



## Општи подаци и протокол истраживања

**Назив Пројекта :** ИСПИТИВАЊЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОМПЛЕКСА ЗЛАТА, ПЛАТИНЕ И РУТЕНИЈУМА *IN VITRO* НА ЋЕЛИЈСКИМ ЛИНИЈАМА АДЕНОКАРЦИНОМА ПЛУЋА И *IN VIVO* НА МИШЈЕМ МОДЕЛУ МЕТАСТАЗА КАРЦИНОМА ПЛУЋА

**Кључне речи :** A549 и LLC ћелијске линије; аденокарцином плућа, NSCLC; комплекси злата, платине и рутенијума.

## Предмет, садржај и циљ истраживања

### Сажетак

Лечење тумора цисплатином је повезано са бројним нежељеним ефектима и релативно брзим развојем резистенције. Због тога су стално актуелна истраживања нових комплекса тешких метала која би имала сличан терапеутски ефекат као цисплатина а мање нежељених дејстава и слабији развој резистенције. Резистенција на цисплатину може да буде природна или стечена и углавном је повезана са променама p53 молекула, повећањем експресије молекула са тиол групама (метилотионеин, глутатион) који инактивирају цисплатину, већом експресијом молекула укључених у поправку DNA. Токсичност цисплатине је углавном повезана са великом продукцијом слободних радикала у ћелијама изложеним цисплатини.

Карцином плућа представља водећи узрок смрти од малигних болести у мушкараца и на другом месту је као узрочник смрти од малигнитета у свету, а приближно 80% ових тумора спада у групу не-ситно-ћелијског карцинома плућа, NSCLC (од енг. Non Small Cell Lung Cancer). Хемиотерапија NSCLC тумора плућа подразумева примену деривата платине самостално или у комбинацији са другим групама хемиотерапеутика као што су антимераболити фолата.

Ово истраживање има за циљ да испита цитотоксичност нових комплекса злата, платине и рутенијума на епителним ћелијама аденокарцинома плућа (ћелијске линије A549 и LLC1). Уколико неки комплекси покажу знатну цитотоксичност у поређењу са цисплатином и метротрексатом на који су LLC1 ћелије осетљиве, циљ је да се детаљније испита механизам дејства комплекса и да се утврде разлике у механизму изазивања смрти ћелија у односу на цисплатину. На мишјем моделу експерименталних метастаза тумора плућа провериће се који комплекси изазивају смрт туморских ћелија *in vivo* и који би комплекс могао даље да се испита као потенцијални терапеутик.



### Циљ истраживања:

Основни циљ овог истраживања је да се испита цитотоксичност новосинтетисаних комплекса платине, злата и рутенијума на ћелијским линијама карцинома плућа.

У складу са основним циљем постављени су следећи специфични циљеви.

1. МТТ тестом испитати потенцијалну цитотоксичност комплекса.
2. Испитати релативни однос некротичне и апоптотске смрти ћелија изазване ипитиваним комплексима.
3. Испитати који је доминантни пут апоптотске смрти изазване комплексима.
4. Испитати да ли комплекси утичу на смањење већ успостављених метастаза карцинома плућа у мишјем моделу.
5. Утврдити да ли примена комплекса утиче на преживљавање мишева са успостављеним метастазама карцинома плућа.

### Актуелност истраживања:

Ако се посматрају малигне болести, карцином плућа представља водећи узрок смрти мушкараца у свету а у целокупној популацији заузима друго место. Приближно се региструје око 1.2 милиона нових случајева годишње и 80-85% тумора плућа спада у групу не-ситно-ћелијског карцинома, NSCLC. Историјски гледано, хируршки приступ решавању овог проблема представља најбољу шансу већини пацијената за петогодишње преживљавање (1), али само 25%–30% NSCLC тумора је уопште погодно за хируршку ресекцију. Уз адекватну хемиотерапију, преоперативно или постоперативно, петогодишње преживљавање је описано и код оболелих који се налазе у трећем или четвртом стадијуму болести (2). Од деведесетих година прошлог века као стандардна терапија у ове сврхе користи се комбинација деривата платине (3), а касније и у комбинацији са аликилирајућим агенсима и антиметаболитима фолата. У новије време се као прва терапијска мера за лечење локално одмаклих и метастатских стадијума NSCLC (*non squamous cell type*) користи комбинација цисплатине и пеметрексета (4), или пре било какве терапије пеметрексет самостално (5). Али резултати ових различитих комбинација хемиотерапеутика и даље нису задовољавајући, јер је проценат болесника са продуженим преживљавањем и даље врло мали. Преживљавање се у просеку повећава за 1.5 месец, а апсолутно продужење живота од годину дана је забележено код 10% оболелих (6).

Примена цисплатине је повезана како са релативно брзим развојем резистенције, тако и са бројним нежељеним ефектима. Цисплатина пролази ћелијску мембрану, у ћелији се активира и остварује интеракцију са DNA и протеинима. Оштећену DNA препознају протеини који се активирају и могу симултано да индукују различите про- и анти- апоптотске путеве. Од релативног интензитета и/или дужине сваког од ових сигнала који се нисходно укрштају зависи коначна судбина ћелије (7,8). Механизми поправке DNA повезани су са активацијом контролних тачака ћелијског циклуса и процесом апоптозе, а сва три процеса повезује p53



протеин (8,9). Цисплатина изазива посредну активацију p53 молекула, тек после низа усходних догађаја. Активирају се ATM/ATR и MAPK (ERK, JNK, p35) киназе које катализују фосфорилацију p53 молекула, који изазива транслокацију Вах из цитосола у митохондрије, ослобађа се Сут с, активирају се каспазе 9 и 3 и резултат је апоптоза (10,11). Цисплатина, такође може да индукује апоптозу активацијом Fas/FasL и каспазе-8, са или без помоћи p53 (12). Активација MAPK киназа може и да антагонизује апоптозу што све зависи од типа ћелије, величине оштећења DNA и сигнала из екстрацелуларне средине. Активирани p53 молекул делује на p21 и продужава се G2/M контролна тачка ћелијског циклуса када је могућа поправка DNA. Резистенција неких ћелија на цисплатину може, између осталог, да буде последица изражене репарације DNA, дисфункције p53, повећане експресије bcl-2 молекула. Злато (III) комплекси са полиаминима, полипиридинима, порфирином и дитиокарбаматом су показали *in vitro* цитотоксичност сличну, или у неким случајевима већу у односу на цисплатину(13). Рутенијум је показао не само велику цитотоксичност према малигним ћелијама, већ и генерално ниску токсичност у организму(14).

#### Предмет и опис истраживања:

Испитиваће се цитотоксичност комплекса платине, злата и рутенијума на ћелијским линијама мишјег и хуманог карцинома плућа.

Као контрола за наведене супстанце користиће се цисплатина [PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] и метотрексат. LLC1 ћелијска линија је осетљива на метотрексат.

#### Ћелијске линије:

- **A549** (CCL-185, ATCC): хумани карцином плућа, NSCLC
- **LLC1** (CRL-1642, ATCC): мишји карцином плућа, NSCLC

#### *In vitro* испитивања

**Вијабилност ћелија третираних комплексима ће се испитати МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) тестом.** У метаболички активним ћелијама се МТТ редукује до љубичастих кристала формазана. Митохондријална редуктаза (сукцинат дехидрогеназа), активна само у живим ћелијама, катализује ову реакцију, па је редукција првобитног једињења до формазана директно пропорционална броју живих ћелија. А549 и LLC ћелије ће се излагати комплексима 24 и 72 сата, а испитаће се ефекти 8 различитих разблажења, свако разблажење ће се радити у трипликату.

**Утицај комплекса на цитолизу А549 и LLC ће се испитати LDH тестом.** LDH је стабилни ензим присутан у цитоплазми ћелија који се убрзо по оштећењу плазма мембране отпушта у медијум у којем се ћелије гаје. Активност LDH ензима у супернатантима третираних ћелија расте са порастом броја мртвих или ћелија са оштећеном мембраном. И за овај тест ће се



користити 8 разблажења испитиваних комплекса, али ће излагање ћелија комплекса да траје само 24 сата. Тип ћелијске смрти ће се квалитативно испитати бојењем ћелија излаганих комплекса акридин оранжом и етидијум бромидом и посматрањем под флуоресцентним микроскопом и *DNA laddering-ом*. За *DNA laddering* ће се користити *Roche* кит.

**Процент ћелија умрлих апоптозом након излагања комплекса испитаће се *flow* цитометријском анализом ћелија бојених *Annexin-ом V* и пропидијум јодидом.**

**Апоптотска смрт ће се потврдити** инкубацијом ћелија са панинхибитором каспаза пре излагања испитиваним супстанцама и одређивањем процента вијабилних ћелија МТТ тестом и поређењем са процентом вијабилних ћелија које нису биле третиране инхибиторима каспаза.

**Доминантни пут индукције апоптозе** ће се испитати инкубацијом ћелија са инхибиторима каспазе 8 и 9 пре излагања испитиваним комплексима, одређивањем процента вијабилних ћелија МТТ тестом и поређењем са процентом вијабилних ћелија третираних само комплексима.

### ***In vivo* испитивање**

Да би се испитало да ли постоји корелација између резултата добијених у култури ћелија и ефеката у живом систему урадиће се *in vivo* испитивање на анималном моделу за метастазе аденокарцинома плућа.

**Експерименталне животиње:** C57BL/6 мужјаци узраста 6 до 10 недеља.

**Индукција експерименталних метастаза тумора плућа:** мишевима ће се интравенски апликовати  $5 \times 10^5$  LLC1 ћелија у репну вену. Мишеви ће бити подељени у 3 контролне и 3 експерименталне групе од по 17.

**Снага студије и одређивање величине узорка (групе):** Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима броја метастаза на површини плућа, публикованих у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући алфа као 0.05 и снагу студије од 0.8 за Student's t тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G\*Power3. С обзиром да је за број метастаза нађена најмања разлика између експерименталне и контролних група, ова вредност је коришћена за израчунавање величине узорка. Разлика у вредностима броја метастаза између контролне групе и испитиваних група износи 3, а да је стандардна девијација такође 3 утврђени број експерименталних животиња према групама износи 17 за сваку од група, али користимо по 25 мишева у свакој групи. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (Student's t тест за два независна узорка или Mann-Whitney тестом) између две групе испитаника, са снагом студије  $\geq 80\%$ . За статистичку обраду добијених резултата ће се користити комерцијални програмски пакет SPSS верзија 13.



**I контролна група:** мишеви ће 10 дана од апликације туморских ћелија интравенски примати физиолошки раствор

**II контролна група:** мишеви ће 10 дана од апликације туморских ћелија интравенски примати цисплатину.

**III контролна група:** мишеви ће 10 дана од апликације туморских ћелија интравенски примати метотрексат.

**I експериментална група:** мишеви ће 10 дана од апликације туморских ћелија интравенски примати комплекс.

**II експериментална група:** мишеви ће 10 дана од апликације туморских ћелија интравенски примати комплекс.

**III експериментална група:** мишеви ће 10 дана од апликације туморских ћелија интравенски примати комплекс рутенијума.

Све супстанце мишеви ће примати 3 пута недељно а дозе ће бити одређене на основу *in vitro* испитивања.

Пратиће се преживљавање по групама. Мишеви ће се жртвовати 18. дана експеримента (или раније ако су присутни знаци патње, смањена покретљивост или измењено понашање).

#### **Хистолошка анализа:**

Након жртвовања мишевима ће се извадити плућа, медијастинални лимфни чворови и мозак од којих ће се правити парафински исечци и бојити хематоксилин/еозином. Одређиваће се присуство и број метстазау паренхиму плућа и упоређиваће се број метастаза по групама.

#### **Статистичка обрада података**

Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 13. Пре статистичке обраде података, прво ће се испитати правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). Уколико вредности буду имале правилну расподелу користићемо параметарски Student's t тест, док ће се неправилна расподела поредити коришћењем непараметарског Mann-Whitney теста. Резултати експеримента ће се изражавати као вредност  $\pm$  стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи  $p < 0,05$ , док је статистички веома значајна разлика када је  $p < 0,01$ .



### Значај истраживања:

Обзиром да су карциноми плућа најчешћи узрок смрти од малигнитета у мушкараца и на другом месту по морталитету у жена, постоји стална потреба за налажењем нових терапеутских мера. Испитивањем новосинтетисаних комплекса на ћелијским линијама хуманог адено-карцинома плућа (A549) стекао би се *evidence-based* основ за даље испитивање ових једињења *in vivo*. Такав комплекс би могао даље да се испитује као потенцијални терапеутик (примарни или додатни) за карцинома плућа.

### Временски оквир:

Истраживање ће се спровести у периоду од годину дана.

### Литература:

1. Datta D, Lahiri B. Preoperative evaluation of patients undergoing lung resection surgery. *Chest* 2003;123(6):2096
2. Gatzemeier U, von PJ, Gottfried M, et al. Phase III comparative study of high-dose cisplatin versus a combination of paclitaxel and cisplatin in patients with advanced non-“small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2000;18
3. Collaborative Group. *BMJ* 1995; 311(7010): 899-909. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. *Non-small Cell Lung Cancer*
4. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3543–51.
5. Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004;22: 1589–97.
6. The Role of Pemetrexed in Advanced Non Small-Cell Lung Cancer: Special Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. Joerger M, Omlin A, Cerny T, Früh M. *Curr Drug Targets*. 2010 Jan;11(1):37-47.
7. DNA unwinding produced by site-specific intrastrand crosslinks of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II), Steven F. Bellon, Julia H. Coleman, Stephen J. Lippard, *Biochemistry*, 1991, 30 (32), pp 8026–8035



8. Jordan P, Carmo-Fonseca M. (2000) Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci.*, 57(8-9):1229-35.
9. p53 mutations and resistance to chemotherapy: A stab in the back for p73, Thierry Soussi, *Cancer Cell*, Volume 3, Issue 4, 303-305, 1 April 2003
10. Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation, Yeh Pei Yen; Chuang Shuang-En; Yeh Kun-Huei; Song Ying Chyi; Ea Chee-Kwee; Cheng Ann-Lii, *Biochemical pharmacology* 2002;63(8):1423-30.
11. Cleavage of Bcl-2 in oxidant- and cisplatin-induced apoptosis of human melanoma cells, Del Bello B; Valentini M A; Zunino F; Comporti M; Maellaro E, *Oncogene* 2001;20(33):4591-5.
12. Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med.* 1998 Dec 7;188(11):2033–2045
13. Synthesis, characterization and cytotoxicity of the gold(III) complexes of 4,5-dihydropyrazole-1-carbothioamide derivatives, Shuxiang Wang, Wenqing Shao, Hongdong Li, Cui Liu, Ke Wang and Jinchao Zhang *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 46, Issue 5, May 2011, Pages 1914-1918
14. The ruthenium(II)–arene compound RAPTA-C induces apoptosis in EAC cells through mitochondrial and p53–JNK pathways Soumya Chatterjee, Subhadip Kundu, Arindam Bhattacharyya, Christian G. Hartinger and Paul J. Dyson, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, Volume 13, Number 7, 1149-1155, DOI: 10.1007/s00775-008-0400-9.