

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Katarina K. Jovanović

**MOLEKULARNI MEHANIZMI
ANTIPROLIFERATIVNOG DEJSTVA
RUTENIJUM(II)-ARENSKOG KOMPLEKSA
SA IZOHINOLIN-3-KARBOKSILNOM
KISELINOM KAO LIGANDOM U
USLOVIMA *IN VITRO***

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Katarina K. Jovanović

**MOLECULAR MECHANISMS OF THE
ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF
RUTHENIUM(II)-ARENE COMPLEX WITH
ISOQUINOLINE-3-CARBOXYLIC ACID AS
LIGAND UNDER *IN VITRO* CONDITIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Mentori:

Dr Nevenka Gligorijević, naučni saradnik
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Dr Mihailo Jelić, docent
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Član komisije:

Dr Sanja Grgurić Šipka, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

Datum odbrane:

Veliku zahvalnost dugujem mentorki dr Nevenki Gligorijević na svemu što me je naučila tokom mog bavljenja naučno-istraživačnim radom, kao i na tome što me je uvela u izuzetno zanimljivu oblast izučavanja antikancerske aktivnosti organometalnih rutenijumskih kompleksa. Zahvaljujem se mentoru dr Mihailu Jeliću na stručnoj pomoći i vrednim savetima prilikom izrade ove disertacije, kao i prof. Dr Sanji Grgurić Šipki na korisnim sugestijama vezanim za hemiju rutenijumskih kompleksa.

Zahvaljujem se prof. dr Živoslavu Tešiću i dr Ivanki Ivanović jer sam zahvaljujući njima dobila priliku da ispitujem biološku aktivnost rutenijum(II)-arenskog kompleksa.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Siniši Raduloviću, koji mi je omogućio da budem deo izuzetnog naučnog tima na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, i koji je svojim pozitivnim pristupom problematici i smislom za humor uvek doprinio pozitivnoj radnoj atmosferi.

Takođe posebnu zahvalnost dugujem svim koleginicama i kolegama sa odeljenja Eksperimentalne laboratorije, kako na ukazanoj stručnoj pomoći, tako i na pruženoj neizmernoj moralnoj podršci.

Zahvaljujem se svojoj porodici i prijateljima, jer su mi pružali beskonačnu podršku i u najtežim trenucima.

Na kraju, neizmernu zahvalnost dugujem dr Aleksandru Saviću, za svu pruženu ljubav i podršku, i veliki doprinos mom profesionalnom i emotivnom sazrevanju.

Molekularni mehanizmi antiproliferativnog dejstva rutenijum(II)-arenskog kompleksa sa izohinolin-3-karboksilnom kiselinom kao ligandom u uslovima *in vitro*

Rezime

Još od otkrića cisplatine sintetisan je veliki broj kompleksa prelaznih metala, čija je antikancerska aktivnost ispitana. Naročitu pažnju zaslužuju jedinjenja zasnovana na rutenijumu kao metalu koja su pokazala antitumorsku i antimetastatsku aktivnost, sa potencijalnom primenom kod tumora rezistentnih na cisplatinu, ili kao alternative cisplatinu.

Cilj ove disertacije je ispitivanje molekularnih mehanizama antiproliferativne aktivnosti rutenijum(II)-arenskog kompleksa sa izohinolin-3-karboksilnom kiselinom kao ligandom. Rezultati ispitivanja citotoksičnog potencijala sedam novih jedinjenja opšte formule $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{L}^{1-7})\text{Cl}]$ su pokazali da je kompleks sa $\text{L} =$ izohinolin-3-karboksilnom kiselinom (**RuT₇**) u odnosu na ostale komplekse iz serije, ispoljio izraženu citotoksičnu aktivnost, sa IC_{50} vrednostima u opsegu od 18,5 do 84,2 μM . Ovaj kompleks je pokazao dva puta veću aktivnost na HeLa ćelijama nego na normalnoj ćelijskoj liniji MRC-5, što potvrđuju i IC_{50} vrednosti određene nakon inkubacionog perioda od 48 h ($45,4 \pm 3,0$ i $84,2 \pm 5,7 \mu\text{M}$). Analiza ćelijskog ciklusa HeLa ćelija koje su tretirane **RuT₇** kompleksom pokazala je zaustavljanje ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa, kao i povećanje broja ćelija u sub-G1 populaciji. Aneksin V-FITC/PI esej, kao i morfološka analiza ćelija na fluorescentnom mikroskopu, pokazali su da ispitivano jedinjenje ima potencijal indukcije apoptoze. Ispitivanje akumulacije rutenijuma unutar ćelija je pokazalo prisustvo rutenijuma u ćelijskoj unutrašnjosti nakon 6 h inkubacije (8,9 ng Ru/10⁶ ćelija). U cilju detaljnog ispitivanja mehanizma dejstva **RuT₇** kompleksa na HeLa ćelijama, urađena je mikroerej analiza promena u genskoj ekspresiji na celom transkriptomu HeLa ćelija. Analiza funkcionalnih kategorija i signalnih i biohemijskih puteva koji se menjaju tokom odgovora HeLa ćelija na tretman **RuT₇** kompleksom je pokazala da se pod uticajem tretmana aktiviraju molekularni mehanizmi koji vode ćelije u apoptozu i to preko unutrašnjeg (mitohondrijskog) signalnog puta. Do aktiviranja mitohondrijskog apoptotskog

puta dolazi usled direktnog vezivanja **RuT₇** kompleksa za DNK molekul, kao i indirektnim oštećenjem DNK usled dejstva reaktivnih kiseoničnih vrsta. Statistička analiza promena u ekspresiji genskih setova uključenih u poznate puteve toksičnosti koje su izazvane lekovima je pokazala manju predviđenu toksičnost **RuT₇** kompleksa u poređenju sa cisplatinom. Sveobuhvatno, dobijeni rezultati predstavljaju osnovu za dalja istraživanja **RuT₇** kompleksa u okviru studija na životinjama i prekliničkim ispitivanjima kao potencijalnog kandidata za hemioterapeutika.

Ključne reči: rutenijum(II)-arenski kompleksi, citotoksičnost, maligne ćelije, ćelijski ciklus, apoptoza, genska ekspresija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Eksperimentalna onkologija

UDK broj: [615.277 : 546.96] : 616 - 006.04 (043.3)

Molecular mechanisms of the antiproliferative activity of ruthenium(II)-arene complex with isoquinoline-3-carboxylic acid as ligand under *in vitro* conditions

Abstract

Since the discovery of cisplatin, many transition metal complexes have been synthesized and assayed for antineoplastic activity. In recent years, ruthenium-based compounds have emerged as promising antitumor and antimetastatic agents with potential uses in platinum-resistant tumors or as alternatives to platinum.

The aim of this thesis was to investigate molecular mechanisms of the antiproliferative activity of ruthenium(II)-arene complex with isoquinoline-3-carboxylic acid as ligand. The results of investigation of the cytotoxic potential of seven new compounds of the general formula $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{L}^{1-7})\text{Cl}]$ showed that the complex with $\text{L} = \text{isoquinoline-3-carboxylic acid}$ (**RuT₇**) was two times as active on HeLa cells compared to normal cell line MRC-5, as indicated by IC_{50} values determined after 48 h of incubation ($45,4 \pm 3,0$ vs. $84,2 \pm 5,7$ μM , respectively). Cell cycle analysis of HeLa cells treated with **RuT₇** showed S phase arrest and an increase in sub-G1 population. The apoptotic potential of the title compound was confirmed with the Annexin V-FITC/PI assay together with a morphological evaluation of cells using fluorescent microscopy. Analysis of the intracellular accumulation of ruthenium showed 8,9 ng Ru/ 10^6 cells after 6 h of incubation. To gain further insight in the molecular mechanism of action of **RuT₇** on HeLa cells, a whole-transcriptome microarray gene expression analysis was performed. Analysis of functional categories and signaling and biochemical pathways associated with the response of HeLa cells to treatment with **RuT₇** showed that it leads the cells through the intrinsic (mitochondrial) apoptotic pathway, via indirect DNA damage due to the action of reactive oxygen species, and through direct DNA binding of **RuT₇**. Statistical analysis for enrichment of gene sets associated with known drug-induced toxicities identified fewer associated toxicity profiles in **RuT₇**-treated cells compared to cisplatin treatment.

Altogether these results provide the basis for further development of **RuT₇** in animal and pre-clinical studies as a potential drug candidate.

Keywords: rutenium(II)-arene complexes, cytotoxicity, malignant cells, cell cycle, apoptosis, gene expression

Scientific field: Biology

Scientific discipline: Experimental oncology

UDC number: [615.277 : 546.96] : 616 - 006.04 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Uzročnici kancera	1
1.2. Patofiziologija kancera	2
1.3. Terapijski pristupi u lečenju kancera.....	5
1.3.1. Hemioterapija	6
1.4. Kompleksi metala sa antitumorskim dejstvom.....	7
1.4.1. Platinski kompleksi i cisplatina	8
1.4.2. Molekularni mehanizmi dejstva cisplatine	10
1.5. Rutenijumski hemioterapeutici	12
1.5.1. Rutenijum(III) kompleksi u kliničkim ispitivanjima.....	13
1.5.2. Rutenijum(II)-arenski kompleksi	15
1.6. Tipovi ćelijske smrti	20
1.6.1. Apoptoza.....	23
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	26
3. MATERIJAL I METODE.....	27
3.1. Hemijske stukture rutenijum(II)-arenskih kompleksa.....	27
3.2. Kulture ćelija	29
3.2.1. Sastav hranljivog medijuma RPMI 1640	31
3.2.2. Priprema RPMI 1640 hranljive podloge.....	32
3.2.3. Sastav hranljivog medijuma DMEM	32
3.2.4. Priprema DMEM hranljive podloge	34
3.2.5. Postupak održavanja kulture ćelija	34

3.2.6. Postupak pasažiranja kultura ćelija.....	35
3.3. Postupak ispitivanja antiproliferativnog potencijala kompleksa rutenijuma(II)	35
3.3.1. Postupak određivanja vijabilnosti ćelija.....	35
3.3.2. Postupak ispitivanja antiproliferativnog potencijala rutenijum(II)-arenskih kompleksa MTT testom.....	36
3.4. Analiza promena distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa pod dejstvom ispitivanog rutenijum(II)-arenskog kompleksa metodom na protočnom citometru.....	40
3.5. Analiza apoptoze bojenjem sa aneksin V-FITC-om i propidijum-jodidom na protočnom citometru	41
3.6. Morfološka analiza ćelijske smrti na fluorescentnom mikroskopu.....	42
3.7. Analiza ukupne intraćelijske akumulacije rutenijuma metodom ICP-MS	44
3.7.1. Priprema uzoraka.....	44
3.7.2. Priprema ćelijskog taloga	44
3.8. Analiza promena u genskoj ekspresiji HeLa ćelija pod uticajem tretmana RuT ₇ kompleksom mikroerej metodom.....	44
3.8.1. Postavka eksperimenta i izolacija RNK	46
3.8.2. Obeležavanje uzoraka i <i>microarray</i> hibridizacija	47
3.8.3. Obrada i analiza podataka.....	48
3.8.4. Funkcionalna analiza lista gena.....	49
4. REZULTATI.....	52
4.1. Citotoksičnost ispitivanih kompleksa.....	52
4.2. Rezultati analize ćelijskog ciklusa.....	55
4.3. Rezultati analize apoptoze	58
4.4. Rezultati morfološke analize ćelijske smrti na fluorescentnom mikroskopu.....	59
4.5. Rezultati analize ukupne intraćelijske akumulacije rutenijuma	60

4.6. Razlike u profilima genske ekspresije HeLa ćelija tretiranih RuT ₇ kompleksom i cisplatinom	62
4.7. Kinetika i funkcionalna analiza promena u genskoj ekspresiji HeLa ćelija indukovanih tretmanom RuT ₇ kompleksom.....	64
4.8. Analiza diferencijalno eksprimiranih gena pomoću Ingenuity Pathway Analysis® (IPA) softvera	67
4.9. Razlike u predviđenim profilima toksičnosti HeLa ćelija indukovanih tretmanom RuT ₇ kompleksom i cisplatinom	68
5. DISKUSIJA.....	69
6. ZAKLJUČAK.....	78
7. LITERATURA	80
8. BIOGRAFIJA AUTORA.....	98

1. UVOD

Kancer je jedan od glavnih uzročnika smrti u svetu, kako u manje ekonomski razvijenim, tako i u ekonomski razvijenijim zemljama. U narednim godinama se očekuje povećanje incidence malignih bolesti u svetu zbog globalnog rasta i starenja populacije, što će posebno biti izraženo u manje razvijenim zemljama, u kojima živi oko 82 % svetskog stanovništva [1]. U 2012. godini zabeleženo je 14,1 miliona novih slučajeva kancera, dok je broj smrtnih slučajeva koji su za uzrok imali kancer bio 8,2 miliona [2].

Termin „kancer“ se upotrebljava za opisivanje preko 200 oboljenja, kojima je zajednička karakteristika nekontrolisan ćelijski rast. Ćelije kancera imaju sposobnost invazije susednih ili udaljenih tkiva u organizmu, preko krvotoka i limfotoka (metastaze). U načelu, jedna mutacija tokom replikacije ćelijske DNK obično nije dovoljna za transformaciju ćelije; niz nezavisnih mutacija u okviru linije proistekle od jedne ćelije je neophodan preduslov za nastanak kancera. Zbog povećanog broja DNK replikacija u okviru potomstva jedne ćelije, tokom starosti nagomilavaju se mutacije i povećava rizik za oboljevanje od raka. Dijagnostifikovanje kancera u fazi ranih mutacionih događaja je vrlo retko, i najčešće se odigrava u podmaklom stadijumu bolesti [3].

1.1. Uzročnici kancera

Za nastanak i razvoj kancera neophodni su mnogobrojni mutacioni događaji, koji za posledicu imaju gubitak kontrole nad transformisanom ćelijom. Do povećanja incidence kancera sa starošću individue dolazi delom zbog nagomilavanja mutacija tokom vremena, a delom zbog oslabljenih efekata molekularnih mehanizama reparacije u ćelijama i imunog sistema [3].

Pored spontanih mutacija koje nastaju tokom replikacije DNK kao posledica grešaka u samim procesima replikacije i reparacije, promene u genetičkom materijalu mogu biti uzrokovane spoljašnjim (sredinskim) faktorima, mutagenima, koji mogu biti:

- Hemijski kancerogeni koji reaguju sa DNK molekulom i modifikuju ga, kao što su arsen, hromati (soli hromatne kiseline), aflatoksin (prirodni

mikotoksini poreklom iz gljiva roda *Aspergillus*), policiklični aromatični ugljovodonici (*eng. Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs*, mogu se naći u velikim količinama u roštiljskom mesu i duvanskom dimu);

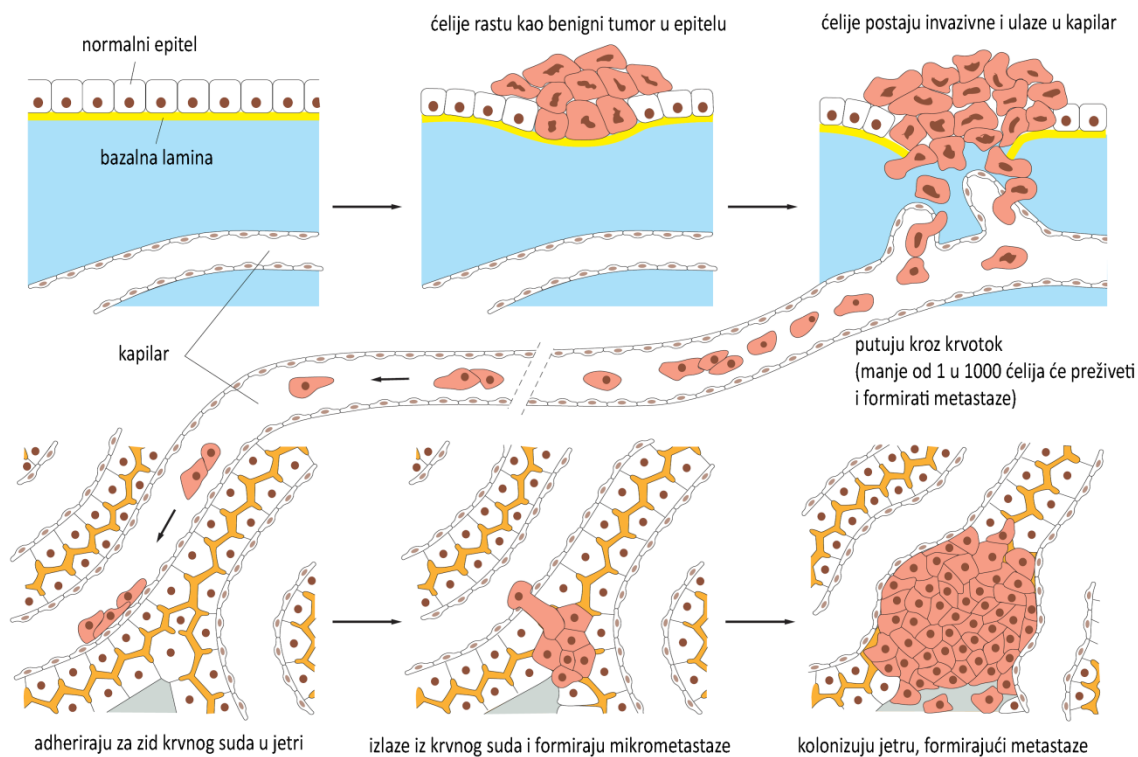
- Fizički kancerogeni, kao što su jonizujuće (uzrokuje hromozomske prekide i rearanžmane) i UV zračenje;
- Biološki kancerogeni, virusi, koji vrše inserciju svog RNK ili DNK genoma u genom domaćina remeteći na taj način njegovo normalno funkcionisanje

Tumorski promotori koji se prirodno nalaze u biljkama i našem organizmu takođe doprinose razvoju kancera, tako što u određenom stadijumu karcinogeneze dodatno stimulišu ćelijske deobe, i tu spadaju forbol estri (poreklom iz biljnih ulja), komponente duvanskog dima i hormoni [4].

1.2. Patofiziologija kancera

Osnovne karakteristike ćelija kancera, koje ih suštinski razlikuju od zdravih ćelija, su:

- Sposobnost nekontrolisane ćelijske deobe – normalne ćelije se mogu podeliti određeni broj puta, nakon čega gube sposobnost deobe, osim u slučaju kada postoji potreba zamene mrtvih ćelija. Nasuprot tome, tumorske ćelije nemaju ograničenja u broju ćelijskih deoba, imaju sposobnost umnožavanja u odsustvu mitotskih signala od drugih ćelija, i ne podležu apoptozi u slučaju oštećenja njihove DNK. Kao posledica ovih aberantnih svojstava dolazi do preteranog rasta ćelija i formiranja benignog tumora (Slika 1), koji se najčešće može hiruški ukloniti.
- Sposobnost invazije na druga tkiva i metastaza – tumor postaje malign onog trenutka kada ćelije otpočnu invaziju na okolna tkiva, zatim migriraju preko krvnog i limfnog sistema i formiraju sekundarne tumore (metastaze, Slika 1) [3].



Slika 1. Višestepeni proces nastanka kancera (modifikovano prema [3])

Kanceri se prema poreklu mogu podeliti na:

- karcinome, poreklom od epitelijalnih ćelija
- sarkome, transformisane ćelije mezenhima (koštana, hrskavičava, mišićna, vaskularna ili hematopoetička tkiva)
- leukemije, kancere krvi ili koštane srži [3, 4].

Ćelje kancera imaju veliki broj karakteristika, koje im omogućavaju kompetitivnu prednost u odnosu na normalne ćelije:

- njihov ćelijski rast, preživljavanje i deoba su nezavisni od signala poreklom od drugih ćelija;
- uspešno izbegavanju apoptozu i prepoznavanje od strane ćelija imunskog sistema;
- imaju sposobnost neograničene proliferacije;

- Poseduju svojstvo invazivnosti zahvaljujući odsustvu molekula za ćelijsku adheziju (kadherini);
- imaju sposobnost preživljavanja i proliferacije u drugim tkivima i formiranja metastaza;
- imaju sposobnost angiogeneze što im obezbeđuje kiseonik i hranljive materije;
- metabolizam im je ograničen najvećim delom na proces glikolize [3, 5, 6].

U osnovi sticanja ovih osobina je genetička nestabilnost koja dovodi do povećanja broja mutacija u određenim genima i inflamacije, što dalje dodatno doprinosi razvoju navedenih karakteristika [6].

Mutacije koje su značajne za proces kancerogeneze uglavnom pogađaju regione proto-onkogeno povećavajući njihovu aktivnost, što za rezultat ima preteranu ekspresiju određenih proteina, ili regione tumor supresora, smanjujući ili potpuno inhibirajući njihovu aktivnost:

- Mutacije u proto-onkogenima dovode do stvaranja onkogeno, koji konstantno šalju abnormalne kontrolne signale i na taj način podstiču nekontrolisanu ćelijsku deobu ili uzrokuju preživljavanje ćelija koje ne bi trebalo da prežive. Primer je ras protein koji učestvuje u aktivaciji faktora rasta. Mutacija u *ras* genu može dovesti do preterane sinteze istoimenog proteina i posledično do abnormalne kontrole ćelijskog ciklusa.
- Tumor supresorski geni u normalnim uslovima štite ćelije od nekontrolisanih deoba. Mutacije u ovim genima mogu ukloniti njihovu zaštitnu ulogu i ovakve ćelije imaju povećan rizik za transformaciju u ćelije kancera. Veliki procenat kancera nastaje kao posledica mutacija u p53 genu. U normalnim ćelijama p53 se aktivira kao odgovor na oštećenja DNK molekula, nakon čega dolazi do sinteze p53 proteina koji zaustavlja ćelijski ciklus sve dok se oštećenja ne isprave. U slučaju da oštećenja DNK molekula ne mogu biti ispravljena, uključuje se apoptotski put, vodeći na taj način ćeliju u kontrolisanu smrt. U

odsustvu funkcionalnog p53 gena, ćelija ne dobija signale za zaustavljanje ćelijskog ciklusa i ulazak u apoptozu, i takva ćelija sa neispravljenim oštećenjima na molekulu DNK nastavlja da se deli [3, 4].

1.3. Terapijski pristupi u lečenju kancera

Zbog velike raznovrsnosti u tipovima kancera, postoje različiti terapijski pristupi u lečenju malignih bolesti, koji takođe zavise i od stadijuma bolesti, lokacije tumorskog tkiva kao i od opšteg zdravstvenog stanja pacijenta. U savremenoj medicini se najčešće koriste sledeći vidovi lečenja:

1. Hiruško uklanjanje tumorskog tkiva, koje predstavlja osnovni pristup u lečenju kancera. Na ovaj način veličina tumora se redukuje pre početka primene terapije ili se tumor u potpunosti uklanja.
2. Terapija zračenjem, koja predstavlja primenu jonizujućeg zračenja iz eksternog ili internog izvora (brahiterapija) u cilju smanjenja ili potpune redukcije tumora. Zračenje uzrokuje nepopravljiva oštećenja na DNK molekulu koja dovode do apoptoze tretiranih ćelija. Ovaj metod lečenja nosi sa sobom ozbiljne neželjene efekte, jer jonizujuće zračenje podjednako oštećuje kako tumorske tako i normalne ćelije, dovodeći do oštećenja epitela, oticanja mekih tkiva i sterilnosti.
3. Hemioterapija, predstavlja tretman citotoksičnim antineoplastičnim agensima koji ometaju replikaciju DNK malignih ćelija i primoravaju ih u apoptozu. Zbog odsustva selektivnosti prema malignim ćelijama, zdrave ćelije su takođe pogođene tretmanom, što izaziva ozbiljne toksične efekte kao što su nefro- i hepatotoksičnost (oštećenja bubrega i jetre), imuno- i mijelosupresija i opadanje kose.
4. Imunoterapija predstavlja relativno nov pristup u lečenju kancera koji se zasniva na stimulaciji imunskog sistema pacijenta injektiranjem mrtvih tumorskih ćelija, tumorskih antigena ili interferona i citokina.

5. Hormonska terapija, zasniva se na činjenici da su neki tipovi tumora osetljivi na određene hormone (npr. estrogen-zavisni rak dojke), čije se dejstvo u organizmu može blokirati primenom lekova koji inhibiraju sintezu ili aktivnost ovih hormona.

Krajni cilj terapije protiv kancera je kompletno uklanjanje tumora i potencijalnih metastaza. U cilju postizanja maksimalne uspešnosti terapije, uobičajena je praksa kombinovanja dva ili više metoda lečenja, ili kombinovana upotreba hemioterapeutskih agenasa koji se dopunjuju (kombinovana terapija) [7].

1.3.1. Hemioterapija

Hemioterapeutici su svrstani u sledeće kategorije prema svojoj strukturi i mehanizmu dejstva:

- Alkilirajući agensi, narušavaju normalnu ćelijsku funkciju alkilacijom DNK, RNK i proteina, i na taj način inhibiraju replikaciju. Primeri alkilirajućih agenasa su triazini, azotni iperiti, alkil sulfonati i nitrozouree;
- Lekovi koji sadrže jone metala, koji u zavisnosti od svoje strukture imaju različite mehanizme delovanja. Najpoznatiji iz ove kategorije su svakako platina(II) kompleksi cisplatina, karboplatina i oksaliplatina, za koje je poznato da izazivaju strukturne promene na molekulu DNK kovalentnim vezivanjem metalnog centra, što vodi ćeliju u smrt;
- Antimetaboliti, koji zamenjuju ili su u konkurenciji sa biomolekulima uključenim u sintezu DNK i RNK, i na taj način menjaju suštinski važne puteve sinteze nukleotida. Primeri su analozi folne kiseline, purina i pirimidina (npr. 5-fluorouracil);
- Inhibitori topoizomeraza, vrlo bitnih enzima koji održavaju topologiju i integritet DNK molekula. Inhibicija topoizomeraza ometa ključne korake u održavanju i propagaciji genetičkog materijala, kao što su replikacija, transkripcija, translacija i rekombinacija. Primeri za inhibitore topoizomeraza su etopozidi.

Ostali pristupi u lečenju kancera obuhvataju primenu antitumorskih antibiotika, hormonskih inhibitora, inhibitora mitoze, monoklonska antitela, inhibitore enzima i signalne transdukcije. Neki od najnovijih terapijskih pristupa su upotreba nanočestica [8], zatim ciljane terapije, kao i genske terapije (blokira ekspresiju onkogeni, a čak može zameniti nefunkcionalne ili nedostajuće tumor-supresorske gene) [9]. Nanočestice (veličine u nanometarskom opsegu) funkcionišu kao nosači leka, na kojima je moguće izvršiti različite modifikacije tako da ispoljavaju afinitet za tumorsku mikrosredinu, zatim da se ciljano vezuju za membrane ćelija kancera, kao i za receptore koji se nalaze u citoplazmi i jedru ćelija kancera [10].

1.4. Kompleksi metala sa antitumorskim dejstvom

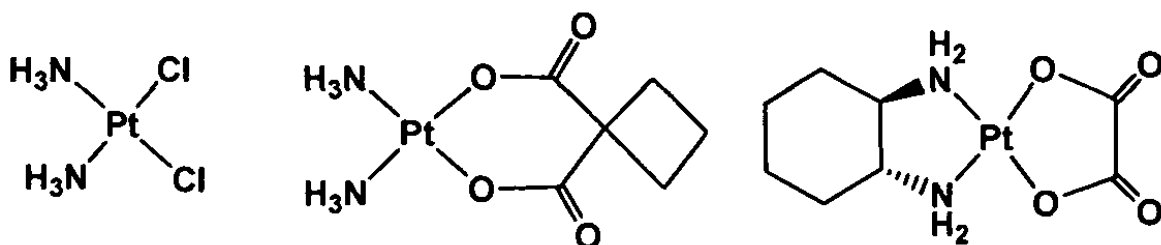
Metali imaju važnu ulogu u živim sistemima jer učestvuju u različitim biološkim procesima. Na primer, gvožđe koje se nalazi u sastavu molekula hemoglobina učestvuje u procesu transporta kiseonika, cink je sastavni deo proteina sa domenom cinkanih prstiju i prirodna je komponenta insulina. Takođe, gvožđe, nikel, mangan, bakar i magnezijum su katalitički aktivna mesta u metaloenzimima. I pored toga što se sa upotrebom metala u medicinske svrhe počelo pre oko 5000 godina [11], na farmaceutskom tržištu su oduvek dominirale supstance organskog porekla. Međutim, poslednjih 50-ak godina bioneorganska hemija postaje sve važnija grana medicinske hemije, jer je doprinela razvoju novih lekova sa potpuno novim mehanizmima dejstva i omogućila lečenje oboljenja koja su se smatrala neizlečivim [12]. U prvoj polovini XX veka je Pol Erlih, koji se smatra osnivačem hemioterapije, zajedno sa Sahakirom Hatom razvio supstancu pod imenom Salvarsan koja je sadržala arsen, i koja se uspešno koristila za lečenje sifilisa [11]. Interesovanje naučnika za medicinsku neorgansku hemiju je konačno podstaknuto otkrićem pozitivnih terapeutskih svojstava cisplatine, koja danas predstavlja jednu od najčešće primenjivanih anti-kancerskih lekova [12].

1.4.1. Platinski kompleksi i cisplatina

Antitumorska aktivnost cisplatine (*cis*-diamindihloroplatina(II), *cis*-DDP, CDDP) (Slika 2) je otkrivena od strane Barneta Rozenberga krajem 60-ih godina prošlog veka, a odobrena je za upotrebu 1978. godine od strane Uprave za hranu i lekove (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) [13]. Danas se široki spektar tumora uspešno leči cisplatinom, uključujući kancer testisa, jajnika, pluća, cerviksa, endometrijuma, bešike i ezofagusa. Cisplatina se daje intravenoznim putem, rastvorena u rastvoru natrijum hlorida, a aktivira se intracelularno, zamenom hloridnih odlazećih grupa molekulima vode. Pretpostavlja se da ovo jedinjenje ulazi u ćeliju pasivnom difuzijom [14] i aktivnim transportom preko proteina za transport bakra [15]. U ćeliji dovodi do oštećenja na molekulu DNK koordinativnim vezivanjem metala za N7 atom purinskih nukleotida, izazivajući apoptozu ćelija [14].

Veliki naponi su učinjeni na polju razvoja novih derivata cisplatine koji bi imali bolja farmakološka svojstva, ali su se za sada jedino karboplatina i oksaliplatina pokazale uspešnim citostaticima.

Karboplatina (*cis*-diamino(1,1-ciklobutandikarboksilato)platina(II)) ispoljava značajno manje toksičnih efekata od cisplatine (Slika 2) i upotrebljava se kao standardna terapija kod kancera jajnika, a takođe se često primenjuje i kod krupnoćelijskog i sitnoćelijskog kancera pluća.



Slika 2. Platinski kompleksi cisplatina, karboplatina i oksaliplatina

Treći platinski kompleks koji je u svetu u kliničkoj upotrebi [16], oksaliplatina ([*(1R,2R)*-diaminocikloheksan]oksalatoplatina(II)) (Slika 2), je efikasna u lečenju uznapredovalog kolorektalnog karcinoma, gde su se cisplatina i karboplatina pokazale neefikasnim [14].

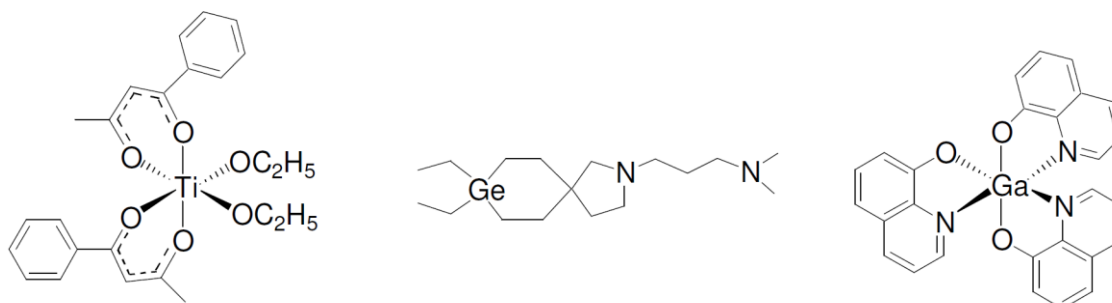
Uprkos značajnom antitumorskom potencijalu platinskih kompleksa treba imati na umu veliki broj toksičnih efekata koje izazivaju, kao što su nefro- i neurotoksičnost, ototoksičnost, mučninu i povraćanje [13]. Takođe, javlja se i primarna ili stečena rezistencija tumora na tretman, što zajedno sa toksičnim efektima smanjuje efikasnost ove klase jedinjenja [17].

U cilju pravazilaženja navedenih negativnih svojstava u primeni platinskih hemioterapeutika, pristupilo se razvoju novih jedinjenja sa različitim mehanizmima dejstva, većom selektivnošću prema tumorskim ćelijama i posledično nižom toksičnosti za organizam.

Neorganska jedinjenja Trisenox[®] (As₂O₃) [18] i galijum(III) nitrat [19, 20] su već odobrena u terapiji kancera za lečenje akutne promijelocitne leukemije i hiperkalcemije kao posledice kancera [21].

Butotitan (*cis*-dietoksibis(1-fenilbutan-1,3-dionato-κ²O¹,O²)titanijum(IV), Slika 3) je bio među prvim neplatinskim antitumorskim agensima koji je ušao u kliničke studije, ali je njegovo ispitivanje prekinuto nakon faze I, dok je titanocen dihlorid, koji je bio prvi organometalni kompleks u kliničkim ispitivanjima, napušten u fazi II studija jer nisu primećene prednosti ove terapije u odnosu na ostale terapijske pristupe [21, 22].

Dva jedinjenja germanijuma, germanijum-132 (karboksietilgermanijum seskvioksid) i spirogermanijum (*N*-(3-dimetilaminopropil)-2-aza-8,8-dietil-8-germaspiro-4,5-dekan dihidrohlorid, Slika 3), su dospela do faze II kliničkih studija, ali su takođe odbačena, bez jasno navedenog razloga [21].



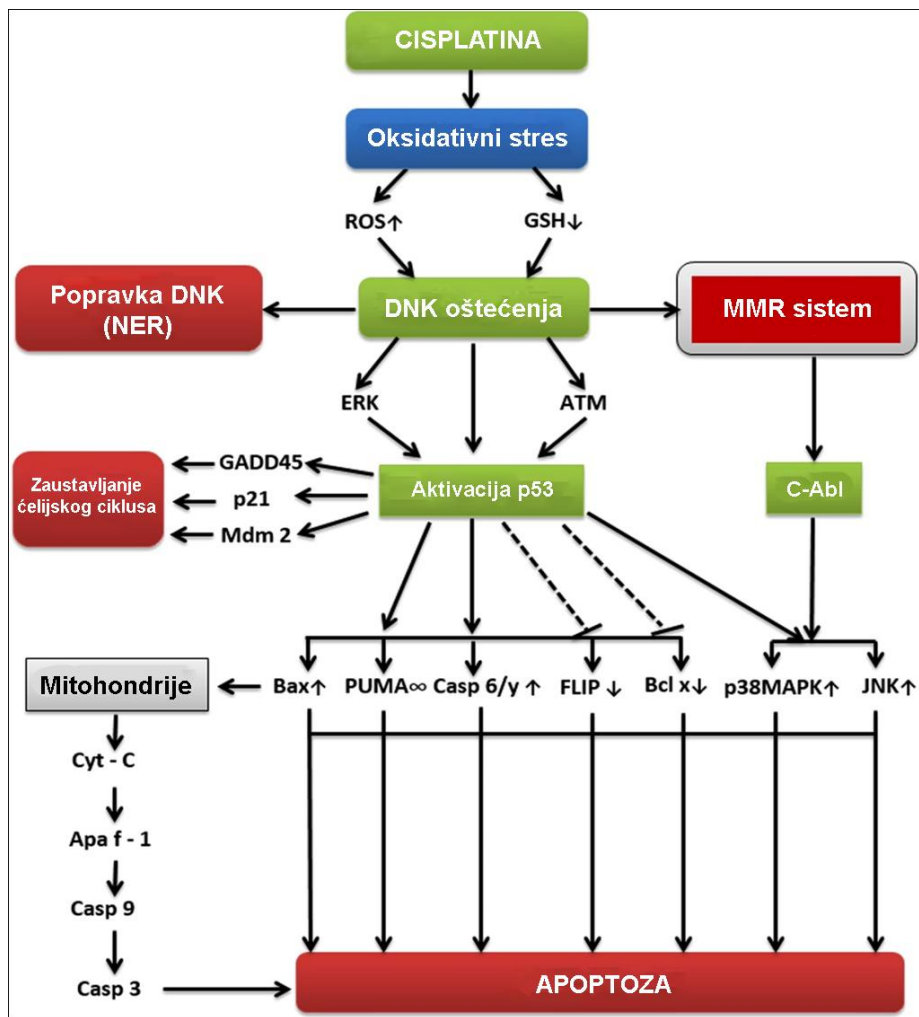
Slika 3. Strukture butotitana (levo), spirogermanijuma (u sredini) i KP46 (desno).

Već duži niz godina su u toku intenzivna istraživanja na polju primene rutenijumskih i galijumskih jedinjenja. Naime, rutenijumski kompleksi KP1019 i NAMI-A su zajedno sa galijumskim jedinjenjima KP46 (tris(8-hinolinolato)galijum(III), Slika 3) i galijum maltolatom [23] u kliničkim istraživanjima [20]. Ostala neplatinska jedinjenja u kliničkim istraživanjima su GSAO, MGd (moteksafin gadolinijum) i TM (tetratiomolibdat) [24].

1.4.2. Molekularni mehanizmi dejstva cisplatine

Biohemijski mehanizmi kojima cisplatina ulazi u ćeliju su brojni i još uvek nedovoljno razjašnjeni. Do sada je otkriveno nekoliko membranskih transportera platinskih kompleksa koji su analozi MDR1 transportera (engl. *Multidrug Resistance Transporter*), uključujući efluksne ATPaze (MRP familija, ATP7A/B) i membranske proteinske nosače (CTR1, SLC familija, AQP2 i AQP9). MDR1 je ATP-vezujući transporter koji je godinama bio poznat kao P-glikoprotein [25, 26]. Ulazak cisplatine u ćeliju je posredovan transporterom bakra Ctr1 kod kvasca i sisara [27]. Potvrđeno je da kod humanih ćelija cisplatina izaziva brzu degradaciju membranskog transportera bakra CTR1, zbog čega dolazi do smanjenja ulaska cisplatine u ćeliju, što na kraju dovodi do stvaranja rezistencije na terapiju [28, 29]. Eksperimentalne životinje kojima je genetičkom manipulacijom inhibirana ekspresija gena za CTR1 protein pokazuju rezistenciju na tretman cisplatinom, dok kod ćelija sa povećanom ekspresijom ovog gena dolazi do povećanja akumulacije platine, i u većini slučajeva, do povećane osetljivosti na tretman cisplatinom. Pronađen je membranski protein TMEM205, koji je povezan sa ćelijskom otpornošću na cisplatinu. Analiza profila ekspresije TMEM205 proteina u normalnim ljudskim tkivima pokazuje različit obrazac ekspresije, sa povećanom ekspresijom u jetri, pankreasu i nadbubrežnim žlezdama. Shodno tome, povećana ekspresija TMEM205 proteina u ćelijama rezistentnim na cisplatinu može imati uticaja na tu rezistenciju i može biti korisna kao biomarker ili ciljana struktura u hemioterapiji kancera [25]. Za glukozni transporter 1 (Glut1) se ne smatra da direktno učestvuje u transportu cisplatine, ali promena položaja ovog transportera pojačava fenotip rezistencije na cisplatinu [25].

Nakon što uđe u ćeliju, cisplatina postaje aktivna. U citoplazmi dolazi do zamene atoma hlora molekulima vode. Ovakav hidrolizovan produkt predstavlja moćan elektrofil koji sada može reagovati sa bilo kojim nukleofilom, uključujući sulfhidrilne grupe na proteinima i donore azota u sklopu nukleinskih kiselina. Cisplatina se vezuje za N7 reaktivni centar purinskih ostataka i kao takva uzrokuje oštećenja na DNK, zaustavljajući ćelijsku deobu i dovodeći do ćelijske smrti po tipu apoptoze. Najučestalije promene na DNK izazvane cisplatinom su 1,2-intralančani mostovi između purinskih baza. U okviru ovih promena razlikujemo 1,2-intralančane d(GpG) adukate koji čine oko 90 % svih adukata, i 1,2-intralančane d(ApG) adukate koji čine oko 10 % adukata. Citotoksičnosti cisplatine takođe doprinose i 1,3-intralančani d(GpXpG) i drugi adukti, kao što su interlančani mostovi i nefunkcionalni adukti. Mnogobrojni literaturni podaci ukazuju na DNK kao na glavni ciljni molekul preko koga cisplatina ispoljava svoju citotoksičnost, pri čemu se najpouzdanijim dokazom smatra hipersenzitivnost na cisplatinu prokariotskih i eukariotskih ćelija kojima nedostaju mehanizmi popravke DNK [30, 31]. Na Slici 4 su prikazani molekularni mehanizmi dejstva cisplatine koji dovode do apoptoze.



Slika 4. Molekularni mehanizmi dejstva cisplatine (modifikovano prema [32])

1.5. Rutenijumski hemioterapeutici

Dobro razvijena hemija sinteze rutenijumskih kompleksa pruža mogućnosti za mnogobrojne pristupe u dizajnu novih jedinjenja [33]. Nekoliko osobina rutenijuma kao metala ga čini vrlo podesnim za primenu u medicini:

- Dodatna koordinaciona mesta – oktaedarska geometrija rutenijumskih kompleksa pruža više koordinacionih mesta od kvadratno-planarne geometrije platina(II) kompleksa [19];

- Opseg oksidacionih stanja – rutenijum(II), rutenijum(III) i rutenijum (IV) su oksidaciona stanja prisutna u fiziološkim uslovima;
- Dinamika izmene liganda - rutenijum(II) i rutenijum(III) kompleksi poseduju sličnu kinetiku izmene liganda kao platina(II) kompleksi, što predstavlja važnu determinantu biološke aktivnosti;
- Sposobnost imitacije gvožđa – rutenijum ima sposobnost vezivanja za mnoge biološke molekule uključujući transferin i albumin i to na mestu vezivanja gvožđa koje se inače nalazi u organizmu, usled čega se ispoljava niža toksičnost i različit mehanizam dejstva rutenijuma u odnosu na ostale metale;
- Veća selektivnost – ćelije kancera se odlikuju izuzetno brzim deobama, što dovodi do njihove povećane potrebe za jonima gvožđa. Pretpostavlja se da će zbog ovog svojstva rutenijum ulaziti u većoj količini u maligne, a u manjoj u zdrave ćelije [34].

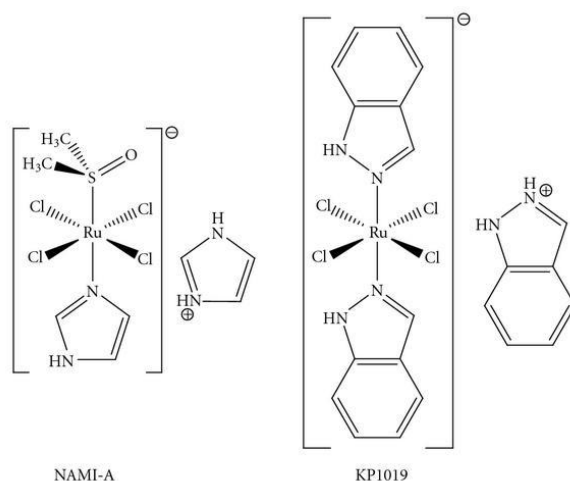
1.5.1. Rutenijum(III) kompleksi u kliničkim ispitivanjima

Rutenijum(III) kompleksi NAMI-A i KP1019 (Slika 5) su ušli u klinička ispitivanja, i pokazuju obećavajuću aktivnost. Imidazol *trans*-[tetrahlorido(imidazol)(dimetilsulfoksid)rutenat(III)] (NAMI-A) pokazuje selektivnu efikasnost ka plućnim metastazama solidnih metastazirajućih tumora, i to sa značajno većom aktivnošću od cisplatine, a sa daleko manje ozbiljnih toksičnih efekata.

Čini se da mehanizam dejstva NAMI-A kompleksa predstavlja kombinaciju različitih interakcija van i unutar ćelija kancera, što finalno zaustavlja ćeliju u G2/M fazi i dovodi do inicijacije apoptoze. Takođe, ovo jedinjenje ispoljava antiangiogenetski efekat i učestvuje u regulaciji aktin-zavisne adhezije i remodelovanju citoskeleta, što dovodi do inhibicije invazivnosti i metastaza [35].

Indazol *trans*-[tetrahloridobis(1H-indazol)rutenat(III)] (KP1019) je pokazao dobru aktivnost ka nekoliko tipova tumora u prekliničkim studijama, uključujući kolorektalne tumore [35, 36]. Faza I kliničke studije je već završena sa pet od ukupno šest pacijenata

koji boluju od različitih tipova solidnih tumora, koji su odgovorili na terapiju stabilizacijom bolesti i blagim posledicama toksičnosti tretmana [37].



Slika 5. Strukture rutenijum(III) kompleksa NAMI-A i KP1019

KP1019 se daje pacijentima intravenski [35], ali tačan mehanizam dejstva još uvek nije sasvim rasvetljen. Poznato je da se ovo jedinjenje vezuje sa velikim afinitetom za proteine u seruma, kao što su albumin i transferin za koje se smatra da su značajni za specifičnu akumulaciju rutenijuma u tumorskim ćelijama. Prema hipotezi o aktivaciji redukcijom u unutrašnjosti ćelija rutenijum(III) se oslobađa i redukuje do rutenijuma(II) [36, 38]. Pretpostavka je da rutenijum(III) kompleksi funkcionišu kao pro-lek i da se aktiviraju redukcijom do svog aktivnog rutenijum(II) stanja zahvaljujući hipoksičnoj i blago kiseljoj sredini u solidnim tumorima [33]. Specifična akumulacija u tumorskim ćelijama i aktivacija redukcijom bi takođe objasnila i nisku toksičnost ovog leka.

Smatra se da KP1019 indukuje ćelijsku smrt vodeći je putem apoptoze preko mitohondrijskog puta aktivacije, na taj način što dovodi do depolarizacije mitohondrijske membrane, smanjenja ekspresije endogenog bcl-2 i aktivacijom kaspaze-3 [36], mada se ne mogu isključiti i interakcije sa DNK molekulom [35].

Zbog slabe rastvorljivosti KP1019 kompleksa u vodi, ispitivanja optimalne i maksimalno tolerisane doze u kliničkim studijama nisu mogla biti nastavljena. Zbog toga je

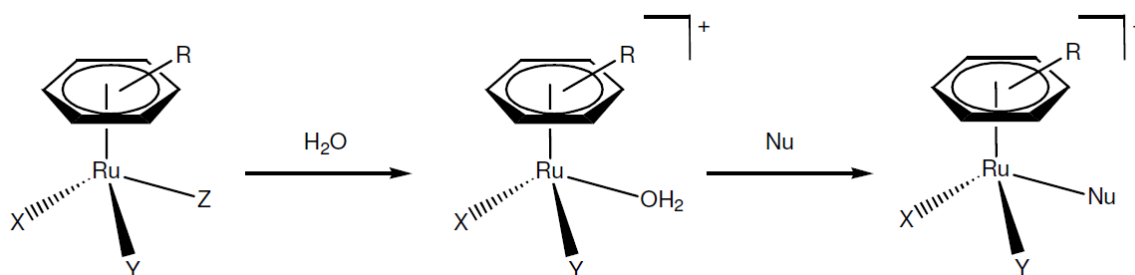
30 puta bolje rastvorljiva natrijumova so KP1339 korišćena u daljim kliničkim ispitivanjima sa sličnim postignutim rezultatima [38].

1.5.2. Rutenijum(II)-arenski kompleksi

Citotoksična svojstva prvog rutenijum(II)-arenskog kompleksa su ispitana 1980. godine. Bio je to rutenijumski analog cisplatine, *cis*-Ru(NH₃)₄Cl₂, koji premda je pokazao antitumorsku aktivnost, nije bio dovoljno rastvorljiv za farmaceutsku primenu. U narednim godinama ispitana su antitumorska svojstva velikog broja rutenijum(II) jedinjenja, uključujući *cis*- i *trans*-[Ru(DMSO)₄X₂] (X = Br, Cl) [39], kao i komplekse sa većim organskim ligandima, konkretno polipiridil komplekse kao što su *cis*-Ru(*N,N*-bipi)₂Cl₂ i *mer*-Ru(*N,N,N*-terpi)Cl₃ (bipi = 2,2' - bipiridin, terpi = 2,2' : 6'2'' – terpiridin) [40].

Žerar Žeuen, koji je radio na organometalnim karbonilnim kompleksima, je 1985. godine uvrstio termin „bioneorganska hemija“ u naučnu literaturu i na taj način između ostalog podstakao istraživanja u oblasti organometalnih jedinjenja [41].

U poslednjih 20 godina klasa organometalnih rutenijum(II)(η⁶-aren) kompleksa privlači sve više pažnje i intenzivno se ispituje [42]. Ovi polu-sendvič kompleksi koji u prostoru zauzimaju konformaciju tzv. „stolice klavira“ (engl. *piano stool*) (Slika 6) nude mnogobrojne mogućnosti za hemijski dizajn leka modifikacijom arenskog liganda i funkcionalizacijom tri preostala mesta koordinacije (X, Y i Z) ubacivanjem tri monodentatna, jednog monodentatnog i jednog bidentatnog ili čak jednog tridentatnog helatnog liganda. U zavisnosti od vezanih liganada, kompleksi mogu biti neutralni ili naelektrisani. Ovakve osobine omogućavaju kontrolu reaktivnosti ovih jedinjenja i fino podešavanje farmakoloških svojstava kao što su ulazak u ćeliju, potencijalne interakcije sa biomolekulima i mehanizam dejstva [43].

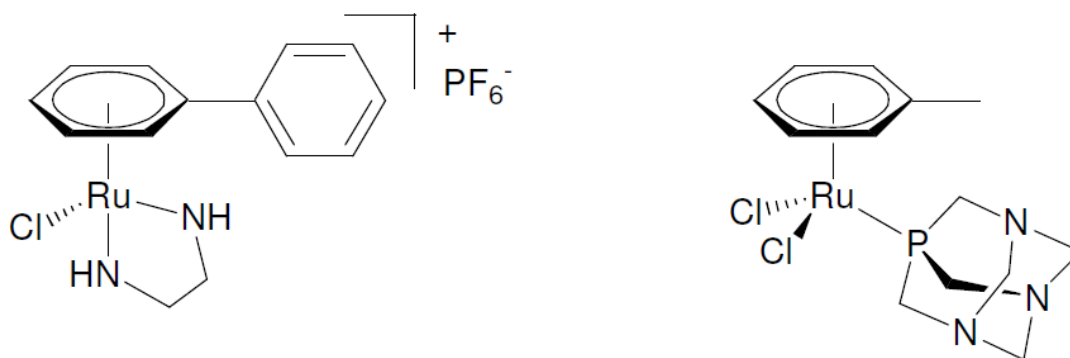


Slika 6. Opšte strukture polu-sendvič rutenijum(II)-arenskih kompleksa (R = H, funkcionalne grupe, alkil, aril; X, Y, Z = ligandi)

Arenski ligand stabilizuje rutenijum(II) u njegovom oksidacionom stanju i obezbeđuje lipofilnost kompleksa, što može pospešiti interakcije sa biomolekulima i pasivan transport putem difuzije rutenijum(II) kompleksa kroz ćelijsku membranu [44]. Koordinacijom jednog halida (najčešće hlora) za rutenijumski centar, taj halid se ponaša kao tzv. odlazeća grupa, koja se u vodenom rastvoru zamenjuje molekulom vode i dobija se $[\text{Ru}(\eta^6\text{-aren})(\text{X})(\text{Y})(\text{OH}_2)]^{n+}$. Smatra se da je ovakav kompleks reaktivna vrsta, spremna da reaguje sa biološkim nukleofilima kao što su DNK, aminokiseline i ostali biomolekuli (Slika 6) [45]. Reakcija hidrolize može često biti inhibirana dodatkom natrijum hlorida. Obzirom da je vanćelijska koncentracija hlora veća od one u ćeliji, pretpostavlja se da se kompleksi aktiviraju akvatacijom čim uđu u ćeliju, analogno cisplatinu [44]. Većina supstanci koje pripadaju ovoj klasi mogu da se vezuju za jedarnu DNK sa velikim afinitetom za atom azota na poziciji 7 guanina (N7), formirajući monofunkcionalne adukte [45], mada se ovo ne smatra uvek njihovim glavnim načinom delovanja. U mnogim slučajevima priroda koordinaciono vezanih liganada određuje mehanizam dejstva, na primer kroz interakciju sa određenim enzimima [46].

Pionirski radovi u istraživanju antikancerskih rutenijum(II)-arenskih kompleksa su objavljeni od strane Sedlera, na kompleksima koji sadrže etilendiamin ligande, i Dajsona, na tzv. RAPTA kompleksima (rutenijum(II)-arenski kompleksi sa 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantanskim ligandom) (Slika 7), od kojih su oba u naprednoj prekliničkoj fazi istraživanja [42]. RAPTA kompleksi sadrže PTA ligand (1,3,5-triaza-7-fosfoadamantan) koji utiče na to da ovi kompleksi budu selektivno aktivirani u hipoksičnoj sredini solidnih

tumora. RAPTA-T (Slika 7), jedna od vodećih supstanci, je samo blago citotoksična, ali je vrlo selektivna prema tumorskim ćelijama i ima sposobnost da inhibira migraciju i metastaziranje ćelija *in vitro*. Ovo jedinjenje je takođe pokazalo određeni stepen aktivnosti *in vivo* na modelu solidnog metastazirajućeg tumora [47].



Slika 7. Strukture Sedlera, RM175 (levo) i Dajsona, RAPTA-T (desno)

RAPTA-C, *p*-cimenski analog RAPTA-T kompleksa, izaziva oštećenja na DNK molekulu, međutim ovaj tip jedinjenja je takođe u stanju da inhibira aktivnost katepsina B i tioredoksin reduktaze, dva enzima za koja se smatra da su ciljni molekuli u terapiji kancera [48]. RAPTA-C takođe indukuje apoptozu i usporava ćelijsku deobu [49].

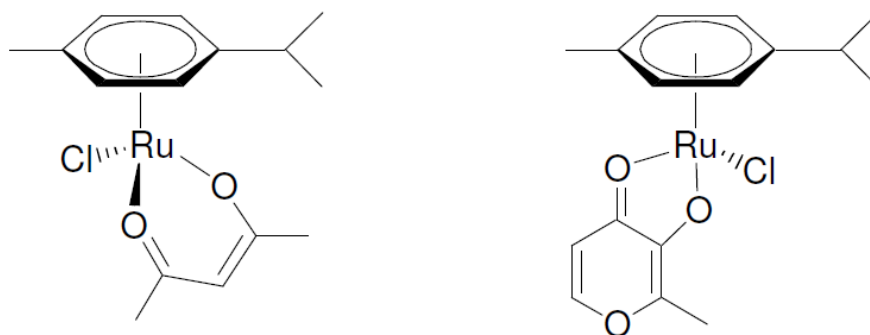
Razni su pokušaji da se poboljša citotoksičnost ove klase jedinjenja. Kada se PTA ligand zameni 3,5,6-biciklofosfit- α -D-glukofuranozid ligandom, dobijaju se RAPTA analozi sa pojačanom citotoksičnom aktivnošću, zbog povećane lipofilnosti [50].

Vezivanje arenskog liganda za humani serum albumin (HSA) povećava ćelijsku akumulaciju i na taj način poboljšava *in vitro* selektivnost [51]. Vezivanje etakrinske kiseline za aromatični ligand ima za rezultat jedinjenje koje poseduje inhibitornu aktivnost prema glutathion-S-transferazi, za kojom sledi odvajanje fragmenta zaduženog za inhibitornu aktivnost enzima od metalnog dela, koji se sada može vezati za sledeći biomolekul, na primer DNK. Obzirom da glutathion-S-transferaza katalizuje vezivanje ksenobiotika za glutathion u cilju njihovog odstranjivanja iz metabolizma, ovakav koncept hemijskog dizajna omogućuje terapiju tumora koji su rezistentni na više lekova [52, 53].

Katjonski rutenijum(II)-arenski kompleksi koji u svom sastavu sadrže etilendiamin helatne ligande pokazuju vrlo visoku citotoksičnost *in vitro*, posebno u obliku heksafluorofosfata. Zamena hloridne odlazeće grupe jodidom ima jako mali uticaj na *in vitro* antitumorsku aktivnost. Nasuprot tome, varijacije u arenskom ligandu, od benzena preko *p*-cimena, bifenil liganda (RM175, Slika 7), dihidroantracena do tetrahydroantracena, dovode do značajnog porasta antiproliferativne aktivnosti kompleksa, u zavisnosti od njegove veličine i hidrofobnosti [54, 55]. Rutenijum(II)-arenski etilendiamin deo se nakon hidrolize pretežno vezuje za N7 guanina dvolančane DNK, što je dodatno učvršćeno vodoničnom vezom koja se formira između NH etilendiamina i O6 guanina [55], dok su u slučaju bifenil, dihidroantracenskog i tetrahydroantracenskog liganda takođe u pitanju nekovalentne hidrofobne interakcije, što može uključivati interkalaciju arena i vezivanje za mali žleb DNK [56]. Shodno tome, pokazano je da RM175 indukuje apoptozu preko izmena u p53-p21-bax signalnom putu [57]. RM175 takođe pokazuje visoku aktivnost *in vivo* na A2780 (humani karcinom jajnika) ksenograftu [54], i na karcinomu mlečnih žlezda, uključujući i redukciju metastaza [58].

Pored mogućeg uticaja arenskog liganda na antikancersku aktivnost, vrsta helatnog liganda igra značajnu ulogu i ispoljava znatan uticaj na hemijska, fizička i biološka svojstva rutenijum(II)-arenskih jedinjenja. Zamenom neutralnog *N,N*-helatnog liganda etilendiamina *O,O*-helatom kao što je acetilacetonat (acac, Slika 8) dolazi do značajnih promena u selektivnosti prema DNK nukleotidima, promena u naelektrisanju rutenijumskog centra i do promena u ponašanju odlazećih grupa. $[\text{Ru}(\eta^6\text{-aren})(\text{acac})\text{Cl}]$ kompleksi pokazuju veći afinitet za adenin nego za guanin i takođe povećanu učestalost i stepen hidrolize [59].

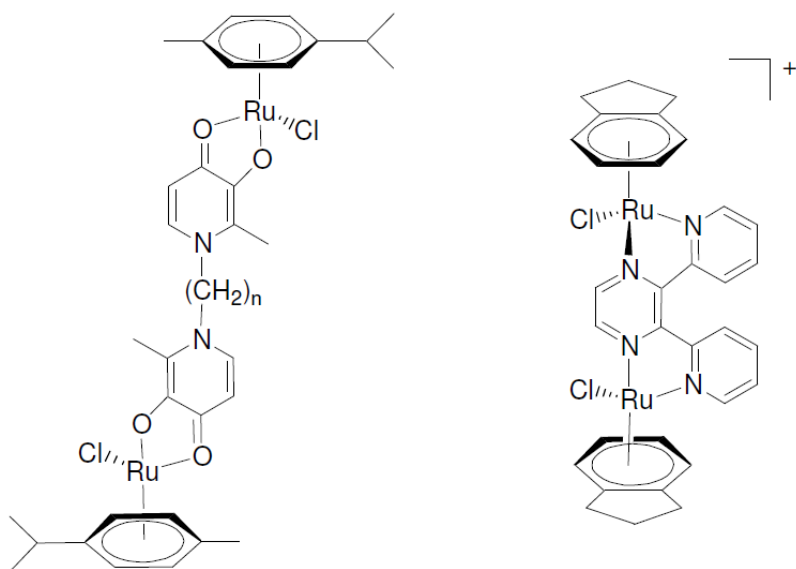
Rutenijum(II)-arenski kompleksi sa *O,O*-helatnim ligandom maltolom (Slika 8) pokazuju umerenu antikancersku aktivnost i takođe se pretežno vezuju za N7 guaninskih nukleotida. Nasuprot etilendiaminskim kompleksima, varijacije u arenskom ligandu i halido odlazećoj grupi nemaju uticaja na citotoksičnu aktivnost ovih kompleksa. Zanimljivo je da se zamenom *O,O*-helatnog maltola *S,O*-tiomaltolom dobijaju jedinjenja sa poboljšanom aktivnošću i stabilnošću, na koje ćelijska linija kolorektalnog karcinoma SW480 pokazuje povećanu senzitivnost, umesto generalno senzitivnije linije karcinoma jajnika CH1 [60].



Slika 8. Rutenijum(II)-arenska jedinjenja sa *O,O*-helirajućim ligandima maltolom (levo) i acac-om (desno)

Moglo se očekivati da bi multinuklearnost rutenijumskih kompleksa poboljšala aktivnost kandidata za antikancerske lekove, kao što je pokazano za platinske antitumorske agense [61]. Prvi objavljeni dinuklearni rutenijum(II)-arenski kompleks koji je pokazao veću aktivnost od analognih monomera je u svom sastavu imao most od derivata piridona i pokazivao je zanimljivu zavisnost citotoksične aktivnosti *in vitro* od dužine mosta i samim tim i od lipofilnosti (Slika 9). Ovi kompleksi imaju sposobnost vezivanja za transferin *in vitro* i mogu se ponašati kao DNK interkalirajući i agensi koji dovode do uspostavljanja unakrsnih veza između DNK i proteina u ćeliji [62, 63].

Dinuklearni rutenijum(II)-arenski kompleksi sa 2,3-bis(2-piridil)pirazinom kao helirajućim ligandom pokazuju potencijal za primenu u fotodinamičkoj terapiji. Derivat indana (Slika 9) podleže disocijaciji nakon izlaganja UV zračenju ili vidljivoj svetlosti, i posledično formira stabilne dirutenijum DNK adukte, što dovodi do smrti ćelije [64].



Slika 9. Dinuklearni rutenijum(II)-arenski kompleksi sa mostom od derivata piridona (levo) i sa 2,3-bis(2-piridil)pirazinom kao bishelirajućim ligandom (desno)

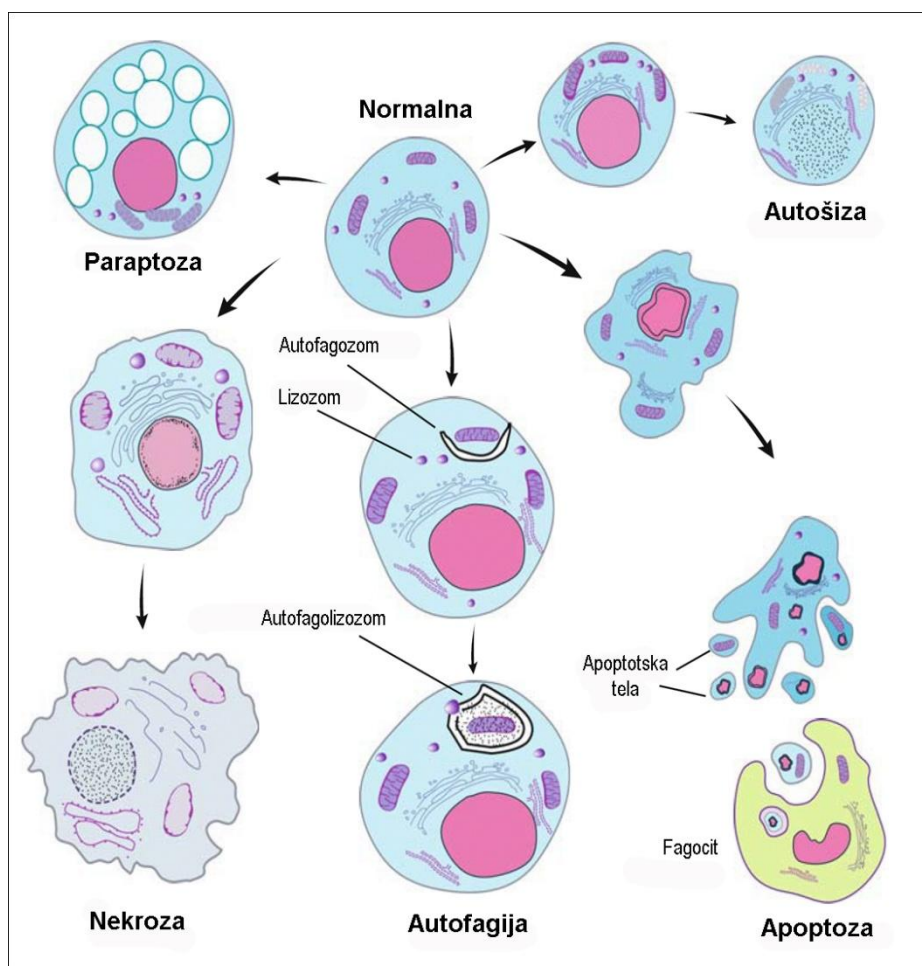
Aktivnost tetranuklearnih rutenijum(II)-arenskih kompleksa koji sadrže porfirin se zasniva na kombinovanom fotodinamičkom dejstvu porfirina i citotoksične aktivnosti rutenijuma. Vezivanje rutenijuma za heterociklični sistem povećava rastvorljivost liganda kao i selektivnost ka tumorskim ćelijama [65]. U skorije vreme su takođe ispitivani rutenijum(II)-arenski kompleksi sa više centara, kao i rutenijumski kavezi koji bi mogli funkcionisati kao „Trojanski konj“, tj. da isporuče hidrofobni molekul koji sadrži metal do tumorske ćelije, dok je istovremeno i kavez sam po sebi citotoksičan [42].

1.6. Tipovi ćelijske smrti

Ćelijska smrt ima centralnu ulogu kod višecelijskih organizama tokom embrionalnog razvića u formiranju delova tela, kao i kasnije tokom života u održavanju homeostaze. Takođe, ćelijska smrt ima funkciju uklanjanja ćelija oštećenih tokom bolesti, starenja, infekcije, mutacijama, i nakon izlaganja toksičnim agensima [66]. Kerr i saradnici [67] su prvi uveli termin „apoptoza“, koji se odnosio na morfologiju fiziološke ćelijske smrti koja uključuje skupljanje ćelije, kondenzaciju nukleusa, stvaranje ispupčenja na površini

membrane, ćelijsku i nukleusnu fragmentaciju, i finalno nastanak apoptotskih tela (Slika 10). Promene na nivou membranskih lipida na kraju dovode do fagocitiranja apoptotičkih ćelijskih fragmenata.

Postoji 12 različitih tipova ćelijske smrti opisanih u literaturi, koji se mogu grupisati u 5 glavnih tipova: apoptoza, nekroza, autofagija, paraptoza i autošiza [68]. Druge forme ćelijske smrti se mogu klasifikovati u jedan od navedenih tipova. Na primer, anoikiza je podtip apoptoze, a onkoza nekroze, a oba podtipa indukuje odlepljivanje ćelija od podloge. Iako se termin „programirana ćelijska smrt“ koristi da opiše apoptozu, drugi tipovi ćelijske smrti se mogu ubrajati u ovu kategoriju, pod uslovom da je za njihovo izvršenje neophodna aktivacija specifičnih gena.



Slika 10. Morfološke karakteristike različitih tipova ćelijske smrti (modifikovano prema [66])

Nekroza nastaje kao posledica slučajnih i letalnih događaja, kao što su dejstvo toksina, fizičkih stimulusa, ili može nastati u patološkim stanjima, kao što je ishemija. Nekrozu karakteriše ćelijski edem, razaranje gusto pakovanog hromatina, pucanje plazma membrane i oslobađanje ćelijskog sadržaja u vanćelijski prostor, što dovodi do inflamacije (Slika 10). Nasuprot tome, tokom procesa apoptoze dolazi veoma kasno do oštećenja membrane, a mrtve ćelije budu fagocitirane od strane susednih ćelija ili fagocita, što minimizira ili potpuno sprečava inflamaciju. Iako se nekroza najčešće smatra tipom slučajne ćelijske smrti, neki podaci ukazuju na to da se nekroza takođe može odigrati na programiran način, i da nekrotična i apoptotična smrt mogu imati određenih sličnosti [69]. Ipak, pokazano je da do nekroze dolazi u ćelijama koje imaju defektne apoptotske mehanizme, ili nakon inhibicije apoptoze [70], i ova forma ćelijske smrti postaje značajan alat u lečenju kancera [71]. Neki oblici ćelijske smrti mogu pokazivati morfološke osobine i apoptoze i nekroze, i nazivaju se „aponekrozom“ [72].

Autofagija, koja se još naziva i „makroautofagijom“ ili „tipom II programirane ćelijske smrti“ [73], se karakteriše „sekvestracijom“ citoplazme i organela u autofagne vakuole, strukture obavijene dvostrukom ili višestrukom membranom, za kojom sledi degradacija sadržaja vakuola fuzionisanjem sa lizozomima iste te ćelije (Slika 10). Iako tačna uloga autofagije u procesu ćelijske smrti nije poznata, već dugo vremena se smatra mehanizmom preživljavanja ćelija, gde ćelije u procesu gladovanja, sekvestracijom i degradacijom dela citoplazme i organela, iz kompleksnih polimera proizvode osnovne molekule (proteine, lipide, polisaharide, nukleinske kiseline). Shodno tome, smatra se da proces autofagije može doprineti preživljavanju ćelija kancera u uslovima gde su ograničene hranljive materije i kiseonik, i tokom dejstva jonizujućeg zračenja [74, 75].

Paraptoza se morfološki karakteriše intenzivnom vakuolizacijom citoplazme, koja uključuje i povećanje zapremine mitohondrija i endoplazmatičnog retikuluma (Slika 10). Pokazano je da se ovaj tip ćelijske smrti može inhibirati inhibitorima transkripcije i translacije, kao što su cikloheksimid i aktinomicin D, što ukazuje na to da paraptoza zahteva sintezu novih proteina u ćeliji [76]. Pokazano je da se vakuolizacija citoplazme dešava kod velikog broja ćelijskih linija kako spontano, tako i pod dejstvom različitih

stimulusa. Stepen vakuolizacije zavisi od tipa ćelije, i reverzibilan je do određenog trenutka, kada ćelija odlazi u smrt [77].

Autošiza je novootkrivena forma ćelijske smrti, koju pokreće oksidativni stres [78], a karakteriše je redukcija citoplazme do uskog prstena oko nukleusa, dok se hromatin povlači tako da oblaže celu unutrašnju ivicu nukleusa [79]. Mitohondrije se zajedno sa drugim organelama sakupljaju oko nukleusa, što predstavlja posledicu oštećenja na citoskeletu i gubitka citoplazme. Granulirani endoplazmatični retikulum je očuvan sve do kasnih faza autošize, kada se ćelije fragmentiraju, nukleolus se kondenzuje i deli na manje fragmente [79]. Autošizom obično umiru povezane grupe ćelija *in vitro* i *in vivo*, ali povremeno može zahvatiti i rasute, individualne ćelije zarobljene u subkapsularnim sinusima limfnih čvorova [80].

1.6.1. Apoptoza

Istraživanja su pokazala da se proces apoptoze može podeliti u tri sukcesivne faze: (1) početna faza, koja započinje pod uticajem vanćelijskih ili unutarćelijskih signala; (2) faza izvršenja; i (3) faza čišćenja, tokom koje se mrtve ćelije uklanjaju od strane susednih ćelija i eventualno degradacijom u okviru lizozoma fagocita [81]. Proteinska mašinerija koja učestvuje u procesu apoptoze je evoluciono očuvana od valjkastih crva do čoveka [82].

Mehanizmi regulacije ćelijske smrti po tipu apoptoze su veoma složeni i uključuju kaskadu molekularnih događaja koji su energetske zavisni. Istraživanja su pokazala da se razlikuju dva glavna apoptotska puta: spoljašnji ili put preko receptora za smrt, i unutrašnji ili mitohondrijski put. Postoji i dodatni apoptotski put koji se uključuje tokom citotoksičnosti posredovane T-ćelijama, i funkcioniše po principu perforin-granzim posredovanog ćelijskog ubijanja. Perforin/granzim apoptotski put može indukovati apoptozu preko granzima A ili granzima B. Sva tri navedena puta zatim konvergiraju ka istom terminalnom putu izvršenja, koji se inicira aktivacijom efektorskih kaspaza 3 i 7, što dovodi do degradacije citoplazmatičnih, citoskeletnih i jedarnih proteina, fragmentacije DNK, formiranja apoptotskih tela, ekspresije liganada za fagocitozu, i na kraju do uklanjanja mrtve ćelije od strane fagocita.

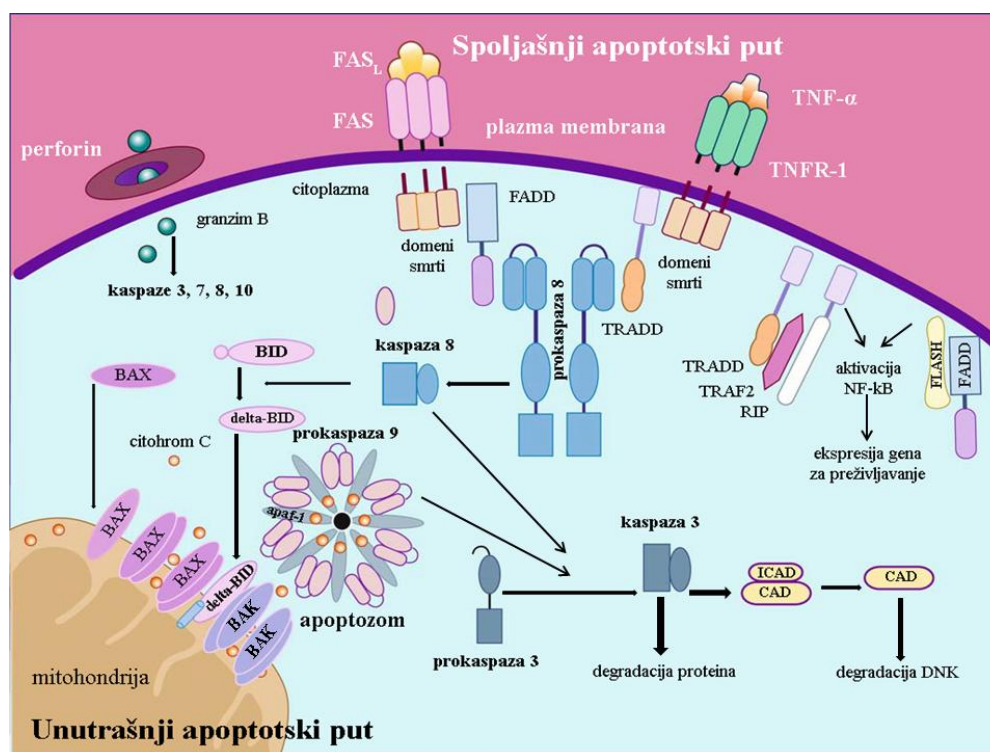
1.6.1.1. Spoljašnji apoptotski put

Spoljašnji apoptotski put uključuje ligande smrti kao što su faktor nekroze tumora α (engl. *tumour necrosis factor- α , TNF- α*), CD95 ligand (Fas ligand) i ligand koji indukuje apoptozu povezan sa TNF (engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL*). Ovi ligandi se vezuju za svoje srodne receptore na površini ćelija TNFR1, CD95/Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2 i DR seriju receptora [83], što dovodi do aktivacije inicijatorske kaspaze 8, i posledične aktivacije efektorske kaspaze 3 (Slika 11) [84]. Citoplazmatični domeni receptora smrti sadrže „domen smrti“, koji igra presudnu ulogu u prenosu signala od površine ćelije do signalnih molekula unutar ćelije. Vezivanjem liganada za svoje receptore dolazi do trimerizacije receptora i regrutovanja adapterskih proteina na ćelijsku membranu, što uključuje homofilične interakcije između domena smrti receptora i adapterskih proteina. Adapterski protein za TNFR1 i DR3 receptore je protein TRADD (engl. *TNFR-associated death domain protein*) [85], dok je za Fas, TRAIL-R1, TRAIL-R2 i DR4 receptore adaptorski protein FADD (engl. *Fas-associated death domain protein*) [86].

1.6.1.2. Unutrašnji apoptotski put

U odgovoru na različite stresne stimulse, kao što su lekovi, toksini, toplota, zračenje, hipoksija i virusne infekcije, ćelije mogu pokrenuti apoptotski put. Međutim, ćelijska smrt nije obavezno neizbežna opcija nakon izlaganja ovim agensima, i mehanizmi koji igraju odlučujuću ulogu u ovom procesu se i dalje ispituju. Pretpostavlja se da intenzitet i trajanje stimulusa zajedno određuju krajnji ishod, i da stimulus mora preći prazni intenzitet i trajanje da bi indukovao apoptozu. Iako mehanizmi za svaki stimulus mogu biti različiti, određeni obrasci su identifikovani. Na primer, agensi koji oštećuju DNK, kao što su jonizujuće zračenje i određeni ksenobiotici, dovode do aktivacije mehanizama koji su posredovani p53 tumor supresorom, i koji vode ćeliju putem apoptoze delom preko povišene ekspresije proapoptotskih proteina [87]. Ostali stresori dovode do povećane aktivnosti stresom aktiviranih protein kinaza, što vodi ćeliju putem apoptoze [88].

Svi opisani mehanizmi dovode do promena u propustljivosti spoljašnje membrane mitohondrija i oslobađanja dve glavne grupe proapoptotskih proteina iz međumembranskog prostora u citoplazmu [89]. Prva grupa proteina se sastoji od citohroma *c*, Smac/DIABLO i serin proteaze HtrA2/Omi [90-92]. Citohrom *c* se vezuje za adapterski protein Apaf-1 i prokaspazu 9, formirajući kompleks „apoptozoma“, što vodi aktivaciji kaspaza [93]. Spajanje prokaspaze 9 u apoptozom dovodi do aktivacije kaspaze 9. Inhibitori proteina apoptoze (engl. *Inhibitors of Apoptosis Proteins, IAPs*) aktiviraju kaspazu 9 i dovode do aktivacije nizvodnih efektorskih kaspaza. Smatra se da Smac/DIABLO i HtrA2/Omi vode ćeliju u apoptozu inhibirajući aktivnost IAPs – a [94]. Druga grupa proapoptotskih proteina, AIF, endonukleaza G i DNAza aktivirana kaspazom (engl. *caspase-activated DNase, CAD*) se oslobađa iz mitohondrija tokom apoptoze, ali predstavlja kasni događaj koji se odigrava nakon što ćelija umre. Kontrola i regulacija ovih mitohondrijskih događaja tokom apoptoze se obavlja preko članova Bcl-2 familije proteina [95].



Slika 11. Apoptotski signalni putevi (modifikovano prema [66])

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Dobro razvijena hemija sinteze rutenijumskih kompleksa poslednjih godina je pružila mogućnosti za mnogobrojne pristupe u dizajnu novih jedinjenja [33]. Sintetisan je veliki broj kompleksa rutenijuma, naročito rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa veoma raznovrsnim ligandnim sistemima, od kojih je značajan broj jedinjenja pokazao dobru antitumorsku aktivnost.

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se prvobitno odredi citotoksični potencijal sedam novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa derivatima pikolinske kiseline na tri maligne ćelijske linije. Ova serija predstavlja modifikaciju prethodne serije rutenijum(II)-arenskih kompleksa, i sintetisana je sa ciljem da se poboljša antitumorska aktivnost i poveća selektivnost ka ćelijama kancera. Analiza citotoksičnog potencijala je obuhvatila dva najznačajnija aspekta ispitivanja citotoksičnosti, a to su poređenje sa cisplatinom kao referentnim jedinjenjem i ispitivanje toksičnosti za normalne ćelijske linije.

Dalje je cilj disertacije bio *in vitro* ispitivanje molekularnih mehanizama antikancerske aktivnosti rutenijum(II)-arenskog kompleksa sa izohinolin-3-karboksilnom kiselinom kao ligandom, kao najaktivnijeg jedinjenja iz ispitivane serije na odabranoj ćelijskoj liniji na kojoj je ispoljio značajno citotoksično dejstvo.

U okviru ovog cilja uključeni su sledeći eksperimenti:

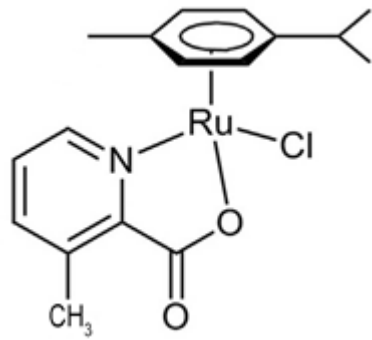
- Analiza distribucije malignih ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon tretmana ispitivanim kompleksom;
- Određivanje tipa ćelijske smrti tretiranih malignih ćelija na protočnom citometru, kao i morfološkim analizama, odnosno bojenjem fluorescentnim bojama;
- Praćenje ukupne intraćelijske akumulacije rutenijuma u toku vremena;
- Mikroerej analiza promena u genskoj ekspresiji na celom transkriptomu senzitivne ćelijske linije.

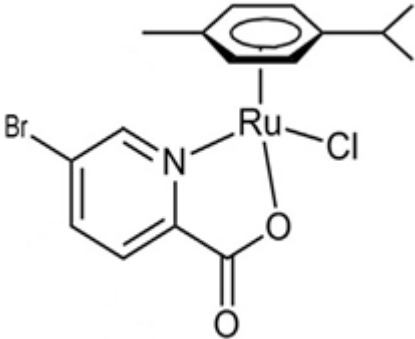
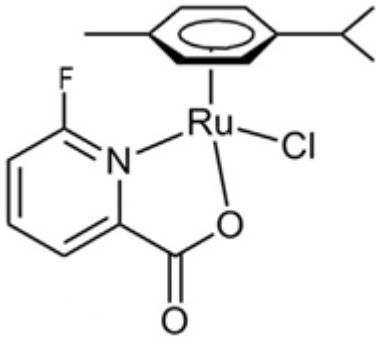
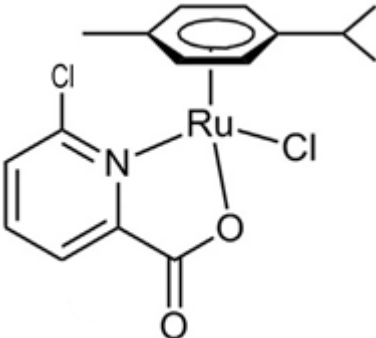
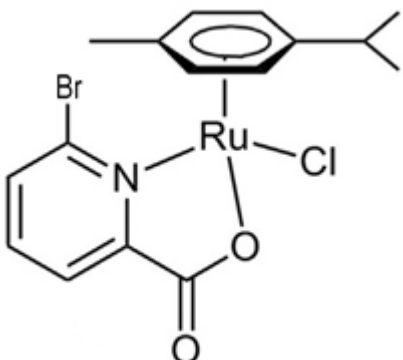
3. MATERIJAL I METODE

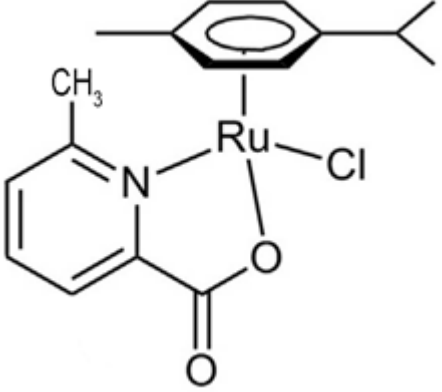
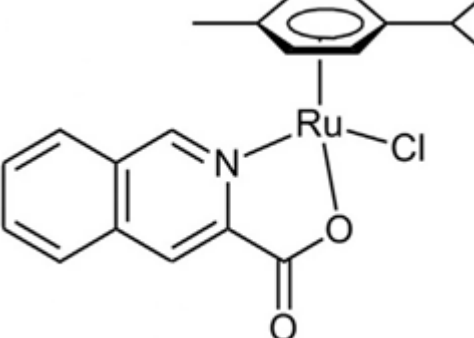
3.1. Hemijske strukture rutenijum(II)-arenskih kompleksa

Hemijske strukture rutenijum(II)-arenskih kompleksa, koji su podvrgnuti preliminarnom određivanju citotoksičnog potencijala, kao i hemijska struktura rutenijum(II)-arenskog kompleksa sa izohinolin-3-karboksilnom kiselinom kao ligandom, čiji su molekularni mehanizmi antiproliferativnog dejstva ispitivani u ovom radu, prikazani su u Tabeli 1. Kompleksi su sintetisani i okarakterisani na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, od strane profesora Dr Živoslava Tešića i njegovog tima. U pitanju je serija od ukupno sedam novih rutenijum(II)-arenskih kompleksa opšte formule $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{L}^{1-7})\text{Cl}]$, gde su ligandi L^{1-6} fluoro, hlora, bromo ili metil derivati pikolinske kiseline, ili je ligand izohinolin-3-karboksilna kiselina (L^7). Karakterizacija dobijenih jedinjenja je prethodno izvršena metodama elementalne analize, IC i NMR (^1H i ^{13}C) spektroskopije, elektrosprej masene spektrometrije, kao i rendgenske strukturne analize za jedinjenja dobijena u kristalnom obliku [96].

Tabela 1. Oznake, nazivi i hemijske strukture ispitivanih jedinjenja

Oznaka jedinjenja	Hemijski naziv jedinjenja	Strukturna formula jedinjenja
RuT₁	η^6 - <i>p</i> -cimenhlora-3-metilpikolinato-rutenijum(II)	

<p>RuT₂</p>	<p>η^6-<i>p</i>-cimenhloro-5-brompikolinato-rutenijum(II)</p>	
<p>RuT₃</p>	<p>η^6-<i>p</i>-cimenhloro-6-fluorpikolinato-rutenijum(II)</p>	
<p>RuT₄</p>	<p>η^6-<i>p</i>-cimenhloro-6-hlorpikolinato-rutenijum(II)</p>	
<p>RuT₅</p>	<p>η^6-<i>p</i>-cimenhloro-6-brompikolinato-rutenijum(II)</p>	

<p>RuT₆</p>	<p>η^6-<i>p</i>-cimenhloro-6-metilpikolinato-rutenijum(II)</p>	
<p>RuT₇</p>	<p>η^6-<i>p</i>-cimenhloro-izohinolin-3-karboksilato-rutenijum(II)</p>	

3.2. Kulture ćelija

Kulture ćelija upotrebljene u ovom radu su: tumorske ćelije epitela poreklom iz humanog karcinoma grlića materice (**HeLa**), ćelije humanog melanoma (**FemX**), četiri tipa ćelija humanog karcinoma dojke (**MDA-MB-361**, **MDA-MB-453**, **MDA-MB-231** i **MCF-7**), ćelije kolorektalnog karcinoma (**LS-174**), ćelije adenokarcinoma pluća (**A549**), ćelije hronične mijeloidne leukemije (**K562**) i dve normalne, zdrave ćelijske linije - fetalni humani fibroblasti pluća (**MRC-5**) i humani bronhijalni epitel (**BEAS-2B**). Navedene kulture ćelija su iz kolekcije ćelijskih linija Instituta za Onkologiju i Radiologiju Srbije, Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju. Karakteristike ćelijskih linija, korišćenih u ovom radu, prikazane su u Tabeli 2.

Ćelije su gajene u hranljivim medijumima, koji su čuvani u frižideru, a pre upotrebe zagrejani do temperature od 37 °C. Ćelijske linije HeLa, MDA-MB-453, MDA-MB-361, MDA-MB-231, A549, LS-174, FemX, MRC-5 i BEAS-2B se održavaju kao monosloj, a

K562 kao suspenzija, u hranljivoj podlozi RPMI 1640, pH 7,2, koja sadrži 10 % fetalnog goveđeg seruma (eng. Fetal Calf Serum, FCS), termički inaktivisanog na 56 °C, 30 minuta. RPMI 1640 je obogaćena penicilinom 192 IU/ml i streptomycinom 200 µg/ml, L-glutationom (3 mM), HEPES-om (25 mM). Linija MCF-7 se održava kao monosloj u hranljivoj podlozi DMEM, pH 6,9, koja sadrži 10 % fetalnog goveđeg seruma, termički inaktivisanog, sa dodatkom penicilina 192 IU/ml, streptomicina 200 µg/ml i L-glutaciona (3 mM).

Tabela 2. Karakteristike ćelijskih linija korišćenih u ovom radu

ćelijska linija	tip	poreklo	tkivo/organ	tumor
HeLa	epitelijalni	humano	cerviks	adenokarcinom
A549	epitelijalni	humano	pluća	adenokarcinom
MDA-MB-453	epitelijalni	humano	dojka	metastatski karcinom, perikardijalna efuzija
MDA-MB-361	epitelijalni	humano	dojka	metastatski adenokarcinom, mozak
MDA-MB-231	epitelijalni	humano	dojka	metastatski adenokarcinom, pleuralna efuzija
MCF-7	epitelijalni	humano	dojka	metastatski adenokarcinom, pleuralna efuzija
K562	limfoblastni	humano	koštana srž	hronična mijeloidna leukemija
LS-174	epitelijalni	humano	kolon	adenokarcinom
FemX	epitelijalni	humano	koža	melanom
MRC-5	fibroblasti	humano fetalno	pluća	/
BEAS-2B	epitelijalni, transformisan adenovirusom 12-SV40	humano	pluća	/

3.2.1. Sastav hranljivog medijuma RPMI 1640

RPMI 1640 podloga je proizvod istraživača Moore i saradnika sa instituta "Roswell Park Memorial Institute", odakle i potiče njen naziv RPMI. RPMI 1640 je primarno formulisan za gajenje humanih ćelijskih kultura koje rastu u monosloju ili suspenziji. Osnovni sadržaj podloge je fosfatni pufer (eng. Phosphate Buffer Saline, PBS), u koji se dodaju amino kiseline i vitamini, a sastav je sledeći (g/l) [97]:

L-Glutamin	0,3
Glicin	0,01
L-Histidin	0,015
Hidroksi-L-prolin	0,02
L-Izoleucin	0,05
L-Leucin	0,05
L-Lizin-HCl	0,04
L-Metionin	0,015
L-Prolin	0,02
L-Fenilalanin	0,015
L-Serin	0,03
L-Treonin	0,02
L-Triptofan	0,005
L-Tirozin x 2Na x 2H ₂ O	0,029
L-Valin	0,02
D-Biotin	0,0002
Holin-hlorid	0,003
Folna kiselina	0,001
Mioinozitol	0,035
Niacinamid	0,001
p-Aminobenzoeva kiselina	0,001
D-Pantotenska kiselina	0,00025

Piridoksin x HCl	0,001
Riboflavin	0,002
Tiamin x HCl	0,001
Vitamin B12	0,000005
D-glukoza	2
Glutation	0,001
HEPES	5,958
Fenol crveno (Na-so)	0,0053

3.2.2. Priprema RPMI 1640 hranljive podloge

Praškasta RPMI 1640 podloga je rastvorena u sterilnoj destilovanoj vodi (102 g/l), uz mešanje na temperaturi 15 - 20 °C. U rastvor je dodato 2 g NaHCO₃. Tokom pripreme podloge, pH vrednost podloge je podešavana na 0,1 – 0,2 jedinica ispod željene pH vrednosti, koja iznosi 6,7 – 7,0. Podešavanje pH je vršeno rastvorima 1 M HCl i 1 M NaOH. Podloga je sterilisana takozvanom „hladnom sterilizacijom“, upotrebom membranskog filtra poroznosti 0.22 mikrona. U podlogu je dodato 10 % fetalnog govedeg seruma termički inaktivisanog na 56 °C, 30 minuta. Podloga je takođe opskrbljena penicilinom 192 IU/ml i streptomycinom 200 µg/ml, L-glutationom (3 mM), HEPES-om (25 mM) [97].

3.2.3. Sastav hranljivog medijuma DMEM

DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*) je modifikacija BME (engl. *Basal Medium Eagle*). Originalna formula je sadržala 1 g/l glukoze i korišćena je za kulture mišjih embrionalnih ćelija, a od tada je modifikovana na više načina da bi bila pogodna za primarne kulture mišjih i kokošijih ćelija, kao i za normalne i transformisane ćelije. Hemijski sastav DMEM podloge je sledeći (g/l) [98]:

Kalcijum-hlorid, anhidrovani	0,20000
------------------------------	---------

Holin-hlorid	0,00400
D-Kalcijum-pantotenat	0,00400
D-Glukoza, anhidrovana	4,50000
Gvožđe(III)-nitratnonahidrat	0,00010
Folna kiselina	0,00400
Glicin	0,03000
HEPES	5,95800
L-Arginin	0,08400
L-Cistin-dihidrohlorid	0,06300
L-Glutamin	0,58400
L-Histidin-hidrohloridmonohidrat	0,04200
L-Izoleucin	0,10500
L-Leucin	0,10500
L-Lizin-hidrohlorid	0,14600
L-Metionin	0,03000
L-Fenilalanin	0,06600
L-Serin	0,04200
L-Treonin	0,09500
L-Triptofan	0,01600
L-Dinatrijum-tirozinhidrat	0,10400
L-Valin	0,09400
Magnezijum-sulfat, anhidrovan	0,09767
Mio-Inozitol	0,00720
Niacinamid	0,00400
Fenol-crveno, natrijumova so	0,01500
Kalijum-hlorid	0,40000
Piridoksinhidrohlorid	0,00400
Riboflavin	0,00040
Natrijum-bikarbonat	3,70000
Natrijum-hlorid	4,75000

Dinatrijumhidrogen-fosfatmonohidrat	0,12500
Tiamin-hidrohlorid	0,00400

3.2.4. Priprema DMEM hranljive podloge

Praškasta DMEM podloga se rastvara u sterilnoj destilovanoj vodi uz mešanje na temperaturi 15 - 20 °C. Tokom pripreme podloge, pH vrednost podloge je podešavana na 0,1 – 0,3 jedinice ispod željene pH vrednosti, koja iznosi 6,9, a podešavanje pH je vršeno rastvorima 1 M HCL i 1 M NaOH. Podloga je sterilisana takozvanom „hladnom sterilizacijom“, upotrebom membranskog filtra poroznosti 0,22 mikrona. U podlogu je dodato 10 % fetalnog goveđeg seruma termički inaktivisanog na 56 °C, 30 minuta. Podloga je takođe opskrbljena penicilinom 192 IU/ml, streptomycinom 200 µg/ml, L-glutationom (3 mM), i HEPES-om (25 mM) [98].

3.2.5. Postupak održavanja kulture ćelija

Kultura ćelija se održava kao monosloj u odgovarajućoj hranljivoj podlozi. Kultura ćelija se gaji u inkubatoru na temperaturi 37 °C, u atmosferi vazduha sa 5 % CO₂, zasićenog vodenom parom (Flow Laboratories, CO₂ inkubator 220). Za gajenje ćelija korišćeni su polietilenski sudovi, zapremine 50 – 450 ml, odnosno površine dna 25 - 225 cm². Održavanje ćelija u monosloju postignuto je presejavanjem ćelija u svežu podlogu, tj. „pasažiranjem“, svakih 4 - 5 dana.

Pasažiranje ćelija je obavljano u sterilnoj komori, uz korišćenje sterilnih laboratorijskih sudova i nošenje zaštitne laboratorijske opreme. Pasažiranje se vrši kada ćelije potpuno prekriju dno suda, ili kada se istroše nutrijenti podloge, na šta ukazuje indikator promene pH podloge [99].

3.2.6. Postupak pasažiranja kultura ćelija

Kada je dno suda potpuno prekriveno monoslojem ćelija ili kada su nutritivne materije iz podloge potpuno potrošene, na šta može da nam ukaže boja podloge, podloga se odliva iz falkona. Dno falkona na kome su zalepljene ćelije ($V = 50$ ml) je isprano sa 3 ml 0,25 % rastvora tripsina zagrejanog do $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u vodenom kupatilu. Zatim se nalije 5 ml 0,25 % rastvora tripsina i inkubira na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 - 5 minuta. Promena morfologije ćelija je praćena pod svetlosnim mikroskopom, na uveličanju 20/0,40 (50 puta). Kada su ćelije počele da se zaokrugljuju, sadržaj iz boćice je špricom prenešen u epruvetu u kojoj se već nalazi 2 ml hranljive podloge. Antitripsin prisutan u podlozi neutrališe dalje dejstvo tripsina na prenete ćelije. Ćelije stoje još 3 - 5 minuta u termostatu na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i resuspenduju se u toj podlozi pomoću šprica. Jedna zapremina suspenzije ćelija je vraćena u sud za gajenje ćelija, dopunjena svežom podlogom do zapremine $V = 15$ ml i sud je vraćen u inkubator na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Preostala suspenzija ćelija je korišćena za eksperimente *in vitro* [99].

3.3. Postupak ispitivanja antiproliferativnog potencijala kompleksa rutenijuma(II)

3.3.1. Postupak određivanja vijabilnosti ćelija

Analiza vijabilnosti ćelija *in vitro* zasniva se na razumevanju procesa rasta i proliferacije, što podrazumeva i pravilno određivanje broja ćelija [99]. Procena rasta kulture ćelija može se vršiti posmatranjem ćelija pod svetlosnim mikroskopom, dok kvantifikacija vijabilnosti zahteva određivanje taćnog broja ćelija na kojima se vrši eksperiment. Koncentracija ćelija u suspenziji može biti određena korišćenjem hemocitometra - optićki ravna komora za posmatranje ćelija pod mikroskopom. Ćelije se broje unutar obeleženih zona na komori, a broj ćelija po mililitru suspenzije, tj. hranljivog medijuma, određuje se na osnovu formule navedene u daljem tekstu.

Vijabilnost se definiše kao broj živih ćelija od ukupno 100 izabranih ćelija. Vijabilnost ćelija u ovom radu je određena metodom bojenja sa tripan-plavim (engl. *trypan*

blue) i zasniva se na osobini živih ćelija da izbacuju boju tripan-plavo i ostaju bezbojne, dok mrtve ćelije akumuliraju boju i postaju plavo obojene [99].

U 50 μ l suspenzije ćelija u hranljivoj podlozi dodato je 450 μ l rastvora boje tripan-plavo, tako da je finalna koncentracija boje 0,004 %. Obojena suspenzija ćelija je dobro promešana na vorteksu i 50 μ l ove suspenzije je preneseno automatskom pipetom na komoru za bojenje (Neubauer, Fife Depth Profounder; 0.100 mm; 0.0025 mm²).

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

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

N_s = prosečan broj ćelija po polju komore

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

3.3.2. Postupak ispitivanja antiproliferativnog potencijala rutenijum(II)-arenskih kompleksa MTT testom

Antiproliferativni potencijal ispitivanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa i cisplatine kao referentnog jedinjenja, utvrđen je kolorimetrijskim MTT testom na tri maligne ćelijske linije, dok je ispitivanje citotoksičnosti rutenijum(II)-arenskog kompleksa sa izohinolin-3-karboksilnom kiselinom kao ligandom i cisplatine urađeno na dodatnih šest malignih ćelijskih linija poreklom iz različitih tipova kancera [100, 101]. Takođe je ispitana i selektivnost toksičnog dejstva na uspostavljenim linijama normalnih humanih ćelija (Tabela 4). U testovima su korišćeni 10 mM štokovi ispitivanih kompleksa u DMSO-u. Ispitivani kompleksi su prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. Ispitivani rutenijum(II)-arenski kompleksi

RuT₁	η^6 - <i>p</i> -cimenchloro-3-metilpikolinato-rutenijum(II)
------------------------	--

RuT₂	η^6 - <i>p</i> -cimenhloro-5-brompikolinato-rutenijum(II)
RuT₃	η^6 - <i>p</i> -cimenhloro-6-fluorpikolinato-rutenijum(II)
RuT₄	η^6 - <i>p</i> -cimenhloro-6-hlorpikolinato-rutenijum(II)
RuT₅	η^6 - <i>p</i> -cimenhloro-6-brompikolinato-rutenijum(II)
RuT₆	η^6 - <i>p</i> -cimenhloro-6-metilpikolinato-rutenijum(II)
RuT₇	η^6 - <i>p</i> -cimenhloro-izohinolin-3-karboksilato-rutenijum(II)
CDDP	<i>cis</i> -[Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂]

MTT test je kolorimetrijski test kojim se određuje sposobnost živih ćelija da konvertuju tetrazolijum so (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid (MTT), žute boje, u formazanski precipitat, tamno crvene boje [101, 102]. MTT u ćeliji zapravo preuzima ulogu koenzima, tj. prima elektron u oksidoredukcionim reakcijama koje katalizuje enzim ciklusa glikolize sukcinat-dehidrogenaza. Tako se reakcija redukcije MTT-a odvija samo u metabolički aktivnim ćelijama. Nastali formazan apsorbuje u vidljivom delu spektra sa maksimumom apsorpcije oko 570 nm.

3.3.2.1. Konstrukcija kalibracione krive za MTT

Polazeći od suspenzije ćelija (za svaku ispitivanu ćelijsku liniju) u hranljivoj podlozi (10⁶/ml), formirana je serija razblaženja ove suspenzije, tako da broj ćelija/ml bude redom: 12500, 25000, 50000, 100000, 200000, 400000. U središnje bunarčice plastične ploče (engl. *cell culture plate*, NUNC) sa 96 bunarčica i ravnim dnom, zasejano je 100 μ l pripremljenog razblaženja. U preostale bunarčice ploče sipana je samo hranljiva podloga po 100 μ l, kao slepa proba.

Na ovaj način zasejane su dve ploče i ostavljene u inkubatoru na 37 °C, u atmosferi vazduha zasićenog parom, sa 5 % CO₂. U jednu ploču je nakon 4 h u svaki bunarčić sipano po 20 μ l MTT rastvora (5 mg MTT/ml u fiziološkom rastvoru). Nakon 4 h inkubacije dodato je 100 μ l rastvora 10 % SDS-a. Nakon 24 h izmerena je apsorbanacija na 570 nm na ELISA čitaču (Microplate reader, Behring EL 311). Na drugu ploču je nakon 20 h

inkubacije u svaki bunarčić sipano po 20 μ l MTT rastvora (5 mg MTT/ml u fiziološkom rastvoru). Nakon 4 h inkubacije dodato je 100 μ l rastvora 10 % SDS-a. Nakon 24 h izmerena je apsorbancija na 570 nm na ELISA čitaču. Na osnovu dobijenih apsorbancija formiran je grafik zavisnosti apsorbancije MTT reagensa u funkciji broja ćelija, za vreme inkubacije ćelija $t = 0$ h (T_0) i $t = 20$ h (T_{20}).

3.3.2.2. Postupak određivanja preživljavanja ćelija MTT testom

U središnje bunarčiće plastične ploče (cell culture plate, NUNC) sa 96 bunarčića sa ravnim dnom, u 100 μ L hranljive podloge zasejane su ćelijske linije u odgovarajućem broju: HeLa (3000 c/w), FemX (4000 c/w), A549 (5000 c/w), K562 (5000 c/w), MDA-MB-361 (7000 c/w), MDA-MB-453 (3000c/w), MDA-MB-231 (5000 c/w), MCF-7 (5000 c/w), LS-174 (7000c/w), MRC-5 (5000 c/w) i BEAS-2B (7000 c/w). Svaka ćelijska linija (sa svakim tretmanom) je analizirana u triplikatu, tj. na tri bunarčića sa ćelijama ostavljena su tri bunarčića u koje je sipana samo hranljiva podloga (slepa proba). Sve ćelije su gajene 24 h u inkubatoru na 37 °C, u atmosferi vazduha zasićenog parom, sa 5 % CO₂, osim K562, koje su ostavljene da se stabilizuju 4 h. Sve ćelijske linije na kojima su vršeni eksperimenti su adherentne, i zahtevaju period gajenja od 24 h pre stavljanja tretmana, da bi se adekvatno zalepile za dno bunarčića i otpočele sa rastom i proliferacijom, osim K562 ćelijske linije, koja se gaji u suspenziji, i zahteva samo period stabilizacije od 4 h, nakon čega je spremna za dodavanje tretmana.

Neposredno pre dodatka pojedinačnog kompleksa za svaki ispitivani kompleks napravljeni su 10 mM štokovi u DMSO-u (Sigma-Aldrich Co., St. Louis). Merenja su vršena na analitičkoj vagi sa tačnošću merenja na 4 decimale (Mettler H43). Polazeći od štoka ispitivanih kompleksa za svaki je formirana serija razblaženja u odgovarajućoj hranljivoj podlozi. Nakon 24 h od zasejavanja ćelija u bunarčiće (odnosno 4 h u slučaju K562 ćelijske linije), u bunarčiće sa ćelijama kao i u bunarčiće samo sa hranljivom podlogom (slepa proba) sipano je u triplikatu 50 μ l svakog razblaženja ispitivanog kompleksa. Razblaženja kompleksa **RuT₁ - RuT₆** u odgovarajućoj podlozi su formirana tako da finalne koncentracije kompleksa u bunarčiću ploče budu redom: 18,75; 37,5; 75;

150; 300 μM , dok su za kompleks **RuT₇** razblaženja bila redom: 6,25; 12,5; 25; 50; 100 μM . Procenat DMSO po bunarčiću nije prelazio 1 %.

Ćelije se zatim inkubiraju sa ispitivanim agensima u inkubatoru sa 5 % CO_2 na 37 °C, tokom 48 h. Nakon inkubacije 20 μl MTT rastvora (5 mg MTT/ml u fiziološkom rastvoru) je dodato u svaki bunarčić. Nakon 4 h dodato je 100 μl rastvora 10 % SDS-a, a nakon 24 h očitana je apsorbancija na 570 nm.

3.3.2.3. Obrada podataka

Izračunavanja parametara koji karakterišu intenzitet citotoksičnog, odnosno citostatičkog dejstva ispitivanog agensa urađena su prema Monks-u [102]. Sa kalibracione krive za MTT je određeno u kom opsegu broja ćelija postoji linearna zavisnost apsorbancije na 570 nm od broja zasejanih ćelija po bunarčiću. Kasniji eksperimenti su rađeni u tom opsegu broja ćelija.

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

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

Konstruisan je dijagram preživljavanja ćelija (%) = f (koncentracija agensa) i iz navedene krive dobijen je podatak o koncentraciji agensa koji izaziva smanjenje preživljavanja ćelija za 50 %, što predstavlja IC_{50} vrednost.

3.4. Analiza promena distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa pod dejstvom ispitivanog rutenijum(II)-arenskog kompleksa metodom na protočnom citometru

Analiza ćelijskog ciklusa nakon inkubacije ćelija sa ispitivanim rutenijum(II)-arenskim kompleksom sa izohinolin-3-karboksilnom kiselinom kao ligandom (**RuT₇**) i cisplatinom (CDDP), vršena je na protočnom citometru (Becton Dickinson, CA, SAD) nakon bojenja tretiranih ćelija sa propidijum-jodidom (engl. *Propidium-Iodide*, *PI*) [103, 104]. Metoda se zasniva na određivanju sadržaja DNK po ćeliji, a koji je u funkciji faze ćelijskog ciklusa u kome se ćelija nalazi.

Ćelije (HeLa) u ekponencijalnoj fazi rasta, u gustini od 2×10^5 ćelija/Petri šolji (dimenzija 60 x 15 mm, NUNC), izložene su dejstvu ispitivanih kompleksa rastvorenih u odgovarajućoj podlozi, u koncentracijama $0,5 \times IC_{50}$ (22,7 μ M u slučaju **RuT₇**, 2,6 μ M u slučaju CDDP) i IC_{50} (45,4 μ M u slučaju **RuT₇**, 5,2 μ M u slučaju CDDP). Ćelije su inkubirane sa ispitivanim kompleksom i CDDP 24 i 48 h.

Nakon inkubacije sa ispitivanim kompleksom ćelije su isprane u fosfatnom puferu (PBS, pH 7,2) dva puta, nakon čega su resuspendovane u 200 μ l PBS-a. U suspenziju je dodato 2 ml ledenog 70 % etanola, uz blago vorteksovanje. Ćelije su inkubirane u etanolu na ledu, minimum 30 minuta. Nakon fiksacije u etanolu, ćelije su taložene centrifugiranjem na 2000 rpm/10 min. Supernatant je odliven, a talog resuspendovan u 800 μ l PBS-a. Suspenzija je inkubirana sa 100 μ l rastvora RNaze A koncentracije 1 mg/ml, na 37 °C, 30 minuta.

Nakon tretmana Rnazom A, uzorcima je dodato 100 μ l rastvora PI (400 μ g/ml) i ćelije su odmah analizirane na protočnom citometru. Analiza sadržaja DNK i ćelijskog ciklusa je vršena na FACS (engl. *Fluorescence - Activated Cell Sorting*) Calibur Becton Dickinson protočnom citometru, korišćenjem lasera argona sa ekscitacijom na 488 nm. DNK histogram je analiziran korišćenjem kompjuterskog softvera Cell Quest Pro.

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

Apoptozu karakterišu razne morfološke promene, kao što su promene na ćelijskoj membrani (gubitak asimetrije membrane), skupljanje ćelije, kondenzacija hromatina i internukleozomalno sečenje DNK. Promene na plazma membrani spadaju u rane promene na ćelijama koje podležu apoptozi, i uključuju između ostalog i translokaciju membranskog fosfolipida fosfatidil-serina (engl. *Phosphatidyl Serine, PS*), sa unutrašnje strane membrane na spoljašnju. Aneksin-V je 35 - 36 kDa Ca^{2+} -zavistan fosfolipid-vezujući protein koji ima visoki afinitet za PS. Aneksin-V može biti vezan za fluorohrome kao što je fluorescein - izotiocijanat (engl. *Fluorescein Isothiocyanate, FITC*). U toj formi aneksin V-FITC može poslužiti za analizu apoptoze na protočnom citometru [105, 106].

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

Ovakvo dvokolono bojenje omogućava razlikovanje:

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

Treba napomenuti da ovim testom nije moguće razlikovati ćelije koje se nalaze u kasnim fazama apoptoze od onih koje su umrle putem nekroze, jer se oba tipa ćelija boje obema bojama.

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

1×10^6 HeLa ćelija/ml je tretirano sa ispitivanim kompleksom **RuT₇** i CDDP u koncentracijama od $0,5 \times \text{IC}_{50}$ (22,7 μM u slučaju **RuT₇**, 2,6 μM u slučaju CDDP) i IC_{50}

(45,4 μM u slučaju **RuT₇**, 5,2 μM u slučaju CDDP). Čelije su inkubirane sa ispitivanim kompleksom i CDDP 24 h.

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

1. Čelije se isperu dva puta hladnim PBS-om
2. Isprane ćelije se resuspenduju u puferu za vezivanje aneksina i prebaci se 100 μl rastvora u epruvetu za protočni citometar (zapremine 5 ml)
4. Zatim se doda 5 μl aneksin V-FITC-a i 5 μl PI.
5. Čelije se blago vorteksiraju i inkubiraju 15 min na sobnoj temperaturi (25 °C) u mraku.
6. Nakon inkubacije, u svaku epruvetu se dodaje 400 μl pufera za vezivanje aneksina (10 mM Hepes/NaOH (pH 7,4), 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) i nakon blagog vorteksiranja pripremljeni rastvor se analizira korišćenjem FACS Calibur Becton Dickinson protočnog citometra i Cell Quest kompjuterskog softvera u toku narednog sata.

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

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

3.6. Morfološka analiza ćelijske smrti na fluorescentnom mikroskopu

Akridin oranž/etidijum bromid (AO/EB) bojenje je metoda koja omogućuje razlikovanje živih od apoptotskih i nekrotičnih ćelija na fluorescentnom mikroskopu.

Akridin oranž (AO) je katjonska boja koja boji žive i rano apoptotske ćelije, odnosno sve ćelije kod kojih je očuvan integritet membrane. Ona interaguje sa DNK i RNK pseudointerkalacijom i elektrostatičkim privlačenjima, i ulazi u odeljke ćelije sa niskom pH vrednošću gde postaje protonizovana, i na ovaj način boji nukleus u zelenu boju. Žive ćelije i ćelije u ranoj fazi apoptoze se razlikuju po tome što se kod ćelija u ranoj fazi apoptoze

može uočiti karakteristična kondenzacija hromatina, i promena oblika nukleusa. Sledeću fazu odlikuje fragmentacija nukleusa i stvaranje ispupčenja na površini membrane, a finalno dolazi do fragmentacije ćelije i nastanka apoptotskih tela.

Etidijum bromid (EB) boji ćelije čiji je membranski integritet narušen, tj. kasno apoptotske i nekrotične ćelije. Ovo aromatično jedinjenje je interkalirajući agens koji ne može proći kroz membranu živih ćelija. Iako je ovo jedinjenje fluorescentno i njegovu fluorescenciju je uvek moguće uočiti nakon izlaganja ultraljubičastom svetlu, njegova fluorescencija se povećava skoro dvadeset puta nakon vezivanja za molekul DNK. Etidijum bromid može bojiti jedino ćelije čiji je integritet membrane narušen, što znači ćelije kod kojih dolazi do primarne ili sekundarne nekroze. Nekrotične ćelije odlikuje postojanje dobro očuvanog nukleusa, koji je narandžasto obojen, i tek u kasnijim fazama nekroze dolazi do njegove dezintegracije i ispuštanja sadržaja [107].

U Petri šolje sa ubačenim pokrovnim staklom (dimenzija 60 x 15 mm, NUNC) u RPMI medijumu pH vrednosti 7,2 zasađeno je $1,5 \times 10^5$ HeLa ćelija po Petri šolji. Ćelije su ostavljene jedan dan u inkubatoru sa 5 % CO_2 i nakon toga tretirane kompleksom rutenijuma i cisplatinom u koncentracijama jednakim $0,5 \times \text{IC}_{50}$. Ćelije su inkubirane sa ispitivanim kompleksima na 37 °C, u inkubatoru sa 5 % CO_2 u trajanju od 3, 5 i 24 h. Po završetku inkubacije pod svetlosnim mikroskopom analizirane su morfološke promene ćelija. Ćelije koje su se odlepile sa dna suda, odlivene su zajedno sa medijumom u epruvetu. Ćelije koje su ostale prilepljene za pokrovno staklo uronjene su na nekoliko sekundi u Petri šolje sa pripremljenim razblaženjem akridin-oranža (3 $\mu\text{g/ml}$) i etidijum-bromida (10 $\mu\text{g/ml}$) i nakon toga posmatrane su pod fluorescentnim mikroskopom (Carl Zeiss PALM MicroBeam sa Axio Observer.Z1) opremljenim AxioCam MRm kamerom (filteri Alexa Fluor 489 i Alexa Fluor 546), kroz Fluar 10x/0,30 M27 i LD Plan-NeoFluar 40x/0,60 Corr Ph2 M27 objektivne. Fotografije su napravljene pomoću softvera AxioVision imaging software Version 4,7 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

3.7. Analiza ukupne intraćelijske akumulacije rutenijuma metodom ICP-MS

Nivo rutenijuma(II) u ukupnoj ćelijskoj frakciji određen je korišćenjem ICP-MS (engl. *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*) za uzorke HeLa ćelija. Nivo rutenijuma je određen u ćelijskom talogu nakon što su uzorci pripremljeni prema standardnoj proceduri za ICP-MS korišćenjem aparata Thermo Scientific iCAP Qc ICP-MS (Thermo Scientific, Bremen, Germany) [108].

3.7.1. Priprema uzoraka

RuT₇ kompleksom u koncentraciji jednakoj IC₅₀ vrednosti (45,4 μM) je tretirano 1 x 10⁶, 0,7 x 10⁶ i 0,5 x 10⁶ HeLa ćelija sađenih u posudama za gajenje od 25 cm³ (NUNC). Tretman je primenjivan u trajanju od 6, 24 i 48 časova.

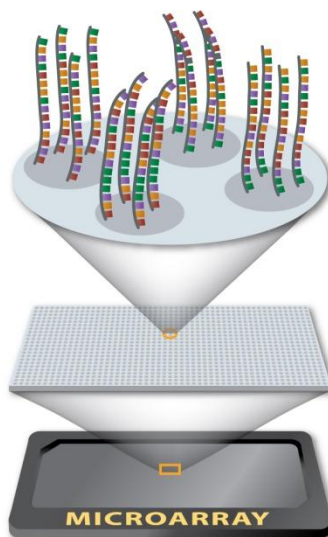
3.7.2. Priprema ćelijskog taloga

Nakon tretmana HeLa ćelije su pokupljene i pripremljene za brojanje, u cilju određivanja broja ćelija u svakom od uzoraka. Zatim su ćelije isprane u PBS-u i centrifugirane na 2000 rpm, 10 min, na 4 °C, nakon čega je talog ćelija zamrznut na -80 °C. Nivo rutenijuma je određen u ukupnom ćelijskom talogu, nakon što su uzorci pripremljeni za ICP-MS prema standardnoj proceduri korišćenjem Thermo Scientific iCAP Qc ICP-MS (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Rezultati su izraženi prema broju ćelija u svakom od uzoraka.

3.8. Analiza promena u genskoj ekspresiji HeLa ćelija pod uticajem tretmana RuT₇ kompleksom mikroerej metodom

Humani genom se sastoji od približno 19000 protein-kodirajućih sekvenci (gena) [109]. U svakom trenutku, u različitim tipovima ćelija aktivna je različita kombinacija gena. DNK mikroerej (engl. *DNA microarray*) je metoda koja omogućava istovremenu analizu promena u genskoj ekspresiji hiljade gena poznate i nepoznate funkcije [110].

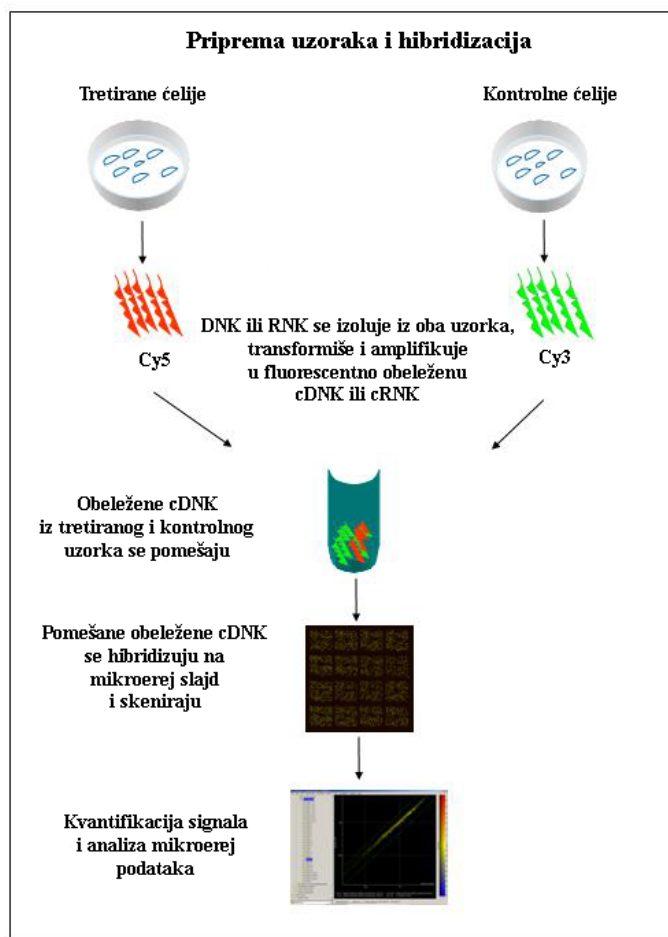
DNK mikroerej tehnologija se zasniva na upotrebi nekoliko hiljada tačno određenih sekvenci (pa čak i celog humanog transkriptoma) koje su vezane za stakleni ili silikonski čip, ili najlonsku membranu. Svaka od navedenih sekvenci predstavlja fragment genomske DNK, cDNK, PCR produkta ili hemijski sintetisanog oligonukleotida do 70 nukleotida, i predstavlja jedan gen. Obično jedan DNK mikroerej slajd/čip može sadržati na hiljade tačaka, od kojih svaka odgovara jednom genu, koje zajedno mogu sačinjavati ceo transkriptom nekog organizma. U okviru jedne tačke koja predstavlja tačno određenu sekvencu ili gen, nalazi se određeni broj identičnih kopija te sekvence (Slika 12). Princip mikroerej eksperimenta počiva na hibridizaciji sekvenci DNK u uzorku sa komplementarnim sekvencama koje se nalaze na mikroerej slajdu. Precizna lokacija i sekvenca svake tačke se nalazi u bazi podataka kompjuterskog softvera [111].



Slika 12. Princip mikroerej tehnologije (preuzeto sa <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/microarray/>)

Standardni dizajn mikroerej eksperimenta se sastoji u poređenju profila ekspresije uzorka koji je bio izložen određenim eksperimentalnim uslovima (npr. ćelije pod dejstvom tretmana) i kontrolnog uzorka (Slika 13). Nakon obeležavanja DNK poreklom od uzoraka čiji se profili ekspresije porede, pristupa se hibridizaciji te DNK sa komplementarnim DNK sekvencama koje se nalaze na mikroerej slajdu. Nakon ispiranja viška nehibridizovane

DNK, mikroerej slajdovi se skeniraju i dobijeni rezultati se obrađuju bioinformatičkim metodama [112].



Slika 13. Eksperimentalni dizajn mikroerej eksperimenta (prilagođeno prema

<http://grf.lshtm.ac.uk/microarrayoverview.htm#top>

3.8.1. Postavka eksperimenta i izolacija RNK

1×10^6 i $0,7 \times 10^6$ HeLa ćelija/ 25 cm^3 posude za gajenje ćelija (NUNC) je tretirano sa ispitivanim **RuT₇** kompleksom i cisplatinom 12 i 24 h, u koncentraciji jednakoj $0.5 \times \text{IC}_{50}$ vrednosti ($22,7 \mu\text{M}$ u slučaju **RuT₇**, $2,6 \mu\text{M}$ u slučaju CDDP). U kontrole je dodat samo hranljivi medijum, a svaki eksperiment je rađen u triplikatu. Nakon isteka perioda inkubacije, ćelije su sakupljene procesom tripsinizacije, isprane od ostataka medijuma

ledeno hladnim PBS-om, centrifugirane 10 min na 2000 rpm pri temperaturi od 4 °C, nakon čega je ćelijski talog zamrznut na -80 °C. Ukupna RNK je izolovana iz ćelijskog taloga korišćenjem TRIzol[®] reagensa (Invitrogen) prema protokolu proizvođača (http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00001/BTN_A_000112401_O_1292a.pdf). Ukupna RNK svakog uzorka je kvantifikovana spektrofotometrijski (BioSpec Nano, Shimadzu Scientific Instruments) merenjem apsorbance na 260 nm. Odnos apsorbanci A260/A280 je korišćen za procenu čistoće izolovane RNK. Kako bismo utvrdili kvalitet RNK, urađena je gel elektroforeza (Pharmacia Biotech) na 2 % agaroznom gelu sa etidijum bromidom. RNK uzorci su mešani sa ksilen cijanol bojom (0,25 % ksilen cijanol boje u 30 % glicerolu u vodi) i pušteni u 0,5 x TBE puferu 50 minuta na 25 mA. RNK trake su vizuelizovane na UV transiluminatoru (Hoefler).

3.8.2. Obeležavanje uzoraka i *microarray* hibridizacija

Korišćenjem Low Input Quick Amp Labeling Kita (Agilent Technologies) 100 ng ukupne RNK svakog uzorka je umnoženo i obeleženo Cijanin-3 fluorescentnom bojom (engl. *Cyanine-3*, *Cy3*). Fluorescentno obeleženi uzorci su prečišćeni upotrebom QIAGEN's RNeasy Mini Spin kolona, eluirani u 30 µl destilovane vode u kojoj nema nukleaza. Količina komplementarne RNK kao i stepen ugradnje Cy3 boje su određeni pomoću BioSpec Nano spektrofotometra (Shimadzu Scientific Instruments). Za gensko profilisanje su korišćeni Agilent SurePrint G3 Hmn GE 8x60 K mikroerej slajdovi, koji pokrivaju 27958 gena iz Entrez baze podataka, kao i 7419 molekula dugih, nekodirajućih RNK. Hibridizacija uzoraka sa mikroerej slajdovima je urađena prema protokolu proizvođača. Za svaki od uzoraka (kontrola, tretman **RuT₇**, tretman CDDP) je urađena hibridizacija u triplicatu za oba vremena inkubacije (12 i 24 h), tako da se ekperiment sastojao od ukupno 18 uzoraka. Fragmentacija na 60 °C u trajanju od 1 h je odrađena sa 600 ng cRNK obeležene Cy3 bojom svakog uzorka, nakon čega su uzorci podvrgnuti hibridizaciji na 65 °C u trajanju od 17 h. Nakon toga mikroerej slajdovi su isprani prema protokolu proizvođača i skenirani na Agilent SureScan Microarray skeneru (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Slike su obrađene pomoću Agilent Feature

Extraction v.11 programa. Pouzdanost i ponovljivost svakog mikroereja su provereni pomoću Quality Control izveštaja, nakon čega su dva uzorka izbačena iz dalje analize.

3.8.3. Obrada i analiza podataka

Izvorni podaci su uvezeni pomoću programa Agilent GeneSpring, obeležene i kontrolne probe su filtrirane. Zatim je izvršena korekcija za pozadinski šum, kao i normalizacija putem skaliranja na 75. percentil uz logaritamsku transformaciju sa logaritmom osnove 2. U okviru proba bilo je najmanje 70 % obeleženih, dok je 20 % slabo eksprimiranih proba odbačeno, čime je ostao ukupan broj od 41929 proba. Kontrola kvaliteta je sprovedena analizom glavnih komponenti (engl. *Principal component analysis*) i preko matrice korelacija. Ukupno tri replike su bile van opsega, i one su odbačene iz daljih analiza. Geni čija je ekspresija pokazala značajnost, testirani su putem moderisanog t-testa (engl. *moderated t-test*), sa pragom od 0,05 FDR (engl. *False discovery rate*) za korekciju p-vrednosti (Benjamini and Hochberg) i *fold change* (FC)¹ koji je veći od 2. Procenjen nivo značajnosti korigovan je za test višestrukih hipoteza korišćenjem Benjamini and Hochberg podešavanja lažno pozitivnih rezultata [113]. Srednja standardna devijacija proba je izračunata i podaci su filtrirani tako da se odbace rezultati sa srednjom standardnom devijacijom manjom od 1. Nadgledano hijerarhijsko klasterovanje sa Pirsonovim necentriranim koeficijentom korelacije urađeno je softverom *Cluster 3.0*, dok je za vizuelizaciju dobijenih podataka upotrebljen *JavaTreeView* (program je dostupan na sajtu <http://jtreeview.sourceforge.net>).

Kako bi se posmatrale razlike ekspresionih profila tokom vremena između ćelija koje su tretirane **RuT₇** kompleksom i kontrolne grupe ćelija, upotrebili smo algoritam *MaSigPro* [114, 115] koji je implementiran zajedno sa programom *Babelomics 4,0* na bioinformatičkom sajtu (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>). *MaSigPro* koristi pristup baziran na dvostepenoj regresiji kako bi identifikovao različito eksprimirane gene u različitim uzorcima (kontrola, tretmani) u toku vremena. Prvo je za eksperimentalne grupe

¹ Fold change - veličina koja opisuje koliko se neko svojstvo menja od inicijalne do krajnje vrednosti u kvantitativnom smislu

(kontrolne ćelije i ćelije tretirane sa **RuT₇**) upotrebljen uopšteni regresioni model za podatke. Različito eksprimirani geni, identifikovani su preko jeste-nije promenljivih (engl. *dummy variables*), preko tehnike najmanjih kvadrata. Nakon toga, selektovani su geni sa značajnom promenom u ekspresiji, i primenjena je metoda odbacivanja lažno pozitivnih rezultata [113]. U drugom koraku analize, stepenasta regresija (engl. *stepwise regression*) je upotrebljena na selektovanim genima kao deo strategije za selekciju promenljivih kako bi se proučile razlike između eksperimentalnih grupa i pronašla statistička značajnost između različitih profila ekspresije. Nakon toga, dodatno filtriranje gena urađeno je preko R^2 modela stepenaste regresije. Odabrani geni su podeljeni u klastere sa sličnim tipom ekspresije koji je određen regresionim modelom. Grafici putanje su korišćeni radi vizuelizacije vremenski zavisne promene genske ekspresije između kontrolne i tretirane grupe ćelija. Set podataka sa mikroereja javno je dostupan kao deo *GEO* baze podataka <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/info/linking.html> (*GEO accession number, GSE72905*).

3.8.4. Funkcionalna analiza lista gena

Ingenuity Pathway Analysis® software (IPA, Ingenuity Systems, Redwood City, CA), je upotrebljen kako bi se stekao uvid u globalne molekulske mreže i kanonske puteve koji se značajno razlikuju kod različito eksprimiranih gena u eksperimentima sa ćelijama koje su tretirane **RuT₇** kompleksom i CDDP u periodima inkubacije od 12 i 24 h. Rangiranje gena je urađeno preko moderisanog t-testa i q-vrednosti, sa apsolutnim modom za sortiranje gena u okviru liste. Liste gena su filtrirane kako bi se redukovao broj gena, u skladu sa preporukama IPA, a što je bazirano na q-vrednosti i FC razlici u ekspresiji. Granice vrednosti za merenja koja se odbacuju bile su $q < 0,01$ i $FC > 11$ za kontrola - CDDP za vreme tretmana od 12 i 24 h. Na taj način, konačna lista gena je svedena na 1908 gena za vreme tretmana od 12 h i 2163 gena za vreme tretmana od 24 h. Granice vrednosti merenja koja se odbacuju bile su $q < 0,01$ i $FC > 6$ za kontrola - **RuT₇**, za trajanje tretmana od 12 h i $q < 0,01$ i $FC > 63$ za kontrola - **RuT₇**, za trajanje tretmana od 24 h. Definisani opseg vrednosti je filtriranjem ukupnog broja gena sveo listu na 846 gena za vreme tretmana od 12 h i 2026 gena za vreme tretmana od 24 h. Setovi gena su definisani na osnovu poznatih i

objavljenih podataka iz date oblasti, koji su javno dostupni preko baza podataka, kao što su baza biohemijskih puteva *KEGG* (*KEGG*, *Biocarta*, *Reactome*). Takođe, setove gena je bilo moguće odrediti i na osnovu rezultata genske koekspresije iz prethodnih eksperimenata. Rezultati su prečišćeni i ubačeni u Ingenuity Knowledge bazu podataka (*Ingenuity Knowledge Database*[®]). Lažno pozitivni rezultati, definisani q-vrednošću, izračunati su programom *IPA*. Biohemijski putevi čiji je FDR < 0,05 smatrani su značajno obogaćenim u odnosu na sve poređene klase puteva. Putevi koji su imali manje od 15, odnosno više od 500 genskih članova, su bili eliminisani iz dalje analize. Lista gena je preklapljena i upoređena sa globalnom mrežom gena koja je dostupna u *IPA* bazi podataka (*IPA knowledge base – IPKB*). Za analizu dobijenih mreža, *IPA* izračunava skor ($p - score = -\log_{10}(p - value)$) u skladu sa fitovanjem seta pomoćnih gena i listom bioloških funkcija koje se mogu pronaći u *IPKB*. Skor uzima u obzir broj gena u mreži kao i veličinu same mreže kako bi opisao stepen relevantnosti te mreže u odnosu na početnu listu gena, dajući na taj način prioritet tim mrežama u daljim analizama. Skor veći od 3 ($p < 0,001$) ukazuje da sa intervalom poverenja > 99,9 % mreža gena nije stvorena slučajnošću. Funkcionalna analiza identifikovala je biološke funkcije i kanonske signalne puteve koju imaju najveću značajnost za analizirani set podataka. Značajnost povezivanja između seta ulaznih podataka i funkcije signalnih puteva opisana je sa dva parametra: (1) odnos broja gena iz seta podataka koji se mapira sa funkcijom/signalnim putem podeljen sa ukupnim brojem gena koji se mapiraju sa funkcijom/signalnim putem; (2) P - vrednost, izračunata Fišerovim testom kojim se određuje verovatnoća da povezanost gena iz seta podataka i funkcionalnog/signalnog puta bude slučajnost. *IPA Core Analysis* urađena je za svaki tip tretmana i svaku vremensku tačku, čime se omogućuje analiza bioloških promena tokom vremena i između različitih tretmana. *IPA Tox Analysis* je urađena sa ciljem predviđanja profila toksičnosti za ciljane organske sisteme i fiziološke funkcije, kao i da bi se procenila bezbednost upotrebe **RuT₇** kompleksa. Pored toga, urađena je i *Tox Comparison Analysis*, kako bi se uporedili profili toksičnosti između **RuT₇** i CDDP u tretmanima koji su trajali 12 i 24 h i razumeli biohemijski putevi toksičnosti svakog tretmana.

Kako bi se identifikovali statistički značajno zastupljeni Gene Ontology (GO) termini u listama gena koji pripadaju specifičnim klasterima, upotreбили smo *GOEAST - Gene*

Ontology Enrichment Analysis Software Toolkit [116]. P – vrednost za zastupljenost GO termina je izračunata korišćenjem hipergeometrijske raspodele verovatnoće i podešavanjem za višestruko testiranje kontrolisanjem FDR parametra po proceduri Benjamini–Hochberg–Yekutieli [117], i pragom značajnosti podešenim na 0,01 FDR .

4. REZULTATI

4.1. Citotoksičnost ispitivanih kompleksa

Citotoksični potencijal novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa ispitan je inicijalno korišćenjem MTT testa na panelu od četiri ćelijske linije - tri tumorske (HeLa, A549, FemX) i jednoj normalnoj ćelijskoj liniji (MRC-5) (Tabela 4). Pored serije od sedam rutenijum(II)-arenskih kompleksa, korišćena je i CDDP kao referentno jedinjenje. Rezultati su prikazani kao IC_{50} vrednosti i predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm standardna devijacija, pri čemu je svaki eksperiment rađen u triplikatu.

Rezultati citotoksičnosti pokazuju da kompleksi **RuT₃** - **RuT₆**, gde su ligandi fluoro, hloro, bromo ili metil derivati pikolinske kiseline, sa supstituentima na poziciji 6 prstena pikolinske kiseline, pokazuju odsustvo ili vrlo slabu citotoksičnu aktivnost u ispitivanom opsegu koncentracija (do 300 μ M). Kompleksi **RuT₁** i **RuT₂**, sa metil grupom na poziciji 3 i bromo supstituentom na poziciji 5 piridinskog prstena, pokazuju slabu citotoksičnost sa IC_{50} vrednostima do 190,1 μ M. U odnosu na ostale komplekse iz serije, **RuT₇**, sa izoholin-3-karboksilnom kiselinom kao ligandom (koja se može smatrati derivatom pikolinske kiseline sa fuzionisanom fenil grupom), na inicijalnom ispitivanju citotoksičnosti na tri tumorske i jednoj normalnoj ćelijskoj liniji je pokazao izraženu citotoksičnu aktivnost, sa IC_{50} vrednostima od 18,5 μ M na FemX ćelijskoj liniji, pa do 84,2 μ M na normalnoj ćelijskoj liniji MRC-5. Treba istaći selektivnost u dejstvu ovog kompleksa prema tumorskim ćelijskim linijama u odnosu na normalnu liniju plućnih fibroblasta, MRC-5. U odnosu na ovu ćelijsku liniju, **RuT₇** pokazuje i do 5 puta jaču citotoksičnost (FemX) na tumorskim ćelijskim linijama.

Posebno je zanimljiva citotoksična aktivnost ispitivanog rutenijum(II)-arenskog kompleksa prema ćelijskoj liniji adenokarcinoma pluća (A549), gde je IC_{50} vrednost u nivou one određene za CDDP. Značaj ovakvog rezultata se ogleda u tome što se ova linija karakteriše povećanom rezistencijom na tretman citotoksičnim agensima, a u slučaju tretmana **RuT₇** kompleksom pokazuje tri puta veću senzitivnost u odnosu na normalnu

ćelijsku liniju (MRC-5). Nasuprot tome, CDDP je pokazala dva puta veću citotoksičnost na normalnim ćelijama fibroblasta u odnosu na A549 ćelijsku liniju.

Rezultati MTT testa ukazuju na to da se iz serije novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa po svojoj aktivnosti na svim ispitanim ćelijskim linijama izdvaja kompleks sa izohinolin-3-karboksilnom kiselinom kao ligandom (**RuT₇**). Rezultati citotoksičnosti na proširenom panelu ćelijskih linija tretiranih **RuT₇** kompleksom pokazuju da se IC₅₀ vrednosti kreću od 20,7 μM za MDA-MB-231 ćelijsku liniju, do 54,3 μM za LS-174 kao najrezistentniju ispitanu tumorsku ćelijsku liniju na dejstvo ovog kompleksa (Tabela 5). U poređenju sa normalnom ćelijskom linijom MRC-5 sve ispitane tumorske linije iz proširenog panela pokazuju veću senzitivnost na tretman ovim kompleksom, a posebno se ističe senzitivnost ćelijskih linija adenokarcinoma dojke (MDA-MB-231, MDA-MB-361 i MDA-MB-453), sa IC₅₀ vrednostima od 20,7 do 27,8 μM. Sa druge strane, MCF-7, takođe metastatski adenokarcinom dojke, pokazuje nešto manju senzitivnost (39,4 μM).

Selektivnost u dejstvu **RuT₇** kompleksa prema ćelijskim linijama različitog tkivnog porekla se takođe ogleda u razlici u citotoksičnosti na dve normalne, zdrave ćelijske linije (MRC-5 i BEAS-2B). Iz dobijenih IC₅₀ vrednosti za MRC-5 (84,2 μM) i BEAS-2B ćelijsku liniju (36,2 μM) se vidi da je BEAS-2B linija, poreklom iz epitela pluća, dvostruko osetljivija na tretman **RuT₇** kompleksom od MRC-5, ćelijske linije fetalnih fibroblasta pluća. Nasuprot tome, tretman cisplatinom ne pokazuje selektivnost u okviru normalnih ćelijskih linija, koje su podjednako osetljive na ovaj citostatik.

Rezultati MTT testa ukazuju na to da se iz serije novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa po svojoj aktivnosti na svim ispitanim ćelijskim linijama izdvaja kompleks sa izohinolin-3-karboksilnom kiselinom kao ligandom (**RuT₇**). Dalje istraživanje je usmereno na izučavanje molekularnih mehanizama antiproliferativnog dejstva **RuT₇** kompleksa na HeLa ćelijskoj liniji.

Tabela 4. Rezultati citotoksičnosti rutenijum(II)-arenskih kompleksa i CDDP predstavljeni u vidu IC₅₀ vrednosti nakon 48 h inkubacije.

Ćelijska linija	HeLa	FemX	A549	MRC-5
	Kompleks			
	IC ₅₀ ^{48h} [μM]			
RuT₁	119,9 ± 13,7	36,5 ± 1,3	128,3 ± 12,7	190,1 ± 7,7
RuT₂	114,3 ± 16,1	73,8 ± 3,7	141,3 ± 16,1	144,0 ± 17,1
RuT₃	> 300	219,5 ± 12,5	> 300	> 300
RuT₄	> 300	> 300	> 300	> 300
RuT₅	> 300	> 300	> 300	> 300
RuT₆	278,4 ± 13,5	168,7 ± 19,9	> 300	> 300
RuT₇	45,4 ± 3,0	18,5 ± 1,9	25,8 ± 1,3	84,2 ± 5,7
CDDP	5,2 ± 0,3	10,8 ± 0,9	26,2 ± 5,4	12,1 ± 0,9

Tabela 5. Rezultati citotoksičnosti **RuT₇** i CDDP na proširenom panelu ćelijskih linija predstavljeni u vidu IC₅₀ vrednosti nakon 48 h inkubacije.

Kompleks	RuT ₇	CDDP
	Ćelijska linija	
	IC ₅₀ ^{48h} [μM]	
HeLa	45,4 ± 3,0	5,2 ± 0,3
FemX	18,5 ± 1,9	10,8 ± 0,9
A549	25,8 ± 1,3	26,2 ± 5,4
K562	38,4 ± 0,5	18,6 ± 3,3
MDA-MB-361	27,8 ± 3,5	14,7 ± 1,2
MDA-MB-453	25,5 ± 6,2	13,5 ± 2,6

MDA-MB-231	20,7 ± 0,6	29,8 ± 4,7
MCF-7	39,4 ± 1,1	17,0 ± 1,1
LS-174	54,3 ± 6,8	22,4 ± 7,2
MRC-5	84,2 ± 5,7	12,1 ± 0,9
BEAS-2B	36,2 ± 4,0	13,2 ± 1,3

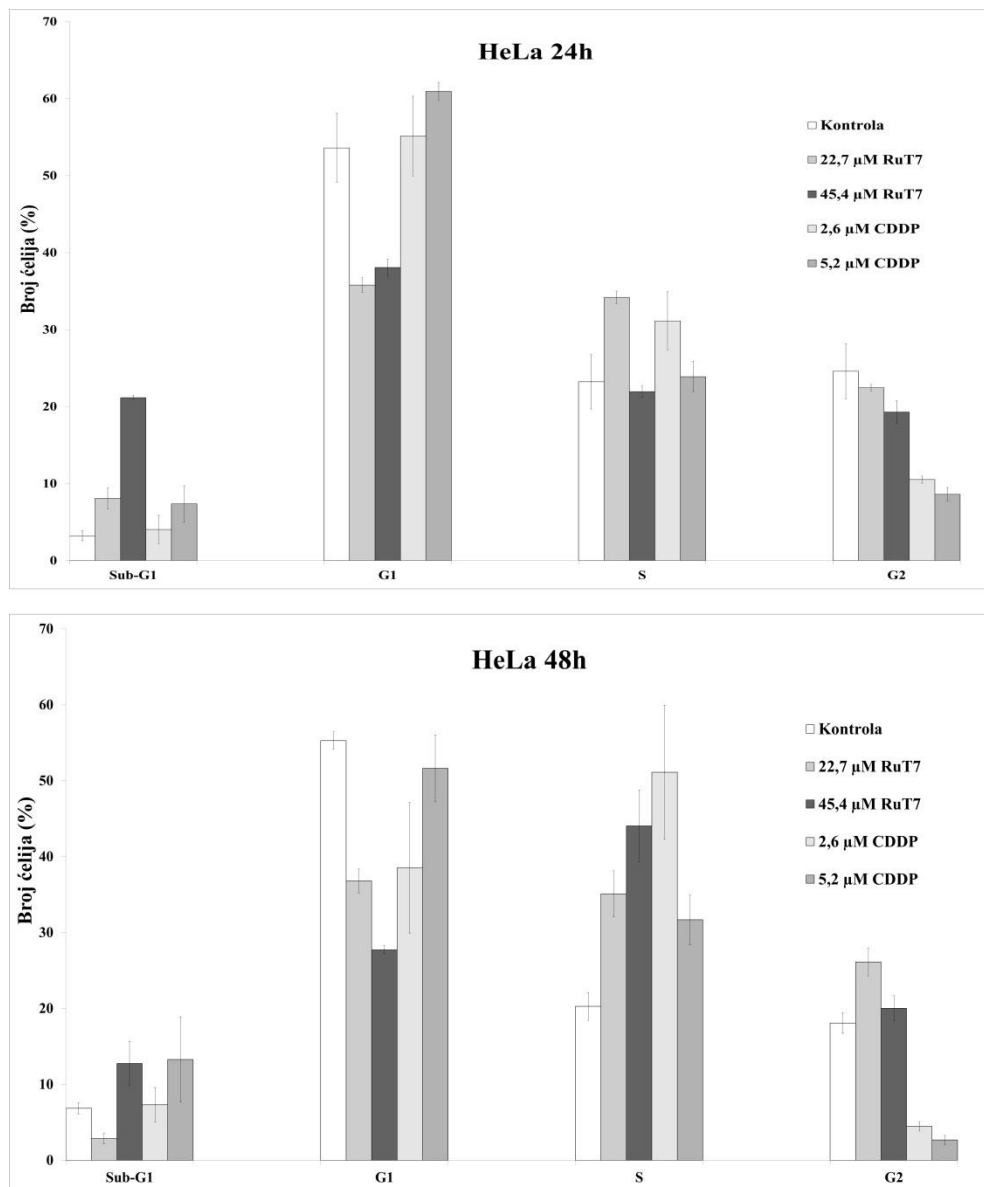
4.2. Rezultati analize ćelijskog ciklusa

U cilju utvrđivanja mehanizma citotoksičnog delovanja ispitivanog **RuT₇** kompleksa analiziran je njegov potencijal da izazove promene na nivou ćelijskog ciklusa HeLa ćelija na protočnom citometru. Metoda se zasniva na određivanju sadržaja DNK u ćeliji, koji je u funkciji faze ćelijskog ciklusa u kome se ćelija nalazi. CDDP je korišćena kao referentno jedinjenje. HeLa ćelije su tretirane 24 i 48 h ispitivanim kompleksom i CDDP u koncentracijama jednakim 0,5 x IC₅₀ i IC₅₀. Na Slici 14A prikazan je efekat delovanja kompleksa nakon tretmana u trajanju od 24 h, dok Slika 14B prikazuje efekat delovanja kompleksa nakon tretmana od 48 h.

Nakon tretmana od 24 h dolazi do porasta u procentu ćelija u sub-G1 fazi ćelijskog ciklusa u odnosu na kontrolnu populaciju ćelija, što je još izraženije sa porastom koncentracije **RuT₇** kompleksa (do 20 % pri koncentraciji od IC₅₀ = 45,4 μM, u poređenju sa kontrolom, 3 %) (Slika 14A). Takođe, nakon tretmana **RuT₇** kompleksom dolazi do primetne redukcije u broju ćelija u G1 fazi nezavisno od primenjene koncentracije (sa 53 % u kontroli na oko 35 % nakon tretmana), kao i do akumulacije HeLa ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa pri tretmanu sa nižom koncentracijom (0,5 x IC₅₀ = 22,7 μM). Ovakav efekat **RuT₇** kompleksa na ćelijski ciklus HeLa ćelija je sličan efektu koji indukuje cisplatina, koja takođe dovodi do zastoja ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa (sa 23 % u kontroli na 31 % pri koncentraciji od 0,5 x IC₅₀). Takođe, nakon tretmana cisplatinom dolazi do dvostrukog smanjenja broja ćelija u G2 fazi u poređenju sa kontrolnom populacijom, nezavisno od primenjene koncentracije. Nasuprot tome, daleko veći procenat

ćelija dospe u G2 fazu nakon tretmana **RuT₇** kompleksom (Slika 14A). Dobijeni rezultati ukazuju na potencijalne sličnosti i razlike u tipu interakcija sa DNK, njihovoj jačini ili mehanizmu i potencijalu popravke nastalih oštećenja na ovom molekulu.

Nakon 48 h tretmana HeLa ćelija **RuT₇** kompleksom zapaža se veliki pad u procentu ćelija u G1 fazi (do 27 % u poređenju sa kontrolom). Takođe se može primetiti dalja akumulacija ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa, koja se povećava sa rastom koncentracije **RuT₇** kompleksa, a smanjuje sa primenom veće koncentracije CDDP (Slika 14B). Ovde treba istaći da nakon tretmana **RuT₇** kompleksom, drastično veći procenat ćelija ulazi u G2 u poređenju sa tretmanom CDDP. Ovakav rezultat može ukazivati na razlike u mehanizmu dejstva između **RuT₇** kompleksa i CDDP, ili na razlike u odgovoru ćelija na tretman ovim jedinjenjima.



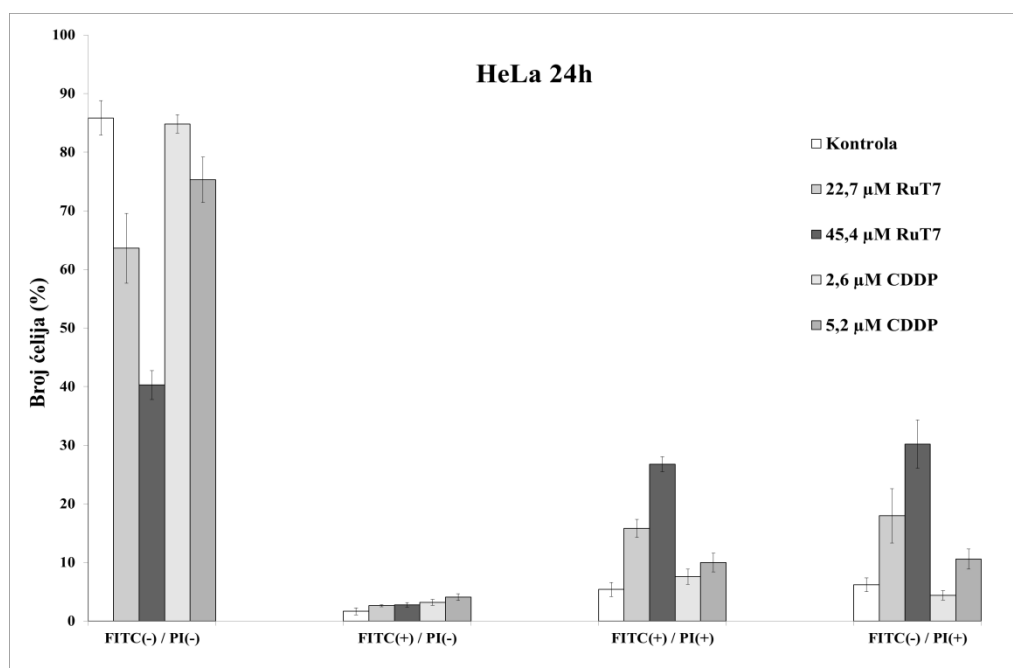
Slika 14. Distribucija HeLa ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h (A) i 48 h (B) kontinualnog tretmana **RuT₇** kompleksom i CDDP u koncentracijama jednakim 0,5 x IC₅₀ i IC₅₀. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama dobijene izvođenjem tri nezavisna eksperimenta

4.3. Rezultati analize apoptoze

Potencijal ispitivanog kompleksa da indukuje apoptozu HeLa ćelija ispitan je metodom protočne citometrije korišćenjem dvokolornog bojenja sa aneksin-V-FITC-om i propidijum-jodidom (princip metode opisan u poglavlju 3.5).

HeLa ćelije su 24 h tretirane **RuT₇** kompleksom i CDDP u koncentracijama jednakim 0,5 x IC₅₀ i IC₅₀ i rezultati u vidu procenta apoptotičnih ćelija prikazani su na Slici 15.

Nakon 24 h tretmana **RuT₇** kompleksom može se opaziti povećan broj ćelija u FITC(+)/PI(+) i FITC(-)/PI(+) subpopulacijama, dok istovremeno broj živih ćelija opada (FITC(-)/PI(-)), što je još više primetno nakon primene veće koncentracije **RuT₇** kompleksa (Slika 2). Tretman cisplatinom u istim eksperimentalnim uslovima nije uspeo da izazove slične efekte za dato vreme inkubacije.



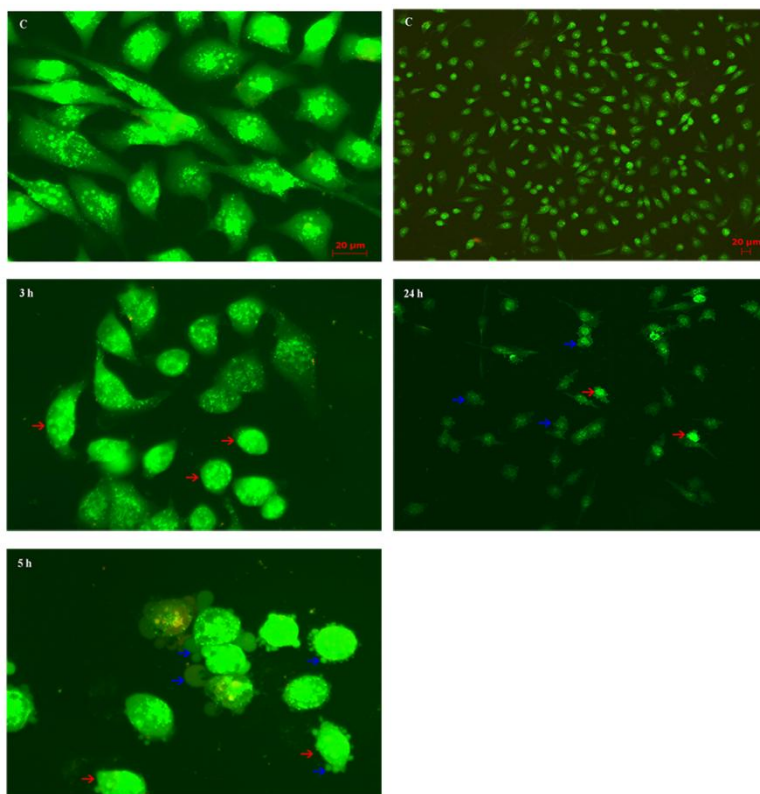
Slika 15. Potencijal indukovanja apoptoze **RuT₇** kompleksa i CDDP. Ćelije su tretirane 24 h **RuT₇** kompleksom u koncentracijama jednakim 0,5 x IC₅₀ i IC₅₀ (22,7 i 45,4 μM) i CDDP (2,6 i 5,2 μM); FITC(-)/PI(-) su žive ćelije, FITC(+)/PI(-) su rano apoptotične ćelije, FITC(+)/PI(+) su kasno apoptotične ili nekrotične ćelije i FITC(-)/PI(+) su mrtve ćelije.

Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama dobijene izvođenjem tri nezavisna eksperimenta

4.4. Rezultati morfološke analize ćelijske smrti na fluorescentnom mikroskopu

Morfološke karakteristike ćelijske smrti HeLa ćelija, indukovane ispitivanim **RuT₇** kompleksom u koncentraciji jednakoj $0,5 \times IC_{50}$ nakon 3, 5 i 24 h delovanja, analizirane su na fluorescentnom mikroskopu nakon bojenja tretiranih ćelija akridin-oranžom (AO) i etidijum-bromidom (EtBr) i reprezentativni rezultati su prikazani na Slici 16.

HeLa ćelije u kontrolnoj populaciji na fotomikrografijama su svetlo zeleno obojene, izdužene i vretenastog oblika. Već nakon 3 h inkubacije sa ispitivanim rutenijumskim kompleksom redukcija u broju ćelija je očigledna; takođe, dolazi do gubitka normalne morfologije ćelija i one se zaokrugljuju. Rani markeri apoptoze, kao što su smanjenje zapremine ćelije, kondenzacija i ekscentrično pozicioniranje nukleusa su uočljivi nakon tretmana **RuT₇** kompleksom. Nakon 5 h inkubacije uočava se najistaknutija morfološka promena na membranama HeLa ćelija, baloniranje membrane, što se može smatrati nedvosmislenom karakteristikom apoptotskih ćelija. Nakon 24 h na preostalim zalepljenim ćelijama se i dalje primećuju navedene morfološke karakteristike, iz čega se može zaključiti da ćelije i dalje prolaze kroz proces apoptoze, što može biti znak produženog dejstva **RuT₇** kompleksa.

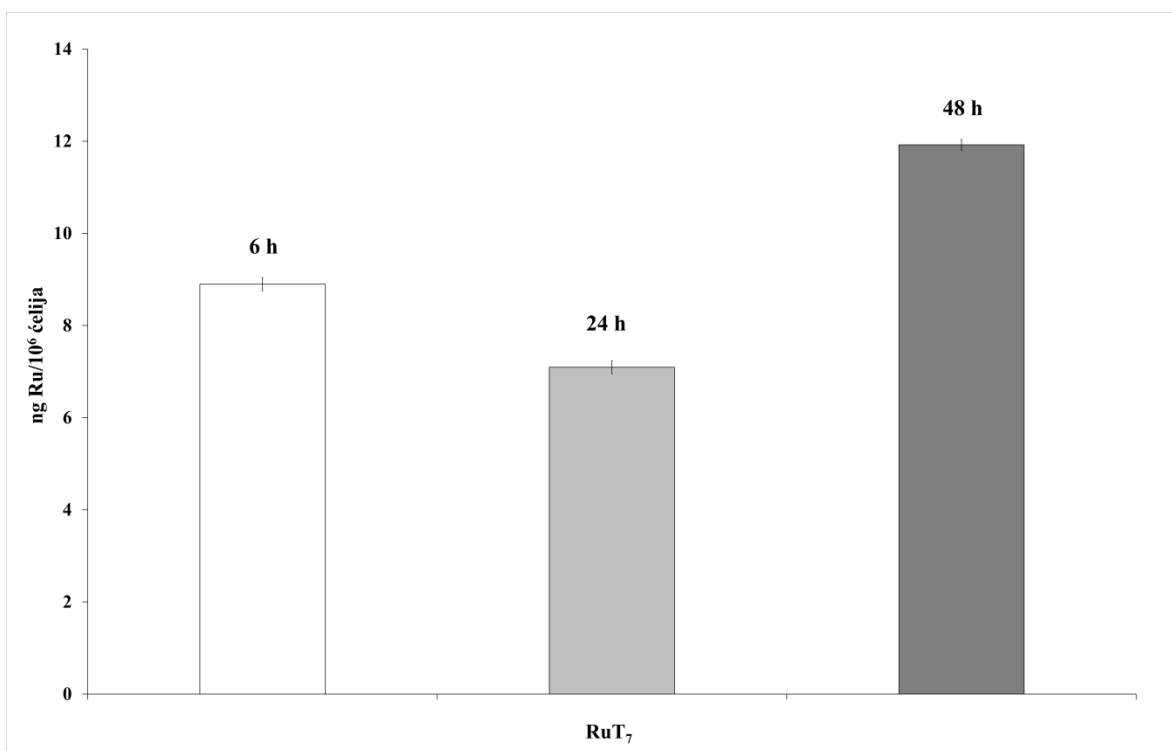


Slika 16. Fotomikrografije kontrolnih HeLa ćelija obojenih akridin-oranžom (AO) i etidijum-bromidom (EtBr) (C) i HeLa ćelija tretiranih 3 i 5 h **RuT₇** kompleksom (levo), i fotomikrografije kontrolnih HeLa ćelija obojenih akridin-oranžom (AO) i etidijum-bromidom (EtBr) (C) i HeLa ćelija tretiranih 24 h **RuT₇** kompleksom (desno). Crvene strelice označavaju smanjenje zapremine ćelije i kondenzaciju nukleusa; plave strelice označavaju baloniranje membrane. Skale uveličanja na gornjim slikama odgovaraju uveličanju na slikama ispod

4.5. Rezultati analize ukupne intraćelijske akumulacije rutenijuma

Metodom ICP-MS analizirana je ukupna intracelularna akumulacija rutenijuma u HeLa ćelijama, koje su tokom 6, 24 i 48 h tretirane **RuT₇** kompleksom u koncentraciji koja odgovara IC₅₀ vrednosti, i rezultati su prikazani na Slici 17.

Rezultati merenja ukupne intracelularne akumulacije rutenijuma u HeLa ćelijama nakon tretmana ispitivanim kompleksom ukazuju da se nivo akumuliranog rutenijuma povećava sa vremenom. Već nakon tretmana od 6 h rutenijum je prisutan u značajnoj količini unutar ćelija (8,9 ng Ru/10⁶ ćelija). Nakon 24 h nivo intracelularnog rutenijuma ostaje stabilan, sa zabeleženim manjim padom (7,1 ng Ru/10⁶ ćelija), da bi se posle 48 h izloženosti rutenijumskom kompleksu akumulacija ukupnog rutenijuma u ćelijama značajno povećala (11,9 ng Ru/10⁶ ćelija). Ovi rezultati ukazuju na konstantnu akumulaciju i dugotrajno zadržavanje rutenijuma u ćelijama.

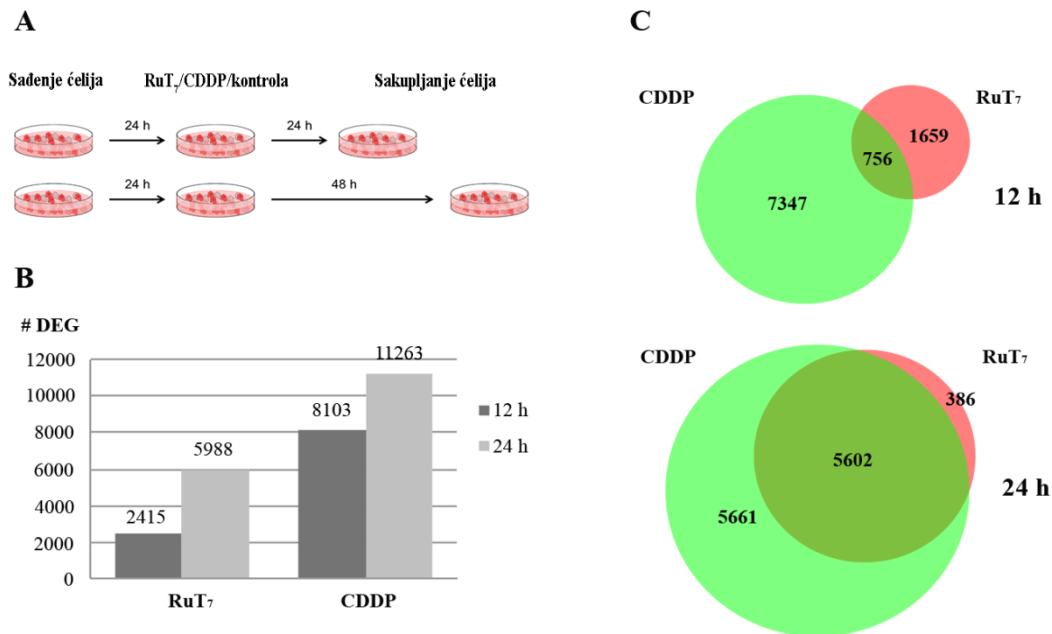


Slika 17. Ukupna intracelularna količina rutenijuma nakon tretmana u trajanju od 6, 24 i 48 h, izražena po broju ćelija u uzorku, izmerena ICP-MS metodom. Prikazane su srednje vrednosti sa standardnim devijacijama dobijene izvođenjem tri nezavisna eksperimenta

4.6. Razlike u profilima genske ekspresije HeLa ćelija tretiranih RuT₇ kompleksom i cisplatinom

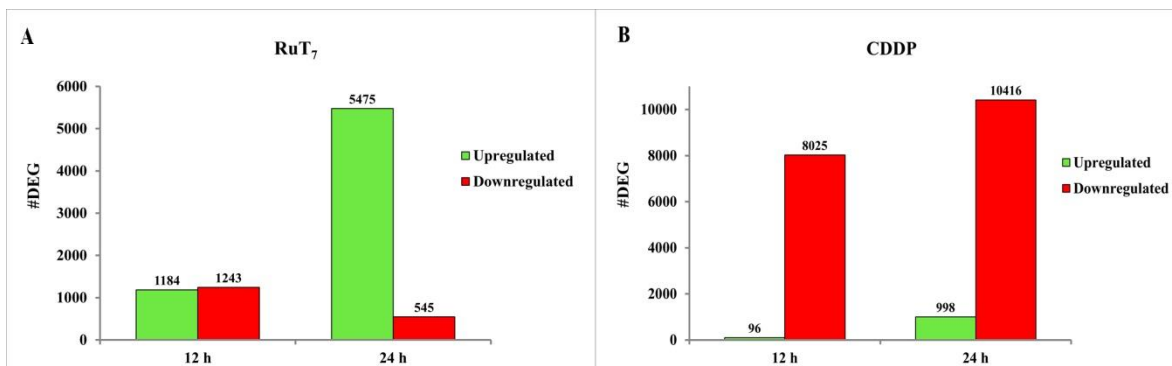
U cilju utvrđivanja promena u profilima genske ekspresije ukupna RNK HeLa ćelija tretiranih **RuT₇** kompleksom i cisplatinom, kao i kontrolnih uzoraka, je analizirana primenom metode hibridizacije na genskoj ploči - mikroerej.

Izvršeno je poređenje promena u profilima genske ekspresije HeLa ćelija tretiranih **RuT₇** kompleksom i cisplatinom, nakon tretmana od 12 h (rani odgovor ćelija na tretman) i 24 h (kasni odgovor ćelija na tretman). Kako bi se identifikovali diferencijalno eksprimirani geni tretiranih ćelija u odnosu na kontrolnu populaciju korišćen je moderisani limma t-test. Nakon oba vremena inkubacije rezultati su pokazali da je tretman **RuT₇** kompleksom izazvao blaže promene u genskoj ekspresiji u poređenju sa promenama koje je izazvao tretman cisplatinom (Slika 18B). Nakon 12 h, tretman **RuT₇** kompleksom je indukovao značajne promene u ekspresiji 2415 jedinstveno anotiranih gena u poređenju sa netretiranom populacijom HeLa ćelija, od čega je 1184 sa povećanom i 1243 sa smanjenom ekspresijom. Taj efekat je pojačan nakon 24 h dejstva tretmana, sa ukupno 5988 diferencijalno eksprimiranih gena, od čega je 5475 sa povećanom i 545 sa smanjenom ekspresijom u poređenju sa kontrolom. Nasuprot tome, tretman cisplatinom je izazvao drastičnije promene u genskoj ekspresiji nakon oba vremena inkubacije u poređenju sa kontrolom. Nakon 12 h tretmana dobijeno je ukupno 8103 diferencijalno eksprimiranih gena, od čega samo 96 sa povećanom i 8025 sa smanjenom ekspresijom, dok je nakon tretmana od 24 h dobijeno 11263 diferencijalno eksprimiranih gena, od čega 998 sa povećanom i 10416 sa smanjenom ekspresijom u odnosu na kontrolnu populaciju HeLa ćelija (Slika 19).



Slika 18. A. Eksperimentalna procedura. B. Diferencijalno eksprimirani geni (DEG) HeLa ćelija nakon tretmana **RuT₇** kompleksom i cisplatinom u trajanju od 12 i 24 h. C. Venovi dijagrami koji predstavljaju jedinstvene i zajedničke gene sa promenjenom ekspresijom (FDR < 0,05 i FC > 2) nakon tretmana **RuT₇** kompleksom (crveno) i cisplatinom (zeleno) u trajanju od 12 i 24 h

Kada se radi o zajedničkim diferencijalno eksprimiranim genima za tretman **RuT₇** kompleksom i cisplatinom, od ukupno pomenutih 2415 diferencijalno eksprimiranih gena za tretman **RuT₇** kompleksom nakon 12 h, samo je 756 zajedničkih sa cisplatinom, dok su ostali 1659 jedinstveni za tretman ovim kompleksom. Sa druge strane, tretman cisplatinom se odlikuje daleko većim brojem jedinstvenih diferencijalno eksprimiranih gena nakon 12 h tretmana, čak 7347 (Slika 18C). Zanimljivo je da nakon 24 h, odnosno tokom kasnog odgovora ćelija na tretman, **RuT₇** kompleks deli većinu diferencijalno eksprimiranih gena sa cisplatinom (5602), dok je samo 386 diferencijalno eksprimiranih gena specifično za odgovor na tretman ovim jedinjenjem. Nasuprot tome, cisplatinu karakteriše i kasni odgovor sa velikim brojem specifično diferencijalno eksprimiranih gena, čak 5661.



Slika 19. Diferencijalno eksprimirani geni sa povećanom (zeleno) i smanjenom ekspresijom (crveno) u poređenju sa kontrolom, nakon tretmana HeLa ćelija **RuT₇** kompleksom (A) i cisplatinom (B) u trajanju od 12 i 24 h

4.7. Kinetika i funkcionalna analiza promena u genskoj ekspresiji HeLa ćelija indukovanih tretmanom RuT₇ kompleksom

U cilju identifikacije gena čija promena ekspresije predstavlja specifičan odgovor na tretman **RuT₇** kompleksom, kao i detaljnijeg ispitivanja kinetike promena u genskoj ekspresiji, primenili smo algoritam *MaSigPro*. Kao rezultat analize izdvojeno je 5790 gena grupisanih u 9 koeksprimiranih setova čija se ekspresija značajno razlikuje nakon 12 i 24 h tretmana **RuT₇** kompleksom, u poređenju sa kontrolnim ćelijama. Da bi se odredio biološki značaj tih promena u ekspresiji za svaki genski klaster pojedinačno, upotrebljen je GOEAST (engl. *Gene Ontology Enrichment Analysis Software Toolkit*), koji omogućava identifikaciju značajno zastupljenih GO termina u okviru genskog seta, u odnosu na učestalost svih gena koje pokriva analiza. Ovo ima za cilj razumevanje promena u ekspresiji vezanih za tačno određenu funkcionalnu kategoriju u ćeliji (biološki proces, molekularnu funkciju i ćelijsku komponentu).

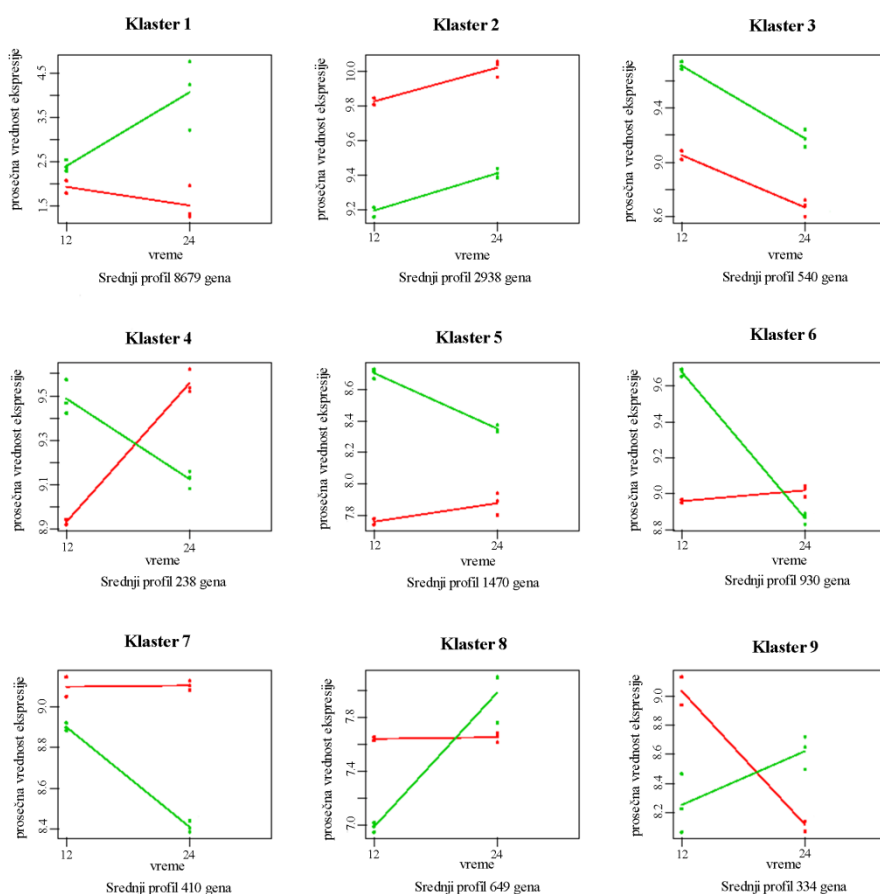
Promene u genskoj ekspresiji indukovane tretmanom su primećene u klasterima 2, 3 i 5. U okviru klastera 2 detektovano je 2938 visoko eksprimiranih gena čija ekspresija je konstantno smanjena, dok je u klasteru 3 identifikovano 540 gena čija je ekspresija konstantno povećana tokom tretmana **RuT₇** kompleksom, i prati dinamiku promene ekspresije u vremenu kontrolne populacije (Slika 20). Ekspresija 1470 gena koji pripadaju

klasteru 5 je povećana nakon tretmana ćelija **RuT₇** kompleksom, dok su ti isti geni konstantno eksprimirani tokom vremena u kontroli. Funkcionalna karakterizacija gena koji pripadaju navedenim klasterima (2, 3 i 5) je pokazala da je, što se tiče GO molekularnih funkcija, klaster 2 značajno zastupljen za funkcije povezane sa aktivnošću hidrolaze i katalitičku aktivnost oksidoreduktaze i vezivanje jona, dok značajno zastupljene biološke funkcije uključuju metaboličke procese organskih supstanci i ATP-aznu aktivnost kuplovane sa transmembranskim transportom jona. Klasteri 3 i 5 su značajno zastupljeni za molekularne funkcije povezane sa vezivanjem nukleinskih kiselina, heterocikličnih supstanci i jona prelaznih metala, dok su biološke funkcije u sklopu ovih klastera povezane sa opštim metaboličkim procesima.

Geni u sklopu ranog odgovora na tretman **RuT₇** kompleksom, koji su identifikovani u okviru klastera 6 (njih 930) pokazuju povećanu ekspresiju nakon 12 h praćenu padom ekspresije na nivo ekspresije kontrolnih ćelija, koja je detektovana nakon 24 h. U okviru klastera 8 nađeno je 649 gena čija je ekspresija suprimirana nakon tretmana od 12 h, dok nakon 24 h dolazi do povećanja njihove ekspresije. Značajno zastupljene molekularne funkcije za gene koji pripadaju klasteru 6 uključuju vezivanje nukleinskih kiselina, heterocikličnih supstanci i jona prelaznih metala, kao i aktivnost histon metiltransferaze, dok su biološki procesi acetilacija histona, negativna regulacija transkripcije kao i aktivacija unutrašnjeg (mitohondrijskog) apoptotskog puta kao odgovora na oštećenje DNK. Geni sa promenom ekspresije koji su detektovani u okviru klastera 8 imali su par značajno zastupljenih molekularnih funkcija, koje su uključivale vezivanje za WW proteinski domen, aktivnost transferaze i transfer acil grupa, dok su značajno zastupljeni biološki procesi regulacija organizacije mitotičkog vretena i M faze ćelijskog ciklusa, koji su lokalizovani u okviru ćelijskih kompartmenata kompleksa Ndc80, hromozoma u nukleusu i centrozoma.

Geni u sklopu kasnog odgovora na tretman **RuT₇** kompleksom su identifikovani u okviru klastera 1 i klastera 7. Klaster 1 sadrži 2722 nisko eksprimiranih gena koji pokazuju značajnu promenu u indukciji tokom vremena, dok 410 visoko eksprimiranih gena u sklopu klastera 7 pokazuju značajno smanjenu ekspresiju nakon 24 h tretmana. Molekularne funkcije aktivnosti receptora kuplovane sa G-proteinom, aktivnosti katjonskog kanala

osetljivog na intracelularni cAMP, aktivnosti signalnog transduktora i komunikacije između ćelija kao odgovor na stimulus, su značajno zastupljene u sastavu nisko ekspimiranih gena klastera 1 čija se ekspresija povećava tokom kasnog odgovora. Najznačajniji GO termini za gene u sklopu klastera 7 čija se ekspresija smanjuje tokom kasnog odgovora obuhvataju aktivnost regulatora enzima, aktivnost inhibitora serin/treonin kinaze i DNK N-glikozilaze, aktivnost replikacione viljuške, organizacionog centra mikrotubula, regulaciju aktivnosti ciklin-zavisne serin/treonin kinaze i regulaciju transkripcije uključene u G1/S fazu ćelijskog ciklusa.



Slika 20. Grupni plotovi koji pokazuju smer promena ekspresije tokom vremena za svaki genski klaster (12 i 24 h) i razlike između kontrolnih (crvena linija) i ćelija tretiranih **RuT7** kompleksom (zelena linija). Prosečni nivo genske ekspresije je prikazan za svaki klaster, sa intervalom poverenja od 95 % (gornje i donje tačke). Koeficijent nagiba predstavlja

vrednosti procenjenih koeficijenata regresije, koji je pozitivan za indukovane, a negativan za suprimirane genske klasterne

Tretman **RuT₇** kompleksom je prouzrokovao intenzivan efekat na ekspresiju vremenski-zavisnih gena uključenih u klaster 4 (238 gena) i klaster 9 (334 gena). Geni u sklopu klastera 4 su indukovani nakon tretmana od 12 h, da bi nakon tretmana od 24 h usledio pad u ekspresiji, što je u suprotnosti sa obrascem promene u genskoj ekspresiji kontrolne populacije. Geni koji ulaze u sastav klastera 9 su pokazali promenu u genskoj ekspresiji suprotnog smera u odnosu na klaster 4.

4.8. Analiza diferencijalno eksprimiranih gena pomoću Ingenuity Pathway Analysis® (IPA) softvera

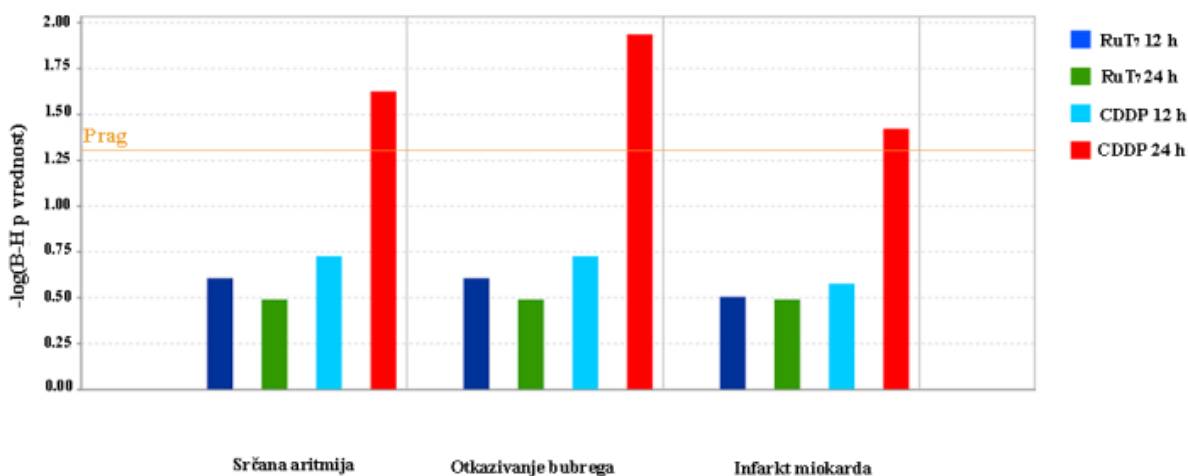
Da bismo dobili detaljniji uvid u promene na nivou bioloških procesa izazvane tretmanom **RuT₇** kompleksom i cisplatinom nakon 12 i 24 h, analizirali smo diferencijalno eksprimirane gene pomoću Ingenuity Pathway Analysis® (IPA) softvera (IPA, Ingenuity Systems, Redwood City, CA).

Nakon 12 i 24 h kontinuiranog tretmana **RuT₇** kompleksom, na vrhu liste značajno zastupljenih bioloških funkcija (engl. *significantly enriched biological functions*) su se našle funkcije povezane sa ćelijskom smrću i preživljavanjem, ćelijskim kompromisom, metabolizmom nukleinskih kiselina, biohemijom malih molekula, interakcijom i signaliziranjem između ćelija, molekularnim transportom, ćelijskim razvojem, ćelijskim rastom i proliferacijom, metabolizmom lekova i ćelijskim ciklusom. Tretman cisplatinom je pokazao promene u biološkim funkcijama antimikrobnog odgovora i molekularnog transporta. Dodatno, nakon 12 h tretmana HeLa ćelija **RuT₇** kompleksom postoji značajna zastupljenost gena koji pripadaju biološkim funkcijama RNK oštećenja i popravke, sakupljanja slobodnih radikala, DNK replikacije, rekombinacije i popravke, sinteze proteina i transportom proteina. Kanonski putevi koji su primenom IPA analize značajno zastupljeni nakon 12 i 24 h tretmana **RuT₇** kompleksom obuhvataju biosintezu estrogena, adheziju i dijapedezu agranulocita i puteve metaboličke degradacije, dok je analiza

značajno zastupljenih kanonskih puteva HeLa ćelija tretiranih cisplatinom pokazala značajnu povezanost sa promenama u transportu kalcijuma i metabolizmu citrulina.

4.9. Razlike u predviđenim profilima toksičnosti HeLa ćelija indukovanih tretmanom RuT₇ kompleksom i cisplatinom

U cilju predviđanja potencijalne toksičnosti povezane sa tretmanom **RuT₇** kompleksom, primenili smo IPA uporednu analizu toksičnosti na diferencijalno eksprimirane gene nakon 12 i 24 h tretmana **RuT₇** kompleksom i uporedili dobijeni profil toksičnosti sa cisplatinom (Slika 21). Nakon 24 h tretmana dobijene su značajne razlike između **RuT₇** kompleksa i cisplatine, gde se nakon tretmana cisplatinom mogu videti značajno zastupljeni geni povezani sa srčanom aritmijom, infarktom miokarda i otkazivanjem bubrežne funkcije, dok nakon tretmana **RuT₇** kompleksom nismo dobili značajno zastupljene gene povezane sa toksičnim funkcijama.



Slika 21. Značajno obogaćene biološke funkcije (FDR<0.05) povezane sa toksičnošću određene primenom IPA uporedne analize toksičnosti

5. DISKUSIJA

Od otkrića antiproliferativnih karakteristika cisplatine do današnjih dana, intenzivna istraživanja se sprovode na polju alternativnih hemioterapeutika koji sadrže prelazni metal u svom sastavu [118]. Jedinjenja koja u svom sastavu sadrže rutenijum kao metal su se pokazala kao dobri potencijalni hemioterapeutske agensi, pre svega zbog svojih osobina kao što su dinamika zamene liganda, opseg dostupnih oksidacionih stanja u fiziološkim uslovima i sposobnost rutenijuma da oponaša gvožđe i njegovog vezivanja za određene biološke molekule [34]. U poslednje vreme, rutenijum(II)-arenski kompleksi su u žiži naučnog interesovanja u oblasti biologije rutenijumskih jedinjenja, zbog svoje stabilnosti, rastvorljivosti u vodi i podložnosti manipulacijama u strukturi kompleksa. Navedena svojstva pružaju nebrojene mogućnosti za optimizaciju strukture ovih jedinjenja, pa samim tim i povećanje biološke aktivnosti i minimizaciju toksičnih efekata [119].

Prethodno je u Laboratoriji za farmakologiju (IORS) ispitana *in vitro* antitumorska aktivnost serije rutenijum(II)-arenskih kompleksa koja sadrži *p*-cimen kao arenski ligand i derivate piridina. Uočeno je da zamena različito supstituisanih piridinskih liganada kod neaktivnih kompleksa anjonom pikolinske kiseline dovodi do povećanja antiproliferativne aktivnosti. Osim što je ovaj kompleks pokazao značajni antiproliferativni potencijal i selektivnost ka tumorskim ćelijskim linijama, takođe je pokazao i potencijal vezivanja za DNK i zaustavljanja ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa, kao i značajan antimetastatski i antiangiogenetski efekat [120, 121].

U cilju poboljšanja citotoksičnih svojstava ove grupe rutenijum(II)-arenskih kompleksa, sintetisana je i okarakterisana nova serija od sedam rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa derivatima pikolinske kiseline [96]. Ova serija je sintetisana kao modifikacija prethodne, već ispitane serije rutenijum(II)-arenskih kompleksa, sa ciljem da se poboljša antitumorska aktivnost i poveća selektivnost ka ćelijama kancera. Obzirom da je u prethodnoj seriji kompleks koji sadrži pikolinski anjon kao ligand pokazao istaknutu antitumorsku aktivnost na ćelijama kancera *in vitro* u poređenju sa ostalim jedinjenjima iz serije, očekujemo da će analogni kompleksi iz nove serije pokazati sličan ili veći citotoksični potencijal.

Citotoksična aktivnost nove serije rutenijum(II)-arenskih kompleksa opšte formule $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{L}^{1-7})\text{Cl}]$ je određena uz pomoć MTT kolorimetrijskog testa na panelu od 11 ćelijskih linija - 9 tumorskih (HeLa, A549, FemX, MDA-MB-361, MDA-MB-453, MDA-MB-231 i MCF-7, LS-174, K562) i 2 normalne, zdrave ćelijske linije (MRC-5, BEAS-2B). Rezultati MTT testa su pokazali da je uvođenje izohinolin-3-karboksilne kiseline kao liganda u slučaju **RuT₇** kompleksa dovelo do značajnog povećanja citotoksičnog delovanja u odnosu na ostala jedinjenja iz iste serije, koji sadrže fluoro, hlоро, bromo ili metil derivate pikolinske kiseline. Ovaj kompleks je pokazao selektivnost prema tumorskim ćelijskim linijama u odnosu na normalnu, MRC-5 ćelijsku liniju, što predstavlja dobar preduslov za dalje ispitivanje biološkog mehanizma dejstva potencijalnog hemioterapeutika (Tabela 5). Poznato je da terapijski potencijal antikancerskih jedinjenja može biti ograničen usled velike toksičnosti prema zdravim ćelijama, kao i to da cisplatina poseduje brojne toksične efekte, što ograničava njenu upotrebu [122].

Povećana citotoksičnost **RuT₇** kompleksa u odnosu na ostala jedinjenja iz serije može biti objašnjena prisustvom izohinolin-3-karboksilne kiseline, koja može da doprinese potencijalnim dodatnim nekovalentnim interakcijama sa molekulom DNK [96].

Ispitivanje mehanizma dejstva **RuT₇** kompleksa je rađeno na HeLa ćelijskoj liniji koja je pokazala dvostruko veću senzitivnost u odnosu na normalnu, netumorsku liniju (MRC-5).

Rezultati analize ćelijskog ciklusa HeLa ćelija su potvrdili da je mehanizam dejstva cisplatine vezivanje za DNK molekul i inhibicija replikacije [123]. Na isti način, akumulacija ćelija u S fazi (fazi sinteze DNK) ćelijskog ciklusa nakon tretmana **RuT₇** kompleksom sugeriše mogućnost njegovog vezivanja za molekul DNK i/ili oštećenja DNK izazvanih ovim kompleksom, što posledično dovodi do inhibicije replikacije DNK tumorske ćelije. Već nakon 24 h tretmana HeLa ćelija nižim koncentracijama **RuT₇** kompleksa ($0,5 \times \text{IC}_{50}$), dolazi do istaknute akumulacije ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa (Slika 14). Ovakav rezultat je u saglasnosti sa rezultatima ispitivanja promena u ćelijskom ciklusu izazvanih rutenijumskim kompleksom slične strukture, gde je kompleks opšte formule $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{L})\text{Cl}_2]$ sa pikolinskom kiselinom kao ligandom (L) doveo do akumulacije ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa i pokazao preferencijalnu akumulaciju u DNK

frakciji tretiranih ćelija. Dobijeni podaci sugerišu da DNK predstavlja ciljni molekul za koji se jedinjenja ove strukture primarno vezuju [120, 124]. Takođe, nakon 24 h inkubacije HeLa ćelija sa **RuT₇** kompleksom dolazi do povećanja broja ćelija u Sub-G1 fazi ćelijskog ciklusa (ćelije sa fragmentisanom DNK, tj. apoptotičnih i/ili nekrotičnih ćelija). Prilikom tretmana HeLa ćelija sa dvostruko većom koncentracijom **RuT₇** kompleksa (IC₅₀) dolazi do drastičnog povećanja broja ćelija u Sub-G1 populaciji, i to se može tumačiti kao posledica opšte, neselektivne toksičnosti **RuT₇** kompleksa. Ovakav rezultat ističe značaj određivanja adekvatne koncentracije tretmana prilikom ispitivanja njene aktivnosti.

Rezultati analize ćelijskog ciklusa koji jasno pokazuju zaustavljanje HeLa ćelija u S fazi i time potencijal interakcije **RuT₇** kompleksa sa DNK molekulom su u saglasnosti sa rezultatima ispitivanja potencijala ovog kompleksa za vezivanje za DNK u vanćelijskom sistemu UV spektroskopskom titracijom [96].

Kandidati za antikancerske lekove koji ne pokažu potencijal indukcije apoptoze se često odlikuju smanjenom kliničkom efikasnošću [125]. Zbog toga primena eseja kojima se ispituje apoptotski potencijal ima važnu ulogu u rasvetljavanju mehanizma dejstva kandidata za antikancerske lekove. Eksternalizacija fosfatidilserina sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane predstavlja jedan od prvih znakova rane apoptoze. Aneksin V, Ca²⁺-zavisni protein sa afinitetom vezivanja za fosfolipide, poseduje visok afinitet za fosfatidilserin, i u konjugaciji sa odgovarajućom fluoroforom (fluorescein izotiocijanatom, FITC) se može koristiti za detekciju fosfatidilserina na površini ćelije u ranoj apoptozi [105, 106]. Nakon tretmana **RuT₇** kompleksom u trajanju od 24 h, praćena je eksternalizacija fosfatidilserina na ćelijskoj membrani HeLa ćelija. U poređenju sa kontrolom, porast u subpopulaciji ćelija u ranoj apoptozi (FITC(+)/PI(-)) nije primećen, kako nakon tretmana **RuT₇** kompleksom, tako ni nakon tretmana cisplatinom. Međutim, zapaža se značajan porast u broju ćelija u (FITC(+)/PI(+)) subpopulaciji (ćelije u kasnim fazama apoptoze i/ili mrtve ćelije). Takođe, primetan je i porast u broju mrtvih ćelija (FITC(-)/PI(+)) subpopulacija (Slika 15). Odsustvo FITC(+)/PI(-) frakcije (ćelija u ranoj apoptozi) se može objasniti dinamikom dejstva **RuT₇** kompleksa, gde se pretpostavlja da ovo jedinjenje u kratkom vremenskom periodu od tretmana počinje da ispoljava svoje dejstvo. Shodno tome, može se pretpostaviti da su nakon perioda trajanja tretmana od 24 h

većina ćelija u ranoj apoptozi već ušle u fazu kasne apoptoze, i da je neophodno ispitati dinamiku dejstva ovog kompleksa praćenjem iste u funkciji vremena. Ovi rezultati su u korelaciji sa rezultatima analize ćelijskog ciklusa, gde je dobijena Sub-G1 frakcija ćelija nakon tretmana **RuT₇** kompleksom (Slika 14).

Uprkos konstantnom razvoju brojnih molekularnih markera, analiza morfoloških promena je još uvek „zlatni standard“ u izučavanju tipa ćelijske smrti [126, 127]. Uobičajene morfološke karakteristike apoptotičnih ćelija su visoko kondenzovan nukleus, skupljanje ćelije i formiranje apoptotskih tela. U ranim fazama apoptoze, dok je integritet ćelijske membrane još uvek očuvan, jedino akrudin oranž može ući u ćeliju, i kao posledica toga nukleusi ćelija će fluorescirati u zelenom delu spektra. U toku kasnih faza apoptotskog procesa postepeno dolazi do gubitka integriteta ćelijske membrane, u ćeliju ulaze i akrudin oranž i etidijum bromid, i nukleusi se boje narandžasto-crveno [128]. Nakon samo 3 h kontinuiranog tretmana **RuT₇** kompleksom, uočavaju se morfološke promene na HeLa ćelijama, od kojih su najistaknutije smanjena gustina/broj ćelija, promena oblika (zaokrugljivanje) i početne faze kondenzacije nukleusa (Slika 16). Nakon 5 h kontinuiranog tretmana **RuT₇** kompleksom, visoko kondenzovani nukleusi i baloniranje membrane su dominantne morfološke karakteristike. Ovi rezultati, zajedno sa fotomikrografijama dobijenim nakon 24 h kontinuiranog tretmana, se mogu prodiskutovati u svetlu rezultata Aneksin V-FITC eseja, i potvrđuju pretpostavljenu dinamiku dejstva **RuT₇** kompleksa. Morfološka analiza HeLa ćelija na fluorescentnom mikroskopu, tretiranih **RuT₇** kompleksom i bojenih akrudin oranž/etidijum bromid dvojnim bojenjem, je nedvosmisleno pokazala da ispitivani agens poseduje potencijal indukcije apoptoze, što ga čini dobrim kandidatom za dalje ispitivanje kao hemioterapeutskog agensa.

ICP-MS analiza ukupne intracelularne akumulacije rutenijuma je pokazala porast u sadržaju rutenijuma koji je zavisao od vremena (Slika 17). Visoka intracelularna koncentracija rutenijuma već nakon 6 h inkubacije HeLa ćelija sa **RuT₇** kompleksom ($8,83 \pm 0,09$ ng Ru/10⁶ ćelija) je u skladu sa prethodnim nalazom o brzom dejstvu **RuT₇** kompleksa na ćelije. Pretpostavlja se da **RuT₇** kompleks ulazi u ćeliju veoma brzo, što implicira mogućnost pasivnog transporta kroz membranu ovog jedinjenja. Pasivan transport je moguć zahvaljujući prisustvu arenskog liganda [44, 129, 130], kao i izohinolin-3-

karboksilne kiseline (derivata pikolinske kiseline sa fuzionisanom fenil grupom), koji značajno doprinose lipofilnosti kompleksa [131-138]. Tokom vremena, koncentracija rutenijuma se zadržava na istom nivou, a kasnije čak i povećava (tretmani u trajanju od 24 i 48 h, Slika 17). Ovim rezultatima se može objasniti kontinuirano prisustvo ćelija koje pokazuju morfološke karakteristike apoptotskih ćelija tokom vremena (Slika 16). Rezultati analize intracelularne akumulacije rutenijuma pokazuju njegovu kontinuiranu akumulaciju i impliciraju vezivanje ovog metala za strukture unutar ćelije (biološke molekule) [139].

Iz dobijenih rezultata je jasno da, na ćelijskom nivou, **RuT₇** kompleks pokazuje citotoksični efekat koji je uporediv sa efektom cisplatine. Međutim, na molekularnom nivou se ovaj efekat ogleda u vidu blaže perturbacije transkriptoma HeLa ćelija u odnosu na onu izazvanu tretmanom cisplatinom. Pored generalno manjih promena u genskoj ekspresiji izazvanih tretmanom **RuT₇** kompleksom, razlike u mehanizmu dejstva se mogu uočiti sa šematskog prikaza specifičnih i zajedničkih dereguliranih gena HeLa ćelija nakon 12 i 24 h tretmana **RuT₇** kompleksom i cisplatinom (Venovi dijagrami, Slika 18C). Nakon kontinuiranog tretmana od 12 h pronađeno je 1659 DEG-a za tretman **RuT₇** kompleksom, čija ekspresija nije bila promenjena nakon tretmana cisplatinom. Ovi rezultati pružaju dokaz da su, tokom „ranog odgovora“ ćelija na tretman (12 h), različiti molekularni mehanizmi aktivni u odgovoru na tretman **RuT₇** kompleksom i cisplatinom.

Analiza genskih klastera u okviru kojih su grupisani geni sa sličnim obrascima genske ekspresije dala je informacije od značaja za razumevanje mehanizma biološkog dejstva **RuT₇** kompleksa. Tretman **RuT₇** kompleksom je indukovao konstantnu povišenu ekspresiju gena koji su uključeni u molekularne funkcije vezivanja nukleinskih kiselina, heterocikličnih supstanci i jona prelaznih metala (klasteri 3, 5 i 6). Osim jakog dokaza o vezivanju ovog kompleksa za DNK molekul živih ćelija, ovi rezultati pružaju informacije o mogućim interakcijama samog metala rutenijuma, kao i heterocikličnog liganda sa genetičkim materijalom ćelija. Ovi podaci zajedno bi mogli ukazivati na vezivanje organometalnog kompleksa kao celine za ćelijsku DNK, kao što je i prethodno pokazano da se ta interakcija odigrava u nećelijskom sistemu [96]. Ovaj podatak takođe ukazuje na stabilnost jedinjenja u fiziološkim uslovima, odnosno na to da, nakon ulaska u ćeliju, ispitivani kompleks interaguje sa biološkim molekulima zadržavajući pri tom svoj

strukturni integritet. Dalje, povišena ekspresija gena ranog odgovora koji pripadaju klasteru 6, a uključeni su u GO biološke funkcije acetilacije histona, negativne regulacije transkripcije i aktivacije unutrašnjeg (mitohondrijskog) apoptotskog puta kao odgovora na oštećenje DNK, jasno ukazuju na aktivaciju ćelijskog odgovora na oštećenje DNK (engl. *DNA Damage Response, DDR*), koji predstavlja usaglašeni niz ćelijskih mehanizama kojima je regulisana progresija ćelije kroz ćelijski ciklus i popravka nastalih oštećenja na DNK molekulu, i tokom kojih se olakšava pristup nastalim lezijama na DNK proteinskoj mašineriji zaduženoj za popravku istih [140]. Povišena ekspresija gena uključenih u aktivaciju unutrašnjeg (mitohondrijskog) apoptotskog puta kao odgovora na oštećenje DNK predstavlja dobru potvrdu rezultata protočne citometrije i dvokolornog bojenja akridin oranžom/etidijum bromidom. Kao što je i pretpostavljeno, apoptotski signalni put se aktivira nedugo po tretmanu (geni iz klastera 6 koji pokazuju povišenu ekspresiju nakon tretmana od 12 h), što za posledicu ima veliki broj ćelija u kasnim fazama apoptoze i mrtvih ćelija nakon 24 h kontinuiranog tretmana (Slika 15).

Geni ranog odgovora u okviru klastera 8 uključeni su u regulaciju bioloških funkcija regulacije organizacije mitotičkog vretena i M faze ćelijskog ciklusa. Snižena ekspresija ovih gena u odgovoru na tretman **RuT₇** kompleksom u poređenju sa kontrolom može ukazivati na inhibiciju ćelijske deobe (mitoze). Postoje mnogobrojni literaturni podaci o rutenijum(III) kompleksima koji pokazuju sličan mehanizam dejstva [141-144]. Isto tako, ekspresija gena kasnog odgovora u okviru klastera 7, koji su uključeni u regulaciju transkripcije na nivou G1/S faze ćelijskog ciklusa i sličnih bioloških funkcija, je značajno snižena, što govori o procesima povezanim sa zaustavljanjem ćelija u G1/S fazi ćelijskog ciklusa. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima analize ćelijskog ciklusa, gde je nakon tretmana **RuT₇** kompleksom, koncentracijom od 0,5 x IC₅₀, u trajanju od 24 h dobijena akumulacija HeLa ćelija u S-fazi (Slika 14).

Dalja analiza mehanizma dejstva **RuT₇** kompleksa je fokusirana na ulogu diferencijalno ekspimiranih gena u specifičnim biološkim funkcijama i kanonskim putevima, što doprinosi dodatnom rasvetljavanju potencijalnih mehanizama dejstva **RuT₇** kompleksa. Nakon 12 h kontinuiranog tretmana **RuT₇** kompleksom, značajna zastupljenost gena koji pripadaju GO biološkoj funkciji sakupljanja slobodnih radikala može ukazivati na

odgovor HeLa ćelja na oksidativni stres, koji se aktivira zbog prisustva reaktivnih kiseoničnih vrsta u spoljašnjoj sredini. Ova značajno zastupljena GO biološka funkcija može biti u vezi sa biološkim funkcijama DNK replikacije, rekombinacije i popravke i RNK oštećenja i popravke, koje zajedno ukazuju na oštećenja na DNK/RNK molekulima, koja verovatno nastaju kao posledica stvaranja slobodnih radikala unutar ćelije. Ovo tumačenje rezultata je u skladu sa literaturnim podacima o mehanizmu dejstva kompleksa koji sadrže rutenijum [145]. Pored DNK/RNK oštećenja nastalih kao posledica direktnog vezivanja **RuT₇** kompleksa za ove molekule, dobijeni rezultati bi mogli ukazivati na alternativan mehanizam dejstva ovog jedinjenja. Sinteza proteina i transport proteina su biološke funkcije koje su takođe isključivo značajno zastupljene nakon 12 h tretmana **RuT₇** kompleksom. Ove funkcije se mogu povezati sa pomenutim oštećenjem DNK, jer je ćeliji neophodna kompleksna proteinska mašinerija za popravku nastalih oštećenja, kao i za replikaciju DNK molekula, a takođe i za procese zaustavljanja ćelijskog ciklusa i pokretanje apoptotskog puta [123, 146-149]. Ova razmatranja se takođe slažu i sa GO značajno zastupljenim biološkim funkcijama u okviru klastera 7 i 8, koje opisuju zaustavljanje ćelija G1/S i G2/M fazama ćelijskog ciklusa.

GOEAST analiza je pokazala da su ćelijski rast i proliferacija, ćelijski ciklus i ćelijska smrt biološke funkcije značajno zastupljene nakon 12 i 24 h kontinuiranog tretmana, što se može smatrati potvrdom navedenih rezultata. Zajedno, ove funkcije daju informacije o genima koji su povezani sa rastom i proliferacijom ćelija, kao i sa fazama u ćelijskom ciklusu, uključujući i deobu ćelije. Ovi rezultati, zajedno sa rezultatima protočne citometrije, značajno naglašavaju funkciju **RuT₇** kompleksa u inhibiciji progresije ćelijskog ciklusa. Druge GO biološke funkcije koje su značajno zastupljene nakon oba vremena inkubacije HeLa ćelija sa tretmanom (12 i 24 h) su interakcija i signaliziranje između ćelija, kao i ćelijski kompromis. Rezultati ove disertacije jasno pokazuju da, nakon 12 i 24 h kontinuiranog tretmana **RuT₇** kompleksom, njegovi efekti između ostalog obuhvataju i narušavanje međućelijskih spojeva i/ili kontakata na ćelijskoj površini, nakon čega sledi pucanje ćelijske membrane i oštećenje normalne ćelijske funkcije. Rezultati morfološke analize HeLa ćelija tretiranih **RuT₇** kompleksom, nakon bojenja akridin oranžom i etidijum bromidom pokazali su da već nakon 3 h kontinuiranog tretmana ćelije počinju da gube

svoju normalnu morfologiju, kontakte sa drugim ćelijama i počinju da se odvajaju od podloge (Slika 16). Ovo ugrožavanje ćelijske funkcije preko direktnog oštećenja ćelijske membrane se može smatrati posledicom redoks aktivnosti **RuT₇** kompleksa. Izgleda da, pored oksidativnog oštećenja izazvanog unutar ćelije, **RuT₇** kompleks ispoljava direktno dejstvo na ćelijsku membranu kroz još uvek nepoznat mehanizam dejstva.

Iako je analiza funkcionalnog profilisanja gena dala biološke funkcije koje su specifične za tretman od 12 h, nakon 24 h kontinuiranog tretmana HeLa ćelija **RuT₇** kompleksom nisu nađene biološke funkcije specifične za taj period inkubacije. Naprotiv, broj bioloških funkcija koje su značajno zastupljene se nakon 24 h inkubacije smanjuje, ali se broj gena uključenih u biološke funkcije koje su zajedničke za oba perioda inkubacije povećava. Ovaj podatak opet ističe dinamiku dejstva **RuT₇** kompleksa.

Jedan od glavnih aspekata u proceduri uvođenja novih hemioterapeutika u kliničku praksu je svakako i predviđanje njihove potencijalne sistemske toksičnosti. IPA uporedna analiza toksičnosti za diferencijalno eksprimirane gene nakon tretmana **RuT₇** kompleksom i cisplatinom u trajanju od 12 i 24 h je pokazala značajne razlike u predviđenim profilima toksičnosti između ova dva jedinjenja (Slika 21). Za gene uključene u procese srčane aritmije, infarkta miokarda i otkazivanje bubrežne funkcije, ćelije tretirane cisplatinom pokazuju snažnu indukciju gena koji su povezani sa ovim oboljenjima nakon 24 h tretmana. Iste ove funkcije toksičnosti su daleko ispod praznih vrednosti za ćelije tretirane **RuT₇** kompleksom. Ovi rezultati koji rasvetljavaju molekularnu osnovu toksičnosti cisplatine su u korelaciji sa već postojećim podacima dobijenim na pacijentima [150-153]. Ovakvi rezultati jasno pokazuju razliku u sistemskoj toksičnosti između **RuT₇** kompleksa i cisplatine.

Na osnovu rezultata analize promena u genskoj ekspresiji pod uticajem tretmana **RuT₇** kompleksom, može se zaključiti da ovaj kompleks indukuje apoptozu HeLa ćelija preko mitohondrijskog puta indukcije apoptoze. Osim što izaziva oštećenja na DNK molekulu direktnim vezivanjem za njega, rezultati pokazuju da dolazi i do oštećenja na samoj površini ćelija i narušavanja integriteta ćelijske membrane. Usled navedenih oštećenja dolazi do aktiviranja različitih bioloških procesa uključenih u ćelijsku deobu (M faza ćelijskog ciklusa, geni ranog odgovora sa sniženom ekspresijom u okviru klastera 8),

nakon čega sledi remodelovanje hromatina i popravka DNK molekula (geni ranog odgovora sa povišenom ekspresijom u okviru klastera 6), što potencijalno dovodi do blokiranja sinteze DNK molekula (geni kasnog odgovora sa sniženom ekspresijom u okviru klastera 7). Podaci iz literature o mehanizmu dejstva različitih rutenijumskih kompleksa koji su u skladu sa dobijenim rezultatima su brojni [49, 124, 142, 154-157]. Bez obzira na to što mnogi mehanizmi dejstva rutenijumskih kompleksa nisu potpuno razjašnjeni, pored sposobnosti inhibicije metastaza [47, 158], drugi mehanizmi dejstva ovih jedinjenja su predloženi, i uključuju interakcije sa DNK [159], proteinima [160], stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta [145], inhibiciju aktivnosti topoizomeraze [161, 162], indukovanje apoptoze [163], i antiangiogenetske efekte [164, 165].

Imajući na umu razlike u mehanizmu dejstva **RuT₇** kompleksa u odnosu na cisplatinu, kao i razlike u predviđenim profilima toksičnosti, dalji napori bi trebalo da budu orijentisani ka uključivanju ovog jedinjenja u *in vivo* i preklinička ispitivanja kao potencijalnih kandidata za hemioterapeutike.

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ispitivanja citotoksičnosti nove serije rutenijum(II)-arenskih kompleksa na panelu tumorskih ćelijskih linija su pokazali da uvođenje izohinolin-3-karboksilne kiseline kao liganda dovodi do značajnog povećanja citotoksičnog delovanja u odnosu na ostala jedinjenja iz iste serije, koji sadrže fluoro, hloro, bromo ili metil derivate pikolinske kiseline. **RuT₇** kompleks je pokazao selektivnost prema tumorskim ćelijskim linijama u odnosu na normalnu, MRC-5 ćelijsku liniju, što predstavlja osnovni preduslov za dalje ispitivanje biološkog mehanizma dejstva potencijalnog hemioterapeutika. Analizom dobijenih rezultata koji rasvetljavaju mehanizam dejstva **RuT₇** kompleksa mogu se izvući sledeći zaključci:

- Nakon 24 h tretmana HeLa ćelija **RuT₇** kompleksom dolazi do istaknute akumulacije ćelija u Sub-G1 i S fazama ćelijskog ciklusa.
- **RuT₇** kompleks nedvosmisleno pokazuje potencijal indukcije apoptoze na HeLa ćelijama, što je utvrđeno morfološkom analizom na fluorescentnom mikroskopu i protočnom citometrijom
- Prisustvo rutenijuma u HeLa ćelijama je značajno već nakon 6 h delovanja tretmana, što je pokazano ICP-MS analizom ukupne intracelularne akumulacije rutenijuma.
- Na molekularnom nivou se efekat **RuT₇** kompleksa ogleda u vidu blaže perturbacije transkriptoma HeLa ćelija u odnosu na onu izazvanu tretmanom cisplatinom, kao i u drugačijem profilu promene genske ekspresije, što ukazuje na sličnosti i razlike u mehanizmu dejstva ovog kompleksa u odnosu na cisplatinu.
- Rezultati analize diferencijalno eksprimiranih genskih klastera ukazuju na stabilnost jedinjenja u fiziološkim uslovima, sugerišući da **RuT₇** kompleks interaguje sa biološkim molekulima zadržavajući svoj strukturni integritet.
- Oštećenja na DNK izazvana **RuT₇** kompleksom nastaju kako njegovim direktnim vezivanjem za ovaj molekul, tako i dejstvom reaktivnih kiseoničnih vrsta koje se stvaraju unutar ćelije

- Nakon tretmana **RuT₇** kompleksom, dolazi do aktivacije unutrašnjeg (mitohondrijskog) apoptotskog puta kod HeLa ćelija.
- IPA uporedna analiza toksičnosti za diferencijalno eksprimirane gene je pokazala odsustvo sistemske toksičnosti kod HeLa ćelija tretiranih **RuT₇** kompleksom za procese srčane aritmije, infarkta miokarda i otkazivanje bubrežne funkcije.

7. LITERATURA

1. Torre, L. A.; Bray, F.; Siegel, R. L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* **2015**, *65*, (2), 87-108.
2. *Global Cancer Facts & Figures*; American Cancer Society: Atlanta, 2015.
3. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P., Cancer. In *Molecular Biology of the Cell*, 6 ed.; Garland Science: New York, 2014; pp 1091-1143.
4. Elliott, W. H.; Elliott, D. C., *Biochemistry and Molecular Biology*. 4 ed.; Oxford University Press: Oxford, 2009.
5. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, (1), 57-70.
6. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, (5), 646-74.
7. Haskell, C. M., *Cancer Treatment*. 5 ed.; Saunders: Saint Louis, Missouri, USA, 2001.
8. Takimoto, C. H.; Calvo, E., Principles of oncologic pharmacotherapy. In *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*, 11 ed.; Pazdur, R.; Wagman, L. D.; Camphausen, K. A., Eds. CMPMedica: 2008.
9. Segota, E.; Bukowski, R. M. The promise of targeted therapy: cancer drugs become more specific. *Cleveland Clinic journal of medicine* **2004**, *71*, (7), 551-60.
10. Haley, B.; Frenkel, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol* **2008**, *26*, (1), 57-64.
11. Orvig, C.; Abrams, M. J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. *Chemical reviews* **1999**, *99*, (9), 2201-4.
12. Guo, Z.; Sadler, P. J. Metals in medicine. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38*, (11), 1512-1531.
13. Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature reviews. Cancer* **2007**, *7*, (8), 573-84.

14. Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Keppler, B. K. Tumour-inhibiting platinum complexes--state of the art and future perspectives. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **2003**, *146*, 1-54.
15. Du, X.; Wang, X.; Li, H.; Sun, H. Comparison between copper and cisplatin transport mediated by human copper transporter 1 (hCTR1). *Metallomics : integrated biometal science* **2012**, *4*, (7), 679-85.
16. Wheate, N. J.; Walker, S.; Craig, G. E.; Oun, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton transactions* **2010**, *39*, (35), 8113-27.
17. Heffeter, P.; Jungwirth, U.; Jakupec, M.; Hartinger, C.; Galanski, M.; Elbling, L.; Micksche, M.; Keppler, B.; Berger, W. Resistance against novel anticancer metal compounds: differences and similarities. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **2008**, *11*, (1-2), 1-16.
18. Antman, K. H. Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy. *The oncologist* **2001**, *6 Suppl 2*, 1-2.
19. Clarke, M. J.; Zhu, F.; Frasca, D. R. Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chemical reviews* **1999**, *99*, (9), 2511-34.
20. Galanski, M.; Arion, V. B.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K. Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. *Current pharmaceutical design* **2003**, *9*, (25), 2078-89.
21. Bratsos, I.; Gianferrara, T.; Alessio, E.; Hartinger, C. G.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K., Ruthenium and Other Non-Platinum Anticancer Compounds. In *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, Alessio, E., Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2011; pp 151-174.
22. Kopf-Maier, P. Complexes of metals other than platinum as antitumour agents. *European journal of clinical pharmacology* **1994**, *47*, (1), 1-16.
23. Bernstein, L. R.; Tanner, T.; Godfrey, C.; Noll, B. Chemistry and pharmacokinetics of gallium maltolate, a compound with high oral gallium bioavailability. *Metal-based drugs* **2000**, *7*, (1), 33-47.

24. Jungwirth, U.; Kowol, C. R.; Keppler, B. K.; Hartinger, C. G.; Berger, W.; Heffeter, P. Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes. *Antioxidants & redox signaling* **2011**, *15*, (4), 1085-127.
25. Shen, D. W.; Pouliot, L. M.; Hall, M. D.; Gottesman, M. M. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev* **2012**, *64*, (3), 706-21.
26. Johnson, S. W.; Shen, D.; Pastan, I.; Gottesman, M. M.; Hamilton, T. C. Cross-resistance, cisplatin accumulation, and platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin-sensitive and -resistant human hepatoma cell lines. *Experimental cell research* **1996**, *226*, (1), 133-9.
27. Ishida, S.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Herskowitz, I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, (22), 14298-302.
28. Lin, X.; Okuda, T.; Holzer, A.; Howell, S. B. The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular pharmacology* **2002**, *62*, (5), 1154-9.
29. Holzer, A. K.; Manorek, G. H.; Howell, S. B. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Molecular pharmacology* **2006**, *70*, (4), 1390-4.
30. Beck, D. J.; Brubaker, R. R. Effect of cis-platinum(II)diamminodichloride on wild type and deoxyribonucleic acid repair deficient mutants of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **1973**, *116*, (3), 1247-52.
31. Fraval, H. N.; Rawlings, C. J.; Roberts, J. J. Increased sensitivity of UV-repair-deficient human cells to DNA bound platinum products which unlike thymine dimers are not recognized by an endonuclease extracted from *Micrococcus luteus*. *Mutation research* **1978**, *51*, (1), 121-32.
32. Dasari, S.; Tchounwou, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology* **2014**, *740*, 364-78.
33. Clarke, M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coordination Chemistry Reviews* **2003**, *236*, (1), 209-233.

34. Allardyce, C. S.; Dyson, P. J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and future prospects. *Platinum Metals Review* **2001**, *45*, (2), 62-69.
35. Bergamo, A.; Gaiddon, C.; Schellens, J. H.; Beijnen, J. H.; Sava, G. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. *Journal of inorganic biochemistry* **2012**, *106*, (1), 90-9.
36. Lentz, F.; Drescher, A.; Lindauer, A.; Henke, M.; Hilger, R. A.; Hartinger, C. G.; Scheulen, M. E.; Dittrich, C.; Keppler, B. K.; Jaehde, U.; Central European Society for Anticancer Drug Research, E. Pharmacokinetics of a novel anticancer ruthenium complex (KP1019, FFC14A) in a phase I dose-escalation study. *Anticancer Drugs* **2009**, *20*, (2), 97-103.
37. Hartinger, C. G.; Jakupec, M. A.; Zorbas-Seifried, S.; Groessl, M.; Egger, A.; Berger, W.; Zorbas, H.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K. KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chemistry & biodiversity* **2008**, *5*, (10), 2140-55.
38. Heffeter, P.; Bock, K.; Atil, B.; Reza Hoda, M. A.; Korner, W.; Bartel, C.; Jungwirth, U.; Keppler, B. K.; Micksche, M.; Berger, W.; Koellensperger, G. Intracellular protein binding patterns of the anticancer ruthenium drugs KP1019 and KP1339. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **2010**, *15*, (5), 737-48.
39. Alessio, E.; Mestroni, G.; Nardin, G.; Attia, W. M.; Calligaris, M.; Sava, G.; Zorzet, S. Cis- and trans-dihalotetrakis (dimethyl sulfoxide) ruthenium (II) complexes (RuX₂(DMSO)₄; X = Cl, Br): synthesis, structure, and antitumor activity. *Inorganic chemistry* **1988**, *27*, (23), 4099-4106.
40. Novakova, O.; Kasparikova, J.; Vrana, O.; van Vliet, P. M.; Reedijk, J.; Brabec, V. Correlation between cytotoxicity and DNA binding of polypyridyl ruthenium complexes. *Biochemistry* **1995**, *34*, (38), 12369-78.
41. Jaouen, G.; Vessières, A. Transition metal carbonyl oestrogen receptor assay. *Pure and applied chemistry* **1985**, *57*, (12), 1865-1874.
42. Suss-Fink, G. Arene ruthenium complexes as anticancer agents. *Dalton transactions* **2010**, *39*, (7), 1673-88.

43. Meggers, E. Exploring biologically relevant chemical space with metal complexes. *Curr Opin Chem Biol* **2007**, *11*, (3), 287-92.
44. Morris, R. E.; Aird, R. E.; Murdoch Pdel, S.; Chen, H.; Cummings, J.; Hughes, N. D.; Parsons, S.; Parkin, A.; Boyd, G.; Jodrell, D. I.; Sadler, P. J. Inhibition of cancer cell growth by ruthenium(II) arene complexes. *Journal of medicinal chemistry* **2001**, *44*, (22), 3616-21.
45. Peacock, A. F.; Sadler, P. J. Medicinal organometallic chemistry: designing metal arene complexes as anticancer agents. *Chem Asian J* **2008**, *3*, (11), 1890-9.
46. Smith, G. S.; Therrien, B. Targeted and multifunctional arene ruthenium chemotherapeutics. *Dalton transactions* **2011**, *40*, (41), 10793-800.
47. Bergamo, A.; Masi, A.; Dyson, P. J.; Sava, G. Modulation of the metastatic progression of breast cancer with an organometallic ruthenium compound. *International journal of oncology* **2008**, *33*, (6), 1281-9.
48. Casini, A.; Gabbiani, C.; Sorrentino, F.; Rigobello, M. P.; Bindoli, A.; Geldbach, T. J.; Marrone, A.; Re, N.; Hartinger, C. G.; Dyson, P. J.; Messori, L. Emerging protein targets for anticancer metallodrugs: inhibition of thioredoxin reductase and cathepsin B by antitumor ruthenium(II)-arene compounds. *Journal of medicinal chemistry* **2008**, *51*, (21), 6773-81.
49. Chatterjee, S.; Kundu, S.; Bhattacharyya, A.; Hartinger, C. G.; Dyson, P. J. The ruthenium(II)-arene compound RAPTA-C induces apoptosis in EAC cells through mitochondrial and p53-JNK pathways. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **2008**, *13*, (7), 1149-55.
50. Berger, I.; Hanif, M.; Nazarov, A. A.; Hartinger, C. G.; John, R. O.; Kuznetsov, M. L.; Groessl, M.; Schmitt, F.; Zava, O.; Biba, F.; Arion, V. B.; Galanski, M.; Jakupec, M. A.; Juillerat-Jeanneret, L.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K. In vitro anticancer activity and biologically relevant metabolization of organometallic ruthenium complexes with carbohydrate-based ligands. *Chemistry* **2008**, *14*, (29), 9046-57.
51. Ang, W. H.; Daldini, E.; Juillerat-Jeanneret, L.; Dyson, P. J. Strategy to tether organometallic ruthenium-arene anticancer compounds to recombinant human serum albumin. *Inorganic chemistry* **2007**, *46*, (22), 9048-50.

52. Ang, W. H.; Parker, L. J.; De Luca, A.; Juillerat-Jeanneret, L.; Morton, C. J.; Lo Bello, M.; Parker, M. W.; Dyson, P. J. Rational design of an organometallic glutathione transferase inhibitor. *Angewandte Chemie* **2009**, *48*, (21), 3854-7.
53. Chatterjee, S.; Biondi, I.; Dyson, P. J.; Bhattacharyya, A. A bifunctional organometallic ruthenium drug with multiple modes of inducing apoptosis. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **2011**, *16*, (5), 715-24.
54. Aird, R. E.; Cummings, J.; Ritchie, A. A.; Muir, M.; Morris, R. E.; Chen, H.; Sadler, P. J.; Jodrell, D. I. In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer. *British journal of cancer* **2002**, *86*, (10), 1652-7.
55. Chen, H.; Parkinson, J. A.; Morris, R. E.; Sadler, P. J. Highly selective binding of organometallic ruthenium ethylenediamine complexes to nucleic acids: novel recognition mechanisms. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, (1), 173-86.
56. Novakova, O.; Chen, H.; Vrana, O.; Rodger, A.; Sadler, P. J.; Brabec, V. DNA interactions of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media. *Biochemistry* **2003**, *42*, (39), 11544-54.
57. Hayward, R. L.; Schornagel, Q. C.; Tente, R.; Macpherson, J. S.; Aird, R. E.; Guichard, S.; Habtemariam, A.; Sadler, P.; Jodrell, D. I. Investigation of the role of Bax, p21/Waf1 and p53 as determinants of cellular responses in HCT116 colorectal cancer cells exposed to the novel cytotoxic ruthenium(II) organometallic agent, RM175. *Cancer Chemother Pharmacol* **2005**, *55*, (6), 577-83.
58. Bergamo, A.; Masi, A.; Peacock, A. F.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J.; Sava, G. In vivo tumour and metastasis reduction and in vitro effects on invasion assays of the ruthenium RM175 and osmium AFAP51 organometallics in the mammary cancer model. *Journal of inorganic biochemistry* **2010**, *104*, (1), 79-86.
59. Fernandez, R.; Melchart, M.; Habtemariam, A.; Parsons, S.; Sadler, P. J. Use of chelating ligands to tune the reactive site of half-sandwich ruthenium(II)-arene anticancer complexes. *Chemistry* **2004**, *10*, (20), 5173-9.

60. Kandioller, W.; Kurzwernhart, A.; Hanif, M.; Meier, S. M.; Henke, H.; Keppler, B. K.; Hartinger, C. G. Pyrone derivatives and metals: From natural products to metal-based drugs. *Journal of Organometallic Chemistry* **2011**, *696*, (5), 999-1010.
61. Manzotti, C.; Pratesi, G.; Menta, E.; Di Domenico, R.; Cavalletti, E.; Fiebig, H. H.; Kelland, L. R.; Farrell, N.; Polizzi, D.; Supino, R.; Pezzoni, G.; Zunino, F. BBR 3464: a novel triplatinum complex, exhibiting a preclinical profile of antitumor efficacy different from cisplatin. *Clin Cancer Res* **2000**, *6*, (7), 2626-34.
62. Mendoza-Ferri, M. G.; Hartinger, C. G.; Mendoza, M. A.; Groessler, M.; Egger, A. E.; Eichinger, R. E.; Mangrum, J. B.; Farrell, N. P.; Maruszak, M.; Bednarski, P. J.; Klein, F.; Jakupec, M. A.; Nazarov, A. A.; Severin, K.; Keppler, B. K. Transferring the concept of multinuclearity to ruthenium complexes for improvement of anticancer activity. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52*, (4), 916-25.
63. Novakova, O.; Nazarov, A. A.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K.; Brabec, V. DNA interactions of dinuclear RuII arene antitumor complexes in cell-free media. *Biochemical pharmacology* **2009**, *77*, (3), 364-74.
64. Magennis, S. W.; Habtemariam, A.; Novakova, O.; Henry, J. B.; Meier, S.; Parsons, S.; Oswald, I. D.; Brabec, V.; Sadler, P. J. Dual triggering of DNA binding and fluorescence via photoactivation of a dinuclear ruthenium(II) arene complex. *Inorganic chemistry* **2007**, *46*, (12), 5059-68.
65. Schmitt, F.; Govindaswamy, P.; Suss-Fink, G.; Ang, W. H.; Dyson, P. J.; Juillerat-Jeanneret, L.; Therrien, B. Ruthenium porphyrin compounds for photodynamic therapy of cancer. *Journal of medicinal chemistry* **2008**, *51*, (6), 1811-6.
66. Allen, T. C.; Cagle, P. T.; Popper, H. H. Basic concepts of molecular pathology. *Archives of pathology & laboratory medicine* **2008**, *132*, (10), 1551-6.
67. Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **1972**, *26*, (4), 239-57.
68. Saikumar, P.; Venkatachalam, M. A., Apoptosis and cell death. In *Basic Concepts of Molecular Pathology*, Cagle, P. T.; Allen, T. C., Eds. Springer: 2009; pp 29-40.

69. Leist, M.; Jaattela, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2001**, *2*, (8), 589-98.
70. Nicotera, P.; Leist, M.; Ferrando-May, E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicology letters* **1998**, *102-103*, 139-42.
71. Zong, W. X.; Ditsworth, D.; Bauer, D. E.; Wang, Z. Q.; Thompson, C. B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes & development* **2004**, *18*, (11), 1272-82.
72. Formigli, L.; Papucci, L.; Tani, A.; Schiavone, N.; Tempestini, A.; Orlandini, G. E.; Capaccioli, S.; Orlandini, S. Z. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of cellular physiology* **2000**, *182*, (1), 41-9.
73. Klionsky, D. J.; Emr, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **2000**, *290*, (5497), 1717-21.
74. Paglin, S.; Hollister, T.; Delohery, T.; Hackett, N.; McMahill, M.; Spiccas, E.; Domingo, D.; Yahalom, J. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer research* **2001**, *61*, (2), 439-44.
75. Cuervo, A. M. Autophagy: in sickness and in health. *Trends in cell biology* **2004**, *14*, (2), 70-7.
76. Sperandio, S.; de Belle, I.; Bredesen, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, (26), 14376-81.
77. Henics, T.; Wheatley, D. N. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: a view on new perspectives and features. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **1999**, *91*, (7), 485-98.
78. Gilloteaux, J.; Jamison, J. M.; Arnold, D.; Summers, J. L. Autoschizis: another cell death for cancer cells induced by oxidative stress. *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia* **2001**, *106*, (2 Suppl 1), 79-92.
79. Jamison, J. M.; Gilloteaux, J.; Taper, H. S.; Calderon, P. B.; Summers, J. L. Autoschizis: a novel cell death. *Biochemical pharmacology* **2002**, *63*, (10), 1773-83.

80. Gilloteaux, J.; Jamison, J. M.; Lorimer, H. E.; Jarjoura, D.; Taper, H. S.; Calderon, P. B.; Neal, D. R.; Summers, J. L. Autoschizis: a new form of cell death for human ovarian carcinoma cells following ascorbate:menadione treatment. Nuclear and DNA degradation. *Tissue & cell* **2004**, *36*, (3), 197-209.
81. Platt, N.; da Silva, R. P.; Gordon, S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends in cell biology* **1998**, *8*, (9), 365-72.
82. Yuan, J. Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death. *Journal of cellular biochemistry* **1996**, *60*, (1), 4-11.
83. Magnusson, C.; Vaux, D. L. Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death. *Immunol Cell Biol* **1999**, *77*, (1), 41-6.
84. Ashkenazi, A.; Dixit, V. M. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **1998**, *281*, (5381), 1305-8.
85. Hsu, H.; Xiong, J.; Goeddel, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **1995**, *81*, (4), 495-504.
86. Chinnaiyan, A. M.; O'Rourke, K.; Tewari, M.; Dixit, V. M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **1995**, *81*, (4), 505-12.
87. Wu, Q.; Kirschmeier, P.; Hockenberry, T.; Yang, T. Y.; Brassard, D. L.; Wang, L.; McClanahan, T.; Black, S.; Rizzi, G.; Musco, M. L.; Mirza, A.; Liu, S. Transcriptional regulation during p21WAF1/CIP1-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277*, (39), 36329-37.
88. Kunz, M.; Ibrahim, S.; Koczan, D.; Thiesen, H. J.; Kohler, H. J.; Acker, T.; Plate, K. H.; Ludwig, S.; Rapp, U. R.; Brocker, E. B.; van Muijen, G. N.; Flory, E.; Gross, G. Activation of c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is critical for hypoxia-induced apoptosis of human malignant melanoma. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **2001**, *12*, (3), 137-45.
89. Saikumar, P.; Dong, Z.; Mikhailov, V.; Denton, M.; Weinberg, J. M.; Venkatachalam, M. A. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *The American journal of medicine* **1999**, *107*, (5), 489-506.

90. Cai, J.; Yang, J.; Jones, D. P. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochimica et biophysica acta* **1998**, *1366*, (1-2), 139-49.
91. Du, C.; Fang, M.; Li, Y.; Li, L.; Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **2000**, *102*, (1), 33-42.
92. van Loo, G.; van Gurp, M.; Depuydt, B.; Srinivasula, S. M.; Rodriguez, I.; Alnemri, E. S.; Gevaert, K.; Vandekerckhove, J.; Declercq, W.; Vandenabeele, P. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* **2002**, *9*, (1), 20-6.
93. Zou, H.; Li, Y.; Liu, X.; Wang, X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, (17), 11549-56.
94. Schimmer, A. D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer research* **2004**, *64*, (20), 7183-90.
95. Cory, S.; Adams, J. M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews. Cancer* **2002**, *2*, (9), 647-56.
96. Ivanović, I.; Jovanović, K. K.; Gligorijević, N.; Radulović, S.; Arion, V. B.; Sheweshein, K. S. A.; Tešić, Ž. L.; Grgurić-Šipka, S. Ruthenium (II)–arene complexes with substituted picolinato ligands: Synthesis, structure, spectroscopic properties and antiproliferative activity. *Journal of Organometallic Chemistry* **2014**, *749*, 343–349.
97. Moore, G. E.; Gerner, R. E.; Franklin, H. A. Culture of normal human leukocytes. *Jama* **1967**, *199*, (8), 519-24.
98. Dulbecco, R.; Freeman, G. Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **1959**, *8*, (3), 396-7.
99. Freshney, R. I., Subculture and Cell Lines. In *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6th ed.; Freshney, R. I., Ed. John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, New Jersey, 2010; pp 199 - 201.
100. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay

for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* **1990**, 82, (13), 1107-12.

101. Supino, R. MTT assays. *Methods in molecular biology* **1995**, 43, 137-49.

102. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* **1991**, 83, (11), 757-66.

103. Ormerod, M. G. Cell cycle analysis of asynchronous populations. *Methods in molecular biology* **1998**, 91, 157-65.

104. Yount, G. L.; Haas-Kogan, D. A.; Levine, K. S.; Aldape, K. D.; Israel, M. A. Ionizing radiation inhibits chemotherapy-induced apoptosis in cultured glioma cells: implications for combined modality therapy. *Cancer research* **1998**, 58, (17), 3819-25.

105. Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods* **1995**, 184, (1), 39-51.

106. Casciola-Rosen, L.; Rosen, A.; Petri, M.; Schlissel, M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, 93, (4), 1624-9.

107. Banda, N. K.; Satterfield, W. C.; Dunlap, A.; Steimer, K. S.; Kurrle, R.; Finkel, T. H. Lack of gp120-induced anergy and apoptosis in chimpanzees is correlated with resistance to AIDS. *Apoptosis* **1996**, 1, (1), 49-62.

108. Heitland, P.; Koster, H. D. Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **2006**, 365, (1-2), 310-8.

109. Ezkurdia, I.; Juan, D.; Rodriguez, J. M.; Frankish, A.; Diekhans, M.; Harrow, J.; Vazquez, J.; Valencia, A.; Tress, M. L. Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Hum Mol Genet* **2014**, 23, (22), 5866-78.

110. Watson, A.; Mazumder, A.; Stewart, M.; Balasubramanian, S. Technology for microarray analysis of gene expression. *Curr Opin Biotechnol* **1998**, *9*, (6), 609-14.
111. Center, G. S. L. DNA Microarray. <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/microarray/> (18 April 2016),
112. Bowtell, D. D. Options available--from start to finish--for obtaining expression data by microarray. *Nat Genet* **1999**, *21*, (1 Suppl), 25-32.
113. Benjamini, Y.; Drai, D.; Elmer, G.; Kafkafi, N.; Golani, I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural brain research* **2001**, *125*, (1-2), 279-84.
114. Nueda, M. J.; Tarazona, S.; Conesa, A. Next maSigPro: updating maSigPro bioconductor package for RNA-seq time series. *Bioinformatics* **2014**, *30*, (18), 2598-602.
115. Conesa, A.; Nueda, M. J.; Ferrer, A.; Talon, M. maSigPro: a method to identify significantly differential expression profiles in time-course microarray experiments. *Bioinformatics* **2006**, *22*, (9), 1096-102.
116. Zheng, Q.; Wang, X. J. GOEAST: a web-based software toolkit for Gene Ontology enrichment analysis. *Nucleic acids research* **2008**, *36*, (Web Server issue), W358-63.
117. Benjamini, Y.; Yekutieli, D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of statistics* **2001**, *29*, (4), 1165-1188.
118. Ho, Y. P.; Au-Yeung, S. C.; To, K. K. Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives. *Medicinal research reviews* **2003**, *23*, (5), 633-55.
119. Yan, Y. K.; Melchart, M.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J. Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. *Chemical communications* **2005**, (38), 4764-76.
120. Gligorijevic, N.; Arandelovic, S.; Filipovic, L.; Jakovljevic, K.; Jankovic, R.; Grguric-Sipka, S.; Ivanovic, I.; Radulovic, S.; Tesic, Z. Picolinate ruthenium(II)-arene complex with in vitro antiproliferative and antimetastatic properties: comparison to a series of ruthenium(II)-arene complexes with similar structure. *Journal of inorganic biochemistry* **2012**, *108*, 53-61.

121. Ivanović, I.; Grgurić-Šipka, S.; Gligorijević, N.; Radulović, S.; Roller, A.; Tešić, Ž. L.; Keppler, B. K. X-ray structure and cytotoxic activity of a picolinate ruthenium (II)-arene complex. *Journal of the Serbian Chemical Society* **2011**, *76*, (1), 53-61.
122. Ries, F.; Klastersky, J. Nephrotoxicity induced by cancer chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **1986**, *8*, (5), 368-79.
123. Chu, G. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *The Journal of biological chemistry* **1994**, *269*, (2), 787-90.
124. Brabec, V.; Novakova, O. DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **2006**, *9*, (3), 111-22.
125. Mancini, M.; Sedghinasab, M.; Knowlton, K.; Tam, A.; Hockenbery, D.; Anderson, B. O. Flow cytometric measurement of mitochondrial mass and function: a novel method for assessing chemoresistance. *Annals of surgical oncology* **1998**, *5*, (3), 287-95.
126. Darzynkiewicz, Z.; Juan, G.; Li, X.; Gorczyca, W.; Murakami, T.; Traganos, F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* **1997**, *27*, (1), 1-20.
127. Majno, G.; Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* **1995**, *146*, (1), 3-15.
128. Kasibhatla, S.; Amarante-Mendes, G. P.; Finucane, D.; Brunner, T.; Bossy-Wetzel, E.; Green, D. R. Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. *CSH Protoc* **2006**, *2006*, (3).
129. Giannini, F.; Geiser, L.; Paul, L. E.; Roder, T.; Therrien, B.; Süß-Fink, G.; Furrer, J. Tuning the in vitro cell cytotoxicity of dinuclear arene ruthenium trithiolato complexes: Influence of the arene ligand. *Journal of Organometallic Chemistry* **2015**, *783*, 40-45.
130. Su, W.; Tang, Z.; Xiao, Q.; Li, P.; Qian, Q.; Lei, X.; Huang, S.; Peng, B.; Cui, J.; Huang, C. Synthesis, structures, antiproliferative activity of a series of ruthenium (II) arene derivatives of thiosemicarbazones ligands. *Journal of Organometallic Chemistry* **2015**, *783*, 10-16.

131. Song, R.; Kim, K. M.; Sohn, Y. S. Synthesis and properties of (diamine) platinum (II) complexes of pyridine carboxylate isomers and their antitumor activity. *Inorganica chimica acta* **1999**, 292, (2), 238-243.
132. Stearns, D. M.; Armstrong, W. H. Mononuclear and binuclear chromium (III) picolinate complexes. *Inorganic chemistry* **1992**, 31, (25), 5178-5184.
133. Chakov, N. E.; Collins, R. A.; Vincent, J. B. A re-investigation the electronic spectra of chromium (III) picolinate complexes and high yield synthesis and characterization of Cr 2 (μ -OH) 2 (pic) 4 \cdot 5H 2 O (Hpic=picolinic acid). *Polyhedron* **1999**, 18, (22), 2891-2897.
134. Ding, H.; Olson, L. K.; Caruso, J. A. Elemental speciation for chromium in chromium picolinate products. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **1996**, 51, (14), 1801-1812.
135. Hepburn, D. D.; Xiao, J.; Bindom, S.; Vincent, J. B.; O'Donnell, J. Nutritional supplement chromium picolinate causes sterility and lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, (7), 3766-71.
136. Stearns, D. M.; Silveira, S. M.; Wolf, K. K.; Luke, A. M. Chromium(III) tris(picolinate) is mutagenic at the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase locus in Chinese hamster ovary cells. *Mutation research* **2002**, 513, (1-2), 135-42.
137. Morris, G. S.; Guidry, K. A.; Hegsted, M.; Hasten, D. L. Effects of dietary chromium supplementation on cardiac mass, metabolic enzymes, and contractile proteins. *Nutrition Research* **1995**, 15, (7), 1045-1052.
138. Liang, Y.; Noda, L. K.; Sala, O. Polarizability and concentration effects on the Raman spectra of picolinic acid species in aqueous solution. *Journal of Molecular Structure* **2000**, 554, (2), 271-277.
139. Kuhn, P. S.; Cremer, L.; Gavriluta, A.; Jovanovic, K. K.; Filipovic, L.; Hummer, A. A.; Buchel, G. E.; Dojcinovic, B. P.; Meier, S. M.; Rompel, A.; Radulovic, S.; Tommasino, J. B.; Luneau, D.; Arion, V. B. Heteropentanuclear Oxalato-Bridged nd-4f (n=4, 5) Metal Complexes with NO Ligand: Synthesis, Crystal Structures, Aqueous Stability and Antiproliferative Activity. *Chemistry* **2015**, 21, (39), 13703-13.

140. Luijsterburg, M. S.; van Attikum, H. Chromatin and the DNA damage response: the cancer connection. *Mol Oncol* **2011**, *5*, (4), 349-67.
141. Heffeter, P.; Atil, B.; Kryeziu, K.; Groza, D.; Koellensperger, G.; Korner, W.; Jungwirth, U.; Mohr, T.; Keppler, B. K.; Berger, W. The ruthenium compound KP1339 potentiates the anticancer activity of sorafenib in vitro and in vivo. *Eur J Cancer* **2013**, *49*, (15), 3366-75.
142. Bergamo, A.; Stocco, G.; Gava, B.; Cocchietto, M.; Alessio, E.; Serli, B.; Iengo, E.; Sava, G. Distinct effects of dinuclear ruthenium(III) complexes on cell proliferation and on cell cycle regulation in human and murine tumor cell lines. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2003**, *305*, (2), 725-32.
143. Zorzet, S.; Bergamo, A.; Cocchietto, M.; Sorc, A.; Gava, B.; Alessio, E.; Iengo, E.; Sava, G. Lack of In vitro cytotoxicity, associated to increased G(2)-M cell fraction and inhibition of matrigel invasion, may predict In vivo-selective antimetastasis activity of ruthenium complexes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2000**, *295*, (3), 927-33.
144. Bergamo, A.; Gagliardi, R.; Scarcia, V.; Furlani, A.; Alessio, E.; Mestroni, G.; Sava, G. In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **1999**, *289*, (1), 559-64.
145. Kapitza, S.; Jakupec, M. A.; Uhl, M.; Keppler, B. K.; Marian, B. The heterocyclic ruthenium(III) complex KP1019 (FFC14A) causes DNA damage and oxidative stress in colorectal tumor cells. *Cancer letters* **2005**, *226*, (2), 115-21.
146. Lakin, N. D.; Jackson, S. P. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* **1999**, *18*, (53), 7644-55.
147. Hirao, A.; Kong, Y. Y.; Matsuoka, S.; Wakeham, A.; Ruland, J.; Yoshida, H.; Liu, D.; Elledge, S. J.; Mak, T. W. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **2000**, *287*, (5459), 1824-7.
148. Bartek, J.; Lukas, J. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current opinion in cell biology* **2001**, *13*, (6), 738-47.

149. Takagi, M.; Absalon, M. J.; McLure, K. G.; Kastan, M. B. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* **2005**, *123*, (1), 49-63.
150. Meinardi, M. T.; Gietema, J. A.; van der Graaf, W. T.; van Veldhuisen, D. J.; Runne, M. A.; Sluiter, W. J.; de Vries, E. G.; Willemse, P. B.; Mulder, N. H.; van den Berg, M. P.; Koops, H. S.; Sleijfer, D. T. Cardiovascular morbidity in long-term survivors of metastatic testicular cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2000**, *18*, (8), 1725-32.
151. Goldstein, R. S.; Noordewier, B.; Bond, J. T.; Hook, J. B.; Mayor, G. H. cis-Dichlorodiammineplatinum nephrotoxicity: time course and dose response of renal functional impairment. *Toxicology and applied pharmacology* **1981**, *60*, (2), 163-75.
152. Brillet, G.; Deray, G.; Lucsko, M.; Faucher, C.; Aubert, P.; Rottembourg, J.; Jacobs, C. [Definitive end-stage chronic kidney failure after cisplatin treatment]. *Nephrologie* **1993**, *14*, (5), 227-9.
153. Zhou, H.; Kato, A.; Yasuda, H.; Miyaji, T.; Fujigaki, Y.; Yamamoto, T.; Yonemura, K.; Hishida, A. The induction of cell cycle regulatory and DNA repair proteins in cisplatin-induced acute renal failure. *Toxicology and applied pharmacology* **2004**, *200*, (2), 111-20.
154. Gaiddon, C.; Jeannequin, P.; Bischoff, P.; Pfeffer, M.; Sirlin, C.; Loeffler, J. P. Ruthenium (II)-derived organometallic compounds induce cytostatic and cytotoxic effects on mammalian cancer cell lines through p53-dependent and p53-independent mechanisms. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2005**, *315*, (3), 1403-11.
155. Lin, G. J.; Jiang, G. B.; Xie, Y. Y.; Huang, H. L.; Liang, Z. H.; Liu, Y. J. Cytotoxicity, apoptosis, cell cycle arrest, reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential, and Western blotting analysis of ruthenium(II) complexes. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **2013**, *18*, (8), 873-82.
156. Trondl, R.; Heffeter, P.; Kowol, C. R.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K. NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. *Chemical Science* **2014**, *5*, (5), 2925-2932.

157. Qian, C.; Wang, J. Q.; Song, C. L.; Wang, L. L.; Ji, L. N.; Chao, H. The induction of mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells by ruthenium(II) asymmetric complexes. *Metallomics : integrated biometal science* **2013**, *5*, (7), 844-54.
158. Sava, G.; Zorzet, S.; Turrin, C.; Vita, F.; Soranzo, M.; Zabucchi, G.; Cocchietto, M.; Bergamo, A.; DiGiovine, S.; Pezzoni, G.; Sartor, L.; Garbisa, S. Dual Action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to collagen. *Clin Cancer Res* **2003**, *9*, (5), 1898-905.
159. Moreno, V.; Font-Bardia, M.; Calvet, T.; Lorenzo, J.; Aviles, F. X.; Garcia, M. H.; Morais, T. S.; Valente, A.; Robalo, M. P. DNA interaction and cytotoxicity studies of new ruthenium(II) cyclopentadienyl derivative complexes containing heteroaromatic ligands. *Journal of inorganic biochemistry* **2011**, *105*, (2), 241-9.
160. Martinez, A.; Suarez, J.; Shand, T.; Magliozzo, R. S.; Sanchez-Delgado, R. A. Interactions of arene-Ru(II)-chloroquine complexes of known antimalarial and antitumor activity with human serum albumin (HSA) and transferrin. *Journal of inorganic biochemistry* **2011**, *105*, (1), 39-45.
161. Du, K. J.; Wang, J. Q.; Kou, J. F.; Li, G. Y.; Wang, L. L.; Chao, H.; Ji, L. N. Synthesis, DNA-binding and topoisomerase inhibitory activity of ruthenium(II) polypyridyl complexes. *European journal of medicinal chemistry* **2011**, *46*, (4), 1056-65.
162. Gaur, R.; Mishra, L. Synthesis and characterization of Ru(II)-DMSO-Cl-chalcone complexes: DNA binding, nuclease, and topoisomerase II inhibitory activity. *Inorganic chemistry* **2012**, *51*, (5), 3059-70.
163. Li, L.; Wong, Y. S.; Chen, T.; Fan, C.; Zheng, W. Ruthenium complexes containing bis-benzimidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers. *Dalton transactions* **2012**, *41*, (4), 1138-41.
164. Nazarov, A. A.; Baquie, M.; Nowak-Sliwinska, P.; Zava, O.; van Beijnum, J. R.; Groessl, M.; Chisholm, D. M.; Ahmadi, Z.; McIndoe, J. S.; Griffioen, A. W.; van den Bergh, H.; Dyson, P. J. Synthesis and characterization of a new class of anti-angiogenic agents based on ruthenium clusters. *Scientific reports* **2013**, *3*, 1485.
165. Nowak-Sliwinska, P.; van Beijnum, J. R.; Casini, A.; Nazarov, A. A.; Wagnieres, G.; van den Bergh, H.; Dyson, P. J.; Griffioen, A. W. Organometallic ruthenium(II) arene

compounds with antiangiogenic activity. *Journal of medicinal chemistry* **2011**, *54*, (11), 3895-902.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Katarina Jovanović je rođena 29.05.1986. godine u Paraćinu. Nakon završetka srednje škole (Gimnazija Čuprija) 2005. godine upisala je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. Diplomirala je 2012. godine u okviru izborne oblasti Eksperimentalna medicina sa prosečnom ocenom 9.27 i ocenom 10 na diplomskom radu.

Doktorske studije je upisala na istom fakultetu 2012/2013. godine na smeru Biologija, modul Genetika. Na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije je zaposlena od 2012. godine, u okviru Odeljenja za eksperimentalnu onkologiju, u Laboratoriji za eksperimentalnu farmakologiju, gde je i uradila eksperimentalni deo svoje doktorske teze.

Zvanje istraživača pripravnika stekla je 2012. godine, a zatim i zvanje istraživača saradnika od 2013. godine u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (broj projekta III41026).

Dobitnik je stipendije Asocijacije Evropskih Biofizičkih Društava (European Biophysical Societies' Association, EBSA) za učešće na Regionalnoj Biofizičkoj Konferenciji (Regional Biophysics Conference, RBC) u Smolenicama, Slovačka, u maju 2014. godine, kao i stipendije fonda Boehringer Ingelheim za kratkotrajni boravak u inostranoj naučnoj instituciji (Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija), u periodu od maja – jula 2015. godine.

Autor je 15 naučnih radova u međunarodnim časopisima, od čega je 11 naučnih radova objavila u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21 kategorije) i 4 u časopisima M23 kategorije. Takođe je autor i 13 saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova, štampanih u celini i u izvodu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана _____ Катарина К. Јовановић _____
број индекса _____ Б3046/2012 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Молекуларни механизми антипролиферативног дејства рутенијум(II)-аренског комплекса са изохинолин-3-карбоксилном киселином као лигандом у условима *in vitro*

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Катарина К. Јовановић

Број индекса Б3046/2012

Студијски програм Биологија

Наслов рада Молекуларни механизми антипролиферативног дејства рутенијум(II)-аренског комплекса са изохинолин-3-карбоксилном киселином као лигандом у условима *in vitro*

Ментори др Невенка Глигоријевић, научни сарадник, др Михаило Јелић, доцент

Потписани/а Катарина К. Јовановић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Молекуларни механизми антипролиферативног дејства рутенијум(II)-аренског комплекса са изохинолин-3-карбоксилном киселином као лигандом у условима *in vitro*

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

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