

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Nevenka N. Gligorijević

**Ispitivanje antiproliferativnog i *in vitro*
antimetastatskog potencijala pikolinato
rutenijum(II)-cimenskog kompleksa:
poređenje sa serijom rutenijum(II)-
arenskih kompleksa sa sličnom
struktururom**

Doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Nevenka N. Gligorijević

Investigation of antiproliferative and *in vitro* antimetastatic potential of picolinate ruthenium(II)-cymene complex: Comparison to a series of ruthenium(II)-arene complexes with similar structure

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

DOKTORSKA DISERTACIJA HEMIJSKIH NAUKA

Mentori Prof. Dr Sanja Grgurić-Šipka
Vanredni profesor
Hemijski fakultet
Univerzitet u Beogradu

Dr Sandra Arandžević
Naučni saradnik
Institut za Onkologiju i Radiologiju Srbije

Članovi komisije

Prof. Dr Sanja Grgurić-Šipka
Vanredni profesor
Hemijski fakultet
Univerzitet u Beogradu

Dr Sandra Arandžević
Naučni saradnik
Institut za Onkologiju i Radiologiju Srbije

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

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

Prof. Dr Marija Gavrović-Jankulović
Vanredni profesor
Hemijski fakultet
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost za nastanak ovog rada dugujem Dr Sandri Arandelović, Dr sci. med. Sini i Raduloviću, kao i Prof. Sanji Grgurić-Šipka i Prof. Živoslavu Teiću koji su rukovodili eksperimentalnim delom ovog rada i svojim znanjem, stavovima i iskustvom doprineli uspešnoj realizaciji.

Eksperimentalni deo ovog rada urađen je u laboratoriji za eksperimentalnu farmakologiju i laboratoriji za genetiku Instituta za Onkologiju i Radiologiju Srbije. Zahvaljujem se svim naučnim, stručnim i tehničkim saradnicima IORS-a, koji su doprineli nastajanju ovog rada.

Takođe se zahvaljujem koleginicama Ivanki Ivanović i Biljani Dojčinović sa hemijskog fakulteta koje su doprinele realizaciji ovog rada.

Naročitu zahvalnost dugujem mojoj porodici, koja mi je pružila veliku podršku i uvek imala razumevanja za moja interesovanja.

Posvećeno mojim roditeljima

Ispitivanje antiproliferativnog i *in vitro* antimetastatskog potencijala pikolinato rutenijum(II)-cimenskog kompleksa: poređenje sa serijom rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa sličnom strukturom

Abstrakt

Cilj ove disertacije bio je ispitivanje potencijala antiproliferativnog i *in vitro* antimetastatskog dejstva serije novosintetisanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa. U pitanju je serija Ru(II)-arenskih kompleksa sledećih strukturnih formula: $[(\eta^6\text{-p-cimen})\text{Ru}(\text{L1-3})\text{Cl}_2]$, gde je L1-3: 3-acetilpiridin (**1**), 4-acetilpiridin (**2**) i 2-amino-5-hloropiridin (**3**), kao i $[(\eta^6\text{-p-cimen})\text{Ru}(\text{HL4,5})\text{Cl}_2]$, gde HL4 i HL5 odovara izonikotinskoj kiselini (**4**) i nikotinskoj kiselini (**5**) i $[(\eta^6\text{-p-cimen})\text{Ru}(\text{HL6-9})\text{Cl}]$, gde H₂L6-9 predstavlja 2,3-piridindikarboksilnu kiselinu (**6**), 2,4-piridindikarboksilnu kiselinu (**7**), 2,5-piridindikarboksilnu kiselinu (**8**) i 2,6-piridindikarboksilnu kiselinu (**9**), i $[(\eta^6\text{-p-cimen})\text{RuCl}(\text{L11})]$, gde je HL11 pikolinska kiselina (**11**). Kompleks (**10**) je polazni kompleks $[(\eta^6\text{-p-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$ koji je korišćen za sinteze navedenih kompleksa u reakciji sa odgovarajućim ligandima. Antiproliferativna aktivnost Ru(II)-arenskih kompleksa je ispitana na: est tumorskih ćelijskih linija (HeLa, MDA-MB-361, MDA-MB-453, FemX, B16, LS-174), na dve transformisane endotelijalne linije (EA.hy 926, MS1) i na jednoj normalnoj humanoj liniji (MRC-5). Za dalja ispitivanja poređenja povezanosti strukture i aktivnosti odabrana su dva kompleksa sa monodentatno vezanim piridinskim ligandom (**1** i **3**) i dva kompleksa sa bidentano vezanim piridinskim ligandom (**6** i **7**), koji nisu imali značajnu citotoksičnu aktivnost i pikolinato rutenijum(II)-cimenski kompleks (**11**), kao kompleks sa značajnom aktivnošću. Potencijal ispitivanih kompleksa da indukuju promene na nivou ćelijskog ciklusa određen je korišćenjem protočnog citometra nakon bojenja tretiranih ćelija sa propidijum-jodidom. Takođe, korišćenjem testa za detekciju rane faze apoptoze, dvokolornim bojenjem ćelija sa aneksinom i propidijum-jodidom i analize na protočnom citometru ispitan je potencijal kompleksa **11** da indukuje apoptozu. Distribucija rutenijuma(II) u proteinskoj i DNK frakciji HeLa ćelija tretiranih sa ispitivanim kompleksima utvrđena je korišćenjem indukovano kuplovane plazme sa

optičko emisionom spektrometrijom (ICP-OES). Kako bismo utvrdili da li ispitivani kompleksi indukuju odgovor ćelije zavisan od DNK reparacije kao rezultat interakcija sa DNK, ispitivali smo mRNK (koristeći Kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze u realnom vremenu) i proteinski nivo (koristeći Western blot) ekspresije ERCC1 i MSH-2, koji predstavljaju najznačajnije elemente NER i MMR reparacionih sistema ćelije. S obzirom da značajan broj rutenijumskih antikancerskih agenasa, pokazuje pre svega dobre antimetastatske karakteristike, *in vitro* antimetastatski potencijal ispitivanih kompleksa praćen je serijom testova kojima je utvrđen njihov efekat na adheziju, migraciju, invazivnost kroz matrigel, angiogenezu, kao i na aktivnost matriksnih metaloproteinaza (MMP-2 i MMP-9). Efekat kombinovanog tretmana kompleksa **11** i inhibitora PARP-a (3-aminobenzamida), kao i klinički relevantnih antikancerskih lekova, cisplatine i paklitaksela, ispitan je na HeLa ćelijama.

Ispitivani kompleksi **1-9** nisu pokazali značajnu antiproliferativnu aktivnost do koncentracije od 200 $\mu\text{mol/L}$. Izuzetak od ove serije je kompleks **11** koji je pokazao citotoksičnu aktivnost na svim ispitivanim ćelijskim linijama nakon 48 i 72 h tretmana, sa IC_{50} vrednostima u opsegu 36-250 $\mu\text{mol/L}$. Analizom akumulacije rutenijuma(II) u proteinskoj tj. DNK frakciji tretiranih HeLa ćelija korićenjem ICP-OES, utvrđen je značajno viši nivo kompleksa **11** u DNK frakciji. Kompleks **11** je, takođe, indukovao promene na nivou ćelijskog ciklusa HeLa ćelija i to smanjujući procenat ćelija u G1 fazi i indukujući blagi zastoj u S fazi ćelijskog ciklusa, bez apoptotskog efekta nakon 24 h tretmana. Tek nakon 48 h tretmana HeLa ćelija sa ispitivanim kompleksom **11** korićenjem testa za detekciju rane faze apoptoze uočen je nešto veći procenat apoptotičnih ćelija. Kompleks **11** je uticao na nivo ekspresije enzima reparacije DNK, ERCC1 i MSH2, i pokazao pojačanu aktivnost u kombinaciji sa inhibitorom PARP-a. Bez obzira na potencijal uticaja na rast i preivljavanje tumorskih ćelija, odabrani ispitivani rutenijum(II)-arenski kompleksi su pokazali *in vitro* antimetastatski potencijal utičući na adheziju, migraciju, invazivnost tumorskih ćelija, kao i na angiogenezu *in vitro*. Kompleks **11** je dodatno pokazao inhibitorni efekat i na degradaciju vanćelijskog matriksa utičući na aktivnost matriksnih metaloproteinaza (MMP-2 i MMP-9). Poređenje strukture i aktivnosti rutenijuma(II)-arenskih kompleksa ispitivanih u ovom radu je istaklo krucijalan značaj strukture i načina vezivanja liganda vezanog za stabilizovani Ru(II)-arenski sistem i potencijal i raznovrsnost ovog sistema za dalje

sinteze potencijalnih antikancerskih agenasa sa preferencijalno antimetastatskim karakteristikama.

Ključne reči: rutenijum(II)-aren, antiproliferativna aktivnost, apoptoza, antimetastatska aktivnost, MMP, ERCC1, PARP

Naučna oblast: Hemija

U a naučna oblast: bioneorganska hemija

UDK: 546.96

Investigation of antiproliferative and *in vitro* antimetastatic potential of picolinate ruthenium(II)-cymene complex: Comparison to a series of ruthenium(II)-arene complexes with similar structure

Abstract

The aim of this thesis was to investigate antiproliferative and *in vitro* antimetastatic potential of series of newly synthesized ruthenium(II)-arene complexes. It is a series of Ru(II)-arene complexes of general formula: $[(\eta^6\text{-p-cymene})\text{Ru}(\text{L1-3})\text{Cl}_2]$, where L1-3 is 3-acetylpyridine (**1**), 4-acetylpyridine (**2**) and 2-amino-5-chloropyridine (**3**), correspondingly, $[(\eta^6\text{-p-cymene})\text{Ru}(\text{HL4,5})\text{Cl}_2]$, where HL4 i HL5 are respectively isonicotinic acid (**4**) and nicotinic acid (**5**) and $[(\eta^6\text{-p-cymene})\text{Ru}(\text{HL6-9})\text{Cl}]$, where H₂L6-9 represent 2,3-pyridinedicarboxylic acid (**6**), 2,4-pyridinedicarboxylic acid (**7**), 2,5-pyridinedicarboxylic acid (**8**) and 2,6- pyridinedicarboxylic acid (**9**), and $[(\eta^6\text{-p-cymene})\text{RuCl}(\text{L11})]$, where HL11 is picolinic acid (**11**). Complex $[(\eta^6\text{-p-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$ (**10**) was starting complex used for the synthesis of complexes of this series with the corresponding ligands. Analysis of cell growth inhibition caused by Ru(II)-arene complexes was performed on: six tumor cell lines (HeLa, MDA-MB-361, MDA-MB-453, FemX, B16, LS-174), on two transformed endothelial lines (EA.hy 926, MS1) and on one normal human cell line (MRC-5). For further examination of comparison of structure and activity we used two complexes with monodentate bonded pyridine ligand (**1** an **3**) and two with bidentate bonded pyridine ligand (**6** and **7**), which didn't have any important cytotoxic activity and picolinate ruthenium(II)-cymene complex (**11**), as complex with important activity. Potential of investigated complexes to induce cell cycle perturbations was determined after staining of treated cells with propidium iodide (PI) on flow cytometer. As well as determination of induction of early apoptotic changes by complex **11**, after two colors staining with Annexin V-FITC and PI and analysis on flow cytometer. Ru(II) distribution among the DNA and protein fractions in HeLa cells treated with investigated complexes was determined using inductive coupled plasma with optical emission spectrometry (ICP-OES). In this study we evaluated whether DNA-repair-dependent signaling, as a result of interaction with DNA, which includes components of NER or MMR is utilized in cell response to

ruthenium(II)-p-cymene complexes, by following expression of ERCC1 (mRNA and protein level) and MSH2 (protein level) using Quantitative Real-Time PCR (RQ-PCR) and Western blot. Knowing that great number of ruthenium complexes although devoid of direct cytotoxicity *in vitro*, exhibit important antimetastatic characteristics, potential of our Ru(II)-p-cymene complexes to modulate several steps of metastatic progression like adhesion, migration, invasion through matrigel, proteolytic degradation of extracellular matrix (through influence on matrix metalloproteinase activity) and formation of new blood vessels has been studied *in vitro*. We also performed combined treatment of HeLa cells with complex **11** and PARP inhibitor (3-aminobenzamide) and complex **11** with clinically relevant anticancer agents, cisplatin and paclitaxel.

Investigated complexes **1-9** didn't show any important cytotoxic activity up to 200 $\mu\text{mol/L}$ concentration. Exception was complex **11**, which exhibited cytotoxic activity on all investigated cell lines after both 48 h and 72 h of continual incubation, with IC_{50} values falling in the 36-250 $\mu\text{mol/L}$ rang. Analysis of ruthenium(II) accumulation in DNA and protein fractions of HeLa cells, using ICP-OES revealed significantly higher content of complex **11** in DNA fraction in comparison to the other tested compounds. It also altered cell cycle progression by decreasing the percent of cells in G1 phase and inducing slight deadlock in S phase without apoptotic effect after 24 h treatment. Only after 48 h treatment of HeLa cells with complex **11** and using test for detection of early phases of apoptosis, higher percent of cells in apoptosis was detected. Complex **11** also affected expression of DNA repair enzymes ERCC1 and MSH2, and showed enhanced activity in combination with PARP inhibitor. Regardless of their effect on tumor cell growth, Ru(II) complexes exerted antimetastatic effect on several tumor cell lines *in vitro*, achieved mostly by the effect on cell adhesion, migration, invasion and angiogenesis, while picolinate ruthenium(II)-cymene additionally exerted inhibitory effect on extracellular matrix degradation by affecting matrix metalloproteinases activity (MMP-2 and MMP-9). Comparison of structure and activity of ruthenium(II)-arene complexes investigated in this work pointed out importance of structure of the ligand and the way it is bonded to stabilized Ru(II)-arene system, for the further synthesis of potential anticancer agents with preferentially antimetastatic characteristics.

Keywords: ruthenium(II)-arene, antiproliferative activity, apoptosis, antimetastatic, MMP, ERCC1, PARP

Academic expertise: Chemistry

Narrow academic expertise: bioinorganic chemistry

UDK: 546.96

SKRAĆENICE

CDDP- *cis*-diammindihloroplatina(II) (cisplatina)

DMSO- dimetilsulfoksid

NAMI-A- Imidazolijum trans-[tetrahloro(dimetilsulfoksid)(1H-imidazol)rutenat(III)]
(Novi Anti-tumorski Inhibitor Metastaza-A)

KP1019- Indazolijum trans-[tetrahlorobis(1H-indazol)rutenat(III)]

ROS- reaktivne vrste kiseonika

pta- 1,3,5-triaza-7-fosfatriciklo[3.3.1.1]-dekan (1,3,5-triaza-7-fosfoadamantan)

RAPTA- rutenijum-arenski kompleksi sa pta

RM175- [(bifenil)-rutenijum-(etilendiamin)hloro]heksafluorofosfat

hMSH2- humani homolog MutS reparacionog gena *E. coli*

MMR- (eng. MisMatch Repair complex) kompleks proteina reparacije pogrešno sparenih baza)

HMG- (eng. High-Mobility Group) grupa hromozomalnih proteina

TBP- (eng. transcriptional factor TATA Binding Protein) protein koji se veže za transkripcioni faktor TATA

NER- (eng. Nucleotide Excision Repair) proteinski sistem reparacije isecanjem nukleotida

ERCC1- (eng. Excision Repair Cross-Complementing) protein sistema za reparaciju

XP- eng. Xeroderma pigmentosum

DNK oštećenja isecanjem nukleotida

PARP- (eng. Poly(ADP-ribose) polymerases) Poli(ADP-ribozil)polimeraze

SSB- (eng. Single-Strand DNA Breaks) prekidi na jednom lancu DNK

BER- (eng. Base Excision Repair) multiproteinski kompleks za reparaciju isecanje baza

NAD⁺- nikotin amin adenin dinukleotid

ATP- adenzin trifosfat

ADP- adenzin difosfat

3-AB- 3-aminobenzamid

ECM- (eng. Extracellular matrix) Vanćelijski matriks

MMP- (eng. Matrix Metalloproteinases) Matriksne metaloproteinaze

TIMP- (eng. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) tkivni inhibitor metaloproteinaza

AMF- autokrini faktori kretanja

VEGF- (eng. vascular endothelial-derived growth factor) vaskularni endotelijalni faktor rasta

bFGF- (eng. basic Fibroblast-like Growth Factor) bazni faktor rasta fibroblasta

EGF- (eng. Epidermal Growth Factor) epidermani faktor rasta

IL-8- interleukin 8

TGF- β - (eng. Transforming Growth Factor β) transformni ući faktor rasta β

HeLa- ćelije humanog karcinoma grlića materice

FemX- ćelije humanog melanoma

MDA-MB-361 i MDA-MB-453- ćelije karcinoma dojke

LS-174- ćelije kolorektalnog karcinoma

B16- ćelije mišjeg melanoma

EA.hy 926- humane transformisane endotelijalne ćelije

MS1- mišje transformisane endotelijalne ćelije

MRC-5- humani fetalni fibroblasti pluća

RPMI 1640- (eng. Roswell Park Memorial Institute) hranljivi medijum

DMEM- (eng. Dulbecco's Modified Eagles Medium) hranljivi medijum

BME- (eng. Basal Medium Eagle) osnovni hranljivi medijum

FCS- (eng. Fetal Calf Serum) fetalni goveđi serum

MTT- 3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid)

PI- propidijum jodid

FITC- fluorescein-izotiocijanat

FASC- (eng. Fluorescence Activated Sorting Cells) sortiranje ćelija zasnovano na fluorescenciji

ICP-OES- (eng. Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry) indukovana spregnuta plazma-optička emisiona spektrometrija

RT-PCR- lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

EDTA- etilendiamintetrasirćetna kiselina

SRB- sulforodamin B boja

TCA- trihlor sirćetna kiselina

SDS-PAGE- natrijum-dodecil-sulfat-poliakrilamidna-gel-elektroforeza

CBB- (eng. Coomassie Brilliant Blue) komazi brilijantno plava boja

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. Kompleksi metala kao antikancerski agensi.....	4
2.2. Cisplatina.....	4
2.3. Hemija rutenijuma	6
2.4. Strukture i aktivnosti najznačajnijih rutenijumskih antikancerskih kompleksa	7
2.4.1. NAMI-A	10
2.4.2. KP1019	12
2.4.3. Ru(II)-arenski kompleksi.....	13
2.4.3.1. RM175	14
2.4.3.2. Rutenijum-aren pta (RAPTA) kompleksi.....	15
2.5. Reparacija DNK adukata.....	17
2.5.1. Reparacija oštećenja DNK isecanjem nukleotida (NER)	18
2.5.2. Reparacija DNK uklanjanjem pogrešno sparenih baza (MMR).....	19
2.5.3. Inhibitori reparacije DNK u kombinovanoj terapiji	21
2.6. Molekulski aspekti invazivnosti i metastaziranja tumorskih ćelija.....	26
2.6.1. Trostepena teorija invazivnosti.....	28
2.6.2. Uloga matriksnih metaloproteinaza u metastaziranju	29
2.6.3. Uloga kretanja tumorskih ćelija u procesu metastaziranja	31
2.6.4. Uloga angiogeneze u procesu metastaziranja.....	32
2.6.4.1. Mehanizam angiogeneze kod kancera.....	33
3. MATERIJAL I METODE	35
3.1. Hemijske strukture ispitivanih kompleksa	36
3.2. Kulture ćelija	38
3.2.1. Sastav hranjive podloge RPMI 1640.....	40
3.2.2. Priprema RPMI 1640 hranjive podloge.....	41
3.2.3. Sastav hranjive podloge DMEM	41
3.2.4. Priprema DMEM hranjive podloge.....	43
3.2.5. Postupak održavanja kulture ćelija.....	43
3.2.6. Postupak pasažiranja kultura ćelija.....	43
3.3. POSTUPAK ISPITIVANJA ANTIPROLIFERATIVNOG POTENCIJALA KOMPLEKSA RUTENIJUMA(II) MTT TESTOM	45
3.3.1. Postupak određivanja viabilnosti ćelija.....	46
3.3.2. Postupak određivanja preživljavanja ćelija MTT testom	47
3.3.2.1. Konstrukcija kalibracione krive za MTT	47
3.3.2.2. Postupak određivanja preživljavanja ćelija MTT testom	48
3.3.2.3. Obrada podataka	49
3.4. Analiza promena distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa pod dejstvom ispitivanih kompleksa metodom na protočnom citometru	50
3.5. Analiza apoptoze bojenjem sa aneksin V-FITC-om i propidijum jodidom na protočnom citometru	51
3.6. Analiza unutarćelijske distribucije Ru(II) (u proteinskoj vs DNK frakciji) metodom ICP-OES	53
3.6.1. Priprema uzorka.....	53

3.6.2. Razdvajanje faza.....	53
3.6.3. Izolovanje RNK.....	54
3.6.4. Izolovanje DNK.....	54
3.6.5. Izolovanje proteina	54
3.7. Analiza uticaja ispitivanih kompleksa na invazivni i metastatski potencijal tumorskih ćelija <i>in vitro</i>	55
3.7.1. Želatinska zimografija	55
3.7.2. Uticaj ispitivanih kompleksa na invazivnost tumorskih ćelija analizom u invazivnim komorama presvučenim matrigelom	58
3.7.3. Analiza uticaja ispitivanih kompleksa na migraciju tumorskih ćelija <i>in vitro</i> ("Scratch assay")	60
3.7.4. Analiza uticaja ispitivanih kompleksa na adheziju tumorskih ćelija.....	61
3.7.5. Uticaj ispitivanih kompleksa Ru(II) na angiogenezu <i>in vitro</i> ("Tube formation assay").....	62
3.7.6. Određivanje efekta kompleksa 11 na ekspresiju MMP-2 mRNK nivoa koristeći kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze u realnom vremenu ("Quantitative Real-Time PCR- RQ-PCR").....	64
3.7.6.1. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu.....	64
3.7.6.1.1. Izolovanje RNK i sinteza cDNK	64
3.7.6.1.2. RQ-PCR.....	65
3.8. Određivanje efekta ispitivanih kompleksa na ekspresiju ERCC1 mRNK nivoa (kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu) i proteinskog nivoa (Western blot)	66
3.8.1. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu.....	66
3.8.1.1. Izolovanje RNK i sinteza cDNK	66
3.8.1.2. RQ-PCR.....	66
3.8.2. Western blot.....	67
3.8.3. Određivanja koncentracije proteina (Bradford-ova metoda).....	70
3.9. Ispitivanje kombinovanog efekta kompleksa 11 i inhibitora PARP-a/ cisplatin/ paklitaksela	71
3.9.1. Obrada podataka	72
4. REZULTATI	77
4.1. Rezultati MTT testa.....	78
4.2. Rezultati analize ćelijskog ciklusa.....	83
4.3. Rezultati analize apoptoze	86
4.4. Intraćelijska distribucija Ru(II) u proteinskoj nasuprot DNK frakciji	88
4.5. <i>In vitro</i> antimetastatski potencijal ispitivanih kompleksa	89
4.5.1. Želatinska zimografija	89
4.5.2. Rezultati uticaj ispitivanih kompleksa na invazivnost tumorskih ćelija.....	95
4.5.3. Rezultati uticaja ispitivanih kompleksa na migraciju tumorskih ćelija <i>in vitro</i> ("Scratch assay")	96
4.5.4. Rezultati uticaja ispitivanih kompleksa na adheziju tumorskih ćelija.....	98
4.5.5. Uticaja kompleksa Ru(II) na angiogenezu <i>in vitro</i> ("Tube formation assay")	99
4.6. Rezultati analize uticaja ispitivanih kompleksa na nivo ekspresije enzima koji učestvuju u reparaciji DNK	100
4.6.1. Efekat ispitivanih kompleksa na ekspresiju ERCC1	100
4.6.2. Efekat ispitivanih kompleksa na ekspresiju MSH2 na proteinskom nivou	101

4.7.1. Rezultati ispitivanja kombinovanog efekta pikolinato rutenijum(II)-p-cimenskog kompleksa i inhibitora PARP-a (3-AB)	103
4.7.2. Rezultati ispitivanja kombinovanog efekta pikolinato rutenijum(II)-p-cimenskog kompleksa i antikancerskih lekova (cisplatine i paklitaksela)	106
5. DISKUSIJA	114
6. ZAKLJUČAK.....	122
LITERATURA	125
BIOGRAFIJA.....	134

1. UVOD

Otkriće antitumorskih karakteristika kompleksa platine, cisplatine (*cis*-diammindihloroplatine(II)-CDDP), pokrenulo je novu oblast istraživanja zasnovanu na ispitivanju kompleksa metala kao lekova [1]. Cisplatina i njeni analozi su do danas ostali među najefikasnijim hemoterapeutskim agensima u kliničkoj upotrebi. U potrazi za antikancerskim agensima koji sadrže neki drugi metal osim platine, kao najperspektivniji pojavili su se kompleksi rutenijuma [1]. Kompleksi rutenijuma su pokazali drugačiji mehanizam antitumorskog dejstva i kliničke toksičnosti od cisplatine. Ustanovljeno je da kompleksi rutenijuma najverovatnije interaguju sa proteinima plazme, kolagenom vanćelijskog matriksa, aktinima, regulatornim enzimima i DNK, što im daje raznovrsnost u mehanizmu dejstva, uključujući procese izvan i unutar ćelije [2].

U ovom radu je ispitana *in vitro* antitumorska aktivnost novosintetisanih kompleksa Ru(II) čija sinteza je nedavno objavljena [3,4]. Rutenijum(II)-arenski kompleksi formule $[(\eta^6\text{-p-cimen})\text{Ru}(\text{L1-3})\text{Cl}_2]$, gde je L1-3: 3-acetilpiridin (**1**), 4-acetilpiridin (**2**) i 2-amino-5-hloropiridin (**3**), kao i $[(\eta^6\text{-p-cimen})\text{Ru}(\text{HL4,5})\text{Cl}_2]$, gde HL4 i HL5 odgovara izonikotinskoj kiselini (**4**) i nikotinskoj kiselini (**5**) i $[(\eta^6\text{-p-cimen})\text{Ru}(\text{HL6-9})\text{Cl}]$, gde H₂L6-9 predstavlja 2,3-piridindikarboksilnu kiselinu (**6**), 2,4-piridindikarboksilnu kiselinu (**7**), 2,5-piridindikarboksilnu kiselinu (**8**) i 2,6-piridindikarboksilnu kiselinu (**9**) su dobijeni reakcijom $[(\eta^6\text{-p-cimen})_2\text{RuCl}_2]_2$ (**10**) sa odgovarajućim ligandom. U pitanju je serija rutenijum(II) kompleksa (**1-9**) koja sadrži p-cimen kao arenski ligand i piridinski derivat koordinovan monodentatno ili bidentatno za rutenijum, kojima je pridružen i srodni kompleks koji sadrži pikolinski anjon kao ligand $[(\eta^6\text{-p-cimen})\text{RuCl}(\text{L11})]$ (**11**). Svi ovi kompleksi imaju „piano-stool“ geometriju (tj. geometriju „stolice klavira“) gde arenski ligand formira sedište dok helatni ligandi zajedno sa hlorido ligandima su noge te stolice.

U ovom radu je izučavan uticaj navedenih kompleksa na preživljavanje tumorskih ćelija u kulturi, njihova interakcija sa unutarćelijskim komponentama, kao i potencijal da menjaju neke karakteristike neophodne za invazivnost tumorskih ćelija, kao što su adhezija, migracija, razlaganje vanćelijskog matriksa i angiogeneza.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Kompleksi metala kao antikancerski agensi

Koordinaciona hemija nudi brojne mogućnosti za razvoj antitumorskih agenasa koji sadrže metal [5]. Lekovi na bazi platine su u kliničkoj upotrebi u lečenju karcinoma više od 30 godina. Cisplatina i njeni analozi su do danas među najefikasnijim hemoterapeutskim agensima u kliničkoj upotrebi [1].

Međutim, klinička upotreba cisplatine je ograničena na relativno uzak opseg tumora, zbog primarne rezistencije na cisplatinu i razvoja sekundarne rezistencije na inicijalni tretman [6]. Dodatno, cisplatina se primenjuje intravenski zbog ograničene rastvorljivosti u vodi, a ima i ozbiljna neželjena delovanja.

Ova ograničenja su pokrenula potragu za efikasnijim i manje toksičnim antitumorskim agensom zasnovanim na metalu. Rezultat je bio sinteza hiljade platinskih kompleksa i njihova evaluacija kao antitumorskih agenasa. Tek relativno skoro su naučnici shvatili da kompleksi metala ne moraju da budu visoko citotoksični da bi imali značajne antitumorske karakteristike. Neka od najperspektivnijih istraživanja su otkrića novijih kompleksa rutenijuma i galijuma, koji uglavnom imaju antimetastatski efekat. Mada su neki od ovih kompleksa uspešno završili I i II fazu kliničkih ispitivanja, mehanizam njihovog dejstva je još uvek nepoznat [7].

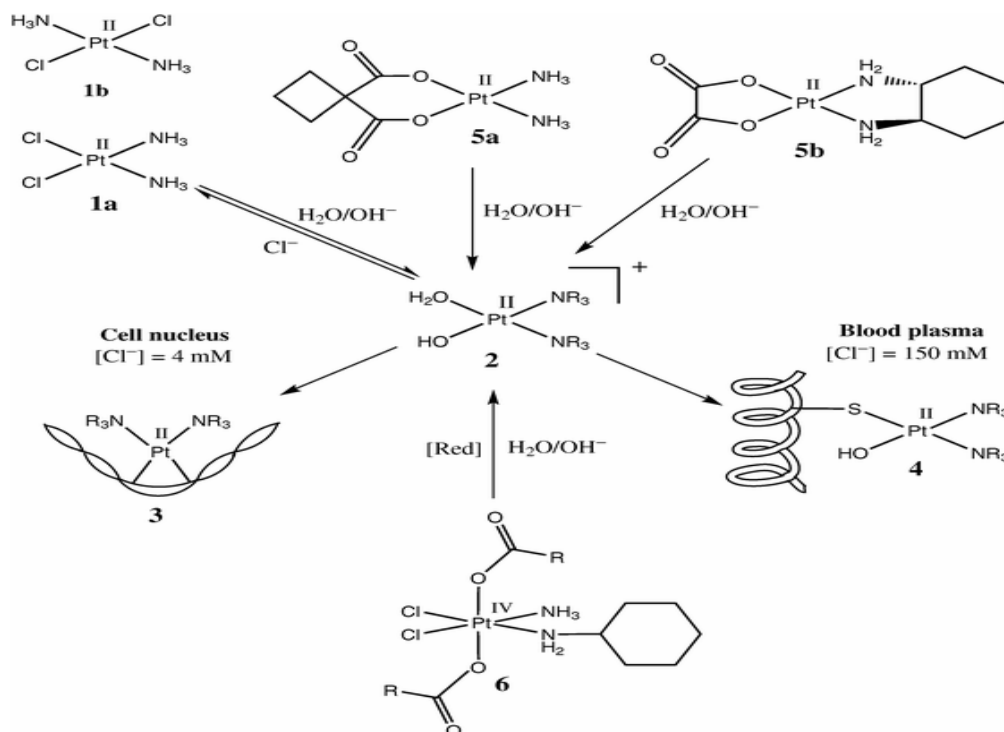
Biološke aktivnosti, uključujući antikancersku aktivnost, rutenijumskih kompleksa prvi put su uočene od strane Dwyer-a i saradnika 1950-tih godina [8-10]. Međutim, ovo istraživanje je zapostavljeno do slučajnog otkrića aktivnosti cisplatine od strane Rosenberga i saradnika 1960-tih godina [11-13], nakon čega se dalji razvoj rutenijumskih antikancerskih lekova često ugledao na platinske lekove [2].

2.2. Cisplatina

Citotoksičnost cisplatine (1a) (Shema 2.1) na ćelijama tumora je nekoliko puta veća u poređenju sa citotoksičnošću *trans*-platine (1b), što ukazuje na to da izomeri sa istim donorskim ligandima mogu da imaju veoma različitu biološku aktivnost [2].

U fiziološkim uslovima, relativno labilni hloridni ligandi (koji se nazivaju odlazeća grupa) se stupnjevito i lako supstituišu u roku od nekoliko sati sa molekulima vode, što dovodi do delimično hidrolizovanih vrsta. Pozitivno naelektrisani kompleks

Pt(II) je elektrofil, koji će lako reagovati sa svim nukleofilnim grupama u ćeliji, uključujući sulfhidrilne grupe proteina i nukleofilne centre nukleinskih kiselina [14].



Shema 2.1. *Prihvaćen mehanizam dejstva platinskih antikancerskih lekova [2].*

Kako bi postigla svoju citotoksičnu aktivnost, smatra se da cisplatina treba da difunduje neizmenjena u nukleus ćelije, gde dolazi do aktivacije i hidrolize, praćene vezivanjem za DNK. U nekim slučajevima to vezivanje za dve susedne guaninske baze DNK dovodi do značajnih oštećenja strukture DNK, koju ne uspevaju da poprave postojeći enzimski sistemi i to dovodi do smrti ćelije putem apoptoze [12,13]. Prerana aktivacija i hidroliza u vanćelijskom medijumu dovodi do formiranja adukata platine sa proteinima (primarno albuminom seruma). Smatra se da ovaj nepoželjan proces deaktivira 98% cisplatine primenjene intravenski, uprkos činjenici da je brzina aktivacije u krvnoj plazmi niža nego u ćelijama s obzirom na višu koncentraciju hloridnih jona (150 mmol/L van ćelije vs. 4-20 mmol/L unutar ćelije) [12,13]. Dalja deaktivacija cisplatine može se desiti u citoplazmi vezivanjem za intraćelijske donore sumpora, kao što je glutation (vezivanje Pt(II) za sumpor je favorizovano s obzirom na „meku“ prirodu i Pt i S atoma) [2,12].

Nažalost, kao što je već rečeno, opseg dejstva cisplatine (koja se uglavnom koristi u lečenju kancera ovarijuma i testisa) je ograničen, mada ima mnogo širi opseg dejstva u kombinovanoj terapiji [15]. Kao rezultat sinteze i testiranja hiljada jedinjenja, samo su još dva kompleksa platine(II), karboplatina (5a) i oksaliplatina (5b) (Shema 2.1) ušle u kliničku upotrebu [2,12,13,16].

2.3. Hemija rutenijuma

Potruga za citotoksičnim agensom sa prihvatljivijim profilom toksičnosti, ali produžene, i ako je moguće proširene aktivnosti u odnosu na cisplatinu i platinske komplekse, dovela je do zainteresovanosti za molekule koji sadrže druge teške metale grupa 8, 9, i 10 (prethodno poznati kao grupa VIII) periodnog sistema, koji imaju slične karakteristike sa platinom. Teorijske prednosti upotrebe jona drugih prelaznih metala obuhvataju: a) dostupnost dodatnih koordinacionih mesta u oktaedarskim kompleksima, b) drugačiji afinitet za ligande i kinetika supstitucije, c) promene u oksidacionim stanjima, d) fotodinamički pristup terapiji [6]. Zbog njihove varijacije u hemijskim karakteristikama, mehanizam dejstva i spektar aktivnosti ovih jedinjenja drugih prelaznih metala može se značajno razlikovati od onog cisplatine.

Do sada, mnogo je novih jedinjenja ovih metala koji su se pokazali aktivni *in vitro* prema raznim tipovima tumorskih ćelijskih linija i mogu se smatrati potencijalno novim antikancerskim agensima.

Od svih elemenata periodnog sistema, rutenijum ima najširi opseg oksidacionih stanja od -2 do +8. Stoga su kompleksi rutenijuma redukciono aktivni i njihova primena kao redukcionih agenasa u različitim hemijskim reakcijama je od značaja. Kinetička stabilnost rutenijuma u nekoliko različitih oksidacionih stanja, često reverzibilna priroda njegovih redoks parova, i relativna lakoća sa kojom se mogu dobiti kompleksi mešovitih liganada, sve čini rutenijum naročito atraktivnom metom za izučavanje [17].

2.4. Strukture i aktivnosti najznačajnijih rutenijumskih antikancerskih kompleksa

Ru(III) je dominantno oksidaciono stanje za Ru u fiziološkim uslovima dok su Ru(II) i Ru(IV) oksidaciona stanja koja se lako postižu u prisustvu bioloških reduktanata (askorbat ili glutation) ili oksidacionih agenasa (O_2 ili H_2O_2). Sva ova tri oksidaciona stanja (Ru(II), Ru(III), i Ru(IV)) grade koordinaciona jedinjenja sa oktaedarskom geometrijom (uglavnom sa relativno „mekim“ N i S kao donorskim ligandima), dok Ru(II) organometalni kompleksi su tetraedarski („piano-stool“, pseudo-oktaedarska geometrija), uljučujući bar jednu π -vezu sa arenskim ligandom [2].

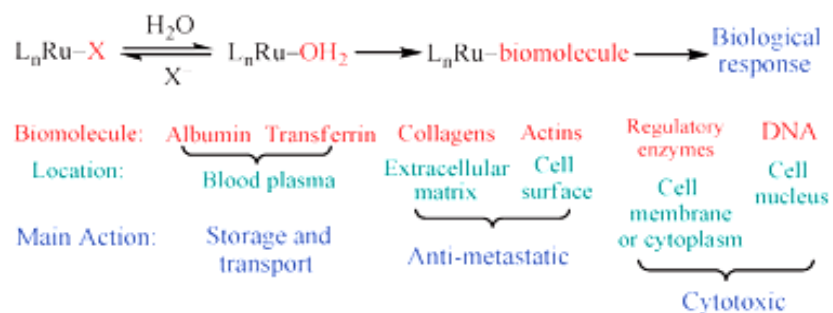
Jedni od prvih tipova antikancerskih rutenijumskih kompleksa, predloženi od strane Clarke-a i saradnika 1980-tih, su bili hlorido-ammin Ru(II) i Ru(III) kompleksi jasno inspirisani cisplatinom, za koje se smatralo da reaguju primarno sa DNK [18]. Među ostalim rutenijum-aminskim kompleksima testiranim po pitanju njihove citotoksičnosti prema ćelijama kancera, je bila dobro poznata citološka boja, rutenijum crveno, za koju se smatra da inhibira transport Ca(II) u ćeliju selektivnim vezivanjem za Ca(II) transportujuće proteine [18-20].

Jedan od glavnih problema za biološku aplikaciju nenaelektrisanih kompleksa, kao što su cisplatina i hlorido-ammin-Ru(II) kompleksi je njihova slaba rastvorljivost u vodi [21]. Stoga je sledeća velika grupa jedinjenja koja je bila izučavana (od strane italijanskih naučnika, Alessio i Sava i njihovih saradnika) bila grupa visoko rastvornih u vodi Ru(II)-hlorido-DMSO kompleksa [22-24]. Otkriveno je da je u ovom slučaju *trans* kompleks mnogo više citotoksičan nego njegov *cis* izomer [22,25]. To je suprotno aktivnosti Pt(II) kompleksa, što je istaklo verovatnu razliku u mehanizmu dejstva Ru(II) i Pt(II) kompleksa. Daljim istraživanjima je utvrđeno da Ru(II)-hlorido-DMSO kompleksi imaju antimetastatsku aktivnost (pogotovo kod nemikrocelularnog karcinoma pluća), dok su prilično neaktivni prema primarnim tumorima [23,26].

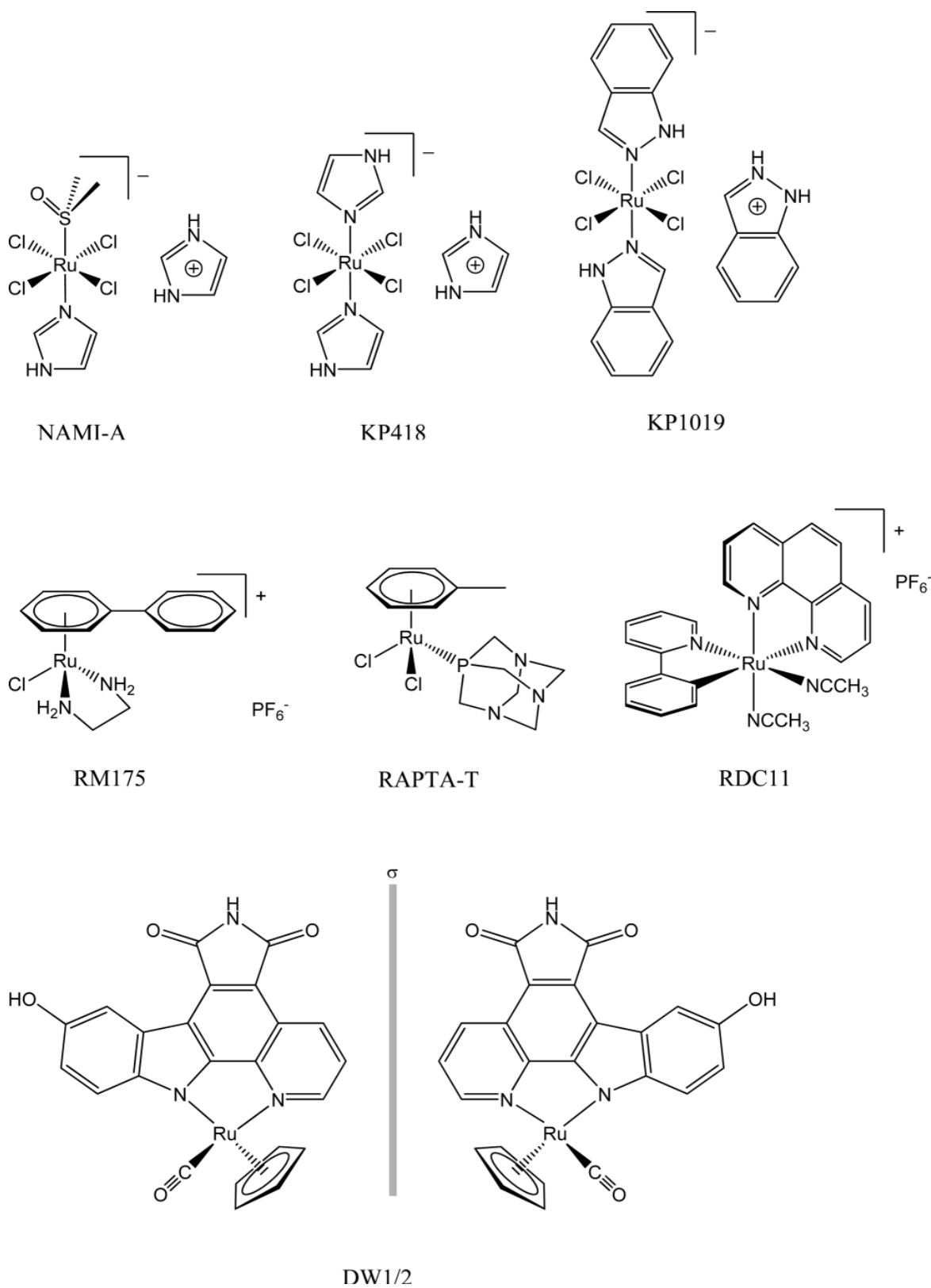
Potruga za biološki aktivnijim jedinjenjem dovela je do razvoja NAMI-A, specifično antimetastatskog agensa, koji je trenutno u fazi II kliničkih ispitivanja [21,27,28].

Pošto NAMI-A podleže hidrolizi i akvataciji u roku od nekoliko minuta u vodenom rastvoru na pH 7,4 i 37 °C i praktično je necitotoksičan na ćelije kancera, jasno je da njegova aktivnost nije primarno vezana za vezivanje za DNK u nukleusu

ćelije [24,27]. Interakcije sa aktinima unutar ćelije [29,30] ili sa kolagenom vanćelijskog matriksa [6] koji dovode do redukovane mobilnosti invazivnih ćelija kancera, predložene su kao mogući mehanizam antimetastatskog dejstva NAMI-A.



Slika 2.1. Potencijalne interakcije kompleksa rutenijuma sa različitim biomolekulima [2].



Slika 2.2. Hemijske strukture najbitnijih rutenijumskih kompleksa.

2.4.1. NAMI-A

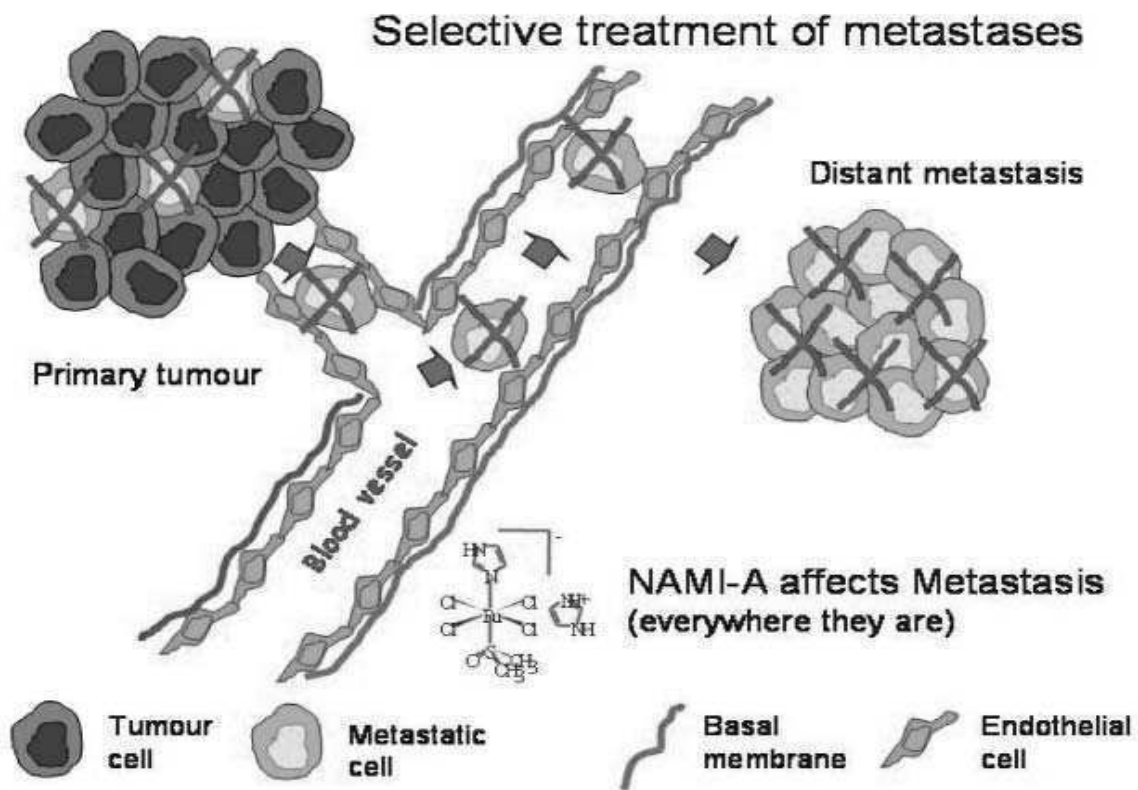
NAMI-A¹ [33], (Him)[*trans*-RuCl₄(Him)(DMSO)] (im=imidazol, DMSO=dimetilsulfoksid) je kompleks Ru(III) sa dimetilsulfoksidom i imidazolom koordinovanim za rutenijum(III) (Slika 2.2). NAMI-A je prvi rutenijumski kompleks koji je ušao u klinička ispitivanja (1999. godine) kao antikancerski kandidat protiv raznih metastazirajućih solidnih tumora, uključujući kolorektalni, tumor pluća, melanom, ovarijum i tumor pankreasa [34].

Predloženi mehanizam dejstva NAMI-A uključuje [35] (Slika 2.3):

- interakciju sa regulacijom ćelijskog ciklusa koja rezultuje u prolaznoj akumulaciji ćelija u G₂/M fazi [36,37];
- inhibiciju matriksnih metaloproteinaza [36] i aktivaciju adhezionih molekula, kao što su beta-integrini [31];
- povećanje debljine kapsule oko primarnog tumora i vanćelijskog matriksa oko krvnih sudova, čime sprečava tumorske ćelije da prodiru u okolno tkivo i krvne sudove [37] i
- vezivanje za nukleinske kiseline, pokazujući direktan efekt na DNK tumorskih ćelija [39].

Pokazalo se da je dejstvo NAMI-A nezavisno od tipa tumora ili kliničkog stadijuma bolesti [40]. NAMI-A je sposoban ne samo da prevenira formiranje metastaza već i da inhibira njihov rast kada su već uspostavljene [28]. Takođe, otkriven je čest sinergizam NAMI-A u kombinaciji sa cisplatinom i drugim klasičnim antikancerskim lekovima (taksani, antraciklini), u *in vitro* i *in vivo* uslovima [41].

¹ NAMI je akronim za Novi Anti-tumorski Inhibitor Metastaza; -A znači da je prvi u seriji.



Slika 2.3. *Selektivno dejstvo NAMI-A na metastaze tumora. Rezultat je slaba redukcija primarnog tumora (gde metastaze predstavljaju subpopulaciju) i izraženo, skoro potpuno uklanjanje metastaza (gde ćelije koje metastaziraju predstavljaju skoro 100% ukupnih ćelija) [27].*

2.4.2. KP1019

Istovremeno sa razvojem NAMI-A od strane Prof. G. Save i saradnika sa Univerziteta u Trstu, Prof. B. Keppler i njegovi saradnici sa Univerziteta u Beču su otkrili Ru(III) hlorido-indazol kompleks, KP1019, $(InH)[trans-RuCl_4(In)_2]$, (in=indazol). KP1019 je stabilan kompleks Ru(III) koji sadrži dva prstena indazola koordinovana za metalni centar preko atoma azota (Slika 2.2.). KP1019 je rezistentniji na akvataciju i hidrolizu i ćelija ga usvaja brže nego NAMI-A. Ovaj kompleks pokazuje izuzetnu aktivnost prema primarnim cisplatina rezistentnim kolorektalnim tumorima, međutim ne pokazuje izraženu antimetastatsku aktivnost [2].

KP1019 je ušao u prvu fazu kliničkih ispitivanja 2003. godine kao aktivan protiv cisplatina-rezistentnih tumora. S obzirom da oba kompleksa i NAMI-A i KP1019 reaguju sa biološkim reduktantima (askorbat ili glutation) u model sistemima bez proteina [42-44], pretpostavljeno je da je redukcija Ru(III) u Ru(II) neophodna za biološku aktivnost [2].

Za razliku od NAMI-A, KP1019 se smatra da poseduje direktnu citotoksičnost indukujući apoptozu kod velikog broja tumorskih ćelijskih linija, kao i kod brojnih tumorskih modela (naročito kolorektalnog kancera), uključujući primarne eksplante tumora [35].

KP1019 indukuje apoptozu kod ćelija kolorektalnog kancera interferirajući sa elektronskim transportnim lancem, depolarizujući mitohondrijalnu membranu i aktivirajući kaspazu-3, kao i snižavajući nivo antiapoptotskog faktora bcl-2 [35].

Uočeno je da je ćelijska smrt indukovana sa KP1019 nezavisna od p53 statusa tumorskih ćelija, ukazujući na to da prekidi na DNK nisu dominantni u mehanizmu dejstva ovog agensa [35].

KP1019 interaguje sa DNK slično cisplatinu ali u manjem intenzitetu. Isto tako, konformacione promene indukovane na sekundarnoj strukturi DNK su slabije nego one izazvane cisplatinom [41]. Takođe je uočena pojava reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) kod tumorskih ćelijskih linija što može da doprinese oštećenju DNK [35].

KP1019 nema uticaja na metastatsko ponašanje ćelija, limitirajući svoje dejstvo na citotoksičnu redukciju tumorske mase [41].

2.4.3. Ru(II)-arenski kompleksi

Najbrojnija grupa citotoksičnih rutenijumskih kompleksa je grupa Ru(II)-arenskih kompleksa, koju su razvili Dyson i saradnici [2,45-47] i Sadler i saradnici [48-50], mada nijedno od ovih jedinjenja nije ušlo u klinička ispitivanja. Jedna od motivacija za razvoj ovih stabilnih Ru(II) kompleksa je bila hipoteza o aktivaciji redukcijom.

Kompleksi Sadler-a i Dyson-a su relativno strukturno slični, posedujući tzv. "piano-stool" geometriju, gde veza metal-ugljenik predstavlja „piano seat“, a noge stolice predstavljaju hlorido joni i slabo odlazeće grupe dietilamino (RM-kompleks) ili fosfoadamantan (RAPTA-kompleksi). Ova jedinjenja bi trebalo da imaju biološku aktivnost jer im hloridna odlazeća grupa daje potencijal za reaktivnost ka biološkim targetima, oni ipak imaju različit biološki efekat. RM-kompleksi poseduju dobru citotoksičnost *in vitro* [51], a RAPTA kompleksi su skoro potpuno bez direktnog citotoksičnog potencijala [52-54].

Na primeru ovih jedinjenja vidimo da varijacije u tri glavne gradivne komponente (monodentatni ligand, bidentatni ligand i aren) omogućavaju fine promene u farmakološkim karakteristikama. Helatni ligand može da odredi stabilnost i kinetiku supstitucije liganada u kompleksu; priroda arena može da potpomogne usvajanje kompleksa i interakcije sa potencijalnim targetima, i odlazeća grupa, koja je obično hlorid i oslobađa mesto na metalu za vezivanje biomolekula, može biti od važnosti za kontrolu kinetike aktivacije kompleksa [55].

2.4.3.1. RM175

Kompleksi kao što je RM175 $[(\eta^6\text{-bifenil})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ (en=etan-1,2-diammin) (Slika 2.2.), sintetisani od strane saradnika Prof. P. J. Sadler-a (Edinburg), krše pravilo „mehanizma aktivacije redukcijom“, pošto su oni zasnovani na rutenijumu u +2 oksidacionom stanju i nemaju potrebu za redukcijom radi aktivacije. RM175 je organometalni kompleks rutenijuma, koji sadrži direktnu metal-ugljenik vezu, koja ispunjava generalna pravila koja se očekuju od lekova zasnovanih na metalima dizajniranim za DNK kao target sa glavnim ciljem prevazilaženja rezistencije kod kancerskih ćelija rezistentnih na cisplatinu. Od ovih kompleksa se očekivalo da prevaziđu rezistenciju na osnovu toga što pored konvencionalnog vezivanja za DNK preko guanina uključuju interkalaciju arenkog liganda. Pri čemu jedinjenjima sa bicikličnim arenima dovode do većih oštećenja DNK od onih sa monocikličnim arenom [6,41,56,57].

Rezultati vezivanja za DNK se uklapaju sa IC_{50} vrednostima dobijenim u radu sa ćelijskim kulturama [41,51]. RM175 se vezuje za DNK i dovodi do ćelijske smrti zbog izmene p53-p21-bax puta nakon kratkog izlaganja kolorektalnih kancerskih ćelija (HCT116) [41,58]. Ostalo je da se ispita da li će utvrđene determinante odgovora ćelije biti reflektovane na antitumorsku *in vivo* aktivnost RM175.

2.4.3.2. Rutenijum-aren pta (RAPTA) kompleksi

Rutenijum-arenski kompleksi formule $[(\eta^6\text{-aren})\text{RuCl}_2(\text{pta})]$ (pta=1,3,5-triaza-7-fosfatriciklo[3.3.1.1]-dekan), nazvani RAPTA kompleksi sintetisani su od strane Prof. P. J. Dyson-a (Lozana) [59]. Ove komplekse karakteriše prisustvo pta liganda na mestu etilendiammin liganda u kompleksima Prof. Sadler-a. To su takođe organometalni kompleks „piano stool“ geometrije [41,52,59].

RAPTA kompleksi nakon hidrolize brzo reaguju sa DNK i proteinima. *In vitro* ispitivanja citotoksičnosti ovih kompleksa su pokazala da su mnogo manje citotoksični u odnosu na platinske lekove. Mnogi čak ne mogu biti klasifikovani kao citotoksični. Većina ih pokazuje ograničenu citotoksičnost prema tumorskim ćelijama, dok su prema normalnim zdravim ćelijama netoksični. Ovi kompleksi su pokazali značajnu sposobnost da utiču na ponašanje tumorskih ćelija u pogledu invazivnosti i metastaziranja [60]. Na seriji tumorskih ćelija dojke je izvedeno nekoliko eksperimenata kako bi se razjasnio mehanizam kojim RAPTA-T (Slika 2.2) selektivno redukuje broj i težinu metastazirajućih tumora. Utvrđeno je da RAPTA-T inhibira neke od faza metastatskog procesa, kao što su odvajanje ćelija od primarnog tumora, migracija i adhezija na novom mestu [60]. Uočen je izraženiji efekt kada su korišćene ćelije kancera sa većim invazivnim potencijalom, nego kada su korišćene manje invazivne ćelije.

RAPTA-T je pokazao i izvesnu aktivnost *in vivo* na modelu solidnih metastazirajućih tumora [41,60]. Ovo je prvi dokaz za još jedan rutenijumski kompleks da pokazuje selektivnost ka metastazama, posle NAMI-A.

U prethodnom delu je prikazana raznovrsnost jedinjenja sa antikancerskim karakteristikama, koja sadrže rutenijum kao metalni centar. Još uvek nije moguće odabrati koje jedinjenje od gore navedenih i nabrojanih je dobro referentno jedinjenje za dalji razvoj lekova na bazi rutenijuma. Jedinjenja navedena ovde predstavljaju veoma različite pristupe i ne mogu se grupisati samo na osnovu toga što sadrže isti metal, ali je od izuzetne važnosti poznavanje dosadašnjeg znanja o mehanizmu njihovog dejstva kako bi se isti u sklopu budućih istraživanja što tačnije utvrdio. Povećano interesovanje

za rutenijum dovelo je mnoge eksperte do isticanja hipoteze o prednostima koje pruža hemija rutenijuma u lečenju raka [41].

Međutim, bez obzira na mnoge razlike koje dele komplekse rutenijuma KP1019, RAPTA i NAMI-A, postoje neki uobičajeni aspekti koji su im zajednički. Ova jedinjenja potiču od, kako se to naziva, „sinteze vođene sa IC₅₀“, procedure koja favorizuje potragu za lekom koji može da ubije ćelije pri koncentraciji nižoj od one potrebne referentnom jedinjenju (obično je to cisplatina). Glavni princip ove procedure je da se izmeni molekul, tj. da mu se promene supstituenti kako bi mu se podesila „ukupna reaktivnost“ ka većoj mogućnosti interakcija sa DNK, molekulom koji se smatra odgovornim za antitumorsku aktivnost cisplatine. Nažalost, za rutenijumske komplekse ne postoje jasni podaci o mehanizmu dejstva, i glavnoj meti u ćeliji odgovornoj za antitumorsku aktivnost. Nedostatak takvih podataka je ozbiljno ograničenje za razvoj ovih novih lekova. Aktivnost ovih jedinjenja, uočena *in vitro* i *in vivo*, ukazuje na mogućnost da oni interaguju sa više ciljnih mesta i da je ukupna aktivnost rezultat integracije ovih brojnih aktivnosti. Postoje očekivanja da će ćelija kod koje je napadnuto više targeta simultano biti osetljivija na lek i neće biti u mogućnosti da u velikoj meri razvije mutacije i izgubi senzitivnost na lek tokom administracije hemoterapije, što favorizuje ispitivanje takvih jedinjenja [41].

2.5. Reparacija DNK adukata

Rezistencija tumorskih ćelija na lekove je glavna prepreka za uspešnu hemoterapiju kancera. Rezistencija može biti postignuta smanjenom akumulacijom leka, unutarćelijskom detoksifikacijom leka, povećanom reparacijom DNK/tolerancijom i neuspešnim uvođenjem ćelija u apoptozu [61].

DNK je primarna meta većine citotoksičnih agenasa koji se koriste u terapiji tumora. Visok nivo oštećenja DNK dovodi do zastoja u ćelijskom ciklusu i smrti ćelije. Odgovor ćelije na oštećenje DNK zavisi od prirode lezija. Aktivira se kompleksan sistem proteina koji učestvuju u prepoznavanju oštećenja na DNK i njenoj reparaciji.

Identifikovano je preko 20 različitih proteina koji prepoznaju oštećenja na DNK indukovanih cisplatinom i vežu se za fizičke distorzije na DNK [61]. Ovi proteini koji prepoznaju oštećenja su hMSH2 ili hMutS komponente MMR kompleksa (eng. MisMatch Repair complex, tj. kompleksa reparacije pogrešno sparenih baza), nehistsonska HMG1 i HMG2 grupa proteina (eng. High-Mobility Group, tj. grupa lako pokretljivih proteina), humana RNK-polimeraza I, TBP (eng. Transcriptional factor TATA Binding Protein, tj. transkripcioni faktor TATA vezujući protein) [61]. Da li je jedan protein ili kombinacija uključena u detekciju oštećenja nije jasno.

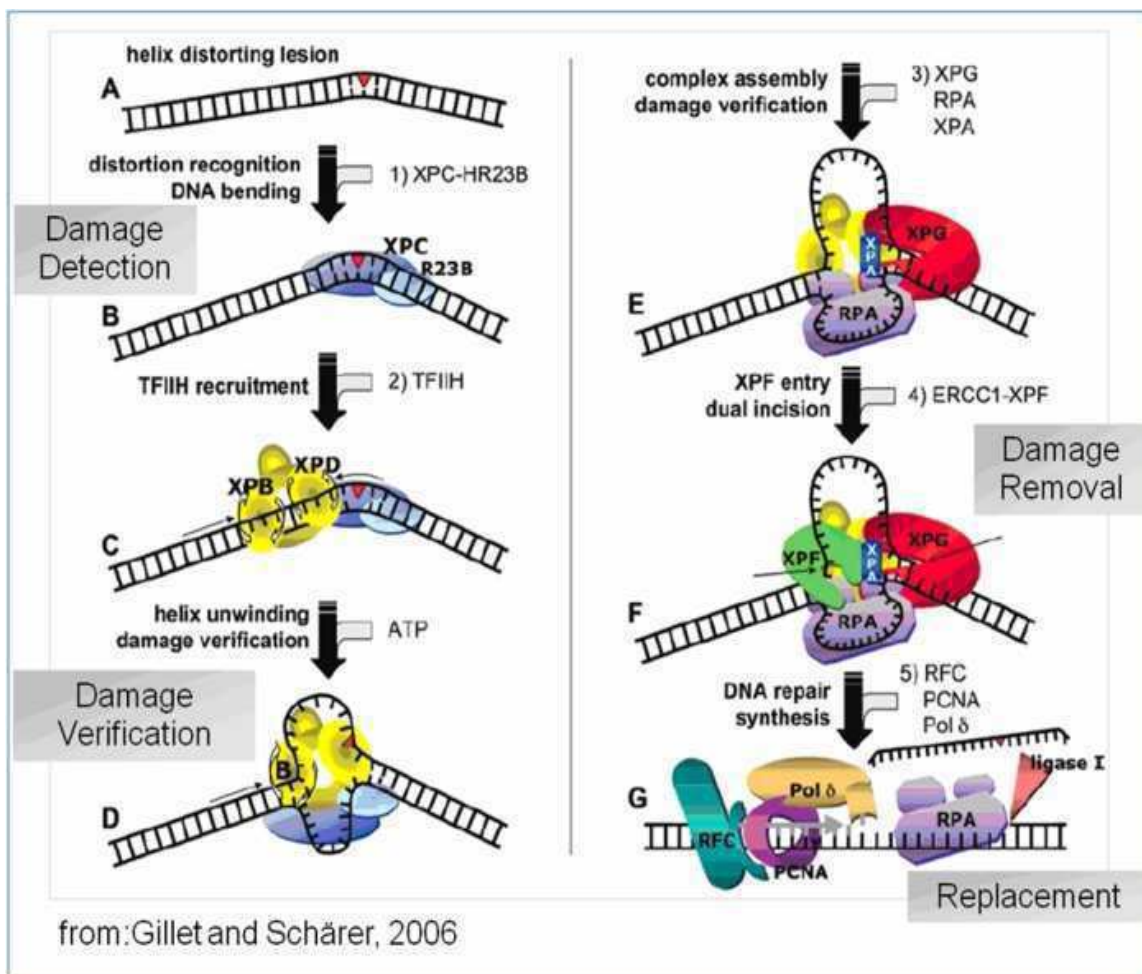
Iako je glavna uloga ovih proteina koji prepoznaju oštećenja DNK da prenose signal o oštećenju dalje do efektor, njihov biološki značaj nije limitiran samo na ovu funkciju. Na primer, HMG1 protein interaguje sa DNK aduktima i zaklanja (štiti) je od reparacije [61]. TBP su uključeni u inicijaciju transkripcije RNK polimerazom I, ali adukti cisplatine okupljaju ove faktore na oštećenim mestima na DNK i sprečavaju njihovo učešće u transkripciji. Stoga se smatra da svaki od proteina koji prepoznaju oštećenja može da inicira jedan ili više specifičnih događaja tako da rezultat DNK oštećenja bude nekoliko naizgled nepovezanih bioloških efekata. Ovo je u skladu sa shvatanjem da adukti narušavaju replikaciju i transkripciju ali ne koreliraju direktno sa smrti ćelije. U suštini, pro-apoptotski i signal za preživljavanje su aktivirani simultano usled izloženosti cisplatinu i relativni intenzitet i trajanje svakog su integrisani dalje, kako bi se odredila konačna sudbina ćelije.

Glavni mehanizmi uključeni u reparaciju lezija koje indukuje cisplatinu su reparacija isecanjem nukleotida (eng. Nucleotide Excision Repair-NER) i reparacija pogrešno sparenih baza (MMR), stoga su se ova dva mehanizma pokazala kritična za

nivo rezistencije [61]. Za nas je bilo interesantno da ispitamo da li ova dva mehanizma, tačnije dva proteina, moglo bi se reći glavni predstavnici ovih sistema (ERCC1 i MSH2), učestvuju i u ćelijskom odgovoru na tretman sa ispitivanim kompleksima rutenijuma.

2.5.1. Reparacija oštećenja DNK isecanjem nukleotida (NER)

Prvi korak NER podrazumeva prepoznavanje oštećenja na DNK od strane dva proteina XPC (eng. Xeroderma pigmentosum group C) i HR23B. Ovaj proteinski kompleks dovodi transkripcioni faktor TFIIH na ovo mesto. On sadrži dve helikaze XPD i XPB koje otvaraju DNK oko lezije i potvrđuju oštećenje. Zatim XPG i ERCC1 (eng. Excision Repair Cross-Complementing 1)/XPF kompleksi endonukleaza prave 3' i 5' prekide. Regioni sa oštećenjem DNK indukovanim cisplatinom bivaju isečeni i reparacioni proces se završava uz učešće DNK polimeraza, PCNA (eng. Proliferating Cell Nuclear Antigen) i DNK ligaze [61-63]. Kolektivno ovi biohemijski događaji vraćaju oštećenu DNK u nativnu konformaciju. Defekti u NER sistemu rezultuju u hipersenzitivnosti na cisplatinu [62]. Nedavno se pokazalo da je NER kuplovan sa transkripcijom više vezan za rezistenciju na cisplatinu nego globalni genomski NER [64]. Pokazalo se da ERCC1 i fizički interaguje sa MMR proteinom MSH2, i time ovi proteini mogu kooperativno da učestvuju u rezistenciji na cisplatinu (Slika 2.4) [65].

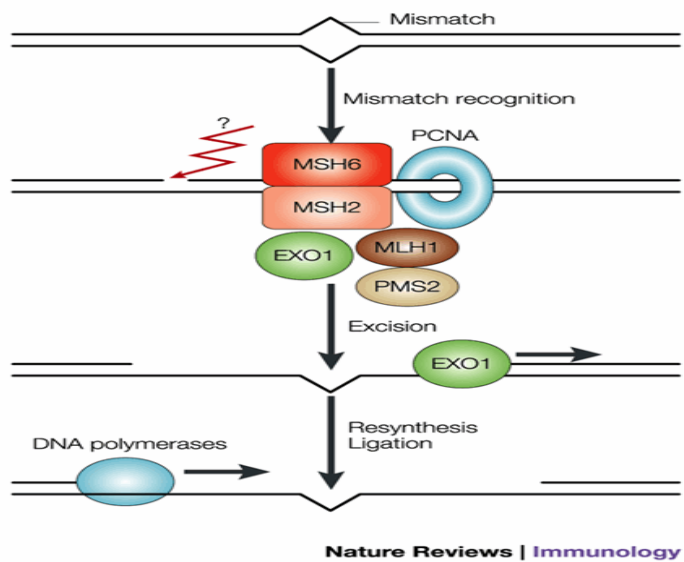


Slika 2.4. Prikaz NER puta kod eukariota, koji vodi od prepoznavanja oštećenja do potvrđivanja oštećenja i uklanjanja i resinteze [63].

2.5.2. Reparacija DNK uklanjanjem pogrešno sparenih baza (MMR)

MMR je post-replikaciona reparacija koja ispravlja nesparene ili pogrešno sparene nukleotide. Kod bakterija proces reparacije DNK postižu MutS, MutL i MutH proteini. MMR sistem sisara obuhvata bar pet proteina (MLH1-MutL homolog; MSH2-MutS homolog, MSH3, MSH6 i PMS1-homolog MutL takođe) i funkcioniše kao reparacioni mehanizam koji zahteva ATP [64]. Značaj uloge koju ima sistem reparacije DNK ističe njegova visoka konzervativnost od bakterija do kvasaca i sisara. Odnos između prepoznavanja oštećenja DNK od strane MMR proteina i citotoksičnosti još

uvek je nerazjašnjen. MSH2 je uključen u inicijalno prepoznavanje pogrešno sparenih nukleotida, nakon što se on veže za “mismatched” dupleks DNK, pridružuju mu se heterodimer koji se sastoji od MLH1 i PMS1, egzozukleaza i PCNA koji potpomažu dalje faze MMR [65] (Slika 2.5).



Slika 2.5. Shematski prikaz reparacije DNK MMR-om kod eukariota (65).

Većina puteva reparacije DNK posreduje u rezistenciji na oštećenja DNK, a za MMR se pokazalo da je u stvari neophodna i za toksičnost nekih antikancerskih agenasa. Ovo se objašnjava “uzaludnim reparacionim ciklusom” modelom u kome MMR uklanja novo-ubačene netaknute baze umesto oštećenih baza, inicirajući time još jedan ciklus “uzaludne” reparacije koji može biti štetan za ćeliju [66]. Moguće je i da MMR ima važnu ulogu u pokretanju proveravanja (eng. checkpoint signalling) i apoptoze, koji mogu da posreduju u povećanoj citotoksičnosti [67]. Ustanovljeno je da defekti u MMR su povezani sa rezistencijom na neke DNK-oštećujuće antikancerske agense, kao što su monofunkcionalni alkilirajući agensi i cisplatina, kao i antimetabolit 6-thioguanine [66]. Kod tumora ovarijuma i kolona, MMR veoma malo doprinosi rezistenciji na cisplatinu u poređenju sa NER. U stvari, kod ova dva tipa tumora intaktni MMR sistem je esencijalan za povezivanje oštećenja na DNK/reparacije sa inicijacijom apoptoze [68].

2.5.3. Inhibitori reparacije DNK u kombinovanoj terapiji

Dobro poznavanje reparacije DNK, od principa nastajanja oštećenja na DNK do popravke istih, omogućilo je racionalno kombinovanje citotoksičnih agenasa i inhibitora reparacije DNK kako bi se povećala toksičnost na tumorske ćelije. Izvestan broj inhibitora reparacije DNK su razvijeni i predmet su kliničkih ispitivanja [69].

Strategije korišćenja inhibitora reparacije DNK u terapiji kancera:

- Inhibitori reparacije DNK mogu biti korišćeni u kombinaciji sa antikancerskim agensima koji oštećuju DNK. Ovo bi povećalo efikasnost tretmana inhibirajući uklanjanje toksičnih lezija na DNK.
- Inhibitori reparacije DNK mogu biti korišćeni u monoterapiji kako bi selektivno ubijali ćelije kancera sa defektima u odgovoru na oštećenje ili reparaciju DNK.
- U budućnosti, inhibitori reparacije DNK mogu biti korišćeni za amplifikaciju tumor specifičnih replikacionih lezija kako bi selektivno ubijali ćelije kancera.

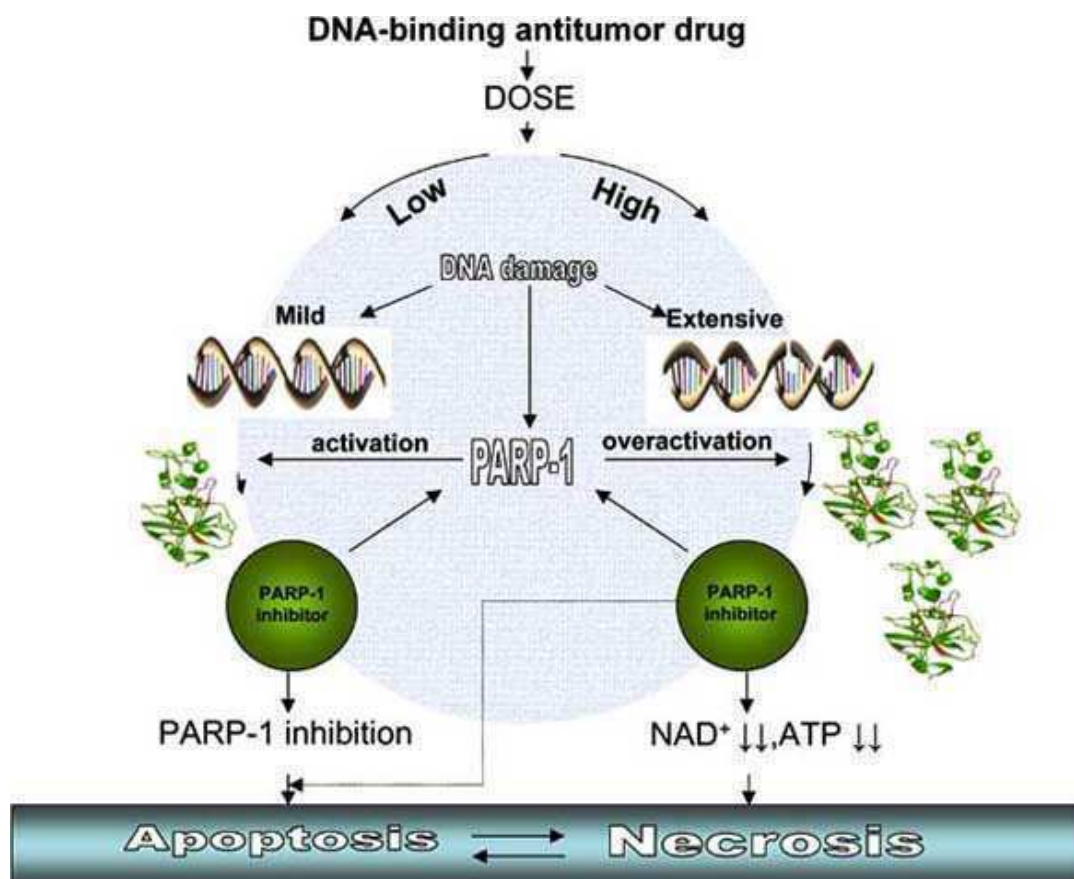
Poli(ADP-ribozil)polimeraze (PARP enzimi) (eng. Poly(ADP-ribose) polymerases) ili poli(ADP-ribozil)sintetaze i poli(ADP-ribozil)transferaze predstavljaju familiju jedarnih enzima koji katalizuju poli(ADP-ribozilaciju) DNK vezujućih proteina [70-72]. Ovi enzimi predstavljaju ključnu komponentu trenutnog ćelijskog odgovora na oštećenje DNK, stoga bi se inhibicijom PARP-a mogla povećati hemosenzitivnost na brojne agense koji oštećuju DNK, uključujući zračenje, alkilirajuće agense i inhibitore topoizomeraze I [69].

Nakon što detektuje prekide na jednom lancu DNK (eng. Single-Strand DNA Breaks-SSB), PARP-1 formira zajedno sa DNK ligazom III, XRCC proteinom i DNK polimerazom β reparacioni multiproteinski kompleks za isecanje baza (eng. Base Excision Repair-BER) [73-75]. Kao odgovor na oštećenje DNK indukovano jonizujućim zračenjem, oksidativnim stresom i DNK vezujućim antikancerskim agensima, PARP enzim dodaje ADP-riboznu jedinicu na karboksilatnu grupu asparaginske i glutaminske kiseline ciljnih proteina [71,72]. Ova poli(ADP-ribozilaciona) aktivnost PARP-a je post-translaciona modifikacija koja dovodi do inaktivacije akceptorskog proteina preko kačenja kompleksnog razgranatog polimera ADP-riboznih jedinica [76].

PARP-1 je prvi okarakterisan i najbolje poznat član PARP familije. PARP je visoko zastupljen i očuvan enzim vezan za hromatin koji se veže za prekide na DNK kao homodimer (MW=2x113 kDa) i posreduje u zaštiti od oštećenja DNK.

Poli(ADP-ribozil) polimeraza interaguje sa raznim proteinima u jedru koji su, inače, uključeni u kontrolu metabolizma DNK i konformacije. Ciljni proteini PARP-a su: histoni, topoizomerase I i II, DNK i RNK polimeraze, DNK ligaze, p53, Ca²⁺/Mg²⁺ zavisne endonukleaze [77]. Poli(ADP-ribozilacija) svih ovih supstrata modulira njihovu aktivnost utičući na replikaciju DNK [78], transkripciju [79] i reparaciju [75,80-84].

Kada je oštećenje DNK blago, aktivira se PARP-1 i indukuje reparaciju i preživljavanje ćelije. Međutim, u slučaju obimnog oštećenja DNK, PARP-1 je prekomerno aktiviran i indukuje trošenje ćelijskog NAD⁺ i ATP nivoa dovodeći do poremećaja u funkcionisanju ćelije ili čak do nekroze [85] (Slika 2.6). S obzirom na dvostruku prirodu odgovora PARP-1 na oštećenje DNK i njegovo učešće u ćelijskoj smrti, farmakološka modulacija aktivnosti PARP-a može da predstavlja korisno oruđe za povećanje aktivnosti antikancerskih agenasa koji se vezuju za DNK.



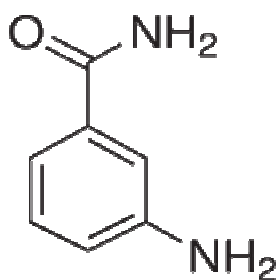
Slika 2.6. Farmakološka inhibicija aktivnosti PARP-1 u hemoterapiji kancera. Niska ili umerena doza leka koji se vezuje za DNK može da indukuje blago oštećenje DNK i aktivaciju PARP-1. U ovom slučaju, korišćenje inhibitora PARP-a u kombinaciji sa antitumorskim agensom koji se veže za DNK može da rezultuje u efikasnoj blokadi reparacije DNK i potom apoptozi. Visoka doza leka može da indukuje velika oštećenja DNK i preteranu aktivaciju PARP-1 tako da se troši NAD^+ i ATP do nivoa koji indukuje umiranje ćelije putem nekroze. U ovom slučaju, korišćenje inhibitora PARP-1 u kombinaciji sa DNK vezujućim agensom može da blokira povećanu aktivaciju PARP-1 i time se smrt ćelije prevodi iz nekroze u apoptozu [85].

Inhibitori PARP-a, prvobitno razvijeni od strane Prof. Thomas-a Helleday-a, su grupa farmakoloških inhibitora PARP enzima, koji su razvijeni za različite indikacije, a najbitnija je tretman kancera [85].

Kao što je prikazano na Slici 2.6 inhibicija PARP-a u ćelijama izloženim lekovima koji oštećuju DNK će smanjiti reparaciju DNK i indukovati apoptozu i

smanjiti nekrozu. Moguće je da inhibitori PARP-a budu efikasniji protiv tumorskih ćelija, nego protiv normalnih ćelija. Npr. kod ćelija niskog stepena malignog ne-Hoćkinovog limfoma i hepatocelularnog carcinoma, povećana aktivnost PARP-1 je uočena u odnosu na zdrave limfocite ili hepatocite [86]. Tako, inhibicija PARP-1 može da poveća senzitivnost tumorskih ćelija na lekove koji oštećuju DNK. Uočeno je da 3-aminobenzamid povećava apoptozu i redukuje nekrozu indukovanu agensom koji se veže za manji žljeb DNK MeOSO₂(CH₂)₂-leksitropsin (Me-Lex) [87]. Ipak, većina studija je fokusirana na sinergizam inhibitora PARP-1 u kombinaciji sa zračenjem ili lekovima koji se vezuju za DNK i inhibitorima topoizomeraza [85].

Inhibitori PARP-a se mogu grupisati u sledeće hemijske klase: Nikotinamid i 3-aminobenzamid (3-AB); Dihidroizohinolini i izohinolini; Bezimidazoli i indazoli, Izoindolinoni; Ftalazinoni i kinazolinoni; Henantridinoni; “Zink-Fingers” PARP inhibitori.



Slika 2.7. 3-aminobenzamid (3-AB)

Analiza mehanizma dejstva 3-AB-a (Slika 2.7) je pokazala da je za njegovu inhibitornu aktivnost kritična karboksamidna grupa. Takođe, postoje podaci da benzamidi mogu da se vežu za prekide na DNK, onemogućavajući da PARP-1 prepozna prekide na DNK i time sprečavaju aktivaciju enzima [88]. PARP-1 inhibitori sami po sebi nisu citotoksični pri koncentracijama koje postižu PARP-1 inhibiciju. Međutim, pri višim koncentracijama 3-AB pokazuje inhibiciju “*de novo*” sinteze purina i zaustavljanje deobe ćelija u kulturi [89,90]. Većina inhibitora je uglavnom dizajnirana tako da imitira interakcija supstrat-enzim, između NAD⁺ i PARP-1 [85].

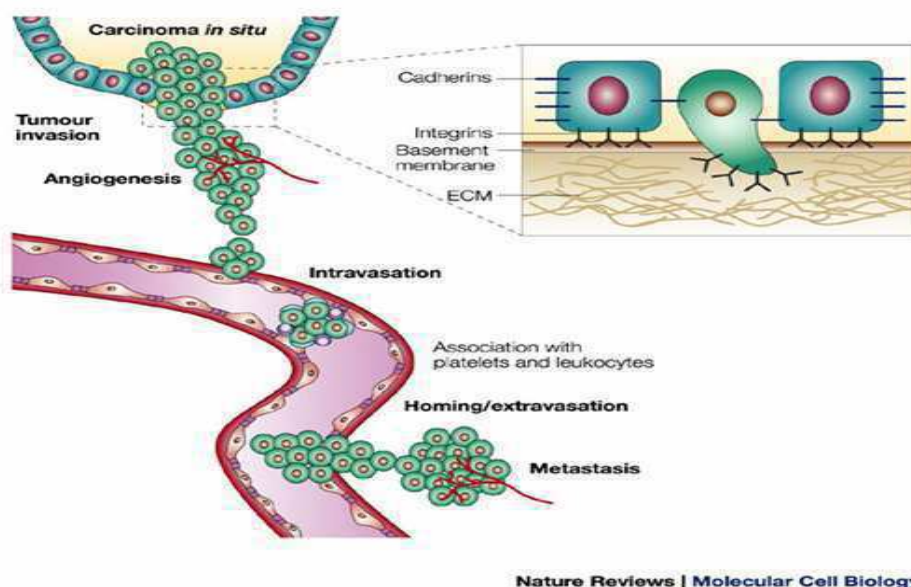
Takođe, postoji hipoteza po kojoj je PARP farmakološka meta lekova na bazi metala [91], s obzirom da struktura PARP-a sadrži ZF motiv (eng. "Zink-Finger"-cinkov prst) koji može biti izmenjen pod uticajem kompleksa metala.

2.6. Molekulski aspekti invazivnosti i metastaziranja tumorskih ćelija

Više od 90 % smrti uzrokovane kancerom su posledica metastatskog širenja tumora [92]. Metastatsko širenje je poslednja klinička faza progresije tumora. Koraci u toku primarne progresije tumora su danas veoma dobro shvaćeni i na ćelijskom i na molekulskom nivou. Međutim, mehanizam metastatskog procesa još uvek nije dovoljno rasvetljen.

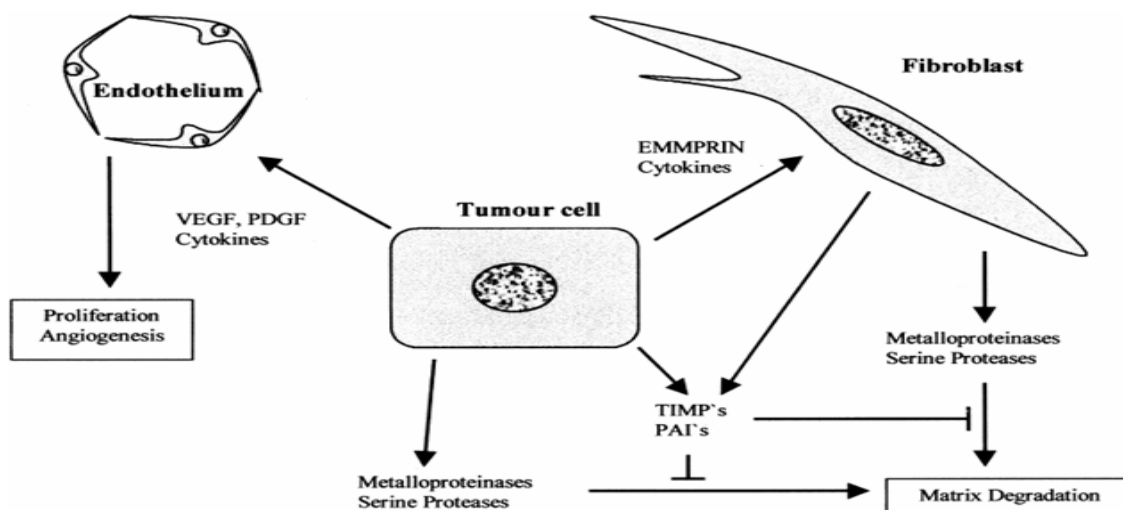
1mg mase primarnog tumora oslobađa oko 4×10^6 ćelija dnevno u krvotok i limfu [93]. Većina ovih ćelija nestaje putem apoptoze ili pod pritiskom imunskog sistema. Međutim, neke od ovih ćelija preživljavaju. Samo mali procenat (0,04 %) ovih ćelija u cirkulaciji će stvoriti klaster ćelija, omogućavajući proces metastaziranja.

Nemogućnost da se utvrdi tačna lokacija metastaza, kao i njihova heterogenost po pitanju ćelija koje ih čine, onemogućavaju operativno uklanjanje i ograničavaju odgovor na sistemske antikancerske agense. Glavni problem u otkrivanju racionalnih, antimetastatskih terapijskih strategija je nedostatak razumevanja čitavog procesa (Slika 2.8). Međutim, upravo je ta kompleksnost procesa metastaziranja primorala istraživače da se usredsrede na jedan po jedan proces kako bi se redukovao broj promenljivih do razumnog nivoa [94].



Slika 2.8. Metastatska ćelija prvo ulazi u vanćelijski matriks primarne strome tumora koristeći proteaze (prvenstveno matriks metaloproteinaze), zatim prolazi kroz endotelijum krvnog suda i ulazi u krv i/ili limfu.

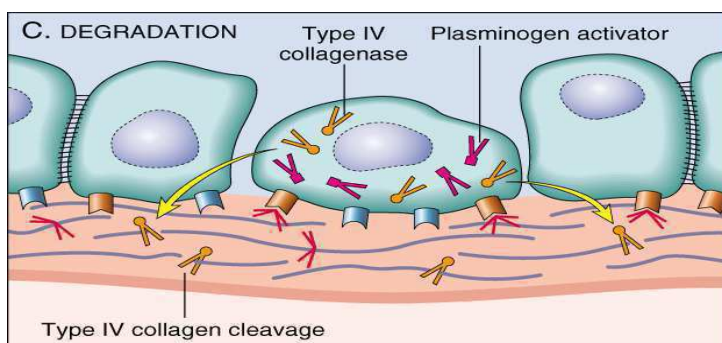
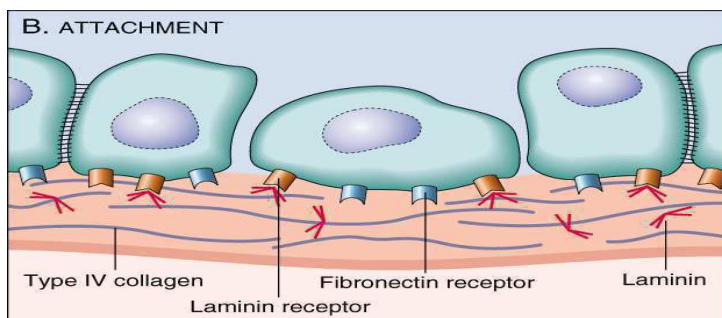
Metastazirajuće tumorske ćelije najpre moraju da interaguju sa vanćelijskim matriksom (Slika 2.9). **Vanćelijski matriks (eng. Extracellular matrix-ECM)** je gusta mreža kolagena i elastina ugrađena u viskoznu osnovu koju čine proteoglikani i glikoproteini. To je potporna osnova koja izoluje kompartmente tkiva i utiče na njihovu arhitekturu [94-98]. Matriks se ponaša kao selektivan makromolekulski filter i igra ulogu u mitozu i diferencijaciji. Interakcije između normalnih ćelija i matriksa mogu biti izmenjene kod neoplazija, i ovo može da omogućava proliferaciju tumora i invazivnost [99]. Vanćelijski matriks se sastoji od intersticijalnog matriksa (koji ispunjava prostor između ćelija) i bazalne membrane. **Bazalna membrana** je tanak sloj vlakana koji podupire epitelijum, koji ovičava šupljine i površine organa uključujući kožu ili endotelijum, koji ovičava unutrašnju stranu krvnih sudova. Bazalna membrana se sastoji iz dve lamine, bazalne lamine i retikularne lamine. Ona je mreža koja se sastoji od kolagena tipa IV, specifičnih glikoproteina, kao što su laminin i entaktin i heparan-sulfat proteoglikana [100-106]. Smatra se da ima ključnu ulogu tokom progresije invazivnih tumora i njihove diseminacije.



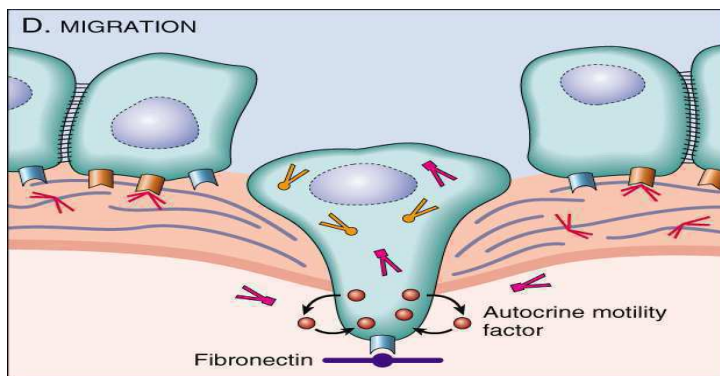
Slika 2.9. Interakcije između tumorske ćelije i okolnog vezivnog tkiva.

2.6.1. Trostepena teorija invazivnosti

Intersticijalna stroma većine tkiva normalno ne sadrži kanale za prolaz ćelija. Bazalna membrana je nerastvorna, kontinualna ali ujedno i fleksibilna struktura koja je nepropusna za velike proteine [100]. Ovaj tip vanćelijskog matriksa postaje permeabilan za prolazak ćelija samo tokom zarastanja tkiva i remodelovanja, inflamacije i neoplazija. Prolazak ćelije kroz matriks zavisi od brojnih faktora uključujući karakteristike i ćelije koja prolazi kao i lokalnih ćelija, kao i karakteristika samog matriksa. Liotta je predložio **trostepenu hipotezu** invazivnosti (Slika 2.10) [107] opisujući redosled biohemijskih događaja tokom invazivnosti tumorske ćelije kroz vanćelijski matriks.



- Prvi korak podrazumeva kačenje tumorske ćelije preko receptora na površini ćelije koji se specifično vezuju za komponente matriksa kao što je laminin (za bazalnu membranu) i fibronektin (za stromu) [108,109].
- Tako usidrene tumorske ćelije sekretuju hidrolitičke enzime (ili podstiču lokalne ćelije da sekretuju enzime) koji poseduju potencijal lokalnog razlaganja matriksa (uključujući degradaciju komponentata za kačenje). Liziranje matriksa se verovatno dešava u visoko lokalizovanom regionu blizu površine tumorske ćelije.



- Treći korak je kretanje ćelije u region matriksa modifikovan proteolizom.

Slika 2.10. Prikaz trostepene teorije invazivnosti.

Invazivnost kroz matriks se pretpostavlja da se obavlja cikličnim ponavljanjem ova tri koraka.

2.6.2. Uloga matriksnih metaloproteinaza u metastaziranju

Matriksne metaloproteinaze (eng. **Matrix Metalloproteinases-MMP**) su familija enzima koja ima centralnu ulogu u prometu (eng. turnover) i remodelovanju vanćelijskog matriksa zasnovanom na njihovoj sposobnosti da hidrolizuju proteinske komponente ECM-a. One su sposobne i da regulišu brojne funkcije ćelije uključujući rast ćelije, angiogenezu, apoptozu, invazivnost, metastaziranje i imuni odgovor sečenjem prekursora faktora rasta, adhezionih molekula i drugih bioaktivnih proteina.

Trenutno postoji više od 20 matriksnih metaloproteinaza, koje se razlikuju u supstratnoj specifičnosti, ali dele brojne strukturne i funkcionalne sličnosti.

Kako bi se izbeglo neželjeno oštećenje tkiva potrebna je odgovarajuća kontrola aktivnosti proteaza. Iz tog razloga aktivnost proteaza je regulisana na više nivoa uključujući transkripciju, sekreciju, aktivaciju i dejstvo inhibitora proteaza.

Specifična grupa matriksnih metaloproteinaza, **želatinaze: MMP-2 i MMP-9** su intenzivno proučavane kod kancera i drugih bolesti. MMP-2 su eksprimirane u velikoj meri kod normalnih fibroblasta, endotelijalnih i epitelijalnih ćelija kao i kod mnogih transformisanih ćelija. MMP-9 su eksprimirane kod normalnih leukocita kao i kod transformisanih ćelija.

MMP-2 i MMP-9 su veoma slični enzimi, ali postoji značajna razlika u regulaciji ekspresije, glikozilacije, aktivaciji proenzima i supstratnoj specifičnosti. Npr. pro-MMP-2 je neglikozilovan protein molekulske mase 72 kDa, dok je pro-MMP-9 protein molekulske mase 92 kDa i sadrži dva N-glikozilovana mesta u prodomenu i katalitičkom domenu i brojne O-vezane glikane. MMP-9 postoji u plazmi kao monomer ili kao dimer, dok je MMP-2 striktno monomer (Tabela 2.1.).

Tabela 2.1. Karakteristike želatinaza [110].

Uobičajena imena	Želatinaza A	Želatinaza B
	72 kDa	92 kDa
Nomenklatura	MMP-2	MMP-9
Supstratna specifičnost	Želatin, tip I,IV,V kolagen, elastin	Želatin, tip I,IV,V kolagen, elastin
Molekulska masa	72 kDa	92 kDa
Molekulska masa aktivne vrste	64 kDa	82 kDa
Fiziološki aktivatori	MT1-MMP, tip I kolagen, lipopolisaharid, faktor rasta hepatocita,	Serin proteaze
Latentna forma se veže za TIMP	TIMP-2	TIMP-1
Sinteza endotelijalnih ćelija	konstitutivna	inducibilna

MMP se sekretuju kao neaktivni proenzimi koji zahtevaju potpunu aktivaciju za katalitičku aktivnost. MMP mogu biti aktivirane proteinazama ili *in vitro* hemijskim agensima. Aktivacija želatinaza i drugih rastvornih MMP se dešava na površini ćelije ili u vanćelijskoj sredini. MMP postaju katalitički aktivne sečenjem propeptida ili narušavanjem njegove konformacije, što oslobađa Zn-vezujuće aktivno mesto. Ovaj proces aktivacije je zasnovan na principu „cisteinskog okidača“. Tačnije, cisteinski ostatak je u kontaktu sa katalitičkim cinkom i blokira ulazak molekula vode do aktivnog mesta. Ulazak molekula vode u katalitičko mesto rezultuje u formiranju aktivnog katalitičkog mesta. MMP su aktivne na neutralnom pH i zahtevaju Ca^{2+} jone za potpunu aktivnost [110, 111].

Povećana ekspresija MMP-2 i MMP-9 je primećena kod kancera dojke, kolona, pluća, kože, ovarijuma i prostate, između ostalih. Povećana ekspresija želatinaza kod ovih kancera je često praćena sa povećanom invazivnošću i metastaziranjem kao i smanjenim preživljavanjem. Ekspresija matriksnih metaloproteinaza može zavisiti od stadijuma kancera. Smatra se da su želatinaze i druge MMP neophodne za mnoge faze u progresiji tumora i različiti tumori koriste različite MMP. Koraci u kojima su uključene MMP uključuju rast primarnog tumora, angiogenezu, migraciju i invaziju metastatskih ćelija u sekundarne organe, kao i inicijaciju i pospešivanje rasta tumora na metastatskom mestu. MMP mogu da aktiviraju ili suprimiraju progresiju tumora sečenjem različitih bioaktivnih supstrata. Stoga konačni efekat želatinaza na progresiju tumora značajno zavisi od konteksta [111].

2.6.3. Uloga kretanja tumorskih ćelija u procesu metastaziranja

Aktivno kretanje tumorskih ćelija, povezano sa proteolizom, je neophodno za prolazak kroz bazalnu membranu i intersticijalnu stromu pri prelasku iz *in situ* u invazivni karcinom. Tumorske ćelije takođe pokazuju usmereno kretanje tokom ulaska u krvni sud i izlaska iz istog [112].

Tumorske ćelijske linije, poznate kao linije sa većim potencijalom invazivnosti i metastaziranja, pokazuju veći nivo mobilnosti od tumorskih ćelijskih linija sa nižim potencijalom metastaziranja. Veliki broj agenasa stimuliše kretanje tumorskih ćelija *in vitro*, uključujući faktore koje proizvode ćelije domaćina, faktore rasta [113], komponente vanćelijskog matriksa [114], hijaluronan [115] i faktore koje sekretuju tumori [116]. Kretanje stimulirano bilo kojim od ovih faktora može biti nasumično (hemokineza) ili usmereno (hemotaksija). Hemotaksija se definiše kao usmereno kretanje ćelija kao odgovor na koncentracioni gradijent faktora u rastvoru. Tumorske ćelije migriraju usmereno ka nerastvornim proteinima ECM-a u odsustvu rastvorenih atraktanata (haptotaksija) [113]. Ova raznovrsnost stimulusa omogućava tumorskoj ćeliji da prolazi kroz razne sredine tokom procesa metastaziranja.

Otkrivena je grupa citokina koja utiče na kretanje a koje proizvode same tumorske ćelije i nazvani su autokrini faktori kretanja (eng. Autocrine Motility Factor-AMF). Predložena je i AMF hipoteza: ćelije primarnog tumora uglavnom proizvode

AMF sve dok koncentracija ne dostigne nivo da stimuliše kretanje preko receptora ćelija koje reaguju [112]. Enzimi koji razlažu matriks bivaju oslobođeni i aktivirani kako bi omogućili ćelijama koje se kreću da razlože međućelijske veze i druge biološke barijere.

Ćelije kancera se šire iz primarnog tumora ili kao pojedinačne ćelije, koristeći ameboidno ili mezenhimalno kretanje, ili kao listovi ćelija, niti i klasteri koristeći kolektivni tip migracije [117].

Proučavanja morfoloških promena su pokazala da tumorska ćelija, kao i leukocit, pokazuje kao jedan vid kretanja, ameboidno kretanja, koje karakterišu pseudopodije. Ovaj način kretanja zahteva usklađenost više koraka, uključujući napredovanje ćelije na vodećem kraju, formiranje novih adhezija, oslobađanje "starih" veza, rezultujući u asimetričnoj morfologiji ćelije koja se kreće [112]. Prvo ćelija koja se kreće postane polarizovana i izdužena. Stvaraju se pseudopodije izduživanjem vodećeg kraja ćelije koji se veže za ECM kao supstrat. Zatim, se celo telo ćelije kontrahuje, time formirajući vučnu silu koja dovodi do postepenog klizenja tela ćelije [117].

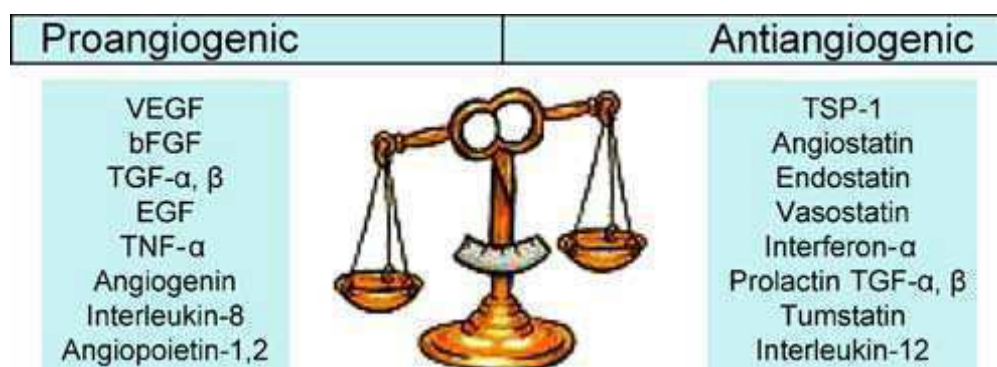
2.6.4. Uloga angiogeneze u procesu metastaziranja

Angiogeneza, formiranje novih krvnih sudova od endotelijuma postojećih krvnih sudova, je neophodna za rast tumora, progresiju i metastaziranje [118]. Kompleksna mreža krvnih sudova tumoru garantuje adekvatno snabdevanje sa nutrientima i kiseonikom i obezbeđuje adekvatnu drenažu metabolita. Uz neophodnost rasta primarnog tumora, rast metastaza zavisi od neovaskularizacije bar u dva koraka: prvo, maligne ćelije moraju da napuste primarni tumor i uđu u cirkulaciju; drugo, nakon pristizanja u udaljene organe, metastatične ćelije moraju da indukuju angiogenezu da bi tumor narastao. 1970. godine hirurg Juda Folkman [119] je prvi postavio hipotezu da utičući na snabdevanje hranom, inhibirajući formiranje krvnih sudova, može da dovede do zastoja rasta tumora ili čak skupljanja tumora. Fiziološka osnova ove hipoteze je da tumori ne mogu da pređu veličinu od 1-2 mm³ u avaskularnom stanju. Stoga se počelo sa intenzivnim izučavanjem procesa angiogeneze. U poslednjih 30 godina brojni pro- i antiangiogenetski molekuli, njihovi ligandi, i unutarćelijski signalni putevi su identifikovani. Uprkos brojnim obećavajućim rezultatima u predkliničkim modelima,

nekoliko inicijalnih kliničkih studija nisu dali ubedljive rezultate za efikasnu terapiju tumora klasičnim antiangiogenetskim agensima kao monoterapija. Ovo je dovelo da razvoja novih antiangiogenetskih jedinjenja i uspešne kombinacije inhibitora angiogeneze sa klasičnim citotoksičnim agensima i radioterapijom. 2004. godine prvi antiangiogenetski agens bevacizumab (Avastin) je odobren od strane Food and Drug Administration (FDA) kao prva linija terapije u kombinaciji sa 5-fluorouracilom kod pacijenata sa uznapredovalim kolorektalnim karcinomom.

2.6.4.1. Mehanizam angiogeneze kod kancera

Kada je neoplastična mutacija nastala, sledi avaskularna faza rasta tumora. Tumorske ćelije se snabdevaju difuzijom i rast tumora se zaustavlja na veličini od 1-2 mm³. Sledeći stadijum dormantnosti tumora može da traje godinama [120]. Danas je prihvaćena teorija **angiogenetskog okidača**, koja podrazumeva da je početak angiogeneze kontrolisan ravnotežom između pro- i antiangiogenih molekula u mikrosredinih solidnog tumora [121] (Slika 2.11). Okidač uključuje čitavu mrežu pozitivnih i negativnih regulatora [121].



Slika 2.11. Primeri pro- i antiangiogenih molekula koji balansiraju “angiogeni okidač”.

Ćelije kancera su sposobne da stimulišu angiogenezu proizvodeći neke od angiogenih faktora, koji uključuju vaskularni endotelijani faktor rasta (eng. Vascular Endothelial-derived Growth Factor - VEGF), angiopoetin, bazni factor rasta fibroblasta (eng. basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), epidermani faktor rasta (eng. Epidermal

Growth Factor-EGF), interleukin 8 (IL-8), i transformišući factor rasta- β (eng. transforming growth factor- β , TGF- β) pored brojnih drugih molekula (Slika 2.11.).

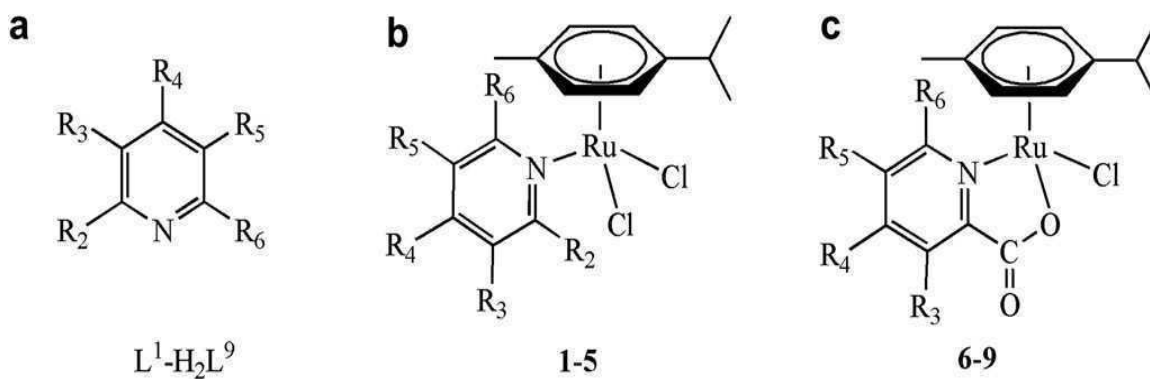
Pored tumorskih ćelija, tumorske endotelijalne, stromalne ćelije i cirkulišuće ćelije domaćina su u stanju da sintetišu modulatore angiogeneze [118].

Nekoliko sekvencijalnih koraka se ističe tokom angiogeneze tumora. Kod zrelih, nerastućih kapilara, zid krvnih sudova se sastoji od linije endotelijalnih ćelija, bazalne membrane i sloja pericita. Angiogeni faktori koje proizvode tumorske ćelije vezuju se za receptore endotelijalnih ćelija i iniciraju angiogenezu. Angiogeneza je rezultat čitave serije molekularnih i ćelijskih događaja, koji dovode do migracije, proliferacije i diferencijacije endotelijalnih ćelija u novoformirane kapilare koji potom mogu da se razviju u još zrelije krvne sudove. Kada su endotelijalne ćelije stimulisane da rastu, one sekretuju protease, heparanaze i druge digestivne enzime koji razlažu bazalnu membranu koja okružuje krvne sudove. Razlaganje vanćelijskog matriksa omogućava oslobađanje proangiogenih faktora iz matriksa. Veze između endotelijalnih ćelija postaju propustljiva, i novoformirani sudovi rastu ka izvoru stimulusa. Na kraju dolazi do maturacije i stabilizacije novoformirane mikrovaskulature snabdevajući sudove sa pericitima, rekonstitucijom bazalne membrane i formiranjem veza. U tumorskom tkivu ovaj korak je nepotpun i rezultuje u sudovima koji su nepravilni, sa fragmentisanom bazalnom membranom i sa povećanom propustljivošću.

3. MATERIЈAL I METODE

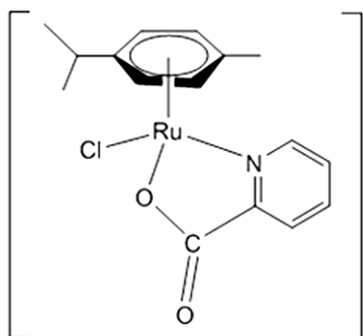
3.1. Hemijske strukture ispitivanih kompleksa

U ovom radu je ispitivana *in vitro* antitumorska aktivnost kompleksa strukturne formule $[(\eta^6\text{-p-cimen})\text{Ru}(\text{L1-3})\text{Cl}_2]$, gde je L1-3: 3-acetilpiridin (**1**), 4-acetilpiridin (**2**) i 2-amino-5-hloropiridin (**3**), kao i $[(\eta^6\text{-p-cimen})\text{Ru}(\text{HL4,5})\text{Cl}_2]$, gde HL4 i HL5 odgovara izonikotinskoj kiselini (**4**) i nikotinskoj kiselini (**5**) i $[(\eta^6\text{-p-cimen})\text{Ru}(\text{HL6-9})\text{Cl}]$, gde $\text{H}_2\text{L6-9}$ predstavlja 2,3-piridindikarboksilnu kiselinu (**6**), 2,4-piridindikarboksilnu kiselinu (**7**), 2,5-piridindikarboksilnu kiselinu (**8**) i 2,6-piridindikarboksilnu kiselinu (**9**), koji su dobijeni u reakciji polaznog kompleksa $[(\eta^6\text{-p-cimen})_2\text{RuCl}_2]_2$ (**10**) (Slika 3.1) i odgovarajućeg liganda [3,4]. Kao i srodnog kompleksa koji sadrži pikolinski anjon kao ligand $[(\eta^6\text{-p-cimen})\text{RuCl}(\text{L11})]$ (**11**) (Slika 3.2).



- L^1 , **1**: $R_2, R_4, R_5, R_6 = H; R_3 = COCH_3$
 L^2 , **2**: $R_2, R_3, R_5, R_6 = H; R_4 = COCH_3$
 L^3 , **3**: $R_2 = NH_2; R_3, R_4, R_6 = H; R_5 = Cl$
 HL^4 , **4**: $R_2, R_3, R_5, R_6 = H; R_4 = COOH$
 HL^5 , **5**: $R_2, R_4, R_5, R_6 = H; R_3 = COOH$
 H_2L^6 , **6**: $R_2, R_3 = COOH; R_4, R_5, R_6 = H$
 H_2L^7 , **7**: $R_2, R_4 = COOH; R_3, R_5, R_6 = H$
 H_2L^8 , **8**: $R_2, R_5 = COOH; R_3, R_4, R_6 = H$
 H_2L^9 , **9**: $R_2, R_6 = COOH; R_3, R_4, R_5 = H$

Slika 3.1. Strukturne formule (a) liganada; (b) kompleksa sa monodentatno vezanim ligandom **1-5**; (c) kompleksa sa bidentatno vezanim ligandom **6-9** [3].



Slika 3.2. Strukturna formula kompleksa **11** [4].

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**), dva tipa ćelija karcinoma dojke (**MDA-MB-361** i **MDA-MB-453**), ćelije kolorektalnog karcinoma (**LS-174**), ćelije mišijeg melanoma (**B16**), dve transformisane endotelijalne linije humanog (**EA.hy 926**) i mišijeg (**MS1**) porekla; i jedna normalna zdrava ćelijska linija fetalnih humanih fibroblasta pluća (**MRC-5**). Navedene kulture ćelija su iz kolekcije ćelijskih linija Instituta za Onkologiju i Radiologiju Srbije, Odeljenje za eksperimentalnu onkologiju. EA.hy 926 i MS1 ćelije su poklon Instituta za medicinska istraživanja, Beograd, Srbija. Neke karakteristike ovih ćelijskih linija prikazane su u Tabeli 3.2.1.

HeLa, B16, FemX, MDA-MB-361, MDA-MB-453, LS-174 ćelije se održavaju kao monosloj 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 min. RPMI 1640 je opskrbljena penicilinom 192 IU/mL i streptomycinom 200 µg/mL, L-glutationom (3 mmol/L), HEPES-om (25 mmol/L).

EA.hy 926 i MS1 ćelije se održavaju kao monosloj u hranljivoj podlozi DMEM, pH 6,9 koja sadrži 10 % fetalnog goveđeg seruma, termički inaktivisanog. DMEM podloga je takođe opskrbljena penicilinom 192 IU/mL i streptomycinom 200 µg/mL, L-glutationom (3 mmol/L).

Podloge su čuvane u frižideru, a pre upotrebe tj. rada sa ćelijama su zagrejane do temperature 37 °C, u vodenom kupatilu.

Tabela 3.1. Karakteristike ćelijskih linija korišćenih u ovom radu

ćelijska linija	morfologija	vrsta	tkivo/organ	tumor
tumorske linije				
HeLa	epitelijalna	humane	cerviks	adenokarcinom
MDA-MB-361	epitelijalna	humane	dojka	adenokarcinom metastatski
MDA-MB-453	epitelijalna	humane	dojka	karcinom
FemX	epitelijalna	humane	koža	melanom
B16	vretenasta	mišje	koža	melanom
LS-174	epitelijalna	humane	kolon	adenokarcinom
endotelijalne imortalizovane				
EA.hy 926	endotelijalna	humane	hibrid somatskih ćelija	/
MS1	endotelijalna	mišje	hibrid	/
normalna linija				
MRC-5	vretenasta	humane	pluća	/

3.2.1. Sastav hranljive podloge RPMI 1640

RPMI 1640 podloga je proizvod istraživača Moore i saradnika sa instituta "Roswell Park memorial Institute", po čemu joj je i dat naziv RPMI. Podlogu čini fosfatni pufer u koji se dodaju amino kiseline i vitamini. Hemijski sastav RPMI 1640 podloge je sledeći (g/L) [122]:

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-hidrohlorid	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-Dinatrijum-tirozinat-dihidrat	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-hidrohlorid	0,001
Riboflavin	0,002
Tiamin-hidrohlorid	0,001

Vitamin B12	0,000005
D-glukoza	2
Glutation	0,001
HEPES	5,958
Fenol crveno (Na-so)	0,0053

3.2.2. Priprema RPMI 1640 hranljive podloge

Praškasta RPMI 1640 podloga se rastvara u sterilnoj destilovanoj vodi, uz mešanje na temperaturi 15 – 20 °C. U rastvor je dodato 2g 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 mol/L HCl i 1 mol/L NaOH. Podloga je sterilisana takozvanom hladnom "sterilizacijom", korišćenjem membranskog filtra poroznosti 0,22 mikrona. U podlogu je dodato 10 % fetalnog goveđeg seruma termički inaktivisanog tokom 30 minuta na 56 °C. Podloga je opskrbljena i penicilinom 192 IU/mL i streptomycinom 200 µg/mL, L-glutationom (3 mmol/L), HEPES-om (25 mmol/L) [122].

3.2.3. Sastav hranljive podloge DMEM

DMEM (eng. Dulbecco's Modified Eagles Medium) je modifikacija BME (eng. Basal Medium Eagle). Originalna formula je sadržala 1 g/L glukoze i korišćena je za kulture mišjih embrionalnih ćelija. Od tada je modifikovana na više načina da bi bila pogodna za primarne kulture mišjih i kokošijih ćelija, kao i za mnoge normalne i transformisane ćelije.

Hemijski sastav DMEM podloge je sledeći (g/L) (123):

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-tirozindihidrat	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. Podešavanje se obavlja rastvorima 1 mol/L HCl i 1 mol/L NaOH. U podlogu je dodato 10 % fetalnog goveđeg seruma termički inaktivisanog tokom 30 minuta na 56 °C. Podloga je sterilisana takozvanom "hladnom sterilizacijom", korišćenjem membranskog filtra poroznosti 0,22 mikrona. Podloga je opskrbljena penicilinom 192 IU/mL, streptomycinom 200 µg/mL, L-glutationom (3 mmol/L) i HEPES-om (25 mmol/L) [123].

3.2.5. Postupak održavanja kulture ćelija

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

Pasažiranje ćelija je obavljano u sterilnoj komori, uz korišćenje sterilnih laboratorijskih sudova i nošenje zaštitne laboratorijske opreme. Pasažiranje se vrši kada ćelije potpuno prekriju dno suda, ili kada se istroše nutrijenti podloge, na šta ukazuje indikator promene pH podloge [124].

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 odlije iz falkona. Dno falkona na kome su zalepljene ćelije (V= 50 mL) je isprano sa 3 mL 0,25 % rastvora tripsina zagrejanog do 37 °C u vodenom kupatilu.

Zatim se nalije 5 mL 0,25 % rastvora tripsina i inkubira na 37 °C, 1 - 5 min. Promena morfologije ćelija je praćena pod svetlosnim mikroskopom, na uvećanju 20/0.40. Kada su ćelije počele da se zaokrugljuju, sadržaj iz boćice je špricem prenesen u epruvetu u kojoj se već nalazi 2 mL hranljive podloge. Antitripsin prisutan u podlozi neutrališe dalje dejstvo tripsina na prenete ćelije. Ćelije stoje još 3-5 min u termostatu na 37 °C dok se sve ne zaokrugle, nakon čega se odlepe sa dna suda mlazom podloge zagrejane na 37 °C i resuspenduju se u toj podlozi pomoću šprica. Jedna zapremina suspenzije ćelija je vraćena u sud za gajenje ćelija, dopunjena svežom podlogom do zapremine $V=15$ ml i sud je vraćen u inkubator na 37 °C. Preostala suspenzija ćelija je korišćena za eksperimente *in vitro* [124].

3.3. POSTUPAK ISPITIVANJA ANTIPROLIFERATIVNOG POTENCIJALA KOMPLEKSA RUTENIJUMA(II) MTT TESTOM

Antiproliferativni potencijal ispitivanih kompleksa rutenijuma(II) utvrđen je kolorimetrijski MTT testom na HeLa, MDA-MB-361, MDA-MB-453, FemX, B16, LS-174, EA.hy 926 i MS1 ćelijama, kao i MRC-5 ćelijama [126].

Tabela 3.3.1 *Ispitivani kompleksi*

1	$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{L1})\text{Cl}_2]$
2	$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{L2})\text{Cl}_2]$
3	$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{L3})\text{Cl}_2]$
4	$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{HL4})\text{Cl}_2]$
5	$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{HL5})\text{Cl}_2]$
6	$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{HL6})\text{Cl}]$
7	$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{HL7})\text{Cl}]$
8	$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{HL8})\text{Cl}]$
9	$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{HL9})\text{Cl}]$
10*	$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{RuCl}_2]_2$
11	$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{RuCl}(\text{L11})]$

* polazni kompleks korišćen za sinteze ostalih kompleksa

** L1= 3-acetilpiridin, L2= 4-acetilpiridin, L3= 2-amino-5-hloropiridin, HL4= izonikotinska kiselina, HL5= nikotinska kiselina, HL6= 2,3-piridindikarboksilna kiselina, HL7= 2,4-piridindikarboksilna kiselina, HL8= 2,5-piridindikarboksilna kiselina, HL9= 2,6-piridindikarboksilna kiselina, HL11= pikolinska kiselina

3.3.1. Postupak određivanja viabilnosti ćelija

Viabilnost se definiše kao broj živih ćelija u ukupno 100 izabranih ćelija. Viabilnost ćelija u ovom radu je određena metodom bojenja sa tripan-plavim (eng. tripan blue) i zasniva se na osobini živih ćelija da izbacuju boju tripan-plavo i ostaju bezbojne, dok mrtve ćelije akumuliraju boju i postaju plavo obojene [126].

Rastvori:

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

U 50 μ L suspenzije ćelija u hranljivoj podlozi, dodato je 450 μ L rastvora boje tripan-plavo (Rastvor 2), 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).

Prosečan broj živih ćelija po polju komore, određen je brojanjem ćelija pod mikroskopom na uveličanju 20/0,4. Svako polje na komori za brojanje zauzima zapreminu od 10^{-4} mL Broj ćelija 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 određivanja preživljavanja ćelija MTT testom

MTT test je kolorimetrijski test kojim se određuje sposobnost živih ćelija da konvertuju tetrazolijum so (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid (MTT), žute boje, u formazanski precipitat, tamno crvene boje [125]. MTT u ćeliji zapravo preuzima ulogu koenzima, tj. elektron akceptora u oksidoredukcionim reakcijama koje katalizuje enzim (na putu razgradnje glukoze) 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 (10^6 /mL), formirana je serija razblaženja ove suspenzije, tako da broj ćelija/ml bude redom: 12500, 25000, 50000, 100000, 200000, 400000. U središnje bunarčiće plastične ploče (cell culture plate, NUNC) sa 96 bunarčića sa ravnim dnom, zasejano je 100 μ L pripremljenog razblaženja. U preostale bunarčiće ploče sipana je samo hranljiva podloga po 100 μ L, kao slepa proba.

Na ovaj način zasejane su dve ploče i ostavljene u inkubatoru na 37 °C, u atmosferi vazduha zasićenog parom, sa 5 % CO₂. U jednu ploču je nakon 4 h sipano u svaki bunarčić po 20 μ L MTT rastvora (5 mg MTT/mL u fiziološkom rastvoru). Nakon 4 h inkubacije dodato je 100 μ L rastvora (10 % SDS). Nakon 24 h izmerena je apsorbanca na 570 nm na ELISA čitaču. Na drugu ploču je nakon 20 h inkubacije sipano u svaki bunarčić po 20 μ L MTT rastvora (5 mg MTT/mL u fiziološkom rastvoru). Nakon 4 h inkubacije dodato je 100 μ L rastvora 10 % SDS-a. Nakon 24 h izmerena je apsorbanca na 570 nm na ELISA čitaču. Na osnovu dobijenih apsorbanaci formiran je grafik zavisnosti apsorpcije 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, zasejano je HeLa (2000c/w), B16 (2000c/w), FemX (2000c/w), LS-174(7000c/w), MDA-MB-361(7000c/w), MDA-MB-453 (1500c/w), EA.hy 926 (4000c/w) and MS1 (7000c/w) u 100 μ L hranjive podloge. Sve je rađeno u triplikatu, tj. na tri sudića ćelija ostavljena su tri sudića u koje je sipana samo hranjiva podloga (slepa proba). Ćelije su gajene 24 h u inkubatoru na 37 °C, u atmosferi vazduha zasićenog parom, sa 5 % CO₂.

Neposredno pre dodatka pojedinačnog kompleksa za svaki ispitivani kompleks napravljeni su 30 mmol/L štokovi u DMSO-u. Merenja su vršena na analitičkoj vagi sa tačnošću merenja na 4 decimale. Za svaki kompleks je polazeći od štoka ispitivanog kompleksa, formirana serija razblaženja u odgovarajućoj hranljivoj podlozi. 24 h nakon zasejavanja ćelija u bunarčiće, pošto su se ćelija zalepile za dno suda, u bunarčiće sa ćelijama, kao i u bunarčiće samo sa podlogom (slepa proba), sipano je u triplikatu 50 μ L svakog razblaženja ispitivanog kompleksa. Razblaženja kompleksa u odgovarajućoj podlozi su formirana tako da finalne koncentracije kompleksa u bunarčiću ploče budu redom: 18.75; 37.5; 75; 150; 300 μ mol/L.

Ćelije se zatim inkubiraju sa ispitivanim agensima u inkubatoru sa 5% CO₂ na 37 °C, tokom 48 h. Nakon inkubacije 20 μ L MTT rastvora (5 mg MTT/mL u fiziološkom rastvoru) je dodato u svaki bunarčić. Nakon 4 h dodato je 100 μ L rastvora 10 % SDS-a.

Nakon 24 h očitana je apsorbancija na 570 nm.

3.3.2.3. Obrada podataka

Izračunavanja parametara koji karakterišu intenzitet citotoksičnog, odnosno citostatičkog dejstva ispitivanog agensa urađena su prema A. Monks et al. [127].

Sa kalibracione krive za MTT je određeno u kom opsegu broja ćelija postoji linearna zavisnost apsorbance 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 srednja vrednost apsorbancija uzoraka ćelija gajenih u prisustvu različitih koncentracija ispitivanog agensa i ako se kao probe koriste absorbance hranljivog medijuma bez ćelija, sa odgovarajućim koncentracijama ispitivanog agensa, tada je:

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

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 %, IC_{50} .

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

Analiza ćelijskog ciklusa HeLa ćelija nakon inkubacije ćelija sa ispitivanim kompleksima, vršena je na protočnom citometru (Becton Dickinson, CA, SAD) nakon bojenja tretiranih ćelija sa propidijum-jodidom [128,129]. Metoda se zasniva na određivanju sadržaja DNK po ćeliji, a koji je u funkciji faze ćelijskog ciklusa u kome se ćelija nalazi.

Rastvori:

1. Rastvor RNaze A (1 mg/mL)
2. Rastvor propidijum-jodida (400 µg/mL)

HeLa i EA.hy 926 ćelije u eksponencijalnoj fazi rasta, u gustini od 2×10^5 ćelija/Petri šolji (dimenzija 60x15 mm, NUNC) izložene su dejstvu ispitivanih kompleksa rastvorenih u odgovarajućoj podlozi, u koncentraciji 300 µmol/L (**1**, **3**, **6**, **7**), 82 µmol/L tj. IC₅₀ (**11**). Ćelije su inkubirane sa ispitivanim kompleksima 24 h.

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

Nakon tretmana RNazom, uzorcima je dodato 100 µL rastvora PI (400 µg/mL) i ćelije su odmah analizirane na protočnom citometru. Analiza sadržaja DNK i ćelijskog ciklusa je vršena na FASC (eng. Fluorescence Activated Sorting Cells) Calibur Becton Dickinson protočnom citometru, korišćenjem lasera argona sa λ ekscitacije na 488 nm. DNK histogram je analiziran korišćenjem kompjuterskog softvera Cell Quest Pro.

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

Apoptoza je forma programirane ćelijske smrti koju karakterišu razne morfološke promene, uključujući promene u ćelijskoj membrani kao što je gubitak asimetrije membrane, skupljanje ćelije, kondenzacija hromatina i internukleozomalno sečenje DNK. Promene na plazma membrani su jedne od ranih promena na ćelijama koje podležu apoptozi. Jedna od prvih karakteristika je translokacija membranskog fosfolipida fosfatidil-serina (eng. Phosphatidyl Serine-PS), sa unutrašnje strane membrane na spoljašnju. Aneksin-V je 35-36 kDa Ca^{2+} -zavisan fosfolipid-vezujući protein koji ima visoki afinitet za PS. Aneksin-V može biti vezan za fluorohrome kao što je fluorescein-izotiocijanat (eng. Fluorescein Isothiocyanate-FITC). U toj formi aneksin V-FITC može poslužiti za analizu apoptoze na protočnom citometru.

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

Ovakvo dvokolono bojenje omogućava razlikovanje :

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

Ovaj test ne razlikuje ćelije koje su podlegle apoptozi od ćelija koje su već umrle putem nekroze jer će se oba tipa ćelija bojiti sa obe boje.

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

Ćelije tretirane sa ispitivanim kompleksom **11** u tri koncentracije i cisplatinom u dve koncentracije i nakon inkubacije od 48 h su fiksirane, obojene aneksin V-FITC-om i PI i analizirane na protočnom citometru.

Reagensi:

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

1x10⁶ HeLa ćelija/mL je tretirano sa 0,5xIC₅₀, IC₅₀ i 1,5xIC₅₀ koncentracijama kompleksa **11** i 0,5xIC₅₀ i IC₅₀ koncentracijama cisplatine (videti Tabelu 4.1) 48 h.

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

1. Ćelije se isperu dva puta sa hladnim PBS-om
2. Isprane ćelije se resuspenduju u puferu za vezivanje aneksina tako da koncentracija ćelija bude 1x10⁶ ćelija/mL.
3. Prebaci se 100 µL rastvora (koji sadrži oko 1x10⁵ ćelija) u epruvetu za protočni citometar (zapremine 5 mL)
4. Zatim se doda 2,5 µL aneksin V-FITC-a i 2,5 µL PI.
5. Ćelije se blago vorteksiraju i inkubiraju 15 min na sobnoj temperaturi (25 °C) u mraku.
6. Nakon inkubacije u svaku epruvetu se dodaje 400 µL pufera za vezivanje aneksina nakon blagog vorteksiranja pripremljeni rastvor se analizira korišćenjem FASC Calibur Becton Dickinson protočnog citometra i Cell Quest Pro kompjuterskog softvera u toku narednog sata.

3.6. Analiza unutarćelijske distribucije Ru(II) (u proteinskoj vs DNK frakciji) metodom ICP-OES

Nivo rutenijuma(II) u proteinskoj tj. DNK frakciji HeLa ćelija nakon tretmana sa ispitivanim kompleksima je određen koristeći ICP-OES (eng. Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry). DNK i proteini su izolovani koristeći TRI Reagent® (Sigma-Aldrich Co.) prema proceduri proizvođača i koncentracije su određene spektrofotometrijski merenjem apsorbance na 260 i 280 nm respektivno (ependorf BioPhotometer 6131). Nivo rutenijuma je određen u izolovanim DNK i proteinskim frakcijama, nakon što su uzorci pripremljeni za ICP-OES prema standardnoj proceduri, koristeći Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, UK).

3.6.1. Priprema uzorka

6×10^6 ćelija/75 cm² posude za gajenje ćelija (NUNC) su tretirane sa ispitivanim kompleksima (100 µmol/L koncentracije) 24 h. Nakon tretmana ćelije su isprane sa ledeno hladnim PBS-om i sakupljene guljenjem. Nakon centrifugiranja na 2000 rpm, 10 minuta na 4 °C talog ćelija je zamrznut na -70 °C.

3.6.2. Razdvajanje faza

DNK i proteini su izolovani koristeći TRI Reagent® (Sigma-Aldrich Co.) prema proceduri proizvođača. Na $5-10 \times 10^6$ ćelija dodali smo 1mL Tri reagenta i lizirali ih mehanički pipetiranjem. Uzorke smo ostavili 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim smo dodali po 0.2 mL hloroforma na 1 mL početnog reagenta. Ependorfica se zatvori i izmićka nekoliko puta. Nakon stajanja 7 minuta na sobnoj temperaturi uzorci su centrifugirani 15 minuta na 11000 rpm na 4 °C. Centrifugiranjem se dobijaju tri faze: donja- organska u kojoj se nalaze proteini, interfaza- u kojoj je DNK i gornja-vodena faza u kojoj je RNK.

3.6.3. Izolovanje RNK

Prebacili smo vodenu fazu u novu ependorficu i dodali 0.5 ml izopropanola (na 1 mL početnog TRI reagenta) i izmućkali. Ostavili smo uzorke 5-10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja 10 minuta na 11000 rpm osušili smo talog RNK na vazduhu. Nakon sušenja od 30 minuta talog je rastvoren u 50 µL ampulirane vode i čuvan u zamrzivaču na -80 °C. Talog RNK je sačuvan za RT-PCR analizu mRNK nivoa ERCC1.

3.6.4. Izolovanje DNK

Na interfazu u kojoj je DNK dodali smo 0.3 mL 100 % etanola, promućkali i ostavili 2 - 3 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su centrifugirani na 4500 rpm 5 minuta na 2 - 8 °C. Supernatant sačuvan za izolovanje proteina na 2 - 8 °C u frižideru. DNK pelet resuspendovan u 75 % etanolu i ostavljen da stoji 20 - 30 minuta na sobnoj temperaturi.

3.6.5. Izolovanje proteina

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

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

Nivo rutenijuma je određen u izolovanim DNK i proteinskim frakcijama, nakon što su uzorci pripremljeni za ICP-OES prema standardnoj proceduri, koristeći Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, UK).

3.7. Analiza uticaja ispitivanih kompleksa na invazivni i metastatski potencijal tumorskih ćelija *in vitro*

3.7.1. Želatinska zimografija

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

Metoda se zasniva na sposobnosti ovih enzima da razlažu želatin. Uzorci koji sadrže MMP su podvrgnuti razdvajanju proteina natrijum-dodecil-sulfat-poliakrilamidnom-gel-elektroforezom (SDS-PAGE, eng. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) u gelu koji sadrži ko-polimerizovan supstrat za proteaze kao što je želatin (0,1 %). Nakon razdvajanja u gelu proteaze se renaturišu i hidrolizuju supstrat u gelu. Prisustvo i relativna aktivnost MMP u uzorku se tako određuje usled smanjenja bojenja sa komazi plavim (eng. Coomassie Brilliant Blue-CBB) razloženog želatina na mestima aktivnosti MMP [130,131].

Rastvori:

1. Želatin (1 mg/mL)
2. Akrilamid/bisakrilamid (30 %T/2,67 %C)
3. Akrilamidni gel za razdvajanje (10 %)
Akrilamid/bisakrilamid3,3 mL
1,875 mol/L Tris-HCl (pH 8,8).....2 mL
10 % SDS.....0,1 mL
Želatin (1 mg/mL).....1 mL
TEMED (*N,N,N,N*-tetrametil-etilendiamin).....50 µL
Dopuniti do 10 mL destilovanom vodom i dodati 200 µL 10 % APS-a
(amonijum- persulfata)
4. Akrilamid gel za koncentrovanje (4 %)
Akrilamid/bisakrilamid.....1,5 mL

1,25 mol/L Tris-HCl, pH 6,8.....	1 mL
10 % SDS.....	100 μ L
TEMED.....	15 μ L

Dopuniti do 10 mL sa destilovanom vodom i dodati 200 μ L 10 % APS-a (amonijum-persulfata)

5. Pufer za uzorak (PUZ)

- 0.125 mol/L Tris-HCl, pH 6,8
- 20 % glicerol
- 2 % SDS
- 1 % Brom-fenol plavo

6. Renaturišući pufer

- 25 % Triton X-100

7. Pufer za razvijanje:

- 50 mmol/L Tris-baza
- 50 mmol/L Tris-HCl
- 0,2 mol/L NaCl
- 5 mmol/L CaCl₂
- 0,05 % NaN₃

8. Pufer za bojenje:

- Coomassie Brilliant Blue G-250
- Metanol
- Sirćetna kiselina
- Destilovana voda

Odnos Metanol:Sirćetna kiselina: destilovana voda= 2,5:1:6,5

9. Obezbojivač:

- 4 % Metanol
- 8 % Sirćetna kiselina

Kolagenolitička aktivnost netretiranih i tretiranih HeLa, EA.hy926 i FemX ćelija je analizirana i identifikovana želatin zimografijom na 10 % natrijum-dodecil-sulfat-poliakrilamidnom gelu sa 0,1 % želatina.

2×10^6 ćelija/uzorku su tretirane sa štok rastvorom **1, 3, 6, 7, 11** i CDDP (u slučaju HeLa i EA.hy 926 ćelija; jedino u sličaju FemX ćelija samo sa kompleksom **11** u više koncentracija) da bi se postigla finalna koncentracija od 100 $\mu\text{mol/L}$. Ćelije su tretirane sa ispitivanim kompleksima 24 h u medijumu bez FCS-a, kontrola su bile netretirane ćelije. Uzorci supernatanta (medijuma u koji su ćelije ispustile matriksne metaloproteinaze) su pomešani sa Puferom za nalivanje (za uzorak) i podvrgnuti elektroforezi (20 μL po bunarčiću). Posle elektroforeze na 125 V gelovi su isprani 3×20 min. u renaturišućem puferu, a zatim inkubirani 48 h na 37 °C u pufer za razvijanje (pufer za razvijanje traka enzimske aktivnosti). Nakon inkubacije gelovi su bojeni sa 0,05 % Coomassie Brilliant Blue G-250 bojom u smesi metanola:sirćetne kiseline:vode (2,5:1:6,5) i obezbojeni u 4 % metanolu sa 8 % sirćetne kiseline. Za bolju senzitivnost gelovi su dalje obezbojeni u rastvoru 1 % Triton X-100 (1 - 2 h). Sposobnost matriksnih metaloproteinaza da razlože želatin je vizualizovana kao svetle trake nasuprot tamne pozadine gela obojenog sa bojom.

3.7.2. Uticaj ispitivanih kompleksa na invazivnost tumorskih ćelija analizom u invazivnim komorama presvučenim matrigelom

Invazivnost tumorskih ćelija je značajan rani korak u procesu metastaziranja tumora. Ovaj proces podrazumeva seriju događaja. Tumorska ćelija mora da se oslobodi adhezije za primarnu tumorsku masu, da razloži barijere vanćelijskog matriksa (ECM), lizira proteine matriksa i migrira. *In vitro* proučavanje invazivnosti, kao što je skrining anti-metastatskih lekova, postignuto je korišćenjem raznih formi testa u modifikovanim Bojdenovim komorama [132]. Potencijal ispitivanih rutenijum(II)-p-cimenskih kompleksa (**1**, **3**, **6**, **7**, **11**) da inhibiraju invazivnost HeLa ćelija ispitan je testom u invazivnoj komori koja se sastoji od ploče sa 24 bunarčića za ćelijske kulture, sa 12 inserata (BD BioCoat Matrigel™ Invasion Chambers, BD Biosciences) prema proceduri proizvođača. Dno inserta predstavlja PET membrana (polietilen terftalat membrana) sa 8- μ m veličinom pora. Membrana je sa unutrašnje strane inserta presvučena sa tankim slojem Matrigela. Matrigel je smesa proteina bazalne membrane vanćelijskog matriksa, primarno lamina i kolagena IV dobijena iz Englebreth-Holm-Swarm mišijeg tumora (EHS). Invazivne ćelije su sposobne da razlože ECM i migriraju na donju stranu membrane gde ostaju zakačene. Ćelije se zatim otkace sa membrane i fluorescentno obeležavaju sa Kalcein-AM (Sigma) i kvantifikuju fluorimetrijski. Kalcein-AM je acetometoksi derivat kalceina, fluorescentne boje, koji se koristi u biologiji za testiranje preživljavanja ćelija. Kalcein-AM je forma boje koja ne fluorescira ali nakon transporta kroz ćelijsku membranu u živim ćelijama unutarćelijske esteraze uklanjaju acetometoksi grupu i molekul fluorescira zeleno.

Rastvori:

Rastvor za odlepljivanje i bojenje ćelija:

- 0.05 % Trypsin
- 0.02 % EDTA
- 5 μ mol/L Kalcein-AM

HeLa ćelije (2×10^5 ćelija/bunarčiću) su zasađene u plastičnoj ploči sa šest bunarčića (6-well plate, NUNC) u medijumu. Nakon 24 h ćelije su tretirane sa ispitivanim

kompleksima rutenijuma **1, 3, 6, 7** (100 $\mu\text{mol/L}$) i **11** ($0.5 \times \text{IC}_{50}$) 24 h. Kontrola su bile ćelije samo u medijumu. Nakon tretmana ćelije su ostavljene 4 h u medijumu bez seruma RPMI 1640 sa 0.2 % BSA. Nakon gladovanja ćelije su pokupljene tripsinizacijom i resuspendovane u medijumu bez seruma sa 0.2 % BSA. U inserte prekrivene matrigelom (sa 8 μm veličinom pora) zasađeno je 4×10^4 ćelija/0.5mL/bunarčiću. RPMI 1640 medijum sa 10 % FCS smo dodali u donji deo u ploči kao hemoatraktant. Nakon inkubacije, na 37 °C, u atmosferi 5 % CO_2 48 h, ćelije koje nisu prošle kroz matrigel i membranu uklonjene su guljenjem. Ćelije koje su prošle i ostale zakačene sa donje strane membrane su skinute i obojene sa puferom za odlepljivanje ćelija Tripsin/EDTA (0.05%/0.02%) u PBS-u sa 5 $\mu\text{mol/L}$ Kalcein-AM. 200 μL Tripsin/EDTA rastvora koji sadrži odlepljene ćelije je prebačeno iz svakog bunarčića u ploču sa 96 bunarčića u duplikatu. Ćelije su kvantifikovane sa fluorimetrom (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Electron Corporation) pri čemu je talasna dužina ekscitacije bila 485 nm i emisije 520 nm. Eksperiment je ponovljen dva puta.

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

Aktivno kretanje tumorskih ćelija, u kombinaciji sa proteolizom, je nophodno za prolazak kroz bazalnu membranu i intestinalnu stromu tokom invazivnosti karcinoma. Tumorske ćelije takođe pokazuju usmereno kretanje tokom ulaska u i izlaska iz krvnog suda.

In vitro “scratch” test je jednostavan, ekonomičan, dobro razvijen metod za merenje migracije ćelija [133]. Test podrazumeva stvaranje “scratch” (ogrebotine ili proreza) u monosloju ćelija, zatim fotografisanje na početku i u regularim intervalima tokom migracije ćelija do zatvaranja proreza i na kraju poređenje fotografija. Jedna od glavnih prednosti ovog jednostavnog metoda je da imitira do izvesnog nivoa migraciju ćelija *in vivo*.

In vitro “scratch” esej nam je poslužio za ispitivanje potencijala rutenijumskih kompleksa da inhibiraju migraciju HeLa ćelija.

4×10^5 HeLa ćelija je zasađeno po bunarčiću u plastičnoj ploči za ćelijske kulture sa 6 bunarčića i gajeno u RPMI 1640 medijumu sa 10 % FCS-a u inkubatoru za ćelijske kulture u atmosferi sa 5 % CO₂. U centru monosloja ćelija napravljen je prorez sa sterilnim nastavkom za pipete (p200) kako bismo dobili jaz konstantne širine. Ćelije koje su se odlepile guljenjem su blago isprane sa PBS-om. Početne slike proreza su napravljene sa Olympus digitalnim fotoaparatom povezanim sa invertnim mikroskopom (Carl Zeiss, Jena, Germany, objective 6.3/0.20) i ćelije su dalje inkubirane 24 h i 48 h u svežem medijumu za kontrolu tj. sa ispitivanim kompleksima u željeni koncentracijama **1**, **3**, **6**, **7** (100 μmol/L) i **11** (0,5xIC₅₀). Napravljene su fotografije nakon 24 i 48 sati kako bi kvalitativno odredili uticaj ispitivanih kompleksa na migraciju HeLa ćelija. Fotografije inicijalnog proreza na monosloju ćelija su upoređene sa odgovarajućim fotografijama tretiranih ćelija.

3.7.4. Analiza uticaja ispitivanih kompleksa na adheziju tumorskih ćelija

Migracija ćelija zavisi od delikatne ravnoteže između adhezije ćelija i njihove sposobnosti otkaćinjanja. Poznato je da tumorska ćelija tokom metastaziranja prvo mora da se otkaci od primarnog tumora, zatim da se zakači za bazalnu membranu, da je razloži, prođe i opet se zakači na neko novo mesto.

Postoje podaci koji ukazuju da tumorske ćelije koje imaju veću sposobnost adhezije za substrat ili druge ćelije su manje pokretne i sa manjim potencijalom stvaranja novih tumora [112].

Uticaj ispitivanih rutenijumskih kompleksa na adheziju HeLa ćelija za plastiku kao substrat (neprekrivena površina plejta) je utvrđen kao rezistencija na tretman tripsinom, koja je dobra mera jačine adhezije [134].

HeLa ćelije su zasađene u gustini od 3×10^4 ćelija/mL, u 0.2 mL/bunarčiću u ploči sa 96 bunarčića (NUNC) i inkubirane na 37 °C. Ćelije su nakon 48 h tretirane sa ispitivanim kompleksima pri koncentraciji od 100 $\mu\text{mol/L}$, 90 minuta. Ukratko, 30 μL (0.05 %, w/v) rastvora tripsina po bunarčiću je korišćeno za odlepljivanje ćelija na 37 °C 30 minuta. Ćelije koje su ostale zalepljene su fiksirane sa 200 μL 10 % (w/v) ledene trihlor sirćetne kiseline (TCA) na 4 °C 1 h. Broj adherentnih ćelija je određen bojenjem sa sulforodaminom B (SRB; Sigma) [135], i absorbanca je čitana na ELISA čitaču (ThermoLabsystems Multiskan EX 200-240V) na 570 nm. Svaki eksperiment je izveden u triplikatu.

3.7.5. Uticaj ispitivanih kompleksa Ru(II) na angiogenezu *in vitro* (“Tube formation assay”)

Angiogeneza uključuje proliferaciju endotelijalnih ćelija, migraciju i formiranje novih krvnih sudova. Uticaj ispitivanih kompleksa na angiogenezu *in vitro* je analiziran koristeći “Tube formation assay” kod mišijih endotelijalnih ćelija MS1.

MS1 ćelije kada se zasade na gel koji sadrži proteine bazalne membrane, počinju da se reorganizuju, izdužuju se stvarajući produžetke kojima formiraju kontakte ćelija-ćelija i strukture nalik poligonu (nalik tubulama, krvnim sudovima) [136]. U navedenom eksperimentu MS1 endotelijalne ćelije su tretirane sa sub-toksičnom koncentracijom ispitivanih kompleksa kako bi odredili njihov potencijal da smanjuju sposobnost ovih ćelija da se izdužuju i diferenciraju u strukture nalik tubulama.

Reagensi:

Rastvor za 5 mL gela: 1 mL DMEM bez NaHCO₃

0.5 mL FCS

0.5 mL NaHCO₃ (0.26 mol/L)

0.02 mL NaOH (1 mol/L)

0.1 mL H₂O

Kolagen (3.5 mg/mL) (Kolagen izolovan iz mišijeg repa je poklon Instituta za Medicinska Istraživanja u Beogradu)

Plejt za ćelijske kulture sa 24 bunarčića je presvučen sa gelom. Gel je napravljenim na sledeći način: rastvoru koji sadrži 1 mL DMEM bez NaHCO₃, 0.5 mL FCS, 0.5 mL NaHCO₃(0.26 mol/L), 0.02 mL NaOH (1 mol/L) i 0.1 mL H₂O dodali smo 2 mL kolagena (3.5 mg/mL) nežno promešali, dodali još 0.88 mL DMEM dobro promešali i nalili po 0.5 mL po bunarčiću. Gel je ostavljen 30 minuta u inkubatoru na 37 °C da očvrstne. MS1 (mišije endotelijalne ćelije) su zasađene u gustini 1x10⁵ ćelija po bunarčiću u odgovarajućem medijumu. 2 h nakon što su se ćelije stabilizovale dodali smo tretman (za komplekse **1**, **3**, **6**, **7** koncentracija je bila 100 μmol/L, i za kompleks **11** koncentracija je bila 0,5xIC₅₀). Formiranje tubula je posmatrano periodično pod mikroskopom i urađene su reprezentativne slike nakon inkubacije 24 h sa Olympus

digitalnim fotoaparatom povezanim sa invertnim mikroskopom (Carl Zeiss, Jena, Germany, objective 6.3/0.20).

3.7.6. Određivanje efekta kompleksa 11 na ekspresiju MMP-2 mRNA nivoa koristeći kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze u realnom vremenu ("Quantitative Real-Time PCR- RQ-PCR")

Konstitutivno povećana ekspresija MMP-aza se često uočava kod malignih tumora. Aktivnost MMP je regulisana na nivou transkripcije, translacije i sekrecije. MMP su inhibirane od strane specifičnih tkivnih inhibitora (TIMP) i helatora metala [137].

Kod kancera cerviksa uočen je direktan odnos između mRNA nivoa ekspresije MMP-2 i invazivne sposobnosti ćelija. Sličan odnos kod mMMP-9 nije uočen [137].

Kako bismo utvrdili da li je smanjenje aktivnosti MMP pod dejstvom kompleksa 11 posledica interakcije na proteinskom ili mRNA nivou, ispitali smo nivo ekspresije mRNA za MMP-2 i MMP-9 nakon tretmana FemX ćelija 24 h sa subcitotoksičnim koncentracijama kompleksa.

3.7.6.1. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

3.7.6.1.1. Izolovanje RNK i sinteza cDNK

RNK je izolovana iz 6×10^6 FemX ćelija, nakon tretmana sa ispitivanim kompleksom 11 (opseg koncentracija 6,25 - 100 $\mu\text{mol/L}$) 24 h, koristeći TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) prema proceduri proizvođača koja je navedena u delu 3.6. materijala i metoda. Ukupna RNK svakog uzorka je kvantifikovana spektrofotometrijski (Eppendorf BioPhotometer) merenjem absorbance na 260 nm. Odnos A_{260}/A_{280} je korišćen za procenu čistoće izolovane RNK. Koncentracija RNK je izražena u $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Kako bismo utvrdili kvalitet RNK, urađena je gel elektroforeza (Pharmacia Biotech) na 2 % agaroznom gelu sa etidijum bromidom. RNK uzorci su mešani sa ksilen cianol bojom (0.25 % ksilen cijanol u 30 % glicerolu u vodi) i pušteni u 0.5xTBE puferu 50 minuta na 25 mA. RNK trake su vizuelizovane na UV transiluminatoru (Hofer). Kako bismo izveli RT-PCR sa random primers, 2 μg ukupne RNK je upotrebjeno kao templat za reverznu transkriptazu (MultiScribe™ Reverse Transcriptase) (50 U/ μL) pri čemu je korišćen Kit za reverznu transkripciju cDNA visokog kapaciteta "High-Capacity cDNA

Reverse Transcription kit“ (Applied Biosystems), prema preporuci proizvođača. Reakciona smesa je inkubirana u Mastercycler gradient (Eppendorf).

3.7.6.1.2. RQ-PCR

Analiza nivoa genske ekspresije MMP-2 i GAPDH (endogena kontrola) je urađena koristeći “TaqMan® Gene Expression Assay” (*MMP-2* probe, Applied Biosystem, ID: Hs_01548727_m1, i TaqMan® MGB *GAPDH* probe, Applied Biosystem, ID: Hs_00355782_m1), na ABI PRISM® 7500 PCR instrumentu (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). PCR reakcije su pripremljene u duplikatu za svaki uzorak u optičkom plejtu sa 96 bunarčića. Svaki bunarčić je sadržao 11 μL TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 μL cDNA (100 ng/ μL) i 8 μL H₂O. Kontrola bez templata, u duplikatu takođe, je korišćena kao PCR negativna kontrola (11 μL TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 9 μL H₂O). PCR ciklus se sastojao od sledećih koraka: aktivacija enzima 50 °C 2 min; inicijalna denaturacija 95 °C 10 min; 40 ciklusa denaturacije na 95 °C 15 sec., i annealing/extension at 60 °C 1 min.

3.8. Određivanje efekta ispitivanih kompleksa na ekspresiju ERCC1 mRNK nivoa (kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu) i proteinskog nivoa (Western blot)

Odgovor ćelije na oštećenja DNK zavisi od prirode oštećenja i uključuje kompleksan sistem proteina koji prepoznaju oštećenje DNK i popravljaju isto.

Glavni mehanizmi uključeni u reparaciju oštećenja DNK indukovanih cisplatinom su NER i MMR. Kako bismo odredili da li ispitivani kompleksi rutenijuma indukuju odgovor ćelije zavisano od DNK reparacije kao rezultat DNK lezija, ispitivali smo nivo ekspresije mRNA ERCC1, i proteinski nivo ekspresije ERCC1 i MSH2, koji mogu kooperativno biti uključeni u odgovor ćelije na DNK vezujuće antikancerske agense.

ERCC1 je važna komponenta NER koji je primarno uključen u reparaciju platina-DNK adukata, poznato je da njegove funkcije u reparaciji prevazilaze NER i može imati ulogu u odgovoru ćelije na druge tipove DNK lezija.

3.8.1. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

3.8.1.1. Izolovanje RNK i sinteza cDNK

Izolacija RNK i sinteza cDNK je urađena prema prethodno opisanoj proceduri u delu 3.7.6.

3.8.1.2. RQ-PCR

Analiza nivoa genske ekspresije ERCC1 i GAPDH (endogena kontrola) je urađena koristeći “TaqMan® Gene Expression Assay” (*ERCC1* probe, Applied Biosystem, ID: Hs_01012155_g1, and TaqMan® MGB *GAPDH* probe, Applied Biosystem, ID: Hs_00355782_m1), na ABI PRISM® 7500 PCR instrumentu (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) prema prethodno navedenoj proceduri u delu 3.7.6.

3.8.2. Western blot

Western blot je metoda koja omogućava identifikaciju specifičnim antitelima proteina, koji su prethodno razdvojeni prema veličini gel elektroforezom. Koristeći western blot identifikovan je nivo dva enzima koji učestvuju u reparaciji DNK: ERCC1 i MSH2 nakon tremana sa ispitivanim kompleksima kod HeLa ćelija.

Rastvori:

1. Akrilamid/bisakrilamid (30%T/2,67%C)
2. Pufer za gel za razdvajanje (1.5 mol/L Tris HCl pH 8.8)
3. Pufer za gel za koncentrovanje (0.5 mol/L TrisHCl pH 6.8)
4. Rastvor detergenta natrijum dodecilsulfat (10 % SDS)
5. Inicijator amonijum persulfat (10 % APS)
6. Pufer za uzorak (PUZ)
 - 0.0625 mol/L Tris-HCl pH 6.8
 - 2 % SDS
 - 0.002 % Brom fenol plavo (BFP)
 - 5 % β -merkaptano etanol (β -ME)
7. Pufer za elektroforezu (pH 8.3)
 - 0.25 mol/L Tris
 - 0.192 mol/L Glicin
 - 0.1 % SDS
8. Gel za razdvajanje (10%)
 - A/B (30%T/2,67%C).....4 mL
 - Tris-HCl (1.5 mol/L) pH 8.8.....2.5 mL
 - 10 % SDS.....0.1 mL
 - TEMED.....6.75 μ L
 - H₂O.....3.4 mL
 - APS.....0.1 mL

Ukupno ...10 mL

(Po nalivanju gela preko je naliven pufer. Gel je ostavljen da se stabilizuje 40 min.)

9. Gel za koncentrovanje (4 %)

- A/B (30%T/2,67%C).....1.3 mL
- Tris-HCl (0,5 mol/L) pH 6.8.....2.5 mL
- 10 % SDS.....0.1 mL
- TEMED.....10 μ L
- H₂O.....6.1 mL
- APS.....0.1 mL

Ukupno.....10 mL

(Gel je ostavljen da se stabilizuje 30 min)

10. Pufer za transfer (pH 8,5)

- 25 mmol/L Tris
- 0,2 mol/L glicin
- 20 % MetOH

11. Pufer za blokiranje:

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

12. 20 mmol/L TBS (pH 7,6) (10X TBS)

- Tris.....24.2g
- NaCl.....80g
- H₂O do.....1000mL

13. Pufer za ispiranje TBS/T

- TBS
- 0.1 % Tween-20

14. Ponceau S

- 0.1 % Ponceau S
- 1 % CH₃COOH

15. Obezbojivac Ponceau S (1 % CH₃COOH)

16. Pufer za liziranje celija:

- 37 mmol/L Tris-HCl
- 75 mmol/L NaCl

-
- 5 % Triton X-100
 - koktel inhibitora proteaza (1:10) (Sigma-Aldrich)

HeLa ćelije su tretirane sa ispitivanim kompleksima rutenijuma: **1, 3, 6, 7, 11** u koncentraciji od 100 $\mu\text{mol/L}$ i sa CDDP u koncentraciji od 7 $\mu\text{mol/L}$ 24 h. Kontrola su bile netretirane ćelije, održavane samo u medijumu. Nakon tretmana ćelije su isprane sa PBS-om i ceo ćelijski lizat je pokupljen u puferu za liziranje. Uzorci su čuvani na - 20 °C do dalje analize.

Koncentracija proteina u lizatima je određena metodom po M. Bradford-u [138]. Ćelijski lizat u ekvivalentnim koncentracijama proteina je pomešan sa Lemlijevim puferom i podvrgnut 1 h SDS-PAGE (10% PAA gel) elektroforezi na 120 V. Nakon elektroforeze urađen je elektroblotting na nitroceluloznu membranu (0.45 μm) (Bio-Rad Laboratories, Inc.) 1 h na 100 V. Membrana je potom blokirana 1 h sa 5 % mlekom u PBS-u na sobnoj temperaturi i zatim je inkubirana preko noći sa prečišćenim mišijim anti-humanim ERCC1 monoklonskim antitelom (1: 500 razblaženje) (BD Biosciences Pharmingen), ili prečišćenim mišijim anti-humanim MSH2 monoklonskim antitelom (1: 1000 razblaženje) (BD Biosciences Pharmingen). Nakon ispiranja membrane sa TBS puferom tri puta, membrana je inkubirana sa anti-mišijim IgG-peroksidaza konjugovanim sekundarnim antitelom (1: 2000 razblaženje) (Sigma-Aldrich Co.) 1 h. Nivo specifičnih proteina je detektovan koristeći sistem na bazi hemiluminescencije (eng. enhanced chemiluminescence-ECL) (Amersham Biosciences), praćen autoradiografijom.

3.8.3. Određivanja koncentracije proteina (Bradford-ova metoda)

Metoda se zasniva na vezivanju boje Coomasie Brilliant Blue G-250, pri čemu se maksimum boje pomera sa 465 nm (kada proteini nisu prisutni) na 595 nm (kompleks protein-boja) [138]. Meri se porast apsorbance na 595 nm. Boja se razvija nakon 2 minuta i stabilna je u toku 1 sata.

Rastvori:

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

CBB G-250.....100 mg

95 %EtOH.....50 mL

H₃PO₄.....100 mL

Vode do.....200 mL

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

2. Bradford-ov reagens (BR) (1x)

Rastvora 1.....100 mL

Vode do500 mL

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

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

Postupak:

1. U kivetu za kalibraciju spektrofotometra sipati 2,5 mL Bradfordovog reagensa.
2. U kivetu sa 2,5 mL Bradfordovog reagensa dodati 50 µL uzorka.
3. Promešati okretanjem
4. Nakon 5 min. Meriti apsorbancu na 595 nm.

3.9. Ispitivanje kombinovanog efekta kompleksa **11** i inhibitora PARP-a/ cisplatine/ paklitaksela

Zbog značajnih terapijskih prednosti kombinacije lekova se često koriste i postale su vodeći izbor za lečenje malignih bolesti.

S obzirom na različite mehanizme dejstva kompleksa platine i rutenijuma bilo nam je interesantno da ispitamo kombinovani efekat najaktivnijeg rutenijumskog kompleksa **11** sa cisplatinom, kao i sa paklitakselom, koji ima potpuno drugačiji mehanizam dejstva od lekova na bazi metala.

Takođe, pretpostavljajući da se kompleks rutenijuma sa pikolinskom kiselinom kao ligandom (**11**) vezuje za DNK, indukujući lezije, pretpostavili smo da bi inhibitor PARP-a mogao povećati senzitivnost tumorskih ćelija na kompleks rutenijuma. Ispitali smo da li kombinovani tretman kompleksom **11** i inhibitorom PARP-a 3-aminobenzamidom (3-AB) na HeLa i MDA-MB-361 ćelijama, interferira sa citotoksičnošću kompleksa **11**.

Senzitivnost tumorskih ćelija (HeLa i MDA-MB-361) na kombinovani efekat kompleksa **11** rutenijuma i PARP inhibitora određena je SRB testom (test bojenja sulforodaminom B) [135].

Rastvori:

1. 40 % rastvor trihlor sirćetne kiseline (TCA)
2. Rastvor za bojenje:
 - 0,4 % sulforodamin B (SRB)
 - 1 % sirćetna kiselina
3. 10 mmol/L Tris baza (pH 10,5)

Ćelije su zasađene u ploči sa 96-bunarčića u gustini od 2000 ćelija po bunarčiću za HeLa ćelije i 7000 ćelija po binarčiću za MDA-MB-361 ćelije. Nakon inkubacije ćelija 24 h u inkubatoru sa 5 % CO₂, na 37 °C, ćelije su tretirane sa samim kompleksom **11** rutenijuma ili u kombinaciji sa 3-AB-om istovremeno (tj. u kombinaciji sa cisplatinom ili paklitakselom) i kontinualno tokom 48 h.

Nakon inkubacije ćelije su fiksirane sa 10 % (v/v) ledene trihlorsirćetne kiseline (TCA) na 4 °C 1 h. Nakon fiksacije TCA je uklonjena i bunarčići su isprani sa destilovanom vodom i osušeni na vazduhu. U bunarčiće smo dodali 40 µL/bunarčiću SRB rastvora (0.4 % w/v, u 1 % sirćetnoj kiselinu) i plejtovi su ostavljeni 30 minuta na sobnoj temperaturi. Plejtovi su zatim isprani tri puta sa 1 % sirćetnom kiselinom. Zatim su osušeni na vazduhu i vezana boja je rastvorena u 10 mmol/L Tris baze na pH 10,5. Apsorbanca je čitana na ELISA čitaču (ThermoLabsystems Multiskan EX 200-240V, Ascent Software Version 2.6) na 570 nm. Svaki eksperiment je izveden u triplicatu.

Na osnovu dobijenih vrednosti aposorbance formirana je kriva preživljavanja ćelija u zavisnosti od koncentracije agensa. Sa krive je određen udeo mrtvih ćelija F_a ("Fraction affected"). Na osnovu ove vrednosti izračunat je udeo ćelija koje su preživele F_u ("Fraction unaffected") ($F_u = 1 - F_a$) za određene koncentracije agensa/agenasa. Dobijeni podaci su obrađeni po metodi Chou and Talalay [139,140] korišćenjem softvera CalcuSyn Biosoft [140] za izračunavanje i grafičko prikazivanje kombinacionog indeksa CI (eng. Combination Index). Svaka koncentracija supstanci, tj. njihova kombinacija primenjena je u tri ponavljanja.

3.9.1. Obrada podataka

CI indeks ukazuje na modalitet međusobnog dejstva supstanci, pri kombinovanom dejstvu [139]. Chou and Talalay metod omogućava kvantitativnu definiciju za aditivni efekat ($CI=1$), sinergizam ($CI < 1$), i antagonizam ($CI > 1$) pri izučavanju kombinacija lekova. Pri čemu antagonizam ($CI > 1$) podrazumeva efekat kombinovanog dejstva supstanci koji je umanjen u odnosu na efekat pojedinačnih supstanci, sinergizam ($CI < 1$) podrazumeva pojačan efekat u odnosu na efekat pojedinačnih supstanci (u međusobnoj interakciji jedan lek pojačava dejstvo drugog) i aditivni efekat ($CI=1$) je jednak efektu koji je očekivan od bioloških aktivnosti individualnih supstanci (nema interakcije među lekovima).

Treba naglasiti da CI može da varira promenom opsega koncentracija lekova, tako da jedna kombinacija koncentracija lekova može da daje antagonističan efekat, druga kombinacija aditivan a treća kombinacija sinergističan efekat [139].

LABORATORIJSKI INSTRUMENTI I HEMIKALIJE

LABORATORIJSKI APARATI KORIŠĆENI U OVOM RADU

- Svetlosni mikroskop (Karl Zeiss, Jena, Nemačka)
- Inkubator (CO₂ inkubator 220, Flow Laboratories, Velika Britanija)
- Inkubator na 37 °C (Sutjeska, Beograd)
- Vorteks (REAX 2000, Heidolph Instrumeets GmbH&Co.KG, Schwabach, Nemačka)
- Analitička vaga (Mettler H43)
- Vodeno kupatilo (Sutjeska, Beograd)
- Centrifuga (BOECO U-32, Nemačka)
- Čitač mikrotitar ploča (ThermoLabsystems Multiskan EX 200-240V)
- Sterilna komora (Klimaoprema, Samobor, Hrvatska)
- Protočni citometar, (FASC Calibur Becton Dickinson, CA, SAD)
- Centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5417 R)
- Spektrofotometar (Eppendorf BioPhotometer 6131)
- UV transilluminator (Hoefer)
- Mastercycler gradient (Eppendorf).
- ABI PRISM® 7500 PCR instrument (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA)
- Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, Velika Britanija).
- Aparat za elektroforezu (Mini-Protean 3 Cell, BIO RAD)
- Platforma za mućkanje (Ultra Rocker, BIO RAD)
- Power supply (Power Pac HC TM, BIO RAD)
- Densitometar (GS-710 Calibrated Imaging Densitometer, BIO RAD)
- Fluorimetar (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Electron Corporation)
- Olympus digitalni fotoaparati (objective 6.3/0.20, Carl Zeiss, Jena, Nemačka)
- Mikrotitar ploče sa 96 i 6 sudića (NUNC, Apogent Company, Roskilde, Danska)
- Petri šolje (30x10mm, Flow laboratories, Velika Britanija)

-
- Automatske pipete (Eppendorf Research)
 - Nastavci za automatske pipete
 - Steper (NICHIRYO MODEL 8100)
 - Špricevi (Henke Sass Wolf, Nemačka)
 - Igle (Henke Sass Wolf, Nemačka)
 - Sudovi za gajenje ćelija-falkoni (Easy flask 25v/c, NUNC, Apogent Company, Roskilde, Danska)
 - Inserti sa mikroporoznom membranom za ćelijske culture (8,0 μm), FALCON, BD, SAD)
 - Membranski filter (Millex-HA, Millipore, 0.22 μm , SARSTED, Nemačka)
 - Komorica za brojanje ćelija (Neubauer, Fife Depth Profounder, 0,100 mm, 0,0025 mm^2)
 - Pokrovno staklo (Gold Seal, SAD)

HEMIKALIJE KORIŠĆENE U OVOM RADU

- Praškasta podloga RPMI 1640 (Sigma- Aldrich Co., SAD)
- Praškasta podloga DMEM (Sigma- Aldrich Co., SAD)
- Natrijumdodecilsulfat, SDS (Sigma- Aldrich Co.,)
- (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolijum-bromid (MTT), (Sigma- Aldrich Co., SAD)
- Dimetil-sulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich.Co)
- Fetalni goveđi serum (FCS-Fetal calf serum), (PAA GmbH Laboratories, Austria)
- Penicilin (Panfarma, Beograd)
- Streptomycin (Panfarma, Beograd)
- L-glutation
- HEPES-om (Sigma-Aldrich Co.)
- Cisplatina (BristolMayer Scuib)
- Etanol (Medicom, Šabac)
- Fiziološki rastvor (Hemofarm, Vršac)
- NaHCO₃ ("Zorka Pharm", Šabac)
- Na₂CO₃ (E. Merck, Darmstadt, Nemačka)
- NaH₂PO₄ (Alkaloid, Skoplje)
- Na₂HPO₄ (Alkaloid, Skoplje)
- NaOH ("Zorka Pharm", Šabac)
- HCl (E. Merck, Darmstadt, Nemačka)
- CH₃COOH ("Zorka Pharm", Šabac)
- Fosfatni pufer pH 7,2 (PBS) (Torlak, Beograd)
- RNaze A (Sigma- Aldrich Co., SAD)
- Propidijum-jodid (Sigma- Aldrich Co., SAD)
- TRI Reagent® (Sigma-Aldrich Co.)
- Hloroform (Lach-Ner, s.r.o., Czech Republic)
- Izopropanol (Lach-Ner, s.r.o., Czech Republic)
- Tripsin (Torlak, Beograd)

-
- EDTA (Fluka Chemika, Switzerland)
 - Kalcein-AM (Sigma)
 - Goveđi albumin (Bovine Serum Albumin-BSA, Sigma-Aldrich Co.)
 - Trihlorsirćetna kiselina-TCA (Fluka AG)
 - Sulforodamin-SRB (Sigma-Aldrich Co.)
 - Akrilamid (Sigma-Aldrich Co.)
 - Tris (ICN Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio)
 - Glicin (ICN Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio)
 - Natrijum-deoksiholat (Sigma-Aldrich Co.)
 - NaN_3 (Merck, Nemačka)
 - B-merkapt etanol (Sigma-Aldrich Co.)
 - Mleko u prahu (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Co, Švajcarska)
 - Brom fenol plavo (Sigma-Aldrich Co.)
 - Amonijum persulfat (Sigma-Aldrich Co.)
 - *N,N,N,N*-tetrametil-etilendiamin, TEMED (Sigma-Aldrich Co.)
 - Tripan plavo (E. Merck, Darmstadt, Nemačka)
 - Kolagena (3.5 mg/mL) (Kolagen izolovan iz mišijeg repa je poklon Instituta za Medicinska Istraživanja u Beogradu)
 - Agaroza (Sigma)

4. REZULTATI

4.1. Rezultati MTT testa

Cilj ovog rada bio je da se ispita citotoksični potencijal novosintetisanih kompleksa Ru(II) na tumorskim ćelijskim linijama, kao i da se što je moguće bliže utvrdi mehanizam njihovog dejstva.

Citotoksični potencijal serije Ru(II)-arenskih kompleksa je ispitan na sledećim tumorskim ćelijskim linijama: HeLa, MDA-MB-361, MDA-MB-453, FemX, B16, LS-174; kao i na dve transformisane endotelijalne linije: EA.hy 926 (humana), MS1 (mišja); i na jednoj normalnoj humanoj liniji MRC-5, MTT testom. Rezultati su prikazani u Tabeli 4.1 kao IC_{50} vrednosti (IC_{50} vrednosti ispitivanih kompleksa određene su sa grafika koji prikazuje procenat preživljavanja ćelija u funkciji koncentracije ispitivanog kompleksa, kao ona koncentracija agensa koja smanjuje preživljavanje ispitivane kulture ćelija za 50 %). Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta \pm standardna devijacija, pri čemu je svaki eksperiment rađen u triplikatu (tabele 4.1.i 4.2.).

Ispitivani kompleksi **1-9** nisu pokazali značajnu citotoksičnu aktivnost do koncentracije od 200 $\mu\text{mol/L}$ [3], izuzetak je kompleks **11** koji je pokazao citotoksičnu aktivnost na svim ispitivanim ćelijskim linijama nakon 48 i 72 h tretmana, sa IC_{50} vrednostima u opsegu 36-250 $\mu\text{mol/L}$. Uočena je nešto veća senzitivnost ćelija melanoma (naročito humanog) na kompleks **11**. Produživanje vremena inkubacije nije pospešilo antiproliferativnu aktivnost.

Znajući da izvestan broj kompleksa rutenijuma, koji su pokazali slabu genotoksičnost i citotoksičnost *in vitro*, je pokazao značajan antimetastatski potencijal, dalje smo proširili naše istraživanje na transformisane endotelijalne ćelijske linije. U pitanju su EA.hy 926 (transformisane endotelijalne ćelije dobijene fuzionisanjem HUVEC ćelija- humanih ćelija iz vene pupčane vrpce sa ćelijama tumora pluća A549) i MS1 (mišje endotelijalne ćelije) ćelijske linije koje se smatraju dobrim model sistemom za *in vitro* analizu antiangiogenetskog potencijala.

Jedinjenja koja pokazu biološku aktivnost važno je ispitati dalje, u pogledu neželjenih toksičnih efekata, što bi moglo da ograniči njihov terapijski potencijal. Kako bi se ispitala ova značajna karakteristika, pratili smo efekat tretmana jedinog agensa koji je pokazao značajan nivo antiproliferativnog dejstva, kompleksa **11**, na

zdrave ćelije humanog fetalnog fibroblasta pluća (MRC-5). Pokazalo sa da je nivo toksičnosti kompleksa **11** značajno niži na normalnoj liniji u odnosu na aktivnost na tumorskim linijama, kao i u odnosu na toksičnost CDDP na istoj liniji, što mu pruža dobru perspektivu u daljem razvoju kao potencijalnog antikancerskog leka (Tabela 4.1 i 4.2, Slika 4.1).

Kao što je već navedeno, nizak nivo citotoksičnosti *in vitro* je česta karakteristika rutenijumskih antikancerskih agenasa, koji su pokazali pre svega dobre antimetastatske karakteristike [15,142], stoga je veliki deo i ovog rada posvećen utvrđivanju antimetastatskog potencijala ispitivanih kompleksa.

Tabela 4.1. Rezultati MTT testa za komplekse 1–11 i CDDP predstavljeni u vidu IC_{50} vrednosti, dobijenih nakon 48 ili 72 h treatmenta

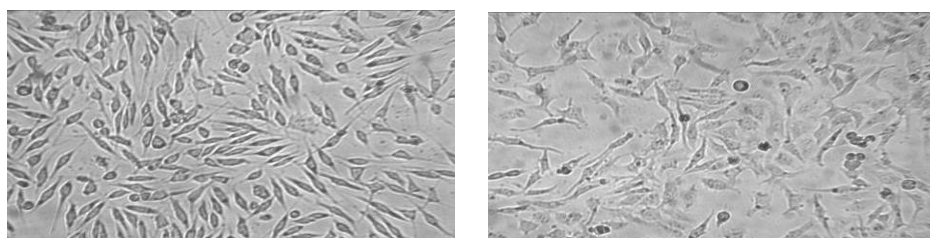
		IC ₅₀ (μmol/L)					
		HeLa	MDA-MB-361	MDA-MB-453	FemX	B16	LS-174
Kompleks		(cerviks)	(dojka)	(dojka)	(melanom)	(melanom)	(kolon)
1	48h	275.71±1.57	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72h	244.00±1.91	290.02±6.65	>300	220.50±6.36	>300	>300
2	48h	>300	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72h	295.75±2.95	>300	>300	>300	>300	>300
3	48h	>300	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72h	283.20±3.12	>300	>300	>300	>300	>300
4	48h	>300	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72h	>300	>300	>300	>300	>300	>300
5	48h	>300	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72h	>300	>300	>300	>300	>300	>300
6	48h	>300	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72h	>300	>300	>300	>300	>300	>300
7	48h	>300	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72h	>300	>300	>300	269.86±8.53	>300	>300
8	48h	>300	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72h	>300	>300	>300	>300	>300	>300
9	48h	>300	n.d.	n.d.	>300	n.d.	n.d.
	72h	>300	>300	>300	>300	>300	>300
10	48h	211.00±1.20	n.d.	n.d.	>300	n.d.	n.d.
	72h	212.97±2.14	202.21±2.77	220.25±7.63	149.26±9.60	>300	>300
11	48h	81.97±14.17	109.72±11.82	76.64±5.73	36.23±4.59	n.d.	n.d.
	72h	149.35±12.06	n.d.	n.d.	53.51±5.40	71.97±3.97	245.75±5.27
CDDP	48h	6.79±1.97	14.7±1.2	n.d.	6.28±0.91	n.d.	14.3±4.17
	72h	n.d.	25.46±3.57	9.59±1.96	n.d.	n.d.	n.d.

Tabela 4.2. Rezultati MTT testa za izdvojene komplekse za dalje ispitivanje predstavljeni u vidu IC_{50} vrednosti, dobijenih nakon 48 ili 72 h treatmenta

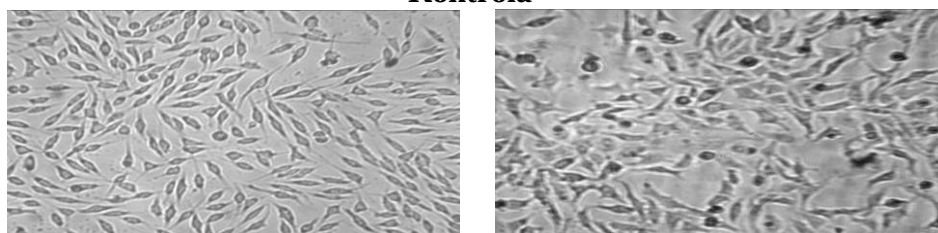
Kompleks	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)		
	EA.hy 926	MS1	MRC-5
	(endotelijum)	(endotelijum)	(pluća)
1	48 h	>300	>300
	72 h	>300	270.04±3.71
3	48 h	>300	220.82±15.98
	72 h	258.46±2.79	218.91±6.21
6	48 h	>300	253.33±2.35
	72 h	259.42±9.83	>300
7	48 h	>300	>300
	72 h	>300	>300
11	48 h	95.47±7.36	78.3±4.09
	72 h	88.36±8.10	108.54±9.45

MRC-5 ćelije

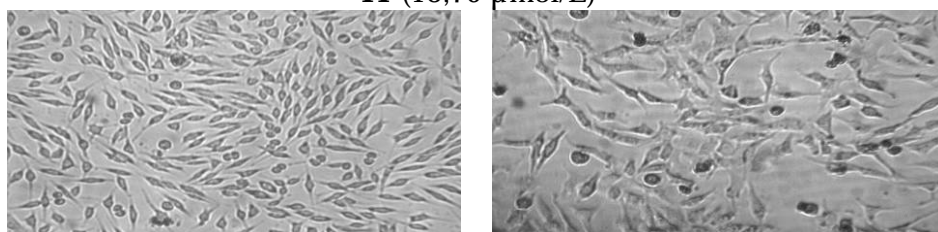
HeLa ćelije



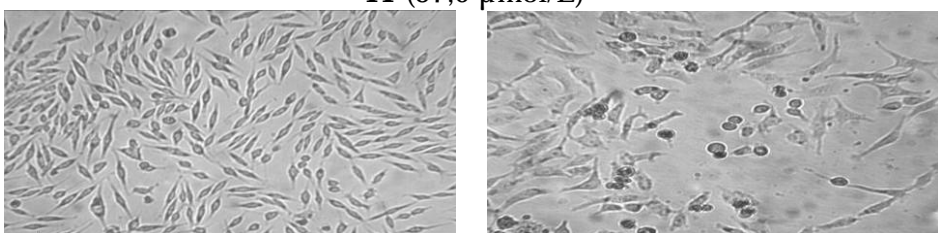
Kontrola



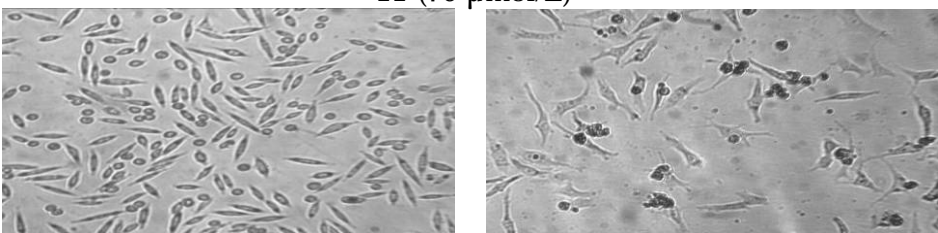
11 (18,75 $\mu\text{mol/L}$)



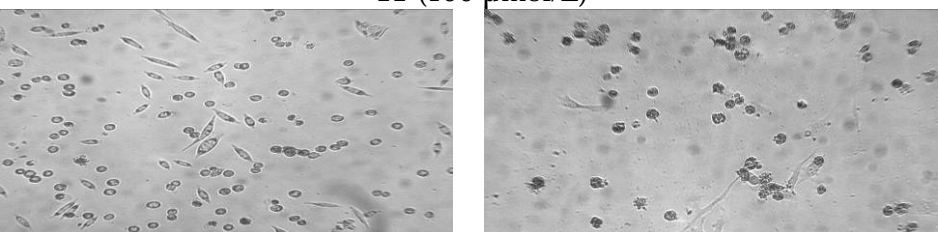
11 (37,5 $\mu\text{mol/L}$)



11 (75 $\mu\text{mol/L}$)



11 (150 $\mu\text{mol/L}$)



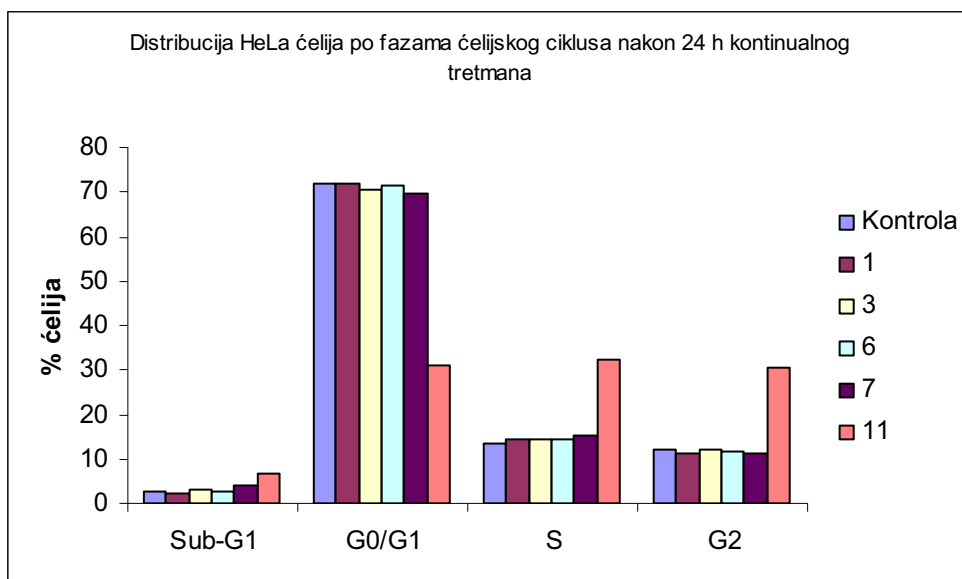
11 (300 $\mu\text{mol/L}$)

Slika 4.1. Fotomikrografije MRC-5 i HeLa ćelija tretiranih 48 h sa različitim koncentracijama kompleksa 11.

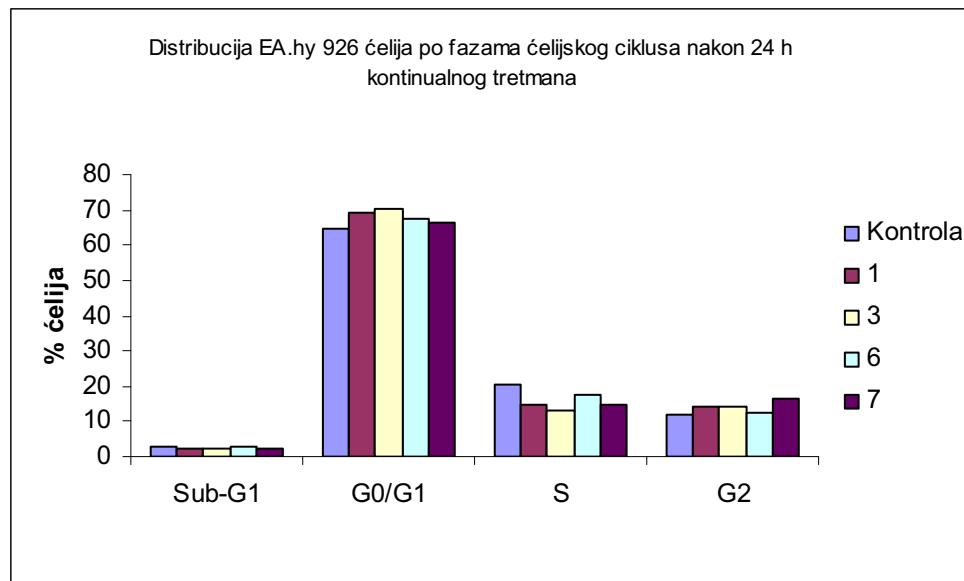
4.2. Rezultati analize ćelijskog ciklusa

Ćelije u različitim fazama ćelijskog ciklusa pokazuju različitu osetljivost na dejstvo citotoksičnih lekova. Tako, na primer, neki citotoksični lekovi dobro deluju samo na ćelije u određenoj fazi ćelijskog ciklusa, a drugi deluju na ćelije u bilo kojoj fazi ćelijskog ciklusa, treći deluju nezavisno od ćelijskog ciklusa. Stoga je za razumevanje mehanizma citotoksičnog dejstva nekog agensa važno poznavanje dejstva na kinetiku ćelijskog ciklusa [143].

U cilju utvrđivanja mehanizma citotoksičnog dejstva ispitivanih kompleksa Ru(II) analizirali smo potencijal ovih kompleksa da izazovu promene na nivou ćelijskog ciklusa HeLa i EA.hy 926 ćelija korišćenjem analize sadržaja DNK na protočnom citometru. HeLa i EA.hy 926 ćelije su tretirane 24 h ispitivanim kompleksima **1**, **3**, **6**, **7** (300 $\mu\text{mol/L}$) i **11** (82 $\mu\text{mol/L}$, što predstavlja IC_{50} za 48 h tretman).



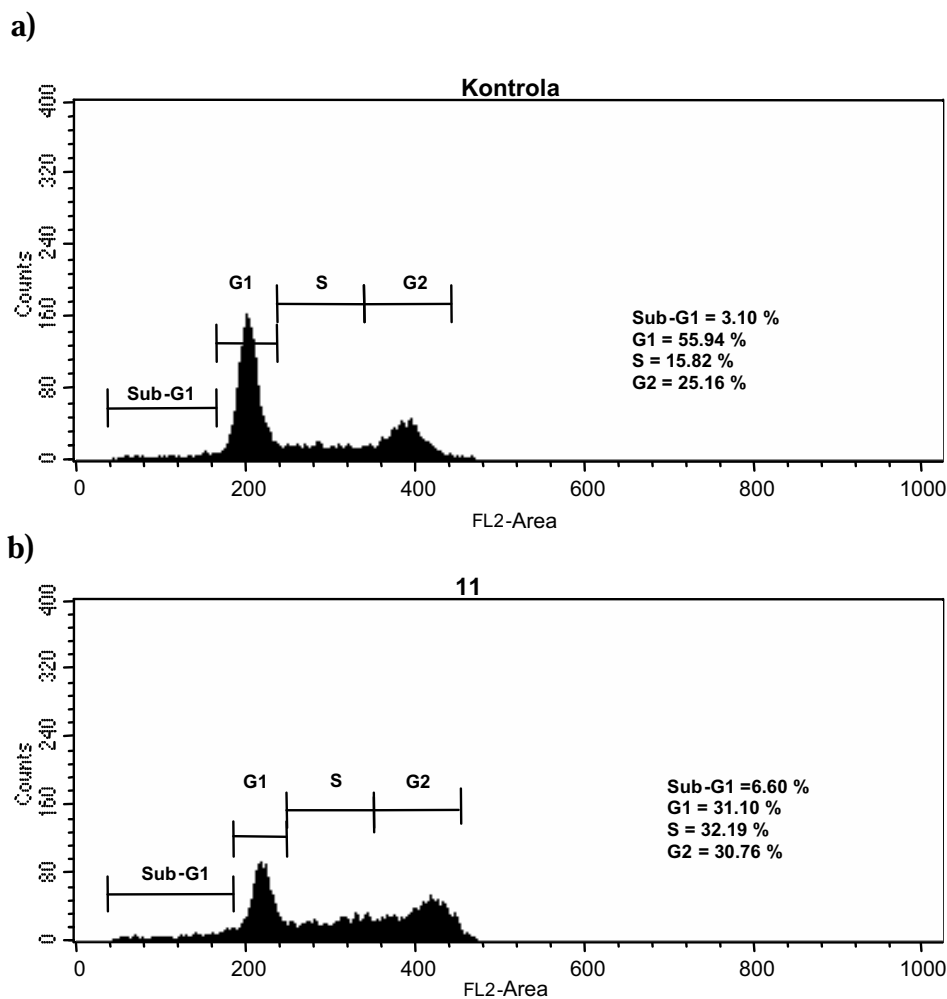
Slika 4.2. *Distribucija HeLa ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h kontinualnog tretmana sa kompleksima 1, 3, 6, 7 (koncentracije 300 $\mu\text{mol/L}$) i 11 (koncentracije 82 $\mu\text{mol/L}$ tj. IC_{50}). Prikazan je reprezentativni eksperiment.*



Slika 4.3. Distribucija EA.hy 926 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nakon 24 h kontinualnog tretmana sa kompleksima 1, 3, 6, 7 (koncentracije 300 $\mu\text{mol/L}$). Prikazan je reprezentativni eksperiment.

Rezultati analize ćelijskog ciklusa su pokazali da je jedino citotoksični kompleks **11** indukovao blage perturbacije ćelijskog ciklusa HeLa ćelija (prikazano na Slici 4.2.). Ostali ispitivani kompleksi nisu imali uticaja na ćelijski ciklus HeLa ćelija i pokazali su vrlo zanemarljiv uticaj na ćelijski ciklus EA.hy 926 ćelija (Slike 4.2. i 4.3.).

Rezultati analize uticaja kompleksa **11** na ćelijski ciklus predstavljeni su i u vidu histograma radi jasnijeg prikaza efekta i lakšeg komentarisanja rezultata. Na Slici 4.4. su rezultati prikazani kao histogrami zavisnosti broja ćelija ("Counts") u funkciji njihovog sadržaja DNK što predstavlja FL2-Area (tj. FL2-Area je mera ukupne fluorescencije PI koja je proporcionalna ukupnom sadržaju DNK).



Slika 4.4. Histogram reprezentativnog eksperimenta analize ćelijskog ciklusa HeLa ćelija a) netretiranih i b) nakon 24 h kontinualnog dejtva kompleksa **11** (koncentracije 82 $\mu\text{mol/L}$).

Dobijeni rezultati pokazuju da kompleks **11** indukuje smanjenje procenta ćelija u G1 fazi i blagi zastoje u S fazi ćelijskog ciklusa, bez apoptotskog efekta (koji predstavljaju ćelije u Sub-G1 fazi, a čiji procenat je iznosio 6,6 %). Sporiji prolazak kroz replikacionu fazu ćelijskog ciklusa pokazuje njegovo preferencijalno vezivanje za DNK i u korelaciji je sa rezultatima dobijenim ICP-OES (navedeni kasnije). Na osnovu ovih i rezultata citotoksičnosti, kompleks **11** se može svrstati u blage ciklusno specifične agense, s obzirom na blage perturbacije ćelijskog ciklusa.

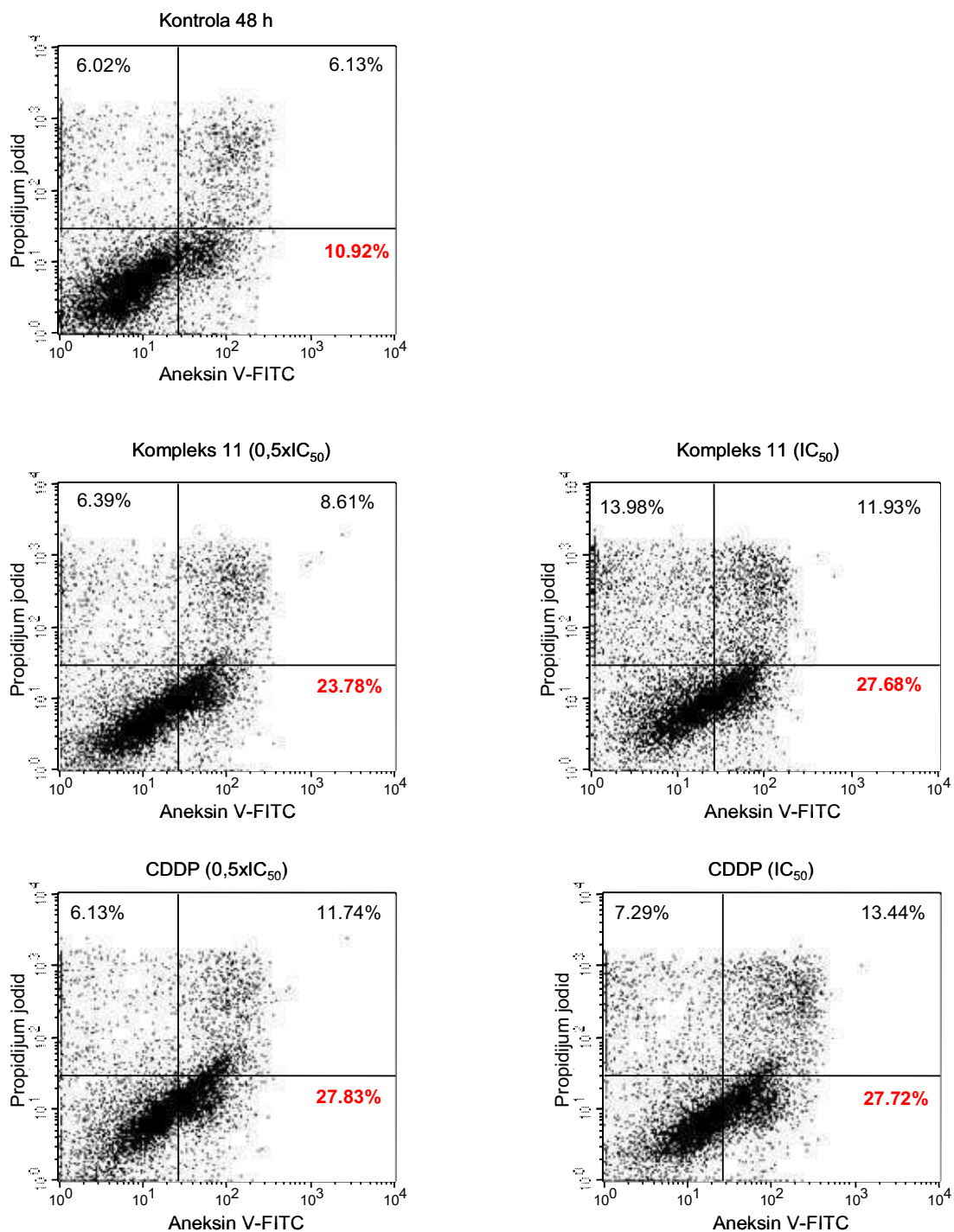
4.3. Rezultati analize apoptoze

Poznato je da je apoptoza glavni odgovor na hemioterapiju mnogih lekova, gde spada i tretman cisplatinom. Potencijal indukcije apoptoze se smatra odgovornim za uspeh terapije. Ovo je dovelo do toga da je moderan dizajn lekova zasnovan na ispitivanju sposobnosti novosintetisanih jedinjenja da indukuju apoptozu kao manje agresivan tip ćelijske smrti [144].

U ranim fazama apoptoze membranski fosfolipid fosfatidil-serin (PS) se translocira sa unutrašnje na spoljašnju stranu plazma membrane. Da bismo ovo pratili koristili smo aneksin V-FITC, Ca^{2+} -zavisani protein koji vezuje fosfolipide i ima veliki afinitet za fosfatidil-serin. FITC znači da je za njega zakačena fluorohroma fluorescein-izotiocijanata koja omogućava detekciju. Dvokolornim bojenjem sa aneksin-V-FITC-om (boji apoptotične ćelije) i propidijum jodidom (boji nekrotične ćelije) ispitivali smo da li i u kojoj meri kompleks **11** indukuje apoptozu na HeLa ćelijama u poređenju sa cisplatinom. HeLa ćelije su tretirane 48 h sa kompleksom **11** i cisplatinom (u koncentracijama $0,5 \times \text{IC}_{50}$ i IC_{50}). Vezivanje aneksina na HeLa ćelijama je analizirano na protočnom citometru.

Rezultati su prikazani na Slici 4.5 u vidu tačkastih (eng. dot plot) dijagrama. Ćelije u ranoj fazi apoptoze se boje samo sa aneksinom i vidljive su u donjem desnom kvadrantu tačkastog dijagrama, dok se žive ćelije nalaze u donjem levom kvadrantu (nisu obojene ni sa aneksin V-FITC ni sa PI). Ćelije u nekrozi ili kasnoj fazi apoptoze će vezati samo PI ili PI i aneksin V-FITC i uočavaju se u gornjim kvadrantima (gornjem levom odnosno gornjem desnom kvadrantu).

Oba agensa nakon 48 h dejstva imaju sličan potencijal indukcije apoptoze koji za koncentraciju IC_{50} za kompleks **11** iznosi 27,68 %, a za CDDP 27,72 % (Slika 4.5). Istovremeno se uočava i povećanje procenta ćelija koje su ušle u kasnu apoptozu kao i nekrozu. Nakon tretmana sa kompleksom **11** nešto je veći procenat nekrotičnih ćelija (13,98 %) u odnosu na tretman sa CDDP (7,29 %), pri koncentraciji IC_{50} agenasa. Ovo ukazuje da kompleks **11** indukuje dominantno ćelijsku smrt putem apoptoze, praćene u izvesnoj meri i nekrozom.

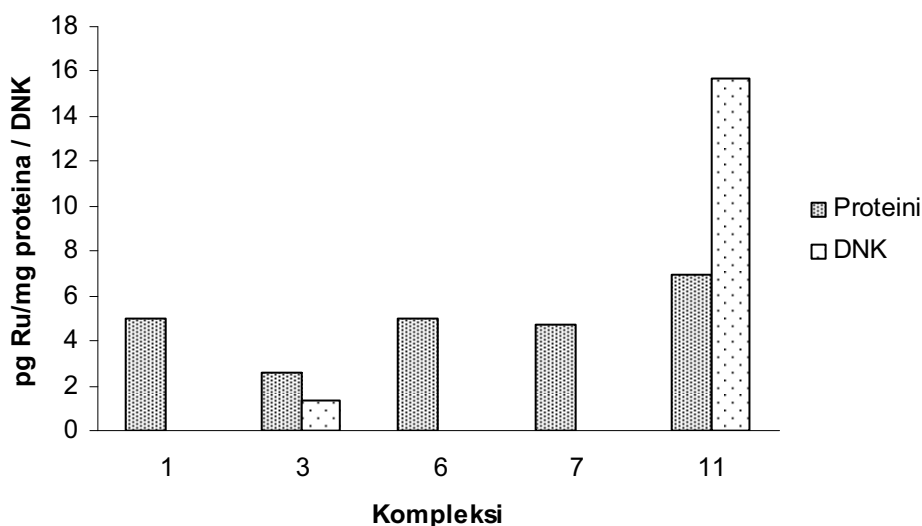


Slika 4.5. Tačkasti dijagrami procenta zastupljenosti tretiranih HeLa ćelija u apoptozi tj. nekrozi u zavisnosti od bojenja Aneksinom i PI i analize na protočnom citometru.

4.4. Intraćelijska distribucija Ru(II) u proteinskoj nasuprot DNK frakciji

Proučavajući mehanizam dejstva agenasa koji su potencijalni lekovi imperativ je locirati ključna mesta delovanja u ćeliji. Analizirali smo distribuciju rutenijuma(II) u proteinskoj i DNK frakciji HeLa ćelija tretiranih sa ispitivanim kompleksima, koristeći ICP-OES, nakon 24 h tretmana sa koncentracijom od 100 $\mu\text{mol/L}$ ispitivanih kompleksa.

Svaki ispitivani kompleks je nađen unutar ćelije, mada su pokazali različit nivo intraćelijske akumulacije i različit afinitet za vezivanje za proteine ili DNK (Slika 4.5). Kompleks **11** se u najvećoj meri akumulirao u DNK frakciji, pokazujući drastično veći afinitet za vezivanje za DNK u poređenju sa ostalim ispitivanim kompleksima, što može biti razlog za njegovo citotoksično dejstvo. Nivo rutenijuma(II) vezan za proteinsku frakciju je sličan među testiranim kompleksima. Nije uočeno prisustvo kompleksa **1**, **6** i **7** u ispitivanim DNK frakcijama ćelija tretiranih sa ovim kompleksima, što ukazuje da strukturne razlike među ligandima testiranih kompleksa značajno utiču na afinitet i stabilnost interakcija sa DNK.



Slika 4.5. Intraćelijska distribucija rutenijuma(II) nakon tretmana HeLa ćelija sa ispitivanim kompleksima 24 h pri koncentraciji od 100 $\mu\text{mol/L}$. Reprezentativni eksperiment od tri nezavisna eksperimenta.

4.5. *In vitro* antimetastatski potencijal ispitivanih kompleksa

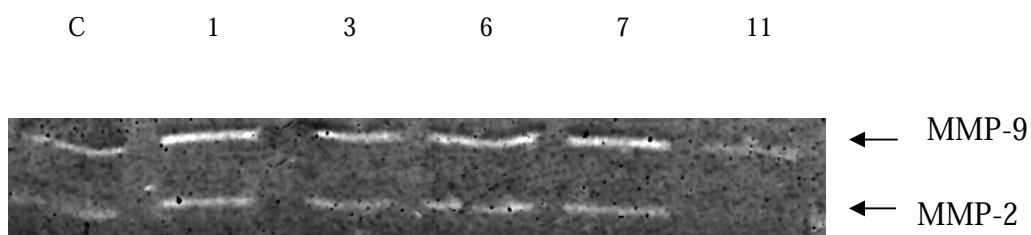
Metastaziranje tumora je jedna od glavnih prepreka u lečenju karcinoma. Predstavlja višestepeni proces koji uključuje invazivnost, adheziju, direktnu migraciju i proteolitičku aktivnost kako bi došlo do degradacije vanćelijskog matriksa [94,130]. Pokazalo se da kompleksi rutenijuma poseduju jedinstvene antimetastatske karakteristike bez obzira na njihov citotoksični potencijal [142,145]. Stoga je veliki deo naših ispitivanja bio usmeren ka ispitivanju potencijala rutenijum(II)-p-cimen kompleksa da inhibiraju neke od faza invazivnosti i angiogeneze, polazeći od analize inhibitornog efekta na aktivnost matriksnih metaloproteinaza (MMP) HeLa ćelija.

4.5.1. Želatinska zimografija

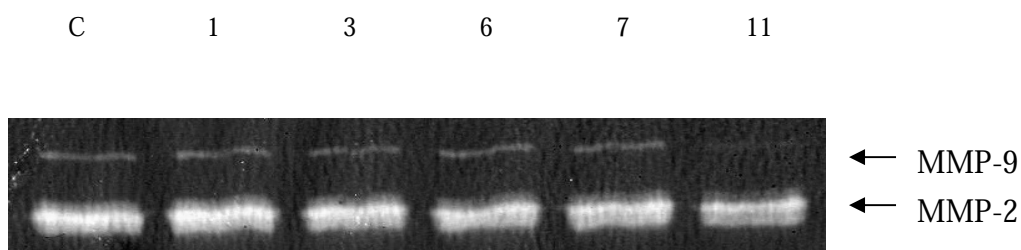
Grupa matriksnih metaloproteinaza, kojoj pripadaju MMP-9 i MMP-2 se smatraju posebno značajnim za invazivnost kancerskih ćelija [130]. Aktivnost MMP, kao što je navedeno u metodama, može se pratiti želatinskom zimografijom koja se zasniva na njihovoj sposobnosti da razlažu želatin kao substrat.

Aktivnost MMP-2 i MMP-9 nakon tretmana 24 h HeLa i EA.hy 926 ćelija sa ispitivanim kompleksima (**1**, **3**, **6** i **7** sa koncentracijom od 300 $\mu\text{mol/L}$, i **11** sa koncentracijom od 100 $\mu\text{mol/L}$) analizirana je želatinskom zimografijom. Rezultati pokazuju da jedino kompleks **11** pokazuje značajnu inhibitornu aktivnost na MMP-2 i MMP-9, kod HeLa i EA.hy 926 ćelija (Slika 4.6). Drugi kompleksi rutenijuma ne pokazuju značajnu inhibitornu aktivnost u ovom testu, čak kod HeLa ćelija povećavaju aktivnost MMP-9, što može da se tumači dvojako. Prvo to može da ukaže da rutenijum kao metal nije odgovoran za inhibitornu aktivnost, ne interaguje sa katalitičkim centrom ili interakcije, ako postoje, nisu u toj meri značajne ili jake. Drugo bazalni nivo MMP kod ove dve ćelijske linije se razlikuje, kao i proizvodnja (kod endotelijalnih ćelija sinteza MMP-9 je inducibilna, a MMP-2 je konstitutivan), što može da odredi dalji rezultat uticaja različitih kompleksa.

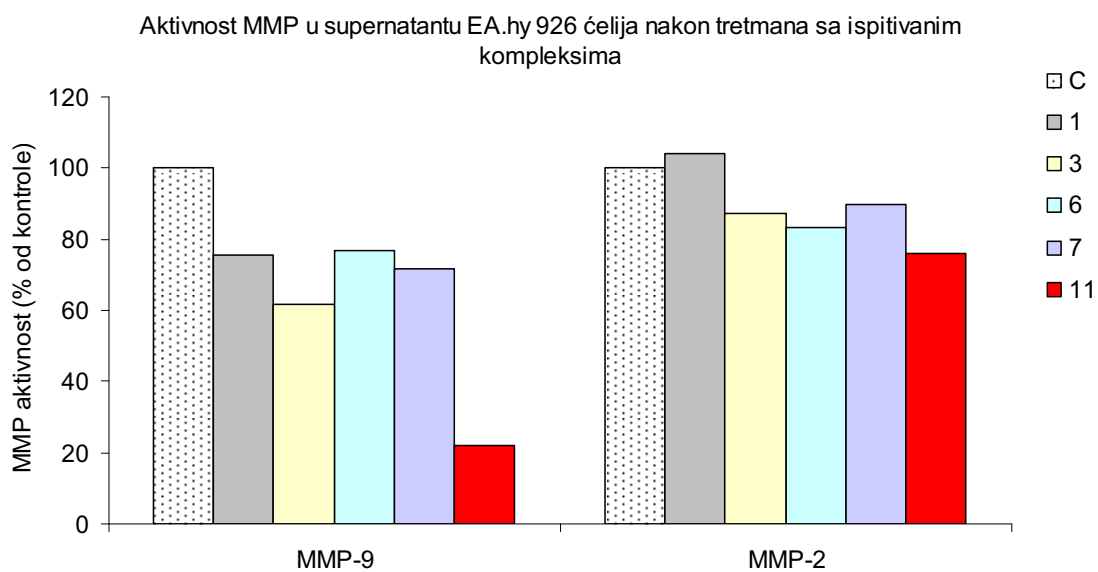
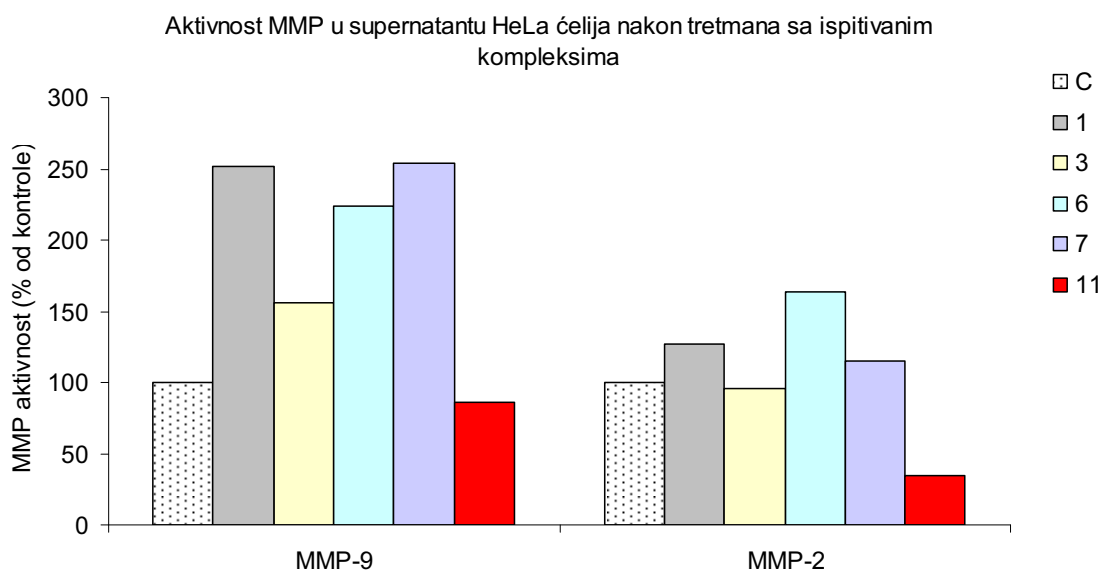
A) Supernatant HeLa ćelija



B) Supernatant EA.hy 926 ćelija



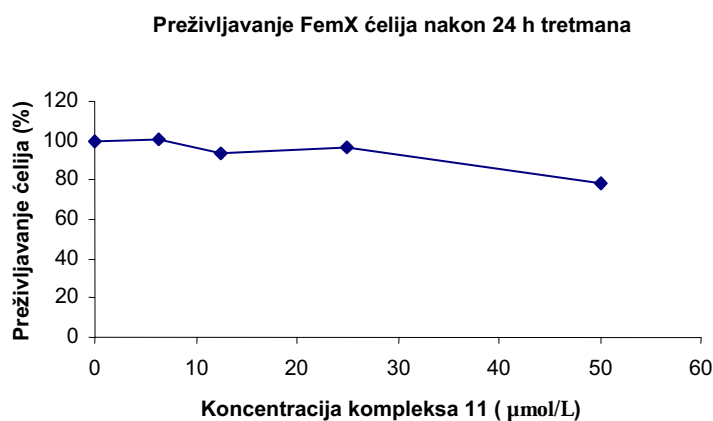
Slika 4.6. Želatinska zimografija: C-kontrolne ćelije inkubirane u medijumu 24 h; 1-ćelije tretirane sa kompleksom **1** ($[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{L}1)\text{Cl}_2]$); 3- ćelije tretirane sa kompleksom **3** ($[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{L}3)\text{Cl}_2]$); 6- ćelije tretirane sa kompleksom **6** ($[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{HL}6)\text{Cl}]$); 7- ćelije tretirane sa kompleksom **7** ($[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{HL}7)\text{Cl}]$); 11- ćelije tretirane sa kompleksom **11** ($[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{RuCl}(\text{L}11)]$).



Slika 4.7. Rezultati denzitometrijske analize, tj. kvantitativne analize proteolitičke aktivnosti MMP-9 i MMP-2 koristeći Image J softver. (Trake na gelu su skenirane denzitometrijski i površine ispod pika aproksimativno predstavljaju aktivnost želatinaza).

Ćelije humanog melanoma (FemX) su se pokazale kao najsenzitivnije na dejstvo kompleksa **11**, sa IC_{50} vrednostima 36.23 ± 4.59 i 53.51 ± 5.40 ($\mu\text{mol/L}$) za 48 odnosno 72 h tretmana (Tabela 4.1). S obzirom na značajan nivo uticaja kompleksa **11** na aktivnost MMP-2, naročito kod ove ćelijske linije, dalje je ispitano da li je efekat kompleksa **11** posledica uticaja na nivo ekspresije MMP-2 na mRNK nivou ili je smanjenje aktivnost posledica interakcije sa samim enzimom.

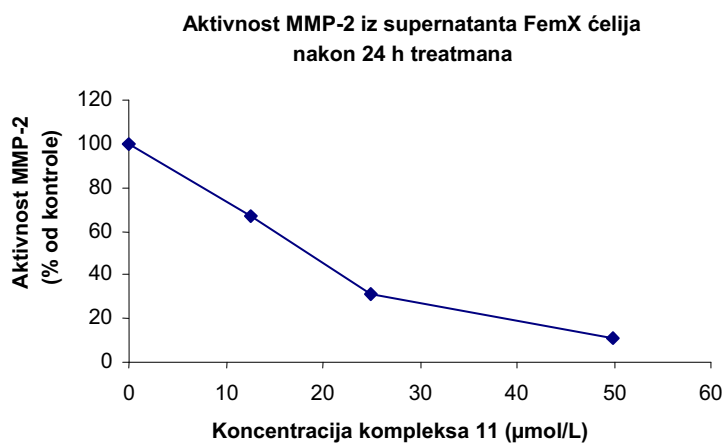
U eksperimentu su korišćene koncentracije kompleksa **11** koje su za 24 h tretmana subcitotoksične što je prikazano na Slici 4.8.



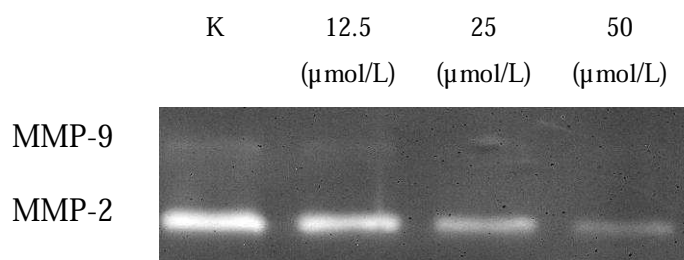
Slika 4.8. Kriva preživljavanja FemX ćelija u funkciji koncentracije kompleksa **11** nakon 24 h tretmana, određena MTT testom.

Pokazalo se da kompleks **11** značajno smanjuje enzimsku aktivnost MMP- 2 nakon 24 h tretmana u opsegu subcitotoksičnih koncentracija (Slika 4.9), dok se nivo mRNK za MMP-2 pri istom tretmanu povećava (Slika 4.10). Ovo može da ukaže da je aktivnost MMP-2 pod uticajem kompleksa **11** regulisana na nivou enzima.

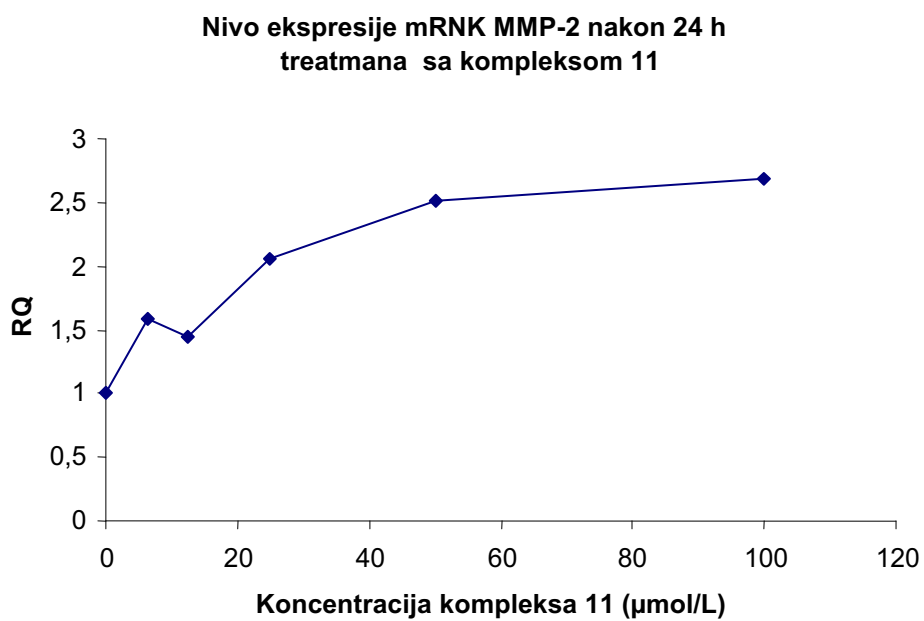
A



B



Slika 4.9. Aktivnost MMP-2 iz supernatanta FemX ćelija tretiranih sa kompleksom **11** prikazana kao A) arbitrarne jedinice-aktivnosti MMP-2 (% od kontrole) dobijene denzitometrijskom analizom gela i korišćenjem Image J softvera, B) prikaz gela.



Slika 4.10. *Nivo ekspresije MMP-2 na mRNK nivou nakon 24 h tretmana kompleksom 11 određen korišćenjem kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu.*

4.5.2. Rezultati uticaj ispitivanih kompleksa na invazivnost tumorskih ćelija

Potencijal ispitivanih kompleksa da *in vitro* inhibiraju invazivnost HeLa ćelija je analiziran korišćenjem sistema komore “BD BioCoat Matrigel invasion chambers”, kao sistema sa rekonstituisanim matriksom bazalne membrane-Matrigelom kao invazivnim substratom na površini mikroporozne membrane (prema prethodno opisanoj metodi 3.7.2.) [132].

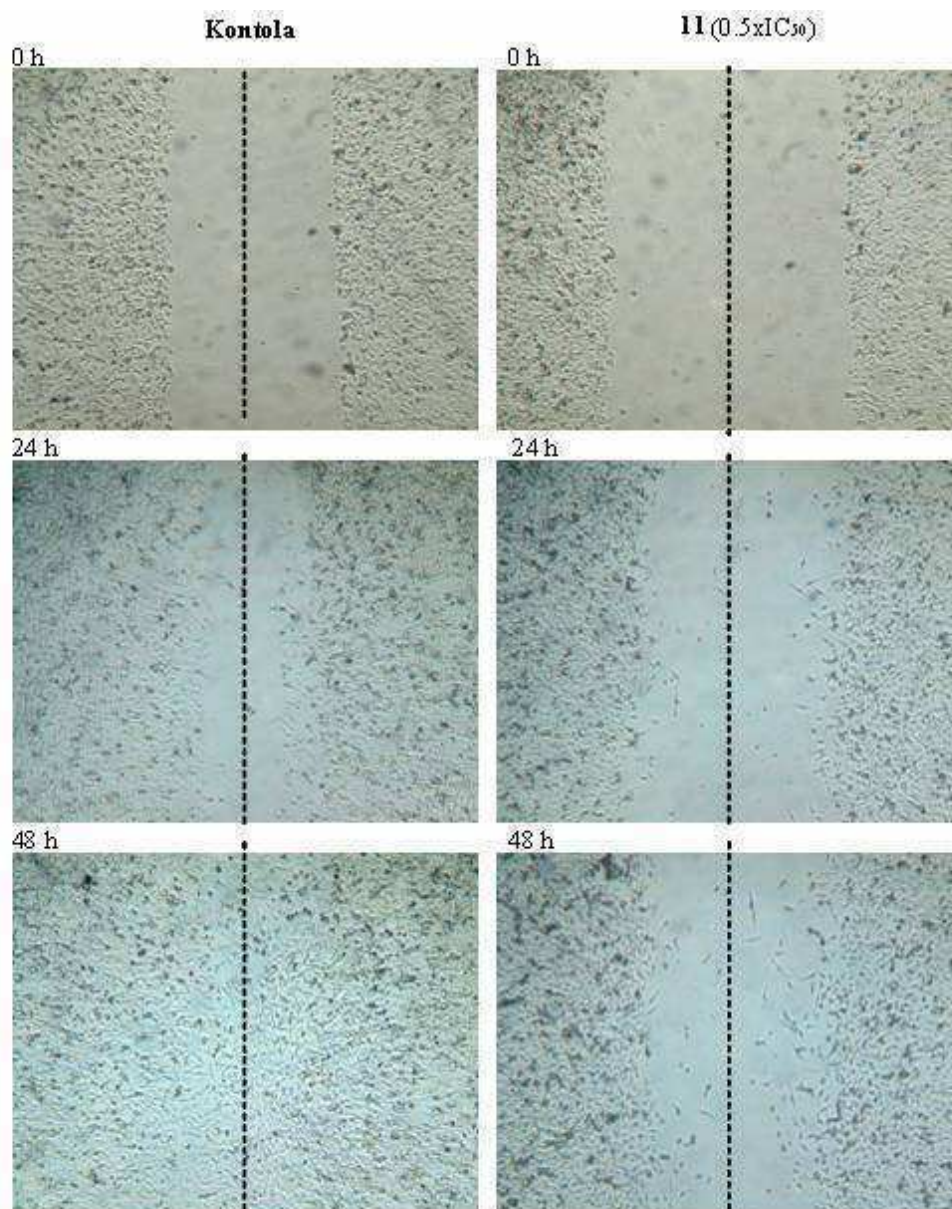
Svi ispitivani kompleksi rutenijuma su pokazali da inhibišu invazivnosti HeLa ćelija (Slika 4.11). Među netoksičnim kompleksima rutenijuma, primenjenim u ekvimolarnim koncentracijama (100 $\mu\text{mol/L}$), kompleks **3** je pokazao najveći inhibicioni potencijal na invazivnost, 33.3 % u odnosu na kontrolu. Citotoksični kompleks **11** je pokazao inhibicioni efekat na invazivnost HeLa ćelija do 20 %, mada je on primenjen u nižoj koncentraciji koja je iznosila 41 $\mu\text{mol/L}$ (što je koncentracija koja odgovara $0.5 \times \text{IC}_{50}$).



Slika 4.11. *Efekt ispitivanih kompleksa na invazivnost HeLa ćelija, određen korišćenjem komora presvučenih Matrigelom. Rezultati su predstavljani kao procenat u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije) i predstavlja reprezentativni eksperiment.*

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

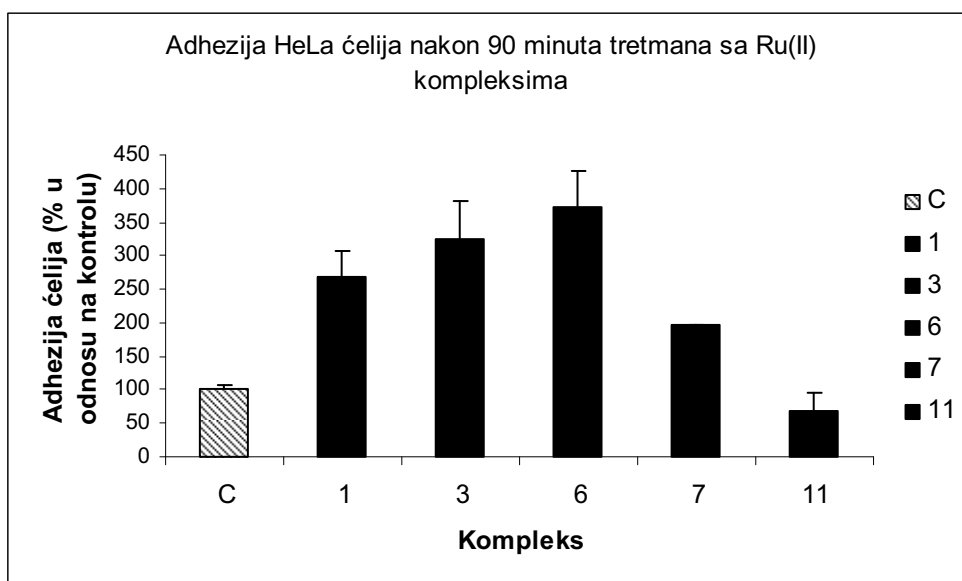
“Wound migration assay (Scratch assay)” tzv. “test zarastanja rane” je korišćen kao *in vitro* test za merenje uticaja ispitivanih kompleksa na direktnu migraciju HeLa ćelija [133]. U ovom testu na konfluentnoj kulturi HeLa ćelija napravljen je prorez, a zatim su ćelije inkubirane u medijumu. Migracija ćelija je posmatrana periodično pod mikroskopom i napravljene su reprezentativne fotografije nakon 24 h i 48 h. Komplex **11** je inhibirao migraciju HeLa ćelija, što je bilo naročito uočljivo nakon 48 h inkubacije (Slika 4.12.).



Slika 4.12. *Reprezentativne fotomikrografije efekta kompleksa 11 u poređenju sa kontrolom na migraciju HeLa ćelija.*

4.5.4. Rezultati uticaja ispitivanih kompleksa na adheziju tumorskih ćelija

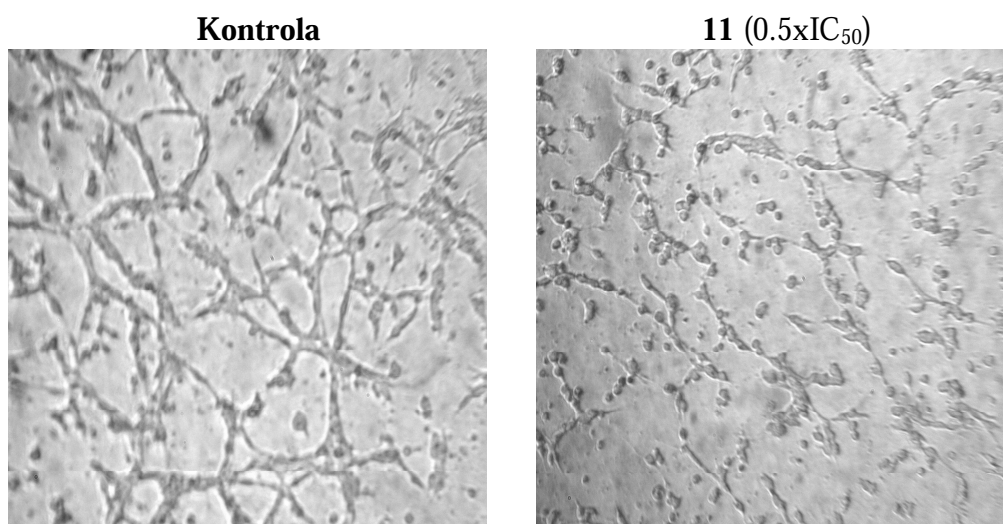
Pro-adhezivne karakteristike ispitivanih kompleksa na adheziju HeLa ćelija za plastičnu površinu kao substrat (neprekriveno dno plastične ploče) analizirane su kao rezistencija na tretman tripsinom, koji je dobra mera adhezije [134]. Utvrdili smo da nakon 90 minuta tretmana sa koncentracijom 100 $\mu\text{mol/L}$, kompleksi **3** i **6** doprinose tri puta više adheziji HeLa ćelija, za plastičnu površinu, u poređenju sa netretiranim ćelijama (Slika 4.13). Povećana adhezija pod uticajem tretmana može da doprinese smanjenoj migraciji ćelija i smanjenju invazivnog i metastatskog potencijala, kao što se i pokazalo u testu invazivnosti gde je verovatno povećana adhezija ćelija pod uticajem tretmana dovela do smanjene migracije i invazivnosti HeLa ćelija (Slika 4.11).



Slika 4.13. Efekt ispitivanih kompleksa na adheziju HeLa ćelija za plastičnu površinu (pri dozi od 100 $\mu\text{mol/L}$, 90 min) određeno SRB testom. Prikazan je rezultat reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta sa standardnim devijacijama, u poređenju sa netretiranom kontrolom.

4.5.5. Uticaja kompleksa Ru(II) na angiogenezu *in vitro* (“Tube formation assay”)

Kao što je već navedeno, angiogeneza uključuje proliferaciju endotelijalnih ćelija, migraciju i formiranje struktura nalik tubulama. Uticaj ispitivanih kompleksa na angiogenezu *in vitro* je analiziran koristeći “Tube formation assay” kod mišjih endotelijalnih ćelija MS1. U navedenom eksperimentu, MS1 endotelijalne ćelije su tretirane subcitotoksičnom koncentracijom ispitivanih kompleksa kako bi odredili njihov potencijal da smanjuju sposobnost ovih ćelija da se izdužuju i diferenciraju u strukture nalik tubulama. Ispitivani kompleksi **1**, **7** i **11** inhibiraju angiogenetsko ponašanje endotelijalnih ćelija. Kompleks **11** je pokazao značajan inhibicioni potencijal pa su na Slici 4.14. prikazani rezultati samo tretmana ovim kompleksom.



Slika 4.14. “Tube formation assay” (test angiogeneze *in vitro*). Reprezentativne mikrografije MS1 ćelija u kontroli (netretirane) i tretirane 24 h sa kompleksom **11** ($0,5 \times IC_{50}$).

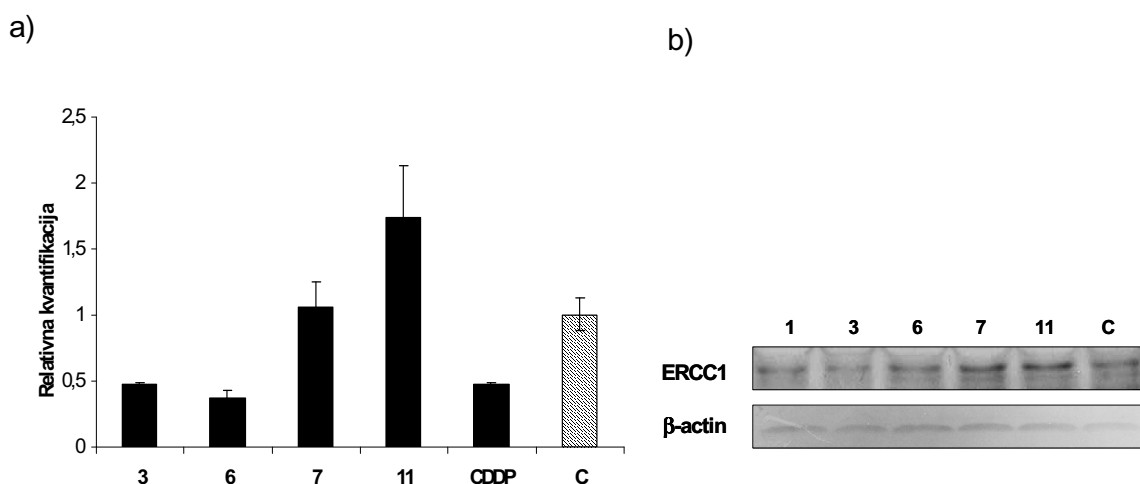
4.6. Rezultati analize uticaja ispitivanih kompleksa na nivo ekspresije enzima koji učestvuju u reparaciji DNK

Veoma značajna karakteristika kompleksa rutenijuma(II) je njihova interakcija sa DNK, bez obzira da li je DNK primarna ili sporedna meta delovanja ovih kompleksa, kao i biološki efekat do kojeg ona dovodi [6,146,147]. Kako bismo utvrdili da li ispitivani kompleksi indukuju odgovor ćelije zavisen od DNK reparacije kao rezultat nastalih DNK lezija, ispitivali smo mRNA i proteinski nivo ekspresije ERCC1 i MSH-2, koji mogu kooperativno učestvovati u odgovoru ćelije na agense koji se vezuju za DNK [148]. ERCC1 je najvažnija komponenta NER-a koji se primarno uključuje u reparaciju velikih DNK adukata. Poznato je da njegovo dejstvo prevazilazi NER i može da ima ulogu i u odgovoru ćelije i na druge tipove DNK lezija [148].

4.6.1. Efekat ispitivanih kompleksa na ekspresiju ERCC1

Rezultati dobijeni nakon kontinualnog tretmana 24 h sa ispitivanim kompleksima pokazuju da kompleks **11** značajno povećava nivo ekspresije ERCC1 na mRNA nivou (Slika 4.15.a). Drugi ispitivani kompleksi ne pokazuju efekt ili pokazuju negativan efekat na nivo ekspresije ERCC1 na mRNA nivou, u poređenju sa kontrolnim netretiranim ćelijama, što je utvrđeno korišćenjem kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu (RQ-PCR). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Western blota (Slika 4.15.b), koji su pokazali povećan nivo ekspresije ERCC1 proteina indukovani tretmanom sa kompleksom **11**, u poređenju sa kontrolom.

ERCC1 je ispitivan kao potencijalni marker rezistencije na cisplatinu i nivo mRNA ekspresije ERCC1 korelira sa senzitivnošću na cisplatinu do izvesnog nivoa [146]. Stoga je cisplatina korišćena kao referentno jedinjenje u ovom istraživanju. Nakon tretmana od 24 h HeLa ćelija, ekspresija ERCC1 na nivou mRNA je smanjena, što je suprotno efektu kompleksa rutenijuma **11**. Dodatna ispitivanja su neophodna kako bi se utvrdila uloga povećane ekspresije ERCC1 mRNA kao odgovora na dejstvo kompleksa **11**.



Slika 4.15. Nivo ekspresije *ERCC1* na a) mRNK nivou određen korišćenjem kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu; b) proteinskom nivou određen korišćenjem Western blota, kod HeLa ćelija nakon 24 h tretmana sa ispitivanim kompleksima **1, 3, 6, 7, 11** ($100\ \mu\text{mol/L}$) i CDDP ($7\ \mu\text{mol/L}$).

4.6.2. Efekat ispitivanih kompleksa na ekspresiju MSH2 na proteinskom nivou

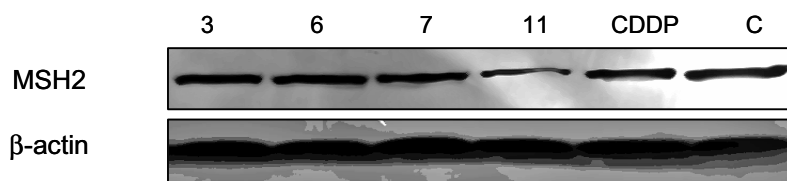
MSH2 protein je komponenta sistema reparacije pogrešno sparenih baza (MMR) koja ima centralnu ulogu u ispravljanju pogrešno sparenih baza koje se javljaju tokom udvajanja DNK i uključen je i u indukciji apoptoze izazvane mnogim citotoksičnim antikancerskim agensima [149].

Ranija ispitivanja mehanizma prepoznavanja pogrešno sparenih baza i drugih distorzija DNK od strane MutS protein (MMR protein *Escherichia coli*) indukovanih cisplatinom ili UV zračenjem su pokazala da je interakcija MutS sa “mismatched” DNK zasnovana na modelu indukovanog fitovanja (“induced fit” mode) u kojem prednost imaju destabilizovani substrati [150]. Afinitet MutS zavisi od tipa proizvoda nastalog pogrešnim sparivanjem baza i konteksta sekvence [151-154]. Ispitivanje Prof. V. Brabeca i saradnika [155], u kome je određivan afinitet MutS proteina za DNK oštećenu od strane monofunkcionalnih Ru(II)-arenskih kompleksa sa tricikličnim ili monocikličnim arenskim prstenom, je pokazalo da prisustvo rutenijum(II)-arenskog adukta smanjuje afinitet MutS za DNK dupleks za koji je vezan rutenijum i da

moгуćnost interkalacije (koju poseduje triciklični prsten) doprinosi značajno ovom inhibitornom efektu.

Na osnovu činjenica da MSH komponente utiču na senzitivnost na agense koji oštećuju DNK, ispitivali smo potencijalno učešće MSH2 u odgovoru ćelije na dejstvo Ru(II)-p-cimenskih kompleksa, naročito kompleksa **11** koji je pokazao značajan afinitet vezivanja za DNK. Analizirali smo nivo ekspresije MSH2 na proteinskom nivou kod HeLa ćelija nakon 24 h tretmana sa ispitivanim agensima, u poređenu sa cisplatinom i netretiranom kontrolom. Dobijeni podaci ukazuju da se nivo proteina MSH2 smanjuje nakon tretmana kompleksom **11**, dok ostali kompleksi, uključujući cisplatinu kao referentno jedinjenje, nisu imali efekta (Slika 4.16.). S obzirom da kompleks **3**, koji je zastupljen u maloj meri u DNK frakciji tretiranih ćelija, a kompleksi **6** i **7** nisu detektovani u DNK frakciji tretiranih HeLa ćelija, za očekivati je da nemaju uticaja na MSH2 protein. Navedeni rezultati ukazuju da se lezije indukovane kompleksom **11** uklanjaju mehanizmima koji ne podrazumevaju MMR, što je u skladu sa rezultatima Prof. V. Brabeca kada su u pitanju monociklični Ru(II) arenki kompleksi koji indukuju fleksibilne distorzije DNK.

Moramo primetiti da smanjen nivo MSH2 može biti i posledica direktne interakcije agensa sa MSH2 proteinom ili MSH2/DNK kompleksom, a ne samo posledica lezija na DNK koje je indukovao agens.



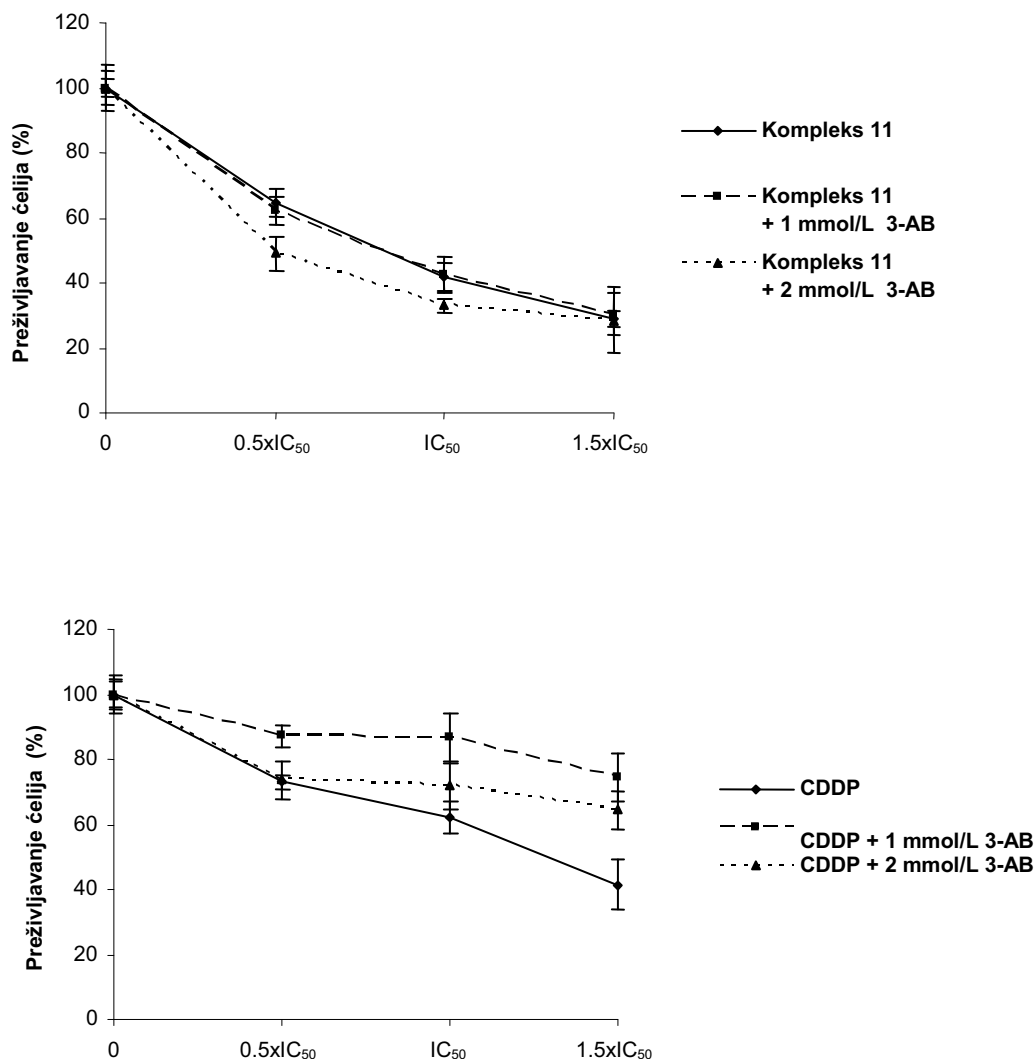
Slika 4.16. Nivo ekspresije MSH2 proteina (~102 kDa) kod HeLa ćelija nakon 24 h tretmana sa ispitivanim kompleksima **3**, **6**, **7**, **11** (100 μmol/L) i CDDP (7 μmol/L) određen korišćenjem Western blota.

4.7.1. Rezultati ispitivanja kombinovanog efekta pikolinato rutenijum(II)-p-cimenskog kompleksa i inhibitora PARP-a (3-AB)

Kao što je već istaknuto u uvodu, PARP je familija enzima koji čine ključnu komponentu trenutnog ćelijskog odgovora na oštećenje DNK, stoga se očekuje da inhibicija PARP-a poveća hemosenzitivnost na agense koji oštećuju DNK.

Pretpostavljajući da se kompleks rutenijuma sa pikolinskom kiselinom kao ligandom vezuje za DNK indukujući lezije, ispitali smo da li kombinovanim tretmanom kompleksa **11** i inhibitora PARP-a 3-aminobenzamida (3-AB) na HeLa i MDA-MB-361 ćelijama, inhibitor interferira sa citotoksičnošću kompleksa **11**.

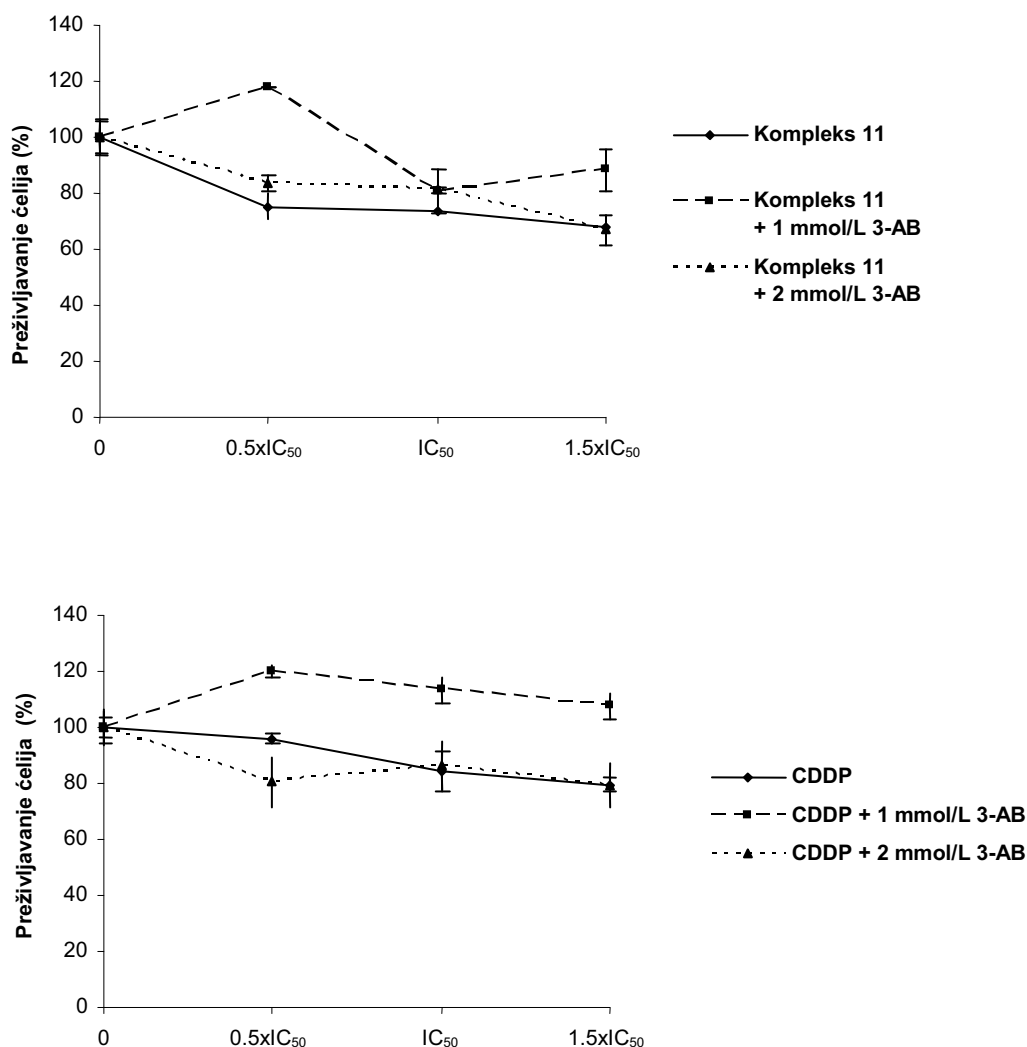
Kombinovani tretman HeLa ćelija sa kompleksom **11** u kombinaciji sa 3-AB-om istovremeno tokom 48 h, u poređenju sa cisplatinom u kombinaciji sa 3-AB-om, pokazao je da 3-AB pojačava aktivnost kompleksa rutenijuma sa povećanjem koncentracije 3-AB, kada su u pitanju niže koncentracije kompleksa **11** (Slika 4.17). To može da ukaže na potencijal kompleksa **11** da indukuje prekide na jednom lancu DNK, kao posledicu direktnog vezivanja za DNK ili kao posledicu indirektnog citotoksičnog efekta. Međutim, 3-AB je smanjivao citotoksičnost cisplatine na HeLa ćelijama. Iz literature je poznato da su inhibitori PARP-a sposobni da senzitivizuju neke, ali ne i sve, ćelijske linije na dejstvo cisplatine [87]. Uticaj cisplatine na aktivnost PARP-a nije do kraja razjašnjen i tema je brojnih kontroverzi.



Slika 4.17. Krive preživljavanja HeLa ćelija nakon 48 h istovremenog tretmana kompleksa **11** (pri koncentracijama koje odgovaraju $0.5 \times IC_{50}$, IC_{50} i $1.5 \times IC_{50}$) i 3-AB (pri koncentracijama od 1 mmol/L i 2 mmol/L), određene SRB testom. Prikazan je reprezentativni eksperiment od tri nezavisna eksperimenta sa standardnim devijacijama.

Nasuprot rezultatu dobijenom na HeLa ćelijama, kombinovani tretman MDA-MB-361 ćelija sa kompleksom **11** u kombinaciji sa 3-AB-om istovremeno tokom 48 h, u poređenju sa cisplatinom u kombinaciji sa 3-AB-om, pokazao je da 3-AB ne pojačava citotoksičnost nijednog ispitivanog agensa. Poznato je da PARP-a može biti različito

ekspimiran kod različitih ćelijskih linija, što doprinosi različitom uticaju inhibitora PARP-a na citotoksičnost pojedinih agenasa.



Slika 4.18. Krive preživljavanja MDA-MB-361 ćelija nakon 48 h istovremenog tretmana kompleksa **11** (pri koncentracijama koje odgovaraju $0.5 \times IC_{50}$, IC_{50} i $1.5 \times IC_{50}$) i 3-AB (pri koncentracijama od 1 mmol/L i 2 mmol/L), određene SRB testom. Prikazan je reprezentativni eksperiment od tri nezavisna eksperimenta sa standardnim devijacijama.

4.7.2. Rezultati ispitivanja kombinovanog efekta pikolinato rutenijum(II)-p-cimenskog kompleksa i antikancerskih lekova (cisplatine i paklitaksela)

Kombinovana terapija predstavlja jedan od najuspešnijih načina lečenja kancera, i cisplatina se primenjuje zajedno sa drugim lekovima kako bi se povećali antitumorski efekti [156]. *In vitro* kombinaciona ispitivanja pokazala su najčešće sinergizam NAMI-A i RAPTA-T u kombinaciji sa cisplatinom [156], kao i sa drugim klasičnim antikancerskim lekovima, kao što su taksani, adriamicin *in vitro* i *in vivo* [41].

Paklitaksel se, zajedno sa cisplatinom, pokazao kao izuzetno važan agens u hemoterapiji kancera. Pokazalo se da ima značajnu antitumorsku aktivnost prema različitim solidnim tumorima [157].

Paklitaksel je hemoterapeutski agens koji sprečava depolimerizaciju mikrotubula, zaustavljajući proliferaciju ćelija u G2-M fazi ćelijskog ciklusa što dovodi do smrti ćelija [157]. Dodatno menja brojne intraćelijske procese koji dovode do apoptoze i razlaganja nukleusa. Glavni nedostatak terapije paklitakselom je širok opseg reakcija preosetljivosti, kao i izražena neurotoksičnost i mijelosupresija. Stoga je veliki broj istraživanja usmeren na kombinovanu terapiju sa paklitakselom sa krajnjim ciljem povećanja terapijske efikasnosti pri nižim koncentracijama paklitaksela, kako bi se smanjila toksičnost.

Za nas je bilo interesantno da ispitamo uticaj kombinovanog tretmana kompleksa **11** sa cisplatinom i paklitakselom. Ispitivani kompleks rutenijuma **11** primenjen je u koncentracijama koje odgovaraju $0,5 \times IC_{50}$ i $1,5 \times IC_{50}$, dok su cisplatina i paklitaksel primenjeni u tri koncentracije koje odgovaraju $0,5 \times IC_{50}$, IC_{50} i $1,5 \times IC_{50}$. Ispitivani agensi su primenjeni istovremeno.

Kombinovani tretman HeLa ćelija sa kompleksom **11** i klinički relevantnim lekovima cisplatinom i paklitakselom, sa svakim pojedinačno, pokazao je da kompleks **11** ima približno aditivan efekat ($CI \approx 1$) sa najnižom koncentracijom paklitaksela ($0,5 \times IC_{50}$), dok sa višim koncentracijama paklitaksela i svim koncentracijama cisplatine pokazuje antagonizam ($CI > 1$) (Tabele 4.3-4.6.). Rezultati su dobijeni koristeći CalcuSyn program [140] i prikazani su u vidu procenta preživljavanja ćelija (Fu) u odnosu na kontrolu pod dejstvom paklitaksela i/ili **11** (Tabela 4.3) i cisplatine i/ili **11** (Tabela 4.5.). Rezultati su izraženi i preko kombinacionog indeksa CI (Tabela 4.4. i 4.6.), pri čemu su rezultati izračunati uzimajući u obzir obe petpostavke da ispitivani

agensi imaju sličan mehanizam dejstva i/ili rezistencije (“mutually exclusive”) tj. različit mehanizam dejstva i/ili rezistencije (“mutually non-exclusive”)².

² Kada se sa sigurnošću ne zna da li ispitivani agensi imaju sličan ili različit mehanizam dejstva, CI se rutinski računa na oba načina.

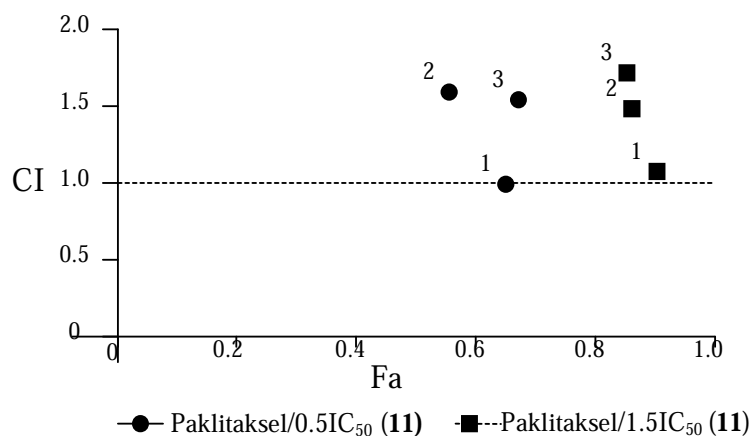
Tabela 4.3. Efekt paklitaksela i/ili kompleksa **11** na preživljavanje ćelija.

Rezultati su izraženi kao % od kontrole (srednja vrednost \pm s.d.)

Paklitaksel (nmol/L)	11 ($\mu\text{mol/L}$)		
	0	0.5x IC₅₀	1.5x IC₅₀
0	100	57.37 \pm 10.00	13.65 \pm 1.91
0.5xIC₅₀	87.9 \pm 8.34	34.9 \pm 2.59	9.76 \pm 3.88
IC₅₀	44.3 \pm 2.96	44.47 \pm 7.66	13.77 \pm 2.66
1.5x IC₅₀	47.03 \pm 9.06	32.77 \pm 4.06	14.67 \pm 1.03

Tabela 4.4. Vrednosti kombinacionog indeksa (CI) za paklitaksel i kompleks **11**

Paklitaksel (nmol/L)	11 ($\mu\text{mol/L}$)	
	0.5x IC₅₀	1.5x IC₅₀
0.5xIC₅₀	0.999 (približno aditivan)	1.082 (približno aditivan)
IC₅₀	1.593 (antagonizam)	1.487 (antagonizam)
1.5x IC₅₀	1.548 (antagonizam)	1.721 (antagonizam)



Slika 4.19. Grafički prikaz kombinacionog indeksa (CI), za simultano dejstvo 48 h kompleksa **11** sa paklitakselom, na HeLa ćelijama (CI<1 sinergizam, CI=1 adicija, CI>1 antagonizam).

CI za eksperimentalne vrednosti

Paklitaksel ($\mu\text{mol/L}$)	11 ($\mu\text{mol/L}$)	Fa	CI
0.0039	41	0.651	0.999
0.0078	41	0.5553	1.593
0.01172	41	0.6723	1.548

“Mutually non-exclusive” CI za eksperimentalne vrednosti (za agense sa različitim mehanizmom dejstva i/ili rezistencije)

Paklitaksel ($\mu\text{mol/L}$)	11 ($\mu\text{mol/L}$)	Fa	CI
0.0039	41	0.651	1.213
0.0078	41	0.5553	2.226
0.01172	41	0.6723	2.1

CI za eksperimentalne vrednosti

Paklitaksel ($\mu\text{mol/L}$)	11 ($\mu\text{mol/L}$)	Fa	CI
0.0039	123	0.9033	1.082
0.0078	123	0.8623	1.487
0.01172	123	0.8533	1.721

“Mutually non-exclusive” CI za eksperimentalne vrednosti (za agense sa različitim mehanizmom dejstva i/ili rezistencije)

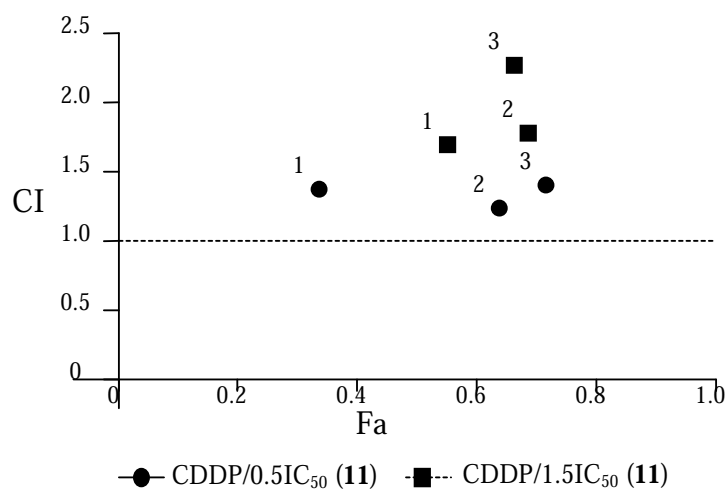
Paklitaksel ($\mu\text{mol/L}$)	11 ($\mu\text{mol/L}$)	Fa	CI
0.0039	123	0.9033	1.215
0.0078	123	0.8623	1.880
0.01172	123	0.8533	2.356

Tabela 4.5. Efekt CDDP i/ili kompleksa **11** na preživljavanje ćelija

CDDP ($\mu\text{mol/L}$)	11 ($\mu\text{mol/L}$)		
	0	0.5x IC ₅₀	1.5x IC ₅₀
0	100	97.87 \pm 9.33	38.30 \pm 6.62
0.5xIC ₅₀	66.06 \pm 7.67	66.38 \pm 3.32	44.89 \pm 1.69
IC ₅₀	52.55 \pm 5.27	36.28 \pm 10.98	31.38 \pm 2.86
1.5x IC ₅₀	20.64 \pm 5.42	28.37 \pm 4.22	33.62 \pm 6.32

Tabela 4.6. Vrednosti kombinacionog indeksa (CI) za cisplatinu i kompleks **11**

CDDP ($\mu\text{mol/L}$)	11 ($\mu\text{mol/L}$)	
	0.5x IC ₅₀	1.5x IC ₅₀
0.5xIC ₅₀	1.373 (antagonizam)	1.691 (antagonizam)
IC ₅₀	1.235 (antagonizam)	1.777 (antagonizam)
1.5x IC ₅₀	1.401 (antagonizam)	2.263 (antagonizam)



Slika 4.20. Grafički prikaz kombinacionog indeksa (CI), za simultano dejstvo 48 h, kompleksa **11** sa cisplatinom, na HeLa ćelijama (CI<1 sinergizam, CI=1 adicija, CI>1 antagonizam).

CI za eksperimentalne vrednosti

CDDP ($\mu\text{mol/L}$)	11 ($\mu\text{mol/L}$)	Fa	CI
3.5	41	0.3362	1.373
7	41	0.6372	1.235
10.5	41	0.7163	1.401

“Mutually non-exclusive” CI za eksperimentalne vrednosti (za agense sa različitim mehanizmom dejstva i/ili rezistencije)

CDDP ($\mu\text{mol/L}$)	11 ($\mu\text{mol/L}$)	Fa	CI
3.5	41	0.3362	1.800
7	41	0.6372	1.545
10.5	41	0.7163	1.747

CI za eksperimentalne vrednosti

CDDP ($\mu\text{mol/L}$)	11 ($\mu\text{mol/L}$)	Fa	CI
3.5	123	0.5511	1.691
7	123	0.6862	1.777
10.5	123	0.6638	2.263

“Mutually non-exclusive” CI za eksperimentalne vrednosti (za agense sa različitim mehanizmom dejstva i/ili rezistencije)

CDDP ($\mu\text{mol/L}$)	11 ($\mu\text{mol/L}$)	Fa	CI
3.5	123	0.5511	2.314
7	123	0.6862	2.555
10.5	123	0.6638	3.532

5. DISKUSIJA

Cilj ovog rada je bio da se ispita antiproliferativna i antimetastatska aktivnost, u *in vitro* uslovima, serije Ru(II)-arenskih kompleksa koji sadrže p-cimen kao arenski ligand i piridinske derivate koordinovane za rutenijum monodentatno preko atoma azota piridina kod kompleksa **1-5**, ili azota i kiseonika-bidentatno u slučaju kompleksa **6-9** i **11**.

Antiproliferativna aktivnost serije Ru(II)-arenskih kompleksa je ispitan na šest tumorskih ćelijskih linija (HeLa, MDA-MB-361, MDA-MB-453, FemX, B16, LS-174), na dve transformisane endotelijalne linije (EA.hy 926, MS1) i na jednoj normalnoj zdravoj humanoj liniji (MRC-5). Ispitivani kompleksi **1-9** nisu pokazali značajnu citotoksičnu aktivnost do koncentracije od 200 $\mu\text{mol/L}$. Izuzetak od ove serije je pikolinato-Ru(II)-cimenski kompleks (**11**) koji je pokazao citotoksičnu aktivnost na svim ispitivanim ćelijskim linijama nakon 48 i 72 h tretmana, sa IC_{50} vrednostim u opsegu 36-250 $\mu\text{mol/L}$. Uočena je nešto veća senzitivnost ćelija melanoma (naročito humanog) na kompleks **11** (FemX $\text{IC}_{50}^{48\text{h}} = 36.23 \pm 4.59 \mu\text{mol/L}$ i FemX $\text{IC}_{50}^{72\text{h}} = 53.51 \pm 5.40 \mu\text{mol/L}$), kao i rezistentnost ćelija karcinoma kolona (LS-174 $\text{IC}_{50}^{72\text{h}} = 245.75 \pm 5.27 \mu\text{mol/L}$). Produživanje vremena inkubacije nije pospešilo antiproliferativnu aktivnost.

Treba naglasiti da je u okviru proučavanja inhibitorne aktivnosti nekih aromatičnih masnih kiselina na tumorskim ćelijskim linijama ovarijuma uočeno da pikolinska kiselina ima inhibitorni efekat na rast 2774, CAOV3 i A2780 tumorskih ćelija ovarijuma [158]. Međutim, IC_{50} vrednosti za pikolinsku kiselinu su bile u opsegu 1,4 - 2,5 mmol/L, što je mnogo više od opsega aktivnosti kompleksa **11** u našim ispitivanjima.

U radu smo između ostalih ispitivali i komplekse i nikotinske (**5**) i izonikotinske (**4**) kiseline koje su strukturni izomeri pikolinske kiseline. S obzirom, da se one monodentatno koordinuju za razliku od bidentatno koordinovanog anjona pikolinske kiseline, odsustvo antiproliferativne aktivnosti njihovih kompleksa je bilo očekivano.

Za dalja ispitivanja aktivnosti radi poređenja povezanosti strukture i aktivnosti odabrana su dva kompleksa sa monodentatno vezanim 3-acetipiridinom (**1**) i 2-amino-5-hloropiridinom (**3**) i dva kompleksa sa bidentano vezanom 2,3-piridindikarboksilnom kiselinom (**6**) i 2,4-piridindikarboksilnom kiselinom (**7**), koji nisu imali značajnu citotoksičnu aktivnost i kompleks **11**, kao kompleks sa značajnom aktivnošću.

Odabrane komplekse je bilo veoma važno ispitati u pogledu neželjenih toksičnih efekata, što bi moglo da ograniči njihov dalji značaj kao potencijalnih terapijskih agenasa. Pratili smo efekat tretmana jedinog agensa koji je pokazao značajan nivo antiproliferativnog dejstva, kompleksa **11**, i četiri odabrana neaktivna kompleksa na zdrave ćelije-humane fetalne fibroblaste pluća (MRC-5). Pokazalo sa da je nivo toksičnosti kompleksa **11** značajno niži na normalnoj liniji (MRC-5 $IC_{50}^{72h} = 264.02 \pm 17.53 \mu\text{mol/L}$) u odnosu na aktivnost na tumorskim linijama, kao i u odnosu na toksičnost CDDP na istoj liniji (MRC-5 $IC_{50}^{48h} = 28.15 \mu\text{mol/l}$), što mu pruža dobru perspektivu u daljem razvoju kao potencijalnog antikancerskog leka. Ostali kompleksi (**1**, **3**, **6**, **7**) su pokazali izostanak antiproliferativne aktivnosti i na MRC-5 ćelijama.

Poređenje strukture i aktivnosti pet odabranih kompleksa je pokazalo da je zamena supstituisanog piridinskog liganda (u kompleksima **1**, **3**, **6**, **7**) ligandom bez supstituenata, kao što je anjon pikolinske kiseline (u kompleksu **11**), dovelo do značajne antiproliferativne aktivnosti na tumorskim ćelijama.

U cilju ispitivanja korelacije između antiproliferativne aktivnosti odabranih kompleksa (**1**, **3**, **6**, **7** i **11**) i njihovog mehanizma dejstva, analizirali smo njihov potencijal indukcije promena na nivou ćelijskog ciklusa korišćenjem protočnog citometra nakon bojenja tretiranih ćelija sa propidijum-jodidom. Rezultati su pokazali da jedino citotoksični kompleks **11** indukuje blage perturbacije ćelijskog ciklusa HeLa ćelija (smanjenje procenta ćelija u G1 fazi i blagi zastoj u S fazi ćelijskog ciklusa, bez apoptotskog efekta), nakon 24 h tretmana. Sporiji prolazak kroz replikacionu fazu ćelijskog ciklusa pokazuje njegovo preferencijalno vezivanje za DNK i u korelaciji je sa rezultatima dobijenim ICP-OES, koji će biti razmotreni kasnije.

Nešto veći procenat apoptotičnih ćelija oko 28 % (za tretman sa IC_{50} koncentracijom) uočen je nakon tretmana HeLa ćelija 48 h sa ispitivanim kompleksom **11**, korišćenjem testa za detekciju rane faze apoptoze, dvokolornim bojenjem ćelija sa aneksinom i propidijum-jodidom i analize na protočnom citometru. Istovremeno se uočava i blago povećanje procenta ćelija koje ulaze u kasnu apoptozu (12 % za tretman sa IC_{50} koncentracijom), ali i nekrozu (14 % za tretman sa IC_{50} koncentracijom).

Od ranije je poznato da pikolinska kiselina ima potencijal indukcije apoptoze kod tumorski ćelija. Tako je uočeno da kod HL-60 [159], i K562 ćelija [7] indukuje

apoptozu preko kaspaznog puta. Međutim, kod humanih limfocita pod istim uslovima, apoptoza nije indukovana ovim jedinjenjem [7].

Karakteristika kompleksa **11** sa anjonom pikolinske kiseline kao ligandom da zadrži potencijal indukcije apoptoze koji ima sam ligand (pikolinska kiselina) je još jedna od pozitivnih osobina kompleksa koja ga favorizuje za potencijalne farmakološke agense.

Ostali ispitivani kompleksi nisu imali uticaja na ćelijski ciklus HeLa ćelija i vrlo zanemarljiv uticaj na ćelijski ciklus EA.hy 926 ćelija.

Na osnovu ovih i rezultata citotoksičnosti ispitivanih kompleksa može se pretpostaviti da su u pitanju ciklusno nespecifični agensi u slučaju kompleksa: **1**, **3**, **6** i **7**, s obzirom da je antiproliferativni potencijal pojedinih od njih zavisao od doze ali ne i dužine ekspozicije. Kompleks **11** može svrstati u blago ciklusno specifične agense, s obzirom na veličinu perturbacije ćelijskog ciklusa.

Proučavajući mehanizam dejstva agenasa koji su potencijalni lekovi imperativ je locirati ključne interakcije u ćeliji. Mada se DNK smatra najvažnijom metom mnogih citotoksičnih agenasa i formiranja adukata, proteini su se našli u centru interesovanja kada su rutenijumski kompleksi u pitanju. Ispitivanje distribucije rutenijuma(II) u proteinskoj i DNK frakciji HeLa ćelija tretiranih ispitivanim kompleksima, koristeći ICP-OES, je pokazalo da je svaki ispitivani kompleks nađen unutar ćelije, mada su pokazali različit nivo intraćelijske akumulacije i različit afinitet za vezivanje za proteine ili DNK. Kompleks **11** se u najvećoj meri akumulirao u DNK frakciji, za razliku od ostalih kompleksa, od kojih se samo kompleks **3** našao u DNK frakciji. Time je kompleks **11** pokazao drastično veći afinitet za vezivanje za DNK u poređenju sa ostalim ispitivanim kompleksima, ili potencijal građenja adukata koje je teže ukloniti, što može biti razlog za njegovo citotoksično dejstvo. Nivo rutenijuma(II) vezan za proteinsku frakciju je sličan među testiranim kompleksima, što može da ukaže na značaj samog rutenijuma za interakciju sa proteinima.

Kako bismo utvrdili da li ispitivani kompleksi indukuju odgovor ćelije zavisao od DNK reparacije kao rezultat interakcija sa DNK, ispitivali smo mRNA i proteinski nivo ekspresije ERCC1 i MSH-2, koji predstavljaju najznačajnije elemente NER i MMR reparacionih sistema ćelije, koji mogu i kooperativno učestvovati u odgovoru ćelije na agense koji se vezuju za DNK.

Rezultati ove analize su pokazali da kompleks **11** povećava nivo ekspresije ERCC1 na mRNK i proteinskom nivou. Ovaj kompleks je indukovao i smanjen nivo ekspresije MSH2 na proteinski nivo, što ukazuje na učešće odgovora ćelije zavisnog od reparacionih mehanizama koji verovatno ne podrazumevaju MMR sistem.

Mora se uzeti u obzir da smanjen nivo MSH2 može biti i posledica direktne interakcije agensa sa MSH2 proteinom ili MSH2/DNK kompleksom, a ne samo posledica lezija na DNK koje je indukovao agens.

Uočena preferencijalna akumulacija kompleksa **11** u DNK frakciji HeLa ćelija, potencijal uticaja na faze ćelijskog ciklusa i uticaj na ekspresiju reparacionih enzima ukazuju na evidentno značajan doprinos interakcija kompleksa **11** sa DNK njegovom, po svemu sudeći, veoma kompleksnom mehanizmu dejstva.

Kao što je već navedeno, nizak nivo citotoksičnosti *in vitro* je česta karakteristika rutenijumskih antikancerskih agenasa, koji su pokazali pre svega dobre antimetastatske karakteristike [22,23], stoga je veliki deo i ovog rada posvećen utvrđivanju *in vitro* antimetastatskog potencijala ispitivanih kompleksa.

Metastaziranje tumora predstavlja višestepeni proces koji uključuje invazivnost, adheziju, direktnu migraciju, proteolitičku aktivnost kako bi došlo do degradacije vanćelijskog matriksa [25,26], kao i angiogenezu. Veliki deo ispitivanja bio je usmeren ka ispitivanju potencijala rutenijum(II)-p-cimenskih kompleksa da inhibiraju neke od faza invazivnosti i angiogeneze, polazeći od analize inhibitornog efekta na aktivnost matriksnih metaloproteinaza (MMP-2 i MMP-9).

Kao što je već naglašeno u uvodu, želatinaze i druge MMP su neophodne za mnoge faze u progresiji tumora. Koraci u kojima su uključene MMP uključuju rast primarnog tumora, angiogenezu, migraciju i invaziju metastatskih ćelija u sekundarne organe, kao i inicijaciju i pospešivanje rasta tumora na metastatskom mestu. MMP mogu da aktiviraju ili suprimiraju progresiju tumora sečenjem različitih bioaktivnih supstrata. Stoga konačni efekat želatinaza na progresiju tumora značajno zavisi od konteksta [37].

Rezultati analize aktivnost MMP-2 i MMP-9 nakon tretmana 24 h HeLa i EA.hy 926 ćelija sa ispitivanim kompleksima (**1**, **3**, **6**, **7** i **11**) pokazali su da jedino kompleks **11** pokazuje značajnu inhibitornu aktivnost na MMP-2 i MMP-9, kod HeLa i EA.hy 926

ćelija. Drugi kompleksi rutenijuma ne pokazuju značajnu inhibitornu aktivnost u ovom testu.

Dalje je bilo interesantno utvrditi da li je potencijal kompleksa **11** da utiče na aktivnost MMP-2 i MMP-9 kod FemX ćelija, koje su pokazale nešto veću senzitivnost na ovaj kompleks, posledica uticaja na aktivnost enzima ili uticaja na nivo mRNK. Pokazalo se da je nivo MMP-2 na mRNK nivou 2,6 puta veća nakon tretmana sa kompleksom **11**, dok nivo enzimske aktivnosti značajno opada sa povećanjem koncentracije agensa. Na osnovu ovih rezultata možemo da tvrdimo da je rezultirajuće opadanje aktivnosti MMP-2 nakon tretmana posledica uticaja na enzimskom nivou, ali ne i nivou mRNK.

U daljim ispitivanjima uticaja na invazivnost tumorskih ćelija ispitivanih kompleksa u vidu potencijala povećanja adhezije za podlogu, smanjenja migracije ćelija i invazivnosti kroz matrigel, pokazalo se da svi kompleksi podvrgnuti ovim testovima (**1, 3, 6, 7 i 11**) pokazuju anti-invazivne osobine, povećavajući adheziju HeLa ćelija za podlogu (kompleks **11** čak pri nižoj koncentraciji od ostalih kompleksa) smanjujući migraciju i invazivnosti HeLa ćelija kroz matrigel.

S obzirom da proces angiogeneze, bez koga nije moguć rast i opstanak metastaza, uključuje proliferaciju endotelijalnih ćelija, migraciju, razlaganje matriksa i formiranje struktura nalik tubulama između ostalih procesa, za očekivati je da kompleks koji je imao značajan potencijal uticaja na ove procese kod tumorskih ćelija, kompleks **11**, ima isti efekat i na endotelijalnim ćelijama, što se i pokazalo tačno.

Ovakav tip uticaja kompleksa **11** na faze metastaziranja tumorskih ćelija ukazuje na značaj interakcije kompleksa sa proteinima, kako unutar ćelije tako i izvan nje, kao i na značaj ispitivanja ovih interakcija.

Upotrebom različitih lekova, može se postići efekat na različite targete, različite subpopulacije, ili različite bolesti simultano. Moguće prednosti sinergizma su sledeće:

- povećanje efikasnosti terapijskog delovanja,
- smanjenje doze ali povećanje ili održavanje iste efikasnosti kako bi se izbegla toksičnost,
- minimiziranje ili usporavanje razvoja rezistencije.

Zbog navedene terapijske koristi, kombinacije lekova se često upotrebljavaju i postale su najčešći način lečenja u onkologiji.

Kombinovani tretman HeLa ćelija sa kompleksom **11** u kombinaciji sa inhibitorom PARP-a (3-AB-om), istovremeno tokom 48 h, u poređenju sa cisplatinom u kombinaciji sa 3-AB-om, pokazao je da 3-AB pojačava aktivnost kompleksa rutenijuma sa povećanjem koncentracije 3-AB. To ukazuje na potencijal kompleksa rutenijuma da indukuje prekide na jednom lancu DNK, kao posledica direktnog vezivanja za DNK ili kao posledica indirektnog citotoksičnog efekta.

Analiza mehanizma dejstva 3-AB je pokazala da je za njegovu inhibitornu aktivnost kritična karboksamidna grupa. Takođe, postoje podaci da benzamidi mogu da se vežu za prekide na DNK, time onemogućavajući da ih PARP-1 prepozna i time sprečavajući aktivaciju enzima [86]. PARP-1 inhibitori sami po sebi nisu citotoksični pri koncentracijama koje postižu PARP-1 inhibiciju. Međutim, pri višim koncentracijama, 3-AB pokazuje inhibiciju "de novo" sinteze purina, i zaustavljanje deobe ćelija u kulturi [87,88]. Većina inhibitora je dizajnirana tako da imitira interakcije supstrat-enzim između NAD⁺ i PARP-1 [83].

Predložena je i alternativna hipoteza mehanizma kod koje je PARP farmakološki target lekova na bazi metala [155]. Ova hipoteza je zasnovana na studiji istraživanja inhibitorne aktivnosti serije lekova na bazi metala (platine, rutenijuma, zlata) na čistom PARP-1 i na proteinskoj komponenti humanih ćelija kancera dojke MCF-7 [155]. Ovaj aspekt aktivnosti kompleksa **11** će biti ispitan u okviru narednih istraživanja u našoj laboratoriji (Laboratorija za eksperimentalnu farmakologiju, IORS).

Ispitivani kompleks **11** je pokazao potencijal smanjenja MSH2 proteina kod tretiranih ćelija, a s obzirom da je poznato da je MMR jedan od sistema za reparaciju lezija indukovanih cisplatinom, bilo je interesantno ispitati da li kompleks **11** utiče na aktivnost cisplatine.

Takođe, bilo je interesantno ispitati i kombinovani efekat kompleksa **11** sa paklitakselom, antikancerskim agensom sa potpuno drugačijim mehanizmom dejstva.

Kombinovani tretman HeLa ćelija sa kompleksom **11** i klinički relevantnim lekovima cisplatinom i paklitakselom, sa svakim pojedinačno, pokazao je da kompleks **11** ima približno aditivan efekat sa najnižom koncentracijom paklitaksela, dok sa višim koncentracijama paklitaksela i svim koncentracijama cisplatine pokazuje antagonizam. S obzirom da preovladava antagonizam kao rezultujući efekat tretmana sa kompleksom **11** u kombinaciji sa cisplatinom tj. paklitakselom, to ukazuje da bi mehanizam dejstva

kompleksa **11** mogao da ima nekih dodirnih tačaka (nekih zajedničkih interakcija) sa mehanizmom dejstva cisplatine i paklitaksela.

Poređenje strukture i aktivnosti ispitivanih rutenijum(II)-arenskih kompleksa u ovom radu ukazuje na heterogenu prirodu aktivnosti ovih kompleksa. Zamena supstituisanog piridinskog liganda kod neaktivnih kompleksa (**1-9**) sa anjonom pikolinske kiseline (kompleks **11**) doprinela je značajnom antiproliferativom i *in vitro* antimetastatskom efektu ovog kompleksa.

Ru(II)-arenski kompleksi ispitivani u ovom radu su, bez obzira na antiproliferativni potencijal, pokazali *in vitro* antimetastatski efekat, koji se ogledao u uticaju na adheziju, migraciju i angiogenezu, dok je kompleks **11** uticao i na degradaciju vanćelijskog matriksa.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata *in vitro* ispitivanja antikancerskih karakteristika Ru(II)-arenskih kompleksa, uočava se da ispitivani kompleksi imaju veoma komplikovan mehanizam dejstva, koji uključuje procese kako unutar tako i izvan ćelije.

Uočeno je da je zamena različito supstituisanih piridinskih liganada kod neaktivnih kompleksa (**1-9**) sa anjonom pikolinske kiseline dovela do povećane antiproliferativne aktivnosti kompleksa (**11**). Time je ovaj kompleks postao glavna tema daljih ispitivanja.

Pikolinato-Ru(II)-p-cimenski kompleks je pokazao niz značajnih karakteristika:

- Značajan antiproliferativni potencijal na ispitivanim tumorskim ćelijskim linijama i odsustvo istog na ispitivanim normalnim ćelijama
- Potencijal blagog zaustavljanja ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa praćenog uvođenjem ćelija u apoptozu
- Značajan potencijal vezivanja za DNK, praćen povećanjem ekspresije reparacionog enzima ERCC1 na proteinskom i mRNK nivou, i uticajem na nivo MSH2 proteina, što ukazuje na odgovor ćelije zavisen od reparacije DNK
- Pojačanje antiproliferativnog dejstva u kombinaciji sa inhibitrom PARP-a 3-aminobenzamidom
- U koinkubaciji sa paklitakselom i cisplatinom kompleks **11** je pokazao aditivan efekat sa najnižom koncentracijom paklitaksela, dok sa višim koncentracijama paklitaksela i svim koncentracijama cisplatine je pokazao antagonizam
- Značajan inhibitorni uticaj na invazivnost i metastatičnost tumorskih ćelija u vidu inhibitornog delovanja na aktivnost MMP-aza, migraciju tumorskih ćelija kao i inhibitorni uticaj na angiogenezu *in vitro*.

S obzirom na interakcije sa DNK i *in vitro* antimetastatske karakteristike pikolinato-Ru(II)-p-cimenski kompleks je postao tema i daljih *in vitro* ispitivanja mehanizma dejstva. U budućnosti se očekuje da postane tema i *in vivo* ispitivanja.

LITERATURA

1. G. S. Fink, *Dalton Trans.*, 39 (2010) 1673-1688.
2. A. Levina, A. Mitra, P. A. Lay, *Metallomics*, 1 (2009) 458-470.
3. S. Grgurić-Šipka, I. Ivanović, G. Rakić, N. Todorović, N. Gligorijević, S. Radulović, V. B. Arion, B. K. Keppler, Ž. Lj. Tešić, *Eur. J. Med. Chem.*, 45 (2010) 1051–10582.
4. I. Ivanović, S. Grgurić-Šipka, N. Gligorijević, S. Radulović, A. Roller, Ž. LJ. Tešić, B. K. Keppler, *J. Serb. Chem. Soc.*, 76 (2011) 53–61.
5. Z. Guo, P. J. Sadler: *Metals in Medicine*. *Angew Chem. Int. Ed.*, 38 (1999) 1512-1531.
6. V. Brabec, O. Novakova, *Drug Resis. Updates*, 9 (2006) 111-122.
7. R. Schuecker, R. O. John, M. A. Jakupec, V. B. Arion, B. K. Keppler, *Organometallics*, 27 (2008) 6587–6595.
8. F. P. Dwyer, E. C. Gyarfas, W. P. Rogers, J. H. Koch, *Nature*, 170 (1952) 190–191.
9. F. P. Dwyer, E. Mayhew, E. M. F. Roe, A. Shulman, *Br J Cancer*, 19 (1965) 195–199.
10. E. Meggers, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 11 (2007) 287-292.
11. B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature*, 205 (1965) 698-699.
12. R. A. Alderden, M. D. Hall and T. W. Hambley, *J. Chem. Educ.*, 83 (2006) 728–734.
13. J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 10 (2009) 1303–1312.
14. E. B. Double, *Pharmacol. Ther.*, 25 (1984) 297–326.
15. S. P. Fricker, *Dalton Trans.*, 47 (2007) 4903-4917.
16. S. Kerpel-Fronius, in *Analogue-Based Drug Discovery*, ed. J. Fischer, G. C. Robin, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2006, pp. 385–394.
17. I. Kostova, *Curr. Med. Chem.*, 13 (2006) 1085-1107.
18. M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.*, 236 (2003) 209-233
19. M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.*, 232 (2002) 69–93.
20. Y. J. Chang, H. L. Kim, S. J. Sacket, K. Kim, M. Han, J. Y. Jo, D. S. Im, *J. Appl. Pharmacol.*, 15 (2007) 150–155.

-
21. I. Bratsos, S. Jedner, T. Gianferrara, E. Alessio, *Chimia*, 61 (2007) 692-697.
 22. E. Alessio, G. Mestroni, G. Nardin, W. M. Attia, M. Calligaris, G. Sava, S. Zorzet, *Inorg. Chem.*, 27 (1988) 4099-4106.
 23. G. Mestroni, E. Alessio, G. Sava, S. Pacor, M. Coluccia, A. Boccarelli, *Met-Based. Drugs*, 1 (1994) 41-63.
 24. I. Bratsos, A. Bergamo, G. Sava, T. Gianferrara, E. Zangrando, E. Alessio, *J. Inorg. Biochem.*, 102 (2008) 606-617.
 25. M. Coluccia, G. Sava, F. Loseto, A. Nassi, A. Boccarelli, D. Giordano, E. Alessio and G. Mestroni, *Eur. J. Cancer*, 29 (1993) 1873-1879.
 26. G. Sava, S. Pacor, G. Mestroni, E. Alessio, *Clin. Exp. Metastasis*, 10 (1992) 273-280.
 27. A. Bergamo, G. Sava, *Dalton Trans.*, 13 (2007) 1267-1272.
 28. G. Sava, I. Capozzi, K. Clerici, G. Gagliardi, E. Alessio, G. Mestroni, *Clin. Exp. Metastasis*, 16 (1998) 371-379.
 29. B. Gava, S. Zorzet, P. Spessotto, M. Cocchietto, G. Sava, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 317 (2006) 284-291.
 30. G. Sava, F. Frausin, M. Cocchietto, F. Vita, E. Podda, P. Spessotto, A. Furlani, V. Scarcia, G. Zabucchi, *Eur. J. Cancer*, 40 (2004) 1383-1396.
 31. C. Casarsa, M. T. Mischis, G. Sava, *J. Inorg. Biochem.*, 98 (2004) 1648-1654.
 32. G. Sava, S. Zorzet, C. Turrin, F. Vita, M. Soranzo, G. Zabucchi, M. Cocchietto, A. Bergamo, S. DiGiovine, G. Pezzoni, L. Sartor and S. Garbisa, *Clin. Cancer Res.*, 9 (2003) 1898-1905.
 33. G. Mestroni, E. Alessio, G. Sava, (1998) International Patent PTC C07F 15/00, A 61 K 31/28, WO 98/0043
 34. J. H. Beijnen, *Clin. Cancer Res.*, 10 (2004) 3717-3727.
 35. E. S. Antonarakis, A. Emadi, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 66 (2010) 1-9.
 36. A. Bergamo, R. Gagliardi, V. Scarcia, A. Furlani, E. Alessio, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999, 289,559-564.
 37. S. Zorzet, A. Bergamo, M. Cocchietto, A. Sorc, B. Gava, E. Alessio, E. Iengo, G. Sava, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 295 (2000) 927-933.
 38. A. Vacca, M. Bruno, A. Boccarelli, M. Coluccia, D. Ribatti, A. Bergamo, S. Garbisa, L. Sartor, G. Sava, *Br. J. Cancer*, 86 (2002) 993-998.

-
39. D. Pluim, R. Waardenburg, J. Beijnen, J. Schellens, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 54 (2004) 71-78.
 40. G. Sava, R. Gagliardi, A. Bergamo, E. Alessio, G. Mestroni, *Anticancer Res.*, 19 (1999) 969-972.
 41. A. Bergamo, C. Gaiddon, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, G. Sava, J. *Inorg. Biochem.*, 106 (2012) 1-178.
 42. G. Sava, A. Bergamo, S. Zorzet, B. Gava, C. Casarsa, M. Cocchietto, A. Furlani, V. Scarcia, B. Serli, E. Iengo, E. Alessio, G. Mestroni, *Eur. J. Cancer*, 38 (2002) 427-435.
 43. P. Schluga, C.G. Hartinger, A. Egger, E. Reisner, M. Galanski, M. A. Jakupec, B. K. Keppler, *Dalton Trans.*, 14 (2006) 1796-1802.
 44. M. Brindell, D. Piotrowska, A. A. Shoukry, G. Stochel, R. van Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 12 (2007) 809-818.
 45. W. H. Ang and P. J. Dyson, *Eur. J. Inorg. Chem.*, (2006) 4003-4018.
 46. P. J. Dyson., *Chimia*, 61 (2007) 698-703.
 47. W. H. Ang, *Chimia*, 61 (2007) 140-142.
 48. A. F. A. Peacock, P. J. Sadler, *Chem.-Asian J.*, 3 (2008) 1890-1899.
 49. S. J. Dougan, P. J. Sadler, *Chimia*, 61 (2007) 704-715.
 50. Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, (2005) 4764-4776.
 51. R. E. Aird, J. Cummings, A. A. Ritchie, M. Muir, R. E. Morris, H. Chen, P. J. Sadler, D. I. Jodrell, *Br. J. Cancer*, 86 (2002) 1652-1657.
 52. C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurencyzy, T. J. Geldbach, G. Sava, P. J. Dyson, *J. Med. Chem.*, 48 (2005) 4161-4171.
 53. C. Scolaro, T. J. Geldbach, S. Rochat, A. Dorcier, C. Gossens, A. Bergamo, M. Cocchietto, I. Tavernelli, G. Sava, U. Rothlisberger, P. J. Dyson, *Organometallics*, 25 (2006) 756-765.
 54. A. Bergamo, G. Sava, *Dalton Trans.*, 40 (2011) 7817-7823.
 55. A. M. Pizzaro, A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Top. Organomet. Chem.*, 32 (2010) 21-56.
 56. H. Chen, J. A. Parkinson, S. Parsons, R. A. Coxall, R. O. Gould, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 3064-3082.

-
57. H. Chen, J. A. Parkinson, R. E. Morris, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 173-186.
58. R. L. Hayward, Q. C. Schornagel, R. Tente, J. S. Macpherson, R. E. Aird, S. Guichard, A. Habtemariam, P. Sadler, D. I. Jodrell, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 55 (2005) 577-583.
59. Claire S. Allardyce, Paul J. Dyson, David J. Ellis and Sarah L. Heath, *Chem. Comm.*, 15 (2001) 1396-1397.
60. A. Bergamo, A. Masi, P. J. Dyson, G. Sava, *Int. J. Oncol.*, 33 (2008) 1281-1289.
61. V. Cepeda, M. A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo, J. M. Pérez, *Anti-Canc. Agents. Med. Chem.*, 7 (2007) 3-18.
62. S. G. Chaney, A. Sancar, *J. Natl. Cancer Inst.*, 88 (1996) 1346-1360.
63. L. C. J. Gillet, O. D. Scharer, *Chem. Rev.*, 106 (2006) 253-276.
64. R. Fishel, *Cancer Res.*, 61 (2001) 7369-7374.
65. A. Martin, M. D. Scharff, *Nature Immunol.*, 2 (2002) 605-614.
66. P. Karran, M. G. Marinus, *Nature*, 296 (1982) 868-869.
67. K. Yoshioka, Y. Yoshioka, P. Hsieh, *Mol. Cell*, 22 (2006) 501-510.
68. E. Reed, In *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers*. H. M. Pinedo, D. L. Longo, B. A. Chabner, Eds.; Elsevier Science BV: Amsterdam, 1999, pp. 144-151.
69. T. Helleday, E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson, R. A. Sharma, *Nature Reviews Cancer*, 8 (2008) 193-204.
70. D. J. Lautier, J. Lagueaux, L. M. Thibodeau, G. G. Poirier, *Mol. Cell Biochem.*, 122 (1993) 171-193.
71. T. Lindahl, M. S. Satoh, G.G: Poirier, A. Klungland, *Trends Biochem. Sci.*, 20 (1995) 405-411.
72. D. D'Amours, S. Desnoyers, I. D'Silva, G. G. Poirier, *Biochem. J.*, 342 (1999) 249-68.
73. C. R. Calabrese, M. A. Batey, H. D. Thomas, *Clin. Cancer. Res.*, 9 (2003) 2711-2718.
74. A. Ruf, J. M. de Murcia, G. de Murcia, G. E. Schulz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (1996) 7481-7485.

-
75. V. Schreiber, D. Hunting, C. Trucco, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (1995) 4753-4757.
 76. S. Beneke, J. Diefenbach, A. Burkle, *Int. J. Cancer*, 111 (2004) 813-818.
 77. S. Shall, *Biochimie*, 77 (1995) 313-318.
 78. C. F. Cesarone, L. Scarabelli, A. I. Scovassi, et al. *Biochim. Biophys. Acta*, 1087 (1990) 241-246.
 79. M. Meisterernst, G. Stelzer, R. G. Roeder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 (1997) 2261-2265.
 80. M. S. Satoh, T. Lindahl, *Nature*, 356 (1992) 356-358.
 81. Y. A. Lazebnik, S. H. Kaufmann, S. Desnoyers, G. G. Poirier, W. C. Earnshaw, *Nature*, 371 (1994) 346-347.
 82. J. C. Martinou, R. Sadoul, *Curr Opin Neurobiol*, 6 (1996) 609-614.
 83. D. W. Nicholson, A. Ali, N. A. Thornberry, et al., *Nature*, 376 (1995) 37-43.
 84. C. Trucco, F. J. Oliver, G. de Murcia, J. M. de Murcia, *Nucleic. Acids. Res.*, 26 (1998) 2644-2649.
 85. V. Cepedaa, M. A. Fuertesa, J. Castillac, C. Alonsoa, C. Quevedob, M. Sotoa, J. M. Pérez, *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 1 (2006) 39-53.
 86. M. Shiobara, M. Miyazaki, H. Ito, et al., *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 16 (2001) 338-344.
 87. L. Tentori, A. Balduzzi, I. Portarena, et al., *Cell Death Differ*, 8 (2001) 817-828.
 88. J. McLick, A. Hakam, P. I. Bauer, E. Kun, D. E. Zacharias, J. P. Glusker, *Biochim. Biophys. Acta*, 909 (1987) 71-83.
 89. J. C. Marecki, J. M. McCord, *Arch Biochem Biophys*, 402 (2002) 227-34.
 90. J. E. Cleaver, *Biochim Biophys Acta*, 739 (1983) 301-311.
 91. F. Mendes, M. Groessl, A. A. Nazarov, Y. O. Tsybin, G. Sava, I. Santos, P. J. Dyson, A. Casini, *J. Med. Chem.*, 54 (2011) 2196-2206.
 92. P. S. Steeg, *Nature Med.*, 12 (2006) 895-904.
 93. D. Ribatti, B. Nico, E. Crivellato, A. M. Roccaro, A. Vacca, *Leukemia*, 21 (2007) 44-52.
 94. L. A. Liotta, *Cancer Res.*, 46 (1986) 1-7.
 95. E. D. Hay, *Cell Biology of Extracellular Matrix*. New York: Plenum Publishing Corp., 1982

-
96. H. K. Kleinman, R. J. Klebe, G. R. Martin, *J. Cell Biol.*, 88 (1981) 473-482.
 97. M. R. Bembek, S. D. Banerjee, R. H. Conn, *J. Cell Biol.*, 52 (1972) 674-680.
 98. M. S. Wicha, L. A. Liotta, S. Garbisa, *Exp. Cell Res.*, 124 (1980) 181-190.
 99. L. A. Liotta, C. N. Rao, S. H. Barsky, *Lab. Invest.*, 49 (1983) 636-649.
 100. R. Vracko, *Am. J. Pathol.*, 77 (1974) 313-346.
 101. A. Martinez-Hernandez, P. S. Amenta, *Lab. Invest.*, 48 (1983) 656-680.
 102. N.A. Kefalides, R. Alper, C. C. Clark, *Int. Rev. Cytol.*, 67 (1979) 167-180.
 103. J.A. Madri, H. Furthmayr, *Am. J. Pathol.*, 94 (1979) 322-332.
 104. R. Timpl, H. Wiedmann, V. VanDelden, H. Furthmayer, *Eur. J. Biochem.*, 120 (1981) 203-212.
 105. B. L. Hogan, *Dev. Biol.*, 76 (1980) 275-281.
 106. B. Carlin, R. Jaffe, B. Bender, A. Chung, *J. Biol. Chem.*, 256 (1981) 5209-5218.
 107. L. A. Liotta, J. Kleinerman, P. Catanzara, D. Rynbrandt, *J. Natl. Cancer Inst.*, 58 (1977) 1427-1439.
 108. R. H. Kramer, R. Gonzalez, G. L. Nicolson, *Int. J. Cancer*, 26 (1980) 639-642.
 109. V. P. Terranova, D. H. Rohrbach, G. R. Martin, *Cell*, 22 (1980) 719-726.
 110. M. Nguyen, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 33 (2001) 960-970.
 111. R. Visse, H. Nagase, *Circ. Res.*, 92 (2003) 827-839.
 112. S. Aznavoorian, A. N. Murphy, *Cancer*, 71 (1993) 1368-1383.
 113. S. Aznavoorian, M. L. Stracke, H. Krutzsch H, et al. *J. Cell Biol.*, 110 (1990) 1427-1438.
 114. J. B. McCarthy, L. T. Furcht, *J. Cell Biol.*, 84 (1984) 1474-1480.
 115. E. A. Turley, L. Austen, K. Vandeligt, C. Clary, *Cell Biol.*, 112 (1991) 1041-1047.
 116. L. A. Liotta, R. Mandler, G. Murano, D. A. Katz, R. K. Gordon, P. K. Chiang, E. Schiffmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 (1986) 3302-3306.
 117. A. C. Jamieson, J. C. Miller, C. O. Pabo, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2 (2003) 361-368.
 118. J. Folkman (1990) *J Natl Cancer Inst* 82:4-6, *Langenbecks Arch. Surg.*, 392 (2007) 371-3791.
 119. J. Folkman, *N. Engl. J. Med.*, 285 (1971) 1182-11863.

-
120. J. Folkman, R. Kalluri, *Nature*, 427 (2004) 787.
 121. G. Bergers, L. E. Benjamin, *Nat. Rev. Cancer*, 3 (2003) 401–4106.
 122. G. E. Moore, R. E. Gerner, H.A. Franklin, *J. Am. Med. Assoc.*, 199 (1967) 519-524.
 123. R. Dulbecco, G. Freeman, *Virology*, 8 (1959) 396.
 124. *Biochemical and reagents for life science research*, Sigma, Chem., 1997 str. 1752.
 125. R. Supino, in S. O'Hare, C. K. Atterwill (Eds.), *Methods in Molecular Biology, In Vitro Toxicity Testing Protocols*, Humana press, New Jersey, 1995, str. 137-149.
 126. W. Strober, *Curr. Protoc. Immunol.*, (2001), Appendix 3, Appendix 3B.
 127. Monks, *J. Natl. Cancer Inst.*, 83 (1991) 757-766.
 128. M. G. Ormerod, in M. G. Ormerod (Ed.), *Analysis of DNA-General Methods. Flow Cytometry, a Practical Approach*, Oxford University Press, New York, 1994, str. 119-125.
 129. G. L. Yount, D. A. Haas-Kogan, K. S. Levine, K. D. Aldape, M. A. Israel, *Cancer Res.*, 58 (1998) 3819-3825.
 130. K. Shravan, A. O. Francis, M. Sanjeera, *Clin. Exp. Metastasis*, 15 (1997) 361-367.
 131. C. Fernandez-Patron, C. Zouki, R. Whittal, *Biol. Proceed. Online*, 4 (2002) 38-48.
 132. A. Albin, Y. Iwamoto, H. K. Kleinman, et al., *Cancer Res.*, 47 (1987) 3239-3245.
 133. C.-C. Liang, A. Y. Park, J.-L. Guan, *Nature protocols*, 2 (2007) 329-333.
 134. G. Sava, F. Frausin, M. Cocchietto, F. Vita, E. Podda, P. Spessotto, A. Furlani, V. Scarzia, G. Zabucchi, *Eur. J. Canc.*, 40 (2004) 1383–1396.
 135. P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M.R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82 (1990) 1107–1112.
 136. E. Aranda, G. I. Owen, *Biological Research*, 142 (2009) 377-389.
 137. K. Yasuhito, Y. Tsuyoshi, I. Mutsuo, *Oncology reports*, 9 (2002) 565-569.
 138. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248–254.

-
139. C. Chou, P. Talalay, *Trends in Pharmacological Sciences*, 4 (1983) 450
 140. [www. Biosoft Software for Science.htm](http://www.Biosoft Software for Science.htm)
 141. S. P. Pratesi, P. Perego, D. Polizzi, S. C. Righetti, R. Supino, C. Caserini, C. Manzotti, F. C. Giuliani, G. Pezzoni, S. Tognella, S. Spinelli, N. Farrell, F. Zunino, *Br. J. Cancer*, 80 (1999) 1912.
 142. P.J. Dayson, G. Sava, *Dalton Trans.*, 16 (2006) 1929–1933.
 143. M. Jančić-Zguricas, I. Spužić, *Osnovi onkologije*, Medicinski fakultet u Beogradu, Elit-Medica, 1995, str. 122-130.
 144. Y. Sedletska, M. J. Giraud-Panis, J. M. Malinge, *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, 5 (2005) 251-265.
 145. S. Arandžević, S. Bjelogrić, N. Malešević, Ž.L.J. Tešić, S. Radulović, J. BUON, 14 (2009) 271–279.
 146. O. Novakova, H. Chen, O. Vrana, A. Rodger, P.J. Sadler, V. Brabec, *Biochemistry*, 42 (2003) 11544–11554.
 147. A. Pizzaro, P. J. Sadler, *Biochimie*, 91 (2009) 1198–1211.
 148. H. Zhenga, X. Wanga, R. J. Legerskic, P. M. Glazerd, L. Li, *DNA Repair*, 5 (2006) 566–574.
 149. M. J. Schofield, F. E. Brownwell, S. Nayak, C. Du, E. T. Kool, .P. Hsieh, J. *Biol. Chem.*, 276 (2001) 45505-45508.
 150. L. Fourier, P. Brooks, J. M. Malinge, *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 21267-21275.
 151. Y. Sedletska, L. Fourier, J. M. Malinge, *J. Mol. Biol.*, 369 (2007) 27-40.
 152. F. R. Salsbury, J. E. Clodfelter, M. B. Gentry, T. Hollis, K. D. Scarpinato, *Nucleic Acids Res*, 34 (2006) 2173- 2185.
 153. P. D. Hoffman, H. Wang, C. W. Lawrence, et al., *DNA Repir*, 4 (2005) 983-993.
 154. J. Malina, M. J. Hannon, V. Brabec, *J Biol Inorg Chem*, 13 (2008) 993- 999.
 155. M. Castellano-Castillo, H. Kosthunova, V. Marini, J. Kasparkova, P. J. Sadler, J. M. Malinge, V. Brabec, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 13 (2008) 993-999.
 156. I. Khalaila, A. Bergamo, F. Bussy, G. Sava, P. J. Dyson, *Inter. J. Oncol.*, 29 (2006) 261-268.

-
157. S. Mehta, D. Blackinton, I. Omar, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 46 (2000) 85-92.
 158. B. Melichar, G. Ferrandina, C. F. Vershraegen, et al., *Clin. Cancer res.* 4 (1998) 3069-3076.
 159. S. Ogata, K. Inove, K. Iwata, K. Okumura, H. Taguchi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65 (2001) 2337-2339.

BIOGRAFIJA

Nevenka Gligorijević rođena je 15.12.1978. godine u Beogradu. Na Hemijski fakultet, Univerziteta u Beogradu, smer biohemija, upisala se školske 1997/98 godine. Diplomirala je 25.07.2003. godine sa prosečnom ocenom 8,09, a diplomski rad je odbranila sa ocenom 10.

Na poslediplomske studije pri Katedri za analitičku hemiju upisala se školske 2003/04 godine.

Od 11.11. 2003. godine zaposlena je kao istraživač-pripravnik na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije u Laboratoriji za eksperimentalnu farmakologiju.

16.07.2007. godine odbranila je magistarsku tezu pod nazivom: „Ispitivanje citotoksične aktivnosti novih kompleksa Pt(II) i Pd(II) na tumorskim ćelijskim linijama u poređenju sa cisplatinom“ i time stekla zvanje magistra hemijskih nauka.

24.04.2008. godine stekla je zvanje istraživača-saradnika na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije

Angažovana na projektima finansiranim od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije od 2003. godine.

Član je Evropske organizacije za borbu protiv raka (EACR) i Srpskog društva istraživača raka (SDIR).

SPISAK NAUČNIH RADOVA

1. **N. Malešević**, T. Srdić, S. Radulović, D. Sladić, V. Radulović, I. Brčeski, K. Anđelković, Synthesis and characterization of a novel Pd(II) complex with the condensation product of 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde and ethyl hidrazinoacetate. Cytotoxic activity of the synthesized complex and related Pd(II) and Pt(II) complexes, *Journal of Inorganic Biochemistry* 100 (2006) 1811-1818.
2. **N. Gligorijević**, T. Todorović, S. Radulović, D. Sladić, N. Filipović, D. Gođevac, D. Jeremić, K. Anđelković, Synthesis and characterization of new Pt(II) and Pd(II) complexes with 2-quinolinecarboxaldehyde selenosemicarbayone: Cytotoxic activity evaluation of Cd(II), Zn(II), Ni(II), Pt(II) and Pd(II) complexes with heteroaromatic selenosemicarbazones, *European Journal of Medicinal Chemistry* 44 (2009) 1623-1629.
3. S. S. Arandelović, S. K. Bjelogrić, **N. N. Malešević**, Ž. Lj. Tešić, S. S. Radulović, Antitumor activity of Ru(III) complexes carrying β -diketonato ligands in vitro and in vivo, *Journal of BUON* 14 (2009) 271-279.
4. S. Grgurić-Šipka, I. Ivanović, G. Rakić, N. Todorović, **N. Gligorijević**, S. Radulović, V. B. Arion, B. K. Keppler, Ž. Lj. Tešić, Ruthenium(II)-arene complexes with functionalized pyridines: Synthesis, characterization and cytotoxic activity, *European Journal of Medicinal Chemistry* 45 (2010) 1051-1058.
5. I. Ivanović, S. Grgurić-Šipka, **N. Gligorijević**, S. Radulović, A. Roller, Ž. Lj. Tešić and B. K. Keppler, X-Ray structure and cytotoxic activity of a picolinate ruthenium(II)-arene complex, *J. Serb. Chem. Soc.* 76 (2011) 1-10.
6. V. Marković, S. Erić, T. Stanojković, **N. Gligorijević**, S. Arandelović, N. Todorović, S. Trifunović, N. Manojlović, R. Jelić, M. D. Joksović,

Antiproliferative activity and QSAR studies of a series of new 4-aminomethylidene derivatives of some pyrazol-5-ones, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 21 (2011) 4416–4421.

7. N. **Gligorijević**, S. Arandelović, L. Filipović, K. Jakovljević, R. Janković, S. Grgurić-Šipka, I. Ivanović, S. Radulović, Ž. Lj. Tešić, 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* 108 (2012) 53-61
8. M. Skorića, S. Todorovića, N. **Gligorijević**, R. Janković, S. Živković, M. Ristić, S. Radulović, Cytotoxic activity of ethanol extracts of in vitro grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines, *Industrial Crops and Products* 38 (2012) 153-159.

SPISAK SAOPŠTENJA

1. K. Anđelković, N. **Malešević**, S. Radulović, Ž. Lj. Tešić, T. Todorović, D. Sladić, Synthesis, characterization and cytotoxic activity of Pt(II) and Pd(II) complexes with 2-[(2E)-2-[2-(diphenylphosphino)benzylidene]hydrazino]-2-oxoacetamide, *The Seventh Yugoslav Materials Research Society Conference*, Herceg Novi, Yugoslavia, 2005, Book of Abstracts p. 166.
2. T. Todorović, K. Anđelković, N. **Malešević**, S. Radulović, Ž. Tešić, I. Brčeski, D. Sladić, Synthesis, characterization, antimicrobial and antitumor activity of Pt(II) and Pd(II) complexes with 2-[(2E)-2-[2-(diphenylphosphino)benzylidene]hydrazino]-2-oxoacetamid *Xth International Symposium on Bioinorganic Chemistry: Challenge for a new generation*, Szklarska Poreba, Poland, 2005. Book of Abstracts, p. 107.

-
3. V. Radulović, **N. Malešević**, T. Srdić, S. Radulović, D. Sladić, K. Anđelković, Cytotoxic activity of novel Pd(II) and Pt(II) complexes with condensation products of 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde and semioxamazine or ethyl hyd., *1st European Chemistry Congress*, Budapest, Hungary **2006**. Book of Abstracts, p.369
 4. N. Filipović, **N. Gligorijević**, S. Radulović, T. Todorović, D. Sladić, K. Anđelković, Evaluation of cytotoxic activity of Ni(II) and Cd(II) complexes with 2-quinolinecarboxaldehyde selenosemicarbazone *41st IUPAC World Chemistry Congress*, Turin, Italy, August 5-11, 2007., Book of Abstracts p.157.
 5. **Gligorijević N.**, Arandelović S., Radulović S., Anđelković K., Effect of Pd(II) and Pt(II) complexes with condensation products of 2-(diphenylphosphino)benzaldehyde on activation of caspase-3 and migratory potential of HeLa cells, *10th International Symposium on Platinum Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy and Satellite Symposium "Molecular aspects of metal-anticancer drugs"* 30th November - 3rd December, 2007 Verona – Italy
 6. **Nevenka Gligorijević**, Sandra Arandelović, Lana Filipović, Ksenija Jakovljević, Radmila Janković, Siniša Radulović, Ivanka Ivanović, Sanja Grgurić-Šipka, Biljana Dojčinović, Živoslav Tešić, Antiproliferative and in vitro antimetastatic properties of several ruthenium(II)-p-cymene complexes, EACR Anticancer Agents Research Congress, 13-16 October, 2011. Antalya, Turkey
 7. Lana Filipović, Gordana Rakić, Sandra Arandelović, **Nevenka Gligorijević**, Ksenija Jakovljević, Radmila Janković, Biljana Dojčinović, Živoslav Tešić, Siniša Radulović, Cytotoxic And In Vitro Antimetastatic Potential Of Trans-Dichloridoplatinum(II) Complexes With 3- And 4-Acetylpyridine, EACR Anticancer Agents Research Congress, 13-16 October, 2011. Antalya, Turkey



Picolinate ruthenium(II)–arene complex with *in vitro* antiproliferative and antimetastatic properties: Comparison to a series of ruthenium(II)–arene complexes with similar structure

Nevenka Gligorijević^a, Sandra Aranđelović^a, Lana Filipović^a, Ksenija Jakovljević^a, Radmila Janković^a, Sanja Grgurić-Šipka^b, Ivanka Ivanović^b, Siniša Radulović^{a,*}, Živoslav Lj. Tešić^b

^a Institute for Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14, 11000 Belgrade, Serbia

^b Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12-16, 11 000 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2011

Received in revised form 8 December 2011

Accepted 9 December 2011

Available online 16 December 2011

Keywords:

Ruthenium(II)–arene
Antiproliferative activity
Antimetastatic
ERCC1
PARP

ABSTRACT

In our previous study, ruthenium(II)–*p*-cymene complexes of general formula $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{L})\text{Cl}_2]$, L: 3-acetylpyridine (**1**), 2-amino-5-chloropyridine (**2**); and $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{HL})\text{Cl}]$, HL: 2,3-pyridinedicarboxylic acid (**3**), 2,4-pyridinedicarboxylic acid (**4**), revealed low antiproliferative activity, except complex $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{picolinic acid})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**5**) which exhibited IC_{50} around 80 μM . In this study we further investigated *in vitro* potential of antimetastatic action of ruthenium complexes on HeLa and two endothelial cell lines. Comparison of structure and activity of five complexes indicated heterogenic mode of activity, with regard to the potential of antimetastatic and antiproliferative effect. Replacement of substituted pyridine ligand with picolinic acid (complex **5**) around Ru(II) center contributed to complex cytotoxicity and ruthenium DNA binding affinity. Analysis of ruthenium(II) accumulation in DNA and protein fractions of HeLa cells, using ICP-OES revealed significantly higher content of complex **5** in DNA fraction in comparison to the other tested compounds. It also altered cell cycle progression, affected expression of DNA repair enzymes ERCC1 and MSH2, and showed enhanced activity in combination with 3-aminobenzamide. Regardless of their effect on cell growth, Ru(II) complexes exerted antimetastatic effect on several tumor cell lines *in vitro*, achieved mostly by the effect on cell adhesion, migration and angiogenesis, while picolinate ruthenium(II)–arene additionally exerted inhibitory effect on extracellular matrix degradation.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cisplatin and structurally related platinum based drugs represent unique and important class of antitumor agents. Among the great number of non-platinum metal complexes examined for anticancer characteristics up to date, recent attention is focused on ruthenium complexes. Ruthenium complexes are reported to show patterns of antitumor activity and clinical toxicity that are distinct from those of platinum complexes [1–4].

The most likely interactions of ruthenium complexes are with: plasma proteins, collagens of the extracellular matrix (ECM), actins on the cell surface, regulatory enzymes within the cell membrane and/or in the cytoplasm and DNA in the cell nucleus, which can give them diversity of modes of action involving both extra- and intracellular processes [5].

In the last 30 years, a large number of ruthenium containing agents have been synthesized and tested for potential anticancer

activity [1]. Interestingly, some ruthenium complexes demonstrate greater efficacy against cancer metastasis than against primary tumors. Examples of such complexes include the two complexes NAMI-A and KP1019 which underwent phase II clinical trials [1].

The most numerous group of cytotoxic ruthenium compounds is Ru(II)–arene complexes, which were developed primarily by Dyson and co-workers and Sadler and co-workers, although none of these compounds has yet entered clinical trials [5].

In our previous studies series of ruthenium(II) complexes containing the *p*-cymene ligand and a pyridine derivative coordinated in a monodentate or bidentate manner were synthesized and characterized by standard analytical techniques [6,7].

Analysis of cell growth inhibition caused by Ru complexes of structural formula $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{L})\text{Cl}_2]$, (L: 3-acetylpyridine (**1**), 2-amino-5-chloropyridine (**2**)); and $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{HL})\text{Cl}]$, (HL: 2,3-pyridinedicarboxylic acid (**3**), 2,4-pyridinedicarboxylic acid (**4**)), and $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{picolinic acid})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**5**) (Fig. 1) on panel of tumor cell lines (HeLa, B16, MDA-MB-361, MDA-MB-453 and LS-174) revealed low antiproliferative activity ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{M}$), except for compound **5** with IC_{50} 81.97 μM as already reported [6,7]. Knowing that few Ru complexes which failed traditional anticancer

* Corresponding author. Fax: +381 11 2067 294.

E-mail address: sinisar@ncrc.ac.rs (S. Radulović).

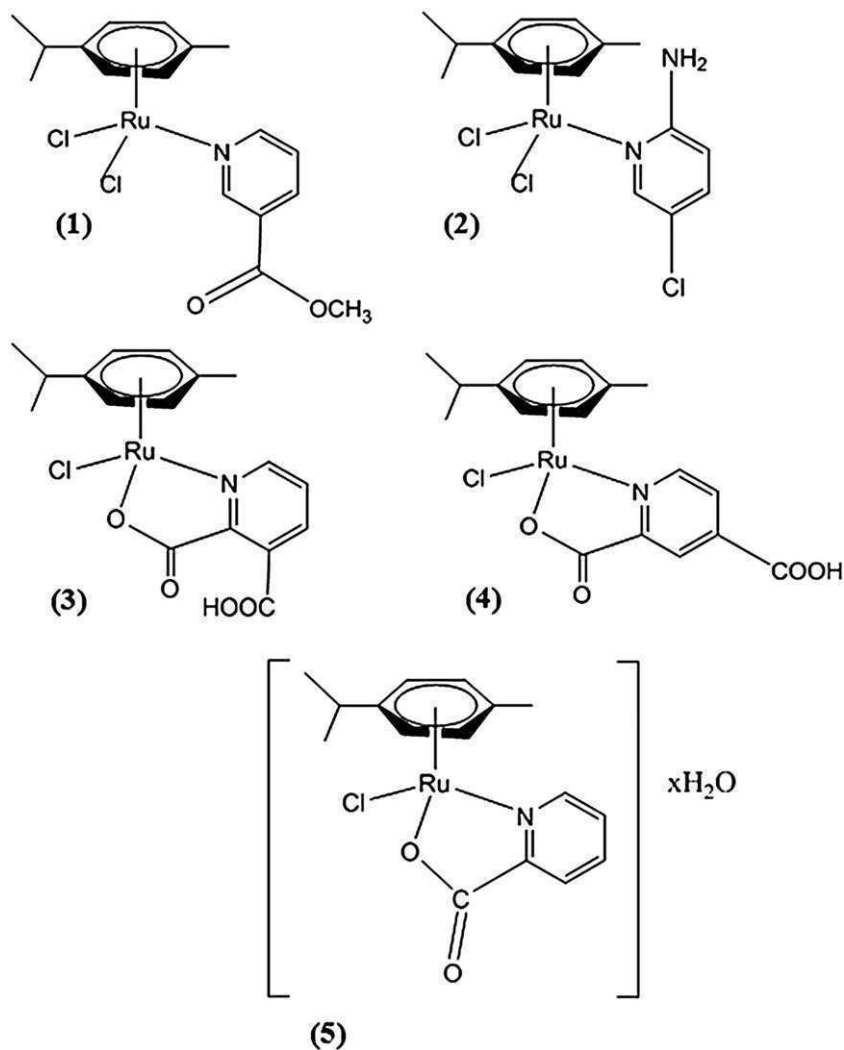


Fig. 1. Structures of investigated ruthenium-*p*-cymene complexes.

drug screening programs based on their level of genotoxicity and cytotoxicity *in vitro*, have demonstrated antimetastatic activity [1–3], we further investigated mechanism of action of our Ru(II)-*p*-cymene complexes, and extended our research on endothelial cells lines: EA.hy 926 (transformed human umbilical vein endothelial cells) and MS1 (murine endothelial cells), as model systems for *in vitro* analysis of antiangiogenic activity [8,9].

Potential of our Ru(II)-*p*-cymene complexes to modulate several steps of metastatic progression like adhesion, migration, invasion, proteolytic degradation of extracellular matrix and formation of new blood vessels has been studied *in vitro*.

Intracellular distribution of ruthenium among protein and DNA cellular fractions in HeLa cells was analyzed by ICP-OES, while effect on cell cycle progression was determined by Flow cytometry.

Though the pharmacological target of ruthenium complexes has not been unequivocally identified, it is generally accepted that their cytotoxicity is related to their ability to bind DNA, comparably to platinum based drugs [10]. Cell DNA-damage response depends upon the nature of the lesion and recruits complex system of DNA-damage recognition/repair proteins.

Major mechanisms involved into repair of cisplatin induced DNA-lesions are reported to be Nucleotide Excision Repair (NER) and Mismatch Repair (MMR) mechanisms, and role of excision repair cross-complementing 1 (ERCC1) protein and MutS homolog (MSH) proteins in cell response to platinum drugs has been extensively investigated [11–14]. In this study we evaluated whether

DNA-repair-dependent signaling which includes components of NER or MMR is utilized in cell response to ruthenium(II)-*p*-cymene complexes, by following expression of ERCC1 (mRNA and protein level) and MSH2 (protein level) using Quantitative Real-Time PCR (RQ-PCR) and Western blot. PARP is another nuclear enzyme responsible for recognition and repair of single-strand DNA-breaks, which might be induced by metal based drugs or oxidative stress [15–17]. PARP also takes role in cell cycle progression and cell death signaling, and is potential molecular target for development of PARP inhibitors as chemo-sensitizer to DNA-damaging agents [18]. In order to determine contribution of PARP in cell response to ruthenium-based complexes we investigated whether PARP inhibition by 3-aminobezamide may potentiate action of complex 5 on HeLa cells.

2. Results and discussion

2.1. Results of MTT assay

Antiproliferative action of a series of Ru(II)-arene complexes of structural formula $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{L}^{1,2})\text{Cl}_2]$, where $\text{L}^{1,2}$ is 3-acetylpyridine (1) and 2-amino-5-chloropyridine (2), correspondingly, and $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{3,4})\text{Cl}]$, where $\text{H}_2\text{L}^{3,4}$ represent 2,3-pyridinedicarboxylic acid (3), 2,4-pyridinedicarboxylic acid (4) have been reported previously on six tumor cell lines showing no cytotoxic activity up to 200 μM [6]. In this study additional structure

Table 1

Results of MTT assay for complexes **1–5** are presented as IC₅₀ values, obtained after 48 or 72 h treatment.

Complex		IC ₅₀ (μM)		
		EA.hy 926	MS1	HeLa ^a
1	48 h	>300	>300	275.71 ± 1.57
	72 h	>300	270.04 ± 3.71	244.00 ± 1.91
2	48 h	>300	220.82 ± 15.98	>300
	72 h	258.46 ± 2.79	218.91 ± 6.21	283.20 ± 3.12
3	48 h	>300	>300	>300
	72 h	259.42 ± 9.83	>300	>300
4	48 h	>300	>300	>300
	72 h	>300	>300	>300
5	48 h	95.47 ± 7.36	78.3 ± 4.09	81.97 ± 14.17
	72 h	88.36 ± 8.10	108.54 ± 9.45	149.35 ± 12.06

^a Results of activity on HeLa cells are already published [6,7].

activity comparison has been performed on endothelial cell lines (model systems for *in vitro* angiogenesis) by MTT assay [19], including compound of structural formulae [(η⁶-*p*-cymene)RuCl(picolinic acid)]·H₂O (**5**) [7]. Results are shown in Table 1. in terms of IC₅₀ values, determined from 3 to 4 independent experiments.

Antiproliferative activity of investigated complexes on endothelial cells were low, indicated by high IC₅₀ values (>200 μM), except for complex **5**. Ruthenium compound **5** exhibited cytotoxic activity on all investigated cell lines after both 48 h and 72 h of continual incubation, with IC₅₀ values falling in the 80–150 μM range. No significant tumor cell type selectivity was observed, although HeLa are

marginally the most sensitive to this complex. Prolongation of incubation time (from 48 h to 72 h) did not improve the antiproliferative activity.

As already mentioned, the low cytotoxicity *in vitro* is very common feature for ruthenium-based anticancer agents which were shown in a number of cases to possess good antitumor, and above all, antimetastatic properties [20,21].

2.2. Cell cycle

The effect of investigated ruthenium(II)-*p*-cymene complexes on cell cycle progression of HeLa and EA.hy 926 cells was examined by flow cytometry after continual treatment for 24 h, using staining with PI [22]. Examination of the histograms indicated that only cytotoxic complex **5** induced perturbations of cell cycle of HeLa cells, and results are presented in Fig. 2. Other complexes had no effect on cell cycle phase progression in both HeLa and EA.hy 926 (data not presented).

Obtained results show that complex **5** induced decrease of percent of cells in G1 and slight arrest in the S phase of cell cycle, with no apoptotic effect (evaluated as Sub-G1 fraction). Slower progression through replication phase indicates its preferential binding to DNA and correlates with the results obtained by ICP-OES (see below).

2.3. Intracellular distribution of ruthenium(II) in protein vs. DNA fraction

While investigating mechanism of action of potential drug candidates it is imperative to locate drug interactions with key targets in the cell [20]. We separately analyzed ruthenium(II) distribution

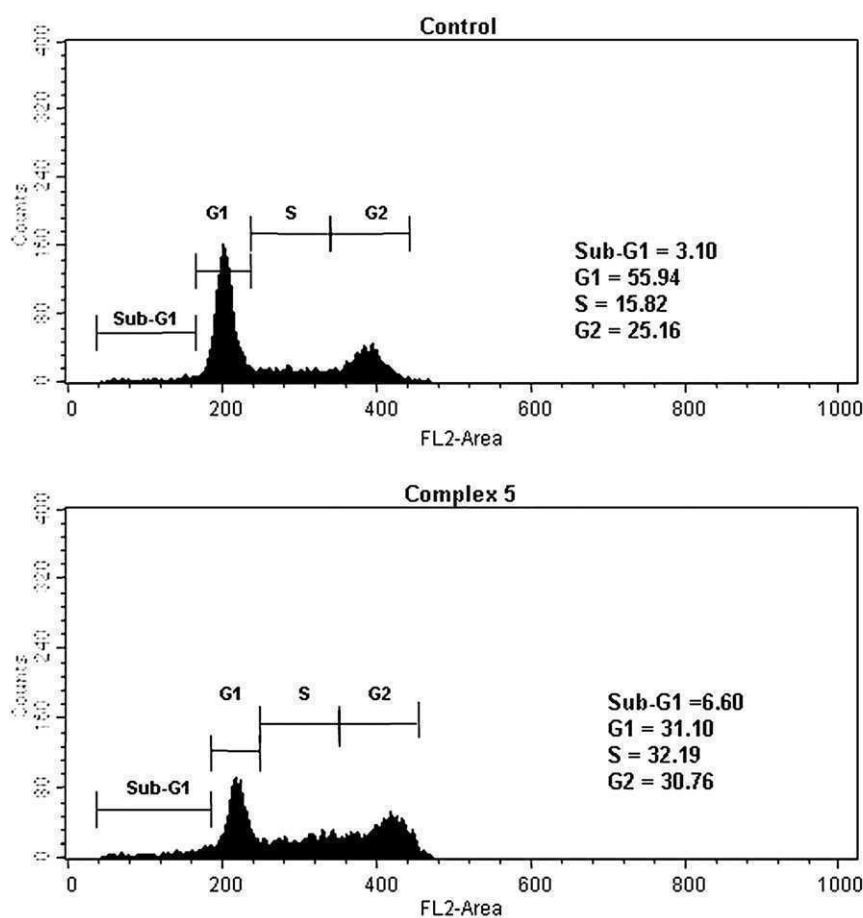


Fig. 2. Effect of the complex **5** (IC₅₀) on cell cycle progression of HeLa cells following 24 h incubation. Histograms presented are representative of three independent experiments.

among the DNA and protein fractions in HeLa cells treated with investigated ruthenium(II)-p-cymene complexes, using ICP-OES analysis, after 24 h treatment with 100 μM of investigated complexes. Each investigated Ru(II) compound was found intracellular, although exhibiting different levels of intracellular accumulation and different affinities for protein or DNA binding (Fig. 3). Complex 5 was preferentially accumulated in DNA fraction, showing drastically higher affinity for DNA-binding in comparison to other investigated Ru complexes, which may be a reason for its cytotoxic action. Level of ruthenium bound to protein fraction was comparable among the tested complexes. Complexes 1, 3, 4 exhibited no DNA binding, which indicates that ligand structural differences of tested Ru(II) compounds significantly influenced affinity or stability of DNA interactions. Complexes 1 and 2 as well as 3 and 4 have some characteristics which probably obstruct DNA interactions, especially drug intercalation through η^6 -bonded arene (such as rotation of the organic ligand about the Ru–N bond in complexes 1 and 2; and –COOH residue in meta- and para-position with respect to the N atom of the aromatic ring at complexes 3 and 4).

In contrast, complex 5 has a relatively planar surface, free from substituents, which enables interactions with DNA thus inducing the observed antiproliferative activity.

2.4. *In vitro* antimetastatic potential

Tumor metastasis is one of the major obstacles to cancer treatment and is a complex multistep process that involves invasion, adhesion, direct migration, and proteolytic activity to degraded ECM barriers [23,24]. Ru-based complexes are reported to exhibit unique antimetastatic properties regardless of their cytotoxic effect [20,25]. Thus far, we investigated potential of our ruthenium(II)-p-cymene complexes to inhibit several steps of tumor cell invasion and angiogenesis, starting with analysis of their inhibitory activity on matrix metalloproteinases (MMPs), in HeLa cells.

2.4.1. Gelatin zymography

MMPs are the family of tissue degrading enzymes that facilitate invasion and metastasis through dissolution of the basement membrane and degradation of the ECM. Among the MMPs, MMP-9 and MMP-2 (capable of degrading gelatin) are thought particularly important in the invasion of the cancer cells [24].

The activities of secreted MMP-2 and MMP-9 after 24 h treatment of HeLa and EA.hy 926 cells were analyzed by gelatin zymography. Results show that only complex 5 exhibited inhibitory activity on secreted MMP-2 and MMP-9 in HeLa and EA.hy 926 cells, respectively (Fig. 4C).

Other ruthenium complexes have not shown any inhibitory effect in this assay.

2.4.2. Invasion assay

In order to investigate *in vitro* potential of ruthenium complexes to inhibit invasion of HeLa cells, we used BD BioCoat Matrigel invasion chambers as a system with the reconstituted basement membrane matrix-matrigel as an invasive substrate coated on a microporous filter membrane [26]. All investigated ruthenium complexes exhibited the potential of inhibiting HeLa cells invasion (Fig. 4A). Among the non toxic ruthenium complexes which were applied at equimolar concentrations (100 μM), complex 2 reduced invasion with 33.6% of inhibition compared to the control (100% invasion). Cytotoxic complex 5 exhibited inhibitory activity on HeLa cell invasion up to 20%, although at lower concentration being 41 μM (which is half of its IC_{50} value).

2.4.3. Adhesion assay

Pro-adhesive properties of investigated ruthenium(II)-p-cymene complexes on adhesion of HeLa cells on plastic substrate (uncoated bottom of the plates) were evaluated as resistance to trypsin treatment, which is a good measure of adhesive strength [27]. We determined that after 90 min treatment with 100 μM concentration, complexes 2 and 3 contributed 3 times more to the adhesion of HeLa cells, on plastic surface, compared to that in the same test performed with control cells (Fig. 4B).

Results of the adhesion assay seem to be compatible with the results of the matrigel invasion assay (Fig. 4A). The same ruthenium complexes 2 and 3, which among the tested complexes contributed the most to the cell adhesion, also exhibited the greatest inhibitory effect on invasion behavior of the cell, through Boyden chamber membranes.

2.4.4. Inhibition of cell migration (Scratch assay)

Wound migration assay was used as *in vitro* assay to determine at first glance whether investigated ruthenium complexes have direct influence on migration of HeLa cells [28]. For this assay confluent cultures of HeLa cells were wounded and then incubated in fresh complete medium. Migration of cells was observed periodically over time under the microscope and representative pictures were taken at 24 h and 48 h. Complex 5 induced inhibition of migration of HeLa cells which was very visible after 48 h incubation (Fig. 4D shows results of wound assay for complex 5 only). Other tested complexes 1, 2, 3 and 4 induced mild inhibition effects (results not shown).

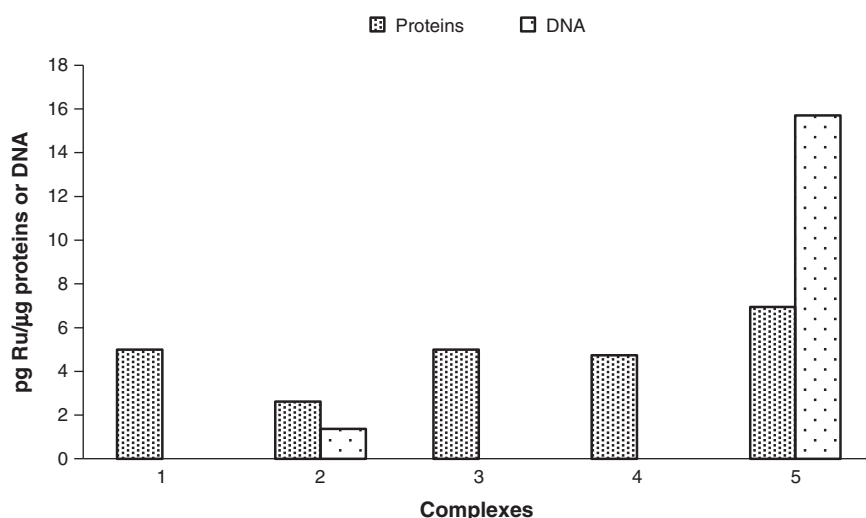


Fig. 3. Ruthenium(II) content in HeLa cells (DNA vs. protein fraction of cells) after 24 h treatment, measured by ICP-OES. Representative experiment.

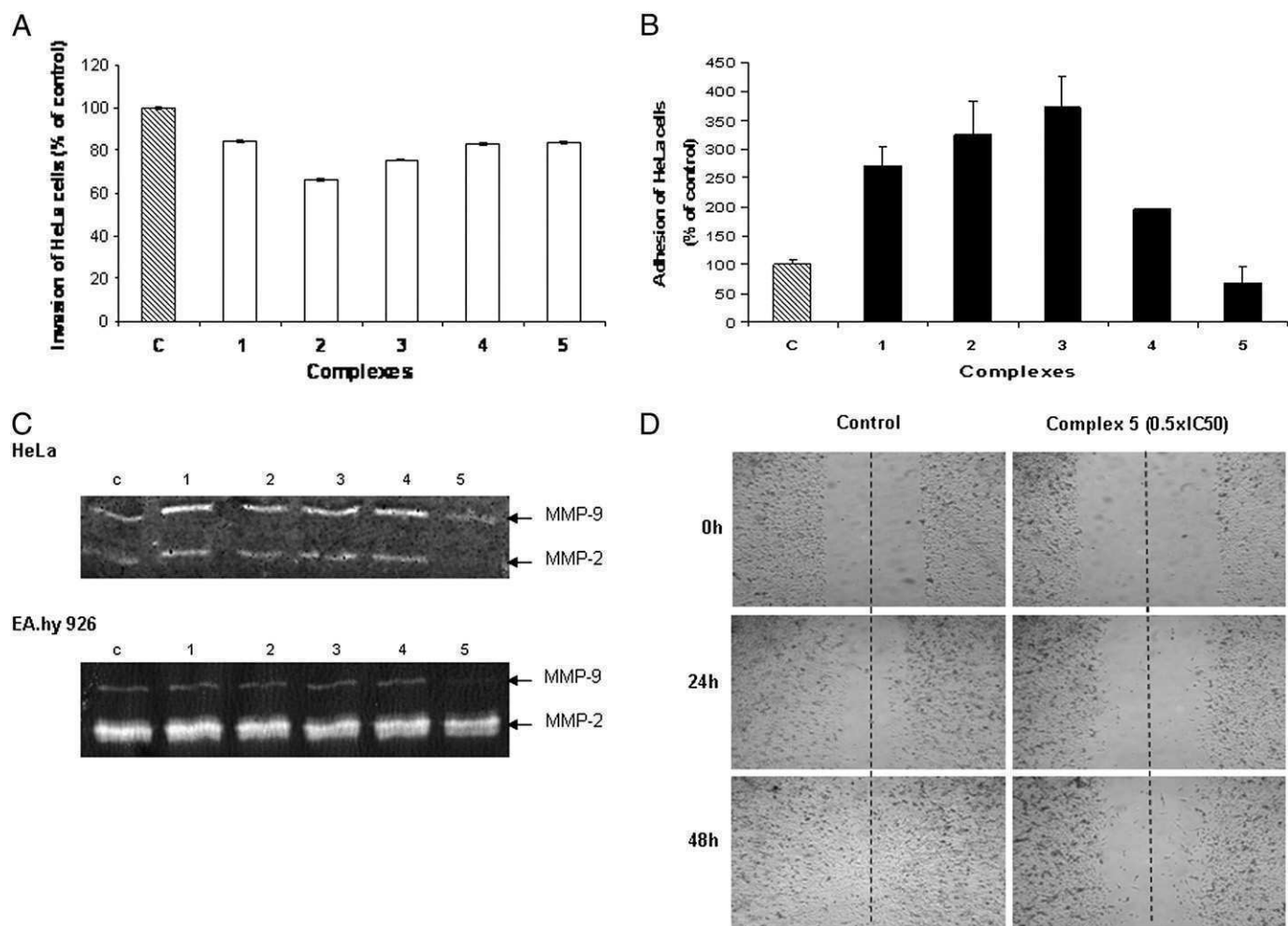


Fig. 4. *In vitro* antimetastatic properties of the complexes. A. The effect of investigated complexes on HeLa cell invasion, after 24 h treatment and 48 h invasion determined by Matrigel invasion assay. Data are presented as the percentage relative to the control (untreated cells) and are representative of one experiment in duplicates. B. The effect of compounds on adhesion ability of HeLa cells to plastic surface (at a dose of 100 μ M for 90 min) determine by SRB assay. Data are representative of one out of three separate experiments with standard deviations, compared to non treated controls. C. Gelatin zymography of HeLa and EA.hy 926 cell treated for 24 h with 100 μ M of investigated complexes. D. Typical results of migration assay (scratch assay) for HeLa cells either in the absence or presence of $0.5 \times IC_{50}$ complex 5. Center of the gap is indicated with the spot line.

2.4.5. Tube formation assay

Angiogenesis involves endothelial cell proliferation, migration and capillary tube formation. To examine the effect of our investigated

ruthenium complexes on angiogenesis *in vitro*, the tube formation assay was performed. When seeded onto matrigel in the presence of appropriate media MS1 (endothelial) cells start to reorganize, showing

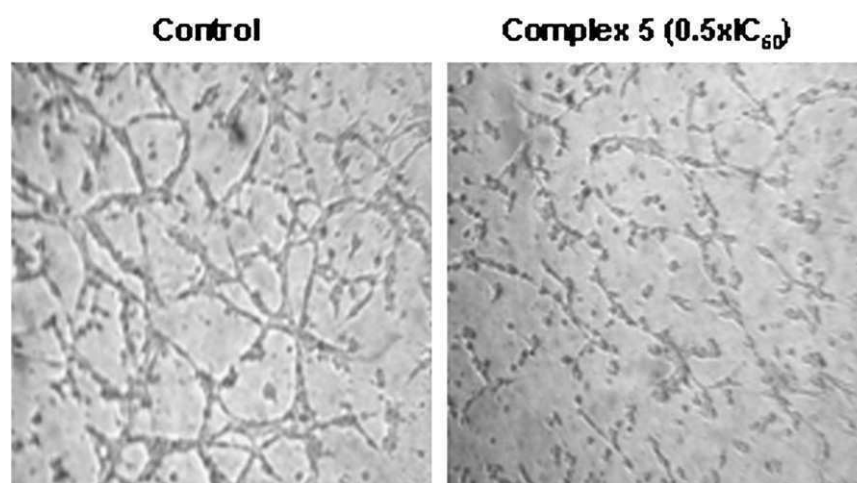


Fig. 5. Tube formation assay (antiangiogenic potential *in vitro*). Representative micrographs of tube formation of MS1 cells treated for 24 h with complex 5 ($0.5 \times IC_{50}$) versus control.

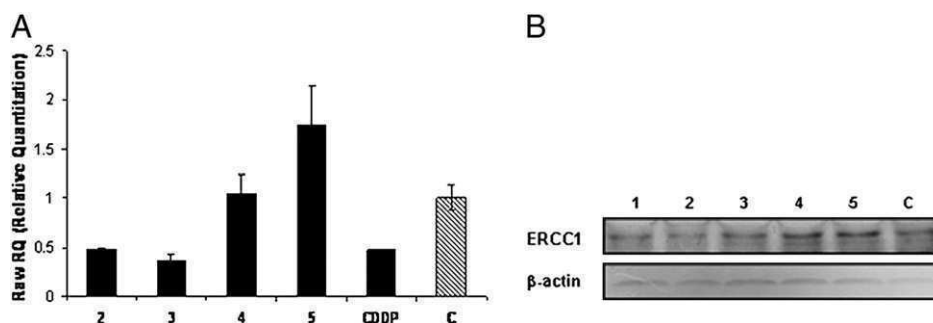


Fig. 6. Expression level of ERCC1 mRNA determined by Real-Time-PCR (A) and protein expression level determined by Western blot (B), in HeLa cells after 24 h exposure with investigated complexes **2**, **3**, **4**, **5** (100 μ M) and CDDP (7 μ M).

projections and forming cell–cell contacts and polygon structures [8]. In our experiment MS1 endothelial cells were treated with sub-toxic concentrations of investigated complexes to determine their potential to decrease ability of these cells to extend and differentiate into tube-like structures. Our complexes **1**, **4**, and **5** showed some potential to inhibit characteristics of angiogenic behavior of endothelial cells. Complex **5** induced the highest inhibitory effect among the tested complexes, and results are presented in Fig. 5.

2.5. Effect on expression of ERCC1 mRNA level by Quantitative Real-Time PCR (RQ-PCR) and protein level (Western blot)

There is considerable interest in the interactions of ruthenium(II) complexes with DNA as well as the biological impact of the interactions [10,29,30]. In order to evaluate whether investigated ruthenium complexes induce DNA-repair-dependent cell response as the result of cytotoxic DNA lesions, we investigated mRNA expression level of ERCC1, and protein expression level of ERCC1 and MSH2, which might be cooperatively involved in cell response to DNA-binding anticancer agents [31]. ERCC1 is critical component of NER which is primarily induced in the repair of bulky platinum–DNA adducts, and it is known that its repair function extends beyond NER and may play role in cell response to the other type of DNA lesions [31]. Data obtained on HeLa cells after 24 h continual treatment showed that cytotoxic complex **5** significantly increased expression of ERCC1 on mRNA level (Fig. 6A). Other ruthenium compounds showed no effect or negatively modulated relative expression levels of ERCC1 mRNA, compared to the non treated control, as determined by RQ-PCR. This data are in accordance with the results of Western blot (Fig. 6B), which showed increased protein expression level induced by complex **5**, in comparison to the control. ERCC1 has been investigated as a marker of cisplatin resistance, and ERCC1 mRNA expression correlates to sensitivity to cisplatin to some extent [12], thus far cisplatin has been used as reference compound in this study. After 24 h cisplatin treatment in HeLa cells, ERCC1 mRNA expression was slightly downregulated, which was opposite to the effect of Ru complex **5**. An additional study is necessary to address the role of ERCC1 upregulation in response to complex **5** induced cytotoxicity.

2.6. Effect on expression of MSH2 protein level (Western blot)

MSH2 is a component of mismatch repair system (MMR) which has central role in correcting mismatches in DNA occurring during

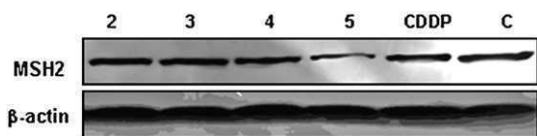


Fig. 7. MSH2 protein expression level in HeLa cells after 24 h treatment with complexes **1–5** (100 μ M) and CDDP (7 μ M) determined by western blot.

DNA replication and has been implicated in triggering of apoptosis induced by a number of cytotoxic anticancer agents [8]. Based on the idea that MSH components mediate sensitivity to DNA damaging agents, we investigated whether MSH2 might be included in cell response to Ru(II)-p-cymene complexes, especially complex **5** which showed preferential affinity for DNA binding. We have analyzed MSH2 protein expression level in HeLa after 24 h treatment with investigated complexes, comparing to cisplatin and non treated control. Data obtained indicated that protein level of MSH2 decreased after treatment with complex **5**, while rest of the complexes, including cisplatin as a reference, had no effect (Fig. 7).

2.7. Combinational drug study

PARP is a nuclear enzyme involved in single strand-break repair and may be inhibited to increase chemosensitivity to wide spectrum of DNA-damaging agents including alkylating agents (cisplatin), topoisomerase I inhibitors (etoposide) etc. [17]. Assuming that ruthenium complex **5** bind to DNA, inducing lesions, we investigated whether combination study of complex **5** with PARP-1 inhibitor 3-aminobenzamide on HeLa cells, may interfere with complex **5** induced cytotoxicity. Results of combinational drug study (Fig. 8) showed that 3-AB at concentration of 2 mM potentiated cytotoxicity of complex **5** which indicates that Ru complexes may induce DNA-single-strand breaks, either as the result of direct binding to DNA or as an indirect cytotoxic effect [16].

3. Conclusion

Based on their *in vitro* anticancer properties, investigated complexes have one complicated mechanism of action, involving both

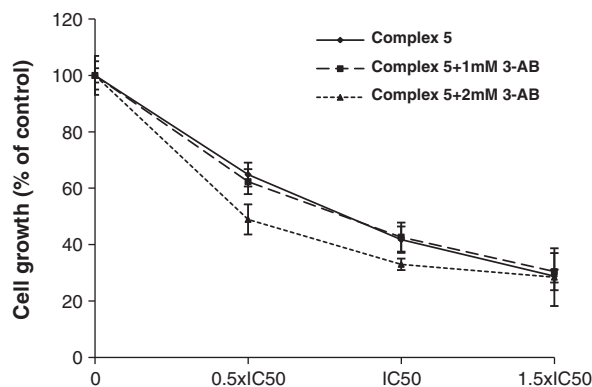


Fig. 8. Cell growth inhibition graph of HeLa cells after 48 h continual action of combined treatment of complex **5** (at concentrations corresponding to 0.5 \times IC₅₀, IC₅₀ and 1.5 \times IC₅₀) and 3-AB (at concentrations 1 mM and 2 mM), determined by SRB assay. Data are representative for one out of three separate experiments with standard deviations.

extra and intra-cellular processes, quite distinct from that of classical platinum-based compounds.

In accordance with the previously published results [6,7] where replacement of pyridine ligands in the molecule of the ineffective ruthenium(II)-arene (complexes **1–4**), with picolinic acid, resulted in an enhancement of antiproliferative activity, additional study on two endothelial cell lines (EA.hy 926, MS1) showed again that picolinate ruthenium(II)-arene (complex **5**) exhibited enhanced activity, compared to the other complexes. Complex **5** exerted its cytotoxic effect through S phase cell cycle arrest and significant preference for DNA binding. Our investigation of intracellular distribution of ruthenium complexes allowed us to conclude that DNA, rather than proteins, may present target for complex **5** cytotoxic action. Moreover, it upregulated expression of DNA repair enzyme ERCC1 on both mRNA and protein level, and affected protein level of MSH2, which indicated involvement of DNA-repair-dependent cell response. Potentiation of action of complex **5** in combination with PARP-1 inhibitor 3-AB, suggests importance of understanding cellular pathways or targets utilized by ruthenium complexes which show enhanced sensitization of tumor cells in combination with PARP inhibition.

Complexes **1–4** which preferentially accumulated in protein fraction had minor growth inhibitory effect and modest anti-invasive potential. Complex **5** showed inhibition of MMP-s activity, inhibition of migration of HeLa cells, and inhibition of tube formation of MS1 endothelial cells (antiangiogenic potential *in vitro*). Comparably to NAMI-A like ruthenium compounds (**3**), Ru(II) complex **5** showed capacity to modify important parameters of metastasis. However, the nature of the target(s) responsible for the antimetastatic activity remains to be elucidated.

Structure-activity comparison revealed heterogenic mode of activity of tested ruthenium(II) complexes with regard to antimetastatic effect and cytotoxic potential. Variations of the nature of monodentate or bidentate ligand significantly influenced pharmacological properties of the complexes. Moreover, arene identity may affect drug-uptake and interactions with the potential intracellular targets such as DNA, contributing to noncovalent, hydrophobic interactions with DNA bases, such as intercalation (29).

Based on the data obtained in this research, picolinate ruthenium(II)-arene (complex **5**) distinguished among the tested ruthenium complexes, according to its highest antiproliferative and antimetastatic potential *in vitro*. Replacement of substituted pyridine ligand (in complexes **1, 2, 3, 4**) with ligand of planar surface, free from substituents such as picolinic acid (complex **5**) allowed for better DNA binding affinity and cytotoxicity.

Due to the interaction with DNA and *in vitro* antimetastatic characteristics we believe that complex **5** is promising candidate for further *in vivo* antitumor study.

4. Experimental protocols

4.1. Synthesis

The complexes of structural formula $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{L}^{1,2})\text{Cl}_2]$, where $\text{L}^{1,2}$ is 3-acetylpyridine (**1**) and 2-amino-5-chloropyridine (**2**), correspondingly, and $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{H}_2\text{L}^{3,4})\text{Cl}]$, where $\text{H}_2\text{L}^{3,4}$ represent 2,3-pyridinedicarboxylic acid (**3**), 2,4-pyridinedicarboxylic acid (**4**), and $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{picolinic acid})\cdot\text{H}_2\text{O}]$ (**5**) were synthesized and characterized as previously described [6,7].

4.2. Analysis of cell growth inhibition by Ru(II)-complexes

4.2.1. Cell culture

The endothelial cell lines EA.hy 926 (permanent human cell line derived from a fusion of human umbilical vein endothelial cells-HUVEC and human lung adenocarcinoma cells-A549) and MS1 (murine endothelial cells immortalized by infection encoding SV40 large T antigen)

were maintained as monolayer culture in nutrient medium, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Powdered DMEM medium was purchased from Sigma-Aldrich Co. Nutrient medium DMEM was prepared in sterile ionized water, supplemented with penicillin (192 IU/ml), streptomycin (200 µg/ml), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) (25 mM), L-glutamine (3 mM) and 10% of heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (pH 7.2) and D-glucose (4.5 g/l).

The cells were grown at 37 °C in 5% CO₂ and humidified air atmosphere.

4.2.2. MTT assay

Antiproliferative activity of complexes **1–5** was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich Co.) assay [19]. Cells were seeded in 96-well cell culture plates (NUNC) EA.hy 926 (4000c/w) and MS1 (7000c/w) in culture medium and grown for 24 h. Compounds were dissolved in DMSO and further diluted with nutrient medium to desired concentrations (up to 300 µM). Final concentration of DMSO never exceeded 1%. Solutions of various concentrations of examined compound were added to the wells, except the control wells where only nutrient medium was added. All tests were carried out in triplicate. After incubation periods of 48 and 72 h 20 µL of MTT solution, 5 mg/mL in phosphate buffer solution, pH 7.2 were added to each well. Samples were incubated for 4 h at 37 °C, with 5% CO₂ in humidified atmosphere. Formazan crystals were dissolved in 100 µl of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS). Absorbances were recorded on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (ThermoLabsystems Multiskan EX 200–240 V) after 24 h at the wavelength of 570 nm. IC₅₀ (µM) values were determined from the cell survival diagrams.

4.3. Flow-cytometric analysis of cell cycle phase distribution

Quantitative analysis of cell cycle phase distribution was performed by flow-cytometric analysis of the DNA content in fixed HeLa and EA.hy 926 cells, after staining with propidium iodide (PI) [22].

Cells were seeded at density of 2×10^5 cells/well at 6-well plate and growth in nutrition medium. After 24 h cells were continually exposed to investigated compounds **1–4** (300 µM) and **5** (82 µM/IC₅₀). After 24 h of continual treatment cells were collected by trypsinization, washed twice with ice-cold PBS, and fixed for 30 min in 70% EtOH. After fixation cells were washed again with PBS, and incubated with RNaseA (1 mg/mL) for 30 min at 37 °C. Just before flow-cytometric analysis cells were stained with PI at concentration of 400 µg/mL. Cell cycle phase distribution was analyzed using a fluorescence activated sorting cells (FASC) Calibur Becton Dickinson flow cytometer and Cell Quest computer software.

4.4. Intracellular distribution of investigated complexes (proteins vs. DNA fraction)

Ruthenium level in proteins vs. DNA fraction after treatment of HeLa cells with investigated complexes was determined using ICP-OES. 6×10^6 cells/75 cm² falcon dish (NUNC) were treated with investigated complexes in 100 µM concentrations for 24 h. After treatment cells were washed by ice cold PBS and harvested by scraping. After centrifugation at 2000 rpm, 10 min at 4 °C cell pellet was frozen at –70 °C.

DNA and proteins were isolated using TRI Reagent® (Sigma-Aldrich Co.) according to manufacturer's procedure and concentrations determined spectrophotometrically by measuring absorbance at A260 and A280 nm respectively (Eppendorf BioPhotometer 6131). Ruthenium levels were determined in isolated DNA and protein fraction, after sample preparation for ICP-OES according to standard procedure, using Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, UK)

4.5. *In vitro* antimetastatic potential

4.5.1. Gelatin zymography

Gelatinolytic activity of secreted MMP-2 and MMP-9 in drug-treated HeLa and EA.hy 926 cells was analyzed by zymography in 10% SDS-polyacrylamide gels impregnated with 0.1% gelatin.

Cells were seeded in 6-well plate (NUNC) in duplicate (6×10^5 cells/w) in nutrition medium being RPMI for HeLa and DMEM for EA.hy 926 cells. At 70% of confluence cells were exposed to investigated complexes (100 μ M) in serum-free medium, for 24 h. Equal amounts of supernatant proteins for each sample, as determined by Bradford assay [32], were mixed with loading buffer (loading buffer: 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8; 20% glycerol; 10% SDS and 0.25% bromophenol blue) before loading to the SDS-polyacrylamide gels. Electrophoresis was performed at 125 V, gels were washed 3 times for 20 min in renaturing solution (2.5% Triton X-100) followed by a 48 h incubation at 37 °C in the enzyme assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.2 M NaCl; 5 mM CaCl₂; 0.05% NaN₃) for the development of enzyme activity bands. After incubation, the gels were stained with 0.05% Coomassie brilliant blue G-250 in a mixture of MeOH: AcOH:H₂O (2.5:1:6.5) and destained in 4% MeOH with 8% AcOH. In order to increase the sensitivity, the gels were further destained in a solution of 1% Triton X-100 (1–2 h) [24,33]. The gelatinolytic activities were visualized as clear transparent bands against the blue background of Coomassie brilliant blue-stained gelatin.

4.5.2. Matrigel invasion assay

The potential of our ruthenium(II)-p-cymene complexes, to inhibit invasion of HeLa cells we carried out by matrigel invasion assay in 24-well BD BioCoat Matrigel invasion chambers (BD Biosciences) [26]. 2×10^5 cells/well of HeLa cells were seeded in 6-well cell culture plate (NUNC) in nutrition medium. After 24 h cells were treated with investigated ruthenium complexes **1–4** (100 μ M) and **5** ($0.5 \times IC_{50}$) for 24 h. Control were cells in the nutrition medium only. After treatment cells were left for 4 h in serum-free RPMI 1640 medium with 0.2% BSA. After starvation cells were harvested by trypsinization and resuspended in serum-free RPMI 1640 medium with 0.2% BSA. 4×10^4 cells/0.5 mL/well were seeded onto the matrigel-coated filters (with 8 μ m pore size) in BioCoat Matrigel invasion chambers. RPMI 1640 medium with 10% FCS was added to the lower compartment as chemoattractant. After incubation in a humidified tissue culture incubator, at 37 °C, 5% CO₂ atmosphere for 48 h, the non-invading cells are removed from the upper surface of the membrane by “scrubbing”. Cells that invaded the lower surface of the filters were detached and stained with detachment buffer Trypsine/EDTA (0.05%/0.02%) in PBS with 5 μ M Calcein-AM. 200 μ L of the Trypsine/EDTA solution containing the dislodged cells was transferred from each well of 24 well plate to a 96-well plate in duplicate. Invaded cells were quantified in 96-well plate with the fluorescence microplate reader (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Electron Corporation) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm. Assay was done in duplicate.

4.5.3. Cell adhesion assay (resistance to detachment assay)

To evaluate potential influence of investigated ruthenium(II)-p-cymene complexes on adhesion of tumor cells, the adhesion of HeLa cells on plastic substrate (uncoated bottom of the plates) was evaluated according to method reported by [27].

HeLa cells were grown at a density of 3×10^4 cells/mL, in 0.2 mL/well nutrition medium in a 96-well plastic plate (NUNC) and incubated at 37 °C. At 70% confluence cells were treated with investigated complexes at 100 μ M concentrations, for 90 min. Briefly, 30 μ L of (0.05%, w/v) trypsin solution per well was used to detach cell at 37 °C for 30 min. Nondetached cells were fixed with 200 μ L of 10% (w/v) cold trichloroacetic acid (TCA) at 4 °C for 1 h. Number of adherent cells was determined using sulforhodamine B (SRB; Sigma) staining [30],

and absorbances recorded on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (ThermoLabsystems Multiskan EX 200–240 V) at the wavelength of 570 nm. Each experiment was done in triplicate.

4.5.4. Cell migration assay (Scratch assay)

To gain first insights in the potential of investigated ruthenium complexes to inhibit migration of HeLa cells, *in vitro* scratch assay was done [22]. 4×10^5 cells/well were seeded into 6-well cell culture plate and cultured in RPMI 1640 with 10% FCS in tissue culture 5% CO₂ incubator to confluence. A scrape was made in the center of the cell monolayer with a sterile pipette tip (p200) to create a gap of constant width. Cells detached by scraping were removed by gently washing with PBS. The initial images of the wounds were captured with Olympus digital camera connected to the inverted microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany, objective 6.3/0.20) and cells were further incubated for 24 h and 48 h in fresh medium for control or with investigated complexes in desired concentrations **1–4** (100 μ M) and **5** ($0.5 \times IC_{50}$). Pictures were taken to qualitatively determine the influence of investigated complexes on migration. Photographs of the initial wounded monolayers were compared with the corresponding images of treated cells. Artificial line traversing through the middle of gap was drawn on pictures of original wounds and overlaid on the images of cultures after incubation.

4.5.5. Tube formation assay (*in vitro* angiogenesis assay)

Potential of investigated complexes to inhibit angiogenesis *in vitro* was analyzed by tube formation assay in mouse endothelial cells (MS1). MS1 cells plated into gel of basement membrane proteins, rapidly organize into multicellular tube-like structures, while antiangiogenic effect of tested compounds is observed as reduction of tube formation [8]. Briefly, 24-well plates were coated with collagen and allowed to solidify at 37 °C for 1 h. MS1 (mouse endothelial cells) were seeded 1×10^5 cells/well in medium. Treatment was added 2 h after cells settled (for complexes **1–4** concentration was 100 μ M, and for complex **5** concentration was $0.5 \times IC_{50}$). Tube formation was observed periodically over time under microscope and representative pictures were taken after 24 h incubation with Olympus digital camera connected to the inverted microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany, objective 6.3/0.20).

4.6. Quantitative Real-Time PCR (RQ-PCR)

4.6.1. RNA isolation and cDNA synthesis

RNA was isolated from 6×10^6 HeLa cells, after treatment with investigated complexes **2–5** (100 μ M) for 24 h, using TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's procedure. Total RNA of each sample was quantified by a spectrophotometer (Eppendorf BioPhotometer) measuring the absorbance at 260 nm. The ratio A_{260}/A_{280} was used to assess the purity of isolated RNA. The RNA concentration was calculated in μ g/ μ L. To analyze the RNA banding pattern, gel electrophoresis (Pharmacia Biotech) in 2% agarose gels with ethidium bromide was performed. The RNA samples were mixed with xylene cyanol color (0.25% xylene cyanol in 30% glycerol in water) and run in $0.5 \times$ TBE buffer for 50 min at 25 mA. The RNA bands were visualized on a UV transilluminator (Hoefer). To perform RT-PCR with random primers, 2 μ g of total RNA was used as template for MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/ μ L) in High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. The reaction mixtures were incubated in Mastercycler gradient (Eppendorf).

4.6.2. Quantitative Real-Time PCR (RQ-PCR)

The analysis of gene expression level of ERCC1 and GAPDH (endogenous control) was done by using TaqMan® Gene Expression Assay (ERCC1 probe, Applied Biosystem, ID: Hs_01012155_g1, and TaqMan® MGB GAPDH probe, Applied Biosystem, ID: Hs_00355782_m1), on ABI PRISM® 7500 PCR instrument (Applied Biosystems Inc., Foster City,

CA). PCR reactions were prepared in duplicate for every sample in 96-well optical plates. Each well contained 11 μL of TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 μL of cDNA (100 ng/ μL) and 8 μL H_2O . No template control in duplicate as well, was used as a PCR negative control (11 μL TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 9 μL H_2O). PCR profile consisted of the following steps: enzyme activation 50 °C 2 min; initial denaturation 95 °C 10 min; 40 cycles of denaturation at 95 °C 15 s, and annealing/extension at 60 °C 1 min.

4.7. Western blot

HeLa cells were treated with investigated ruthenium complexes 1–5 in concentration 100 μM and CDDP in concentration 7 μM for 24 h. Control were untreated cells, maintained in medium only. After treatment cells were washed with phosphate buffered saline (PSB) (Sigma-Aldrich Co.) and whole cell lysates were harvested in 100 μL of Lysis buffer containing: 37 mM Tris-HCl, 75 mM NaCl, 25% Triton X-100, and 10 μL protease inhibitor cocktail (Sigma). Samples were stored at –20 °C until further analysis.

Protein concentrations of the resulting lysates were determined using Bradford assay [32]. Whole cell lysates were mixed with Laemmli loading buffer and subjected for 1 h to SDS-PAGE (10% PAA gel) at 120 V, followed by electroblotting to nitrocellulose membrane (0.45 μm) (Bio-Rad Laboratories, Inc.) for 1 h at 100 V. Membranes were blocked for 1 h with 5% non-fat milk in PBS at room temperature and subsequently probed overnight with a purified mouse anti-human ERCC1 monoclonal antibody (1:500 dilution) (BD Biosciences Pharmingen), or purified mouse anti-human MSH2 monoclonal antibody (1:1000 dilution) (BD Biosciences Pharmingen). After washing the membranes with Tris-buffered saline three times, the membranes were incubated with anti-mouse IgG-peroxidase conjugated secondary antibody (1:2000 dilution) (Sigma-Aldrich Co.) for 1 h. The levels of specific proteins were detected using enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Biosciences), followed by autoradiography.

4.8. Combinational drug study

In order to determine the sensitivity of tumor cells to ruthenium complex 5 in combination with PARP inhibitor 3-aminobenzamide, sulforhodamine B (SRB) test was done [34]. Briefly, 2000 cells per well were seeded in 96-well plates, and day after cells were treated by ruthenium compound 5 alone or in combination with 3-AB for 48 h of continual action. Absorbances were recorded on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (ThermoLabsystems Multiskan EX 200–240 V) at the wavelength of 570 nm. Each experiment was done in triplicate.

Abbreviations

ECM	Extracellular matrix
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry
NER	Nucleotide Excision Repair
MMR	Mismatch Repair
ERCC1	Excision Repair Cross-Complementing 1
MSH2	Mut S homolog 2
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
3-AB	3-aminobezamide
PI	Propidium iodide
MMP	Matrix metalloproteinases
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

HEPES	4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
FCS	Fetal calf serum
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FASC	Fluorescence Activated Sorting Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
TCA	Trichloroacetic acid
SRB	Sulforhodamine B
CDDP	Cis-diamminedichloroplatinum (II)
ECL	Enhanced Chemiluminescence
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Science, Republic of Serbia, Grant, No. III 41026 and Grant, No 172017.

References

- [1] E.S. Antonarakis, A. Emandi, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66 (2010) 1–9.
- [2] M. Galanski, V.B. Arion, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, *Curr. Pharm. Des.* 9 (2003) 2078–2089.
- [3] A. Vacca, M. Bruno, A. Boccarelli, M. Coluccia, D. Ribatti, A. Bergamo, S. Garbisa, L. Sartor, G. Sava, *Br. J. Cancer* 86 (2002) 993–998.
- [4] S. Arandjelovic, Z. Tesic, P. Perego, L. Gatti, N. Carenini, F. Zunino, R. Leone, P. Apostoli, S. Radulovic, *Med. Chem.* 2 (2006) 227–237.
- [5] A. Levina, A. Mitra, P.A. Lay, *Metallomics* 1 (2009) 458–470.
- [6] S. Grgurić-Šipka, I. Ivanović, G. Rakić, N. Todorović, N. Gligorijević, S. Radulović, V.B. Arion, B.K. Keppler, Ž.Lj. Tešić, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1051–1058.
- [7] I. Ivanović, S. Grgurić-Šipka, N. Gligorijević, S. Radulović, A. Roller, Ž.Lj. Tešić, B.K. Keppler, *J. Serb. Chem. Soc.* 76 (2011) 53–61.
- [8] E. Aranda, G.I. Owen, *Biol. Res.* 42 (2009) 337–389.
- [9] J.L. Arbiser, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 (1997) 861–866.
- [10] V. Brabec, O. Novakova, *Drug Resist. Updates* 9 (2006) 111–122.
- [11] C. Lanzi, P. Perego, R. Supino, S. Romanelli, T. Pensa, N. Carenini, I. Viano, D. Colangelo, R. Leone, P. Apostoli, G. Cassinelli, R.A. Gambetta, F. Zunino, *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998) 1247–1254.
- [12] Y. Tomoda, M. Katsurai, M. Okajima, N. Hosoya, N. Kolmo, K. Miyagama, *Int. J. Cancer* 124 (2009) 2997–3001.
- [13] L.P. Martin, T.C. Hamilton, R.J. Schilder, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 1291–1295.
- [14] E. Reed, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 6100–6102.
- [15] D. D'Amours, S. Desnoyers, I. D'silva, G.G. Poirier, *Biochem. J.* 342 (1999) 249–268.
- [16] S. Kapitzka, M.A. Jakupec, M. Uhl, B.K. Keppler, B. Marian, *Cancer Lett.* 226 (2005) 115–121.
- [17] T. Helleday, E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson, R.A. Sharma, *Nat. Rev. Cancer* 8 (2008) 193–204.
- [18] V. Schreiber, F. Dantzer, J.C. Ame, G. de Murcia, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 517–528.
- [19] R. Supino, *Methods in Molecular Biology*, in: S. O'Hare, C.K. Atterwill (Eds.), *Vitro Toxicity Testing Protocols*, Humana Press, New Jersey, 1995, pp. 137–149.
- [20] P.J. Dayson, G. Sava, *Dalton Trans.* 16 (2006) 1929–1933.
- [21] I. Kostova, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 1085–1107.
- [22] M.G. Ormerod, *Analysis of DNA—General Methods*, in: M.G. Ormerod (Ed.), *Flow Cytometry, a Practical Approach*, Oxford University Press, New York, 1994, pp. 119–125.
- [23] L.A. Liotta, *Cancer Res.* 46 (1986) 1–7.
- [24] K. Shrivastava, A.O. Francis, M. Sanjeera, *Clin. Exp. Metastasis* 15 (1997) 361–367.
- [25] S. Arandelović, S. Bjelogrić, N. Malešević, Ž.Lj. Tešić, S. Radulović, *J. BUON* 14 (2009) 271–279.
- [26] A. Albini, Y. Imamoto, K. Kleinman, G.R. Martin, S.A. Aronson, J.M. Kozlowski, R.N. McEwan, *Cancer Res.* 47 (1987) 3239–3245.
- [27] G. Sava, F. Fransin, M. Cocchietto, F. Vita, E. Podda, P. Spessotto, A. Furlani, V. Scarzia, G. Zabucchi, *Eur. J. Cancer* 40 (2004) 1383–1396.
- [28] C.C. Liang, A.Y. Park, J.L. Guan, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 329–333.
- [29] O. Novakova, H. Chen, O. Vrana, A. Rodger, P.J. Sadler, V. Brabec, *Biochemistry* 42 (2003) 11544–11554.
- [30] A. Pizzaro, P.J. Sadler, *Biochimie* 91 (2009) 1198–1211.
- [31] H. Zhenga, X. Wang, R.J. Legerskic, P.M. Glazer, L. Li, *DNA Repair* 5 (2006) 566–574.
- [32] M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [33] C. Fernandez-Patron, C. Zouki, R. Whittall, J.S.D. Chan, S.T. Davidge, J.G. Filep, *Biol. Proced. Online* 4 (2002) 38–48.
- [34] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M.R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* 82 (1990) 1107–1112.



Original article

Ruthenium(II)–arene complexes with functionalized pyridines: Synthesis, characterization and cytotoxic activity

Sanja Grgurić-Šipka^{a,*}, Ivanka Ivanović^a, Gordana Rakić^a, Nina Todorović^b, Nevenka Gligorijević^c, Siniša Radulović^c, Vladimir B. Arion^d, Bernhard K. Keppler^d, Živoslav Lj. Tešić^a^a Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12-16, 11000 Belgrade, Serbia^b Department of Chemistry, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, Studentski trg 14, 11000 Belgrade, Serbia^c Institute of Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14, 11000 Belgrade, Serbia^d Institute of Inorganic Chemistry, University of Vienna, Währinger Str. 42, 1090 Vienna, Austria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 September 2009

Received in revised form

17 November 2009

Accepted 27 November 2009

Available online 16 December 2009

Keywords:

Ruthenium(II)–arene

Pyridine derivatives

Cytotoxicity

ABSTRACT

Ruthenium(II)–arene complexes of general formulae $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{L}^{1-3})\text{Cl}_2]$, where L^{1-3} is 3-acetylpyridine (**1**), 4-acetylpyridine (**2**) and 2-amino-5-chloropyridine (**3**), correspondingly, $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{HL}^{4,5})\text{Cl}_2]$, where HL^4 and HL^5 are respectively isonicotinic acid (**4**) and nicotinic acid (**5**) and $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{HL}^{6-9})\text{Cl}]$, where H_2L^{6-9} represent 2,3-pyridinedicarboxylic acid (**6**), 2,4-pyridinedicarboxylic acid (**7**), 2,5-pyridinedicarboxylic acid (**8**) and 2,6-pyridinedicarboxylic acid (**9**), were prepared by the reaction of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$ (**10**) with the corresponding ligand in 1:2 molar ratio in isopropanol. The complexes were characterized by elemental analysis, mass spectrometry, IR and NMR spectroscopies. According to these data the molecules adopt the usual “three-leg piano-stool” geometry which is common for this type of complexes. The structures of **1** and **7** were determined by X-ray crystallography. The complexes revealed low antiproliferative activity in six investigated tumor cell lines (HeLa, B16, FemX, MDA-MB-361, MDA-MB-453 and LS-174). The reaction of **6** with 9-methyladenine was studied by ^1H NMR, ^1H , ^1H COSY and ^1H , ^1H NOESY spectroscopy.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Organoruthenium(II) complexes are the subject of interest in the design of metal-based complexes as anticancer agents [1]. Some of the ruthenium(II)–arene compounds showed antiproliferative activity *in vitro* and/or *in vivo* [2–6]. The first ruthenium(II)–arene complex that was assayed for cytotoxicity and showed high activity is $[(\eta^6\text{-benzene})\text{RuCl}_2(\text{metronidazole})]$ [7]. Later, some of the complexes of the general formula $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]\text{PF}_6$, where en is ethylenediamine and arene represents benzene, *p*-cymene, tetrahydroanthracene, dihydroanthracene and biphenyl, were found to exhibit anticancer activity both *in vitro* and *in vivo*, including activity against cisplatin resistant cells [8,9]. Complexes of the type $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{XY})\text{Cl}]$, where XY is a chelating N,N-, N,O- or O,O-ligand, were shown to be less active [10,11]. Finally, a series of ruthenium(II)–arene complexes containing 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (PTA) or its derivatives as co-ligands were synthesized and studied for antiproliferative activity [12–16].

All these complexes have typical “piano-stool” geometry, where the arene ligand forms the seat and the chelating ligand along with

chlorido ligand are the legs of the piano stool. It should be noted that Ru(II)–arene complexes often possess good aqueous solubility combined with satisfactory lipophilicity needed to cross the cell membrane. In addition, the arene ligand stabilizes the ruthenium in the +2 oxidation state, which makes the corresponding complexes kinetically more labile when compared to those of ruthenium(III). Moreover, the arene identity appears to affect the cell uptake and interactions with the potential intracellular targets. The monodentate ligand, usually chlorido, as leaving group facilitates the binding of the biomolecule to the metal centre. Finally, a bidentate ligand has an effect on the kinetics of the complexes. Although there are no strict structure–activity relationships for these complexes, the variations in the arene ligand identity, as well as the nature of monodentate or bidentate ligand influence the pharmacological properties of these complexes [17].

It should be also stressed that high cytotoxicity is not a prerequisite for a further development of a compound as an anticancer drug candidate. One of the most investigated potential ruthenium anticancer drug, $[\text{Hind}][\text{trans-RuCl}_4(\text{indazole})_2]$, where (Hind = protonated indazole) [18] is only moderately cytotoxic to cancer cells, while another ruthenium(III) complex, namely $[\text{HIm}][\text{RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{imidazole})]$ (Him = protonated imidazole) is essentially non-toxic to primary cancer cells, but exhibits antimetastatic

* Corresponding author. Tel.: +381 113336736; fax: +381 112184330.

E-mail address: sanjag@chem.bg.ac.rs (S. Grgurić-Šipka).

activity [19]. Both complexes successfully completed the phase I and will be studied in phase II clinical trials in the near future [20,21]. This implies that not only cytotoxicity assays, but also additional *in vivo* evaluations are necessary for prediction whether the compound will be effective in the treatment of tumors [22].

Pyridinedicarboxylic acids are known for their various biological applications. In particular, 2,4-pyridinedicarboxylic acid showed immune-suppressive and fibro-suppressive properties [23] and is capable of protecting certain enzymes from heat inactivation [24,25]. In addition, 2,4-, 2,5- and 2,6-pyridinedicarboxylic acids were found to inhibit or activate some metalloenzymes [26,27]. The iron(III) 2,6-pyridinedicarboxylates play a role in electron transfer in some models of biological systems [28,29] and were recognized as specific molecular tools in DNA cleavage [30]. Since the role of pyridinedicarboxylic acids in these processes is not well-understood, the study of their coordination chemistry towards biologically relevant metal ions is of particular interest.

It should be also mentioned that a search for the new platinum anticancer compounds [31] prompted by intrinsic and acquired tumor resistance and side effects to cisplatin, one of the most successful clinical drugs, started with replacement of chlorido ligands with dicarboxylato ligands leading to a number of other active compounds. We applied the same strategy, bringing together the ruthenium-arene moiety with the potentially active dicarboxylic, acetyl or amino pyridine derivatives. In this paper, our research was focused on the synthesis of compounds of general formulae $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{L}^{1-3})\text{Cl}_2]$, where L^{1-3} is 3-acetylpyridine (**1**), 4-acetylpyridine (**2**) and 2-amino-5-chloropyridine (**3**), correspondingly, $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{HL}^{4,5})\text{Cl}_2]$, where HL^4 and HL^5 are respectively isonicotinic acid (**4**) and nicotinic acid (**5**) and $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{HL}^{6-9})\text{Cl}]$, where HL^{6-9} represent 2,3-pyridinedicarboxylic acid (**6**), 2,4-pyridinedicarboxylic acid (**7**), 2,5-pyridinedicarboxylic acid (**8**) and 2,6-pyridinedicarboxylic acid (**9**), their spectroscopic characterization and the study of anti-proliferative activity of the prepared complexes in six tumor cell lines: human cervix carcinoma cells (HeLa), murine melanoma cells (B16), human melanoma cells (FemX), breast cancer cells (MDA-MB-361 and MDA-MB-453) and human colon cancer cells (LS-174). In spite of the adopted opinion that the interaction of ruthenium-arene complexes with nucleobases is an important factor determining the anticancer activity, we showed in this study that fast hydrolysis of complexes and high-yield binding to 9-methyladenine did not lead to the desired cytotoxicity of investigated compounds. Hydrolytic behaviour of complexes **1** and **6** and the reaction of **6** with 9-methyladenine studied by one- and two-dimensional NMR spectroscopy are also reported.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis

Reaction of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$ with the corresponding ligand (Fig. 1a) in 1:2 molar ratio in isopropanol at room temperature afforded the complexes of general formulae, $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{L}^{1-3})\text{Cl}_2]$ (**1–3**), $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{HL}^{4,5})\text{Cl}_2]$ (**4** and **5**), (Fig. 1b) and $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{HL}^{6-9})\text{Cl}_2]$ (**6–9**) (Fig. 1c) in high yields. The complexes precipitated directly from the reaction mixture. All complexes were soluble in water, methanol, ethanol, acetonitrile and dimethylsulfoxide.

2.2. Spectroscopy

The ^1H NMR spectra allowed the integration and assignment of all signals. The characteristic pattern of the *p*-cymene moiety is observed in the spectra of all complexes. The singlet of the

methyl group appeared at 2.08–2.16 ppm, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ as a multiplet at 2.68–2.84 ppm and $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ as a doublet at 1.12–1.21 ppm for **1–9**. All complexes display the resonances related to protons of arene ring at 5.68–5.92 ppm. The signals of the pyridine ring protons are at 6.44–9.49 ppm. In addition, complex **3** displays a singlet at 6.13 ppm attributed to the $-\text{NH}_2$ group, and complexes **5**, **6** and **9** display a singlet at ca. 13.50 ppm attributable to the uncoordinated $-\text{COOH}$ group. The ^{13}C NMR spectra for **1–9** are very similar. They display resonances at ca. 18.00 ppm attributable to the methyl groups attached to the cymene moiety, at ca. 21.00 ppm from $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, at around 30.00 ppm signals arising from $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ group and in the range from 80, to 106 ppm resonances due to aromatic carbons from *p*-cymene. The δ_{C} for the signals originating from pyridine carbons depend on substituents at the pyridine ring and display expected patterns.

The ESI mass spectra of aqueous solutions of **1–9** showed peaks corresponding to the $[\text{M} - \text{Cl}]^+$ ions. The complexes **6–8** in methanol displayed peaks at m/z 438 which can be attributed to $[\text{M} + \text{H}]^+$ ions. In addition, complex **6** showed a peak at m/z 358 resulted from decarboxylation and loss of chlorido ligand $[\text{M} - \text{Cl} - \text{CO}_2]^+$, and complex **3** a peak at m/z 312 resulted from the fragmentation of the parent ion. The isotopic patterns for the assigned ions agreed well with the calculated isotopic distributions.

Infrared spectra for **6–9** contain a stretching vibration at ca. 1650 cm^{-1} attributed to the coordinated carboxylato group, as well as analogous vibrations of free carboxylic group of $\text{HL}^6\text{--HL}^9$ (1725 , 1715 , 1710 cm^{-1}) indicating participation of one group in binding to ruthenium. Furthermore, all complexes display bands in the region from 1600 to 1550 cm^{-1} typical for the $\text{ar}(\text{C}=\text{C})$ valence vibrations and in the region from 1300 to 1100 cm^{-1} , assigned to the aromatic C–H vibrations.

Although it is known that ligands used in this work can adopt various binding modes in metal complexes [32,33] the IR and NMR spectra provide evidence that the monoanion of 2,3-, 2,4-, 2,5- and 2,6-pyridinedicarboxylic acids coordinates to ruthenium(II) in a bidentate fashion via pyridine nitrogen and one of the carboxylate groups with formation of the five-membered chelate ring, whereas 3-acetylpyridine, 4-acetylpyridine, 2-amino-5-chloropyridine, isonicotinic and nicotinic acid coordinate in a monodentate mode through the pyridine nitrogen.

2.3. X-ray crystallography

The structures of **1** and **7** were confirmed by X-ray diffraction. The compounds crystallize in the monoclinic and orthorhombic space groups *Cc* and *Pca*₂₁ correspondingly. Both compounds have the characteristic “three-leg piano-stool” geometry well-documented for a large number of ruthenium(II) arene complexes, with an η^6 π -bound *p*-cymene ring forming the seat, and three monodentate ligands in the case of **1** (3-acetylpyridine bound via nitrogen atom, and two chlorido ligands) or one bidentate ligand, i.e. monodeprotonated 2,4-pyridinedicarboxylic acid bound via nitrogen and one carboxylic oxygen, and one chlorido ligand for **7**, as the legs of the piano-stool. Selected bond distances and angles are quoted in the legend of Figs. 2 and 3.

The molecule of **1** does not contain electronegative elements that can act as proton donors to be involved in hydrogen bonding in the crystal. The two chlorido ligands Cl1 and Cl2 as proton acceptors partake in weak interactions of the type $\text{Cl}\cdots\text{H}-\text{C}$ with adjacent molecules, i.e. $\text{Cl1}\cdots\text{H}-\text{C}3^i$ ($x - 1, y, z$), where $\text{Cl1}\cdots\text{H}$ 2.834, $\text{H}-\text{C}3^i$ 0.95, $\text{Cl1}\cdots\text{C}3^i$ 3.618(3) Å, $\text{Cl1}\cdots\text{H}-\text{C}3^i$ 140.48°, $\text{Cl1}\cdots\text{H}-\text{C}9^i$, where $\text{Cl1}\cdots\text{H}$ 2.897, $\text{H}-\text{C}9^i$ 0.95, $\text{Cl1}\cdots\text{C}9^i$ 3.831(3) Å, $\text{Cl1}\cdots\text{H}-\text{C}3^i$ 159.78°, $\text{Cl2}\cdots\text{H}-\text{C}2^i$, where $\text{Cl1}\cdots\text{H}$ 2.729, $\text{H}-\text{C}3^i$ 0.95, $\text{Cl2}\cdots\text{C}2^i$ 3.367(3) Å, $\text{Cl2}\cdots\text{H}-\text{C}2^i$ 125.20°, $\text{Cl2}\cdots\text{H}-\text{C}14^{ii}$ ($x, 2 - y, z - 0.5$), where $\text{Cl2}\cdots\text{H}$

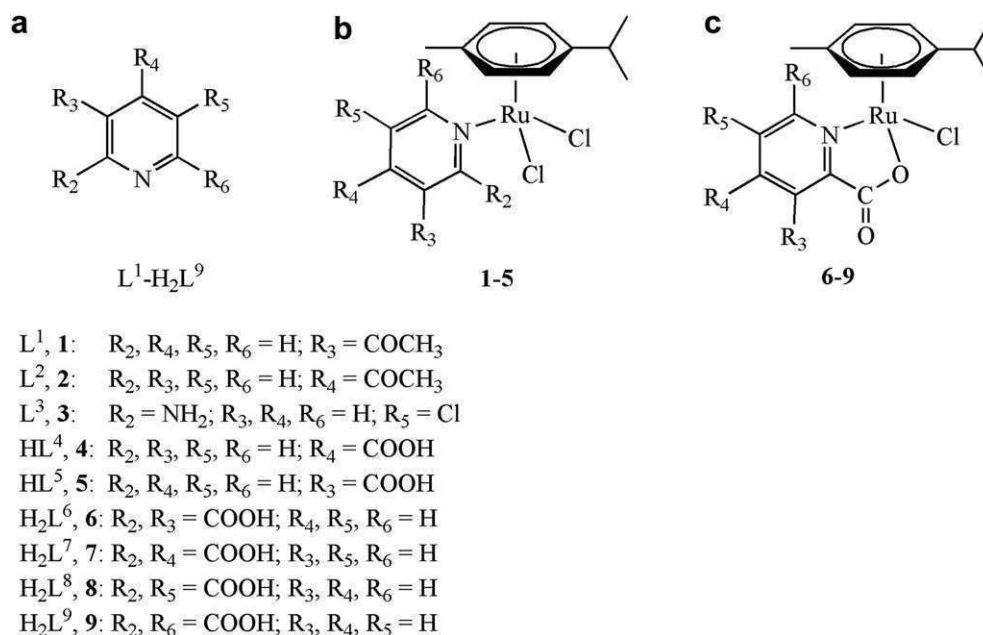


Fig. 1. Structures of the (a) ligands; (b) complexes **1-5**; (c) complexes **6-9**.

2.800, H–C14ⁱⁱ 0.95, Cl2⋯C14ⁱⁱ 3.572(3) Å, Cl2⋯H–C14ⁱⁱ 139.09°, Cl2⋯H–C17ⁱⁱⁱ ($x+1, 2-y, z+0.5$), where Cl2⋯H 2.840, H–C17ⁱⁱⁱ 0.95, Cl2⋯C17ⁱⁱⁱ 3.618(3) Å, Cl2⋯H–C17ⁱⁱⁱ 146.25°.

A strong hydrogen bond between the COOH group which is not involved in coordination to ruthenium(II) atom as proton donor and oxygen atom O2ⁱ of the coordinated COO[−] group of the neighbouring molecule as proton acceptor is evident [O3–H⋯O2ⁱ ($-x+1.5, y-1, z-0.5$) with O3–H 0.76, H⋯O2ⁱ 1.83, O3⋯O2ⁱ 2.569(4) Å, O3–H⋯O2ⁱ 163.6°] in the crystal structure of **7** (Fig. 4). In addition, there are a number of weak hydrogen bonding interactions of the type Cl1⋯H–C6ⁱⁱ ($x, y+1, z$) with Cl1⋯C6ⁱⁱ 3.757(4) Å, Cl1⋯H–C10ⁱⁱⁱ ($x+1, -y+2, z-0.5$) with Cl1⋯C10ⁱⁱⁱ 3.508(4) Å, O4⋯H–C15^{iv} ($1.5-x, y, z-0.5$) with O4⋯C15^{iv} 3.340(5) Å.

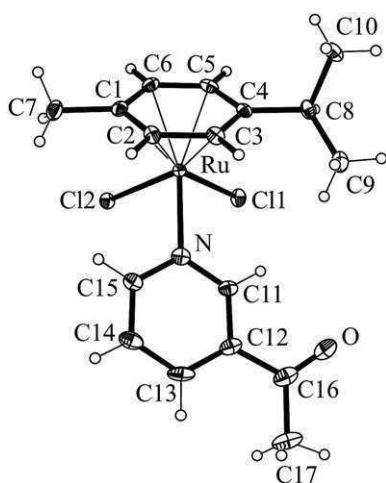


Fig. 2. ORTEP view of the molecule of **1** with atom-labeling scheme and thermal ellipsoids drawn at 50% probability level. Selected bond distances (Å) and angles (°): Ru–N1 2.130(2), Ru–Cl1 2.4029(7), Ru–Cl1 2.3986(7), Ru–Cl1 2.197(3), Ru–C2 2.178(3), Ru–C3 2.183(3), Ru–C4 2.209(3), Ru–C5 2.154(3), Ru–C13 2.161(3), N1–Ru–Cl1 87.61(6), N1–Ru–Cl2 84.50(6), Cl1–Ru–Cl2 87.00(2).

2.4. Cytotoxic activity

Cytotoxicity of investigated complexes **1-10** was determined by MTT assay in six tumor cell lines: HeLa, B16, MDA-MB-361, MDA-MB-453, FemX and LS-174. Activity was determined after incubations for 48 and 72 h. Results of this assay (Table 1) indicate that complexes after 48 h of incubation exhibited very low cytotoxic activity and did not reach IC₅₀ values in the range of applied concentrations (up to 300 μM) in all investigated cell lines. Exceptions were complexes **1** and **10** which had IC₅₀ on HeLa cells.

After prolonged incubation for 72 h investigated complexes did not reach IC₅₀ values (up to 300 μM concentration) in B16, LS-174 and MDA-MB-453 cells. Exception was again complex **10** which had IC₅₀ in MDA-MB-453 cells. However, after 72 h of incubation with HeLa cells complexes **1-3** and **10** revealed IC₅₀ at concentrations below 300 μM. Also, after incubation for 72 h complexes **1, 7** and **10**

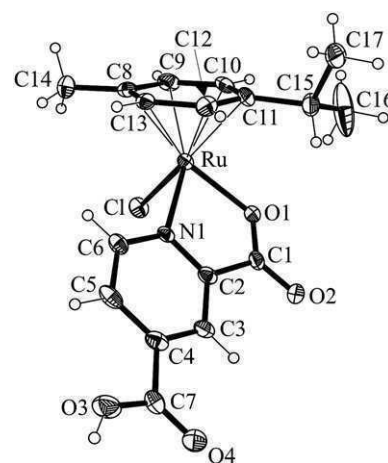


Fig. 3. ORTEP view of the molecule of **7** with atom-labeling scheme and thermal ellipsoids drawn at 50% probability level. Selected bond distances (Å) and angles (deg): Ru–O1 2.099(2), Ru–N1 2.101(3), Ru–Cl1 2.4049(9), Ru–C8 2.203(3), Ru–C9 2.178(3), Ru–C10 2.186(3), Ru–C11 2.187(3), Ru–C12 2.145(3), Ru–C13 2.166(3), O1–Ru–N1 77.94(10).

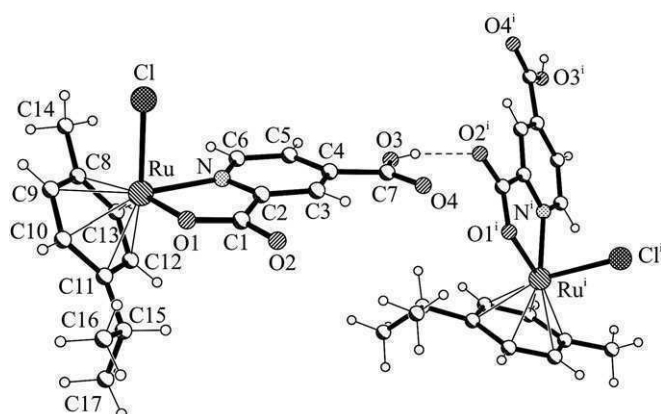


Fig. 4. Part of the crystal structure of **7** showing intermolecular hydrogen bonding interaction.

in FemX cells and complexes **1** and **10** in MDA-MB-361 cells reached IC_{50} values at concentrations below 300 μ M.

Lack of cytotoxic activity *in vitro* was expected for ruthenium compounds, which were shown in a number of cases to possess good antitumor, and above all antimetastatic properties against animal models [34].

2.5. Hydrolysis of **6** and its reactivity towards 9-methyladenine

Hydrolysis of Ru–Cl bond with generation of active intermediates is assumed to be an important step in the mechanism of cytotoxic action.

The hydrolysis of complex **6** was studied by 1H NMR spectroscopy. The 1H NMR spectrum of **6** in D_2O at pH^* 7.4 showed that hydrolysis appeared to be fast and completed by the time the first

spectrum was measured (Fig. 5). Addition of 100 (blood plasma), 22.7 (cytoplasm) and 4 mmol NaCl (cell nucleus), correspondingly, to 2 mmol of complex **6** partially reversed the hydrolysis, resulting in 67:33, 40:60 and 13:87 ratios of chlorido to aqua species. The spectra recorded within 30 min after sample preparation and after incubation at 310 K for 24 h were identical. The similar trend was observed in the spectra of complex **1** (Fig. S1).

The hydrolysis of all complexes was also studied by UV/VIS spectroscopy, dissolving complexes in water and in aqueous solution of 100 mmol NaCl. In the spectra of complexes in water an increase in the intensity of the peaks was observed, while in the spectra of complexes in solution of NaCl no changes were noted. No peaks associated to the free ligand or *p*-cymene were observed. This showed that complexes underwent fast hydrolysis while the rest of molecule being intact. In the case of studied complexes the enhanced hydrolysis is not in correlation with inhibition of tumor cell growth. In addition, the high lability of the chlorido species can be the reason for the low level or even lack of cytotoxicity for **1–9**. The aqua complex formed upon hydrolysis may be deactivated via interaction with other cellular biomolecules before reaching the target [35–37].

DNA is thought to be a key target in the mechanism of action of antitumor agents. The interaction of complex **6** with the model compound 9-methyladenine was studied in order to reveal whether correlation could be found between the extent of interaction and the low activity of complex.

Reaction of complex **6** with 9-methyladenine was studied by one- and two-dimensional NMR spectroscopy. 1H NMR investigation showed that complex **6**, which is fully hydrolyzed immediately after dissolution in D_2O , reacts rapidly with 9-methyladenine. The first spectrum recorded 10 min after mixing the compounds showed the presence of signals attributable to the starting compounds, namely aqua species and 9-methyladenine, the adduct of the hydrolyzed complex **6** with 9-methyladenine and one unidentified

Table 1
Cytotoxicity results for **1–9** after 48 and 72 h incubation.^a

Complex		IC_{50} (μ M)					
		FemX	MDA-MB-361	MDA-MB-453	HeLa	B16	LS-174
1	48 h	>300	>300	>300	275.71 \pm 1.57	n.d.	n.d.
	72 h	220.50 \pm 6.36	290.02 \pm 6.65	>300	244.00 \pm 1.91	>300	>300
2	48 h	>300	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72 h	>300	>300	>300	295.75 \pm 2.95	>300	>300
3	48 h	>300	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72 h	>300	>300	>300	283.20 \pm 3.12	>300	>300
4	48 h	>300	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72 h	>300	>300	>300	>300	>300	>300
5	48 h	>300	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72 h	>300	>300	>300	>300	>300	>300
6	48 h	>300	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72 h	>300	>300	>300	>300	>300	>300
7	48 h	>300	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72 h	269.86 \pm 8.53	>300	>300	>300	>300	>300
8	48 h	>300	>300	>300	>300	n.d.	n.d.
	72 h	>300	>300	>300	>300	>300	>300
9	48 h	>300	n.d.	n.d.	>300	n.d.	n.d.
	72 h	>300	>300	>300	>300	>300	>300
10^b	48 h	>300	n.d.	n.d.	211.00 \pm 1.20	n.d.	n.d.
	72 h	149.26 \pm 9.60	202.21 \pm 2.77	220.25 \pm 7.63	212.97 \pm 2.14	>300	>300

The sign (>) indicates that IC_{50} value is not reached in the examined range of concentrations (the sign is in front of the maximum value of the concentration in the examined range of concentrations).

n.d. for not determined.

^a The results are presented in terms of IC_{50} values that are determined from cell survival diagrams. Values of IC_{50} represent the average of the three experiments, with each experiment performed in three replicates.

^b The complex **10** is $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$.

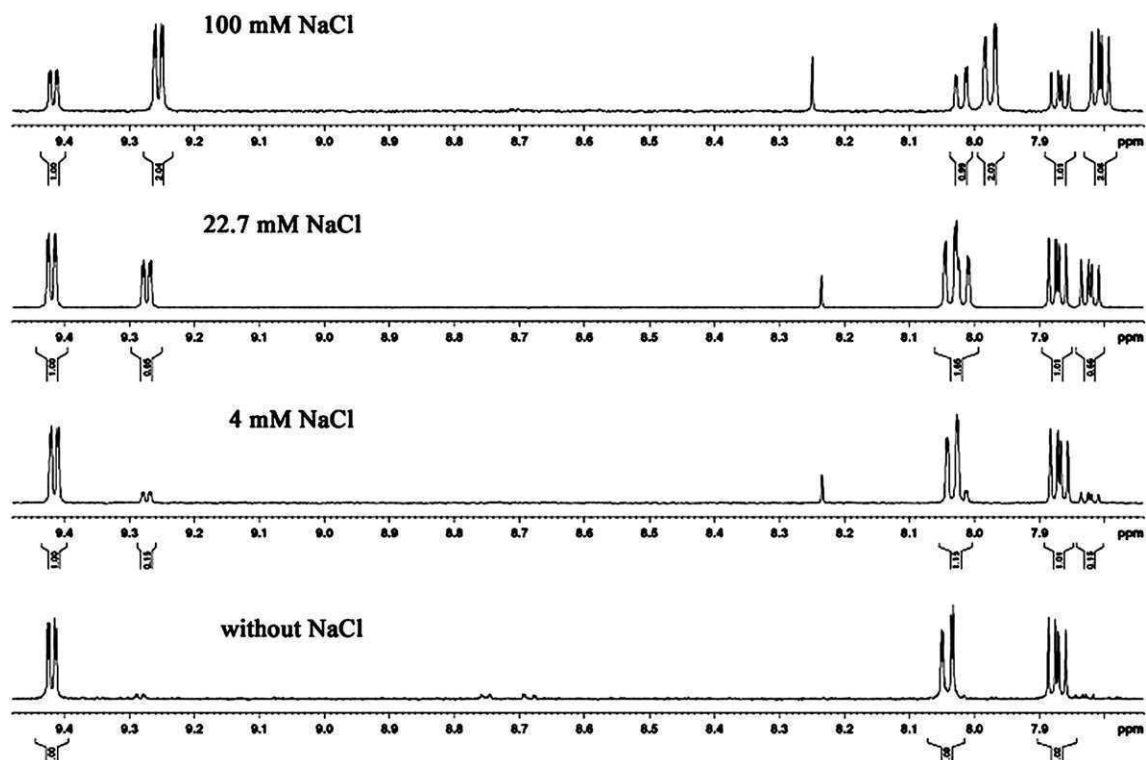


Fig. 5. Part of ^1H NMR spectra of complex **6** in D_2O and solutions of NaCl.

minor product. The spectra recorded after 3 h and later (up to 24 h) remained unchanged suggesting that the equilibrium was reached. Three well separated H6 doublets at 9.62, 9.57 and 9.33 ppm, belonging to the minor product, 9-methyladenine adduct and initial compound, respectively, allowed us to monitor the quantitative changes in the reaction mixture with time (Fig. 6). The integral ratio of H6 protons of the minor product, the main adduct and original aqua complex gradually changed from 0.4:0.5:0.9 to 0.2:1.1:0.5 in the solution measured 10 min and 3 h after mixing, respectively, and then remained unchanged till the end of the experiment (24 h). A number of other well-resolved ^1H signals followed the same behaviour. Obviously, the amount of the starting compounds and the minor product decrease on behalf of the major product during 3 h, when reaction reaches equilibrium and the yield of the major product is ca. 60%. COSY and NOESY spectra measured 24 h after mixing, enabled the assignment of protons of the species in the

reaction mixture. Furthermore, NOE correlations unambiguously proved that the major product is the complex-adenine adduct.

3. Conclusion

Organoruthenium(II) complexes containing the *p*-cymene ligand and a pyridine derivative coordinated in a monodentate or bidentate manner were prepared and characterized by standard analytical techniques. The cytotoxicity of the complexes in six tumor cell lines was found to be very low. In addition, the compounds display no significant differences in cytotoxicity in investigated tumor cell lines, indicating poor selectivity. The complexes containing 3-acetylpyridine, 4-acetylpyridine, 2-amino-5-chloropyridine and 2,4-pyridinedicarboxylic acid were slightly more effective than the other compounds studied in this assay.

The results of this work imply that there is no simple correlation between fast hydrolysis of complexes, high-yield reaction with 9-methyladenine and inhibition of tumor cells growth. It is obviously that for these ruthenium complexes hydrolysis and interaction with 9-methyladenine are not the only prerequisites for inhibition of tumor cell growth. The high lability of the chlorido species can be even the reason for the low level or even lack of cytotoxicity. The aqua complex formed upon hydrolysis may be deactivated via interaction with other cellular biomolecules before reaching the target. To achieve desired cytotoxic activity, a type of complex-DNA adduct as well as plenty of other interactions with DNA molecule must be involved.

4. Experimental

4.1. Materials and measurements

3-acetylpyridine, 4-acetylpyridine, 2-amino-5-chloropyridine, isonicotinic acid, nicotinic acid, 2,3-pyridinedicarboxylic acid, 2,4-

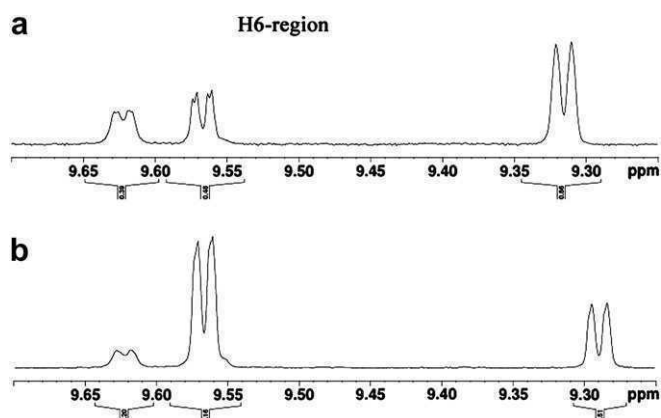


Fig. 6. Part of ^1H NMR spectra of complex **6** and 9-methyladenine (a) 10 min after mixing; (b) 3 h after mixing.

pyridinedicarboxylic acid, 2,5-pyridinedicarboxylic acid, 2,6-pyridinedicarboxylic acid were purchased from Acros organics and used without further purification.

$[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$ (**10**) was prepared according to published procedure [38]. Elemental analyses were carried out with Elemental Vario EL III microanalyzer. Infrared spectra were recorded on a Nicolet 6700 FT-IR spectrometer using ATR technique. UV/Vis spectra were recorded on a GBC Cintra 6 spectrophotometer. The NMR spectra of **1–9** (including ^1H , ^1H COSY and ^1H , ^1H NOESY) were recorded on a Varian Gemini 200 instrument or Bruker Avance III 500 spectrometer (500.26 MHz for ^1H). Chemical shifts for ^1H and ^{13}C spectra were referenced to residual ^1H and ^{13}C presented in deuterated dimethylsulfoxide. The hydrolytic behaviour of **1** and **6** and the reaction of equimolar amounts of **6** with 9-methyladenine at pH* 7.4 and 310 K in D_2O were followed by ^1H NMR spectroscopy over 24 h. The pH was adjusted with diluted NaOD and solutions were allowed to equilibrate at 310 K before mixing. Mass spectra measurements were carried out on an MS system consisted of 6210 TOF LC/MS (G1969 A, Agilent Technologies) in water and in methanol solutions.

4.2. Synthesis of complexes

4.2.1. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}_2(\text{L}^1)]$ (**1**)

To a suspension of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$ (0.120 g, 0.20 mmol) in isopropanol (15 cm^3), 3-acetylpyridine (L^1) (0.05 cm^3 , 0.43 mmol) in isopropanol (5 cm^3) was added at room temperature and the mixture was stirred for 135 min. The orange product was filtered off, washed with several drops of isopropanol, diethyl ether and dried in air (0.13 g, 76.1%). Found: C, 47.63; H, 4.99; N, 3.62; Calc. for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{NORu}$ (M_r 427.36): C, 47.77; H, 4.96; N, 3.28%; $\nu_{\text{max}}(\text{ATR})/\text{cm}^{-1}$ 3051 (m), 2960 (m), 1690 (s), 1593 (m); δ_{H} (199.97 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 9.12 (1H, s, C2H), 8.79 (1H, d, J 4, C6H), 8.27 (1H, d, J 6.4, C4H), 7.57 (1H, dd, J 4.8 and 5.6, C5H), 5.79 (4H, 2d, J 6.4 and 10, $4 \times \text{CH}(\text{arene})$), 2.83 (1H, m, J 6.8, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.63 (3H, s, C8H₃), 2.08 (3H, s, CH₃), 1.21 (6H, d, J 7, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); δ_{C} (50.28 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 18.03 (CH₃), 21.66 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 30.14 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 81.56, 82.98, 85.69, 86.55, 100.30, 106.60 ($\text{CH}(\text{arene})$), 149.71 (C2), 132.15 (C3), 135.78 (C4), 124.08 (C5), 153.64 (C6), 197.69 (C7), 27.10 (C8); ESI-MS (H_2O): m/z 392 [$\text{M} - \text{Cl}$]⁺.

4.2.2. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}_2(\text{L}^2)]$ (**2**)

To a warm solution of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$ (0.120 g, 0.20 mmol) in isopropanol (35 cm^3), 4-acetylpyridine (L^2) (0.05 cm^3 , 0.43 mmol) in isopropanol (5 cm^3) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 40 min and the dark-yellow product formed was filtered off, washed with several drops of isopropanol, diethyl ether and dried in air (0.15 g, 89.6%). Found: C, 47.42; H, 4.91; N, 3.21; Calc. for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{NORu}$ (M_r 427.36): C, 47.77; H, 4.96; N, 3.28%; $\nu_{\text{max}}(\text{ATR})/\text{cm}^{-1}$ 3061 (w), 2965 (w), 1696 (s), 1550 (m); δ_{H} (199.97 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 8.82 (2H, 2d, J 1.6 and 4.4, C2H and C6H), 7.82 (2H, 2d, J 1 and 3.8, C3H and C5H), 5.80 (4H, 2d, J 6.2 and 9.4, $4 \times \text{CH}(\text{arene})$), 2.84 (1H, m, J 6.8, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.63 (3H, s, C8H₃), 2.09 (3H, s, CH₃), 1.19 (6H, d, J 7.2, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); δ_{C} (50.28 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 18.05 (CH₃), 21.67 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 30.16 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 81.67, 83.25, 85.73, 86.57, 100.30, 106.58 ($\text{CH}(\text{arene})$), 151.06 (C2), 121.53 (C3), 142.78 (C4), 121.53 (C5), 151.06 (C6), 180.41 (C7), 27.08 (C8); ESI-MS (H_2O): m/z 392 [$\text{M} - \text{Cl}$]⁺.

4.2.3. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}_2(\text{L}^3)]$ (**3**)

To a warm solution of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$ (0.100 g, 0.16 mmol) in isopropanol (25 cm^3), 2-amino-5-chloropyridine (L^3) (0.046 g, 0.35 mmol) in isopropanol (8 cm^3) was added. The mixture was stirred at room temperature for 3.5 h. The yellow-orange product was filtered off, washed with several drops of

isopropanol, diethyl ether and dried in air (0.12 g, 86.3%). Found: C, 41.38; H, 4.58; N, 6.38; Calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{Ru}$ (M_r 434.78): C, 41.43; H, 4.41; N, 6.44%; $\nu_{\text{max}}(\text{ATR})/\text{cm}^{-1}$ 3438 (w), 3280 (w) 3056, 2967 (vw), 1618, 1591 (m); δ_{H} (199.97 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 7.87 (1H, d, J 2.2, C6H), 7.40 (1H, 2d, J 2.8 and 8.8, C4H), 6.44 (1H, d, J 9, C3H), 6.13 (2H, s, NH₂), 5.80 (4H, 2d, J 6.8 and 10, $4 \times \text{CH}(\text{arene})$), 2.83 (1H, m, J 7.2, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.08 (3H, s, CH₃), 1.19 (6H, d, J 6.6, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); δ_{C} (50.28 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 18.05 (CH₃), 21.67 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 30.16 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 85.73, 86.57, 100.30, 106.56 ($\text{CH}(\text{arene})$), 158.76 (C2), 109.49 (C3), 136.95 (C4), 117.54 (C5), 145.89 (C6).

4.2.4. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}_2(\text{HL}^4)]$ (**4**)

To a warm solution of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$ (0.100 g, 0.16 mmol) in isopropanol (25 cm^3), isonicotinic acid (HL^4) (0.043 g, 0.36 mmol) suspended in isopropanol (15 cm^3) was added. The mixture was stirred at room temperature for 1 h 45 min. The dark-yellow precipitate was filtered off, washed with several drops of isopropanol, diethyl ether and dried in air (0.10 g, 72.8%). Found: C, 45.07; H, 5.05; N, 2.97; Calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{Ru}$ (M_r 429.33): C, 44.76; H, 4.47; N, 3.26%; $\nu_{\text{max}}(\text{ATR})/\text{cm}^{-1}$ 3066 (w), 2972 (w), 1707 (m), 1613, 1556 (w); δ_{H} (199.97 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 8.78 (2H, 2d, J 1.4 and 4.4, C6H and C2H), 7.82 (2H, 2d, J 1.6 and 4.4, C3H and C5H), 5.80 (4H, 2d, J 6.6 and 10, $4 \times \text{CH}(\text{arene})$), 2.84 (1H, m, J 7, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.09 (3H, s, CH₃), 1.12 (6H, 2d, J 7 and 6.2, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); δ_{C} (50.28 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 18.05 (CH₃), 21.67 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 30.16 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 85.71, 86.57, 100.30, 106.58 ($\text{CH}(\text{arene})$), 150.88 (C2), 122.98 (C3), 137.70 (C4), 122.98 (C5), 150.88 (C6), 166.44 (C7); ESI-MS (H_2O): m/z 394 [$\text{M} - \text{Cl}$]⁺.

4.2.5. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}_2(\text{HL}^5)]$ (**5**)

To a warm solution of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$ (0.100 g, 0.16 mmol) in isopropanol (30 cm^3), nicotinic acid (HL^5) (0.043 g, 0.36 mmol) in isopropanol (8 cm^3) was added. The mixture was stirred at room temperature for 7 days. The orange-red microcrystalline product was filtered off after three weeks, washed with several drops of isopropanol, diethyl ether and dried in air (0.125 g, 91.0%). Found: C, 44.50; H, 4.41; N, 3.28; Calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{NO}_2\text{Ru}$ (M_r 429.33): C, 44.76; H, 4.47; N, 3.26%; $\nu_{\text{max}}(\text{ATR})/\text{cm}^{-1}$ 3057 (m), 1725 (s), 1600 (m); δ_{H} (199.97 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 13.50 (1H, s, COOH), 9.08 (1H, d, J 2, C2H), 8.79 (1H, d, J 4.8, C6H), 8.28 (1H, d, J 7.8 C4H), 7.56 (1H, 2d, J 4.7 and 7.8, C5H), 5.81 (4H, 2d, J 6.4 and 9.8, $4 \times \text{CH}(\text{arene})$), 2.84 (1H, m, J 7, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.09 (3H, s, CH₃), 1.19 (6H, d, J 7, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); δ_{C} (50.28 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 18.07 (CH₃), 21.69, ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 30.18 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 85.73, 86.58, 100.31, 106.60 ($\text{CH}(\text{arene})$), 150.46 (C2), 127.03 (C3), 137.24 (C4), 124.08 (C5), 153.55 (C6), 166.54 (C7); ESI-MS (H_2O): m/z 394 [$\text{M} - \text{Cl}$]⁺.

4.2.6. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{HL}^6)]$ (**6**)

To a suspension of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$ (0.100 g, 0.16 mmol) in isopropanol (25 cm^3), 2,3-pyridinedicarboxylic acid (H_2L^6) (0.062 g, 0.36 mmol) in isopropanol (5 cm^3) was added. The mixture was stirred at room temperature for 3 h. The light-yellow precipitate was filtered off, washed with several drops of isopropanol, diethyl ether and dried in air (0.13 g, 93%). Found: C, 46.74; H, 4.20; N, 3.20; Calc. for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClNO}_4\text{Ru}$ (M_r 436.84): C, 46.73; H, 4.16; N, 3.21%; $\nu_{\text{max}}(\text{ATR})/\text{cm}^{-1}$ 2970 (vw), 1725 (s), 1602 (m), 1580, 1541 (s); δ_{H} (199.97 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 13.80 (1H, s, COOH), 9.33 (1H, d, J 4.4, C6H), 8.14 (1H, d, J 7.9, C4H), 7.80 (1H, 2d, J 5 and 7.8, C5H), 5.88 (2H, d, J 6, $2 \times \text{CH}(\text{arene})$), 5.68 (2H, t, J 6.2, $2 \times \text{CH}(\text{arene})$), 2.74 (1H, m, J 6.6, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.15 (3H, s, CH₃), 1.15 (6H, 2d, J 6.8 and 3.4, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); δ_{C} (50.28 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 18.25 (CH₃), 22.06 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 30.70 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 80.47, 81.32, 82.68, 82.69, 98.44, 101.55 ($\text{CH}(\text{arene})$), 146.29 (C2), 128.15 (C3), 138.02 (C4), 134.14 (C5), 154.81 (C6), 154.82 (C7), 167.32 (C8); ESI-MS (H_2O): m/z 402 [$\text{M} - \text{Cl}$]⁺, (CH_3OH): m/z 438 [$\text{M} + \text{H}$]⁺.

4.2.7. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{HL}^7)]$ (**7**)

To a warm solution of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$ (0.100 g, 0.16 mmol) in isopropanol (25 cm³), 2,4-pyridinedicarboxylic acid (H_2L^7) (0.062 g, 0.36 mmol) in isopropanol (8 cm³) was added. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The yellow-orange product was filtered off, washed with several drops of isopropanol, diethyl ether and dried in air (0.10 g, 71.5%); Found: C, 46.28; H, 4.17; N, 3.16; Calc. for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClNO}_4\text{Ru}$ (M_r 436.84): C, 46.73; H, 4.16; N, 3.21%; ν_{max} (ATR)/cm⁻¹ 3058 (w), 2967 (vw), 1715 (s), 1626 (s), 1598 (s), 1560 (s); δ_{H} (199.97 MHz, DMSO-*d*₆) 9.45 (1 H, d, *J* 5.2, C6H), 8.10 (1 H, s, C5H), 8.06 (1 H, d, *J* 4.3, C3H), 5.92 (2 H, 2d, *J* 3.4 and 5, 2 × CH(arene)), 5.70 (2 H, t, *J* 6.2, 2 × CH(arene)), 2.74 (1 H, m, *J* 6.8, CH(CH₃)₂), 2.16 (3 H, s, CH₃), 1.13 (6 H, 2d, *J* 4 and 7.4, CH(CH₃)₂); δ_{C} (50.28 MHz, DMSO-*d*₆) 18.27 (CH₃), 21.95 (CH(CH₃)₂), 30.65 (CH(CH₃)₂), 80.49, 81.49, 82.82, 83.04, 98.75, 101.72 (CH(arene)), 151.86 (C2), 127.04 (C3), 141.21 (C4), 124.06 (C5), 155.16 (C6), 164.95 (C7), 170.01 (C8); ESI-MS (H_2O): *m/z* 402 [M – Cl]⁺, (CH₃OH): *m/z* 438 [M + H]⁺.

4.2.8. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{HL}^8)]$ (**8**)

To a solution of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$ (0.120 g, 0.20 mmol) in isopropanol (35 cm³), 2,5-pyridinedicarboxylic acid (H_2L^8) (0.072 g, 0.43 mmol) in isopropanol (10 cm³) was added. The mixture was stirred at room temperature for 4.5 h. The dark orange product was filtered off, washed with several drops of isopropanol, diethyl ether and dried in air (0.14 g, 81.75%). Found: C, 46.53; H, 4.28; N, 3.96; Calc. for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClNO}_4\text{Ru}$ (M_r 436.84): C, 46.73; H, 4.16; N, 3.21%; ν_{max} (ATR)/cm⁻¹ 3066 (w), 2958 (vw), 1710 (m), 1603 (s), 1571 (s); δ_{H} (199.97 MHz, DMSO-*d*₆) 9.49 (1 H, s, C6H), 8.51 (1 H, d, *J* 8, C4H), 7.89 (1 H, d, *J* 8, C3H), 5.96 (2 H, t, *J* 6.2, 2 × CH(arene)), 5.70 (2 H, d, *J* 6.4, 2 × CH(arene)), 2.75 (1 H, m, *J* 6.8, CH(CH₃)₂), 2.15 (3 H, s, CH₃), 1.14 (6 H, 2d, *J* 5.6 and 6.6, CH(CH₃)₂); δ_{C} (50.28 MHz, DMSO-*d*₆) 18.32 (CH₃), 22.06 (CH(CH₃)₂), 30.70 (CH(CH₃)₂), 80.03, 80.67, 83.11, 83.20, 99.11, 101.15 (CH(arene)), 153.28 (C2), 125.60 (C3), 140.55 (C4), 130.98 (C5), 154.26 (C6), 169.85 (C7), 164.70 (C8); ESI-MS (H_2O): *m/z* 402 [M – Cl]⁺, (CH₃OH): *m/z* 438 [M + H]⁺.

4.2.9. $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{HL}^9)]$ (**9**)

To a warm solution of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{RuCl}_2]_2$ (0.100 g, 0.16 mmol) in isopropanol (25 cm³), 2,6-pyridinedicarboxylic acid (H_2L^9) (0.062 g, 0.36 mmol) in isopropanol (8 cm³) was added. The mixture was stirred at room temperature for 4 days. The orange precipitate was filtered off, washed with several drops of isopropanol, diethyl ether and dried in air (0.12 g, 82.42%). Found: C, 44.37; H, 4.30; N, 3.08; Calc. for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClNO}_4\text{Ru} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (M_r 454.87): C, 44.89; H, 4.43; N, 3.08%; ν_{max} (ATR)/cm⁻¹ 2970 (vw), 1657 (s), 1599 (m), δ_{H} (199.97 MHz, DMSO-*d*₆) 13.50 (1 H, s, COOH), 8.18 (1 H, m, *J* 3.4, C4H), 7.90 (1 H, d, *J* 1.6, C3H), 7.90 (1 H, d, *J* 2.8, C5H), 5.79 (2 H, t, *J* 3.4, 2 × CH(arene)), 5.63 (2, d, *J* 6.2, 2 × CH(arene)), 2.68 (1 H, m, *J* 6.6, CH(CH₃)₂), 2.16 (3 H, s, CH₃), 1.14 (6 H, 2d, *J* 7.4 and 10.2, CH(CH₃)₂); δ_{C} (50.28 MHz, DMSO-*d*₆) 18.05 (CH₃), 21.67 (CH(CH₃)₂), 30.58 (CH(CH₃)₂), 79.52, 81.30, 85.73, 86.57, 100.30, 106.60 (CH(arene)), 148.36 (C2), 127.74 (C3), 139.48 (C4), 127.74 (C5), 148.36 (C6), 165.72 (C7), 165.72 (C8); ESI-MS (H_2O): *m/z* 402 [M – Cl]⁺.

4.3. Crystallographic structure determination

X-ray diffraction quality single crystals of **1** and **7** were selected directly from the reaction vessel. The measurements were performed on Bruker X8 APEXII CCD diffractometer. Single crystals were positioned at 35 and 40 mm from the detector and 1185 and 2076 frames were measured, each for 50 and 20 s over 1° scan width for **1** and **7**, correspondingly. The data were processed using SAINT software [39]. Crystal data, data collection parameters, and structure refinement details are given in Table 2. The structure was

Table 2

Crystal data and details of data collection for **1** and **7**.

Complex	1	7
Empirical formula	C ₁₇ H ₂₁ Cl ₂ NORu	C ₁₇ H ₁₈ ClNO ₄ Ru
<i>F_w</i>	427.32	436.84
Space group	Cc	Pca2 ₁
<i>a</i> , Å	9.6983(6)	25.7032(6)
<i>b</i> , Å	29.152(2)	6.1267(1)
<i>c</i> , Å	7.0000(4)	10.7704(3)
<i>V</i> , Å ³	1714.17(19)	1696.08(7)
<i>Z</i>	4	4
λ , Å	0.71073	0.71073
ρ_{calcd} , g cm ⁻³	1.656	1.711
Crystal size, mm ³	0.35 × 0.05 × 0.03	0.25 × 0.20 × 0.20
<i>T</i> , K	100	100
μ , cm ⁻¹	12.27	11.02
Flack parameter	–0.05(2)	–0.01(3)
<i>R</i> ¹	0.0285	0.0263
<i>wR</i> ² _b	0.0535	0.0731
<i>GOF</i> ^c	0.973	1.067

$$^a R1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|.$$

$$^b wR2 = \{ \sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum [w(F_o^2)^2] \}^{1/2}.$$

^c $GOF = \{ \sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / (n - p) \}^{1/2}$, where *n* is the number of reflections and *p* is the total number of parameters refined.

solved by direct methods and refined by full-matrix least-squares techniques. Non-hydrogen atoms were refined with anisotropic displacement parameters. H atoms were placed at calculated positions and refined as riding atoms in the subsequent least-squares model refinements. The isotropic thermal parameters were estimated to be 1.2 times the values of the equivalent isotropic thermal parameters of the non-hydrogen atoms to which hydrogen atoms were bonded. The following software, personal computer and table were used: structure solution, SHELXS-97 [40], refinement, SHELXL-97 [41], molecular diagrams, ORTEP [42], Pentium IV; scattering factors [43].

4.4. Cytotoxicity

4.4.1. Cell culture

Human cervix carcinoma cells (HeLa), murine melanoma cells (B16), human melanoma cells (FemX), breast cancer cells (MDA-MB-361 and MDA-MB-453) and human colon cancer cells (LS-174) were maintained as monolayer culture in the Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 nutrient medium (Sigma Chemicals Co, USA). RPMI 1640 nutrient medium was prepared in sterile ionized water, supplemented with penicillin (192 U/ml), streptomycin (200 µg/ml), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) (25 mM), L-glutamine (3 mM) and 10% of heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (pH 7.2). The cells were grown at 37 °C in 5% CO₂ and humidified air atmosphere.

4.4.2. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity of **1–10** was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) assay [44]. Cells were seeded in 96-well cell culture plates (NUNC) 2000 c/w (HeLa, FemX and B16), 1500 c/w (MDA-MB-453) and 7000c/w (MDA-MB-361 and LS-174) in culture medium and grown for 24 h. Compounds were dissolved in DMSO and further diluted with nutrient medium to desired concentrations (up to 300 µM). Final concentration of DMSO never exceeded 1%. Solutions of various concentrations of examined compounds were added to the wells, except the control wells where only nutrient medium was added. All tests were carried out in triplicate. Nutrient medium with corresponding agent concentrations, but without target cells was used as blank, also in triplicate. After incubation periods of 48 and 72 h, 20 µl of MTT solution, 5 mg/ml in phosphate buffer solution, pH 7.2 were

added to each well. Samples were incubated for 4 h at 37 °C, with 5% CO₂ in humidified atmosphere. Formazan crystals were dissolved in 100 μl of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) in 0.01 M HCl. Absorbances were recorded on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader after 24 h at the wavelength of 570 nm. IC₅₀ (μM) values were determined from the cell survival diagrams.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Science, Republic of Serbia, Grants' No. 142010, 142062 and 145035. We also thank Alexander Roller for collection of X-ray data for **1** and **7**.

Appendix. Supplementary data

Crystallographic data for **1** and **7** has been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center as supplementary publications no. CCDC 737856 and no. CCDC 715878. Copies of the data can be obtained free of charge on application to The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: +44 1223 336 033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

Fig. S1. Part of ¹H NMR spectra of complex **1** in D₂O and solutions of NaCl.

The supplementary materials can be viewed at [doi:10.1016/j.ejmech.2009.11.055](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.11.055).

References

- [1] Y.K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P.J. Sadler, *Chem. Commun.* (2005) 4764–4776.
- [2] M. Melchart, P.J. Sadler, in: G. Jaouen (Ed.), *Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, pp. 39–62.
- [3] F. Schmitt, P. Govindaswamy, G. Süß-Fink, W.H. Ang, P.J. Dyson, L. Juillerat-Jeanneret, B. Therrien, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 1811–1816.
- [4] W.F. Schmid, R.O. John, V.B. Arion, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, *Organometallics* 26 (2007) 6643–6652.
- [5] C.A. Vock, C. Scolaro, A.D. Phillips, R. Scopelliti, G. Sava, P.J. Dyson, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 5552–5561.
- [6] C.A. Vock, W.H. Ang, C. Scolaro, A.D. Phillips, L. Lagopoulos, L. Juillerat-Jeanneret, G. Sava, R. Scopelliti, P.J. Dyson, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 2166–2175.
- [7] L.D. Dale, J.H. Tocher, T.M. Dyson, D.I. Edwards, D.A. Tocher, *Anti-Cancer Drug Des.* 7 (1992) 3–14.
- [8] R.E. Aird, J. Cummings, A.A. Ritchie, M. Muir, R.E. Morris, H. Chen, P.J. Sadler, D.I. Jodrell, *Br. J. Cancer* 86 (2002) 1652–1657.
- [9] R.E. Morris, R.E. Aird, P.D.S. Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N.D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D.I. Jodrell, P.J. Sadler, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 3616–3621.
- [10] A. Habtemariam, M. Melchart, R. Fernández, S. Parsons, I.D.H. Oswald, A. Parkin, F.P.A. Fabbiani, J.E. Davidson, A. Dawson, R.E. Aird, D.I. Jodrell, P.A. Sadler, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 6858–6868.
- [11] M. Melchart, A. Habtemariam, S. Parsons, S.A. Moggach, P.J. Sadler, *Inorg. Chim. Acta* 359 (2006) 3020–3028.
- [12] W.H. Ang, P.J. Dyson, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2006) 4003–4018.
- [13] C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchiello, G. Laurency, T.J. Geldbach, G. Sava, P.J. Dyson, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 4161–4171.
- [14] C.S. Allardyce, A. Dorcier, C. Scolaro, P.J. Dyson, *Appl. Organomet. Chem.* 19 (2005) 1–10.
- [15] S.J. Dougan, M. Melchart, A. Habtemariam, S. Parsons, P.J. Sadler, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 10882–10894.
- [16] B. Dutta, C. Scolaro, R. Scopelliti, P.J. Dyson, K. Severin, *Organometallics* 27 (2008) 1355–1357.
- [17] C.A. Vock, A.K. Renfrew, R. Scopelliti, L. Juillerat-Jeanneret, P.J. Dyson, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2008) 1661–1671.
- [18] A. Galeano, M.R. Berger, B.K. Keppler, *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 42 (1992) 821–824.
- [19] G. Sava, R. Gagliardi, A. Bergamo, E. Alessio, G. Mestroni, *Anticancer Res.* 19 (1999) 969–972.
- [20] S. Kapitza, M. Pongratz, M.A. Jakupec, P. Heffeter, W. Berger, L. Lackinger, B.K. Keppler, B. Marian, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 131 (2005) 101–110.
- [21] J.M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 3717–3727.
- [22] P.J. Dyson, G. Sava, *Dalton Trans.* (2006) 1929–1933.
- [23] C. Dette, H. Waertz, H. Uhl, *Pharmazie* 48 (1993) 276–280.
- [24] K. Tochikubo, Y. Hachisuka, T. Murachi, *Jpn. J. Microbiol.* 12 (1968) 435–440.
- [25] Y. Hachisuka, K. Tochikubo, Y. Yokoi, T. Murachi, *J. Biol. Chem.* 61 (1967) 659–661.
- [26] D.L. Griggs, P. Heden, K.E. Temple Smith, W. Rademacher, *Phytochemistry* 30 (1991) 2513–2517.
- [27] B.L. Martin, *Arch. Biochem. Biophys.* 345 (1997) 332–338.
- [28] P. Laine, A. Gourdon, J.P. Launay, *Inorg. Chem.* 34 (1995) 5129–5137.
- [29] A.G. Mauk, C.L. Coyle, E. Bardingnon, H.B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 5054–5056.
- [30] J.T. Groves, I.O. Kady, *Inorg. Chem.* 32 (1993) 3868–3972.
- [31] N. Farrell, L.R. Kelland, in: N.P. Farrell (Ed.), *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*, Humana Press, Totowa, 2000, pp. 321–338.
- [32] A.M. Baruah, A. Karmakar, J.B. Baruah, *Polyhedron* 26 (2007) 4518–4524.
- [33] P. Sengupta, S. Ghosh, T.C.W. Mak, *Polyhedron* 20 (2001) 975–980.
- [34] I. Kostova, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 1085–1107.
- [35] T. Gianferrara, I. Bratsos, E. Alessio, *Dalton Trans.* (2009) 7588–7598.
- [36] A. Bergamo, L. Messori, F. Paccioli, M. Cocchiello, G. Sava, *Invest. New Drugs* 21 (2003) 401–411.
- [37] A. Levina, A. Mitra, P.A. Lay, *Metalomics* 1 (2009) 458–470.
- [38] S.B. Jensen, S.J. Rodger, M.D. Spicer, *J. Organomet. Chem.* 556 (1998) 151–158.
- [39] SAINT-Plus (Version 7.06a) and APEX2. Bruker-Nonius AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA, 2004.
- [40] G.M. Sheldrick, *SHELXS-97*, Program for Crystal Structure Solution. University Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
- [41] G.M. Sheldrick, *SHELXS-97*, Program for Crystal Structure Refinement. University Göttingen, Göttingen, Germany, 1997.
- [42] G.K. Johnson, Report ORNL-5138. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, 1976.
- [43] A.J.C. Wilson (Ed.), *International Tables for X-ray Crystallography*, vol. C, Kluwer Academic Press, Dodrecht, The Netherlands, 1992 Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4.
- [44] R. Supino, in: S. O'Hare, C.K. Atterwill (Eds.), *Methods in Molecular Biology, in Vitro Toxicity Testing Protocols*, Humana Press, New Jersey, 1995, pp. 137–149.



X-Ray structure and cytotoxic activity of a picolinate ruthenium(II)–arene complex

IVANKA IVANOVIĆ¹, SANJA GRGURIĆ-ŠIPKA^{1*#}, NEVENKA GLIGORIJEVIĆ²,
SINIŠA RADULOVIĆ², ALEXANDER ROLLER³, ŽIVOSLAV LJ. TEŠIĆ^{1#}
and BERNHARD K. KEPPLER³

¹Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12-16, 11 000 Belgrade

²Institute of Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14, 11000 Belgrade, Serbia
and ³Institute of Inorganic Chemistry, University of Vienna, Währinger Str. 42,
1090 Vienna, Austria

(Received 17 May, revised 17 August 2010)

Abstract: A ruthenium(II)–arene complex with picolinic acid, $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{pico})]\cdot\text{H}_2\text{O}$, was prepared by the reaction of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}_2]_2$ with picolinic acid in a 1:2 molar ratio in 2-propanol. The compound was characterized by elemental analysis, and IR and NMR spectroscopy. X-ray diffraction analysis showed that the molecule adopts a “three-leg piano-stool” geometry, which is common for this type of complexes. The cytotoxic activity of the complex was tested in two human cancer cell lines HeLa (cervix) and FemX (melanoma) by MTT assay. The IC_{50} values were at 82.0 and 36.2 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ for HeLa and FemX cells, respectively.

Keywords: ruthenium(II)–arene; picolinic acid; cytotoxic activity.

INTRODUCTION

The structures and chemical properties of metal complexes of some pyridine carboxylates have been widely investigated.^{1–5} Picolinic acid (2-pyridinecarboxylic acid) is a biologically important ligand incorporated into some enzymes, and it is an active agent in some drugs as well.^{6–11} It is also catabolite of L-tryptophan detected in the human body.^{12,13} Picolinates are used as dietary supplements. In particular, the chromium(III) complex reduces diabetes risk and therefore is used as a dietary supplement for obese people.¹⁴ Zinc picolinate revealed an effect in the oxidant–antioxidant balance in patients with chronic obstructive pulmonary disease.¹⁵ Alkaline picolinates inhibit the growth of *Escherichia coli*.^{16,17} Platinum complexes with picolinic acid have been synthesized and screened for cytotoxic activity.¹⁸

* Corresponding author. E-mail: sanjag@chem.bg.ac.rs

Serbian Chemical Society member.

doi: 10.2298/JSC100517017I

In recent years, ruthenium complexes have gained much attention^{19–23} in attempts to overcome the downsides of platinum complexes. Organometallic complexes and half-sandwich complexes of Ru(II) emerged as promising scaffolds for anticancer drug design.^{24–35} They often show aqueous solubility along with the necessary lipophilicity. The electronic system of the arene ligand stabilizes the metal in its lower oxidation state and also provides a hydrophobic face in the complex, which might enhance transport of ruthenium through cell membranes. In addition, ruthenium compounds possess good cytotoxic activity, while not notably affecting normal cells.^{36,37} One aspect of the action of ruthenium complexes is their ability to bind with the serum proteins: transferrin and albumin.³⁸ Tumor cells are more susceptible to ruthenium complexes due to an increased demand for iron and therefore there is an increased number of transferrin receptors on their surface.^{39,40} In addition, because ruthenium can mimic iron in binding to carrier proteins, its excess can be removed from cells, which is the reason for lower toxicity of ruthenium complexes compared to platinum complexes.³⁹

Recently, two series of Ru(II)-arene complexes with functionalized pyridines were described of the general formulae $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{XY})\text{Cl}]$ and $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{X})\text{Cl}_2]$, where XY were the mono-anionic N,O-bidentates 2,3-pyridine-, 2,4-pyridine-, 2,5-pyridine- and 2,6-pyridine-dicarboxylate, while X were monodentate ligands 3-acetylpyridine, 4-acetylpyridine, 2-amino-5-chloropyridine, isonicotinic or nicotinic acid bound to ruthenium(II) *via* the pyridine nitrogen.⁴¹

Herein the X-ray diffraction structure of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}(\text{pico})\text{Cl}]$ and its antiproliferative activity in two human cancer cell lines (cervix HeLa and melanoma Femx) are reported. Since the introduction of picolinate into a metal complex can result in enhanced activity,^{42,43} the aim of this work was to compare the activities of the prepared complex with previously described analogue complexes.⁴¹ It should be noted that the complex was previously described but its X-ray diffraction structure has not hitherto been reported.⁴⁴

EXPERIMENTAL

Materials and measurements

Picolinic acid was purchased from Acros Organics and used without further purification. $[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymene})\text{RuCl}_2]_2$ was prepared according to a published procedure.⁴⁵ Elemental analysis was realized using an Elemental Vario EL III microanalyzer. The infrared spectra were recorded on a Nicolet 6700 FT-IR spectrometer using the attenuated total reflectance (ATR) technique. The ¹H- and ¹³C-NMR spectra of the ligand and the complex were recorded on a Varian Gemini 200 instrument. Chemical shifts were referenced to residual ¹H and ¹³C present in deuterated dimethyl sulfoxide.

Synthesis of the complex

To a warm solution of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}_2]_2$ (0.100 g, 0.16 mmol) in 2-propanol (25 cm³) was added a solution of picolinic acid (0.046 g, 0.35 mmol) in 2-propanol (5 cm³). The

mixture was stirred at room temperature for 7 days and then kept in refrigerator until the product precipitated. The yellow-orange product was filtered off, washed with several drops of 2-propanol and then diethyl ether and dried in air. A crystal suitable for X-ray analysis was obtained by the slow evaporation of the mother liquor.

Crystallographic structure determination

The measurement was performed on a Bruker X8 APEXII CCD diffractometer. A single crystal was positioned at 35 mm from the detector and 941 frames were measured, each for 30 s over a 1° scan width. The data were processed using SAINT-Plus software.⁴⁶ The crystal data, data collection parameters and structure refinement details are given in Table I. The structure was solved by direct methods and refined by full-matrix least-squares techniques. Non-hydrogen atoms were refined with anisotropic displacement parameters. The H atoms were placed at calculated positions and refined as riding atoms in the subsequent least-squares model refinements. The isotropic thermal parameters were estimated to be 1.2 or 1.5 times (methyl groups) the values of the equivalent isotropic thermal parameters of the non-hydrogen atoms to which the hydrogen atoms were bonded. The following software programs, personal computer and tables were used: structure solution, SHELXS-97,⁴⁷ refinement, SHELXL-97,⁴⁸ molecular diagrams, ORTEP,⁴⁹ Pentium IV, Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4 for the scattering factors were taken from the literature.⁵⁰

TABLE I. Crystal data and details of data collection for 1·H₂O

Empirical formula	C ₁₆ H ₂₀ ClNO ₃ Ru
<i>FW</i>	410.85
Space group	<i>Pn</i>
<i>a</i> / Å	8.9150(4)
<i>b</i> / Å	8.6498(4)
<i>c</i> / Å	10.6539(4)
β / °	91.853(3)
<i>V</i> / Å ³	821.12(6)
<i>Z</i>	2
λ / Å	0.71073
ρ_{calcd} / g cm ⁻³	1.662
Crystal size, mm ³	0.50×0.05×0.01
<i>T</i> / K	100
μ / mm ⁻¹	1.128
<i>R</i> ₁ ^a	0.0381
<i>wR</i> ₂ ^b	0.0687
GOF ^c	0.979

^a $R_1 = \Sigma||F_o| - |F_c||/\Sigma|F_o|$; ^b $wR_2 = \{\Sigma[w(F_o^2 - F_c^2)^2]/\Sigma[w(F_o^2)^2]\}^{1/2}$; ^cGOF = $\{\Sigma[w(F_o^2 - F_c^2)^2]/(n - p)\}^{1/2}$, where *n* is the number of reflections and *p* is the total number of parameters refined.

Cytotoxicity

Cell culture. Human cervix carcinoma cells (HeLa) and human melanoma cells (FemX) were maintained as monolayer cultures in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 nutrient medium (Sigma Chemicals Co, USA). The RPMI 1640 nutrient medium was prepared in sterile deionized water, supplemented with penicillin (192 U ml⁻¹), streptomycin (200 µg ml⁻¹), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) (25 mM), L-glutamine (3 mM) and 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (pH 7.2). The cells were grown at 37 °C in a 5 % CO₂ humidified air atmosphere.

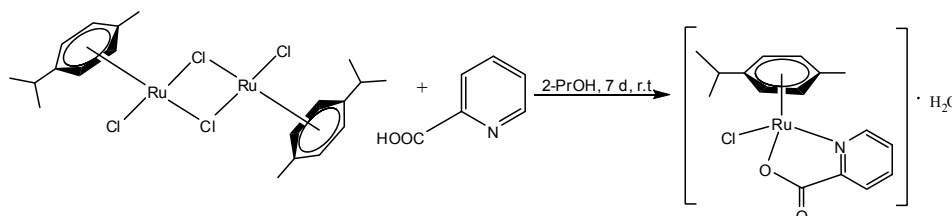
Cytotoxicity assay. The drug-induced cytotoxicity was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma) assay.⁵¹ Cells were seeded in 96-well cell culture plates (NUNC), HeLa (2000 c/w) and FemX (2000 c/w), in culture medium and grown for 24 h. A stock solution of the complex was prepared in DMSO at a concentration of 30 mM and subsequently diluted with nutrient medium to the desired final concentrations (in the range up to 300 μM).

Solutions of various concentrations of the examined compound were added to the wells, except for the control wells where only the nutrient medium was added. All samples were prepared in triplicate. Nutrient medium with corresponding agent concentrations but without the target cells was used as the blank, also in triplicate. The cells were incubated with the test compound for 48 h at 37 °C, in a 5 % CO₂ humidified air atmosphere. After incubation, 20 μL of MTT solution, 5 mg mL⁻¹ in phosphate buffer solution (PBS), pH 7.2, were added to each well. The samples were incubated for 4 h at 37 °C in a 5 % CO₂ humidified air atmosphere. Formazan crystals were dissolved in 100 μL 10 % sodium dodecyl sulfate (SDS) in 0.01 M HCl. The absorbance was recorded on an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader after 24 h at a wavelength of 570 nm. The IC₅₀ (μM) was defined as the concentration of drug producing 50 % inhibition and was determined from cell survival diagrams.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis

The reaction of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}_2]_2$ with picolinic acid in a 1:2 molar ratio in 2-propanol at room temperature leads to the formation of the complex $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{pico})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ in high yield (Scheme 1). Crystals precipitated directly from the reaction mixture. The complex is soluble in water, methanol, ethanol, acetonitrile and dimethyl sulfoxide.



Scheme 1. Synthesis of the complex $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{pico})]\cdot\text{H}_2\text{O}$

Analytic and spectral data

Yield: 0.1 g, 76.9 %. Anal. Calcd. for C₁₆H₂₀O₃NRuCl ($M_r = 410.86$): C, 46.77; H, 4.91; N, 3.41 %. Found: C, 46.70; H, 4.98; N, 3.39. IR (ATR, cm⁻¹): 3536, 3467 (*m*), 3069, 2955 (*w*), 1637 (*s*), 1601 (*w*). ¹H-NMR (199.97 MHz, DMSO-*d*₆, δ / ppm): 1.12 (6H, *dd*, -CH(CH₃)₂, $J = 2.2$ and 7 Hz), 2.15 (3H, *s*, -CH₃), 2.72 (1H, *m*, -CH(CH₃)₂, $J = 6.8$ Hz), 5.88 and 5.65 (4H, 2*t*, CH (arene), $J = 4.6$ and 7.8 Hz), 7.74 (1H, *m*, H⁴, $J = 7.3$ Hz), 7.79 (1H, *m*, H³), 8.09 (1H, *td*, H⁵, $J = 7.5$ Hz), 9.26 (1H, *d*, H⁶, $J = 5.6$ Hz). ¹³C-NMR (50.28 MHz, DMSO-*d*₆, δ / ppm) 18.27 (CH₃), 22.00 (CH(CH₃)₂), 30.65 (CH(CH₃)₂), 80.23, 81.21, 82.60,

82.78, 98.38 and 101.17 (CH (arene)), 125.59 (C3), 128.30 (C5), 139.86 (C4), 150.73 (C2), 154.01 (C6), 170.70 (C1).

Spectroscopy

$[(\eta^6\text{-}p\text{-Cymene})\text{RuCl}(\text{pico})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ exhibits an asymmetric stretching vibration $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ at 1637 cm^{-1} . Picolinic acid revealed an analogous vibration of the free carboxylic group at 1718 cm^{-1} . The difference in frequency is due to coordination of the ligand through one of the oxygen atoms of the carboxylic group and nitrogen atom of the pyridine ring, and is consistent with the X-ray diffraction structure.

The ^1H NMR spectrum of the complex contains a characteristic pattern for the *p*-cymene moiety. A methyl group singlet is seen at 2.15 ppm, the resonance signal of $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ appears as a multiplet at 2.72 ppm and $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ as a doublet at 1.12 ppm. The resonances of the arene ring protons were found at 5.64 and 5.88 ppm. Aromatic region of the ^1H -NMR spectrum of the complex also shows four resonances (7.74 (1H), 7.78 (1H), 8.09 (1H), 9.26 (1H)) of coordinated picolinate. Concerning the pyridine protons, H^3 and H^4 are shifted downfield by 0.3 and 0.27 ppm, respectively, while H^5 and H^6 are shifted upfield by 0.44 and 0.52 ppm, respectively, compared with the free ligand as a consequence of picolinate coordination to the ruthenium(II) atom.

The ^{13}C -NMR spectrum displays resonances at 18.27 ppm from the methyl group attached to the cymene moiety, 22.00 ppm from $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, while the signal at 30.65 ppm is due to the $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ group. The aromatic carbons from cymene display resonances within 80.23–101.17 ppm. Five pyridine carbon resonances were observed at 125.59 (C³), 128.30 (C⁵), 139.86 (C⁴), 150.73 (C²), 154.01 (C⁶) and carboxylate carbon at 170.67 ppm (C¹).

X-Ray crystallography

The structure of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{pico})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ was confirmed by X-ray diffraction. The complex crystallized in the monoclinic space group *Pn* and has the typical “three-leg piano-stool” geometry well-documented for a large number of ruthenium(II) and osmium(II) arene complexes, and in particular, for the closely related compounds $[(\eta^6\text{-}1,3,5\text{-Me}_3\text{C}_6\text{H}_3)\text{RuCl}(\text{pico})]^{52}$ and $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{OsCl}(\text{pico})]^{42}$ with the η^6 π -bound arene ring forming the seat and the picolinate ligand bound *via* a nitrogen and one carboxylic oxygen, with one chloride ligand as the legs of the piano-stool. Selected bond lengths and angles are given in the legend to Fig. 1. The bond lengths Ru–ring centroid, Ru–Cl, Ru–O1 and Ru–N1 in $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Ru}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{pico})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ of 1.665(9), 2.4225(9), 2.085(2) and 2.101(3) Å, respectively, are slightly longer than similar bonds 1.652(2), 2.4048(13), 2.080(3) and 2.090(4) Å in $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Os}^{\text{II}}\text{Cl}(\text{pico})]^{42}$. The shortening of the Ru–N and Ru–O bonds in *mer*- $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{pico})_3]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (2.052(3), 2.064(3), 2.052(3)

and 2.002(3), 2.024(3), 1.996(2) Å, respectively)⁵³ is even more evident. The Ru–Cl, Ru–N1 and Ru–O1 bonds in $[(\eta^6\text{-}1,3,5\text{-Me}_3\text{C}_6\text{H}_3)\text{RuCl}(\text{pico})]^{52}$ are at 2.420(1), 2.102(4) and 2.101(4) Å, respectively. Two hydrogen bonding interactions between the co-crystallized water molecule and **1** of the type O3–H \cdots O2 (O3–H, 0.86, H \cdots O2, 1.94, O3 \cdots O2, 2.78 Å, O3–H \cdots O2, 168.5°) and O3–H \cdots Cl1ⁱ ($x + 0.5, -y + 1, z + 0.5$) (O3–H, 0.87, H \cdots O2, 1.94, O3 \cdots Cl1ⁱ, 2.78 Å, O3–H \cdots Cl1ⁱ, 172.6°) are evident in the crystal structure of **1**·H₂O.

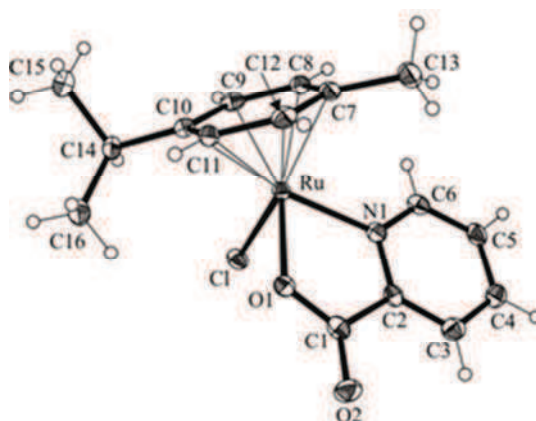


Fig. 1. ORTEP view of a molecule of **1** with atom-labeling scheme and thermal ellipsoids drawn at the 50 % probability level. Selected bond distances (Å) and angles (°): Ru–O1 2.085(2), Ru–N1 2.101(3), Ru–Cl 2.4225(9), Ru–C7 2.195(3), Ru–C8 2.186(3), Ru–C9 2.175(4), Ru–C10 2.211(4), Ru–C11 2.192(4) and Ru–C12 2.176(4), O1–Ru–N1 77.96(10).

Cytotoxic activity

The antiproliferative activity of the prepared complex was assayed in two human cancer cell lines HeLa (cervix) and FemX (melanoma) by the MTT assay. The tumor cells were incubated for 48 h with the investigated complex. The results of these tests indicate that the complex after 48 h of incubation exhibited cytotoxic activity with IC_{50} 81.97 μM for HeLa cells and 36.23 μM for FemX cells. These values are the mean of 2 to 3 independent experiments, whereby the standard deviations were less than 15 %. The results of representative experiments are shown in Fig. 2.

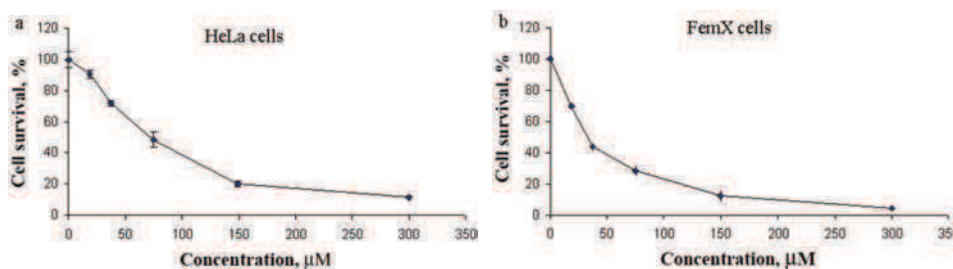


Fig. 2. Diagram of (a) HeLa and (b) FemX cells survival after 48 h of continual agent action. Data are representative for one out of two to three separate experiments with standard deviation.

CONCLUSIONS

In this paper, the synthesis and characterization of the organoruthenium complex, $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{RuCl}(\text{pico})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ is described. Although in a previous work, structurally related complexes were found to have limited antiproliferative activity in tumor cells, the complex reported herein exhibits much higher cytotoxicity in cervix HeLa and melanoma FemX human cancer cell lines. This implies that the presence of picolinate coordinated to a metal center had a notable effect on cytotoxic activity. This makes this new ruthenium complex of interest for further investigation.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Crystallographic data for **1** has been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center as supplementary publication No. CCDC 775760. Copies of the data can be obtained free of charge on application to The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: +44 1223 336 033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

Acknowledgements. This work was supported by the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Grant Nos. 142010, 142062 and 145035.

ИЗВОД

РЕНДГЕНСКА СТРУКТУРНА АНАЛИЗА И ЦИТОТОКСИЧНА АКТИВНОСТ
ПИКОЛИНАТО РУТЕНИЈУМ(II)–АРЕНСКОГ КОМПЛЕКСА

ИВАНКА ИВАНОВИЋ¹, САЊА ГРГУРИЋ-ШИПКА¹, НЕВЕНКА ГЛИГОРИЈЕВИЋ², СИНИША РАДУЛОВИЋ²,
ЖИВОСЛАВ Љ. ТЕШИЋ¹, ALEXANDER ROLLER³ и BERNHARD K. KEPPLER³

¹Хемијски Факултет и Универзитет у Београду, Студентски тир 12–16, 11 000 Београд, ²Институт за онкологију и радиологију Србије, Пастерова 14, 11000 Београд и ³Institute of Inorganic Chemistry, University of Vienna, Währinger Str. 42, 1090 Vienna, Austria

Рутенијум(II)–аренски комплекс са пиколинском киселином $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{RuCl}(\text{пиколинато})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ синтетисан је у реакцији $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{RuCl}_2]_2$ комплекса са пиколинском киселином у молском односу 1:2 у изопропанолу. Једињење је окарактерисано елементалном анализом, ИЦ и NMR спектроскопијом. Анализа дифракцијом X-зрацима показала је да молекул има тзв. “three-leg piano-stool” геометрију која је карактеристична за овај тип комплекса. Цитотоксична активност комплекса је одређена на две хумане туморске ћелијске линије, HeLa (грлића материце) и FemX (меланома), МТТ тестом. IC₅₀ вредности су биле 82,0 и 36,2 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ за HeLa и FemX ћелије, редом.

(Примљено 17. маја, ревидирано 17. августа 2010)

REFERENCES

1. O. Jøns, E.S. Johansen, *Inorg. Chim. Acta* **151** (1988) 129
2. S.C. Dixit, R. Sharan, R.N. Kapoor, *Inorg. Chim. Acta* **109** (1989) 113
3. E. Libby, R.J. Webb, W.E. Streib, K. Folting, J.C. Huffman, D.N. Hendrickson, G. Christou, *Inorg. Chem.* **28** (1989) 4037
4. D.M. Streamns, W.H. Armstrong, *Inorg. Chem.* **31** (1992) 5178
5. W. Li, M.M. Olmstead, D. Miggins, R.H. Fish, *Inorg. Chem.* **35** (1996) 51
6. H. Ding, L.K. Olson, J.A. Caruso, *Spectrochim. Acta B* **51** (1996) 1801

7. G.S. Morris, K.A. Guindry, M. Hegsted, D.L. Hasten, *Nutr. Res.* **15** (1995) 1045
8. N.E. Chakov, R.A. Collins, J.B. Vincent, *Polyhedron* **18** (1999) 2891
9. Y. Liang, L.K. Noda, O. Sala, *J. Mol. Struct.* **554** (2000) 271
10. D.M. Stearns, S.M. Silveira, K.K. Wolf, A.M. Luke, *Mutat. Res.* **513** (2002) 135
11. D.D. Hepburn, J.M. Burney, S.A. Woski, J.B. Vincent, *Polyhedron* **2** (2003) 455
12. M. Hidalgo, S.G. Eckhardt, *J. Natl. Cancer Inst.* **93** (2001) 178
13. S. Cai, K. Sato, T. Shimizu, S. Yamabe, M. Hiraki, C. Sano, H. Tamioka, *J. Antimicrob. Chemother.* **57** (2006) 85
14. J. R. Komorowski, D. Greenberg, V. Juturu, *Toxicol. In Vitro* **22** (2008) 819
15. G. Kirkil, M. Hamdi Muz, D. Seckin, K. Sahin, O. Kucuk, *Respiro. Med.* **102** (2008) 840
16. P. Koczoń, J. Piekut, M. Borawska, R. Świslocka, W. Lewandowski, *Spectrochim. Acta A* **61** (2005) 819
17. P. Koczoń, J. Piekut, M. Borawska, R. Świslocka, W. Lewandowski, *Anal. Bioanal. Chem.* **384** (2006) 302
18. R. Song, K. M. Kim, Y. S. Sohn, *Inorg. Chim. Acta* **292** (1999) 238
19. S. Grguric-Sipka, C. R. Kowol, S.-M. Valiahdi, R. Eichinger, M. A. Jakupec, A. Roller, S. Shova, V. B. Arion, B. K. Keppler, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2007) 2870
20. C. R. Kowol, R. Eichinger, M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* **101** (2007) 1946
21. W. F. Schmid, S. Zorbas-Seifried, R. O. John, V. B. Arion, M. A. Jakupec, A. Roller, M. Galanski, I. Chiorescu, H. Zorbas, B. K. Keppler, *Inorg. Chem.* **46** (2007) 3645
22. I. Bratsos, G. Birarda, S. Jedner, E. Zangrando, E. Alessio, *Dalton Trans.* (2007) 4048
23. C. Streu, P. J. Carroll, R. K. Kohli, E. Meggers, *J. Organomet. Chem.* **693** (2008) 551
24. W. F. Schmid, R. O. John, V. B. Arion, M. A. Jakupec, B. K. Keppler, *Organometallics* **26** (2007) 6643
25. W. F. Schmid, R. O. John, G. Mühlgassner, P. Hefeter, M. A. Jakupec, M. Galanski, W. Berger, V. B. Arion, B. K. Keppler, *J. Med. Chem.* **50** (2007) 6343
26. R. Schuecker, R. O. John, M. A. Jakupec, V. B. Arion, B. K. Keppler, *Organometallics* **27** (2008) 6587
27. L. K. Filak, G. Mühlgassner, M. A. Jakupec, P. Hefeter, W. Berger, V. B. Arion, B. K. Keppler, *J. Biol. Inorg. Chem.* **15** (2010) 903
28. S. M. Guichard, R. Else, E. Reid, B. Zeitlin, R. Aird, M. Muir, M. Dodds, H. Fiebig, P. J. Sadler, D. I. Jodrell, *Biochem. Pharm.* **71** (2006) 408
29. T. Bugarcic, A. Habtemariam, J. Stepankova, P. Heringova, J. Kasparikova, R. J. Deeth, R. D. L. Johnstone, A. Prescimone, A. Parkin, S. Parsons, V. Brabec, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **47** (2008) 11470
30. T. Bugarcic, A. Habtemariam, R. J. Deeth, F. P. A. Fabbiani, S. Parsons, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **48** (2009) 9444
31. T. Bugarcic, O. Nováková, A. Halámková, L. Zerzánková, O. Vrána, J. Kašpárková, A. Habtemariam, S. Parsons, P. J. Sadler, V. Brabec, *J. Med. Chem.* **51** (2008) 5310
32. M. Gras, B. Therrien, G. Süß-Fink, P. Štěpnička, A. K. Renfrew, P. J. Dyson, *J. Org. Chem.* **693** (2008) 3419
33. M. Auzias, J. Gueniat, B. Therrien, G. Süß-Fink, A. K. Renfrew, P. J. Dyson, *J. Org. Chem.* **694** (2009) 855
34. C. Sclaro, C. G. Hartinger, C. S. Allardyce, B. K. Keppler, P. J. Dyson, *J. Inorg. Biochem.* **102** (2008) 1743

35. S. Grgurić-Šipka, M. M. Alshtewi Al. Arbi, D. Jeremić, G. N. Kaluderović, S. Gomez-Ruiz, Ž. Žižak, Z. Juranić, T. J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* **73** (2008) 619
36. V. Rajendiran, M. Murali, E. Suresh, S. Sinha, K. Somasundaram, M. Palaniandavar, *Dalton Trans.* (2008) 148
37. V. Djinovic, M. Momcilovic, S. Grguric-Sipka, V. Trajkovic, S. M. Mostarica, D. Miljkovic, T. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004) 2168
38. A. Bergamo, L. Messori, F. Piccioli, M. Cocchietto, G. Sava, *Invest. New Drug.* **21** (2003) 401
39. A. R. Timerbaev, C. G. Hartinger, S. S. Aleksenko, B. K. Keppler, *Chem. Rev.* **106** (2006) 2224
40. W. H. Ang, P. J. Dyson, *Eur. J. Inorg. Chem.* **20** (2006) 8153
41. S. Grgurić-Šipka, I. Ivanović, G. Rakić, N. Todorović, N. Gligorijević, S. Radulović, V. B. Arion, B. K. Keppler, Ž. Lj. Tešić, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 1051
42. A. F. A. Peacock, S. Parsons, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 3348
43. S. H. van Rijt, A. F. A. Peacock, R. D. L. Johnstone, S. Parsons, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **48** (2009) 1753
44. D. Camm, A. El-Sokkary, A. L. Gott, P. G. Stockley, T. Belyaeva, P. C. McGowan, *Dalton Trans.* (2009) 10914
45. S. B. Jensen, S. J. Rodger, M. D. Spicer, *J. Organomet. Chem.* **556** (1998) 151
46. *SAINT-Plus*, version 7.56a, Bruker AXS Inc., Madison, WI, 2008
47. G. M. Sheldrick, *SHELXS-97, Program for Crystal Structure Solution*, University Göttingen, Göttingen, 1997
48. G. M. Sheldrick, *SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement*, University Göttingen, Göttingen, 1997
49. G. K. Johnson, *Report ORNL-5138*, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, 1976
50. *International Tables for X-Ray Crystallography*, Vol. C, A. J. C. Wilson, Ed., Kluwer Academic Press, Dordrecht, 1992, Tables 4.2.6.8 and 6.1.1.4.
51. R. Surpino, in *Methods in Molecular Biology, in Vitro Toxicity Testing Protocols*, S. O'Hare, C.K. Atterwill, Eds., Humana Press, New York, 1995, p. 137
52. L. Carter, D. L. Davies, J. Fawcett, D. R. Russell, *Polyhedron* **12** (1993) 1599
53. M. C. Barrel, R. Jimenez-Aparicio, E. C. Royer, M. J. Sancedo, F. A. Urbanos, E. Gutierrez-Pueblo, C. Ruiz-Valero, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1991) 1609.

Изјава о ауторству

Потписани-а Nevenka Gligorijević

број уписа 577

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Ispitivanje antiproliferativnog i *in vitro* antimetastatskog potencijala pikolinato rutenijum(II)-cimenskog kompleksa: poređenje sa serijom rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa sličnom strukturom“

- 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 докторанта

У Београду, _____

Gligorijević Nevenka

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Nevenka Gligorijević

Број уписа 577

Студијски програм "Doktor hemijskih nauka"

Наслов рада _____

**„Ispitivanje antiproliferativnog i *in vitro* antimetastatskog potencijala pikolinato
rutenijum(II)-cimenskog kompleksa: poređenje sa serijom rutenijum(II)-
arenskih kompleksa sa sličnom strukturom“**

Ментор Prof. Dr Sanja Grgurić-Šipka

Потписани Nevenka Gligorijević

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 докторанта

У Београду, _____

Nevenka Gligorijević

Изјава о коришћењу

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

„Ispitivanje antiproliferativnog i *in vitro* antimetastatskog potencijala pikolinato rutenijum(II)-cimenskog kompleksa: poređenje sa serijom rutenijum(II)-arenskih kompleksa sa sličnom strukturom“

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 докторанта

У Београду, _____

Тисомир Јевт *Невена*
