



ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

**Антитуморски ефекат новосинтетисаних комплекса  
рутенијума(II) на туморске ћелије *in vitro***

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

КАНДИДАТ

Асист. др Петар Чановић

МЕНТОР

проф. др Иванка Зелен

# Садржај

1. Увод .....	1
1.1. Канцерогенеза.....	2
1.2. Учесталост тумора .....	5
1.2.1. КАРЦИНОМ ПЛУЋА .....	6
1.2.2. КАРЦИНОМ ДОЈКЕ .....	7
1.2.3. КАРЦИНОМ ГРЛИЋА МАТЕРИЦЕ (ЦЕРВИКСА).....	9
1.2.4. МАЛИГНИ МЕЛАНОМ .....	10
1.3. Ћелијске линије .....	12
1.4. Програмирана ћелијска смрт.....	13
1.4.1. Типови програмиране ћелијске смрти.....	13
1.4.3. Механизам апоптозе.....	15
1.5. Ћелијски циклус .....	19
1.5.1. <i>G1/S</i> ФАЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА.....	20
1.5.2. <i>G2/M</i> ФАЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА .....	21
1.6. Лекови у хемиотерапији малигнитета.....	22
1.7. Комплекси метала у медицини .....	23
1.8. Комплекси метала у терапији канцера.....	24
1.9. Комплекси платине и цисплатина .....	25
1.10. Комплекси рутенијума.....	27
2. Циљеви и хипотезе студије.....	30
3. Материјал и методе.....	31
3.1. Врста студије .....	31
3.2. Култивација ћелија.....	31
3.3. Варијабле истраживања.....	31
3.4. <i>MTT</i> тест .....	32
3.5. <i>ANNEXIN V-FITC</i> тест апоптотичности .....	34
3.6. Анализа ћелијског циклуса .....	35
3.7. Имуноцитохемијска бојења специфичним антителима за <i>Bax</i> , <i>Bcl-2</i> , цитохром <i>c</i> и активну каспазу 3 .....	35
3.8. Евалуација проточном цитометријом .....	36

4. Резултати.....	37
4.1. Комплекси рутенијума(II) и цисплатина смањују вијабилност туморских ћелија....	37
4.1.1. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија епителног аденокарцинома плућа <i>A549</i> .....	37
4.1.2. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија карцинома дојке <i>MCF7</i> .....	45
4.1.3. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија карцинома цервикса <i>HeLa</i> .....	54
4.1.4. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија малигног меланома <i>Hs 294T</i> .....	62
4.2. Комплекси рутенијума(II) смањују вијабилност туморских ћелија индукцијом апоптозе.....	71
4.2.1. Комплекси рутенијума и цисплатина индукују апоптозу на ћелијама епителног аденокарцинома плућа <i>A549</i> .....	72
4.2.2. Комплекса рутенијума и цисплатина индукују апоптозу на ћелијама карцинома дојке <i>MCF7</i> .....	74
4.2.3. Комплекси рутенијума и цисплатина индукују апоптозу на ћелијама карцинома цервикса <i>HeLa</i> .....	76
4.2.4. Комплекси рутенијума и цисплатина индукују апоптозу на ћелијама малигног меланома <i>Hs 294T</i> .....	78
4.3. Комплекси рутенијума(II) утичу на ћелијски циклус туморских ћелија.....	81
4.3.1. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус <i>A549</i> ћелија епителног аденокарцинома плућа.....	81
4.3.2. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус <i>MCF7</i> ћелија карцинома дојке.....	84
4.3.3. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус <i>HeLa</i> ћелија карцинома цервикса.....	86
4.3.4. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус <i>Hs 294T</i> ћелија малигног меланома.....	88
4.4. Комплекси рутенијума индукују апоптозу туморских ћелија активацијом унутрашњег, митохондријалног сигналног пута апоптозе.....	91
5. Дискусија.....	97
6. Закључци.....	118
7. Литература.....	119

## 1. Увод

Термин „тумор“ се у медицини користи да значи увећање ткива које не мора увек бити неопластично, као што је случај код гранулома. Неопластични процес је процес који представља нови и неконтролисан раст ћелија који није регулисан физиолошким механизмима. Неоплазме су промене које се могу класификовати као бенигне или малигне на основу морфологије, степена диференцијације, инвазивности и функционалних карактеристика ћелија које их изграђују. Сам термин „карцином“ означава малигну лезију са абнормалним растом ћелија које имају тенденцију да се прошире на остале делове тела (1).

Упркос великом напретку у дијагностици и терапији малигну неоплазми последњих година, карцином је водећи узрок смрти у развијеним земљама, док је у земљама у развоју други водећи узрок смрти, одмах након кардиоваскуларних болести. У свету је 2012. године дијагностиковано 14 милиона нових пацијената који болују од малигну неоплазми. Такође, малигне неоплазме су у свету узроковале 8,2 милиона смрти током 2012. године, при чему је за 25% већа инциденца оболелих од карцинома код мушког пола у односу на жене (2). Према подацима Националног института за канцер (енг. NCI, National Cancer Institute) од 20. марта 2017. године, само у Сједињеним Америчким Државама је у 2016. години дијагностиковано око 1,7 милиона нових пацијената оболелих од канцера, а скоро 600.000 људи је преминуло од канцера. Инциденца, односно број новооткривених пацијената који болују од канцера у Сједињеним Америчким Државама је 454,8 на 100.000 одраслих особа годишње, према подацима од 2008-2012. године. Такође, број пацијената који премину од канцера у Сједињеним Америчким Државама је 171,2 на 100.000 одраслих особа према подацима из истог периода. Током 2014. године је дијагностиковано 15.780 нових случајева канцера код деце и адолесцената до 19 година, а 1960 особа до 19 година је преминуло услед канцера током 2014 године у Сједињеним Америчким Државама. Поред тога, поражавајуће делује процена Националног института за канцер, да ће се код 39,6% одраслих особа током живота појавити канцер (3).

У Србији је од 1999. до 2009. године, забележен значајан пораст инциденце и морталитета оболелих од канцера, а забележене су и алармантно високе стопе морталитета

оболелих од различитих типова канцера у односу на остатак Европе. У 2008. години, Србија је, у односу на остале земље Европе, имала највећи морталитет оболелих од канцера дојке, док је по инциденци цервикалног карцинома била на другом месту, одмах иза Румуније. Код мушкараца у Србији су забележене стопе морталитета за канцер плућа и канцер колона знатно изнад просека у Европи, док је једино инциденца карцинома простате била испод европског просека за 2008. годину (4).

Јасно је да канцер представља озбиљан здравствени проблем у целом свету, нарочито ако се у обзир узме процена да ће до 2030. године број особа које премину од канцера, порастати на 13 милиона годишње (3). Услед тога је важно разумети факторе који узрокују процес настанка канцера, односно процес канцерогенезе, како би ефикасније покушали да пронађемо начин за лечење малигних неоплазми.

## 1.1. Канцерогенеза

Канцерогенеза представља процес трансформације здравих ћелија у канцерогене, услед акумулације генских грешака у молекулу ДНК, чиме се ремети механизам пролиферације ћелије и репарације грешака у структури ДНК. Највећи број оштећења ДНК молекула током репликације подразумева мутације, односно промене у секвенцама нуклеотида ДНК (5, 6). Мутације у молекулу ДНК могу бити последица случајних грешака током процеса репликације, као и изложености ДНК карциногенима и њиховом дејству, и/или могу настати услед неефикасних механизма репарације молекула ДНК (5). За малигну трансформацију ћелије није довољна лезија једног појединачног гена, већ је потребно да се догоди неколико сукцесивних мутација које ћелија није у могућности да поправи својим механизмима репарације (7, 8). Услед малигне трансформације, долази до сталне, патолошке и неконтролисане пролиферације ћелија (9).

За настанак малигне трансформације ћелије кључни су поремећаји у грађи и функцији гена који регулишу пролиферацију ћелије. Гени, чији су протеински производи одговорни за промоцију физиолошког раста ћелија називају се протоонкогени. Мутацијом протоонкогена настају онкогени, а молекули протеина који се синтетишу на основу информације забележене у онкогенима, називају се онкопротеини. Онкогени су први гени који су повезивани са малигном трансформацијом ћелија (10). Онкопротеини стимулишу деобу ћелија, инхибирају диференцијацију ћелија и спречавају ћелијску смрт. Сви ови процеси су важни за физиолошки раст и развој ткива и органа. Транскрипција онкогена

међутим, доводи до повећане синтезе онкопротеина што има за последицу убрзање ћелијске деобе, смањење диференцијације ћелија и инхибицију ћелијске смрти. Ћелија са свим овим променама поседује карактеричан фенотип малигне ћелије. Стога, онкогени су тренутно кључни молекули приликом дизајна нових лекова у терапији против канцера. Неки од лекова који су синтетисани тако да делују инхибирајуће на транскрипцију онкогена су трастузумаб који делује на *HER-2* онкоген код карцинома дојке и иматиниб који делује на *BCR/ABL* онкоген код хроничне мијелоидне леукемије (11).

Насупрот онкогенима, постоје и тумор-супресорски гени који заустављају ћелијски циклус и на тај начин омогућавају поправку грешака у грађи молекула ДНК. Губитак функције тумор-супресор гена је веома битан у процесу малигне трансформације ћелија, јер уколико се јави губитак функције ових гена то за последицу има неконтролисани ћелијски раст (10). Тумор-супресор гени се активирају услед оштећења молекула ДНК, хетероплоидије или повећане активности онкогена и руководе ћелијским одговорима на стрес као што су процеси заустављања ћелијског циклуса и процес апоптозе. Неки од тумор-супресор гена су *TP53* и *RBI* (ретинобластома 1 ген) (12, 13). Ген *TP53* и његов протеински продукт *p53*, су битни за одговор ћелије на различите стресогене факторе почев од рибозомалних до метаболичких фактора (13). Соматске мутације гена *TP53* се јављају код већине канцера, па се стога ген *TP53* назива и „чуваром” генома. У здравим ћелијама, експресија протеина *p53* је значајно ниска захваљујући *p53*-интерагујућем протеину *MDM2*. Протеин *MDM2* је убиквитинска лигаза која стимулише убиквитинизацију и протеозомалну деградацију протеина *p53*. Протеин *p53* се везује за молекулу ДНК, што доводи до активације контролних тачака ћелијског циклуса (енг. *checkpoint activation*). Активација контролних тачака ћелијског циклуса дејством протеина *p53*, може за последицу имати или заустављање ћелијског циклуса и активацију протеина који репарирају молекулу ДНК или иницијацију апоптозе, уколико је оштећење ДНК молекула непоправљиво (12).

Тумор-супресор ген *RBI* и његов протеин pRB, регулишу прелазак ћелије из *G1* у *S*-фазу ћелијског циклуса репресијом *E2F* транскрипционих фактора који стимулишу експресију гена одговорних за прогресију ћелијског циклуса (12, 14). *E2F* транскрипциони фактори активирају циклин *DI* механизмом позитивне повратне спреге, што резултује преласком ћелије кроз *S*-фазу ћелијског циклуса (12). Ген *RBI* је први тумор-супресор ген

који је потпуно дефинисан као молекул, односно чија је молекулска структура потпуно разјашњена. Мутације овог гена се јављају код скоро свих фамилијарних и спорадичних форми ретинобластома, а различите мутације овог гена су присутне и код других хуманих карцинома што указује на његов значај у процесу канцерогенезе (14).

Посебна фамилија гена, која је укључена у патогенезу малигнитета су гени одговорни за поправку молекула ДНК. Овај систем гена за репарацију молекула ДНК је неопходан у циљу одржавања интегритета генома ћелије (10).

Промене на молекулу ДНК, такође, могу настати и услед дејства различитих вируса који се повезују са настанком различитих типова канцера. Експериментално је показано да ретровируси, који припадају РНК вирусима, могу да изазову туморе код животиња, али није утврђена њихова значајнија улога у малигној трансформацији хуманих ћелија (15). Изузетак је Хумани-Т ћелијски вирус (енг. *Human T-lymphotropic virus, HTLV*), ретровирус који је главни узрок настанка хуманог Т-ћелијског лимфома. За разлику од РНК вируса, доказано је да су ДНК вируси много више заступљени у патогенези хуманих малигнитета. Хумани папилома вируси (енг. *human papillomavirus, HPV*) представљају главни узрок настанка карцинома грлића материце, док вируси хепатитиса *B* и *C* имају кључну улогу у етиопатогенези хепатоцелуларног карцинома (16).

Осим поремећаја у грађи и функцији гена који регулишу пролиферацију ћелије, постоји још један битан фактор који утиче на раст укупне туморске масе. Туморске ћелије су метаболички изразито активне и за своју активност захтевају велику количину кисеоника и хранљивих материја. Стога ангиогенеза као сложен процес у коме долази до развоја нових крвних судова, представља кључни фактор за раст туморске масе. Развој нових крвних судова, настаје као одговор на повећане потребе туморских ћелија за хранљивим материјама и кисеоником у односу на здраве, малигно неизмењене ћелије. Осим што има кључну улогу везану за раст туморске масе, ангиогенеза је такође веома битан процес који омогућава малигним ћелијама да метастазирају у друга ткива (17).

Метаболизам малигних ћелија је такође измењен у односу на метаболизам здравих ћелија. Неконтролисана пролиферација малигно трансформисаних ћелија доводи до убрзаног енергетског метаболизма, како би малигне ћелије могле несметано да расту и неконтролисано да се деле. У аеробним условима здраве ћелије метаболишу глукозу до пирувата процесом гликолизе и који се одвија у цитосолу. Затим се тако настали молекули

пирувата у присуству молекула кисеоника, процесом оксидативне декарбоксилације конвертују до ацетил-коензима А, који се метаболише до угљен-диоксида у митохондријама циклусом трикарбоксилних киселина. Ото Варбург је 1930. године први приметио разлику између метаболизма здравих ћелија и метаболизма малигнућ ћелија. Први је доказао да и у присуству кисеоника, малигне ћелије „репрограмирају“ метаболизам глукозе у анаеробну гликолизу, што се назива "Варбургов ефекат" (18). Доказано је да је Варбургов ефекат присутан и у многим брзорастућим ембрионалним ткивима, у којима се јавља интензивна пролиферација (19). Аеробним метаболизмом глукозе у митохондријама се производи 18 пута већа количина енергије у односу на анаеробну гликолизу, тако да малигне ћелије овај дефицит енергије компензују повећавајући експресију транспортера за молекулу глукозе, првенствено *GLUT1* транспортних протеина, који омогућава улазак глукозе у цитоплазму (20). На тај начин, малигнућ измењене ћелије троше велику количину глукозе и других хранљивих материја које су потребне и осталим, малигнућ неизмењеним ћелијама за функционисање. Стога, малигнућ неизмењене ћелије, са растом туморске масе, добијају све мање хранљивих материја (18, 20). Додатни чинилац који доприноси „гладовању“ здравих ћелија и ткива је и настанак секундарних, удаљених тумора, односно метастаза (20).

Метастазе представљају секундарне туморе, који су настали од иницијалног или примарног тумора дистално од места његовог настанка. Малигнућ ћелије се могу одвојити од примарног тумора и тако могу доспети на неко друго место у организму путем крвотока, лимфотока или одвајањем у телесне шупљине. Заправо, основни узрок mortalитета и morbидитета људи оболелих од канцера су метастазе које и представљају највећи проблем у терапији малигнитета (20).

## 1.2. Учесталост тумора

Према локализацији, најчешћа малигна неоплазма која се јавља и код мушкараца и код жена је карцином плућа. Око 15% мушкараца и 14% жена од укупног броја новооткривених пацијената који болују од малигнућ тумора сваке године оболи од карцинома плућа (21). Код жена се најчешће дијагностикује и карцином дојке, од кога оболи свака осма жена, затим карцином цервикса, који је четврти најчешћи тумор код жена у Сједињеним Америчким Државама (21, 22). Један од типова малигнућ неоплазми који се релативно често јавља и који има изузетно високу стопу mortalитета пацијената је



меланом. Око 2% Американаца ће оболети од меланома током живота, што ће резултовати бројем од 65% преминулих особа који оболе од тумора коже (21).

### **1.2.1. КАРЦИНОМ ПЛУЋА**

Карцином плућа је водећи узрок смрти у свету међу пацијентима оболелих од карцинома, јер око 1,4 милиона људи у свету умире од овог карцинома сваке године (23). У Сједињеним Америчким Државама карцином плућа је најчешћи облик малигнитета, са преко 219.000 дијагностикованих нових случајева и преко 159.000 смртних случајева забележених током 2009. године (24). Током последњих четрдесет година, стопа преживљавања се незнатно повећала, а разлог је касна дијагноза карцинома плућа у одмаклој фази болести када терапија није ефективна (23, 25). У треутку постављања дијагнозе, 80% пацијената са карциномом плућа има метастазе на костима, јетри, лимфним чворовима и мозгу (25).

Тачан узрочник карцинома плућа није познат. Разни респираторни иританси, пушење, аерозагађење, експозиција хемијским агенсима и зрачења, повећавају ризик обољевања од карцинома плућа (26, 27). Код пушача ризик за настанак карцинома плућа је 5 до 10 пута већи него код непушача, 80% оболелих од немикроцелуларног карцинома плућа и чак 98% оболелих од микроцелуларног карцинома плућа су пушачи (26, 28).

Симптоматологија карцинома плућа зависи од локализације тумора, начина интраторакалног раста, хематогених метастаза и паранеопластичног синдрома. Уколико је тумор централно локализован симптоми су везани за опструкцију бронха, а код периферно локализованих тумора симптоми су везани за плеуру и торакални зид. Рани и најчешћи симптом болести је кашаљ, који може бити сув, иритативан или продуктиван са пурулентном експекторацијом због опструкције бронха тумором и дисталне инфламације. Такође, хемоптизије су чест симптом код тумора локализованих у већим бронхиима (24, 26). Диспнеја је један од главних симптома и јавља се углавном код тумора који су локализовани у главним и лобарним бронхиима. Уколико се јављају понављане хемоптизије и рецидивирајуће пнеумоније код пушача, такође можемо посумњати на карцином плућа. Због афекције плеуре и инвазије коштаних структура тумором, као чест симптом јавља се бол. Код пацијената са карциномом плућа, могу се јавити и општи симптоми као што су губитак апетита, губитак телесне тежине, замор и повишена

температура (23, 29). Хематогене метастазе карцинома плућа се најчешће налазе у костима (33%), мозгу (28,4%), надбубрежној жлезди (16,7%) и јетри (13,4 %) (26, 30, 31).

У циљу поуздане и тачне дијагнозе карцинома плућа као и због планирања терапије неходна је хистолошка или цитолошка потврда дијагнозе карцинома. Најважнији дијагностички поступак за детекцију канцерогених лезија у плућима и дијагнозу карцинома је бронхоскопија (32). Дијагноза карцинома плућа се може заснивати и на цитолошком прегледу испљувка и плеуралног излива, али без услова за диференцирање типа тумора (26).

Могућности за лечење карцинома плућа су релативно ограничене јер већина пацијената оболелих од карцинома плућа у тренутку постављања дијагнозе има системске метастазе. Услове за хирушко лечење има свега 15% до 20% болесника, а постопетративно лечење се може наставити радиотерапијом или цитостатицима. Основни вид лечења иноперабилних карцинома је радиотерапија. С друге стране, системском хемиотерапијом се може постићи привремена потпуна регресија тумора. Цитостатици који су показали највећи успех у терапији карцинома плућа су циклофосфамид, доксорубицин, етопозид и цисплатина. Ипак, најбоље резултате у терапији карцинома плућа показује комбинација хемотерапије и радиотерапије (26).

### **1.2.2. КАРЦИНОМ ДОЈКЕ**

Карцином дојке представља малигну пролиферацију епителних ћелија које облажу каналиће (дуктусе) и режњиће (лобусе) дојке. Епителне неоплазме дојке су најчешће дијагностиковани канцери код жена и чине приближно једну трећину свих врста дијагностикованих канцера код жена (33, 34). Број оболелих од карцинома дојке је удвостручен у временском периоду од 1975. до 2000. године, што се може приписати повећању животног века жена као и повећаном изложеношћу факторима ризика (33, 35). Око 1,38 милиона нових случајева са карциномом дојке дијагностиковано је у 2008. години, а чак 60% смртних случајева код жена оболелих од овог карцинома је забележено у слабије развијеним земљама (36).

Око 10 % карцинома дојке је повезано са герминативним мутацијама. Тумор-супресор ген *BRCA 1* је идентификован на хромозомском локусу *17q21* и протеински продукт овог гена има главну улогу у контроли ћелијског циклуса и поправци оштећеног

ДНК молекула (37). Уколико жене наследе мутирани алел *BRCA 1* гена, имаће 40% до 80% већи ризик да оболе од карцинома дојке до 70. године живота (38). Такође, мутација гена *BRCA 2* који је локализован на хромозому *13q12*, се везује за повећану инциденцу карцинома дојке и код жена и код мушкараца (36, 37, 38). Ген *BRCA 2* има сличну функцију коју има и *BRCA 1* ген (37).

Осим генетских, фактори ризика за настанак карцинома дојке могу бити и хормонске природе. Мањи ризик од настанка карцинома дојке имају жене које су прву менструацију имале у 16. години у односу на оне које су добиле прву менструацију са 12 година (36, 39). Такође, свако одлагање, односно каснија појава менопаузе у временском периоду од годину дана за 3% повећава ризик од настанка карцинома дојке код жена, док одлагање менопаузе у временском периоду од 5 година за 17% повећава ризик од настајања карцинома дојке у односу на жене код којих менопауза наступа у физиолошком оквиру од 48. до 55. године. Жена која изнесе трудноћу пре 18. године смањује ризик за настанак карцинома дојке за 30% до 40% од жене која није рађала (39, 40).

Улога исхране код настанка карцинома дојке је јасно показана на анималним моделима болести (41, 42). Гојазност изазвана прекомерним уносом масти, код животиња повећава ризик за настанак неколико врста карцинома, укључујући и карцином дојке (42). Код жена у постменопаузи које имају повећан индекс телесне масе (енг. *Body Mass Index*, *BMI*), студије показују да је присутан повећан ризик од настанка карцинома дојке у односу на жене са нормалним индексом телесне масе (41, 43).

Од великог значаја за настанак карцинома дојке је улога егзогено примењених хормона, код жена које користе оралне контрацептиве и постменопаузалну супституциону хормонску терапију (енг. *Hormone Replacement Therapy*, *HRT*). Жене које су користиле *HRT* имају већи ризик од настанка карцинома дојке, од жена које нису узимале ову терапију (44). Насупрот томе, примена оралних контрацептива не доприноси настанку карцинома оваријума, а ови лекови пружају и значајну заштиту од епителијалних тумора јајника и ендометријалног карцинома код жена које их користе у односу на жене које не узимају оралне контрацептиве (16).

Дијагностика карцинома дојке обухвата клинички преглед, мамографију код жена после 40. године живота и ултрасонографију пре 40. године живота (36, 45). Лечење карцинома дојке обухвата радиотерапију, хормонску терапију и хемиотерапију. Од

хемотерапеутика који се користе у терапији карцинома дојке, треба споменути доксорубицин, циклофосфамид, паклитаксел, флуороурацил, метотрексат и цисплатину.

### 1.2.3. КАРЦИНОМ ГРЛИЋА МАТЕРИЦЕ (ЦЕРВИКСА)

Карцином грлића материце је други по реду најчешћи узрок смрти код жена. По инциденци карцинома код оба пола, карцином грлића материце заостаје за карциномом дојке, плућа, колона, ендометријума и јајника. Сваке године се дијагностикује просечно око 500.000 нових случајева жена оболелих од карцинома грлића материце, а морталитет износи око 280.000 годишње (46).

Важну етиолошку улогу код настанка карцинома грлића материце има венерична трансмисија хуманог папилома вируса (енг. *human papillomavirus*, *HPV*) (46, 47). Хумани папилома вируси спадају у групу ДНК вируса и изоловани су код 95% пацијенткиња са дијагностикованим карциномом грлића материце (48). Укупно, преко 66 типова *HPV* вируса је изоловано и многи од њих су значајни за патогенезу гениталних папилома. Онкогени типови *HPV* вируса који имају улогу у настанку карцинома грлића материце су 16, 18, 31, 45, 51, 52 и 53 (48). Хумани папилома вируси кодирају 8 до 10 протеина који имају улогу у регулацији транскрипције и транслације у зараженим ћелијама (49). Протеински продукти *HPV-16* и *HPV-18* вируса, *E6* и *E7* ремете ћелијски циклус домаћина, везивањем и инактивирањем тумор-супресор гена и циклин-зависних киназа (48, 49). Протеин *E7* у својој структури има око 100 аминокиселина, везује и инактивира тумор-супресор ген *RB* и на тај начин омогућава неконтролисано дељење ћелија (50). Продукт *HPV-18* вируса, протеин *E6* у својој структури садржи 150 аминокиселина и има способност да веже и инактивира тумор-супресор ген *p53* (48, 49, 51). Протеини *E6* и *E7* су неопходни и довољни да изазову малигну трансформацију ћелије *in vitro*. Некомпликована *HPV* инфекција доњег гениталног тракта и кондиломатозна атипична грлића материце могу прогредирати у карцином грлића материце.

Симптоми карцинома цервикса код жена су најчешће ненормално или посткоитално тачкасто крварење, које се може развити у обилна крварења између менструација или током њих (54).

Карцином грлића материце *in situ* успешно се лечи конизацијом или абдоминалном хистеректомијом. Код пацијенткиња са локално одмаклом болешћу, хемиотерапија на бази платинских препарата (цисплатина), примењена истовремено са зрачном терапијом,

доводи до дужег преживљавања у поређењу са терапијском процедуром која обухвата само зрачење. Као терапија најчешће се примењује 5-флуороурацил у комбинацији са цисплатином од првог до петог дана зрачне терапије. Овом процедуром се смањује ризик од релапса од 30% до 50% (54).

#### **1.2.4. МАЛИГНИ МЕЛАНОМ**

Меланом представља малигни тумор који настаје из меланоцита, пигментних ћелија коже (55). Број пацијената оболелих од малигног меланома се сваке године повећава више него број пацијената оболелих од било ког другог облика карцинома (55, 56). Највећа стопа обољевања од малигног меланома је у Аустралији и Новом Зеланду, где је забележено 40 до 60 случајева оболелих на 100.000 становника (57). Меланом се може дијагностиковати код особа било које старости, врло често и код тинејџера, што није тако чест случај са другим карциномима. У последњих неколико година стопа преживљавања код пацијената код којих је дијагностикован малигни меланом је повећана, јер су клиничке карактеристике овог тумора јасно дефинисане, тако да се може детектовати и третирати на време, пре него што болест значајно унапредује (57).

Сматра се да је један од главних разлога повећане инциденце малигног меланома последњих година, повећано излагање сунчевом зрачењу посебно у млађем животном добу. Повећан ризик од оболевања од малигног меланома имају особе светле пути чија кожа теже потамни и које лако добијају опекотине приликом сунчања (58). Такође, особе са повећаним бројем „гигантских” конгениталних невуса и атипичних, диспластичних невуса имају повећан ризик да оболе од малигног меланома у односу на особе које немају овакве промене (58, 59). Мањи ризик да оболе од малигног меланома имају тамнопуте популације и оријенталци од особа светле пути (55, 60).

Постоје четири типа меланома коже: акрални лентигозни меланом, лентиго малигни меланом, суперфицијално ширећи меланом и нодуларни меланом (55, 58).

Акрални лентигозни меланом настаје услед малигне трансформације меланоцита који су локализовани у базалном слоју епидермиса коже. Термин „акрални” се односи на локализацију овог типа меланома који захвата најчешће шаке, стопала, прсте и нокте. Овај тип малигног меланома среће се претежно код старијих особа, односно особа које имају преко 60 година, а промене које се јављају на кожи су у виду полицикличких браон флека (58, 61).

Лентиго малигни меланом се јавља на деловима тела који су експонирани сунцу. Овај облик малигног меланома представља површинску преинвазивну форму из које се у каснијој фази може развити инвазивни лентиго малигни меланом. Промене на кожи су у облику тамнобраон флека које могу бити величине неколико милиметара до неколико центиметара (58).

Суперфицијално ширећи меланом је облик који се најчешће јавља код особа са дијагнозом малигног меланома. Туморске ћелије се углавном налазе у граничној (јункционој) зони између епидермиса и дермиса, делимично изнад и испод базалне мембране, али је такође присутна и дифузна инвазија епидермиса. Суперфицијално ширећи меланом је најчешће локализован на дорзуму стопала (62).

Нодуларни меланом за разлику од прва три облика меланома, нема радијалну фазу ширења и представља дубоки инвазивни тумор, са способношћу стварања метастаза. Овај облик меланома не расте хоризонтално већ вертикално што доводи до инвазије дубљих слојева коже (16).

Симптоматологија код појаве малигног меланома је врло дискретна и карактеристична. У око 70% случајева, пацијенти уочавају повећање или промене у боји посматране лезије на кожи. Може се јавити и промена облика лезије и појава нових промена око малигно измењене промене на кожи. Касни знаци који се такође јављају код малигног меланома су крварење, улцерација и бол (63).

Код унапредовалог облика малигног меланома, који није хирушки решив, корист од терапије лековима се мери степеном регресије тумора, односно временом које прође до прогресије болести и трајањем преживљавања без симптома. Системска терапија унапредовалог меланома је испробана са свим агенсима за лечење канцера током последњих 50. година. До недавно, није било забележено значајно продужење живота ни са једним од хемиотерапијских лекова јер су меланоми веома резистентни на хемиотерапеутике који су се до скоро примењивали. Свеобухватна национална мрежа за канцер (енг. *National Comprehensive Cancer Network*) тренутно препоручује ипилумумаб, вемурафениб, дабрафениб и високе дозе интрелеукина-2 (*IL-2*) као прву терапијску опцију код пацијената оболелих од меланома градуса 4 (64). Стога, је потрага за новим агенсима који могу да делују терапијски на ћелије меланома и даље веома актуелна.

### 1.3. Ћелијске линије

Претклинички модели, као што су ћелијске линије, су веома корисни у предвиђању одговора туморског и здравог ткива на тестирану супстанцу. Примена ћелијских линија *in vitro* да би се проучиле варијације у одговору туморских ћелија на лек има велики број предности. Ћелијске линије су обновљив ресурс и кроз доступне јавне базе података имамо увид у особине ћелијских линија. Стога је први корак у испитивању антитуморског потенцијала нових супстанци, тестирање дејства тих супстанци на туморске ћелијске линије *in vitro* (65). Прва туморска ћелијска линија која је пропагирана је била HeLa, изолована из карцинома цервикса пацијенткиње Хенријете Лакс, 1951. године. Након тога је успостављено и пропагирано више стотина туморских ћелијских линија. Неке од туморских ћелијских линија које се користе у испитивању антитуморског потенцијала нових агенаса су A549 ћелије аденокарцинома плућа, MCF7 ћелије карцинома дојке и Hs 294T ћелије меланома (66)

Истраживачи који испитују *in vitro* антитуморску активност неке супстанце често превиђају оно што је пацијентима заиста потребно. Пацијентима су потребни лекови који убијају туморске ћелије, а при терапијским концентрацијама не утичу на здраве ћелије. Стога се, осим туморских ћелијских линија, за испитивање антитуморског потенцијала неке супстанце користе и ћелије здравог ткива као што је MRC-5 ћелијска линија фибробласта. Да би нека супстанца која је кандидат за лек, била укључена у претклиничке *in vivo* студије, потребно је да током претклиничких *in vitro* студија делује селективније од лека који се стандардно примењује у терапији малигнитета. Односно, потребно је да антитуморски агенс делује цитотоксично на туморске ћелије, а да при истим тестираним концентрацијама не делује на здраве ћелије. Тек након тога, за одређену супстанцу можемо да кажемо да поседује антитуморски потенцијал који је вредан даљег истраживања (67).

Поремећаји на нивоу експресије тумор-супресор гена и повишена експресија онкогена доводе до канцерогенезе. Услед промене експресије тумор-супресор гена као и појаве онкогена ремети се нормално функционисање ћелија односно ремете се два битна и уско повезана физиолошка процеса у ћелији. То су процеси програмиране ћелијске смрти и ћелијски циклус (68).

## **1.4. Програмирана ћелијска смрт**

Термин програмирана ћелијска смрт је искључиво коришћена као синоним за процес апоптозе, а сада је познато да програмирана ћелијска смрт подразумева и типове смрти као што су аутофагија и програмирана некроза. Апоптоза, аутофагија и програмирана некроза су контролисани процеси од стране генетски кодираних сигнала или унутрашњих биохемијских процеса у ћелији (69).

### **1.4.1. Типови програмиране ћелијске смрти**

Први аутори који су описали апоптозу или тип 1 програмиране ћелијске смрти су били Кар и сарадници (70). Код типа 1 програмиране ћелијске смрти је уочено да процес карактеришу специфичне морфолошке и биохемијске промене као што су скупљање ћелија, кондензација и фрагментација једра, стварање протрузија на ћелијској мембрани и одвајање апоптотичних ћелија од суседних ћелија и екстрацелуларног матрикса (70, 71). У процесу апоптозе постоје одређене биохемијске карактеристике које обухватају разлагање једарног хроматина на фрагменте, излагање фосфатидилсерина на спољашњу страну ћелијске мембране и протеолизу специфичних ћелијских протеина у унутрашњости ћелије под дејством специфичних протеаза (72, 73).

Карактеристично за аутофагију или тип 2 програмиране ћелијске смрти је формирање аутофагозома који се састоје из двослојне мембране који окружују цитоплазматске макромолекуле и органеле предодређене за рециклирање (74). Током периода недостатка хранљивих материја и одсуства фактора раста, процес аутофагије има кључну улогу у преживљавању ћелија.

Постоји такође тип 3 програмиране ћелијске смрти који се назива програмирана некроза, током које долази до бубрења ћелија, поремећаја функције ћелијских органела и лизе ћелија (74).

### **1.4.2. Апоптоза**

Апоптоза представља облик програмиране ћелијске смрти, у коме кључну улогу имају унутарћелијске каспазе које делујући на своје унутарћелијске супstrate активирају апоптотичне процесе у ћелији. Услед активације процеса апоптозе долази до кондензације цитоплазме и једра, раздвајања хроматина, формирања апоптотичних телашаца при чему је очуван континуитет ћелијске мембране на којој се формирају протрузије. У процесу



апоптозе не долази до запаљенског и имунског одговора (75). Карактеристике ћелије у апоптози се разликују у зависности да ли се ћелија налази у раном или касном стадијуму апоптозе. Уколико се налази у раном стадијуму апоптозе, ћелија ће активирати механизме који могу поправити настала оштећења. Када се ћелија налази у стадијуму касне апоптозе она подлеже смрти због немогућности поправке насталих оштећења (76-78). Ћелија у почетној фази апоптозе губи контакт са околним ћелијама, смањује се и долази до формирања протрузија на ћелијској мембрани (76, 78). Као последица кондензације хроматина настаје пикноза, која представља најкарактеристичнију промену у апоптози. Затим, на ћелијској мембрани долази до формирања протрузија и до цепања једра и раздвајања ћелијских фрагмената чиме се формирају апоптотска телашца. У својој структури апоптотска телашца садрже делове цитоплазме у којој се налазе спаковане органеле са или без делова једра. Комплетна структура органела је очувана и сав садржај је обавијен ћелијском мембраном. Ћелије које фагоцитују апоптотска телашца не продукују инфламаторне цитокине, садржај апоптотских телашца се не ослобађа у спољашњу средину, из тог разлога не долази до инфламаторне реакције (79).

### 1.4.3. Механизам апоптозе

Да би се процес апоптозе у ћелији покренуо, неопходна је активација једног од два основна сигнална пута, или активација сигналног пута рецептора смрти или унутрашњег митохондријалног пута. Познато је да су оба сигнална апоптотска пута у ћелији узајамно повезана преко митохондрија. Приликом активације било спољашњег било унутрашњег сигналног пута апоптозе долази до промене у експресији кључних регулаторних протеина апоптозе као што су *Bcl-2* и *Bax* што последично доводи до промене у пермеабилност митохондријалне мембране, а као крајњи резултат долази до активације каспазе-3 и последичне фрагментације молекула ДНК, деградације цитоскелета и једарних протеина, формирања апоптотских телашца и финално њихове фагоцитозе од стране макрофага (79).

#### 1.4.3.1. Спољашњи пут апоптозе

Активацијом спољашњих трансмембранских ћелијских протеина који припадају суперфамилији протеина рецептора смрти покреће се спољашњи сигнални пут апоптозе. У ове протеине рецепторе смрти спадају, рецептор 1 фактора некрозе тумора (енг. *TNF-R1*, *tumor necrosis factor receptor 1*), *Fas*, *DR3*, *TRAIL-R1/2 (DR4/5)* и *DR6*. Свим члановима суперфамилије рецептора смрти заједничко је да имају интрацитоплазматски део који се назива домен смрти. Након везивања лиганда за рецептор смрти, активирају се домени смрти и привлаче интраћелијске адапторне протеине *FADD* (енг. *FADD*, *Fas associated death domain*). У следећем кораку следи везивање *FADD* за прокаспазу-8. Као крајњи резултат активације рецептора је везивање прокаспазе-8 у *DISC* (енг. *death inducing signaling complex*). У овом комплексу долази до димеризације и активације прокаспазе-8 у иницијаторску каспазу-8. Активирана каспаза-8 доводи до цепања прокаспазе-3 у активну каспазу-3 и активира *Bid*. Протеин *Bid* спада у групу проапоптотских протеина *Bcl-2* фамилије (74).

#### 1.4.3.2. Унутрашњи пут апоптозе

Унутрашњи пут апоптозе може бити покренут дејством различитих унутарћелијских и ванћелијских фактора. Фактори ван ћелије који покрећу унутрашњи пут апоптозе су недостатак хранљивих материја неопходних за физиолошко функциоњање ћелије, физички и хемијски стресни фактори. До активације унутрашњег пута апоптозе могу довести и унутарћелијски фактори као што су оксидативни стрес, оштећење молекула ДНК и оштећење ендоплазматског ретикулума. Сви наведени фактори изазивају

промене у пермеабилности митохондријалне мембране, услед чега долази до отварања пора у спољашњој мембрани митохондрија, губитка митохондријалног трансмембранског потенцијала и касније до транслокације апоптотичних протеина из митохондријалног међумембранског простора у цитоплазму укључујући цитохром *c* и *APAF-1* и последично да формирања апоптозома, активације каспазе-3 и индукције апоптозе (79, 80).

Кључни регулаторни протеини унутрашњег пута апоптозе су протеини *Bcl-2* фамилије (81). Улога ових протеина је управљање пермеабилацијом митохондријалне мембране, односно регулација изласка апоптогенних молекула из митохондрија, на пример цитохрома *c*. Фамилија *Bcl-2* протеина је класификована у три групе: антиапоптотични протеини (*Bcl-2*, *Bcl-xL*, *Bcl-w*, *Mcl-1*, *A1* итд.), проапоптотични протеини са неколико *Bcl-2* хомологих (*BH*) домена означених *BH1-4* (*Bax*, *Bak* итд.) и протеини који садрже само *BH3* домене (*Bad*, *Bid*, *Bim*, *Puma*, *Noxa* итд.) (81, 82).

Чланови *Bcl-2* фамилије протеина захваљујући постојању *BH* домена могу међусобно да формирају хомодимере и хетеродимере, чиме настају њихове конформационе промене које су одговорне за активност ових протеина. Антиапоптотични протеини имају улогу у секвестрацији и инхибицији проапоптотичних протеина као што су *Bax* и *Bak*. Секвестрацију *Bax*-а могу извршити сви антиапоптотични протеини, а једино *Bcl-xL* и *Mcl-1* могу да се вежу за *Bak* (82).

Начин на који протеини *Bcl-2* фамилије регулишу апоптозу још увек није потпуно јасан. Једна од теорија је да се *Bax* и *Bak* налазе у неактивном стању, због директних интеракција са *Bcl-2* антиапоптотичним протеинима. Активацијом проапоптотичних протеина који садрже само *BH3* домене, долази до њиховог везивања за антиапоптотичне протеине, а као последица тога долази до одвајања *Bax* и *Bak* од њихових антиапоптотичних лиганата (74, 82). Протеини који садрже само *BH3* домене селективно се везују за антиапоптотичне протеине, на пример *Noxa* се везује само за *Mcl-1* и *A1*, *Bad* се везује само за *Bcl-2*, *Bcl-w* и *Bcl-xL*, док *Bim* и *Puma* се могу везати за све наведене антиапоптотичне протеине (81, 83). Овај податак нам указује да је неопходна активација већег броја проапоптотичних протеина који садрже само *BH3* домене да би се одвијао процес апоптозе. Да би се процес апоптозе активирао неопходно је повећање експресије и протеина *Bad* и протеина *Noxa* како би дошло до ослобађања *Bak*-а од *Bcl-xL* и *Mcl-1* и његове активације. Када би дошло до повећане експресије само једног протеина, или

протеина *Bad* или протеина *Noxa*, не би дошло до довољно снажне активације *Bak*-а да индукује процес апоптозе, већ би за активацију апоптозе био потребан додатни други апоптотични сигнал. Насупрот томе, одређени протеини који у својој структури садрже само *BH3* домене могу да интерагују са проапоптотичним протеинима инхибирајући њихову интеракцију са антиапоптотичним протеинима и на тај начин да индукују апоптозу везивањем директно за протеине *Bax* и *Bak* (84).

Приликом активације процеса апоптозе долази до активације *Bax* протеина тј. ослобађања његовог амино краја од антиапоптотичних протеина *Bcl-2*, транслокације из цитоплазме у спољашњу мембрану митохондрија и олигомеризације у активни *Bax*. Олигомерни облик активног *Bax*-а проузрокује стварање пора у спољашњој митохондријалној мембрани, при чему долази до повећања њене пермеабилности и ослобађања цитохрома *c* из међумембранског простора митохондрија у цитоплазму. Цитохром *c* је хемопротеин који је везан за кардиолипине митохондријалне мембране и на тај начин је повезан са спољашњом страном унутрашње митохондријалне мембранане. За разлику од осталих цитохрома, цитохром *c* је хидросолубилан због изразито позитивног наелектрисања. Због присуства хем групе и хидросолубилности, цитохром *c* има физиолошку улогу у процесу оксидативне фосфорилације и током овог процеса цитохром *c* преноси по један електрон између комплекса III и комплекса IV респираторног ланца. У процесу апоптозе, долази до повећане продукције реактивних кисеоничних врста у митохондријама, што за последицу има оксидацију кардиолипина и одвајање цитохрома *c* од унутрашње митохондријалне мембране. На тај начин, цитохром *c* може напустити митохондријални међумембрански простор кроз формиране *Bax/Bak* поре у спољашњој мембрани митохондрија и ући у цитоплазму (85). У цитоплазми цитохром *c* интерагује са молекулом *Apaf-1*, при чему долази до активације неактивне прокаспазе-9 у активну каспазу-9. Затим, активирана каспаза-9 активира прокаспазу-3 у каспазу-3, последично активирајући нисходну каскаду каспаза које доводе до апоптозе (86).

### 1.4.3.3. КАСПАЗЕ

Кључну улогу у процесу апоптозе има група цистеин зависних специфичних протеаза за аспартат које се називају каспазе (енг. *cysteine-aspartic proteases* или енг. *cysteine-dependent aspartate-directed proteases*). Каспазе представљају ендопопептидазе које врше хидролизу пептидних веза које формирају резидеу аспарагинске киселине супстрата (87). Каспазе имају улогу у стварању активних сигналних молекула који учествују у процесима као што су апоптоза и инфламација.

Каспазе су класификоване на каспазе које учествују у процесу апоптозе (каспаза-2, -3, -6, -7, -8, -9 и -10) и на каспазе које учествују у процесу инфламације (каспаза-1, -4, -5, -11 и -12). Каспазе које учествују у процесу апоптозе су класификоване према функцији на каспазе које иницирају апоптозу (каспаза-8 и -9) и на каспазе које спроводе процес апоптозе или ефекторне каспазе (каспаза-3, -6 и -7) (88).

Примарно, каспазе се синтетишу као неактивни мономерни молекули који се називају прокаспазе. У циљу активације прокаспаза, неопходна је њихова димеризација и ограничена протеолиза. Формирање активних димера каспаза, односно спајање прокаспаза је олакшано адаптерним протеинима, који имају могућност да се вежу за специфична места која се налазе у продоменима прокаспаза. Тачан механизам спајања прокаспаза у активне димере се разликује и зависи од протеина који су укључени у овај процес. У процесу апоптозе контролисано је „разлагање“ унутарћелијских компонената, и том приликом не долази до инфламације и оштећења околних ћелија. Иницијаторске каспазе имају улогу у активацији каспаза које спроводе процес апоптозе, а њиховом даљом активношћу се разграђују структурни протеини у ћелији и активирају други ензими који даље спроводе апоптозу. Иницијаторске каспазе, каспаза-8 и каспаза-9, се физиолошки налазе у ћелији у облику неактивних мономера као прокаспаза-8 и прокаспаза-9. Ове каспазе се активирају димеризацијом, а не ограниченом протеолизом (89).

Егзекуторне, односно извршилачке каспазе се синтетишу у неактивном облику, такође у облику прокаспаза (90). Неопходно је да иницијаторске каспазе поделе егзекуторне каспазе на малу и велику субјединицу како дошло до активације извршилачких каспаза. Сама подела егзекуторских каспаза на малу и велику подјединицу омогућава њихову конформациону промену и стварање функционалних протеаза (87).

## 1.5. Ћелијски циклус

Ћелијски циклус обухвата низ комплексних биолошких, генетски програмираних процеса кроз које једна ћелија пролази док се не подели на две нове „ћерке“ ћелије. У еукариотској ћелији, ћелијски циклус је подељен на четири фазе: *G1* (енг. *Gap phase 1*), *S* (енг. *Synthesis*), *G2* (енг. *Gap phase 2*) и *M* (енг. *Mitosis*). Између две деобе постоји период који се назива интерфаза и обухвата *G1*, *S* и *G2* фазу. Након деобе већина ћелија прави „паузу“ током *G1* фазе и ова фаза се тада назива *G0* фаза или фаза мировања. У *G0* фази ћелија може остати и функционисати месецима, данима или годинама. Ипак, ћелије након уласка у *G0* фазу могу у њој остати трајно или привремено. Лимфоцити се налазе у *G0* фази све док на њих не почну да делују цитокини, специфични антигени, односно фактори који стимулишу пролиферацију лимфоцита. За разлику од лимфоцита неутрофили трајно остају у *G0* фази (91).

Ћелијски циклус представља строго контролисан физиолошки процес, а главну улогу у контроли имају контролне тачке (енг. "*checkpoints*") као и координирана активност циклина, циклин зависних киназа и инхибитора циклин зависних киназа. Циклини представљају групу протеина који имају сличну структуру и који се синтетишу циклично током различитих фаза ћелијског циклуса. Циклин зависне киназе (енг. *cyclin dependent kinases*, *Cdks*) су чланови фамилије серин-треонин киназа и учествују у контроли ћелијског циклуса. Постоји преко 20 група циклин зависних киназа, а њихова улога се огледа у фосфорилацији сопствених супстрата и на тај начин регулацији кључних фаза у ћелијском циклусу, односно ћелијској деоби. Киназна активност *Cdks* је регулисана инхибиторима циклин зависних киназа (енг. *cyclin dependent kinase inhibitors*, *CDIs*), а сврха инхибиције *Cdks* је у спречавању прогресије ћелијског циклуса у неповољним условима. На основу структурне сличности инхибитори циклин зависних киназа су подељени у две класе: *Ink4* фамилија којој припадају *p16<sup>INK4a</sup>* (*Cdkn2a*), *p15<sup>INK4b</sup>* (*Cdkn2b*), *p18<sup>INK4c</sup>* (*Cdkn2c*) и *p19<sup>INK4d</sup>* (*Cdkn2d*), и фамилија *CIP/Kip* којој припадају *p21<sup>Cip1</sup>* (*Cdkn1a*), *p27<sup>Kip1</sup>* (*Cdkn1b*) и *p57<sup>Kip2</sup>* (*Cdkn1c*) (91, 92).

Да би ћелијски циклус отпочео неопходно је везивање фактора раста за своје рецепторе. Фактори раста се могу везивати за трансмембранске рецепторе, а сигнал се преноси на протеине локализоване у цитоплазми, а то узрокује ослобађање транскрипционих фактора унутар једра и покретање ћелијског циклуса (92).

### 1.5.1. G1/S ФАЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА

У *G1* фази ћелијског циклуса ћелија се „увећава“ односно повећава се маса ћелије. Ова фаза ћелијског циклуса временски траје најдуже, на пример код ћелија које се интензивно деле ова фаза траје и неколико сати. У *G1* фази ћелија није доступна за деловање сигнала из спољашње средине. У *G1* фази ћелијског циклуса дешава се интензивна синтеза протеина који ће имати градивну улогу у ћелији, као и ензима и рецептора. Након везивања фактора раста и започињања ћелијског циклуса, прво долази до синтезе циклина *D*, а како *G1* фаза одмиче тако расте и количина овог циклина, да би свој максимум достигао на крају *G1* фазе (93, 94). Циклин *D* обухвата три типа циклина, циклин *D1*, циклин *D2* и циклин *D3* који граде комплексе са *Cdk4* и *Cdk6*, који даље узрокују фосфорилацију протеина ретинобластома (*pRb*) (95, 96). У нефосфорилисаном стању, *pRb* везује и инхибира *E2F-1*, транскрипциони фактор. Циљни гени *E2F-1*, транскрипционог фактора су регулатори ћелијског циклуса, циклин *A* и циклин *E*, као и ензими неопходни за репликацију ДНК (97, 98).

Фосфорилацијом долази до конформационих промена у структури протеина *pRb* и последичног ослобађања *E2F-1* транскрипционог фактора. Након синтезе циклина *E* долази до додатне фосфорилације *pRb* и ово представља рестрикциону тачку да ли ће ћелија прећи у *S* фазу ћелијског циклуса (99). У *S* фази ћелијског циклуса долази до репликације ДНК молекула, тако да диплоидна ( $2n$ ) ћелија постаје тетраплоидна ( $4n$ ) ћелија (99, 100).

Када нису испуњени услови за деобу ћелије доћи ће до заустављања циклуса, као и активације контролних механизма (*G1 checkpoint*) (100). Физички, хемијски агенси или оксидативни стрес током *G1* фазе могу довести до оштећења молекула ДНК (101).

Током *G1* фазе ћелијског циклуса уколико дође до оштећења ДНК повећаће се активност транскрипционог фактора *p53* (102). Активацијом транскрипционог фактора *p53*, долази до повећане синтезе *p21* који инхибира комплексе циклина и циклин зависних киназа формираних током *G1* фазе ћелијског циклуса, и на тај начин долази до застоја у овој фази ћелијског циклуса. Такође *p21* учествује у процесима репарације када је молекул ДНК оштећен (103). Уколико је оштећење ћелије неповратно, транскрипциони фактор *p53* ће повећати експресију гена, који ће индуковати процес апоптозе (104).

### 1.5.2. G2/M ФАЗА ЋЕЛИЈСКОГ ЦИКЛУСА

Број хромозома у *G2* фази је дуплиран, такође у овој фази ћелијског циклуса долази до дуплирања осталих компоненти ћелија како би настале две ћерке ћелије. Током *G2* фазе активан је комплекс циклина *A* и *Cdk2*, као и комплекс циклина *B* и *Cdk1* и ови комплекси узрокују кондензацију хромозома и „распад“ једарне мембране па су значајни за надвладавање друге рестрикционе тачке и улазак у *M* фазу (105). Повећање степена активности комплекса циклина и одговарајуће *Cdk* узрокује формирање деобног вретена у ћелији као и причвршћивање центромера за нити деобног вретена. Ензимски комплекс *APC* (енг. *Anaphase-promoting complex*), узрокује раздвајање хроматида и поделу ћелије, затим долази до разградње циклина, што за последицу има дефосфорилацију циљних протеина и тиме се процес митозе завршава (106).

Заустављање циклуса у *G2* фази настаје као последица дефекта у хромозомима, приликом чега се активира *G2* контролна тачка и као последица долази до супресије активности циклин *B/Cdk1*. Показано је да у *G2* фази приликом оштећења хромозома *p53* активира транскрипцију *p21*, чиме се зауставља ћелијски циклус у овој фази и зауставља се синтеза циклина *B* и *Cdk1* (107).

Приликом оштећења молекула ДНК, ћелија се зауставља у било којој фази ћелијског циклуса, да би могла да се исправе оштећења на молекулу ДНК активирањем контролних механизма и тиме заврши ћелијски циклус или ћелија може да активира апоптотске механизме што последично води до смрти ћелије. Који ће од ова два пута ћелија одабрати, зависиће искључиво од степена оштећења на молекулу ДНК (68). Уколико су оштећења на молекулу ДНК значајнија и обимнија, ћелија ће неминовно ући у процес апоптозе (68, 108).

Код туморских ћелија, механизам који руководи ћелијским циклусом представља алтернативну „мету“ за циљану антитуморску терапију и туморску дијагностику. Прецизнија анализа иницијације репликације молекула ДНК и синтезе протеина који су укључени у процес митозе води ка идентификацији нових биомаркера за детекцију и прогнозу малигнитета. Такође, боље разумевање функције молекула који су битни за физиолошко функционисање ћелијског циклуса или оних молекула који су структурно или функционално промењени код малигнућ ћелија ствара могућности за нове терапијске опције и лекове чији је механизам деловања усмерен ка ћелијском циклусу (108).



## 1.6. Лекови у хемиотерапији малигнитета

Антиканцерогене лекове можемо поделити у неколико категорија зависно од механизма деловања:

1. Антиметаболити; њихов механизам деловања се заснива на блокади метаболичких путева који су укључени у синтези молекула ДНК (метотрексат, флуороацил).
2. Цитотоксични антибиотици; они представљају супстанце пореклом из микроорганизама и спречавају деобу ћелија (идарубицин, епирубицин, митокстантрон).
3. Хормони; у овој групи су најважнији стероиди односно гликокортикоиди, естрогени и андрогени и
4. Алкилирајући агенси и сличне супстанце; у ову групу лекова спадају комплекси који у својој структури садрже платину, као што је цисплатина.

Антиметаболити свој механизам деловања заснивају на конкуренцији са физиолошким молекулима који учествују у синтези молекула ДНК и РНК, односно то су структурни аналози. Антиметаболити или замењују физиолошке молекуле или се такмиче са њима око активних места на ензимима. Стога је њихова највећа активност у *S*-фази ћелијског циклуса, тј. практично не утичу на вијабилност туморских ћелија које се налазе у фази мировања. У антиметаболите спадају пурински аналози (меркаптопурин, флударабин), аналози фолата (метотрексат), аналози урее (хидроксиуреа) и аналози пиримидина (цитарабин, 5-флуороурацил) (109).

Цитотоксични антибиотици као заједничку особину имају способност да прекину деобу ћелија (110). Најзначајније подгрупе ових лекова су антрациклини (доксорубицин и даунорубицин) и блеомицин. Механизам дејства антитуморских антибиотика се заснива на интерпонирању, односно интеркалирању, ових лекова између две суседне азотне базе у молекулу ДНК. Цитотоксични антибиотици нарочито имају способност да се интеркалирају између цитозина и гуанина, односно између тимина и гуанина, што онемогућава даљу репликацију. Поред тога, доказано је да цитотоксични антибиотици могу да инхибирају ензиме ДНК топоизомеразу I и II (109).

Хормонска терапија се користи углавном у терапији карцинома дојке и простате. Код ова два типа канцера, малигне ћелије су осетљиве на високу концентрацију хормона у

крви, тј. да би даље расли, ови тумори захтевају присуство високе концентрације полних хормона у крви (111, 112). Око 2/3 свих малигнитета дојке су изграђени од ћелија које поседују хормонске рецепторе. Ти рецептори могу бити естрогенски и/или прогестеронски. Стога је код малигнитета дојке висока концентрација естрогена потребна за раст малигнућ ћелија и даље ширење тумора (111). С друге стране, код карцинома простате се примењује терапија којом се врши супресија лучења мушких полних хормона, односно андрогена, чиме се смањује стимулација ћелија карцинома простате за даљи раст (112).

Алкилирајући агенси поседују алкил-радикале који се лако везују за атоме азота у пуринским и пиримидинским азотним базама молекула ДНК и РНК. Ови антитуморски агенси се најчешће везују за азот у положају 7 пуринских азотних база. Стога, током репликације молекула ДНК долази до погрешног спаривања азотних база или немогућности за спаривање азотних база у новим молекулима ДНК и последично смрти ћелије. Алкилирајући агенси делују у свим фазама ћелијског циклуса малигнућ ћелија, па се могу користити и у терапији брзорастућих тумора који најчешће припадају хематолошким малигнитетима, и у терапији тумора који садрже велики проценат ћелија у фази мировања као што су солидни тумори (113). У групу алкилирајућих агенаса спадају пливаци (циклофосфамид, хлорамбуцил), препарати нитрозоуреае и препарати платине и слична једињења (цисплатина, карбоплатина, прокарбазин, дакарбазин) (109).

Поред препарата платине, последњих година се све више испитују антитуморске терапијске могућности других метала попут злата, паладијума, бакра и рутенијума.

## **1.7. Комплекси метала у медицини**

Метали су своју примену у медицини имали чак неколико стотина година п.н.е. Током овог периода, древни Асирци, Египћани и Кинези су користили метале у лечењу разних тегоба. Цинк се апликовао локално са циљем да дође до бржег зарастања рана, а као антибактеријско средство коришћено је сребро. Традиционални кинески лекари су арсен-триоксид користили као антисептик у лечењу реуматоидних обољења, сифилиса и псоријазе. Третман овим металима је тада више био заснован на искуствима и народном веровању него на рационалном коришћењу ових метала (114).

Данас је познато да комплекси метала поседују антибактеријско, антитуморско и антифунгицидно дејство, па се користе у модерној медицини у третману инфекција и карцинома (115).

Револуција у терапији лековима који садрже метале тј. металне јоне почиње шездесетих година двадесетог века открићем цисплатине. Цисплатину је први синтетисао Мишел Пероне 1844. године, а хемијску структуру цисплатине је први објаснио Алфред Венер 1883. године. Биофизичар Барнет Розенберг са Државног Универзитета у Мичигену је први открио да цисплатина поседује и антитуморска својства (116). Цисплатина је данас најупотребљивији хемиотерапеутик који се користи у лечењу различитих типова малигнитета попут неоплазми плућа, дојке, цервикса, тестиса, мокраћне бешике, мозга и у терапији меланома (117-120).

Да би тешки метали ушли у клиничку примену, био је потребан дуг временски период, јер поједини метали у организму немају биолошку функцију. Посебно је интересно да цисплатина као један од најчешће коришћених лекова у терапији различитих типова карцинома у својој структури садржи платину која у нашем организму нема биолошку улогу.

## **1.8. Комплекси метала у терапији канцера**

Терапијски потенцијал комплекса метала је привукао велико интересовање због тога што метали показују јединствене карактеристике као што је редокс активност и реактивност према одређеним органским супстратима. Ове особине метала омогућиле су синтезу великог броја комплекса који у својој структури садрже метале, и могу се везати за одређене биомолекуле и на тај начин ометати механизме ћелијске пролиферације (114, 121).

Цисплатина, карбоплатина и оксалплатина је одобрена од стране Америчке Администрације за храну и лекове (енг. *Food and Drug Administration, FDA*), а у поједним земљама се користи и хептаплатина (Јужна Кореја), недаплатина (Јапан) и лобоплатина (Кина) (122).

Осим комплекса који у својој структури садрже метал платину, од потенцијалних хемиотерапеутика, комплекси који у својој структури садрже рутенијум *NAMI-A* и *KP1019* су ушли у први фазу клиничког истраживања (123).

## 1.9. Комплекси платине и цисплатина

Иако је неколико хиљада комплекса платине синтетисано, само су цисплатина, карбоплатина и оксалплатина ушли у клиничку употребу (124). Цисплатина и карбоплатина се користе у терапији истих типова карцинома, али се карбоплатина користи у већим терапијским дозама због мање цитотоксичности у односу на цисплатину. Приликом терапије карцинома оксалплатина показује мање нежељених ефеката од цисплатине и веома често се користи у лечењу колоректалног карцинома (125).

Цисплатина је хидросолубилни комплекс који у својој структури у центру садржи атом платине који је окружен са два атома хлора и две амонијум групе (125, 126). Цисплатина се примењује спором интравенском инјекцијом или инфузијом. Када се нађе у циркулацији цисплатина се везује за протеине плазме као што су трансферин и албумини (127). Сматра се да је сам улазак цисплатине у ћелију омогућен пасивном дифузијом или посредством транспортних протеина на ћелијској мембрани (124). Велики број ћелијских компоненти као што су цитоскелетни микрофиламнети, молекули РНК и пептиди који садрже тиол групе као што је глутатион, могу инактивирати цисплатину и као резултат ових интеракција ћелија може постати резистентна на терапију цисплатином. Након уласка у ћелију, хлор дисоцира од цисплатине остављајући реактиван комплекс који у присуству воде везује молекуле ДНК. Цисплатина се везује за азот у положају 7 молекула пуринских азотних база, пре свих гуанина. Такође, у мањој мери се цисплатина може везати за аденин и при томе се формира ковалентно координативна веза између платине и слободног електронског пара са азотовог атома у положају 7 пуринског прстена. Везивање цисплатине за молекуле ДНК доводи до последичне дисторзије молекула ДНК, чиме се онемогућава репликација и транскрипција. Ћелија са тако измењеним молекулом ДНК поседује значајно измењен и оштећен генетски материјал услед чега се ћелија уводи у процес апоптозе (128).

Иако се широко примењује у лечењу малигнитета, терапијску примену цисплатине ограничава велики број нежељених дејстава. Најизраженији нежељени ефекат цисплатине представља нефротоксичност, па се често дешава да пацијент коме се цисплатина апликује развије акутну бубрежну инсуфицијенцију (128). Стога се пацијентима који примају цисплатину често одређује клиренс креатинина. Адекватна хидратација и одржавање диурезе се користе да би се превенирао настанак оштећења бубрежне функције.

Патогенеза акутне бубрежне инсуфицијенције чији је узрок цисплатина укључује 4 главна механизма:

1. оштећење проксималних тубула,
2. оксидативни стрес,
3. инфламацију и
4. васкуларна оштећења бубрега (129).

Неуротоксичност је друго озбиљно нежељено дејство цисплатине које се може предвидети спровођењем тестова спроводљивости нерава (118, 119). Честа неуролошка нежељена дејства која се јављају одмах након започињања третмана цисплатином су поремећаји вида и слуха (119).

Мука, гађење и повраћање као симптоми од стране дигестивног тракта, се често јављају као нежељена дејства у терапији цисплатином. Цисплатина је један од хемотерапеутика који имају најснажније еметогено дејство (118). Ипак, профилактичком применом антиеметика (ондансетрон, гранисетрон) је могуће неутралисати или бар ублажити мучнину и повраћање узроковане применом цисплатине (119).

Услед ототоксичности цисплатине, може доћи до губитка слуха због континуиране примене овог лека. Након дуже терапије цисплатином, због њеног неселективног деловања долази и до оштећења ћелија костне сржи, првенствено прекурсора еритропоезе, што резултује хемолитичком анемијом (118, 119).

Још једна група нежељених дејстава због администрације цисплатине је појава хипомагнезијемije и хипокалцемије. Хипомагнезијемija се јавља код више од половине пацијената који користе цисплатину, а као последицу има поремећаје у функционисању ЦНС-а, срца и скелетних мишића (119).

Други тип нежељених ефеката цисплатине је развој ћелијске резистенције на дејство овог лека. Прецизан механизам развоја резистенције није познат, али се претпоставља да више фактора утиче на развој резистентности ћелије на цисплатину. Смањена апсорпција лека у туморским ћелијама и инактивација цисплатине биомолекулима који поседују тиолне групе повећавају резистенцију малигне ћелије на лек (130).

Упркос успеху у лечењу различитих врста тумора, клиничка ефикасност цисплатине је веома ограничена развијањем резистенције тумора на лек и појавом

изражених нежељених ефеката. Из тог разлога постоји потреба за проналажењем нових једињења која садрже метале и која су мање токсична и боље се подносе *in vivo*. Нове генерације хемотерапеутика који садрже метале, пружају могућност за савладавање резистенције канцера на цисплатину. Поред тога што могу деловати на молекулу ДНК, комплекси метала утичу и на *redox*-баланс у туморским ћелијама што може бити јако ефикасна стратегија у борби против малигнитета. Неки од таквих комплекса су комплекси иридијума(III), осмијума(II) и рутенијума(II) (131).

### 1.10. Комплекси рутенијума

Комплекси рутенијума су познати кандидати за терапију неоплазми иако имају веома мало заједничких особина са већ постојећим комплексима који у својој структури садрже платину (119). Антитуморски ефекат комплекса рутенијума је установљен пре више од две деценије, али је интерес за даља истраживања ових комплекса опадао из разлога што немају исти начин деловања као цисплатина. У физиолошким условима рутенијум је стабилан у оксидационим стањима *Ru(II)*, *Ru(III)* и *Ru(IV)* (132).

Комплекси рутенијума имају способност да имитирају начин везивања гвожђа на сличан начин као и биомолекули као што су хумани серум албумин и трансферин. Будући да туморске ћелије на својим мембранама повећано експримирају трансферинске рецепторе због повећане потребе малигних ћелија за гвожђем, допремање комплекса рутенијума до канцерских ћелија је ефикасније у односу на једињења платине (133). Након везивања за трансферински рецептор на ћелијским мембранама, инертни комплекс *Ru(III)* у туморским ћелијама може да се активира, односно редукује у реактивнији *Ru(II)* комплекс. Заправо, сам редокс потенцијал комплекса рутенијума омогућава ефикаснију антитуморску терапију. Глутатион, аскорбат и протеини имају могућност да редукују, док молекулски кисеоник и цитохроми оксидују *Ru(II)*. У малигним ћелијама се налази мања концентрација кисеоника и повећана концентрација глутатиона, што за последицу има редукцију *Ru(III)* комплекса у реактивнији *Ru(II)* комплекс (134). Такође, показано је да од хемијске структуре комплекса рутенијума тј. од природе лиганда који је координативно везан за јон рутенијума зависи начин везивања комплекса за протеине, липофилност односно могућност уласка комплекса у ћелију, хидросолубилност односно начин транспорта до ћелија, као и сам начин везивања за ДНК молекулу (123).

Први комплекс рутенијума чија су антитуморска дејства испитивана био је структурни аналог цисплатине, хлоро-амино комплекс  $Ru(III)$ . Резултате о антитуморској активности комплекса  $fac[RuCl_3(NH_3)_3]$  први је објавио Кларк са својим сарадницима (135).

Због свог доказаног антитуморског ефекта  $Ru(II)$ , истраживања су се фокусирали на синтезу антиканцерогених „half sandwich“  $Ru(II)$  структура. У овој структури рутенијум је везан координативним везама за позиције X, Y и Z. На позицијама X, Y и Z могу се везати различити лиганди што за последицу има и промену степена активности овог комплекса (136).

Међу првим синтетисаним  $Ru(II)$  комплексима био је комплекс  $[Ru(\eta^6-C_6H_6)(DMSO)Cl_2]$ , а истраживање је показало да овај комплекс  $Ru(II)$  инхибира активност топоизомеразе II која је значајна током процеса ћелијске репликације (133). Заменом  $DMSO$  лиганда са 1,3,5-триаза-7-фосфаадамтан ( $PTA$ ) лигандом добијени су  $RAPTA-C$  комплекси. Присуство  $PTA$  лиганда у комплексу рутенијума је обезбедило бољу растворљивост комплекса у води и антиметастатско дејство комплекса (123).

Синтезом два нова комплекса рутенијума(III), која су означена као  $ICR$  и  $KP1019$  односно  $[ImH]trans-[RuCl_4(Im)_2]$  и  $[IndH]trans-[RuCl_4(Ind)_2]$ , направљен је крупан корак у даљем истраживању антитуморског ефекта комплекса који садрже метале. Наиме, ови комплекси рутенијума су испољили снажан цитотоксични ефекат према различитим типовима тумора, а посебну активност су показали према туморима који су резистентни на цитотоксични ефекат цисплатине. Комплекс  $KP1019$  је тренутно у другој фази клиничког испитивања а досадашњи резултати указују да комплекс  $KP1019$  испољава значајну антитуморску активност нарочито према колоректалним карциномима (137).

Осим комплекса рутенијума који имају карактеристичну „half sandwich“  $Ru(II)$  структуру, проучавани су и комплекси рутенијума са полипиридинским лигандима. Полипиридински лиганди нису „лако одлазеће групе“, односно хемијске групе које је могуће лако „истиснути“ из комплекса. Из тог разлога се полипиридински комплекси рутенијума везују за молекуле ДНК, чиме заустављају процес репликације. Полипиридински комплекси рутенијума су испољили снажан цитотоксични ефекат на шири спектар туморских ћелијских линија у односу на једињења платине (131, 138).

Последњих година, полипиридински комплекси рутенијума(II) буде велико интересовање научника због могућности да се користе као алтернатива класичној

хемиотерапији цисплатином. Показано је да полипиридилски комплекси рутенијума(II), могу да интеркалирају са молекулом ДНК, али и да, попут цисплатине, делују као алкилирајући агенси. Неки од комплекса рутенијума(II) имају снажно антитуморско дејство *in vitro*. На пример, комплекси комплекс 78 и комплекс 79 смањују вијабилност туморских ћелија на 50% при врло ниским микромоларним концентрацијама. Резултати *MTT* теста су показали да ови комплекси делују цитотоксично на ћелије аденокарцинома плућа *A549* и ћелије карцинома колоне *HCT116*. Други полипиридилски комплекси рутенијума(II) 83-85 делују цитотоксично на *HeLa* ћелије карцинома цервикса и ћелије аденокарцинома плућа *A549*. Комплекс рутенијума(II) 86 је показао снажну антипролиферативну активност на *MCF-7* ћелије карцинома дојке и *HT-29* ћелије карцинома колоне. Такође, комплекси 90-93 су деловали цитотоксично на ћелије хепатоцелуларног карцинома *BEL-7402*, при чему су комплекси 90-92 изазвали застој у *G0/G1* фази ћелијског циклуса, а комплекс 93 у *G2/M* фази ћелијског циклуса. Поред тога, комплекси 90-93 су индуковали апоптозу *BEL-7402* ћелија митохондријалним сигналним путем делујући на протеине из *Bcl-2* фамилије протеина апоптозе (139).

Комплекси рутенијума(II) се разликују по концентрацији потребној да смање вијабилност туморских ћелија на 50%. Разлике у јачини антитуморске активности комплекса рутенијума потичу од њихове липофилности. Што је неки комплекс липофилнији, то ће његова антитуморска активност *in vitro* бити снажнија, али ће истовремено комплекс бити мање селективан, односно снажније ће смањивати вијабилност и туморских и здравих ћелија (139). Стога се континуирано синтетишу нови комплекси рутенијума(II) и испитују њихова антитуморска својства, да би се дошло до најидеалнијег кандидата за антитуморску терапију.



## 2. Циљеви и хипотезе студије

А. Основни циљеви овог истраживања су:

1. Испитивање потенцијалне цитотоксичности комплекса рутенијума:
  - а)  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(o\text{-pda})\text{Cl}]\text{Cl}$  (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, o-pda = o-fenilendiamin) (у даљем тексту: комплекс *Ru-1*)
  - б)  $[\text{Ru}(\text{Cl-Ph-tpy})(\text{phen})\text{Cl}]\text{Cl}$  (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, phen = 1,10-fenantrolin) (у даљем тексту: комплекс *Ru-2*) на следећим ћелијским линијама:
    - 1) *A549* – карцином плућа,
    - 2) *MCF7* – карцином дојке,
    - 3) *HeLa* – карцином цервикса,
    - 4) *Hs 294T* – малигни меланом,
    - 5) *MRC-5* – фибробласти (контрола).
2. Одредити релативни однос некротичне и апоптотске смрти туморских ћелија изазване испитиваним супстанцама.
3. Утврдити утицај испитиваних супстанци на релативни однос проапоптотичног *Bax* и антиапоптотичног *Bcl-2* протеина.
4. Одредити ефекат испитиваних супстанци на локализацију цитохрома *c* и активацију *Bax-a* и каспазе-3.
5. Утврдити да ли испитивани комплекси рутенијума заустављају раст туморских ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса

Б. Сходно досадашњим сазнањима и постављеним циљевима, радне хипотезе студије су следеће:

1. Комплекс *Ru-1* и комплекс *Ru-2* делују цитотоксично на туморске ћелије, а не делују цитотоксично на здраве фибробласте.
2. Наведене супстанце индукују апоптозу туморских ћелија, повећавајући релативни однос *Bax/Bcl-2*, што доводи до транслокације цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму и активације *Bax-a* и каспазе-3.

## 3. Материјал и методе

### 3.1. Врста студије

Студија је дизајнирана као експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*. У истраживању су коришћене четири хумане туморске ћелијске линије: ћелијска линија епителног аденокарцинома плућа *A549* (ATCC<sup>®</sup> CCL-185<sup>™</sup>), епителног аденокарцинома дојке *MCF7* (ATCC<sup>®</sup> HTB-22<sup>™</sup>), аденокарцинома цервикса *HeLa* (ATCC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>), меланома *Hs 294T* (ATCC<sup>®</sup> HTB-140<sup>™</sup>) и здрава ћелијска линија хуманих фибробласта *MRC-5* (ATCC<sup>®</sup> CCL-171<sup>™</sup>) на којима су испитивани антитуморски ефекти комплекса рутенијума.

### 3.2. Култивација ћелија

Истраживање је обухватило четири туморске ћелијске чиније: *A549* (карцином плућа), *MCF7* (карцином дојке), *HeLa* (карцином цервикса), *Hs 294T* (малигни меланом) и контролну ћелијску линију *MRC-5* (фибробласти). Ћелијске линије су култивисане на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> у комплетном медијуму за раст ћелија кога чине: *DMEM* са високом концентрацијом глукозе од 4500 mg/L (енг. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium – High Glucose, Sigma, Germany*) коме је додато 2mM глутамин, 100 IU пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина и 10% топлотом инактивисаног феталног телећег серума (енг. *FBS, fetal bovine serum, Capricorn Scientific, Germany*). Медијум је стерилисан филтрирањем кроз нитроцелулозне филтере са порама које су дијаметра 0,22 µm и чуван је на температури од 4°C до извођења експеримента.

### 3.3. Варијабле истраживања

Примењени новосинтетисани комплекси рутенијума *Ru-1* [Ru(Cl-Ph-tpy)(*o*-pda)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, *o*-pda = *o*-fenilendiamin) и комплекса *Ru-2* [Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, phen = 1,10-fenantrolin) представљаће независне варијабле студије (узрок), а вредности мерених параметара вијабилности и апоптозе ћелија представљаће зависне варијабле (исход).

У експериментима смо користили различите концентрације комплекса рутенијума растворене у диметил-сулfoxиду (енг. *DMSO, dimethyl sulfoxide* ) и разблажене у медијуму при чему финална концентрација диметил-сулfoxида није прелазила 0,5% v/v. Новосинтетисани комплекси рутенијума су добијени као поклон од стране проф. др Живадина Бугарчића и његовог истраживачког тима (Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу).

У узорцима који су укључени у студију одређивана је вијабилност ћелија 24, 48 и 72 часа након третмана различитим концентрацијама испитиваних комплекса у односу на вијабилност нетретираних ћелија применом *MTT* теста (140). Као позитивна контрола, односно супстанца са доказаним цитотоксичним ефектом, коришћена је цисплатина. У даља истраживања су били укључене концентрације комплекса рутенијума које нису утицале на вијабилност здравих фибробласта, а у испитиваним концентрацијама су деловали цитотоксично на бар једну од четири туморске ћелијске линије *A549, MCF7, HeLa* и *Hs 294T*. Тип ћелијске смрти као и релативни однос некротичне и апоптотичне смрти туморских ћелија изазване тестирањем комплекса испитиван је методом проточне цитометрије ћелија бојених *Annexin-ом V* и 7-аминоактиномицином *D* (141).

За испитивање механизма апоптозе индуковане комплексима рутенијума користили смо проточну цитометрију бојењем третираних ћелија специфичним антителима за регулаторне апоптотичне протеине као што су *Bax, Bcl-2*, цитохром *c* и активну каспазу-3. Одређивали смо релативни однос експресије проапоптотичног протеина *Bax* и антиапоптотичног *Bcl-2* протеина. Такође, одређивали смо проценат ћелија код којих је дошло до транслокације цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму и активације *Bax*-а и каспазе-3 у групи третираних у односу на нетретирани туморске ћелије.

### **3.4. *MTT* тест**

*MTT* тест се користи за одређивање вијабилности или пролиферације ћелија (140). Квантификација цитотоксичног ефекта комплекса рутенијума на испитиване ћелије *in vitro* извршена је применом *MTT* теста (*Sigma*, Немачка).

Принцип теста: Жуто обојену со тетразолијум бромида, *MTT* (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум бромид), редукују митохондријални ензими дехидрогеназе метаболички активних ћелија и стварају редуковане еквиваленте као што су  $NADH+H^+$  и  $NADPH+H^+$ . Љубичасто обојени формаза који се такође добија

при овој реакцији и који је локализован интрацелуларно у живим, метаболички активним ћелијама, може бити растворен и квантификован спектрофотометријски. *MTT* тест пролиферације ћелија мери брзину ћелијске пролиферације, а уколико дође до апоптозе или некрозе ћелија, овај тест мери смањење вијабилности ћелија. На *ELISA* читачу (*Zenyth 3100, Anthos Labtec Instruments*) мерен је интензитет боје, читавањем на таласној дужини од 595 nm.

Тест се изводи у микротитар плочи са 96 бунара. Вијабилност ћелија приликом третмана комплексима рутенијума је испитивана у трипликату и у три независна експеримента.

Концентрације комплекса рутенијума у микротитар плочима су биле у опсегу од 0,3  $\mu\text{M}$  до 100  $\mu\text{M}$  (0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ). Комплекси рутенијума су прво растворени у диметил-сулфоксиду (у концентрацији која је била бар 400 пута већа од највеће испитиване концентрације биоактивне супстанце), тако да финална концентрација *DMSO*-а у медијуму није била већа од 0,5% v/v.

Ћелијска вијабилност је одређивана након 24, 48 и 72 часа инкубације ћелија са тестираним комплексима или само у комплетном медијуму (контрола). У сваком бунару укупна запремина суспензије ћелија и тестираних биоактивних супстанци је била 200  $\mu\text{l}$ , а број ћелија по бунару је био  $5 \times 10^4$ .

Радни раствор *MTT*-а се добијао из штока *MTT*-а (5 mg/ml PBS-а (енг. *Phosphate Buffer Saline*, фосфатни пуфер)) разблаживањем са медијумом у односу 1:10.

Након постављања 100  $\mu\text{l}$  суспензије ћелија од  $5 \times 10^4$  ћелија по бунару у микротитар плочу и инкубације са комплексима или у медијуму у временском периоду од 24, 48 и 72 часа, у сваки бунар је додавано 100  $\mu\text{l}$  радног раствора *MTT*-а и ћелије су инкубиране још 4 часа на 37° C у атмосфери са 5%  $\text{CO}_2$ . Затим је супернатант пажљиво извлечен, а у сваки бунарчић је додавано по 150  $\mu\text{l}$  чистог *DMSO*-а. Након тога, плоча је постављена на шејкер у временском периоду од 30 минута, а онда је читавана апсорбанца на 595 nm. Вредности апсорбанце третираних ћелија су поређене са вредностима апсорбанце нетретираних ћелија и на основу тога је израчунато смањење или повећање вијабилности ћелија услед дејства комплекса рутенијума. Процент цитотоксичних ћелија је израчунат по формули: Цитотоксичност (%) =  $[1 - (\text{експериментална група } (OD)) / (\text{контролна група } (OD))] \times 100$ .

### 3.5. ANNEXIN V-FITC тест апоптотичности

Применом *ANNEXIN V-FITC* теста апоптотичности испитиван је апоптотични ефекат комплекса рутенијума на туморске ћелије. Помоћу сета *ANNEXIN V-FITC/7-AAD* (енг. *Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/7-amino-actinomycin D (7-AAD) Apoptosis Kit, BD Biosciences*), израчунат је проценат апоптотичних ћелија у групи третираних ћелија након 24 часова инкубације са тестираним комплексима (141).

Интегритет ћелијске мембране у раној апоптотичној фази је очуван, али долази до губитка асиметрије мембранских фосфолипида. Фосфатидил-серин је негативно наелектрисан трансмембрански фосфолипид чија је физиолошка локализација са унутрашње стране плазма мембране, а у раној фази апоптозе бива изложен на спољашњу страну ћелијске мембране. Протеин *Annexin V* има способност да се везује за калцијум, фосфолипиде и фосфатидил-серин. Губитак интегритета ћелијске мембране јавља се у касној фази апоптозе и у некрози, што омогућава вијабилним бојама као што су *FITC* (флуоресцеин изотиоцијанат) и *7-AAD* (7 аминок-актиномицин Д) да се вежу за молекуле ДНК. Комплет реагенса који је коришћен у нашим експериментима садржи *7-AAD* који се везује директно за молекуле ДНК. Из тог разлога се претпоставља да су *Annexin V (-)/7-AAD (-)* ћелије вијабилне, *Annexin V (+)/7-AAD (-)* ћелије у раној фази апоптозе, *Annexin V (+)/7-AAD (+)* ћелије у касној фази апоптозе, а да су некротичне ћелије *Annexin V (-)/7-AAD (+)*.

Након 24-часовног третмана комплексима рутенијума, ћелије су опране у *PBS*-у и ресуспендоване у епруветама са ледено хладним везујућим пуфером (енг. *binding buffer*) до финалне концентрације ћелија  $1 \times 10^6/\text{ml}$ . Након тога, у 100  $\mu\text{l}$  суспензије ћелија додато је 10  $\mu\text{l}$  *Annexin V-FITC*-а и 20  $\mu\text{l}$  *7-AAD*. Затим су ћелије инкубиране 15 минута у мраку на 4° C. Потом је садржај епрувета ресуспендован у 400  $\mu\text{l}$  везујућег пуфера и анализиран на проточном цитометру (*The Cytomics FC 500 Series, Beckman Coulter*). Процент третираних ћелија у раној апоптози, касној апоптози као и проценат некротичних ћелија су одређивани коришћењем софтвера *CXP Cytometer, FlowJo* и *Flowing software v2.5*.

### 3.6. Анализа ћелијског циклуса

Бојење ћелија пропидијум-јодидом (*PI*) је коришћено за анализу процентуалне заступљености ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса (142, 143). Пропидијум-јодид интеркалира у молекулу нуклеинских киселина, а на основу интензитета флуоресценције може се одредити количина молекула ДНК у анализираним туморским ћелијама које се налазе у одређеној фази ћелијског циклуса. Диплоидне ћелије ( $2n$ ) се налазе у *G0/G1* фази, ћелије са хаплоидним садржајем молекула ДНК ( $<2n$ ) одговарају ћелијама које се налазе у процесу апоптозе, ћелије у *S* фази имају већи садржај молекула ДНК од диплоидног (између  $2n$  и  $4n$ ), док ћелије у *G2/M* фази имају двоструко већи садржај од диплоидног ( $4n$ ).

Туморске ћелије *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T* су третиране 24 часа цисплатином и комплексима рутенијума, концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  вредностима за сваку ћелијску линију као и са свежим медијумом (контрола) на  $37^{\circ}C$  у атмосфери са 5%  $CO_2$  и апсолутном влажношћу. Након 24 часа третмана покупљене су како залепљене тако и ћелије у суспензији које су се одлепиле током третмана, затим су опране у *PBS*-у и фиксирани у 70% хладном етанолу преко ноћи на  $4^{\circ}C$ . Тако фиксирани ћелије су ресуспендоване у 1ml *PBS*-а са *RNA*-зом А (500  $\mu g/ml$ ) и инкубирани 30 минута на  $37^{\circ}C$ . Додавањем *RNA*-зе А у испитиваном узорку се разлаже постојећа РНК, јер пропидијум-јодид има могућност неселективног везивања и за молекулу ДНК и за РНК. Након додавања 5  $\mu l$  раствора за бојење (10mg *PI/ml* *PBS*-а) ћелије су инкубирани 15 минута у мраку на  $4^{\circ}C$ . Анализа је извршена помоћу проточног цитометра *Cytomics FC500* (*Beckman Coulter*). Одређиван је садржај ДНК помоћу *Flowing Software*-а и *FlowJo*-а, а дистрибуција ћелијског циклуса приказана је хистограмски.

### 3.7. Имуноцитохемијска бојења специфичним антителима за *Bax*, *Bcl-2*, цитохром *c* и активну каспазу 3

У циљу испитивања механизма апоптозе одређивана је експресија и активација проапоптотичног протеина *Bax*, експресија антиапоптотичног протеина *Bcl-2*, цитохрома *c* и активне каспазе 3 на *HeLa* туморским ћелијама које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума и цисплатине након 24 часа инкубације (144-146).

Након третмана са комплексима рутенијума ћелије су опране три пута ледено хладним *PBS*-ом и потом ресуспендоване у концентрацији  $2 \times 10^6/ml$ , фиксирани и

пермеабилсане (*Fixation and Permeabilization Kit, eBioscience*). Потом је следила инкубација у временском периоду од 20 минута раствором који садржи 0,2 М глицина, 20  $\mu$ l козјег серума и 30  $\mu$ l *PBS*-а да би се блокирало неспецифично везивање антитела. Затим су ћелије опране три пута у *PBS*-у додавањем 4 ml *PBS*-а, центрифугирањем 5 минута на 400xg и одливањем супернатанта као и у претходним прањима.

Ћелије су се бојиле на два различита начина. Антитело за *Bcl-2* (*Bcl-2 fluorescein isothiocyanate primary antibody, mhbcl01, Life technologies*) је примарно антитело које је већ обележено флуорохромом (*FITC*), па су пермеабилсане ћелије инкубирани 15 минута на собној температури са антителом за *Bcl-2* у разблажењу 1:800. Преостале три групе ћелија (ћелије припремљене за бојење антителима за *Bax*, цитохром *c* и активну каспазу-3) су прво инкубирани 30 минута на собној температури са примарним антителима за *Bax* (*N20, sc-493, Santa Cruz Biotech. Inc*), цитохром *c* (*G7421, Promega*) и активну каспазу-3 (*#9661, Cell signaling Technology*). Након тога ове ћелије су опране *PBS*-ом и инкубирани одговарајућим секундарним антителима 30 минута у мраку на собној температури. Секундарна антитела су коришћена у разблажењу 1:2000 и то *Alexa 488 goat anti-mouse IgG (H+L) antibody (A-11001, Life Technologies)* за цитохром *c* и *goat to rabbit IgG FITC (Ab6717-1, Abcam)* за *Bax* и активну каспазу-3. Потом су све четири групе ћелија опране и ресуспендоване у *PBS*-у и анализирани на проточном цитометру.

### **3.8. Евалуација проточном цитометријом**

Методом проточне цитометрије експресија протеина активног *Bax*-а, *Bcl-2*, цитохрома *c* и активне каспазе-3 је квантификована у третираним и нетретираним HeLa ћелијама. Коришћењем проточног цитометра (*The Cytomics FC 500 Series, Beckman Coulter*) до 20000 ћелија је мерен интензитет флуоресценције испитиваних протеина на популацији HeLa ћелија. Интензитет флуоресценције је стандардизован коришћењем антитела за негативну изотипску контролу. Просечан интензитет флуоресценције испитиваних ћелија (енг. *MFI, mean fluorescence intensity*) за *Bax* и *Bcl-2* је израчунат као однос интензитета флуоресценције одговарајућег протеина (*raw mean channel fluorescence*) и флуоресценције изотипске контроле. Квантификација експресије цитохрома *c* и активне каспазе-3 у третираним и нетретираним туморским ћелијама је извршена анализом процента ћелија које испољавају флуоресценцију.

## 4. Резултати

### 4.1. Комплекси рутенијума(II) и цисплатина смањују вијабилност туморских ћелија

У циљу одређивања цитотоксичних ефеката комплекса рутенијума(II) на туморске ћелије и ћелије здравих фибробласта, испитиван је ефекат два комплекса, комплекса *Ru-1* [Ru(Cl-Ph-tpy)(*o*-pda)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, *o*-pda = *o*-fenilendiamin) и комплекса *Ru-2* [Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, phen = 1,10-fenantrolin).

У циљу поређења цитотоксичног ефекта комплекса рутенијума, такође је испитиван и ефекат цисплатине на вијабилност туморских ћелија и фибробласта. Ефекат комплекса рутенијума(II) и цисплатине на вијабилност туморских ћелија и фибробласта одређиван је након култивације ћелија са комплексима различитих концентрација у временском периоду од 24, 48 и 72 часа, применом *MTT* теста вијабилности ћелија.

#### 4.1.1. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија епителног аденокарцинома плућа *A549*

Наше истраживање је показало да примена комплекса *Ru-1* статистички значајно смањује вијабилност *A549* ћелија након 24 часа инкубације у концентрацијама већим од 10  $\mu\text{M}$  (за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија износи  $67,9 \pm 2,8\%$ , за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  износи  $54,7 \pm 2,3\%$ , а за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  износи  $47,1 \pm 2,4\%$ ) у односу на вијабилност контролних нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 1). Након култивације *A549* ћелија у трајању од 24 часа комплексом *Ru-1* у концентрацијама нижим од 10  $\mu\text{M}$  (0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ ) не долази до статистички значајне промене вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 1).

Такође, примена комплекса *Ru-2* статистички значајно смањује вијабилност *A549* ћелија након 24 часа инкубације у концентрацијама вишим од 10  $\mu\text{M}$  и то: за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је  $79,7 \pm 2,8\%$ ; за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност је  $54,8 \pm 4,6\%$ ; за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  вијабилност



испитиваних ћелија износи  $47,1 \pm 2,7\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 1). Приликом третмана *A549* ћелија комплексом *Ru-2* у концентрацијама нижим од  $10 \mu\text{M}$  тј. применом концентрација од  $0,3 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$  и  $3 \mu\text{M}$ , не долази до статистички значајне промене вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 1).

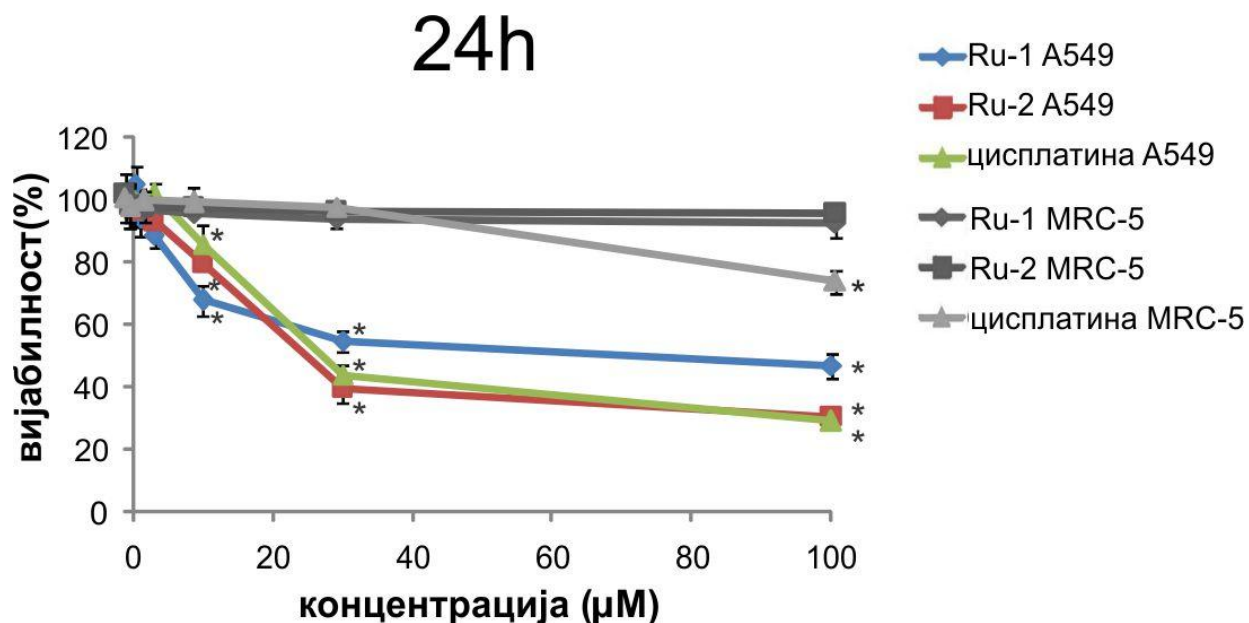
Исто тако и након 24-часовног третмана испитиваних ћелија цисплатином у концентрацијама од  $10 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$  и  $100 \mu\text{M}$  долази до статистички значајног смањења вијабилности *A549* ћелија (за  $10 \mu\text{M}$  вијабилност је  $85,8 \pm 2,2\%$ ; за  $30 \mu\text{M}$  износи  $43,8 \pm 3,6\%$  и за  $100 \mu\text{M}$  измерена је вијабилност од  $29,2 \pm 3,9\%$ ) у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 1). Након култивације *A549* ћелија цисплатином у трајању од 24 часа, при концентрацијама нижим од  $10 \mu\text{M}$  ( $0,3 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$  и  $3 \mu\text{M}$ ) не долази до статистички значајне промене вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 1).

Да бисмо у потпуности испитали цитоксични ефекат комплекса рутенијума и цисплатине у истим временским интервалима (24, 48 и 72 часа), истовремено са испитивањем вијабилности ћелија аденокарцинома плућа, *A549* ћелија, испитивали смо и вијабилност здравих фибробласта, тј. *MRC-5* ћелија које смо користили као контролу.

Током испитивања комплекса *Ru-1* у свим испитиваним концентрацијама ( $0,3 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $3 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$  и  $100 \mu\text{M}$ ) након 24 часа култивације не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 1).

Након култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 24 часа, у присуству растућих концентрација комплекса *Ru-2* од  $0,3 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $3 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$  и  $100 \mu\text{M}$ , не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 1).

Цисплатина статистички значајно смањује вијабилност *MRC-5* ћелија након 24 часа инкубације, само при максималној испитиваној концентрацији од  $100 \mu\text{M}$  на  $71,0 \pm 3,6\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 1). При концентрацијама цисплатине од  $0,3 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $3 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$  и  $30 \mu\text{M}$ , након 24 часа инкубације, не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 1).



**Графикон 1.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *A549* и *MRC-5* ћелија након 24-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Испитивани комплекси не доводе до промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *A549* туморских ћелија после 24 часа.

Након 48-часовне инкубације испитиваних ћелија са комплексом *Ru-1*, до статистички значајног смањења вијабилности *A549* ћелија долази приликом примене комплекса *Ru-1* у концентрацији од 3 µM, при којој је вијабилност ћелија смањена на  $70,2 \pm 7,3\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 2). Смањење вијабилности *A549* ћелија након примене комплекса *Ru-1* након 48 часова инкубације, такође је статистички значајно и у концентрацијама од 10 µM, 30 µM и 100 µM и износи  $46,7 \pm 10,8\%$ ,  $30,5 \pm 1,4\%$  и  $31,3 \pm 7,9\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 2). Приметно је да са продужењем трајања третмана (са 24 на 48 часова) статистички значајно смањење вијабилности испитиваних *A549* ћелија се јавља при нижој концентрацији. За третман од 24 часа та концентрација је 10 µM а за третман од 48 часова до статистички значајног смањења вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија долази при концентрацији комплекса *Ru-1* од 3 µM. При концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3 µM и 1 µM, након култивације *A549* ћелија у

трајању од 48 часова, не долази до статистички значајне промене вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 2).

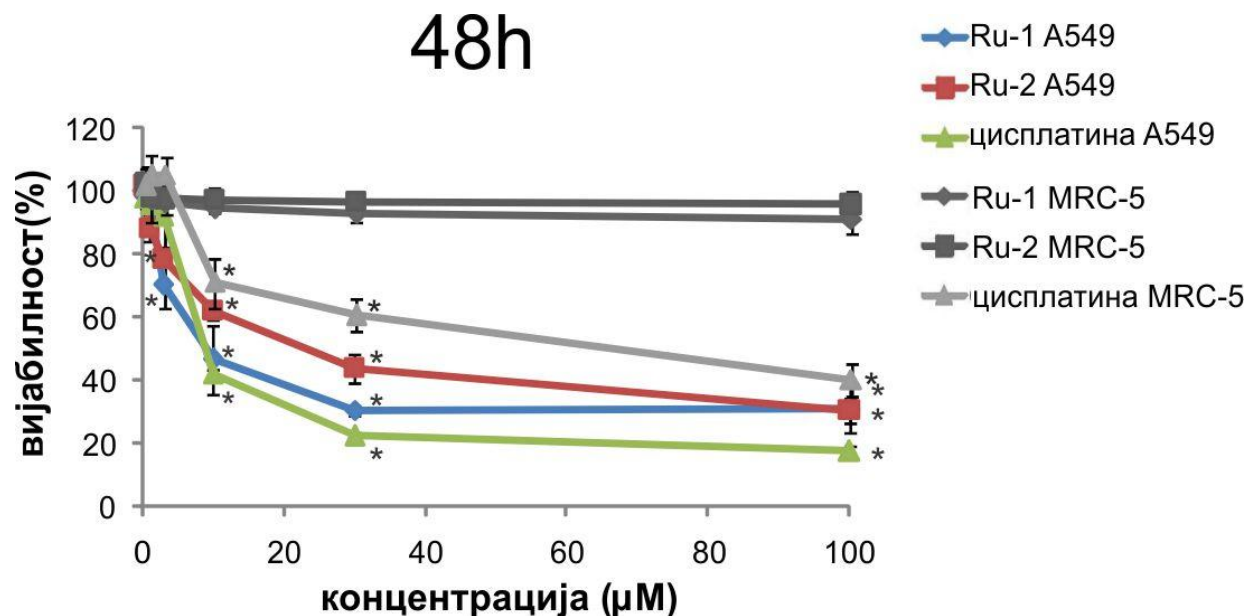
Исти тренд примећујемо и приликом испитивања цитотоксичног ефекта комплекса *Ru-2* у трајању од 48 часова. До статистички значајног смањења вијабилности *A549* испитиваних ћелија долази при концентрацији од 3  $\mu\text{M}$ ; измерено је смањење вијабилности на  $78,3 \pm 0,4\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 2). Такође, примећено је статистички значајно смањење вијабилности *A549* ћелија након 48 часова инкубације са комплексом *Ru-2*, у концентрацијама од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , на  $62,1 \pm 2,6\%$ ,  $43,9 \pm 4,6\%$  и  $30,6 \pm 3,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 2). Приликом примене комплекса *Ru-2* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  током третмана од 48 часова није дошло до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 2).

Испитивањем цитотоксичног ефекта цисплатине током третмана у трајању од 48 часова уочава се да при концентрацији цисплатине од 10  $\mu\text{M}$  долази до статистички значајног смањења вијабилности *A549* ћелија и да оно износи  $41,9 \pm 1,3\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 2). При концентрацијама цисплатине од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , то смањење вијабилности *A549* ћелија које је статистички значајно износи  $22,3 \pm 1,2\%$  и  $17,5 \pm 1,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 2). Након култивације *A549* ћелија цисплатином у трајању од 48 часова, при концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , нема статистички значајне промене вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 2).

Након 48 сати култивације *MRC-5* ћелија при концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 2).

При концентрацијима комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  након 48 часова култивације не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 2).

Приликом култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 48 сати, концентрација цисплатине од 10  $\mu\text{M}$  доводи до статистички значајног смањења вијабилности на  $66,8 \pm 7,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 2). При вишим концентрацијама цисплатине долази до даљег смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, тако да је најмања вијабилност испитиваних ћелија при концентрацији цисплатине од 100  $\mu\text{M}$ , када износи  $35,9 \pm 5,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија, а при концентрацији цисплатине од 30  $\mu\text{M}$  износи  $56,3 \pm 5,0\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 2). Није уочено статистички значајно смањење вијабилности *MRC-5* ћелија након 48 часова инкубације, при концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 2).



**Графикон 2.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *A549* и *MRC-5* ћелија након 48-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Испитивани комплекси не доводе до промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *A549* туморских ћелија после 48 часова.

Када смо испитивали ефекат комплекса *Ru-1* на *A549* ћелије аденокарцинома плућа након 72-часовне инкубације уочили смо да није било статистички значајног смањења

вијабилности *A549* ћелија приликом примене комплекса *Ru-1* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 3). Међутим, када се комплекс *Ru-1* примени под истим условима (инкубација у трајању од 72 часа) у концентрацијама од 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $59,6 \pm 5,3\%$ ,  $35,4 \pm 2,9\%$ ,  $30,2 \pm 2,4\%$  и  $20,9 \pm 2,6\%$ ) долази до статистички значајног смањења вијабилности третираних *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3).

Приликом 72-часовног третмана комплексом *Ru-2* у концентрацији од 3  $\mu\text{M}$  измерено је статистички значајно смањење вијабилности *A549* ћелија које износи  $84,2 \pm 3,6\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). Применом виших концентрација комплекса *Ru-2* (10,  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) након инкубације од 72 часа такође бележимо смањење вијабилности *A549* ћелија ( $69,5 \pm 7,1\%$ ,  $34,3 \pm 2,1\%$  и  $33,1 \pm 2,3\%$ ) у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). При нижим концентрацијама комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  након култивације *A549* ћелија у трајању од 72 часа, не долази до статистички значајне промене вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 3).

Након култивације *A549* ћелија цисплатином у трајању од 72 часа, при концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , не долази до статистички значајне промене вијабилности *A549* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 3). Применом цисплатине у концентрацији од 10  $\mu\text{M}$ , меримо статистички значајно смањење вијабилности *A549* ћелија које износи  $43,4 \pm 1,9\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). Даље повећање концентрације цисплатине, за третман који траје 72 часа, доводи до још значајнијег смањења вијабилности *A549* туморских ћелија; за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  износи  $20,0 \pm 1,3\%$ , а за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  износи  $17,5 \pm 0,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *A549* ћелија. Смањење вијабилности третираних *A549* ћелија је статистички значајно за обе испитиване концентрације ( $p < 0,05$ , графикон 3).

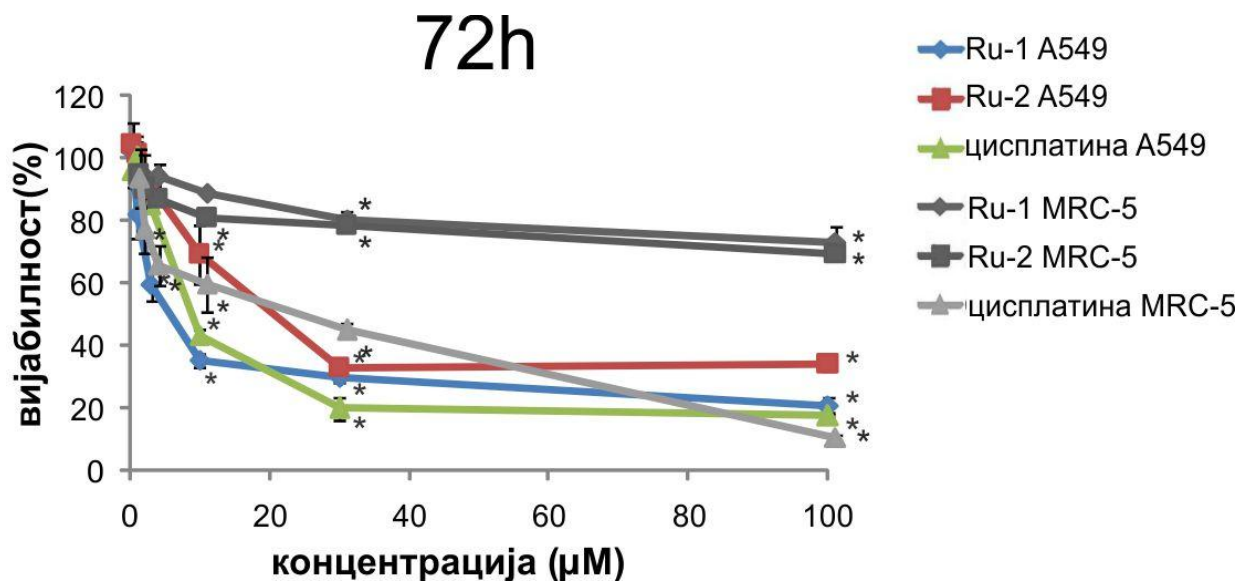
При култивацији *MRC-5* ћелија у трајању од 72 часа до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија, долази при концентрацији комплекса *Ru-1* од 10  $\mu\text{M}$ , када вијабилност износи  $87,6 \pm 1,3\%$  у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). При концентрацији комплекса *Ru-1* од

30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације такође долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија на  $79,2 \pm 3,8\%$  и  $71,9 \pm 3,7\%$  у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). При концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације, не долази статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 3).

Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија у присуству комплекса *Ru-2* концентрације од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  је долазило до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). При концентрацији комплекса *Ru-2* од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је смањена на  $79,5 \pm 4,8\%$ , при концентрацији комплекса *Ru-2* од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је смањена на  $77,1 \pm 3,3\%$ , а при максималној испитиваној концентрацији од 100  $\mu\text{M}$ , вијабилност *MRC-5* ћелија је износила  $68,2 \pm 1,4\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). Након 72 часа инкубације *MRC-5* ћелија, при концентрацији комплекса *Ru-2* од 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , није долазило до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 3).

Након 72 часовне култивације *MRC-5* ћелија у присуству растућих концентрација цисплатине, дошло је до смањења вијабилности *MRC-5* ћелија при концентрацијама цисплатине од 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ , графикон 3). Највеће смањење вијабилности *MRC-5* ћелија било је при концентрацији цисплатине од 100  $\mu\text{M}$  када је вијабилност *MRC-5* ћелија износила  $9,2 \pm 1,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 3). Није дошло до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, након 72 часа инкубације, при концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 3).

Испитивани комплекси не доводе до промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије, али делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *A549* туморских ћелија после 72 часа.



**Графикон 3.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *A549* и *MRC-5* ћелија након 72-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

У табели 1 су приказане израчунате  $IC_{50}$  вредности за комплексе рутенијума, *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину на *A549* и *MRC-5* ћелијама. Након 24 часа култивације *A549* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $55,3 \pm 9,3 \mu\text{M}$ ,  $25,1 \pm 3,3 \mu\text{M}$  и  $27,2 \pm 4,1 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне култивације *A549* ћелија са тестираним једињењима,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $9,5 \pm 3,2 \mu\text{M}$ ,  $23,8 \pm 3,8 \mu\text{M}$  и  $9,5 \pm 1,8 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *A549* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $4,6 \pm 2,1 \mu\text{M}$ ,  $21,7 \pm 4,3 \mu\text{M}$  и  $8,8 \pm 2,7 \mu\text{M}$  (Табела 1).

Након 24 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко  $300 \mu\text{M}$ , а за цисплатину  $183,7 \pm 16,2 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне инкубације *MRC-5* ћелија са тестираним једињењима,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко  $300 \mu\text{M}$ , а за цисплатину  $43,1 \pm 8,8 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $192,6 \pm 17,2 \mu\text{M}$ ,  $238,1 \pm 19,3 \mu\text{M}$  и  $19,7 \pm 6,7 \mu\text{M}$  (Табела 1).

Добијене  $IC_{50}$  вредности нам јасно показују да испитивани комплекси не доводе до значајне промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *A549* туморских ћелија.

<b>A549</b>			
<b><math>IC_{50}(\mu M)</math></b>	<b>Ru-1</b>	<b>Ru-2</b>	<b>цисплатина</b>
<b>72h</b>	4.6 ± 2.1	21.7 ± 4.3	8.8 ± 2.7
<b>48h</b>	9.5 ± 3.2	23.8 ± 3.8	9.5 ± 1.8
<b>24h</b>	55.3 ± 9.3	25.1 ± 3.3	27.2 ± 4.1
<b>MRC-5</b>			
<b><math>IC_{50}(\mu M)</math></b>	<b>Ru-1</b>	<b>Ru-2</b>	<b>цисплатина</b>
<b>72h</b>	192.6 ± 17.2	238.1 ± 19.3	19.7 ± 6.7
<b>48h</b>	>300	>300	43.1 ± 8.8
<b>24h</b>	>300	>300	183.7 ± 16.2

Табела 1.  $IC_{50}$  вредности комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на *A549* и *MRC-5* ћелијама.

#### 4.1.2. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија карцинома дојке *MCF7*

Када смо испитивали ефекат комплекса *Ru-1* на *MCF7* ћелије карцинома дојке након 24-часовне инкубације уочили смо да није било статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* ћелија приликом примене комплекса *Ru-1* у концентрацијама од 0,3  $\mu M$ , 1  $\mu M$ , 3  $\mu M$  и 10  $\mu M$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 4). Међутим, када се комплекс *Ru-1* примени под истим условима (инкубација у трајању од 24 часа) у концентрацијама од 30  $\mu M$  и 100  $\mu M$  ( $71,2 \pm 2,4\%$  и  $53,6 \pm 1,7\%$ ) долази до статистички значајног смањења вијабилности третираних *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 4).

Приликом 24-часовног третмана комплексом *Ru-2* у концентрацији од 3  $\mu M$  измерено је статистички значајно смањење вијабилности *MCF7* ћелија које износи  $76,1 \pm$



2,2% у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 4). Применом виших концентрација комплекса *Ru-2* (10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) након инкубације од 24 часа такође бележимо смањење вијабилности *MCF7* ћелија ( $55,7 \pm 1,4\%$ ,  $13,6 \pm 0,9\%$  и  $10,8 \pm 2,9\%$ ) у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 4). При нижим концентрацијама комплекса *Ru-2* које износе 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  након култивације *MCF7* ћелија у трајању од 24 часа, не долази до статистички значајне промене вијабилности *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 4).

Након култивације *MCF7* ћелија цисплатином у трајању од 24 часа, при концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ , не долази до статистички значајне промене вијабилности *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 4). Применом цисплатине у концентрацији од 3  $\mu\text{M}$ , меримо статистички значајно смањење вијабилности *MCF7* ћелија које износи  $77,8 \pm 2,9\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 4). Даље повећање концентрације цисплатине, за третман који траје 24 часа, доводи до још значајнијег смањења вијабилности *MCF7* туморских ћелија; за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  износи  $78,9 \pm 2,9\%$ , за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  износи  $63,6 \pm 3,1\%$ , а за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$ , износи  $51,4 \pm 1,4\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија. Смањење вијабилности третираних *MCF7* ћелија је статистички значајно за испитиване концентрације од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ , графикон 4).

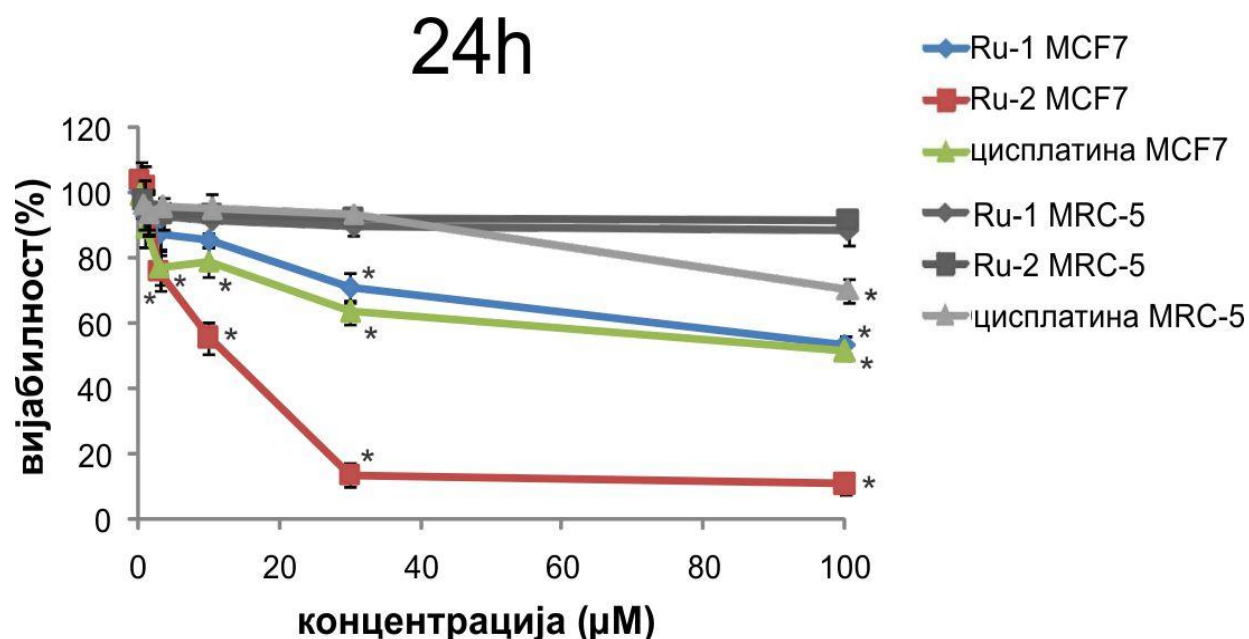
Да бисмо у потпуности испитали цитоксични ефекат комплекса рутенијума и цисплатине у истим временским интервалима (24, 48 и 72 часа), истовремено са испитивањем вијабилности ћелија карцинома дојке, *MCF7* ћелија, испитивали смо и вијабилност здравих фибробласта, тј. *MRC-5* ћелија које смо користили као контролу.

Током испитивања комплекса *Ru-1* у свим испитиваним концентрацијама (0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) након 24 часа култивације не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 4).

Након култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 24 часа, у присуству растућих концентрација комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , не долази

до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 4).

Цисплатина статистички значајно смањује вијабилност *MRC-5* ћелија након 24 часа инкубације, само при максималној испитиваној концентрацији од 100  $\mu\text{M}$  на  $71,0 \pm 3,6\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p<0,05$ , графикон 4). При концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  и 30  $\mu\text{M}$ , након 24 часа инкубације, не долази статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p>0,05$ , графикон 4).



**Графикон 4.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *MCF7* и *MRC-5* ћелија након 24-часовног третмана. \*  $p<0,05$

Испитивани комплекси не доводе до промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије, а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* туморских ћелија после 24 часа.

Наше истраживање је показало да примена комплекса *Ru-1* статистички значајно смањује вијабилност *MCF7* ћелија након 48 часова инкубације у концентрацијама већим од 3  $\mu\text{M}$  (за концентрацију од 3  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија износи  $79,6 \pm 2,12\%$ , за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  износи  $65,2 \pm 1,8\%$ , за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  износи  $42,8 \pm$

2,0%, а за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  износи  $13,7 \pm 2,4\%$ ) у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 5). Приметно је да са продужењем трајања третмана (са 24 на 48 часова) статистички значајно смањење вијабилности испитиваних *MCF7* ћелија се јавља при нижој концентрацији. За третман од 24 часа та концентрација је 30  $\mu\text{M}$  а за третман од 48 часова до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* ћелија долази при концентрацији комплекса *Ru-1* од 3  $\mu\text{M}$ . Након култивације *MCF7* ћелија у трајању од 48 часова комплексом *Ru-1* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ , не долази до статистички значајне промене вијабилности *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 5).

Такође, примена комплекса *Ru-2* статистички значајно смањује вијабилност *MCF7* ћелија након 48 часова инкубације у концентрацијама вишим од 3  $\mu\text{M}$  и то: за концентрацију од 3  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је  $75,7 \pm 4,1\%$  за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је  $25,0 \pm 2,2\%$ ; за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност је  $8,9 \pm 1,6\%$ ; за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија износи  $5,6 \pm 3,4\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 5). Приликом третмана *MCF7* ћелија комплексом *Ru-2* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ , не долази до статистички значајне промене вијабилности *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 5).

Исто тако и након 48-часовног третмана испитиваних ћелија цисплатином у концентрацијама од 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , долази до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* ћелија (за 3  $\mu\text{M}$  вијабилност је  $88,2 \pm 2,3\%$ ; за 10  $\mu\text{M}$  вијабилност је  $65,1 \pm 1,1\%$ ; за 30  $\mu\text{M}$  износи  $43,3 \pm 3,1\%$  и за 100  $\mu\text{M}$  измерена је вијабилност од  $27,2 \pm 2,1\%$ ) у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 5). Након култивације *MCF7* ћелија цисплатином у трајању од 48 часова, при концентрацијама нижим од 3  $\mu\text{M}$  (0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ ) не долази до статистички значајне промене вијабилности третираних *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 5).

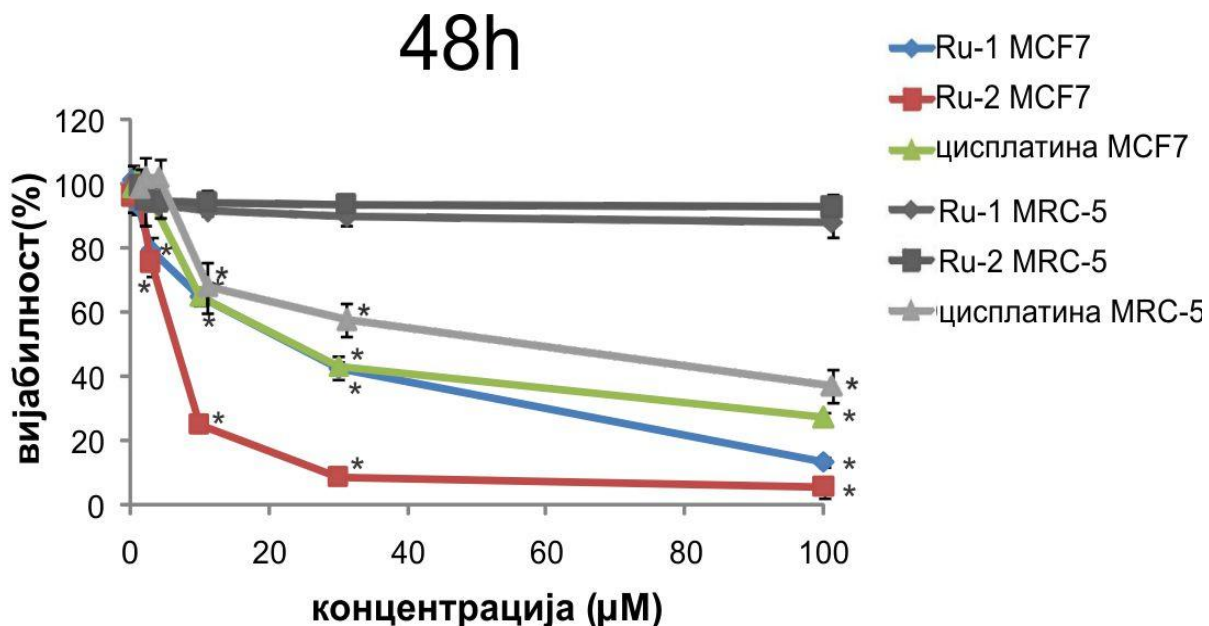
Након 48 сати култивације *MRC-5* ћелија при концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  не долази до статистички значајне промене

вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 5).

При концентрацијима комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  након 48 часова култивације не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 5).

Приликом култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 48 сати, концентрација цисплатине од 10  $\mu\text{M}$  доводи до статистички значајног смањења вијабилности на  $66,8 \pm 7,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 5). При вишим концентрацијама цисплатине долази до даљег смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, тако да је најмања вијабилност испитиваних ћелија при концентрацији цисплатине од 100  $\mu\text{M}$ , када износи  $35,9 \pm 5,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија, а при концентрацији цисплатине од 30  $\mu\text{M}$  износи  $56,3 \pm 5,0\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 5). Није уочено статистички значајно смањење вијабилности *MRC-5* ћелија, након 48 часова инкубације, при концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 5).

Испитивани комплекси не доводе до промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије, а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* туморских ћелија после 48 часова.



**Графикон 5.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *MCF7* и *MRC-5* ћелија након 48-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Након 72-часовне инкубације испитиваних ћелија са комплексом *Ru-1*, до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* ћелија долази приликом примене комплекса *Ru-1* у концентрацији од 3 µM, при којој је вијабилност ћелија смањена на  $84,2 \pm 4,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). Смањење вијабилности *MCF7* ћелија након примене комплекса *Ru-1* после 72 часа инкубације, такође је статистички значајно и у концентрацијама од 10 µM, 30 µM и 100 µM и износи  $59,9 \pm 7,7\%$ ,  $17,2 \pm 6,1\%$  и  $1,84 \pm 3,3\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). При концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3 µM, 1 µM и 3 µM, након култивације *MCF7* ћелија у трајању од 72 часа, не долази до статистички значајне промене вијабилности *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 6).

Исти тренд примећујемо и приликом испитивања цитотоксичног ефекта комплекса *Ru-2* у трајању од 72 часа. До статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* испитиваних ћелија долази при концентрацији од 3 µM; измерено је смањење вијабилности на  $58,1 \pm 7,6\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). Такође, примећено је статистички значајно смањење вијабилности *MCF7* ћелија након 72 часа инкубације са комплексом *Ru-2*, у концентрацијама од 10 µM, 30 µM

и 100  $\mu\text{M}$ , на  $11,0 \pm 2,6\%$ ,  $3,4 \pm 1,6\%$  и  $2,7 \pm 1,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). Приликом примене комплекса *Ru-2* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  током третмана од 48 часова није дошло до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 6).

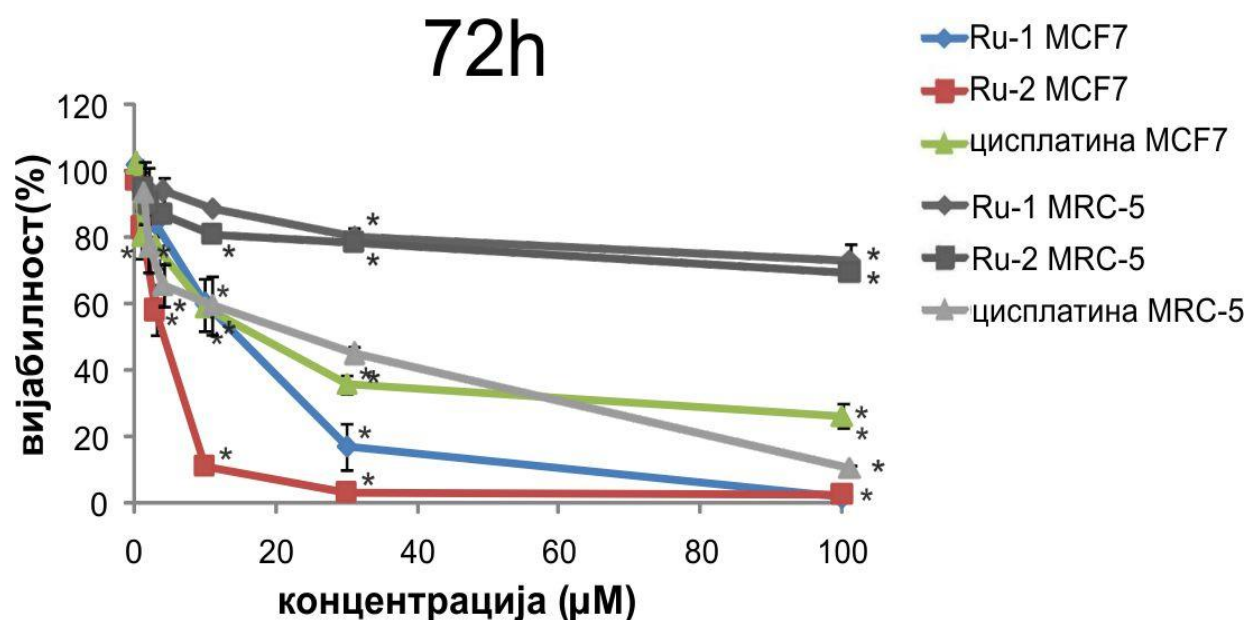
Испитивањем цитотоксичног ефекта цисплатине током третмана у трајању од 72 часа уочава се да при концентрацији цисплатине од 1  $\mu\text{M}$  долази до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* ћелија и да оно износи  $80,0 \pm 1,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). При концентрацијама цисплатине од 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , то смањење вијабилности *MCF7* ћелија које је статистички значајно износи  $77,8 \pm 2,8\%$ ,  $59,0 \pm 6,1\%$ ,  $36,1 \pm 2,4\%$  и  $26,4 \pm 3,5\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). Након култивације *MCF7* ћелија цисплатином у трајању од 48 часова, при концентрацији од 0,3  $\mu\text{M}$ , нема статистички значајне промене вијабилности *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 6).

При култивацији *MRC-5* ћелија у трајању од 72 часа до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија, долази при концентрацији комплекса *Ru-1* од 10  $\mu\text{M}$ , када вијабилност износи  $87,6 \pm 1,3\%$  у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). При концентрацији комплекса *Ru-1* од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације такође долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија на  $79,2 \pm 3,8\%$  и  $71,9 \pm 3,7\%$  у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). При концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације, не долази статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 6).

Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија у присуству комплекса *Ru-2* концентрације од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  је долазило до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). При концентрацији комплекса *Ru-2* од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је смањена на  $79,5 \pm 4,8\%$ , при концентрацији комплекса *Ru-2* од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је смањена на  $77,1 \pm 3,3\%$ , а при максималној испитиваној концентрацији од 100

$\mu\text{M}$ , вијабилност *MRC-5* ћелија је износила  $68,2 \pm 1,4\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). Након 72 часа инкубације *MRC-5* ћелија, при концентрацији комплекса *Ru-2* од  $0,1 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$  и  $3 \mu\text{M}$ , није долазило до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 6).

Након 72 часовне култивације *MRC-5* ћелија у присуству растућих концентрација цисплатине, дошло је до смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија при концентрацијама цисплатине од  $3 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$  и  $100 \mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ , графикон 6). Највеће смањење вијабилности *MRC-5* ћелија било је при концентрацији цисплатине од  $100 \mu\text{M}$  када је вијабилност *MRC-5* ћелија износила  $9,2 \pm 1,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 6). Није дошло до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, након 72 часа инкубације, при концентрацијама цисплатине од  $0,3 \mu\text{M}$  и  $1 \mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 6).



**Графикон 6.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *MCF7* и *MRC-5* ћелија након 72-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Испитивани комплекси не доводе до промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије, а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* туморских ћелија после 72 часа.

У табели 2 су приказане израчунате  $IC_{50}$  вредности за комплексе рутенијума, *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину на *MCF7* и *MRC-5* ћелијама. Након 24 часа култивације *MCF7* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $102,4 \pm 12,6 \mu\text{M}$ ,  $13,9 \pm 3,4 \mu\text{M}$  и  $94,1 \pm 11,7 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне култивације *MCF7* ћелија са тестираним једињењима,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $22,9 \pm 1,7 \mu\text{M}$ ,  $7,2 \pm 1,3 \mu\text{M}$  и  $24,5 \pm 3,3 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *MCF7* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $13,8 \pm 1,8 \mu\text{M}$ ,  $4,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$  и  $17,0 \pm 1,9 \mu\text{M}$  (Табела 2).

Након 24 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко  $300 \mu\text{M}$ , а за цисплатину  $183,7 \pm 16,2 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне инкубације *MRC-5* ћелија са тестираним једињењима,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко  $300 \mu\text{M}$ , а за цисплатину  $43,1 \pm 8,8 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $192,6 \pm 17,2 \mu\text{M}$ ,  $238,1 \pm 19,3 \mu\text{M}$  и  $19,7 \pm 6,7 \mu\text{M}$  (Табела 2).

Добијене  $IC_{50}$  вредности нам јасно показују да испитивани комплекси не доводе до значајне промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *MCF7* туморских ћелија.



<b>MCF7</b>			
<b>IC<sub>50</sub>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>Ru-1</b>	<b>Ru-2</b>	<b>цисплатина</b>
<b>72h</b>	13.8 $\pm$ 1.8	4.6 $\pm$ 0.9	17.0 $\pm$ 1.9
<b>48h</b>	22.9 $\pm$ 1.7	7.2 $\pm$ 1.3	24.5 $\pm$ 3.3
<b>24h</b>	102.4 $\pm$ 12.6	13.9 $\pm$ 3.4	94.1 $\pm$ 11.7
<b>MRC-5</b>			
<b>IC<sub>50</sub>(<math>\mu</math>M)</b>	<b>Ru-1</b>	<b>Ru-2</b>	<b>цисплатина</b>
<b>72h</b>	192.6 $\pm$ 17.2	238.1 $\pm$ 19.3	19.7 $\pm$ 6.7
<b>48h</b>	>300	>300	43.1 $\pm$ 8.8
<b>24h</b>	>300	>300	183.7 $\pm$ 16.2

Табела 2. IC<sub>50</sub> вредности комплекса рутенијума Ru-1 и Ru-2 и цисплатине на MCF7 и MRC-5 ћелијама.

#### 4.1.3. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија карцинома цервикса *HeLa*

Након 24-часовне инкубације испитиваних ћелија са комплексом Ru-1, до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* ћелија долази приликом примене комплекса Ru-1 у концентрацији од 100  $\mu$ M, при којој је вијабилност ћелија смањена на 75,6  $\pm$  0,1% у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 7). При концентрацијама комплекса Ru-1 од 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M и 30  $\mu$ M након култивације *HeLa* ћелија у трајању од 24 часа, не долази до статистички значајне промене вијабилности *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 7).

Исти тренд примећујемо и приликом испитивања цитотоксичног ефекта комплекса Ru-2 у трајању од 24 часа. До статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* испитиваних ћелија долази при концентрацији од 10  $\mu$ M; измерено је смањење вијабилности на 30,4  $\pm$  3,1% у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 7). Такође, примећено је статистички значајно смањење вијабилности *HeLa* ћелија након 24 часа инкубације са комплексом Ru-2, у концентрацијама од 30  $\mu$ M и 100

$\mu\text{M}$ , на  $12,2 \pm 3,6\%$  и  $6,7 \pm 0,5\%$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 7). Приликом примене комплекса *Ru-2* у концентрацијама од  $0,3 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$  и  $3 \mu\text{M}$  током третмана од 24 часа није дошло до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 7).

Испитивањем цитотоксичног ефекта цисплатине током третмана у трајању од 24 часа уочава се да при концентрацији цисплатине од  $30 \mu\text{M}$  долази до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* ћелија и да оно износи  $44,7 \pm 1,6\%$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 7). При концентрацији цисплатине од  $100 \mu\text{M}$ , то смањење вијабилности *HeLa* ћелија које је статистички значајно износи  $23,1 \pm 2,3\%$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 7). Након култивације *HeLa* ћелија цисплатином у трајању од 24 часа, при концентрацијама од  $0,3 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $3 \mu\text{M}$  и  $10 \mu\text{M}$  нема статистички значајне промене вијабилности *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 7).

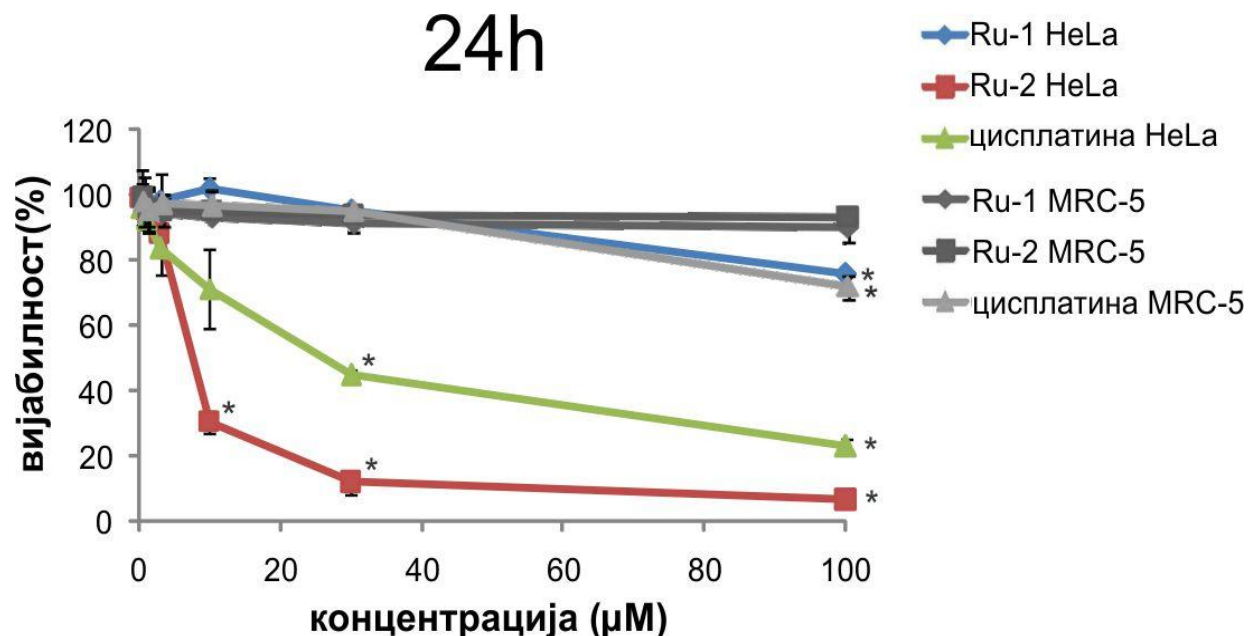
Да бисмо у потпуности испитали цитотоксични ефекат комплекса рутенијума и цисплатине у истим временским интервалима (24, 48 и 72 часа), истовремено са испитивањем вијабилности ћелија карцинома цервикса, односно *HeLa* ћелија, испитивали смо и вијабилност здравих фибробласта, тј. *MRC-5* ћелија које смо користили као контролу.

Током испитивања комплекса *Ru-1* у свим испитиваним концентрацијама ( $0,3 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $3 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$  и  $100 \mu\text{M}$ ) након 24 часа култивације не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 7).

Након култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 24 часа, у присуству растућих концентрација комплекса *Ru-2* од  $0,3 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $3 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$  и  $100 \mu\text{M}$ , не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 7).

Цисплатина статистички значајно смањује вијабилност *MRC-5* ћелија након 24 часа инкубације, само при максималној испитиваној концентрацији од  $100 \mu\text{M}$  на  $71,0 \pm 3,6\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ ). При концентрацијама

цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  и 30  $\mu\text{M}$ , након 24 часа инкубације, не долази статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 7).



**Графикон 7.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *HeLa* и *MRC-5* ћелија након 24-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Испитивани комплекси не доводе до промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије, а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* туморских ћелија после 24 часа.

Када смо испитивали ефекат комплекса *Ru-1* на *HeLa* ћелије карцинома цервикса након 48-часовне инкубације уочили смо да није било статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* ћелија приликом примене комплекса *Ru-1* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 8). Међутим, када се комплекс *Ru-1* примени под истим условима (инкубација у трајању од 24 часа) у концентрацијама од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $86,3 \pm 0,8\%$  и  $57,3 \pm 5,4\%$ ) долази до статистички значајног смањења вијабилности третираних *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 8). Приметно је да са продужењем трајања третмана (са 24 на 48 часова) статистички значајно смањење

вијабилности испитиваних *HeLa* ћелија се јавља при нижој концентрацији. За третман од 24 часа та концентрација је 100  $\mu\text{M}$  а за третман од 48 часова до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* ћелија долази при концентрацији комплекса *Ru-1* од 30  $\mu\text{M}$ .

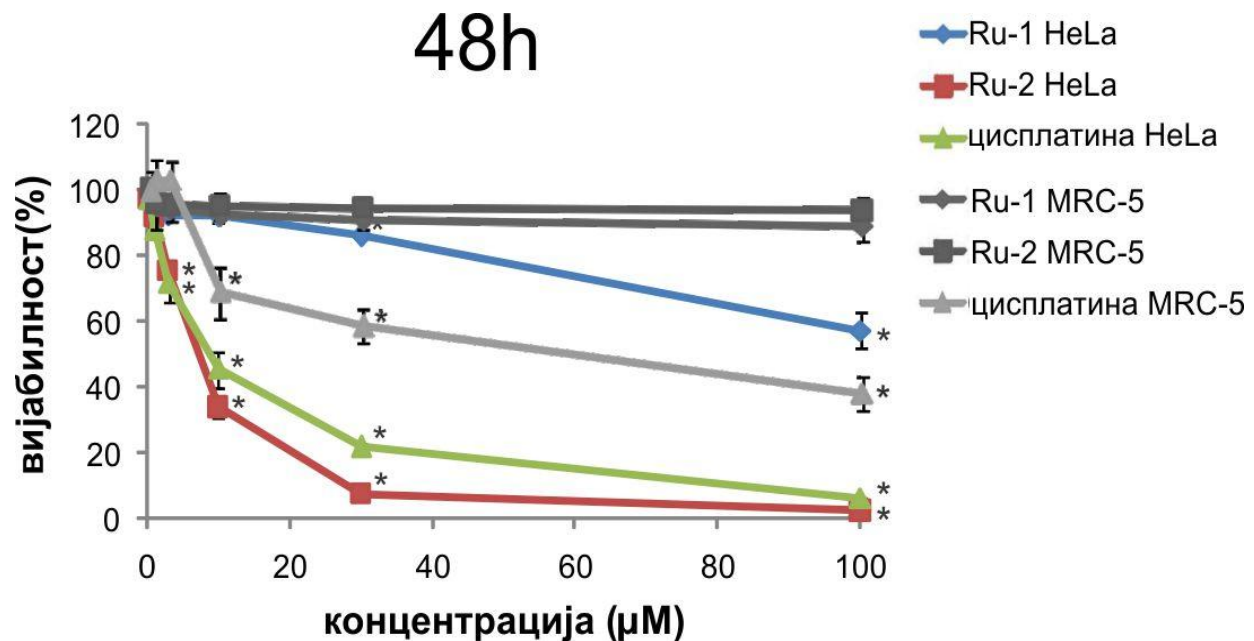
Приликом 48-часовног третмана комплексом *Ru-2* у концентрацији од 3  $\mu\text{M}$  измерено је статистички значајно смањење вијабилности *HeLa* ћелија које износи  $75,6 \pm 2,2\%$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 8). Применом виших концентрација комплекса *Ru-2* (10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) након инкубације од 48 часова такође бележимо статистички значајно смањење вијабилности *HeLa* ћелија ( $34,0 \pm 3,2\%$ ,  $7,6 \pm 0,4\%$  и  $2,3 \pm 0,4\%$ ) у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 8). При нижим концентрацијама комплекса *Ru-2* које износе 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  након култивације *HeLa* ћелија у трајању од 48 часова, не долази до статистички значајне промене вијабилности *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 8).

Након култивације *HeLa* ћелија цисплатином у трајању од 48 часова, при концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ , не долази до статистички значајне промене вијабилности *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 8). Применом цисплатине у концентрацији од 3  $\mu\text{M}$ , меримо статистички значајно смањење вијабилности *HeLa* ћелија које износи  $71,8 \pm 4,7\%$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 8). Даље повећање концентрације цисплатине, за третман који траје 48 часова, доводи до још значајнијег смањења вијабилности *HeLa* туморских ћелија, за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  износи  $45,6 \pm 5,4\%$ , за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  износи  $21,8 \pm 1,3\%$  а за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$ , износи  $6,4 \pm 0,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија. Смањење вијабилности третираних *HeLa* ћелија је статистички значајно за испитиване концентрације од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ , графикон 8).

Након 48 сати култивације *MRC-5* ћелија при концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 8).

При концентрацијима комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  након 48 часова култивације не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 8).

Приликом култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 48 сати, концентрација цисплатине од 10  $\mu\text{M}$  доводи до статистички значајног смањења вијабилности на  $66,8 \pm 7,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 8). При вишим концентрацијама цисплатине долази до даљег смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, тако да је најмања вијабилност испитиваних ћелија при концентрацији цисплатине од 100  $\mu\text{M}$ , када износи  $35,9 \pm 5,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија, а при концентрацији цисплатине од 30  $\mu\text{M}$  износи  $56,3 \pm 5,0\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 8). Није уочено статистички значајно смањење вијабилности *MRC-5* ћелија након 48 часова инкубације, при концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 8).



**Графикон 8.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *HeLa* и *MRC-5* ћелија након 48-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Испитивани комплекси не доводе до промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије, а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* туморских ћелија после 48 часова.

Наше истраживање је показало да примена комплекса *Ru-1* статистички значајно смањује вијабилност *HeLa* ћелија након 72 часа инкубације у концентрацијама већим од 3  $\mu\text{M}$  (за концентрацију од 3  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија износи  $75,1 \pm 2,1\%$ , за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  износи  $65,2 \pm 6,0\%$ , за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  износи  $60,5 \pm 4,1\%$ , а за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  износи  $43,5 \pm 6,8\%$ ) у односу на вијабилност контролних нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 9). Након култивације *HeLa* ћелија у трајању од 72 часа комплексом *Ru-1* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ , не долази до статистички значајне промене вијабилности *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 9).

Такође, примена комплекса *Ru-2* статистички значајно смањује вијабилност *HeLa* ћелија након 72 часа инкубације у концентрацијама вишим од 1  $\mu\text{M}$  и то: за концентрацију од 1  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је  $81,6 \pm 1,7\%$ ; за концентрацију од 3  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је  $69,9 \pm 4,1\%$ ; за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија је  $27,8 \pm 1,1\%$ ; за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност је  $6,4 \pm 0,6\%$ ; за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$  вијабилност испитиваних ћелија износи  $3,4 \pm 0,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 5). Приликом третмана *HeLa* ћелија комплексом *Ru-2* у концентрацији од 0,3  $\mu\text{M}$ , не долази до статистички значајне промене вијабилности *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 9).

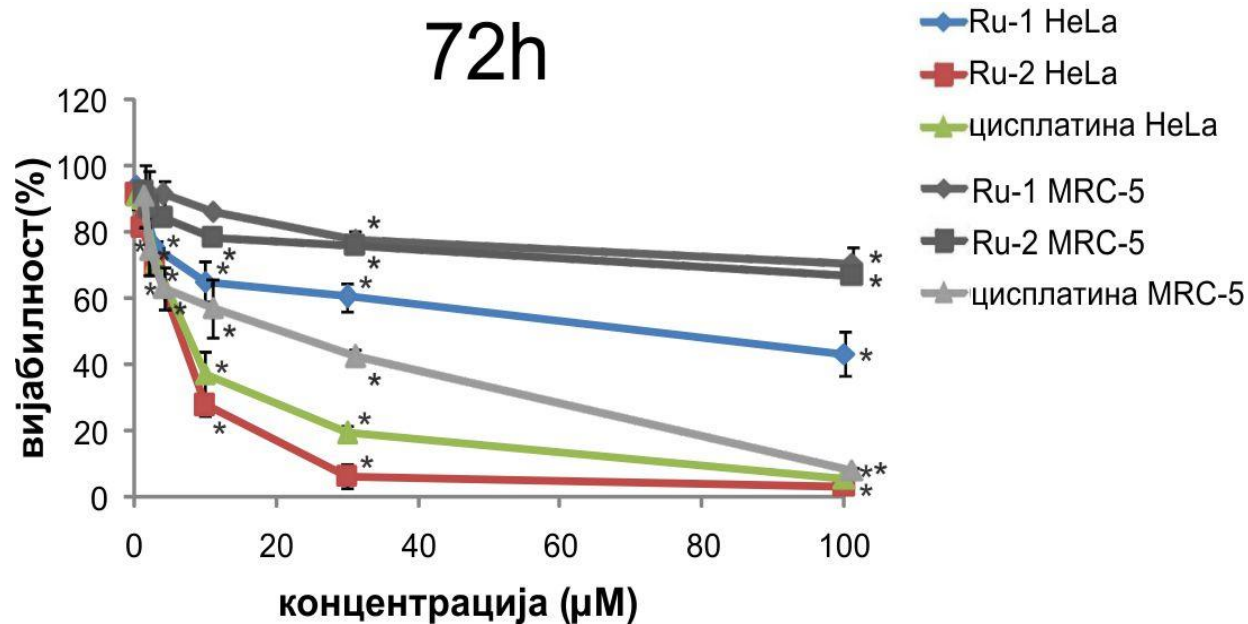
Исто тако и након 72-часовног третмана испитиваних ћелија цисплатином у концентрацијама од 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , долази до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* ћелија (за 3  $\mu\text{M}$  вијабилност је  $71,3 \pm 2,0\%$ ; за 10  $\mu\text{M}$  вијабилност је  $37,4 \pm 6,8\%$ ; за 30  $\mu\text{M}$  износи  $19,3 \pm 2,2\%$  и за 100  $\mu\text{M}$  измерена је вијабилност од  $5,5 \pm 0,1\%$ ) у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 5). Након култивације *HeLa* ћелија цисплатином у трајању од 48 часова, при концентрацијама нижим од 3  $\mu\text{M}$  (0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ ) не долази до статистички значајне промене вијабилности третираних *HeLa* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *HeLa* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 9).

При култивацији *MRC-5* ћелија у трајању од 72 часа до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија, долази при концентрацији комплекса *Ru-1* од 10  $\mu\text{M}$ , када вијабилност износи  $87,6 \pm 1,3$  % у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 9). При концентрацији комплекса *Ru-1* од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације такође долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија на  $79,2 \pm 3,8\%$  и  $71,9 \pm 3,7\%$  у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 9). При концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације, не долази статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 9).

Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија у присуству комплекса *Ru-2* концентрације од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  је долазило до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 9). При концентрацији комплекса *Ru-2* од 10  $\mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је смањена на  $79,5 \pm 4,8\%$ , при концентрацији комплекса *Ru-2* од 30  $\mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је смањена на  $77,1 \pm 3,3\%$ , а при максималној испитivanoј концентрацији од 100  $\mu\text{M}$ , вијабилност *MRC-5* ћелија је износила  $68,2 \pm 1,4\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 9). Након 72 часа инкубације *MRC-5* ћелија, при концентрацији комплекса *Ru-2* од 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , није долазило до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 9).

Након 72 часовне култивације *MRC-5* ћелија у присуству растућих концентрација цисплатине, дошло је до смањења вијабилности *MRC-5* ћелија при концентрацијама цисплатине од 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ , графикон 9). Највеће смањење вијабилности *MRC-5* ћелија било је при концентрацији цисплатине од 100  $\mu\text{M}$  када је вијабилност *MRC-5* ћелија износила  $9,2 \pm 1,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 9). Није дошло до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, након 72 часа инкубације, при концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 9).

Испитивани комплекси не доводе до промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије, а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* туморских ћелија после 72 часа.



Графикон 9. Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *HeLa* и *MRC-5* ћелија након 72-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

У табели 3 су приказане израчунате  $IC_{50}$  вредности за комплексе рутенијума, *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину на *HeLa* и *MRC-5* ћелијама. Након 24 часа култивације *HeLa* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $212,4 \pm 36,4 \mu\text{M}$ ,  $7,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$  и  $25,7 \pm 2,9 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне култивације *HeLa* ћелија са тестираним једињењима,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $120,2 \pm 13,5 \mu\text{M}$ ,  $7,4 \pm 1,6 \mu\text{M}$  и  $8,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *HeLa* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $75,5 \pm 10,4 \mu\text{M}$ ,  $6,4 \pm 1,3 \mu\text{M}$  и  $7,6 \pm 1,7 \mu\text{M}$  (Табела 3).

Након 24 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко  $300 \mu\text{M}$ , а за цисплатину  $183,7 \pm$



16,2 $\mu$ M. Такође, после 48-часовне инкубације *MRC-5* ћелија са тестираним једињењима,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300  $\mu$ M, а за цисплатину 43,1  $\pm$  8,8 $\mu$ M. Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле 192,6  $\pm$  17,2 $\mu$ M, 238,1  $\pm$  19,3 $\mu$ M и 19,7  $\pm$  6,7 $\mu$ M (Табела 3).

Добијене  $IC_{50}$  вредности нам јасно показују да испитивани комплекси не доводе до значајне промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *HeLa* туморских ћелија.

<b>HeLa</b>			
<b><math>IC_{50}(\mu M)</math></b>	<b>Ru-1</b>	<b>Ru-2</b>	<b>цисплатина</b>
<b>72h</b>	75.5 $\pm$ 10.4	6.4 $\pm$ 1.3	7.6 $\pm$ 1.7
<b>48h</b>	120.2 $\pm$ 13.5	7.4 $\pm$ 1.6	8.7 $\pm$ 1.3
<b>24h</b>	212.4 $\pm$ 36.4	7.5 $\pm$ 1.4	25.7 $\pm$ 2.9
<b>MRC-5</b>			
<b><math>IC_{50}(\mu M)</math></b>	<b>Ru-1</b>	<b>Ru-2</b>	<b>цисплатина</b>
<b>72h</b>	192.6 $\pm$ 17.2	238.1 $\pm$ 19.3	19.7 $\pm$ 6.7
<b>48h</b>	>300	>300	43.1 $\pm$ 8.8
<b>24h</b>	>300	>300	183.7 $\pm$ 16.2

Табела 3.  $IC_{50}$  вредности комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на *HeLa* и *MRC-5* ћелијама.

#### 4.1.4. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на вијабилност ћелија малигног меланома *Hs 294T*

Комплекс *Ru-1* доводи до незнатног смањења вијабилности *Hs 294T* ћелија након култивације ћелија од 24 часа. При концентрацијима комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M и 100  $\mu$ M, након 24 часа култивације, не долази до статистички значајне промене вијабилности *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 10).

Након култивације *Hs 294T* ћелија у присуству растућих концентрација комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  у трајању од 24 часа, не долази до статистички значајне промене вијабилности *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 10).

Цисплатина статистички значајно смањује вијабилност *Hs 294T* ћелија након 24 часа инкубације, само при максималној концентрацији од 100  $\mu\text{M}$  на  $70,1 \pm 0,2 \%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 10). При концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  и 30  $\mu\text{M}$ , након 24 часа инкубације, не долази до статистички значајне промене вијабилности *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p > 0,05$ ).

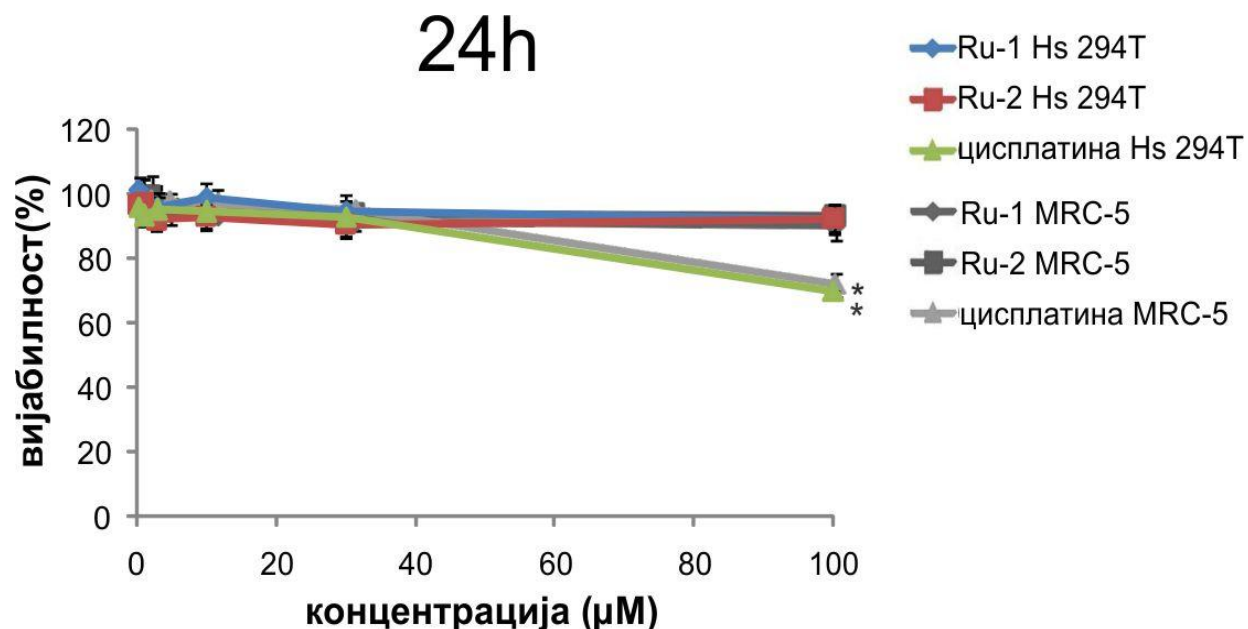
Да бисмо у потпуности испитали цитоксични ефекат комплекса рутенијума и цисплатине у истим временским интервалима (24, 48 и 72 часа), истовремено са испитивањем вијабилности ћелија малигног меланома, *Hs 294T* ћелија, испитивали смо и вијабилност здравих фибробласта, тј. *MRC-5* ћелија, које смо користили као контролу.

Током испитивања комплекса *Ru-1* у свим испитиваним концентрацијама (0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) након 24 часа култивације не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 10).

Након култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 24 часа, у присуству растућих концентрација комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 10).

Цисплатина статистички значајно смањује вијабилност *MRC-5* ћелија након 24 часа инкубације, само при максималној испитиваној концентрацији од 100  $\mu\text{M}$  на  $71,0 \pm 3,6 \%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 1). При концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  и 30  $\mu\text{M}$ , након 24 часа инкубације, не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 10).

Испитивани комплекси не доводе до промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије али не делују ни на туморске ћелије односно не доводе до статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* туморских ћелија после 24 часа.



**Графикон 10.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *Hs 294T* и *MRC-5* ћелија након 24-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Након култивације од 48 часова *Hs 294T* ћелија са *Ru-1* комплексом, до статистички значајног смањења вијабилности је дошло при концентрацији комплекса *Ru-1* од 10 µM, где је измерена вијабилност *Hs 294T* ћелија била  $83,0 \pm 0,1$  % у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 11). То смањење вијабилности је било дозно зависно, јер је при концентрацијама комплекса *Ru-1* од 30 µM вијабилност била  $77,0 \pm 2,7$ %, а при концентрацији од 100 µM вијабилност била  $72,3 \pm 3,6$ % у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 11). Приметно је да са продужењем трајања третмана (са 24 на 48 часова) статистички значајно смањење вијабилности испитиваних *Hs 294T* ћелија се јавља при нижој концентрацији. За третман од 24 часа ни концентрација комплекса *Ru-1* од 100 µM није доводила до смањења вијабилности испитиваних ћелија, а за третман од 48 часова до статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* ћелија долази при концентрацији комплекса *Ru-1* од 10 µM. При концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3 µM, 1 µM и 3µM након култивације *Hs 294T* ћелија у трајању од 48 часова, не долази до статистички значајне промене вијабилности *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 11).

Исти тренд примећујемо и приликом испитивања цитотоксичног ефекта комплекса *Ru-2* у трајању од 48 часова. До статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* испитиваних ћелија долази при концентрацији од 30  $\mu\text{M}$ ; измерено је смањење вијабилности на  $82,2 \pm 2,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 11). Такође, примећено је статистички значајно смањење вијабилности *Hs 294T* ћелија након 48 часова инкубације са комплексом *Ru-2*, у концентрацији од 100  $\mu\text{M}$  на  $74,2 \pm 1,6\%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 11). Приликом примене комплекса *Ru-2* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  током третмана од 48 часова није дошло до статистички значајног смањења вијабилности испитиваних ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 11).

Испитивањем цитотоксичног ефекта цисплатине током третмана у трајању од 48 часова уочава се да при концентрацији цисплатине од 10  $\mu\text{M}$  долази до статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* ћелија и да оно износи  $53,5 \pm 1,2\%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 11). При концентрацијама цисплатине од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , то смањење вијабилности *Hs 294T* ћелија које је статистички значајно износи  $47,4 \pm 1,1\%$  и  $22,3 \pm 1,7\%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 11). Након култивације *Hs 294T* ћелија цисплатином у трајању од 48 часова, при концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$ , нема статистички значајне промене вијабилности *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 11).

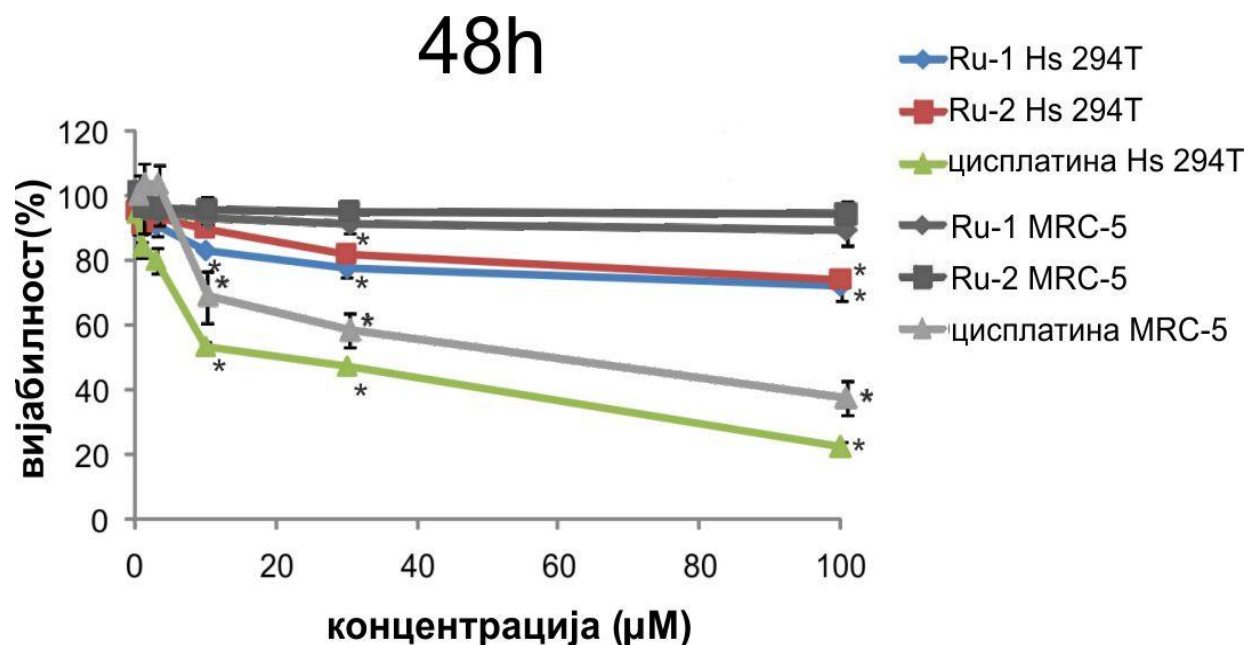
Након 48 сати култивације *MRC-5* ћелија при концентрацијама комплекса *Ru-1* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 11).

При концентрацијима комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  након 48 часова култивације не долази до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 11).

Приликом култивације *MRC-5* ћелија у трајању од 48 сати, концентрација цисплатине од 10  $\mu\text{M}$  доводи до статистички значајног смањења вијабилности на  $66,8 \pm 7,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 11). При

вишим концентрацијама цисплатине долази до даљег смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, тако да је најмања вијабилност испитиваних ћелија при концентрацији цисплатине од 100  $\mu\text{M}$ , када износи  $35,9 \pm 5,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија, а при концентрацији цисплатине од 30  $\mu\text{M}$  износи  $56,3 \pm 5,0\%$  у односу на вијабилност нетретираних ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 11). Није уочено статистички значајно смањење вијабилности *MRC-5* ћелија након 48 часова инкубације, при концентрацијама цисплатине од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 11).

Испитивани комплекси не доводе до промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* туморских ћелија после 48 часова.



**Графикон 11.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *Hs 294T* и *MRC-5* ћелија након 48-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

Када смо испитивали ефекат комплекса *Ru-1* на *Hs 294T* ћелије малигног меланома након 72-часовне инкубације уочили смо да није било статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* ћелија приликом примене комплекса *Ru-1* у концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон

12). Међутим, када се комплекс *Ru-1* примени под истим условима (инкубација у трајању од 72 часа) у концентрацијама од 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$  ( $80,2 \pm 8,3\%$ ,  $70,5 \pm 4,4\%$  и  $61,9 \pm 3,2\%$ ) долази до статистички значајног смањења вијабилности третираних *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 12).

Приликом 72-часовног третмана комплексом *Ru-2* у концентрацији од 10  $\mu\text{M}$  измерено је статистички значајно смањење вијабилности *Hs 294T* ћелија које износи  $82,3 \pm 2,0\%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 12). Применом виших концентрација комплекса *Ru-2* (30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) након инкубације од 72 часа такође бележимо смањење вијабилности *Hs 294T* ћелија ( $71,9 \pm 4,3\%$  и  $67,0 \pm 9,0\%$ ) у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 12). При нижим концентрацијама комплекса *Ru-2* од 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  и 3  $\mu\text{M}$  након култивације *Hs 294T* ћелија у трајању од 72 часа, не долази до статистички значајне промене вијабилности *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 12).

Након култивације *Hs 294T* ћелија цисплатином у трајању од 72 часа, при концентрацијама од 0,3  $\mu\text{M}$  и 1  $\mu\text{M}$ , не долази до статистички значајне промене вијабилности *Hs 294T* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 12). Применом цисплатине у концентрацији од 3  $\mu\text{M}$ , меримо статистички значајно смањење вијабилности *Hs 294T* ћелија које износи  $63,4 \pm 4,2\%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 12). Даље повећање концентрације цисплатине, за третман који траје 72 часа, доводи до још значајнијег смањења вијабилности *Hs 294T* туморских ћелија; за концентрацију од 10  $\mu\text{M}$  износи  $54,8 \pm 1,3\%$ , за концентрацију од 30  $\mu\text{M}$  износи  $34,6 \pm 1,7\%$ , а за концентрацију од 100  $\mu\text{M}$ , износи  $15,9 \pm 1,8\%$  у односу на вијабилност нетретираних *Hs 294T* ћелија. Смањење вијабилности третираних *Hs 294T* ћелија је статистички значајно за све три испитиване концентрације ( $p < 0,05$ , графикон 12).

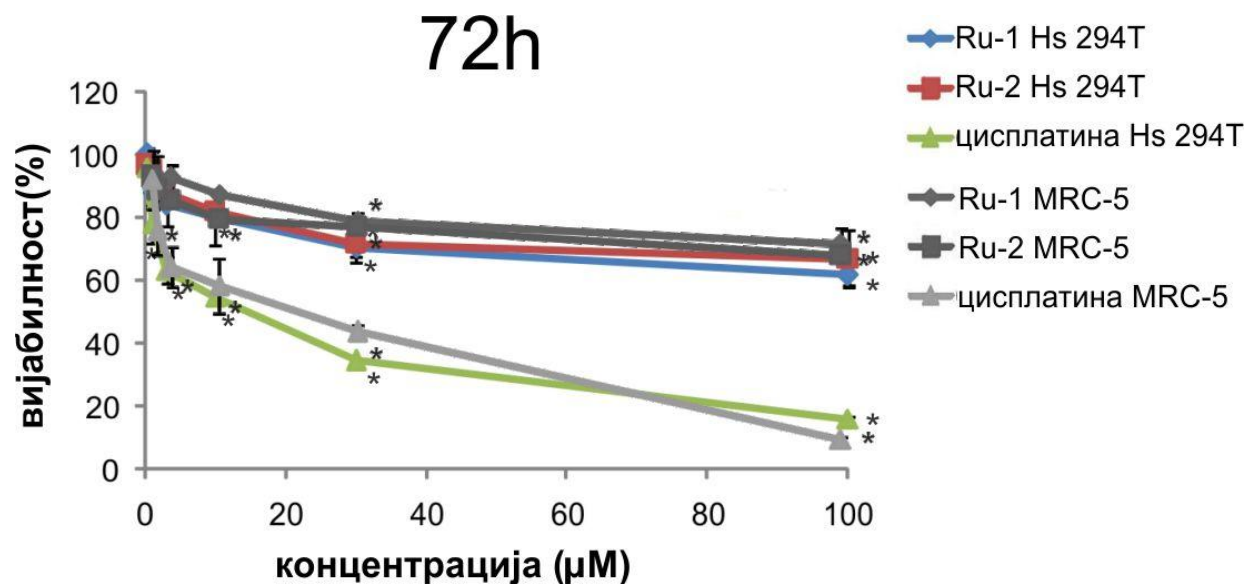
При култивацији *MRC-5* ћелија у трајању од 72 часа до статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија, долази при концентрацији комплекса *Ru-1* од 10  $\mu\text{M}$ , када вијабилност износи  $87,6 \pm 1,3\%$  у односу на контролну групу нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 12). При концентрацији комплекса *Ru-1* од 30  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације такође долази до статистички значајне промене вијабилности

*MRC-5* ћелија на  $79,2 \pm 3,8\%$  и  $71,9 \pm 3,7\%$  у односу на вијабилност контролне групе нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 12). При концентрацијама комплекса *Ru-1* од  $0,3 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$  и  $3 \mu\text{M}$ , након 72 часа инкубације, не долази статистички значајне промене вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 12).

Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија у присуству комплекса *Ru-2* концентрације од  $10 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$  и  $100 \mu\text{M}$  је долазило до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 12). При концентрацији комплекса *Ru-2* од  $10 \mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је смањена на  $79,5 \pm 4,8\%$ , при концентрацији комплекса *Ru-2* од  $30 \mu\text{M}$  вијабилност *MRC-5* ћелија је смањена на  $77,1 \pm 3,3\%$ , а при максималној испитиваној концентрацији од  $100 \mu\text{M}$ , вијабилност *MRC-5* ћелија је износила  $68,2 \pm 1,4\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 12). Након 72 часа инкубације *MRC-5* ћелија, при концентрацији комплекса *Ru-2* од  $0,1 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$  и  $3 \mu\text{M}$ , није долазило до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 12).

Након 72 часовне култивације *MRC-5* ћелија у присуству растућих концентрација цисплатине, дошло је до смањења вијабилности *MRC-5* ћелија при концентрацијама цисплатине од  $3 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $30 \mu\text{M}$  и  $100 \mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ , графикон 12). Највеће смањење вијабилности *MRC-5* ћелија било је при концентрацији цисплатине од  $100 \mu\text{M}$  када је вијабилност *MRC-5* ћелија износила  $9,2 \pm 1,1\%$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 12). Није дошло до статистички значајног смањења вијабилности *MRC-5* ћелија, након 72 часа инкубације, при концентрацијама цисплатине од  $0,3 \mu\text{M}$  и  $1 \mu\text{M}$  у односу на вијабилност нетретираних *MRC-5* ћелија ( $p > 0,05$ , графикон 12).

Испитивани комплекси не доводе до промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* туморских ћелија после 72 часа.



**Графикон 12.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на вијабилност *Hs 294T* и *MRC-5* ћелија након 72-часовног третмана. \*  $p < 0,05$

У табели 4 су приказане израчунате  $IC_{50}$  вредности за комплексе рутенијума, *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину на *Hs 294T* и *MRC-5* ћелијама. Након 24 часа култивације *Hs 294T* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* преко 300 µM, а за цисплатину је износила  $124,2 \pm 14,6 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне култивације *Hs 294T* ћелија са тестираним једињењима,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $247,8 \pm 21,0 \mu\text{M}$ ,  $231,6 \pm 33,8 \mu\text{M}$  и  $21,3 \pm 5,5 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *Hs 294T* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $179,6 \pm 27,9 \mu\text{M}$ ,  $183,1 \pm 17,1 \mu\text{M}$  и  $13,8 \pm 6,2 \mu\text{M}$  (Табела 4).

Након 24 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300 µM, а за цисплатину  $183,7 \pm 16,2 \mu\text{M}$ . Такође, после 48-часовне инкубације *MRC-5* ћелија са тестираним једињењима,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300 µM, а за цисплатину  $43,1 \pm 8,8 \mu\text{M}$ . Након 72 часа култивације *MRC-5* ћелија са испитиваним супстанцама,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $192,6 \pm 17,2 \mu\text{M}$ ,  $238,1 \pm 19,3 \mu\text{M}$  и  $19,7 \pm 6,7 \mu\text{M}$  (Табела 4).

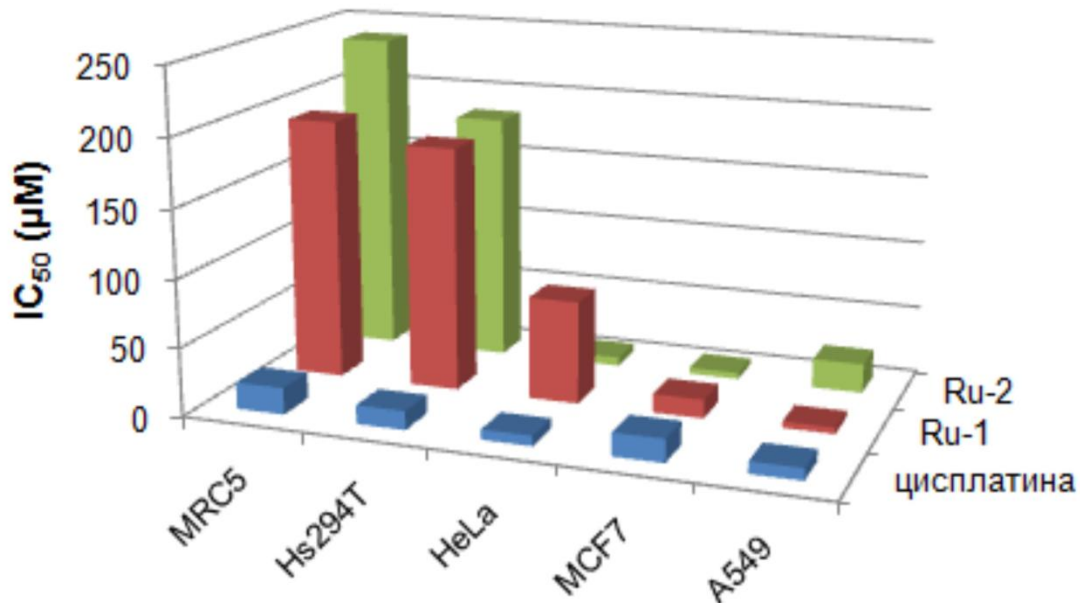


Добијене  $IC_{50}$  вредности нам јасно показују да испитивани комплекси не доводе до значајне промене вијабилности тј. немају дејство на здраве ћелије а делују на туморске ћелије доводећи до статистички значајног смањења вијабилности *Hs 294T* туморских ћелија. Ипак, испитивани комплекси смањују вијабилност туморских *Hs 294T* ћелија при знатно вишим  $IC_{50}$  вредностима него што је то случај код претходно испитиваних *A549*, *MCF7* и *HeLa* туморских ћелија (Табеле 1-4).

<b>Hs 294T</b>			
<b><math>IC_{50}(\mu M)</math></b>	<b>Ru-1</b>	<b>Ru-2</b>	<b>цисплатина</b>
<b>72h</b>	179.6 ± 27.9	183.1 ± 17.1	13.8 ± 6.2
<b>48h</b>	247.8 ± 21.0	231.6 ± 33.8	21.3 ± 5.5
<b>24h</b>	>300	>300	124.2 ± 14.6
<b>MRC-5</b>			
<b><math>IC_{50}(\mu M)</math></b>	<b>Ru-1</b>	<b>Ru-2</b>	<b>цисплатина</b>
<b>72h</b>	192.6 ± 17.2	238.1 ± 19.3	19.7 ± 6.7
<b>48h</b>	>300	>300	43.1 ± 8.8
<b>24h</b>	>300	>300	183.7 ± 16.2

Табела 4.  $IC_{50}$  вредности комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на *Hs 294T* и *MRC-5* ћелијама.

Сумарно,  $IC_{50}$  вредности за комплексе рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине су израчунате коришћењем резултата МТТ теста. Ове  $IC_{50}$  вредности након 72 часа култивације *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T* туморских ћелија, као и здравих фибробласта *MRC-5* су приказане и графички на графикону 13.



**Графикон 13.** Вредности  $IC_{50}$  за комплексе рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатину примењених на ћелијској линији малигно неизмењених фибробласта *MRC-5* и туморским ћелијским линијама *Hs 294T*, *HeLa*, *MCF7* и *A549*.

## 4.2. Комплекси рутенијума(II) смањују вијабилност туморских ћелија индукцијом апоптозе

Резултати МТТ теста у нашем истраживању су показали да комплекси рутенијума(II) смањују вијабилност одређених туморских ћелија и стога је следећи корак у нашем истраживању био да се испита којим типом ћелијске смрти се индукује смрт туморских ћелија третираних испитиваним комплексима. Туморске ћелије су третиране концентрацијом одговарајућих рутенијум(II) комплекса која смањује вијабилност туморских ћелија за 50% ( $IC_{50}$ ) после 24 часа третмана и на тој популацији ћелија је анализиран доминантан тип ћелијске смрти индукован рутенијум(II) комплексима, користећи методу *Annexin V/7AAD* бојења ћелија и мерећи проценат апоптотичних и некротичних ћелија у тој популацији третираних ћелија проточном цитометријом. Узрок смањења вијабилности туморских ћелија је испитиван и применом цисплатине на туморске ћелије, која је коришћена као референтни лек, односно као позитивна контрола

јер се цисплатина користи као хемиотерапеутик у терапији великог броја карцинома (116-118). Након три независна експеримента, добили смо следеће резултате.

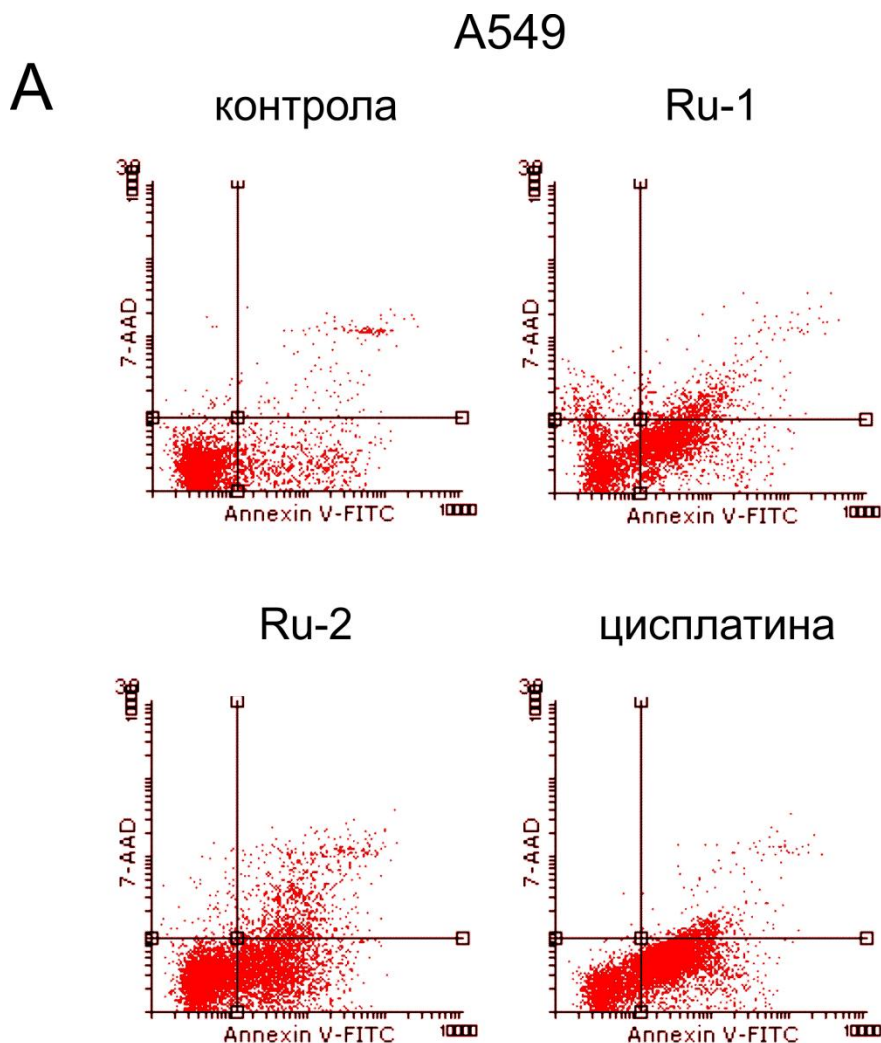
#### **4.2.1. Комплекси рутенијума и цисплатина индукују апоптозу на ћелијама епителног аденокарцинома плућа A549**

Контролне нетретирание ћелије епителног аденокарцинома плућа A549, као и ћелије третиране  $IC_{50}$  вредностима Ru-1, Ru-2 и цисплатином, су након 24 часа инкубације са испитиваним супстанцама бојене Annexin V-FITC-ом и 7AAD-ом и FACS анализом је одређиван проценат апоптотичних ћелија у односу на укупну популацију третираних ћелија.

У контролној популацији нетретираних ћелија епителног аденокарцинома плућа A549, 11,44% од укупне популације ћелија је било у стадијуму ране апоптозе, 4,41% ћелија је било у стадијуму касне апоптозе, а незнатан проценат ћелија, односно 0,28% ћелија, је било некротично. Очекивано, највећи проценат ћелија и то 83,87% је било вијабилно.

Наше истраживање је показало да примена комплекса Ru-1 статистички значајно смањује вијабилност и индукује апоптозу A549 ћелија. Комплекс Ru-1 у концентрацији од 55,3  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  вредност за Ru-1 је после 24 часа третмана смањило вијабилност A549 ћелија на 37,97%, од чега је било 56,29% апоптотичних ћелија, а 5,74% некротичних ћелија. Од укупне популације ћелија третираних Ru-1 комплексом, 44,46% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 11,83% у фази касне апоптозе.

Након третмана A549 ћелија са концентрацијом комплекса Ru-2 од 25,1  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  вредност за Ru-2 после 24 часа третмана, 51,14% ћелија је било вијабилно. Детектовано је 47,37% апоптотичних ћелија и то 35,12% ћелија у фази ране апоптозе и 12,25% ћелија у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је било 1,49% некротичних ћелија (графикон 14).



**Б**

	% A549 ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
Рана апоптоза	11,44	44,46	35,12	61,86
Некроза	0,28	5,74	1,49	0,16
Касна апоптоза	4,41	11,83	12,25	6,15

**Графикон 14.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на тип смрти ћелија епителног аденокарцинома плућа *A549* након 24 часа третмана након  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине у поређењу са контролном популацијом нетретираних ћелија. **A** Горњи леви квадрант-некротичне ћелије, горњи десни квадрант-ћелије у фази касне апоптозе, доњи леви квадрант-вијабилне ћелије, доњи десни квадрант-ћелије у фази

ране апоптозе. **Б** Процент ћелија у одређеној фази ћелијске смрти. Вредности у табели представљају аритметичку средину три независна експеримента.

Примена цисплатине у концентрацији од 27,2  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  вредност за цисплатину након 24 часа инкубације *A549* ћелија, смањује вијабилност испитиваних ћелија на 31,84%. У овој концентрацији, цисплатина индукује апоптозу 68% ћелија при чему је 61,86% ћелија у стадијуму ране апоптозе, а 6,15% ћелија у стадијуму касне апоптозе. Такође, било је 0,16% некротичних ћелија од укупне популације испитиваних ћелија (графикон 14).

#### **4.2.2. Комплекса рутенијума и цисплатина индукују апоптозу на ћелијама карцинома дојке *MCF7***

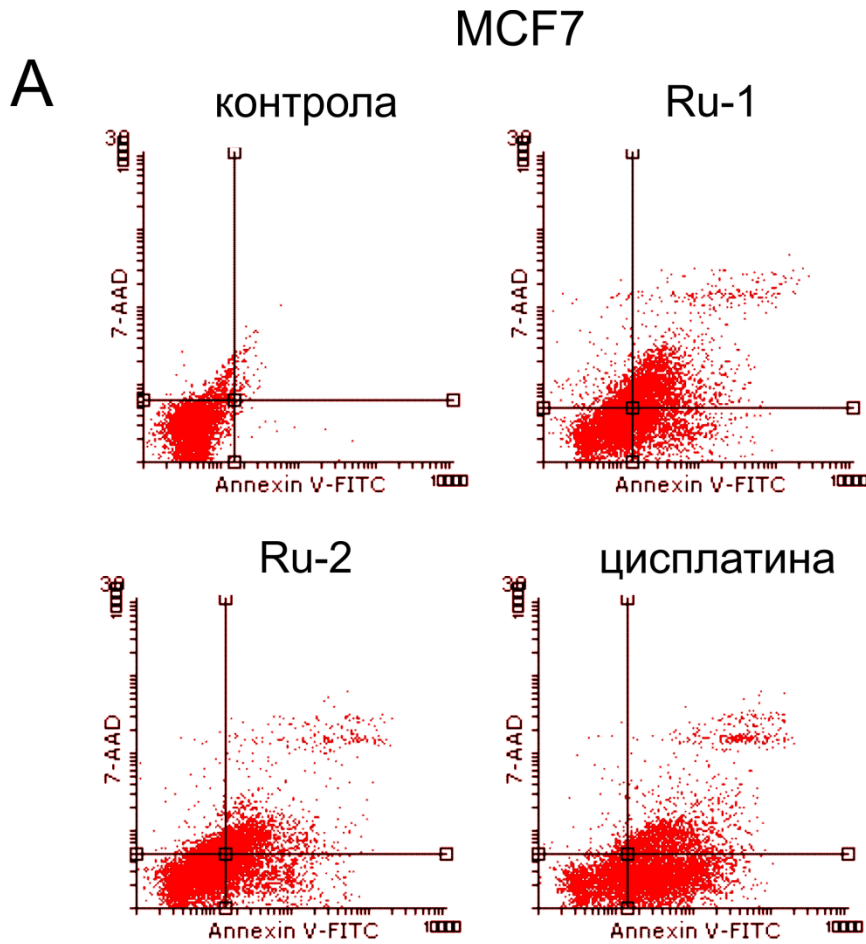
Код контролне популације нетретираних ћелија карцинома дојке *MCF7*, након 24 часа инкубације у медијуму за раст ћелијске културе, проценат вијабилних ћелија је износио 92,66%, апоптотичних ћелија је било 2,33%, а некротичних ћелија је било 5,01%. Од укупног броја ћелија, 0,72% је било у стадијуму ране апоптозе, а 1,62% у стадијуму касне апоптозе.

Наше истраживање је показало да примена комплекса *Ru-1* статистички значајно смањује вијабилност ћелија карцинома дојке, односно *MCF7* ћелија у односу на вијабилност нетретираних *MCF7* ћелија. Комплекс *Ru-1* у концентрацији од 102,4  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  вредност за *Ru-1* је после 24 часа третмана смањио вијабилност *MCF7* ћелија на 40,61%, од чега је било 49,11% апоптотичних ћелија, а 10,27% некротичних ћелија. Од укупне популације ћелија, 19,22% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 29,88% ћелија у фази касне апоптозе.

Након третмана *MCF7* ћелија у концентрацији комплекса *Ru-2* од 13,9  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  вредност за *Ru-2* после 24 часа, 53,78% ћелија је било вијабилно. Детектовано је 37,19% апоптотичних ћелија и то 17,29% ћелија у фази ране апоптозе и 19,89% ћелија у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је детектовано и 9,03% некротичних ћелија.

Примена цисплатине у концентрацији од 94,11  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  вредност за цисплатину након 24 часа инкубације *MCF7* ћелија, смањује вијабилност испитиваних ћелија на 26,46%. У овој концентрацији, цисплатина индукује апоптозу 71,11% ћелија при чему је 49,38% ћелија у стадијуму ране апоптозе, а 21,74% ћелија у стадијуму касне

апоптозе. Такође, било је 2,42% некротичних ћелија од укупне популације испитиваних ћелија (графикон 15).



**B**

	% MCF7 ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
Рана апоптоза	0,72	19,22	17,29	49,38
Некроза	5,01	10,28	9,03	2,42
Касна апоптоза	1,62	29,88	19,89	21,74

**Графикон 15.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на тип смрти ћелија карцинома дојке *MCF7* након 24 часа третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине у поређењу са контролном популацијом нетретираних ћелија. **A** Горњи леви квадрант-некротичне ћелије, горњи десни квадрант-ћелије у фази касне апоптозе, доњи леви квадрант-вијабилне ћелије, доњи десни квадрант-ћелије у фази ране апоптозе. **B** Процент ћелија у

одређеној фази ћелијске смрти. Вредности у табели представљају аритметичку средину три независна експеримента.

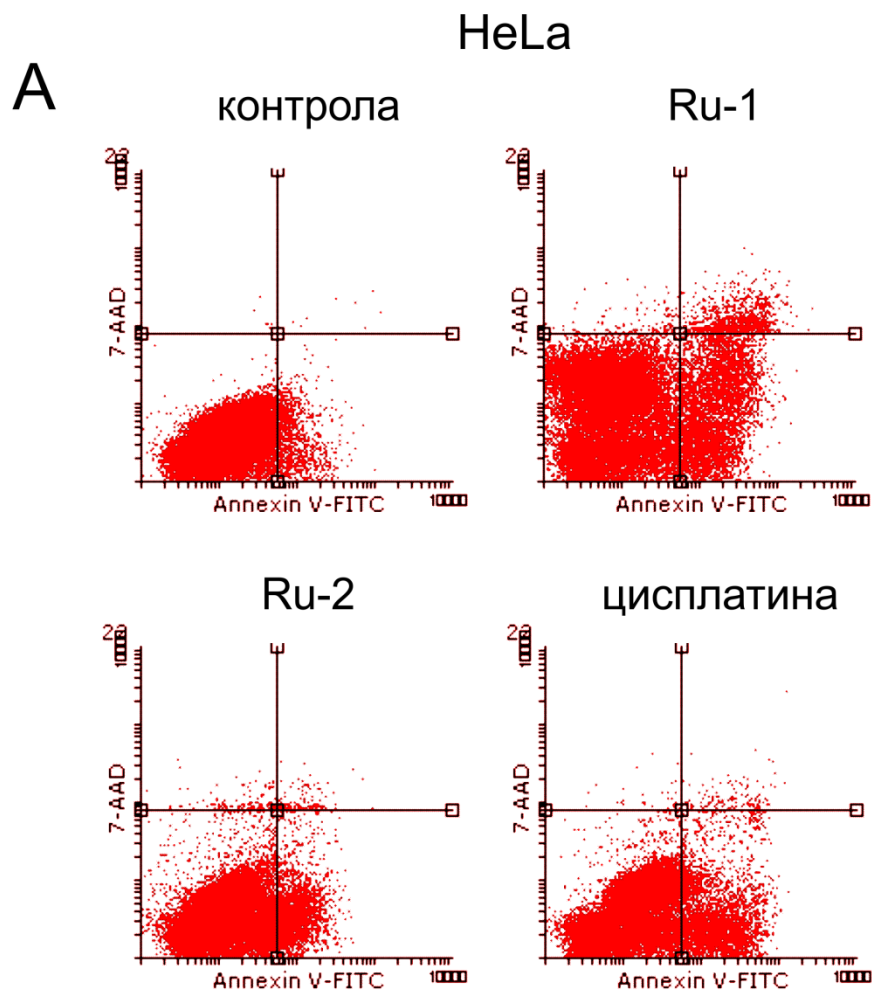
#### **4.2.3. Комплекси рутенијума и цисплатина индукују апоптозу на ћелијама карцинома цервикса *HeLa***

Код контролне популације нетретираних ћелија карцинома цервикса *HeLa*, након 24 часа инкубације у медијуму за раст ћелијске културе, проценат вијабилних ћелија је износио 95,24%, апоптотичних ћелија је било 4,73%, а некротичних ћелија је било 0,03% ћелија. Од укупног броја ћелија, 4,70% ћелија је било у стадијуму ране апоптозе, а 0,03% ћелија у стадијуму касне апоптозе.

Резултати нашег истраживања су показали да примена комплекса *Ru-1*, као и комплекса *Ru-2* и цисплатине статистички значајно смањује вијабилност ћелија карцинома цервикса, односно *HeLa* ћелија. Комплекс *Ru-1* у концентрацији од 212,4  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  вредност за *Ru-1*, је после 24 часа смањио вијабилност *HeLa* ћелија на 51,71%, од чега је било 46,87% апоптотичних ћелија, а 1,41% некротичних ћелија. Од укупне популације ћелија, 43,76% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 3,11% ћелија у фази касне апоптозе.

Након третмана *HeLa* ћелија у концентрацији комплекса *Ru-2* од 7,5  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  вредност за *Ru-2* после 24 часа, 61,92% ћелија је било вијабилно. Детектовано је 37,34% апоптотичних ћелија и то 36,85% ћелија у фази ране апоптозе и 0,5% ћелија у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је детектовано и 0,74% некротичних ћелија.

Примена цисплатине у концентрацији од 25,7  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  вредност за цисплатину након 24 часа инкубације *HeLa* ћелија, смањује вијабилност испитиваних ћелија на 58,09%. У овој концентрацији, цисплатина индукује апоптозу 41,73% ћелија при чему је 41,24% ћелија у стадијуму ране апоптозе, а 0,5% ћелија у стадијуму касне апоптозе. Такође, било је 0,18% некротичних ћелија од укупне популације испитиваних ћелија (графикон 16).



**Б**

	% HeLa ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
Рана апоптоза	4,70	43,76	36,85	41,24
Некроза	0,03	1,41	0,74	0,18
Касна апоптоза	0,03	3,11	0,50	0,50

**Графикон 16.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на тип смрти ћелија карцинома цервикса *HeLa* након 24 часа третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине у поређењу са контролном популацијом нетретираних ћелија. **А** Горњи леви квадрант-некротичне ћелије, горњи десни квадрант-ћелије у фази касне апоптозе, доњи леви квадрант-вијабилне ћелије, доњи десни квадрант-ћелије у фази ране апоптозе. **Б** Процент ћелија у



одређеној фази ћелијске смрти. Вредности у табели представљају аритметичку средину три независна експеримента.

#### **4.2.4. Комплекси рутенијума и цисплатина индукују апоптозу на ћелијама малигног меланома *Hs 294T***

Код контролне популације нетретираних ћелија малигног меланома *Hs 294T*, након 24 часа инкубације у медијуму за раст ћелијске културе, проценат вијабилних ћелија је износио 95,86%, апоптотичних ћелија је било 5,02%, а некротичних ћелија је било 0,12%. Од укупног броја ћелија, 4,28% је било у стадијуму ране апоптозе, а 0,74% у стадијуму касне апоптозе.

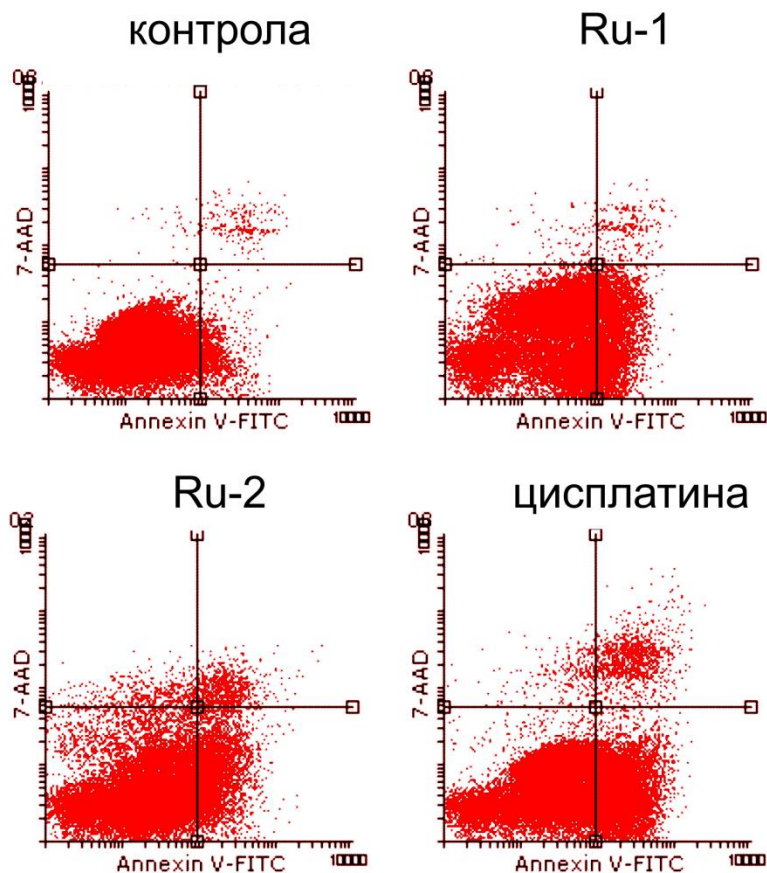
Комплекс *Ru-1* у концентрацији од 300  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  вредност за *Ru-1* је после 24 часа смањило вијабилност *Hs 294T* ћелија малигног меланома на 63,57%, од чега је било 35,93% апоптотичних ћелија, а 0,5% некротичних ћелија. Од укупне популације *Hs 294T* ћелија, 35,18% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 0,75% ћелија у фази касне апоптозе.

Након третмана *Hs 294T* ћелија у концентрацији комплекса *Ru-2* од 300  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  вредност за *Ru-2* после 24 часа, 67,88% *Hs 294T* ћелија је било вијабилно. Детектовано је 29,87% апоптотичних ћелија и то 27,59% у фази ране апоптозе и 2,28% у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је детектовано и 2,25% некротичних ћелија.

Примена цисплатине у концентрацији од 124,2  $\mu\text{M}$  која представља  $IC_{50}$  вредност за цисплатину након 24 часа инкубације *Hs 294T* ћелија, смањује вијабилност испитиваних ћелија малигног меланома *Hs 294T* на 63%. У овој концентрацији, цисплатина индукује апоптозу 35,89% ћелија при чему је 32,02% ћелија у стадијуму ране апоптозе, а 3,87% ћелија у стадијуму касне апоптозе. Такође, постоји 1,1% некротичних ћелија од укупне популације испитиваних *Hs 294T* ћелија (графикон 17).

## Hs 294T

**A**

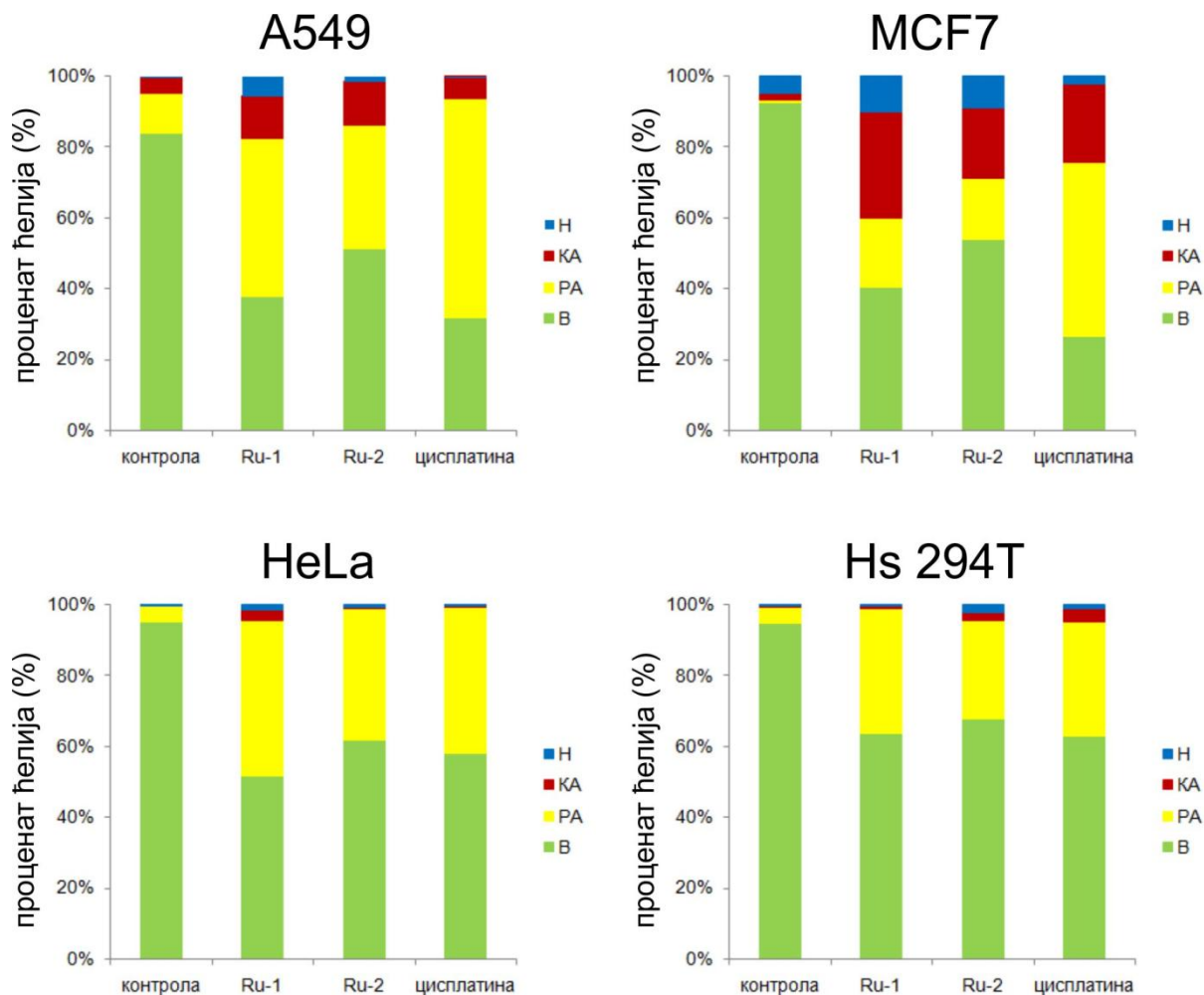


**Б**

	% Hs294T ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
Рана апоптоза	4,28	35,18	27,59	32,02
Некроза	0,12	0,50	2,25	1,10
Касна апоптоза	0,74	0,75	2,28	3,87

**Графикон 17.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на тип смрти ћелија малигног меланома *Hs 294T* након 24 часа третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине у поређењу са контролном популацијом нетретираних ћелија. **A** Горњи леви квадрант-некротичне ћелије, горњи десни квадрант-ћелије у фази касне апоптозе, доњи леви квадрант-вијабилне ћелије, доњи десни квадрант-ћелије у фази ране апоптозе. **Б** Процент ћелија у одређеној фази ћелијске смрти. Вредности у табели представљају аритметичку средину три независна експеримента.

Графички приказ процента вијабилних, апоптотичних и некротичних ћелија након третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине на *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T* туморским ћелијама је приказан на графикаону 18.



**Графикон 18.** Процент вијабилних, апоптотичних и некротичних туморских ћелија *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T* након 24-часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине у поређењу са контролном популацијом нетретираних ћелија. B- вијабилне ћелије, PA- ћелије у фази ране апоптозе, KA- ћелије у фази касне апоптозе, H- некротичне ћелије.

Резултати нашег истраживања су показали да након 24-часовног третмана туморских ћелија *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T*  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, долази до индукције апоптозе у туморским ћелијама, а приликом третмана здравих фибробласта *MRC-5* под истим условима (исто трајање инкубације и при истој

концентрацији испитиваних комплекса рутенијума) не долази до смањења вијабилности здравих фибробласта, односно ћелија које нису туморске.

### **4.3. Комплекси рутенијума(II) утичу на ћелијски циклус туморских ћелија**

До смањења вијабилности туморских ћелија третираних одређеним антитуморским агенсима може доћи услед активације апоптозе у туморским ћелијама, услед застоја у некој од фаза ћелијског циклуса у туморским ћелијама, или услед оба наведена механизма (147). Резултати МТТ теста нашег истраживања су показали да комплекси рутенијума(II) смањују вијабилност испитиваних туморских ћелија индукцијом апоптозе. Наредни корак у нашем истраживању је био да се испита да ли и на који начин комплекси рутенијума(II) утичу на проценат ћелија које се налазе у различитим фазама ћелијског циклуса, односно да ли долази до заустављања раста ћелија у некој од фаза ћелијског циклуса. Контролна група ћелија су биле нетретиране туморске ћелије. Све испитиване туморске ћелије смо третирали одговарајућим рутенијум(II) комплексима у концентрацији која смањује вијабилност туморских ћелија за 50% ( $IC_{50}$ ) после 24 часа третмана. У третираној популацији ћелија, као и у популацији нетретираних ћелија (контрола) смо анализирали проценат ћелија које се налазе у  $G0/G1$ ,  $S$  и  $G2/M$  фази користећи проточну цитометрију методом бојења ћелија пропидијум јодидом. Такође, испитивали смо ефекат цисплатине на ћелијски циклус третираних туморских ћелија. Цисплатина је и у овом случају била референтни лек, односно позитивна контрола. Након три независна експеримента, добили смо следеће резултате.

#### **4.3.1. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус *A549* ћелија епителног аденокарцинома плућа**

У контролној популацији нетретираних *A549* ћелија, након 24 часа се 68,49% ћелија налази у  $G0/G1$  фази ћелијског циклуса, 15,06% ћелија је у  $S$ -фази а 16,44% ћелија је у  $G2/M$  фази ћелијског циклуса.

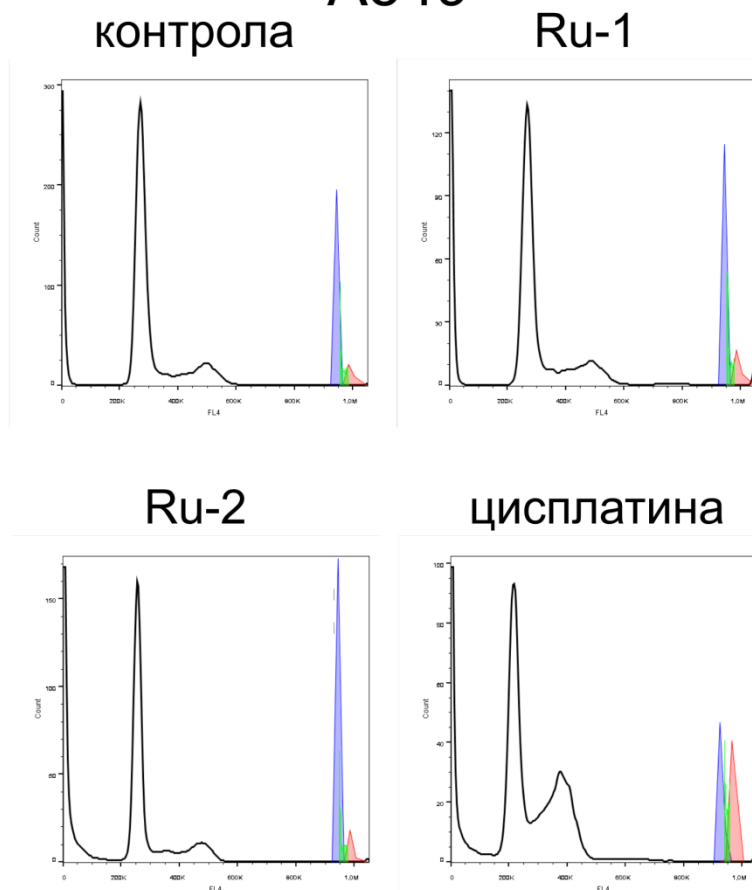
Комплекс *Ru-1* у концентрацији од 55,3  $\mu$ M је после 24 часа довео до застоја у  $G2/M$  фази ћелијског циклуса код *A549* ћелија епителног аденокарцинома плућа што за последицу има статистички значајно повећање процента ћелија које се налазе у  $G2/M$  фази

у односу на нетретираних ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 18). Процент *A549* третираних ћелија *Ru-1* комплексом које су у *G2/M* фази ћелијског циклуса је износио 25,6%, у *S*-фази их је било 13,44%, а у *G0/G1* фази је било 60,96% ћелија након 24 часа култивације (Графикон 18).

Након третмана *A549* ћелија *Ru-2* комплексом у концентрацији од 25,1  $\mu\text{M}$  после 24 часа такође је дошло до акумулације ћелија у *G2/M* фази ћелијског циклуса код *A549* ћелија што је проузроковало статистички значајно повећање процента ћелија које се налазе у *G2/M* фази у односу на проценат ћелија код нетретираних туморских ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 18). Процент *A549* ћелија након 24-часовног третмана комплексом *Ru-2* у *G2/M* фази ћелијског циклуса је износио 28,19%, у *S*-фази их је било 14,63%, а у *G0/G1* фази је било 57,17% ћелија.

Примена цисплатине у концентрацији од 27,2  $\mu\text{M}$  након 24 часа инкубације код *A549* третираних ћелија узрокује застој у *G2/M* фази ћелијског циклуса и проузрокује статистички значајно повећање процента ћелија које се налазе у *G2/M* фази ћелијског циклуса у односу на нетретираних ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 18). Процент *A549* ћелија у *G2/M* фази ћелијског циклуса након третмана цисплатином је износио 37,9%, у *S*-фази је било 23,43%, а у *G0/G1* фази је било 38,67% ћелија након 24 часа култивације (графикон 18).

Наше истраживање је показало да комплекси као и цисплатина проузрокују повећање процента ћелија у *G2/M* фази ћелијског циклуса код *A549* третираних ћелија у односу на процентат ћелија код нетретираних туморских ћелија.

**A****A549****Б**

	% A549 ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
G0/G1	68,49	60,96	57,17	38,67
S	15,06	13,44	14,63	23,43
G2/M	16,44	25,60	28,19	37,90

**Графикон 18.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на фазе ћелијског циклуса ћелија аденокарцинома плућа *A549* после 24 часа третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине. **А** Хистограми репрезентују проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса контролне популације ћелија и ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине. Плавом бојом су означене ћелије у *G0/G1* фази ћелијског циклуса, зеленом бојом у *S*-фази, а црвеном бојом су означене ћелије у *G2/M* фази ћелијског циклуса. **Б** Процент ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса.

#### 4.3.2. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус *MCF7* ћелија карцинома дојке

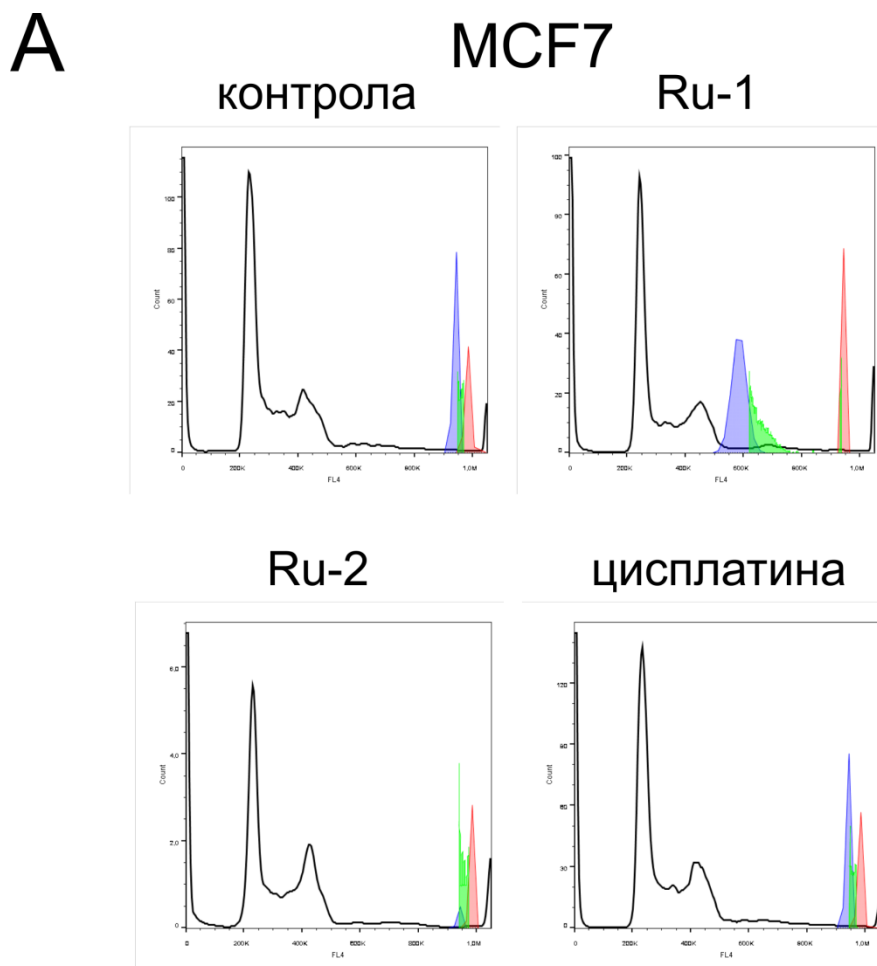
У контролној популацији нетретираних *MCF7* ћелија, након 24 часа инкубације у медијуму се 56,95% ћелија налази у *G0/G1* фази ћелијског циклуса, 18,29% ћелија је у *S*-фази а 24,76% ћелија је у *G2/M* фази ћелијског циклуса.

Третман *MCF7* ћелија карцинома дојке комплексом *Ru-1* у концентрацији од 102,4  $\mu\text{M}$  је после 24 часа доводио до застоја у *G0/G1* фази ћелијског циклуса и до статистички значајног повећања процента ћелија које се налазе у *G0/G1* фази у односу на нетретирание ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 19). Процент ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса *MCF7* ћелија је износио 62,98%, у *S*-фази их је било 17,5%, а у *G2/M* фази је било 19,51% ћелија након 24 часа култивације.

Након дејства комплекса *Ru-2* на *MCF7* ћелије у концентрацији од 13,9  $\mu\text{M}$  после 24 часа није дошло до статистички значајне промене процента ћелија које су се налазиле у различитим фазама ћелијског циклуса у односу на нетретирание ћелије ( $p > 0,05$ , графикон 19). Процент *MCF7* ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса након третмана комплексом *Ru-2* је износио 52,59%, у *S*-фази их је било 22,11%, а у *G2/M* фази је било 25,29% ћелија након 24 часа култивације.

Примена цисплатине у концентрацији од 94,11  $\mu\text{M}$  након 24 часа инкубације *MCF7* ћелија карцинома дојке узрокује застој у *G2/M* фази ћелијског циклуса третираних ћелија и доводи до статистички значајног повећања процента ћелија које се налазе у *G2/M* фази ћелијског циклуса у односу на нетретирание *MCF7* ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 19). Процент ћелија у *G2/M* фази ћелијског циклуса *MCF7* ћелија након третмана цисплатином је износио 32%, у *S*-фази их је било 24,24%, а у *G0/G1* фази је било 43,76% ћелија након 24 часа култивације (графикон 19).

Наше истраживање је показало да комплекси проузрокују повећање процента ћелија у *G0/G1* фази, а цисплатина у *G2/M* фази ћелијског циклуса код *MCF7* третираних ћелија у односу на процентат ћелија код нетретираних туморских ћелија.



**Б**

	% MCF7 ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
G0/G1	56,95	62,98	52,59	43,76
S	18,29	17,50	22,11	24,24
G2/M	24,76	19,51	25,29	32,00

**Графикон 19.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на фазе ћелијског циклуса ћелија карцинома дојке *MCF7* после 24 часа третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине. **А** Хистограми репрезентују проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса контролне популације ћелија и ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине. Плавом бојом су означене ћелије у *G0/G1* фази ћелијског циклуса, зеленом бојом у *S*-фази, а црвеном бојом су означене ћелије у *G2/M* фази ћелијског циклуса. **Б** Процент ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса.



#### 4.3.3. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус *HeLa* ћелија карцинома цервикса

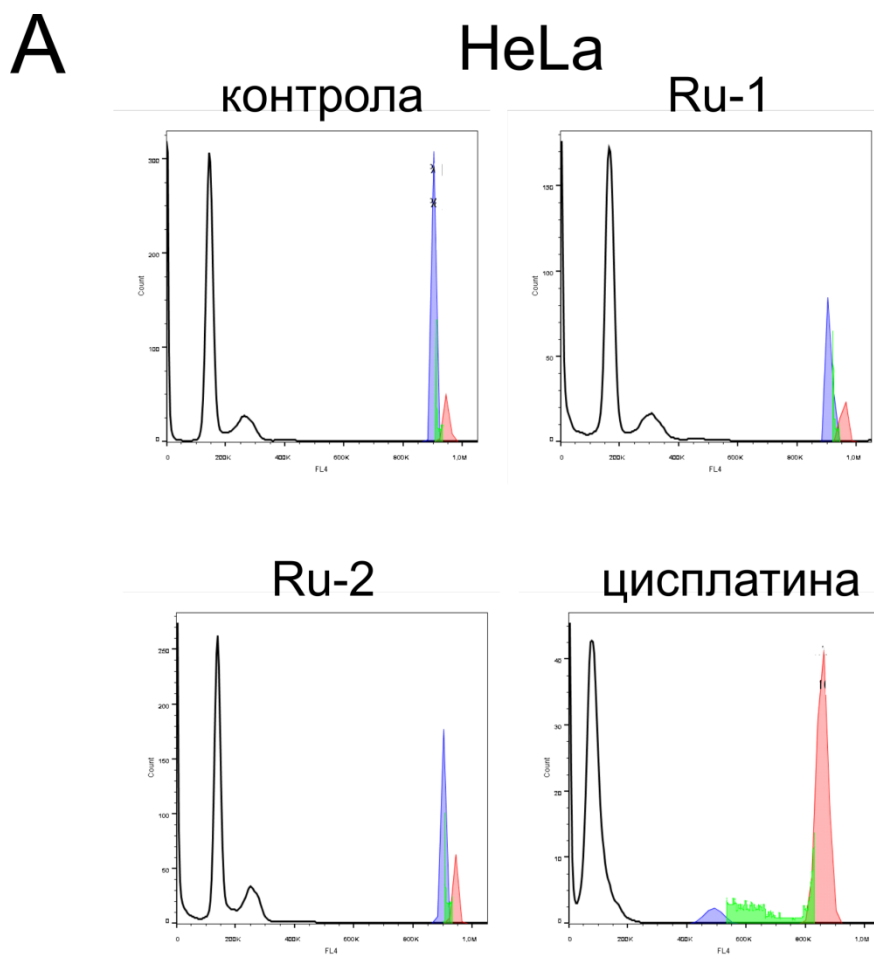
У контролној популацији нетретираних *HeLa* ћелија, након 24 часа инкубације се 71,49% ћелија налази у *G0/G1* фази ћелијског циклуса, 10,44% ћелија је у *S*-фази а 18,07% ћелија је у *G2/M* фази ћелијског циклуса.

Након третмана *HeLa* ћелија комплексом *Ru-1* у концентрацији 212,4 $\mu$ М после 24 часа није дошло до статистички значајне промене процента ћелија које су се налазиле у различитим фазама ћелијског циклуса у односу на нетретираних *HeLa* ћелије ( $p > 0,05$ , графикон 20). Процент *HeLa* ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса након третмана комплексом *Ru-1* је износио 73,26%, у *S*-фази их је било 8,84%, а у *G2/M* фази је било 17,9% ћелија након 24-часовног третмана.

Дејство комплекса *Ru-2* концентрације 7,5  $\mu$ М на *HeLa* ћелије карцинома цервикса је после 24 часа узроковало застој у *G2/M* фази ћелијског циклуса и услед тога до статистички значајног повећања процента ћелија које се налазе у *G2/M* фази у односу на нетретираних ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 20). Процент *HeLa* ћелија у *G2/M* фази ћелијског циклуса је износио 22,13%, у *S*-фази их је било 12,96%, а у *G0/G1* фази је било 64,9% ћелија након 24 часа култивације.

Примена цисплатине у концентрацији од 25,7  $\mu$ М након 24 часа инкубације *HeLa* ћелија узрокује застој у *G2/M* фази ћелијског циклуса што за последицу има статистички значајно повећање процента ћелија које се налазе у *G2/M* фази ћелијског циклуса у односу на нетретираних *HeLa* ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 20). Процент ћелија у *G2/M* фази ћелијског циклуса *HeLa* ћелија након третмана цисплатином је износио 64,95%, у *S*-фази је било 26,14%, а у *G0/G1* фази је било 8,9% ћелија након 24 часа култивације (графикон 20).

Наше истраживање је показало да комплекс *Ru-1* није проузроковао повећање процента ћелија некој од фаза ћелијског циклуса, а комплекс *Ru-2* и цисплатина су проузроковали повећање процента ћелија у *G2/M* фази ћелијског циклуса код *HeLa* третираних ћелија у односу на процентат ћелија код нетретираних туморских ћелија.



# Б

	% HeLa ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
G0/G1	71,49	73,26	64,90	8,90
S	10,44	8,84	12,96	26,14
G2/M	18,07	17,90	22,13	64,95

**Графикон 20.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на фазе ћелијског циклуса ћелија карцинома цервикса *HeLa* после 24 часа третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине. **А** Хистограми репрезентују проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса контролне популације ћелија и ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине. Плавом бојом су означене ћелије у *G0/G1* фази ћелијског циклуса, зеленом бојом у *S*-фази, а црвеном бојом су означене ћелије у *G2/M* фази ћелијског циклуса. **Б** Процент ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса.

#### 4.3.4. Ефекат комплекса рутенијума и цисплатине на ћелијски циклус *Hs 294T* ћелија малигног меланома

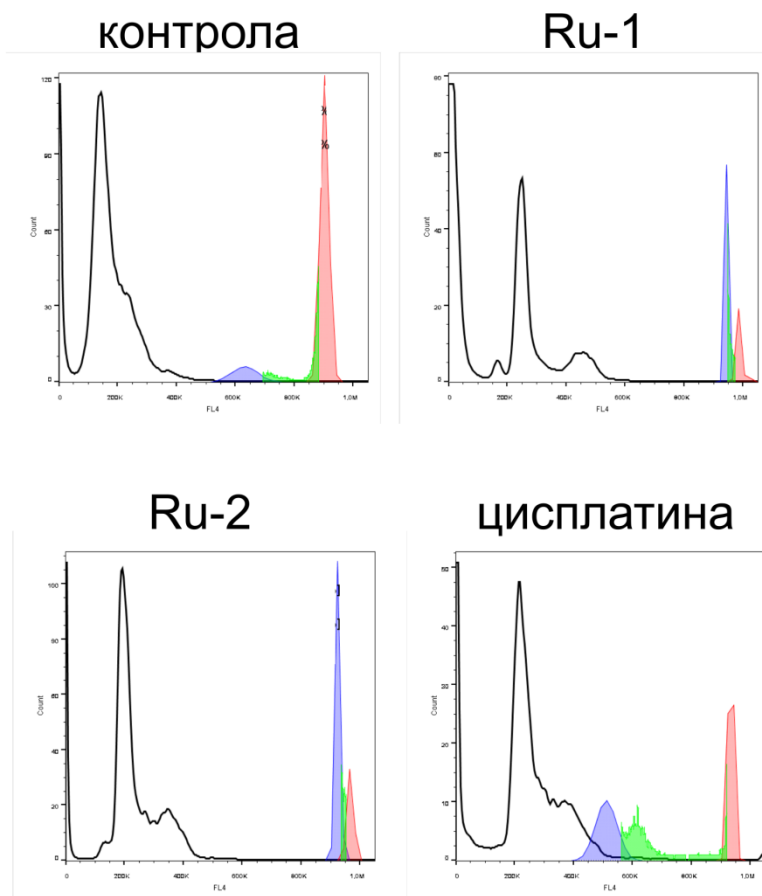
У контролној популацији нетретираних *Hs 294T* ћелија, након 24 часа 12,48% ћелија се налази у *G0/G1* фази ћелијског циклуса, 14,54% ћелија је у *S*-фази а 72,98% ћелија је у *G2/M* фази ћелијског циклуса.

Примена комплекса *Ru-1* у концентрацији од 300  $\mu\text{M}$  је после 24 часа довела до застоја у *G0/G1* фази ћелијског циклуса код *Hs 294T* ћелија малигног меланома и до статистички значајног повећања процента ћелија које се налазе у *G0/G1* фази ћелијског циклуса у односу на нетретирание ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 21). Процент *Hs 294T* ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса је износио 57,77%, у *S*-фази их је било 19,81%, а у *G2/M* фази ћелијског циклуса је било 22,42% ћелија након третмана *Ru-1* комплексом током 24 часа култивације.

Након третмана *Hs 294T* ћелија комплексом *Ru-2* од 300  $\mu\text{M}$  после 24 часа такође је дошло до акумулације ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса код *Hs 294T* ћелија малигног меланома и то се види у статистички значајном повећању процента ћелија које се налазе у *G0/G1* фази у односу на нетретирание ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 21). Процент *Hs 294T* ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса након третмана комплексом *Ru-2* је износио 62,16%, у *S*-фази их је било 12,1%, а у *G2/M* фази је било 25,75% ћелија након 24 часа култивације.

Примена цисплатине у концентрацији од 124,2  $\mu\text{M}$  након 24 часа инкубације *Hs 294T* ћелија узрокује застој у *G0/G1* фази ћелијског циклуса код *Hs 294T* ћелија малигног меланома и доводи до статистички значајног повећања процента ћелија које се налазе у *G0/G1* фази ћелијског циклуса у односу на нетретирание ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 21). Процент *Hs 294T* ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса након третмана цисплатином је износио 31,97%, у *S*-фази их је било 31,99%, а у *G2/M* фази је било 36,03% ћелија након 24 часа култивације (Графикон 21).

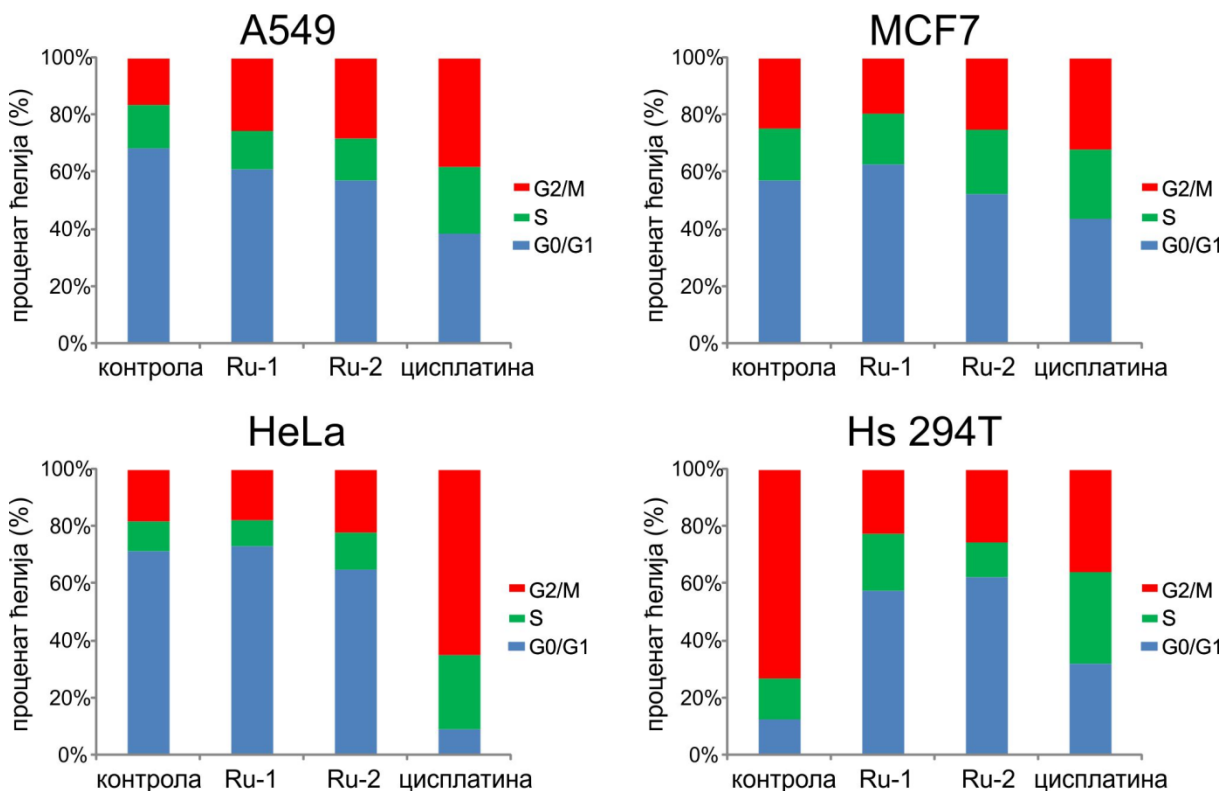
Наше истраживање је показало да комплекси као и цисплатина проузрокују повећање процента ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса код *A549* третираних ћелија у односу на процентат ћелија код нетретираних туморских ћелија.

**A****Hs 294T****B**

	% Hs 294T ћелија			
	контрола	Ru-1	Ru-2	цисплатина
G0/G1	12,48	57,77	62,16	31,98
S	14,54	19,81	12,10	31,98
G2/M	72,98	22,42	25,75	36,03

**Графикон 21.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на фазе ћелијског циклуса ћелија малигног меланома *Hs 294T* после 24 часа третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине. **A** Хистограми репрезентују проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса контролне популације ћелија и ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине. Плавом бојом су означене ћелије у *G0/G1* фази ћелијског циклуса, зеленом бојом у *S*-фази, а црвеном бојом су означене ћелије у *G2/M* фази ћелијског циклуса. **B** Процент ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса.

Графички приказ процента ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса након 24-часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатине на *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T* туморским ћелијама је приказан и графички на графикону 22.



**Графикон 22.** Процент туморских ћелија *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T* у различитим фазама ћелијског циклуса након 24-часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине у поређењу са контролном популацијом нетретираних ћелија.

Смањење вијабилности туморских ћелија под дејством супстанци које делују цитотоксично може настати услед индукције апоптозе туморских ћелија, инхибиције пролиферације туморских ћелија због заустављања ћелијског циклуса, или може настати због комбинације ова два механизма (148). Резултати нашег истраживања су показали да након 24-часовног третмана  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатином у поређењу са контролном популацијом нетретираних ћелија долази до застоја у некој од фаза ћелијског циклуса, што је један од механизма деловања антитуморских лекова.

#### 4.4. Комплекси рутенијума индукују апоптозу туморских ћелија активацијом унутрашњег, митохондријалног сигналног пута апоптозе

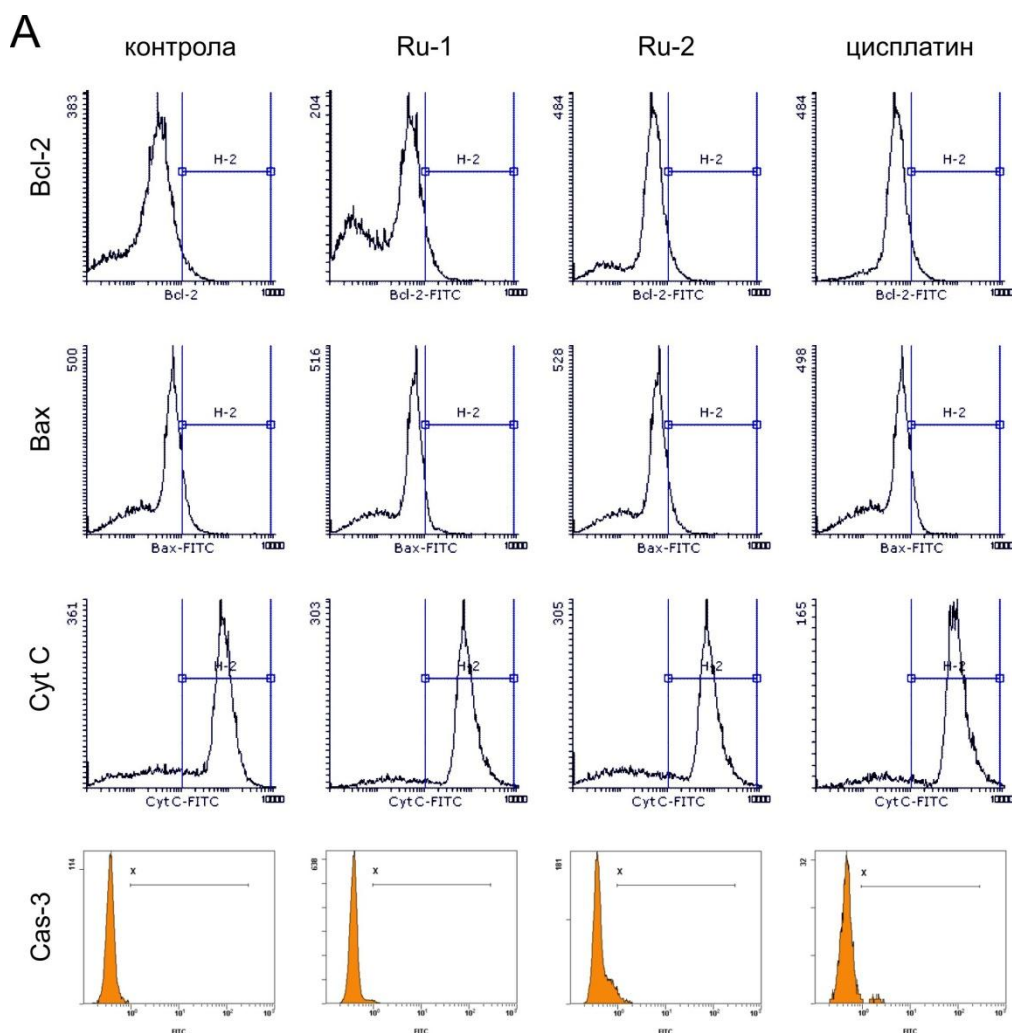
Досадашња истраживања су показала да постоје два главна сигнална пута апоптозе (Zhao 2012). Спољашњи пут апоптозе укључује активацију „рецептора смрти“ (енг. *death receptor*) и иницијаторске каспазе-8. Унутрашњи или митохондријални сигнални пут апоптозе може да се, између осталог, активира различитим апоптотичним стимулусима што доводи до поремећаја равнотеже у експресији између проапоптотичних протеина као што је *Bax* и антиапоптотичних протеина као што је *Bcl-2* у корист проапоптотичних протеина. Када се јави, дисбаланс у експресији ових протеина доводи до транслокације *Bax* из цитоплазме у спољашњу митохондријалну мембрану, што доводи до повећања пропустљивости митохондријалне мембране, ослобађања цитохрома *c* из међумембранског простора митохондрија у цитоплазму, активације каспаза 9 и 3 и последичне индукције апоптозе (149, 150). У нашем истраживању, испитиван је ефекат  $IC_{50}$  концентрација комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа инкубације *HeLa* ћелија, на експресију и активацију кључних протеина укључених у регулацију процеса апоптозе: *Bax*, *Bcl-2*, цитохром *c* и каспазу-3. Механизам апоптозе смо испитивали бојењем *HeLa* ћелија третираних  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине и нетретираних *HeLa* ћелија специфичним примарним и секундарним антителима за *Bax*, *Bcl-2*, цитохром *c* и каспазу-3. Ниво експресије и активације ових протеина одређиван је мерењем просечног интензитета флуоресценције (енг. *MFI - mean fluorescence intensity*) као и одређивањем процента ћелија које емитују флуоресценцију за одговарајуће специфично антитело коришћењем проточне цитометрије.

Наши резултати су показали да комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатина доводе до статистички значајног повећања просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) тј. експресије активног проапоптотичног протеина *Bax* код третираних у односу на нетретиране ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 23). Просечан интензитет флуоресценције за активни *Bax* је износио 188,4 у контролној популацији нетретираних *HeLa* ћелија, док је код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа износио 227,9, 207,1 и 377,6.

Тачније, код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа је дошло до повећања експресије за активни проапоптотични протеин *Bax* за 20,9%, 9,9% и 100,4% у односу на ниво експресије *Bax*-а у нетретираним ћелијама.

Поред тога, терапија *HeLa* ћелија комплексима рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатином доводе до статистички значајног смањења просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за антиапоптотични протеин *Bcl-2* код третираних у односу на нетретирание ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 23). Просечан интензитет флуоресценције за антиапоптотични протеин *Bcl-2* је износио 196 у контролној популацији нетретираних *HeLa* ћелија, док је код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа износио 189,8, 165,4 и 165,8. Тачније, код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа је дошло до смањења експресије за антиапоптотични протеин *Bcl-2* за 3,2%, 15,6% и 15,4% у односу на ниво експресије за *Bcl-2* код нетретираних ћелија.

Пораст просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за проапоптотични протеин *Bax* и смањење просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за антиапоптотични протеин *Bcl-2* код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа доводи и до статистички значајног смањења односа *Bcl-2/Bax* у поређењу са контролном популацијом нетретираних *HeLa* ћелија ( $p < 0,05$ , графикон 23). Овај однос *Bcl-2/Bax* је код контролне популације нетретираних *HeLa* ћелија износио 1,04, а код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа износио 0,83, 0,8 и 0,44. Тачније, код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа је дошло до смањења односа *Bcl-2/Bax* за 20,2%, 23,1% и 57,6% у односу на нетретирание ћелије.



**B**

HeLa	Bcl-2	Bax	Bcl2/Bax Ratio	Cyt C	Cas-3
	MFI	MFI		MFI	%
контрола	196,0	188,4	1,04	897,5	1,9
Ru-1	189,8	227,9	0,83	994,2	9,1
Ru-2	165,4	207,1	0,80	971,8	15,7
цисплатин	165,8	377,6	0,44	1214,5	11,3

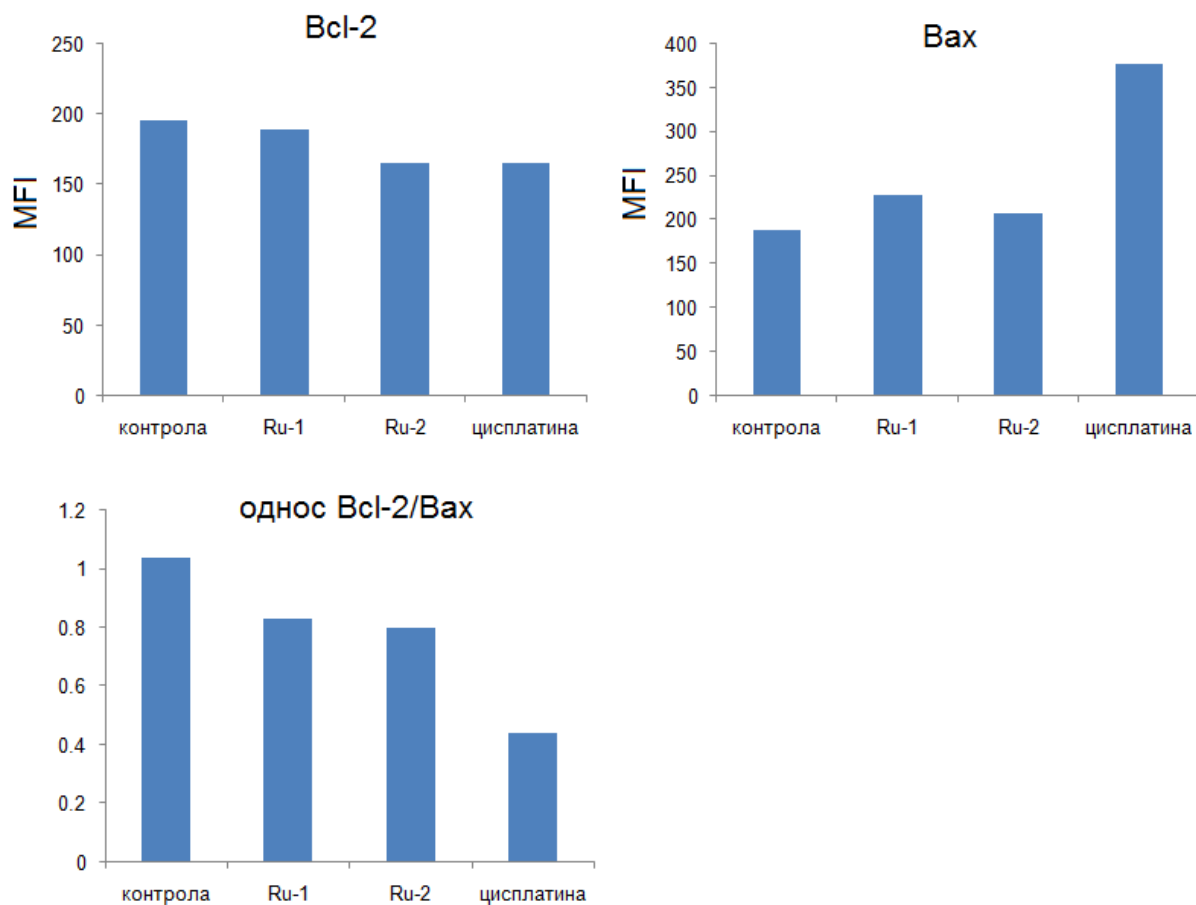
**Графикон 23.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на експресију и активацију кључних молекула укључених у регулацију процеса апоптозе *HeLa* туморских ћелија после 24 часа третмана  $IC_{50}$  вредностима комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине. **A** Репрезентативни хистограми који показују *MFI* вредности протеина *Bax*, *Bcl-2* и цитохрома *c* и процене ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3. **B** Измерене *MFI* вредности за протеине *Bax*, *Bcl-2* и цитохром *c*, *Bcl-2/Bax* количник, као и проценат ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3.



Дејство комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на туморске ћелије доводи до статистички значајног повећања просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за цитохром *c* код третираних *HeLa* ћелија у односу на нетретиране *HeLa* ћелије после 24 часа третмана ( $p < 0,05$ , графикон 23). Просечан интензитет флуоресценције за цитохром *c* је износио 897,5 у контролној популацији нетретираних *HeLa* ћелија, док је код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* као и цисплатине после 24 часа износио 994,2, 971,8 и 1214,5.

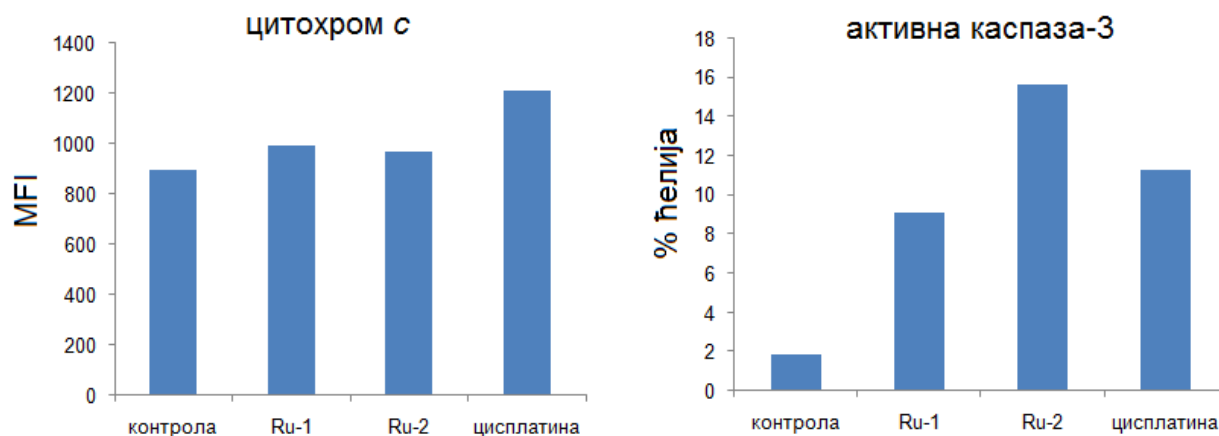
Смањење односа *Bcl-2/Bax* и повећање просечног интензитета флуоресценције за цитохром *c* су јасан показатељ индукције апоптозе туморских ћелија третираним комплексима рутенијума и то специфично активацијом унутрашњег, митохондријалног апоптотичног пута. Стога смо желели да испитамо да ли је у процес апоптозе туморских ћелија индукованом комплексима рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* укључена и активна ефекторска каспаза-3. Примена комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на туморске ћелије доводи до статистички значајног повећања процента ћелија које емитују флуоресценцију, тј. код којих долази до повећања експресије активне каспазе-3, код третираних у односу на нетретиране ћелије ( $p < 0,05$ , графикон 23). Процент ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3 је износио 1,9% у контролној популацији нетретираних *HeLa* ћелија, док је код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* и цисплатине после 24 часа износио 9,1%, 15,7% и 11,3% (графикон 23).

Графички приказ експресије кључних протеина укључених у процес апоптозе у третираним и нетретираним *HeLa* ћелијама је приказан на графиконима 24 и 25. На графикону 24 се јасно уочава смањење експресије за протеин *Bcl-2* и повећање експресије за протеин *Bax* код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* и цисплатином у односу на експресију ових протеина код контролне популације нетретираних *HeLa* ћелија након 24-часовног третмана. Такође се уочава смањење количника *Bcl-2/Bax* код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* и цисплатином у односу на овај количник код контролне популације нетретираних *HeLa* ћелија након 24-часовног третмана (графикон 24).



**Графикон 24.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на експресију и активацију кључних молекула укључених у процес апоптозе *HeLa* туморских ћелија. Репрезентативни дијаграми који показују *MFI* вредности протеина *Bax* и *Bcl-2* као и *Bcl-2/Bax* количник после 24 часа третмана *HeLa* туморских ћелија  $IC_{50}$  вредностима комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине.

На графикону 25 се уочава повећање експресије за цитохром *c* и повећање процента ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3 код *HeLa* ћелија које су третиране  $IC_{50}$  концентрацијама комплекса рутенијума *Ru-1*, *Ru-2* и цисплатином у односу на експресију, односно проценат ћелија код контролне популације нетретираних *HeLa* ћелија након 24-часовног третмана.



**Графикон 25.** Ефекат комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине на експресију и активацију кључних молекула укључених у процес апоптозе *HeLa* туморских ћелија. Репрезентативни дијаграми који показују *MFI* вредности цитохрома *c* и процене ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3, после 24 часа третмана *HeLa* туморских ћелија  $IC_{50}$  вредностима комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине.

Резултати нашег истраживања су показали да комплекси *Ru-1* и *Ru-2* ефикасније смањују вијабилност туморских ћелија у односу на цисплатину, односно делују при нижим  $IC_{50}$  вредностима у односу на цисплатину. Комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* немају ниске  $IC_{50}$  вредности на ћелијској линији малигно неизмењених фибробласта *MRC-5*, односно не делују на здраве ћелије за разлику од цисплатине, чиме се „штеде” ћелије здравог ткива. Стога би требало да, у клиничкој примени, наши новосинтетисани комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* испоље мање нежељених дејстава у односу на цисплатину. Такође, комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* селективно смањују вијабилност туморских ћелија индукцијом унутрашњег, митохондријалног пута апоптозе и деловањем на ћелијски циклус туморских ћелија. На тај начин, комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* смањују вијабилност туморских ћелија и непосредно након третмана индукцијом апоптозе, али и спречавањем брзог одвијања ћелијског циклуса и његовим успоравањем, успоравају и бујање туморског ткива и повећање апсолутног броја туморских ћелија.

## 5. Дискусија

Тумори представљају један од највећих здравствених проблема, како у свету тако и у нашој земљи. Познато је да су карциноми водећи узрок смрти у развијеним земљама, док се у земљама у развоју налазе на другом месту, одмах иза кардиоваскуларних болести (2). Такође, и у Србији је последњих година забележен значајан пораст инциденце и морталитета оболелих од канцера, као и алармантно високе стопе морталитета оболелих од различитих типова канцера у односу на остатак Европе (4). Претпоставља се да молекуларни механизми који доводе до процеса канцерогенезе захтевају присуство неколико сукцесивних мутација на молекулу ДНК са којима ћелије не могу да се изборе (2). Услед таквих мутација на молекулу ДНК, долази до поремећаја експресије, локализације и активности регулаторних молекула у ћелији одговорних за физиолошко одвијање програмиране ћелијске смрти или ћелијског циклуса (4, 5).

Неки од регулаторних молекула чија је експресија, локализација и активност веома значајна у процесу програмиране ћелијске смрти су проапоптотични протеин *Bax* и антиапоптотични протеин *Bcl-2*. Код малигнух тумора, најчешће долази до убрзане деобе ћелија и спречавања апоптозе код малигно измењених ћелија услед смањене активности проапоптотичног протеина *Bax* и повећања цитоплазматске експресије антиапоптотичног протеина *Bcl-2*. Један од циљева антитуморске терапије је, између осталог, и да се изазове процес програмиране ћелијске смрти код малигно измењених ћелија, чиме би се смањила популација малигно измењених ћелија. Повећање активације проапоптотичног протеина *Bax* и смањење цитоплазматске концентрације антиапоптотичног протеина *Bcl-2* услед дејства антитуморских агенаса би довело до отпуштања цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму, последично активирајући нисходну каскаду каспаза које доводе до активације каспазе-3 и апоптозе туморских ћелија (82). Такође, након деобе већина ћелија прави „паузу“ или су у фази мировања у којој ћелија физиолошки може функционисати у различитом временском периоду, месецима, данима или годинама. Код туморских ћелија, фаза мировања је или скраћена или практично не постоји (1).

Актуелна антитуморска терапија највећег броја карцинома укључује примену лекова који изазивају озбиљна нежељена дејства код пацијената на којима се ти лекови апликују. Поред тога, код великог броја пацијената долази до појаве резистенције тумора

на примењене цитостатике (15). Такође, данас се примени платинских металокомплекса у терапији малигнух тумора приписује и индукција леукемије (151, 152). Стога је проналажење нових антитуморских агенаса који могу ефикасније и са мање нежељених дејстава да доведу до ремисије малигнитета, један од императива савремене медицине (15).

У овом истраживању је прво испитиван ефекат два новосинтетисана рутенијум(II) комплекса, комплекса *Ru-1* [Ru(Cl-Ph-tpy)(*o*-pda)Cl]Cl (Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, *o*-pda = *o*-fenilendiamin) и комплекса *Ru-2* [Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)Cl]Cl(Cl-Ph-tpy = 4-(4'-hlorofenil)-2,2',6',2''-terpiridin, phen = 1,10-fenantrolin) на вијабилност различитих туморских ћелија као што су *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T* као и на вијабилност здравих *MRC-5* фибробласта применом МТТ теста. Оба новосинтетисана рутенијум (II) комплекса припадају групи терпиридинских комплекса рутенијума.

Карцином плућа је карцином са највећим степеном морталитета од свих малигнух тумора (5), па смо стога прво испитивали цитотоксични ефекат комплекса рутенијума на ћелијској линији карцинома плућа *A549*. Резултати нашег истраживања су показали да примена новосинтетисаних терпиридинских рутенијум(II) комплекса *Ru-1* и *Ru-2*, као и примена цисплатине, статистички значајно смањује вијабилност ћелија аденокарцинома плућа *A549* у односу на вијабилност нетретираних ћелија након 24, 48 и 72 часа култивације. Након 24 часа култивације *A549* ћелија са комплексима рутенијума, IC<sub>50</sub> вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле 55,3 ± 9,3μМ, 25,1 ± 3,3μМ и 27,2 ± 4,1μМ. После 48 часова инкубације *A549* ћелија са комплексима рутенијума, IC<sub>50</sub> вредности за комплексе *Ru-1*, *Ru-2* као и за цисплатину су износиле 9,5 ± 3,2μМ, 23,8 ± 3,8μМ и 9,5 ± 1,8μМ, а након 72 часа култивације *A549* ћелија, IC<sub>50</sub> вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле 4,6 ± 2,1μМ, 21,7 ± 4,3μМ и 8,8 ± 2,7μМ. На основу добијених IC<sub>50</sub> вредности испитиваних једињења на ћелијској линији аденокарцинома плућа *A549*, можемо да закључимо да рутенијум(II) комплекси имају следеће особине: комплекс *Ru-1* са повећањем трајања периода инкубације има ефикаснији цитотоксични ефекат на *A549* ћелијама; потребне су значајно мање концентрације овог комплекса да смање вијабилност *A549* ћелија на 50% у односу на контролу након 72 часа, у поређењу са концентрацијама истог комплекса које су потребне да смање вијабилност *A549* ћелија на 50% у односу на контролу после 24 и 48 часова

инкубације. Поред тога, потребна је два пута мања концентрација комплекса *Ru-1* у односу на концентрацију цисплатине да би дошло до смањења вијабилности *A549* ћелија за 50% у односу на контролну популацију нетретираних ћелија након 72 часа инкубације. Овај комплекс има најефикаснији цитотоксични ефекат на *A549* ћелијама од сва три испитивана једињења. За комплекс *Ru-1* су израчунате  $IC_{50}$  вредности које су ниже и од  $IC_{50}$  вредности цисплатине и од  $IC_{50}$  вредности комплекса *Ru-2* при истим дужинама трајања третмана. Концентрације комплекса *Ru-2* које смањују вијабилност *A549* ћелија за 50% у односу на контролу нису статистички значајно различите после свих испитиваних временских интервала. Такође, комплекс *Ru-2* има статистички значајно слабији цитотоксични ефекат на *A549* ћелијама након 72 часа у поређењу са цисплатином, јер је потребна два пута већа концентрација комплекса *Ru-2* да смањи вијабилност испитиваних ћелија за 50% у односу на контролу. У поређењу са комплексом *Ru-1*, потребна је четири пута већа концентрација комплекса *Ru-2* да изазове смањење вијабилности за 50% у односу на контролу.

Насупрот резултатима нашег истраживања, бензенски комплекси рутенијума(II) који садрже ароилтиоуреу нису имали значајан цитотоксичан ефекат на *A549* ћелијама (153). Од четири оваква комплекса које су синтетисали Jeualakshmi и сарадници (153), три комплекса означена као комплекс 2, комплекс 3 и комплекс 4, су имала  $IC_{50}$  вредности које су биле преко 250  $\mu\text{M}$ . Само комплекс 1 који су ови аутори синтетисали је имао  $IC_{50}$  вредност од 95,6  $\mu\text{M}$  на *A549* ћелијама, што је значајно виша концентрација од оних  $IC_{50}$  вредности које су добијене за наше новосинтетисане рутенијум (II) комплексе *Ru-1* и *Ru-2*. Jeualakshmi и сарадници су добили  $IC_{50}$  вредност 18  $\mu\text{M}$  за цисплатину на *A549* ћелијама, што је скоро два пута виша  $IC_{50}$  вредност за цисплатину са *A549* ћелијама у односу на ону  $IC_{50}$  вредност коју смо ми добили и која износи 9,5  $\mu\text{M}$ .

С друге стране, полипиридински комплекси рутенијума које су синтетисали Луо и сарадници имају значајно више  $IC_{50}$  вредности према *A549* ћелијама ( $IC_{50}$  вредност после 48 часова за комплекс рутенијума означен бројем 2 у истраживању је 157,2 $\mu\text{M}$ , а за комплекс 4 је преко 400 $\mu\text{M}$ ) у поређењу са нашим комплексима (154). Такође, потребно је истаћи да је  $IC_{50}$  вредност на *A549* ћелијама за цисплатину после 48 часова култивације код ових аутора износила 18,8  $\mu\text{M}$ , што је слично  $IC_{50}$  вредности цисплатине добијене у нашем истраживању и која износи 9,5  $\mu\text{M}$ .

Такође, Lai и сарадници су са њиховим, по структури и хемијском саставу другачијим полипиридинским рутенијум (II) комплексима, добили IC<sub>50</sub> вредности на A549 ћелијама које су упоредиве са нашим IC<sub>50</sub> вредности на A549 ћелијама (148). Четири новосинтетисана рутенијум(II) комплекса ових аутора имају IC<sub>50</sub> вредности које су износиле од 3,8 µM и 5 µM за комплексе 4 и 1 до 10 µM и 45 µM за комплексе 2 и 3. Измерена IC<sub>50</sub> вредност за цисплатину ових аутора је износила 6,3 µM и била је упоредива са IC<sub>50</sub> вредношћу за цисплатину на A549 ћелијама у нашем истраживању. Резултати Lai-ја и сарадника су показали да је само комплекс 4 имао нижу IC<sub>50</sub> вредност за A549 ћелије од IC<sub>50</sub> вредности нашег комплекса Ru-1. Сви други комплекси ових аутора су након 72 часа имали слабији цитотоксични ефекат према A549 ћелијама у односу на наш новосинтетисани терпиридински рутенијум(II) комплекс Ru-1.

Полипиридински рутенијум(II) комплекси које су синтетисали Nan и сарадници 2014. године су имали сличне IC<sub>50</sub> вредности на A549 ћелијама у поређењу са IC<sub>50</sub> вредностима наших рутенијум(II) комплекса (155). После 72 часа инкубације и у студији ових аутора је измерена слична IC<sub>50</sub> вредност за цисплатину од 7,3 ± 1,4 µM, као у нашој студији, где је износила 8,8 ± 2,7 µM. Три рутенијум(II) полипиридилска комплекса ових аутора, означени као комплекси 1-3 су имали значајно ниже IC<sub>50</sub> вредности на A549 ћелијама после 72 сата од 7,3 до 13,3 µM, у односу на наш Ru-2 комплекс који је имао IC<sub>50</sub> вредност од 21,7 µM. Ипак, за разлику од Ru-2 комплекса, наш Ru-1 комплекс је имао статистички значајно јачи цитотоксични ефекат у поређењу са комплексима Nan-а и сарадника на A549 ћелијама. Наш новосинтетисани терпиридински рутенијум(II) комплекс Ru-1 је био скоро два пута цитотоксично ефикаснији на A549 ћелијама од комплекса Nan-а и сарадника, јер је била потребна скоро два пута мања концентрација комплекса Ru-1 од 4,6 µM, у односу на концентрације комплекса 1-3, да смањи вијабилност A549 ћелија на 50% у односу на контролу после 72 сата.

Лазих и сарадници су 2016. године испитивали цитотоксични ефекат рутенијум(II) терпиридинских комплекса који се незнатно разликују од наших комплекса по хемијској структури (156). Сва четири комплекса ових аутора су имала значајно више IC<sub>50</sub> вредности у односу на терпиридинске рутенијум(II) комплексе које смо ми истраживали. На A549 ћелијама, комплекси 3 и 4 ових аутора су имали IC<sub>50</sub> вредности које су износиле преко 250 µM, комплекс 2 је имао IC<sub>50</sub> вредност од 110 µM, док је измерена IC<sub>50</sub> вредност за

комплекс 1, износила 58,4  $\mu\text{M}$ . Вредност која је смањивала вијабилност *A549* ћелија за 50% у односу на контролу (односно  $\text{IC}_{50}$  вредност) код ових аутора за цисплатину је износила 33  $\mu\text{M}$ . Оба наша терпиридинска рутенијум(II) комплекса су имала снажнији цитотоксични ефекат на *A549* ћелијама у поређењу са комплексима ових аутора. На основу досадашњих резултата, можемо закључити да су наши рутенијум (II) комплекси ефикаснији антитуморски агенси за терапију карцинома плућа.

Пошто је карцином дојке један од најчешћих малигних тумора који се јавља код жена, следећа ћелијска линија која је била укључена у наше истраживање је била ћелијска линија карцинома дојке, *MCF7*. Резултати нашег истраживања су показали да примена наших новосинтетисаних терпиридинских рутенијум(II) комплекса *Ru-1* и *Ru-2*, као и примена цисплатине, статистички значајно смањује вијабилност ћелија карцинома дојке, *MCF7*, након 24, 48 и 72 часа култивације. Показали смо да су након 24 часа култивације *MCF7* ћелија,  $\text{IC}_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину износиле  $102,4 \pm 12,6 \mu\text{M}$ ,  $13,9 \pm 3,4 \mu\text{M}$  и  $94,1 \pm 11,7 \mu\text{M}$ . Поред тога, након 48 часова инкубације *MCF7* ћелија,  $\text{IC}_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $22,9 \pm 1,7 \mu\text{M}$ ,  $7,2 \pm 1,3 \mu\text{M}$  и  $24,5 \pm 3,3 \mu\text{M}$ , а након 72 часа култивације *MCF7* ћелија,  $\text{IC}_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $13,8 \pm 1,8 \mu\text{M}$ ,  $4,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$  и  $17 \pm 1,9 \mu\text{M}$ .

На основу добијених  $\text{IC}_{50}$  вредности испитиваних једињења на ћелијској линији карцинома дојке, *MCF7* можемо да закључимо да рутенијум(II) комплекси имају следеће ефекте према *MCF7* ћелијама: оба новосинтетисана терпиридинска рутенијум(II) комплекса, *Ru-1* и *Ru-2*, са повећањем трајања периода инкубације имају статистички значајно већи цитотоксични ефекат на *MCF7* ћелијама; потребне су значајно мање концентрације ових комплекса да смање вијабилност *MCF7* ћелија на 50% у односу на контролу после 72 часа, у поређењу са концентрацијама које су потребне да смање вијабилност *MCF7* ћелија на 50% у односу на контролу после 24 и 48 часова инкубације. Такође, оба комплекса рутенијума имају значајно мање  $\text{IC}_{50}$  вредности после 48 часова у односу на  $\text{IC}_{50}$  вредности после 24 часа инкубације *MCF7* ћелија. Слично комплексу *Ru-2*, и комплекс *Ru-1*, доводи до временски зависног смањења вијабилности *MCF7* ћелија. Концентрације комплекса *Ru-1* које смањују вијабилност *MCF7* ћелија за 50% у односу на контролу су сличне као вредности за цисплатину после 24 и 48 часова, али су ниже од



цисплатине после 72 сата. Важно је нагласити и да је потребна више од три пута мања концентрација комплекса *Ru-2* у односу на цисплатину да би дошло до смањења вијабилности *MCF7* ћелија за 50% у односу на контролну популацију нетретираних ћелија након 72 часа инкубације. Комплекс *Ru-2* показује најснажнији цитотоксични ефекат од сва три испитивана једињења на *MCF7* ћелијама после 72 сата инкубације. Комплекс *Ru-2* има  $IC_{50}$  вредности које су ниже и од  $IC_{50}$  вредности цисплатине и од  $IC_{50}$  вредности комплекса *Ru-1* у свим испитиваним временским интервалима. Прецизније, комплекс *Ru-2* врло брзо остварује свој цитотоксични ефекат на *MCF7* ћелијама, већ после 24 часа. Наиме, после 24 часа инкубације, комплекс *Ru-2* смањује вијабилност *MCF7* ћелија на 50% у односу на контролу при концентрацији од 13,9  $\mu\text{M}$ .

За разлику од резултата нашег истраживања, бензенски комплекси рутенијума(II) који садрже ароилтиоуреу нису имали значајан цитотоксичан ефекат на *MCF7* ћелијама (153). Од четири оваква комплекса које су синтетисали Jeyalakshmi и сарадници 2017. године, сва четири комплекса означена као комплекс 1, комплекс 2, комплекс 3 и комплекс 4, су имала  $IC_{50}$  вредности које су биле преко 150  $\mu\text{M}$ . Најнижу  $IC_{50}$  вредност на *MCF7* ћелијама је имао комплекс 1 ових аутора од 151,29  $\mu\text{M}$  на *MCF7* ћелијама, што је знатно виша концентрација од оних које су добијене за наше рутенијум(II) комплексе *Ru-1* и *Ru-2* и које су износиле 13,8  $\mu\text{M}$  и 4,6  $\mu\text{M}$ . Слично као и у нашем истраживању, Jeyalakshmi и сарадници су добили  $IC_{50}$  вредност од 21,5  $\mu\text{M}$  за цисплатину на *MCF7* ћелијама, што је слично  $IC_{50}$  вредности за цисплатину на *MCF7* ћелијама коју смо ми добили од 17  $\mu\text{M}$ .

Lida и сарадници (157) су такође, 2016. године синтетисали комплексе рутенијума који нису имали тако снажан цитотоксичан ефекат на *MCF7* ћелијама наших терпиридинских рутенијум(II) комплекса. Њихови рутенијум-аренски комплекси су имали „умерен“ цитотоксични ефекат на *MCF7* ћелијама после 72 часа инкубације, са  $IC_{50}$  вредностима које су се кретале 50  $\mu\text{M}$ .

Полипиридински комплекси рутенијума које су синтетисали Luo и сарадници су имали значајно више  $IC_{50}$  вредности на *MCF7* ћелијама у поређењу са  $IC_{50}$  вредностима наших комплекса (154). Резултати истраживања ових аутора показују да 4 њихова полипиридинска комплекса рутенијума имају  $IC_{50}$  вредности на *MCF7* ћелијама од 66,0  $\mu\text{M}$  за њихов комплекс рутенијума 4 до 341,5  $\mu\text{M}$  колико износи  $IC_{50}$  вредност за комплекс

1. Ове концентрације полипиридинских комплекса рутенијума су потребне после 48 часова култивације да би се вијабилност *MCF7* ћелија смањила за 50% у односу на контролу. Такође је потребно истаћи да је  $IC_{50}$  вредност на *MCF7* ћелијама за цисплатину после 48 часова култивације код ових аутора износила 29,7  $\mu\text{M}$ , што је слично вредности коју смо ми добили и која износи 24,5  $\mu\text{M}$ . На основу свих добијених резултата, можемо закључити да наши рутенијум комплекси су потенцијално ефикаснији антитуморски агенси на ћелија тумора дојке *MCF7* у односу на комплексе које су синтетисали и Jeyalakshmi и сарадници и Луо и сарадници.

Терпиридински рутенијум(II) комплекси које су синтетисали Deng и сарадници 2017. године (158) су такође имали снажан цитотоксични ефекат на *MCF7* ћелијама као и наши рутенијум(II) комплекси. Концентрације које смањују вијабилност *MCF7* ћелија после 72 часа инкубације на 50% у односу на контролу су за комплексе које су синтетисали ови аутори износиле око 30 $\mu\text{M}$ . За комплекс 2c,  $IC_{50}$  вредност је износила 30,2  $\mu\text{M}$ , а за поједине друге комплексе, прецизна  $IC_{50}$  вредност није могла бити одређена због ниске растворљивости комплекса у медијуму, али је она износила преко 20  $\mu\text{M}$ . Ипак, и у овом случају наши новосинтетисани рутенијум(II) комплекси делују ефикасније на смањење вијабилности *MCF7* ћелија и имају ниже  $IC_{50}$  вредности и у поређењу са комплексима ових аутора после 72 часа инкубације. Потребно је навести и да је измерена  $IC_{50}$  вредност за цисплатину на *MCF7* ћелијама код ових аутора износила 29,7  $\mu\text{M}$  што је дупло мање од  $IC_{50}$  вредности за цисплатину на *MCF7* ћелијама које смо ми измерили и која је у нашем истраживању износила 17  $\mu\text{M}$  после 72 сата. Дакле, наши рутенијум комплекси су потенцијално ефикаснији антитуморски агенси за лечење карцинома дојке у поређењу са свим осталим до сада наведеним испитиваним агенсима.

Пошто је карцином грлића материце други по реду најчешћи узрок смрти код жена, следећа ћелијска линија коју смо користили у нашем истраживању је била ћелијска линија карцинома грлића материце, *HeLa* (1). Резултати нашег истраживања су показали да примена наших новосинтетисаних терпиридинских рутенијум(II) комплекса *Ru-1* и *Ru-2*, као и примена цисплатине, статистички значајно смањује вијабилност ћелија карцинома грлића материце, *HeLa*, након 24, 48 и 72 часа култивације у односу на вијабилност нетретираних ћелија. Показали смо да су након 24 часа култивације *HeLa* ћелија,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину износиле  $212,4 \pm 36,4\mu\text{M}$ ,  $7,5 \pm$

1,4 $\mu$ M и 25,7  $\pm$  2,9 $\mu$ M. Поред тога, након 48 часова инкубације *HeLa* ћелија, IC<sub>50</sub> вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле 120,2  $\pm$  13,5 $\mu$ M, 7,4  $\pm$  1,6 $\mu$ M и 8,7  $\pm$  1,3 $\mu$ M, а након 72 часа култивације *HeLa* ћелија, IC<sub>50</sub> вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину износиле су 75,5  $\pm$  10,4 $\mu$ M, 6,4  $\pm$  1,3 $\mu$ M и 7,6  $\pm$  1,7 $\mu$ M.

На основу добијених IC<sub>50</sub> вредности испитиваних једињења на ћелијској линији аденокарцинома плућа *HeLa*, можемо да закључимо да рутенијум(II) комплекси имају следеће ефекте на *HeLa* ћелијама. Комплекс *Ru-1* са повећањем трајања периода инкубације ћелија има ефикаснији цитотоксични ефекат на *HeLa* ћелијама у односу на нетретиране ћелије. Потребне су значајно мање концентрације овог комплекса да смање вијабилност *HeLa* ћелија на 50% у односу на контролу после 72 часа, у поређењу са концентрацијама које су потребне да смање вијабилност *HeLa* ћелија на 50% у односу на контролу после 24 и 48 часова инкубације. Поред тога, потребна је скоро десет пута већа концентрација комплекса *Ru-1* у односу на цисплатину и комплекс *Ru-2* да би дошло до смањења вијабилности *HeLa* ћелија за 50% у односу на контролну популацију нетретираних ћелија након 72 часа инкубације. Можемо закључити да комплекс *Ru-1* делује скоро десет пута слабије на вијабилност *HeLa* ћелија у односу на цисплатину, као и у односу на комплекс *Ru-2*. Комплекс *Ru-1* има најслабији цитотоксични ефекат од сва три испитивана једињења. За разлику од комплекса *Ru-1*, комплекс *Ru-2*, не доводи до временски зависног смањења вијабилности *HeLa* ћелија. Концентрације комплекса *Ru-2* које смањују вијабилност *HeLa* ћелија за 50% у односу на контролу су сличне после свих испитиваних временских интервала. Тачније, комплекс *Ru-2* након 24 часа третмана смањује вијабилност *HeLa* ћелија на 50% у односу на контролу при концентрацији од око 7,6  $\mu$ M, а након 72 часа је потребна незнатно нижа концентрација овог комплекса од 6,4  $\mu$ M да изазове идентичан цитотоксичан ефекат. Комплекс *Ru-2* нема статистички значајно различит цитотоксични ефекат на *HeLa* ћелијама након 72 часа у поређењу са цисплатином. При статистички истим концентрацијама комплекса *Ru-2* и цисплатине од 6,4  $\pm$  1,3  $\mu$ M односно 7,6  $\pm$  1,7  $\mu$ M, долази до смањења вијабилности *HeLa* ћелија за 50% у односу на контролу.

Аренски рутенијум(II) бензхидразонски комплекси које су 2016. године синтетисали Subarkhan и сарадници (159), су показали сличан цитотоксичан ефекат као и

наши рутенијум(II) терпиридински комплекси на *HeLa* ћелије карцинома грлића материце. После 24 часа култивације *HeLa* ћелија, 6 комплекса ових аутора су смањивала вијабилност *HeLa* ћелија на 50% у односу на контролу при концентрацијама које су се кретале од  $11,4 \pm 0,7 \mu\text{M}$ , колико је износила  $\text{IC}_{50}$  вредност за комплекс 6, до  $25,9 \pm 0,8 \mu\text{M}$ , колико је износила  $\text{IC}_{50}$  вредност за комплекс 2. Концентрација цисплатине која је била потребна да смањи вијабилност *HeLa* ћелија на 50% после 24 часа у односу на контролу је, по овим ауторима, износила  $19,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$ , што је било упоредиво са вредношћу коју смо ми добили од  $25,7 \pm 2,9 \mu\text{M}$ . За разлику од комплекса рутенијума Subarkhan-а и сарадника који после 24 часа имају снажан цитотоксичан ефекат на *HeLa* ћелије, наш новосинтетисани комплекс *Ru-1*, није имао статистички значајан цитотоксичан ефекат. Потребна је 10-20 пута већа концентрација комплекса *Ru-1* од комплекса Subarkhan-а и сарадника да смањи вијабилност *HeLa* ћелија на 50% у односу на контролу после 24 часа. Међутим, за разлику од комплекса *Ru-1*, комплекс *Ru-2* делује цитотоксично ефикасније од већине рутенијумских комплекса Subarkhan-а и сарадника. Једино је комплекс 6 ових аутора имао  $\text{IC}_{50}$  вредност од  $11,4 \pm 0,7 \mu\text{M}$  која је била виша али упоредива са  $\text{IC}_{50}$  вредношћу нашег комплекса *Ru-2* која је износила  $7,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$ .

Liao и сарадници (160) су 2015. године синтетисали три рутенијум(II) полипиридилска комплекса, комплекс 1, 2 и 3, који су показали сличан цитотоксичан ефекат као и наши рутенијум(II) терпиридински комплекси на *HeLa* ћелије. Ови аутори су показали да рутенијум(II) комплекси смањују вијабилност *HeLa* ћелија на 50% у односу на контролу након 48 часова при концентрацијама које су износиле  $37,45 \mu\text{M}$ ,  $21,37 \mu\text{M}$  и  $23,85 \mu\text{M}$  за комплексе 1, 2 и 3, тим редом. Концентрација цисплатине која је потребна да смањи вијабилност *HeLa* ћелија на 50% после 48 часова у односу на контролу је, по овим ауторима, износила  $16,75 \mu\text{M}$ , а код нас је износила  $8,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$ . Рутенијум(II) комплекси Liao-а и сарадника су деловали знатно ефикасније на смањење вијабилности *HeLa* ћелија у односу на наш рутенијум(II) комплекс *Ru-1*, коме је била потребна 3-6 пута виша концентрација да постигне исти цитотоксични ефекат на *HeLa* ћелијама после 48 сати. Међутим, за разлику од комплекса *Ru-1*, наш новосинтетисани рутенијум(II) комплекс *Ru-2* је имао  $\text{IC}_{50}$  вредност на *HeLa* ћелијама која је била 3-5 пута нижа у односу на  $\text{IC}_{50}$  вредности комплекса Liao-а и сарадника. Односно, можемо закључити да комплекс *Ru-2*,

3-5 пута ефикасније делује на смањење вијабилности *HeLa* ћелија од комплекса Liao-a и сарадника.

Наш комплекс *Ru-2* је имао снажан цитотоксични ефекат на *HeLa* ћелијама карцинома грлића материце. Тачније, *Ru-2* комплекс је смањио вијабилност *HeLa* ћелија ефикасније и од комплекса Subarkhan-a и сарадника (159) и од комплекса Liao-a и сарадника (160). Међутим, полипиридински рутенијум(II) комплекс 1 који је 2014. године синтетисао Jiang и сарадници (161) је деловао подједнако ефикасно на смањење вијабилности *HeLa* ћелија карцинома грлића материце као и наш новосинтетисани рутенијум(II) терпиридински комплекс *Ru-2*. Рутенијум(II) комплекс 1 ових аутора је после 48 часова при концентрацији од  $9,0 \pm 0,8 \mu\text{M}$  смањивао вијабилност *HeLa* ћелија на 50% у односу на контролу, слично као и наш *Ru-2* комплекс који је исти ефекат постигао при концентрацији од  $7,4 \pm 1,6 \mu\text{M}$ . Потребно је нагласити да  $IC_{50}$  вредност од  $7,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$  за цисплатину после 48 часова на *HeLa* ћелијама ових аутора статистички није била различита од наше  $IC_{50}$  вредности од  $8,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$  за цисплатину после 48 часова на *HeLa* ћелијама. Такође, за разлику од комплекса 1 Jiang-a и сарадника, који је ефикасно смањивао вијабилност *HeLa* ћелија на 50% при концентрацијама од  $9 \mu\text{M}$ , наш комплекс *Ru-1* није деловао толико ефикасно на *HeLa* ћелије. Комплексу *Ru-1* је била потребна 13 пута већа концентрација од комплекса 1 Jiang-a и сарадника да смањи вијабилност *HeLa* ћелија на 50% у односу на контролу, после 48 часова инкубације.

Малигни меланом је тип тумора који је веома резистентан на хемиотерапеутике. До недавно је његова терапија била ограничена искључиво на комбинацију хируршке и зрачне терапије, да би се применом лекова као што су ипилумумаб, вемурафениб, дабрафениб и високе дозе интрелеукина-2 (IL-2) ситуација изменила у смислу да данас ипак постоје неки хемиотерапеутици који се користе у терапији малигног меланома (2). Управо из разлога што је малигни меланом резистентан на највећи број хемиотерапеутика који се данас примењују, испитивали смо утицај комплекса рутенијума, *Ru-1* и *Ru-2*, на вијабилност *Hs 294T* ћелија малигног меланома. Резултати нашег истраживања су показали да наши новосинтетисани терпиридински рутенијум(II) комплекси имају веома слаб цитотоксични ефекат на *Hs 294T* ћелијама малигног меланома након 24, 48 и 72 часа инкубације. За разлику од наших комплекса рутенијума, цисплатина је знатно ефикасније смањивала вијабилност *Hs 294T* ћелија после 24, 48 и 72 часа. Прецизније, након 24 часа

култивације *Hs 294T* ћелија,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко 300  $\mu\text{M}$ , док је за цисплатину  $IC_{50}$  вредност износила  $124,2 \pm 14,6\mu\text{M}$ . Након 48 часова култивације *Hs 294T* ћелија,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $247,8 \pm 21,0\mu\text{M}$ ,  $231,6 \pm 33,8\mu\text{M}$  и  $21,3 \pm 5,5\mu\text{M}$ , а након 72 часа култивације *Hs 294T* ћелија,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* као и за цисплатину су износиле  $179,6 \pm 27,9\mu\text{M}$ ,  $183,1 \pm 17,1\mu\text{M}$  и  $13,8 \pm 6,2\mu\text{M}$ . Сва три испитивана једињења, комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатина су са продужењем времена инкубације *Hs 294T* ћелија имали све снажнији цитотоксични ефекат. Била је потребна статистички значајно нижа концентрација сва три једињења да изазове смањење вијабилности *Hs 294T* ћелија за 50% у односу на контролу после 48 и 72 сата инкубације, у односу на концентрације ових једињења које су биле потребне да изазову исти ефекат на *Hs 294T* ћелијама после 24 часа. Такође, важно је напоменути да је након 72 сата инкубације једино цисплатин имао снажан цитотоксични ефекат на *Hs 294T* ћелијама, док је нашим новосинтетисаним терпиридинским комплексима рутенијума била потребна око 13 пута већа концентрација да изазове исти ефекат.

До сада, активност комплекса рутенијума није испитивана на *Hs 294T* ћелијама малигног меланома. Наши резултати су недвосмислено показали да комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* имају врло слаб цитотоксичан ефекат на *Hs 294T* ћелије са  $IC_{50}$  вредностима које су преко 150  $\mu\text{M}$  после 72 сата инкубације. Могуће је да су и други аутори добили сличне резултате, па да услед тога и нема публикација који би потврдиле нашу претпоставку да комплекси рутенијума не делују цитотоксично на *Hs 294T* ћелије малигног меланома. Ипак, да би се оваква тврдња прихватила, потребно је спровести још истраживања.

С друге стране, испитиван је утицај комплекса рутенијума на *A375* ћелијама малигног меланома. У овим истраживањима су други аутори добили резултате који су обећавајући за нека будућа детаљнија истраживања терапије малигног меланома. Комплекси рутенијума које су синтетисали Zhao и сарадници (162) су смањивали вијабилност *A375* ћелија малигног меланома на 50% у односу на контролу при концентрацијама од око 30  $\mu\text{M}$  до око 78  $\mu\text{M}$  након 72 сата, што је 2,5 до 6 пута мање од концентрација које су биле потребне нашим комплексима да изазову исти ефекат на *Hs 294T* ћелијама.

Такође и терпиридински комплекс 2c, који су синтетисали Deng и сарадници 2017. године је, за разлику од наших комплекса, деловао ефикасно на ћелије малигног меланом (158). Комплекс 2c је при концентрацији од  $16,9 \pm 3,1 \mu\text{M}$  смањивао вијабилност A375 ћелија на 50% после 72 сата инкубације и тиме потврдио јак цитотоксични ефекат.

Да би нека супстанца била кандидат за будући хемиотерапеутик, потребно је да задовољи одређене критеријуме. Једна од битних карактеристика коју таква супстанца мора да поседује је потпуно одсуство или присуство врло слабе цитотоксичности ка ћелијама здравог, малигно неизмењеног ткива. Стога смо испитивали утицај комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и на ћелијској линији здравих ћелија, односно ћелијској линији фибробласта *MRC-5*. Резултати нашег истраживања су показали да наши новосинтетисани терпиридински рутенијум(II) комплекси имају веома слаб цитотоксични ефекат на *MRC-5* фибробластима након 24, 48 и 72 часа инкубације. За разлику од наших комплекса рутенијума, цисплатина је знатно ефикасније смањивала вијабилност *MRC-5* ћелија после 24, 48 и 72 часа. Након 24 и 48 часова култивације *MRC-5* ћелија,  $IC_{50}$  вредности за комплексе *Ru-1* и *Ru-2* су износиле преко  $300 \mu\text{M}$ , док је после 72 сата култивације  $IC_{50}$  вредност за комплекс *Ru-1* износила  $192,6 \pm 17,2 \mu\text{M}$ , а за комплекс *Ru-2*,  $238,1 \pm 19,3 \mu\text{M}$ . Концентрације цисплатине потребне да смање вијабилност *MRC-5* ћелија за 50% у односу на контролу су биле  $183,7 \pm 16,2 \mu\text{M}$  после 24 часа,  $43,1 \pm 8,8 \mu\text{M}$  после 48 часова и  $19,7 \pm 6,7 \mu\text{M}$  после 72 часа инкубације. Сва три испитивана једињења, комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатина, су са продужењем времена инкубације *MRC-5* ћелија имали све снажнији цитотоксични ефекат. Била је потребна статистички значајно нижа концентрација сва три једињења да изазове смањење вијабилности *MRC-5* ћелија за 50% у односу на контролу после 72 сата инкубације, у односу на концентрације ових једињења које су биле потребне да изазову исти ефекат на *MRC-5* ћелијама после 24 и после 48 часова. Такође, након 72 сата инкубације једино је цисплатин имао снажан цитотоксични ефекат на *MRC-5* ћелијама, док је нашим новосинтетисаним терпиридинским комплексима рутенијума била потребна бар 10 пута већа концентрација да изазове исти ефекат.

Резултати слични нашим на *MRC-5* ћелијама су 2017. године добијени од стране Милутиновића и сарадника (163). Терпиридински рутенијум(II) комплекси које су ови аутори синтетисали су као и у нашој студији имали веома слаб цитотоксичан ефекат на

*MRC-5* ћелијама. Од 6 синтетисаних рутенијум(II) комплекса ових аутора, само су комплекси 3 и 4 имали  $IC_{50}$  вредности на *MRC-5* ћелијама које су биле мање од 100  $\mu M$  после 72 сата инкубације. Комплекс 3 је при концентрацији од  $97,67 \pm 6,93 \mu M$  смањивао вијабилност *MRC-5* ћелија на 50% у односу на контролу, а комплекс 4 је исти ефекат постигао при вредностима од  $86,66 \pm 2,62 \mu M$ . Наши рутенијум(II) комплекси *Ru-1* и *Ru-2* су деловали још слабије на *MRC-5* ћелије, јер су њихове  $IC_{50}$  вредности после 72 сата за *MRC-5* ћелије биле  $192,6 \pm 17,2 \mu M$  за комплекс *Ru-1* и  $238,1 \pm 19,3 \mu M$  за комплекс *Ru-2*.

На основу добијених  $IC_{50}$  вредности комплекса рутенијума, *Ru-1* и *Ru-2*, и цисплатине на туморским ћелијским линијама *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs 294T*, као и на основу резултата које смо добили на ћелијској линији здравих фибробласта *MRC-5*, можемо закључити да комплекси рутенијума делују селективно према различитим типовима ћелија. Првенствено, оба комплекса рутенијума, *Ru-1* и *Ru-2*, практично немају, односно имају врло слаб цитотоксични ефекат на популацији здравих ћелија, тј. *MRC-5* фибробласта. Такође, и према туморским ћелијама ови комплекси делују селективно. Оба комплекса имају врло слаб цитотоксични ефекат на *Hs 294T* ћелијама малигног меланома, али с друге стране имају снажно цитотоксично дејство на ћелије карцинома плућа *A549* и карцинома дојке *MCF7*. Интересантно је да комплекс *Ru-1* има снажније цитотоксично дејство на ћелије карцинома плућа *A549* од комплекса *Ru-2*, док са друге стране, комплекс *Ru-2* има снажније цитотоксично дејство на ћелије карцинома дојке *MCF7* од комплекса *Ru-1*. Селективност ових комплекса према различитим типовима ћелија још више долази до изражаја код *HeLa* ћелија карцинома грлића материце. Комплекс *Ru-1* нема снажно цитотоксично дејство на *HeLa* ћелије попут комплекса *Ru-2*. Потребна је скоро 12 пута већа концентрација комплекса *Ru-1* од комплекса *Ru-2*, да смањи вијабилност *HeLa* ћелија за 50% у односу на контролу после 72 сата. С друге стране, комплекс *Ru-2* има веома снажан цитотоксични ефекат на *HeLa* ћелије карцинома грлића материце, при чему је после 72 сата инкубације,  $IC_{50}$  вредност за *Ru-2* комплекс на *HeLa* ћелијама само  $6,4 \pm 1,3 \mu M$ .

Пошто су резултати нашег истраживања показали да комплекси *Ru-1* и *Ru-2* имају селективно цитотоксично дејство на различите врсте туморских ћелија, а истовремено практично не делују цитотоксично на здраве ћелије, следећи корак у нашем истраживању је био да се утврди и бар делимично објасни механизам деловања комплекса *Ru-1* и *Ru-2*.



Хомеостаза сваког сложеног организма се одржава захваљујући деловању три високо регулисана процеса у које спадају ћелијска пролиферација, диференцијација и смрт. Иако је дуго година пажња научника била усмерена ка пролиферацији и диференцијацији ћелија, средином XX века је ситуација почела да се мења, када је уведен термин „програмирана ћелијска смрт“. „Програмирана ћелијска смрт“ је означавала смрт ћелије током процеса њене диференцијације. Нешто касније, 1972. године, Кер, Вајли и Кари (*Kerr, Wyllie* и *Currie*), су увели нов термин „апоптоза“, који је означавао „механизам контролисане делације ћелија који има комплементарну, али супротну улогу у односу на митозу у регулацији популације ћелија код животиња“ (100). Данас је познато да је поремећај регулације апоптозе повезан са развојем отпорности тумора на цитостатике, као и да је у основи канцерогенезе заправо присутан поремећај апоптозе ћелија. Тачније, способност ћелија које имају потенцијално штетне генетске мутације да избегну апоптозу је кључни корак у канцерогенези. Стога је коначни циљ у терапији канцера да се селективно изазове смрт туморских ћелија као и да се превазиђе проблем везан за појаву резистенције туморских ћелија на цитостатике (100).

Суштински, није важно на који начин ћемо потпуно елиминисати туморске ћелије у организму, да ли хируршком терапијом, радиотерапијом или неким од агенаса који изазивају мање или више селективну смрт ћелија канцера. Међутим, показано је да ће, уколико индукујемо процес апоптозе туморских ћелија, уследити бржа регресија тумора у односу на оне туморе код којих индукција апоптозе није могућа. Код тумора код којих се процес апоптозе не може изазвати, процес некрозе има важну улогу у регресији тумора стимулацијом нативног имунског одговора. Оно што ипак можемо претпоставити је да специфична индукција апоптозе, дакле индукција апоптозе искључиво туморских ћелија, односно оних ћелија код којих је дошло до поремећаја у апоптози, представља једну од метода у терапији канцера која обећава. Управо из тог разлога смо желели да утврдимо којим типом ћелијске смрти долази до смањења вијабилности испитиваних туморских ћелијских линија *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs294T* након третирања ових ћелија комплексима рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* у концентрацији која смањује вијабилност туморских ћелија за 50% ( $IC_{50}$ ) после 24 часа.

Резултати нашег истраживања су показали да је комплекс *Ru-1* у концентрацији која смањује вијабилност *A549* туморских ћелија за 50% ( $IC_{50}$ ) после 24 часа смањено

вијабилност *A549* ћелија на 37,97%, од чега је било 56,29% апоптотичних ћелија, а 5,74% некротичних ћелија. Од укупне популације ћелија, 44,46% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 5,74% у фази касне апоптозе. Такође, након третмана *A549* ћелија  $IC_{50}$  концентрацијом комплекса *Ru-2* од 25,1  $\mu M$  после 24 часа, око 51,14% ћелија је било вијабилно. Показано је да је од укупне популације ћелија, око 47,37% апоптотичних ћелија и то 35,12% у фази ране апоптозе и 12,25% у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је било 1,49% некротичних ћелија.

Сличне резултате као код *A549* ћелија смо добили и на другим ћелијским линијама, односно на *MCF7*, *HeLa* и *Hs294T* ћелијама након третирања ових ћелија комплексима рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* у концентрацији која смањује вијабилност туморских ћелија за 50% ( $IC_{50}$ ) после 24 часа. Тако је примена комплекса *Ru-1* статистички значајно смањила вијабилност ћелијске линије карцинома дојке, односно *MCF7* ћелија индукцијом апоптозе. Комплекс *Ru-1* у концентрацији од 102,4  $\mu M$  је после 24 часа смањив вијабилност *MCF7* ћелија на 40,61%, од чега је било 49,11% апоптотичних ћелија, а 10,27% некротичних ћелија. Од укупне популације ћелија, 19,22% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 29,88% у фази касне апоптозе. Након третмана *MCF7* ћелија у концентрацији комплекса *Ru-2* од 13,9  $\mu M$  после 24 часа, око 53,78% ћелија је било вијабилно. Детектовано је 37,19% апоптотичних ћелија и то 17,29% у фази ране апоптозе и 19,89% у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је детектовано и 9,03% некротичних ћелија. Комплекс *Ru-1* у концентрацији од 212,4  $\mu M$  је после 24 часа смањив вијабилност *HeLa* ћелија на 51,71%, од чега је било 46,87% апоптотичних ћелија, а 1,41% некротичних ћелија. Од укупне популације ћелија, 43,76% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 3,11% у фази касне апоптозе. Након третмана *HeLa* ћелија у концентрацији комплекса *Ru-2* од 7,5  $\mu M$  после 24 часа, око 61,92% ћелија је било вијабилно. Детектовано је 37,34% апоптотичних ћелија и то 36,85% у фази ране апоптозе и 0,5% у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је детектовано и 0,74% некротичних ћелија. Комплекс *Ru-1* у концентрацији од 300  $\mu M$  је после 24 часа смањив вијабилност *Hs 294T* ћелија малигног меланома на 63,57%, од чега је било 35,93% апоптотичних ћелија, а 0,5% некротичних ћелија. Од укупне популације *Hs 294T* ћелија, 35,18% ћелија је било у фази ране апоптозе, а 0,75% у фази касне апоптозе. Након третмана *Hs 294T* ћелија у концентрацији комплекса *Ru-2* од 300  $\mu M$  после 24 часа, око 67,88% *Hs 294T* ћелија је било вијабилно. Детектовано је 29,87%

апоптотичних ћелија и то 27,59% у фази ране апоптозе и 2,28% у фази касне апоптозе, а од укупне популације ћелија је детектовано и 2,25% некротичних ћелија. Резултати нашег истраживања јасно показују да оба терпиридинска рутенијум(II) комплекса смањују вијабилност испитиваних туморских ћелија *A549*, *MCF7*, *HeLa* и *Hs294T* после 24 часа инкубације, тако што доминантно индукују апоптозу ових ћелија. Само мали проценат испитиваних ћелија умире услед индукције некрозе дејством наших новосинтетисаних терпиридинских рутенијум(II) комплекса *Ru-1* и *Ru-2*.

Суштински, нема битних разлика у проценту ћелија које се налазе у различитим фазама апоптозе, односно у некрози између различитих типова туморских ћелија. Оба комплекса рутенијума, и *Ru-1* и *Ru-2* врло мало мењају вијабилност испитиваних ћелија индукцијом некрозе. Комплекси *Ru-1* и *Ru-2* једино индукују некрозу око 10% *MCF7* ћелија при концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  вредностима за ове комплексе, али је и то ипак значајно мање у односу на проценат апоптотичних *MCF7* ћелија.

Слично резултатима наше студије, смањење вијабилности туморских ћелија индукцијом апоптозе услед деловања рутенијум(II) комплекса, је показано и у студијама других аутора. Полипиридински рутенијум(II) комплекси које су синтетисали Lai и сарадници (148), Mazuryk и сарадници (164) и Han и сарадници (155) су слично као и наши терпиридински рутенијум(II) комплекси, смањивали вијабилност *A549* ћелија тако што су индуковали њихову апоптозу. Такође, Liao и сарадници су показали да њихови полипиридински рутенијум(II) комплекси смањују вијабилност *HeLa* ћелија индукујући апоптозу *HeLa* ћелија, што је идентично резултатима нашег истраживања за рутенијум(II) комплексе *Ru-1* и *Ru-2* (160). Резултате који су у сагласности са резултатима нашег истраживања су добили и други аутори, који су показали да рутенијум(II) комплекси смањују вијабилност туморских ћелија тако што индукују њихову апоптозу (153, 154, 158, 161, 162).

Смањење вијабилности туморских ћелија под дејством супстанци које делују цитотоксично може настати услед индукције апоптозе туморских ћелија, инхибиције пролиферације туморских ћелија због заустављања ћелијског циклуса, или може настати због комбинације ова два механизма (148). Стога смо анализирали проценат ћелија које се налазе у различитим фазама ћелијског циклуса код контролне популације нетретираних

туморских ћелија, као и у популацијама ћелија које смо третирали нашим терпиридинским рутенијум(II) комплексима *Ru-1* и *Ru-2*.

Резултати нашег истраживања су показали да је комплекс *Ru-1* у концентрацији од 55,3  $\mu\text{M}$  после 24 часа довео до застоја у G2/M фази ћелијског циклуса код *A549* ћелија епителног аденокарцинома плућа јер је довео до повећања процента ћелија које се налазе у G2/M фази у односу на нетретиране ћелије. И након третмана *A549* ћелија у концентрацији комплекса *Ru-2* од 25,1  $\mu\text{M}$  после 24 часа такође је дошло до акумулације ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса код *A549* ћелија епителног аденокарцинома плућа јер се јавило статистички значајно повећање процента ћелија које се налазе у G2/M фази у односу на нетретиране ћелије. Застој *A549* ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса такође узрокује и цисплатина слично као што чине оба наша рутенијум(II) комплекса *Ru-1* и *Ru-2*.

Наше истраживање је показало да је комплекс *Ru-1* у концентрацији од 102,4  $\mu\text{M}$  после 24 часа доводио до застоја у G0/G1 фази ћелијског циклуса код *MCF7* ћелија карцинома дојке јер је индуковао повећање процента ћелија које се налазе у G0/G1 фази у односу на нетретиране ћелије. За разлику од комплекса *Ru-1*, комплекс *Ru-2* концентрације 13,9  $\mu\text{M}$  после 24 часа није утицао на проценте ћелија које су се налазиле у различитим фазама ћелијског циклуса у односу на нетретиране ћелије. Поред тога, за разлику од комплекса *Ru-1* и *Ru-2*, примена цисплатине у концентрацији од 94,11  $\mu\text{M}$  након 24 часа инкубације *MCF7* ћелија узрокује застој у G2/M фази ћелијског циклуса код *MCF7* ћелија карцинома дојке.

Такође, показали смо да после третмана *HeLa* ћелија у концентрацији комплекса *Ru-1* од 212,4  $\mu\text{M}$  после 24 часа, није долазило до статистички значајне промене процента ћелија које су се налазиле у различитим фазама ћелијског циклуса у односу на нетретиране ћелије. За разлику од резултата које смо добили на *HeLa* ћелијама деловањем комплекса *Ru-1*, комплекс *Ru-2* и цисплатина су на *HeLa* ћелијама доводили до застоја у G2/M фази ћелијског циклуса.

Иако смо већ утврдили да рутенијум(II) комплекси *Ru-1* и *Ru-2* имају врло слабо цитотоксично дејство на *Hs 294T* ћелије малигног меланома, ипак смо испитали утицај комплекса *Ru-1* и *Ru-2* на ћелијски циклус *Hs 294T* ћелија. Резултати нашег истраживања су показали да оба наша терпиридинска рутенијум(II) комплекса *Ru-1* и *Ru-2* доводе до акумулације ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса код *Hs 294T* ћелија малигног

меланома, јер су довели до повећања процента ћелија које се налазе у *G0/G1* фази ћелијског циклуса у односу на нетретирани ћелије. Сличан ефекат на ћелијски циклус је показан и на цисплатини која је, као и комплекси *Ru-1* и *Ru-2*, доводила до акумулације *Hs 294T* ћелија у *G0/G1* фази ћелијског циклуса.

На основу резултата које смо добили испитујући утицај наших комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* на ћелијски циклус туморских ћелија, можемо закључити да и овде постоје разлике у крајњем ефекту комплекса на ћелијски циклус туморских ћелија. Тако оба комплекса које смо испитивали могу да доведу до застоја у *G0/G1* фази ћелијског циклуса, *G2/M* фази ћелијског циклуса или да уопште не утичу на ћелијски циклус, зависно од тога о ком типу туморских ћелија се ради. Јасно је да су потребна даља истраживања како би се прецизније утврдио и разјаснио механизам којим наши терпиридински рутенијум(II) комплекси утичу на ћелијски циклус туморских ћелија.

Други аутори су такође испитивали утицај комплекса рутенијума на ћелијски циклус туморских ћелија. Међутим, за разлику од резултата нашег истраживања где смо показали да комплекси *Ru-1* и *Ru-2* индукују застој у *G2/M* фази ћелијског циклуса код *A549* ћелија, Lai и сарадници су добили другачије резултате (148). Наиме, Lai и сарадници су показали да 4 њихова рутенијум(II) полипиридилска комплекса доводе до застоја у *G0/G1* фази ћелијског циклуса код *A549* ћелија што је потпуно супротно резултатима нашег истраживања. Такође и Nan и сарадници (155) су закључили да њихова три рутенијум(II) полипиридилска комплекса доводе до застоја у *G0/G1* фази ћелијског циклуса код *A549* ћелија што је опет, потпуно супротно резултатима нашег истраживања. Ипак, Mazuryk и сарадници (164) су показали да полипридилски комплекси рутенијума могу довести и до застоја ћелија у S фази ћелијског циклуса што је у складу са резултатима нашег истраживања да комплекси рутенијума не заустављају ћелијски циклус увек у *G0/G1* фази ћелијског циклуса. Поред тога, 3 полипиридилска комплекса рутенијума које су синтетисали Liao и сарадници (160) различито делују на ћелијски циклус *HeLa* ћелија, што је у сагласности са резултатима нашег истраживања. Наиме, од три комплекса које су Liao и сарадници синтетисали, један комплекс зауставља ћелијски циклус *HeLa* ћелија у *G2/M* фази, други у *G0/G1* и *G2/M* фази ћелијског циклуса, а трећи рутенијум(II) комплекс ових аутора доводи до застоја у S фази ћелијског циклуса. Резултати нашег истраживања су показали да комплекс *Ru-2* доводи до застоја у *G2/M*

фази ћелијског циклуса на *HeLa* ћелијама што је идентично дејству комплекса 1 који су добили Liao и сарадници на овој ћелијској линији.

Да бисмо прецизније утврдили којим механизмом рутенијум(II) комплекси *Ru-1* и *Ru-2* индукују апоптозу *HeLa* ћелија, наредни корак у нашем истраживању је био да испитамо локализацију и концентрацију кључних протеина који су укључени у процес програмиране ћелијске смрти, односно процеса апоптозе.

Резултати нашег истраживања су показали да комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, као и цисплатина доводе до статистички значајног повећања просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за активни проапоптотични протеин *Bax* код третираних у односу на нетретиране *HeLa* ћелије. Поред тога, показали смо да под дејством комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* долази и до статистички значајног повећања просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за антиапоптотични протеин *Bcl-2* код третираних у односу на нетретиране *HeLa* ћелије. Сличан ефекат на *HeLa* ћелије је показала и цисплатина, која је као и наши комплекси рутенијума такође повећавала просечни интензитет флуоресценције (*MFI*) за антиапоптотични протеин *Bcl-2* код третираних у односу на нетретиране *HeLa* ћелије. Услед оваквог дејства комплекса *Ru-1* и *Ru-2* на проапоптотични протеин *Bax* и антиапоптотични протеин *Bcl-2* код третираних *HeLa* ћелија може доћи до активације унутрашњег пута апоптозе (84), што је у сагласности са резултатима који су добијени у нашој студији. Прецизније, резултати нашег истраживања су показали да комплекси рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатина доводе до статистички значајног повећања просечног интензитета флуоресценције (*MFI*) за цитохром *c* код третираних *HeLa* ћелија у односу на нетретиране *HeLa* ћелије после 24 часа култивације. Услед ослобађања цитохром *c* код третираних *HeLa* ћелија може доћи и до активације каскаде каспаза и последичне активације и егзекуторне каспазе-3 (87). А резултати нашег истраживања су и доказали да се то дешава код *HeLa* ћелија услед деловања комплекса *Ru-1* и *Ru-2*. Наиме, показали смо да примена комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2* и цисплатине доводе до статистички значајног повећања процента ћелија које емитују флуоресценцију за активну каспазу-3 код третираних у односу на нетретиране *HeLa* ћелије.

Укратко, наши резултати су показали да услед дејства комплекса *Ru-1* и *Ru-2*, долази до повећања концентрације активног проапоптотичног протеина *Bax* и смањења

концентрације антиапоптотичног протеина *Bcl-2* код третираних *HeLa* ћелија. Због тога, јавља се отпуштање цитохрома *c* из матрикса митохондрија у цитоплазму и долази до активације каспазе-3 и последичне апоптозе код *HeLa* ћелија које су третиране комплексима *Ru-1* и *Ru-2*.

Резултате који су у сагласности са нашим резултатима, су добили други аутори на рутенијум(II) комплексима. Тако су Luo и сарадници (154) показали да због дејства њиховог полипиридилског рутенијум(II) комплекса 4 долази до повећања концентрације активног проапоптотичног протеина *Bax* и смањења концентрације антиапоптотичног протеина *Bcl-2* код третираних *A375* ћелија у односу на контролу. Такође су закључили да услед дејства комплекса 4 долази до активације каспазе-3 и индукције апоптозе третираних *A375* ћелија што је у сагласности са нашим резултатима добијеним испитивањем комплекса *Ru-1* и *Ru-2* на *HeLa* ћелијама. Поред тога, и Lai и сарадници (148) су показали да применом њихових рутенијум(II) полипиридинских комплекса долази до повећања експресије за *Bax* и смањења експресије за *Bcl-2*, што доводи до активације егзекуторне каспазе-7 код третираних *A549* ћелија. Тако да можемо закључити да су резултати ове две студије у сагласности са резултатима нашег истраживања.

У сагласности са резултатима нашег истраживања су и резултати које су добили Nan и сарадници (155) на *A549* ћелијама које су третирали полипиридинским рутенијум(II) комплексом. И ови аутори су закључили да применом рутенијум(II) комплекса, конкретно у овом случају њиховог комплекса 3, долази до активације апоптозе која је зависна од деловања каспаза и то каспазе-3, -7 и -9. Међутим, за разлику од резултата који су добијени у нашем истраживању, Nan и сарадници нису показали да долази до промене експресије за *Bcl-2* због дејства рутенијум(II) комплекса. Код њих је експресија за *Bcl-2* била идентична код третираних и контролне популације нетретираних ћелија. Ипак, и овде је, као и у нашем истраживању, показано да рутенијум(II) комплекси доводе до повећања експресије за проапоптотични протеин *Bax*.

Терпиридински комплекси које су синтетисали Deng и сарадници (158) су имали веома добар цитотоксични ефекат на *A375* ћелије малигног меланома. Детаљнијом анализом, ови аутори су закључили да њихов терпиридински комплекс 2с индукује апоптозу *A375* ћелија активацијом каспаза. За разлику од резултата нашег истраживања, где је показано да каспаза-3 има веома битну улогу у активацији апоптозе узроковане

дејством комплекса рутенијума *Ru-1* и *Ru-2*, у студији Deng-а и сарадника је утврђено да кључну улогу у активацији апоптозе због дејства рутенијум(II) комплекса, и то у овом случају комплекса 2с, има каспаза-8. Стога, ови аутори сугеришу да терпиридински комплекс рутенијума 2с индукује апоптозу A375 ћелија активацијом спољашњег сигналног пута апоптозе путем рецептора смрти, што је у супротности са резултатима нашег истраживања, где смо показали да је апоптоза изазвана нашим комплексима рутенијума индукована унутрашњим, митохондријалним сигналним путем.

Управо ове разлике у начинима изазивања апоптозе туморских ћелија дејством комплекса рутенијума су највероватније последица суптилних варијација на молекуларном нивоу код различитих типова тумора. Због тога су потребна даља истраживања како бисмо прецизно разјаснили све механизме деловања комплекса рутенијума на туморске ћелије, а истовремено и разјаснили варијације које постоје на молекуларном нивоу између различитих типова тумора.



## 6. Закључци

На основу комплетне анализе добијених резултата можемо закључити следеће:

1. Новосинтетисани комплекси рутенијума(II) показују временски и дозно-зависно повећање цитотоксичности на свим испитиваним туморским ћелијским линијама (*A549* – карцином плућа, *MCF7* – карцином дојке, *HeLa* – карцином цервикса, *Hs 294T* – малигни меланом), уз повећану селективност према туморским ћелијама у односу на здраве малигно нетрасформисане фибробласте (*MRC-5*).
2. Након третмана комплексима рутенијума(II) туморских ћелијских линија (*A549* – карцином плућа, *MCF7* – карцином дојке, *HeLa* – карцином цервикса, *Hs 294T* – малигни меланом) показано је да новосинтетисани комплекси рутенијума(II) у високом проценту индукују апоптозу.
3. Наша истраживања су показала да новосинтетисани комплекси рутенијума(II) повећавају релативни однос *Bax/Bcl-2*, што доводи до транслокација цитохрома *c* из митохондрија у цитоплазму што за последицу има активацију каспазе-3 и индукције апоптозе *HeLa* туморских ћелија.
4. У третираним туморским ћелијама комплекси рутенијума(II) доводе до застоја у различитим фазама ћелијског циклуса.

## 7. Литература

1. Katić V, Kutlešević C, Stojanović D. Opšta patologija: udžbenik za studente medicine i stomatologije. Prosveta, Niš. 1997.
2. <http://globocan.iarc.fr/>
3. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>
4. Mihajlović J, Pechlivanoglou P, Miladinov-Mikov M, Zivković S, Postma MJ. Cancer incidence and mortality in Serbia 1999-2009. BMC Cancer. 2013;13:18.
5. Bertram JS. The molecular biology of cancer. Mol Aspects Med. 2000;21(6):167-223.
6. Mahdieh N, Rabbani B. An Overview of Mutation Detection Methods in Genetic Disorders. Iranian Journal of Pediatrics. 2013;23(4):375-388.
7. Sonoda K. Molecular biology of gynecological cancer. Oncology Letters. 2016; 11(1):16-22.
8. Croce CM. Oncogenes and cancer. N Engl J Med. 2008;358(5):502-11.
9. Kalyanaraman B. Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. Redox Biol. 2017;12:833-842.
10. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. Data status, Beograd. 2005.
11. Chial, H. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. Nature Education. 2008;1(1):33.
12. Lee EY, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(10):a003236.
13. Muñoz-Fontela C, Mandinova A, Aaronson SA, Lee SW. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. Nat Rev Immunol. 2016;16(12):741-750.
14. Dyson NJ. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. Genes Dev. 2016;30(13):1492-502.
15. Živančević-Simonović S, Đukić A, Đurđević P, Jurišić V, Mijatović Lj. Opšta patološka fiziologija. Medicinski fakultet Kragujevac, Kragujevac. 2002.
16. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. Harisonova načela interne medicine. Bard-Fin, Romanov. 2004.

17. Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Sharma V. Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*. 2015;9(6):XE01-XE05.
18. Warburg OH. *The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology*, Arnold Constable, London UK. 1930.
19. Hanahan D, Weinberg A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144:646-674.
20. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev*. 2009; 23:537–548.
21. Voltaggio L, Cimino-Mathews A, Bishop JA, Argani P, Cuda JD, Epstein JI, Hruban RH, Netto GJ, Stoler MH, Taube JM, Vang R, Westra WH, Montgomery EA. Current concepts in the diagnosis and pathobiology of intraepithelial neoplasia: A review by organ system. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(5):408-36.
22. Waldum HL, Sandvik AK, Brenna E, Fossmark R, Qvigstad G, Soga J. Classification of tumours. *J Exp Clin Cancer Res*. 2008;27:70.
23. Shim J, Brindle L, Simon M, George S. A systematic review of symptomatic diagnosis of lung cancer. *Fam Pract*. 2014;31(2):137-48.
24. Polanski J, Jankowska-Polanska B, Rosinczuk J, Chabowski M, Szymanska-Chabowska A. Quality of life of patients with lung cancer. *Onco Targets Ther*. 2016;29;9:1023-8.
25. Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer*. 2003;41(3):245-58.
26. Manojlović D. *Interna medicina*. Zavod za udžbenike, Beograd. 1998.
27. Miller YE. Pathogenesis of Lung Cancer: 100 Year Report. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;33(3):216-23.
28. Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signaling pathways: roadmap for therapies. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2009; 33(6): 1485-1497.
29. Hamilton W, Peters TJ, Round A, Sharp D. What are the clinical features of lung cancer before the diagnosis is made? A population based case control study. *Thorax*. 2005;60(12):1059-65.

30. Popper HH. Progression and metastasis of lung cancer. *Cancer Metastasis Reviews*. 2016;35:75-91.
31. Tamura T, Kurishima K, Nakazawa K, et al. Specific organ metastases and survival in metastatic non-small-cell lung cancer. *Molecular and Clinical Oncology*. 2015;3(1): 217-221.
32. Andolfi M, Potenza R, Capozzi R, Liparulo V, Puma F, Yasufuku K. The role of bronchoscopy in the diagnosis of early lung cancer: a review. *Journal of Thoracic Disease*. 2016;8(11):3329-37.
33. Assi HA, Khoury KE, Dbouk H, Khalil LE, Mouhieddine TH, El Saghir NS. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. *Journal of Thoracic Disease*. 2013;5(Suppl 1):S2-S8.
34. DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(6):409-18.
35. Boyle P, Howell A. The globalisation of breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*. 2010;12(Suppl 4):S7.
36. Shah R, Rosso K, Nathanson SD. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014;5(3): 283-98.
37. Teng L, Zheng Y, Wang H. BRCA1/2 associated hereditary breast cancer . *Journal of Zhejiang University Science B*. 2008;9(2): 85-89.
38. Lukong KE. Understanding breast cancer - The long and winding road. *BBA Clin*. 2017;7:64-77.
39. Hsieh CC, Trichopoulos D, Katsouyanni K, Yuasa S. Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int J Cancer*. 1990;46(5): 796-800.
40. Kelsey JL, Gammon MD, John EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev*. 1993;15(1):36-47.
41. Ferrini K, Ghelfi F, Mannucci R, Titta L. Lifestyle, nutrition and breast cancer: facts and presumptions for consideration. *ecancermedicalsecience*. 2015;9:557.
42. Chlebowski RT. Nutrition and physical activity influence on breast cancer incidence and outcome. *Breast*. 2013;22 Suppl 2:S30-7.

43. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau ME, Koo J, Madarnas Y, Hartwick W, Hoffman B, Hood N. Fasting insulin and outcome in early-stage breast cancer: results of a prospective cohort study. *J Clin Oncol.* 2002;20(1):42-51.
44. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, van Gils CH, Khaw KT, et al. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 2004;111(5):762-71.
45. Maksimović Z. Hirurgija za studente medicine i lekare. Medicinski fakultet Beograd, Beograd. 2008.
46. Peralta-Zaragoza O, Bermúdez-Morales VH, Pérez-Plasencia C, Salazar-León J, Gómez-Cerón C, Madrid-Marina V. Targeted treatments for cervical cancer: a review. *OncoTargets and therapy.* 2012;5:315-328.
47. zur Hausen H. Papillomaviruses. To vaccination and beyond. *Biochemistry (Moscow).* 2008;73(5):498-503.
48. Ibeanu OA. Molecular pathogenesis of cervical cancer. *Cancer Biol Ther.* 2011;11(3):295-306.
49. Burd EM. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews.* 2003;16(1):1-17.
50. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology.* 2009;384(2):335-44.
51. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology.* 2009;384(2):324-34.
52. Papanicolaou GN. A survey of the actualities and potentialities of exfoliative cytology in cancer diagnosis. *Ann Intern Med.* 1949;31(4):661-74.
53. <https://www.cancer.gov/types/cervical/pap-hpv-testing-fact-sheet>
54. Plećaš D, Stanimirović B, Stanković A, Vasiljević M. Ginekologija i akušerstvo: udžbenik za studente medicine. CIBID, Beograd. 2014.
55. Bristow IR, de Berker DA, Acland KM, Turner RJ, Bowling J. Clinical guidelines for the recognition of melanoma of the foot and nail unit. *J Foot Ankle Res.* 2010;3:25.
56. Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol.* 2004;150(2):179-85.

57. Brandão FV, Pereira AF, Gontijo B, Bittencourt FV. Epidemiological aspects of melanoma at a university hospital dermatology center over a period of 20 years. *An Bras Dermatol.* 2013;88(3):344-53.
58. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, Grob JJ, et al.; European Dermatology Forum (EDF).; European Association of Dermato-Oncology (EADO).; European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. *Eur J Cancer.* 2016; 63: 201-17.
59. Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res.* 2003;16(3):297-306.
60. Chang JW, Yeh KY, Wang CH, Yang TS, Chiang HF, Wei FC, Kuo TT, Yang CH. Malignant melanoma in Taiwan: a prognostic study of 181 cases. *Melanoma Res.* 2004;14(6):537-41.
61. Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment cell & melanoma research.* 2011;24(5): 879-897.
62. Barnes BC, Seigler HF, Saxby TS, Kocher MS, Harrelson JM. Melanoma of the foot. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76(6):892-8.
63. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(6):345-58.
64. Maverakis E, Cornelius LA, Bowen GM, Phan T, Patel FB, Fitzmaurice S, et al. Metastatic melanoma - a review of current and future treatment options. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(5):516-24.
65. Niu N, Wang L. In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics.* 2015;16(3):273-285.
66. Gillet JP, Varma S, Gottesman M. The Clinical Relevance of Cancer Cell Lines. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(7):452-458.
67. López-Lázaro M. Two preclinical tests to evaluate anticancer activity and to help validate drug candidates for clinical trials. *Oncoscience.* 2015;2(2):91-98.

68. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.* 2003;36(3):165-75.
69. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, Pyroptosis and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukariotic cells; *Infection and Immunity* 2005;73(4):1907-1916.
70. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
71. Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K. Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circ Res.* 2008;103(4):343-51.
72. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell.* 1995;82(3):349-52.
73. Cohen GM, Sun XM, Fearnhead H, MacFarlane M, Brown DG, Snowden RT, Dinsdale D. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J Immunol.* 1994;153(2):507-16.
74. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 2012;45(6):487-98
75. Wang A, Dean D. Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases: Molecular Mechanisms. *JAMA.* 2007;298(18):2203-04
76. Lawen A. Apoptosis-an introduction. *Bioessays.* 2003;25(9):888-96.
77. Chamond RR, Añón JC, Aguilar CM, Pasadas FG. Apoptosis and disease. *Alergol Immunol Clin.* 1999;14(6):367-374.
78. Singh N. Apoptosis in health and disease and modulation of apoptosis for therapy: An overview. *Indian J Clin Biochem.* 2007;22(2):6-16.
79. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
80. Zhao H. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review in "Apoptosis and Medicine". InTech, Rijeka, Croatia. 2012.
81. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 2007;26(9):1324-37.
82. Billard C. Design of novel BH3 mimetics for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 2012;26(9):2032-8.

83. Hussain SR, Cheney CM, Johnson AJ, Lin TS, Grever MR, Caligiuri MA, Lucas DM, Byrd JC. Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clin Cancer Res.* 2007;13(7):2144-50.
84. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C45-51.
85. Orrenius S, Zhivotovsky B. Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free. *Nat Chem Biol.* 2005;1(4):188-9.
86. Wen X, Lin ZQ, Liu B, Wei YQ. Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2012;45(3):217-24.
87. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a008656.
88. Si Ming M, Thirumala-Devi K. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nature Reviews Immunology.* 2016;16:7–21.
89. Reimann M, Schmitt CA. Molecular Basis in Disease Therapy in “Apoptosis, Cell Signaling and Human Diseases: Molecular Mechanisms. Volume 1”. Humana Press Inc., New York, USA. 2007.
90. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene.* 2006;25(34):4798-811.
91. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:295-312.
92. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* 2013;140(15): 3079-93.
93. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003;36(3):131-49.
94. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RAM. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2013;14(8):518-28.
95. Dick FA, Rubin SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(5):297-306.
96. Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(11):785-97.



97. Dowdy S, Kaulich M. Cyclin D: Cdk4/6 activates RB by mono-phosphorylation during early G1 phase. *Cancer Research*. 2014;74(19):1304-1304.
98. Jung H, Hsiung B, Pestal K, Procyk E, Raulet D. RAE-1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(13):2409-22.
99. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*. 2003;36(3):165-75.
100. Foster DA, Yellen P, Xu L, Saqcena M. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). Gelman IH, Sudol M, eds. *Genes & Cancer*. 2010;1(11):1124-1131.
101. Greinert R, Volkmer B, Henning S, Breitbart EW, Greulich KO, Cardoso MC, Rapp A. UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic acids research*. 2012;40(20):10263-73.
102. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(3):a026104.
103. Chen A, Huang X, Xue Z, et al. The Role of p21 in Apoptosis, Proliferation, Cell Cycle Arrest, and Antioxidant Activity in UVB-Irradiated Human HaCaT Keratinocytes. *Medical Science Monitor Basic Research*. 2015;21:86-95.
104. Lu M, Boschetti C, Tunnacliffe A. Long term aggresome accumulation leads to dna damage, p53-dependent cell cycle arrest, and steric interference in mitosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(46):27986-28000.
105. Petrović M, Todorović D. Apoptoza i ćelijski ciklus. *Racionalna terapija*. 2014;6(1):21-32.
106. Yhang J, Wan L, North B, Inuzuka H, Wei W. The role od APC E3 Ubiquitin ligase complex in tumorigenesis. Springer, New York, USA. 2014.
107. Porter LA, Donoghue DJ. Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Prog Cell Cycle Res*. 2003;5:335-47.
108. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *J Pathol*. 2012;226(2):352-64.
109. Janković S. Farmakologija i toksikologija. Medicinski Fakultet Kragujevac, Kragujevac. 2003.

110. Masui K, Gini B, Wykosky J, et al. A tale of two approaches: complementary mechanisms of cytotoxic and targeted therapy resistance may inform next-generation cancer treatments. *Carcinogenesis*. 2013;34(4):725-738.
111. Abdulkareem IH, Zurmi IB. Review of hormonal treatment of breast cancer. *Niger J Clin Pract*. 2012;15(1):9-14.
112. Recine F, Sternberg CN. Hormonal therapy and chemotherapy in hormone-naive and castration resistant prostate cancer. *Transl Androl Urol*. 2015 Jun;4(3):355-64.
113. Oronsky BT, Reid T, Knox SJ, Scicinski JJ. The Scarlet Letter of Alkylation: A Mini Review of Selective Alkylating Agents. *Translational Oncology*. 2012;5(4):226-229.
114. Ndagi U, Mhlongo N, Soliman ME. Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:599-616.
115. Chohan ZH, Arif M, Akhtar MA, Supuran CT. Metal-Based Antibacterial and Antifungal Agents: Synthesis, Characterization, and In Vitro Biological Evaluation of Co(II), Cu(II), Ni(II), and Zn(II) Complexes With Amino Acid-Derived Compounds. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2006;2006:83131.
116. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*. 2014;0:364-378.
117. Lippert B. *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA. 2006.
118. <https://www.drugs.com/monograph/cisplatin.html>
119. Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol*. 2008;6(1):1-18.
120. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park)*. 2009;23(6):488-96.
121. Frezza M, Hindo S, Chen D, Davenport A, Schmitt S, Tomco D, Dou QP. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr Pharm Des*. 2010;16(16):1813-25.
122. Monneret C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. *Ann Pharm Fr*. 2011;69(6):286-95.
123. Motswainyana M, Ajibade P. Anticancer activities of mononuclear ruthenium (II) coordination complexes. *Advances in Chemistry*. 2015;(2015):859730.

124. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery, and Pt(IV) prodrugs. *Chem Rev.* 2016;116(5):3436-86
125. Mehmood RK. Review of Cisplatin and oxaliplatin in current immunogenic and monoclonal antibody treatments. *Oncol Rev.* 2014 23;8(2):256.
126. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids.* 2010;(2010):201367.
127. Nagai N, Okuda R, Kinoshita M, Ogata H. Decomposition kinetics of cisplatin in human biological fluids. *J Pharm Pharmacol.* 1996;48:918-24.
128. Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol.* 2008;6(1):1-18.
129. Ozkok A, Edelstein CL. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biomed Res Int.* 2014;2014:967826.
130. Shen D-W, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. Sibley DR, ed. *Pharmacological Reviews.* 2012;64(3):706-721.
131. Lazić D, Arsenijević A, Puchta R, Bugarčić ŽD, Rilak A. DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium (II) terpyridine complexes. *Dalton Trans.* 2016;45(11):4633-46.
132. Jakupec MA, Galanski M, Arion VB, Hartinger CG, Keppler BK. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Trans.* 2008;(2):183-94.
133. Griffith D, Cecco S, Zangrando E, Bergamo A, Sava G, Marmion JC. Ruthenium (III) dimethyl sulfoxide pyridinehydroxamic acid complexes as potential antimetastatic agents: synthesis, characterisation and in vitro pharmacological evaluation. *J Biol Inorg Chem.* 2008;13(4):511–20.
134. Antonarakis ES, Emadi A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;66(1):1-9.
135. Bratsos I, Jedner S, Gianferrara T, Alessio E. Ruthenium Anticancer Compounds: Challenges and Expectations. *CHIMIA International Journal for Chemistry.* 2007;61(11):692–697.

136. Kumar P, Gupta RK, Pandey DS. Half-sandwich arene ruthenium complexes: synthetic strategies and relevance in catalysis. *Chem Soc Rev.* 2014;43(2):707-33.
137. Gopal YN, Jayaraju D, Kondapi AK. Inhibition of topoisomerase II catalytic activity by two ruthenium compounds: a ligand-dependent mode of action. *Biochemistry.* 1999;38(14):4382-8.
138. Silvestru C. *Metal complexes in cancer chemotherapy.* John Wiley and Sons, Ltd. Hoboken, USA. 1994.
139. Lazarević T, Rilak A, Bugarčić ŽD. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur J Med Chem.* 2017. pii: S0223-5234(17)30262-3.
140. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63.
141. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995; 184(1): 39-51.
142. Shirali S, Aghaei M, Shabani M, Fathi M, Sohrabi M, Moenifard M. Adenosine induces cell cycle arrest and apoptosis via cyclinD1/Cdk4 and Bcl-2/Bax pathways in human ovarian cancer cell line OVCAR-3. *Tumor Biology.* 2013; 34(2):1085-1095.
143. Loos C, Syrovets T, Mysyanovych A, Mailänder V, Landfester K, Simmet T. Amino-functionalized nanoparticles as inhibitors of mTOR and inducers of cell cycle arrest in leukemia cells. *Biomaterials.* 2014; 35(6):1944-1953
144. Cicala C, Arthos J, Rubbert A, Selig S, Wildt K, Cohen OJ, Fauci AS. HIV-1 envelope induces activation of caspase-3 and cleavage of focal adhesion kinase in primary human CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(3):1178-83.
145. Waterhouse NJ, Trapani JA. A new quantitative assay for cytochrome c release in apoptotic cells. *Cell Death Differ.* 2003;10(7):853-5.
146. Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, Maurillo L, Buccisano F, Tamburini A, et al., Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood.* 2003;101(6):2125-31.
147. Liu SH, Zhao JH, Deng KK, Wu Y, Zhu JW, Liu QH, Xu HH, Wu HF, Li XY, Wang JW, Guo QF. Effect of radiation on cytotoxicity, apoptosis and cell cycle arrest of human

- osteosarcoma MG-63 induced by a ruthenium (II) complex. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015;140:202-9.
148. Lai SH, Li W, Wang XZ, Zhang C, Zeng CC, Tang B, Wan D, Liu YJ. Apoptosis, autophagy, cell cycle arrest, cell invasion and BSA-binding studies in vitro of ruthenium (II) polypyridyl complexes. *RSC Advances*. 2016;6(68):63143-55.
149. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2006;1757(5):639-47.
150. Gogvadze V, Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Chemico-biological interactions*. 2006;163(1):4-14.
151. Sprance HE, Hempling RE, Piver MS. Leukemia following cisplatin-based chemotherapy for ovarian carcinoma at Roswell Park. *European journal of gynaecological oncology*. 1991;13(2):131-7.
152. Shimura K, Shimazaki C, Okano A, Hatsuse M, Okamoto A, Takahashi R, Hirai H, Sumikuma T, Ashihara E, Inaba T, Fujita N. Therapy-related myeloid leukemia following platinum-based chemotherapy for ovarian cancer. [*Rinsho ketsueki*] *The Japanese journal of clinical hematology*. 2001;42(2):99-103.
153. Jeyalakshmi K, Haribabu J, Balachandran C, Bhuvanesh NS, Emi N, Karvembu R. Synthesis of Ru (ii)-benzene complexes containing aroylthiourea ligands, and their binding with biomolecules and in vitro cytotoxicity through apoptosis. *New Journal of Chemistry*. 2017;41(7):2672-86.
154. Luo Z, Yu L, Yang F, Zhao Z, Yu B, Lai H, Wong KH, Ngai SM, Zheng W, Chen T. Ruthenium polypyridyl complexes as inducer of ROS-mediated apoptosis in cancer cells by targeting thioredoxin reductase. *Metallomics*. 2014;6(8):1480-90.
155. Han BJ, Jiang GB, Wang J, Li W, Huang HL, Liu YJ. The studies on bioactivity in vitro of ruthenium (II) polypyridyl complexes towards human lung carcinoma A549 cells. *RSC Advances*. 2014;4(77):40899-906.
156. Lazić D, Arsenijević A, Puchta R, Bugarčić ŽD, Rilak A. DNA binding properties, histidine interaction and cytotoxicity studies of water soluble ruthenium (II) terpyridine complexes. *Dalton Transactions*. 2016;45(11):4633-46.

157. Iida J, Bell-Loncella ET, Purazo ML, Lu Y, Dorchak J, Clancy R, Slavik J, Cutler ML, Shriver CD. Inhibition of cancer cell growth by ruthenium complexes. *Journal of translational medicine*. 2016;14(1):48.
158. Deng Z, Gao P, Yu L, Ma B, You Y, Chan L, Mei C, Chen T. Ruthenium complexes with phenylterpyridine derivatives target cell membrane and trigger death receptors-mediated apoptosis in cancer cells. *Biomaterials*. 2017;129:111-26.
159. Subarkhan MK, Ramesh R, Liu Y. Synthesis and molecular structure of arene ruthenium (II) benzhydrazone complexes: impact of substitution at the chelating ligand and arene moiety on antiproliferative activity. *New Journal of Chemistry*. 2016;40(11):9813-23.
160. Liao G, Chen X, Wu J, Qian C, Wang Y, Ji L, Chao H. Ruthenium (ii) polypyridyl complexes as dual inhibitors of telomerase and topoisomerase. *Dalton Transactions*. 2015;44(34):15145-56.
161. Jiang GB, Yao JH, Wang J, Li W, Han BJ, Xie YY, Lin GJ, Huang HL, Liu YJ. The induction of apoptosis in BEL-7402 cells through the ROS-mediated mitochondrial pathway by a ruthenium (II) polypyridyl complex. *New Journal of Chemistry*. 2014;38(6):2554-63.
162. Zhao Z, Luo Z, Wu Q, Zheng W, Feng Y, Chen T. Mixed-ligand ruthenium polypyridyl complexes as apoptosis inducers in cancer cells, the cellular translocation and the important role of ROS-mediated signaling. *Dalton Transactions*. 2014;43(45):17017-28.
163. Milutinović MM, Rilak A, Bratsos I, Klisurić O, Vraneš M, Gligorijević N, Radulović S, Bugarčić ŽD. New 4'-(4-chlorophenyl)-2, 2': 6', 2''-terpyridine ruthenium (II) complexes: synthesis, characterization, interaction with DNA/BSA and cytotoxicity studies. *Journal of inorganic biochemistry*. 2017;169:1-2.
164. Mazuryk O, Suzenet F, Kieda C, Brindell M. The biological effect of the nitroimidazole derivative of a polypyridyl ruthenium complex on cancer and endothelial cells. *Metallomics*. 2015;7(3):553-66.