Hep-2 i A549

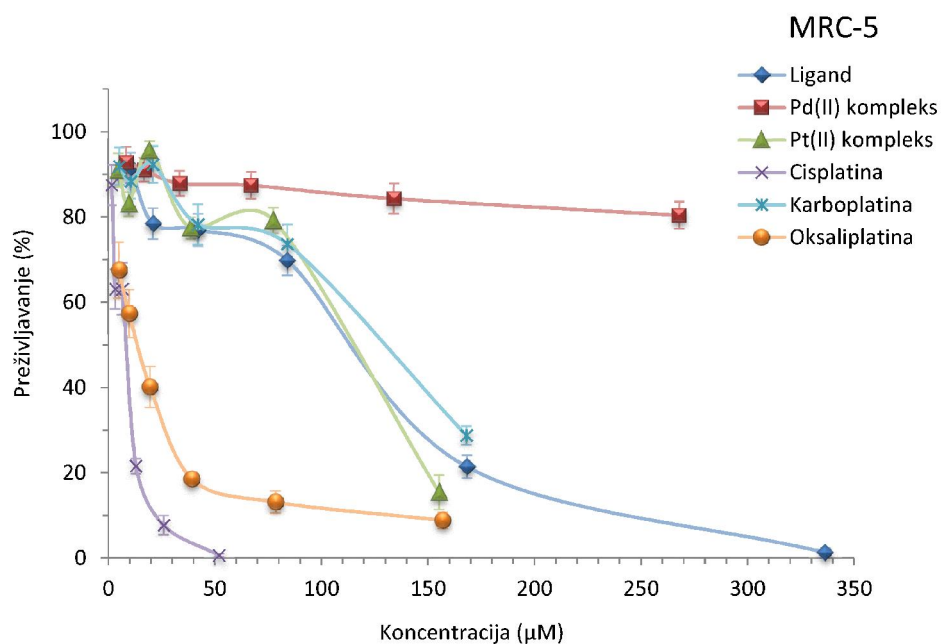
Citotoksičnost liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa ispitana je na zdravim ćelijama pluća MRC-5, epitelnim ćelijama humanog karcinoma larinksa Hep-2 i na ćelijama humanog adenokarcinoma pluća A549. Supstance su rastvarane u DMSO i razređene do najveće netoksične koncentracije ovog rastvarača za navedene ćelijske linije (0,78%), pa su testirane koncentracije liganda do 336,5 μ M, Pd(II) kompleksa do 268 μ M i Pt(II) kompleksa do 155,2 μ M. Kao pozitivne kontrole korišćeni su citostatici koji sadrže platinu – cisplatina, karboplatina i oksaliplatina. Određivanje broja preživelih ćelija praćeno je nakon tretmana od 48 sati, u resazurin mikrotitracionom UptiBlue™ testu. Rezultati citotoksičnosti izraženi su kao koncentracije koje smanjuju preživljavanje

ispitivane kulture ćelija za 50% IC₅₀ i koje su očitane sa krive preživljavanja. Eksperimenti su rađeni u triplikatu i ponavljani tri puta.

Efekti različitih koncentracija liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cistostatika – cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na preživljavanje MRC-5, Hep-2 i A549 ćelija prikazani su u **tabelama 4.2., 4.4. i 4.6.** i **slikama 4.1.- 4.3.**, a IC₅₀ vrednosti date su u **tabelama 4.3., 4.5. i 4.7.**

Tabela 4.2. Efekat različitih koncentracija liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cistostatika – cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na preživljavanje MRC-5 ćelija.

MRC-5					
Ligand		Pd(II) kompleks		Pt(II) kompleks	
Konc. (μM)	Preživlj. (%)	Konc. (μM)	Preživlj. (%)	Konc. (μM)	Preživlj. (%)
336,50	1,31 ± 0,88	268	80,41 ± 3,20	155,20	15,41 ± 4,06
168,30	21,43 ± 2,66	134	84,33 ± 3,54	77,50	79,17 ± 2,98
84,10	69,78 ± 3,51	67	87,43 ± 3,19	38,75	77,38 ± 2,50
42,10	76,97 ± 3,80	33,50	87,88 ± 2,89	19,38	95,57 ± 2,12
21,00	78,46 ± 3,62	16,75	91,06 ± 2,81	9,69	82,99 ± 2,86
10,50	91,48 ± 3,55	8,24	92,77 ± 3,61	4,84	90,94 ± 3,93
Cisplatina		Karboplatina		Oksaliplatina	
Konc. (μM)	Preživlj. (%)	Konc. (μM)	Preživlj. (%)	Konc. (μM)	Preživlj. (%)
52	0,62 ± 0,40	168	28,74 ± 2,21	157	8,87 ± 1,79
26	7,70 ± 2,26	84	73,68 ± 4,50	78,5	13,11 ± 2,56
13	21,53 ± 1,76	42	78,24 ± 4,73	39,3	18,57 ± 1,61
6.5	63,13 ± 6,05	21	92,28 ± 4,29	19,6	40,14 ± 4,80
3.3	63,03 ± 4,63	10,5	88,38 ± 4,10	9,8	57,34 ± 5,60
1,6	87,47 ± 4,71	5,25	91,88 ± 4,35	4,9	67,50 ± 6,58



Slika 4.1. Citotoksični efekat liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cistostatika – cisplatine, karboplatine i oksaliplatine i krive preživljavanja MRC-5 ćelija

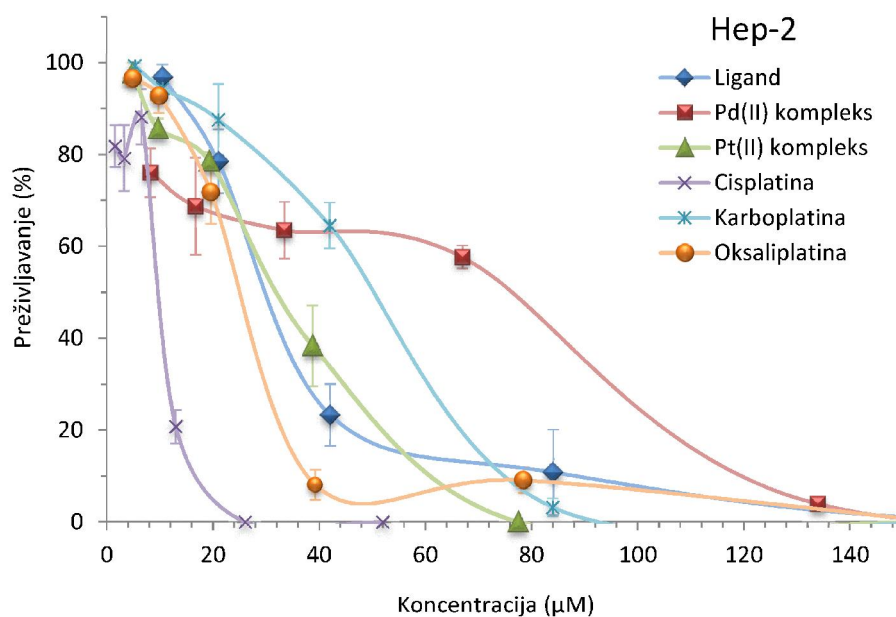
Tabela 4.3. IC₅₀ vrednosti liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na MRC-5 ćelijskoj liniji.

MRC-5	IC ₅₀ ± SE (μM)		
Ligand	114,07 ± 5,11	Cisplatina	12,50 ± 1,74
Pd(II) kompleks	>268	Karboplatina	125,92 ± 3,33
Pt(II) kompleks	111,30 ± 2,72	Oksaliplatina	16,13 ± 0,42

U **tabeli 4.3.** prikazane su vrednosti IC₅₀ liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na MRC-5 ćeliskoj liniji. Vrednosti IC₅₀ pokazuju sličnu citotoksičnost liganda i Pt(II) kompleksa (IC₅₀Lig = 114,07 ± 5,11 μM i IC₅₀Pt(II) = 111,30 ± 2,72 μM). Pd(II) kompleks nije citotoksičan, sa preživljavanjem ćelija većim od 80% (**Tabela 4.2.**, **Slika 4.1.**). Vrednost IC₅₀ za cisplatinu utvrđena je pri koncentraciji 12,50 ± 1,74 μM, a oksaliplatina je nešto manje citotoksična, sa IC₅₀ na 16,13 ± 0,42 μM. Najmanja citotoksična aktivnost dobijena je za karboplatinu (IC₅₀ = 125,92 ± 3,33 μM).

Tabela 4.4. Efekat različitih koncentracija liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cistostatika – cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na preživljavanje Hep-2 ćelija.

Hep-2					
Ligand		Pd(II) kompleks		Pt(II) kompleks	
Konc. (μM)	Preživlj. (%)	Konc. (μM)	Preživlj. (%)	Konc. (μM)	Preživlj. (%)
336,50	0	268	0	155,20	0
168,30	0	134	3,90 ± 1,00	77,50	0
84,10	10,78 ± 9,33	67	57,63 ± 2,53	38,75	38,37 ± 8,80
42,10	23,28 ± 6,74	33,50	63,50 ± 6,17	19,38	78,55 ± 1,94
21	78,50 ± 6,92	16,75	68,73 ± 10,60	9,69	85,60 ± 2,14
10,50	96,85 ± 2,73	8,24	76,00 ± 5,28	4,84	97,78 ± 2,23
Cisplatina		Karboplatina		Oksaliplatina	
Konc. (μM)	Preživlj. (%)	Konc. (μM)	Preživlj. (%)	Konc. (μM)	Preživlj. (%)
52	0	168	0	157	0
26	0	84	3,18 ± 1,90	78,5	9,08 ± 2,82
13	20,72 ± 3,66	42	64,50 ± 5,03	39,3	8,07 ± 3,25
6,5	88,13 ± 6,02	21	87,58 ± 7,67	19,6	71,83 ± 6,95
3,3	79,20 ± 7,15	10,5	94,38 ± 1,98	9,8	92,73 ± 3,72
1,6	81,78 ± 4,54	5,25	99,30 ± 0,70	4,9	96,60 ± 1,79



Slika 4.2. Citotoksični efekat liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cistostatika – cisplatine, karboplatine i oksaliplatine i krive preživljavanja Hep-2 ćelija

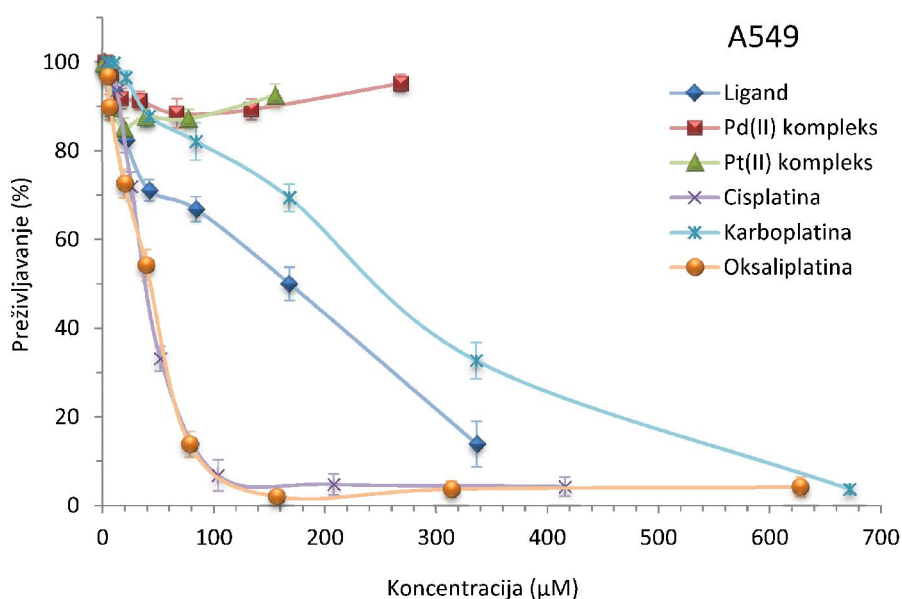
Tabela 4.5. IC₅₀ vrednosti liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na Hep-2 ćelijskoj liniji

Hep-2	IC ₅₀ ± SE (μM)		
Ligand	28,45 ± 1,74	Cisplatina	9,68 ± 0,31
Pd(II) kompleks	73,53 ± 1,99	Karboplatina	50,98 ± 2,57
Pt(II) kompleks	31,88 ± 2,97	Oksaliplatina	32,75 ± 5,00

U **tabeli 4.5.** prikazane su vrednosti IC₅₀ liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na Hep-2 ćeliskoj liniji. Tumorska ćelijska linija Hep-2 osetljiva je na sva testirana jedinjenja. Vrednosti IC₅₀ liganda (28,45 ± 1,74 μM) i Pt(II) kompleksa (31,88 ± 2,97 μM) pokazuju sličnu citotoksičnu aktivnost oksaliplatini (IC₅₀ = 32,75 ± 5 μM). Za Pd(II) kompleks dobijena je IC₅₀ na 73,53 ± 1,99 μM, a za karboplatinu na 50,98 ± 2,57 μM. Najveću citototoksičnu aktivnost pokazala je cisplatina sa IC₅₀ na 9,68 ± 0,31 μM.

Tabela 4.6. Efekat različitih koncentracija liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cistostatika – cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na preživljavanje A549 ćelija

A549					
Ligand		Pd(II) kompleks		Pt(II) kompleks	
Konc. (μM)	Preživlj. (%)	Konc. (μM)	Preživlj. (%)	Konc. (μM)	Preživlj. (%)
336,50	13,9 ± 5,12	268	95,20 ± 5,90	155,20	92,40 ± 2,68
168,30	50,00 ± 3,75	134	89,30 ± 6,94	77,50	87,20 ± 2,08
84,10	66,80 ± 2,81	67	88,40 ± 9,87	38,75	87,60 ± 2,23
42,10	71,10 ± 2,41	33,50	91,30 ± 6,13	19,38	85,10 ± 2,26
21	82,40 ± 2,85	16,75	91,70 ± 6,87	9,69	89,60 ± 2,90
10,50	93,60 ± 2,41	8,38	97,40 ± 4,83	4,84	98,80 ± 0,78
5,25	98,30 ± 1,50	4,19	98,50 ± 4,28	2,42	99,50 ± 0,53
2,63	100	2,10	99,91 ± 0,27	1,21	99,70 ± 0,28
Cisplatina		Karboplatina		Oksaliplatina	
Konc. (μM)	Preživlj. (%)	Konc. (μM)	Preživlj. (%)	Konc. (μM)	Preživlj. (%)
416	4,30 ± 2,17	672	3,70 ± 1,02	628	4,20 ± 2,18
208	4,80 ± 2,40	336	32,70 ± 4,11	314	3,70 ± 1,86
104	6,80 ± 3,47	168	69,40 ± 3,12	157	2,00 ± 1,19
52	33,10 ± 2,77	84	82,10 ± 4,20	78,50	13,80 ± 2,91
26	71,90 ± 3,30	42	87,80 ± 2,40	39,25	54,20 ± 3,52
13	93,60 ± 1,80	21	96,50 ± 1,52	19,63	72,60 ± 3,20
6,50	98,80 ± 0,71	10,50	99,80 ± 0,20	6,81	89,80 ± 2,90
3,25	100	5,25	100	4,91	96,70 ± 1,46



Slika 4.3. Citotoksični efekat liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cistostatika – cisplatine, karboplatine i oksaliplatine i krive preživljavanja A549 ćelija

Tabela 4.7. IC_{50} vrednosti liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na A549 ćelijskoj liniji

A549	$IC_{50} \pm SE (\mu M)$		
Ligand	$165,90 \pm 17,60$	Cisplatina	$40,00 \pm 1,40$
Pd(II) kompleks	>268	Karboplatina	$256,10 \pm 14,00$
Pt(II) kompleks	$>155,20$	Oksaliplatina	$42,60 \pm 2,50$

U **tabeli 4.7.** prikazane su vrednosti IC_{50} liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na A549 ćelijskoj liniji. Vrednost IC_{50} liganda dobijena je pri koncentraciji $165,9 \pm 17,6 \mu M$. Kompleksi Pd(II) i Pt(II) nisu citotoksični, sa preživljavanjem ćelija većim od 85% (**Tabela 4.6.**). Cisplatina ($IC_{50} = 40 \pm 1,4 \mu M$) i oksaliplatina ($IC_{50} = 42,6 \pm 2,5 \mu M$) postigle su sličnu citotoksičnu aktivnost, dok je karboplatina najslabije citotoksična ($IC_{50} = 256,1 \pm 14,0 \mu M$).

4.2.1. Selektivna toksičnost prema kancerskim ćelijama Hep-2 i A549

Na osnovu vrednosti IC_{50} , izračunati su indeksi selektivnosti, koji pokazuju da li se testirane ćelijske linije razlikuju u afinitetu prema ispitanom jedinjenju i da li se ispoljava selektivna toksičnost prema kancerskim ćelijama. SI predstavlja odnos koncentracije koja smanjuje preživljavanje ćelija zdrave ćelijske linije za 50% i koncentracije koja smanjuje preživljavanje ćelija kancerske ćelijske linije za 50%. Jedinjenja sa vrednostima $SI \geq 2$ selektivno su toksična, a sa vrednostima $SI \geq 3$, visoko selektivno toksična (Bézivin i sar., 2003; Prayong i sar., 2008; Badisa i sar., 2009; Eldahshan i sar., 2013; Feng i sar., 2015). Vrednosti SI liganda, Pd(II) kompleksa i Pt(II) kompleksa prikazane su u **tabeli 4.8.**

Tabela 4.8. Indeksi selektivnosti (SI) liganda, Pd(II) i kompleks Pt(II) kompleksa

Indeks selektivnosti (SI)		
Ćelije	MRC-5 / Hep-2	MRC-5 / A549
Ligand	4,0	0,7
Pd(II) kompleks	>3,6	1,0
Pt(II) kompleks	3,5	<0,7

Zasencene su vrednosti $SI \geq 2$

Prema Hep-2 kancerskim ćelijama dobijene su vrednosti SI: 4,0 za ligand, >3,6 za Pd(II) kompleks i 3,5 za Pt(II) kompleks. Izračunate su vrednosti SI prema kancerskim ćelijama A549: 0,7 za ligand, 1,0 za Pd(II) kompleks i < 0,7 za Pt(II) kompleks. Na osnovu prikazanih rezultata, ligand, Pd(II) i Pt(II) kompleks ispoljavaju visoko-selektivnu citotoksičnu aktivnost prema kancerskim ćelijama Hep-2. Prema ćelijama A549 ligand, Pd(II) i Pt(II)kompleks nisu selektivno toksični.

Vrednosti SI citostatika – cisplatine, karboplatine i oksaliplatine prikazane su u **tabeli 4.9.**

Tabela 4.9. Indeksi selektivnosti (SI) cisplatine, karboplatine i oksaliplatine

Indeks selektivnosti (SI)		
Ćelije	MRC-5 / Hep-2	MRC-5 / A549
Cisplatina	1,3	0,3
Karboplatina	2,5	0,5
Oksaliplatina	0,5	0,4

Zasenčene su vrednosti $SI \geq 2$

Dobijene su vrednosti SI prema Hep-2 kancerskim ćelijama: 1,3 za cisplatinu, 2,5 za karboplatinu i 0,5 za oksaliplatinu. Vrednosti SI prema kancerskim ćelijama A549 iznose: 0,3 za cisplatinu, 0,5 za karboplatinu i 0,4 za oksaliplatinu. Na osnovu vrednosti SI, karboplatina ispoljava selektivnu toksičnost prema kancerskim ćelijama Hep-2. Prema kancerskim ćelijama A549 testirani citostatici nisu selektivno toksični.

4.3. Efekat liganda i njegovih Pd(II) i Pt(II) kompleksa na proliferaciju i vreme dupliranja populacije ćelija MRC-5, Hep-2 i A549

Efekat liganda 2-(difenilfosfino)benzaldehyd-1-adamantolhidrazona, njegovih Pd(II) i Pt(II) kompleksa i referentnih citostatika na proliferaciju i vreme dupliranja populacije ćelija praćen je eksperimentom kratkotrajne šestodnevne proliferacije na MRC-5, Hep-2 i A549 ćelijama. Za ovaj eksperiment su korišćene ćelijske suspenzije male koncentracije (2×10^4 ćel/ml), zbog dužine tretmana, a broj vijabilnih ćelija je određivan metodom bojenja tripan plavim, bojom koja je indikator proliferacije. Koncentracije koje su korišćene u eksperimentu proliferacije bile su u okviru netoksičnih koncentracija $\leq IC_{20}$ (1,1-102 μM), a u zavisnosti od dobijenih rezultata i ćelijske linije, testirane su i koncentracije $IC_{20} - IC_{60}$ (18,9-27,9 μM). Proliferacija ćelija MRC-5, Hep-2 i A549 izloženih delovanju različitih koncentracija jedinjenja izražena je procentom prema proliferaciji netretiranih ćelija. Koncentracija koja je dovela do 50% inhibicije proliferacije uzeta je kao značajni efekat, a u **tabelama 4.10. – 4.12.** obeležene su vrednosti gde je proliferacija niža od 50%. Vrednosti PDT, za procenu citostatke aktivnosti supstanci (Calonghi i sar., 2002; Freshney, 2005; Billy i Clairambault, 2013), očitane su u eksponencijalnoj fazi odgovarajuće krive rasta (**Prilog, Slike 1-12**) i prikazane su u vidu histograma. Za statističku analizu značajnosti razlike između rezultata dobijenih u tretmanima i u kontroli, primenjen je Studentov *t*-test, a vrednost parametra $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

4.3.1. Efekat na MRC-5 ćelije

Efekti različitih koncentracija liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i citostatika – cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na proliferaciju i PDT MRC-5 ćelija prikazani su u **tabeli 4.10.**

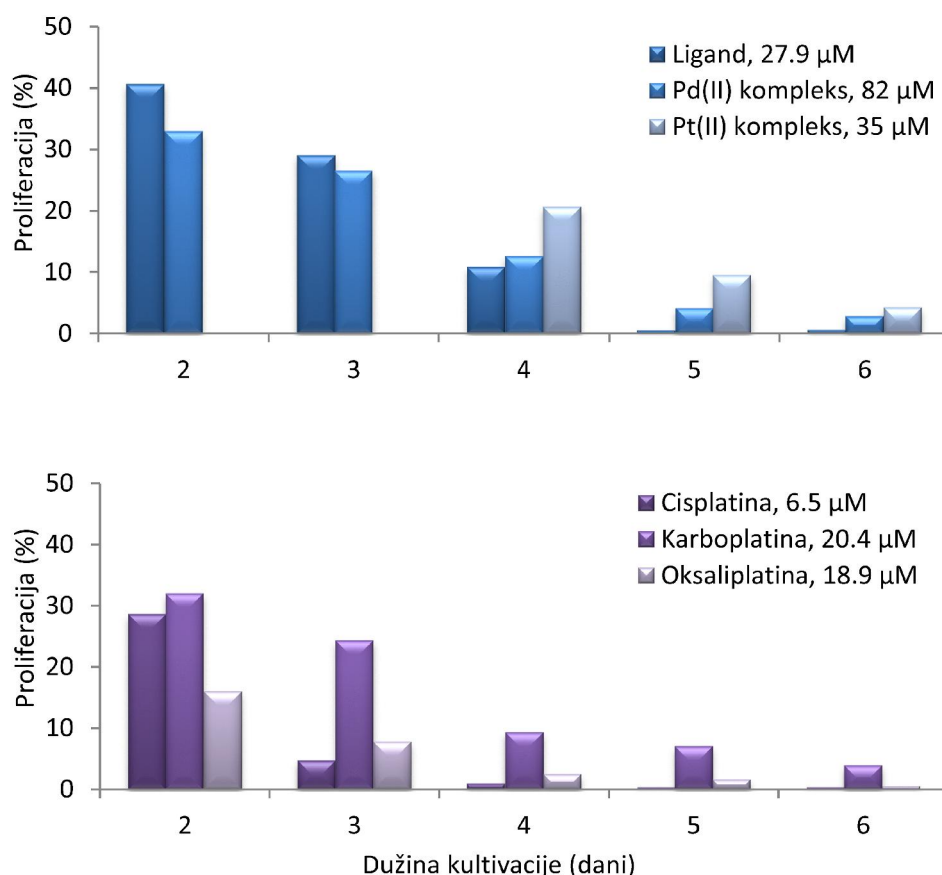
Tabela 4.10. Proliferacija MRC-5 ćelija

Proliferacija MRC-5 ćelija (%) i PDT (h)										
	Ligand			Pd(II) kompleks				Pt(II) kompleks		
Konc. (μM)	1,1	5,6	27,9	1,7	8,4	41	82	1,4	7	35
Dan										
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	91,9	100	91,9	105,6	94	95,5	95	104,1	108,4	100
2	98,8	73,4	40,6	97,4	102,0	98,2	32,9	95,7	110,4	59,5
3	90,3	74,2	29,0	101,4	106,4	101,2	26,5	85,4	79,9	56,3
4	92,3	45,4	10,8	99,5	98,2	101,3	12,6	90,6	52,8	20,6
5	78,0	25,2	0,5	114,1	129,3	111,8	4,1	87,6	36,8	9,5
6	78,2	16,0	0,6	68,2	74,1	75,8	2,8	76,5	22,5	4,2
PDT (h)	25,8 ±3,5	27,5 ±5,7	n/p	11,0 ±2,6	11,3 ±3,0	12,8 ±2,8	n/p	15,0 ±7,0	19,5 ±0,5	24,3 ±3,2
	Cisplatina		Karboplatina			Oksaliplatina				
Konc. (μM)	1,6	6,5	5,1	10,2	20,4	4,7	9,5	18,9		
Dan										
0	100	100	100	100	100	100	100	100		
1	117,9	113,8	104,6	96,3	81,8	90,4	91,0	72,7		
2	54,3	28,6	46,4	33,1	32,0	44,7	33,7	16,0		
3	67,5	4,7	51,0	27,6	24,3	43,5	14,0	7,8		
4	24,2	0,9	30,9	14,9	9,3	29,0	7,4	2,5		
5	6,6	0,3	22,8	10,7	7,0	26,9	5,2	1,6		
6	4,2	0,3	17,8	7,0	3,9	18,0	3,5	0,5		
PDT (h)	7,5 ±0,5	n/p	22,3 ±1,9	49,0 ±3,2	n/p	31,0 ±4,6	n/p	n/p		
Kontrola ćelija 13,0 ± 1,7 h										
DMSO 11,3 ± 1,4 h										

Zasnečene su vrednosti gde je inhibicija proliferacije > 50%

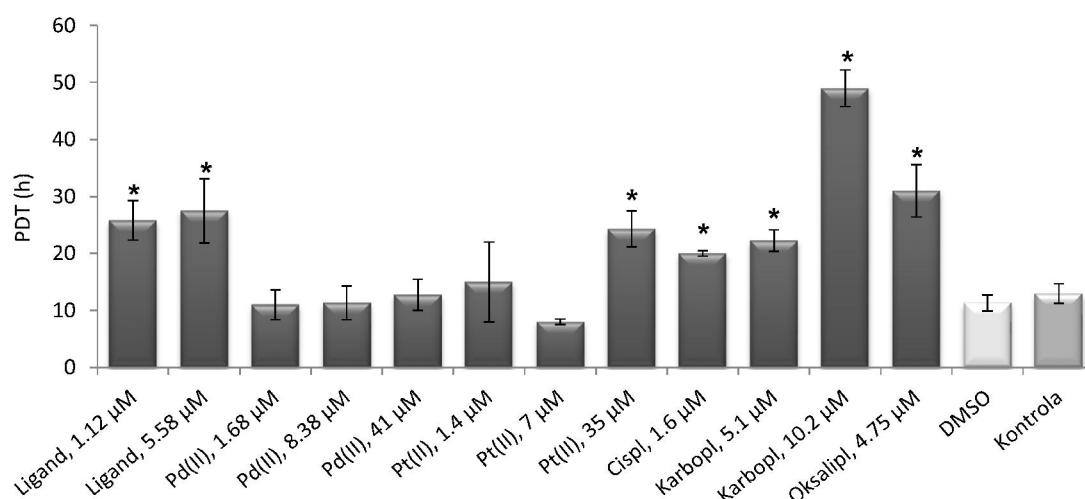
n/p – nije primenljivo

Na **slici 4.4.** prikazani su histogrami sa efektima najvećih primenjenih koncentracija jedinjenja koje su inhibirale proliferaciju MRC-5 ćelija za više od 50%.



Slika 4.4. Antiproliferativni efekat liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa, cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na MRC-5 ćelijama

Značajne inhibicije proliferacije ligandom i Pd(II) kompleksom detektovane su nakon 2 dana. Dobijene su proliferacije ćelija: 40,6% sa 27,9 μ M liganda i 32,9% sa 84 μ M Pd(II) kompleksa. Značajne inhibicije proliferacije Pt(II) kompleksom (35 μ M) dobijene su nakon 4 dana (20,6% proliferacije). Nastavkom tretmana Pt(II) kompleksom do 6 dana, došlo je do dalje inhibicije proliferacije ćelija, ali je dobijen slabiji antiproliferativni efekat u poređenju sa ligandom i Pd(II) kompleksom. Značajne inhibicije za cisplatinu, karboplatinu i oksaliplatinu detektovane su nakon 2 dana, a dobijene su vrednosti proliferacije: 28,6% za 6,5 μ M cisplatine, 32% za 20,4 μ M karboplatine i 16% za 18,9 μ M oksaliplatine. Nastavkom tretmana do 6 dana, došlo je do inhibicije proliferacije MRC-5 ćelija, pri čemu je najveći antiproliferativni efekat dobijen za cisplatinu, a najmanji za karboplatinu.



Slika 4.5. Vreme dupliranja populacije ćelija MRC-5 nakon tretmana ligandom, Pd(II), Pt(II), kompleksom i citostaticima – karboplatinom i oksaliplatinom (srednja vrednost PDT $\pm$ SE, * $p < 0,05$, Studentov t -test)

Efekti različitih koncentracija jedinjenja na PDT MRC-5 ćelija prikazani su na **slici 4.5**. Za MRC-5 ćelijsku liniju, vreme potrebno da se broj ćelija u eksponencijalnoj fazi krive rasta udvostruči iznosi $13 \pm 1,7$ h. Pri koncentracijama 1,7 - 41 μ M, Pd(II) kompleks ne dovodi do promene PDT u poređenju sa netretiranim ćelijama. Do značajnih povećanja PDT na $25,8 \pm 3,5$ h, odn. $27,5 \pm 5,7$ h došlo je pri koncentracijama 1,1 μ M i 5,6 μ M liganda. Koncentracije Pt(II) kompleksa 1,4 i 7 μ M ne utiču na PDT, dok 35 μ M ovog kompleksa značajno povećava PDT na $24,3 \pm 3,2$ h. Pri koncentracijama 5,1 μ M i 10,2 μ M karboplatine, detektovano je značajno povećanje PDT na $22,3 \pm 1,9$ h, odn. $49,0 \pm 3,2$ h. Značajno povećanje PDT detektovano je delovanjem oksaliplatine, pri koncentraciji 4,7 μ M ($31,0 \pm 4,6$ h).

4.3.2. Efekat na Hep-2 ćelije

Efekti različitih koncentracija liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i citostatika – cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na proliferaciju i PDT Hep-2 ćelija prikazani su u tabeli 4.11.

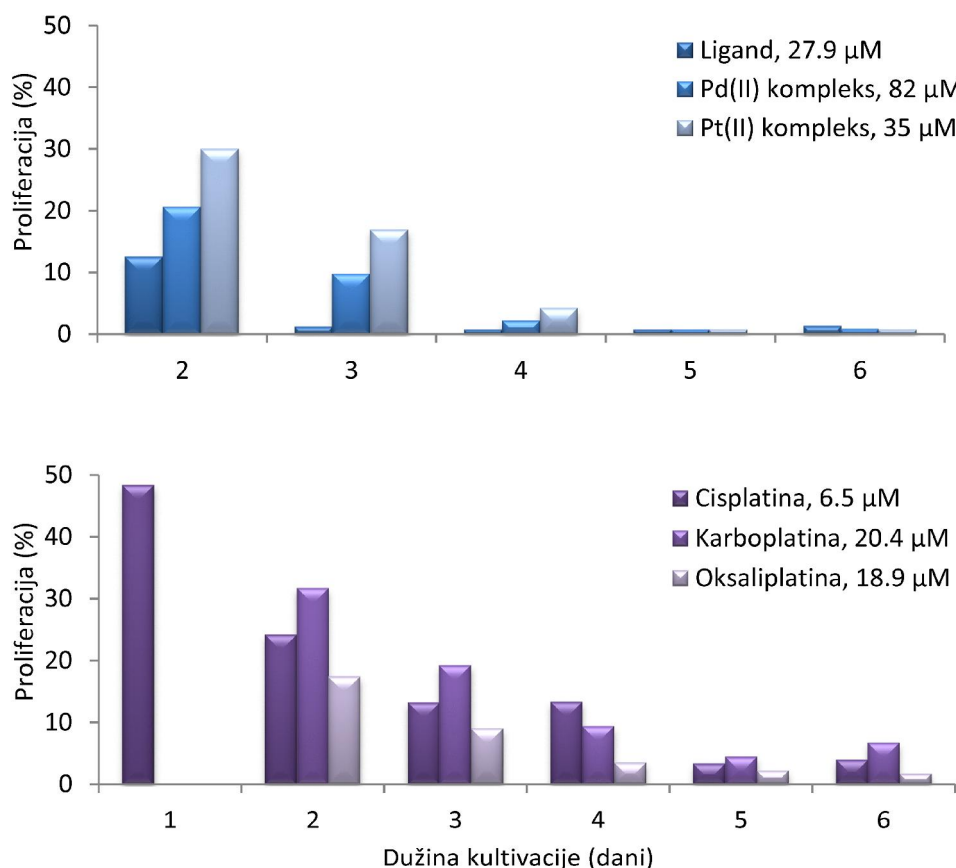
Tabela 4.11. Proliferacija Hep-2 ćelija

Proliferacija Hep-2 ćelija (%) i PDT (h)										
	Ligand			Pd(II) kompleks				Pt(II) kompleks		
Konc. (μM)	1,1	5,6	27,9	1,7	8,4	41	82	1,4	7	35
Dan										
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	104,2	92,2	64,0	111,6	109,0	92,2	54,6	92,2	100,0	72,1
2	57,0	26,4	12,5	89,9	78,4	82,7	20,6	103,2	52,5	30,0
3	47,0	15,7	1,2	98,8	98,8	67,4	9,8	100,0	30,8	16,9
4	31,3	21,8	0,7	114,1	108,6	59,5	2,2	44,1	26,3	4,2
5	50,7	33,3	0,7	95,4	95,4	45,3	0,7	31,7	24,5	0,7
6	72,3	31,6	1,3	93,8	97,9	47,6	0,8	22,8	18,4	0,7
PDT (h)	54,0 ±3,0	36,0 ±1,0	n/p	27,7 ±5,4	25,3 ±5,1	45,3 ±9,2	n/p	26,0 ±1,0	70,5 ±1,5	n/p
	Cisplatina		Karboplatina			Oksaliplatina				
Konc. (μM)	1,6	6,5	5,1	10,2	20,4	4,7	9,5	18,9		
Dan										
0	100	100	100	100	100	100	100	100		
1	104,8	48,4	101,2	101,5	109,6	95,2	94,4	95,4		
2	46,2	24,2	64,1	37,7	31,7	62,6	30,3	17,4		
3	26,8	13,2	48,3	28,5	19,2	38,2	21,6	9,0		
4	10,0	13,3	25,7	12,9	9,4	23,0	13,0	3,5		
5	7,2	3,3	18,0	5,3	4,4	22,3	11,2	2,2		
6	6,4	4,0	11,7	6,3	6,7	25,7	10,6	1,7		
PDT (h)	n/p	n/p	36,7 ±5,2	59,5 ±1,5	n/p	41,0 ±7,0	n/p	n/p		
Kontrola ćelija 24,8 ± 0,6										
DMSO 23,8 ± 3,4										

Zasnečene su vrednosti gde je inhibicija proliferacije > 50%

n/p – nije primenljivo

Na **slici 4.6.** prikazani su histogrami sa efektima najvećih primenjenih koncentracija testiranih jedinjenja koje su inhibirale proliferaciju Hep-2 ćelija za više od 50%.

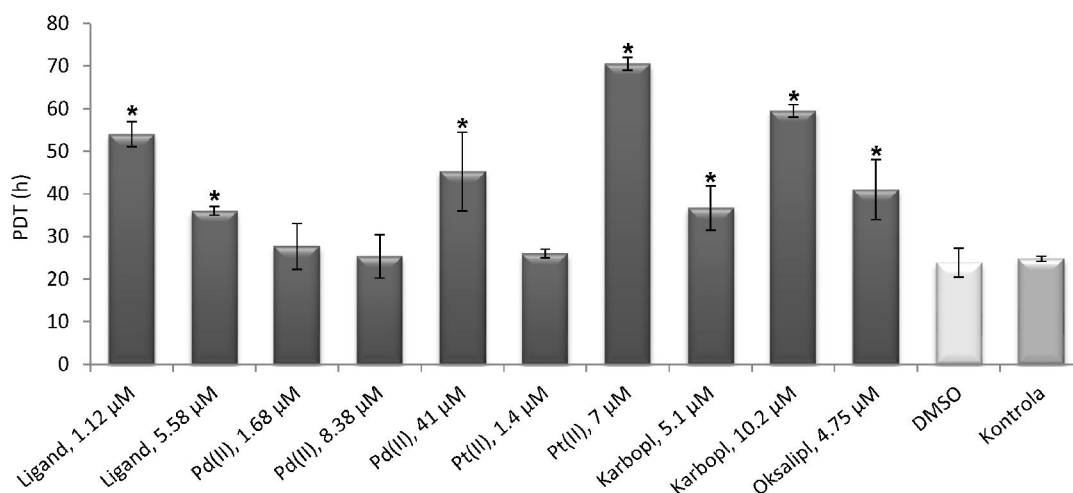


Slika 4.6. Antiproliferativni efekat liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa, cisplatine, karboplatine i oksalipatine na Hep-2 ćelijama

Značajne inhibicija proliferacije Hep-2 ćelija detektovane su nakon 2 dana u prisustvu 27,9 μ M liganda, 82 μ M Pd(II) kompleksa i 35 μ M Pt(II) kompleksa. Dobijene su vrednosti proliferacije: 12,5% za ligand, 20,6% za Pd(II) kompleks i 30% za Pt(II) kompleks. U nastavku tretmana od 3. do 6. dana najveći antiproliferativni efekat detektovan je za ligand, a najmanji za Pt(II) kompleks.

Značajne inhibicije proliferacije sa 6,5 μ M cisplatine detektovane su već posle prvog dana (24 h) (46,2% proliferacije), a sa karboplatinom (20,4 μ M) i oksaliplatinom (18,9 μ M) posle 2 dana (31,7 i 17,4% proliferacije). U nastavku tretmana od 3. do 6.

dana najveći antiproliferativni efekat dobijen je za oksaliplatinu, a najmanji za karboplatinu.



Slika 4.7. Vreme dupliranja populacije ćelija Hep-2 nakon tretmana ligandom, Pd(II), Pt(II), kompleksom i citostaticima – karboplatinom i oksaliplatinom (srednja vrednost PDT ± SE, *p < 0,05, Studentov *t*-test)

Efekti različitih koncentracija jedinjenja na PDT Hep-2 ćelija prikazani su na **slici 4.7**. Broj Hep-2 ćelija se u eksponencijalnoj fazi duplira za $24,8 \pm 0,6$ h. Povećanje PDT na $45,3 \pm 9,2$ h detektovano je nakon tretmana sa 41 µM Pd(II) kompleksa. Pri koncentracijama 1,1 µM i 5,6 µM liganda, PDT se povećava na $54,0 \pm 3,0$ h i $36,0 \pm 1,0$ h. Pt(II) kompleks ne menja PDT kada se primeni koncentracija 1,4 µM. U prisustvu 7 µM kompleksa platine, PDT se povećava na $70,5 \pm 1,5$ h. Karboplatina (5,1 µM i 10,2 µM) izaziva povećanje PDT (na $36,7 \pm 5,2$ h i $59,5 \pm 1,5$ h). Tretmanom sa 4,7 µM oksaliplatine PDT je povećan za dodatnih 16 h u poređenju sa kontrolom.

4.3.3. Efekat na A549 ćelije

Efekti različitih koncentracija liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i citostatika – cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na proliferaciju i PDT A549 ćelija prikazani su u **tabeli 4.12**.

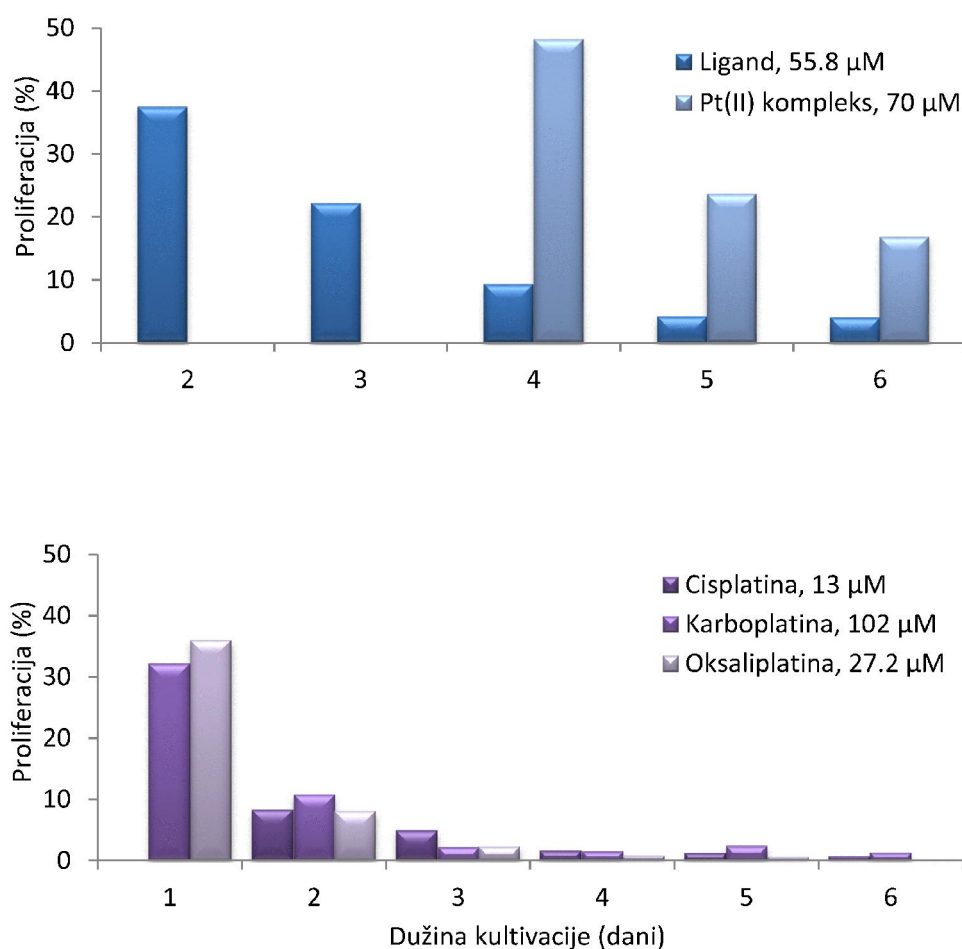
Tabela 4.12. Proliferacija A549 ćelija

Proliferacija A549 ćelija (%) i PDT (h)									
	Ligand			Pd(II) kompleks			Pt(II) kompleks		
Konc. (μM)	5,6	27,9	55,8	1,7	8,4	41	7	35	70
Dan									
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	100,0	100,0	113,0	100,0	108,5	95,0	104,2	108,5	95,4
2	97,9	35,4	37,5	112,5	105,0	102,5	108,8	87,5	70,0
3	117,3	25,9	22,2	105,9	112,9	104,7	91,8	102,4	78,8
4	98,1	14,7	9,3	101,5	93,4	100,0	104,4	106,6	48,2
5	55,2	10,9	4,2	109,7	98,8	91,2	100,9	67,1	23,6
6	63,6	7,9	4,0	104,3	88,2	93,1	98,1	64,6	16,8
PDT (h)	23,0 ±2,0	n/p	n/p	25,5 ±4,5	23,0 ±2,0	24,5 ±3,5	25,5 ±4,5	22,0 ±2,0	20,0 ±2,0
	Cisplatina			Karboplatina			Oksaliplatina		
Konc. (μM)	1,6	6,5	13	10,2	20,4	102	6,8	13,6	27,2
Dan									
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	108,5	86,9	52,1	100,0	92,2	32,1	88,0	76,0	36,0
2	39,5	20,8	8,3	40,5	32,4	10,8	29,7	21,6	8,1
3	17,3	11,1	4,9	16,1	10,3	2,2	8,0	5,7	2,3
4	10,4	3,9	1,6	13,8	6,1	1,5	6,1	4,5	0,8
5	8,5	2,4	1,2	13,1	4,7	2,4	3,0	3,0	0,6
6	6,6	1,3	0,7	13,1	2,6	1,3	1,3	0,6	0
PDT (h)	n/p	n/p	n/p	n/p	n/p	n/p	n/p	n/p	n/p
Kontrola ćelija 24,6 ± 3,1									
DMSO 25,8 ± 4,0									

Zasenčene su vrednosti gde je inhibicija proliferacije > 50%

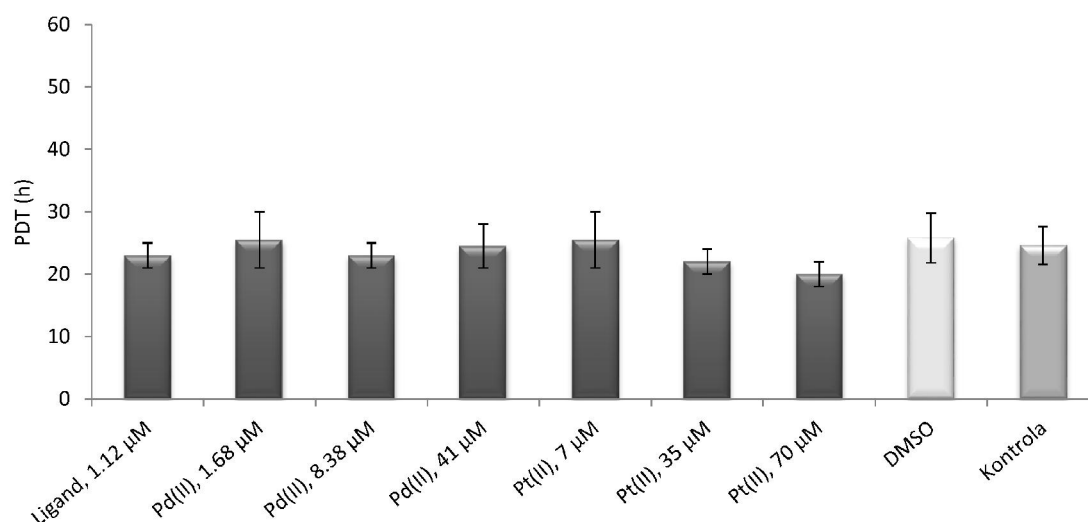
n/p – nije primenljivo

Na **slici 4.8.** prikazani su histogrami sa efektima najvećih primenjenih koncentracija testiranih jedinjenja koje su inhibirale proliferaciju A549 ćelija za više od 50%.



Slika 4.8. Antiproliferativni efekat liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa, cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na A549 ćelijama

Značajne inhibicije proliferacije A549 ćelija ligandom (55,8 μM , 37,5% proliferacije) detektovane su nakon 2 dana, a Pt(II) kompleksom (70 μM , 48,2% proliferacije), nakon 4 dana. U nastavku tretmana do 6 dana uočen je veći antiproliferativni efekat liganda nego Pt(II) kompleksa. Pd(II) kompleks do 41 μM nije inhibirao više od 50% proliferacije (**Tabela 4.12.**). Značajne inhibicije proliferacije karboplatinom (102 μM) i oksaliplatinom (27,2 μM) dobijene su već nakon prvog dana (proliferacija 32,1% i 36,1%), dok su značajne inhibicije proliferacije cisplatinom, pri koncentraciji 13 μM , detektovane posle 2 dana (8,3% proliferacije). U nastavku tretmana do 6 dana efekti cisplatine, karboplatine i oksaliplatine na proliferaciju bili su približno isti.



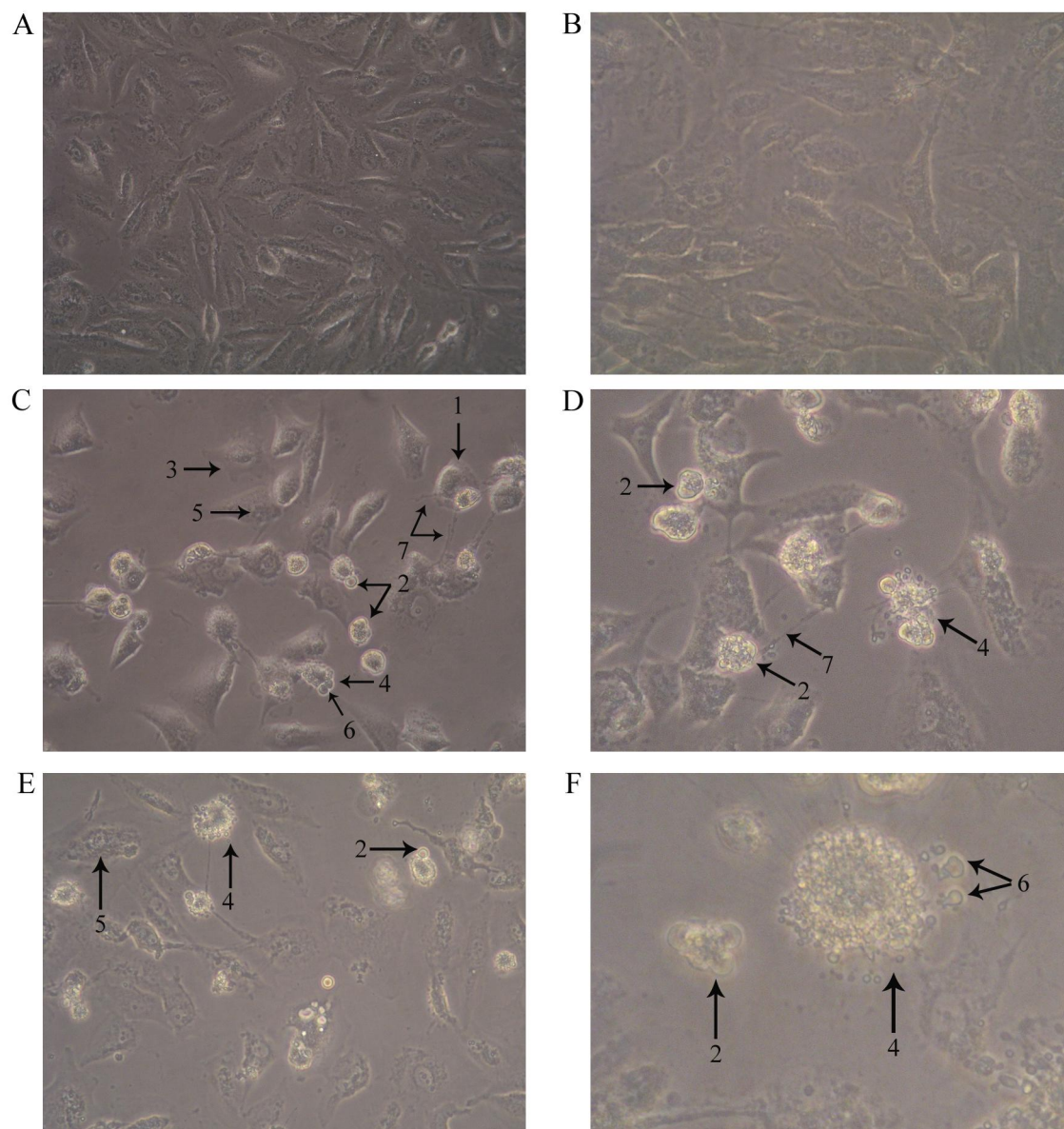
Slika 4.9. Vreme dupliranja populacije ćelija A549 nakon tretmana ligandom, Pd(II) i Pt(II) kompleksom (srednja vrednost PDT $\pm$ SE, * $p < 0,05$, Studentov t -test)

Efekti različitih koncentracija jedinjenja na PDT A549 ćelija prikazani su na **slici 4.9**. Za A549 ćelijsku liniju vreme dupliranja populacije ćelija je $24,6 \pm 3,1$ h. Tretmani ligandom (5,6 µM), Pd(II) kompleksom (1,7-41 µM) i Pt(II) kompleksom (7-70 µM) nisu uticali na promenu parametra PDT.

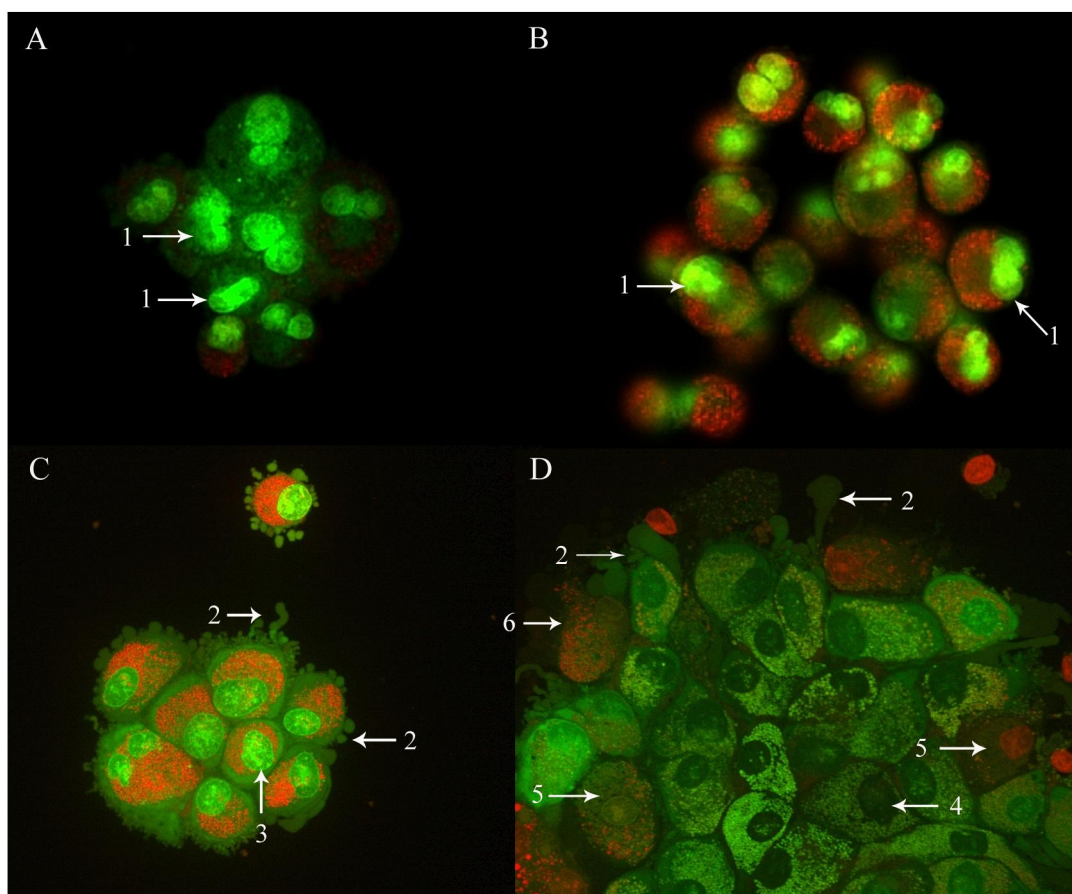
4.4. Morfološka analiza ćelijske smrti A549 ćelija tretiranih ligandom

Morfološka analiza ćelijske smrti ispitana je na modelu ligand – A549 ćelije. Morfologija A549 ćelija prvobitno je posmatrana *in situ* invertnim mikroskopom sa faznim kontrastom (Olympus), posle 24 i 48 sati inkubacije, prema Collins i sar. (1997). Veći deo populacije netretiranih A549 ćelija bila je adherirana za površinu za rast, a ćelije su bile poligonalnog oblika ili blago izdužene, prozračne, sa nekondenzovanim nukleusima (**Slika 4.10.A-B**). Ćelije izložene delovanju liganda ($IC_{50} = 168,3 \mu M$) tokom 24 (**Slika 4.10.C-D**) i 48 sati (**Slika 4.10.E-F**), ispoljile su različite morfološke promene – skupljanje membrane, zaokrugljivanje ćelija, formiranje mehurića na membrani, pojavu vakuola i kondenzaciju citoplazme, fragmentaciju nukleusa, formiranje ehinoidnih šiljaka i apoptotskih tela. Ove promene bile su praćene gubitkom ćelijske adhezije, a pojedine ćelije bile su fragmentisane.

Posle 48 sati izloženosti delovanju liganda, ćelije u suspenziji su obojene AO/EB rastvorom i analizirane na fluorescentnom mikroskopu. Na osnovu integriteta citoplazmatične i nukleusne membrane, ispitane su morfološke apoptotske karakteristike. Citoplazma netretiranih ćelija bila je neupadljiva, sa izraženim, svetlozelenim nukleusima (**Slika 4.11.A-B**). Većina ćelija tretiranih ligandom ispoljila je morfološke promene karakteristične za rane faze apoptoze. Rano apoptotske ćelije bile su prepoznatljive po tamnozeleno obojenom nukleusu sa svetlozelenim zonama, što je ukazlo na snažnu kondenzaciju hromatina koja je tipična morfološka karakteristika apoptoze (**Slika 4.11.C**). Zapaženo je i prisustvo mehurića na ćelijskoj membrani. Veoma mali deo populacije ćelija pokazao je morfološke karakteristike kasne apoptoze – narandžaste ili crvene jasno vidljive nukleuse sa kondenzovanim ili fragmentisanim hromatinom (**Slika 4.11.D**). Uočeno je i nekoliko ćelija u fazi fragmentacije koje su okarakterisane kao nekrotične ćelije.



Slika 4.10. Morfološke promene A549 ćelija *in situ* posle tretmana ligandom (IC_{50}). Reprezentativne fotomikrografije snimljene pomoću invertnog mikroskopa sa faznim kontrastom: A, C, E – na $200\times$ uveličanju; B, D, F – na $400\times$ uveličanju; A, B – kontrola ćelija A549; C, D – tretman 24 h; E, F – tretman 48 h; (1) zaokrugljivanje ćelija, (2) formiranje mehurića na ćelijskoj membrani, (3) skupljanje ćelije, (4) fragmentacija ćelije, (5) fragmentacija nukleusa, (6) apoptotska tela, (7) ehinoidni šiljci



Slika 4.11. Morfološke promene A549 ćelija tretmanih liganda (IC_{50}), obojene sa AO/EB. Reprezentativne fotomikrografije snimljene pomoću fluorescentnog mikroskopa na $200\times$ uveličanju: A, B – kontrola ćelija A549; C, D – tretman 48 h; (1) žive neapoptotske ćelije, (2) formiranje mehurića na ćelijskoj membrani, (3) kondenzacija hromatina, (4) ćelija u ranoj apoptozi, (5) ćelija u kasnoj apoptozi, (6) fragmentacija ćelije

4.5. Efekat liganda i njegovih Pd(II) i Pt(II) kompleksa na migratorni potencijal MRC-5, Hep-2 i A549 ćelija

Efekat liganda, Pd(II) kompleksa i Pt(II) kompleksa na migraciju zdravih ćelija MRC-5 i kancerskih ćelija A549 i Hep-2, ispitivan je primenom *Wound healing* ili *Scratch* testa. U ovom testu, u konfluentnom ćelijskom monosloju, načinjen je prorez ili „rana“, a migracija ćelija i „zarastanje rane“ praćeni su narednih 48 h, pomoću invertnog mikroskopa sa faznim kontrastom. U eksperimentima su korišćene IC₂₀ koncentracije jedinjenja (**Tabela 4.13.**), koje su dobijene u testu citotoksičnosti sa odgovarajuće krive preživljavanja. Na A549 ćelijama testiran je ligand, jer kompleksi Pd(II) i Pt(II) nisu citotoksični za ove ćelije. U test su uključene odgovarajuće negativne kontrole – netretirane ćelije MRC-5, Hep-2 i A549, a kao pozitivna kontrola korišćena je cisplatina.

Tabela 4.13. Koncentracije test jedinjenja (IC₂₀) za test migracije ćelija

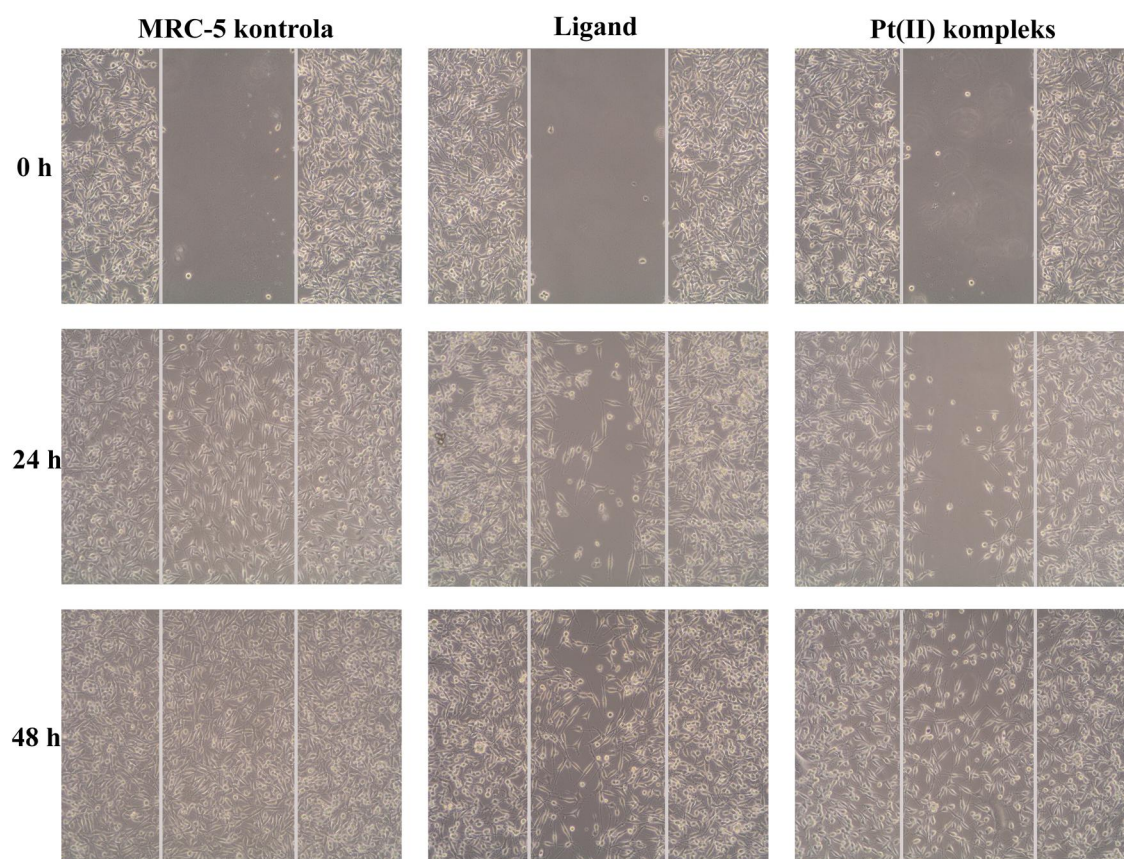
IC ₂₀ (μM)	MRC-5	Hep-2	A549
Ligand	19,0	20,0	25,2
Pd(II) kompleks	268,0	4,0	n/t
Pt(II) kompleks	40,0	17,5	n/t
Cisplatina	2,0	7,0	20,7

n/t – nije testirano

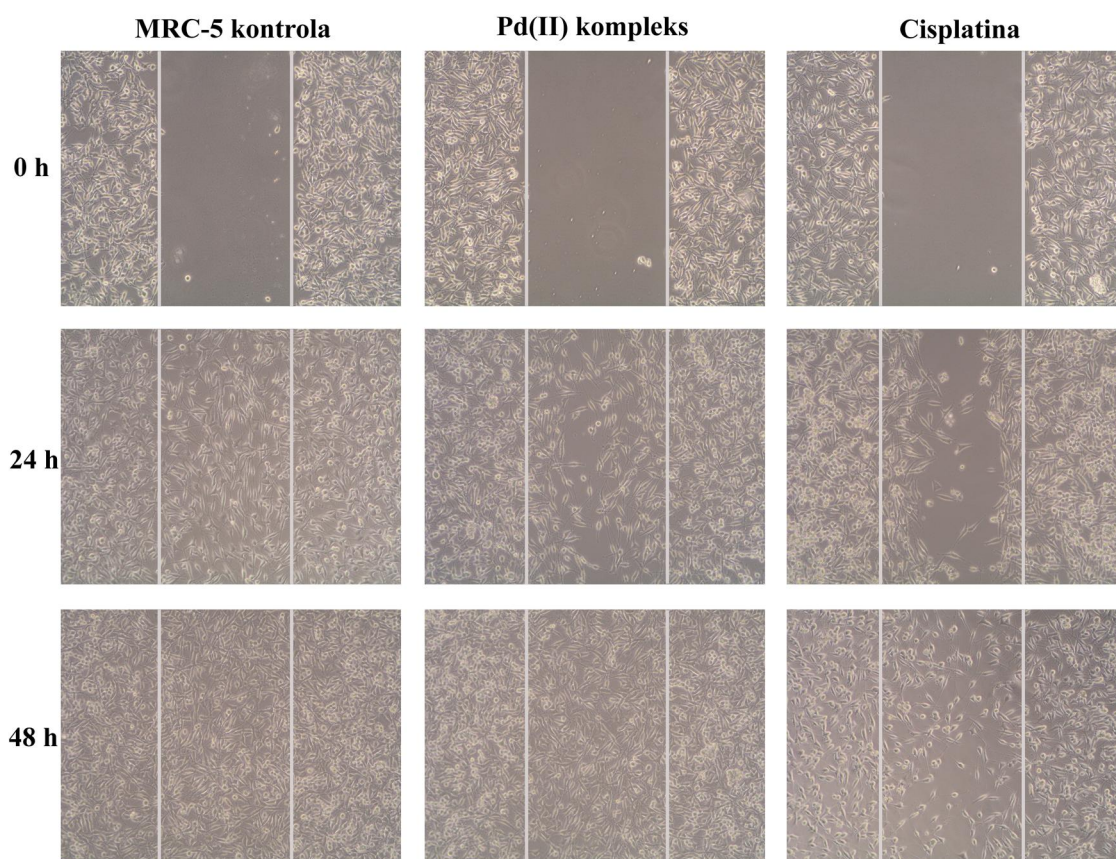
Načinjene su reprezentativne fotomikrografije na kojima je, radi lakšeg upoređivanja, označena početna veličina proreza u ćelijskom monosloju. Rezultati su prikazani na histogramima u vidu procenata zarastanja proreza u ćelijskom monosloju, nakon 24 h i 48 h, koji su ekvivalentni procentu migracije ćelija. Za statističku analizu značajnosti razlike između rezultata dobijenih u tretmanima i u kontroli, primenjen je Studentov *t*-test, a vrednost parametra $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

4.5.1. Efekat na MRC-5 ćelije

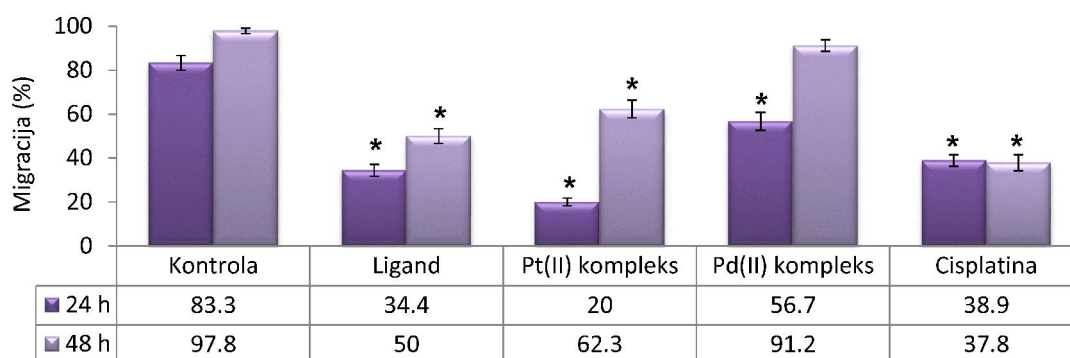
Reprezentativne fotomikrografije migracije MRC-5 ćelija prikazane su na slikama 4.12. i 4.13., a procenti migracije predstavljeni su na slici 4.14. Migracijom MRC-5 ćelija, rana u ćelijskom monosloju zarasla je 83,3% za 24 sata, odnosno 97,8% za 48 sati inkubacije. U prisustvu liganda i Pt(II) kompleksa detektovana su značajna smanjenja migracije ćelija. U prvih 24 sata inkubacije ćelija sa ligandom, popunjeno je 34,4%, dok je nakon 48 sati 50% proreza popunjeno migriranim ćelijama. Nakon 24 sata, u prisustvu Pt(II) kompleksa migracija ćelija iznosila je 20%, a za 48 sati 62,3%. Posle 24 sata izloženosti ćelija Pd(II) kompleksu, detektovana je značajno manja migracija (56,7%), dok se migracija nakon 48 sati (91,2%) nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolu. U prisustvu cisplatine detektovana je značajno manja migracija ćelija i nakon 24 (38,9%) i nakon 48 sati (37,8%).



Slika 4.12. Reprezentativne fotomikrografije efekta liganda i Pt(II) kompleksa na migratorni potencijal MRC-5 ćelija



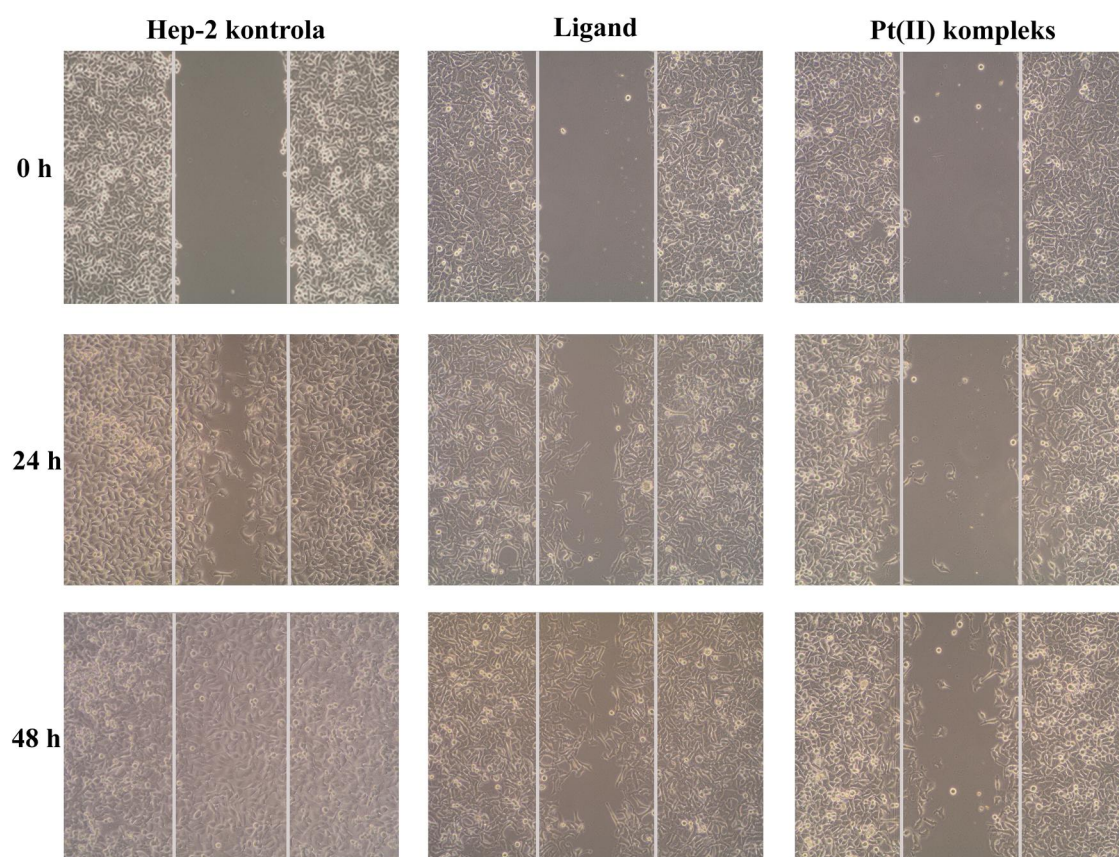
Slika 4.13. Reprezentativne fotomikrografije efekta Pd(II) kompleksa i cisplatine na migratorni potencijal MRC-5 ćelija



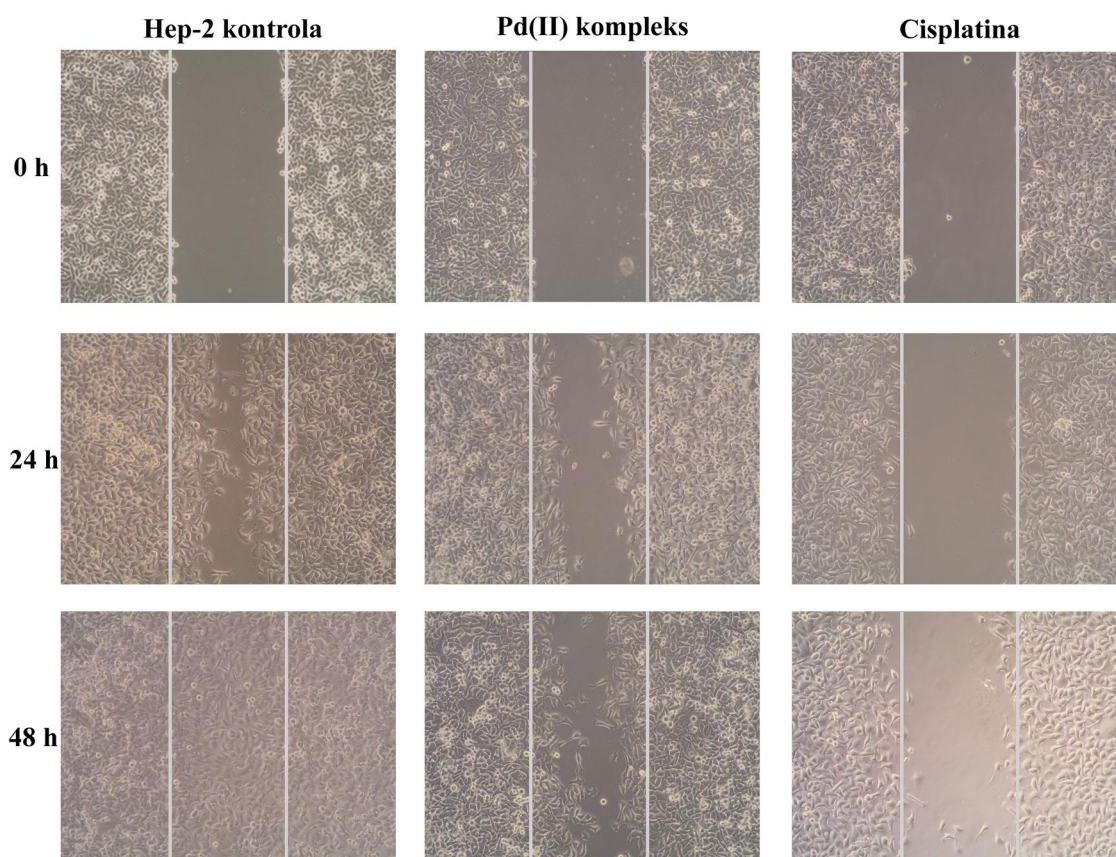
Slika 4.14. Efekat liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cisplatine na migratorni potencijal MRC-5 ćelija (* $p < 0,05$, Studentov t -test)

4.5.2. Efekat na Hep-2 ćelije

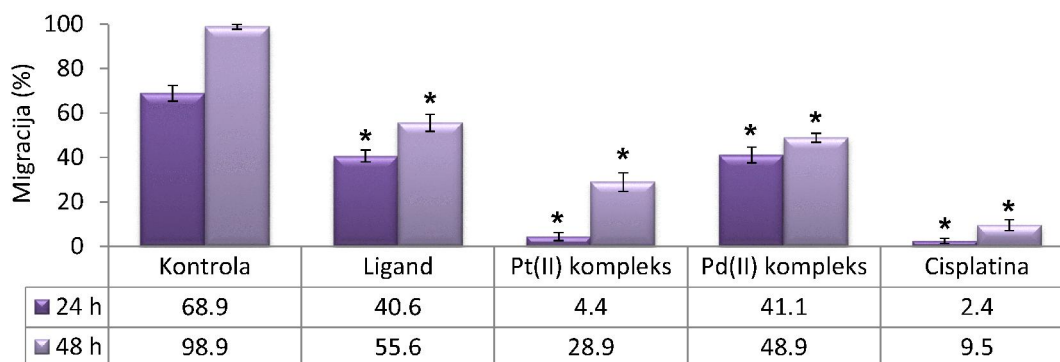
Reprezentativne fotomikrografije migracije Hep-2 ćelija prikazane su na slikama 4.15. i 4.16., a procenti migracije predstavljeni su u vidu histograma na slici 4.17. Migracijom Hep-2 ćelija, rana formirana u ćelijskom monosloju zarasla je 68,9% za 24 sata, odnosno 98,9% za 48 sati inkubacije. Ispitivanje uticaja na migratorni potencijal Hep-2 ćelija pokazalo je da sva testirana jedinjenja značajno redukuju ćelijsku migraciju. Ćelije izložene delovanju liganda popunile su 40,6% proreza posle 24 sata, a 55,6% posle 48 sati. U prisusvu Pt(II) kompleksa u prvih 24 sata, samo 4,4% proreza je popunjeno migriranim ćelijama, a nakon 48 sati, 28,9%. U prisustvu Pd(II) kompleksa Hep-2 ćelije su popunile 41,1% proreza za 24 sata i 48,9% za 48 sati. Cisplatina je izazvala inhibiciju migracije Hep-2 ćelija preko 90%.



Slika 4.15. Reprezentativne fotomikrografije efekta liganda i Pt(II) kompleksa na migratorni potencijal Hep-2 ćelija



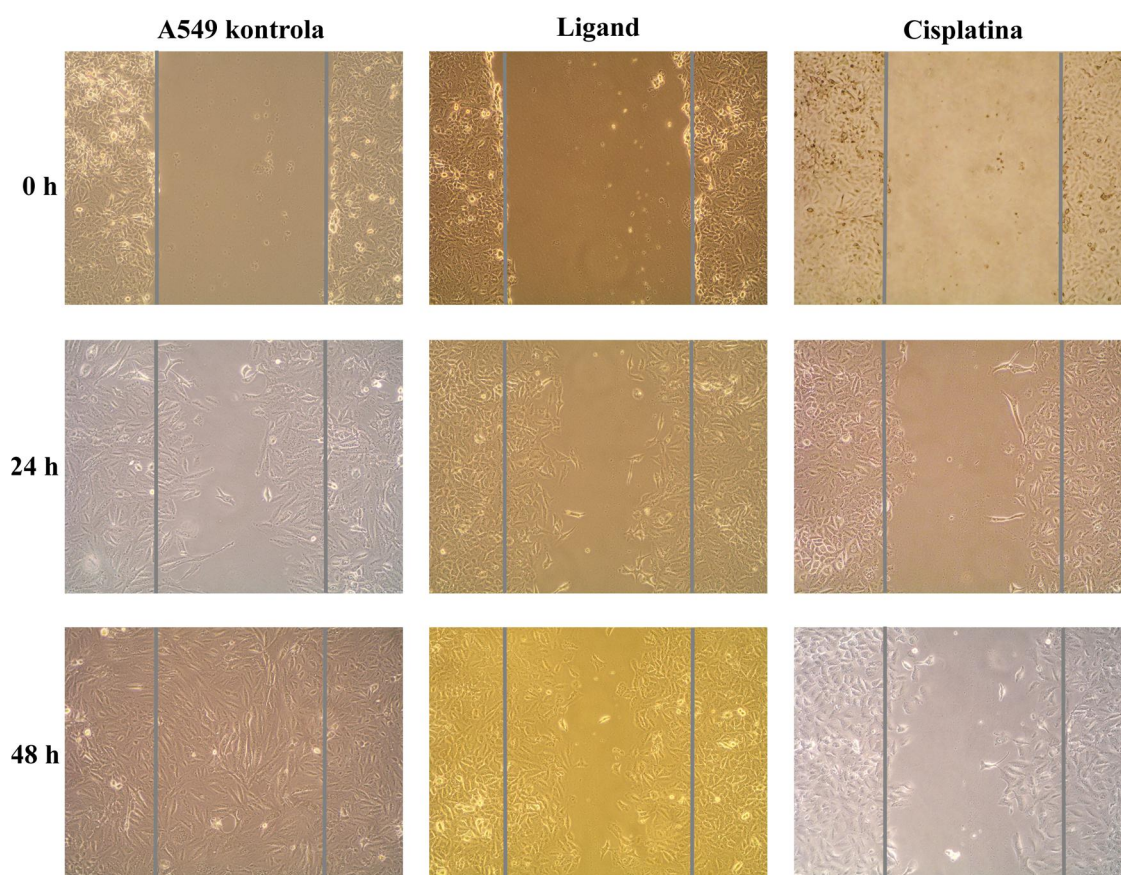
Slika 4.16. Reprezentativne fotomikrografije efekta Pd(II) kompleksa i cisplatine na migratorni potencijal Hep-2 ćelija



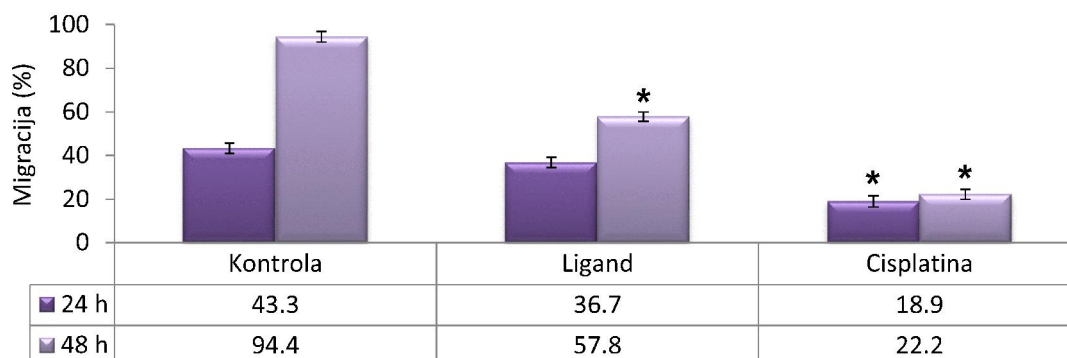
Slika 4.17. Efekat liganda, Pd(II), Pt(II)kompleksa i cisplatine na migratorni potencijal Hep-2 ćelija (* $p < 0,05$, Studentov t -test)

4.5.3. Efekat na A549 ćelije

Reprezentativne fotomikrografije migracije A549 ćelija prikazane su na **slici 4.18.**, a procenti migracije predstavljeni su na **slici 4.19.** Migracijom ćelija A549 popunjava se 43,3% proreza za 24 sata, a za 48 sati napravljeni prorez u monosloju zatvara se skoro u potpunosti (94.4%). Posle 24 sata delovanja liganda nije došlo do značajne inhibicije migracije ćelija (36,7% popunjenosti rane) u poređenju sa kontrolom. Značajna inhibicija migracije ligandom detektovana je posle 48 sati inkubacije (57,8% popunjenosti rane). Cisplatina je značajno inhibirala migraciju ćelija i za 24 sata (18,9% popunjenosti rane) i za 48 sati (22,2% popunjenosti rane).



Slika 4.18. Reprezentativne fotomikrografije efekta liganda i cisplatine na migratorni potencijal A549 ćelija



Slika 4.19. Efekat liganda i cisplatine na migratorni potencijal A549 ćelija (* $p < 0,05$, Studentov t -test)

4.6. Genotoksičnost liganda i njegovih kompleksa Pd(II) i Pt(II) na MRC-5, Hep-2 i A549 ćelijama

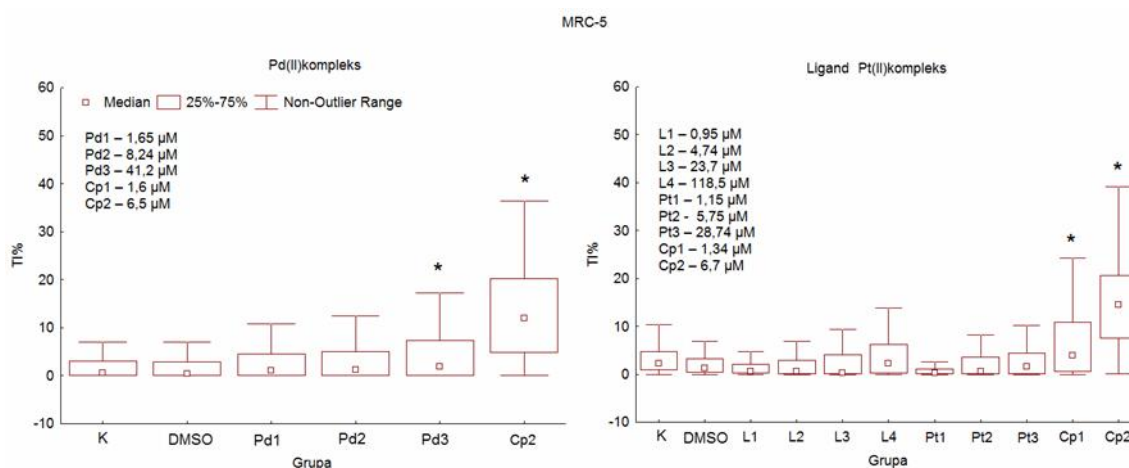
Genotoksični potencijal liganda, kompleksa Pt(II) i kompleksa Pd(II) da dovedu do oštećenja DNK molekula u različitim ćelijskim linijama određivan je komet testom. Genotoksičnost je ispitana na ćelijskim linijama MRC-5, Hep-2 i A549. Pošto kompleksi Pd(II) i Pt(II) nisu pokazali citotoksičnost na A549 ćelijama, na ovoj ćelijskoj liniji testiran je samo ligand. Veličina oštećenja DNK praćena je preko parametra TI. Za statističku analizu korišćen je Kolmogorov-Smirnov test, kojim je proveravano da li rezultati komet testa imaju normalnu raspodelu. Koncentracije koje su korišćene za detekciju genotoksičnosti bile su u okviru netoksičnih i subtoksičnih koncentracija $\leq IC_{40}$ (**Tabela 4.14.**). Ove koncentracije su dobijene u testu citotoksičnosti, a kao pozitivna kontrola korišćen je citostatik cisplatina.

Tabela 4.14. Koncentracije test jedinjenja za detekciju genotoksičnosti

Koncentracije test jedinjenja (μM)				
	Ligand	Pd(II) kompleks	Pt(II) kompleks	Cisplatina
MRC-5	0,95 4,74 23,70 118,50	1,65 8,24 41,20	1,15 5,75 28,74	1,60 / 1,34 6,50 / 6,70
Hep-2	5,65 10,50 21,00 27,30	1,65 8,24 41,20	1,15 5,75 28,74	1,60 6,50 9,67
A549	0,95 4,74 23,70 118,50	n/t	n/t	1,34 6,70 16,60

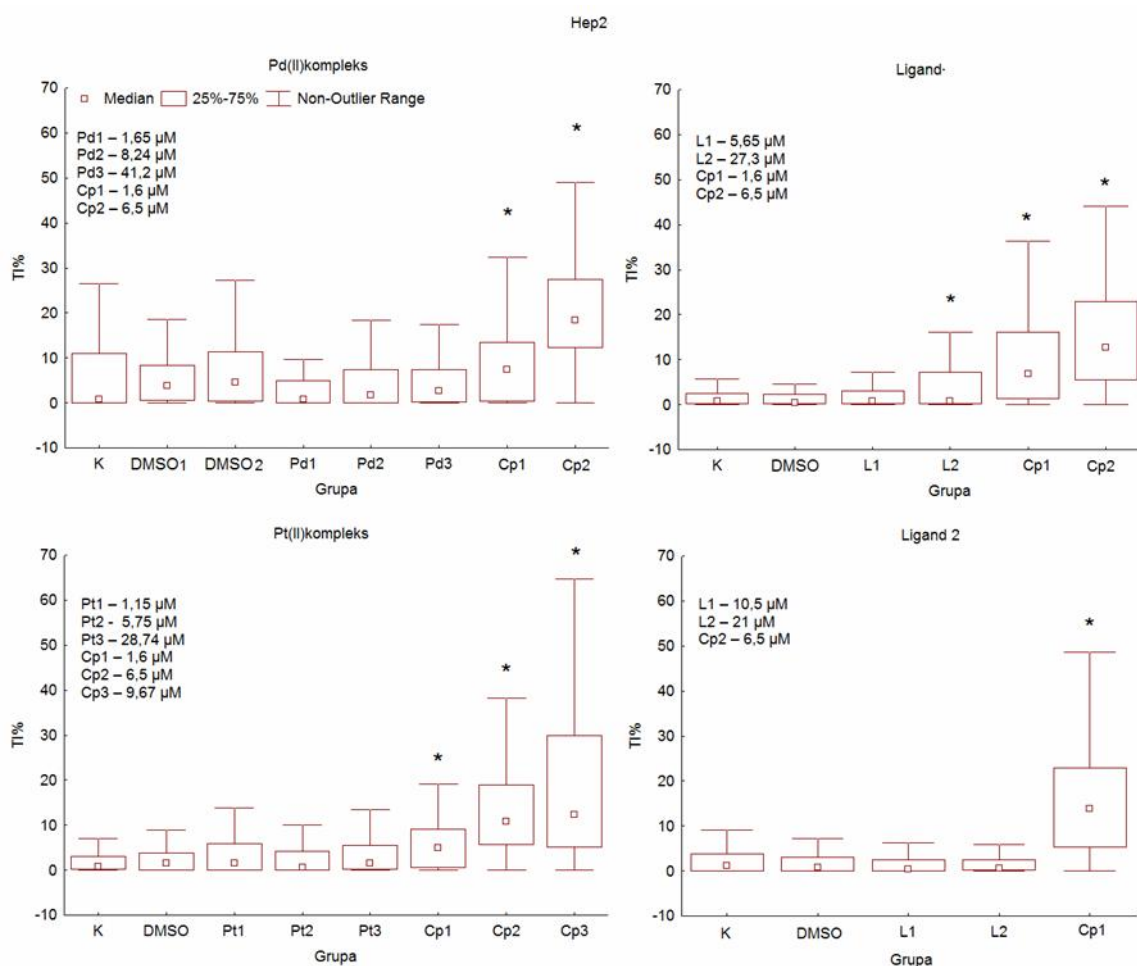
n/t – nije testirano

Cisplatina je izazvala značajna oštećenja DNK Hep-2 i MRC-5 ćelija, pri koncentracijama 1,6 i 6,5 μM . Na A549 ćelijama 16,6 μM cisplatine indukovalo je značajno oštećenje DNK (**Slike 4.20.-4.23.**).

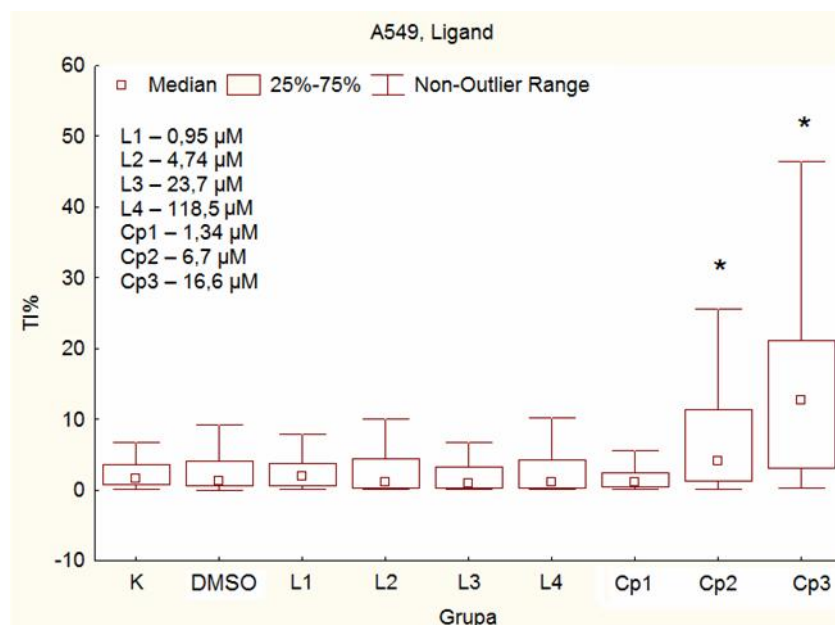

Slika 4.20. Genotoksičnost liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cisplatine na MRC-5 ćelijama ($p < 0,05$, Mann Whitney U-test)

Na zdravim MRC-5 ćelijama (Slika 4.20.), ligand (0,95-118,5 μM) i Pt(II) kompleks (1,15-28,74 μM) nisu izazvali značajna oštećenja DNK. Pd(II) kompleks pri koncentraciji 41,2 μM značajno je povećao nivo DNK oštećenja, a koncentracije 1,65-8,24 μM nisu dovele do značajnog povećanja nivoa oštećenja DNK.

Na kancerškoj Hep-2 ćelijskoj liniji (Slika 4.21.), ligand je doveo do značajnog povećanja nivoa oštećenja DNK pri najvećoj testiranoj koncentraciji (27,3 μM). Koncentracije do 21 μM nisu izazvale značajno povećanje nivoa oštećenja DNK. Kompleksi Pd(II) i Pt(II) nisu doveli do značajnih povećanja oštećenja DNK na Hep-2 ćelijama.



Slika 4.21. Genotoksičnost liganda, Pd(II), Pt(II) kompleksa i cisplatine na Hep-2 ćelijama ($p < 0,05$, Mann Whitney U-test)

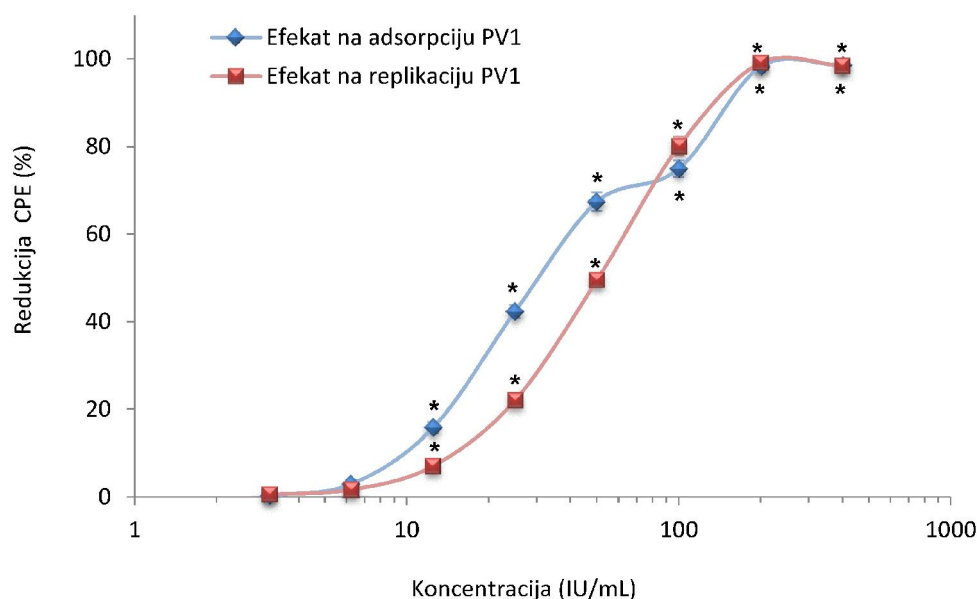


Slika 4.22. Genotoksičnost liganda i cisplatine na A549 ćelijama ($p < 0,05$, Mann Whitney U-test)

Na A549 ćelijama ligand nije indukovao značajno oštećenje DNK molekula, u opsegu koncentracija 0,95-118,5 μM (Slika 4.22.).

4.7. Antivirusna aktivnost liganda i njegovih Pd(II) i Pt(II) kompleksa

Antivirusna aktivnost liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa ispitana je na PV1 – Hep-2 model-sistemu, tretmanima pre i posle infekcije ćelija virusom. Tretmanom Hep-2 ćelija pre infekcije PV1 virusom ispitivan je uticaj jedinjenja na adsorpciju, dok je tretmanom ćelija posle infekcije ispitivan uticaj jedinjenja na replikaciju virusa, odnosno na faze virusnog infektivnog ciklusa koje slede penetraciju. Praćena je redukcija citopatogenog efekta koja je kvantifikovana primenom UptiBlue™ testa. Testirana je antivirusna aktivnosti netoksičnih koncentracija jedinjenja, pri kojima je preživljavanje Hep-2 ćelija više od 80% ($\leq \text{IC}_{20}$). Kao pozitivna kontrola antivirusne aktivnosti korišćen je interferon α -2a. Za statističku analizu primenjen je Studentov t -test, a vrednost parametra $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.



Slika 4.23. Efekat interferona α -2a na adsorpciju i replikaciju PV1. Redukcija CPE $\pm$ SE, u tretmanu pre i posle infekcije ćelija virusom (* $p < 0,05$, Studentov t -test)

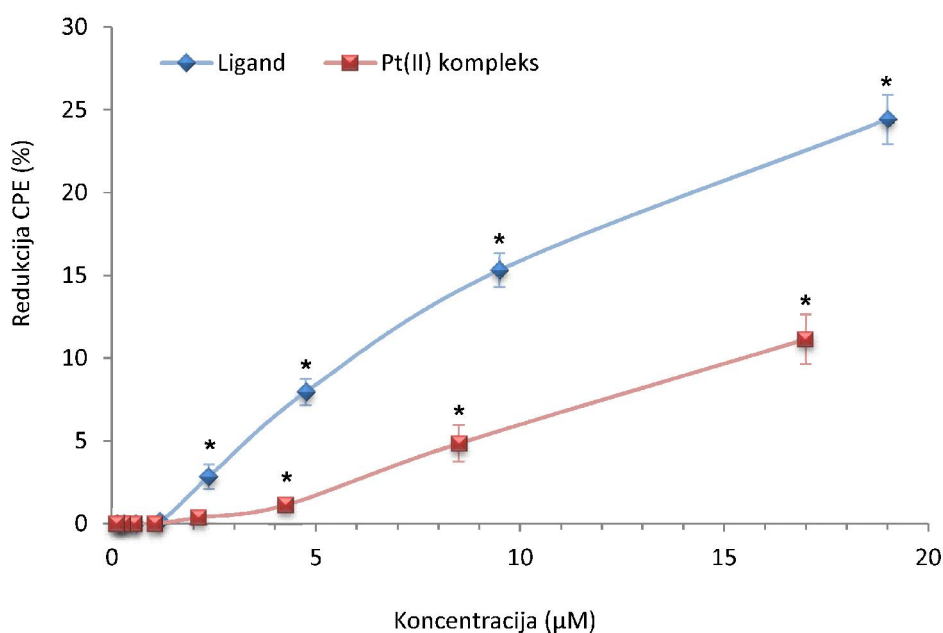
Krive redukcija CPE interferonom α -2a prikazane su na **slici 4.23**. Značajne redukcije CPE u tretmanu pre infekcije ćelija virusom PV1 detektovane su na 12,5 IU/ml i većim koncentracijama, sa najvećim efektom na 400 μ M ($98,52 \pm 1,13\%$ redukcije CPE). Značajne redukcije CPE u tretmanu posle infekcije ćelija virusom dobijene su na 12,5 IU/ml i većim koncentracijama, sa najvećim efektom na 200 μ M ($99,10 \pm 0,78\%$ redukcije CPE). Na osnovu ovih rezultata interferon α -2a ispoljio je antivirusni efekat i na adsorpciju ($EC_{50} = 32,5 \pm 3,7$ IU/mL, $THI > 30,8$) i na replikaciju virusa PV1 ($EC_{50} = 51 \pm 1,16$ IU/mL, $THI > 19,6$).

Pd(II) kompleks nije ispoljio antivirusni efekat ni na adsorpciju, ni na replikaciju PV1, jer je u opsegu testiranih koncentracija 0,06-8,24 μ M CPE ostao 100%. Efekti liganda, Pt(II) kompleksa i inteferona α -2a na adsorpciju PV1, dati su u **tabeli 4.15**.

Tabela 4.15. Efekat liganda, Pt(II) kompleksa i inteferona α -2a na adsorpciju PV1 (srednja vrednost redukcije CPE $\pm$ SE)

Tretman pre infekcije, efekat na adsorpciju virusa								
Ligand								
Koncentracija (μ M)	0,15	0,30	0,59	1,19	2,38	4,75	9,50	19,00
Redukcija CPE (%)	0	0	0	$0,14 \pm 0,08$	$2,84 \pm 0,84$	$7,95 \pm 0,78$	$15,32 \pm 1,03$	$24,42 \pm 1,49$
Pt(II) kompleks								
Koncentracija (μ M)	0,13	0,27	0,53	1,06	2,13	4,25	8,50	17,00
Redukcija CPE (%)	0	0	0	0	$0,38 \pm 0,19$	$1,12 \pm 0,41$	$4,84 \pm 1,10$	$11,14 \pm 1,50$
Interferon α -2a								
Koncentracija (IU/ml)	3,13	6,25	12,50	25	50	100	200	400
Redukcija CPE (%)	$0,29 \pm 0,15$	$2,94 \pm 0,82$	$15,83 \pm 1,25$	$42,34 \pm 1,52$	$67,34 \pm 2,1$	$74,86 \pm 1,85$	$98,02 \pm 0,91$	$98,52 \pm 1,13$

Krive redukcije CPE ligandom i Pt(II) kompleksom u tretmanu pre infekcije ćelija virusom prikazane su na **slici 4.24**. Značajne redukcije CPE ligandom, detektovane su na 2,38 μM i većim koncentracijama, sa najvećim efektom na najvećoj testiranoj koncentraciji, 19 μM ($24,42 \pm 1,49\%$ redukcije CPE). Značajne redukcije CPE kompleksom Pt(II) izmerene su na 4,25 μM i većim koncentracijama, sa najvećim efektom na najvećoj testiranoj koncentraciji, 17 μM ($11,14 \pm 1,50\%$ redukcije CPE). Na osnovu ovih rezultata, ligand je ispoljio veći antivirusni efekat od Pt(II) kompleksa na adsorpciju PV1.

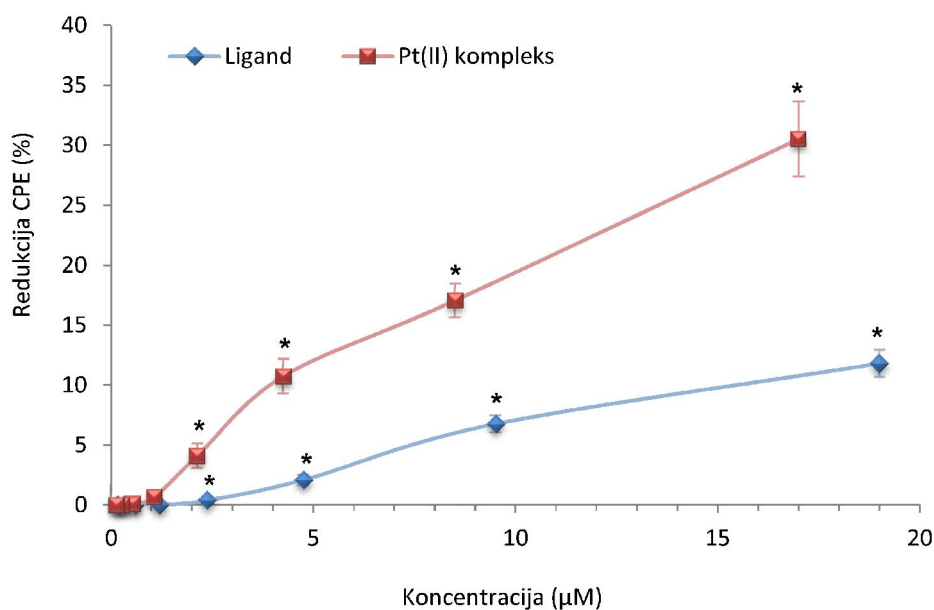


Slika 4.24. Efekat liganda i Pt(II) kompleksa na adsorpciju PV1. Redukcija CPE $\pm$ SE, u tretmanu pre infekcije ćelija virusom (* $p < 0,05$, Studentov t -test)

Efekti liganda, Pt(II) kompleksa i inteferona α -2a na replikaciju PV1, dati su u **tabeli 4.16**.

Tabela 4.16. Efekat liganda, Pt(II) kompleksa i inteferona α -2a na replikaciju PV1 (srednja vrednost redukcije CPE $\pm$ SE)

Tretman posle infekcije, efekat na replikaciju virusa								
Ligand								
Koncentracija (μ M)	0,15	0,30	0,59	1,19	2,38	4,75	9,50	19,00
Redukcija CPE (%)	0	0	0	0	$0,39 \pm 0,18$	$2,08 \pm 0,45$	$6,75 \pm 0,71$	$11,8 \pm 1,13$
Pt(II) kompleks								
Koncentracija (μ M)	0,13	0,27	0,53	1,06	2,13	4,25	8,50	17,00
Redukcija CPE (%)	0	0	$0,09 \pm 0,07$	$0,66 \pm 0,29$	$4,1 \pm 1,03$	$10,72 \pm 1,45$	$17,05 \pm 1,40$	$30,52 \pm 3,12$
Interferon α 2a								
Koncentracija (IU/ml)	3,13	6,25	12,50	25	50	100	200	400
Redukcija CPE (%)	$0,58 \pm 0,38$	$1,67 \pm 0,68$	$7,06 \pm 1,30$	$22,07 \pm 1,35$	$49,50 \pm 1,52$	$80,03 \pm 2,10$	$99,10 \pm 0,78$	$98,43 \pm 1,38$



Slika 4.25. Efekat liganda i Pt(II) kompleksa na replikaciju PV1. Redukcija CPE $\pm$ SE u tretmanu posle infekcije ćelija virusom (* $p < 0,05$, Studentov t -test)

Krive redukcije CPE ligandom i Pt(II) kompleksom u tretmanu posle infekcije ćelija virusom prikazane su na **slici 4.25**. Značajne redukcije CPE ligandom detektovane su na 2,38 μM i većim koncentracijama, sa najvećim efektom na najvećoj testiranoj koncentraciji, 19 μM ($11,8 \pm 1,13\%$ redukcije CPE). Značajne redukcije CPE kompleksom Pt(II) izmerene su na 2,13 μM i većim koncentracijama, sa najvećim efektom na najvećoj testiranoj koncentraciji, 17 μM ($30,52 \pm 3,12\%$ redukcije CPE). Na osnovu ovih rezultata, Pt(II) kompleks je ispoljio veći antivirusni efekat od liganda, na replikaciju PV1.

DISKUSIJA

5. DISKUSIJA

Klinička primena postojećih hemioterapeutskih agenasa koji se koriste u lečenju infektivnih bolesti i kancera ograničena je usled njihovog neselektivnog dejstva, pojave rezistencije i brojnih neželjenih efekata, što ukazuju na potrebu razvoja novih strategija u tretmanima ovih oboljenja. Otkrivanje i ispitivanje biološki aktivnih supstanci koji ispoljavaju veću specifičnost prema invazivnim biološkim agensima i koji ne oštećuju zdrave ćelije, od posebnog su značaja za razvoj novih hemioterapeutskih lekova i njihovu kliničku upotrebu. Istraživanja sprovedena u poslednjoj deceniji otkrila su vrlo perspektivne antimikrobne i antikancerske potencijale derivata 2-(difenilfosfino)benzaldehida (Dpba) i njihovih kompleksa sa prelaznim metalima.

Cilj ove doktorske disertacije bilo je ispitivanje *in vitro* biološke aktivnosti kompleksa Pd(II) i Pt(II) sa 2-(difenilfosfino)benzaldehyd-1-adamantolhidrazonom kao ligandom. U ovom radu je ispitana antimikrobna, citotoksična i genotoksična aktivnost na ćelijskim linijama MRC-5, Hep-2 i A549 i odabranim mikroorganizmima. U okviru antimikrobne aktivnosti ispitana je i antivirusna aktivnost, koja do sada nije ispitivana na drugim grupama derivata Dpba. Rezultati citotoksične aktivnosti usmerili su dalja istraživanja i na druge aspekte antikancerskog dejstva, pa je praćen uticaj na proliferaciju ćelija, ispitana je ćelijska smrt i uticaj na migratorni potencijal ćelija. Kao jedan od važnih aspekata bezbednosti ovih jedinjenja za dalja *in vivo* istraživanja i eventualnu kliničku primenu, ispitan je i genotoksični potencijal *in vitro* na MRC-5, Hep-2 i A549 ćelijskim linijama.

5.1. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa ispitana je na odabranim grampozitivnim i gramnegativnim bakterijama i jednoj vrsti gljivica. Antimikrobno dejstvo tumačeno je na osnovu vrednosti parametara aktivnosti MIC i MBC/MFC. Antimikrobna aktivnost praćena je i na bakteriji *M. bovis*, koja je značajni patogen životinja i čoveka. Za ispitivanje je izabran atenuisani soj *Bacillus Calmette-Guérin* koji stimuliše protektivni imunitet na *M. tuberculosis* (Oettinger i sar., 1999). U

pronalaženju i razvoju novih agenasa protiv tuberkuloze veoma je izazovan zadatak dobiti agens koji dovoljno dobro prolazi kroz izrazito nepermeabilan ćelijski zid mikobakterija. Naime, njihov ćelijski zid sadrži znatnu količinu peptidoglikana prekrivenih lipidima, od kojih su najznačajniji mikolična kiselina i voskovi. Usled povećane lipofilnosti, fosfini u hemijskim strukturama poboljšavaju aktivnost prema mikobakterijama, a poznati su i fosfinski Pd(II) kompleksi sa dobrim efektom na mikobakterije (Berners-Price i Sadler, 1988; Ferreira i sar., 2012). Prema našim saznanjima, derivati Dpba do sada nisu ispitivani na mikobakterijama.

Ova studija je pokazala varijacije u antimikrobnoj aktivnosti liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa u zavisnosti od vrste mikroorganizma i koncentracije ispitivanog jedinjenja. Ligand je ispoljio snažno bakteriostatičko i baktericidno dejstvo na *M. bovis*, dok kompleksi Pd(II) i Pt(II) nisu pokazali aktivnost.

U antimikrobnoj aktivnosti prema referentnim bakterijama primećuje se bolje dejstvo na grampozitivne bakterije. Ligand je pokazao bolju bakteriostatičku aktivnost na *S. aureus*, dok su Pd(II) i Pt(II) kompleksi pokazali bolju bakteriostatičku i baktericidnu aktivnost na *B. subtilis*. Kompleks Pt(II) pokazao je slabo bakteriostatičko dejstvo prema gramnegativnim bakterijama *E. coli* i *S. abony*. Antibakterijske aktivnosti liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa značajno su slabije od referentnih antibiotika enrofloksacina, oksitetraciklina i streptomcina, a antigljivična aktivnost nije pokazana. Milenković i saradnici (2013a; 2014b) i Adaila i saradnici (2014) su pokazali da pojedine grupe Dpba derivata poseduju antigljivično dejstvo.

U ovoj studiji, kao i u studijama sprovedenim na drugim Šifovim bazama (Garoufis i sar., 2009), dobijena je značajno bolja antimikrobna aktivnost liganda od njegovog Pd(II) kompleksa. Ligand ima bolju aktivnost na *S. aureus* od Dpba sa semioksamazidnom strukturom, a postiže se slična aktivnost njegovog kompleksa Pt(II) na *E. coli* (Radulović i sar., 2006). U odnosu na Dpba derivate sa etil-karbazatom i fenil-karbazatom strukturom (Milenković i sar., 2013a; 2014b), ligand postiže bolji antimikrobni efekat na grampozitivne bakterije. Slično antimikrobno dejstvo prema grampozitivnim i slabije prema gramnegativnim bakterijama, ligand pokazuje u poređenju sa Dpba derivatom sa Girard T strukturom (Adaila i sar., 2014, Milenković i sar., 2015). S obzirom da su poznati Dpba derivati koji su aktivni prema rezistentnim kliničkim izolatima *P. aeruginosa* i *E. coli* (Milenković i sar., 2015), ostvarena aktivnost Pt(II) kompleksa na *E. coli* daje osnov da se ispita njegov efekat i na kliničke izolate.

5.2. Antikancerski potencijal

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitan je antikancerski potencijal liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa, preko njihove citotoksičnosti, uticaja na proliferaciju i vreme dupliranja populacije ćelija, indukcije ćelijske smrti nekroze i/ili apoptoze i uticaja na direktnu migraciju ćelija, na tumorskim ćelijama humanog karcinoma larinksa (Hep-2) i adenokarcinoma pluća (A549). U procesu razvoja novih hemioterapeutskih agenasa jedan od parametara koji određuju dalju sudbinu nekog jedinjenja u prekliničkim i kliničkim ispitivanjima je selektivna toksičnost. Poznato je da je pojava neželjenih toksičnih efekata u uskoj vezi sa neselektivnim dejstvom na zdrava tkiva, pa je u istraživanje uključena i ćelijska linija MRC-5, poreklom od zdravih ćelija pluća. Potencijalni toksični efekti liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa mogli bi da ograniče njegovu primenu u hemioterapijama. Antikancerski potencijal je poređen sa aktivnošću hemioterapeutika na bazi platine – cisplatinom, karboplatinom i oksaliplatinom, koji su u našim eksperimentima poslužili kao pozitivne kontrole.

Selektivno citotoksično dejstvo testiranih supstanci određeno je preko parametra SI, na osnovu odnosa koncentracija koje smanjuju preživljavanje ćelija za 50% u normalnoj ćelijskoj liniji MRC-5 i kancerskim ćelijskim linijama Hep-2 i A549. Intenzitet selektivnog citotoksičnog dejstva tumačen je prema sledećim kriterijumima: za $SI \geq 2$ dejstvo je selektivno, za $SI \geq 3$ dejstvo je visoko-selektivno, a jedinjenja sa vrednostima $SI < 2$ smatrana su generalno toksičnim.

Da bi se utvrdilo da li je citotoksični efekat posledica ćelijske smrti ili inhibicije ćelijske deobe praćeno je dejstvo netoksičnih i subtoksičnih koncentracija testiranih supstanci na proliferaciju i vreme dupliranja populacije ćelija PDT, kao parametra proliferacije. Povećanje vrednosti PDT ukazuje na citostatsku aktivnost ispitivane supstance. Vreme dupliranja populacije ćelija varira u zavisnosti od ćelijske linije, pa čak i između ćelijskih linija koje vode poreklo iz istog tkiva (Tsai i sar., 1996).

Programirana ćelijska smrt – apoptoza je poželjan događaj u antikancerskoj aktivnosti, pa je u ovom radu testirano koji tip ćelijske smrti je najzastupljeniji u populaciji tretiranih ćelija. Brojnim studijama molekularnih mehanizama antitumorske aktivnosti cisplatine pokazano je da biohemijski mehanizmi citotoksičnosti uključuju interakciju cisplatine sa DNK (ali i drugim metama) i indukciju ćelijske smrti putem apoptoze, u okviru heterogene populacije ćelija koja formira tumorsku masu (Cepeda i sar., 2007).

Kao reprezentativni model za ispitivanje da li se radi o nekrozi i/ili apoptozi kao tipu ćelijske smrti, odabrali smo ligand i A549 ćelije. Morfološke karakteristike A549 ćelija tretiranih ligandom prvobitno su praćene *in situ*, pomoću svetlosne mikroskopije sa faznim kontrastom. U populaciji tretiranih ćelija detektovan je veliki broj ćelija sa različitim morfološkim promenama koje su odgovarale obeležjima apoptotskih ćelija. Ovaj tip ćelijske smrti, apoptoza, dalje je ispitan diferencijalnim bojenjem ćelija (AO/EB). Na osnovu integriteta ćelijske i nukleusne membrane i na osnovu morfoloških karakteristika hromatina, primenom fluorescentne mikroskopije, dalje je ispitana rana i kasna faza apoptoze.

Antikancerski hemioterapeutici, osim citotoksičnog, antiproliferativnog efekta i indukcije ćelijske smrti apoptoze, mogu imati efekat i na citoskelet i pokretljivost ćelija. Na ovaj način se može redukovati migratorni potencijal kancerogenih ćelija i inhibirati metastaza. Za praćenje uticaja na migratorni potencijal ćelija korišćen je *Wound healing* ili *Scratch* test, jedan od prvih testova u ispitivanjima novih antikancerskih jedinjenja, jer imitira migraciju ćelija *in vivo*. U studijama antimigratornog potencijala ispitan je uticaj liganda, kompleksa Pd(II) i kompleksa Pt(II), pri koncentracijama koje obezbeđuju preživljavanje 80% populacije ćelija, na direktnu migraciju ćelija. Da bi se isključio efekat proliferacije na zatvaranje proreza, ćelije u monosloju su gajene u medijum bez dodatka FBS, tj. sa smanjenom količinom hranljivih sastojaka. Kao pozitivna kontrola korišćena je cisplatina.

5.2.1. Citotoksična aktivnost

Citotoksična aktivnost liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa značajno je varirala u zavisnosti od testirane ćelijske linije. Ligand i Pt(II) kompleks postigli su najvišu citotoksičnu aktivnost na Hep-2 ćelijama, dok je Pd(II) kompleks pokazao dvostruko manju citotoksičnost. Efekat liganda i Pt(II) kompleksa na Hep-2 ćelijama sličan je oksaliplatini, bolji je od karboplatine i slabiji od cisplatine.

Slab citotoksični efekat pokazao je ligand na A549 ćelijama, dok su kompleksi Pd(II) i Pt(II) bili neaktivni, bez citotoksičnog efekta. Dobijena aktivnost liganda na A549 ćelijama značajno je bolja od citostatika karboplatine, ali je oko 4 puta slabija od cisplatine i oksaliplatine. Visoka otpornost A549 ćelija se može objasniti njihovim poreklom od NSCLC koji često pokazuje rezistenciju na citostatike na bazi platine (Cetintas i sar., 2012).

Određen stepen citotoksičnosti na zdravim MRC-5 ćelijama, sličan karboplatini i slabiji od cisplatine i oksaliplatine, pokazali su samo ligand i Pt(II) kompleks.

Upoređivanjem citotoksičnih aktivnosti na zdravim i kancerskim ćelijama, ustanovljena je visoko-selektivna toksičnost sva tri novosintetisana jedinjenja prema Hep-2 ćelijama, a najbolji efekat pokazao je ligand. Karboplatina je pokazala selektivnu, a cisplatina i oksaliplatina neselektivnu citotoksičnu aktivnost prema Hep-2 ćelijama. Ligand i model citostatici pokazali su neselektivnu toksičnost na ćelijama A549. I pored toga, ligand je postigao citotoksičnu aktivnost koja se može smatrati značajnom za dalja ispitivanja, ako se uzme u obzir visoka rezistencija ove ćelijske linije. Rezistencija A549 ćelija na komplekse Pd(II) i Pt(II) verovatno je posredovana mehanizmima kao što su redukovan ćelijski unos i povećana eliminacija, što se odražava na ukupnu akumulaciju jedinjenja u ćeliji. Na pojavu rezistencije značajno je mogla uticati i povećana aktivnost enzima uključenih u reparaciju DNK oštećenja izazvanih ispitivanim agensima (Rabik and Dolan, 2007).

Može se uočiti da je u grupi novosintetisanih jedinjenja Pd(II) kompleks pokazao najslabiju citotoksičnu aktivnost. Za većinu poznatih biološki aktivnih kompleksa Pd(II) karakterična je slabija citotoksičnost u poređenju sa odgovarajućim analogima Pt(II). Ova pojava je posledica termodinamičke i kinetičke nestabilnosti Pd(II) kompleksa, koja se objašnjava brзом hidrolizom kompleksa Pd(II) i formiranjem visoko reaktivnih jedinjenja. Brzina hidrolize Pd(II) kompleksa može biti i do 100.000 puta veća u odnosu na hidrolizu odgovarajućih analoga kompleksa Pt(II). Pretpostavlja se da usled brze hidrolize Pd(II) kompleksi retko stižu u nepromenjenom obliku do svojih farmakoloških meta u ćeliji, zbog čega se povećava rizik od pojave neželjenih efekata, jer novonastali molekuli mogu da ometaju biohemijske procese u ćeliji (Butour i sar., 1997; Abu-Surrah i sar., 2008).

Upoređivanjem antimikrobne i citotoksične aktivnosti liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa, zapaža se da je, u većini slučajeva, antimikrobna aktivnost u opsegu citotoksičnih koncentracija na ćelijskim kulturama MRC-5, Hep-2 i A549. Interesantan podatak je dobijen sa ligandom u slučaju *M. bovis*, kada je bakteriostatički i baktericidni efekat postignut na subtoksičnim koncentracijama za zdrave ćelije pluća MRC-5. Ovakvi rezultati ukazuju na selektivnu toksičnost liganda prema ispitanoj vrsti mikobakterija, koja bi mogla biti osnova za dalja istraživanja antimikobakterijske aktivnosti u studijama *in vivo*.

Prema publikovanim rezultatima, različiti derivati Dpba imaju snažno citotoksično dejstvo prema kancerskim ćelijskim linijama, među kojima se posebno ističe aktivnost na ćelijskim linijama koje su rezistentne na cisplatinu (Malešević i sar., 2006; Motswainyana i sar., 2013). Selektivna citotoksična aktivnost slična ligandu i Pt(II) kompleksu primećuje se kod Dpba jedinjenja sa ortotoluidinskom i 2,6-lutidinskom strukturom (Motswainyana i sar., 2013). Neselektivna citotoksičnost na ćelijama A549 dobijena je kod Dpba liganada sa etil-karbazatnom, fenil-karbazatnom i Girard T strukturom (Milenković i sar., 2013a, 2013b, 2014b, Čobeljić i sar., 2015). Druga grupa acilhidrazona sa 1-adamatoil hidrazonskom strukturom pokazala je bolju citotoksičnu aktivnost od liganda na A549 ćelijama, sličnu cisplatinu (Leovac i sar., 2015). Kod drugih grupa poznatih derivata Dpba primećuje se da kompleksi sa prelaznim metalima imaju bolju citotoksičnu aktivnost od samih liganada (Malešević i sar., 2006). Rezultati citotoksičnosti u našim ispitivanjima na Hep-2 i A549 kancerskim ćelijskim linijama pokazali su da uvođenje metala Pd(II) i Pt(II) u strukturu liganda ne povećava njegovu citotoksičnost.

5.2.2. Antiproliferativna aktivnost

Najbolji antiproliferativni efekat pokazao je ligand na MRC-5, Hep-2 i A549 ćelijama, kao i Pt(II) kompleks na Hep-2 ćelijama. Pt(II) kompleks je pokazao inhibitorni efekat na MRC-5 i A549 ćelije u kasnoj proliferaciji. Pd(II) kompleks je imao najslabiji antiproliferativni efekat na MRC-5 i Hep-2 ćelijama, a na A549 ćelije nije imao antiproliferativno dejstvo. Citostatici cisplatina, karboplatina i oksaliplatina značajno su inhibirali proliferaciju na svim ćelijskim linijama i bili su efikasniji u odnosu na testirane supstance. Vreme dupliranja populacije ćelija sa različitim netoksičnim dozama ligand i njegovi kompleksi Pd(II) i Pt(II) pokazali su značajna povećanja parametra PDT na MRC-5 i Hep-2 ćelijama, ukazujući na citostatsko dejstvo, a citostatski efekat na ćelijama A549 nije detektovan. Citostatska aktivnost je bila izraženija na Hep-2 ćelijama, a Pt(II) kompleks je ispoljio najbolji efekat. Cisplatina, karboplatina i oksaliplatina pokazale su citostatsku aktivnost prema ćelijama MRC-5 i Hep-2, a citostatski efekat na ćelijama A549 nije ostvaren. Zbog izraženog antiproliferativnog efekta parametar PDT u nekim slučajevima nije bio primenljiv, jer nije došlo do dupliranja broja ćelija u eksponencijalnoj fazi rasta populacije.

5.2.3. Antimigratorna aktivnost

Antimigratorna aktivnost cisplatine kao pozitivne kontrole pokazana je u svim testiranim linijama MRC-5, Hep-2 i A549. Ligand, Pd(II) i Pt(II) kompleks inhibirali su migraciju MRC-5 i Hep-2 ćelija, pri čemu je inhibicija bila efikasnija na ćelijama Hep-2. Potencijal sličan cisplatini pokazali su Pt(II) kompleks na Hep-2 i ligand na MRC-5 ćelijama. Na A549 ćelijama testiran je samo ligand koji je dostigao nivo inhibicije slabiji od cisplatine.

Ako se antimigratorna aktivnost posmatra sa gledišta selektivnog dejstva, optimalni efekat testiranih supstanci se očekuje ukoliko je inhibicija migracije kancerskih veća u poređenju sa inhibicijom zdravih ćelija. Na osnovu toga može se zaključiti da je najbolje selektivno dejstvo prema Hep-2 ćelijama postigao Pd(II) kompleks.

Remodeliranje ćelijskog citoskeleta ima značajnu ulogu u procesima ćelijske deobe i aktivnog kretanja ćelija, pa nije iznenađujuća korelacija efekta testiranih supstanci na migraciju i proliferacije ćelija.

Detektovani antimigratorni potencijal liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa ukazuju da bi dalja istraživanja njihove antikancerske aktivnosti *in vitro* mogla biti usmerena i na ispitivanje uticaja na invazivnost i neoangiogenezu.

U literaturi nisu pronađeni podaci o prethodnim ispitivanjima antimetastatske aktivnosti drugih derivata Dpba.

5.2.4. Ćelijska smrt

U studijama ispitivanja ćelijske smrti, većina ćelija izloženih delovanju liganda tokom 48 sati ispoljila je morfološke karakteristike rano apoptotskih ćelija, čime je potvrđeno da ligand indukuje apoptozu u kancerskim A549 ćelijama. Prema literaturnim podacima indukcija apoptoze u A549 ćelijama postiže se i Dpba derivatima sa Girard T strukturom (Čobeljić i sar., 2015). Poznati su derivati Dpba koji indukuju apoptozu kod drugih tipova kancerskih linija (Milenković i sar., 2013). Pojedini kompleksi Pd(II) i Pt(II) sa Dpba strukturom indukuju apoptozu u HeLa ćelijama bez značajnog narušavanja distribucije ćelijskog ciklusa (Malešević i sar., 2006). Zbog značajne

sličnosti u strukturi ovih Dpba jedinjenja i liganda, možemo pretpostaviti da se citotoksična aktivnost ostvaruje istim mehanizmima dejstva.

5.3. Genotoksični potencijal

Genotoksični efekat liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa praćen je u MRC-5, Hep-2 i A549 ćelijama, alkalnim komet testom, kojim se detektuju jednolančani i dvolančani prekidi u molekulu DNK, i alkalno labilna mesta. Testirane su netoksične i subtoksične koncentracije pri kojim je najmanje 60% ćelija vijabilno. Da bi se procenila bezbednost eventualne primene ovih jedinjenja u kliničke svrhe ispitivanja su uključila zdrave ćelije pluća MRC-5 i kancerske ćelije Hep-2 i A549, usled rizika od pojave sekundarnih tumora. Cisplatina je korišćena kao pozitivna kontrola, iako lekovi na bazi platine indukuju visok nivo DNK oštećenja i pripadaju grupi genotoksičnih lekova (Swift i Golsteyn, 2014). Oni zauzimaju značajno mesto u onkološkoj praksi, jer terapijski efekti koje postižu daleko prevazilaze rizike po zdravlje koje donosi njihova upotreba.

Ligand i Pt(II) kompleks nisu pokazali značajan genotoksični efekat u ćelijama MRC-5 za razliku od Pd(II) kompleksa. U Hep-2 ćelijama ligand je izazvao značajni nivo oštećenja DNK.

Iako su ligand i Pd(II) komplekta pokazali genotoksični potencijal, što uključuje oprez u slučaju njihove primene uz strogo definisanje maksimalno dozvoljene doze, u poređenju sa cisplatinom dobijen je značajno niži nivo DNK oštećenja. Ovo ukazuje da bi primena liganda i Pd(II) kompleksa u medicinske svrhe bila bezbednija od cisplatine.

Povećana genotoksičnost, praćena slabijom citotoksičnom aktivnošću, u poređenju sa odgovarajućim Pt analogima dobijena je i kod drugih Pd kompleksa (Miklášová i sar., 2009). Genotoksičnost Pd(II) kompleksa može se dovesti u vezu sa fizičko-hemijskim karakteristikama i termodinamičkom i kinetičkom nestabilnošću Pd(II) kompleksa.

5.4. Antivirusni potencijal

Ispitivanje antivirusne aktivnosti liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleks bazirano je na činjenici da ova jedinjenja sadrže adamantil grupu koja je odgovorna za akriivnost više poznatih antivirusnih lekova. Antivirusna aktivnost prema poliovirusu tip 1 praćena je preko redukcije citopatogenog efekta na visokoosetljivoj ćelijskoj liniji Hep-2, na intracelularnom nivou, variranjem momenta aplikacije ispitivanih jedinjenja u odnosu na momenat infekcije virusom. Kako bi se utvrdilo da li agensi deluju na početne faze virusnog infektivnog ciklusa – adsorpciju i penetraciju, ili na kasnije faze virusnog infektivnog ciklusa u kojima se virus umnožava, ćelije Hep-2 su tretirane jedinjenima pre i posle infekcije virusom. Antivirusna aktivnost je ispitana pri koncentracijama supstanci koje su obezbedile 80% vijabilnih Hep-2 ćelija. Redukcija virusne aktivnosti od 50% uzeta je kao prag značajne antivirusne aktivnosti za ispitivano jedinjenje, prema smernicama za razvoj antiviralnih lekova (FDA, 2006). Rezultati antivirusne aktivnosti poređeni su sa aktivnošću interferona α -2a, koji je u eksperimentima poslužio kao pozitivna kontrola.

Antivirusni efekat liganda je bio veći od Pt(II) kompleksa u slučaju tretmana pre infekcije PV1 virusom. Antivirusna aktivnost je najverovatnije postignuta blokadom ili modifikacijom receptora na površini ćelije za koje se virusi specifično vezuju. Na ovaj način je smanjen broj adsorbovanih virusa i povećana zaštita ćelije od infekcije.

Najveću aktivnost pokazao je kompleks Pt(II) u slučaju tretmana nakon infekcije PV1 virusom. Antivirusna aktivnost ovog kompleksa je rezultat efekta na neku od faza u umnožavanju virusa. Kompleks Pd(II) nije ispoljio antivirusnu aktivnost prema PV1 na intracelularnom nivou, ni u tretmanu pre, ni u tretmanu posle infekcije.

Antivirusna aktivnost liganda i Pt(II) kompleksa ostvarena je pri niskim koncentracijama, što predstavlja osnovu za postizanje selektivnog dejstva *in vivo*. Međutim, antivirusna aktivnost liganda i Pt(II) kompleksa višestuko je manja u poređenju sa efektom koji je ostvario interferon α -2a. Ligand i Pt(II) kompleks nisu dostigli 50% redukcije virusne aktivnosti PV1, pa se njihov antivirusni potencijal može označiti kao slab.

5.5. Biološka aktivnost liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa

Novosintetisana jedinjenja ispitivana u ovom radu, ligand 2-(difenilfosfino)benzaldehyd-1-adamantolhidrazon i njegovi kompleksi Pd(II) i Pt(II), pokazala su antimikrobno dejstvo različitog intenziteta prema odabranim sojevima bakterija i gljivica. Ligand je pokazao snažnu antimikrobnu aktivnost na bakteriji *M. bovis*, koja je značajni patogen životinja i čoveka, pri čemu je razvoj novih agenasa protiv tuberkuloze težak zadatak usled izrazito nepermeabilnog ćelijskog zida mikobakterija.

Ispitivana jedinjenja su ostvarila dozno-zavisnu citotoksičnu aktivnost, kao i antiproliferativno dejstvo prema malignim ćelijskim linijama, poreklom iz raličitih tipova tumora i visoko-selektivno dejstvo prema ćelijskoj liniji koja vodi poreklo od humanog karcinoma larinksa. Dalja istraživanja dovela su do saznanja da su ova jedinjenja aktivna u inhibiciji migracije ćelija.

Posebno se može istaći citotoksično i proapoptotsko dejstvo liganda na ćelijsku liniju poreklom od nemikrocelularnog karcinoma koji je visoko rezistentan na postojeće hemioterapeutike na bazi platine. Slabiji genotoksični efekat liganda i Pd(II) kompleksa u poređenju sa cisplatinom može biti osnova za njihovu potencijalnu primenu. Testirana jedinjenja su pokazala slab antivirusni potencijal prema poliovirusu tip 1.

Poređenem genotoksičnosti, antibakterijske i antivirusne aktivnosti primećuje se da koncentracije liganda i Pt(II) kompleksa kojima se postiže antimikrobni efekat na *M. bovis* i antivirusni efekat prema PV1 nisu izazvale genotoksični efekat na zdravim ćelijama MRC-5, što bi moglo da podrži terapijsku primenu ovih supstanci koja ne nosi rizik od genotoksičnosti.

Ova doktorska disertacija po prvi put u našim laboratorijama predstavlja uticaj kombinovanih jedinjenja sa strukturom Dpba i adamantana na antimikrobnu, citotoksičnu i genotoksičnu aktivnost. Ova istraživanja su pokazala da su derivati 2-(difenilfosfino)benzaldehyda sa adamantil grupom dobri kandidati za dalja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja i da se mogu razmatrati kao potencijalni hemioterapeutici, sa izraženim antimikrobnim, citotoksičnim, antiproliferativnim i antimigratornim svojstvima, i slabijim genotoksičnim potencijalom u odnosu na citostatik cisplatinu, što je važan aspekt bezbednosti za dalja *in vivo* istraživanja i eventualnu kliničku primenu. Rezultati ovog istraživanja mogli bi da doprinesu razvoju novih hemioterapeutskih agenasa za

tretmane infekcija i kancera, sa manjim toksičnim uticajem na organizam i manje neželjenih efekata.

ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa zadatim ciljevima ove doktorske disertacije i dobijenim rezultatima o biološkoj aktivnosti novosintetisanog liganda 2-(difenilfosfino)benzaldehyd-1-adamantoilhidrazona i njegovih Pd(II) i Pt(II) kompleksa, mogu se doneti sledeći zaključci:

- Ligand, Pd(II) i Pt(II) kompleks pokazali su umerenu ili slabu antibakterijsku aktivnost prema pojedinim referentnim grampozitivnim i gramnegativnim bakterijama.
- Ligand je postigao snažno bakteriostatičko i baktericidno dejstvo prema atenuisanom soju *M. bovis Bacillus Calmette-Guérin* koji stimuliše protektivni imunitet na *M. tuberculosis*.
- Ligand je ispoljio selektivno dejstvo prema *M. bovis Bacillus Calmette-Guérin* u poređenju sa zdravim ćelijama pluća MRC-5. Ovakav efekat bi mogao biti osnova za dalja istraživanja antimikobakterijske aktivnosti u studijama *in vivo*.
- Ligand, Pd(II) i Pt(II) kompleks pokazali su izraženo citotoksično dejstvo na ćelijam Hep-2, u opsegu aktivnosti referentnih citostatika oksaliplatine i karboplatine.
- Ligand je pokazao citotoksičnu aktivnost na ćelijama A549 poreklom od visoko-rezistentnog nemirocelularnog karcinoma pluća, koja je značajno bolja od referentnog citostatika karboplatine.
- Efekti citotoksičnosti svih testiranih supstanci na zdravim ćelijama pluća MRC-5 bili su manji u poređenju sa efektom postignutim na kancerskoj ćelijskoj liniji Hep-2, čime je pokazano njihovo selektivno dejstvo.
- Ligand i njegovi kompleksi Pd(II) i Pt(II) ostvarili su visoko-selektivnu citotoksičnu aktivnost prema kancerskim ćelijama larinksa Hep-2, pri poređenju sa zdravim ćelijama pluća MRC-5. Najveću selektivnu toksičnost na Hep-2 ćelijama pokazao je kompleks Pd(II).
- Ligand je pokazao neselektivnu citotoksičnu aktivnost na ćelijama adenokarcinoma pluća A549, kao i referentni citostatici cisplatina, karboplatina i oksaliplatina.

- Antiproliferativno dejstvo liganda, Pd(II) i Pt(II) kompleksa pokazano je na zdravim MRC-5 i kancerskim ćelijama Hep-2, dok je proliferacija A549 ćelija bila inhibirana ligandom i Pt(II) kompleksom. Svi antiproliferativni efekti bili su slabiji od referentnih citostatika cisplatine, karboplatine i oksaliplatine
- Antimigratorni efekat pokazale su sve ispitivane supstance, a naefikasniji i sličan cisplatini je Pt(II) kompleks na Hep-2 ćelijama. Pd(II) kompleks je u poređenju sa zdravim ćelijama MRC-5 ostvario selektivnu antimigratornu aktivnost prema kancerskim ćelijama Hep-2.
- Citostatsko dejstvo su pokazale sve ispitivane supstance, a naefikasniji je Pt(II) kompleks na ćelijama Hep-2. Ligand i Pt(II) kompleks su ispoljili citostatsku aktivnost na MRC-5 ćelijama. Dostignuti citostatski efekti bili su slabiji u poređenju sa referentnim citostaticima.
- Ligand je indukovao programiranu ćelijsku smrt apoptozu u A549 ćelijama adenokarcinoma pluća.
- U poređenju sa cisplatinom dobijeni genotoksični efekti liganda i Pd(II) kompleksa su znatno niži, pa bi njihova primena u medicinske svrhe, sa gledišta genotoksičnih rizika, bila bezbednija od cisplatine.
- Ligand i Pt(II) kompleks pokazuju slabiji antivirusni potencijal na adsorpciju i replikaciju poliovirusa tip 1 u poređenju sa interferonom α -2a.
- Ligand je ostvario bolji antivirusni efekat na početne faze infektivnog ciklusa i adsorbciju virusa, dok je u kasnijim fazama u kojima se virus umnozava Pd(II) kompleks bio efikasniji.
- Na osnovu prethodno iznetih zaključaka, derivati 2-(difenilfosfino)benzaldehida sa adamantil grupom pokazali su se kao dobri kandidati za dalja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja. Na osnovu izraženih antimikrobnih, citotoksičnih, antiproliferativnih i antimigratornih karakteristika ova novosintetisana jedinjenja mogu se razmatrati prilikom razvoja novih hemioterapeutika. Slabiji genotoksični potencijal od cisplatine pruža veći stepen bezbednosti u daljim *in vivo* istraživanjima i eventualnoj kliničkoj primeni, što bi moglo da doprinese razvoju novih hemioterapeutskih agenasa za tretmane infekcija i kancera, sa manjim toksičnim uticajem na organizam i manje neželjenih efekata.

LITERATURA

7. LITERATURA

- Abu-Surrah, A.S., Al-Sa'doni, H.H., Abdalla, M.Y. (2008). Palladium-based chemotherapeutic agents: Routes toward complexes with good antitumor activity. *Cancer Ther.* 6, 1-10.
- Adaila, K., Milenković, M., Bacchi, A., Cantoni, G., Swart, M., Gruden-Pavlović, M., Milenković, M., Čobeljić, B., Todorović, T., Anđelković, K. (2014). Synthesis, characterization, DFT calculations, and antimicrobial activity of Pd(II) and Co(III) complexes with the condensation derivative of 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde and Girard's T reagent. *J. Coord. Chem.* 67, 3633-3648.
- ALIMS (2011). Sažetak karakteristika leka; Carboplatin, 10 mg/ml, koncentrat za rastvor za infuziju, Pfizer (Perth) PTY. Limited. Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, Srbija, Beograd.
- ALIMS (2013). Nacionalni registar lekova. Nacionalni centar za informacije o lekovima. Srbija, Beograd: Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, pp: 1-1044.
- Antonelli, G., Turriziani, O. (2012). Antiviral therapy: old and current issues. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 40, 95-102.
- Arnesano, F., Natile, G. (2009). Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA. *Coordin. Chem. Rev.* 253, 2070-2081.
- Aylward, B., Tangermann, R. (2011). The global polio eradication initiative: lessons learned and prospects for success. *Vaccine*, 29 (S4), 80-85.
- Aznavoorian, S., Murphy, A.N., Stetler-Stevenson, W.G. and Liotta, L.A. (1993). Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 71, 1368-1383.

- Badisa, R.B., Darling-Reed, S.F., Joseph, P., Cooperwood, J.S., Latinwo, L.M., Goodman, C.B. (2009). Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. *Anticancer Res.* 29, 2993-2996.
- Baron, S., Tying, S.K., Fleischmann, W.R., Coppenhaver, D.H., Niesel, D.W., Klimpel, G.R., Stanton, G.J, Hughes, T.K. (1991). The interferons: mechanisms of action and clinical applications. *J. Am. Med. Assoc.* 266, 1375-1383.
- Baskić, D., Popović, S., Ristić, P., Arsenijević, N.N., (2006). Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol. Int.* 30, 924-932.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C.T., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493.
- Berners-Price, S.J., Sadler, P.J. (1988). Phosphines and metal phosphine complexes: relationship of chemistry to anticancer and other biological activity. In *Bioinorganic Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 27-102.
- Bertini, I., Gray, H.B., Lippard, S.J., Valentine, J.S. (1994). *Bioinorganic chemistry*. University Science Books, MillValley, California.
- Bézivin, C., Tomasi, S., Lohezic-Le Devehat, F., Boustie, J. (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phytomedicine* 10, 499-503.
- Billy, F., Clairambault, J. (2013). Designing proliferating cell population models with functional targets for control by anti-cancer drugs. *Discrete Con. Dyn-B* 18, 865-889.
- Bortner, C.D., Cidlowski, J.A. (2014). Ion channels and apoptosis in cancer. *Philos. T. R. Soc. B.* 369, 20130104.

- Bouchal, P., Jarkovsky, J., Hrazdilova, K., Dvorakova, M., Struharova, I., Hernychova, L., Damborsky, J., Sova, P., Vojtesek, B. (2011). The new platinum-based anticancer agent LA-12 induces retinol binding protein 4 in vivo. *Proteome Sci.* 9, 68.
- Boulikas, T., Vougiouka, M. (2003). Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol. Rep.* 10, 1663-1682.
- Boulikas, T., Pantos, A., Bellis, E., Christofis, P. (2007). Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. *Cancer Therapy* 5, 537-583.
- Brenner, G.M., Stevens, C.W. (2013): Chemotherapy. In: *Pharmacology*. 4rd ed. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, USA, 386–450.
- Butour, J.L., Wimmer, S., Wimmer, F., Castan, P. (1997). Palladium(II) compounds with potential antitumour properties and their platinum analogues: a comparative study of the reaction of some orotic acid derivatives with DNA in vitro. *Chem.-Biol. Interact.* 104, 165-178.
- Calfee, D.P., Hayden, F.G. (1998). New approaches to influenza chemotherapy. *Drugs* 56, 537-553.
- Calonghi, N., Boga, C., Cappadone, C., Pagnotta, E., Bertucci, C., Fiori, J., Masotti, L. (2002). Cytotoxic and cytostatic effects induced by 4-hydroxynonenal in human osteosarcoma cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 293, 1502-1507.
- Case, F.H., Schilt, A.A., Simonzadeh, N.T. (1984). Synthesis and chelation properties of hydrazones derived from isoquinoline-1-carboxaldehyde, 2-quinoxalinecarboxaldehyde, 4-isoquinolyldiazine, and 2-quinoxalyldiazine. *Anal Chem.* 56, 2860-2862.
- Cepeda, V., Fuertes, M.A., Castilla, J., Alonso, C., Quevedo, C., Pérez, J.M. (2007). Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anti-Cancer Agent. Me.* 7, 3-18.

- Cetintas, V.B., Kucukaslan, A.S., Kosova, B., Tetik, A., Selvi, N., Cok, G., Gunduz, C., Eroglu, Z. (2012). Cisplatin resistance induced by decreased apoptotic activity in non-small - cell lung cancer cell lines. *Cell Biol. Int.* 36, 261-265.
- Cheung-Ong, K., Giaever, G., Nislow, C. (2013). DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chem. Biol.* 20, 648-659.
- Chew, C.F., Guy, A., Biggin, P.C. (2008). Distribution and dynamics of adamantanes in a lipid bilayer. *Biophys. J.* 95, 5627-5636.
- Chirullo, B., Sgarbanti, R., Limongi, D., Shytaj, I.L., Alvarez, D., Das, B., Boe, A., DaFonseca, S., Chomont, N., Liotta, L., Petricoin, E., Norelli, S., Pelosi, E., Garaci, E., Savarino, A., Palamara, A. T. (2013). A candidate anti-HIV reservoir compound, auranofin, exerts a selective 'anti-memory' effect by exploiting the baseline oxidative status of lymphocytes. *Cell Death Dis.* 4, e944.
- Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F.A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M. R., Ghattas, G., Brenchley, J. M., Schacker, T.W., Hill, B.J., Douek, D.C., Routy, J.P., Haddad, E.K., Sékaly, R.P. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* 15, 893-900.
- Chu, G. (1994). Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J. Biol. Chem.* 269, 787-790.
- Chung, R.T., Gale, M., Polyak, S.J., Lemon, S.M., Liang, T.J., Hoofnagle, J.H. (2008). Mechanisms of action of interferon and ribavirin in chronic hepatitis C: Summary of a workshop. *Hepatology* 47, 306-320.
- Cohen, M.L. (2000). Changing patterns of infectious disease. *Nature* 406, 762-767.
- Collins, A.R., Dobson, V.L., Dušinská, M., Kennedy, G., Štětina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us?. *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.* 375, 183-193.

- Collins, J.A., Schandl, C.A., Young, K.K., Vesely, J., Willingham, M.C. (1997). Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 923-934.
- Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Møller, P., Rojas, E., Dhawan, A., Benzie, I., Coskun, E., Moretti, M., Speit, G., Bonassi, S. (2014). The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. *Mutat. Res.-Rev. Mutat.* 759, 27-39.
- Cornelissen, J.P., Van Diemen, J.H., Groeneveld, L.R., Haasnoot, J.G., Spek, A.L., Reedijk, J. (1992). Synthesis and properties of isostructural transition-metal (copper, nickel, cobalt, and iron) compounds with 7,7',8,8'-tetracyanoquinodimethanide(1-) in an unusual monodentate coordination mode: crystal structure of bis(3,5-bis(pyridin-2-yl)-4-amino-1,2,4-triazole)bis(7,7',8,8'-tetracyanoquinodimethanido)copper(II). *Inorg. Chem.* 31, 198-202.
- Council of Europe (2013). European Pharmacopoeia. 8th ed. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care, Council of Europe, Strasbourg, France.
- Craigie, R. (2001). HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. *J. Biol. Chem.* 276, 23213-23216.
- Crevelin, E.J., Caixeta, S.C., Dias, H.J., Groppo, M., Cunha, W.R., Martins, C.H.G., Crotti, A.E.M. (2015). Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Plectranthus neochilus* against Cariogenic Bacteria. *Evid.-Based Compl. Alt.* 2015.
- Čobeljić, B., Milenković, M., Pevec, A., Turel, I., Vujčić, M., Janović, B., Gligorijević, N., Sladić, D., Radulović, S., Jovanović, K., Anđelković, K. (2015). Investigation of antitumor potential of Ni(II) complexes with tridentate PNO acylhydrazones of 2-(diphenylphosphino) benzaldehyde and monodentate pseudohalides. *J. Biol. Inorg. Chem.* DOI 10.1007/s00775-015-1315-x.

- d'Amato, T.A., Landreneau, R.J., McKenna, R.J., Santos, R.S., Parker, R.J. (2006). Prevalence of *in vitro* extreme chemotherapy resistance in resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* 81, 440-447.
- Dabrowiak, J.C. (2009). *Metals in Medicine*. John-Wiley and Sons, Ltd, Chichester, UK, 73-249.
- Davies, W.L., Grunert, R.R., Haff, R.F., McGahen, J.W., Neumayer, E.M., Paulshock, M., Watts, J.C., Wood, T.R., Hermann, E.C., Hoffmann, C.E. (1964). Antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine). *Science* 144, 862-863.
- de Béthune, M.P. (2010). Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989–2009). *Antivir. Res.* 85, 75-90.
- Decaestecker, C., Debeir, O., Van Ham, P., Kiss, R. (2007). Can anti-migratory drugs be screened *in vitro*? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration. *Med. Res. Rev.* 27, 149-176.
- De Clercq, E. (2002). Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 13-25.
- De Clercq, E. (2004). Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol.* 30, 115-133.
- De Palma, A., Holy, A., Hrebabecky, H., Neyts, J., Sala, M. (2008). Antiviral compounds of the adamantane type. Patent number WO 2008131502 A2.
- De Palma, A.M., Pürstinger, G., Wimmer, E., Patick, A.K., Andries, K., Rombaut, B., De Clercq, E.B., Neyts, J. (2008). Potential use of antiviral agents in polio eradication. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 545-551.
- De Palma, A.M., Vliegen, I., De Clercq, E., Neyts, J. (2008). Selective inhibitors of picornavirus replication. *Med. Res. Rev.* 28, 823-884.
- Despaigne, A.A.R., Da Silva, J.G., do Carmo, A.C.M., Piro, O.E., Castellano, E.E., Beraldo, H. (2009). Structural studies on zinc(II) complexes with 2-benzoylpyridine-derived hydrazones. *Inorg. Chim. Acta* 362, 2117-2122.

- Dorđević, M.M., Jeremić, D.A., Rodić, M.V., Simić, V.S., Brčeski, I. D., Leovac, V.M. (2014). Synthesis, structure and biological activities of Pd(II) and Pt(II) complexes with 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde 1-adamantoylhydrazone. *Polyhedron* 68, 234-240.
- EDQM (2009). CombiStats Version 4.0. Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care, Council of Europe.
- Eldahshan, O.A. (2013). Rhoifolin; a potent antiproliferative effect on cancer cell lines. *Br. J. Pharm. Res.* 3, 46-53.
- Elion, G.B. (1983). The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *J. Antimicrob. Chemoth.* 12(SB), 9-17.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495-516.
- El-Sherif, A.A. (2009). Synthesis, spectroscopic characterization and biological activity on newly synthesized copper(II) and nickel(II) complexes incorporating bidentate oxygen–nitrogen hydrazone ligands. *Inorg. Chim. Acta* 362, 4991-5000.
- EMA (2012). ICH guideline S2 (R1) on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use (EMA/CHMP/ICH/126642/2008). European Medicines Agency, London, UK, 1-28.
- Enan, G., Abdallah, F.M., Bobhy, H. (2012). Effect of acyclovir on bovine herpesvirus type 1 in in vitro cultured cells. *Int. J. Virol.* 8, 307-312.
- FDA (2006). Guidance for Industry, Antiviral Product Development-Conducting and Submitting Virology Studies to the Agency. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Silver Spring, MD, USA.

- Feng, Y.M., Feng, C.W., Chen, S.Y., Hsieh, H.Y., Chen, Y.H., Hsu, C.D. (2015). Cyproheptadine, an antihistaminic drug, inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by blocking cell cycle progression through the activation of P38 MAP kinase. *BMC cancer* 15, 134.
- Ferreira, P.C., Peixoto, M.L., Silva, M.A., Golgher, R.R. (1979). Assay of human interferon in Vero cells by several methods. *J. Clin. Microbiol.* 9, 471-475.
- Ferreira, J.G., Stevanato, A., Santana, A.M., Mauro, A.E., Netto, A.V., Frem, R.C., Pavan, F.R., Leite, C.Q., Santos, R.H. (2012). Structure and antimycobacterial activity of the novel organometallic [Pd (C-bzan)(SCN)(dppp)] compound. *Inorg. Chem. Commun.* 23, 63-66.
- Filipović, N., Borrmann, H., Todorović, T., Borna, M., Spasojević, V., Sladić, D., Novaković, I., Anđelković, K. (2009). Copper(II) complexes of N-heteroaromatic hydrazones: Synthesis, X-ray structure, magnetic behavior, and antibacterial activity. *Inorg. Chim. Acta* 362, 1996-2000.
- Fjelde, A. (1955). Human tumor cells in tissue culture. *Cancer* 8, 845-851.
- Freshney, R.I. (2005). *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*. 5th ed. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, USA, 359–370.
- Fuertes, M.A., Alonso, C., Pérez, J.M. (2003). Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem. Rev.* 103, 645-662.
- Gao, E.J., Wang, L., Zhu, M.C., Liu, L., Zhang, W.Z. (2010). Synthesis, characterization, interaction with DNA and cytotoxicity in vitro of the complexes [M(dmphen)(CO₃)]·H₂O [M = Pt(II), Pd(II)]. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 311-316.
- Garoufis, A., Hadjikakou, S.K., Hadjiliadis, N. (2009). Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents. *Coordin. Chem. Rev.* 253, 1384-1397.

- Georgopapadakou, N.H. (2001). Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on β -1, 3-glucan synthase inhibitors. *Expert Opin. Inv. Drug.* 10, 269-280.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer I.* 51, 1417-1423.
- Golan, D.E., Tashjian, A.H., Armstrong, E.J., Armstrong, A.W. (2012). Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 562-716.
- Golstein, P., Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* 32, 37-43.
- Green, D.W. (2002). The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin. Ther. Tar.* 6, 1-20.
- Greenwood D., Whitley R. (2003). Modes of action. In: Finch R.G., Greenwood D., Norrby S.R., Whitley R.J. (ed) *Antibiotic and Chemotherapy Anti-infective Agents and Their Use in Therapy*. Churchill Livingstone, London, UK, 11-24.
- Grossberg, S.E., Sedmak, J.J. (1984). Assays of interferons. In: Billiau, A. (ed) *Interferon, General and Applied Aspects*. Elsevier, Amsterdam, 189-216.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hay, A.J. (1989). The mechanism of action of amantadine and rimantadine against influenza viruses. In: *Concepts in Virus Pathogenesis*. Springer Verlag, NY, USA, 361-367.
- Hay, A.J. (1992). The action of adamantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. *Semin. Virol.* 3, 27-30.

- Hayden, F.G., Gwaltney, J.M., Van de Castle, R.L., Adams, K.F., Giordani, B. (1981). Comparative toxicity of amantadine hydrochloride and rimantadine hydrochloride in healthy adults. *Antimicrob. Agents Ch.* 19, 226-233.
- Hayden, F.G. (2006). Antivirals for influenza: historical perspectives and lessons learned. *Antivir. Res.* 71, 372-378.
- Henkel, J.G., Hane, J.T., Gianutsos, G. (1982). Structure-anti-Parkinson activity relationships in the aminoadamantanes. Influence of bridgehead substitution. *J. Med. Chem.* 25, 51-56.
- Hicks, C., Gulick, R.M. (2009). Raltegravir: the first HIV type 1 integrase inhibitor. *Clin. Infect. Dis.* 48, 931-939.
- Hortobagyi, G. N. (1997). Anthracyclines in the treatment of cancer. *Drugs* 54, 1-7.
- Huggins, D.J., Sherman, W., Tidor, B. (2012). Rational approaches to improving selectivity in drug design. *J. Med. Chem.* 55, 1424-1444.
- Hurt, A.C., Selleck, P., Komadina, N., Shaw, R., Brown, L., Barr, I.G. (2007). Susceptibility of highly pathogenic A (H5N1) avian influenza viruses to the neuraminidase inhibitors and adamantanes. *Antivir. Res.* 73, 228-231.
- IARC (2014). World cancer report 2014. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- ISO 14644-7:2004. Cleanrooms and associated controlled environments – Part 7: Separative devices (clean air hoods, gloveboxes, isolators and mini-environments).
- Ivanov, A.I., Christodoulou, J., Parkinson, J.A., Barnham, K.J., Tucker, A., Woodrow, J., Sadler, P.J. (1998). Cisplatin binding sites on human albumin. *J. Biol. Chem.* 273, 14721-14730.
- Jacobs, J.P., Jones, C.M., Baille, J.P. (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 227, 168–170.

- Jelínková, I., Šafaříková, B., Blanářová, O.V., Skender, B., Hofmanová, J., Sova, P., Moyer, M.P., Kozubík, A., Kolár, Z., Ehrmann, J., Vaculová, A.H. (2014). Platinum(IV) complex LA-12 exerts higher ability than cisplatin to enhance TRAIL-induced cancer cell apoptosis via stimulation of mitochondrial pathway. *Biochem. Pharmacol.* 92, 415-424.
- Jena, G.B., Kaul, C.L., Ramarao, P. (2002). Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. *Indian J. Pharmacol.* 34, 86-99.
- Johnson, D.K., Murphy, T.B., Rose, N.J., Goodwin, W.H., Pickart, L. (1982). Cytotoxic chelators and chelates 1. Inhibition of DNA synthesis in cultured rodent and human cells by aroylhydrazones and by a copper(II) complex of salicylaldehyde benzoyl hydrazone. *Inorg. Chim. Acta* 67, 159-165.
- Jones, C.J., Thornback, J.R. (2007). *Medicinal Applications of Coordination Chemistry*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 218-291.
- Jordan, M.A., Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer.* 4, 253-265.
- Joyce, L.F., Downes, J., Stockman, K., Andrew, J.H. (1992). Comparison of five methods, including the PDM Epsilometer test (E test), for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2709-2713.
- Kelland, L.R. (2000). Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* 59, 1-8.
- Kim, N.H., Park, H.J., Oh, M.K., Kim, I.S. (2013). Antiproliferative effect of gold(I) compound auranofin through inhibition of STAT3 and telomerase activity in MDA-MB 231 human breast cancer cells. *BMB Rep.* 46, 59-64.
- Kolarević, M.S. (2014). Primena komet testa na slatkovodnim školjkama *Unio pictorum* (Linnaeus, 1758), *Unio timidus* (Philippson, 1788) i *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) u ekogenotoksikološkoj proceni akvatičnih ekosistema. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu.

- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 16, 3-11.
- Lamoureux, G., Artavia, G. (2010). Use of the adamantane structure in medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.* 17, 2967-2978.
- Leovac, V.M., Rodić, M.V., Jovanović, L.S., Joksović, M.D., Stanojković, T., Vujčić, M., Sladić, D., Marković, V., Vojinović-Ješić, Lj.S. (2015). Transition Metal Complexes with 1-Adamantoyl Hydrazones–Cytotoxic Copper(II) Complexes of Tri- and Tetradentate Pyridine Chelators Containing an Adamantane Ring System. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2015, 882-895.
- Lewis, J.A. (1987). Biological assays of interferons. In: Clemens, M.J., Morris, A.G., Gearing, A.J.H. (ed) *Lymphokines and Interferons: A Practical Approach*. IRL, Oxford, UK, 73-87.
- Lewis, M.G., DaFonseca, S., Chomont, N., Palamara, A.T., Tardugno, M., Mai, A., Collins, M., Wagner, W.L., Yalley-Ogunro, J., Greenhouse, J., Chirullo, B., Norelli, S., Garaci, E., Savarino, A. (2011). Gold drug auranofin restricts the viral reservoir in the monkey AIDS model and induces containment of viral load following ART suspension. *Aids* 25, 1347-1356.
- Li, T.K., Liu, L.F. (2001). Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annu. Rev. Pharmacol.* 41, 53-77.
- Li, J., Chen, F., Cona, M.M., Feng, Y., Himmelreich, U., Oyen, R., Verbruggen, A., Ni, Y. (2012). A review on various targeted anticancer therapies. *Target Oncol.* 7, 69-85.
- Liang, C.C., Park, A.Y., Guan, J.L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* 2, 329-333.

- Lieber, M., Todaro, G., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* 17, 62-70.
- Ligozzi, M., Bernini, C., Bonora, M.G., de Fatima, M., Zuliani, J., Fontana, R. (2002). Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1681-1686.
- Linden, L.V.D., Wolthers, K.C., van Kuppeveld, F.J. (2015). Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses* 7, 4529-4562.
- Ling, T.K., Tam, P.C., Liu, Z.K., Cheng, A.F. (2001). Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2964-2966.
- Lipton, S.A. (2006). Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 160-170.
- Liu, C., Eichelberger, M.C., Compans, R.W., Air, G.M. (1995). Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J. Virol.* 69, 1099-1106.
- Liu, J., Obando, D., Liao, V., Lifa, T., Codd, R. (2011). The many faces of the adamantyl group in drug design. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 1949-1963.
- Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Perin, J., Rudan, I., Lawn, J.E., Cousens, S., Mathers, C., Black, R.E. (2015). Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *The Lancet* 385, 430-440.
- Lou, Z., Sun, Y., Rao, Z. (2014). Current progress in antiviral strategies. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 86-102.

- Malešević, N., Srdić, T., Radulović, S., Sladić, D., Radulović, V., Brčeski, I., Anđelković, K. (2006). Synthesis and characterization of a novel Pd(II) complex with the condensation product of 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde and ethyl hydrazinoacetate. Cytotoxic activity of the synthesized complex and related Pd(II) and Pt(II) complexes. *J. Inorg. Biochem.* 100, 1811-1818.
- Manchand, P.S., Cerruti, R.L., Martin, J.A., Hill, C.H., Merrett, J.H., Keech, E., Belshe, R.B., Connell, E.V., Sim, I.S. (1990). Synthesis and antiviral activity of metabolites of rimantadine. *J. Med. Chem.* 33, 1992-1995.
- Mandal, S., Moudgil, M.N., Mandal, S.K. (2009). Rational drug design. *Eur. J. Pharmacol.* 625, 90-100.
- Martin, A., Camacho, M., Portaels, F., Palomino, J.C. (2003). Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob. Agents Ch.* 47, 3616-3619.
- Maurya, M.R., Agarwal, S., Abid, M., Azam, A., Bader, C., Ebel, M., Rehder, D. (2006). Synthesis, characterisation, reactivity and in vitro antiamoebic activity of hydrazone based oxovanadium(IV), oxovanadium(V) and μ -bis(oxo)bis{oxovanadium(V)} complexes. *Dalton T.* 7, 937-947.
- McGuire, J.J. (2003). Anticancer antifolates: current status and future directions. *Curr. Pharm. Design.* 9, 2593-2613.
- McKeage, K. (2009). Memantine, a review of its use in moderate to severe Alzheimer's disease. *CNS Drugs* 23, 881-897.
- Meager, A. (1987). Quantification of interferons by anti-viral assays and their standardization. In: Clemens, M.J., Morris, A.G., Gearing, A.J.H. (Eds.), *Lymphokines and Interferons: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, p. 129.
- Meager, A. (2002). Biological assays for interferons. *J. Immunol. Methods* 261, 21-36.

- Miklášová, N., Fischer-Fodor, E., Lönnecke, P., Schrepler, M.P., Virag, P., Tatomir, C., Cernea, V.I., Hey-Hawkins, E. and Silaghi-Dumitrescu, L. (2009). Antiproliferative effect and genotoxicity of novel synthesized palladium complexes with organoarsenic ligands. *J. Inorg. Biochem.* 103, 1739-1747.
- Milenković, M., Bacchi, A., Cantoni, G., Vilipić, J., Sladić, D., Vujčić, M., Gligorijević, N., Jovanović, K., Radulović, S., Anđelković, K. (2013a). Synthesis, characterization and biological activity of three square-planar complexes of Ni(II) with ethyl (2E)-2-[2-(diphenylphosphino) benzyldene] hydrazinecarboxylate and monodentate pseudohalides. *Eur. J. Med. Chem.* 68, 111-120.
- Milenković, M., Bacchi, A., Cantoni, G., Radulović, S., Gligorijević, N., Arandjelović, S., Sladić, D., Vujčić, M., Mitić, D., Anđelković, K. (2013b). Synthesis, characterisation and biological activity of Co(III) complex with the condensation product of 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde and ethyl carbazate. *Inorg. Chim. Acta* 395, 33-43.
- Milenković, M., Cantoni, G., Bacchi, A., Spasojević, V., Milenković, M., Sladić, D., Krstić, N., Anđelković, K. (2014a). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of Pd(II) and Fe(III) complexes with ethyl (2E)-2-[2-(diphenylphosphino)benzyldene] hydrazinecarboxylate. *Polyhedron* 80, 47-52.
- Milenković, M., Pevec, A., Turel, I., Vujčić, M., Milenković, M., Jovanović, K., Gligorijević, N., Radulović, S., Swart, M., Gruden-Pavlović, M., Adaila, K., Čobeljić, B., Anđelković, K. (2014b). Synthesis, characterization, DFT calculation and biological activity of square-planar Ni(II) complexes with tridentate PNO ligands and monodentate pseudohalides. Part II. *Eur. J. Med. Chem.* 87, 284-297.

- Milenković, M., Pevec, A., Turel, I., Milenković, M., Čobeljić, B., Sladić, D., Krstić, N., Anđelković, K. (2015). Synthesis, crystal structures and antimicrobial activity of square-planar chloride and isocyanate Ni(II) complexes with the condensation product of 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde and Girard's T reagent. *J. Coord. Chem.* 68, 2858-2870, doi: 10.1080/00958972.2015.1055260.
- Monto, A.S. (2003). The role of antivirals in the control of influenza. *Vaccine* 21, 1796-1800.
- Moore, A.E., Sabachewsky, L., Toolan, H.W. (1955). Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.* 15, 598-602.
- Moscona, A. (2005). Neuraminidase inhibitors for influenza. *New Engl. J. Med.* 353, 1363-1373.
- Motswainyana, W.M., Onani, M.O., Madiehe, A.M., Saibu, M., Thovhogi, N., Lalancette, R.A. (2013). Imino-phosphine palladium(II) and platinum(II) complexes: Synthesis, molecular structures and evaluation as antitumor agents. *J. Inorg. Biochem.* 129, 112-118.
- Neu, H.C., Gootz, T.D. (2001). Antimicrobial Chemotherapy. In: Baron, S. (eds.), *Medical Microbiology*. 5th ed. Galvestone. The University of Texas Medical Branch.
- NIBSC (2008). WHO International Standard, 3rd International Standard Anti-Poliovirus serum Types 1, 2 and 3, National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC code: 82/585, Instructions for use, Version 3.0.
- NIBSC (2013). WHO Reference Reagent, 2nd International Reference Reagent 2004 for Live Attenuated Poliovirus (Sabin), National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC code: 02/306, Instructions for use, Version 4.0.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421-5426.

- Oettinger, T., Jørgensen, M., Ladefoged, A., Hasløv, K., Andersen, P. (1999). Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tubercle Lung Dis.* 79, 243-250.
- Olive, P.L., Banáth, J.P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* 1, 23-29.
- Orr, R.M., O'Neill, C.F., Nicolson, M.C., Barnard, C.F.J., Murrer, B.A., Giandomenico, C.M., Vollano, J.F., Harrap, K.R. (1994). Evaluation of novel ammine/amine platinum(IV) dicarboxylates in L1210 murine leukaemia cells sensitive and resistant to cisplatin, tetraplatin or carboplatin. *Brit. J. Cancer* 70, 415-420.
- Paeshuyse, J., Dallmeier, K., Neyts, J. (2011). Ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C virus infection: a review of the proposed mechanisms of action. *Curr. Opin. Virol.* 1, 590-598.
- Palomino, J.C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., Portaels, F. (2002). Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Ch.* 46, 2720-2722.
- Pankey, G.A., Sabath, L.D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* 38, 864-870.
- Park, S.H., Lee, J.H., Berek, J.S., Hu, M.C.T. (2014). Auranofin displays anticancer activity against ovarian cancer cells through FOXO3 activation independent of p53. *Int. J. Oncol.* 45, 1691-1698.
- Parsons, C.G., Danysz, W., Quack, G. (1999). Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist – A review of preclinical data. *Neuropharmacology* 38, 735-767.

- Patole, J., Sandbhor, U., Padhye, S., Deobagkar, D.N., Anson, C.E., Powell, A. (2003). Structural chemistry and *in vitro* antitubercular activity of acetylpyridine benzoyl hydrazone and its copper complex against *Mycobacterium smegmatis*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 13, 51-55.
- Peters, G.J., Backus, H.H.J., Freemantle, S., Van Triest, B., Codacci-Pisanelli, G., Van der Wilt, C.L., Smid, K., Lunec, J., Calvert, A.H., Marsh, S., McLeod, H.L., Bloemena, E., Meijer, S., Jansen, G., van Groeningen, C.J., Pinedo, H.M. (2002). Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. BBA-Mol. Basis Dis. 1587, 194-205.
- Pickart, L., Goodwin, W.H., Burgua, W., Murphy, T.B., Johnson, D.K. (1983). Inhibition of the growth of cultured cells and an implanted fibrosarcoma by aroylhydrazone analogs of the Gly-His-Lys-Cu(II) complex. Biochem. Pharmacol. 32, 3868-3871.
- Prayong, P., Barusrux, S., Weerapreeyakul, N. (2008). Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. Fitoterapia 79, 598-601.
- Prelog, V., Seiwerth, R. (1941). Über die Synthese des Adamantans. Berichte 74, 1644–1648.
- Rabik, C.A., Dolan, M.E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. Cancer Treat. Rev. 33, 9-23.
- Radulović, V., Bacchi, A., Pelizzi, G., Sladić, D., Brčeski, I., Andjelković, K. (2006). Synthesis, structure, and antimicrobial activity of complexes of Pt(II), Pd(II), and Ni(II) with the condensation product of 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde and semioxamazine. Monatsh Chem. 137, 681-691.
- Rebucci, M., Michiels, C. (2013). Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. Biochem. Pharmacol. 85, 1219-1226.

- Rixe, O., Ortuzar, W., Alvarez, M., Parker, R., Reed, E., Paull, K., Fojo, T. (1996). Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem. Pharmacol.* 52, 1855-1865.
- Rogolino, D., Carcelli, M., Bacchi, A., Compari, C., Contardi, L., Fisicaro, E., Gatti, A., Sechi, M., Stevaert, A., Naesens, L. (2015). A versatile salicyl hydrazonic ligand and its metal complexes as antiviral agents. *J. Inorg. Biochem.* 150, 9-17.
- Rosenberger, A., Rössler, U., Hornhardt, S., Sauter, W., Bickeböller, H., Wichmann, H.E., Gomolka, M. (2011). Validation of a fully automated COMET assay: 1.75 million single cells measured over a 5 year period. *DNA Repair* 10, 322–337.
- Rosenthal, K.S., Sokol, M.S., Ingram, R.L., Subramanian, R., Fort, R.C. (1982). Tromantadine: inhibitor of early and late events in herpes simplex virus replication. *Antimicrob. Agents Ch.* 22, 1031-1036.
- Sadler, A.J., Williams, B.R. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 559-568.
- Safrin, S. (2009). Antiviral Agents. In: Katzung, B.G., Trevor, A.J. (ed) *Basic and Clinical Pharmacology*. 13th ed. McGraw-Hill Medical Publishing, NY, USA.
- Scherm, A., Peteri, D. (1971). Antiviral 1 (aminoethoxyacetyl amino)adamantanes. *Chem. Abstr.* 74, 99516.
- Silverman, R.H. (2007). Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and Rnase L during the interferon antiviral response. *J. Virol.* 81, 12720-12729.
- Simić, V., Kolarević, S., Brčeski, I., Jeremić, D., Vuković-Gačić, B. (2016). Cytotoxicity and antiviral activity of palladium(II) and platinum(II) complexes with 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde 1-adamantoylhydrazone. *Turk. J. Biol.* 40: doi:10.3906/biy-1503-23.
- Simon, T.M., Kunishima, D.H., Vibert, G.J., Lorber, A. (1981). Screening trial with the coordinated gold compound auranofin using mouse lymphocytic leukemia P388. *Cancer Res.* 41, 94-97.

- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- Sondhi, S.M., Dinodia, M., Kumar, A. (2006). Synthesis, anti-inflammatory and analgesic activity evaluation of some amidine and hydrazone derivatives. *Bioorgan. Med. Chem.* 14, 4657-4663.
- Sova, P., Mistr, A., Kroutil, A., Semerád, M., Chlubnová, H., Hrusková, V., Chládkova, J., Chládek, J. (2011). A comparative study of pharmacokinetics, urinary excretion and tissue distribution of platinum in rats following a single-dose oral administration of two platinum(IV) complexes LA-12 (OC-6-43)-bis (acetato)(1-adamantylamine) amminedichloroplatinum(IV) and satraplatin (OC-6-43)-bis (acetato) amminedichloro (cyclohexylamine) platinum(IV). *Cancer Chemoth. Pharm.* 67, 1247-1256.
- Spano, R., Linari, G., Marri, R. (1970). 1-Adamantanecarboxylic acid amide of 4-aminoantipyrine. *J. Med. Chem.* 13, 554-554.
- Stager, C.E., Davis, J.R. (1992). Automated systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 302-327.
- Stewart, D.J. (2007). Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 63, 12-31.
- Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* A-3B.
- Swift, L.H., Golsteyn, R.M. (2014). Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 3403-3431.
- Syed Abdul Rahman, S.N., Abdul Wahab, N., Abd Malek, S.N. (2013). *In vitro* morphological assessment of apoptosis induced by antiproliferative constituents from the rhizomes of *Curcuma zedoaria*. *Evid.-Based Compl. Alt.* 2013.

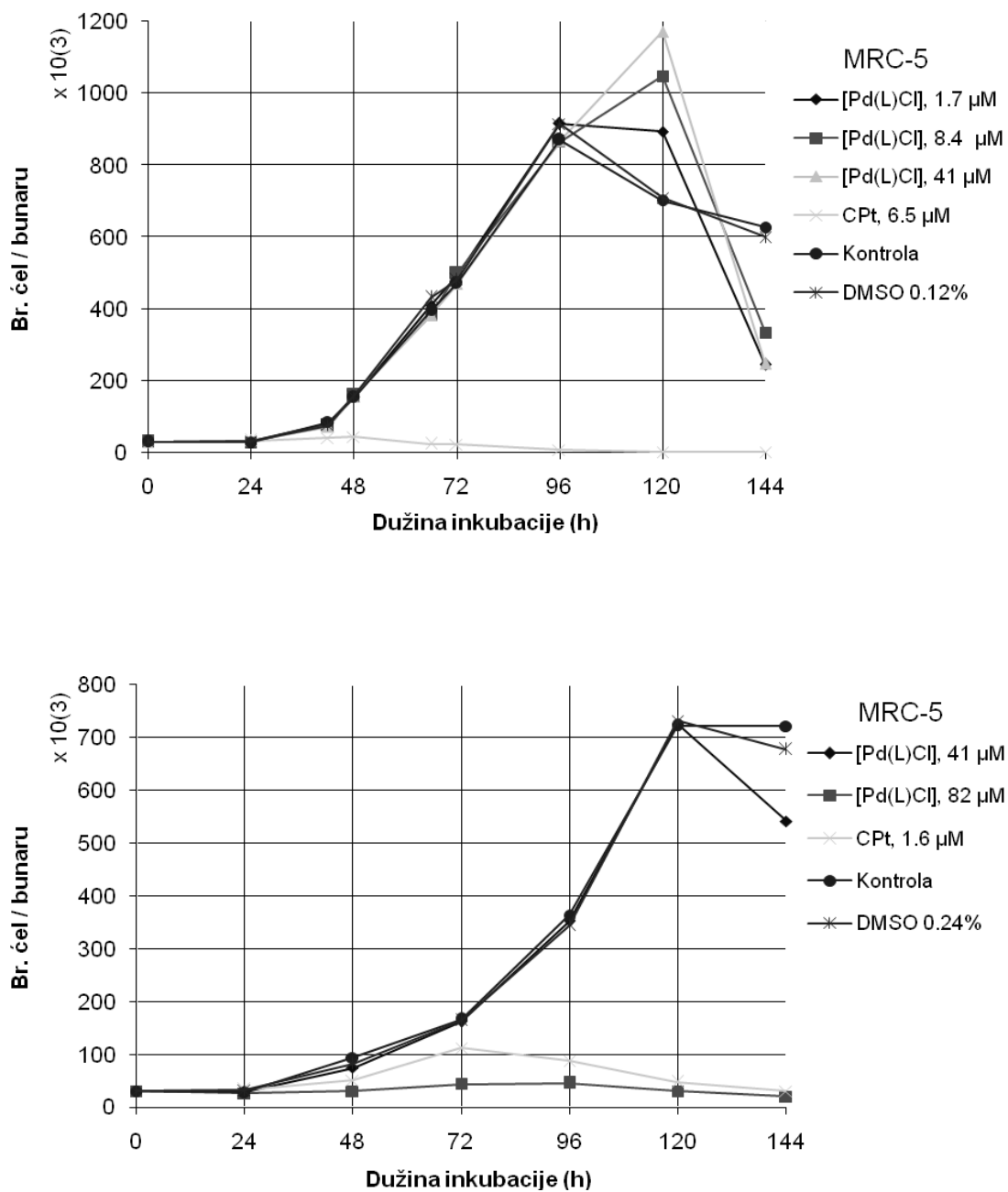
- Šmidling, D., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Simić, D., Knežević-Vukčević, J. (2008). Evaluation of antiviral activity of fractionated extracts of sage *Salvia officinalis* L. (*Lamiaceae*). Arch. Biol. Sci. 60, 421-429.
- Takaoka, A., Hayakawa, S., Yanai, H., Stoiber, D., Negishi, H., Kikuchi, H., Sasaki, S., Imai, K., Shibue, T., Honda, K., Taniguchi, T. (2003). Integration of interferon- α/β signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. Nature 424, 516-523.
- Taneja, N.K., Tyagi, J.S. (2007). Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. J. Antimicrob. Chemoth. 60, 288-293.
- Temesgen, Z., Siraj, D.S. (2008). Raltegravir: first in class HIV integrase inhibitor. Ther. Clin. Risk Manag. 4, 493-500.
- Tennant, R.W., Margolin, B.H., Shelby, M.D., Zeiger, E., Haseman, J.K., Spalding, J., Caspary, V., Resnick, M., Stasiewicz, S., Minor, R., Anderson, B. (1987). Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. Science 236, 933-941.
- Tetko, I.V., Jaroszewicz, I., Platts, J.A., Kuduk-Jaworska, J. (2008). Calculation of lipophilicity for Pt(II) complexes: experimental comparison of several methods. J. Inorg. Biochem. 102, 1424-1437.
- Thomas, H., Foster, G., Platis, D. (2003). Mechanisms of action of interferon and nucleoside analogues. J. Hepatol. 39, 93-98.
- Thorburn, A.L. (1983). Paul Ehrlich: pioneer of chemotherapy and cure by arsenic (1854-1915). Brit. J. Vener. Dis. 59, 404-405.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, R.C., Sasaki, Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 35, 206-221.

- Togo, Y., Hornick, R.B., Dawkins, A.T. (1968). Studies on induced influenza in man: I. Double-blind studies designed to assess prophylactic efficacy of amantadine hydrochloride against A₂/Rockville/1/65 strain. *J. Am. Med. Assoc.* 203, 1089-1094.
- Tsai, C.M., Chang, K.T., Wu, L.H., Chen, J.Y., Gazdar, A.F., Mitsudomi, T., Chen, M.H., Perng, R.P. (1996). Correlations between intrinsic chemoresistance and HER-2/neu gene expression, p53 gene mutations, and cell proliferation characteristics in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 56, 206-209.
- Ulukaya, E., Ari, F., Dimas, K., Sarimahmut, M., Guney, E., Sakellaridis, N., Yilmaz, V.T. (2011). Cell death-inducing effect of novel palladium(II) and platinum(II) complexes on non-small cell lung cancer cells in vitro. *J. Cancer Res. Clin.* 137, 1425-1434.
- Van Derpoorten, K., Balzarini, J., De Clercq, E., Poupert, J.H. (1997). Anti-HIV activity of N-1-adamantyl-4-aminophthalimide. *Biomed. Pharmacother.* 51, 464-468.
- Vejselova, D., Kutlu, H.M., Gökhan, K.U.Ş., Kabadere, S., Ruhi, U.Y.A.R. (2014). Cytotoxic and apoptotic effects of ceranib-2 offering potential for a new antineoplastic agent in the treatment of cancer cells. *Turk. J. Biol.* 38, 916-921.
- Vejselova, D., Kutlu, H.M. (2015). Inhibitory effects of salicylic acid on A549 human lung adenocarcinoma cell viability. *Turk. J. Biol.* 39, 1-5.
- Wang, L.G., Liu, X.M., Kreis, W., Budman, D.R. (1999). The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemoth. Pharm.* 44, 355-361.
- Wanka, L., Iqbal, K., Schreiner, P.R. (2013). The lipophilic bullet hits the targets: medicinal chemistry of adamantane derivatives. *Chem. Rev.* 113, 3516-3604.
- Wassom, J.S. (1989). Origins of genetic toxicology and the Environmental Mutagen Society. *Environ. Mol. Mutagen.* 14(S16), 1-6.

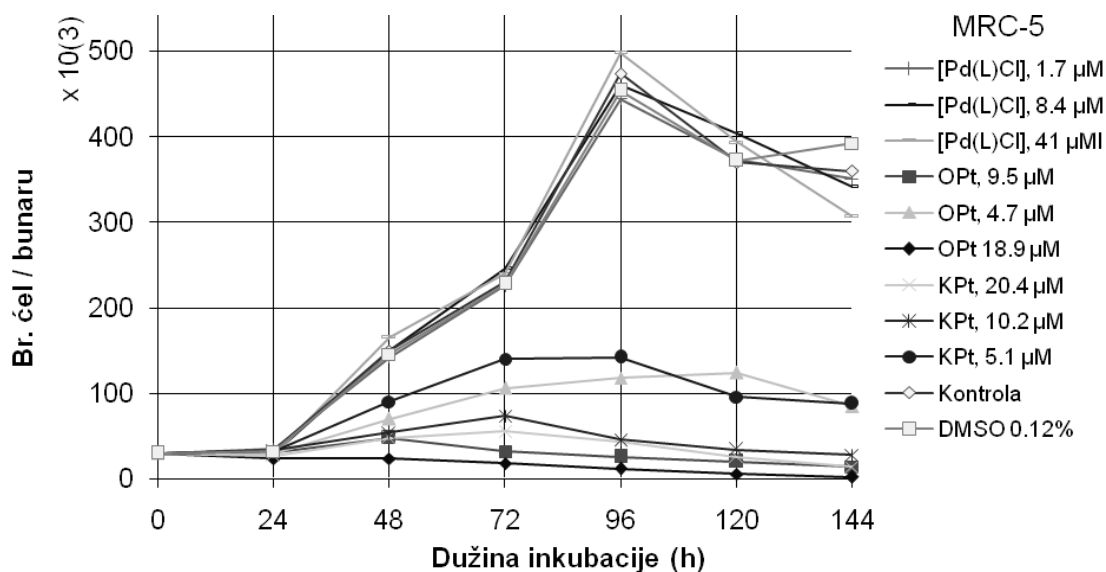
- Wheate, N.J., Walker, S., Craig, G.E., Oun, R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton T.* 39, 8113-8127.
- White, D.O., Fenner, F. (1994). *Medical virology*. 4th ed., San Diego, California. Academic Press.
- WHO (2004). *Polio Laboratory Manual*, 4th edition, WHO/IVB/04.10, Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- WHO (2013). *Global Health Observatory (GHO) data*. Child mortality and causes of death. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- WHO (2014). *Fact Sheet N°310*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO (2015). *Cancer Fact Sheet N°297*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3, 163-175.
- Wilson, J.J., Lippard, S.J. (2013). Synthetic methods for the preparation of platinum anticancer complexes. *Chem. Rev.* 114, 4470-4495.
- Yamazaki, D., Kurisu, S., Takenawa, T. (2005). Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci.* 96, 379-386.
- Zeidan, Y.H., Jenkins, R.W., Hannun, Y. A. (2008). Remodeling of cellular cytoskeleton by the acid sphingomyelinase/ceramide pathway. *J. Cell Biol.* 181, 335-350.
- Zhan, P., Chen, X., Li, D., Fang, Z., Clercq, E., Liu, X. (2013). HIV - 1 NNRTIs: structural diversity, pharmacophore similarity, and implications for drug design. *Med. Res. Rev.* 33, 1-72.

PRILOG

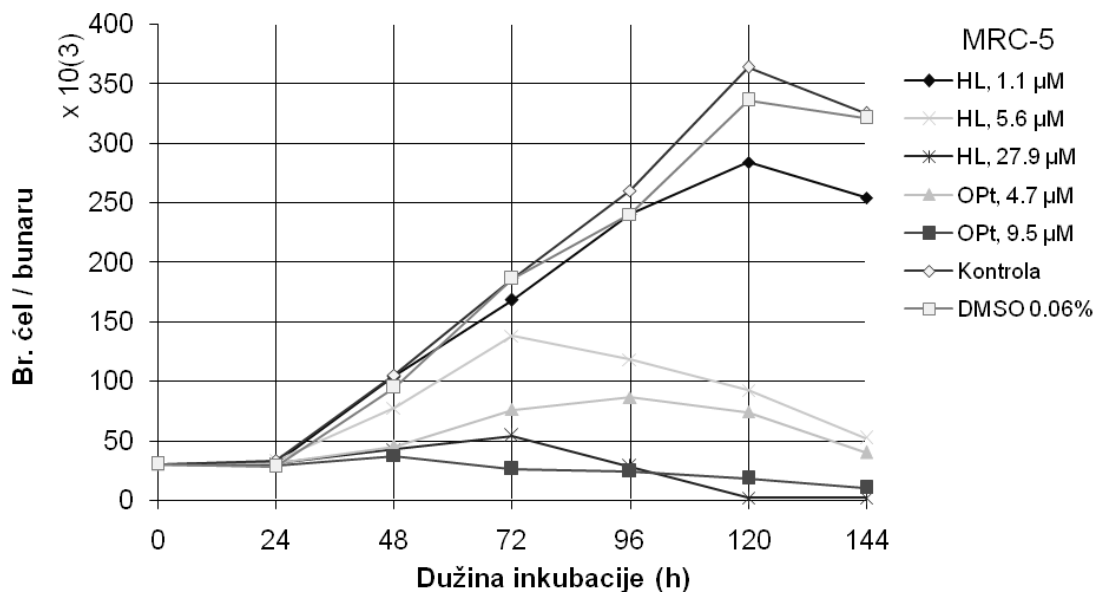
**Krive rasta MRC-5, Hep-2 i A549 ćelija u tretmanima ligandom,
Pd(II) i Pt(II) kompleksom, i model citostaticima cisplatinom,
karboplatinom i oksaliplatinom**



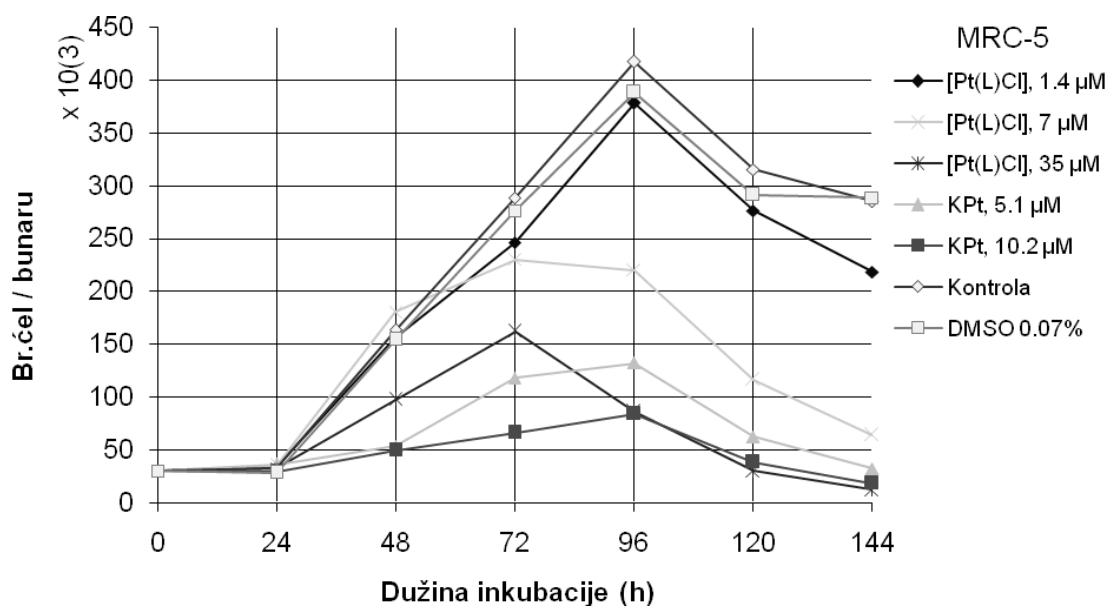
Slika 1. Krive rasta MRC-5 ćelija u tretmanima Pd(II) kompleksom i cisplatinom



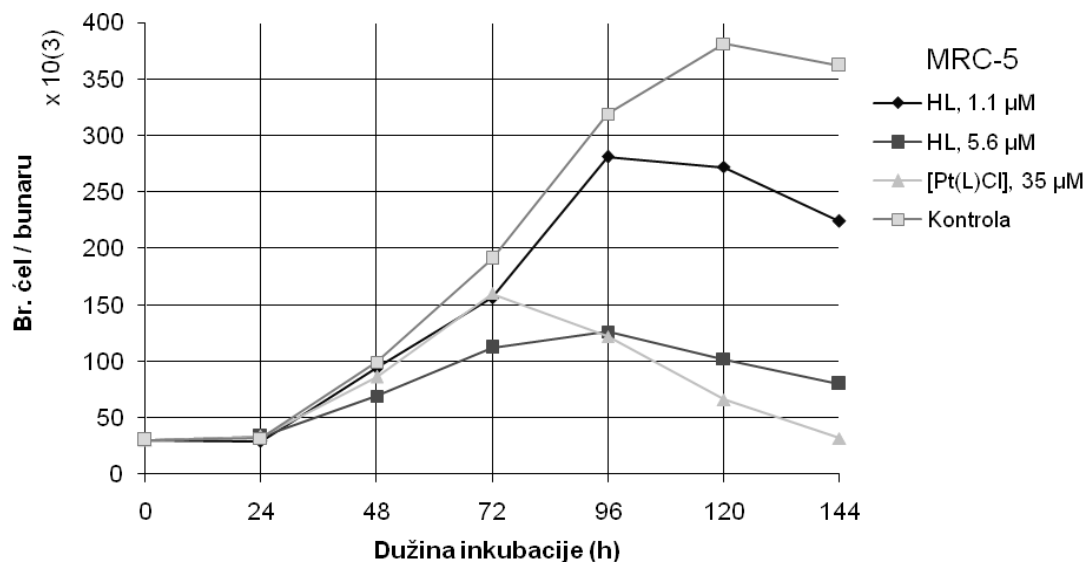
Slika 2. Krive rasta MRC-5 ćelija u tretmanima Pd(II) kompleksom, oksaliplatinom i karboplatinom



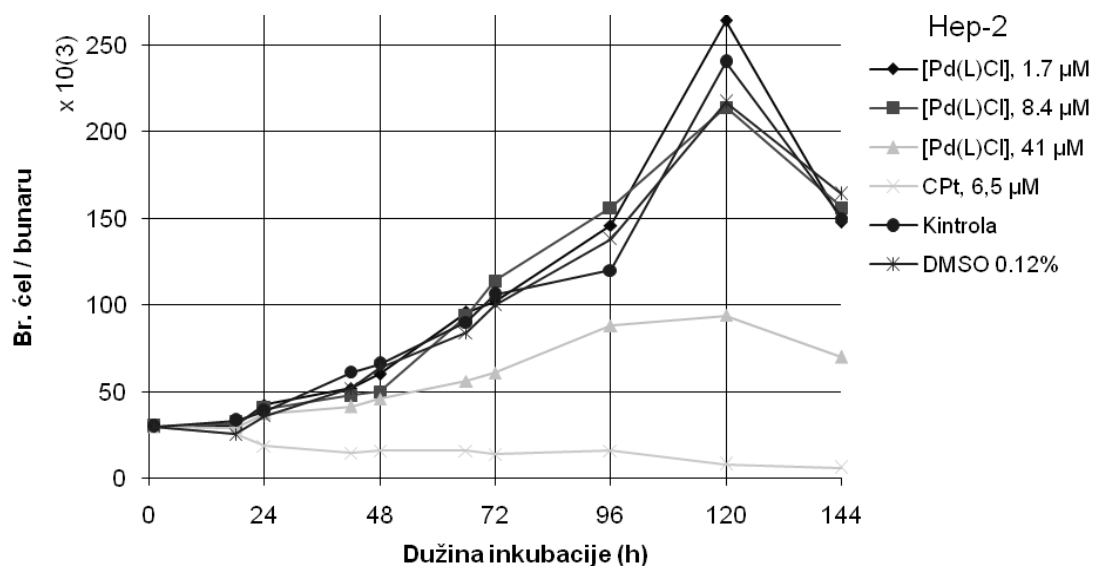
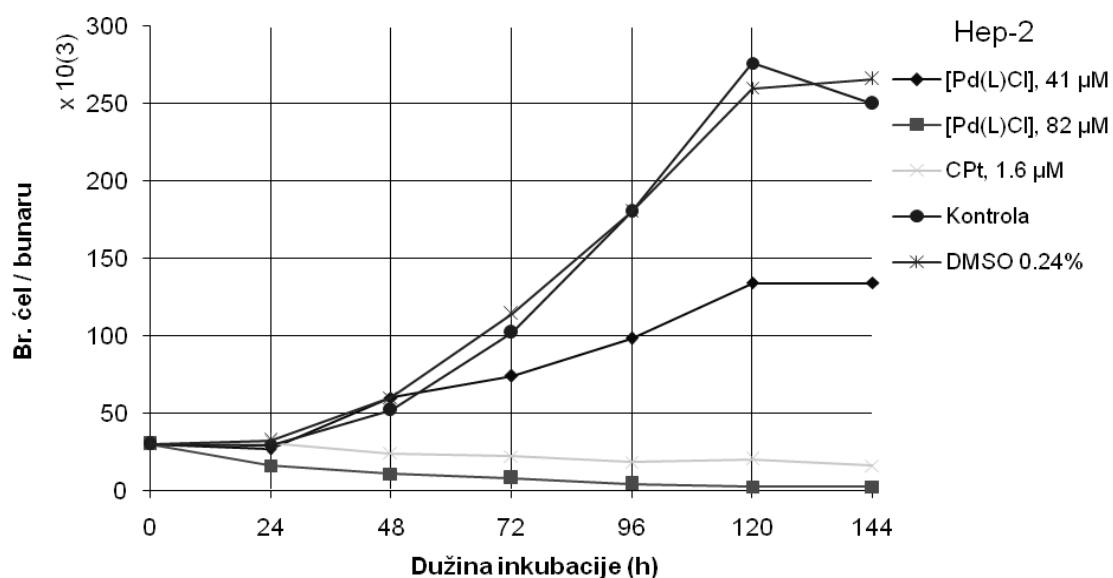
Slika 3. Krive rasta MRC-5 ćelija u tretmanima ligandom i oksaliplatinom



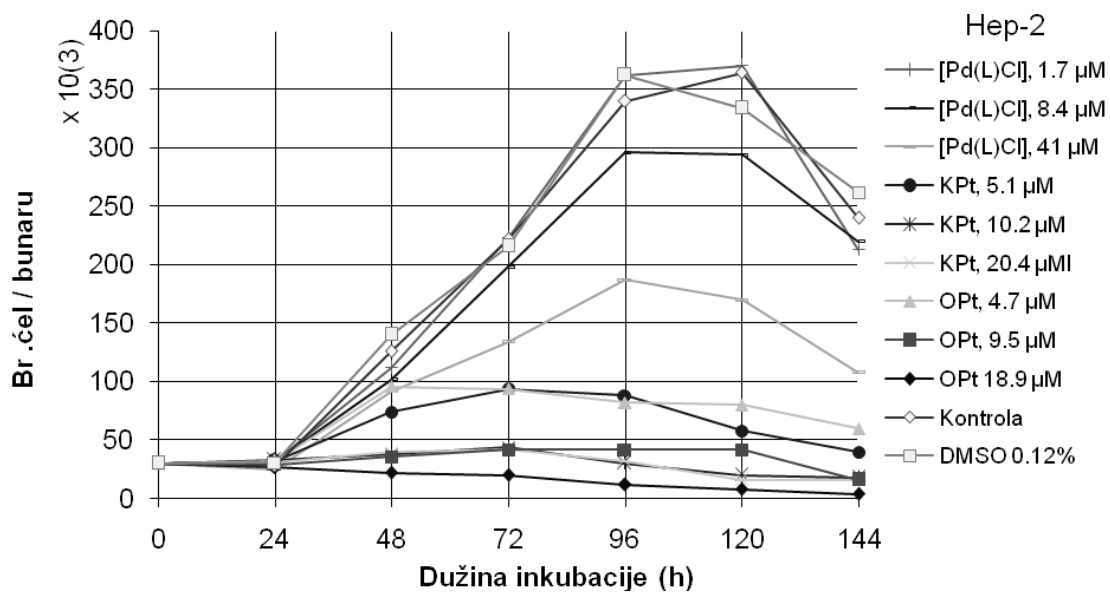
Slika 4. Krive rasta MRC-5 ćelija u tretmanima Pt(II) kompleksom i karboplatinom



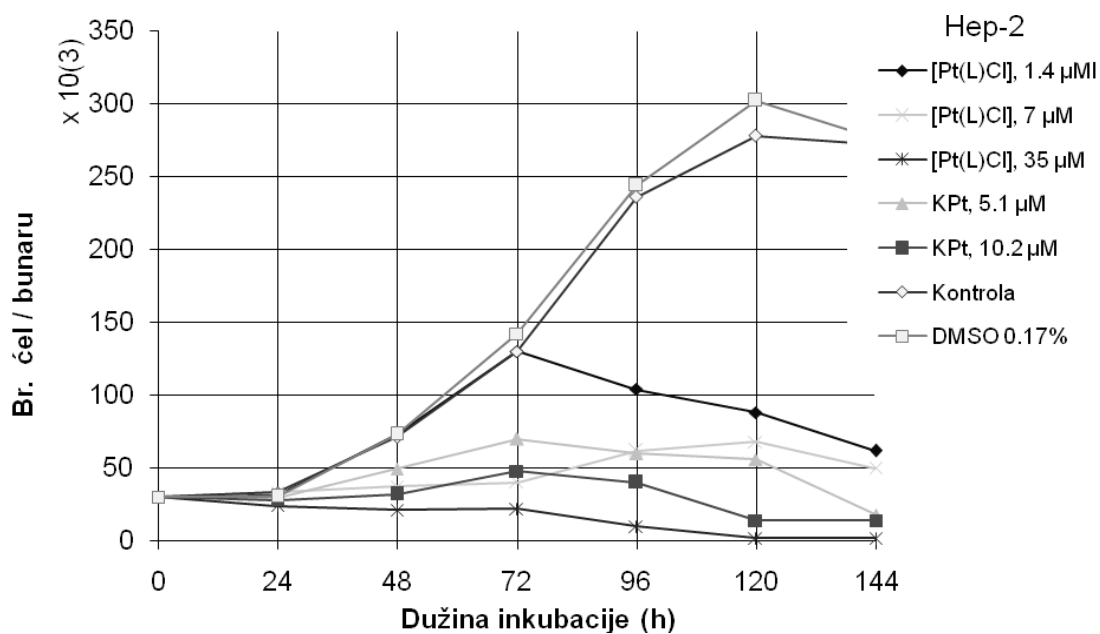
Slika 5. Krive rasta MRC-5 ćelija u tretmanima ligandom i Pt(II) kompleksom



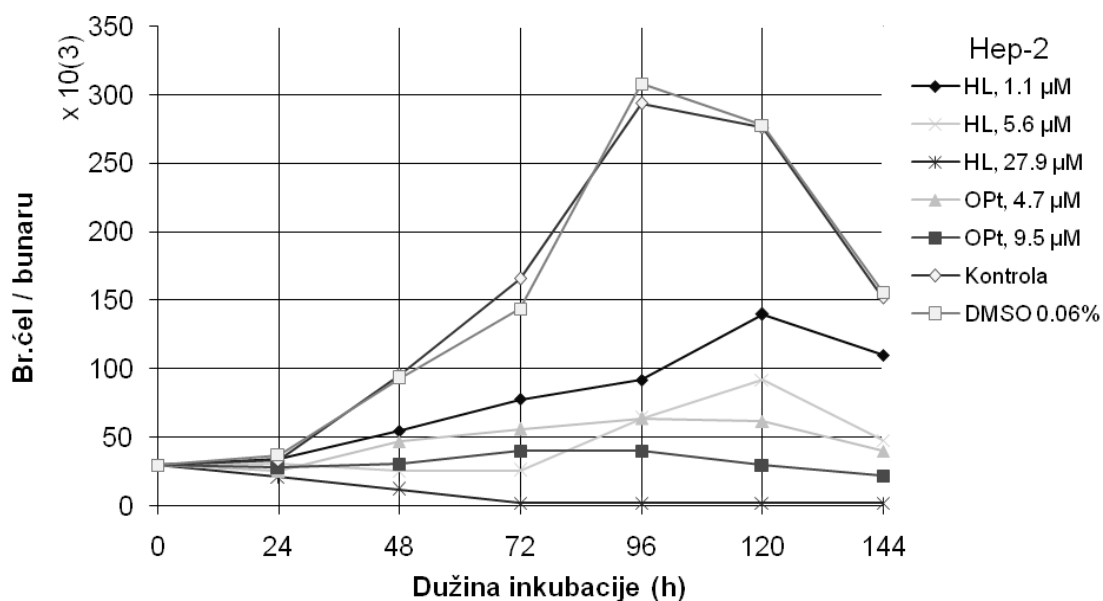
Slika 6. Krive rasta Hep-2 ćelija u tretmanima Pd(II) kompleksom i cisplatinom



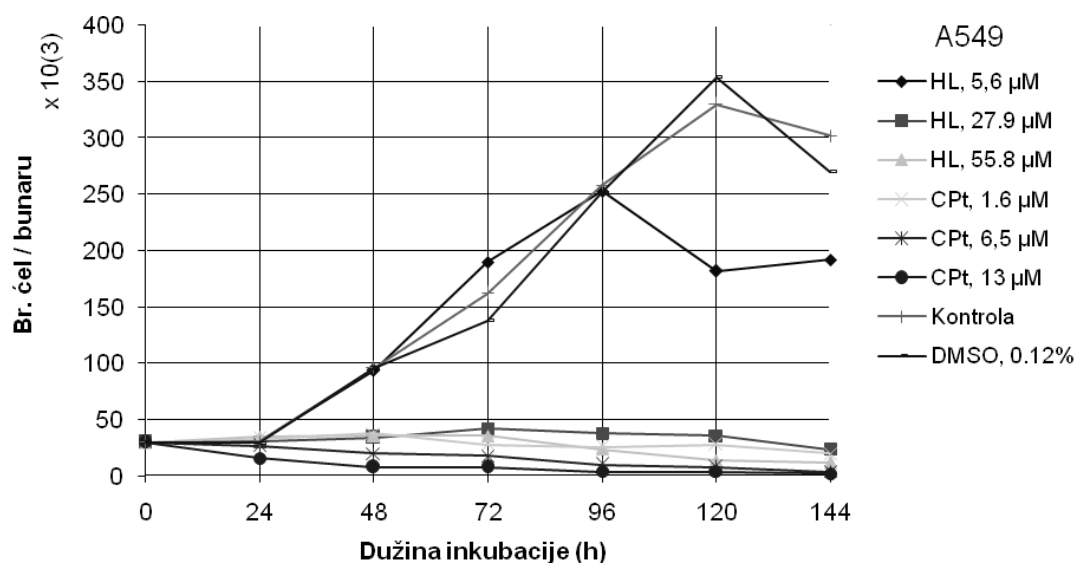
Slika 7. Krive rasta Hep-2 ćelija u tretmanima Pd(II) kompleksom, karboplatinom i oksaliplatinom



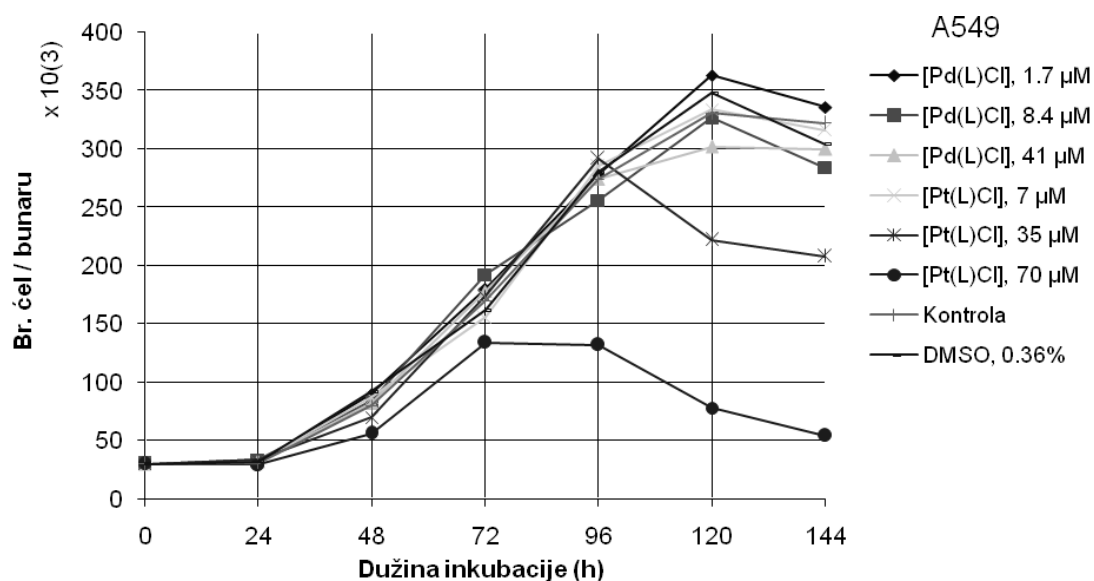
Slika 8. Krive rasta Hep-2 ćelija u tretmanima Pt(II) kompleksom i karboplatinom



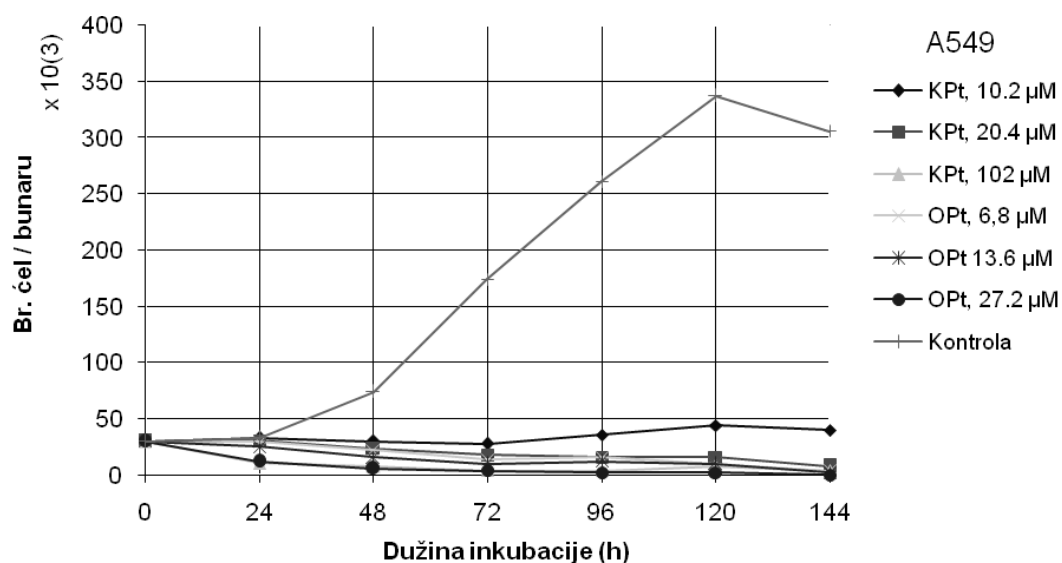
Slika 9. Krive rasta Hep-2 ćelija u tretmanima ligandom i oksaliplatinom



Slika 10. Krive rasta A549 ćelija u tretmanima ligandom i cisplatinom



Slika 11. Krive rasta A549 ćelija u tretmanima Pd(II) i Pt(II) kompleksom



Slika 12. Krive rasta A549 ćelija u tretmanima karboplatinom i oksaliplatinom

Biografija

Vera Simić je rođena 17.01.1974. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i XIV beogradsku gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 1993. godine, a 2001. godine je diplomirala na studijskoj grupi Biologija, sa prosečnom ocenom 8,79 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije na Biološkom fakultetu, modul Mikrobiologija, koji organizuje Katedra za mikrobiologiju, upisala je 2008. godine.

Od 2002. do 2007. godine bila je zaposlena u Institutu za imunologiju, vakcine i serume „Torlak“, na poslovima saradnika u proizvodnji i procesnoj kontroli u Odseku za proizvodnju vakcine protiv gripa. Od 2005. do 2007. godine bila je član stručnog tima za izradu novog pogona za proizvodnju vakcine protiv gripa.

Od 2007. godine zaposlena je u Agenciji za lekove i medicinska sredstva Srbije, gde u Biološkoj laboratoriji Nacionalne kontrolne laboratorije radi na poslovima kontrole kvaliteta lekova, na unapređenju i razvoju bioloških testova za kontrolu farmaceutskih proizvoda, sa posebnim akcentom na laboratorijsku kontrolu kvaliteta i analizu proizvodne dokumentacije pri puštanju u promet serija bioloških lekova – vakcina i derivata ljudske krvi.

Učestvovala je na više stručnih edukacija i konferencija u zemlji i inostranstvu, u organizaciji Evropskog direktorata za kontrolu lekova i zaštitu zdravlja i Svetske zdravstvene organizacije. Bila je predavač po pozivu iz oblasti vakcina na PharmaLab kongresu u Dizeldorfu 2014. godine, u organizaciji European Compliance Academy (ECA).

Do sada je publikovala 2 rada u naučnim časopisima i 5 saopštenja u zbornicima sa naučnih skupova u zemlji i inostranstvu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Вера С. Симић

број индекса Б1002/2008

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Антимикробна, цитотоксична и генотоксична активност новосинтетисаних комплекса паладијума(II) и платине(II) са 2-(дифенилфосфино)бензалдеhid-1-адамантилхидразоном

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

Потпис докторанда

У Београду, 08.02.2016.

V. Simić

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Вера Симић

Број индекса Б1002/2008

Студијски програм биологија

Наслов рада Антимикробна, цитотоксична и генотоксична активност
новосинтетисаних комплекса паладијума(II) и платине(II) са 2-
(дифенилфосфино)бензалдехид-1-адамантоилхидразоном

Ментор Проф. др Бранка Вуковић-Гачић

Потписани/а Вера Симић

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

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 08.02.2016.

V. Simić

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Антимикробна, цитотоксична и генотоксична активност новосинтетисаних комплекса паладијума(II) и платине(II) са 2-(дифенилфосфино)бензалдеhid-1-адамантоилхидразоном

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 08.02.2016.

V. Stanić

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