

# Antitumorski potencijal organometalnih kompleksa rutenija

---

**Pernar, Margareta**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:526400>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno-matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

Margareta Pernar

**Antitumorski potencijal organometalnih kompleksa rutenija**

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom mentorice dr. sc. Anamarije Brozović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Anamariji Brozović na iskazanom povjerenju i vodstvu kroz izradu ovog rada. Hvala Vam na svom prenesenom znanju, stručnim i prijateljskim savjetima, te na svim prilikama koje Ste mi pružili za napredak u znanstvenom smislu.

Također, zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za staničnu biologiju i prijenos signala, Andreji, Alenu, Ani, Dragomiri, Mladenu, Davoru, Nikolini, Marini, Sanjici, Tihani, koji su uvijek bili spremni pomoći i odgovoriti na svako moje pitanje, te napravili atmosferu ugodnom i poticajnom za rad.

Zahvaljujem se i dr. sc. Maji Osmak i suvoditeljici doc. dr. sc. Ingi Marijanović na primjedbama i komentarima koji su pridonijeli poboljšanju ovog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji, roditeljima Renati i Nikoli, sestri Gabrijeli i bratu Dominiku, na bezuvjetnoj podršci, ohrabrenju kada bih posustala, razumijevanju i strpljenju, savjetima, šalama, pohvalama i kritikama koje su me držale na pravom putu.

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Antitumorski potencijal organometalnih kompleksa rutenija**

Margareta Pernar  
Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Kompleksi na bazi platine dominiraju u kemoterapiji zadnjih nekoliko desetljeća. Međutim, zbog visoke opće toksičnosti i razvoja otpornosti tumora na lijek, javlja se potreba za sintezom novih spojeva sa smanjenim popratnim pojavama. U tu svrhu, istražuju se različiti organometalni kompleksi, među kojima su se svojom antitumorskom aktivnošću istaknuli kompleksi rutenija. U ovom istraživanju istražene su biološke karakteristike novosintetiziranih kompleksa rutenija 1 i 2, s fosfanskim ligandima supstituiranim kiralnim ili akiralnim esterima aminokiselina. Citotoksičnost sintetiziranih spojeva ispitana je 3-(4,5-metiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid testom na ljudskim stanicama karcinoma vrata maternice (HeLa). Četiri ( $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$  i  $2_{mA}$ ) od šest sintetiziranih bikonjugata pokazalo je značajnu toksičnost, usporedivu sa cisplatinom. Na temelju uočenih karakteristika biološkog djelovanja na stanice HeLa izdvojen je kompleks  $2_{mG}$  čija je citotoksičnost dalje ispitivana na nekoliko tumorskih i normalnih staničnih linija. Veća toksičnost prema tumorskim, u odnosu na normalne stanične linije, ukazuje na selektivnu aktivnost spoja. Protočnom citometrijom utvrđeno je da spoj  $2_{mG}$  zaustavlja stanice u G1/S fazi staničnog ciklusa i uzrokuje povećanje SubG1 populacije stanica, što upućuje na smrt stanica apoptozom. Predtretman HeLa stanica sa specifičnim inhibitorom sinteze, butionin sulfoksiminom i specifičnim prekursorom sinteze glutaciona, N-acetil cisteinom, te specifičnim inhibitorom glutation-S-transferaze, etakrinom kiselinom i specifičnim inhibitorom membranskih transportera MRP1/2, probenecidom, ukazao je na važnu ulogu glutaciona u odgovoru i detoksikaciji stanica nakon tretmana sa sintetiziranim organometalnim kompleksima rutenija.

(56 stranica, 17 slika, 8 tablica, 70 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: organometalni kompleksi s rutenijem, tumor, glutation, stanična smrt

Voditeljica rada: dr. sc. Anamaria Brozović, viša znanstvena suradnica

Suvoditeljica rada: dr. sc. Inga Marijanović, docent

Ocjenitelji: dr. sc. Inga Marijanović, doc.; dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.; dr. sc. Anamaria Štambuk, doc.

Zamjena: dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 14.02.2018.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation Thesis

### **Anticancer potential of organometallic ruthenium complexes**

Margareta Pernar  
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Platinum-based drugs have been predominantly used in chemotherapy for decades. However, due to their high general toxicity and development of tumour drug resistance, there is a constant need to synthesize new compounds with reduced side effects. Organometallic ruthenium complexes have already shown promising anticancer activity. In this research, we explored biological characteristics of newly synthesized (p-cymene)-ruthenium complexes 1 and 2, bearing phosphane ligands substituted with chiral or non-chiral amino acid esters. Cytotoxic activity was investigated on human cervix carcinoma cell line (HeLa) using MTT assay. Four ( $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$  and  $2_{mA}$ ) out of six synthesized metallated biconjugates showed significant toxicity. Based on characteristics of biological effect on HeLa cells  $2_{mG}$  compound was selected for further experiments. The higher level of toxicity towards tumour compared to normal cell lines indicated its selective activity. Further, using flow cytometry and propidium iodide staining, it was detected that  $2_{mG}$  arrests cells in G1/S phase of cell cycle and causes dose-dependent increase of SubG1 cell population, suggesting its ability to induce apoptosis. Effects of pretreatment with specific inhibitor of glutathione synthesis, buthionine sulfoximine, or specific precursor N-acetyl-cysteine, and inhibitor of glutathion-S-transferase, ethacrynic acid, or inhibitor of multidrug resistance protein family MRP1/2, probenecid, on survival of HeLa cells indicated that glutathione plays important role in cell response and detoxification of newly synthesized organometallic ruthenium compounds.

(56 pages, 17 figures, 8 tables, 70 references, original in: Croatian)

Key words: organometallic ruthenium complexes, tumor, glutathione, cell death

Supervisor: Dr. Anamaria Brozović, Senior Research Associate

Assistant supervisor: Dr. Inga Marijanović, Associate Professor

Reviewers: Dr. Inga Marijanović, Assoc. Prof.; Dr. Nada Oršolić, Full Prof.; Dr. Anamaria Štambuk, Assoc. Prof.

Replacement: Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 14.02.2018.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Tumori .....	1
1.2. Terapije tumora .....	4
1.2.1. Kemoterapeutici na bazi metala .....	5
1.3. Organometalni kompleksi .....	8
1.3.1. Organometalni kompleksni rutenija .....	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	12
3. MATERIJALI I METODE .....	13
3.1. Materijali .....	13
3.1.1. Stanične linije .....	13
3.1.2. Sinteza i karakterizacija organometalnih kompleksa rutenija s trifenilfosfanskim aminokiselinskim biokonjugatima .....	13
3.2. Metode .....	18
3.2.1. Određivanje citotoksičnosti .....	18
3.2.2. Analiza staničnog ciklusa .....	19
3.2.3. Određivanje vrste stanične smrti pomoću protočne citometrije .....	20
3.2.4. Određivanje ekspresije proteina .....	22
3.2.5. Određivanje formacije reaktivnih vrsta kisika .....	24
3.2.6. Mjerenje količine rutenija u ukupnom staničnom lizatu .....	25
3.2.7. Statistička analiza .....	25
4. REZULTATI .....	26
4.1. Citotoksičnost novosintetiziranih organometalnih kompleksa rutenija s trifenilfosfanskim aminokiselinskim biokonjugatima .....	26
4.2. Kompleks $2_{mG}$ potiče nakupljanje stanica u G1/S fazi staničnog ciklusa .....	28
4.3. Kompleks $2_{mG}$ potiče programiranu smrt stanice .....	30
4.4. Glutation smanjuje citotoksični učinak kompleksa $2_{pG}$ , $2_{pA}$ , $2_{mG}$ i $2_{mA}$ .....	32
4.5. Kompleks $2_{mG}$ ne potiče stvaranje reaktivnih vrsta kisika .....	34
4.6. Kompleksi $2_{pG}$ , $2_{pA}$ , $2_{mG}$ i $2_{mA}$ su toksični za stanice otporne na cisplatinu .....	35
4.7. Glutation sudjeluje u detoksikaciji stanica HeLa nakon tretmana s kompleksom $2_{mG}$ .....	38
4.8. Određivanje akumulacije kompleksa $2_{pG}$ , $2_{pA}$ , $2_{mG}$ i $2_{mA}$ unutar stanice .....	39
5. RASPRAVA .....	41
6. ZAKLJUČCI .....	48
7. LITERATURA .....	49
8. ŽIVOTOPIS .....	56

## Korištene kratice

**ABB** - pufer za vezanje aneksina (engl. *Annexin-Binding Buffer*)

**Bcl-2** - B-stanični limfom 2 (engl. *B-cell lymphoma 2*)

**BSO** - L-butionin sulfoksimin (engl. *Buthionine Sulfoximine*)

**cDDP, cisplatina** - *cis*-diamindiklorid-platina(II) (engl. *cis-diamminedichloro-platinum(II)*)

**CM-H<sub>2</sub>DCFDA** - klorometilni derivat 2',7'-diklorohidrofluorescein diacetata (engl.

*chloromethyl derivate of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*)

**CTR1** - transporter bakra 1 (engl. *copper transporter*)

**DMSO** - dimetil sulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*)

**ERK1/2** - izvanstaničnim signalima regulirana kinaza 1/2 (engl. *extracellular-signal-regulated kinases 1/2*)

**ETA** - etakrina kiselina (engl. *Etacrynic Acid*)

**FITC** - fluorescein izotiocijanat (engl. *Fluorescein Isothiocyanate*)

**GSH, γ-glu-cys-gly** - glutation, reducirani oblik (engl. *Glutathione*)

**GST** - glutation S-transferaza (engl. *Glutathione S-transferase*)

**HIF** - faktor hipoksije (engl. *Hypoxia-Inducible Factor*)

**IC<sub>50</sub>** - koncentracija spoja pri kojoj se promatrani biološki efekt smanji za pola (engl. *50% Inhibitory Concentration*)

**ICP-MS** - masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*)

**kaspaza** - cistein-aspartička proteaza (engl. *cysteine-aspartic protease*)

**KP1019** - *trans*-[tetraklorobis(1H-indazol)rutenat(III)] (engl. *trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)]*)

**MRP** - protein otpornosti na više lijekova (engl. *Multidrug-Resistant Protein*)

**mRNA** - glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)

**MTT** - 3-(4,5-metiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (engl. *(3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide*)

**NAC** - natrijev acetilcistein (engl. *N-acetylcysteine*)

**NAMI-A** - *trans*-imidazoldimetilsulfoksidtetraklororutenat (engl. *trans-imidazoledimethylsulfoxidetetrachlororuthenate*)



**PARP** - poli(ADP-riboza) polimeraza (engl. *Poli ADP-Ribose Polymerase*)

**PBS** - fosfatni pufer (engl. *Phosphate Buffered Saline*)

**PI** - propidij jodid (engl. *Propidium Iodide*)

**PS** - fosfatidilserin (engl. *phosphatidylserine*)

**RNaza A** - Ribonukleaza A (engl. *Ribonuclease A, RNase A*)

**ROS** - reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*)

**SD** - standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*)

**$\gamma$ -GCS** -  $\gamma$ -glutamilcistein sintetaza (engl.  *$\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase*)

# 1. UVOD

## 1.1. Tumori

Tumori su skupina bolesti karakterizirana nekontroliranim staničnim rastom te sposobnošću invazije okolnih tkiva i širenja stanica po cijelom organizmu (Pecorino 2012). Tumorske stanice koje posjeduju prvu, ali ne i drugu karakteristiku, nekontrolirano će proliferirati tvoreći benigni (dobročudni) tumor, u većini slučajeva oštro ograničenu, očahurenu masu homotipičnih stanica (stanice slične normalnom tkivu) koja raste ekspanzivno. Takvi tumori mogu biti štetni za organizam zbog svoje veličine i lokacije, ali se uglavnom mogu kirurški u potpunosti ukloniti. Tumor je maligni (zloćudan) kada njegove stanice steknu sposobnost invazije i metastaziranja u druga tkiva. Takvi tumori su često manji, nisu oštro ograničeni, nepravilnog su oblika, imaju infiltrativni rast te veliku gustoću heterotipičnih stanica koje su polimorfne (Alberts 2010). Maligni tumori dalje se dijele na karcinome (tumori nastali iz epitelnih stanica, 85%), sarkome (tumori nastali iz mezodermalnih stanica) te leukemije i limfome (tumori stanica krvotvornih organa koje cirkuliraju u krvi). Metastaziranje, proces prenošenja tumorskih stanica s primarnog na sekundarno mjesto u organizmu, kod karcinoma se odvija putem limfe (limfogeno), a kod sarkoma putem krvi (hematogeno) (Pecorino 2012).

Tumori su u osnovi genetska bolest, jer nastaju kao posljedica mutacija (promjene slijeda DNA) u različitim skupinama gena. Razlikuju se od drugih genetskih bolesti, jer su kod tumora u pitanju uglavnom somatske mutacije, za razliku od mutacija u germinativnim stanicama koje se prenose na potomstvo. Mutacije mogu nastati zbog unutarstaničnih grešaka (pogreške pri replikaciji) ili mogu biti uzrokovane faktorima iz okoliša (zračenje, kemijski karcinogeni, tumorski virusi). Iako je stopa tih mutacija jako visoka (vjerojatnost mutacije za svaki gen je  $10^9$ ), tumori se ne pojavljuju kao posljedica svake mutacije. Razlog tomu je što samo jedna mutacija nije dovoljna, već je potrebno 6-10 mutacija kako bi normalna stanica prešla u tumorsku. Iz toga proizlazi poveznica da je tumor bolest starije dobi, jer je potrebno dulje vrijeme kako bi jedna stanica nakupila veći broj mutacija (Alberts 2010).

Mutacije u tri skupine gena, proto-onkogenima, tumor supresor genima i genima za mikroRNA, važne su za razvoj tumora (Croce 2008). Mutacijom proto-onkogena dolazi do

njihove aktivacije i prelaska u onkogene koji potiču proliferaciju stanica i koče apoptozu. Takve mutacije su dominantne, jer je dovoljan gubitak samo jednog od dva alela gena za ispoljavanje mutiranog fenotipa. Aktivacija onkogenata najčešće je posljedica točkastih mutacija, genske amplifikacije ili kromosomskih rearanžmana, te uzrokuje povećanu ekspresiju gena ili povećanu aktivnost produkta gena. Produkti onkogenata klasificiraju se u 6 grupa: faktori rasta, receptori faktora rasta, unutarstanični prijenosnici signala, transkripcijski faktori, regulatori apoptoze i remodelatori kromatina. Drugu skupinu gena čine tumor supresorski geni. Oni kodiraju za proteine koji imaju važnu ulogu u inhibiciji staničnog rasta i formacije tumora. Mutacije u ovim genima su recesivne, što znači da obje kopije gena moraju biti inaktivirane da se vidi efekt, te tim mutacijama dolazi do gubitka funkcije gena (Alberts 2010, Pecorino 2012). Geni mikroRNA ne kodiraju za proteine. Produkt ovih gena je jednolančana RNA veličine 21 do 23 nukleotida, čija je funkcija regulacija genske ekspresije. Takve male nekodirajuće molekule mikroRNA vežu se na temelju komplementarnosti na ciljnu mRNA, te na taj način blokiraju translaciju proteina ometajući vezanje podjedinica ribosoma ili uzrokuju degradaciju same mRNA. Utvrđeno je da geni mikroRNA često imaju promijenjenu ekspresiju u tumorskim stanicama. Tako će mikroRNA čiji geni imaju povećanu ekspresiju djelovati kao onkogeni, a one čiji geni imaju smanjenu ekspresiju kao tumor supresori (Croce 2008).

Progresijom prema neoplastičnom stanju, normalne stanice stječu određene karakteristike koje im daju prednost nad susjednim stanicama. Šest svojstava, karakterističnih za tumorske stanice, omogućuje rast tumora i metastaziranje (Hanahan i Weinberg 2011):

- Tumorske stanice manje su ovisne o faktorima rasta od normalnih stanica što pridonosi nekontroliranoj proliferaciji. To svojstvo posljedica je mutacije određenih komponenti proliferacijskog signalnog puta (aktivacija onkogenata).
- Tumorske stanice inaktiviraju supresore rasta (kao p53 koji je inaktiviran u preko 50% tumora) čime omogućuju nekontroliran ulazak u stanični ciklus.
- Apoptoza služi kao prirodna prepreka za razvoj tumora. Tumorske stanice šalju stalne signale za apoptozu povezane s hiperproliferacijom (povišeno onkogeno signaliziranje, oštećenja DNA). Ipak, ne dolazi do pokretanja stanične smrti zbog mutacije krovnih senzora oštećenja (među njima p53), te ostalih komponenti apoptotskog puta (kao proteini obitelji Bcl-2).
- Tumorske stanice moraju se neograničeno dijeliti kako bi stvorile makroskopski tumor. Međutim, normalne stanice imaju ograničen broj dioba koje mogu napraviti, nakon čega

odlaze u senescenciju (stanično starenje) ili apoptozu. Razlog tomu je skraćivanje telomera (repetitivne sekvence na krajevima kromosoma) nakon svake diobe. Kratke telomere detektiraju se kao oštećenje DNA što zaustavlja ciklus. Tumorske stanice zato aktiviraju telomerazu, DNA polimerazu koja produžuje telomere dodajući ponavljanja, čime izbjegavaju odlazak u senescenciju ili apoptozu.

- Tumorsko tkivo, kao i normalno, ima stalnu potrebu za nutrijentima i kisikom, ali i za uklanjanjem metaboličkog otpada i ugljikovog dioksida. U jednom trenutku hiperproliferirajuća tumorska masa postaje prevelika da bi se hranila isključivo difuzijom. U unutrašnjosti se razvija stanje hipoksije, čime se aktivira transkripcijski faktor HIF (engl. *hypoxia inducible factor*) i potiče se ekspresija vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) čiji se receptor nalazi na endotelnim stanicama koje grade stijenke krvnih žila. Takva kaskada pokreće proces angiogeneze, grananja novih krvnih žila iz postojećih, te se na taj način postiže bolja prokrvljenost tumora.
- Stanice malignog tumora imaju sposobnost invazije i metastaziranja, širenja na sekundarna mjesta u organizmu. Prvi korak tog složenog procesa je migracija (lokalna invazija) koja uključuje promjenu staničnog fenotipa (epitelno-mezenhimska tranzicija) kako bi se odvojila od susjednih stanica, te prolazak kroz ekstracelularni matriks, što zahtijeva lučenje matriksnih-metaloproteinaza koje ga cijepaju i rade put stanici. Sljedeći koraci uključuju ulazak u krvnu žilu (intravazacija), put kroz krvnu žilu i izlazak iz žile (ekstravazacija). Iz krvne žile, na sekundarnom mjestu u organizmu izlaze stanice koje mogu stvarati mikrometastaze. Tek kada se takve mikrometastaze prilagode na nove uvjete, dolazi do kolonizacije i razvoja makroskopskih metastaza. Međutim, proces metastaziranja ima jako nisku efikasnost; manje od 1% diseminiranih mikrometastaza će razviti makroskopski tumor. Također, kod nekih tipova tumora, primarni tumor suprimira mikrometastaze i drži ih u dormantnom stanju, tako da do njihove aktivacije dolazi tek nakon odstranjivanja primarnog tumora.

Dvije su karakteristike koje omogućuju tumorskim stanicama stjecanje šest navedenih svojstava, genomska nestabilnost i upalni mikrookoliš. Jedno od temeljnih svojstava tumora je njegova klonalnost, nastanak tumora iz jedne stanice koja počinje nenormalno proliferirati (Cooper 2010). Iako sama riječ sugerira da tumor tvore identične stanice (klonovi), tumorska masa je heterogena. Zbog neadekvatnog popravka oštećenja DNA te upalnog okoliša koji oksidativnim stresom još više potiče stvaranje pogrešaka u replikaciji DNA, stopa mutacija raste, te se javljaju različite skupine klonova koji nose onaj isti set osnovnih 6-10 mutacija,

ali se međusobno razlikuju u dodatnim mutacijama koje ih vode na viši stupanj kompetencije. Osim toga, dva svojstva tumori stječu tijekom razvoja. Prvo je promjena metabolizma, koja podrazumijeva glikolizu u aerobnim uvjetima. Naime, kod normalnih stanica, u uvjetima s dovoljno kisika, piruvat dobiven procesom glikolize šalje se u mitohondrij gdje se prevodi do ugljičnog dioksida i energije (ATP). Nasuprot tome, tumorske stanice čak i uz prisutstvo kisika ne šalju piruvat u mitohondrij, već ga prevode u laktat. Iako time dobivaju puno manje ATP-a, ovakvo reprogramiranje im omogućuje preusmjeravanje intermedijera u druge svrhe, kao što je biosinteza makromolekula i organela potrebnih za rast novih stanica. Drugo svojstvo je izbjegavanje imunološkog sustava domaćina. Imunološki sustav ima dvojaku ulogu u tumorigenezi: primarna uloga mu je uklanjanje tumorskih stanica, međutim takvo oblaganje tumora sa stanicama imunološkog sustava stvara upalni mikrookoliš koji pogoduje razvoju tumora. Stalni pritisak imunološkog sustava može dovesti do imunoeditiranja tumora, pri čemu se uništavaju stanice koje imaju visoku ekspresiju tumorskih antigena na površini što ih čini lako vidljivim, dok se izdvajaju one koje su slabo imunogenične, odnosno imaju nisku ekspresiju tumorskih antigena. Takvi tumori zaobilaze prepoznavanje od strane imunološkog sustava i agresivniji su (Hanahan i Weinberg 2011).

## 1.2. Terapije tumora

Bolje razumijevanje mehanizama koje tumorske stanice koriste za preživljenje, proliferaciju i širenje ključno je za pronalazak odgovarajuće terapije. Budući da tumorske stanice brzo i nasumično nakupljaju mutacije, svaki slučaj iste vrste tumora imati će jedinstvenu kombinaciju mutiranih gena, te zbog toga jedna terapija neće djelovati na isti način kod svakog pacijenta. Nadalje, primarni tumor obično se dijagnosticira tek kada dosegne promjer od 1 cm ili više, do kada već ima više od  $10^9$  genetički različitih stanica i često je već metastazirao (Alberts 2010). Usprkos poteškoćama, mnogi tumori se danas uspješno liječe. Tumori se obično liječe jednom od tri najčešće korištene opcije ili njihovom kombinacijom: kemoterapijom, zračenjem i operacijom. Kirurško odstranjenje tumora je najpoželjnija opcija, pogotovo u ranim stadijima bolesti. Međutim, operacija nije uvijek moguća zbog raznih razloga, uključujući tip, lokaciju i stadij tumora (DeSantis i sur. 2014). Kemoterapija je glavna opcija za kasnije stadije tumora, ali se zna koristiti i kod ranih stadija kao adjuvantna terapija za operaciju, kako bi se reducirala veličina tumora i smanjio rizik od njegove ponovne pojave (Corrie 2008). Konvencionalni kemoterapeutici su citotoksični i

funkcioniraju tako što ubijaju stanice koje se brzo dijele, što je značajka tumorskih stanica. Kemoterapeutici su: citotoksični antibiotici (doksorubicin, mitomicin), antimetaboliti (fluoropirimidin, metotreksat), antimikrotubularni agensi (vinkristin, paklitaksel), inhibitori topoisomerase I (irinotekan, kamptotekan), te alkilirajući agensi (cisplatina) (Lovell i sur. 2017).

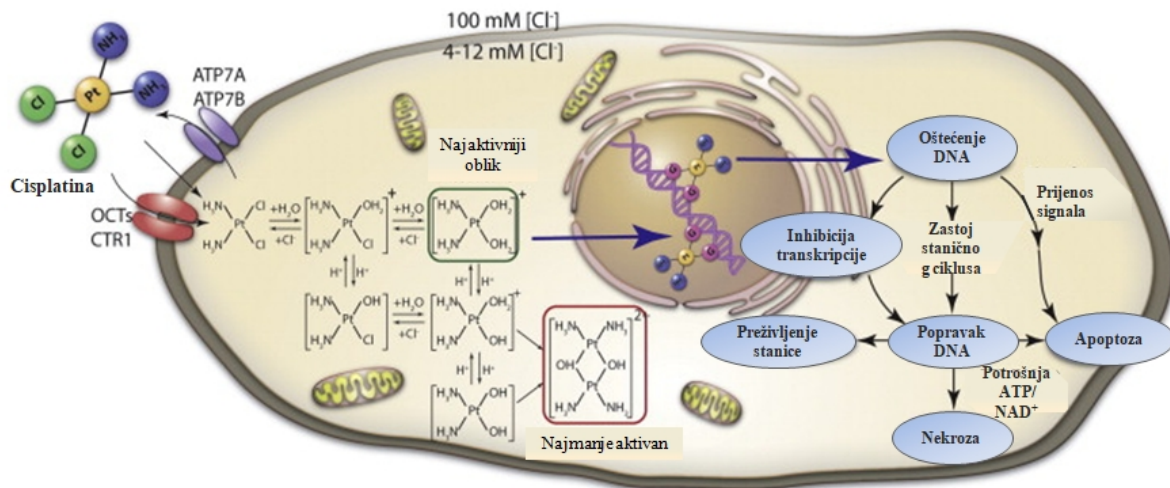
### 1.2.1. Kemoterapeutici na bazi metala

Upotreba metala u liječenju proteže se kroz povijest od samih početaka ljudske civilizacije, a u novije vrijeme dovela je do uspostave zasebnog polja, medicinske anorganske kemije. Metali su zanimljivi za upotrebu jer nude jedinstven spektar djelovanja i strukturnu raznolikost, dostupniju nego kod organskih lijekova. Širok opseg koordinacijskih brojeva i geometrije, dostupnost oksidacijskih stanja, termodinamičke i kinetičke karakteristike, te intrinzične karakteristike kationa metala i liganda nude širok spektar djelovanja koja se mogu iskoristiti i u svrhe sinteze spojeva za eventualno liječenje (Brujininx i Sadler 2009).

Godine 1965. Rosenberg i suradnici proučavajući utjecaj električnog polja na bakterije slučajno su otkrili da produkti hidrolize platinskih elektroda inhibiraju bakterijski rast. Od tih produkata najsnažnije djelovanje pokazala je cisplatina, za koju su kasnije potvrdili da može inhibirati i rast tumorskih stanica (Rosenberg i sur. 1965; Rosenberg i sur. 1969). Usprkos davnom otkriću cisplatina još uvijek dominira u kemoterapiji, s primjenom u preko 50% liječenja različitih epitelnih tumora (Lippert 1999).

Pobliže gledajući mehanizam djelovanja, citotoksičnost cisplatine obuhvaća kombinaciju procesa, uključujući ulazak u stanicu, aktivaciju lijeka, vezanje za DNA te odgovor stanice na stres uvjetovan lijekom (Lippard i sur. 2010). Ulaskom u stanicu difuzijom ili pomoću membranskih transportera (transporter bakra (CTR1)), inertna cisplatina (*cis*-diaminodikloroplatina) se spontano aktivira, zbog relativno niske koncentracije kloridnih iona u usporedbi s onom izvan stanice (Slika 1), nizom reakcija hidratacije koje uključuju supstituciju jedne ili obje kloridne skupine s molekulama vode, čime nastaju visoko reaktivni mono- i bi-hidrirani oblici cisplatine (Siddik 2003). Nastali elektrofilni stvaraju kovalentne veze s purinima (najčešće na poziciji N7) između ili unutar lanaca DNA te veze između DNA i proteina. Formirani adukti DNA i cisplatine, ukoliko se ne uklone, uzrokuju distorziju DNA što ometa procese replikacije i transkripcije, dovodi do staničnog zastoja i na poslijetku

stanične smrti (Sedletska i sur. 2005). Također, aktivirana cisplatina sklona je reagirati s endogenim nukleofilima kao što su reducirani glutation (GSH), metionin, metalotioneini i proteini (preko njihovih cisteina), čime se narušava redoks ravnoteža i potiče oksidativni stres, što dodatno potpomaže oštećenju DNA (Boulikas i Vougiouka 2003).



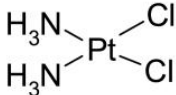
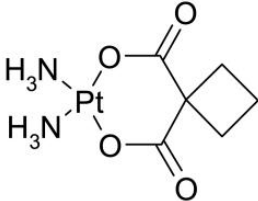
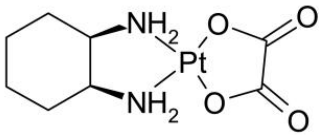
**Slika 1.** Prikaz mehanizma djelovanja cisplatine, od ulaska u stanicu, aktivacije do vezanja na DNA te na poslijetku stanične smrti (preuzeto i prilagođeno prema Oberoi i sur. 2013).

Iako je cisplatina još uvijek najbolja opcija u liječenju pojedinih vrsta tumora (uz rano otkrivanje, izlječenje u preko 90% slučajeva tumora testisa), pokazala se neučinkovitom za liječenje drugih vrsta tumora kao što su tumor debelog crijeva i tumor dojke. Još značajniji problem je nespecifičnost citotoksičnog učinka cisplatine samo za tumorske stanice, budući da citotoksičnost zahvaća i normalne stanice, pogotovo one koje se brzo dijele (stanice koštane srži, stanice epitela crijeva, stanice epitela kože). Kao posljedica toga javljaju se popratne pojave kao što su mučnina, povraćanje, otpadanje kose, ali i oštećenja normalnog tkiva, od kojih su najčešća periferna neurotoksičnost (oštećenje perifernih živaca), nefrotoksičnost (oštećenje bubrega) i ototoksičnost (oštećenje sluha) (Tchounwou i Dasari 2014). Osim navedenih popratnih pojava koje su vidljive ubrzo nakon primitka kemoterapije, zabrinjavaju i one kojima treba više godina za manifestaciju. Alkilirajući agensi kao što je cisplatina, povezani su s nastankom sekundarnih tumora, kao posljedica mutacija koje zaostanu u stanici, budući da je cisplatina karcinogen i mutagen. Tako se cisplatina povezuje s razvojem sekundarne leukemije, ishodom koji je čest nakon tretmana karcinoma testisa i jajnika (Dertinger i sur. 2014).

Kemoterapija često zahtijeva višestruke doze da bi bila uspješna što, osim već spomenute opće toksičnosti, rezultira i otpornošću tumora na lijek. Otpornost može biti primarna (urođena; česta kod karcinoma debelog crijeva, pluća i prostate), nastala tijekom karcinogeneze ili sekundarna (stečena) koja se razvija tijekom terapije (Galuzzi i sur. 2012). Brojni su mehanizmi uključeni u rezistenciju, a mogu se svrstati u nekoliko osnovnih skupina, prateći mehanizam djelovanja same cisplatine (Slika 1): smanjen unos ili povećan iznos lijeka, aktivacija detoksifikacijskog sustava, povećana sposobnost popravka DNA, te izbjegavanje stanične smrti (Gillet i Gottesman 2010).

U svrhu smanjenja nuspojava povezanih s cisplatinom, pokrenuta je sinteza nove generacije učinkovitijih i manje toksičnih analoga lijekova s platinom, s hipotezom kako bi usporavanje reakcija hidratacije moglo izmijeniti toksičnost. U sklopu druge generacije lijekova na bazi platine razvijena je karboplatina (cis-diamin (1,1-ciklobutandikarboksilato) platina (II)), kod koje su kloridne grupe zamijenjene sa stabilnijim bidentatnim ligandom, čime se smanjila nefrotoksičnost, ali je zadržana antitumorska aktivnost (Tablica 1). Nakon odobrenja, zamijenila je cisplatinu u kombinacijskoj terapiji karcinoma jajnika (Calvert i sur. 1982; Ozols i sur. 2003).

**Tablica 1.** Lijekovi na bazi platine i njihova upotreba u liječenju specifičnih tumora (tablica preuzeta i prilagođena prema Oberoi i sur. 2013).

Spoj	Struktura	Godina odobrenja	Klinička upotreba
Cisplatina		1979.	Metastatski tumori testisa i jajnika, karcinom mokraćnog mjehura
Karboplatina		1989.	Karcinom jajnika
Oksaliplatina		2002.	Karcinom debelog crijeva



Treća generacija kompleksa platine dizajnirana je kako bi se zaobišao problem otpornosti tumorskih stanica na cisplatinu i karboplatinu. Kod ove skupine glavna modifikacija odnosi se na amino skupine. Naime, prilikom interakcije s DNA, stabilne amino skupine određuju strukturu adukata, te su adukti cisplatine i karboplatine jednaki, što objašnjava sličnu osjetljivost tumora na ta dva lijeka. Nova hipoteza je dakle bila da bi modifikacija amino skupina dovela do formacije drugačijih lezija DNA, a time i širi spektar antitumorskog djelovanja (O'Dwyer i sur. 1999). Najuspješniji predstavnik ove grupe je oksaliplatina (1,2-diaminocikloheksan platina (II) oksalat), koja se pokazala kao odlična opcija za terapiju tumora koji nisu reagirali na cisplatinu i karboplatinu, kao što je tumor debelog crijeva (de Gramont i sur. 2000).

### **1.3. Organometalni kompleksi**

Zbog ograničene učinkovitosti cisplatine i njenih analoga, uzrokovane raznim popratnim pojavama i otpornošću, razvila se potreba za istraživanjem drugih metalnih kompleksa u želji pronalaska onih s većom selektivnošću i poboljšanom efikasnošću. Sredinom 20. stoljeća, na temelju uspjeha medicinske anorganske kemije, razvija se polje organometalne kemije, koja proučava spojeve koji sadrže direktnu vezu ugljik-metal. U početku su se takvi spojevi smatrali nestabilnima, odnosno neotpornima na djelovanje zraka (kisika) i vode. Međutim, otkrićem molekula kao što su metilkobalamin i enzim acetyl-CoA sintaza, pokazalo se da se takvi spojevi mogu održati i u biološkim uvjetima, što je i važan preduvjet za primjenu tih molekula u farmakologiji. Iz ovog polja naknadno je potekla bioorganometalna kemija koja proučava biokonjugate organometalnih spojeva i biomolekula (DNA, aminokiselina, peptida, ugljikohidrata), koji se primjenjuju i u terapiji tumora (Jaouen i Salmain 2015; Fish i Jaouen 2003).

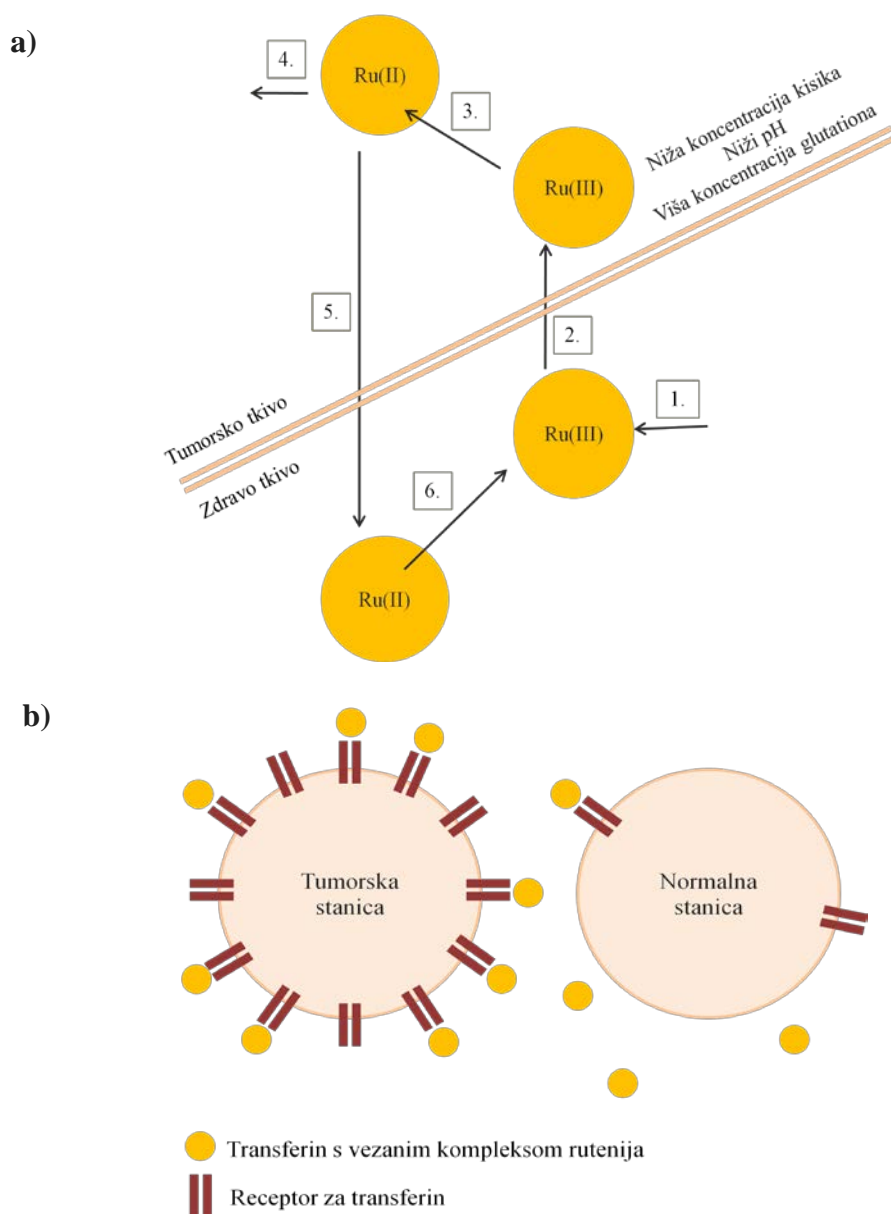
Organometalni kompleksi definiraju se kao kompleksi metala s barem jednom kovalentnom vezom između atoma metala i ugljika. Karakterizira ih središnji atom metala koji je koordinacijskim vezama povezan s organskim ligandima. Njihova jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva, na temelju kojih su prije korišteni kao katalizatori, sada se gledaju kao potencijal za upotrebu u medicini. Odlikuju se raznolikošću u strukturi te raznolikijom stereokemijom u odnosu na organske spojeve. Nadalje, racionalnim dizajnom liganda mogu se kontrolirati ključna kinetička svojstva, kao što je stopa hidrolize liganda. Također, takvi

kompleksi su kinetički stabilni, najčešće nenabijeni, relativno lipofilni, a važna je i dostupnost različitih oksidacijskih stanja središnjeg metala. Ova svojstva doprinose njihovoj protutumorskoj aktivnosti. Od brojnih istraženih metala, istaknuli su se organometalni kompleksi na bazi osmija, iridija i rutenija (Gasser i sur. 2011; Martins i sur. 2014).

### 1.3.1. Organometalni kompleksi rutenija

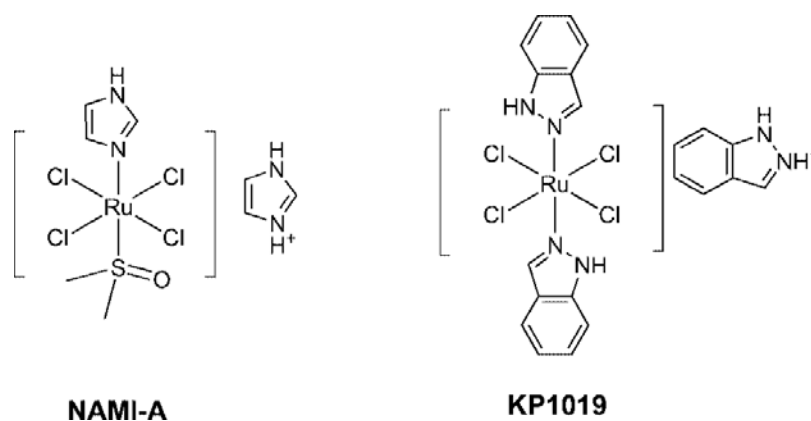
Među istraženim kompleksima, svojim antitumorskim karakteristikama istaknuli su se kompleksi rutenija kao moguća zamjena za spojeve s platinom. Tri su glavne karakteristike koje čine rutenij dobrim kandidatom za upotrebu u farmaceutskoj industriji. Rutenij (Ru) je jedinstven u skupini koju čini šest prijelaznih metala (platina, rodij, paladij, osmij, iridij i rutenij) po tome što su sva tri oksidacijska stanja, II, III i IV, u njegovom slučaju dostupna u fiziološkim uvjetima, s time da je Ru(III) biološki inertniji od druga dva oksidacijska stanja (Dyson i Ang 2006). Redoks potencijal kompleksa može se modificirati promjenama liganda. U biološkim sustavima glutation, askorbat i prijenosnici elektrona reduciraju Ru(III) i Ru(IV), dok molekularni kisik i citokrom oksidaze oksidiraju Ru(II). Ovakav redoks potencijal kompleksa rutenija može se iskoristiti za poboljšanje njihove učinkovitosti (Slika 2a), kroz princip rada prolijeka (mehanizam aktivacije redukcijom). Takav princip podrazumijeva unošenje inertnog Ru(III) kompleksa koji se dolaskom u tumorsko tkivo, gdje vlada reducirajući okoliš, reducira u aktivniji Ru(II) oblik, čime se toksični učinak usmjerava samo na tumorsko, a ne i na zdravo tkivo (Reisner i sur. 2008).

Nadalje, sposobnost Ru da imitira željezo u vezanju za različite biomolekule, kao što su albumin i transportni protein transferin, može pomoći učinkovitijem dopremanju kompleksa rutenija do tumorskih stanica. Tumorske stanice, koje se brže dijele, imaju veću potrebu za željezom, stoga ekspimiraju više receptora za transferin na svojoj površini, čime unose više rutenija (Slika 2b). Ovo svojstvo odgovorno je za selektivnost kompleksa rutenija između tumorskih i normalnih stanica, te posljedično za nižu toksičnost tih kompleksa za normalne stanice u usporedbi s kompleksima platine (Allardyce i Dyson 2001; Dragutan i sur. 2015). Posljednje, ključna prednost lijekova na bazi rutenija je mogućnost kontrole nad kinetikom izmjene liganda preko varijacije liganda (Bruijninx i Sadler 2009).



**Slika 2:** Povoljne karakteristike rutenija: a) predloženi mehanizam aktivacije putem redukcije kompleksa na bazi rutenija *in vivo*: administracija Ru(III) kompleksa (1), vezanje kompleksa preko rutenija za transferin i selektivni unos u tumorske stanice (2), reducirajući okoliš tumorskog tkiva favorizira biološki aktivniji Ru(II) oblik (3), protutumorska aktivnost (4), u slučaju izlaska Ru(II) oblika iz područja niže koncentracije kisika u zdravo tkivo (5), dolazi do ponovne oksidacije u inertiniji Ru(III) oblik (6). b) Prikaz selektivnog unosa transferina s vezanim rutenijem u tumorske stanice (preuzeto i prilagođeno prema Allardyce i Dyson 2001).

Ispitano je jako puno kompleksa rutenija, ali samo nekoliko njih prošlo je detaljne biološke analize. Dva su protutumorska kompleksa rutenija ušla u klinička ispitivanja, NAMI-A koji je trenutno u fazi II, te KP1019 koji je završio fazu I (Slika 3) (Alessio 2017; Hartinger i sur. 2008). Radi se o Ru(III) spojevima koji djeluju po principu aktivacije redukcijom. Istraživanja su pokazala da NAMI-A reducira formaciju metastaza te inhibira njihov rast, ali ima slabi efekt na primarni tumor, dok KP1019 već pri niskim koncentracijama ima visoku učinkovitost, pogotovo na primjeru liječenja karcinoma debelog crijeva, vjerojatno zbog visoke selektivnosti prema tumorima. Osim toga, pokazao se uspješnim i kod tumora koji su otporni na cisplatinu (Jakupec i sur 2008).



**Slika 3:** Strukture NAMI-A i KP1019 (preuzeto iz Dyson i Ang 2006).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja ovog diplomskog rada je:

- a) ispitati citotoksičnost novosintetiziranih organometalnih kompleksa rutenija s trifenilfosfanskim aminokiselinskim biokonjugatima i odabrati spoj biološke aktivnosti interesantne za daljnje eksperimente
- b) ispitati citotoksičnost odabranog spoja na nekoliko tumorskih i normalnih staničnih linija
- c) istražiti mogući mehanizam citotoksičnog djelovanja odabranog spoja.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Stanične linije

U sklopu ovog diplomskog rada korištene su sljedeće ljudske adherentne tumorske stanične linije: stanice karcinoma vrata maternice (HeLa), stanice karcinoma grkljana (HEp2), stanice karcinoma pluća (H460), stanice karcinoma dojke (MDA-MB-231). Također, korištene su i stanice ljudskog karcinoma vrata maternice otporne na cisplatinu (HeLa CA i HeLa CK) prethodno opisane i karakterizirane (Osmak i Eljuga 1993; Brozovic i sur. 2004), te stanice ljudskog karcinoma grkljana s povećanom ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$  (HEp2-K4 i HEp2-K1) prethodno karakterizirane (Brozovic i sur. 2008). Korištene su i dvije normalne ljudske stanične linije, keratinociti (stanice kože) i fibroblasti (stanice vezivnog tkiva) (Steiner i sur. 2016). Sve stanične linije uzgajane su u mediju DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*), s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FCS, engl. *fetal calf serum*). Stanice su rasle u inkubatoru pri 37 °C, u atmosferi određene vlažnosti i mješavine zraka i 5 % CO<sub>2</sub>. Svaka stanična linija rasađivana je dva puta tjedno u svrhu održavanja stanica u kulturi, osim u slučaju fibroblasta koji su zbog sporijeg rasta rasađivani jednom tjedno.

#### 3.1.2. Sinteza i karakterizacija organometalnih kompleksa rutenija s trifenilfosfanskim aminokiselinskim biokonjugatima

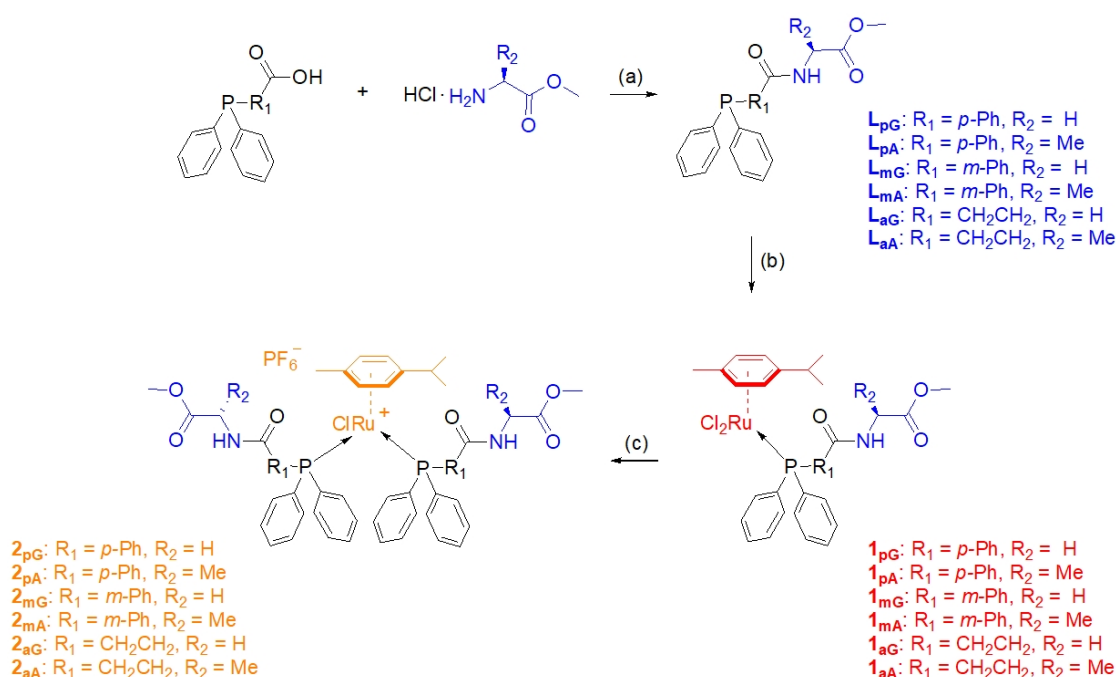
U Laboratoriju za kemiju čvrstog stanja i kompleksnih spojeva (Institut Ruđer Bošković), pod voditeljstvom dr. sc. Srećka Kirina, postdoktorand dr. sc. Zoran Kokan i tehničar Ernest Sanders sintetizirali su nekoliko različitih kompleksa s rutenijem kao metalom, u oksidacijskom stanju II, i organskim ligandima fosfana substituiranih s kiralnim i nekiralnim esterima aminokiselina (neobjavljeni podaci).

Prvi stupanj kemijske sinteze (Slika 4a) podrazumijevao je formiranje amidne veze reakcijom primarne amino skupine aminokiselinskih estera s karboksilnom kiselinom monodentatnih (imaju jedan donorski atom kojim ostvaruju jednu koordinacijsku vezu sa središnjim

metalom) fosfanskim liganada. Kao aminokiseline (plavo) korišteni su akiralni glicin odnosno kiralni L-alanin ( $R_2=H$  ili Me ( $-\text{CH}_3$ )). Fosfanski ligandi (crno) sadrže spojnice ( $R_1= p$ -fenilen,  $m$ -fenilen, etilen) različite supstitucije i fleksibilnosti između donorskog atoma fosfora i karboksilne kiseline. Ovom reakcijom dobiveno je ukupno šest aminokiselinskih biokonjugata označenih L.

Drugi stupanj sinteze (Slika 4b) obuhvaćao je metaliranje aminokiselinskih biokonjugata L s organometalnim prekursorom rutenija (crveno) formule  $\text{Ru}_2(\text{p-cimen})_2\text{Cl}_2$ , čime je dobiveno šest metaliranih biokonjugata oznake 1, u kojima je omjer metal (rutenij):ligand = 1:1 (stehiometrija ML).

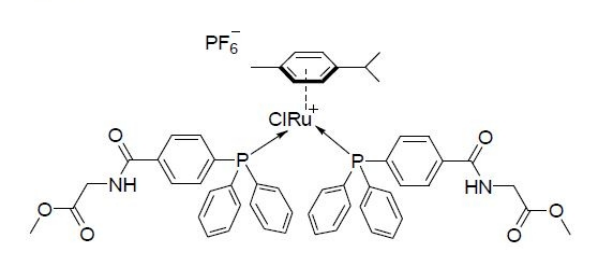
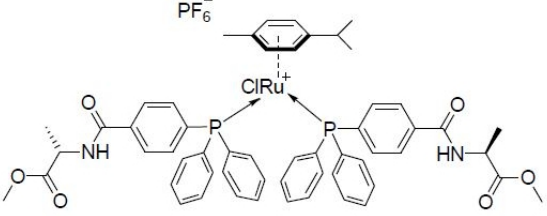
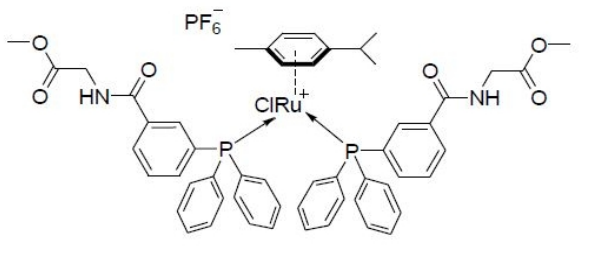
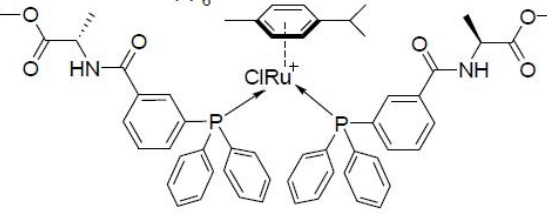
Posljednji, treći stupanj sinteze (Slika 4c) uključivao je reakciju metaliranja biokonjugata 1 s odgovarajućim aminokiselinskim biokonjugatom L, čime je sintetizirano šest metaliranih biokonjugata oznake 2 (stehiometrija  $\text{ML}_2$ ).



**Slika 4:** Reakcija sinteze organometalnih kompleksa rutenija (neobjavljeni podaci).

Kompleksi (biokonjugati L, 1 i 2,  $\text{Ru}_2(\text{p-cimen})_2\text{Cl}_2$ ) su otopljeni u dimetilsulfoksidu i čuvani pri  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  (Tablica 2). Prije upotrebe, kompleksi su razrijeđeni do željene koncentracije u odgovarajućem volumenu medija DMEM.

**Tablica 2.** Oznake i strukturne formule četiri detaljnije istražena organometalna kompleksa rutenija s trifenilfosfanskim aminokiselinskim biokonjugatima.

Oznaka kompleksa	Strukturna formula
<b>2<sub>pG</sub></b>	
<b>2<sub>pA</sub></b>	
<b>2<sub>mG</sub></b>	
<b>2<sub>mA</sub></b>	

Ostale kemikalije, posuđe i uređaji korišteni u radu navedeni su u Tablici 3.



**Tablica 3.** Popis kemikalija, materijala i uređaja korištenih u eksperimentalnom dijelu ovog rada.

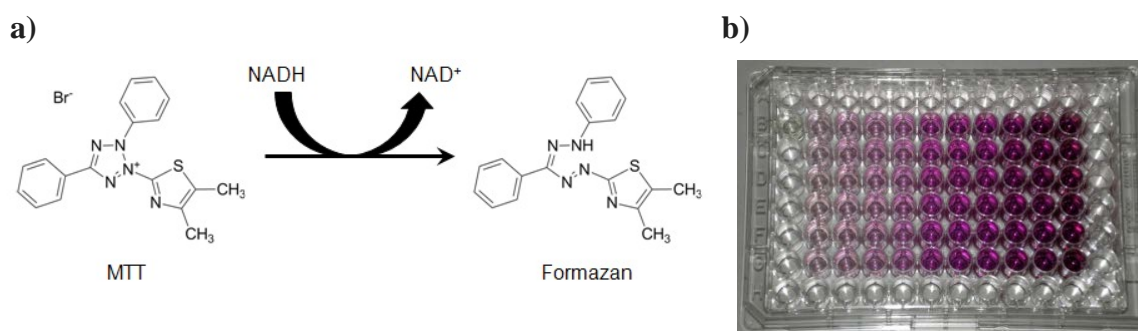
<b>Naziv</b>	<b>Proizvođač</b>
3-(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5difeniltetrazolij bromid (MTT)	Chemicon International Inc., SAD
Akrilamid (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO)	Serva, Njemačka
Amonijev persulfat, APS ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	Serva, Njemačka
Aneksin V - FITC	BD Pharmingen, SAD
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	Invitrogen, SAD
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Kemika, Hrvatska
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium)	Invitrogen, SAD
Etakrina kiselina, ETA (C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> C <sub>12</sub> O <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, SAD
Fetalni goveđi serum (FCS)	Invitrogen, SAD
Fiksir	Fotokemika, Hrvatska
IsoFlow tekućina (engl. IsoFlow Sheath Fluid)	Beckman Coulter Inc., SAD
L-butionin sulfoksimin, BSO (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S)	Sigma-Aldrich, Njemačka
N-acetil cistein, NAC (HSCH <sub>2</sub> CH(NHCOCH <sub>3</sub> )CO <sub>2</sub> H)	Sigma-Aldrich, Njemačka
N, N, N, N'-tetrametiletilenediamin, TEMED (C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, SAD
Nemasno mlijeko u prahu	Roth, Njemačka
Probenecid (C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub> S)	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Propidij jodid, PI (C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> I <sub>2</sub> N <sub>4</sub> )	Thermo Fisher Scientific, SAD
Proteinski marker Precision Plus Protein All Blue Standards	Bio-Rad, SAD
Razvijač	Fotokemika, Hrvatska
RNaza A	Sigma-Aldrich, Njemačka
Tris (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Sigma, Njemačka
Tween-20 <sup>®</sup> (C <sub>56</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub> )	Sigma-Aldrich, SAD
Western Lightening <sup>®</sup> Plus ECL Enhanced Luminol Reagent Plus	PerkinElmer <sup>®</sup> , SAD
Western Lightening <sup>®</sup> Plus ECL Oxidizing Reagent Plus	PerkinElmer <sup>®</sup> , SAD

Fotografski film	GE Healthcare Limited, UK
Nitrocelulozna membrana s porama 0,45 µm	Sigma-Aldrich, Njemačka
Petrijeve zdjelice (100 mm x 15 mm) za uzgoj adherentnih stanica	Falcon Becton Dickinson, SAD
Plastične epruvete (15 i 50 ml)	Falcon Becton Dickinson, SAD
Pločice za uzgoj adherentnih stanica sa 6 i 96 bunarića	Falcon Becton Dickinson, SAD
T-25 i T-75 bočice za uzgoj stanica	Falcon Becton Dickinson, SAD
FACS Calibur	BD Biosciences, SAD
Heraeus cell 150 (inkubator)	Thermo Electron Corporation, SAD
Heraeus Functionline Labofuge 400 (centrifuga)	Thermo Electron Corporation, SAD
Mini-PROTEAN® Tetra System (elektroforetska kadica)	Bio-Rad, SAD
PowerPac™ Basic (izvor napona)	Bio-Rad, SAD
Stat Fax - 2100 (spektrofotometar)	Awareness Technology Inc., SAD
Uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom (homogenizator)	Cole Palmer, SAD
Z2 Coulter® Particle Count and Size Analyzer (automatski brojač i analizator stanica)	Beckman Coulter, SAD

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Određivanje citotoksičnosti

Citotoksičnost novosintetiziranih kompleksa rutenija L, 1 i 2 određena je pomoću testa MTT, koji se temelji na redukciji tetrazolijske boje MTT u netopivi ljubičasto obojeni formazan kao posljedica aktivnosti enzima mitohondrijalne reduktaze, što ukazuje na metaboličku aktivnost stanica. Intenzitet obojenja, proporcionalan vijabilnosti stanica, određuje se mjerenjem apsorbancije pomoću spektrofotometra (Slika 5).



**Slika 5.** Reakcija redukcije MTT-a u formazan (a), mikrotitarska pločica nakon testa MTT (b): gubitak vijabilnih stanica uzrokovan citotoksičnošću spoja rezultira smanjenim intenzitetom ljubičastog obojenja (preuzeto iz Riss i sur. 2013).

Stanice nasadene u T-25 ili T-75 bočicama tripsinizarane su i resuspendirane u mediju DMEM s FCS-om, te nakon toga izbrojane korištenjem brojača stanica. Stanice su zatim nasadene u pločice za uzgoj adherentnih stanica s 96 bunarića ( $2,2-3 \times 10^3$  stanica/180  $\mu$ l medija po bunariću, ovisno o vrsti stanica). Idući dan, stanice su tretirane različitim koncentracijama organometalnih kompleksa rutenija (0,02 ml po bunariću) te je svaka koncentracija testirana u četiri bunarića. Nakon 72 sata inkubacije pri 37 °C uklonjen je medij te je u svaki bunarić dodano 40  $\mu$ l otopine MTT u kojoj su stanice inkubirane 3-4 sata pri istoj temperaturi. Nastali kristali formazana otopljeni su dodavanjem 170  $\mu$ l DMSO-a u svaki bunarić i stavljanjem pločice na tresilicu oko 15 min. Intenzitet obojenja izmjeren je na 590

nm pomoću spektrofotometrijskog čitača mikrotitarskih pločica. Eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta.

Za određivanje uloge glutaciona u odgovoru HeLa stanica na djelovanje četiri ispitana biokonjugata ( $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$ ,  $2_{mA}$ ), stanice na jednoj pločici predtretirane su specifičnim inhibitorom sinteze glutaciona, L-butionin sulfoksiminom (BSO), koncentracije 0,001 mM preko noći, dok su stanice na drugoj pločici predtretirane s prekursorom u sintezi glutaciona, N-acetil cisteinom (NAC), koncentracije 5 mM u trajanju 2 sata. Stanice su nakon toga tretirane različitim koncentracijama biokonjugata, a nakon 72 sata izmjerena je apsorbancija formazana kao što je prethodno opisano.

Kako bi se provjerilo ima li glutation ulogu u detoksikaciji spoja  $2_{mG}$ , stanice HeLa predtretirane su specifičnim inhibitorom glutation-S-transferaze, etakrinom kiselinom, koncentracije 5  $\mu\text{g/ml}$  i 7,5  $\mu\text{g/ml}$  u trajanju od 2 sata. Nadalje, u idućem eksperimentu stanice HeLa predtretirane su specifičnim inhibitorom membranskih transportera MRP1/2 (engl. *multidrug resistance proteins*), probenecidom, koncentracije 0,2 mM i 0,625 mM u trajanju od 2 sata. Stanice su nakon toga tretirane različitim koncentracijama spoja  $2_{mG}$ , a nakon 72 sata izmjerena je apsorbancija kao što je prethodno opisano. Podaci su statistički analizirani korištenjem student T-testa. Svaki eksperiment ponovljen je najmanje tri puta.

### 3.2.2. Analiza staničnog ciklusa

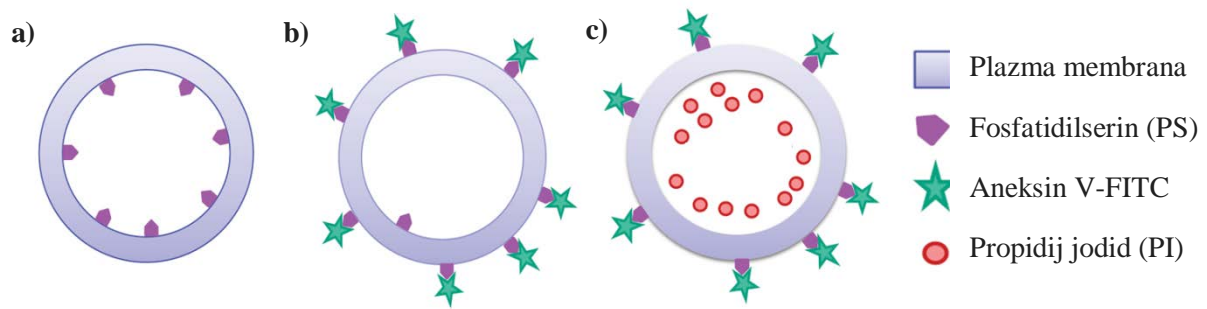
Za određivanje staničnog ciklusa, stanice HeLa nasađene su u koncentraciji  $5 \times 10^5$  stanica/10 ml u 10 cm Petrijevu zdjelicu. Nakon 24 sata stanice su tretirane s 10  $\mu\text{M}$   $2_{mG}$  kako bi se vidio učinak kompleksa na stanice u ovisnosti o vremenu izlaganja, odnosno s različitim koncentracijama spoja  $2_{mG}$  (10  $\mu\text{M}$ , 16  $\mu\text{M}$ , 22  $\mu\text{M}$ ) za učinak u ovisnosti o koncentraciji. Kontrolni uzorak bile su netretirane stanice. Stanice su sakupljene u odgovarajuće epruvete za centrifugiranje nakon određenog vremena inkubacije: za odgovor u ovisnosti o vremenu stanice su sakupljene nakon inkubacije od 24, 48 i 72 sata, a za odgovor u ovisnosti o koncentraciji nakon inkubacije od 72 sata. Sakupljene stanice su centrifugirane 5 min na 1200 okretaja/min, supernatant je dekantiran, a stanice su dva puta ispirane hladnim fosfatnim puferom (PBS, bez  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ ). Nakon ispiranja, suhi talog stanica je resuspendiran u 200  $\mu\text{l}$  PBS-a, da bi se dobile pojedinačne stanice u suspenziji. Potom, uz blago vorteksiranje suspenziji stanica je kap po kap dodano 3 ml hladnog 95 % etanola. Alkohol se koristi za

fiksaciju i permeabilizaciju stanica, što omogućuje ulazak boje u stanicu do DNA. Uzorci su pohranjeni pri -20 °C.

Na dan analize uzoraka protočnim citometrom, pripremljene su otopine RNaze A (c=0,1 µg/µl) i propidij jodida (PI) (c=50 µg/ml). Propidij jodid je boja koja se veže za DNA i fluorescira, dok RNaza A osigurava da se oboji samo DNA, a ne RNA. Nakon što su izvađeni iz zamrzivača, uzorci su centrifugirani 5 min na 1200 okretaja/min pri +4 °C. Supernatant je pažljivo dekantiran, a uzorci su ostavljeni na ledu 2 min kako bi zaostali alkohol ispario. Talog stanica zatim je dva puta ispran s PBS-om i centrifugiran 5 min na 1200 okretaja/min. Uzorcima je nakon toga dodano 200 µl pripremljene otopine RNaze A te su resuspendirani i inkubirani u vodenoj kupelji 15-30 min. U zamračenom prostoru dodano je 200 µl otopine PI-a, te su suspenzije stanica prebačene u epruvete za protočni citometar, stavljene u led i inkubirane najmanje 30 min. Uzorci su analizirani protočnim citometrom (FACS Calibur). Dobiveni rezultati analizirani su korištenjem programa FCS Express 5 (De Novo Software, SAD).

### **3.2.3. Određivanje vrste stanične smrti pomoću protočne citometrije**

Za utvrđivanje vrste smrti stanica korištena je metoda bojanja stanica aneksinom V-FITC i PI-om, čija je fluorescencija mjerena protočnim citometrom. Ova metoda temelji se na određivanju jedne od najranijih karakteristika apoptoze, gubitka asimetrije plazma membrane. U apoptotskoj stanici, membranski fosfolipid fosfatidilserin (PS) se premješta s unutrašnje na vanjsku stranu plazma membrane. Aneksin V je 35-36 kDa velik protein koji s visokim afinitetom veže PS izložen na površini apoptotskih stanica. Aneksin V je za potrebe ove metode konjugiran s fluorokromom, što omogućuje njegovu detekciju protočnim citometrom. Također, nakon premještanja PS-a slijedi gubitak integriteta membrane u kasnijim fazama smrti stanice. Zato se uz aneksin V-FITC, stanice boje s PI-om, što omogućuje razlikovanje stanica u ranoj i kasnoj apoptozi/nekrozi. Stanice s intaktnom membranom (vijabilne stanice i stanice u ranoj apoptozi) neće propuštati PI, dok će on proći kroz permeabilizirane membrane (stanice u kasnoj apoptozi/nekrozi) (Slika 6).



**Slika 6:** Prikaz stanica s biljezima za mjerenje smrti stanica: a) vijabilna stanica, aneksin V/PI negativna; b) stanica u ranoj apoptozi, aneksin V pozitivna, PI negativna; c) stanica u kasnoj apoptozi/nekrozi: aneksin V/PI pozitivna (preuzeto i prilagođeno prema protokolu proizvođača BD Biosciences).

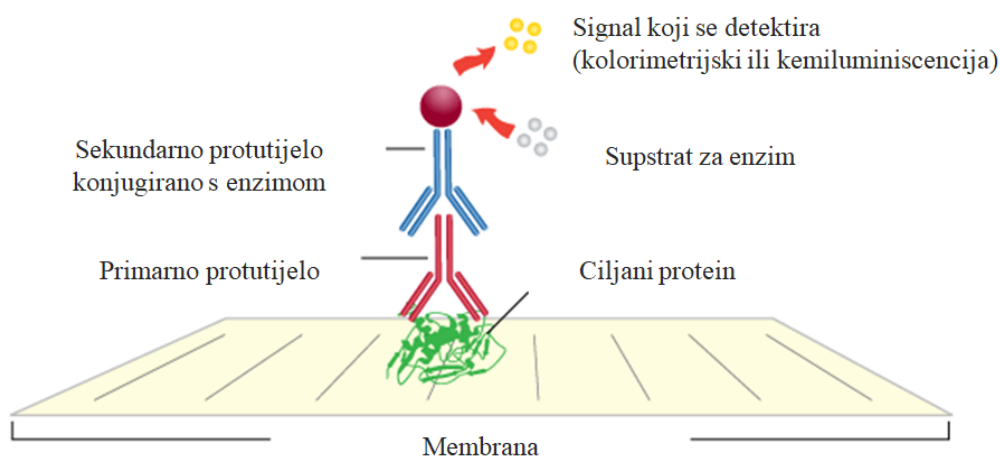
Stanice HeLa nasađene su u koncentraciji  $1,5 \times 10^6$  stanica/10 ml u 10 cm Petrijevu zdjelicu. Nakon 24 sata, stanice su tretirane s određenim koncentracijama kompleksa  $2_{mG}$ . Stanice su sakupljane nakon 48 sati inkubacije. Netretirane stanice ostavljene su za negativnu kontrolu, a za pozitivnu kontrolu stanice su zagrijane pri  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 10 min. Najprije je sakupljen medij, u kojem su se nalazile mrtve stanice, i prebačen u epruvete za centrifugiranje. Stanice koje su još bile prihvaćene za podlogu tripsinizirane su i potom sakupljene. Za svaku suspenziju stanica na brojaču stanica je određen njihov broj. Suspenzije stanica centrifugirane su 5 min na 1100 okretaja/min., nakon čega je dekantiran supernatant, a talog stanica je resuspendiran u 1 ml PBS-a. Nakon ponovnog centrifugiranja, talog je resuspendiran u odgovarajućem volumenu PBS-a (tako da suspenzija stanica sadrži najmanje  $10^5$  stanica), te je suspenzija prebačena u epruvete za protočni citometar (uzorak stanica za negativnu i pozitivnu kontrolu podijeljen je u četiri epruvete). U svaki pripremljeni uzorak dodano je 0,5 ml 1x pufera koji veže aneksin V-FITC (ABB, engl. *annexin-binding buffer*). Uzorci su potom centrifugirani 10 min na 1200 okretaja/min. Za to vrijeme, u mraku su prema Tablici 4 pripremljene otopine aneksina V-FITC i PI-a ( $c=50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ). Supernatant je dekantiran, a talog stanica je resuspendiran u  $100\text{ }\mu\text{l}$  pripremljene otopine, te inkubiran 15 min u mraku pri sobnoj temperaturi. Na kraju je na svaki uzorak još dodano  $400\text{ }\mu\text{l}$  1x ABB-a, nakon čega su epruvete s uzorcima stavljene u led. Uzorci su odmah analizirani protočnim citometrom.

**Tablica 4.** Priprema otopina za aneksin/PI test.

	Uzorak	Otopina
Negativna kontrola/Pozitivna kontrola	O	100 $\mu$ l 1x ABB
	A	2,5 $\mu$ l aneksina + 97,5 $\mu$ l 1x ABB
	PI	10 $\mu$ l PI + 90 $\mu$ l 1x ABB
	A + PI	2,5 $\mu$ l aneksina + 10 $\mu$ l PI + 87,5 $\mu$ l 1x ABB
Tretirani uzorci	A + PI	

### 3.2.4. Određivanje ekspresije proteina

Analiza Western blot koristi se za određivanje prisutnosti i jačine ekspresije proteina, a temelji se na prepoznavanju i stvaranju kompleksa između antigena koji se nalazi na membrani i protutijela (Slika 7).



**Slika 7.** Princip imunodetekcije ciljanog proteina metodom Western blot. Proteini izolirani iz stanica te razdvojeni gel-elektroforezom, prenešeni su na nitroceluloznu membranu. Ciljani protein specifično prepoznaje primarno protutijelo. Njegov položaj određuje se pomoću sekundarnog protutijela (anti-imunoglobulina) za koje je vezan enzim. Ovaj enzim omogućava vizualizaciju traženog proteina na membrani, tako što dodani supstrat pretvara u vidljiv signal koji se detektira (preuzeto i prilagođeno prema protokolu proizvođača Leinco Technologies, Inc.).

Metoda Western blot korištena je za određivanje specifičnog biljega apoptoze, PARP-a (poli(ADP-riboza) polimeraza). Stanice HeLa nasadene su u koncentraciji  $3 \times 10^5$  stanica/5 ml u 6 cm Petrijevu zdjelicu. Nakon 24 sata, stanice su tretirane s 22  $\mu\text{M}$  koncentracijom kompleksa  $2_{\text{mG}}$ , te inkubirane 24, 48, odnosno 72 sata. Adherentne i plutajuće stanice su sakupljene te je za svaku staničnu suspenziju određena gustoća, prema protokolu opisanom u poglavlju 3.5. (do koraka kada je talog stanica resuspendiran u 1 ml PBS-a). Resuspendirani talog prebačen je u epruvete (volumena 2 ml) te centrifugiran, nakon čega je supernatant pažljivo uklonjen pomoću pipete kako bi se dobio suhi talog stanica. Uzorci su pohranjeni pri  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  do analize. Na dan analize, suhi talozi stanica su otopljeni pri sobnoj temperaturi, nakon čega je na uzorke dodana odgovarajuća količina 1x koncentriranog pufera za uzorke (SB, engl. *sample buffer*) (2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 6,8; 1,2 g SDS; 3 ml glicerol; 20 mg bromfenol-plavo; 1,2 ml 2-merkaptetanol u 10 ml  $\text{biH}_2\text{O}$ ) prethodno zagrijanog pri  $96\text{ }^\circ\text{C}$  (100  $\mu\text{l}$  1x SB na  $7 \times 10^5$  stanica). Kako bi se iz stanica izolirali proteini, uzorci su homogenizirani pomoću ultrazvuka tri puta po 5 sekundi. Gustoća gela potrebnog za razdvajanje proteina određena je prema veličini proteina koji je promatran: za PARP je to 10 %. 25  $\mu\text{l}$  svakog uzorka dodano je na pripremljeni 10 % SDS poliakrilamidni gel (pripremljen prema Tablici 5), te je pokrenuta elektroforeza (80-100 V, 2 sata). Razdvojeni proteini s gela su prenešeni na nitroceluloznu membranu, koristeći istu aparaturu Bio-Rad uz uvjete za transfer (400 mA, 1 sat), u pripremljenom Towbin transfer puferu (200 ml MeOH + 100 ml 10 % SDS + 700 ml  $\text{deH}_2\text{O}$ ). Nakon završenog transfera, membrana je odvojena od gela. Uspješnost transfera proteina na membranu provjerena je bojanjem s Ponceau Red bojom, nakon čega je membrana isprana u 1x TBS-T-u (0,788 g 10 mM Tris-HCl, 4,38 g 150 mM NaCl, 0,5 ml 0,1 % Tween 20 u 500 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ). Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje, membrana je inkubirana u puferu za blokiranje (5 % nemasno mlijeko u 1x TBS-T) 1 sat pri sobnoj temperaturi. Membrana je nakon blokiranja isprana u 1x TBS-T-u, nakon čega je uslijedila inkubacija s odgovarajućim primarnim protutijelom (razrjeđenje 1:1000, 5 % nemasno mlijeko u 1x TBS-T) (Tablica 6) preko noći pri  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon ispiranja u 1x TBS-T-u, membrana je inkubirana s odgovarajućim sekundarnim protutijelom konjugiranim s peroksidazom iz hrena (razrjeđenje 1:5000, 5 % nemasno mlijeko u 1x TBS-T), 1 sat pri sobnoj temperaturi. Proteini su vizualizirani reagensom *Western Lightning<sup>®</sup> Plus ECL*, čije se komponente miješaju u omjeru 1:1 (*Oxidizing Reagent; Enhanced Luminol Reagent*). Cijela membrana nakapana je s pripremljenom otopinom i ostavljena 2 min, nakon čega je razvijena slika na filmu u tamnoj komori. Membrana je također inkubirana s protutijelom za ERK1/2



kako bi se potvrdilo nanošenje jednake količine proteina na gel. ERK1/2 je korišten kao kontrola pošto se njegova ekspresija ne mijenja nakon tretmana stanica.

**Tablica 5.** Priprema gelova za SDS elektroforezu.

	Gornji gel (ml)	Donji gel (ml)
	5 %	10 %
H <sub>2</sub> O	5,5	7,9
30 % smjesa akrilamida-bisakrilamida	1,3	6,7
Tris	1,0 (pH 6,8)	5,0 (pH 8,8)
10 % SDS	0,08	0,2
10 % APS	0,08	0,2
TEMED	0,008	0,008

**Tablica 6.** Korištena protutijela.

	Specifičnost	Proizvođač	Kataloški broj
<b>Primarna protutijela</b>	ERK1/2 (K-23) (zečje)	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-94, Lot # F1615
	PARP-1 (mišje)	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-8007, Lot # F2816
<b>Sekundarna protutijela</b>	Protu-mišje IgG ECL™ HRP	GE Healthcare Life Sciences, SAD	NA931V, Lot # 9799907
	Protu-zečje IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-2370, Lot # B0445

### 3.2.5. Određivanje formacije reaktivnih vrsta kisika

Količina reaktivnih vrsta kisika (ROS, engl. *reactive oxygen species*) nastalih uslijed tretmana određena je korištenjem fluorescentne boje CM-H<sub>2</sub>DCFDA (klorometilni derivat 2',7'-diklorohidrofluorescein diacetata). Pripremljena je 1 mM otopina u DMSO-u i čuvana pri -20 °C do upotrebe. Stanice HeLa nasađene su na pločicu sa 6 bunarića u koncentraciji 4x10<sup>5</sup> stanica/2 ml po bunariću. 24 sata nakon nasađivanja, maknut je izvorni medij, te su stanice isprane u mediju bez indikatora i seruma. Medij je uklonjen te je na stanice dodan 1 ml pripremljene 10 µM radne otopine boje (10 µl boje + 990 µl DMEM bez indikatora i seruma). Stanice su inkubirane 1 sat. Medij s bojom je zatim maknut, a stanice su tretirane s različitim

koncentracijama kompleksa  $2_{mG}$  pripremljenih u mediju bez indikatora, tijekom 1 i 3 sata. Kao pozitivna kontrola korištene su stanice tretirane tijekom 30 min s 0,01 %  $H_2O_2$ . Stanice su sakupljene (tripsinizacija se mora napraviti brzo) u mediju sa serumom bez indikatora i centrifugirane. Supernatant je dekantiran, a talog je još jednom ispran u PBS-u, nakon čega je resuspendiran u 200  $\mu$ l PBS-a. Potom, uz blago vorteksiranje suspenziji stanica je kap po kap dodano 3 ml hladnog 80 % metanola. Uzorci mogu biti pohranjeni pri  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  do upotrebe. Prije mjerenja uzorci su centrifugirani, uklonjen je metanol, te su stanice isprane u PBS-u. Talog je resuspendiran u 1 ml PBS-a. Uzorci su analizirani protočnim citometrom.

### 3.2.6. Mjerenje količine rutenija u ukupnom staničnom lizatu

Stanice HeLa nasadene su na pločicu sa 6 bunarića u koncentraciji  $5 \times 10^5$  stanica/2 ml po bunariću kako bi se izmjerila ukupna količina rutenija u stanici nakon tretmana. 24 sata nakon nasadivanja stanice su tretirane s 150  $\mu$ M koncentracijama kompleksa  $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$ ,  $2_{mA}$  kroz 2, 4 i 6 sati, ili s različitim koncentracijama kompleksa tijekom 2 sata. Nakon inkubacije, uklonjen je medij, te su stanice tripsinizirane i sakupljene u epruvete. Stanice su isprane tri puta s hladnim PBS-om, nakon čega su peleti stanica digerirani 1 sat u 0,5 ml 70 %  $HNO_3$  zagrijane u vodenoj kupelji pri  $75\text{ }^\circ\text{C}$ . Alikvoti volumena 400  $\mu$ l razrijeđeni su do ukupnog volumena od 8 ml u Milli-Q vodi. Količina rutenija u stanicama pojedinog uzorka izmjerena je korištenjem masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS, engl. *inductively coupled plasma mass spectrometry*).

### 3.2.7. Statistička analiza

Rezultati metode MTT izraženi su kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice,  $\pm$  vrijednost standardne devijacije (SD). Statistička značajnost (vrijednost P) razlike između preživljenja tretiranih i kontrolnih stanica izračunata je korištenjem student T-testa, u programu GraphPad Software.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Citotoksičnost novosintetiziranih organometalnih kompleksa rutenija s trifenil fosfanskim aminokiselinskim biokonjugatima

Korištenjem metode MTT i stanica HeLa kao eksperimentalnog sustava, ispitana je citotoksičnost šest aminokiselinskih biokonjugata L, šest metaliranih biokonjugata 1, šest metaliranih biokonjugata 2 te organometalnog prekursora rutenija  $\text{Ru}_2(\text{p-cimen})_2\text{Cl}_2$ . Kompleksi se međusobno razlikuju po funkcionalnim skupinama R1 i R2, te u slučaju metaliranih biokonjugata, u omjeru metala i liganda (detaljnije opisano u poglavlju 3.1.2.). Izmjerene vrijednosti  $\text{IC}_{50}$  prikazane su u Tablici 7. Rezultati pokazuju da su vrijednosti  $\text{IC}_{50}$  (koncentracija pri kojoj je preživjelo 50 % stanica) biokonjugata L i 1, te prekursora rutenija veće od 33,3  $\mu\text{M}$  (33,3  $\mu\text{M}$  je bila maksimalna koncentracija kojom su se stanice tretirale kako bi se izbjegla toksičnost otapala (DMSO)), dok su četiri ( $2_{\text{pG}}$ ,  $2_{\text{pA}}$ ,  $2_{\text{mG}}$ ,  $2_{\text{mA}}$ ) od šest sintetiziranih biokonjugata 2 pokazala toksičnost, s  $\text{IC}_{50}$  manjom od 33,3  $\mu\text{M}$ . Rezultati pokazuju da su biokonjugati 2 citotoksičniji za stanice HeLa, u odnosu na ostale ispitivane konjugate, te su oni korišteni za daljnja biološka istraživanja. Vrijednost  $\text{IC}_{50}$  kompleksa  $2_{\text{mG}}$ , koja je između one izmjerene za komplekse  $2_{\text{pG}}$  i  $2_{\text{mA}}$ , te njegova sličnost u strukturi s najtoksičnijim kompleksom  $2_{\text{mA}}$ , odredila ga je kao kandidata za detaljnija ispitivanja biološkog učinka gore opisanih novosintetiziranih konjugata.

**Tablica 7.** Citotoksična aktivnost novosintetiziranih kompleksa rutenija na stanicama HeLa izražena kao vrijednost  $\text{IC}_{50}$ ,  $\pm$  SD vrijednost nakon 72 sata tretmana. Eksperiment je ponovljen tri puta.

Kompleksi	$\text{IC}_{50\pm\text{SD}}$ ( $\mu\text{M}$ )
$L_{\text{pG}}$	>33,3
$L_{\text{pA}}$	>33,3
$L_{\text{mG}}$	>33,3
$L_{\text{aG}}$	>33,3
$L_{\text{aA}}$	>33,3

<b>1<sub>pG</sub></b>	>33,3
<b>1<sub>pA</sub></b>	>33,3
<b>1<sub>mG</sub></b>	>33,3
<b>1<sub>mA</sub></b>	>33,3
<b>1<sub>aG</sub></b>	>33,3
<b>1<sub>aA</sub></b>	>33,3
<b>2<sub>pG</sub></b>	<b>30±3,2</b>
<b>2<sub>pA</sub></b>	<b>15±3,7</b>
<b>2<sub>mG</sub></b>	<b>16±2,5</b>
<b>2<sub>mA</sub></b>	<b>5±2,7</b>
<b>2<sub>aG</sub></b>	>33,3
<b>2<sub>aA</sub></b>	>33,3
<b>Ru<sub>2</sub>(<i>p</i>-cym.)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	>33,3

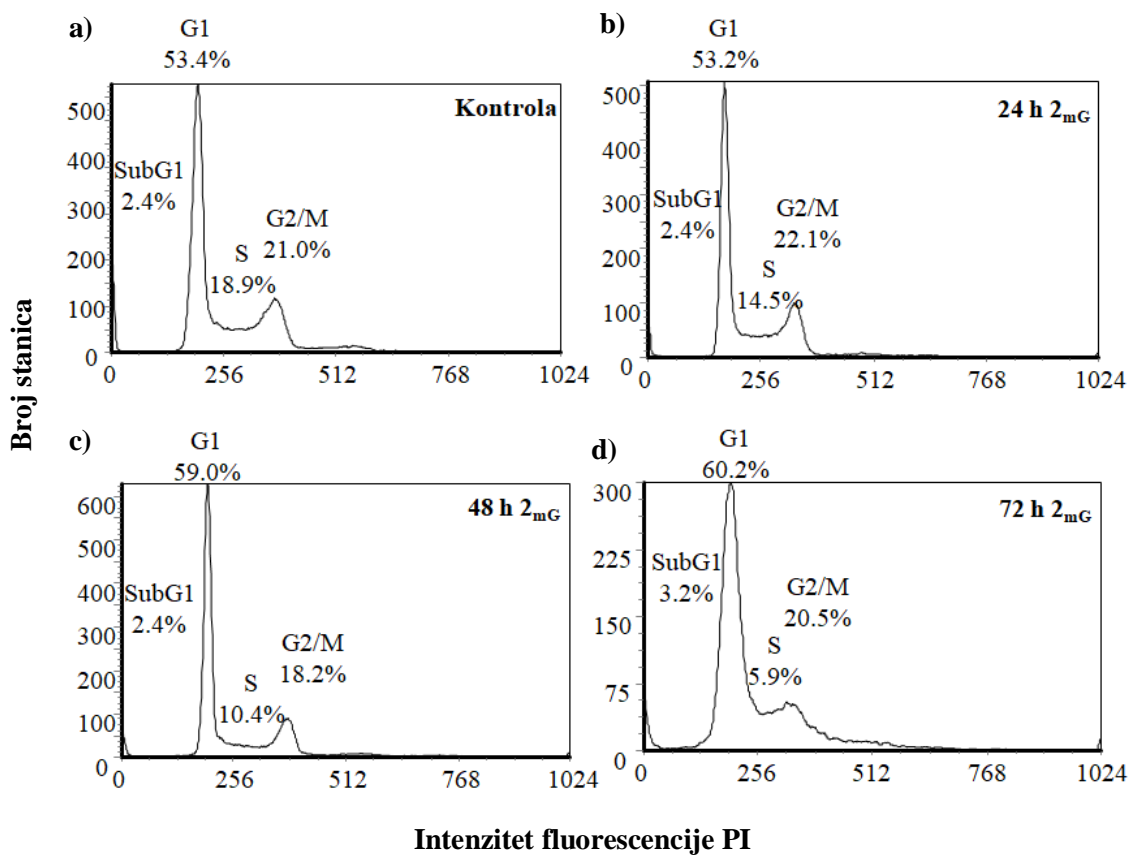
Kako bi se vidjelo postoji li širi opseg protutumorskog djelovanja novosintetiziranih konjugata ili je ono vezano uz specifičnu tumorsku liniju stanica, citotoksičnost kompleksa **2<sub>mG</sub>** ispitana je na nekoliko različitih ljudskih tumorskih linija stanica (HeLa, H460, HEp2, MDA-MB-231). Također, sa spomenutim kompleksom tretirane su i dvije normalne linije stanica (keratinociti i fibroblasti). Rezultati, prikazani u Tablici 8, pokazuju da su sve tumorske linije stanica osjetljive na kompleks **2<sub>mG</sub>**, s vrlo sličnim vrijednostima IC<sub>50</sub>, dok je zanemariva citotoksična aktivnost prema normalnim staničnim linijama. Ovi rezultati pokazuju da novosintetizirani biokonjugati imaju preferencijalnu toksičnost za tumorske u odnosu na normalne stanice.

**Tablica 8.** Citotoksična aktivnost kompleksa  $2_{mG}$  na nekoliko tumorskih i normalnih staničnih linija, izražena kao  $IC_{50}$ ,  $\pm$  SD vrijednost izmjerena nakon 72 h tretmana. Eksperiment je ponovljen tri puta.

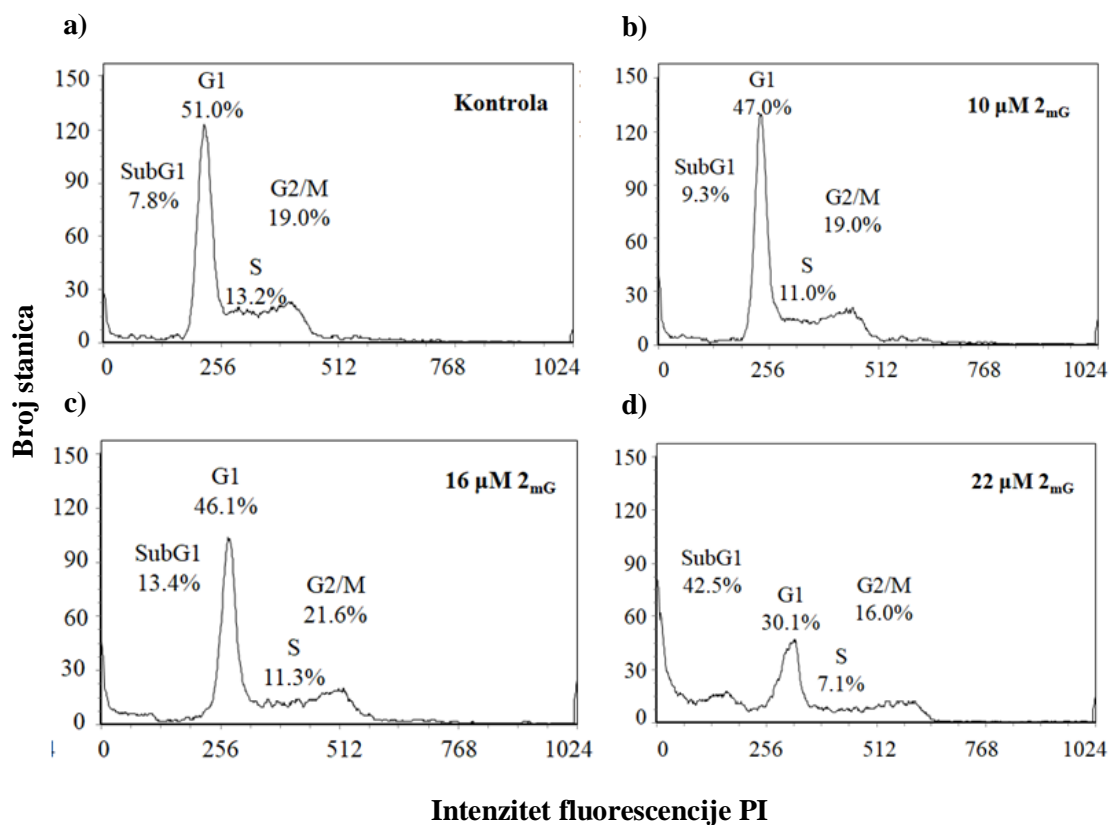
Stanične linije	HEp2	H460	HeLa	MDA-MB-231	Keratinociti	Fibroblasti
$2_{mG}$ ( $IC_{50} \pm SD$ , $\mu M$ )	$16 \pm 2,5$	$15 \pm 0,6$	$14 \pm 4,7$	$12,3 \pm 0,9$	$>33,3$	$>33,3$

#### 4.2. Kompleks $2_{mG}$ potiče nakupljanje stanica u G1/S fazi staničnog ciklusa

Nakon određivanja citotoksičnosti kompleksa  $2_{mG}$ , analiziran je utjecaj na stanični ciklus kako bi se dobio uvid u mehanizam njegovog djelovanja. Stanice HeLa najprije su tretirane  $10 \mu M$  koncentracijom  $2_{mG}$  tijekom 24, 48 i 72 sata. Rezultati pokazuju da  $2_{mG}$  potiče postepeno nakupljanje stanica u G1/S fazi staničnog ciklusa u ovisnosti o duljini trajanja tretmana (Slika 8b-d), u odnosu na kontrolne netretirane stanice koje pokazuju pravilnu raspodjelu stanica po fazama ciklusa (Slika 8a). Nadalje, stanice HeLa su tretirane različitim koncentracijama  $2_{mG}$  tijekom 72 sata. Rezultati pokazuju da  $2_{mG}$  zaustavlja stanice u G1/S fazi staničnog ciklusa u ovisnosti o koncentraciji (Slika 9b-d), čime su potvrđeni prethodni rezultati (Slika 8b-d). Nadalje, iz rezultata je vidljivo da  $2_{mG}$  potiče nakupljanje tzv. SubG1 populacije stanica, koja odgovara mrtvim stanicama (Slika 9b-d).



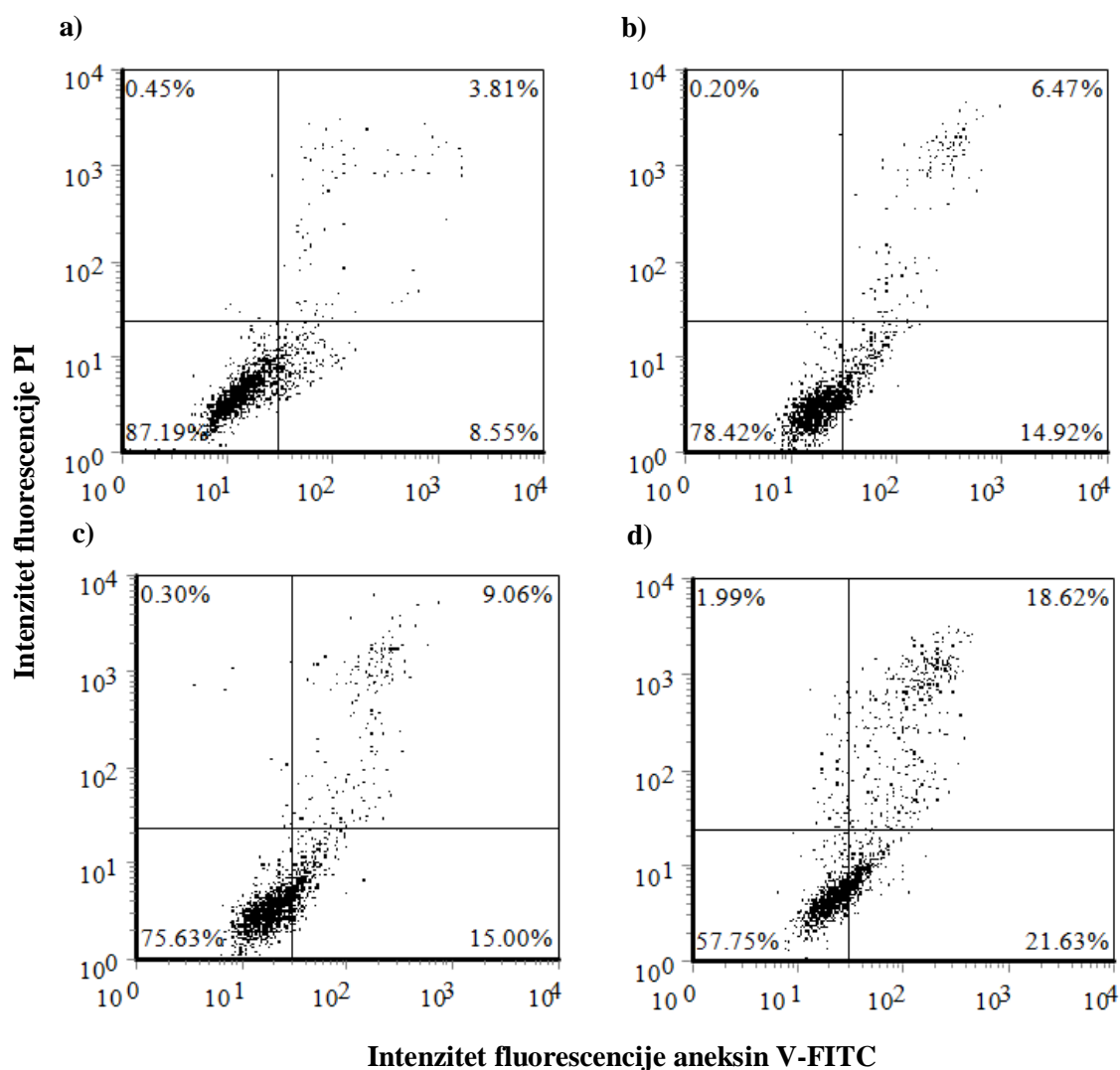
**Slika 8.** Kompleks 2<sub>mG</sub> uzrokuje zastoj staničnog ciklusa u G1/S fazi staničnog ciklusa. Stanice HeLa su 24 sata nakon nasađivanja tretirane s 10 μM koncentracijom kompleksa 2<sub>mG</sub>, te sakupljene nakon 24 (b), 48 (c) i 72 sata (d) inkubacije. Kao kontrola korištene su netretirane stanice (a). Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta, a prikazani su reprezentativni podaci jednog eksperimenta.



**Slika 9.** Kompleks 2<sub>mG</sub> uzrokuje povećanje SubG1 populacije stanica u ovisnosti o dozi. Stanice HeLa su 24 sata nakon nasađivanja netretirane (kontrola) (a) ili tretirane s 10 μM (b), 16 μM (c) i 22 μM (d) koncentracijom kompleksa 2<sub>mG</sub> te sakupljene nakon 72 sata inkubacije. Eksperiment je ponovljen najmanje tri puta, a prikazani su reprezentativni podaci jednog eksperimenta.

#### 4.3. Kompleks 2<sub>mG</sub> potiče programiranu smrt stanice

Analizom staničnog ciklusa utvrđeno je da kompleks 2<sub>mG</sub> uzrokuje nakupljanje stanica u SubG1 fazi staničnog ciklusa (Slika 9), što ukazuje na indukciju apoptoze. Kako bi se dodatno utvrdilo ugibaju li stanice apoptozom ili nekrozom, što je bitno za potencijalnu upotrebu u liječenju, stanice HeLa su nakon tretmana s različitim koncentracijama kompleksa 2<sub>mG</sub> i inkubacije od 48 sati obojane aneksinom V-FITC i PI-om, te je njihova fluorescencija mjerena protočnim citometrom. Rezultati pokazuju da je povećanje postotka stanica u apoptozi proporcijalno porastu koncentracije kompleksa 2<sub>mG</sub>.

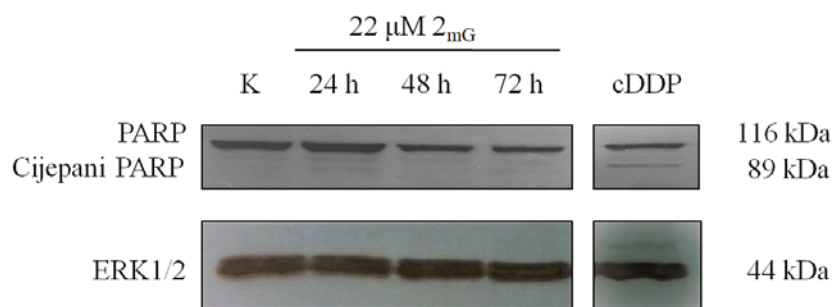


**Slika 10.** Indukcija smrti stanice kompleksom  $2_{mG}$  u ovisnosti o dozi. Stanice HeLa su netretirane (a) ili tretirane s  $10 \mu\text{M}$  (b),  $16 \mu\text{M}$  (c) i  $22 \mu\text{M}$  (d) koncentracijom kompleksa  $2_{mG}$  tijekom 48 sati. Prikazani su reprezentativni rezultati od ukupno tri ponovljena eksperimenta.

Kako bismo dodatno potvrdili radi li se o programiranoj smrti, stanice su tretirane  $22 \mu\text{M}$  koncentracijom kompleksa  $2_{mG}$ , te su uzorci prikupljeni tijekom 24-72 sata. Cijepanje PARP-a, kao prihvaćenog biljega apoptoze (Elmore 2007), praćeno je korištenjem metode Western blot inkubacijom membrane s anti-PARP-1 protutijelom. Za pozitivnu kontrolu stanice su tretirane sa cisplatinom (72 sata,  $5 \mu\text{M}$ ), koja dokazano uzrokuje apoptozu (Rabik i Dolan 2007). Rezultati, prikazani na slici 11, pokazuju pad u količini nepocijepanog oblika proteina PARP, s povećanjem vremena inkubacije, u odnosu na netretirane stanice, međutim nije detektiran pocijepani oblik PARP-a, kao kod cisplatine. Detekcija proteina ERK1/2 pokazala je jednoliko nanošenje uzoraka na gel, zbog čega se uzorci mogu kvantitativno uspoređivati,



ali također i da nije došlo do proteolitičke razgradnje proteina što bi objasnilo pad u količini nepocijepanih oblika PARP-a koji u ovom trenutku ne možemo objasniti. Iz dobivenih rezultata može se pretpostaviti da kompleks  $2_{mG}$  uzrokuje apoptozu neovisnu o kaspazama, što je potrebno istražiti dodatnim eksperimentima.

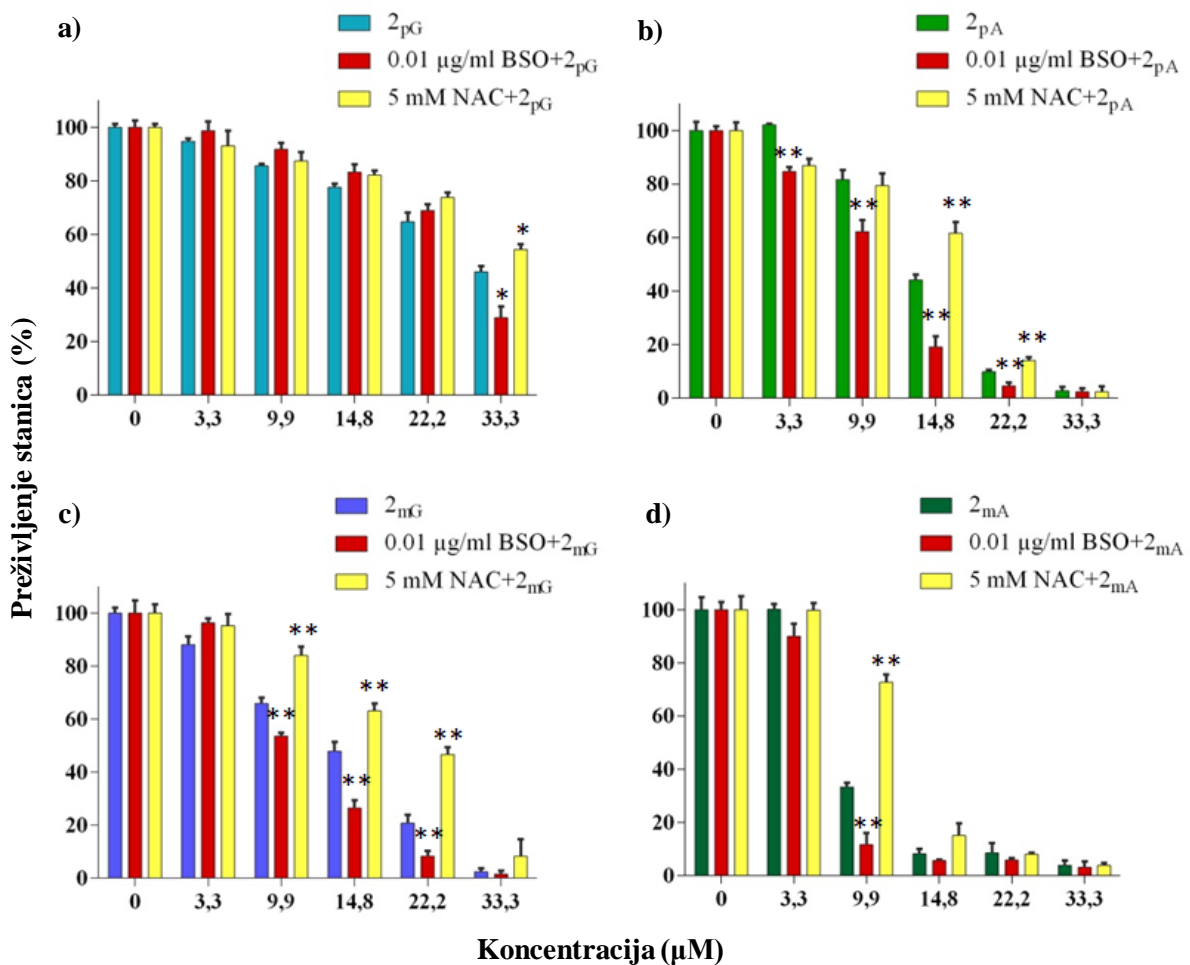


**Slika 11.** Detekcija proteina PARP u stanicama HeLa nakon tretmana s 22  $\mu$ M koncentracijom kompleksa  $2_{mG}$ , nakon različitog vremena inkubacije. Kao negativna kontrola (K) korištene su netretirane stanice sakupljene 48 sati nakon nasadivanja, dok su kao pozitivna kontrola korištene stanice tretirane s 5  $\mu$ M koncentracijom cisplatinom (cDDP), sakupljene nakon 72 sata. ERK1/2 je korišten kao kontrola nanošenja uzoraka. Na slici su označene veličine detektiranih proteina, prema korištenom proteinskom markeru Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio Rad, Cat. No. 1610373). Prikazani su reprezentativni podaci od tri ponovljena eksperimenta.

#### 4.4. Glutation smanjuje citotoksični učinak kompleksa $2_{pG}$ , $2_{pA}$ , $2_{mG}$ i $2_{mA}$

Od obrambenih sustava koje stanica ima na raspolaganju, ako su tretirane kompleksom s metalima, najčešće se spominje glutation (Bruijninx i Sadler 2009). Moguća uloga GSH u obrambenom sustavu stanice, kao odgovor na tretman sa četiri odabrana kompleksa (Tablica 2), ispitana je korištenjem specifičnog inhibitora sinteze GSH, BSO i specifičnog prekursora u sintezi GSH, NAC. BSO inhibira enzim koji sudjeluje u sintezi GSH,  $\gamma$ -glutamylcistein sintetazu ( $\gamma$ -GCS) te se time smanjuje količina GSH u stanici. S druge strane, L-glutaminska kiselina i glicin su dva prekursora u sintezi GSH koja su biološki dostupna, međutim limitirajući prekursor je treća aminokiselina, L-cistein. Stoga dodatak NAC-a povećava razinu GSH u stanici. Stanice HeLa su prije tretmana s različitim koncentracijama kompleksa  $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$  i  $2_{mA}$  predtretirane s 0,001 mM BSO preko noći ili 2 sata s 5 mM NAC-om.

Rezultati dobiveni testom MTT pokazuju da varijacije u količini unutarstaničnog glutationa utječu na toksičnost sva četiri odabrana kompleksa (Slika 12). Tako su stanice HeLa sa smanjenom razinom GSH, zbog predtretmana s BSO osjetljivije u odnosu na stanice koje su tretirane samo s određenim kompleksom. Također, stanice predtretirane s NAC-om, koje posljedično imaju povećanu razinu GSH, bolje preživljavaju tretman s kompleksima. Dakle, rezultati jasno ukazuju da je GSH uključen u odgovor stanica HeLa na tretman s kompleksima  $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$  i  $2_{mA}$ .

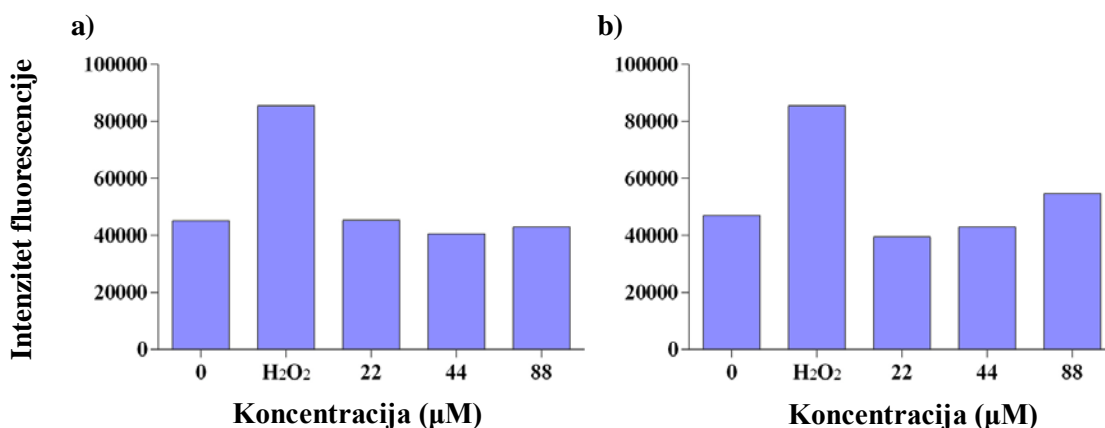


**Slika 12.** Preživljenje stanica HeLa nakon predtretmana sa subtoksičnim koncentracijama L-buthionin sulfoksimina (BSO) i N-acetil cisteinom (NAC) te tretmana s različitim koncentracijama kompleksa  $2_{pG}$  (a),  $2_{pA}$  (b),  $2_{mG}$  (c) i  $2_{mA}$  (d). Preživljenje stanica je mjereno nakon 72 sata inkubacije testom MTT. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice,  $\pm$  SD. Eksperiment je ponovljen tri puta. Vrijednost p je dobivena korištenjem student T-testa. Podaci su uzeti kao značajni za vrijednost p manju od 0,05. \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ .

#### 4.5. Kompleks $2_{mG}$ ne potiče stvaranje reaktivnih vrsta kisika

Budući da su rezultati dobiveni predtretmanom stanica HeLa s BSO-om i NAC-om ukazali na uključenost GSH u odgovor stanica na citotoksičnost kompleksa  $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$  i  $2_{mA}$ , te činjenica da većina organometalnih kompleksa djeluje tako što uzrokuje oksidativni stres, mjerena je indukcija stvaranja reaktivnih vrsta kisika (ROS, engl. *reactive oxygen species*) kao posljedica tretmana s kompleksom  $2_{mG}$ . Prije tretmana, stanice HeLa su inkubirane s  $10 \mu\text{M}$  otopinom boje CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , koja pasivnom difuzijom ulazi u stanice gdje prilikom oksidacije zbog formiranja ROS-a nastaje fluorescentni adukt. Pomoću protočnog citometra mjerena je intenzitet fluorescencije proporcionalan količini ROS-a nastalog kao posljedica tretmana stanica s različitim koncentracijama kompleksa  $2_{mG}$ . Kao pozitivna kontrola korišten je 0,01 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  za kojeg se sigurno zna da potiče stvaranje ROS-a (Oqawa i sur. 2004).

Dobiveni rezultati (Slika 13) pokazuju da nema promjene u količini ROS-a nakon tretmana s kompleksom  $2_{mG}$ , neovisno o duljini inkubacije, u usporedbi sa stanicama tretiranim  $\text{H}_2\text{O}_2$  gdje su postignute dvostruko veće vrijednosti. Slični rezultati su dobiveni i nakon 15 minutnog tretmana kompleksom  $2_{mG}$  (neprikazani rezultati). Budući da kompleks  $2_{mG}$  ne potiče stvaranje ROS-a, može se zaključiti da uloga GSH u odgovoru stanica na kompleks  $2_{mG}$  nije stabilizacija oksidativno-reduktivnog sustava.



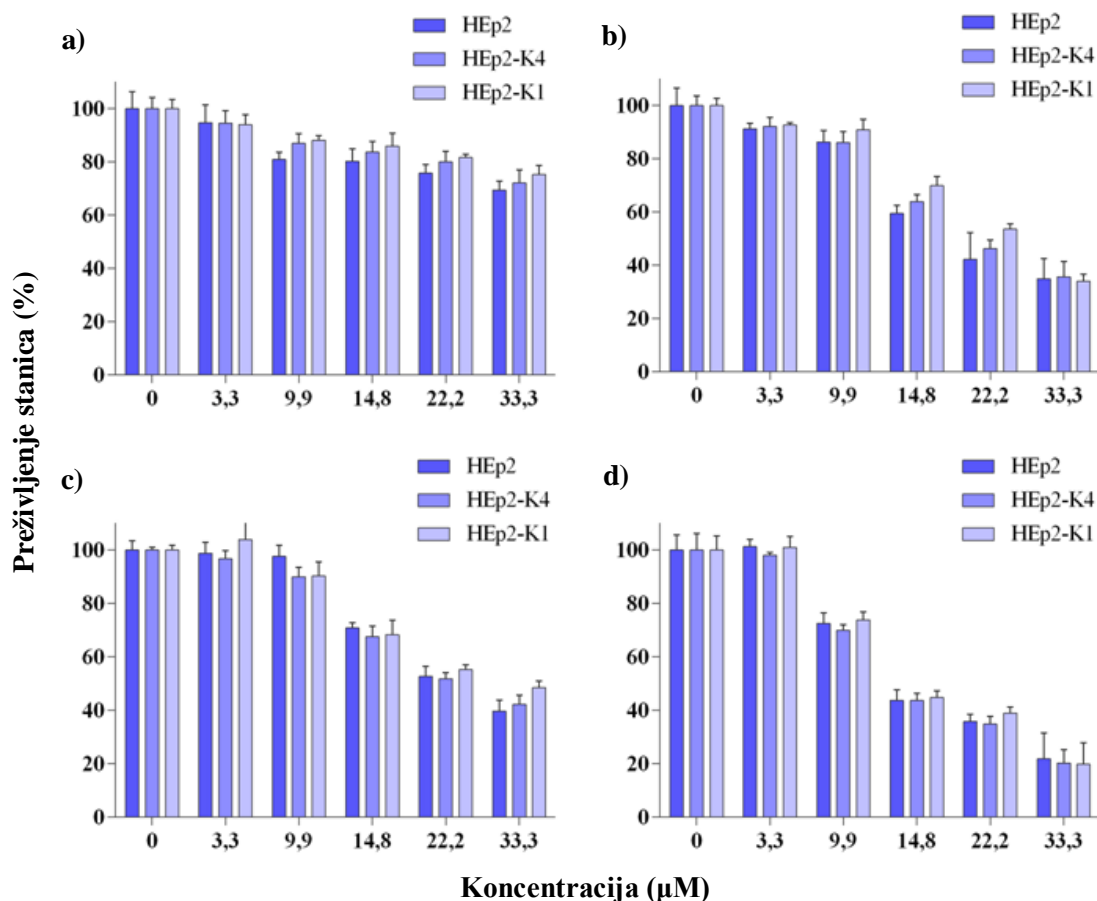
**Slika 13.** Mjerenje indukcije ROS-a u stanicama HeLa nakon tretmana s različitim koncentracijama kompleksa  $2_{mG}$ . Intenzitet fluorescencije mjerena je protočnim citometrom 1 (a) i 3 sata (b) nakon tretmana. Kao pozitivna kontrola korišten je 0,01 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Eksperiment je ponovljen tri puta.

#### 4.6. Kompleksi $2_{pG}$ , $2_{pA}$ , $2_{mG}$ i $2_{mA}$ su toksični za stanice otporne na cisplatinu

Potaknuti zanimljivim rezultatima, krenuli smo u daljnje istraživanje mehanizma djelovanja novosintetiziranih kompleksa. U tu svrhu, testirali smo njihovu toksičnost na linijama stanica, za koje je prethodno utvrđen molekularni mehanizam otpornosti, između ostalog na cisplatinu.

Stoga smo u daljnjim pokusima koristili stanice otporne na cisplatinu, HEp2-K4 i HEp2-K1 (Ambriović-Ristov i sur. 2004). Ove stanice dobivene su stabilnom transfekcijom stanica HEp2 s plazmidom koji nosi gen za podjedinicu integrina  $\beta_3$ , pa stanice imaju povećanu ekspresiju integrina  $\alpha_v\beta_3$ , (ekspresija integrina kod stanica HEp2-K4 je manja od ekspresije kod stanica HEp2-K1). Povećana ekspresija tog integrina povezana je s povećanom količinom GSH u stanici te s njegovom ulogom kao stabilizatora oksidativno-reduktivnog sustava stanice. Ove stanice otporne su na cisplatinu i neke druge kemoterapeutike, za razliku od roditeljske HEp2 linije. Budući da se otpornost može temeljiti na smanjenoj unutarstaničnoj akumulaciji platine, ispitano je nakupljanje platine u tim stanica, te je utvrđeno da je količina platine koja uđe u stanice jednaka kod transfeciranih i kontrolnih stanica (Brozovic i sur. 2008).

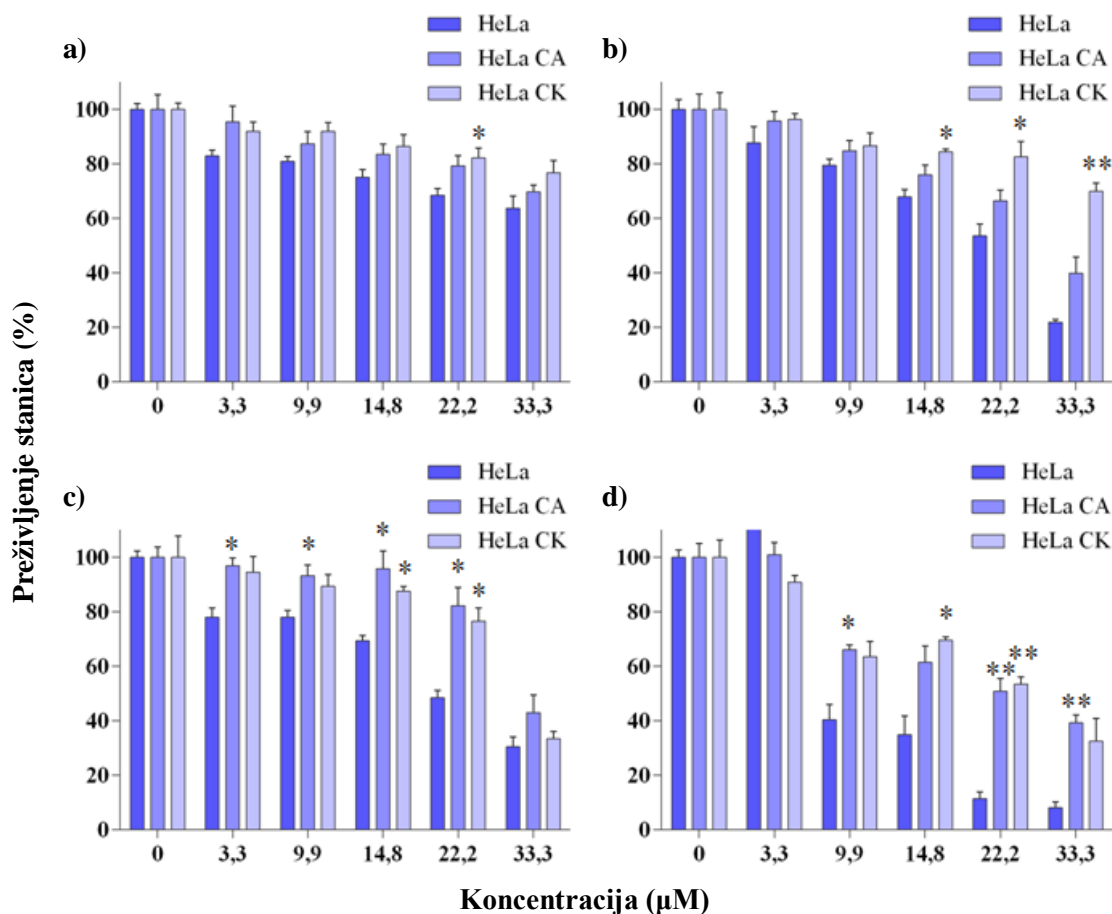
Budući da su prikupljeni rezultati ukazali kako promjene u količini GSH utječu na citotoksičnost kompleksa  $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$  i  $2_{mA}$  (Slika 12), htjeli smo provjeriti hoće li stanice HEp2-K4 i -K1, zbog povećane razine GSH, biti manje osjetljive i na ispitivane komplekse u odnosu na svoju roditeljsku liniju stanica HEp2. Stanice HEp2, HEp2-K4 i HEp2-K1 tretirane su različitim koncentracijama četiri odabrana kompleksa, te je nakon 72 sata mjereno preživljenje stanica testom MTT (Slika 14). Suprotno očekivanjima, linije stanica HEp2-K4 i HEp2-K1 pokazale su se jednako osjetljivim na djelovanje kompleksa kao i roditeljska linija HEp2.



**Slika 14.** Preživljenje stanica HEP2, HEP2-K4 i HEP2-K1 nakon tretmana kompleksima 2<sub>pG</sub> (a), 2<sub>pA</sub> (b), 2<sub>mG</sub> (c) i 2<sub>mA</sub> (d). Stanice su tretirane različitim koncentracijama kompleksa 24 sata nakon nasađivanja. Preživljenje stanica mjereno je testom MTT 72 sata nakon tretmana. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice, ± SD vrijednost. Eksperiment je ponovljen tri puta.

Kao idući eksperimentalni model uzete su stanice razvijene od roditeljske linije stanica HeLa, koje su otporne na akutnu dozu (HeLa CA) odnosno kroničnu dozu cisplatine (HeLa CK) (Osmak i Eljuga 1993). Ove linije stanica imaju jednaku količinu GSH u odnosu na roditeljske stanice HeLa, ali se razlikuju u količini platine koja uđe u stanice.

Kako bi se vidjelo hoće li postojati razlika u osjetljivosti ovih stanica na komplekse 2<sub>pG</sub>, 2<sub>pA</sub>, 2<sub>mG</sub> i 2<sub>mA</sub>, stanice su tretirane s različitim koncentracijama kompleksa, te je preživljenje mjereno nakon 72 sata testom MTT (Slika 15). Rezultati su pokazali kako su stanice HeLa CA i HeLa CK manje osjetljive na djelovanje kompleksa u odnosu na roditeljske stanice HeLa.



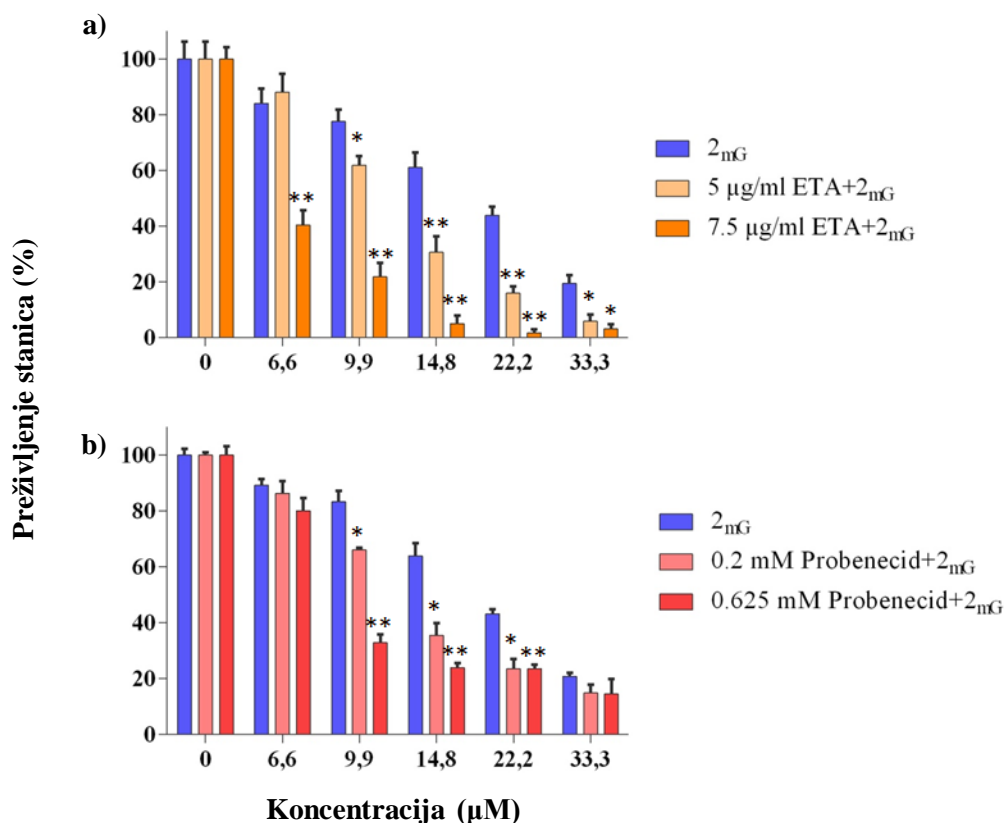
**Slika 15.** Preživljenje stanica HeLa, HeLa CA i HeLa CK nakon tretmana kompleksima 2<sub>pG</sub> (a), 2<sub>pA</sub> (b), 2<sub>mG</sub> (c) i 2<sub>mA</sub> (d). Stanice su tretirane različitim koncentracijama kompleksa 24 sata nakon nasađivanja. Preživljenje stanica mjereno je testom MTT 72 sata nakon tretmana. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice, ± SD vrijednost. Eksperiment je ponovljen tri puta. Vrijednost p je dobivena korištenjem student T-testa. Podaci su uzeti kao značajni za vrijednost p manju od 0,05. \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ .

Gledajući dobivene rezultate zajedno, može se zaključiti da GSH najvjerojatnije ima ulogu u detoksikaciji novosintetiziranih kompleksa. Nadalje, moguće je da osjetljivost stanica na toksični učinak ispitivanih kompleksa ovisi ne samo o strukturi kompleksa, već i o propusnosti membrane stanica, s obzorom da se upravo prema toj karakteristici razlikuju dva ispitivana modela stanica (HEp2 i HeLa model otpornih linija). Naravno, treba imati na umu da se radi o stanicama različitog podrijetla koje mogu imati potpuno drugačiji odgovor na stres potaknut kompleksima s rutenijem, koji se prema svojim karakteristikama razlikuju od spojeva s platinom.

#### 4.7. Glutathion sudjeluje u detoksikaciji stanica HeLa nakon tretmana s kompleksom $2_{mG}$

Budući da su prethodni eksperimenti potvrdili da ispitivani kompleksi ne potiču stvaranje ROS-a, te da GSH nema ulogu u stabilizaciji oksidativno-reduktivnog sustava, ispitana je njegova moguća uloga u detoksikaciji. Stanice HeLa predtretirane su 2 sata s dvije različite koncentracije etakrinske kiseline (ETA) (5  $\mu\text{g/ml}$ , 7,5  $\mu\text{g/ml}$ ) koja je specifični inhibitor glutathion S-transferaze (GST), enzima koji katalizira stvaranje konjugata između staničnih ili unešenih elektrofila i GSH, čime se inhibira njihov toksičan učinak. Dobiveni rezultati pokazuju sinergistički učinak kod kombiniranog tretmana, odnosno manje preživljenje stanica predtretiranih s ETA-om u odnosu na stanice tretirane samo kompleksom  $2_{mG}$  (Slika 16a). Takvi rezultati ukazuju na moguću ulogu GSH u detoksikaciji kompleksa  $2_{mG}$ .

Nadalje, iz literature je poznato da membranski transporteri MRP1 i MRP2 (poznati kao GSH pumpe) imaju ulogu izbacivanja nastalih konjugata GSH i ksenobiotika van stanice (Borst i sur. 2000). Kako bismo vidjeli sudjeluju li MRP1/2 u izbacivanju konjugata GSH i  $2_{mG}$  iz stanica HeLa, stanice su predtretirane 2 sata s dvije različite koncentracije probenecida (0,2 mM i 0,625 mM), specifičnog inhibitora membranskih transportera MRP1/2. Rezultati su pokazali da predtretman s probenecidom povećava osjetljivost stanica na kompleks  $2_{mG}$  (Slika 16b), iz čega se može zaključiti da transporteri MRP sudjeluju u izbacivanju konjugata GSH- $2_{mG}$  iz stanica.



**Slika 16.** Preživljenje stanica HeLa nakon tretmana s različitim koncentracijama kompleksa 2<sub>mG</sub>, te predtretmanom sa subtoksičnim koncentracijama etakrine kiseline (ETA) (a) i probenecida (b). Preživljenje je mjereno testom MTT nakon 72 sata inkubacije. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost postotka preživljenja stanica u odnosu na netretirane stanice ± SD. Eksperiment je ponovljen tri puta. Vrijednost p je dobivena korištenjem student T-testa. Podaci su uzeti kao značajni za vrijednost p manju od 0,05. \*=p<0,05, \*\*=p<0,01.

#### 4.8. Određivanje akumulacije kompleksa 2<sub>pG</sub>, 2<sub>pA</sub>, 2<sub>mG</sub> i 2<sub>mA</sub> unutar stanice

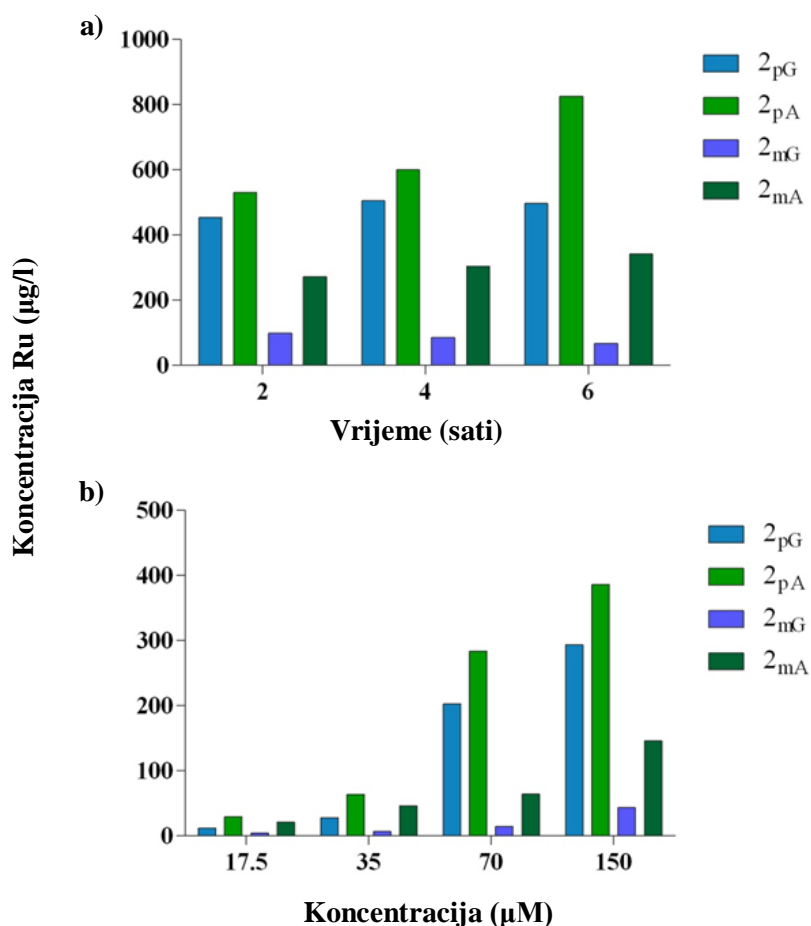
Rezultati prikazani na Slikama 14 i 15 ukazali su na mogućnost da toksičnost ispitivanih kompleksa na pojedine vrste stanica ovisi o kemijskoj strukturi kompleksa koja ne samo da uvjetuje njihovo vezanje za pojedine komponente stanice, već uvjetuje i njihovu akumulaciju unutar stanice. Kako bismo utvrdili je li to točno, mjerena je količina rutenija koja je ušla u stanice HeLa nakon njihovog izlaganja ispitivanim kompleksima 2<sub>pG</sub>, 2<sub>pA</sub>, 2<sub>mG</sub>, 2<sub>mA</sub>. Stanice su inkubirane 2-6 sati sa 150 µM koncentracijom odgovarajućeg kompleksa (Slika 17a), te je unutarstanična količina metala rutenija mjerena pomoću ICP-MS. Mjerenja su pokazala kako kompleks 2<sub>mG</sub> najslabije ulazi u stanice. Također, kompleksi 2<sub>pG</sub>, 2<sub>mG</sub> i 2<sub>mA</sub>



već nakon 2 sata inkubacije dostižu plato, za razliku od kompleksa  $2_{pA}$  čija akumulacija, usprkos izrazito toksičnoj koncentraciji, i dalje raste.

Nadalje, kako bi se potvrdilo da nije došlo do zasićenja zbog visoke koncentracije korištene u prvom eksperimentu, stanice HeLa tretirane su s različitim koncentracijama ( $17,5$ - $150 \mu\text{M}$ ) tijekom 2 sata (Slika 17b). I u ovom slučaju kompleks  $2_{mG}$  pokazao je najmanju akumulaciju unutar stanica, te je odnos između kompleksa ostao isti.

Iz ovih rezultata uočljivo je da sva četiri spoja imaju različitu akumulaciju u stanicama, koja nije usporediva rezultatima citotoksičnosti, prema kojima kompleksi  $2_{mG}$  i  $2_{mA}$  pokazuju najveću toksičnost, a ovdje najmanju akumulaciju.



**Slika 17.** Akumulacija rutenija u stanicama HeLa. Stanice su tretirane s  $150 \mu\text{M}$  koncentracijama kompleksa  $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$  i  $2_{mA}$  kroz 2, 4 i 6 sati (a), ili s različitim koncentracijama kompleksa tijekom 2 sata (b). Prikazani su rezultati jednog eksperimenta. Eksperiment je ponovljen tri puta.

## 5. RASPRAVA

Tumori su drugi vodeći uzrok smrtnosti na svjetskoj razini, s 8,8 milijuna smrti u 2015. godini (WHO). Usprkos napretku medicine u smjeru imunoterapije, kojom se jača imunološki sustav pacijenta, i personaliziranog pristupa ciljane terapije, kemoterapija je još uvijek najkorištenija metoda u liječenju tumora (Brozović 2017). Međutim, uspješnost spojeva na bazi platine, koji se najčešće koriste u kemoterapiji solidnih tumora, ograničena je zbog njihove opće toksičnosti i česte pojave otpornosti tumora na terapiju. Stoga se u posljednje vrijeme ulažu veliki napor u istraživanje novih selektivnijih i učinkovitijih lijekova. U sklopu istraživanja novih spojeva, pažnja je okrenuta na organometalne komplekse na bazi različitih metala koji nude nove mogućnosti u dizajnu protutumorskih lijekova, budući da se kroz razne strukturne varijacije, kao što su promjene vezanih liganada, vrsta metala i njegovo oksidacijsko stanje, može utjecati na aspekte njihovog mehanizma djelovanja (Bruijninx i Sadler 2009).

Rutenij se istaknuo kao obećavajuća zamjena za platinu. Rutenij ima širok raspon oksidativnih stanja dostupnih u fiziološkim uvjetima, što je značajno, budući da je aktivnost protutumorskih lijekova na bazi metala ovisna o njihovom oksidacijskom stanju. Nadalje, kompleksi rutenija manje su toksični od platinskih analoga, što se povezuje sa sposobnošću rutenija da oponaša željezo u vezanju za molekule kao što je transferin. Mehanizam aktivacije redukcijom također se može povezati s nižom općom toksičnošću nekih kompleksa rutenija (Dyson i Ang 2006).

U ovom radu istražena su biološka svojstva organometalnih kompleksa rutenija sintetiziranih u Laboratoriju za kemiju čvrstog stanja i kompleksnih spojeva (Institut Ruđer Bošković), pod voditeljstvom dr. sc. Srećka Kirina. Citotoksična aktivnost sintetiziranih biokonjugata najprije je ispitana na stanicama HeLa, koje su se pokazale kao dobar eksperimentalni model za probir novih kompleksa u prijašnjim istraživanjima (Vajs i sur. 2015). Od sintetiziranih biokonjugata, samo su četiri biokonjugata stehiometrije  $ML_2$  ( $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$ ,  $2_{mA}$ ) pokazala značajnu toksičnost s vrijednostima  $IC_{50}$  u rasponu od 5-30  $\mu M$  (Tablica 7). Razlika u citotoksičnosti između ova četiri kompleksa zanimljiva je budući da se razlikuju samo u prisutnosti metilne skupine te položaju fenilne skupine (*para*- ili *meta*-). Važnost fenilne skupine za citotoksičnu aktivnost ovih kompleksa vidljiva je i iz činjenice da jedina dva biokonjugata ( $2_{aG}$ ,  $2_{aA}$ ) koja nisu pokazala značajnu toksičnost umjesto fenilne skupine imaju

etilenski ostatak (Slika 4). Od četiri navedena kompleksa, za pojedine daljnje eksperimente odabran je kompleks  $2_{mG}$  s vrijednošću  $IC_{50}$   $16 \pm 2,5 \mu M$ . Za usporedbu, često korišteni kemoterapeutik cisplatina ima  $IC_{50}$   $16,3 \pm 3,6 \mu M$  na stanicama HeLa, dobivenu uz jednake eksperimentalne uvjete (Stojanović i sur. 2013), što ukazuje na dobar citotoksični učinak kompleksa  $2_{mG}$ . Iako je ovo najčešća metoda probira za lijekove na bazi metala, koja uključuje ispitivanje citotoksičnosti i usporedbu s referentnim lijekom (u većini slučajeva cisplatinom), treba imati na umu da neki metalni kompleksi ne pokazuju značajnu citotoksičnost *in vitro*, ali imaju protutumorsku aktivnost *in vivo*, i obrnuto. Jedan takav primjer je kompleks rutenija NAMI-A, koji nije pokazao posebnu citotoksičnu aktivnost u staničnoj kulturi, ali je ušao u fazu II kliničkih ispitivanja. Nadalje, kompleksi odabrani ovakvom metodom često se smatraju aktivnim samo zato što su toksični za tumorske stanice, ali se naknadno uspostavi da su toksični i za zdravo tkivo (Sava i sur. 2011). Stoga je bitno da organometalni kompleksi koji se istražuju za potencijalnu primjenu u liječenju ne pokazuju znatnu toksičnost prema normalnim stanicama. Kompleks  $2_{mG}$  osim što je pokazao relevantnu citotoksičnost za različite tumorske linije stanica (Tablica 8), pokazao je i izrazito mali citotoksični učinak prema normalnim stanicama ( $IC_{50} > 33 \mu M$ ), što govori o njegovoj selektivnoj aktivnosti.

Procesi uključeni u progresiju stanica kroz stanični ciklus i programiranu smrt stanice uključuju složene interakcije nekoliko obitelji proteina. To su blisko povezani procesi koji zajedno igraju važnu ulogu u osjetljivosti malignih stanica na kemoterapiju (Shah i Schwartz 2001). Učinak kompleksa  $2_{mG}$  na stanični ciklus vidljiv je u porastu postotka stanica u G1 fazi ciklusa u ovisnosti o vremenu inkubacije (Slika 8), kao i povećanju SubG1 populacije stanica, kojoj pripadaju stanice sa smanjenom količinom DNA nastalom kao posljedica apoptoze, u ovisnosti o dozi (Slika 9). Ovi rezultati upućuju na razliku u mehanizmu djelovanja kompleksa  $2_{mG}$  u odnosu na cisplatinu, koja uzrokuje zastoj ciklusa u G2 fazi (Shah i Schwartz 2001). Nadalje, neobjavljeni rezultati dobiveni u suradnji s Laboratorijem za kemiju čvrstog stanja i kompleksnih spojeva pokazali su kako se novosintetizirani kompleksi rutenija istraživani u sklopu ovog rada ne vežu za DNA, već da njihova struktura ukazuje na sposobnost vezanja proteina. Mjerenja su napravljena korištenjem ctDNA (engl. *calf thymus DNA*), UV/Vis spektroskopije i mikrokolorimetrije u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju (dr. sc. Ivo Piantanida) (Bronowska 2011). Ovo je značajna karakteristika ovdje ispitivanih spojeva budući da u dizajnu protutumorskih lijekova, a posebice kemoterapeutika na bazi metala, DNA uglavnom služi kao glavna meta. Prednost

proteina kao mete terapije u odnosu na DNA je vrlo očita: DNA je prisutna u normalnim i tumorskim stanicama bez nekih većih razlika. S druge strane, proteini kao ciljne molekule otvaraju mogućnost veće selektivnosti, pošto se ekspresija brojnih proteina razlikuje između normalnih i tumorskih stanica (Urruticoechea i sur. 2010; Collins i Workman 2006).

Glavna strategija terapije je djelovati na ciljne tumorske stanice s ograničenim štetnim djelovanjem na funkciju normalnih stanica. Apoptoza je samo jedna od formi stanične smrti. Stanice se mogu eliminirati brojnim alternativnim mehanizmima, uključujući nekrozu, nespecifičan oblik stanične smrti karakteriziran puknućem plazma membrane i izlivanjem staničnog sadržaja u okolnom tkivu što uzrokuje upalni odgovor i posljedično tome oštećenja. Suprotno tome, apoptoza je programirani oblik stanične smrti povezan s brzim uklanjanjem staničnih ostataka posredovanim fagocitima koji prepoznaju signale izložene na vanjskoj površini apoptotske stanice. Navedene razlike između ova dva procesa stanične smrti podcrtavaju razlog zašto je indukcija apoptoze, a ne nekroze, željeni mehanizam djelovanja potencijalnih protutumorskih lijekova (Kroemer i sur. 1998; Henson i sur. 2001; Kasibhatla i Tseng 2003). Naši rezultati dobiveni bojanjem stanica s aneksinom V-FITC i PI-om pokazuju da kompleks  $2_{mG}$  uzrokuje porast stanica u apoptozi u ovisnosti o dozi (Slika 10).

Budući da se mnoge karakteristike apoptoze i nekroze preklapaju, iznimno je važno upotrijebiti više različitih testova za potvrdu da stanična smrt odgovara apoptozi (Elmore 2007). Kako se prvi test temeljio na određivanju rane apoptoze, za dodatnu potvrdu vrste stanične smrti dobro je provesti test koji detektira događaje kasne apoptoze. Kaspaze su cisteinske proteaze koje predstavljaju izvršitelje apoptotske kaskade, cijepajući brojne stanične proteine, kao što su PARP, laminin i  $\beta$ -aktin, što su obilježja programirane stanične smrti (Lazebnik i sur. 1995; Kaufmann i sur. 1993; Chaitanya i sur. 2010). U ovom slučaju mjerena je ekspresija PARP-a nakon tretmana stanica HeLa s kompleksom  $2_{mG}$  (Slika 11). Na fotografskom filmu nije detektiran pocijepani oblik PARP-a, što nas navodi na mogućnost da kompleks  $2_{mG}$  potiče apoptozu neovisnu o kaspazama. Međutim, takvu tvrdnju treba potvrditi s dodatnim eksperimentima, mjerenje aktivnosti kaspaze 3 i 7 (McStay i Green 2014) ili tretmanom s inhibitorima kaspaza (Cregan i sur. 2002), na što će biti usmjerena daljnja istraživanja.

Lijekovi na bazi metala susreću se s raznovrsnim biomolekulama na staničnoj membrani i citosolu prije nego dospiju do ciljane molekule. Stoga je proučavanje interakcija između metalnih kompleksa i proteina, antioksidansa i drugih staničnih komponenti od iznimnog

značaja za razumijevanje biološke aktivnosti *in vitro*, a u daljnjoj fazi i *in vivo*. Od posebnog interesa je interakcija novosintetiziranih kompleksa s tripeptidom glutationom (GSH). Ovaj unutarstanični antioksidans, prisutan u stanici u milimolarnim koncentracijama, poznat je po obrani stanica od ksenobiotika. Iako ima više uloga, dvije se ističu: regulacija oksidativno-reduktivne ravnoteže i detoksikacija (Bruijninx i Sadler 2009; Marí i sur. 2009; Circu i Aw 2010). U ovom radu prvo je ispitana njegova uloga u obrani stanica HeLa na djelovanje kompleksa  $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$  i  $2_{mA}$  kroz stabilizaciju redoks sustava, mijenjanjem stope sinteze GSH (Slika 12). Općenito, povišene razine GSH unutar stanice štite, a niske potiču staničnu smrt (Estrela i sur. 2006). Stanice s povećanom količinom GSH uslijed predtretmana s NAC-om, manje su osjetljive na djelovanje kompleksa. Međutim, NAC sam direktno može vezati protutumorske lijekove i slobodne radikale, stoga tretman s NAC-om nije direktan dokaz o uključenosti GSH u odgovor stanice na neki spoj (Brozovic i sur. 2010). Suprotno tome, smanjenje količine GSH koristeći BSO, povećalo je citotoksičnost istraživanih kompleksa. Ovakvi rezultati pokazuju da GSH ima ulogu u odgovoru stanica na tretman s četiri proučavana kompleksa.

Reaktivne vrste kisika (ROS; superoksidni ion, hidroksil radikal, vodikov peroksid) produkti su normalnog metabolizma (mitohondrij je glavni izvor unutarstaničnog ROS-a) i djelovanja ksenobiotika. Povišene količine ROS-a uzrokuju oksidativne modifikacije staničnih makromolekula, inhibiraju funkciju proteina te promoviraju smrt stanice (Circu i Aw 2010). U literaturi je poznato da lijekovi na bazi metala, kao što je cisplatina, uzrokuju oksidativni stres preko indukcije ROS-a (Brozovic i sur. 2010). Također, pokazano je i da neki do sad ispitani protutumorski kompleksi na bazi rutenija kao ciljnu molekulu imaju mitohondrij, što dovodi do poremećaja oksidativno-reduktivne ravnoteže u tumorskim stanicama i potiče staničnu smrt, uključujući kompleks KP1019 (Bhat i sur. 2015; Qian i sur. 2013; Bergamo i sur. 2012). Međutim, prema našim rezultati kompleks  $2_{mG}$  ne potiče stvaranje ROS-a (Slika 13). Nadalje, predtretman stanica s dva antioksidansa različitog mehanizma djelovanja, tempolom i troloksom, također nije poboljšao preživljenje stanica HeLa nakon tretmana kompleksom  $2_{mG}$  (neprikazani rezultati).

Kako bismo dodatno ispitali ulogu GSH u odgovoru stanica HeLa na tretman novosintetiziranim kompleksima rutenija, iskoristili smo modele stanica uspostavljene i karakterizirane u Laboratoriju za genotoksične agense (današnji Laboratorij za staničnu biologiju i prijenos signala). Budući da smo pokazali kako promjene u količini GSH utječu na citotoksičnost naših kompleksa, koristili smo stanice HEp2-K4 i HEp2-K1 s povećanom

ekspresijom integrina  $\alpha_v\beta_3$ . Povećana ekspresija integrina  $\alpha_v\beta_3$  kod stanica HEp2 (HEp2-K4 i HEp2-K1) povezana je povišenom količinom GSH u tim stanicama i otpornošću na cisplatinu, mitomicin C i doksorubicin, dok je izmjerena količina platine koja je ušla u stanice slična (Brozović i sur. 2008). Očekivali smo da će stanice HEp2-K4 i HEp2-K1 pokazati smanjenu osjetljivost na djelovanje novosintetiziranih spojeva, međutim one su se pokazale jednako osjetljivima kao i roditeljske stanice HEp2 (Slika 14). S druge strane, ovakvi rezultati poklapaju se s našim rezultati mjerenja indukcije ROS-a. Naime, stanice HEp2-K4 i HEp2-K1 otporne su na djelovanje cisplatine, mitomicina C i doksorubicina, kemoterapeutika koji imaju zajednički mehanizam djelovanja, a to je indukcija ROS-a, dok za lijekove koji djeluju preko drugačijeg mehanizma pokazuju sličnu osjetljivost kao i HEp2 (Brozović i sur. 2008). Mi smo ovdje pokazali da kompleks  $2_{mG}$  ne djeluje preko indukcije ROS-a.

Nadalje, citotoksičnost novih kompleksa ispitana je i na stanicama HeLa CA i HeLa CK koje su otporne na akutnu ili kroničnu dozu cisplatine (Osmak i Eljuga 1993). Ove stanice imaju podjednaku količinu unutarstaničnog GSH (Brozović i sur. 2004). Iznenadujuće, usprkos tome ove stanice pokazale su se manje osjetljive na ispitivane komplekse u odnosu na roditeljske stanice HeLa (Slika 15). Nadalje, mjerenjem platinacije DNA, za koju je poznato da je proporcionalna ukupnoj akumulaciji platine u stanici (Brozović i sur. 2009; Brozović i sur. 2013), pokazano je da je kod stanica HeLa CA i HeLa CK ona smanjena u odnosu na roditeljsku liniju, dok je kod stanica HEp2-K4 i HEp2-K1 ona usporediva sa stanicama HEp2. Upravo je smanjena količina platine koja je ušla u stanice odgovorna za zakašnjeli odgovor stanica HeLa CA i HeLa CK na stres, što ukazuje na moguće promjene u membranama tih stanica u odnosu na roditeljsku liniju stanica HeLa. Stoga je moguće da je upravo razlika u ulasku novosintetiziranih kompleksa s rutenijem u stanice HeLa u odnosu na linije stanica HeLa CA i HeLa CK, razlog njihove manje osjetljivosti i na ovdje ispitivane komplekse. Točnije, naši rezultati pokazuju da je GSH bitan u odgovoru stanica na spojeve s rutenijem, ali je krajnji odgovor pojedinih vrsta stanica, kao što je to slučaj kod stanica otpornih na citostatike, ovisan i o količini kompleksa koji je ušao u stanice. Ta je činjenica posebno važna u slučaju moguće upotreba ovih tipova spojeva u terapiji malignih oboljenja, s obzirom da u slučaju kada su stanice tumora razvile otpornost na kemoterapeutik molekularnim mehanizmom koji uključuje promjene u membranama stanica, primjena ovih kompleksa ne bi bila adekvatna. No, kod onih stanica čija se otpornost temelji na stabilizaciji oksidativno-reduktivnog sustava, istraživani kompleksi mogli bi biti potencijalna alternativa u daljnjem liječenju.

Budući da GSH ima ulogu u odgovoru stanica HeLa na ispitivane komplekse, ali je pokazano da kompleks  $2_{mG}$  ne potiče stvaranje ROS-a, ispitana je moguća uloga GSH u detoksikaciji kompleksa  $2_{mG}$ . Vezanje GSH može biti neenzimatsko ili posredovano enzimom kao što je glutation S-transferaza (GST), koji posreduje u stvaranju konjugata između glutationa i ksenobiotika (Laborde 2010; Marí i sur. 2009). Stoga smo koristili etakrinu kiselinu, prihvaćeni inhibitor GST (Ploemen i sur. 1993). Rezultati pokazuju da etakrina kiselina smanjuje preživljenje stanica u odnosu na stanice tretirane samo s  $2_{mG}$  (Slika 16), što upućuje da GSH stvara konjugate s  $2_{mG}$  i tako smanjuje njegovo toksično djelovanje. Nadalje, predtretmanom stanica HeLa s inhibitorom transmembranskih transportera MRP1/2, probenecidom, također je povećana osjetljivost stanica na djelovanje kompleksa  $2_{mG}$ , što je u skladu s očekivanjima budući da su upravo ti transporteri odgovorni za iznos konjugata GSH i ksenobiotika van stanice (Borst i sur. 2000).

Razlike u citotoksičnosti četiri odabrana kompleksa  $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$  i  $2_{mA}$ , osim njihovim strukturnim razlikama, pokušali smo objasniti i mogućim drugačijim ulaskom kompleksa u stanicu. U tu svrhu mjerena je akumulacija rutenija u stanicama. Rezultati su pokazali značajnu razliku između akumulacije kompleksa (Slika 17), koja nije proporcionalna njihovoj citotoksičnosti. Naime, dok je slijed jačine toksičnosti  $2_{mA} > 2_{pA} > 2_{mG} > 2_{pG}$ , slijed akumulacije rutenija je  $2_{pA} > 2_{pG} > 2_{mA} > 2_{mG}$ , što ukazuje da kompleks  $2_{mG}$  pokazuje značajnu toksičnost usprkos izrazito slabom ulasku u stanicu, te ga izdvaja od ostalih istraživanih kompleksa. Hidrofobnost je važna farmakološka karakteristika, jer je usko povezana s unosom i iznosom protutumorskih lijekova, a upravo se fenilna skupina opisuje kao hidrofobna (Bruijninx i Sadler 2011). S obzirom na to, varijacijama liganda mogla bi se poboljšati efikasnost unosa kompleksa. Zanimljivo je da naši rezultati pokazuju kako fenilna skupina u položaju *meta* doprinosi većoj toksičnosti, a kad se nalazi u položaju *para* povezana je s boljim ulaskom kompleksa u stanicu.

Ukoliko rezultate gledamo u okviru potencijalne upotrebe u medicini, kompleksi  $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$ ,  $2_{mA}$  su pokazali određena željena svojstva: značajnu citotoksičnost koja nije vezana za određenu vrstu tumorskih stanica, te selektivnost između tumorskih i normalnih stanica. Nadalje, ukoliko bi ovi kompleksi u budućnosti bili zamjena za neki kemoterapeutik zbog pojave otpornosti tumora na terapiju, vrlo je važno ustanoviti o kakvim se stanicama tumora radi, odnosno koji mehanizam je odgovoran za otpornost. Naime, ukoliko je otpornost nastupila zbog promjena u membrani stanica, npr. promjene u membranskim pumpama, ovi spojevi ne bi bili najbolji kandidati za drugi ciklus terapije, zbog moguće pojave križne

otpornosti koja je vidljiva u slučaju stanica HeLa CA i HeLa CK. Daljnja istraživanja vezana za ovdje ispitivane komplekse trebalo bi usmjeriti na njihov biološki efekt *in vivo*, te ispitivanju mogućih dodatnih modifikacija strukture koje bi pridonijele njihovim još boljim svojstvima.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Četiri ( $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$ ,  $2_{mA}$ ) od šest sintetiziranih organometalnih kompleksa rutenija s trifenilfosfanskim aminokiselinskim biokonjugatima pokazalo je toksični učinak na stanice HeLa.
2. Kompleks  $2_{mG}$ , s  $IC_{50} = 16 \mu M$ , izabran je za daljnja istraživanja.
3. Kompleks  $2_{mG}$  zaustavlja stanice HeLa u fazi staničnog ciklusa G1/S i potiče programiranu staničnu smrt.
4. Glutathion sudjeluje u obrambenom sustavu stanica HeLa tretiranim s kompleksima  $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$ ,  $2_{mA}$ .
5. Kompleks  $2_{mG}$  ne inducira reaktivne vrste kisika.
6. Glutathion ima važnu ulogu u detoksikaciji kompleksa  $2_{mG}$ .
7. Toksičnost i akumulacija kompleksa  $2_{pG}$ ,  $2_{pA}$ ,  $2_{mG}$ ,  $2_{mA}$  ovisi o njihovim strukturnim razlikama.

## 7. LITERATURA

- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A. (2010): Essential cell biology. 3rd edition, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.
- Alessio E. (2017): Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. *European Journal of Inorganic Chemistry* **12**: 1549-1560
- Allardyce C. S., Dyson P. J. (2001): Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects. *Platinum Metals Review* **45**: 62-69
- Ambriović-Ristov A., Gabrilovac J., Cimborá-Zovko T, Osmak M. (2004): Increased adenoviral transduction efficacy in human laryngeal carcinoma cells resistant to cisplatin is associated with increased expression of integrin  $\alpha v \beta 3$  and coxsackie adenovirus receptor. *International Journal of Cancer* **112**: 974-985
- Bergamo A., Gaiddon C., Schellens J. H. M., Beijnen J. H., Sava G. (2012): Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: Status of the art and perspective of ruthenium drug candidates. *Journal of Inorganic Biochemistry* **106**: 90-99
- Bhat T. A., Kumar S., Chaudhary A. k., Yadav N., Chandra D. (2015): Restoration of mitochondria function as a target for cancer therapy. *Drug Discovery Today* **20**: 635-643
- Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. (2000): A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute* **92**: 1295-1302
- Boulikas T., Vougiouka M. (2003): Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncology Reports* **10**: 1663-1682
- Bronowska A. K. (2011): Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Design, Thermodynamics - Interaction Studies - Solids, Liquids and Gases, ed. Dr. J. C. Moreno Piraján, InTech, 2-48
- Brozovic A., Fritz G., Christmann M., Zisowsky J., Jaehde U., Osmak M., Kaina B. (2004): Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and Fas-L expression by cisplatin is

- attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *International Journal of Cancer* **112**: 974-985
- Brozovic A., Majhen D., Roje V., Mikac N., Jakopec S., Fritz G., Osmak M., Ambriović-Ristov A. (2008):  $\alpha_v\beta_3$  Integrin-Mediated Drug Resistance in Human Laryngeal Carcinoma Cells is Caused by Glutathion-Dependent Elimination of Drug-Induced Reactive Oxidative Species. *Molecular Pharmacology* **74**: 298-306
- Brozovic A., Ambriović-Ristov A., Osmak M. (2010): The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathion, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Critical Reviews in Toxicology* **40**: 347-359
- Brozovic A. (2017): The relationship between platinum drug resistance and epithelial-mesenchymal transition. *Archives of Toxicology* **91**: 605-619
- Bruijninx P. C. A., Sadler P. J. (2009): Controlling Platinum, Ruthenium and Osmium Reactivity for Anticancer Drug Design. *Advanced Inorganic Chemistry* **61**: 1-61
- Calvert A. H., Harland S. J.; Newell D. R., Siddik Z. H., Jones A. C., McElwain T. J., Raju S., Wiltshaw E., Smith I. E., Baker J. M., Peckham M. J., Harrap K. R. (1982): Early clinical studies with cis-diammine-1,1-cyclobutane dicarboxylate platinum II. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. **9**: 140-147
- Chaitanya G. V., Steven A. J., Babu P. P. (2010): PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling* **8**: 31-41
- Circu M. L., Aw T. Y. (2010): Reactive oxygen speaces, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine* **48**: 749-762
- Collins I., Workman P. (2006): New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nature Chemical Biology* **2**: 689-700
- Cooper G. M., Hausman R. E. (2009): *The cell: a molecular approach*, 5th edition, Sinauer Associates, Sunderland.
- Corrie P. G. (2008): Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine* **36**: 24-28

- Cregan S., Fortin A., MacLaurin J. G., Callaghan S. M., Cecconi F., Yu S. W., Dawson V. L., Park D. S., Kroemer G., Slack R. S. (2002): Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *The Journal of Cell Biology* **158**: 507-517
- Croce C. M. (2008): Oncogenes and Cancer. *The New England Journal of Medicine* **358**: 502-511
- de Gramont A., Figuer A., Seymour M., Homerin M., Hmissi A., Cassidy J., Boni C., Cortes-Funes H., Cervantes A., Freyer G., Papamichael D., Le Bail N., Louvet C., Hendler D., de Braud F., Wilson C., Morvan F., Bonetti A. (2000): Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* **18**: 2938-2947
- Dertinger S. D., Avlasevich S. L., Torous D. K., Bemis J. C., Phonethepswath S., Labash C., Carlson K., Mereness J., Cottom J., Palis J., MacGregor J. T. (2014): Persistence of Cisplatin-Induced Mutagenicity in Hematopoietic Stem Cells: Implications for Secondary Cancer Risk Following Chemotherapy. *Toxicological Sciences* **140**: 307-314
- DeSantis C. E., Lin C. C., Mariotto A. B., Stein K. D., Kramer J. L., Alteri R., Robbins A. S., Jemal A. (2014): Cancer treatment and survivorship statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **64**: 252-271
- Dragutan I., Dragutan V., Démonceau A. (2015): Editorial of Special Issue Ruthenium Complex: The Expanding Chemistry of the Ruthenium Complexes. *Molecules* **20**: 17244-17274
- Dyson P. J., Ang W. H. (2006): Classical and Non-Classical Ruthenium-Based Anticancer Drugs: Towards Targeted Chemotherapy. *European Journal of Inorganic Chemistry* 4003-4016
- Elmore S. (2007): Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* **35**: 495-516
- Estrela J. M., Ortega A., Obrador E. (2006): Glutathion in cancer biology and therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **43**: 143-181

- Fish R. H., Jaouen G. (2003): Bioorganometallic Chemistry: Structural Diversity of Organometallic Complexes with Biologands and Molecular Recognition Studies of Several Supramolecular Hosts with Biomolecules, Alkali-Metal Ions, and Organometallic Pharmaceuticals. *Organometallics* **22**: 2166-2177
- Galluzzi L., Senivilla L., Vitale I., Michels J., Martins I., Kepp O., Castedo M, Kroemer G. (2012): Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31**: 1869-1883
- Gasser G., Ott I., Metzler-Nolte N. (2011): Organometallic Anticancer Compounds. *Journal of Medical Chemistry* **54**, 3-25
- Gillet J. P., Gottesman M. (2010): Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods in Molecular Biology* **596**: 47-76
- Hanahan D., Weinberg R. A. (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**: 646-669
- Hartinger C. G., Jakupec M. A., Zorbas-Seifried S., Groessl M., Egger A., Berger W., Zorbas H., Dyson P. J., Keppler B. K. (2008): KP1019, a new redox-active anticancer agent- preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chemistry & Biodiversity* **5**: 2140-2155
- Henson P. M., Bratton D. L., Fadok V. A. (2001): Apoptotic cell removal. *Current Biology* **11**: 795-805
- Jakupec M. A., Keppler B. K., Galanski M., Arion V. B., Hartinger C. G. (2008): Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Transactions* **2**:183-194
- Jaouen G., Salmain M. (2014): Bioorganometallic Chemistry: Applications in Drug Discovery, Biocatalysis, and Imaging. Wiley-VCH
- Kasibhatla D., Tseng B. (2003): Why Target Apoptosis in Cancer Treatment? *Molecular Cancer Therapeutics* **2**: 573-580
- Kaufmann S. H., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N. E., Poirier G. G. (1993): Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Research* **53**: 3976-3985

- Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. (1998): The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology* **60**: 619-642
- Laborde E. (2010): Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death and Differentiation* **17**: 1373-1380
- Lazebnik Y. A., Takahashi A., Moir R. D., Goldman R. D., Poirier G. G., Kaufmann S. H., Earnshaw W. C. (1995): Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptosis execution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**: 9042-9046
- Lippard S. J., Ang W. H., Myint M. (2010): Transcription Inhibition by Platinum DNA Cross-links in Live Mammalian Cells. *Journal of the American Chemical Society* **132**: 7429-7435
- Lippert B. (1999): *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich.
- Lovell J. F., Luo D., Carter K. A., Miranda D. (2017): Chemophototherapy: An Emerging Treatment Option for Solid Tumors. *Advanced Science* **4**: 1-24
- Marí M., Morales A., Colell A., Garcia-Ruiz C., Fernandez-Checa C. (2009): Mitochondrial Glutathione, a Key Survival Antioxidant. *Antioxidants & Redox Signaling* **11**: 2865-2700
- Martins P., Marques M., Coito L., Pombeiro A. J., Baptista P. V., Fernandes A. R. (2014): Organometallic compounds in cancer therapy: past lessons and future directions. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* **14**: 1199-1212
- McStay G. P., Green D. R. (2014): Measuring Apoptosis: Caspase Inhibitors and Activity Assays. *Cold Spring Harbor Protocols* 799-806
- Oberoi H. S., Nukolova N. V., Kabanov A. V., Bronich T. K. (2013): Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**: 1667-1685
- O'Dwyer P. J., Stevenson J. P., Johnson S. W. (1999): Clinical status of Cisplatin, Carboplatin, and Other Platinum-Based Antitumor Drugs. U: Lippert B. (ur.)

- Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Zürich, Verlag Helvetica Chimica Acta, str. 31-73
- Oqawa Y., Kobayashi T., Nishioka A., Kariya S., Ohnishi T., Hamasato S., Sequchi H., Yoshida S. (2004): Reactive oxygen species-producing site in hydrogen peroxide-induced apoptosis of human peripheral T cells: involvement of lysosomal membrane destabilization. *International Journal of Molecular Medicine* **13**: 383-388
- Osmak M., Eljuga D. (1993): The characterization of two human cervical carcinoma HeLa sublines resistant to cisplatin. *Research in Experimental Medicine* **193**: 389-396
- Ozols R. F., Bundy B. N., Greer B. E., Fowler J. M., Clarke-Pearson D., Burger R. A., Mannel R. S., DeGeest K., Hartenbach E. M., Baergen R. (2003): Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage II ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology* **21**: 3194-3200
- Pecorino L. (2012): *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*, 3rd edition, Oxford university press, Oxford.
- Ploemen J. H., van Ommen B., Bogaards J. J., van Bladeren P. J. (1993): Ethacrynic acid and its glutathione conjugate as inhibitors of glutathione S-transferases. *Xenobiotica* **23**: 913-923
- Qian C., Wang J. Q., Song C. L., Wang L. L., Ji L. N., Chao H. (2013): The induction of mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells by ruthenium(II) asymmetric complexes. *Metallomics* **5**: 844-854
- Rabik C. A., Dolan M. E. (2007): Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews* **33**: 9-23
- Reisner E., Arion V. B., Keppler B. K., Pombeiro A. J. L. (2008): Electron-transfer activated metal-based anticancer drugs. *Inorganica Chimica Acta* **361**: 1569-1583
- Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Duellman S., Benink H. A., Worzella T. J., Minor L. (2013): *Cell Viability Assays. U: Sittampalam G. S., Coussens N. P., Brimacombe K. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, str. 355-387*

- Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. (1965): Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **205**: 698–699
- Rosenberg B, Vancamp L, Trosko J. E., Mansour V. H. (1969): Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* **222**: 385–386
- Sava G., Bergamo A., Dyson P. J. (2011): Metal-based antitumour drugs in the post-genomic era: what comes next? *Dalton Transactions* **40**: 9069-9075
- Sedletska Y., Giraud-Panis M. J., Malinge J. M. (2005): Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial responses in cancer cells: Importance of apoptotic pathways. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents* **5**: 251-265
- Shah M. A., Schwartz G. K. (2001): Cell Cycle-mediated Drug Resistance. *Clinical Cancer Research* **7**: 2168-2181
- Siddik Z. H. (2003): Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**: 7265-7279
- Steiner I., Stojanovic N., Bolje A., Brozovic A., Polancec D., Ambriovic-Ristov A., Radic Stojkovic M, Piantanida I., Eljuga D., Kosmrlj J, Osmak M. (2016): Discovery of 'click' 1,2,3-triazolium salts as potential anticancer drugs. *Radiology and Oncology* **50**: 280-288
- Stojanović N., Urankar D., Brozović A., Ambriović-Ristov A., Osmak M., Košmrlj J. (2013): Design and Evaluation of Biological Activity of Diazenecarboxamide-extended Cisplatin and Carboplatin Analogues. *Acta Chimica Slovenica* **60**: 368-374
- Tchounwou P. B., Dasari S. (2014): Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanism of action. *European Journal of Pharmacology* **740**: 364-378
- Urruticoechea A., Alemany R., Balart J., Villanueva A., Vinals F., Capella G. (2010): Recent advances in cancer therapy: an overview. *Current Pharmaceutical Design* **16**: 3-10
- Vajs J., Steiner I., Brozovic A., Pevec A., Ambriović-Ristov A., Matković M., Piantanida I., Urankar D., Osmak M., Košmrlj J. (2015): The 1,3-diaryltriazenido(p-cymene)ruthenium(II) complexes with a high *in vitro* anticancer activity. *Journal of Inorganic Biochemistry* **153**: 42-48



## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 21.02.1992. u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole, 2006. godine upisala sam II. gimnaziju. Preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu započela sam 2010. godine da bih 2015. godine upisala diplomski studij molekularne biologije na istom fakultetu.

Tijekom studija bila sam demonstratorica na kolegiju Zoologija u akademskoj godini 2011./2012. Također, sudjelovala sam u izradi i prezentaciji radionica za manifestaciju Noć biologije: u Zavodu za zoologiju 2010./2011. i 2016./2017., u Zavodu za mikrobiologiju 2014./2015, te u Zavodu za molekularnu biologiju 2015./2016. Izradu diplomskog rada započela sam 2016. godine u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Instituta Ruđer Bošković. Za vrijeme rada na projektu, dobila sam priliku sudjelovati na kongresu HDIR-4 (*Fourth Meeting with International Participation "From Bench to Clinic"*) održanom 3.-4.11.2016. u Zagrebu, na kojem sam osvojila nagradu za najbolji poster dodijeljenu od strane EACR-a (engl. *European Association for Cancer Research*), čime sam postala prvi student kome je ta nagrada dodijeljena. Također, rad na projektu predstavila sam na predavanju održanom na godišnjoj skupštini Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR). Sa željom stjecanja dodatnog iskustva i usavršavanja tehnika molekularne biologije, prijavila sam se za Erasmus+ program studentske prakse te sam dobila Erasmus+ stipendiju. Praksu, pod nazivom "Popravak DNA induciran platinom" radila sam u Institutu za toksikologiju Medicinskog fakulteta u Düsseldorfu, u trajanju od tri mjeseca (5.-7. mj. 2017.), pod voditeljstvom prof. dr. Gerharda Fritza.

Tijekom rada na Institutu Ruđer Bošković i Institutu za toksikologiju stekla sam vještine rada u staničnoj kulturi, te sam se usavršila u korištenju različitih metoda molekularne biologije kao što su: testovi preživljenja (MTT, Alamar blue, neutralno crvenilo), mjerenje smrti stanice i ciklusa stanice protočnim citometrom, Western blot, imunocitokemija. Uz materinji hrvatski, koristim se engleskim i talijanskim, a poznajem osnove njemačkog jezika.