



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Сања Ж. Зорнић

**АНТИТУМОРСКА И АНТИМИКРОБНА
АКТИВНОСТ НОВОСИНТЕТИСНИХ
КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) И ПАЛАДИЈУМА(II)**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2024



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Sanja Ž. Zornić

**ANTITUMORSKA I ANTIMIKROBNA
AKTIVNOST NOVOSINTETISANIH KOMPLEKSA
PLATINE(II) I PALADIJUMA(II)**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2024



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCE

Sanja Ž. Zornić

**ANTITUMOR AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY
OF NEWLY SYNTHESIZED PLATINUM(II) AND
PALLADIUM(II) COMPLEXES**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Сања Ж. Зорнић
Датум и место рођења: 08.08.1976. године у Крагујевцу
Садашње запослење: специјалиста Микробиологије са паразитологијом, субспецијалиста Бактериологије, на Одељењу за микробиологију Универзитетског Клиничког центра Крагујевац
Докторска дисертација
Наслов: Антитуморска и антимикробна активност новосинтетисаних комплекса платине(II) и паладијума(II)
Број страница: 114
Број слика: 16 слика, 17 табела и 19 графикана
Број библиографских података: 292
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: проф. др Јелена Пантић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 10.01.2022.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-750-28 од 11.10.2022.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњеност услова кандидата: 1. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, председник 2. Проф. др Марија Живковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Органска хемија, члан 3. Доц. др Божидар Чобелић, доцент Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Општа и неорганска хемија, члан 4. Доц. др Александар Арсенијевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Онкологија, члан 5. НС Бојана Симовић Марковић, научни сарадник Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Онкологија, члан
Комисија за оцену и одбране докторске дисертације: 1. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 2. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 3. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 4. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета 5. титула, име и презиме, звање, назив факултета/ института и универзитета
Датум одбране дисертације:

Identifikaciona stranica doktorske disertacije

Autor
Ime i prezime: Sanja Ž. Zornić
Датум и место рођења: 08.08.1976. године у Крагујевцу
Sadašnje zaposlenje: specijalista Mikrobiologije sa parazitologijom, subspecijalista Bakteriologije, na Odeljenju za mikrobiologiju Univerzitetskog kliničkog centra Kragujevac
Doktorska disertacija
Naslov: Antitumorska i antimikrobna aktivnost novosintetisanih kompleksa platine(II) i paladijuma(II)
Broj stranica: 114
Broj slika: 16 slika, 17 tabela и 19 grafikona
Broj bibliografskih podataka: 292
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Medicina
Mentor: prof. dr Jelena Pantić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija
Oцена i odbrana
Datum prijave teme: 10.01.2022.
Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije: IV-03-750-28 од 11.10.2022.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: 1. Prof. dr Nebojša Arsenijević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za uže naučne oblasti Mikrobiologija i imunologija i Onkologija, predsednik 2. Prof. dr Marija Živković, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Organska hemija, član 3. Doc. dr Božidar Čobelić, docent Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Opšta i neorganska hemija, član 4. Doc. dr Aleksandar Arsenijević, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Onkologija, član 5. NS Bojana Simović Marković, naučni saradnik Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Onkologija, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije 1. titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/ instituta i univerziteta 2. titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/ instituta i univerziteta 3. titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/ instituta i univerziteta 4. titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/ instituta i univerziteta 5. titula, ime i prezime, zvanje, naziv fakulteta/ instituta i univerziteta
Datum odbrane disertacije:

Identification page of the doctoral dissertation

Author
Name and surname: Sanja Ž. Zornić
Date and place of birth: 08.08.1976., Kragujevac
Current employment: Specialist of Microbiology with parasitology, subspecialist of Bacteriology, at the Department of Microbiology, University Clinical Center Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Antitumor and antimicrobial activity of newly synthesized platinum(II) and palladium(II) complexes
No. of pages: 114
No. of images: 16 figures, 17 tables, 19 graf.
No. of bibliographic data: 292
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: Assoc. Prof. Jelena Pantić, Associate professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Microbiology and immunology
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 10.01.2022.
Decision number and date of acceptance of the doctoral: IV-03-750-28 from 11.10.2022.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: 1. Prof. Nebojša Arsenijević, Full professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, for the narrow scientific fields of Microbiology and immunology and Oncology, president 2. Assoc. Prof. Marija Živković, Associate professor at the Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Organic chemistry, member 3. Asst. Prof. Božidar Čobeljić, Assistant professor at the Faculty of Chemistry, University of Belgrade, for the narrow scientific field of General and inorganic chemistry, member 4. Asst. Prof. Aleksandar Arsenijević, Assistant professor at the Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Oncology, member 5. MD PhD Bojana Simović Marković, Research associate professor at the Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, for the narrow scientific field of Oncology, member
Commission for evaluation and defense of doctoral: 1. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university 2. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university 3. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university 4. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university 5. title, name and surname, position, name of faculty/ institute and university
Date of Dissertation Defense:

ЗАХВАЛНИЦА

Неизмерну захвалност за помоћ при изради ове дисертације дугујем мом ментору, проф. др Јелени Пантић, затим проф. др Гордани Радосављевић, као и вишем научном сараднику, др Бојани Симовић Марковић. Хвала вам што ми нисте дале да одустанем, хвала на стрпљењу, времену, подрици, стручној помоћи, знању и вештинама које сте несебично поделиле са мном, привилегија је била радити са вама и учити од вас.

Хвала свим запосленима у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, поносна сам што вас познајем и што сам ових неколико година имала осећај да сам део изузетног тима.

Посебно желим да се захвалим проф. др Небојши Арсенијевићу, на указаном поверењу, подрици, стручним и родитељским саветима који су ми помогли приликом израде ове дисертације.

Велику захвалност дугујем и проф. др Марији Живковић и њеном тиму, на стручној помоћи, сарадњи, уложеном труду и знању.

Хвала свим пријатељима, колегама и целој мојој породици, а посебно Ивану, Петру и Лазару, ви свакако остајете мој највећи успех у животу, хвала на љубави и разумевању.

Мојој нани

САЖЕТАК

Комплекси платине (Pt) и паладијума (Pd) представљају велику групу потенцијалних кандидата за развој антитуморске и антимикробне терапије.

У овој студији синтетисани су динуклеарни комплекси Pt(II) са пиридазином као мостним лигандом и динуклеарни комплекси Pd(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима и анализирани њихове структурне особине и биолошка активност. Евалуација туморицидне активности комплекса Pt(II) и Pd(II) указала је на варијабилан цитотоксички ефекат на различитим линијама туморских ћелија мишијег и хуманог порекла, као и потенцијално мању токсичност у поређењу са цисплатином. Комплекси Pt(II) и Pd(II) су показали умерен антибактеријски и антигљивични ефекат у зависности од хемијске структуре и врсте микроорганизама. Највећу дозно и временски зависну туморицидну активност на ћелијама мишијег и хуманог карцинома дојке *in vitro*, испољио је комплекс $[\{Pt(ibn)Cl\}_2(\mu-pydz)]Cl_2$ (где је *ibn* изобутилендиамин, а *pydz* пиридазин), означен као C2. Комплекс C2 индукује унутрашњи пут апоптозе ћелија карцинома дојке што је документовано повећањем експресије каспазе 9 и каспазе 3. Антипролиферативни ефекат комплекса C2 огледа се у смањењу експресије регулатора ћелијског циклуса циклина E и циклина D3 и повећању експресије инхибитора p27. Проапоптотски и антипролиферативни ефекат комплекса C2 је последица смањене експресије фосфорилисане протеин киназе АКТ и следствено онкогена c-Myc. Међутим, ефекат комплекса C2 на раст мишијег карцинома дојке *in vivo* је изостао, што се може објаснити slabим везивањем за нетранспортно место протеина и ограниченим допремањем у туморско ткиво.

Валидан туморицидни и антимикробни потенцијал комплекса Pt(II) и Pd(II) указује на могућност даљих модификација у циљу побољшања биолошке активности и потенцијалне терапијске примене.

Кључне речи: динуклеарни комплекси Pt(II), динуклеарни комплекси Pd(II), туморицидна активност, антимикробна активност, апоптоза

ABSTRACT

Platinum (Pt) and palladium (Pd) complexes are a large group of potential candidates for the development of antitumor and antimicrobial therapy.

In this study, dinuclear Pt(II) complexes with pyridazine bridging ligand and dinuclear Pd(II) complexes with aromatic *N*-heterocyclic bridging ligands were synthesized and their structural properties and biological activity were analyzed.

Evaluation of Pt(II) and Pd(II) complexes tumoricidal activity indicated variable cytotoxic effects on different mouse and human tumor cell lines, and potentially lower toxicity compared to cisplatin. Pt(II) and Pd(II) complexes showed moderate antibacterial and antifungal effects depending on the chemical structure and microorganism species. Complex $[\{\text{Pt}(\text{ibn})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$ (ibn is isobutylenediamine and pydz is pyridazine), marked as C2, exhibited the highest dose- and time-dependent tumoricidal activity on mouse and human breast cancer cells *in vitro*. Complex C2 induces the intrinsic pathway of breast cancer cells apoptosis, documented by elevated caspase 9 and caspase 3 expression. Antiproliferative effect of complex C2 is reflected in the decreased expression of cell cycle regulators cyclin E and cyclin D3 and the increased expression of inhibitor p27. Proapoptotic and antiproliferative effects of complex C2 are consequences of reduced expression of phosphorylated AKT kinase and c-Myc oncogene. However, the effect of complex C2 on mouse breast cancer growth was absent, which can be explained by weak binding to the non-transport site of the protein and limited delivery to tumor. The valid tumoricidal and antimicrobial potential of Pt(II) and Pd(II) complexes indicates the possibility of further modifications in order to improve biological activity and potential therapeutic application.

Keywords: dinuclear Pt(II) complexes, dinuclear Pd(II) complexes, tumoricidal activity, antimicrobial activity, apoptosis

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Биологија малигне ћелије и основни принципи терапије тумора.....	2
1.1.1. Основни механизми регулације ћелијског циклуса и смрти ћелије.....	3
1.1.2. Фармаколошка терапија тумора.....	9
1.2. Металотерапија тумора.....	11
1.2.1. Комплекси платине у терапији тумора.....	12
1.2.1.1. Примена комплекса платине у терапији карцинома дојке.....	16
1.2.2. Потенцијална примена комплекса паладијума у терапији тумора.....	17
1.3. Комплекси прелазних метала у борби против растуће резистенције микроорганизама на антимикуробне лекове.....	18
1.3.1. Комплекси платине и паладијума као потенцијални антимикуробни лекови..	19
2. ЦИЉ И ХИПОТЕЗЕ	21
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	22
3.1. Синтеза и хемијска карактеризација комплекса C1 – C8.....	22
3.1.1. Синтеза и карактеризација комплекса C1 – C4.....	23
3.1.1.1. Анализа стабилности комплекса C1 – C4.....	24
3.1.2. Синтеза и карактеризација комплекса C5 – C8.....	25
3.2. Испитивање интеракција комплекса C1 - C8 са биомолекулима.....	26
3.2.1. Интеракција комплекса C1 – C8 са молекулом CT-DNK.....	26
3.2.1.1. Апсорпционе спектроскопске студије.....	26
3.2.1.2. Флуоресцентна мерења.....	27
3.2.1.3. Мерење вискозитета.....	27
3.2.2. Интеракција комплекса C1 – C8 са молекулом BSA.....	28
3.2.2.1. Апсорпционе спектроскопске студије.....	28
3.2.2.2. Флуоресцентна мерења.....	28
3.2.3. Студија молекулског докинга за комплексе C1 – C4.....	29
3.3. Евалуација туморицидне активности комплекса C1 – C8 <i>in vitro</i>	29
3.3.1. Ћелијске линије хуманог и мишјег порекла.....	29
3.3.2. Тестови цитотоксичности.....	30
3.3.3. Тест преузимања једињења Pt(II) у ћелије.....	31
3.4. Испитивање антимикуробне активности комплекса C1 – C8.....	31
3.4.1. Референтни сојеви микроорганизама.....	32
3.5. Евалуација механизма антитуморске активности комплекса C2.....	35

3.5.1. Квантитативно испитивање апоптозе.....	35
3.5.2. Анализа ћелијског циклуса.....	35
3.5.3. Проточна цитометрија	36
3.5.4. qRT-PCR	36
3.6. Експериментални модел карцинома дојке и фармаколошки третман мишева	37
3.6.1. Експерименталне животиње	37
3.6.2. Модел карцинома дојке	37
3.6.3. Апликација комплекса C2.....	38
3.7. Статистичка анализа.....	38
4. РЕЗУЛТАТИ	39
4.1. Анализа хемијских карактеристика комплекса C1 – C8	39
4.1.1. Хемијске карактеристике комплекса C1 – C4.....	39
4.1.1.1. Стабилност комплекса C1 – C4.....	43
4.1.2. Хемијске карактеристике комплекса C5 – C8.....	45
4.2. Анализа интеракција комплекса C1 – C8 са биомолекулима.....	48
4.2.1. Интеракција комплекса C1 – C4 са молекулом CT-DNK.....	48
4.2.2. Интеракција комплекса C1 – C4 са молекулом BSA	52
4.2.3. Интеракција комплекса C5 – C8 са молекулом CT-DNK.....	55
4.2.4. Интеракција комплекса C5 – C8 са молекулом BSA	58
4.3. Евалуација туморицидне активности комплекса C1 – C8 <i>in vitro</i>	60
4.3.1. Анализа цитотоксичности комплекса C1 – C4.....	60
4.3.1.1. Ћелијско преузимање комплекса C1 – C4.....	64
4.3.2. Анализа цитотоксичности комплекса C5 – C8.....	65
4.4. Евалуација антимикробне активности комплекса C1 – C8.....	67
4.4.1. Антимикробна активност комплекса C1 – C4.....	68
4.4.2. Антимикробна активност комплекса C5 – C8.....	70
4.5. Евалуација механизма антитуморске активности комплекса C2 на ћелијама карцинома дојке <i>in vitro</i>	71
4.5.1. Комплекс C2 индукује апоптозу ћелија карцинома дојке	71
4.5.2. Комплекс C2 утиче на акумулацију ћелија карцинома дојке у суб-G1 фази ћелијског циклуса	75
4.5.3. Комплекс C2 покреће унутрашњи пут апоптозе и потенцијално некроптозу ћелија мишјег карцинома дојке	76
4.5.4. Комплекс C2 утиче на експресију регулатора ћелијског циклуса туморских ћелија.....	77
4.5.5. Комплекс C2 смањује експресију онкогена c-Мус и pAKT у ћелијама мишјег карцинома дојке	78

4.6. Анализа ефекта комплекса C2 на прогресију мишјег карцинома дојке <i>in vivo</i>	78
5. ДИСКУСИЈА	81
5.1. Модели интеракције комплекса C1 – C8 са биомолекулима	81
5.2. Потенцијал комплекса C1 – C8 за развој антитуморске терапије.....	84
5.3. Потенцијал комплекса C1 – C8 за развој антимикробне терапије	86
5.4. Потенцијални молекулски механизми антитуморске активности комплекса C2 ..	88
5.5. Ефекат комплекса C2 на прогресију мишјег карцинома дојке	91
6. ЗАКЉУЧЦИ	92
7. ЛИТЕРАТУРА	95
СКРАЋЕНИЦЕ	113

1. УВОД

На основу GLOBOCAN 2020 базе података, која садржи извештаје из 185 земаља о учесталости 36 типова малигнитета, у току 2020. године је забележено 19.3 милиона нових случајева и приближно 10 милиона смртних случајева повезаних са малигним болестима. Према наведеној бази података, претпоставља се да ће до 2040. године бити 47% више нових случајева малигну болести него 2020. године. Карцином дојке (11.7%) и карцином плућа (11.4%) су били најчесталији тумори у посматраном периоду (Слика 1) (1).



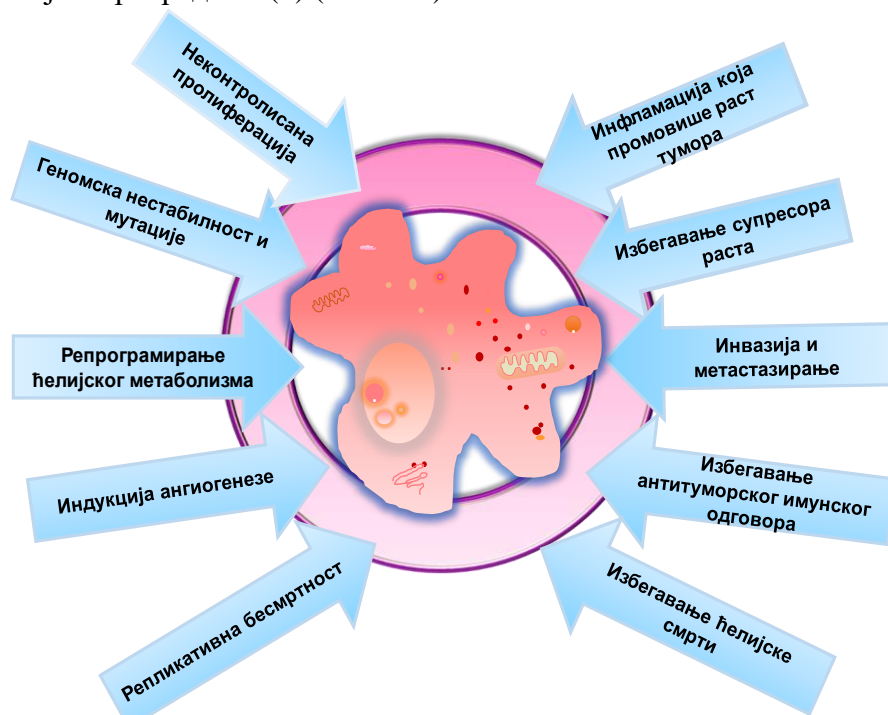
Слика 1. Учесталост тумора најчешћих локализација према подацима из 2020. године. Преузето и кориговано према: *Sung H et al. CA Cancer J Clin 2021; 71(3): 209-49* (1).

Брзорастућа инциденција и морталитет пацијената са малигним болестима широм планете, указују на неопходност интензивних истраживања у области развоја антитуморске терапије која се базира на тестирању потенцијално нових терапеутика. Развој терапије малигну болести подразумева стално истраживање нових терапијских агенаса, модификацију старих, истраживање антитуморских вакцина, примену биотехнолошки дизајнираних лекова, а све са циљем да се стопа смртности смањи и побољша квалитет живота особа са малигнитетом (2). Поред пораста учесталости малигну болести, пораст резистенције микроорганизама на антимикуробне лекове последњих деценија је дефинисан као проблем од глобалног значаја, а настао је као последица прекомерне употребе и злоупотребе антибиотика. Антибиотици постепено све више губе своју ефикасност, а неопходност за истраживањем и развојем нових антимикуробних лекова представља један од приоритета Светске здравствене организације (енгл. *World Health Organization, WHO*) (3).

Иако је примена јона метала у медицини позната хиљадама година, истраживања у овој области постају поново актуелна последњих деценија. Због варијабилног оксидационог статуса јона метала и способности везивања различитих лиганата, постоји готово неисцрпна могућност њихове хемијске синтезе и модификације, а све у циљу проналажења ефикаснијих и стабилнијих једињења, која притом индукују мање нежељених ефеката. Поред нових једињења јона метала, покушава се комбиновање познатих једињења са већ коришћеним хемиотерапеутицима. Актуелно је и истраживање нових облика примене, као што је инкапсулирање комплекса јона метала у липидне и нанопартикуле, како би се побољшала фармакокинетика и повећала селективност (4).

1.1. Биологија малигне ћелије и основни принципи терапије тумора

У зависности од врсте малигне болести, стадијума болести, старости и општег стања пацијента, постоји неколико терапијских третмана који се примењују појединачно или комбиновано. Савремен третман малигну болести подразумева примену конвенционалних хемиотерапеутика, али и хормонску терапију, имунотерапију, инхибиторе ангиогенезе, терапију матичним ћелијама, онколитичку виротерапију и генску терапију (5). Особине малигне ћелије увелико диктирају терапијски приступ, а детерминисане су различитим биохемијским и морфолошким променама у самој ћелији, али и у њеној микросредини (6) (Слика 2).

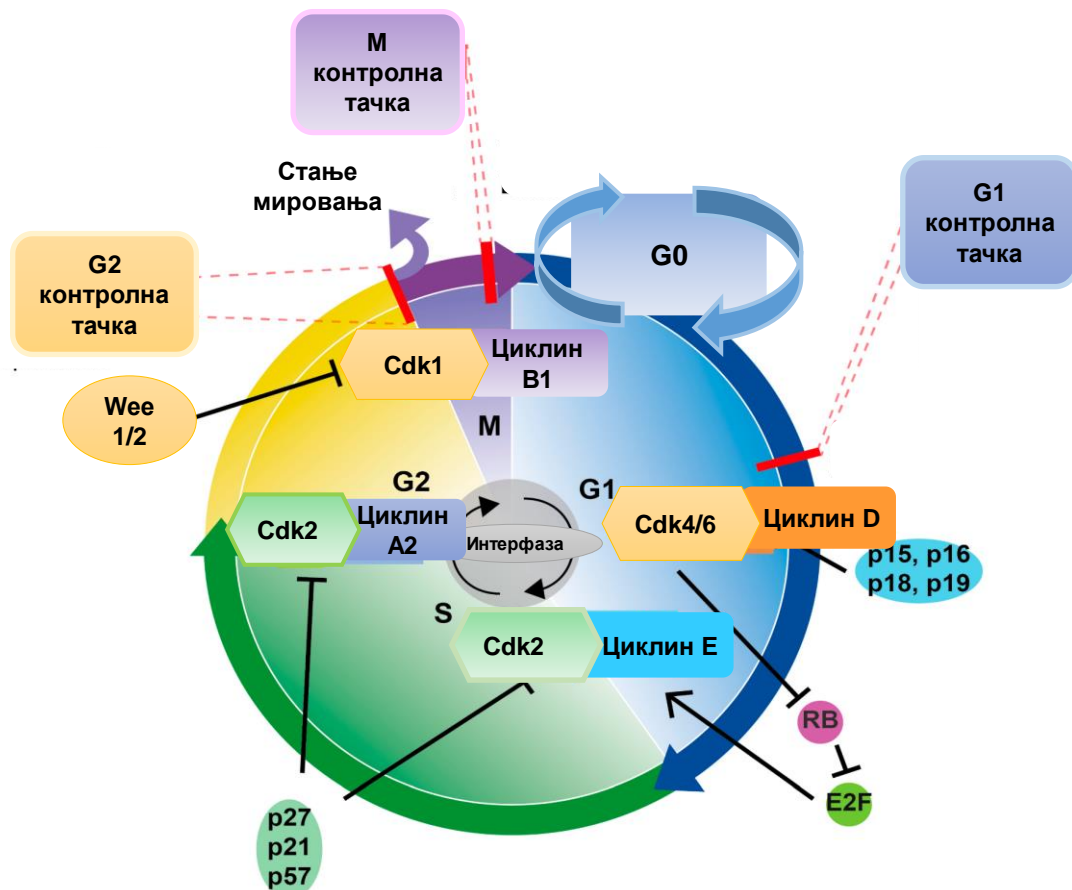


Слика 2. Особине малигне ћелије. Преузето и кориговано према: Hanahan D, Weinberg RA. *Cell* 2011; 144(5):646-74 (6).

Малигну ћелију карактерише интензивна пролиферација, избегавање ћелијске смрти, отпорност на дејство супресора раста, индукција ангиогенезе, способност инвазије и метастазирања, генска нестабилност и мутације, индукција запаљења које подстиче раст тумора и избегавање антитуморског имунског одговора (Слика 2). Свака од наведених особина малигне ћелије може представљати мету за примену, као и развој нових хемиотерапеутика (6). На основу карактеристика малигне ћелије, јасно је да су код малигних болести озбиљно поремећени физиолошки механизми који учествују у регулацији најважнијих биолошких процеса, ћелијског циклуса и ћелијске смрти, поготово апоптозе. Већина антитуморских лекова делује на неку од фаза у овим процесима, или на специфичне молекуле и сигналне путеве који учествују у регулацији пролиферације ћелија и ћелијске смрти.

1.1.1. Основни механизми регулације ћелијског циклуса и смрти ћелије

Код свих еукариота, пролиферацију ћелија контролише сложена мрежа регулаторних механизма како би се осигурало да ћелије које направе грешку не могу да наставе да се деле (7, 8). На Слици 3 је шематски представљен ћелијски циклус.



Слика 3. Шематски приказ ћелијског циклуса. Преузето и кориговано према: *Hu Q, Huang T. Int J Mol Sci 2023;24(10):8939 (8).*

Ћелијски циклус је у целини подељен на четири фазе, G1, S, G2 и М фазу (Слика 3). М фаза представља митозу, деобу ћелије, док остале три фазе заједно чине интерфазу. Интерфаза је период између две деобе током којих ћелија синтетише хранљиве материје и проверава да ли су се остварили сви услови неопходни за митозу. У S фази ћелијског

циклуса се дешава репликација DNK, док су G1 и G2 фаза кључни периоди од којих зависи даља деоба ћелије. Осим ових фаза, ћелије које се не деле могу ући у фазу мировања или G0 фазу (7). Ћелијски циклус је прецизно регулисан процес који се налази под директним утицајем циклина, циклин зависних киназа (енгл. *Cyclin-dependent kinases*, Cdk) и инхибитора циклин-зависних киназа (енгл. *Cyclin-dependent Kinase Inhibitors*, CKIs) (8).

Циклини су протеини који се наизменично стварају и разграђују, а која ће врста бити доминантна у датом тренутку, зависи од фазе у којој се ћелијски циклус налази (9). Да би циклини били активни, неопходно је формирање комплекса са одговарајућим ензимима, Cdk, чија је синтеза и разградња такође условљена фазом ћелијског циклуса. Комплекси циклин-Cdk се активирају фосфорилацијом и у стању су да покрену одговарајуће фазе ћелијског циклуса. У G1 фази ћелијског циклуса најактивнији су циклини D1, D2 и D3, у прелазној, G1/S фази циклин E, у S фази циклин A, док је у M фази активан циклин B (9). Интеракција различитих форми циклина D, Cdk4 и Cdk6 омогућава улазак у ћелијски циклус и пролазак ћелије кроз G1 фазу. G1/S прелаз карактерише формирање комплекса циклина E и Cdk 2 који омогућавају улазак ћелије у S фазу. У S фази ћелијског циклуса доминирају комплекси циклина A и Cdk2. У G2 фази су активни комплекси циклин A/Cdk1, а у фази митозе циклин B/Cdk1 (9). Различите врсте CKIs могу деловати на Cdk и изазвати њихову инактивацију. Две најзначајније фамилије CKIs су INK4 и фамилија CIP/Kip. INK4 инхибитори, p16, p15, p18 и p19 инактивирају Cdk4 и Cdk6 и спречавају њихову комбинацију са циклинима D-типа. С друге стране, CIP/Kip инхибитори, од којих су најпознатији p21, p27 и p57, инхибирају циклин E/Cdk2 и циклин A/Cdk2 комплексе (10).

У току G1 фазе ћелија пролази кроз тачку рестрикције, након које или улази у G0 фазу или се ћелијски циклус наставља. Комплекси циклина и Cdk фосфорилишу и протеин ретинобластома (pRb), који је битан регулатор ћелијског циклуса (11, 12). Наиме, уколико је неактиван и нефосфорилисан, pRb инхибира ослобађање E2F транскрипционог фактора који регулише синтезу циклина E и циклина A, али и других протеина и ензима битних за репликацију. Делимична фосфорилација pRb комплексом циклина D/Cdk4,5 ослобађа део E2F који је неопходан за синтезу циклина E, а тек након комплетне фосфорилације комплексом циклина E/Cdk2 долази до потпуног ослобађања овог транскрипционог фактора (11, 12). Ово би била и прва контролна тачка у G1 фази (енгл. *G1 checkpoint*).

Уколико су испуњени сви услови, ћелија ће ући у S фазу ћелијског циклуса, а уколико нису активираће се контролни механизми. Уколико је дошло до оштећења DNK у овој фази ћелијског циклуса, активираће се фактор p53 који затим ослобађа Cdk инхибитор p21, а он даље спречава активацију киназа. p53 такође може да учествује у повећању експресије гена за молекуле који учествују у процесу апоптозе, уколико су ћелије претрпеле веће оштећење (12). У току S фазе ћелијског циклуса долази до репликације молекула DNK, синтетишу се протеини, као и рибонуклеинска киселина (RNK), што је све неопходно за M фазу. У овој фази су активни комплекси циклин A/Cdk1, а повећава се постепено количина и циклина B који гради комплекс са Cdk1 и захваљујући њиховој активности, ћелија прелази у M фазу (9). Уколико постоји дефект хромозома, активираће се заштитни механизми G2 контролне тачке, који ће спречити даљу прогресију ћелијског циклуса. То укључује активацију p53 протеина, као и механизма репарације DNK. Ако је ово оштећење иреверзибилно, активираће се механизми апоптозе (9). Уколико

оштећење DNK настане у G2 фази ћелијског циклуса, активираће се Wee 1/2 киназе које заустављају ћелијски циклус у G2/M фази довољно дуго да се поправи настало оштећење (13). Деоба ћелије се завршава уласком у митозу. Након што се подела цитоплазме заврши у касној M фази, циклин B се разграђује, а ћелија може или наставити да се дели, уласком у нови ћелијски циклус или улази у стање мировања. Многобројне контролне тачке и у овој фази прекидају или одлажу ћелијски циклус у случају оштећења DNK, грешака у репликацији или аберантне митозе (8).

Онкогени су структурно и функционално хетерогена група гена чији производи контролишу пролиферацију, раст и диференцијацију ћелија, али и трансформацију нормалне ћелије у туморску. Ту спадају фактори раста, рецептори за факторе раста, транскрипциони фактори, различити протеини који учествују у трансдукцији сигнала у сигналним путевима битним за пролиферацију ћелија, као и регулатори апоптозе (14). Заправо, протоонкогенима се називају нормални гени који кодирају протеине битне за раст и пролиферацију ћелије, који после мутације или повећане експресије могу постати онкогени (15). Неки онкогени, као што су *Ras* гени, кодирају протеине који учествују у сигналним каскадама многих биохемијских путева који су битни за пролиферацију ћелије, а њихова мутација изазива неконтролисану деобу и следствену малигну трансформацију ћелије. Једна од таквих сигналних каскада је и MAPK (енгл. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) киназни пут, укључен у контролу експресије различитих транскрипционих фактора међу којима је и c-Мус (16).

c-Мус је један од најзначајнијих онкогена, игра битну улогу у регулацији ћелијског циклуса, а активира се различитим сигналним путевима. Наиме, под његовим директним утицајем се налази експресија неколико гена чији су производи позитивни регулатори ћелијског циклуса, као што су гени за Cdks, циклине и транскрипциони фактор E2F (17). Поред директног утицаја на транскрипцију, c-Мус утиче на хиперактивацију циклин/Cdk комплекса индукцијом Cdc25 фосфатазе или инхибицијом Wee 1 киназе. c-Мус инхибира транскрипцију p21, протеина који је укључен у деградацију p27, тако да и на овај начин, деловањем на SKIs, учествује у регулацији ћелијског циклуса. Такође, c-Мус индукује репликацију DNK регулацијом гена који кодирају протеине потребне за иницирање репликације (17). Препознат је као важна терапијска мета, јер је поремећај његове експресије удружен са многим туморима (18).

Јасно је да су пролиферација, диференцијација и смрт ћелије под строгим контролом комплексне мреже сигналних путева и последичне активације различитих транскрипционих фактора битних за ове процесе у ћелији. Један од најважнијих сигналних путева у регулацији пролиферације ћелије и ћелијске смрти је сигнални пут PI3K/AKT који укључује активацију фосфатидил инозитол 3-киназе (енгл. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*, PI3K) (19). PI3K је ензим који може бити активиран различитим сигналним путевима, као што је везивање фактора раста за рецепторе или преко *Ras* протеина. PI3K даље учествује у настанку фосфатидил-инозитол-3-фосфата (енгл. *Phosphatidylinositol 3-Phosphate*, PIP3) (20). У одговору на различите факторе раста, PI3K активира неколико сигналних путева у којима је PIP3 битан супстрат, међу којима је и PI3K/AKT сигнални пут.

AKT киназа спада у породицу серин/треонин протеин киназа. Фосфорилисани и активирани облик AKT киназе (pAKT) је главни низводни ефектор PI3K/AKT сигналног пута који је укључен у даљу активацију mTOR (енгл. *mammalian Target of Rapamycin*)

киназе (21). Овај сигнални пут је један од најзначајнијих за регулацију ћелијске пролиферације и ћелијске смрти, али и за настанак и прогресију многих тумора. Прекомерена активација или експресија АКТ киназе је повезана са интензивном пролиферацијом и повећаним преживљавањем туморских ћелија (21). АКТ киназа стимулише пролиферацију ћелија, односно пролазак кроз ћелијски циклус, и спречава улазак у апоптозу. Активацијом mTOR сигнализације регулише транскрипцију, синтезу протеина и ћелијску деобу. Поред ефекта на преживљавање и пролиферацију ћелије, једном активирају PI3K/AKT сигнални пут омогућава раст ћелије стимулацијом синтезе протеина преко mTOR киназе (21, 22). Наиме, mTOR киназа је једна од субјединица комплекса mTORC1, који директно делује на синтезу протеина у ћелији. Комплекс mTORC1 утиче на транскрипцију различитих гена битних за опстанак ћелије, утиче на транслацију, регулише ћелијски раст и деобу у одговору на факторе раста и доступне нутријенте. Хипоксија и оштећење ДНК блокирају активност mTOR киназе (22). За mTOR киназу је такође познато да има стимулативни ефекат на ћелијски циклус, односно прелазак из G1 у S фазу ћелијског циклуса (23). Поред мутације гена за *Ras* протеине, мутације гена за PI3K спадају у најчешће детектоване мутације у различитим врстама тумора. Мутације гена који кодира алфа-каталитичку субјединицу PI3K, пронађене су код карцинома дојке, цервикса, ендометријума, простате, колоректалног карцинома, глиобластома, меланома и многих других тумора (24). У истраживању које је спроведено код оболелих од карцинома грлића материце резистентног на зрачење је показана појачана експресија pAKT у односу на контролну групу, тако да је закључено да инхибитори PI3K/AKT сигналног пута могу бити корисни хемиотерапеутици (25).

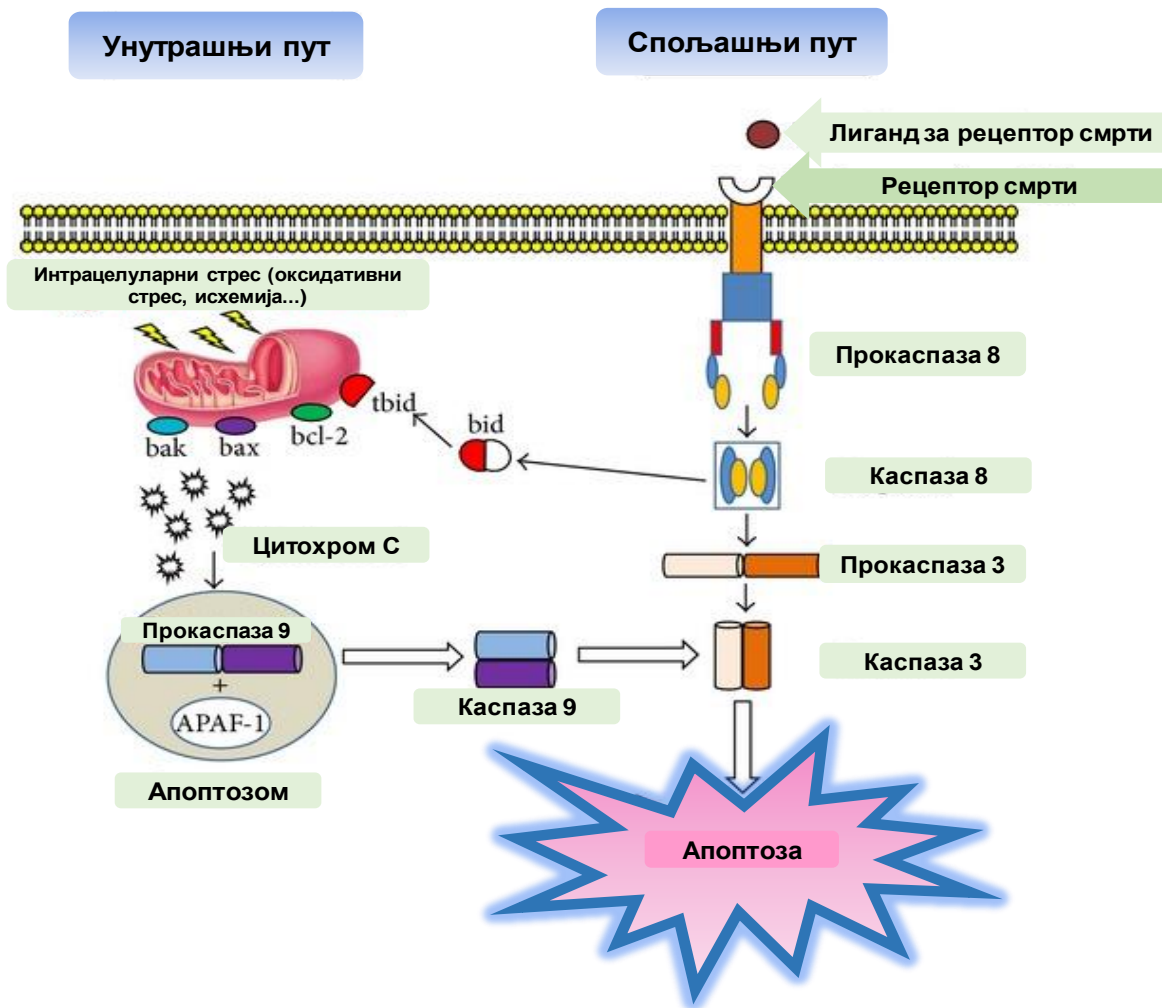
Поред инхибиције ћелијског циклуса, индукција апоптозе и других облика ћелијске смрти такође може бити од значаја за развој антитуморске терапије, с обзиром на то да је једна од основних карактеристика малигне ћелије избегавање ћелијске смрти. У основи, постоје два начина умирања ћелија, случајна или регулисана ћелијска смрт (26, 27). Случајна ћелијска смрт је биолошки неконтролисан процес, и настаје као последица оштећења ткива које превазилази све механизме надзора. Регулисана (програмирана) ћелијска смрт или апоптоза обухвата јасно дефинисане сигналне каскаде и прецизно дефинисане ефекторске механизме. Поред апоптозе, последњих година, термин програмирана ћелијска смрт по новим класификацијама обухвата све више различитих облика ћелијске смрти као што су некроптоза, пироптоза, фероптоза, аутофагија и други (26, 27).

Апоптоза је једна од најзначајнијих врста програмиране ћелијске смрти и сматра се виталном компонентом различитих процеса, како физиолошких тако и патолошких. Строго је регулисан процес који се дешава без индукције запаљеног процеса (28, 29). У току апоптозе се дешавају специфичне морфолошке промене. Карактеристично је да се ћелије смежуравају, долази до бубрења ћелијске мембране, једро постаје пикнотично, губе се елементи цитоскелета и ћелије се заокругљују. Затим, код апоптотских ћелија долази до инверзије ћелијске мембране тако да фосфатидил-серин доспева на спољашњу страну мембране. У следећој фази се формирају апоптотска телаца која садрже цитоплазму, органеле и фрагменте једра. Фосфатидил-серин на спољашњој мембрани привлачи фагоците који га препознају својим рецепторима. Процес фагоцитозе апоптотских телаца спречава иницирање запаљеног процеса у околном ткиву (28, 29).

Главни путеви апоптозе укључују спољашњи пут, преко рецептора смрти, и унутрашњи митохондријални пут. Додатно, апоптоза може бити покренута и гранзимима А и В које ослобађају цитотоксички лимфоцити (30). У програмираној ћелијској смрти, кључну улогу играју цистеин аспартил-специфични ензими, каспазе, које протеолитички разлажу ћелијске супstrate изазивајући биохемијске и морфолошке промене које су карактеристичне за апоптозу. Постоје три групе каспаза - иницијаторске (2, 8, 9, 10), ефекторске (3, 6, 7) и инфламацијске (1, 4, 5, 12) (31). Код сваког од наведених апоптотских путева, другачија иницијаторска каспаза покреће процес (нпр. 8, 9 или 10), да би након низа различитих биохемијских процеса сва три пута довела до активације каспазе 3, која се сматра ефекторском каспазом (29).

Један од врло честих покретача унутрашњег (митохондријског) пута активације апоптозе је оштећење ДНК, које може настати због оксидативног стреса, јонизујућег зрачења, исхемије и других штетних фактора. Следствена промена пермеабилности митохондријалне мембране праћена је ослобађањем проапоптотичких протеина као што су цитохром С и Smac/DIABLO. Цитохром С затим формира комплекс са ензимом АРАФ-1, који активира каспазу 9. Заједно са каспазом 9 формира се структура названа апоптозом који даље активира ефекторску каспазу 3 (32). Smac/DIABLO протеини делују и тако што инактивирају инхибиторне протеине апоптозе (енгл. *Inhibitors of Apoptosis Proteins*, IAPs) (33). Унутрашњи пут апоптозе се налази под контролом велике фамилије Bcl-2 протеина (34). Неки од ових протеина су антиапоптотички (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG), док су други проапоптотички (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik и Blk). Када се проапоптотички протеини, као што су на пример Bax и Bak, активирају, настаје њихова олигомеризација на спољашњој мембрани митохондрија што нарушава њен интегритет и ослобађа се цитохром С који даље омогућава активацију каспазе 9 (34, 35).

Спољашњи пут апоптозе подразумева везивање лиганда за рецепторе смрти. Најпознатији рецептори смрти су FasR, TNFR1 (енгл. *Tumour Necrosis Factor Receptor 1*) и TRAIL-R (енгл. *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor*). Након везивања одговарајућег лиганда, настаје конформациона промена у самом рецептору и следствена активација различитих ензима, односно формирање апоптотског комплекса који активира прокаспазу 8. Каспаза 8 затим активира каспазу 3 (36, 37). Спољашњи пут може покренути унутрашњи, када се активирана каспаза 8 веже за проапоптотички Bid протеин, који мења интегритет митохондријалне мембране ослобађајући цитохром С (26, 38). На Слици 4 су представљени механизми унутрашњег и спољашњег пута апоптозе (38).



Слика 4. Механизми унутрашњег и спољашњег пута апоптозе. Преузето и кориговано према: Loreto C S et al. *Biomed Res Int.* 2014;2014:616149 (38).

Апоптоза је повезана са бројним физиолошким механизмима контроле раста и пролиферације ћелија, тако да је избегавање апоптозе један од предуслова за настанак тумора. Туморске ћелије могу имати поремећај у регулацији апоптозе на више нивоа, почев од поремећаја сигнализације, до повећања експресије антиапоптотичких протеина и смањења експресије проапоптотичких протеина. Дефекти у индукцији апоптозе могу на крају довести до избегавања надзора од стране имунског система и ширења популације туморских ћелија. Значај избегавања апоптозе у развоју тумора се огледа и у томе што већина познатих хемиотерапеутика и зрачење делују тако што изазивају апоптозу туморских ћелија (39).

1.1.2. Фармаколошка терапија тумора

Конвенционална хемиотерапија обухвата примену неколико група хемиотерапеутика чији је циљ заустављање пролиферације туморских ћелија, раста тумора, као и спречавање инвазије и метастазирања. Ови лекови делују различитим механизмима, тако што нарушавају структуру молекула DNK или RNK, ометају синтезу протеина, односно инхибирају молекуле који су битни за преживљавање ћелије што изазива застој у ћелијском циклусу или индукцију апоптозе. На жалост, треба имати у виду да оваква врста терапије делује и на здраве ћелије, због чега је њена примена праћена многобројним нежељеним ефектима (40, 41).

Велики проблем у терапији тумора представља и развој резистенције на конвенционалне цитостатике, који туморске ћелије могу развити на неколико начина - изменом циљног дејства лека, појачањем експресије ефлуксних пумпи, експресијом механизма детоксикације, повећањем способности поправке DNK, смањеном осетљивошћу на апоптозу и измењеном пролиферацијом (42). Циљ истраживања нових хемиотерапеутика, поред избегавања токсичких нежељених дејстава, је и избегавање резистенције на лек.

Постоји неколико група цитотоксичких лекова. Алкилирајући агенси као што су циклофосфамид, стрептозоцин и хлорамбуцил су, заједно са цисплатином, оксалиплатином и карбоплатином, сврстани у исту групу због сличног механизма дејства (41, 43). Ови лекови се лако везују за молекул азота у пуринској бази молекула DNK, гуанину, оштећују молекул DNK и изазивају застој у процесу деобе ћелија (41, 43). Међутим, познато да ови лекови изазивају бројне тешке нежељене ефекте од којих су међу најозбиљнијим нефротоксичност, ототоксичност и мијелосупресија (44). Антиметаболити различитим механизмима дејства оштећују молекул DNK. Неки од њих, као што је гемцитабин, инхибирају синтезу DNK ометајући дејство ензима рибонуклеотид редуктазе (45). Метотрексат врши редукцију фолата и на тај начин омета синтезу пуринских база (46), док 5-флуороурацил, формирајући комплекс са тимидин-синтетазом такође омета синтезу и поправку молекула DNK (47). Антрациклини, као што је доксорубицин, делују на ензиме који учествују у репликацији DNK тако што утичу на све фазе ћелијског циклуса, док у већим дозама изазивају тешка оштећења срчаног мишића (48). Митотски инхибитори су алкалоиди биљака који се као такви могу наћи у природи, а делују тако што инхибишу М фазу ћелијског циклуса. Најпознатији лекови из ове групе су таксани и то паклитаксел и доцетаксел (49), као и *vinca* алкалоиди: винбластин, винкрестин и винорелбин (50). Остале групе хемиотерапеутика чине тзв. антиканцерски антибиотици: блеомицин, митоксантрон, инхибитори топоизомеразе, топотекан и етопосид (41). Приликом примене конвенционалне хемиотерапије се врло често комбинују различите групе лекова, што датира још од истраживања *Einhorn*-а и сарадника, који су, од 1974. до 1978. године, у току проучавања леукемије, успели да комбинацијом хемиотерапијских агенаса као што су цисплатина, винбластин и блеомицин, повећају преживљавање код метастатског карцинома тестиса са 10% на 60% (51).

Други приступ у лечењу тумора представља имунотерапија која обухвата више опција као што су примена моноклонских антитела, која укључује и примену инхибитора контролних тачака, адоптивну ћелијску терапију или терапију тумор инфилтрирајућим

лимфоцитима (енгл. *Tumor Infiltrating Lymphocytes*, TIL) и терапију Т лимфоцитима са химерним антигеним рецептором (енгл. *Chimeric Antigen Receptor*, CAR) (52), примену антитуморских вакцина, као и различитих врста цитокина (53). Хемиотерапија је, са открићем моноклонских антитела заправо прешла у раздобље “циљане терапије” (54). До 2020. године је за клиничку употребу одобрено преко 23 хемиотерапеутика на бази моноклонских антитела, као и 12 хемиотерапеутика који представљају моноклонска антитела конјугована са цитотоксичким лековима (55). Ритуксимаб је прво моноклонско антитело које је одобрено за клиничку примену 1997. године, за терапију лимфома, а везује се за CD20 молекула (56). Цетуксимаб се користи у терапији колоректалног карцинома (57), а трастузумаб, моноклонско антитело специфично за HER-2 рецептор (енгл. *Human Epidermal growth factor Receptor 2*) се веома успешно користи у терапији карцинома дојке који исказују овај рецептор (58). Инхибитори контролних тачака (“*checkpoint*” инхибитори) као што су PD-1 (енгл. *Programmed Cell Death 1*) (ниволумаб, пембролизумаб), PD-L1 (енгл. *Programmed Cell Death Ligand 1*) (атезолизумаб, дуралумаб) и CTLA-4 (енгл. *Cytotoxic T Lymphocyte-Associated protein 4*) (ипилидумаб) инхибитори, су направили револуцију у лечењу различитих врста тумора (59).

Међутим, и ова врста антитуморских агенаса има бројна нежељена дејства од којих се као најозбиљнија могу сматрати неуролошки нежељени ефекти (који укључују аутоимунски енцефалитис, асептични менингитис и мултиплу склерозу) (60), кардиотоксичност (61) и компликације од стране ендокриног система попут индукције *diabetes mellitus*-а (62). У току последње деценије један од главних приступа у лечењу тумора подразумева комбинацију имунотерапије и примене цитотоксичких лекова. Тако је на пример актуелна комбинација трастузумаба и циплатине у терапији карцинома дојке (63). Постоје и истраживања у којима се токсична хемиотерапијска средства конјугују са моноклонским антителима како би се прецизније допремала до циљних ћелија (64).

У последње време, актуелна су истраживања нових антитуморских агенаса који делују као инхибитори ћелијског циклуса. Најчешће делују на Cdks, а могу бити селективни (делују на одређене Cdks) и неселективни (делују на више различитих Cdks). На пример, флавопиридол је неселективни пан-Cdks инхибитор, који може зауставити ћелијски циклус у било ком тренутку (65). Посебно ефикасно се показао у комбинацији са појединим цитотоксичким хемиотерапеутицима. На пример, уколико се флавопиридол примени након терапије лековима који изазивају оштећење ДНК, заустављајући S фазу ћелијског циклуса, инхибиција Cdks даље омета фосфорилацију E2F што уводи ћелију у апоптозу. Такав ефекат је изражен приликом комбинације са гемцитабином (65). Флавопиридол такође показује синергију и са таксанима, па се ефекат комбинације са доцетакселом испитује у клиничкој студији са пацијентима оболелим од карцинома простате (65). Испитивањем R-росковитина, такође неселективног инхибитора Cdks, на ћелијама MCL (енгл. *Mantle Cell Lymphoma*) лимфома, показано је да изазива накупљање ћелија у G2/M фази и индукцију апоптозе (66). Снижен ниво циклина D1 и Mcl-протеина су сугерисали да је до застоја у ћелијском циклусу дошло због инхибиције елонгације транскрипције, што је и показао снижен ниво фосфорилисане RNK-полимеразе II (66). Примери селективних инхибитора Cdk4 и Cdk6 су палбоциклиб, рибоциклиб и абемациклиб, који се налазе у различитим стадијумима клиничких испитивања (67). Палбоциклиб се у комбинацији са другим антитуморским лековима користи у лечењу естроген-позитивног HER-2-негативног карцинома дојке (68).

Примена Cdkс инхибитора је на жалост праћена многобројним нежељеним ефектима, почев од гастроинтестиналних тегоба и електролитског дисбаланса до неутропеније, леукопеније и хепатобилијарне токсичности (69). Интересантно је да неки од ових лекова антагонизују дејство цитостатика, што је примећено приликом комбинације палбоциклиба и карбоплатине (70), поготово кад су у питању неселективни инхибитори.

Блокирање молекула који учествују у PI3K/AKT/mTOR сигналном путу се показало као добра стратегија у антитуморској терапији. У последњим фазама клиничких испитивања се тренутно налазе капивасертиб за лечење карцинома дојке (71), као и ипатасертиб и упросертиб, посебно испитивани за лечење троструко негативног карцинома дојке (енгл. *Triple Negative Breast Cancer*, TNBC) (72), који делују као инхибитори АКТ киназе. Многи инхибитори PI3K и mTOR су већ одобрени од стране Америчке агенције за храну и лекове (енгл. *Food and Drug Administration*, FDA), као што су еверолимус, сиролимус, темсиролимус, алпелисиб, дувелисиб, копанлисиб и идеалисиб (73).

Такође, тренд дизајна антитуморских лекова последњих година је деловање на поједине сегменте апоптотског пута. Највише су испитивани инхибитори каспаза. На пример, показано је да синтетски пан-каспазни инхибитор, *z-VAD-fmk*, када се апликује изазива застој у расту ћелија карцинома дојке MCF-7 и MDA-MB-231 које су претходно инфициране *herpes-simplex* вирусом тип 1 (HSV 1) за 24 - 33% (74). Каспаза-3 инхибитор, M867, је редуковао прогресију и васкуларизацију тумора пореклом од ћелија карцинома плућа H460 (75). Међутим, установљено је да су се ови, а и многи други инхибитори каспаза, показали лоше у претклиничким студијама, због ниске специфичности, мале ефикасности и осетљивости на развој резистенције, тако да ова област захтева још много истраживања како би примена била могућа (75).

1.2. Металотерапија тумора

Примена једињења метала у терапији тумора је позната преко 200 година, а почела је када је када је *Fowler*-ов раствор, калијум-арсенит, примењен за лечење леукемије (76). Од тада, до открића дисплатине, није било нових сазнања у овој области. Међутим, због пораста броја оболелих од малигних болести и бројних нежељених дејстава постојећих хемиотерапеутика, последњих деценија су актуелна истраживања која се баве металотерапијом тумора. Један од разлога је свакако и то што су многобројна једињења метала показала значајан цитотоксички ефекат *in vitro*, а уз то се хемијски могу модификовати додавањем различитих лиганата што може побољшати њихов ефекат и смањити токсичност (77).

Као потенцијални антитуморски агенси највише се проучавају једињења прелазних метала, пре свега платине (Pt) и паладијума (Pd). Актуелна су и испитивања иридијума, осмијума, родијума и рутенијума (78), затим арсена, антимона, бизмута, злата, ванадијума, гвожђа, титанијума, галијума и других (79). Од свих метала, до скоро су се једино једињења Pt користила у клиничкој пракси, за лечење различитих тумора, укључујући туморе тестиса, јајника, бешике, главе и врата, једњака, плућа, дојке, грлића материце, желуца и простате (80). Последњих деценија се испитују комплекси различитих метала за које се претпоставило да могу бити успешни у фотодинамској терапији тумора. Изузев комплекса Pd, (паделипорфин), који је одобрен за терапију код карцинома простате, у различитим фазама клиничких испитивања се налазе комплекси

који садрже калај (ростапорфин), лутецијум (мотексафин), алуминијум (фотосенс) и рутенијум (TLD-1433) (81).

Многи комплекси метала су показали снажан цитотоксички ефекат на хуманим и мишјим културама туморских ћелија. На пример, комплекси сребра са пиридином су у *in vitro* испитивању показали значајан цитотоксички ефекат на ћелијама хепатоцелуларног карцинома, (НерG2), аденокарцинома плућа (A549), карцинома колона (HT29) и дојке (MCF-7) (82). Такође, комплекси злата са *N*-хетероцикличним карбеном су показали туморицидан ефекат на ћелијама карцинома колона (HCT 116) (83), док су комплекси бакра са бензимидазолом цитотоксички деловали на ћелије карцинома дојке (MCF-7) (84).

Изазов истраживачима поред снажног туморицидног ефекта који неки метали показују, представља и испитивање безбедног и прецизног транспорта до циљних ћелија. Развој нових облика транспорта и таргет-терапије отвара много нових могућности за примену метала у терапији тумора (77).

1.2.1. Комплекси платине у терапији тумора

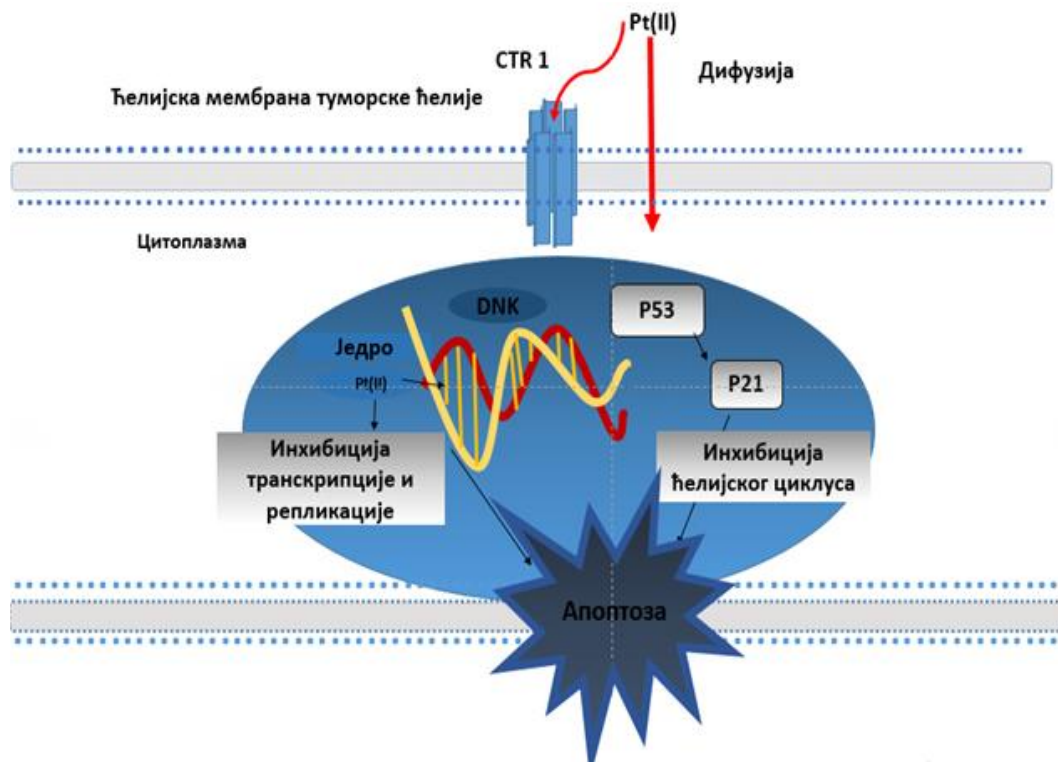
Pt је прелазни метал који припада такозваном “*d*” блоку елемената, тако да лако мења свој оксидациони број, због чега је способна да са различитим врстама лиганда гради координационе комплексе (85). У својим комплексима може имати различит оксидациони број, од +1 до +4, али у природи преовлађује +2 оксидационо стање. Приликом формирања комплекса, у зависности од оксидационог броја, Pt може формирати једињења са различитим бројем лиганда. Најчешћи лиганди у овим комплексима су молекули који садрже фосфор, азот или хлор, као донорске атоме (86).

Комплекси Pt(II) могу бити мононуклеарни или полинуклеарни, у зависности од тога колико језгара Pt садрже. Неколико мононуклеарних комплекса Pt(II) се успешно примењује у хемиотерапији тумора, док за мултинуклеарне комплексе постоји све веће интересовање јер се сматра да имају другачију реактивност и боље биолошке особине у односу на цисплатину и њене аналоге (87). Креирање и синтетисање нових динуклеарних и уопште полинуклеарних комплекса је посебно актуелно последњих година, а усмерено је на истраживање нових начина везивања комплекса за молекуле DNK, како би се превазишао проблем резистенције на мононуклеарне комплексе (88).

Један од првих комплекса Pt(II) примењен у медицини је цисплатина, (*cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂], *cis*-diamminedichloroplatinum(II)). Антипролиферативни ефекат цисплатине, планарног координационог комплекса Pt у *cis* облику, је откривен случајно. Цисплатина је пронађена као супстанца која се ослобађала на површини Pt електрода у амонијачном пуферу, под утицајем електричне струје. Новонастала супстанца је имала способност да инхибира размножавање бактерије *Escherichia coli*, што је и публиковано у раду који су 1965. године објавили *Rosenberg* и сарадници (89), док је касније откривено и њено антитуморско дејство (90). Антитуморски ефекат цисплатине *Rosenberg* и *Van Camp* су доказали и на мишјем саркому *in vivo*, при чему је показано да након једне интраперитонеалне дозе овог једињења долази до регресије тумора за 60% (90). *Rosenberg* 1973. године у свом раду описује испитивање антитуморског ефекта различитих координационих комплекса Pt, углавном добијених модификацијом цисплатине, на чак 28 врста различитих тумора, од којих је већина нових комплекса била

већ у II фази клиничких испитивања (91). Цисплатина је 1978. године постала доступна у онколошкој терапији (*Platinol*[®]) (92).

Након уласка у ћелију, најчешће пасивном дифузијом, цисплатина подлеже хидролизи, а у ћелију се може унети и преко различитих транспортера, од којих је један од најзначајнијих транспортер бакра 1 (енгл. *Cooper Transporter 1*, CTR1). Сматра се да ова интеракција са транспортерима бакра може бити одговорна за резистенцију на лек (93). На Слици 5 је приказано потенцијално туморицидно дејства комплекса Pt(II) (Слика 5).



Слика 5. Потенцијални механизам туморицидног дејства комплекса платине(II). Преузето и кориговано према: *Dilruba S, Kalayda GV. Cancer Chemother Pharmacol 2016;77(6):1103-24.* CTR 1: транспортер бакра 1 (енгл. *Cooper Transporter 1*) (93).

Резултати истраживања које је спроведено на ћелијској линији хуманог карцинома оваријума (A2780), су показали да CTR1 посредује у преузимању цисплатине у ћелије и да вероватно представља једну од детерминанти резистенције јер је пронађена нижа експресија CTR1 у ћелијама које су мање акумулирале цисплатину (94). Потенцијални механизам туморицидног дејства цисплатине и уопште комплекса Pt(II) подразумева да се они најчешће везују за N7 позицију гуанина, на молекулу DNK, формирајући ковалентну везу са једним атомом азота (93). Након везивања, формирају се структуре назване DNK адукти, које су у облику затвореног прстена. DNK адукти нарушавају структуру молекула DNK и доводе до његовог расплитања (95). Комплекси Pt(II) могу формирати укрштене везе, између два суседна ланца DNK, најчешће између два гуанина или између гуанина и аденина (96), затим се могу везивати путем интеркалације што подразумева уметање комплекса Pt(II) између базних парова молекула DNK, што нарушава његову структуру и функције (97). Није ретко ни везивање за мали или велики жлеб DNK, што не нарушава структуру DNK, али може утицати на интеракције молекула DNK и експресију гена (98). Од осталих начина везивања, честе су и електростатичке интеракције, када реагују позитивно наелектрисане групе лигананда

и негативно наелектрисане фосфатне групе ДНК молекула (99). Због постојања адуката комплекс/ДНК настаје инхибиција транскрипције и репликације. Теоретски, постоје два начина да се реши овако настало оштећење ДНК, активација система за поправку ДНК или смрт ћелије. Сматра се да цисплатина оштећује ДНК тешко и ирверзибилно, због чега ћелије подлежу апоптози (100).

Резултати испитивања механизма цитотоксичког дејства цисплатине на три ћелијске линије акутне промијелоцитне леукемије (HL-60, KG-1a и NB4) су показали да цисплатина може да индукује стварање реактивних кисеоничних једињења (енгл. *Reactive Oxygen Species*, ROS). У ћелијама је такође забележено појачано ослобађање продуката липидне пероксидације као што је малондиалдехид што додатно изазива оштећење ДНК. Интересантно је да је приликом третмана цисплатином, дошло до повећања нивоа транскрипционог фактора AP-1 (енгл. *Activator Protein 1*) и p53 протеина, као и повећања експресије p21 и самим тим до застоја ћелијског циклуса у G1 фази (101). Даље, у истом истраживању је показано да цисплатина изазива апоптозу унутрашњим путем јер су забележени повишени нивои експресије каспазе 3 и цитохрома C (101). На основу претходних истраживања, показано је да цисплатина такође може да индукује и некроптозу кроз формирање некрозома који садрже RIPK1 (енгл. *Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 1*), RIPK3 и MLKL (енгл. *Mixed Lineage Kinase domain-Like protein*) протеине, који су укључени у оштећење мембране и каснију ћелијску смрт (102).

Треба истаћи да је цисплатина мононуклеарни комплекс Pt, а да везивање са молекулом ДНК зависи од природе комплекса. На пример, познато је да се мононуклеарни комплекси везују за једну позицију унутар молекула ДНК, формирајући монофункционалне ДНК адукте, док се полинуклеарни комплекси могу везивати на више начина (на пример, динуклеарни комплекси формирају бифункционалне ДНК адукте) (103). Истраживања су показала да динуклеарни комплекси са алкен-диаминским лигандима, могу формирати такозване “*intrastrand*“ унакрсне везе (везују се за два места на једном ланцу ДНК) или “*interstrand*“ (везују се за два различита места на два комплементарна ланца молекула ДНК), а могу повезивати и два молекула ДНК. У свим тим случајевима је везивање ових комплекса бифункционално, што значи да у вези са молекулом ДНК могу бити оба Pt језгра. У ове структуре могу бити укључени и протеини са којима се комплекси Pt везују, тако да се некада могу везивати једним Pt језгром за молекул ДНК, а другим за протеин, па је такво везивање монофункционалног типа (103). Постоје и истраживања на основу којих се може претпоставити да комплекси Pt могу стимулирати антитуморски имунски одговор, па је тако примећено да мишеви са метастатским лезијама карцинома плућа, који су третирани комплексом [PtCl₄(en)], у слезини имају значајно веће проценте NK и NKT ћелија, као и CD8⁺ цитотоксичких Т лимфоцита (104).

Убрзо након примене цисплатине појавили су се и први нежељени ефекти, пре свега нефротоксичност, а затим и ототоксичност, мијелосупресија, хепатотоксичност и кардиотоксичност. Губитак слуха и гастроинтестиналне тегобе у виду мучнине и повраћања су врло честе појаве (44). Без обзира на нежељене ефекте, цисплатина се ефикасно користи за лечење различитих тумора. Међутим, значајан терапијски проблем је и развој резистенције на цисплатину, која је праћена смањеном акумулацијом лека у ћелији. Претпоставља се да разлози могу бити генетске или епигенетске промене које

доведе до губитка везујућег места или транспортера за цисплатину, али и инактивација услед везивања за молекуле који садрже тиол-групе (105).

Како би се смањила токсичност и развој резистенције на лек, синтетисано је неколико мононуклеарних комплекса добијених модификацијом цисплатине, од којих су само карбоплатина и оксалиплатина одобрене за клиничку употребу у целом свету. Од осталих комплекса, одобрене су и недаплатина и мираплатина у Јапану, хептаплатина у Кореји и лобаплатина у Кини (106). У истраживањима се показало да је и карбоплатина ефикасна као антитуморски агенс, да су нежељени ефекти слабији, а да је највећи проблем укрштена резистенција са цисплатином. У активном облику, карбоплатина је идентична цисплатини, тако да сви тумори који су резистентни на цисплатину, најчешће развијају резистенцију и на карбоплатину (107). 2002. године је за клиничку употребу одобрена и оксалиплатина (108). Оксалиплатина се користи за терапију колоректалног карцинома у комбинацији са 5-флуороурацилом и фолинском киселином, поготово код врста код којих су цисплатина и карбоплатина неефикасне (109). Осим тога, због могућности оралне примене, комплекси Pt(IV) су постали предмет великог броја истраживања, али су само два комплекса близу могућности одобрења за клиничку примену, сатраплатина и LA-12 (110). Сатраплатина показује значајну антитуморску активност на неколико линија хуманих туморских ћелија које су резистентне на цисплатину (111).

Инкорпорирање деривата Pt у липозомалне партикуле које омогућавају лакше допремање ових једињења до ћелије се налази у фокусу савремених истраживања (112). На пример, антитуморски агенс *ProLindac*TM се користи у третману карцинома дојке, оваријума, плућа и простате, као и за терапију метастатског карцинома дојке, а представља оксалиплатину повезану са комплексом који јој омогућава лакши транспорт (112). Затим, приликом примене липоплатине, липозомалне варијанте цисплатине, уочено је значајно смањење појаве реналне токсичности, периферне неуропатије, ототоксичности и других нежељених ефеката, попут мучнине и повраћања. Испитивање њеног туморицидног потенцијала и могућност комбинације са другим цитостатицима у циљу ублажавања нежељених дејстава је предмет истраживања бројних клиничких студија (113). Иако се свакодневно испитује веома велики број динуклеарних и полинуклеарних комплекса Pt, углавном се налазе у различитим претклиничким студијама. Један од првих полинуклеарних комплекса Pt који је ушао у фазу II клиничких испитивања је био тринуклеарни бифункционални комплекс, $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}2-\mu\text{-trans-}\{\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2)_2\}](\text{NO}_3)_4$ [Триплатин, VBR3464], који се сматрао ефикасним за лечење тумора који су били резистентни на цисплатину (114).

1.2.1.1. Примена комплекса платине у терапији карцинома дојке

Примену цисплатине код карцинома дојке са метастазама у цервикалним лимфним чворовима је међу првима описао Rossof, 1972. године (115). Иако је показала значајну ефикасност, са 50% регресије тумора која се одржавала 3 месеца, цисплатина није разматрана као лек првог избора пре свега због нежељених ефеката и компликоване примене која је захтевала интензивну парентералну хидратацију (116). Наредне студије су показале да је терапијски успех извеснији уколико се цисплатина примени као прва линија хемиотерапије, поготово кад је у питању метастатски карцином дојке (117).

У низу клиничких студија које су уследиле се испитивало њено комбиновање са другим хемиотерапеутицима. Комбинација са етопосидом је испитивана у клиничким студијама код пацијената са метастазама и у различитим дозама је показала различиту ефикасност (118, 119). У клиничкој студији са пацијенткињама које су биле лечене другим терапијским режимима, комбинација са 5-флуороурацилом се показала успешном, чак и у случају постојања метастаза (120). Примена паклитаксела и цисплатине се показала успешном у фази II клиничких испитивања код метастатског карцинома дојке, али је успех био лимитиран бројним нежељеним ефектима као што су болови у мишићима, мучнина, повраћање, неуропатија, нефротоксичност, неутропенија и анемија (121). Ефекат комбинације са доцетакселом (122) и гемцитабином (123) је био праћен неутропенијом и тромбоцитопенијом као најчешћим нежељеним ефектима (122, 123). Интензивно испитивање цисплатине и њених аналога је постало актуелно 1994. године, када је примећено синергистичко дејство са трастузумабом на култури ћелија хуманог карцинома дојке (124). Предклиничке студије које су уследиле су такође показале да је синергистичко дејство цисплатине и трастузумаба ефикасније него што је ефекат ових агенаса појединачно (125). Интересантно је да је 2019. године Pt(II) по први пут употребљена као везујући елемент између моноклонског антитела трастузумаба и синтетичког цитотоксичког агенса ауристатина F. Прелиминарни резултати су били обећавајући, што је показано туморицидним ефектом на неколико ћелијских линија међу којима је и JИМТ-1, ћелијска линија HER-2 позитивног дукталног карцинома дојке (126).

Хемиотерапија једињењима на бази Pt се показала нарочито ефикасном код TNBC (127). TNBC је веома агресиван облик болести, са већим туморима него код осталих врста и метастазама у лимфним чворовима, а карактерише га одсуство хормонских рецептора за естроген и прогестерон, као и HER-2 рецептора. Чак 50% пацијената у раној фази доживљава рецидив болести, а 37% умире у првих 5 година након операције (128). TNBC се најчешће лечио комбинацијом режима заснованих на примени таксана и антрациклина (129). Садашње смернице подржавају исти протокол, међутим, због хетерогености и високе стопе релапса TNBC, постоји потреба за оптимизацијом ефикасности лечења и развијањем нових терапијских протокола који потенцијално могу побољшати преживљавање (130). Примена деривата Pt, као што је карбоплатина у склопу неoadјувантне терапије, код TNBC и HER-2 позитивних карцинома дојке је индуковала потпуну регресију тумора у патохистолошком смислу, у 53%, односно 33% случајева (131).

1.2.2. Потенцијална примена комплекса паладијума у терапији тумора

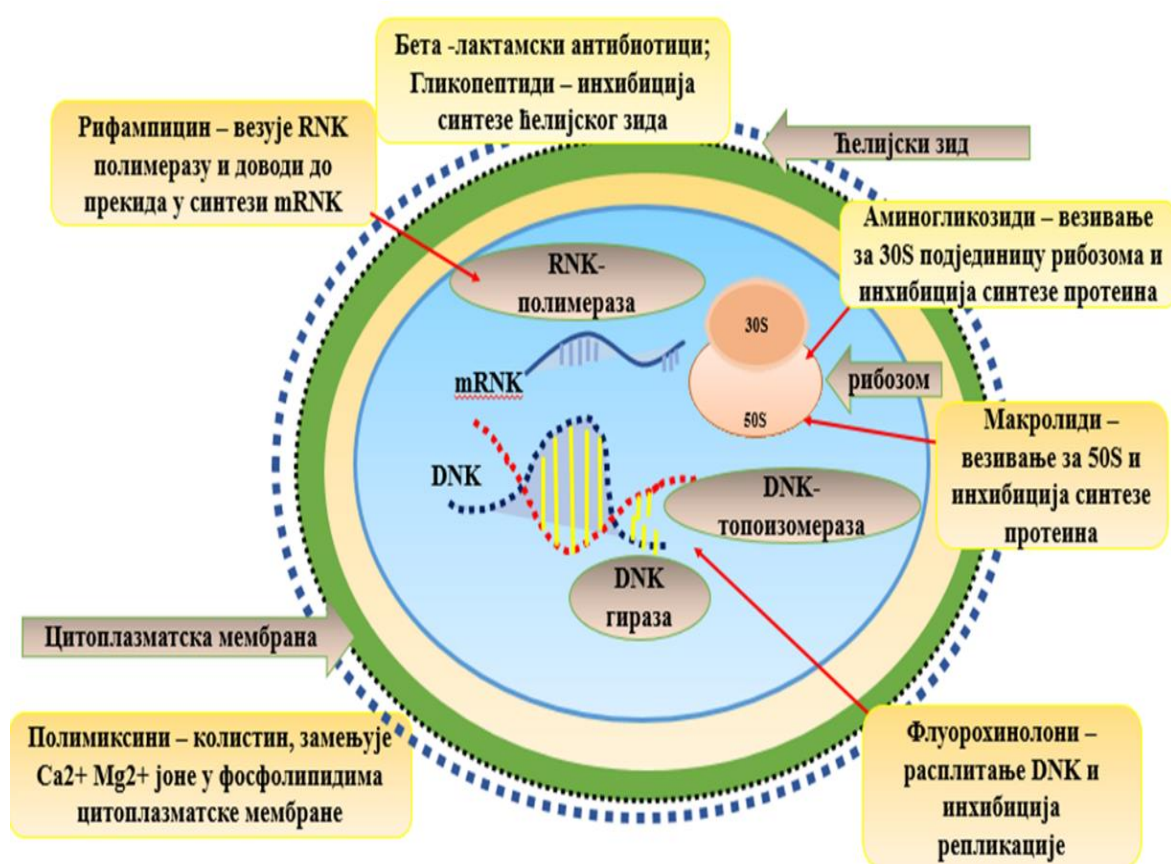
Због токсичности и великог броја нежељених ефеката комплекса Pt, последњих деценија су актуелна истраживања и других метала, који представљају обећавајућу базу за испитивање нових антитуморских агенаса. Pd, као и Pt припада групи прелазних метала, а због физичке и хемијске сличности са Pt, очекује се да су комплекси који садрже Pd по својим антитуморским својствима слични Pt аналозима. Токсиколошка испитивања су показала 10 пута мању токсичност једињења Pd него једињења на бази Pt, што их као потенцијалне антитуморске лекове чини безбеднијим за примену (132). Међутим, за разлику од Pt, комплекси Pd су нестабилни, односно 10^5 пута брже подлежу хидролизи него комплекси Pt, тако да очекивани фармаколошки ефекат често изостаје (133). За велики број различитих мононуклеарних и полинуклеарних комплекса Pd је познат механизам антитуморског дејства али недостаје више студија које би се бавиле метаболичким и *in vivo* ефектима, што је неопходно за разматрање њихове примене у терапији тумора (134).

Низ студија које су спроведене последњих година су се бавиле испитивањем потенцијалних механизма индукције смрти туморских ћелија комплексима Pd(II). На пример, у једној од студија је показано да мононуклеарни комплекси Pd са куркумином изазивају цитотоксички ефекат на неколико ћелијских линија карцинома простате. Ови комплекси су индуковали апоптозу, што је доказано повећањем нивоа каспазе 3, усходном регулацијом проапоптотичких Вах протеина и нисходном регулацијом антиапоптотичких Bcl-2 протеина (135). Такође, у истраживању *Ulukaya* и сарадника је показано да комплекси Pd(II) са сахаринатом и пиридином индукују апоптозу ћелија хуманог карцинома дојке MCF-7, повећањем експресије гена за рецепторе смрти из породице TNF- α , TRAIL-R1 и TRAIL-R2, и следственом активацијом каспазе 8 која затим активира ефекторске каспазе (136). Посебно интересовање постоји за синтезу комплекса Pd(II) са ароматичним лигандима, као што су хидроксипиридин (137) и фенантролин (138), јер се претпоставља да имају потенцијал да буду ефикасни антитуморски лекови. 2017. године је за лечење карцинома простате одобрен први комплекс Pd(II), назван паделипорфин (WST011) (81, 139). Његова ранија модификација, падопорфин (WST09) је растворљива у мастима, али не и у води, због чега је приликом интравенске администрације потребно користити носач (81, 139). Паделипорфин се користи у фотодинамској терапији тумора, а означен је као фотосензибилизатор. Наиме, фотосензибилизатори су супстанце које под утицајем светлости омогућавају настанак реактивног кисеоника који затим уништава туморску ћелију (140).

На основу истраживања *Vojtek* и сарадника, од 1992. до 2018. године, установљено је да се за чак 121 нови комплекс Pd(II) испитује антитуморска активност код карцинома дојке, а посебно код TNBC (141). *Vojtek* и сарадници су комплексе Pd(II) примењене у овим истраживањима поделили на неколико група на основу врсте лиганда који су припадали различитим хемијским једињењима као што су етил-диамини, биогени полиамини, бензил-амини, деривати пиридина, пиразола, имидазола, тиоуреа и тиосемикарбазони. Истраживања су показала да је за неке комплексе Pd(II), као што су комплекси са аминским лигандима, претпостављени механизам дејства оштећење молекула DNK, ковалентним везивањем комплекса за азотне базе, најчешће пуринске, док је за комплексе са бензил аминима и ароматичним једињењима показано да индукују апоптозу (141).

1.3. Комплекси прелазних метала у борби против растуће резистенције микроорганизама на антимикуробне лекове

Постоји веома велики број природних и синтетских антимикуробних супстанци, које на различите начине могу деловати на микроорганизме (142). Бета-лактамски и гликопептидни антибиотици делују тако што инхибирају синтезу ћелијског зида (143); флуорохинолони инхибирају ензиме који учествују у репликацији (144); аминогликозиди, везујући се за 30s (145), а макролиди за 50s подјединицу рибозома, прекидају транслацију и инхибирају синтезу протеина (146); колистин нарушава интегритет цитоплазматске мембране замењујући Ca^{2+} и Mg^{2+} јоне (147), док рифампицин везује β -подјединицу RNK полимеразе, прекидајући синтезу информационе рибонуклеинске киселине (iRNK) (148) (Слика 6).



Слика 6. Механизми дејства појединих антимикуробних лекова. Преузето и кориговано према: *Dehghan Esmatabadi MJ et al. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2017; 63(2):40-8 (142).*

Упркос постојању великог броја антимикуробних лекова, резистенција микроорганизама, а поготово бактерија на антимикуробне лекове постаје све већи здравствени проблем. Механизми резистенције бактерија и гљивица на антимикуробне лекове су бројни. Гени резистенције се могу налазити на хромозомима и на екстрахромозомској DNK. Соматске мутације су ретке, па је најчешћи облик преношења и ширења гена резистенције путем хоризонталног генског трансфера (коњугацијом, трансдукцијом и трансформацијом) уз помоћ мобилних генских елемената као што су плазмиди, интегрони, транспозони и

инсерционе секвенце (149). У току последње деценије, нарочито је забрињавајуће ширење мултирезистентних бактерија, од којих су неке отпорне на сва постојећа антимикуробна средства (150). На основу дефиниције прихваћене од стране европских и светских експерата, под мултирезистентним бактеријама се подразумевају оне које су резистентне на најмање по један антибиотик из најмање три категорије антимикуробних лекова (151). У току 2019. године је у клиничким испитивањима било 32 нове антимикуробне супстанце, од којих је само 6 одобрено за клиничку употребу (150).

Недостатак нових антибиотика остаје главни проблем и погађа здравствене система земаља свих нивоа развоја (150). Посебну опасност представљају мултирезистентни сојеви *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, и *Enterobacter spp.*, који су означени, по почетним словима, као ESKAPE патогени, а најчешћи су изазивачи болничких инфекција (152).

Истраживање нових антимикуробних средстава WHO је означила као приоритет, нарочито за најрезистентније бактерије из ове групе, као што су карбапенем-резистентне *Enterobacteriaceae* и *Acinetobacter baumannii* и метицилин резистентни *Staphylococcus aureus* (MRSA) (150). Већина истраживача је фокусирана на откривање нових места у бактеријској ћелији за која би нова антимикуробна средства могла да се вежу или пак на откривање нових једињења која до сада нису била примењивана у терапији инфекција, на која самим тим микроорганизми нису развили отпорност.

Јони метала играју важну улогу у биолошким процесима због чега могу да се користе за развој нових антимикуробних лекова. Атоми метала лако губе електроне и стварају позитивно наелектрисане јоне што их чини растворљивим у биолошким течностима, због чега лако ступају у интеракцију са биомолекулима који су богати електронима, попут ДНК или протеина (153). Због специфичних хемијских особина координационих комплекса и последичне тродимензионалне структуре, прелазни метали, а међу њима и Pt, имају велики потенцијал да се примене као антимикуробна средства. Антимикуробни ефекат комплекса на бази јона метала може потицати од њихове способности да врше брзу измену лиганда, могућности продукције ROS, деловања на ензимску активност, поремећај функције ћелијске мембране микроорганизма или оштећења њихове ДНК (154).

1.3.1. Комплекси платине и паладијума као потенцијални антимикуробни лекови

Сама цисплатина је првобитно откривена као средство које инхибира деобу бактерије *Escherichia coli* (89). Низ клиничких студија којима је испитивано антимикуробно дејство комплекса Pt управо показује да ови комплекси могу да буду моћна антимикуробна средства (155). *Chlumsky* и сарадници су истражили потенцијалне механизме антимикуробног дејства нанопартикула (NP) које су садржале прелазне метале Pt(II) и Pd(II) (156). Испитујући антибактеријски ефекат ових супстанци на четири бактеријске врсте, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*, они су претпоставили да NP са Pt(II) и Pd(II) прво креирају агрегате на површини бактеријске ћелије, затим замењују поједине молекуле, што индукује оштећење ћелијског зида и ћелијске мембране, утичу на хиперпродукцију ROS, оштећење молекула ДНК, екстернализацију садржаја ћелије и њену последичну смрт. Такође, закључили су да испитиване NP са Pt(II) Pd(II) немају цитотоксички ефекат, али имају инхибиторни ефекат на раст свих испитиваних бактеријских врста (156).

Vaidya и сарадници су у својој студији испитивали антимикуробно дејство комплекса Pt и Pd али и других метала (сребра, злата и бакра), на три бактеријске врсте, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii* и сви комплекси су показали значајну антибактеријску активност, при чему је Pt показала најбоље резултате (157). *Cho* и сарадници су показали да нанопартикуле са сребром и платином показују антимикуробни ефекат и заустављају раст *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* (158). Нанопартикуле са Pt такође инхибирају размножавање бактерија које су пронађене у денталном плаку (*Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*) (159). Комплекси Pt(II) и Pd(II) са нанопартикулама арамида су показали ефикасност против *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus* и *Candida albicans* (160). Мононуклеарни комплекс Pt(II) са 5-квинолин 1,3,5-три-супституисаним пиразолом је показао значајну антимикуробну активност против *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* (161).

Због сличних биолошких и хемијских особина као Pt, а због мање токсичности, липофилности и боље растворљивости у ткивима, комплекси Pd се сматрају изузетно погодним за креирање нових антимикуробних лекова (162). У досадашњим истраживањима, комплекси са различитим лигандима су показивали различиту антимикуробну активност. Једно од првих истраживања које се бавило антимикуробном активношћу Pd је било испитивање комплекса Pd(II) са тетрациклинама. Оно што је интересно је да су ови комплекси показали антимикуробну активност на сојевима *Escherichia coli* за које је претходно утврђено да су резистентне на тетрациклин (163). Међутим, комплекси Pd са квинолинил-амино-фосфонатом у основи, нису показали ни антибактеријску ни антифугалну активност (164). Комплекс Pd(II) са дериватима S-алкил тиосалицилне киселине су показали варијабилну антимикуробну активност на 26 врста микроорганизама, а значајан ефекат су имали само на плесни *Aspergillus fumigatus* и *Aspergillus flavus* (165).

Антимикуробни ефекат комплекса на бази јона Pt, Pd, као и других прелазних метала, их чини предметом будућих истраживања у циљу проналажења нових, ефикасних антимикуробних агенаса.

2. ЦИЉ И ХИПОТЕЗЕ

Циљ истраживања

Главни циљ ове студије је испитивање структурних особина, туморицидних и антимикуробних ефеката синтетисаних динуклеарних комплекса Pt(II) са пиридазином као мостним лигандом и динуклеарних комплекса Pd(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима, као и анализа потенцијалних молекулских механизма њихове антитуморске активности.

Конкретни експериментални задаци постављени су на основу главног циља студије:

1. Испитати структурне особине синтетисаних динуклеарних комплекса Pt(II) и Pd(II)
2. Анализирати интеракције динуклеарних комплекса Pt(II) и Pd(II) са биомолекулима као што су DNK, BSA (енгл. *Bovine Serum Albumin*, говеђи серум албумин) и HSA (енгл. *Human Serum Albumin*, хумани серум албумин)
3. Испитати цитотоксички потенцијал динуклеарних комплекса Pt(II) и Pd(II) на линијама ћелија различитих врста солидних тумора мишјег и хуманог порекла *in vitro*
4. Испитати антимикуробно дејство динуклеарних комплекса Pt(II) и Pd(II) користећи различите сојеве бактерија и гљивица
5. Анализирати ефекат динуклеарних комплекса Pt(II) на механизме ћелијске смрти туморских ћелија
6. Анализирати ефекат динуклеарних комплекса Pt(II) на ћелијски циклус туморских ћелија
7. Анализирати ефекат динуклеарних комплекса Pt(II) на експресију молекула укључених у регулацију ћелијског циклуса и ћелијске смрти
8. Испитати ефекат динуклеарних комплекса Pt(II) на раст тумора и преживљавање у моделу мишјег карцинома дојке *in vivo*

Хипотезе истраживања

1. Динуклеарни комплекси Pt(II) са пиридазином као мостним лигандом и динуклеарни комплекси Pd(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима показују значајну цитотоксичку активност на различитим ћелијама тумора мишјег и хуманог порекла.
2. Динуклеарни комплекси Pt(II) са пиридазином као мостним лигандом и динуклеарни комплекси Pd(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима испољавају антибактеријски и антигљивични ефекат на различитим сојевима испитиваних врста микроорганизама.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Синтеза и хемијска карактеризација комплекса C1 – C8

У студији су синтетисани динуклеарни комплекси Pt(II) (C1 – C4) и Pd(II) (C5 – C8) са различитим лигандима у склопу мононуклеарних јединица или са различитим мостним лигандима (Табела 1). Динуклеарни комплекси Pt(II) имају различите диаминске лиганде и пиридазин (енгл. *pyridazine*, pydz) као мостни лиганд, док је хелатни диамински лиганд за динуклеарне комплексе Pd(II) етилендиамин (енгл. *ethylenediamine*, en), уз различите ароматичне *N*-хетероцикличне мостне лиганде (Табела 1).

Табела 1. Новосинтетисани динуклеарни комплекси Pt(II) и Pd(II).

Динуклеарни комплекси Pt(II) и Pd(II)	Лиганди (L1 – L8)	
C1	$[\{Pt(L1)Cl\}_2(\mu\text{-pydz})]Cl_2$	1,2-pn
C2	$[\{Pt(L2)Cl\}_2(\mu\text{-pydz})]Cl_2$	ibn
C3	$[\{Pt(L3)Cl\}_2(\mu\text{-pydz})]Cl_2$	1,3-pd
C4	$[\{Pt(L4)Cl\}_2(\mu\text{-pydz})]Cl_2$	1,3-pnd
C5	$[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu\text{-L5})](NO_3)_2$	pz
C6	$[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu\text{-L6})](NO_3)_2$	pm
C7	$[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu\text{-L7})](NO_3)_2$	pydz
C8	$[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu\text{-L8})](NO_3)_2$	phz

pydz: пиридазин (енгл. *pyridazine*); 1,2-pn: 1,2-пропилендиамин (енгл. *1,2-propylenediamine*); ibn: изобутилендиамин (енгл. *isobutylenediamine*); 1,3-pd: 1,3-пропилендиамин (енгл. *1,3-propylenediamine*); 1,3-pnd: 1,3-пентандиамин (енгл. *1,3-pentanediamine*); en: етилендиамин (енгл. *ethylenediamine*); pz: пиразин (енгл. *pyrazine*); pm: пиримидин (енгл. *pyrimidine*); phz: феназин (енгл. *phenazine*).

Синтеза и карактеризација свих комплекса је обављена на Институту за хемију, Природно математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Елементална микроанализа на угљеник, водоник и азот је урађена у Микроаналитичкој лабораторији Хемијског факултета Универзитета у Београду.

Чистоћа и састав комплекса C1 – C8 су проверени помоћу резултата елементалне микроанализе, 1H и ^{13}C NMR (енгл. *Nuclear Magnetic Resonance*) спектроскопије и *UV-vis* (енгл. *Ultraviolet-visible*) спектрофотометрије. Елементална микроанализа на C, H и N је урађена на апарату *ELEMENTAR Vario EL III C.H.N.S (Elementar, Analysensysteme GmbH, Germany)*. 1H и ^{13}C NMR спектри су снимљени на спектрометру *Varian Gemini 2000* (1H на 200 MHz, ^{13}C на 50 MHz) коришћењем 5 mm NMR цеви, на 25 °C у деутеријум оксиду (енгл. *Deuterium Oxide, D₂O*) као растварачу, које садрже TSP (енгл. *sodium 3-(trimethylsilyl)propionate*) као интерни стандард. Хемијска померања су дата у деловима на милион (ppm), а скаларне спреге су бележене у херцима (Hz). *UV-vis* спектри су снимљени на *Shimadzu* спектрофотометру (*Shimadzu, Japan*), са двоструким снопом опремљеним кварцним *Suprasil* ћелијама од 1 cm.

3.1.1. Синтеза и карактеризација комплекса C1 – C4

У поступку синтезе комплекса C1 – C4, прво су добијени мононуклеарни комплекси, по модификованом поступку који је раније описан у литератури (166, 167). Циљ је био да се синтетишу комплекси Pt(II), типа $[Pt(L)Cl_2]$, где је L бидентатно координовани диамински лиганд: 1,2-пропилендиамин (енгл. *1,2-propylenediamine*, 1,2-pn) (C1), изобутилендиамин (енгл. *isobutylenediamine*, ibn) (C2), 1,3-пропилендиамин (енгл. *1,3-propylenediamine*, 1,3-pn) (C3) или 1,3-пентандиамин (енгл. *1,3-pentanediamine*, 1,3-pnd) (C4) (Табела 1).

У 10 ml воде је растворено 0.3944 g (9.5×10^{-4} mol) $K_2[PtCl_4]$, па је затим након загревања на 40-50 °C додато 0.6308 g (3.8×10^{-3} mol) калијум јодида. Након неколико минута, када је раствор тако добијеног комплекса јода са јоном Pt(II) потамнео, додата је еквимоларна количина одговарајућег диаминског лиганда L. Након мешања раствора у трајању од 2 h се издваја жути талог $[Pt(L)I_2]$. Талог је одвојен филтрацијом, испран водом, а затим етанолом, и осушен на ваздуху (166, 167). Да би се добио комплекс $[Pt(L)Cl_2]$, неопходно је да се претходно синтетисани $[Pt(L)I_2]$ конвертује у *aqua* комплекс $[Pt(L)(H_2O)_2]^{2+}$, што се постиже додавањем $AgNO_3$ у молском односу 1:1.98. Издвојени талог $AgCl$ је одвојен филтрирањем, а вишак чврстог калијум хлорида је додат у раствор који садржи $[Pt(L)(H_2O)_2]^{2+}$ па је настављено мешање на 60 °C наредна 3 h. Комплекс $[Pt(L)Cl_2]$ настаје кристализацијом на собној температури. Чисти комплекси су добијени рекристализацијом из мале количине вреле воде и хлађењем. Чистоћа и структура комплекса су верификовани 1H и ^{13}C NMR спектроскопијом. За снимање 1H и ^{13}C NMR спектра комплекса $[Pt(L)Cl_2]$, D_2O је коришћен као растварач (166, 167).

Одговарајући динуклеарни комплекси су добијени из мононуклеарних комплекса типа $[Pt(L)Cl_2]$ према поступку претходно описаном у литератури (167-169). Мононуклеарни комплекси типа $[Pt(L)(DMF)Cl]NO_3$ (где је DMF диметилформаид, енгл. *Dimethylformamide*), добијени су мешањем одговарајућег хлоридо-комплекса ($[Pt(L)Cl_2]$) са $AgNO_3$ у молском односу 1:0.98 у DMF као растварачу. У суспензију која садржи 0.30 mmol $[Pt(L)Cl_2]$ у 10 ml DMF је додато 0.29 mmol $AgNO_3$ (49.26 mg) у 5 ml DMF. Реакциона смеша је увијена у алуминијумску фолију и остављена преко ноћи уз мешање на собној температури. Издвојени талог $AgCl$ је одвојен цеђењем, а бледо жути раствор $[Pt(L)(DMF)Cl]^+$ комплекса је коришћен као полазна супстанца за синтезу одговарајућих динуклеарних $[Pt(L)Cl]_2(\mu-pydz)Cl_2$ комплекса. У раствор који садржи комплекс $[Pt(L)(DMF)Cl]^+$ је лагано укапаван раствор који је добијен растварањем 10 mg пиридазина у 5ml DMF. Реакциона смеша је увијена у алуминујумску фолију и остављена уз мешање на собној температури око 24 h. На ротационом вакуум упаривачу је испарен DMF, а суви остатак испран етром неколико пута. Након испаравања етра, суви остатак је растворен у што мањој запремини раствора $LiCl$ (0.5 mol/l). Добијени раствор је остављен у фрижидеру преко ноћи. Светло жути кристали $[Pt(L)Cl]_2(\mu-pydz)Cl_2$ комплекса су одвојени цеђењем, испрани метанолом, а затим етром, и сушени на ваздуху (166, 167). Принос је 40 – 60% (167-169). Применом техника елементалне микроанализе, 1H и ^{13}C NMR спектроскопије и *UV-vis* спектрофотометрије, добијени су следећи подаци о чистоћи и саставу комплекса C1 – C4:

C1: $[\{\text{Pt}(\mathbf{1,2-pn})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$; ($\text{C}_{10}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$: FW = 760.31) Израчунато за: C, 15.80; H, 3.18; N, 11.05%. Нађено: C, 15.46; H, 3.08; N, 11.19 %. ^1H NMR (D_2O , 200 MHz, δ , ppm): 1.46 (m, CH_3 1,2-pn), 2.79 (m, CH_2/CH 1,2-pn), 8.14 (m, H_4/H_5 pydz), 9.58 (m, H_3/H_6 pydz); ^{13}C NMR (D_2O , 50 MHz, δ , ppm): 18 (CH_3 1,2-pn), 54, 60 (CH_2/CH 1,2-pn), 137 (C4/C5 pydz), 164 (C3/C6 pydz). *UV-vis* (H_2O , λ_{max} , nm): 301 ($\epsilon = 3.3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

C2: $[\{\text{Pt}(\mathbf{ibn})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$; ($\text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$: FW = 788.36) Израчунато за: C, 18.28; H, 3.58; N, 10.66%. Нађено: C, 18.41; H, 3.46; N, 10.72 %. ^1H NMR (D_2O , 200 MHz, δ , ppm): 1.46 (m, CH_3 ibn), 2.66 (s, CH_2 , ibn), 8.18 (m, H_4/H_5 , pydz), 9.62 (m, H_3/H_6 , pydz); ^{13}C NMR (D_2O , 50 MHz, δ , ppm): 26 (CH_3 ibn), 64, 65 (CH_2/C ibn), 135 (C4/C5 pydz), 162 (C3/C6 pydz). *UV-vis* (H_2O , λ_{max} , nm): 301 ($\epsilon = 3.5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

C3: $[\{\text{Pt}(\mathbf{1,3-pn})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$; ($\text{C}_{10}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$: FW = 760.31) Израчунато за: C, 15.80; H, 3.18; N, 11.05%. Нађено: C, 15.52; H, 3.02; N, 11.11 %. ^1H NMR (D_2O , 200 MHz, δ , ppm): 1.89 (m, CH_2 1,3-pn), 2.79 (m, CH_2 1,3-pn), 8.14 (m, H_4/H_5 pydz), 9.57 (m, H_3/H_6 pydz); ^{13}C NMR (D_2O , 50 MHz, δ , ppm): 30, 45, 46 (CH_2 1,3-pn), 139 (C4/C5 pydz), 166 (C3/C6 pydz). *UV-vis* (H_2O , λ_{max} , nm): 282 ($\epsilon = 4.0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

C4: $[\{\text{Pt}(\mathbf{1,3-pnd})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-pydz})]\text{Cl}_2$; ($\text{C}_{14}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{Pt}_2$: FW = 816.41) Израчунато за: C, 20.60; H, 3.95; N, 10.29%. Нађено: C, 20.41; H, 3.82; N, 10.16 %. ^1H NMR (D_2O , 200 MHz, δ , ppm): 0.97 (m, CH_3 1,3-pnd), 1.82 (m, CH_2 1,3-pnd), 2.85 (m, CH_2/CH 1,3-pnd), 8.15 (m, H_4/H_5 pydz), 9.63 (m, H_3/H_6 pydz); ^{13}C NMR (D_2O , 50 MHz, δ , ppm): 12 (CH_3 1,3-pnd), 30, 33, 34, 43, 44, 56, 57 (CH_2/CH 1,3-pnd), 135 (C4/C5 pydz), 163 (C3/C6 pydz). *UV-vis* (H_2O , λ_{max} , nm): 292 ($\epsilon = 3.8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.1.1.1. Анализа стабилности комплекса C1 – C4

Стабилност комплекса C1 – C4 у концентрацији $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ у 0.01 M PBS, pH = 7.4, је испитивана праћењем промене у апсорпционом спектру током 72 h на собној температури, *UV-vis* спектрофотометријом, у опсегу таласних дужина од 250 до 380 nm. Стабилност комплекса C1 – C4 је додатно испитана у растварачу D_2O ^1H NMR спектроскопијом.

Масени спектри високе резолуције су забележени коришћењем *Quadrupole Time-of-Flight* масеног детектора (*6550 iFunnel Q-TOF MS, Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA*) опремљеним дуалним електроспреј јонским извором *Agilent Jet Stream (AJS)*, док је за течну фазу, коришћен ликвидни хроматограф (*1290 Infinity LC system, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany*). Додатно, ВЗЛР (енгл. *Becke, 3-parameter, Lee–Yang–Parr*) методом је оптимизована структурна формула комплекса C1 – C4. ВЗЛР метод је један од најпопуларнијих метода у области квантно-хемијског рачунања и посебно погодан за предвиђање структуре молекула (170).

3.1.2. Синтеза и карактеризација комплекса C5 – C8

Комплекси Pd(II), типа $[\{\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-L})](\text{NO}_3)_2$, где је L диазински лиганд и то: пиразин (енгл. *pyrazine*, pz) (C5), пиримидин (енгл. *pyrimidine*, pm) (C6), пиридазин (C7), феназин (енгл. *phenazine*, phz) (C8), су синтетисани по модификованим поступцима претходно описаним у литератури (171, 172).

Поступак синтезе динуклеарних комплекса Pd(II) је сличан синтези претходно описаних динуклеарних комплекса Pt(II), са коришћењем аналогних молекула који уместо јона Pt садрже јон Pd. Прво су синтетисани мононуклеарни комплекси Pd са општом формулом $[\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}_2]$, а затим и динуклеарни комплекси са различитим ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима (Табела 1). Раствору у количини од 10 ml DMF који садржи 80.69 mg (0.475 mmol) AgNO_3 је додато 118.71 mg (0.5 mmol) мононуклеарног комплекса $[\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}_2]$, уз мешање у мраку, на собној температури. Након тога, исталожени AgCl је уклоњен филтрацијом, а жути раствор који је добијен, комплекс $[\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}(\text{DMF})]\text{NO}_3$, је коришћен као полазна супстанца за синтезу динуклеарних комплекса са пиразином и пиридазином (172). Раствору DMF који је садржао 0.25 mmol пиразина, пиридазина, пиримидина или феназина у 5 ml је у капима додат раствор $[\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}(\text{DMF})]\text{NO}_3$, уз мешање на собној температури током 2 h. Запремина је смањена вакуум упаривачем на 5 ml, а затим је додато 20 ml дихлорметана. Након тога, добијен жути талог који је представљао одговарајуће комплексе, је испран етром и осушен на ваздуху (171, 172). Принос је био између 40% и 50%. Применом техника елементалне микроанализе, ^1H и ^{13}C NMR спектроскопије и *UV-vis* спектрофотометрије, добијени су следећи подаци о чистоћи и саставу комплекса C5 – C8:

C5: $[\{\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-pz})](\text{NO}_3)_2$. $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{O}_6\text{Pd}_2$ (FW = 605.04) Израчунато за: C, 15.80; H, 3.32; N, 18.43; Нађено: C, 15.92; H, 3.36; N, 18.57%. ^1H NMR (200 MHz, D_2O): δ = 2.76-2.83 (m, 8H, en), 8.99 (s, 4H, pz) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O): δ = 50.24, 149.90 ppm. IR (KBr, ν , cm^{-1}): ν 3280, 3210 (ν N-H); 3128, 3083, 3039 (ν (Car-H)); 1593, 1562, 1454 (ν (Car=Car) и ν (Car=N)); 1367 (ν као (NO_3)); 834, 724 (γ (Car-H)); 765 (δ (NO_3)). *UV-vis* (H_2O , λ_{max} , nm): 271.0 (ϵ = 5.4×10^3 M $^{-1}\text{cm}^{-1}$) (172).

C6: $[\{\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-pm})](\text{NO}_3)_2$ $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{O}_6\text{Pd}_2$ (FW = 605.04) Израчунато за: C, 15.80; H, 3.32; N, 18.43; Нађено: C, 16.01; H, 3.33; N, 18.32. ^1H NMR (200 MHz, D_2O): δ = 2.74-2.88 (m, 8H, en), 9.78 (s, H, pm), 9.27 (d, 2H, pm), 7.86 (m, H, pm) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O): δ = 50,51, 132, 162, 168 ppm. IR (KBr, ν , cm^{-1}): \sim 3240-3225 (ν (N-H)); 3098-3023 (ν (Car-H)); 1604-1482 (ν (Car=Car) and ν (Car=N)); 1370 ($\nu_{\text{as}}(\text{NO}_3)$); 759 ($\delta(\text{NO}_3)$). *UV-vis* (H_2O , λ_{max} , nm): 278 (ϵ = $6.0 \cdot 10^3$ M $^{-1}\text{cm}^{-1}$).

C7: $[\{\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-pydz})](\text{NO}_3)_2$. $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{O}_6\text{Pd}_2$ (FW = 605.04) Израчунато за: C, 15.80; H, 3.32; N, 18.43; Нађено: C, 15.69; H, 3.38; N, 18.38%. ^1H NMR (200 MHz, D_2O): δ = 2.67-2.91 (m, 8H, en), 8.08 (m, 2H, pydz), 9.35 (m, 2H, pydz) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O): δ = 50.82, 136.54, 164.12 ppm. IR (KBr, ν , cm^{-1}): \sim 3266, 3198 (ν (N-H)); 3116, 3006 (ν (Car-H)); 1606, 1584, 1456 (ν (Car=Car) и ν (Car=N)); 1373 ($\nu_{\text{as}}(\text{NO}_3)$); 827, 725 (δ (Car-H)); 786 (δ (NO_3)). *UV-vis* (H_2O , λ_{max} , nm): 275.0 (ϵ = 4.9×10^3 M $^{-1}\text{cm}^{-1}$) (172).

C8: $[\{\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-phz})](\text{NO}_3)_2$. $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{O}_6\text{Pd}_2$ (FW = 708.16) Израчунато за: C, 27.14; H, 3.42; N, 15.82; Нађено: C, 27.25; H, 3.48; N, 15.77. ^1H NMR (200 MHz, D_2O): $\delta = 2.82$ (s, 8H, en), 10.23 (m, 4H, phz), 8.40 (m, 4H, phz) ppm. ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O): $\delta = 50, 130, 136, 146$ ppm. IR (KBr, ν , cm^{-1}): $\sim 3280, 3210$ ($\nu(\text{N-H})$); 3128, 3083, 3039 ($\nu(\text{Car-H})$); 1593, 1562, 1454 ($\nu(\text{Car=Car})$ and $\nu(\text{Car=N})$); 1367 ($\nu_{\text{as}}(\text{NO}_3)$); 834, 724 ($\gamma(\text{Car-H})$); 765 ($\delta(\text{NO}_3)$). *UV-vis* (H_2O , λ_{max} , nm): 250, 374 ($\epsilon = 7.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}, 1.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.2. Испитивање интеракција комплекса C1 - C8 са биомолекулима

3.2.1. Интеракција комплекса C1 – C8 са молекулом CT-DNK

Интеракције комплекса C1 – C8 са CT-DNK (енгл. *Calf-Timus* DNK) су испитане *UV-vis* спектрофотометријом, флуоресцентном спектроскопијом, као и мерењем вискозитета (за комплексе C1 – C4).

3.2.1.1. Апсорпционе спектроскопске студије

Везивање комплекса C1 – C8 за CT-DNK је проучавано коришћењем *UV-vis* спектрофотометрије. *UV-vis* спектри су снимљени на *Shimadzu* спектрофотометру (*Shimadzu, Japan*), са двоструким снопом опремљеном кварцним *Suprasil* ћелијама од 1 cm, након додавања серије комплекс/CT-DNK раствора, у опсегу таласних дужина од 200 до 600 nm. Серија раствора комплекс/CT-DNK је припремљена коришћењем фиксних концентрација комплекса са растућим концентрацијама CT-DNK. За испитивање интеракција C1 – C4 концентрација комплекса је била 25.7 μM , а концентрације CT-DNK су се кретале од 0 до 25.7 μM . Концентрација комплекса C5 – C8 је била 50 μM , а раствор CT-DNK 0 - 90 μM . За мерење апсорпције коришћен је PBS (0.01 M, pH 7.4 са 2.7 mM KCl и 137 mM NaCl), а апсорбанца је забележена на 37 °C након сваког узастопног додавања раствора CT-DNK и еквилибрације (24 h). Вредност унутрашње константе везивања (K_b) одређена је коришћењем следеће једначине (173):

$$[\text{DNK}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNK}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]$$

где је [DNK] концентрација, ϵ_a је коефицијент екстинкције комплекса при одређеној концентрацији CT-DNK, ϵ_f је коефицијент екстинкције комплекса у слободном раствору а ϵ_b када је потпуно везан за CT-DNK. Графикон $[\text{DNK}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ у односу на [DNK] даје праву линију са нагибом од $1/(\epsilon_b - \epsilon_f)$ и пресеком од $1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]$. Вредност K_b се израчунава као однос нагиба и пресека. *Gibbs*-ова слободна енергија (ΔG) комплекса Pd(II)/CT-DNK је израчуната из једначине: $\Delta G = -RT \ln K_b$, где је R константа идеалног гаса, T је константна температура, а K_b вредност константе везивања.

3.2.1.2. Флуоресцентна мерења

Затим, да би се истражили могући начини везивања за ДНК, интеракције комплекса С1 – С8 са СТ-ДНК су испитиване у присуству етидијум бромида (енгл. *Ethidium bromide*, *3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridium bromide*, EtBr) техником емисионе флуоресцентне спектроскопије на RF-1501 РС спектофлуориметру (*Shimadzu, Japan*). EtBr је коришћен као типични интеркалатор (174, 175).

Флуоресцентна спектроскопија је метода која се користи за проучавање конформационе структуре протеина, али и проучавање интеракција лиганд – протеин, а као основ користи способност флуоресценције која представља емисију електромагнетног зрачења атома или молекула, а настаје као последица прелаза електрона са једног енергетског нивоа на други. Једињења која могу да флуоресцирају се називају флуорофоре (175). Аминокиселине триптофан, тирозин и фенил-аланин представљају унутрашње флуорофоре протеина. Услед промене поларности окружења триптофана, дешава се промена у његовом емисионом спектру као одговор на настале конформационе промене протеина, везивање лиганда или денатурацију. Гашење флуоресценције представља било који процес који смањује њен интензитет (174, 175). На овај начин је испитано да ли комплекси могу да замене EtBr на месту везивања за СТ-ДНК.

Раствор комплекса је додат у раствор добијен мешањем раствора EtBr и СТ-ДНК, у моларном односу 1 : 1, тако да је однос концентрација комплекса и СТ-ДНК био у распону од 0.0 до 1.0. За припрему раствора коришћен је 0.01 М PBS (pH 7.4). У циљу испитивања компетитивних реакција динуклеарних комплекса Pt(II), Pd(II) и EtBr са СТ-ДНК, снимљени су спектри флуоресценције EtBr/СТ-ДНК у одсуству и присуству испитиваних комплекса. Флуоресцентни емисиони спектри су снимљени у опсегу од 550 до 750 nm, док је флуоресцентна емисија забележена на 612 nm. Добијени резултати су графички приказани као зависност I_0/I од $[Q]$. Из нагиба добијене праве одређена је *Stern-Volmerova* константа (K_{sv}). Константа стабилности (K_a), као и број места везивања (n), добијени су на основу једначине (176):

$$\log (I_0-I)/I = \log K_a + n \cdot \log [Q]$$

где су I_0 и I интензитети флуоресценције пре и после додавања комплекса у раствор EtBr/СТ-ДНК, док је $[Q]$ концентрација испитиваног комплекса. Добијени резултати су графички приказани као зависност $\log (I_0-I)/I$ од $\log [Q]$. Вредност K_a се добија из пресека праве са у осом, а број места везивања (n) из нагиба праве.

3.2.1.3. Мерење вискозитета

Мерење вискозитета извршено је коришћењем *Anton Paar* 4100 М вискозиметра при 25.0 ± 0.1 °С. Измерен је релативни вискозитет раствора СТ-ДНК, $\eta_r = \eta/\eta^0$ (где је η вискозитет СТ-ДНК у присуству комплекса, а η^0 је вискозитет СТ-ДНК у PBS-у), са константном концентрацијом СТ-ДНК и различитим концентрацијама комплекса. Подаци су представљени као $(\eta/\eta^0)^{(1/3)}$ у зависности од односа $[комплекс]/[СТ-ДНК]$.

3.2.2. Интеракција комплекса C1 – C8 са молекулом BSA

Интеракција комплекса са албумином говеђег серума, BSA, је испитана флуоресцентном спектроскопијом (за комплексе C1 – C8), *UV-vis* спектрофотометријом (за комплексе C5 – C8) и студијом молекулског докинга (за комплексе C1 – C4).

3.2.2.1. Апсорпционе спектроскопске студије

UV-vis спектрофотометријом је додатно испитано везивање комплекса C5 – C8 за молекул BSA. *UV-vis* спектри су снимљени на *Shimadzu* спектрофотометру (*Shimadzu, Japan*). Концентрација BSA је била 8 μM а концентрација комплекса се кретала од 0 до 120 μM . *UV-vis* спектри су снимљени у PBS-у (10 mM, pH = 7.4 са 2.7 mM KCl и 137 mM NaCl) на собној температури. Апсорпциони спектри, у присуству и одсуству комплекса су забележени на 220-450 nm.

3.2.2.2. Флуоресцентна мерења

Флуоресцентном емисионом спектроскопијом су анализирани промене у интензитету флуоресценције раствора BSA након додавања испитиваних комплекса. Емисиони спектри су забележени у опсегу од 300-500 nm, са екстинкцијом на 295 nm. Ефекат везивања испитиваних комплекса за BSA је детектован на основу смањења интензитета емисије BSA на 360 nm. У серији испитиваних раствора концентрација BSA је била константна (8 μM). BSA и комплекси C1 – C8 су мешани у различитим моларним односима, тако да је концентрација комплекса била од 0 до 160 μM за комплексе C1 – C4 и од 0 до 120 μM за комплексе C5 – C8. Сви емисиони спектри су снимљени под истим експерименталним условима у 0.01 M PBS (pH 7.4) и на температури од 25 °C. На основу *Stern-Volmer*-овог графика су израчунате вредности динамичке *Stern-Volmer*-ове константе (K_{sv}) и константе гашења флуоресценције (K_q) за интеракцију комплекса са BSA, као и вредности константе везивања (K_a) и број везујућих места (n) албумина за испитивани комплекс.

Stern-Volmer-ова константа (K_{sv}) је одређена на основу једначине (175):

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q]$$

где је I_0 почетни интензитет флуоресценције триптофана, а I је интензитет флуоресценције триптофана BSA након додавања комплекса C1 – C8 у раствор протеина, K_q је константа гашења флуоресценције, τ_0 је просечно време флуоресценције албумина у одсуству комплекса ($\tau_0 = 10^{-8}$ s), а $[Q]$ је концентрација комплекса. *Stern-Volmer*-ова константа K_{sv} се графички добија из нагиба праве када су вредности I_0/I исцртане на y оси, а вредности $[Q]$ на x оси. Константа везивања (K_a) као и број места везивања (n) добијени су на основу *Scatchard*-ове логаритамске једначине (176):

$$\log(I_0-I)/I = \log K_a + n \cdot \log[Q]$$

Добијени резултати се могу графички приказати као зависност $\log(I_0-I)/I$ од $\log[Q]$. Вредност K_a се добија из пресека праве са y осом, а број места везивања (n) из нагиба праве.

3.2.3. Студија молекулског докинга за комплексе C1 – C4

Студија молекулског докинга је имала за циљ да утврди природу везе испитиваних комплекса и молекула DNK, говеђег, BSA и хуманог серум албумина, HSA, а спроведена је на хлоридо-динуклеарним Pt(II) комплексима (C1 – C4) и њиховим хидро-дериватима (C1W - C4W). Структура комплекса C1 – C4 је оптимизирана применом B3LYP, са 6-31 g** базног сета за не-металне атоме и *lanl2dz* базног сета за Pt. *Merz–Kollman*-ови атомски набоји су израчунати за све атоме према шеми RESP процедуре, претходно описане у литератури (177). Структура DNK је екстрахована из базе података *Protein Data Bank* (*pdb* код: 1BNA) (178), као и структуре BSA (*pdb* код: 4F5S) (179) и HSA (*pdb* код: 4L8U) (180). Припрема DNK, BSA и HSA структура је извршена помоћу *AutoDock 4.2* програма (181). За виртуелни скрининг је коришћен *Lamarckian* генетички алгоритам. Програм *Discovery Studio* (*BIOVIA Software*) је коришћен за визуелизацију и анализу резултата докинга (182).

3.3. Евалуација туморицидне активности комплекса C1 – C8 *in vitro*

3.3.1. Ћелијске линије хуманог и мишјег порекла

У студији је коришћен панел линија туморских ћелија хуманог и мишјег порекла, а за процену селективности испитиваних комплекса за туморске ћелије коришћена је ћелијска линија хуманих фибробласта, MRC-5 (Табела 2). Сви експерименти су изведени уз одобрење Етичког одбора Факултета медицинских наука у Крагујевцу, број 01- 14729, од 15. 12. 2021. године, као и Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-14555 од 13.12.2021. године.

Табела 2. Ћелијске линије хуманог и мишјег порекла коришћене у истраживању.

Ћелијске линије	Хумано порекло	Мишје порекло
Меланом	A375 (ATCC CRL-1619 TM)	B16-F10 (ATCC CRL-6475 TM)
Карцином дојке	MDA-MB 468 (ATCC HTB-132 TM)	4T1 (ATCC CRL-2539 TM)
Карцином плућа	A549 (ATCC CCL-185 TM)	LLC1 (ATCC CRL-1642 TM)
Фибробласти	MRC-5 (ATCC CCL-171 TM)	

Ћелијска линија мишјег меланома, B16F10 је пореклом од линије меланома B16, добијене са коже мишева соја C57BL/6, а одликује се високом инвазивношћу и могућношћу формирања удаљених метастаза (183, 184). A375 је ћелијска линија хуманог меланома, пореклом из коже 54-годишње жене (185). Ћелијска линија карцинома дојке хуманог порекла, MDA-MB 468 потиче из плеуралне течности пацијенткиње оболеле од аденокарцинома дојке, а по први пут је изолована 1977. године (186, 187). Ова ћелијска линија по својим карактеристикама припада TNBC карциномима дојке, не исказује рецепторе за естроген, прогестерон, као ни HER-2, и спада међу најагресивније типове карцинома (188). Ћелије мишјег карцинома дојке, 4T1, су изоловане из карцинома дојке мишева соја BALB/C (189), и такође припадају TNBC типу (190). Тумор је изузетно агресиван, а метастатски потенцијал велики (190). A549 је ћелијска линија хуманог

аденокарцинома плућа, пореклом од базалних алвеоларних епителних ћелија (191). LLC1, ћелијска линија мишијег карцинома плућа (енгл. *Lewis Lung Carcinoma*) је добијена из *Lewis*-ог карцинома плућа мишева соја C57BL/6, који спада у веома инвазивне карциноме и брзо даје метастазе (192). MRC-5 су хумани фибробласти, пореклом из фетуса старог 14 недеља (193).

Туморске ћелије су узгајане у медијуму DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*) или RPMI 1640, произвођача *Sigma-Aldrich, Munich, Germany*, коме су додати фетални говеђи серум (енгл. *Fetal Bovine Serum, FBS*) (10%), L-глутамин, пеницилин (100 IU/ml), стрептомицин (100 µg/ml) и неесенцијалне аминокиселине (*Sigma-Aldrich, Munich, Germany*), према стандардном протоколу у асептичним условима. У свим експериментима коришћена је ћелијска суспензија са $\geq 95\%$ вијабилних ћелија. За процену вијабилности ћелија коришћена је боја *trypan-blue*.

3.3.2. Тестови цитотоксичности

Цитотоксички ефекат комплекса је прво испитан МТТ (енгл. *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) тестом (*Sigma-Aldrich, Munich, Germany*) и упоређен са ефектом цисплатине (енгл. *cis-diamminedichloroplatinum(II)*, CDDP), као конвенционалним хемиотерапеутиком, а затим и LDH (енгл. *Lactate Dehydrogenase*) тестом. Принцип МТТ теста се заснива на ензимској реакцији која се дешава у митохондријама живих ћелија, где ензим сукцинат-дехидрогеназа редукује соли тетразолијума из МТТ једињења до формазана, који је љубичасте боје (194). Овај тест се чита колориметријски, а интензитет боје је пропорционалан броју живих, односно метаболички активних ћелија (194). Тест је изведен у микротитар плочама (МТР) са 96 бунарчића са равним дном. У сваки бунарчић микротитар плоче додато је по 5×10^3 ћелија у 100 µl медијума и инкубирано у стандардним условима (37 °C и 5% CO₂) у трајању од 24 h. Следећег дана, туморске ћелије су третиране комплексима C1 – C8 у двоструко растућим концентрацијама (7.8 µM, 15.63 µM, 31.25 µM, 62.5 µM, 125 µM, 250 µM и 500 µM) у трајању од 48 h и 72 h. Цисплатина је коришћена као референтни цитостатик. По истеку инкубације, одливен је супернатант, ћелије су пажљиво испране, а затим су изложене 20 % раствору МТТ (5 mg/1 ml PBS-а) у 100 µl медијума, након чега су инкубирани још 4 h у стандардним условима. Затим је у сваки бунарчић, након одливања медијума, додато 150 µl DMSO (*Sigma Aldrich, Munich, Germany*) са 20 µl глицинског пуфера. Оптичка густина (енгл. *Optical Density, OD*) је одређена на таласној дужини од 595 nm на уређају *Microplate multimode detector, Zenyth 3100*. Процент вијабилних ћелија је израчунат по формули (195): % вијабилних ћелија = $(E - B) / (K - B) \times 100$, где су E - ћелије третиране испитиваним комплексима и цисплатином (апсорбанца); B - контрола-медијум (апсорбанца); K - нетретиране ћелије (апсорбанца). Тест је изведен у трипликату, у три независна експеримента. Добијене вредности процента вијабилних ћелија су приказане дијаграмом, у зависности од концентрације испитиваних комплекса односно цисплатине. На основу добијених резултата израчуната је IC₅₀ вредност која представља концентрацију испитиваних комплекса или цисплатине која је довољна да заустави раст 50% третираних ћелија, у односу на нетретиране. Вредности IC₅₀ су израчунате коришћењем програма *Microsoft Office Excel 2010*.

LDH је ензим који је присутан у цитоплазми ћелије, а када је ћелијска мембрана оштећена, ослобађа се у екстрацелуларни простор. Овај процес се дешава само када је ћелијска мембрана оштећена, па се овај тест користи за анализу цитотоксичности

биоактивних супстанци (196). Осим некрозе, ослобађање LDH из ћелије се сматра карактеристичним за касну апоптозу (197). У супернатанту LDH редукује NAD^+ до NADH и H^+ оксидацијом лактата до пирувата, да би затим дошло до реоксидације ($\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+$), при чему се тетразолијум-хлорид редукује у обојени продукт, формазан (196). У супернатанту туморских ћелија које су претходно 48 h биле изложене комплексима C1 – C4 или цисплатини у двоструко растућим концентрацијама, ослобођен LDH је детектован коришћењем кита *In Vitro Toxicology Assay Kit, Lactic Dehydrogenase based (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)* према упутству произвођача. После истека инкубације, одређена је оптичка густина на уређају *Microplate multimode detector, Zenyth 3100*. Процент мртвих ћелија је израчунат према формули: % мртвих ћелија = $(E - B) / ((T - B) - (K - B)) \times 100$ (E - ћелије третиране са испитиваним комплексима или цисплатином (апсорбанца); B - активност LDH ензима у супернатанту (апсорбанца); T - ћелије третиране са тритоном X (апсорбанца); K - контролне нетретиране ћелије (апсорбанца)). Тест је изведен у трипликату, у три независна експеримента.

3.3.3. Тест преузимања једињења Pt(II) у ћелије

За постизање адекватног антитуморског ефекта, неопходно је постићи одговарајућу концентрацију лека у ћелији, због чега је потребно испитивање преузимања у ћелије свих потенцијално антитуморских агенаса (198). Ради истраживања преузимања једињења Pt у ћелије, 4T1 ћелије су засејане и третиране комплексима C1 – C4 или цисплатином, у концентрацији 30 μM током 12 h. Након третмана, ћелије су сакупљене, испране PBS-ом и седиментиране за даље анализе. Дигестија узорака ћелија изведена је на *Advanced Microwave Digestion System (Ethos 1, Milestone, Italy)* користећи HPR-1000/10S сегментни ротор под високим притиском. Узорци су дигестирани са 4.5 ml HNO_3 (65 wt.%, *Suprapur®*) и 0.5 ml H_2O_2 (30 wt.%, *Suprapur®*) (обе из *Merck KGaA, Darmstadt, Germany*) применом микроталасне дигестије за ICP-OES (енгл. *Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*) мерење. Садржај Pt у растворима је одређен ICP-OES спектроскопијом (*iCAP 6500 Duo ICP, Thermo Fisher Scientific*).

Калибрациони раствор је направљен од сертификованог раствора стандарда плазме: Pt, стандардни раствор плазме, *Specpure®*, Pt 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (*Alfa Aesar GmbH & Co KG, Germany*). Квантификација је изведена на таласној дужини Pt(II) од 214.423 nm. Контрола квалитета изведена је коришћењем *blenk* узорака, *matrix-matched* калибрационог раствора и троструком анализом сваког узорка. Поузданост мерења је потврђена релативном стандардном девијацијом (RSD) <0.5%. Граница детекције (LOD) је била 0.962 $\mu\text{g}/\text{L}$, а граница квантификације (LOQ) 3.206 $\mu\text{g}/\text{L}$, у растворима потпуно минерализованих узорака. Квалитет контроле аналитичког процеса (QC) изведен је коришћењем стандардног додавања комплекса Pt на нетретиране ћелије (две контроле) и анализом процеса. Опоравак садржаја Pt био је 99.7%. Концентрације Pt у узорку изражене су као ng Pt/1 x 10⁶ ћелија. Додатно, за предвиђање потенцијалне липофилности (одређивањем вредности logP) и растворљивости у води комплекса C1 – C4 коришћен је програм доступан на сајту SwissADME (199).

3.4. Испитивање антимикуробне активности комплекса C1 – C8

Испитивање антимикуробне активности је извршено на Одељењу за микробиологију Службе за лабораторијску дијагностику Универзитетског клиничког центра Крагујевац.

Све процедуре су одобрене од стране Етичког одбора Универзитетског клиничког центра Крагујевац, број 03/21-447 од 29.12.2021. године.

3.4.1. Референтни сојеви микроорганизама

Комерцијални референтни сојеви микроорганизама, добијени љубазношћу колега са Института за јавно здравље Крагујевац и Завода за јавно здравље Пожаревац су приказани у Табели 3. Овим испитивањем обухваћено је неколико изазивача бактеријских и гљивичних инфекција код људи и једна врста, *Rhodococcus equi*, која пре свега изазива болести животиња. Течне културе испитиваних референтних сојева су засејане на чврсте хранљиве подлоге. За добијање бактеријских култура од подлога је коришћен крвни агар са 5% овчје крви (*Oxoid GMBH, Wesel Germany*), а за културе квасница, *Sabouraud*-декстрозни агар (енгл. *Sabouraud Dextrose Agar, SDA*) (*Oxoid GMBH, Wesel, Germany*). Засејане подлоге су инкубиране на температури од 36.6 °C до 37 °C, у аеробним условима, 24 h за бактеријске културе и 48 h за културе квасница.

Табела 3. Референтни сојеви микроорганизама на којима је испитана антимикуробна активност комплекса C1 – C8.

Микроорганизми	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305
<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 6939
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19112
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 25933
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9763

3.4.2. Микродилуциона бујон метода

Антимикуробна активност новосинтетисаних комплекса C1 – C8 је испитана одређивањем минималне инхибиторне концентрације (енгл. *Minimal Inhibitory Concentration*, MIC) и минималне бактерицидне/фунгицидне концентрације (енгл. *Minimal Bactericidal/Fungicidal Concentration*, MBC/MFC) (200, 201). MIC представља концентрацију испитиваног антимикуробног средства која је довољна да инхибира видљиви пораст бактерија, док се под MBC/MFC подразумева концентрација антимикуробног средства која је довољна да убије све присутне микроорганизме култивисане у дефинисаним условима средине (аеробни услови, 36.6 °C - 37 °C, 24 h и 48 h) (202).

MIC комплекса C1 – C8 је одређена микродилуционом бујон методом, према препорукама Европске комисије за одређивање осетљивости на антимикуробне лекове (енгл. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) (200, 201).

Суспензија микроорганизама је припремљена тако што је узето 2-3 бактеријске колоније, односно колоније квасница, стерилном езом, са чврсте подлоге, након инкубације од 24 h. Колоније микроорганизама су ресуспендоване у физиолошком раствору до густине од 0.5 *McFarland*-а, при чему се сматра да је иницијална концентрација бактерија 10^8 cfu (енгл. *colony forming units*)/ml, а гљивица 10^6 cfu/ml. Густина инокулума је проверена дензитометром (DEN1, *BioSan, Republic of Latvia*). Затим су направљена разблажења до финалне концентрације од 5×10^5 cfu/ml. Да би се проверила исправност финалне концентрације, 100 μ l ове суспензије је засејано на чврсту неселективну хранљиву подлогу (крвни агар са 5% овчје крви, односно SDA агар). Након инкубације од 24 h, односно 48 h, на 36.6 °C, на чврстим подлогама је избројано 40 до 60 колонија, у зависности од врсте микроорганизама (стандард подразумева 20 до 80 колонија), што је значило да је направљена адекватна суспензија (200, 201).

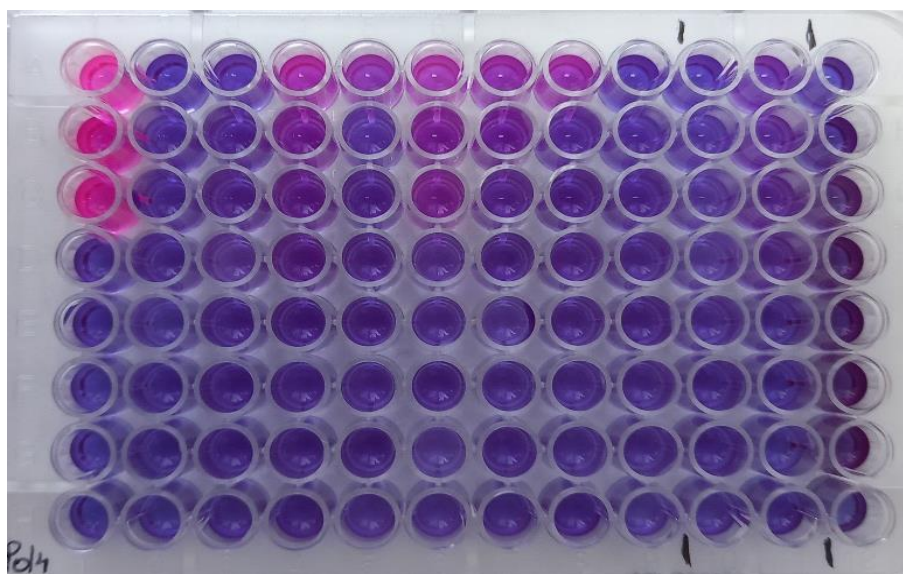
У сваки бунарчић микротитар плоче додато је по 0.1 ml *Mueller-Hinton II* бујона (*Liophilchem, Toramo, Italy*), хранљивог медијума који је погодан за одређивање антимикуробне осетљивости, а препоручен од стране EUCAST-а (200). У бунарчиће у којима ће се испитивати гљивице додато је по 0.1 ml RPMI 1640 медијума (*Sigma Aldrich, Munich, Germany*), такође према препоруци EUCAST-а (201). Затим је додато по 0.1 ml испитиваних комплекса у први ред бунарчића (почетна концентрација 1000 μ g/ml). У следећем кораку су направљена двострука разблажења испитиваних комплекса. За сваку врсту микроорганизама је остављена по једна колона на микротитар плочи у коју се неће додати комплекси, за контролу пораста микроорганизама.

За све врсте бактерија и гљивица је претходно извршено одређивање MIC, MBC и MFC за антимикуробне лекове који се користе у терапији, како би се упоређивањем са стандардима прописаним од стране EUCAST-а, потврдило да су испитивани сојеви исправни као и да би се њихова активност упоредила са активношћу комплекса. Тестирани су следећи антимикуробни лекови: ванкомицин (*Beocompass DOO, Београд, Србија*) за *Gram*-позитивне бактерије, цефтриаксон (*Galenika A.D, Београд, Србија*) за све бактерије изузев *Listeria monocytogenes* и *Enterococcus faecalis*, (за које не постоје дефинисани стандарди осетљивости на овај антибиотик), док је за гљивице коришћен флуконазол (*Hemofarm a.d., Вршац, Србија*). Додатно, за *Gram*-негативне бактерије је испитана осетљивост на пиперацилин-газобактам, комерцијалним MIC тестом (*Liophilchem, Italy*). Пиперацилин-газобактам MIC тест је за сваки сој испитиваних *Gram*-негативних бактерија изведен посебно, према упутству произвођача. Ванкомицин, цефтриаксон и флуконазол су истовремено представљали позитивне контроле. Затим је додато по 10 μ l припремљене бактеријске/гљивичне суспензије у сваки бунарчић микротитар плоче.

Након инкубације на температури од 36.6 °C до 37 °C, у аеробним условима, 24 h за бактерије и 48 h за гљивице, прочитан је резултат уз помоћ инвертног огледала и забележене концентрације тестираних супстанци тамо где се појавио први бистри бунарчић. Бактеријски пораст или изостанак пораста се може верификовати и помоћу раствора ресазурина (*Sigma Aldrich, Munich, Germany*), па је у сваки бунарчић микротитар плоче додато по 10 μ l 1M раствора ресазурина а инкубација је продужена још 3 h (203). Ресазурин је једињење плаве боје које се у присуству оксидоредуктазе из живих ћелија редукује у ресорурфин који је розе боје (204) (Слика 7). Концентрација комплекса у првом бунарчићу у коме је садржај бистар односно концентрација у бунарчићу који је остао плаве боје је представљала MIC.

Вредности MIC контролних антибиотика и флуконазола су упоређене са већ дефинисаним стандардним вредностима које предвиђа EUCAST (200, 201), како би се проверило да ли су добијене MIC у границама дефинисаних вредности што је потврдило исправност испитиваних сојева. Колона у микротитар плочи у којој је у бунарчиће са хранљивим бујоном додата само бактеријска односно гљивична суспензија, без испитиваних комплекса и антибиотика односно антимикотика, је служила као контрола вијабилности испитиваних сојева микроорганизама.

Да би се добила MBC и MFC, по 10 µl суспензије из свих бунарчића који су остали плаве боје, са вишим концентрацијама комплекса, је засејано на чврсте подлоге, крвни агар са 5% овчје крви за бактерије, или на SDA агар, за гљивице. Плоче су инкубирани 24 h за бактерије, односно 48 h за гљивице, на температури од 36.6 °C до 37 °C. MBC односно MFC је она концентрација комплекса која се налази у суспензији којом је засејана прва плоча на којој нема пораста бактеријских или гљивичних колонија, односно прва плоча која је остала стерилна.



Слика 7. Детекција пораста микроорганизама помоћу ресазурина. У бунарчићима који су плаве боје нема пораста микроорганизама. Ресазурин се у присуству живих ћелија редукује у флуоресцентни ресорурфин који је розе боје (203, 204).

3.5. Евалуација механизма антитуморске активности комплекса С2

3.5.1. Квантитативно испитивање апоптозе

Резултати испитивања цитотоксичности испитиваних комплекса МТТ тестом су показали да комплекс С2 показује највећи туморицидни потенцијал, пре свега на линијама 4Т1 ћелија мишјег и MDA-MB 468 ћелија хуманог карцинома дојке. Тако је за анализу потенцијалних механизма антитуморске активности испитиваних комплекса изабран комплекс С2, а његови ефекти упоређени са ефектима цисплатине као референтног цитостатика.

Важна биохемијска карактеристика у току апоптозе је експресија маркера на површини апоптотичних ћелија које препознају фагоцити, што омогућава брзу фагоцитозу уз минималано оштећење околног ткива. Један од маркера је фосфатидил-серин који у току процеса апоптозе доспева на спољашњу површину ћелијске мембране (205). Захваљујући способности да веже фосфатидил-серин, рекомбиновани молекул *Annexin V* се користи за *in vitro* детекцију апоптозе (206).

Након инкубације 4Т1 и MDA-MB 468 ћелија у стандардним условима, медијум је замењен медијумом са додатком комплекса С2 или цисплатине у концентрацијама од 10 μM и 30 μM . Контролне ћелије су узгајане само у медијуму. Након третирања у трајању од 12 h, ћелије су испране два пута у хладном PBS-у, а затим ресуспендоване у хладном везујућем пуферу (10 x везујући пуфер: 0.1M HEPES (pH 7.4), 1.4M NaCl, 25mM CaCl₂), тако да се у 1 ml налази 1 x 10⁶ ћелија. Ћелије су затим обојене *Annexin*-ом V-FITC (*BD Biosciences, CA, USA*) и пропидијум јодидом (енгл. *Propidium Iodide, PI*) (*Sigma Aldrich, Munich, Germany*). У 100 ml ћелијске суспензије додато је 5 μl *Annexin*-а V-FITC и 5 μl PI раствореног у концентрацији 50 $\mu\text{g/ml}$ PBS-а. Затим су ћелије инкубиране 15 минута у мраку на собној температури. За одређивање процента мртвих ћелија коришћен је проточни цитометар *FACS Calibur flow Cytometer* (*BD Biosciences, CA, USA*), а подаци су анализирани коришћењем софтвера *FlowJo* (*Tree Star, Inc., OR, USA*). С обзиром на то да је за *Annexin V* везана флуоресцентна боја, проточном флуоцитометријом смо детектовали ћелије које су *Annexin V* позитивне. С друге стране, PI продире унутар ћелија када им је ћелијска мембрана потпуно уништена, везује се за DNK, и сматра се маркером некротичних ћелија (207). Дистрибуција флуоресценције приказана је *dot plot*-овима, а у сваком квадранту је утврђен проценат флуоресцентних ћелија. Овом врстом двоструког бојења детектоване су живе ћелије (*Annexin V*⁻PI⁻), ћелије у раној апоптози (*Annexin V*⁺PI⁻), ћелије у касној апоптози (*Annexin V*⁺PI⁺), као и некротичне ћелије (*Annexin V*⁻PI⁺).

3.5.2. Анализа ћелијског циклуса

У експоненцијалној фази раста, 4Т1 и MDA-MB 468 ћелије мишјег и хуманог карцинома дојке су 12 h третиране комплексом С2 или цисплатином у концентрацији од 30 μM . Као контрола су коришћене нетретиране 4Т1 ћелије. Ћелије су инкубиране, испране, а затим је направљена суспензија густине 5 x 10⁵ ћелија/ml. Дистрибуција молекула DNK и ћелијски циклус туморских ћелија су затим анализирани методом проточне цитометрије након бојења *Ruby* бојом, која има велики афинитет за молекул DNK. Коришћен је *Vybrant DyeCycle™ Ruby stain* кит (*Thermo Fisher Scientific, Inc., USA*), према упутству произвођача. У 0.5 ml добијене суспензије ћелија додато је по 1 μl *Ruby* боје, а узорци су

даље инкубирани у мраку на 37 °C у трајању од 30 минута. Проенти ћелија у одређеној фази ћелијског циклуса су анализирани проточном цитометријом (*FACS Calibur flow Cytometer* (BD Biosciences, CA, USA) и *FlowJo* (Tree Star, Inc., OR, USA) софтвер), одређена је дистрибуција молекула DNK, а на основу тога закључено у којој се фази ћелијског циклуса ћелије налазе (208).

3.5.3. Проточна цитометрија

Након излагања комплексу C2 или циплатини у концентрацији 30 µM током 12 h, третиране 4T1 ћелије, као и контролне, нетретиране ћелије, су фиксирани и пермебилизоване коришћењем *Cytofix/Cytoperm*TM кита (BD Bioscience, CA, USA), а затим инкубирани са антимишјим циклин Е антителом (#MA5-14336, Thermo Fisher Scientific), као и са APC-конјугованим антителом специфичним за мишју протеин киназу АКТ фосфорилисану на позицији S473 (pAKT) (#17-9715-42, eBioscience), 20 минута на 4 °C, за даљу анализу. За детекцију циклина Е, 4T1 ћелије су додатно инкубирани са секундарним FITC-конјугованим IgG антителом (#ab6785, Abcam, Cambridge, UK). Резултати су анализирани *FACS Calibur* проточним цитометром (BD Biosciences, CA, USA) и обрађени помоћу *FlowJo* софтвера (Tree Star, Inc., OR, USA).

3.5.4. qRT-PCR

Методом qRT-PCR (енгл. *Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*) уз коришћење одговарајућих прајмера, детектована је експресија iRNK за синтезу каспазе 3, каспазе 9, циклина D3, RIPK1, p27 и cMyc. Туморске ћелије 4T1 су најпре изложене комплексу C2 или циплатини у концентрацији 30 µM у трајању од 12 h, а затим је изолована укупна RNK из ових ћелија, коришћењем реагенса TRIzol (*Invitrogen, Carlsbad, CA*). Као контрола су коришћене нетретиране 4T1 ћелије. Затим је урађена реверзна транскрипција изоловане RNK уз помоћ *High-Capacity cDNK Reverse Transcription* кита (*Applied Biosystems Foster City, California, USA*). Процес qRT-PCR је изведен коришћењем *Power SYBR MasterMix* (*Applied Biosystems Foster City, California, USA*) и специфичних прајмера који су приказани у табели (Табела 4).

Реакција qRT-PCR је изведена на апарату *Mastercycler® ep realplex* (*Eppendorf, Hamburg, Germany*) са 40 циклуса према одговарајућој температурној шеми (10 минута инкубације на 95 °C, након чега је уследило 40 циклуса у трајању од 15 s на 95 °C и 60 s на 60 °C). Вредност експресије iRNK је одређена у односу на β-актин за сваки узорак. Релативна експресија гена је израчуната према формули $2^{-(Ct-Ctactin)}$, где је *Ct* (енгл. *Cycle treshold*) вредност за ген од интереса, а *Ctactin* вредност за контролни β-актин као *housekeeping* ген. Подаци су представљени као средња вредност ± стандардна девијација и изражени у односу на контролу (нетретиране туморске ћелије).

Табела 4. Прајмери за амплификацију гена за молекуле укључене у регулацију ћелијског циклуса, ћелијске пролиферације и ћелијске смрти.

Ген	Секвенца прајмера (<i>forward</i>)	Секвенца прајмера (<i>reverse</i>)
Каспаза 3	5'-AAATTCAAGGGACGGGTCAT-3'	5'-ATTGACACAATACACGGGATCTGT-3'
Каспаза 9	5'-GCTCTTCSTTTGTTTCATCTCC-3'	5'-CATCTGGCTCGGGGTTACTGC-3'
RIPK1	5'-AGAAGAAGGGAACТАТTCGCTGG-3'	5'-CATCTATCTGGGTCTTTAGCACG-3'
Циклин D3	5'-CCGTGATTGCGCACGACTTC-3'	5'-TCTGTGGGAGTGCTGGTCTG-3'
p27	5'-AGGAGAGCCAGGATGTCAGC-3'	5'-CAGAGTTTGCCTGAGACCCAA-3'
cMyc	5'-CGGACACACAACGTCTTGGAА-3'	5'-AGGATGTAGGCGGTGGCTTT-3'
β -actin	5'-AGCTGCGTTTTACACCCTTT-3'	5'-AAGCCATGCCAATGTTGTCT-3'

3.6. Експериментални модел карцинома дојке и фармаколошки третман мишева

3.6.1. Експерименталне животиње

У студији су коришћени BALB/с мишеви женског пола, старости 8-10 недеља. Мишеви су узгајани у стандардним условима у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Мишеви су смештени у окружење са контролисаном температуром, са светло-тамним циклусом од 12 h, уз слободан приступ храни и води. Све животиње су добиле хуману негу, а процедуре коришћене у овој студији је одобрила Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-14555 од 13.12.2021. године.

3.6.2. Модел карцинома дојке

За овај експеримент је коришћена ћелијска линија мишјег карцинома дојке, 4T1, и то само ћелије које су имале индекс вијабилности преко 95%. Ћелије су узгајане у стандардним условима, а затим је 3×10^4 ћелија у 50 μ l DMEM убризгано субкутано, у масно ткиво млечне жлезде сингених BALB/с мишева женског пола (209). Након појаве палпабилног тумора (око седмог дана од инокулације) праћена је динамика његовог раста и то сваког другог дана. Тумори су мерени помоћу калипера, а волумен тумора је одређен по формули: Волумен тумора (mm^3) = $L \times W^2 / 2$, где је L највећи, а W најмањи промер тумора.

3.6.3. Апликација комплекса С2

За испитивање ефекта на раст и прогресију тумора *in vivo*, изабран је комплекс С2 који је показао највећи цитотоксички ефекат *in vitro*. Мишеви су подељени на 4 групе, при чему је у свакој било по 10 јединки. Једна група је третирана цисплатином у дози 3 mg/kgТТ, друга група је третирана комплексом С2 у дози 3 mg/kgТТ, трећа комплексом С2 у дози 6 mg/kgТТ, док је четвртој контролној групи мишева убризган 0.9% NaCl. За одређивање дозе испитиваног комплекса су коришћене добијене вредности IC₅₀. Третман мишева је почео седмог дана након убризгавања примарног тумора. Супстанце су убризгаване интраперитонеално, сваког другог дана, у укупно осам доза. Раст тумора је затим праћен до 25-ог дана од инокулације туморских ћелија. Након изолације, измерена је тежина и дијаметар тумора.

3.7. Статистичка анализа

Добијени резултати биће представљени као средње вредности±стандардне грешке. Статистичка значајност одређена је Студентовим t тестом за узорке који имају нормалну расподелу, као и *Mann-Whitney* тестом за узорке који немају нормалну расподелу. За поређење учеталости преживљавања мишева коришћен је *Fisher's exact* тест за сваки од временских интервала током праћења. Резултати су сматрани статистички значајним када је $p < 0.05$. За статистичку обраду добијених резултата коришћен је програмски пакет SPSS верзија 20.

4. РЕЗУЛТАТИ

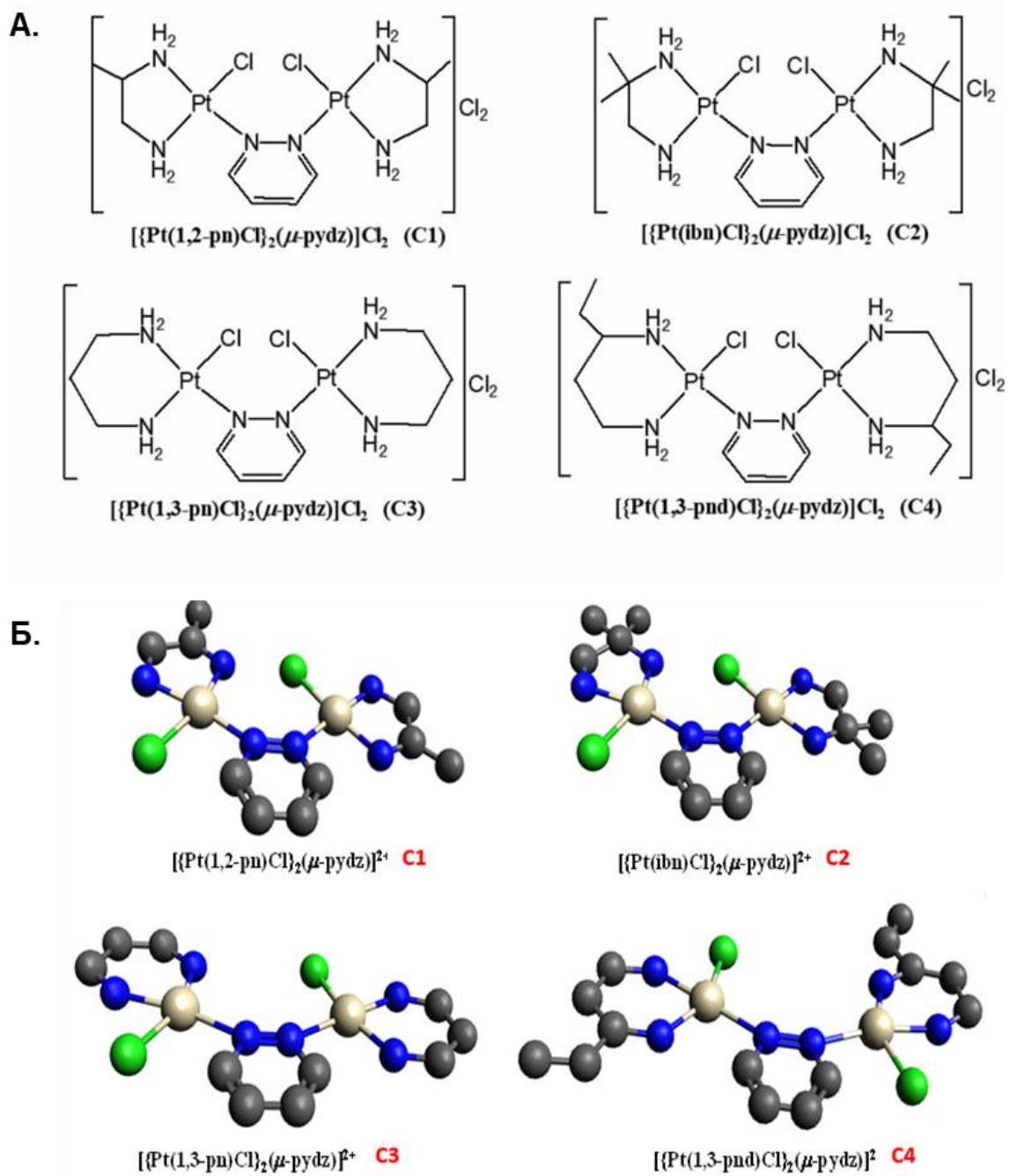
4.1. Анализа хемијских карактеристика комплекса C1 – C8

У овој студији синтетисани су динуклеарни комплекси Pt(II) са пиридазином као мостним лигандом, $[\{Pt(1,2-pn)Cl\}_2(\mu-pydz)]Cl_2$ (C1), $[\{Pt(ibn)Cl\}_2(\mu-pydz)]Cl_2$ (C2), $[\{Pt(1,3-pn)Cl\}_2(\mu-pydz)]Cl_2$ (C3) и $[\{Pt(1,3-pnd)Cl\}_2(\mu-pydz)]Cl_2$ (C4), као и динуклеарни комплекси Pd(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима, $[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu-pz)](NO_3)_2$ (C5), $[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu-pm)](NO_3)_2$ (C6), $[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu-pydz)](NO_3)_2$ (C7) и $[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu-phz)](NO_3)_2$ (C8), а затим су испитане структурне особине, интеракције са биомолекулима попут DNK и BSA, као и њихова биолошка активност.

4.1.1. Хемијске карактеристике комплекса C1 – C4

Динуклеарни комплекси Pt(II) са пиридазином као мостним лигандом, C1 – C4, су добијени из одговарајућих мононуклеарних комплекса према модификованом поступку који је претходно описан у литератури (167-169). У реакцији мононуклеарног комплекса $[Pt(L)Cl_2]$ (L је 1,2-пропилендиамин, изобутилендиамин, 1,3-пропилендиамин или 1,3-пентандиамин) са $AgNO_3$ у молском односу 1:0.98 у раствору DMF, један хлоридо-лиганд је супституисан молекулом DMF. Да би се добили динуклеарни комплекси Pt(II), одговарајући мононуклеарни комплекс, $[Pt(L)(Cl)DMF]^+$, помешан је са пиридазином у моларном односу 2:1, у DMF-у, на собној температури. Динуклеарни комплекси су кристализовани из воденог раствора LiCl. Као што је приказано на Слици 8А, синтетисани динуклеарни комплекси Pt(II) имају исти мостни лиганд, пиридазин, а различите диаминске лиганде. Геометријски модел молекулске структуре добијених динуклеарних комплекса Pt(II) је приказан на Слици 8Б.

1H и ^{13}C NMR спектри пиридазина, као и синтетисаних комплекса C1 – C4 су забележени у D_2O као растварачу. У Табели 5 су приказани одговарајући спектроскопски подаци. У 1H NMR спектру слободног пиридазина, појављују се два мултиплета на 7.83 и 9.20 ppm, који потичу од еквивалентних протона пиридазинског прстена (H4/H5 и H3/H6). Након координације лиганда и јона Pt(II), сигнал се помера на ниже поље, тј. на више хемијско померање за $\Delta\delta = 0.31$ ppm (H4/H5), и за $\Delta\delta = 0.38$ ppm (H3/H6). Такође, у ^{13}C NMR спектру сигнал се помера на ниже поље након координације пиридазина и јона Pt(II) (Табела 5). Након хелатне координације лиганда (1,2-пропилендиамин, изобутилендиамин, 1,3-пропилендиамин или 1,3-пентандиамин) за јон Pt(II) у комплексима C1 – C4, у 1H NMR спектру сигнали који потичу од слободних лиганда померају се на ниже поље, тј. на више хемијско померање. Као што се може видети из Табеле 5, сигнали за атоме угљеника хелатних лиганда у комплексу, такође се померају на више хемијско померање у односу на оне за слободне лиганде. Методом масене спектрометрије високе резолуције додатно су потврђене структуре синтетисаних комплекса.

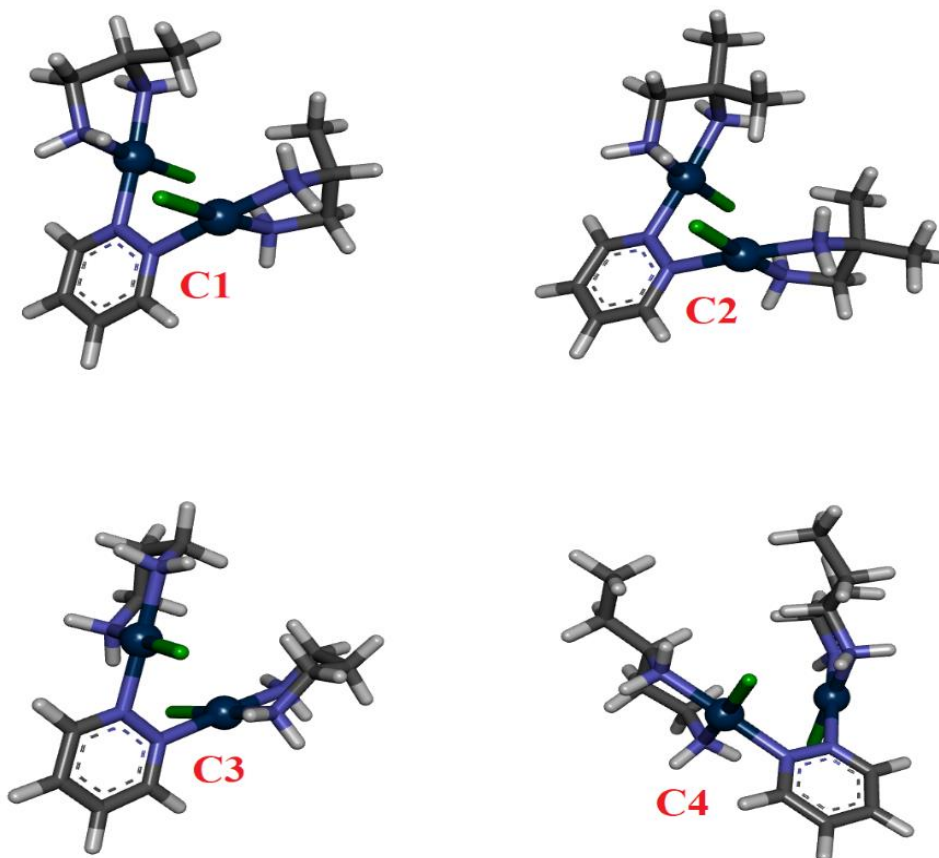


Слика 8. Структурне формуле (А) и геометријски модели (Б) комплекса С1 – С4.

Табела 5. NMR (^1H и ^{13}C) хемијско померање (δ , ppm) за пиридазин (pydz), 1,2-пропилендиамин (1,2-pn) (C1), изобутилендиамин (ibn) (C2), 1,3-пропилендиамин (1,3-pn) (C3), 1,3-пентандиамин (1,3-pnd) (C4) и одговарајуће динуклеарне комплексе Pt(II) у D_2O као растварачу.

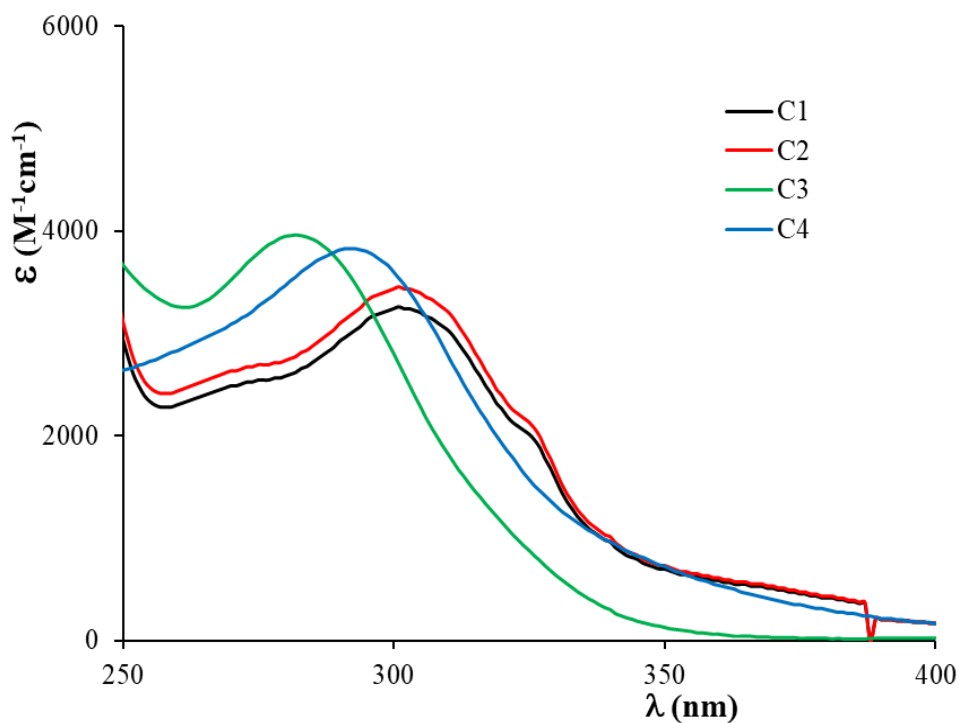
Лиганд/Pt(II) комплекс	^1H NMR	^{13}C NMR
pydz	7.83 (<i>m</i> , H4/H5) 9.20 (<i>m</i> , H3/H6)	130 (C4/C5) 151 (C3/C6)
1,2-pn	1.29 (<i>d</i> , CH ₃), 1.45 (<i>m</i> , CH ₂), 2.64 (<i>m</i> , CH)	16, 47, 52
C1	1,2-pn	
	1.46 (<i>m</i> , CH ₃), 2.79 (<i>m</i> , CH ₂ /CH)	18, 54, 60
	pydz	
ibn	8.14 (<i>m</i> , H4/H5) 9.58 (<i>m</i> , H3/H6)	137 (C4/C5) 164 (C3/C6)
	1.32 (<i>m</i> , CH ₃), 2.48 (<i>s</i> , CH ₂)	22, 52, 58
C2	ibn	
	1.46 (<i>m</i> , CH ₃), 2.66 (<i>s</i> , CH ₂)	26, 64, 65
	pydz	
1,3-pn	8.18 (<i>m</i> , H4/H5) 9.62 (<i>m</i> , H3/H6)	135 (C4/C5) 162 (C3/C6)
	1.60 (<i>m</i> , CH ₃), 2.65 (<i>m</i> , CH ₂)	29, 39
C3	1,3-pn	
	1.89 (<i>m</i> , CH ₃), 2.79 (<i>m</i> , CH ₂)	30, 45, 46
	pydz	
1,3-pnd	8.14 (<i>m</i> , H4/H5) 9.57 (<i>m</i> , H3/H6)	139 (C4/C5) 166 (C6/C6)
	0.86 (<i>t</i> , CH ₃), 1.45 (<i>m</i> , CH ₂), 2.66 (<i>m</i> , CH)	12, 32, 40, 41, 52
C4	1,3-pnd	
	0.97 (<i>m</i> , CH ₃), 1.82 (<i>m</i> , CH ₂) 2.85 (<i>m</i> , CH ₂ /CH)	12, 30, 33, 34, 43, 44, 56, 57
	pydz	
	8.15 (<i>m</i> , H4/H5) 9.63 (<i>m</i> , H3/H6)	135 (C4/C5) 163 (C6/C6)

На основу добијених података, на Слици 9 је приказана оптимизована структура испитиваних комплекса. Може се уочити да се хлоридо-лиганди налазе на различитим странама равни комплекса која пролази кроз пиридазински мостни лиганд. Средње равни хелатних прстенова су нормалне на ову раван, као последица интрамолекулских водоничних веза између Pt-N-H групе и хлоридо-лиганада (Слика 9).



Слика 9. Структура динуклеарних комплекса Pt(II) (C1 – C4), оптимизована B3LYP методом са 6-31g** базног сета за неметалне атоме и *lanl2dz* базним сетом за Pt.

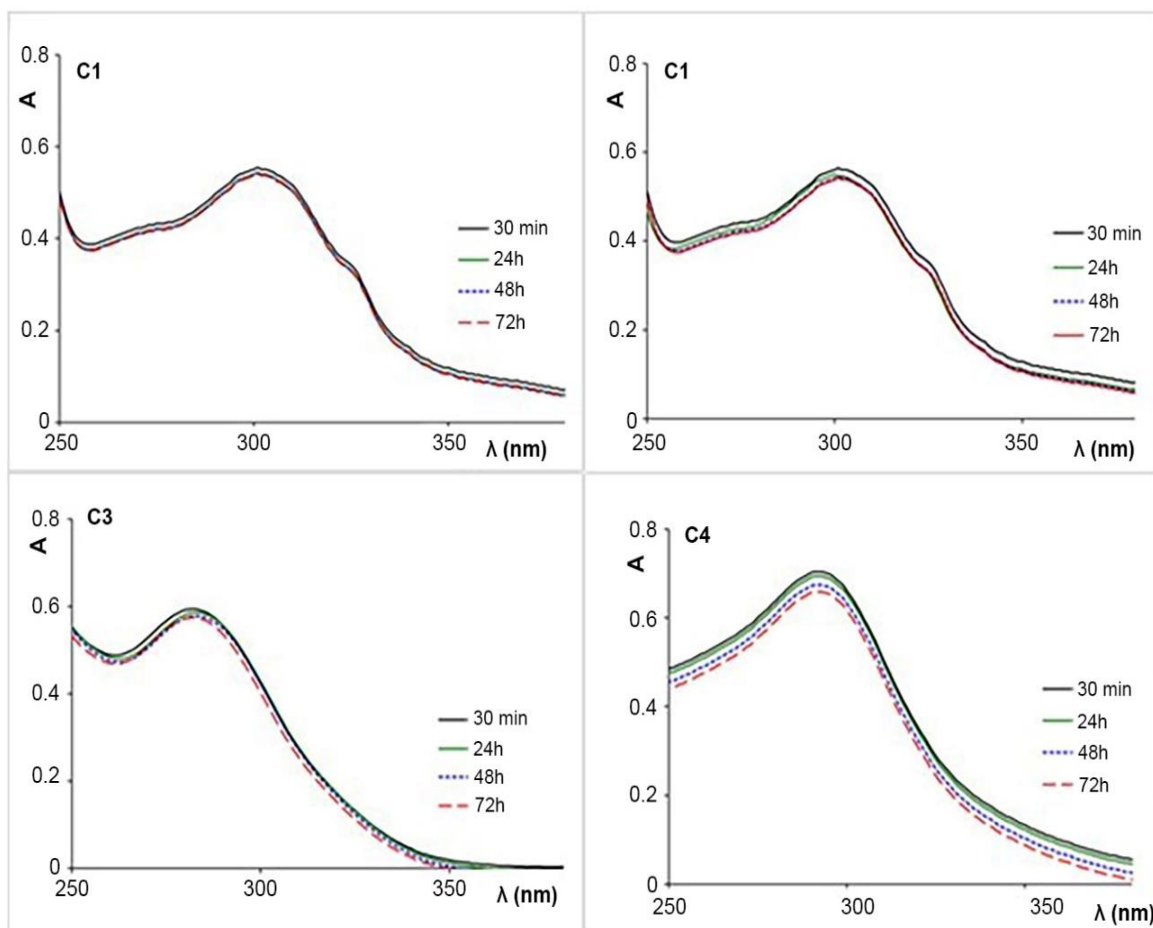
Додатно, *UV-vis* спектрофотометријом су снимљени спектри комплекса C1 – C4 и приказани на Графикону 1. Уочава се да се максимуми апсорпције налазе се на 282 nm за C3, 292 nm за C4, као и на 301 nm за комплексе C1 и C2. Максимуми апсорпције испитиваних комплекса имају помак у односу на максимуме апсорпције лиганада (Графикон 1).



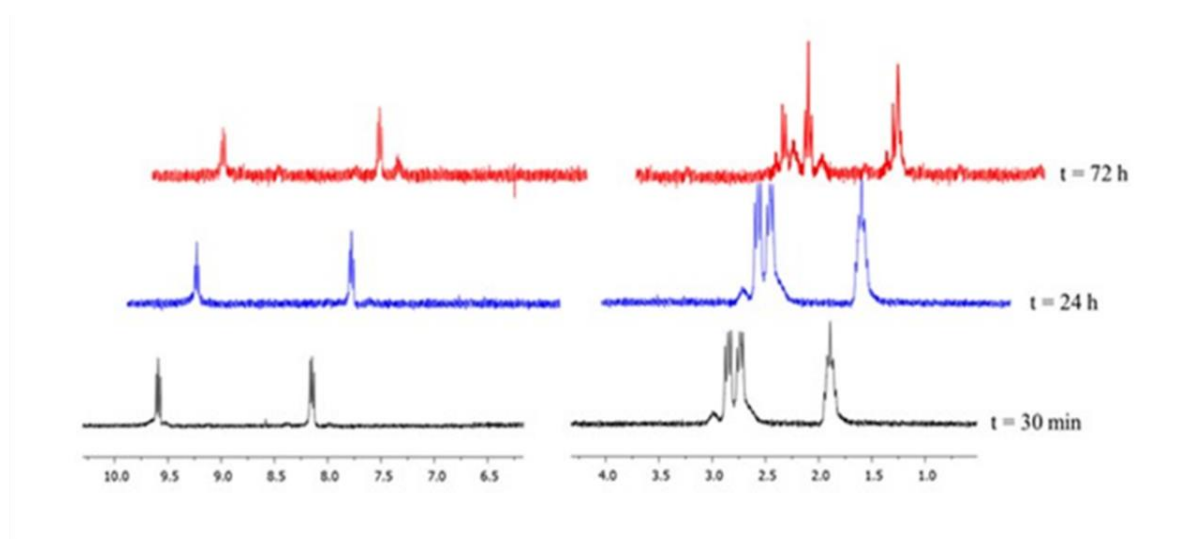
Графикон 1. *UV-vis* спектри синтетизованих динуклеарних комплекса C1 – C4 (5×10^{-5} M).

4.1.1.1. Стабилност комплекса C1 – C4

Испитивање стабилности комплекса C1 – C4 *UV-vis* спектрофотометријом, у различитим временским интервалима током 72 h, је показало веома мале промене у интензитету максимума апсорпције (Графикон 2). Испитивање стабилности ^1H NMR спектроскопијом, у различитим временским интервалима ($t = 30 \text{ min}$, 24 h и 72 h), је показало нове, веома слабе резонанције у ароматичном региону, порекла слободних протона пиридазина, које се појављују у спектру након 72 h (Слика 10). Ове резонанције одговарају слободним мостним лигандима, и резултат су веома спорог распадања динуклеарних комплекса. Може се закључити да су комплекси током испитивања били стабилни.



Графикон 2. Стабилност комплекса C1 – C4 (1×10^{-4} M) (у 0.01 M PBS-а, pH = 7.4, са 2.7 mM KCl и 137 mM NaCl), анализирана UV-vis спектрофотометријом у различитим временским интервалима). A: Апсорбанца.



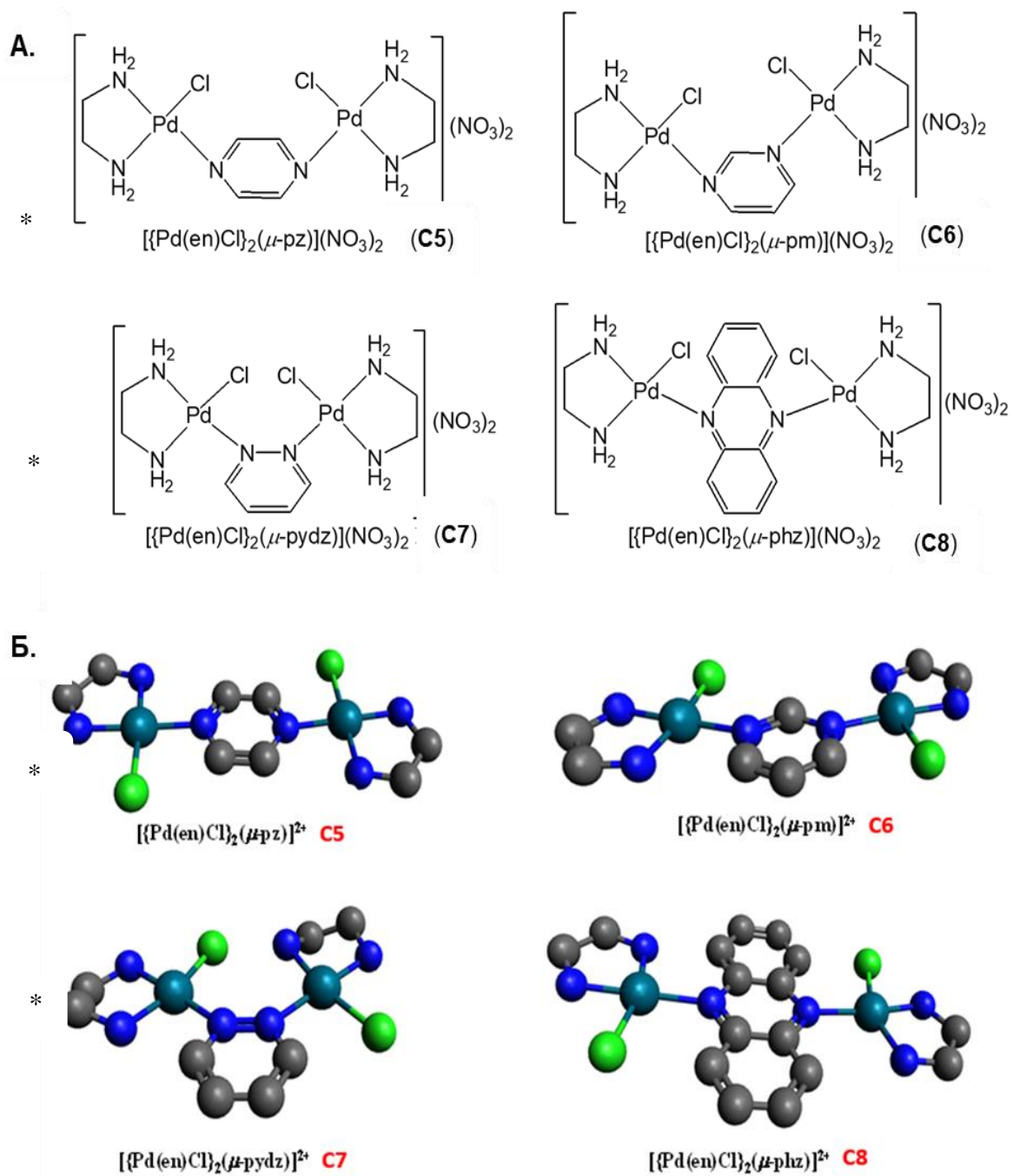
Слика 10. ¹H NMR спектроскопија комплекса C3 (5×10^{-3} M) (у D₂O на собној температури, у различитим временским интервалима).

4.1.2. Хемијске карактеристике комплекса C5 – C8

Динуклеарни комплекси Pd(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима, са општом формулом $[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu-L)](NO_3)_2$ (L је пиразин, пиримидин, пиридазин или феназин, а en је етилендиамин), струкурно су окарактерисани применом елементалне микроанализе и различитих спектроскопских техника. Њихова структурна формула и геометријски модел су приказани на Слици 11A и Б. Сви мостни лиганди садрже два N атома на различитим позицијама.

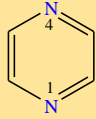


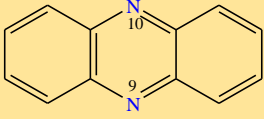
1H и ^{13}C NMR спектри лиганада, као и комплекса C5 – C8, су забележени у D_2O као растварачу. У Табели 6 су приказани одговарајући спектроскопски подаци. У 1H NMR спектрима некоординованих мостних лиганада пиразина, у ароматичној регији, сигнал који се уочава на 8.66 ppm потиче од еквивалентних протона пиразинског прстена. Након координавања са јонима Pd(II), овај сигнал се појављује на 8.99 ppm као мултиплет. Слободни пиримидински лиганд у 1H NMR спектру има три сигнала, на 7.76, 9.04 и 9.39 ppm, који потичу од H5, H4/H6 и H2 протона. У ароматичној регији, 1H NMR спектри комплекса C7 и C8 садрже два сета резонанци које потичу од пиридазинских и феназинских координованих лиганада, чија се хемијска померања разликују од некоординованих. Померање на ниже поље протона из мостних лиганада, које се дешава након координације за јон Pd(II), се може приписати делокализацији π електрона.

Такође, у 1H NMR спектрима комплекса C5 – C8, сигнал који потиче од координованог диаминског лиганда је померен на ниже поље у односу на слободне бидентатне лиганде. Као што се може видети из Табеле 6, ^{13}C NMR спектри комплекса показују више различитих сигнала, односно један за C5, три за C6 и C8 и два за C7. Ови сигнали потичу од угљеникових атома слободних мостних лиганада. Додавање слободних лиганда раствору одговарајућих комплекса резултује појавом још једног сета ^{13}C сигнала. Након координације лиганада за јон Pd(II), сигнали који потичу од угљеника у ароматичним прстеновима мостних лиганада су померени на ниже поље (Табела 6).



Слика 11. Структурне формуле (А) и геометријски модели (Б) комплекса C5 – C8.
 * Živković MD et al. *Bioorg Chem* 2017;72:190-8 (172).

Табела 6. NMR (^1H и ^{13}C) хемијска померања (δ , ppm) за пиразин (pz) (C5), пиримидин (pm) (C6), пиридазин (pydz) (C7) и феназин (phz) (C8) лиганде и одговарајуће динуклеарне комплексе Pd(II) у D_2O као растварачу.

лиганд /Pd(II) комплекс	^1H NMR	^{13}C NMR
pz 	8.66 (s)	145
C5*	8.99 (m)	150
pm 	7.76 (m, H5) 9.04 (m, H4/H6) 9.39 (s, H2)	132 (C5) 152 (C4/C6) 159 (C2)
C6	7.86 (m, H5) 9.27 (m, H4/H6) 9.78 (s, H2)	132 (C5) 162 (C4/C6) 168 (C2)
pydz 	7.83 (m, H4/H5) 9.20 (m, H3/H6)	130 (C4/C5) 151 (C3/C6)
C7*	8.02 (m, H4/H5) 9.46 (m, H3/H6)	137 (C4/C5) 164 (C3/C6)
phz 	7.98 (m, H2/H3/H7/H8) 8.14 (m, H1/H4/H6/H9)	128 (C2/C3/C7/C8) 130 (C1/C4/C6/C9) 140 (C4a, C5a, C9a, C10a)
C8	8.41 (m, H2/H3/H7/H8) 10.26 (m, H1/H4/H6/H9)	130 (C2/C3/C7/C8) 136 (C1/C4/C6/C9) 148 (C4a, C5a, C9a, C10a)

* Živković MD et al. *Bioorg Chem* 2017;72:190-8 (172).

UV-vis спектри комплекса C5 – C8 су снимљени у опсегу таласних дужина од 200 до 500 nm. Спектри апсорпције испитиваних комплекса су веома слични и показују интензивне траке на 271 nm за C5, 278 nm за C6, 275 nm за C7 и на 250 и 374 nm за комплекс C8. Максимуми апсорпције свих синтетисаних комплекса C5 – C8 показују батохромно померање у поређењу са истим слободних пиримидинских, пиразинских, пиридазинских и феназинских лиганата.

4.2. Анализа интеракција комплекса C1 – C8 са биомолекулима

Интеракција комплекса C1 – C8 са молекулима CT-DNK и BSA је испитана применом апсорпционих спектроскопских метода и флуоресцентних мерења.

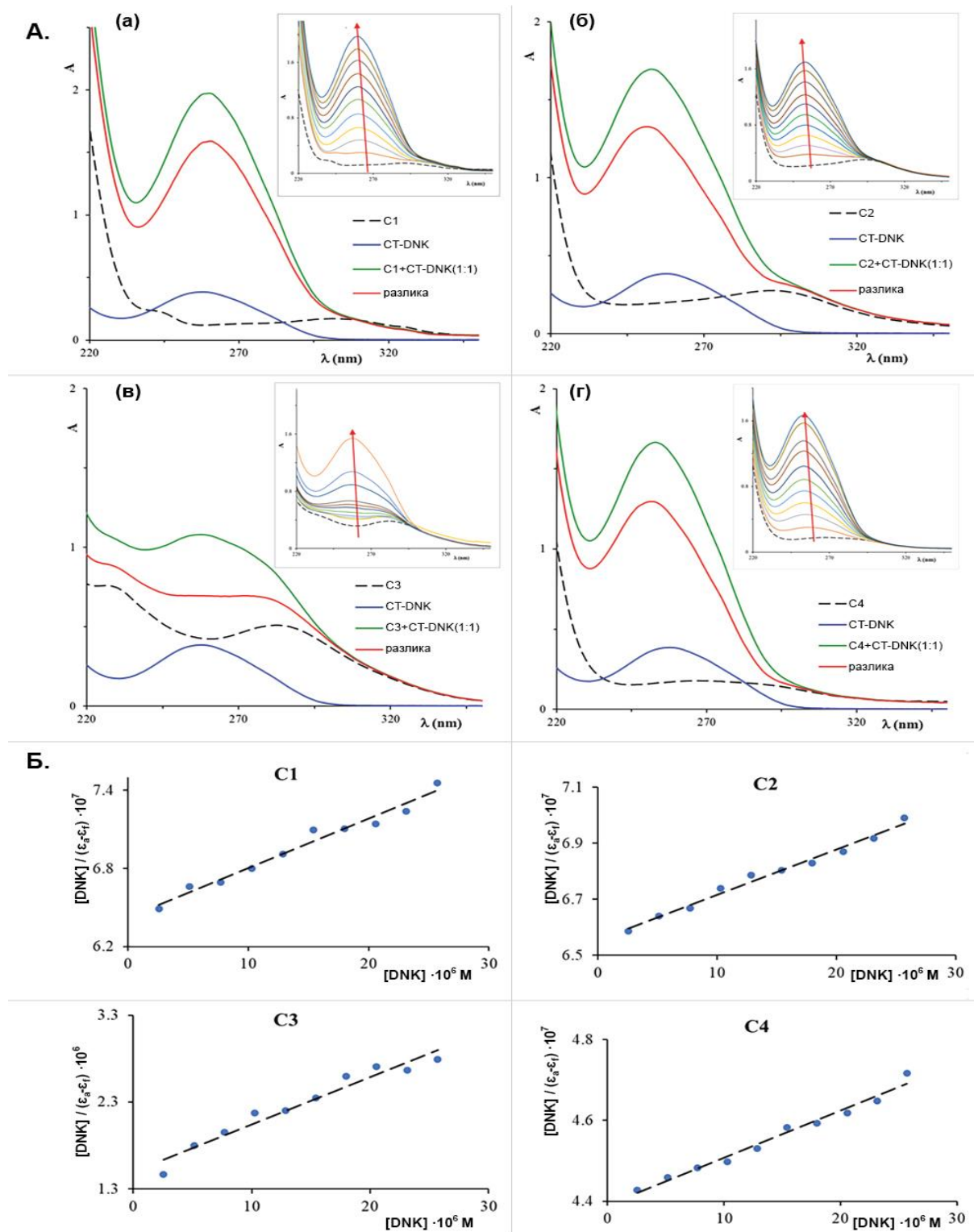
4.2.1. Интеракција комплекса C1 – C4 са молекулом CT-DNK

Спектри апсорпције комплекса C1 – C4 са CT-DNK су снимљени при константној концентрацији комплекса и различитим односима концентрација комплекса и CT-DNK и приказани на Графикону 3. Може се приметити да интензитет апсорпционих трака на $\lambda = 260$ nm постепено расте.

Константе везивања (K_b) су израчунате да би се упоредио афинитет везивања комплекса за CT-DNK, а добијене вредности указују на претпоставку да модел везивања комплекса за молекул CT-DNK није интеркалација (Табела 7). Такође, захваљујући томе што нема батохромног померања максимума апсорпције, може се рећи да комплекси C1 – C4 не формирају ковалентне везе са DNK адуктима. Овакви резултати указују на већу могућност остваривања електростатичких интеракција. Вредности *Stern-Volmer*-ове константе (K_{sv}) и константе стабилности (K_a) додатно говоре у прилог томе да испитивани комплекси нису добри интеркалатори, као и да успостављају слабе везе са молекулом DNK (Табела 7). Приближно исти број везујућих места ($n \approx 1$) потврђује да се интеракције свих испитиваних комплекса и молекула DNK одвијају на исти начин (Табела 7). Најмања вредност константе K_a за комплекс C2 указује на то да овај комплекс остварује најслабије везе са молекулом DNK.

Мерења вискозитета су коришћена да би се додатно разјаснио начин интеракције комплекса C1 – C4 са CT-DNK. Додавање растућих концентрација комплекса (до $r = 1.0$) у раствор CT-DNK утицало је на благо смањење вискозитета што додатно имплицира да интеракција C1 – C4 са CT-DNK није типа интеркалације (Графикон 4).

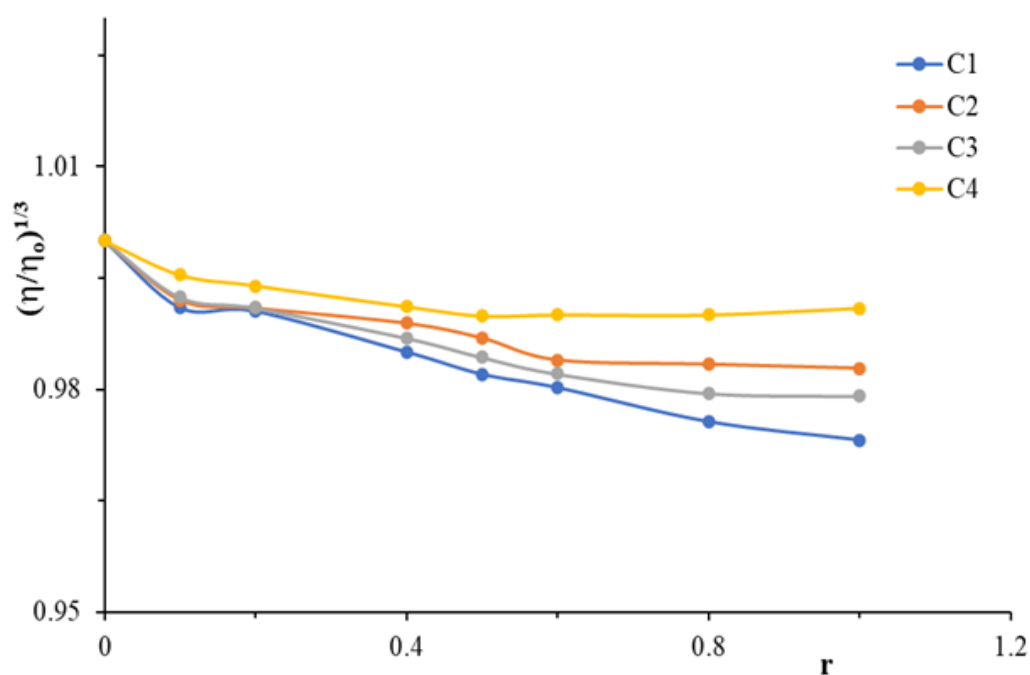
Да би се даље испитала природа интеракције испитиваних комплекса и CT-DNK, као типичан интеркалатор коришћен је етидијум бромид (EtBr) и детектоване промене у спектрима емисије EtBr/CT-DNK након додавања раствора комплекса. Графикон 5 приказује емисионе спектре EtBr/CT-DNK у присуству комплекса C1 – C4. Додавање комплекса C1 – C4 смањило је емисију флуоресценције EtBr за 20% почетне максималне вредности за све испитиване комплексе (праћен је интензитет емисије на 612 nm), што имплицира конкуренцију између EtBr и комплекса за место везивања на молекулу CT-DNK и формирање нових комплекс/CT-DNK адуката. Међутим, релативно мало смањење интензитета флуоресценције потврђује да комплекси C1 – C4 нису добри интеркалатори (Графикон 5).



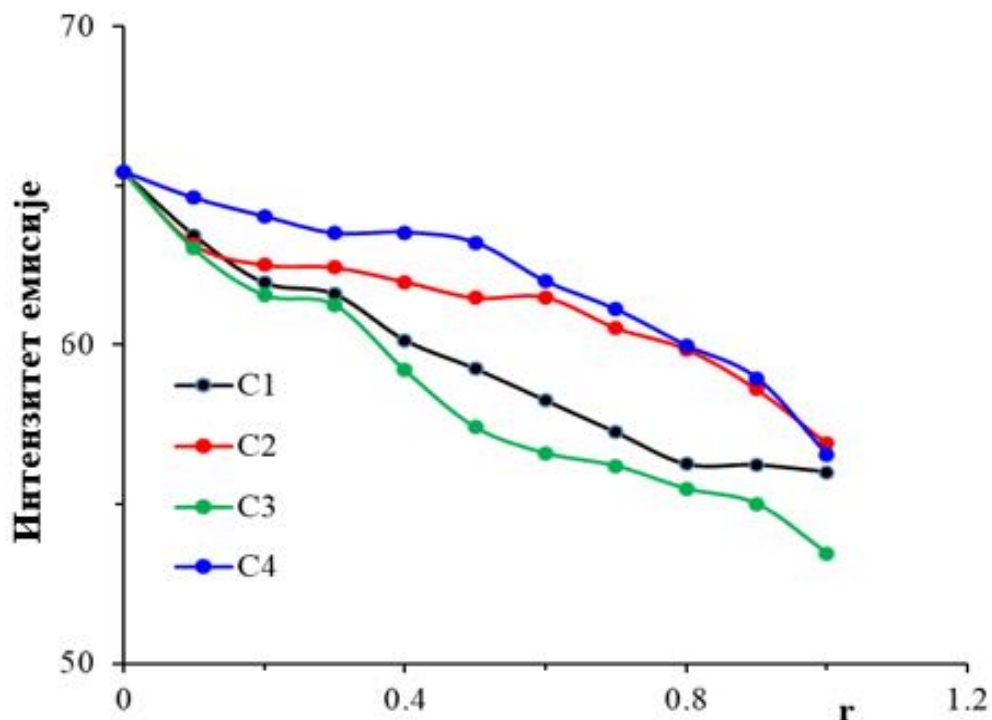
Графикон 3. А. Апсорциони спектри комплекса C1 (а), C2 (б), C3 (в) и C4 (г) у PBS-у (10 mM, pH 7.4, са 2.7 mM KCl и 137 mM NaCl) у одсуству и присуству CT-DNK. Уметнути дијаграм: апсорциони спектри комплекса C1 – C4 након додавања CT-DNK. [комплекс] = 25.7 μM, [DNK] = 0 – 25.7 μM. **Б.** Дијаграм зависности $[\text{DNK}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ од [DNK] за комплексе C1 – C4 у присуству CT-DNK.

Табела 7. Параметри интеракције комплекса C1 – C4 са СТ-DНК (константа везивања (K_b), *Stern-Volmer*-ова константа (K_{sv}), константа стабилности (K_a) и број везујућих места (n)).

Комплекс	$K_b \cdot 10^3 (M^{-1})$	$K_{sv} \cdot 10^3 (M^{-1})$	$K_a \cdot 10^4 (M^{-1})$	n
C1	0.6	4.2	1.3	0.9
C2	0.2	3.8	0.4	0.8
C3	3.6	6.4	2.8	1.0
C4	0.3	4.0	0.9	0.8

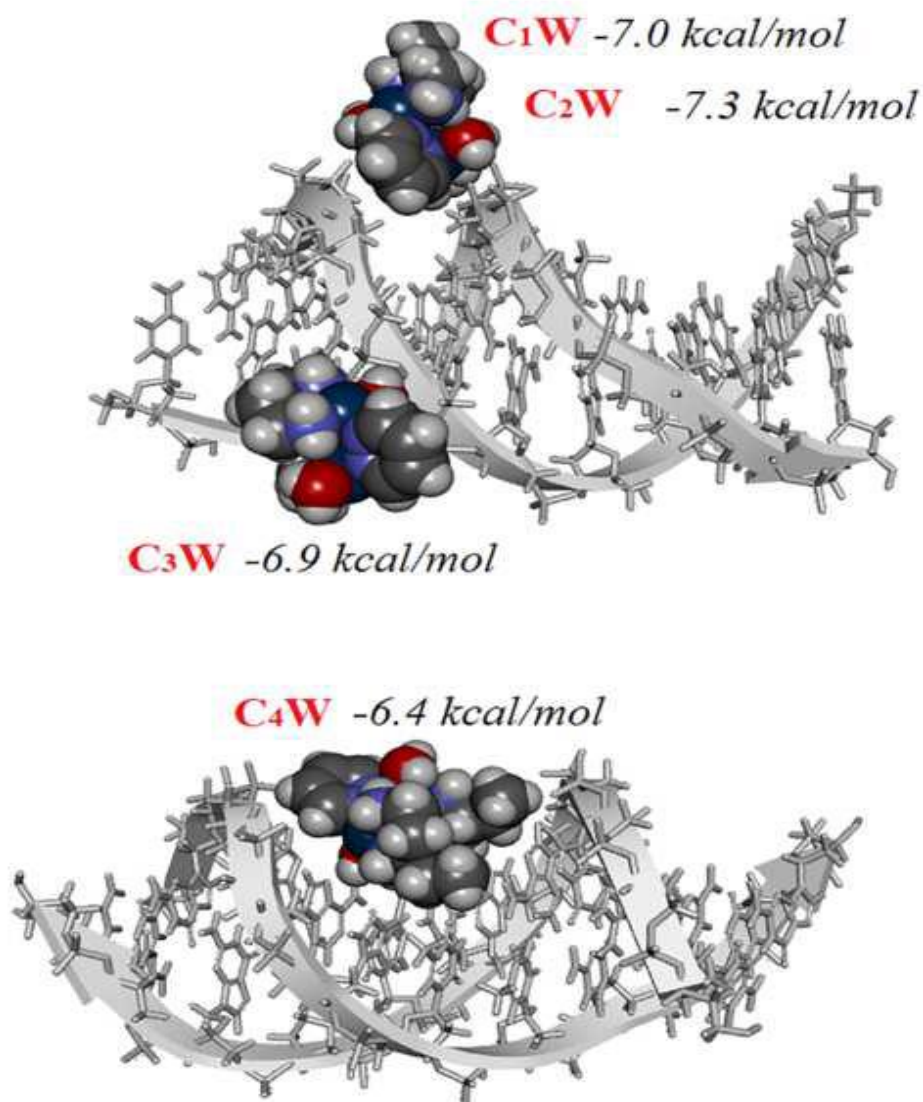


Графикон 4. Ефекат растућих концентрација комплекса C1 – C4 на релативни вискозитет раствора СТ-DНК (8 μ M, на собној температури). $r = [\text{комплекс}]/[\text{СТ-DНК}]$.



Графикон 5. Емисиони спектри СТ-DNK/EtBr у присуству комплекса C1 – C4 (у PBS-у, 10 mM, pH = 7.4, са 2.7 mM KCl и 137 mM NaCl). [СТ-DNK] и [EtBr] = 8×10^{-5} M.

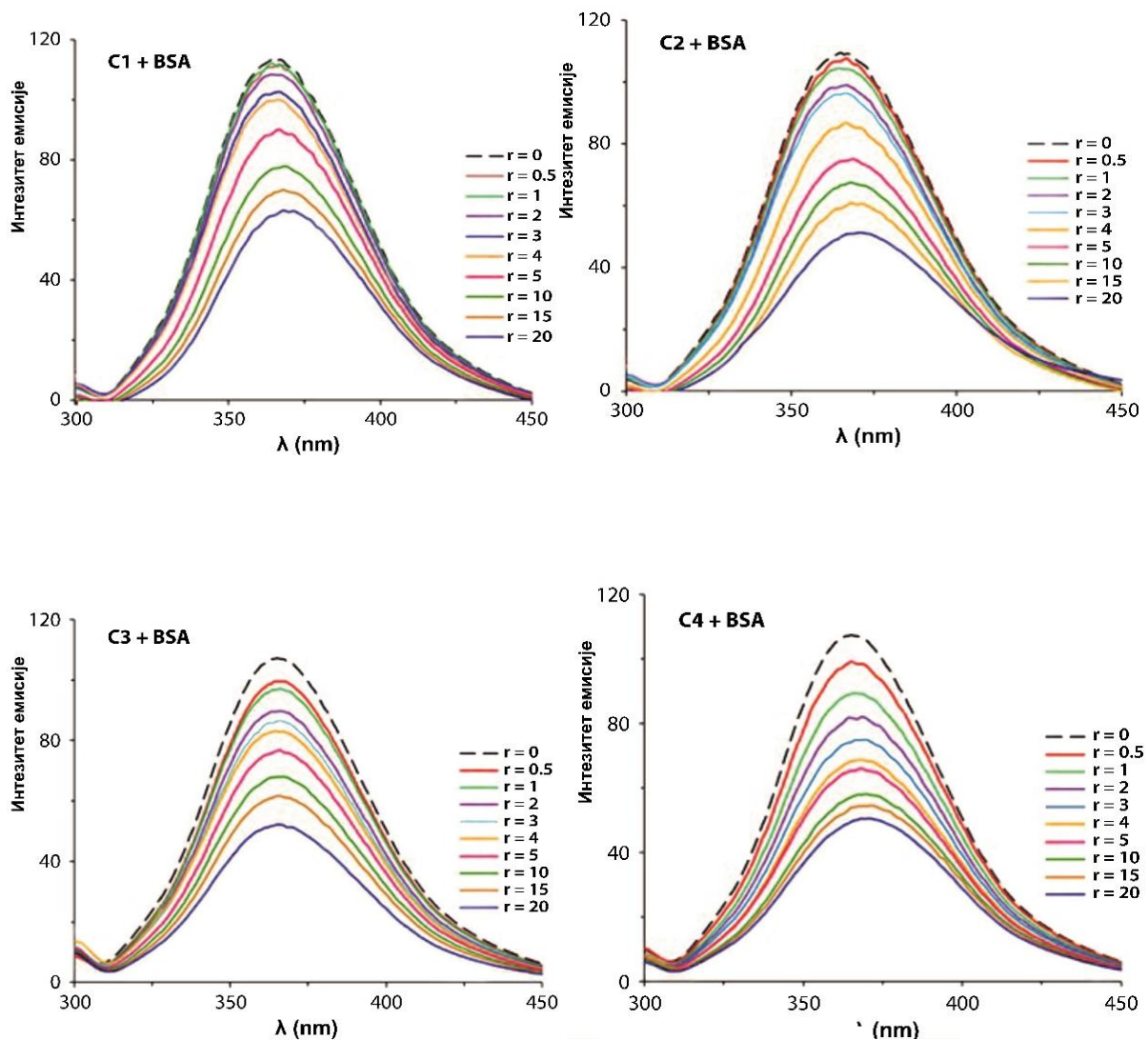
У даљем току истраживања, природа везе комплекса C1 – C4 са молекулом DNK, испитивана је студијом молекулског докинга. За прорачуне су коришћени њихови *aqua*-комплекси (C1W – C4W), с обзиром на то да у једру ћелије, до молекула DNK, продиру само *aqua*-облици који настају након хидролизе полазних комплекса. Везујуће енергије најстабилнијих адуката су у опсегу -6.4 kcal/mol до -7.3 kcal/mol, као што је приказано на Слици 12. Резултати ове студије су показали да су најстабилније везе са молекулом DNK у жлебу (адукти са комплексима C1 и C2), а затим дуж ланца DNK (адукт са комплексом C3), док се комплекс C4 везује за велики жлеб на месту DNK богатом А-Т базним паровима (Слика 12).



Слика 12. Структура најстабилнијих адуката добијена молекулским докингом. Комплекси представљају *aqua*-деривате C1W – C4W одговарајућих хлоридо-комплекса C1 – C4.

4.2.2. Интеракција комплекса C1 – C4 са молекулом BSA

Након додавања комплекса C1 – C4 у раствор BSA, примећује се смањење интензитета флуоресценције на $\lambda = 365$ nm у складу са променом структуре протеина, што указује на то да се комплекси везују за овај молекул (Графикон 6).



Графикон 6. Емисиони спектар BSA у присуству комплекса C1 – C4. [BSA] = 8 μ M, [Q] = 0-160 μ M; λ_{ex} = 295 nm.

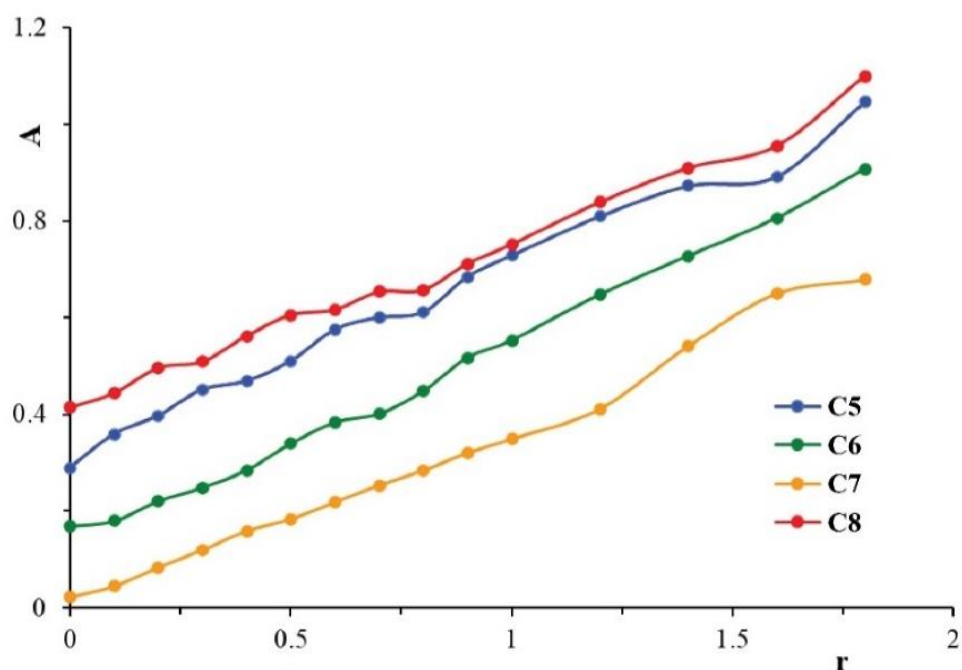
Вредности динамичке *Stern-Volmer*-ове константе (K_{sv}) и константе гашења флуоресценције (k_q) за интеракцију комплекса са BSA су одређене уз помоћ *Stern-Volmer*-ове једначине и приказане у Табели 8. Додатно, у Табели 8 приказане су вредности константе везивања (K_a), као и број везујућих места албумина (n) за испитиване комплексе. У поређењу са вредношћу K_a најјаче познате нековалентне интеракције авидина са различитим лигандима, која износи 10^{15} M^{-1} , вредности K_a за испитиване комплексе указују на слабе везе комплекса са молекулом BSA. Посебно малу вредност K_a је имао комплекс C2, па се може закључити да се овај комплекс најслабије од свих испитиваних комплекса везује за BSA. Додатно, с обзиром на вредности $n \sim 1$, претпоставља се да постоји само једно везујуће место на молекулу BSA за везивање комплекса.

Табела 8. Параметри интеракције комплекса C1 – C4 са BSA (*Stern-Volmer*-ова константа (K_{sv}), константа гашења флуоресценције (k_q), константа стабилности (K_a) и број везујућих места (n)).

Комплекс	$K_{sv} \cdot 10^4 (M^{-1})$	$k_q \cdot 10^{12} (M^{-1}s^{-1})$	$K_a \cdot 10^4 (M^{-1})$	n
C1	5.5	5.5	4.5	0.9
C2	4.2	4.2	3.8	0.8
C3	5.9	5.9	5.1	1.0
C4	4.0	4.0	3.9	0.8

Студијом молекулског докинга је испитана интеракција C1 – C4 са BSA и HSA. За ову студију су коришћени хлоридо-деривати испитиваних комплекса, јер се молекули BSA и HSA налазе у екстрацелуларном простору у коме су комплекси у хлоридо-облику. BSA и HSA имају 3 домена (I, II и III) са по два субдомена (A и B), док молекул HSA има девет везујућих места за лекове, означених са DBS (енгл. *Drug Binding Site*), као што је приказано на Слици 13A.

Ова студија је показала да се комплекси C1 – C4 везују за субдомен IIА на молекулу BSA, на позицији која се не сматра транспортним местом. Енергије везивања су у рангу од -4.22 до -5.07 kcal/mol, што се може сматрати умереном снагом везивања за транспортни протеин (Слика 13A). Резултати су у складу са претходно добијеним вредностима K_a , које указују на то да се комплекси могу ослободити са BSA, пре допремања до циљних ћелија. Када је у питању молекул HSA, постоји једно место за везивање испитиваних комплекса, лоцирано између IA и IIА субдомена, које није означено као DBS. Енергије везивања од -4.26 до -4.44 kcal/mol, слично BSA, показују умерено везивање испитиваних комплекса за HSA (Слика 13A). Најстабилније место везивања комплекса за BSA је електростатички ојачана водонична веза између позитивно наелектрисане групе Pt-N-H комплекса и негативно наелектрисаних аминокиселина (Asp307 и Glu332) (Слика 13Б). Генерално, на основу јачине и природе везивања комплекса C1 – C4 за површину транспортног протеина, на нетранспортном месту, могуће је претпоставити његово лако ослобађање у крвотоку и следствено смањено допремање у циљно ткиво.



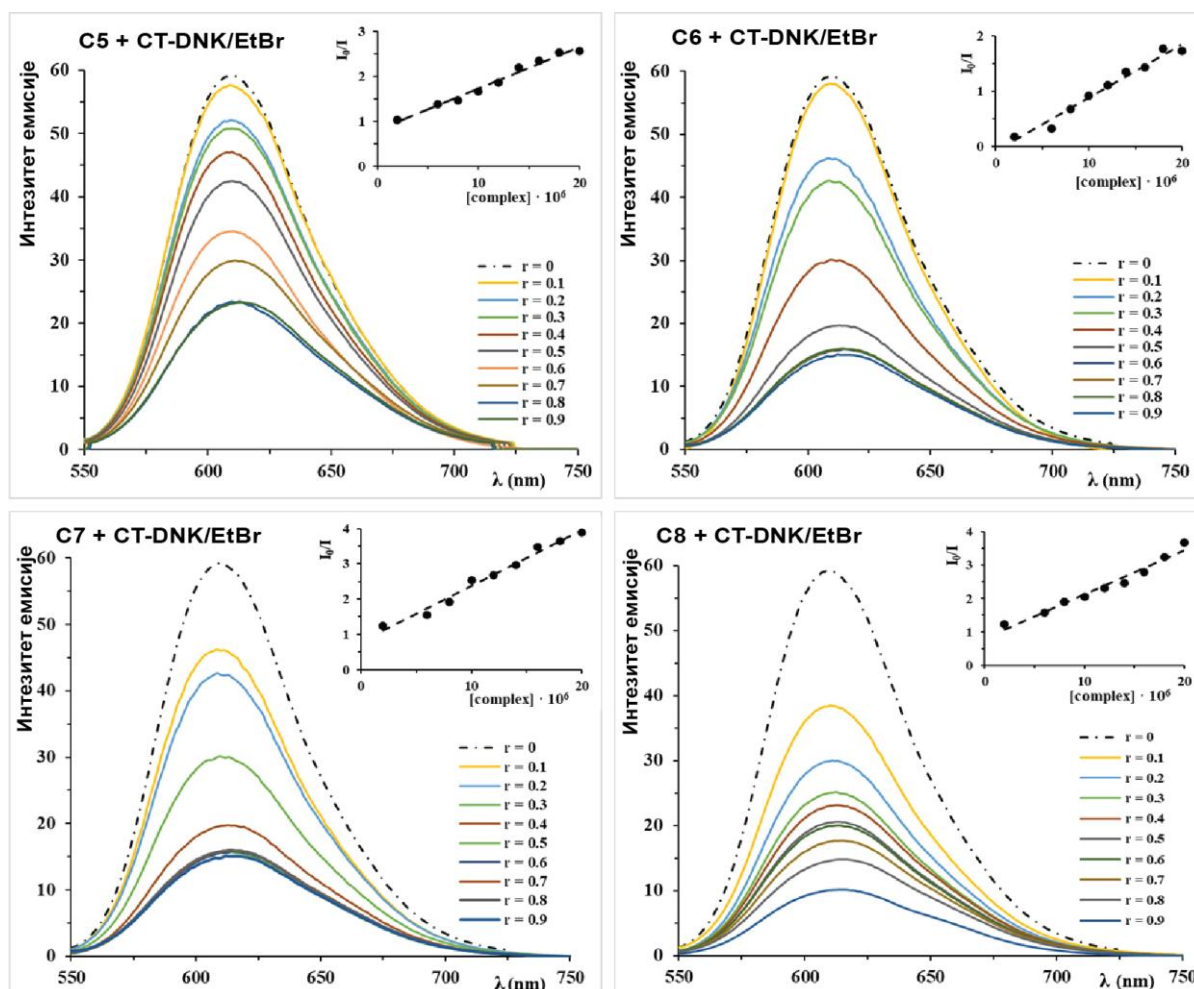
Графикон 7. Интензитет апсорпције за комплексе C5 – C8 на $\lambda = 260 \text{ nm}$ у односу на r ($r = [\text{СТ-DНК}]/[\text{комплекс}]$) (у PBS-у, 10 mM, pH = 7.4, са 2.7 mM KCl и 137 mM NaCl). A: Апсорбанца.

Да би се упоредили афинитети везивања комплекса C5 – C8 за DNK, израчунате су константе везивања K_b и приказане у Табели 9. Уочава се да је комплекс C8 имао највећу вредност K_b ($4.43 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$), због присуства феназинског лиганда и планарности C8 комплекса. Различите вредности K_b указују на то да се комплекси C5 – C8 везују различитом јачином за СТ-DНК. Израчуната *Gibbs*–ова слободна енергија има негативне вредности, што указује на спонтаност интеракције СТ-DНК и испитиваних комплекса.

Табела 9. СТ-DНК константа везивања (K_b), *Gibbs*–ова слободна енергија (ΔG) и *Stern-Volmer*–ова константа (K_{sv}) комплекса C5 – C8.

Комплекс	K_b (1/M)	ΔG (kJ/mol)	K_{sv} (1/M)
C5	2.15×10^4	-25.71	5.02×10^5
C6	4.23×10^3	-21.52	9.66×10^4
C7	1.88×10^3	-19.43	7.89×10^4
C8	4.43×10^4	-27.57	8.62×10^5

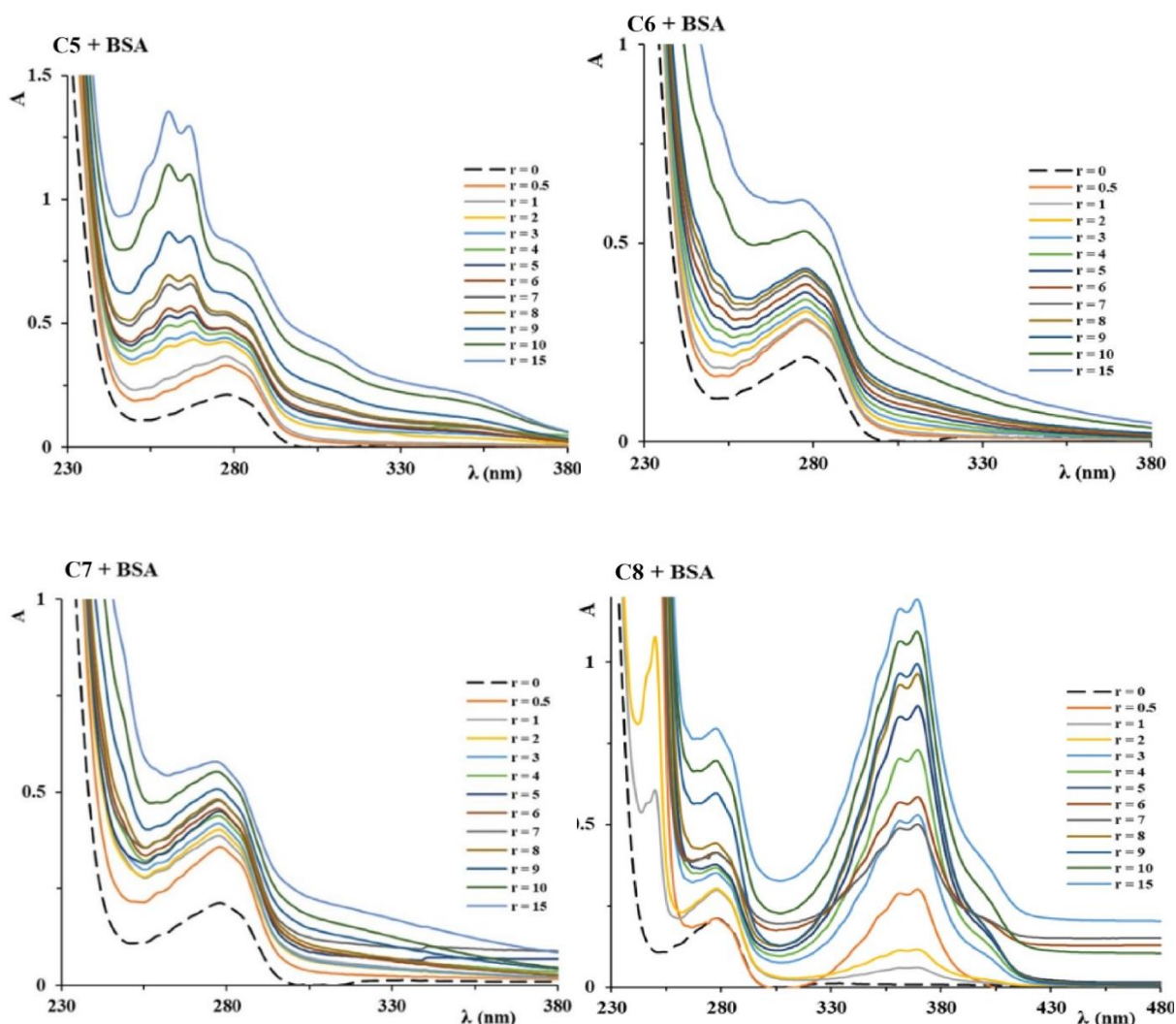
Емисиона флуоресцентна спектроскопија је додатно коришћена метода за испитивање интеракција комплекса C5 – C8 са CT-DNK. EtBr је коришћен као класични интеркалатор. Показано је да, након додавања растућих концентрација комплекса C5 – C8, интензитет емисије на 612 nm опада. Ово смањење емисије последица је измештања EtBr из CT-DNK/EtBr адукта и везивања испитиваних комплекса (Графикон 8). Вредности динамичке константе гашења флуоресценције K_{sv} , су приказане у Табели 9. Највећу вредност K_{sv} има комплекс C8, а затим $C5 > C6 > C7$. Ови резултати даље потврђују да феназински лиганд у комплексу C8 интеркалира са DNK због присуства три прстена.



Графикон 8. Емисиони спектри CT-DNK/EtBr у присуству комплекса C5 – C8 (у PBS-у, 10 mM, pH = 7.4, 2.7 mM KCl и 137 mM NaCl). Дијаграм: I_0/I у односу на [комплекс]. [CT-DNK/EtBr] = 0–18 μ M.

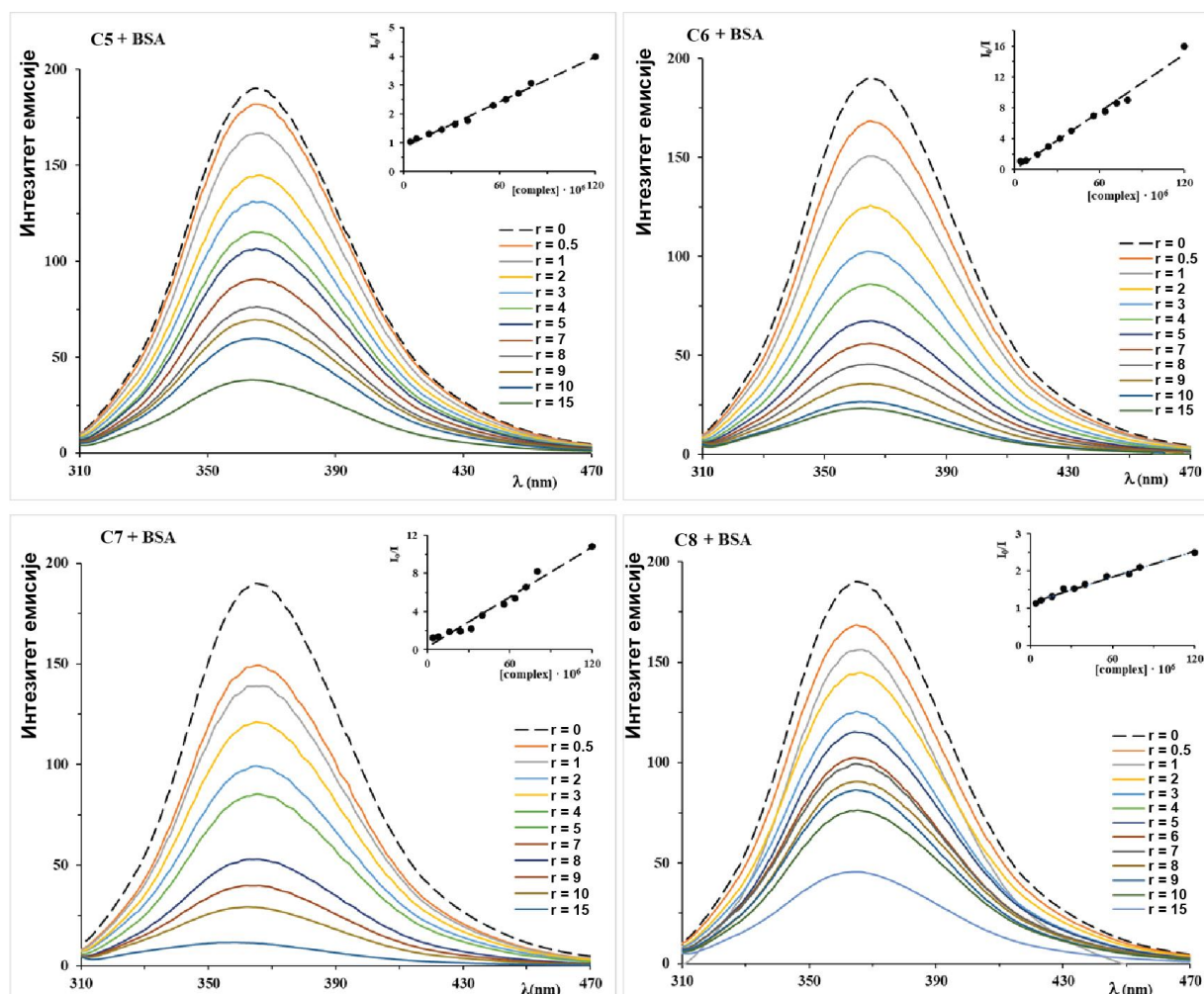
4.2.4. Интеракција комплекса C5 – C8 са молекулом BSA

Интеракција комплекса C5 – C8 са молекулом BSA је испитана *UV-vis* спектрофотометријом, тако што су константној концентрацији раствора BSA (8 μM) додаване растуће концентрације комплекса (0 - 120 μM) (Графикон 9). На основу снимљених спектра може се закључити да нема хипсохромног или батохромног померања апсорпционих максимума на 280 nm, али да постоји хиперхромно померање максимума апсорпције на 280 nm. Овај резултат указује на структурне промене молекула BSA, настале као последица нековалентних интеракција, као што су електростатичке везе, између молекула BSA и испитиваних комплекса.



Графикон 9. *UV-vis* апсорпциони спектри BSA у присуству растућих концентрација C5 – C8 (у PBS-у, 10 mM, pH = 7.4, са 2.7 mM KCl и 137 mM NaCl). [BSA] = 8 μM , [C5 – C8] = 0 – 120 μM . A: Апсорбанца.

Резултати мерења флуоресценције раствора BSA методом емисионе спектроскопије су показали смањење флуоресценције на 365 nm, након додавања комплекса C5 – C8, што се може приписати промени структуре протеина као последице везивања испитиваних комплекса. Резултати флуоресцентних мерења су приказани на Графикону 10.



Графикон 10. Флуоресцентни емисиони спектри BSA у присуству комплекса C5 – C6 (у PBS-у, 10 mM, pH = 7.4, са 2.7 mM KCl и 137 mM NaCl). [BSA] = 8 μM, [C5 – C8] = 0 – 120 μM. Дијаграм: I₀/I у односу на комплекс. A: Апсорбанца.

На основу линеарности *Stern–Volmer*-ових графика, може се закључити да испитивани комплекси индукују гашење флуоресценције триптофана молекула BSA. У Табели 10 приказане су вредности динамичке *Stern-Volmer*-ове константе (K_{sv}) и константе гашења флуоресценције (K_q) за интеракције комплекса са молекулом BSA, као и вредности константи везивања (K_a) и број везујућих места албумина (n) за испитиване комплексе (Табела 10). Вредност K_{sv} за комплекс C6 указује на већи афинитет везивања овог комплекса за молекул BSA.

Табела 10. Stern-Volmer-ова константа (K_{sv}), константа гашења флуоресценције (k_q), константа везивања (K_a) и број везујућих места (n) одређене за комплексе C5 – C8.

Комплекс	$K_{sv}(M^{-1})$	$k_q(M^{-1}s^{-1})$	$K_a(M^{-1})$	n
C5	2.56×10^4	2.56×10^{12}	2.46×10^5	1.2
C6	1.25×10^5	1.25×10^{13}	2.17×10^7	1.6
C7	8.73×10^4	8.73×10^{12}	1.27×10^6	1.3
C8	1.17×10^4	1.17×10^{12}	1.18×10^3	0.7

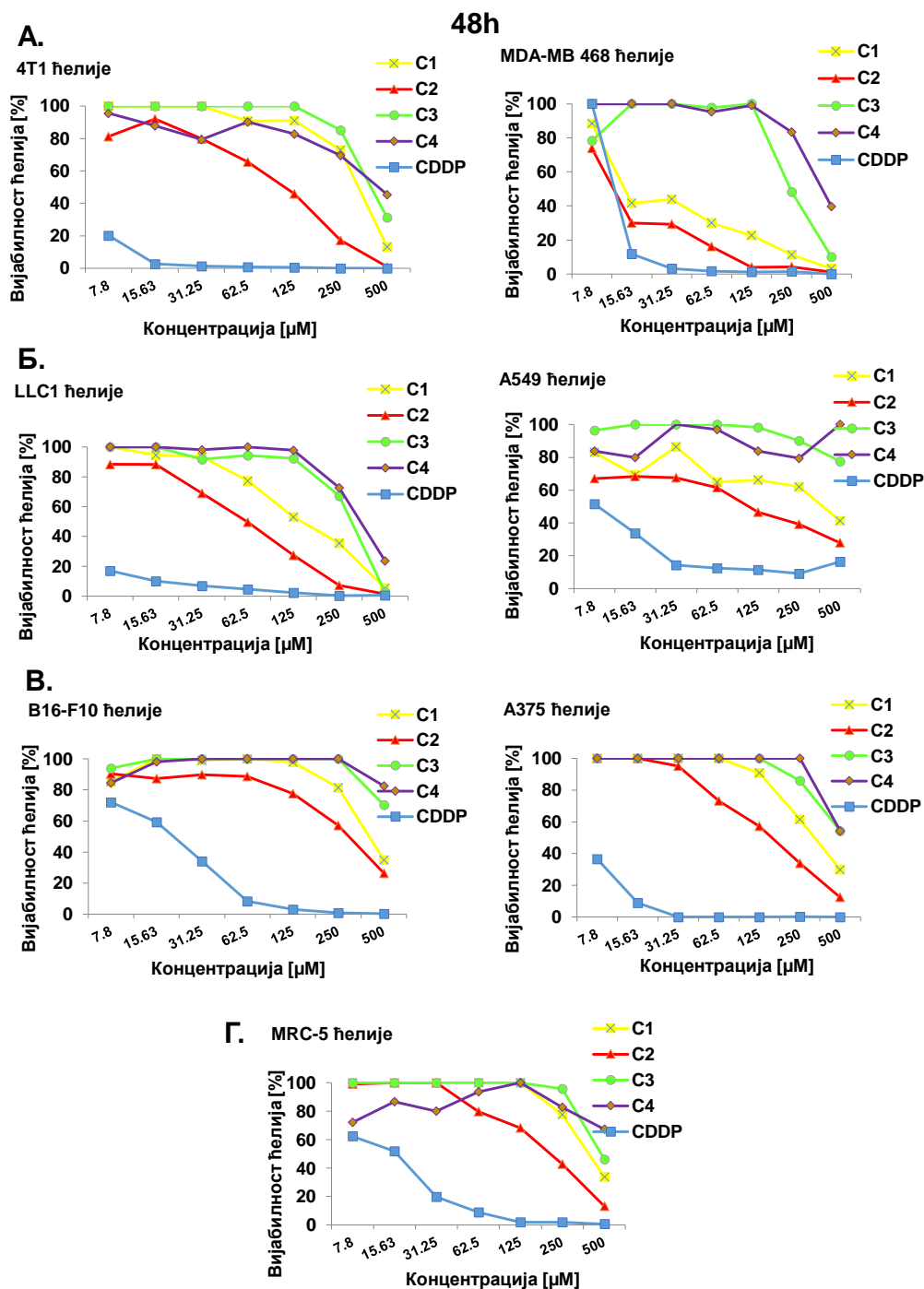
4. 3. Евалуација туморицидне активности комплекса C1 – C8 *in vitro*

У циљу испитивања потенцијалне биолошке активности синтетисаних комплекса Pt(II) (C1 – C4) и комплекса Pd(II) (C5 – C8), најпре је анализирана њихова антитуморска активност на неколико туморских линија мишјег (4T1, LLC1, B16F10) и хуманог (MDA-MB 468, A549, A375) порекла. Туморске ћелије су изложене двоструко растућим концентрацијама комплекса или цисплатине, као референтног цитостатика, у трајању од 48 h и 72 h, након чега је њихова вијабилност детектована МТТ тестом. Потенцијална селективност испитиваних једињења за туморске ћелије тестирана је на линији MRC-5 хуманих фибробласта. На основу добијених резултата израчунате су и IC_{50} вредности комплекса и упоређене са вредностима за цисплатину.

4.3.1. Анализа цитотоксичности комплекса C1 – C4

Након третирања ћелија испитиваним комплексима Pt(II) или цисплатином у трајању од 48 h, најпре је уочено да комплекс C2 показује дозно-зависан цитотоксички ефекат на ћелијама карцинома дојке миша (4T1) ($IC_{50} = 146.5 \pm 75.0 \mu M$), док су C1, C3 и C4 били цитотоксични за ове ћелије само при највишим концентрацијама (250 и 500 μM) (Графикон 11А, Табела 11). Нарочито је значајно је да су комплекси C1 ($IC_{50} = 16.3 \pm 18.8 \mu M$) и C2 ($IC_{50} = 15.9 \pm 0.8 \mu M$) показали изражен цитотоксички потенцијал на ћелијама хуманог карцинома дојке (MDA-MB 468), док је њихова туморицидна активност била слична ефекту цисплатине ($IC_{50} = 12.0 \pm 1.5 \mu M$) (Графикон 11А, Табела 11).

Цитотоксички потенцијал C3 и C4 на MDA-MB 468 ћелијама детектован је само при највишим концентрацијама (Графикон 11А, Табела 11). Цитотоксичка активност комплекса C1, а посебно комплекса C2 ($IC_{50} = 56.3 \pm 10.8 \mu M$), након 48 h третмана, такође је забележена на ћелијској линији карцинома плућа миша (LLC1), док су C3 и C4 били цитотоксични за ове ћелије само у највишим концентрацијама (Графикон 11Б, Табела 11). Са друге стране, тестирани комплекси нису значајно утицали на вијабилност ћелија хуманог карцинома плућа (A549) (Графикон 11Б, Табела 11), а показали су и слаб цитотоксички потенцијал на ћелијским линијама мишјег (B16F10) и хуманог (A375) меланома, који је детектован само при највишим концентрацијама (Графикон 11В, Табела 11).



Графикон 11. Дозно-зависна цитотоксичност комплекса C1 – C4 након 48 h третмана. Линеје туморских ћелија и то: мишје (4T1) и хумане (MDA-MB 468) ћелије карцинома дојке (А), мишје (LLC1) и хумане (A549) ћелије карцинома плућа (Б), мишје (B16-F10) и хумане (A375) ћелије меланома (В), као и хумани фибробласти (MRC-5) (Г) су третиране двоструко растућим концентрацијама комплекса C1 – C4 или цисплатине (CDDP) током 48 h. Вијабилност ћелија је одређена МТТ тестом. Подаци су представљени као средња вредност из три независна експеримента изведена у трипликату.

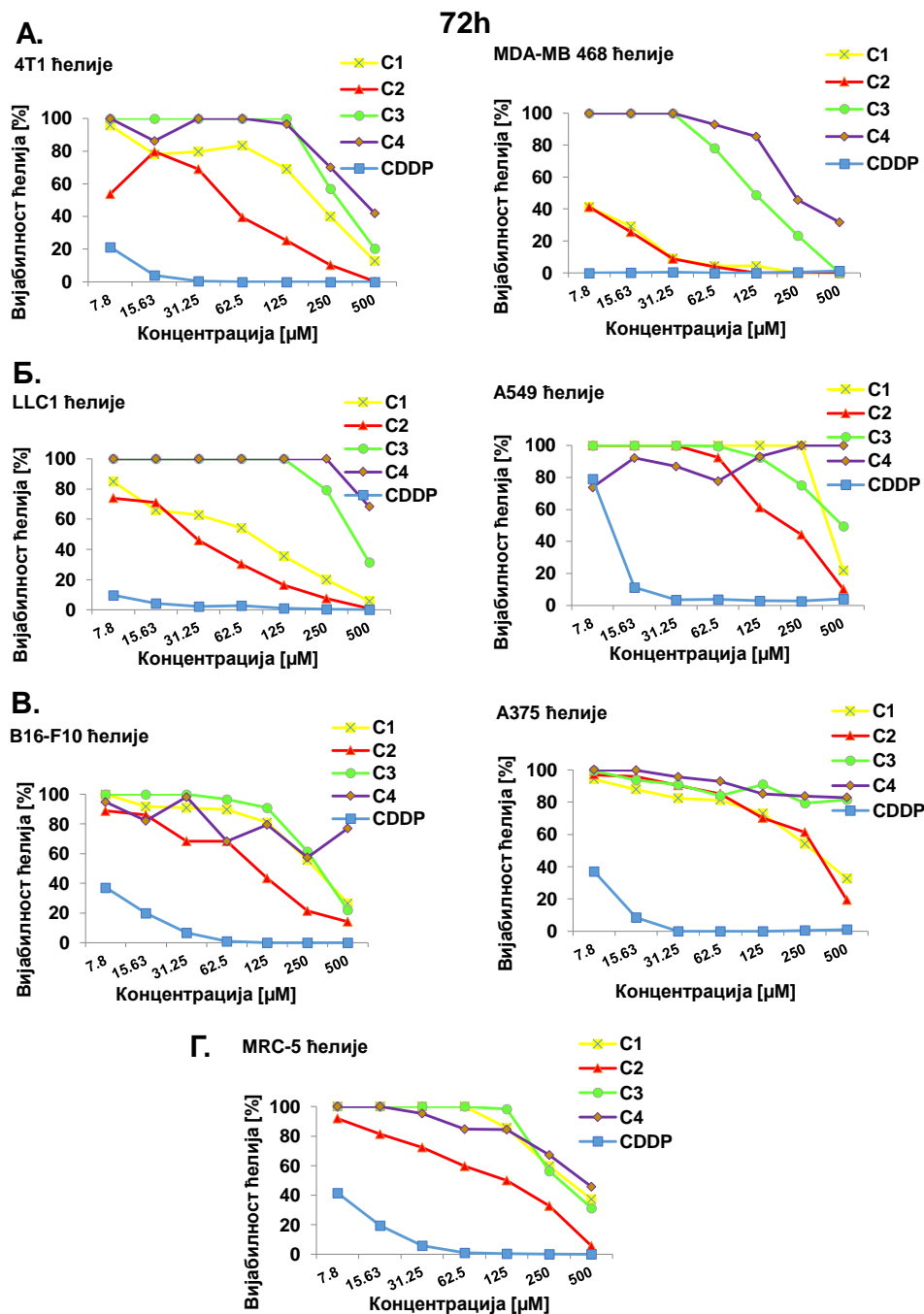
Додатно, потенцијална селективност комплекса C1 – C4 за туморске ћелије, испитана је анализом ефекта на вијабилност нетуморских ћелија линије хуманих фибробласта (MRC-5). Добијени подаци су показали да испитивани комплекси испољавају слабу селективност за туморске ћелије, иако показују мању токсичност у поређењу са цисплатином (Графикон 11Г, Табела 11).

Табела 11. IC₅₀ (µM) вредности C1 – C4 комплекса и цисплатине (CDDP) након 48 h третмана. Подаци су представљени као средња вредност ± SD из три независна експеримента изведена у трипликату.

IC ₅₀ вредности комплекса Pt(II) (µM) након 48 h третмана					
Ћелијска линија	C1	C2	C3	C4	CDDP
4T1	311.1±34.2	146.5±75.0	418.5±82.4	454.4±204.1	<7.8
MDA-MB 468	16.3±18.8	15.9±0.8	279.3±33.7	452.9±107.8	12.0±1.5
LLC1	174.5±47.0	56.3±10.8	268.2±83.0	360.2±147.4	<7.8
A549	427.6±230.6	172.3±78.7	>500	>500	7.1±1.5
B16-F10	396.6±187.5	287.6±141.9	>500	>500	18.1±3.8
A375	352.6±20.1	169.2±91.6	471.9±26.2	>500	<7.8
MRC-5	417.5±51.7	260.4±37.0	>500	>500	12.8±2.4

Сличан образац цитотоксичности комплекса C1 – C4 према испитиваним ћелијским линијама показан је и након 72 h експозиције. Уочено је значајно дозно-зависно смањење вијабилности 4T1 ћелија третираних комплексом C2 (IC₅₀ = 51.1±22.4 µM), али не и осталим тестираним комплексима (Графикон 12А, Табела 12). Такође, за разлику од комплекса C3 и C4 који су показали слаб туморицидни ефекат, C1 (IC₅₀ = 3.0±1.3 µM) и C2 (IC₅₀ = 4.0±2.1 µM) су били изразито цитотоксични за MDA-MB 468 ћелије након 72 h, што је кореспондирало са ефектом цисплатине (Графикон 12А, Табела 12). Затим, вијабилност LLC1 ћелија је дозно-зависно смањена након излагања комплексима C1 (IC₅₀ = 53.2±2.4 µM) и C2 (IC₅₀ = 30.2±21.6 µM), али не и комплексима C3 и C4 (Графикон 12Б, Табела 12).

Штавише, значајно ниже вредности IC₅₀ после 72 h, у поређењу са излагањем у трајању од 48 h, показују да додатно постоји и временски зависан ефекат комплекса, посебно C1 и C2, на вијабилност туморских ћелија. Насупрот томе, након 72 h третмана, тестирани комплекси су показали слаб цитотоксички потенцијал на А549 (Графикон 12Б, Табела 12), као и на В16F10 и А375 ћелијама (Графикон 12В, Табела 12), и то само у највишим концентрацијама. Алтернативно, резултати добијени МТТ тестом су кореспондирали са резултатима LDH теста показујући дозно-зависни цитотоксички ефекат испитиваних комплекса, а додатно су указали на присуство туморских ћелија у касној апоптози и потенцијално некрози. Поред тога, потврђена је мања цитотоксичност тестираних комплекса за нетуморске ћелије MRC-5 линије у поређењу са цисплатином, након 72 h експозиције (Графикон 12Г, Табела 12).



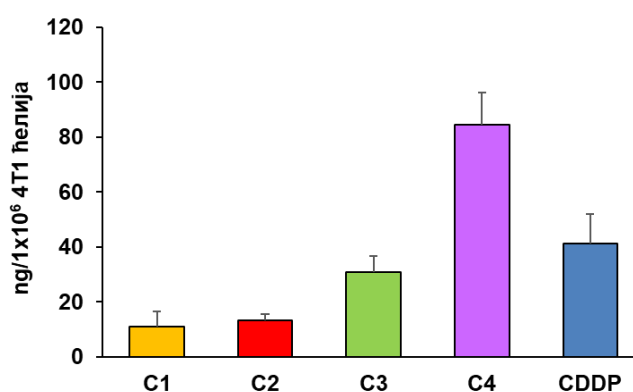
Графикон 12. Дозно-зависна цитотоксичност комплекса C1 – C4 након 72 h третмана. Линеје туморских ћелија и то: мишје (4T1) и хумане (MDA-MB 468) ћелије карцинома дојке (А), мишје (LLC1) и хумане (A549) ћелије карцинома плућа (Б), мишје (B16-F10) и хумане (A357) ћелије меланома (В), као и хумани фибробласти (MRC-5) (Г) су третирани двоструко растућим концентрацијама комплекса C1 – C4 или цисплатина (CDDP) током 72 h. Вијабилност ћелија је одређена МТТ тестом. Подаци су представљени као средња вредност из три независна експеримента изведена у трипликату.

Табела 12. IC₅₀ (μM) вредности комплекса C1 – C4 и цисплатине (CDDP) након 72 h третмана. Подаци су представљени као средња вредност ± SD из три независна експеримента изведена у трипликату.

IC ₅₀ вредности комплекса Pt(II) (μM) након 72 h третмана					
Ћелијска линија	C1	C2	C3	C4	CDDP
4T1	229.0±105.6	51.1±22.4	329.9±41.3	442.5±72.7	<7.8
MDA-MB 468	3.0±1.3	4.0±2.1	130.7±38.0	264.6±114.8	<7.8
LLC1	53.2±2.4	30.2±21.6	407.1±89.4	>500	<7.8
A549	326.4±157.7	233.9±79.4	>500	>500	<7.8
B16-F10	323.4±40.9	160.1±93.1	320.4±37.4	>500	<7.8
A375	327.0±48.7	296.6±86.4	>500	>500	<7.8
MRC-5	386.5±70.9	178.7±25.0	356.2±9.1	436.4±70.5	<7.8

4.3.1.1. Ћелијско преузимање комплекса C1 – C4

У циљу даље евалуације туморицидне активности тестираних комплекса, мерено је њихово преузимање у туморске ћелије и анализирана липофилност (одређена вредностима logP), као и растворљивост у води. Садржај Pt је квантификован у 4T1 ћелијама третираним комплексима C1 – C4 или цисплатином у концентрацији 30 μM током 12 h. Иако су показали већи цитотоксички ефекат, ниво акумулације Pt је био нижи у туморским ћелијама изложеним комплексима C1 и C2, док је највећи ћелијски унос детектован у ћелијама третираним комплексом C4 (Графикон 13).



Графикон 13. Ћелијско преузимање комплекса C1 – C4 (30 μM) и цисплатине (CDDP) (30 μM) у 4T1 ћелије након 12 h излагања. Подаци су представљени као средња вредност ± SD.

Негативне вредности $\log P$ за комплексе (Табела 13) указују на већи афинитет комплекса за водене него за липидне фазе. Међутим, не постоји веза између вредности $\log P$ и измерених вредности преузимања комплекса у ћелије. С друге стране, ћелијско преузимање комплекса је обрнуто пропорционално њиховој растворљивости у води (Табела 13). Очигледно је да мање растворљиви комплекси (попут комплекса C4) лакше продиру у ћелију.

Табела 13. Предвиђена липофилност ($\log P$) и растворљивост у води комплекса C1 – C4.

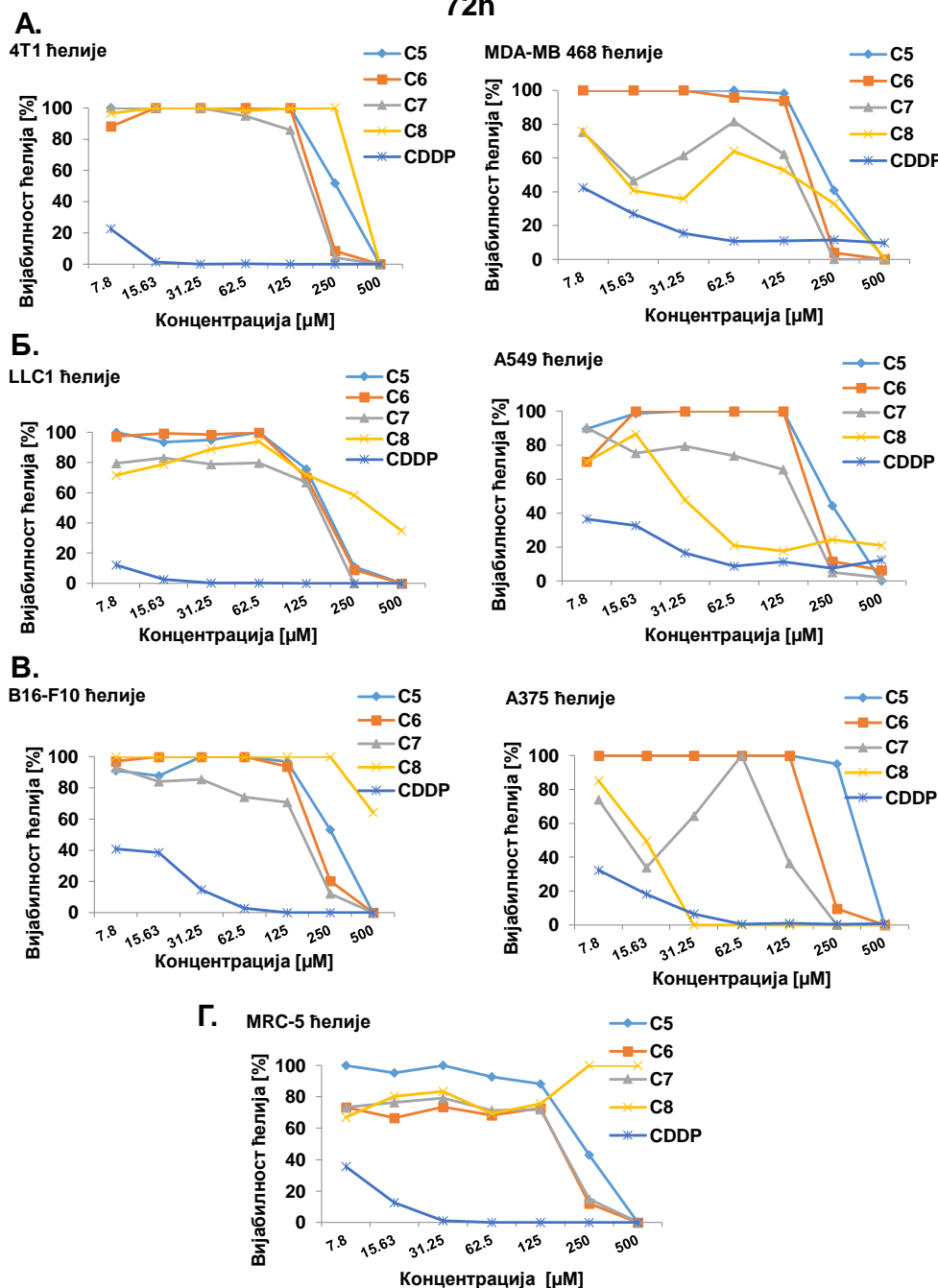
	C1	C2	C3	C4
Липофилност ($\log P$)*	-3.80	-3.29	-3.77	-2.71
Растворљивост у води (mol/l)	$1.55 \cdot 10^{-4}$	$1.04 \cdot 10^{-5}$	$8.83 \cdot 10^{-5}$	$8.09 \cdot 10^{-6}$

* Негативна вредност $\log P$ означава већи афинитет комплекса за водену фазу.

4.3.2. Анализа цитотоксичности комплекса C5 – C8

Туморицидни потенцијал динуклеарних комплекса Pd(II) (C5 – C8) анализиран је након 72 h експозиције туморских ћелија мишјег и хуманог порекла, двоструко растућим концентрацијама комплекса или цисплатине. На Графикону 14 се уочава да су комплекси C7 и C8 показали варијабилан цитотоксички ефекат, нарочито на туморским ћелијским линијама хуманог порекла, док су комплекси C5 и C6 показали туморицидна својства само при концентрацијама већим од 250 μM . Комплекс C7 је показао слаб до умерен цитотоксички потенцијал на свим тестираним ћелијским линијама, осим на 4T1 ћелијама мишјег карцинома дојке, где је његова ефикасност забележена само при највећим концентрацијама (Графикон 14, Табела 14). Најосетљивије на третман комплексом C7 су биле MDA-MB 468 ћелије хуманог карцинома дојке ($IC_{50} = 99.2 \pm 58.5 \mu\text{M}$) (Графикон 14А, Табела 14) и A375 ћелије хуманог меланома ($IC_{50} = 73.2 \pm 72.1 \mu\text{M}$) (Графикон 14В, Табела 14). Такође, ћелијске линије мишјег порекла (4T1, LLC1 и В6F10) су биле високо резистентне на дејство комплекса C8 при концентрацијама мањим од 500 μM (Графикон 14А, Б и В, Табела 14), док су MDA-MB 468 ($IC_{50} = 90.6 \pm 28.9 \mu\text{M}$) и A549 ($IC_{50} = 38.1 \pm 13.8 \mu\text{M}$) ћелије биле осетљивије на његово дејство (Графикон 14А и Б, Табела 14). Занимљиво је да су ћелије хуманог меланома (A375) биле веома осетљиве на третман комплексом C8 ($IC_{50} < 7.8 \mu\text{M}$), што је кореспондирало са ефектом цисплатине ($IC_{50} < 7.8 \mu\text{M}$) (Графикон 14В, Табела 14). Анализа цитотоксичног ефекта C5 – C8 комплекса на нетуморским MRC-5 ћелијама је открила да тестирани комплекси нису били високо селективни за туморске ћелије, али су показали мању токсичност од цисплатине (Графикон 14Г, Табела 14).

72h



Графикон 14. Дозно-зависна цитотоксичност комплекса C5 – C8 након 72 h третмана. Линије туморских ћелија, укључујући мишје (4T1) и хумане (MDA-MB 468) ћелије карцинома дојке (А), мишје (LLC1) и хумане (A549) ћелије карцинома плућа (Б), мишје (B16-F10) и хумане (A375) ћелије меланома (В), као и хумани фибробласти (MRC-5) (Г), третиране су двоструко растућим концентрацијама комплекса C5 – C8 или цисплатина (CDDP) током 72 h. Вијабилност ћелија је одређена MTT тестом. Подаци су представљени као средња вредност из три независна експеримента изведена у трипликату.

Табела 14. IC₅₀ (μM) вредности комплекса C5 – C8 и цисплатине (CDDP) након 72 h третмана. Подаци су представљени као средња вредност ± SD из три независна експеримента изведена у трипликату.

IC ₅₀ вредности комплекса Pd(II) (μM) након 72 h третмана					
Ћелијска линија	C5	C6	C7	C8	CDDP
4T1	267.9±12.0	215.7±31.4	219.8±20.6	>500	<7.8
MDA-MB 468	261.8±10.4	223.2±9.0	99.2±58.5	90.6±29.0	<7.8
LLC1	211.9±32.2	214.2±8.7	167.2±36.0	361.5±62.1	<7.8
A549	254.5±22.8	229.0±23.8	177.3±11.9	38.1±13.8	<7.8
B16F10	257.5±21.7	223.5±42.6	186.3±3.5	>500	7.8±6.5
A375	319.1±25.1	234.2±11.0	73.2±72.1	<7.8	<7.8
MRC-5	253.3±30.6	160.6±10.3	180.3±22.5	443.8±82.6	<7.8

4.4. Евалуација антимикуробне активности комплекса C1 – C8

У циљу даљег испитивања потенцијалних билошких ефеката комплекса Pt(II) (C1 – C4) и комплекса Pd(II) (C5 – C8), тестирана је њихова антимикуробна активност на различитим врстама *Gram*-позитивних и *Gram*-негативних бактерија, као и квасница. Антимикуробни ефекат тестираних комплекса анализиран је одређивањем вредности MIC, MBC односно MFC. За све врсте бактерија и гљивица су претходно одређене MIC, MBC и MFC за антимикуробне лекове који се користе у терапији, како би се упоређивањем са стандардима прописаним од стране EUCAST-а, потврдило да је осетљивост испитиваних сојева у границама референтних вредности (Табела 15).

Табела 15. МИС, МВС и МФС вредности за антимикробне лекове који се користе у терапији.

Тестирани сојеви	Антимикробни агенс (МИС, МВС и МФС вредности (µg/ml))					
	Ванкомицин		Цефтриаксон		Пиперацилин-тазобактам	
	МИС	МВС	МИС	МВС	МИС	МВС
<i>S. aureus</i>	0.49	0.98	1.95	3.91	-	-
<i>S. epidermidis</i>	0.25	0.25	0.98	3.91	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	0.98	0.98	15.63	15.63	-	-
<i>R. equi</i>	0.06	0.98	1.95	3.91	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	0.12	0.12	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i>	0.25	0.25	0.06	0.06		
<i>E. faecalis</i>	0.98	0.98	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	0.25	0.98	31.25	31.25	-	-
<i>B. subtilis</i>	0.25	0.98	31.25	31.25	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	0.06	0.98	2	2
<i>P. mirabilis</i>	-	-	0.125	0.98	2	2
	Флуконазол					
	МИС	МФС				
<i>C. albicans</i>	0.25	0.25	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	0.06	0.06	-	-	-	-

S. aureus: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *S. epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; *S. saprophyticus*: *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305; *R. equi*: *Rhodococcus equi* ATCC 6939; *L. monocytogenes*: *Listeria monocytogenes* ATCC 19112; *S. pneumoniae*: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619; *E. faecalis*: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *B. cereus*: *Bacillus cereus* ATCC 11778; *B. subtilis*: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *E. coli*: *Escherichia coli* ATCC 25922; *P. mirabilis*: *Proteus mirabilis* ATCC 25933; *Candida albicans* ATCC 10231; *S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. МИС: енгл. *Minimal Inhibitory Concentration*, минимална инхибиторна концентрација; МВС: енгл. *Minimal Bactericidal Concentration*, минимална бактерицидна концентрација; МФС: енгл. *Minimal Fungicidal Concentration*, минимална фунгицидна концентрација.

4.4.1. Антимикробна активност комплекса С1 – С4

Антимикробни ефекат комплекса С1 – С4 је испитан на референтним сојевима *Gram*-позитивних бактерија *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Rhodococcus equi*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*, *Gram*-негативних бактерија *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis*, као и квасница *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae* и приказан је у Табели 16. Испитивани комплекси С1 – С4 у целини су показали слабу до умерену антимикробну активност, која се разликовала у зависности од испитиваног соја бактерија, док се ниједан комплекс није посебно издвојио по својој антимикробној активности. Најосетљивије бактерије на сва четири комплекса су биле *Rhodococcus equi* и *Streptococcus pneumoniae* (МИС = 7.81-31.25 µg/ml, МВС = 7.81-62.5 µg/ml). Интересантно је да су МИС вредности за сва четири комплекса за бактерије *Listeria monocytogenes* и *Enterococcus faecalis* биле у рангу од 7.81 µg/ml до 125 µg/ml,

док су вредности МВС биле значајно веће (250 µg/ml до 1000 µg/ml). Комплекси С2, С3 и С4 су показали солидну антимикуробну активност на *Staphylococcus saprophyticus*, са вредностима МИС и МВС једнаким 15.63 µg/ml. Сојеви осталих *Gram*-позитивних бактерија као што су *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*, као и *Gram*-негативних бактерија *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis*, су били слабо осетљиви на сва четири испитивана комплекса са вредностима МИС и МВС већим од 500 µg/ml, са изузетком комплекса С4 чије су вредности МИС и МВС за бактерију *Escherichia coli* биле 125 µg/ml. Такође, комплекси С1, С2 и С3 су имали значајан антигљивични ефекат на квасницу *Candida albicans* са вредностима МИС од 15.63 µg/ml до 31.25 µg/ml и МФС од 15.63 µg/ml до 62.5 µg/ml, док су на *Saccharomyces cerevisiae* имали слабији ефекат (вредности МИС и МФС су биле у рангу од 125 µg/ml до 250 µg/ml) (Табела 16). Додатно се уочава и значајно мања антимикуробна активност комплекса С1 – С4 у поређењу са позитивним контролама приказаним у Табели 15.

Табела 16. Антимикуробна активност комплекса С1 – С4.

Тестирани сојеви	Тестиране супстанце (МИС, МВС и МФС вредности (µg/ml))							
	С1		С2		С3		С4	
	МИС	МВС	МИС	МВС	МИС	МВС	МИС	МВС
<i>S. aureus</i>	500	500	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<i>S. epidermidis</i>	500	500	1000	1000	250	500	250	250
<i>S. saprophyticus</i>	125	125	15.63	15.63	15.63	15.63	15.63	15.63
<i>R. equi</i>	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	31.25
<i>L. monocytogenes</i>	31.25	250	7.81	250	31.25	500	125	1000
<i>E. faecalis</i>	15.63	250	32.5	250	32.5	500	32.5	500
<i>B. cereus</i>	500	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<i>B. subtilis</i>	500	1000	500	500	500	1000	500	500
<i>S. pneumoniae</i>	15.63	31.25	7.81	15.63	31.25	62.5	31.25	62.5
<i>E. coli</i>	1000	1000	1000	1000	500	500	500	500
<i>P. mirabilis</i>	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	МИС	МФС	МИС	МФС	МИС	МФС	МИС	МФС
<i>C. albicans</i>	15.63	62.5	15.63	15.63	31.25	62.5	1000	1000
<i>S. cerevisiae</i>	125	250	250	250	125	125	500	500

S. aureus: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *S. epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; *S. saprophyticus*: *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305; *R. equi*: *Rhodococcus equi* ATCC 6939; *L. monocytogenes*: *Listeria monocytogenes* ATCC 19112; *S. pneumoniae*: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619; *E. faecalis*: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *B. cereus*: *Bacillus cereus* ATCC 11778; *B. subtilis*: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *E. coli*: *Escherichia coli* ATCC 25922; *P. mirabilis*: *Proteus mirabilis* ATCC 25933; *C. albicans*: *Candida albicans* ATCC 10231; *S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. МИС: енгл. *Minimal Inhibitory Concentration*, минимална инхибиторна концентрација; МВС: енгл. *Minimal Bactericidal Concentration*, минимална бактерицидна концентрација; МФС: енгл. *Minimal Fungicidal Concentration*, минимална фунгицидна концентрација.

4.4.2. Антимикробна активност комплекса C5 – C8

Резултати *in vitro* анализе антибактеријске и антигљивичне активности C5 – C8 комплекса на референтним сојевима *Gram*-позитивних бактерија *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Rhodococcus equi*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*, *Gram*-негативних бактерија *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis*, као и квасница *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae*, су приказани у Табели 17.

Најосетљивија *Gram*-позитивна бактерија, на сва четири тестирана комплекса је била *Rhodococcus equi* са вредностима MIC = 15.63 µg/ml и MBC у распону од 15.63 до 125 µg/ml. Затим, постојала је јасна антимикробна активност C6, C7 и C8, али не и C5, против *Gram*-позитивних бактерија *Listeria monocytogenes* (MIC = 15.63-62.5 µg/ml, MBC = 31.25-62.5 µg/ml) и *Staphylococcus saprophyticus* (MIC = 62.5 µg/ml, MBC = 62.5 µg/ml). Такође, за разлику од других тестираних комплекса, чије су вредности MIC и MBC биле веће од 500 µg/ml, C8 је показао умерену антибактеријску активност на *Staphylococcus epidermidis* (MIC = 125 µg/ml, MBC = 125 µg/ml). Друге тестиране врсте, укључујући и *Gram*-негативне бактерије су биле резистентне на тестиране комплексе са вредностима MIC и MBC већим од 250 µg/ml.

Анализа антигљивичне активности тестираних комплекса је показала да је *Candida albicans* најосетљивија на комплекс C8 (MIC = 15.63 µg/ml, MFC = 15.63 µg/ml), а затим и C7 (MIC = 62.5 µg/ml, MFC = 62.5 µg/ml), док су C5 и C6 били мање активни (MIC = 125 µg/ml, MFC = 125 µg/ml). Насупрот томе, комплекси C5 – C8 су показали слаб антифунгални ефекат на квасницу *Saccharomyces cerevisiae* са вредностима MIC и MFC у распону од 250 до 500 µg/ml.

Све у свему, комплекси C5 – C8 су показали променљиву (слабу до умерену) антимикробну активност у зависности од врсте микроорганизама. Додатно, антимикробна активност тестираних комплекса је очигледно била мања у поређењу са позитивним контролама (Табела 15). Међу тестираним комплексима, C8 је показао највећу антимикробну активност према свим испитиваним микроорганизмима, са вредностима MIC у распону од 15.63 µg/ml до 250 µg/ml, изузев према бактерији *Proteus mirabilis* (MIC = 500 µg/ml) (Табела 17).

Табела 17. Антимикробна активност комплекса C5 – C8.

Тестирани сојеви	Тестиране супстанце (MIC, MBC и MFC вредности (µg/ml))							
	C5		C6		C7		C8	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i>	250	250	500	500	250	250	250	250
<i>S. epidermidis</i>	1000	1000	1000	1000	500	500	125	125
<i>S. saprophyticus</i>	250	250	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
<i>R. equi</i>	15.63	15.63	15.63	15.63	15.63	125	15.63	15.63
<i>L. monocytogenes</i>	500	500	15.63	31.25	62.5	62.5	31.25	62.5
<i>E. faecalis</i>	250	250	1000	1000	1000	1000	250	250
<i>B. cereus</i>	250	250	1000	1000	1000	1000	125	250
<i>B. subtilis</i>	500	500	1000	1000	1000	1000	250	250
<i>E. coli</i>	250	250	1000	1000	500	500	250	250
<i>P. mirabilis</i>	500	500	1000	1000	1000	1000	500	500
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. albicans</i>	125	125	125	125	62.5	62.5	15.63	15.63
<i>S. cerevisiae</i>	250	250	250	250	500	500	250	250

S. aureus: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *S. epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; *S. saprophyticus*: *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305; *R. equi*: *Rhodococcus equi* ATCC 6939; *L. monocytogenes*: *Listeria monocytogenes* ATCC 19112; *E. faecalis*: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *B. cereus*: *Bacillus cereus* ATCC 11778; *B. subtilis*: *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *E. coli*: *Escherichia coli* ATCC 25922; *P. mirabilis*: *Proteus mirabilis* ATCC 25933; *C. albicans*: *Candida albicans* ATCC 10231; *S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763; MIC: енгл. *Minimal Inhibitory Concentration*, минимална инхибиторна концентрација; MBC: енгл. *Minimal Bactericidal Concentration*, минимална бактерицидна концентрација; MFC: енгл. *Minimal Fungicidal Concentration*, минимална фунгицидна концентрација.

4.5. Евалуација механизма антитуморске активности комплекса C2 на ћелијама карцинома дојке *in vitro*

Анализом туморицидног потенцијала испитиваних динуклеарних комплекса Pt(II) и Pd(II), уочава се да комплекс C2 показује најинтензивнији дозно и временски зависан цитотоксички ефекат, нарочито на ћелијама хуманог (MDA-MB 468) и мишјег (4T1) карцинома дојке. Наредни циљ истраживања био је да се испитају потенцијални механизми антитуморске активности комплекса C2, односно његов утицај на тип ћелијске смрти и пролиферацију туморских ћелија.

4.5.1. Комплекс C2 индукује апоптозу ћелија карцинома дојке

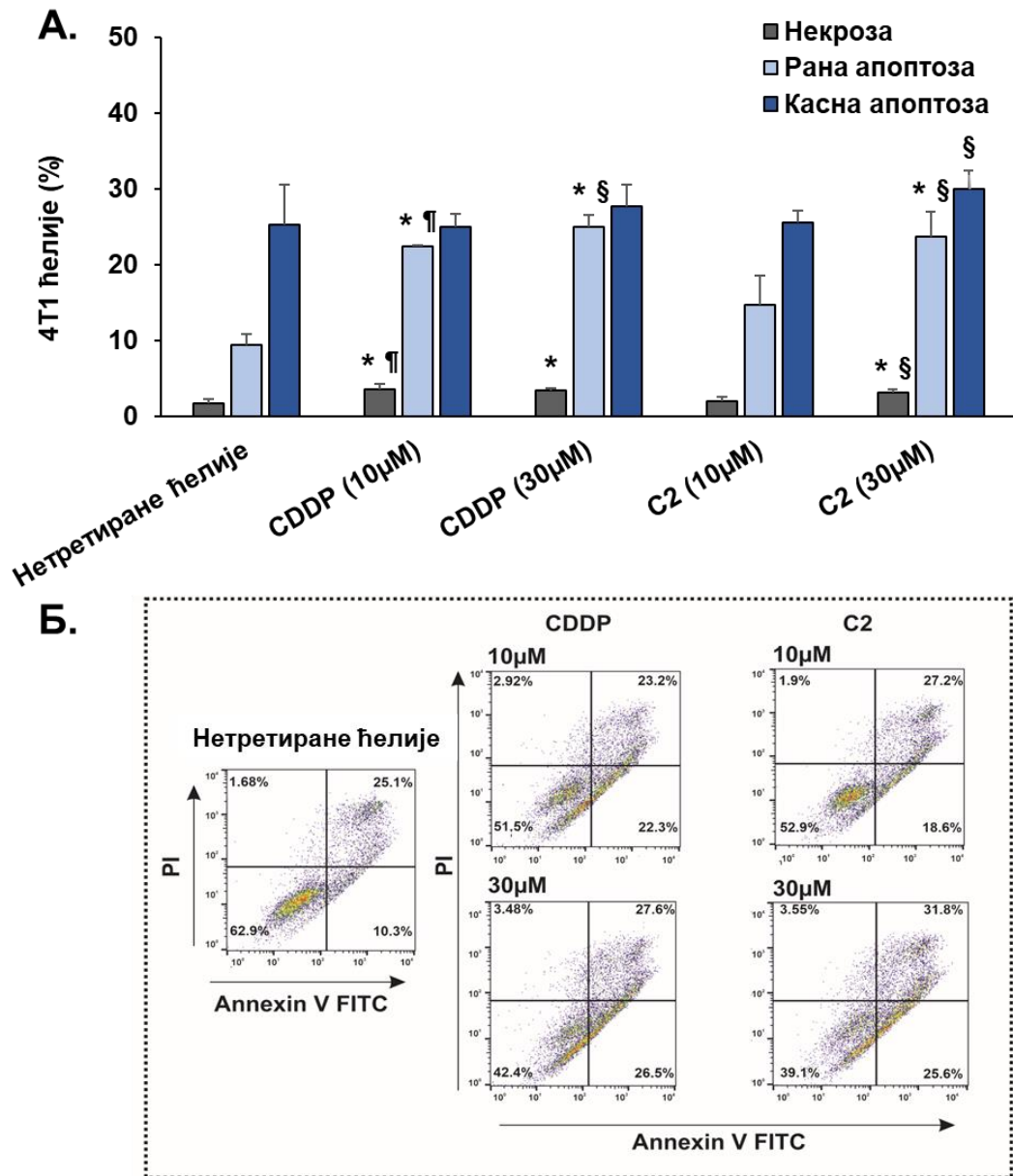
Да би се испитао потенцијални проапоптотски ефекат комплекса C2, ћелије карцинома дојке мишјег (4T1) и хуманог (MDA-MB 468) порекла су третиране комплексом C2 или цисплатином, у концентрацијама 10 µM и 30 µM, током 12 h, и обојене *Annexin*-ом V и PI за даљу анализу методом проточне цитометрије.

Добијени подаци су показали да и цисплатина (у концентрацијама 10 µM и 30 µM) и C2 (само при већој концентрацији, од 30 µM) покрећу апоптозу 4T1 ћелија, што показује

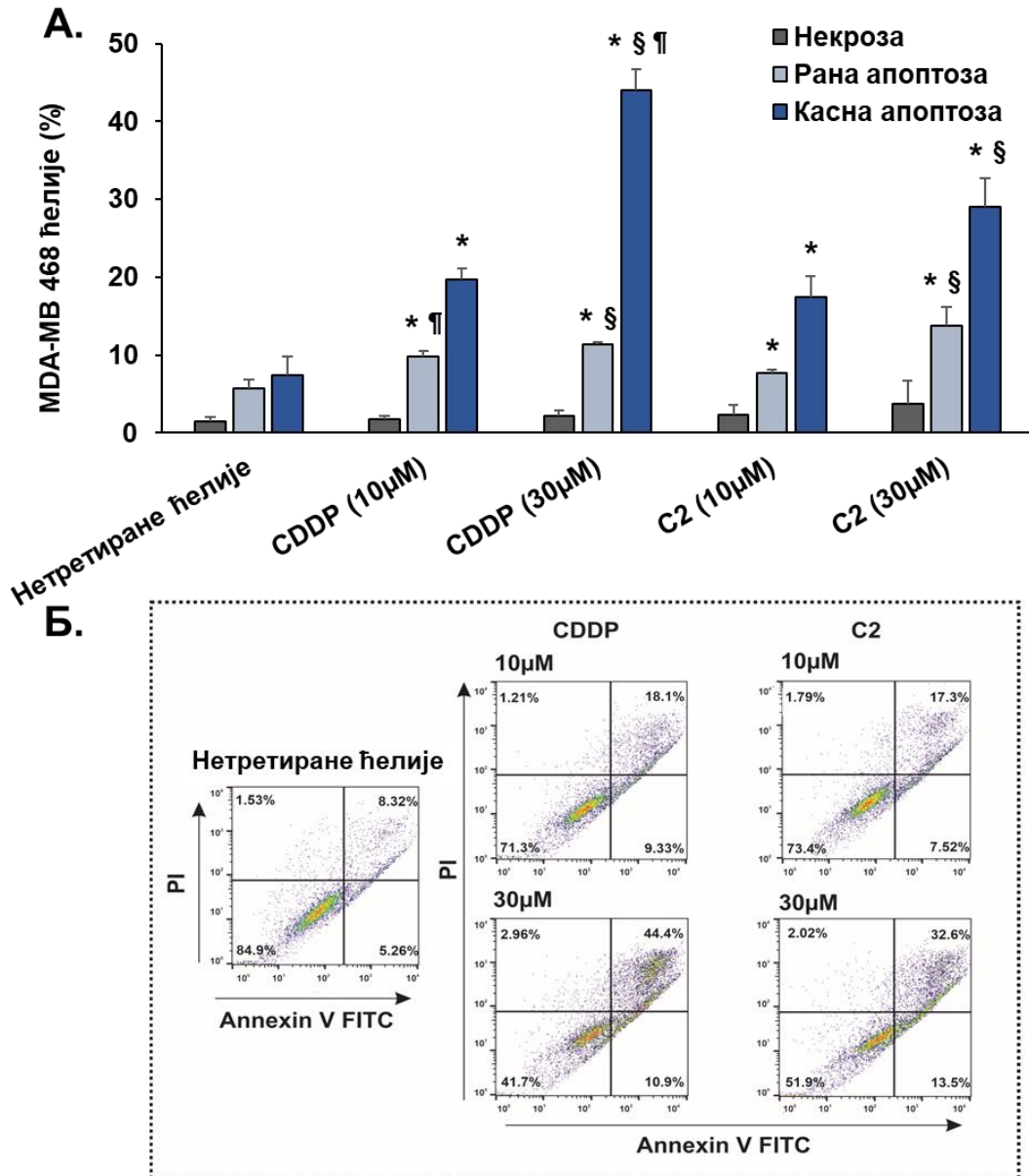
значајно повећан проценат раноапоптотичних (*Annexin V*⁺*PI*⁻), али не и касноапоптотичних (*Annexin V*⁺*PI*⁺) ћелија у поређењу са нетретираним ћелијама (Слика 14А). Додатно, проапоптотски ефекат комплекса С2 је потенцијално дозно-зависан, што произилази из налаза повећаног процента раноапоптотичних 4Т1 ћелија третираних већом концентрацијом, у поређењу са ћелијама третираним мањом концентрацијом комплекса С2 или цисплатине (Слика 14А). Насупрот томе, детектован је мали проценат некротичних *Annexin V*⁺*PI*⁺ 4Т1 ћелија, третираних цисплатином у обе тестиране концентрације или комплексом С2 у већој тестираној концентрацији (Слика 14А). Даље се уочава да је цисплатина, у мањој дози од 10 μM , била ефикаснија у индукцији и апоптозе и некрозе 4Т1 ћелија, што показује повећан проценат раноапоптотичних и некротичних ћелија, у поређењу са ћелијама изложеним истој концентрацији комплекса С2. Међутим, када се примене у већој дози, комплекс С2 и цисплатина су показали сличне ефекте на индукцију апоптозе и некрозе 4Т1 ћелија (Слика 14А). Проенти вијабилних, раноапоптотичних, касноапоптотичних и некротичних 4Т1 ћелија, након експозиције комплексу С2 или цисплатини, документовани су репрезентативним *dot plot*-овима приказаним на Слици 14Б.

Даљим испитивањем проапоптотског ефекта комплекса С2 уочено је значајно дозно-зависно повећање процента раноапоптотичних (*Annexin V*⁺*PI*⁻) и касноапоптотичних (*Annexin V*⁺*PI*⁺) MDA-MB 468 ћелија након третмана испитиваним комплексом или цисплатином (Слика 15А).

Иако је цисплатина показала бољи ефекат на индукцију апоптозе MDA-MB 468 ћелија, што показују повећани проценти раноапоптотичних ћелија (при дози од 10 μM) и касноапоптотичних ћелија (у дози од 30 μM) (Слика 15А), може се рећи да су добијени резултати су у складу са значајном осетљивошћу MDA-MB 468 ћелија на третман комплексом С2 утврђеном тестовима цитотоксичности. За разлику од 4Т1 ћелија, чини се да ни комплекс С2 ни цисплатина нису утицали на некрозу MDA-MB 468 ћелија (Слика 15А). Другим речима, може се закључити да се цитотоксични ефекат комплекса С2 на ћелијама карцинома дојке, слично цисплатини, углавном ослања на дозно-зависну индукцију апоптозе. Проенти вијабилних, раноапоптотичних, касноапоптотичних и некротичних MDA-MB 468 ћелија, након експозиције комплексу С2 или цисплатини, документовани су репрезентативним *dot plot*-овима приказаним на Слици 15Б.



Слика 14. Ефекат комплекса C2 на апоптозу 4Т1 ћелија. А. 4Т1 ћелије мишјег карцинома дојке су изложене цисплатини (CDDP) или комплексу C2 у концентрацијама од 10 μM и 30 μM током 12 сати, а затим обојене FITC обележеним *Annexin*-ом V и пропидијум јодидом (PI) и анализирани методом проточном цитометрије. Подаци су представљени као средња вредност \pm SD. * $p < 0,05$ у поређењу са нетретираним ћелијама; $^{\S}p < 0,05$ већа (30 μM) у поређењу са мањом (10 μM) концентрацијом CDDP или C2; $^{\parallel}p < 0,05$ CDDP у поређењу са C2 у истој концентрацији (10 или 30 μM). Б. Репрезентативним *dot plot*-овима приказани су проценти вијабилних (*Annexin V*-PI⁻), раноапоптоличких (*Annexin V*⁺PI⁻), касноапоптоличких (*Annexin V*⁺PI⁺) и некротичних (*Annexin V*-PI⁺) 4Т1 ћелија након третмана комплексом C2 или CDDP.

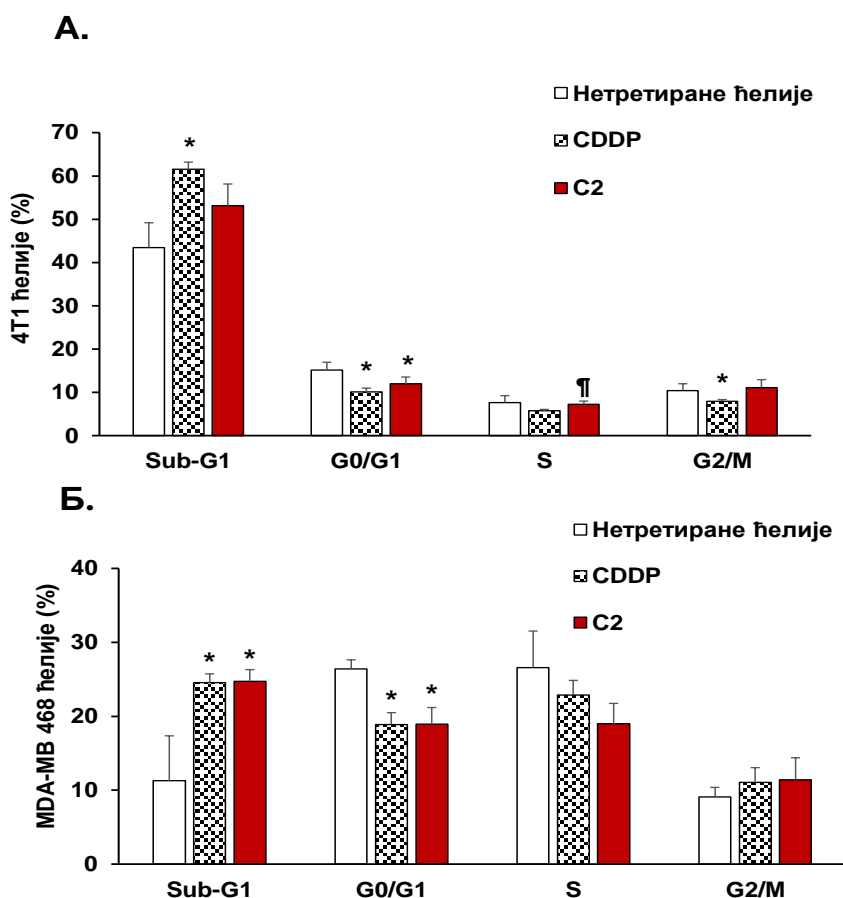


Слика 15. Ефекат комплекса C2 на апоптозу MDA-MB 468 ћелија. Ћелије хуманог карцинома дојке су изложене цисплатини (CDDP) или комплексу C2 у концентрацијама од 10 μM и 30 μM током 12 сати, а затим обојене FITC обележеним *Annexin*-ом V и пропидијум јодидом (PI) и анализирани методом проточном цитометрије. Подаци су представљени као средња вредност \pm SD. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама; § $p < 0.05$ већа (30 μM) у поређењу са мањом (10 μM) концентрацијом CDDP или C2; ¶ $p < 0.05$ CDDP у поређењу са C2 у истој концентрацији (10 или 30 μM). **B.** Репрезентативним *dot plot*-овима приказани су проценти вијабилних (*Annexin V*⁻PI⁻), раноапоптотичних (*Annexin V*⁺PI⁻), касноапоптотичних (*Annexin V*⁺PI⁺) и некротичних (*Annexin V*⁻PI⁺) MDA-MB 468 ћелија након третмана комплексом C2 или CDDP.

4.5.2. Комплекс C2 утиче на акумулацију ћелија карцинома дојке у суб-G1 фази ћелијског циклуса

Ефекат комплекса C2 на прогресију ћелијског циклуса туморских ћелија испитан је након експозиције 4T1 и MDA-MB 468 ћелија комплексу C2 или цисплатини у концентрацији 30 μ M током 12 h, и анализиран методом проточне цитометрије. Као што је приказано на Графикону 15А, чини се да C2, слично цисплатини, индукује акумулацију 4T1 ћелија у суб-G1 фази, док је последично смањен проценат ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса.

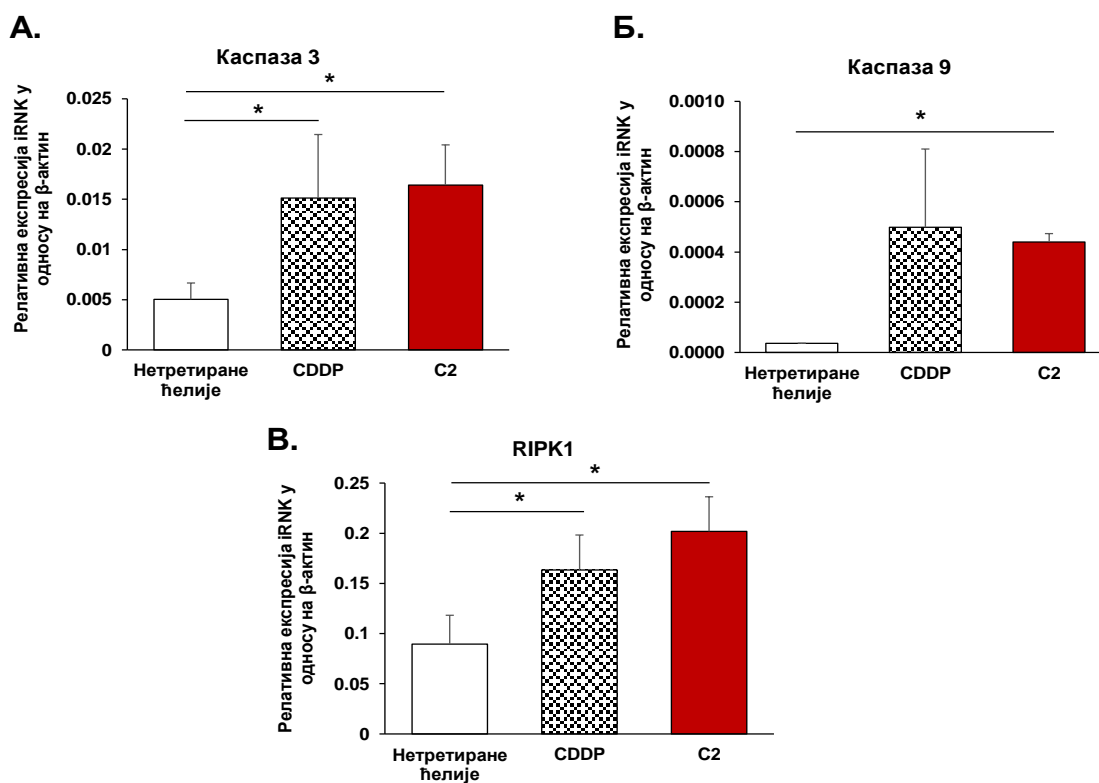
Слично, проценти MDA-MB 468 ћелија у суб-G1 фази су значајно повећани након 12 h третмана комплексом C2 или цисплатином, у поређењу са нетретираним ћелијама, док су проценти ћелија у G0/G1 фази сходно томе смањени (Графикон 15Б). Генерално се може рећи да је комплекс C2 подстакао акумулацију ћелија карцинома дојке у суб-G1 фази, што би могло додатно да указује на апоптозу ових ћелија.



Графикон 15. Ефекат комплекса C2 на прогресију ћелијског циклуса ћелија карцинома дојке. Ћелијски циклус 4T1 (А) и MDA-MB 468 (Б) ћелија, третираних комплексом C2 или цисплатином (CDDP) у концентрацији 30 μ M током 12 сати, анализиран је методом проточне цитометрије. На графиконима је приказан проценат туморских ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса. Подаци су представљени као средња вредност \pm SD. * $p < 0.05$ у поређењу са нетретираним ћелијама; † $p < 0.05$ C2 у поређењу са CDDP.

4.5.3. Комплекс C2 покреће унутрашњи пут апоптозе и потенцијално некроптозу ћелија мишићег карцинома дојке

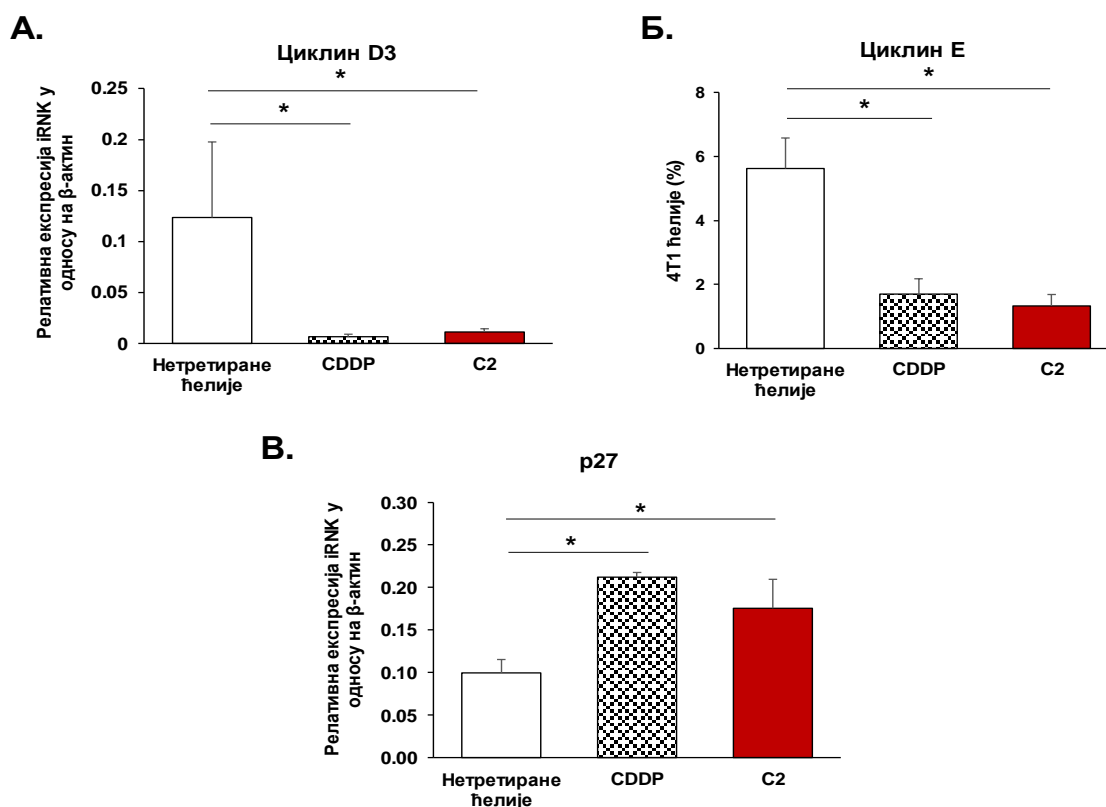
У даљем истраживању, испитан је ефекат комплекса C2 на експресију различитих молекула укључених у апоптозу и потенцијално друге видове ћелијске смрти 4T1 ћелија. Тако је qRT-PCR методом је анализирана експресија гена за каспазу 3, каспазу 9 и RIPK1. Описани ефекат C2 на индукцију апоптозе 4T1 ћелија је документован значајно већом експресијом iRNK за синтезу ефекторске каспазе 3 након третмана комплексом C2 или цисплатином, у односу на нетретиране ћелије (Графикон 16А). Даље, резултати су показали значајно повећање експресије iRNA за каспазу 9 у 4T1 ћелијама након излагања комплексу C2, у поређењу са нетретираним ћелијама, што указује на то да комплекс C2 индукује смрт ћелија карцинома дојке миша тако што покреће унутрашњи пут апоптозе (Графикон 16Б). Са друге стране, повећана експресија iRNA за RIPK1 након експозиције комплексу C2 или цисплатини, указује на то да тестирани комплекс може потенцијално додатно индуковати некроптозу 4T1 ћелија (Графикон 16В).



Графикон 16. Ефекат комплекса C2 на експресију гена за каспазу 3, каспазу 9 и RIPK1 у 4T1 ћелијама. Експресија iRNK за каспазу 3 (А), iRNK за каспазу 9 (Б) и iRNK за RIPK1 (В) у 4T1 ћелијама детектоване су qRT-PCR методом након 12 h експозиције комплексу C2 или цисплатини (CDDP) у концентрацији 30 μM. Подаци су представљени као средња вредност ± SD. *p<0.05.

4.5.4. Комплекс C2 утиче на експресију регулатора ћелијског циклуса туморских ћелија

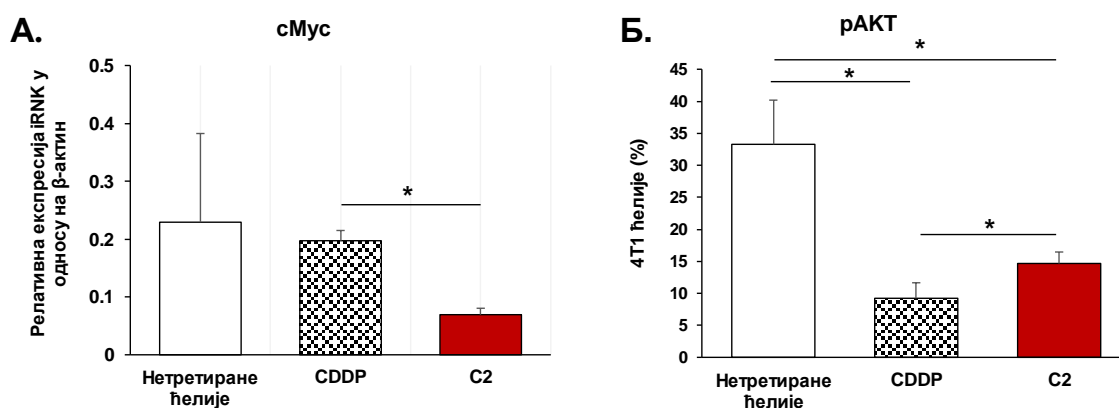
Поред индукције апоптозе, следећи циљ студије је био да се испита ефекат комплекса C2 на пролиферацију ћелија карцинома дојке анализом експресије регулатора ћелијског циклуса. Након излагања 4T1 ћелија комплексу C2 или цисплатини у трајању од 12 h, уочена је значајно смањена експресија iRNK за синтезу циклина D3, као и редукован проценат циклин Е позитивних ћелија, у поређењу са нетретираним ћелијама (Графикон 17А и Б). Истовремено, и комплекс C2 и цисплатина су значајно повећали експресију гена за инхибитор циклин-зависних киназа p27, што указује на важан инхибиторни ефекат на пролиферацију 4T1 ћелија (Графикон 17В).



Графикон 17. Ефекат комплекса C2 на експресију регулатора ћелијског циклуса 4T1 ћелија. 4T1 ћелије су изложене комплексу C2 или цисплатини (CDDP) у концентрацији од 30 μ M током 12 h. Експресија iRNA за синтезу циклина D3 (А), проценат циклин Е позитивних ћелија (Б) и iRNK за p27 (В) су детектовани методама qRT-PCR или проточном цитометријом. Подаци су представљени као средња вредност \pm SD. * $p < 0.05$.

4.5.5. Комплекс C2 смањује експресију онкогена с-Мус и рАКТ у ћелијама мишјег карцинома дојке

Дисрегулација онкогена с-Мус и протеин киназе АКТ, важних за регулацију раста, пролиферације и смрти ћелија, је веома честа у различитим туморима. Резултати испитивања ефекта потенцијалних механизма антитуморске активности комплекса C2 су показали да је испитивани комплекс значајно смањив експресију iRNK за с-Мус у 4T1 ћелијама, у поређењу са ћелијама које су третиране цисплатином (Графикон 18А). Осим тога, комплекс C2 је значајно редуковао проценат 4T1 ћелија које експримирају рАКТ, иако је тај ефекат био слабији од ефекта цисплатине (Графикон 18Б).

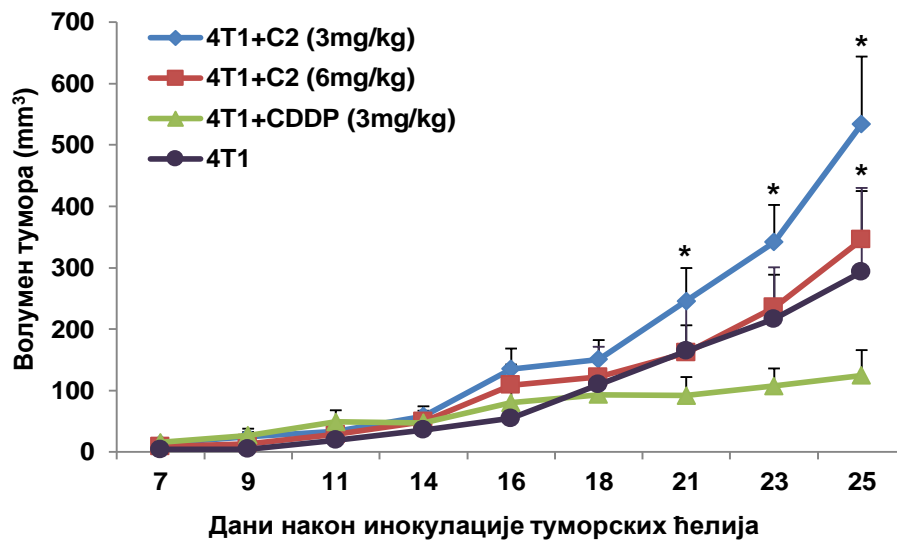


Графикон 18. Ефекат комплекса C2 на експресију онкогена с-Мус и рАКТ у 4T1 ћелијама. 4T1 ћелије су изложене комплексу C2 или цисплатини (CDDP) у концентрацији од 30 μ M током 12 h. **А.** Експресија iRNA за с-Мус детектована је qRT-PCR методом. **Б.** Процент 4T1 ћелија које експримирају фосфорилисану протеин киназу АКТ (рАКТ) детектован је методом проточне цитометрије. Подаци су представљени као средња вредност \pm SD. * $p < 0.05$.

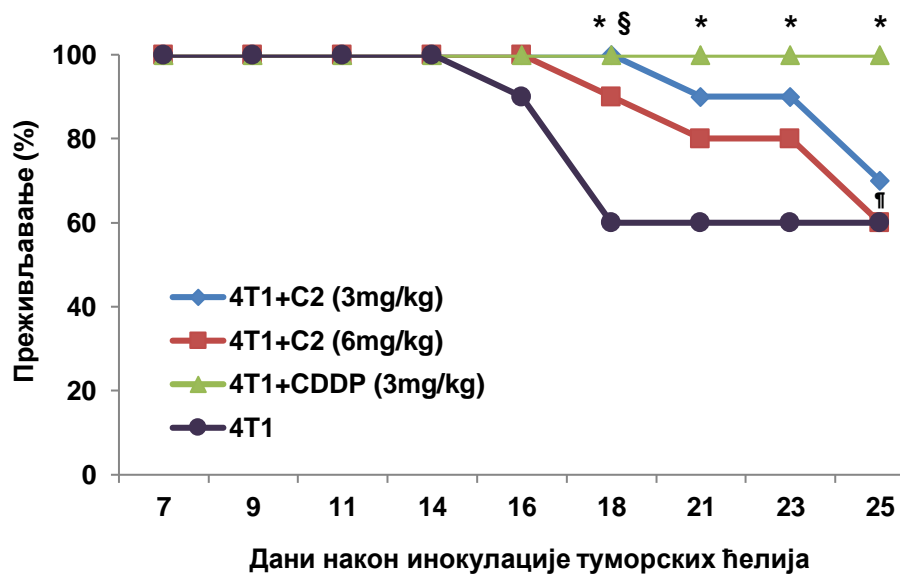
4.6. Анализа ефекта комплекса C2 на прогресију мишјег карцинома дојке *in vivo*

С обзиром на значајну туморицидну активност комплекса C2, детектовану на ћелијама карцинома дојке тестовима цитотоксичности *in vitro*, даље истраживање је било усмерено на испитивање ефеката C2 на прогресију мишјег карцинома дојке *in vivo*. Након имплантације 4T1 ћелија, ефекти комплекса C2 (3 mg/kg и 6 mg/kg) на раст карцинома дојке и преживљавање мишева су праћени до 25-ог дана експеримента, и упоређени са ефектом цисплатине (3 mg/kg), као и контролном групом мишева са тумором којима је апликован физиолошки раствор. Ефикасност цисплатине је документована трендом смањења запремине тумора, иако разлика није достигла статистичку значајност што је потенцијално последица значајно већег морталитета у контролној групи мишева са тумором (Графикон 19А и Б).

A.



Б.



Графикон 19. Ефекат комплекса С2 на прогресију мишјег карцинома дојке и преживљавање. Након појаве палпабилног тумора, 7 дана након имплантације 4Т1 ћелија, мишеви (n = 10 по групи) су третирани комплексом С2 (3 mg/kg и 6 mg/kg), цисплатином (CDDP) (3 mg/kg) или физиолошким раствором, сваког другог дана. **А.** Раст тумора је праћен до 25-тог дана од имплантације 4Т1 ћелија. Подаци су представљени као средња вредност ± SD. *p<0.05 у поређењу са величином тумора код мишева третираних CDDP. **Б.** Преживљавање мишева са тумором којима је апликован комплекс С2, цисплатина или физиолошки раствор. *p<0.05 група мишева третираних цисплатином у поређењу са контролном групом; §p<0.05 група мишева третираних комплексом С2 (3 mg/kg) у поређењу са контролном групом; †p<0.05 група мишева третираних комплексом С2 (6 mg/kg) поређењу са групом којој је апликована CDDP.

Изненађујуће је да третман комплексом С2 није утицао на раст тумора ни у једној од тестираних концентрација, што је било у супротности са цитотоксичким ефектом показаним *in vitro* (Графикон 19А). Штавише, мишеви којима је апликована мања доза комплекса С2 (3 mg/kg) су имали значајно веће запремине тумора у поређењу са мишевима третираним цисплатином почевши од 21-ог дана експеримента (Графикон 19А). Двадесет петог дана након инокулације туморских ћелија, уочена је значајно већа просечна запремина тумора код мишева третираних већом дозом комплекса С2 (6 mg/kg) у поређењу са мишевима којима је апликована цисплатина (Графикон 19А). Међутим, забележена је нешто већа стопа преживљавања мишева након третмана комплексом С2, 18-ог дана код мишева третираних мањом дозом комплекса С2 у поређењу са контролном групом мишева (Графикон 19Б). С друге стране, преживљавање мишева је било смањено код мишева третираних већом дозом комплекса С2 у поређењу са групом којој је апликована цисплатина, 25-ог дана након имплантације тумора (Графикон 19Б).

Генерално, цитотоксички ефекат комплекса С2 показан *in vitro* није кореспондирао са ефектом на прогресију мишјег карцинома дојке *in vivo*. Разлог за овакав резултат се вероватно бар делимично може објаснити хемијским карактеристикама испитиваног комплекса, његовим слабијим везивањем за биомолекуле, односно везивањем за нетранспортно место биомолекула, што следствено отежава његово допремање у туморско ткиво.

5. ДИСКУСИЈА

Због све већег пораста броја оболелих и умрлих од малигнух болести, приоритет у савременој медицини представља истраживање и откривање нових антитуморских лекова, а како су сами почети развоја антитуморске терапије везани управо за откриће туморицидне активности цисплатине, јасно је да је истраживање цитотоксичке активности хемијских модификација комплекса Pt, али и комплекса других прелазних метала, од великог значаја. Такође, пораст резистенције микроорганизама на антимикробне лекове, указао је на потребе за интензивним испитивањима нових антимикробних лекова. Због своје способности да граде комплексе са различитим једињењима са потенцијалним антитуморским дејством, модификације и испитивање биолошке активности једињења Pt(II) и Pd(II) су веома актуелни последњих деценија. У овој студији испитани су антитуморски и антимикробни ефекти динуклеарних комплекса Pt(II) са пиридазином као мостним лигандом и динуклеарних комплекса Pd(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима, на различитим линијама туморских ћелија мишијег и хуманог порекла, односно различитим сојевима *Gram*-позитивних и *Gram*-негативних бактерија, као и гљивица.

Примена лекова на бази Pt у лечењу тумора праћена је бројним нежељеним ефектима који укључују системску токсичност, малу селективност за туморске ћелије, као и развој резистенције (80, 210, 211). У циљу унапређења терапије малигнух болести и смањења нежељених ефеката конвенционалних хемиотерапеутика, много труда је уложено у дизајнирање нових једињења на бази Pt и тестирање њихове антитуморске активности. Бројни новосинтетисани и модификовани комплекси Pt показали су значајну туморицидну активност и испољили цитотоксички, антипролиферативни, проапоптотски и антиангиогени ефекат, уз потенцијално већу селективност за туморске ћелије (104, 212-217). Четири модификована динуклеарна комплекса Pt(II) са општом формулом $[\{Pt(L)Cl\}_2(\mu\text{-pydz})]Cl_2$, где је L диамински лиганд: 1,2-пропилендиамин (C1), изобутилендиамин (C2), 1,3-пропилендиамин (C3) или 1,3-пентандиамин (C4), синтетисано је у складу са претходним студијама (168, 169, 217-220). Поред поменутих комплекса Pt(II), синтетисана су и четири модификована динуклеарна комплекса Pd(II) са општом формулом $[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu\text{-L})](NO_3)_2$, где је L диазински лиганд и то: пирозин (C5), пиримидин (C6), пиридазин (C7) или феназин (C8) такође на основу претходних истраживања (171, 172, 214). Коришћењем различитих методолошких приступа потврђена је структура добијених једињења, а затим испитана њихова стабилност. Резултати *UV-vis* спектрофотометрије и 1H NMR спектроскопије су потврдили веома споро распадање комплекса C1 – C4 у периоду од 72 h, што имплицира њихову стабилност током испитивања.

5.1. Модели интеракције комплекса C1 – C8 са биомолекулима

Бројне студије су показале да је главна мета деловања цисплатине молекула DNK. Цисплатина ковалентним везивањем формира комплекс/DNK адукте и мењајући тако тродимензионалну структуру DNK, утиче на савијање и одмотавање двоструког хеликса. Последица тога је оштећење функције DNK, блокада репликације и транскрипције, и следствена смрт ћелије (221). Осим ковалентног везивања, комплекси прелазних метала могу да остварују и нековалентне интеракције са молекулом DNK и то путем везивања за жлеб DNK, интеркалације, као и формирањем водоничних или електростатичких веза

(222). Како ковалентне, тако и нековалентне интеракције утичу на промену структуре DNK хеликса.

Различитим методама најпре је испитана природа интеракција које комплекси C1 – C4 остварују са молекулом CT-DNK. На основу добијених вредности унутрашње константе везивања, K_b , у опсегу од $0.67 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ до $3.00 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, приказаних у Табели 7, може се рећи да начин интеракције комплекса C1 – C4 и CT-DNK хеликса није интеркалација, јер је модел везивања путем интеркалације праћен много већим вредностима K_b (223). Додатно, одсуство батохромног померања максимума апсорпције имплицира да се комплекси C1 – C4 не везују за CT-DNK хеликс ковалентним везама (224). Смањење интензитета флуоресценције раствора који садржи CT-DNK и EtBr као интеркалатор, а након додавања комплекса C1 – C4, може да укаже на компетицију за везивање за CT-DNK (225, 226). Међутим, релативно мало смањење интензитета флуоресценције говори у прилог томе да комплекси C1 – C4 нису добри интеркалатори (Графикон 5), што потврђују и израчунате вредности K_{sv} и константе стабилности K_a (Табела 7). Додатно, детекцијом релативно малог смањења вискозитета раствора CT-DNK након додавања растућих концентрација испитиваних комплекса потврђено је да модел интеракције није интеркалација (Графикон 4). Претходно је показано да динуклеарни комплекси Pt(II) везивањем за фосфатну кичму индукују савијање и кондензацију молекула DNK, што резултује смањењем вискозитета раствора (227). Генерално, резултати показују да комплекси C1 – C4 формирају слабе везе са молекулом CT-DNK, које највероватније одговарају електростатичким интеракцијама. Осим тога, сви испитивани комплекси Pt(II) имају приближно исти број места везивања (Табела 7), што имплицира да интеракцију са CT-DNA остварују на исти начин. Вредност K_a за комплекс C2 има најмању вредност у односу на остале комплексе, што вероватно одговара стеричном ефекту две метил групе у бидентатно координаном диаминском лиганду.

Природа интеракција комплекса C1 – C4 са молекулом DNK анализирана је и методом молекулског докинга. Комплекси C1 – C4 интерагују са DNK остварујући нековалентне интеракције, а најстабилнији начини везивања су везивање за жлеб (C1 и C2), затим везивање за фосфатну кичму (C3), као и везивање за велики жлеб DNK у региону богатом А-Т базама (C4) (Слика 12). Мало веће енергије везивања за фосфатну кичму су највероватније последица постојања водоничних веза између (Pt)-N-H и (Pt)-O-H група тестираних комплекса и кисеоника DNK ланца, које су ојачане електростатичким везама. Може се, такође, рећи да електростатичке везе настају између позитивно наелектрисаних комплекса и негативно наелектрисане фосфатне кичме DNK хеликса. Сличан модел нековалентних интеракција са молекулом DNK, који не подразумева интеркалацију, као ни везивање за велики жлеб, описан је за тринуклеарни комплекс Pt(II), означен као *TriplatinNC*, који је показао значајну антитуморску активност (114). Показано је да ове интеракције могу изазвати дисторзије хеликса и следствену инхибицију функције DNK (114, 228).

За разлику од комплекса C1 – C4, испитивање природе интеракције комплекса Pd(II) (C5 – C8) са молекулом CT-DNK је показало да се интензитет апсорпционих трака постепено повећавао за испитиване комплексе што указује на хиперхромизам. Овај феномен говори у прилог томе да сви испитивани динуклеарни комплекси Pd(II) интерагују са CT-DNK путем интеркалације (Графикон 7). Упоредивањем добијених вредности константи везивања, K_b , за комплексе C5 – C8 (Табела 9) са вредношћу K_b класичног интеркалатора EtBr, чија је вредност $1.23 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, може се рећи да се испитивани комплекси слабије

везују за СТ-DНК у односу на EtBr (229, 230). Захваљујући феназину као мостном лиганду, комплекс C8 има највећу вредност $K_b = 4.43 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Може се закључити да различите позиције N атома хетероцикличних пиридазинских комплекса утичу на природу интеракције комплекса са молекулом СТ-DНК. Осим тога, на основу података добијених емисионом флуоресцентном спектроскопијом и израчунатих вредности K_{sv} , чини се да комплекси C5 – C8 потенцијално могу да истисну EtBr са везујућег места на молекулу СТ-DНК, што додатно потврђује њихову способност интеркалације (231). Највећу вредност K_{sv} има комплекс C8, а затим редом следе C5, C6 и C7 (Табела 9). Ови резултати даље потврђују да феназин интеркалира са ДНК због присуства три прстена у комплексу C8.

Албумин је природни транспортни протеин који поседује више места која служе за везивање лиганата, како ковалентним тако и нековалентним интеракцијама (232). Осим тога, најзаступљенији је протеин са продуженим полуживотом у циркулацији, што га чини погодним за транспорт лекова у организму (232). Структура молекула HSA је веома флексибилна и омогућава везивање различитих молекула, чинећи га једним од најфункционалнијих транспортних протеина. Интеракција цисплатине и албумина серума је иреверзибилна и веома значајна за дистрибуцију и ефикасност лека, али и његову токсичност (233). Стога, испитивање интеракција BSA и комплекса метала као потенцијалних лекова, као модел везивања за HSA, може дати одговоре на важна питања, како о биолошкој активности, тако и о транспорту једињења у организму (234, 235). BSA показује структурне сличности са HSA. Док HSA садржи један триптофан на позицији Trp-214, BSA садржи два остатка триптофана, Trp-134 и Trp-214. Захваљујући структури протеина, раствор BSA показује интензивну емисију флуоресценције на $\lambda_{em,max} = 365 \text{ nm}$, при екситацији на 295 nm (236, 237). Додавање комплекса C1 – C4 у раствор BSA је утицало на смањење интензитета флуоресценције, на основу чега се може закључити да испитивани комплекси интерагују са овим биомолекулом (Графикон б). Смањење интензитета флуоресценције се може приписати променама у структури протеина, које је настало због везивања комплекса за BSA (236, 237). Константе гашења флуоресценције (k_q) ($>10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) су веће у односу на различите биополимере који утичу на гашење флуоресценције, што указује на постојање значајне интеракције (Табела 8) (236). На основу вредности K_a интеракције комплекса C1 – C4 са BSA, могло би се закључити да је транспорт испитиваних комплекса до циљних ћелија могућ овим путем. Међутим, на основу вредности интеракције авидина са различитим лигандима, за коју се сматра да је најјача позната нековалентна интеракција (10^{15} M^{-1}), а у поређењу са K_a вредностима за комплексе C1 – C4, ипак је јасно да се ови комплекси могу лако ослободити са молекула BSA (Табела 8) (238, 239). Додатно, на основу најмање вредности K_a за комплекс C2 се може рећи да се најслабије везује за BSA (Табела 8). Вредност n показује да вероватно постоји једно потенцијално место на молекулу BSA погодно за везивање комплекса, док остали параметри имплицирају да та веза није довољно јака да омогући допремање комплекса до циљне ћелије (Табела 8).

Молекулским докингом је утврђено да се сва четири испитивана комплекса углавном везују за IIА субдомен молекула BSA, које се не сматра битним за транспорт, при чему су мање енергије везивања у корелацији са вредностима K_a које одговарају релативно слабирезима (Слика 13). Слично томе, комплекси C1 – C4 имају једно погодно место за везивање за молекул HSA између субдомена IA и IIА, које се не сматра транспортним местом за лекове, уз релативно мале енергије везивања (Слика 13). Закључак је да овакве везе највероватније доминантно одговарају електростатичким интеракцијама између позитивно наелектрисаних комплекса и негативно наелектрисаних аминокиселина

албумина серума, а њихова природа указује на могућност лаког ослобађања комплекса у циркулацији током транспорта до циљног ткива.

Као што је познато, електронски апсорпциони спектар BSA има два апсорпциона пика у подручју од 200 – 240 nm и 260 – 300 nm, који потичу од аминокиселинских остатака ароматичних аминокиселина, триптофана, тирозина и фенилаланина (240). Максимум апсорпције на 280 nm је веома осетљив на промене у микроокружењу, односно промене у овом делу спектра указују на промене у конформацији протеина. Промене у области првог максимума апсорпције (200 – 240 nm) приписују се измењеној секундарној структури протеина (241). На основу снимљених спектра може се закључити да нема хипсохромног или батохромног померања апсорпционих пикова на 280 nm, али хиперхромно померање максимума апсорпције на 280 nm указује на структурне промене протеина, које су резултат нековалентних интеракција комплекса C5 – C8 и молекула BSA (Графикон 6) (242). Слично комплексима C1 – C4, ове интеракције могу бити последица настанка водоничних или електростатичких интеракција, односно у овом случају електростатичких веза између BSA и тестираног комплекса (175). На основу вредности K_a , може се закључити да се комплекси C5 – C8 могу везати за BSA и тако транспортовати до ћелије, као и да ова веза може бити раскинута након доласка до циљне ћелије (Табела 10).

Осим значаја за транспорт у системској циркулацији, природа интеракција испитиваних комплекса као потенцијалних лекова, са молекулом BSA може бити важна за њихову активност у организму. Показано је да слабо везивање лиганда смањује његов полуживот, док је снажно везивање могући узрок смањене концентрације слободних лиганда у циркулацији (243). Генерално, интеракција комплекса са DNK и компонентама крви може утицати на њихову биорасположивост, као и токсичност (244).

5.2. Потенцијал комплекса C1 – C8 за развој антитуморске терапије

Приликом испитивања цитотоксичког ефекта МТТ тестом, излагањем различитих линија туморских ћелија испитиваним комплексима у трајању од 48 h, на самом почетку се издвојио комплекс C2 који је показао највећу цитотоксичност на ћелијама карцинома плућа миша (LLC1) ($IC_{50} = 56.3 \pm 10.8 \mu M$) и ћелијама мишјег карцинома дојке (4T1) ($IC_{50} = 146.5 \pm 75 \mu M$), док су и комплекс C1 ($IC_{50} = 16.3 \pm 18.8 \mu M$) и комплекс C2 ($IC_{50} = 15.9 \pm 0.8 \mu M$) показали дозно-зависан цитотоксички ефекат сличан цисплатини ($IC_{50} = 12.0 \pm 1.5 \mu M$) на ћелијама хуманог карцинома дојке MDA-MB 468 (Графикон 11, Табела 11).

Након 72 h, комплекс C2 је показао изразит цитотоксички ефекат зависан од дозе на 4T1 ћелијама ($IC_{50} = 51.1 \pm 22.4 \mu M$), а оба комплекса, и C1 и C2, на ћелијама хуманог карцинома дојке, MDA-MB 468 ($IC_{50} = 3.0 \pm 1.3$ односно $4.0 \pm 2.1 \mu M$) и ћелијама мишјег карцинома плућа, LLC1 и то C1 са $IC_{50} = 53.2 \pm 2.4 \mu M$, а C2 са $IC_{50} = 30.2 \pm 21.6 \mu M$ (Графикон 12, Табела 12). Са друге стране, највеће преузимање у туморске ћелије је детектовано за комплекс C4, што је обрнуто пропорционално растворљивости комплекса (Графикон 13, Табела 13).

У претходним истраживањима је синтетисано и испитано неколико динуклеарних комплекса Pt(II) који су по својој структури били слични комплексима C1 – C4, са истим хелатним диаминским лигандима, али са пиразином као мостним лигандом (217, 220).

Комплекси са пиразином, који су били аналогни комплексима C1, C2 и C3 су показали дозно-зависан цитотоксички ефекат на ћелијским линијама меланома (A375) и карцинома колона (HCT116). У овој студији, снажан цитотоксички ефекат након 72 h експозиције на ћелијама A375, сличан цисплатини, је показао комплекс са 1,3-пропилендиамином и пиразином као мостним лигандом ($IC_{50} = 3 \pm 0.1 \mu M$) (220), за разлику од C3 комплекса са истим хелатним лигандом и пиридазином, који је на ове ћелије цитотоксички деловао само у највишим концентрацијама ($IC_{50} > 500 \mu M$) (Табела 12). Комплекс са 1,3-пропилендиамином и пиразином је такође показао снажан цитотоксички ефекат и на ћелијама карцинома колона миша CT26 ($IC_{50} = 30.0 \pm 0.5 \mu M$) (217), за разлику од комплекса C3, чији је цитотоксички ефекат генерално био много слабији (Табела 12). Јасно је да оваква разлика у активности може потицати и од разлике у структури мостних лиганда, што је потврђено компарацијом комплекса са етилендиамином и пиразином, односно пиридазином. Овај ефекат је објашњен краћом дистанцом између два молекула Pt(II) у комплексу са пиридазином, која највероватније утиче на његову способност везивања за DNK (220). Очекивало би се да разлика у цитотоксичности постоји за све диаминске комплексе са оваквим мостним лигандима, то јест да су комплекси са пиразином ефикаснији, међутим, показано је да активност неких комплекса зависи и од врсте туморских ћелија. На пример, комплекс C2 је показао бољи цитотоксички ефекат на MDA-MB 468 ћелијама ($IC_{50} = 4.0 \pm 2.1 \mu M$) од идентичног комплекса са пиразином, на ћелијама A 375 и HCT116 ($IC_{50} = 120 \pm 3 \mu M$ и $45 \pm 1 \mu M$). Као и комплекси C1 – C4, ни ови комплекси нису показали селективност за туморске ћелије у односу на ћелијску линију хуманих фибробласта MRC-5, али су били мање токсични од цисплатине (220). Ови подаци су показали да је цитотоксички ефекат динуклеарних комплекса Pt(II) са диаминским и диазинским лигандима варијабилан и да зависи од врсте лиганда и линије туморских ћелија.

Значајна осетљивост ћелијских линија карцинома дојке на комплексе Pt(II) са различитим лигандима, слично ефекту комплекса C1 и C2 на ћелијским линијама MDA-MB 468 и 4T1, је показана у још неколико студија. На пример, комплекси Pt(II) са беренилом и лигандима као што су пиперидин, 4-пиколин, 3-пиколин и изопропиламин су показали снажан цитотоксички ефекат на ћелијским линијама карцинома дојке MDA-MB 231 и MCF-7 (245). Такође, слично дејство на ћелијске линије MDA-MB 231 и 4T1 су имали динуклеарни комплекси са етилендиамином и 1,7 фенантролином (213), док је комплекс са 2,2-диметил-малонском киселином цитотоксички ефекат показао на неколико ћелијских линија, укључујући и 4T1 ћелије (246).

Испитивани комплекси нису показали значајну селективност према туморским у односу на нетуморске ћелије, али су били мање токсични од цисплатине. Комплекси C1 и C2 су показали највећу токсичност, али такође и одређену селективност према хуманим ћелијама карцинома дојке MDA-MB 468 и LLC1 ћелијама карцинома плућа миша, након 72 h третмана (Графикон 12Г, Табела 12).

С обзиром на сличне биохемијске карактеристике, а мању токсичност комплекса Pd(II) у поређењу са комплексима Pt(II), испитивање њихове биолошке активности и потенцијалне примене у терапији је интензивно. На основу добијених резултата, комплекси C5 и C6 нису показали значајну цитотоксичку активност на испитиваним туморским ћелијским линијама, након третмана у трајању од 72 h. На туморским линијама мишјег порекла, слаб цитотоксички ефекат је показао комплекс C7, на ћелијским линијама меланома (B16-F10) и карцинома плућа (LLC1) и то у високим

дозама, $>125\mu\text{M}$ (Графикон 14, Табела 14). Хелијске линије хуманог порекла су биле осетљивије на дејство комплекса C5 – C8 па је тако комплекс C8 показао значајан дозно-зависан цитотоксички ефекат на ћелијама карцинома плућа (A549) ($\text{IC}_{50} = 38.1 \pm 13.8$) али и хуманог меланома (A375) ($\text{IC}_{50} < 7.8 \mu\text{M}$), где је цитотоксички ефекат кореспондирао са ефектом цисплатине ($\text{IC}_{50} < 7.8 \mu\text{M}$) (Графикон 14, Табела 14). Такође, комплекси C7 и C8 су испољили сличан дозно-зависан цитотоксички ефекат на ћелијама хуманог карцинома дојке (MDA-MB 468) ($\text{IC}_{50} = 99.2 \pm 58.5$ односно $\text{IC}_{50} = 90.6 \pm 29.0$) (Графикон 14, Табела 14). Другим речима, чини се да је туморицидни потенцијал комплекса C5 – C8 је био варијабилан, у зависности од врсте лиганда али и да је њихова потенцијална токсичност ипак мања од цисплатине (Графикон 14Г, Табела 14).

Резултати испитивања цитотоксичности комплекса C5 – C8 су били слични ефекту раније синтетисаних динуклеарних комплекса Pd са етиледиамином, који су имали мостни бензо-диазински лиганд, квиноксалин, квиназолин или фталазин (214). Према овом истраживању, испитивани комплекси су највећи цитотоксички ефекат показали на ћелијама хуманог карцинома плућа (A549) и мишјег карцинома плућа (LLC1), док су на различитим ћелијским линијама карцинома колоне (SW480, CT26 и HCT116) показали цитотоксичку активност само у концентрацијама већим од $125 \mu\text{M}$ (214). Претпоставку да антитуморска активност комплекса Pd зависи од врсте лиганда су потврдиле и друге студије у којима су синтетисани координациони комплекси Pd који су имали много бољи цитотоксички ефекат од C5 – C8. На пример, изгледа да су комплекси Pd са различитим дериватима тиосемикарбазона ефикаснији од C5 – C8 комплекса, што је потврдило неколико студија у којима је показан значајан цитотоксички потенцијал ових једињења на различитим туморским ћелијским линијама (247-249).

5.3. Потенцијал комплекса C1 – C8 за развој антимикуробне терапије

Резистенција микроорганизама на антимикуробне лекове добија глобалне размере, а све већи број микроорганизама постаје мултирезистентан, због чега је последњих деценија поред профилаксе и спречавања ширења мултирезистентних сојева, актуелно истраживање нових антимикуробних лекова (250). Поред тога што посредују у различитим хемијским реакцијама унутар микроорганизама, јони метала испољавају свој антимикуробни потенцијал тако што утичу на дисфункцију протеина и губитак активности ензима, продукцију и ослобађање реактивних кисеоничних једињења и слободних радикала, оштећење ћелијске мембране микроорганизама и поремећај транспорта електрона (251). Јони метала, наночестице и комплекси метала који показују антимикуробно дејство, познати и као „металоантибиотици“, представљају велику и недовољно истражену групу потенцијалних кандидата за развој нових антибиотика (252). У овој студији је испитана антимикуробна активност комплекса C1 – C8 на различитим сојевима *Gram*-позитивних и *Gram*-негативних бактерија, као и квасницама.

Анализа добијених резултата антимикуробне активности комплекса C1 – C4 је показала да су најосетљивије на сва четири комплекса биле *Gram*-позитивне бактерије, *Rhodococcus equi* и *Streptococcus pneumoniae*, са вредностима MIC од 7.81 до $31.25 \mu\text{g/ml}$ (Табела 16). Такође, значајан антимикуробни ефекат C2, C3 и C4 комплекси су показали на сојевима *Staphylococcus saprophyticus* (MIC и MBC = $15.63 \mu\text{g/ml}$). Велика разлика у вредностима између MIC ($7.81 \mu\text{g/ml}$ до $125 \mu\text{g/ml}$) и MBC ($>250 \mu\text{g/ml}$) за *Listeria monocytogenes* и *Enterococcus faecalis* указује на то да комплекси на ове бактерије не делују бактерицидно већ пре свега бактериостатски (253). Слабију антимикуробну

активност комплекси C1 – C4 су показали према неким сојевима *Gram*-позитивних бактерија као што су *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*, али и *Gram*-негативних бактерија, *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis* (МИС/МВС од 500 до 1000 µg/ml). Када је реч о антифунгалној активности, комплекси C1 – C3 су показали значајну фунгицидну активност према врсти *Candida albicans* (МИС/МВС од 15.63 до 62.5 µg/ml) (Табела 16). Варијабилан антибактеријски и антифунгални ефекат различитих комплекса Pt, а који је зависио од врсте микроорганизама, показале су и друге студије.

Сличан ефекат на *Streptococcus pneumoniae* су показали комплекси Pt са тиоуреом, са МИС вредностима од 3.9 µg/ml, међутим, њихов ефекат на *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* је био много бољи него ефекат комплекса C1 – C4 (МИС = 15.63 µg/ml), док су на *Candida albicans* деловали слично као комплекси C1 и C2 (254). Комплекси Pt са 3-аминоциклохексанеспиро-5-хидантоином су слично комплексима C1 – C4 показали слабу антибактеријску активност на *Staphylococcus aureus* и *Gram*-негативне бактерије, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* и *Klebsiella pneumoniae*, али су на *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae* деловали много слабије од комплекса C1, C2 и C3, са МИС вредностима већим од 800 µg/ml (255). *Ajibade* и *Idemudia* су, испитујући антимикуробну активност комплекса Pd(II) и Pt(II) са триметопримом и пириметамином против различитих врста микроорганизама, закључили да комплекси оба метала имају варијабилну и умерену антимикуробну активност (256). Из свега наведеног чини се да се ниједан тестирани комплекс Pt(II) не издваја по својој антимикуробној активности, односно, она није последица модификација хемијске структуре једињења. Са друге стране, тестирани комплекси Pt(II) су показали варијабилну антимикуробну активност која је зависила од врсте тестираног микроорганизама.

Комплекси C5 – C8 су такође показали варијабилну антимикуробну активност, која се разликовала од врсте тестираног микроорганизама, али и хемијске структуре комплекса. Генерално гледано, најзначајнију антимикуробну активност против свих испитиваних бактеријских врста и квасница је показао комплекс C8, са феназином као лигандом, са МИС/МВС = 15.63 - 250 µg/ml (изузев *Proteus mirabilis* за који је МИС/МВС био 500 µg/ml). Најосетљивија бактерија на сва четири комплекса је била *Rhodococcus equi* (МИС < 15.63 µg/ml), а на C6, C7 и C8, *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus saprophyticus* (МИС/МВС од 15.63 до 62.5 µg/ml). Ефикасност комплекса C8 вероватно потиче од самог феназина, јер је од раније познато да су деривати самог феназина познати као ефикасни антимикуробни агенси, делујући пре свега на разарање структуре биофилма (257). У досадашњим истраживањима, неки комплекси Pd(II) су имали сличну, а неки потпуно различиту антимикуробну активност у односу комплексе C5 – C8. На пример, моноклеарни комплекси Pd(II) са терпиридином су показали интензивнију антимикуробну активност у односу на C5 – C8 комплексе, са мањим вредностима МИС према бактеријама *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* (7.81 – 62.5 µg/ml), док су на квасницу *Candida albicans* деловали слично комплексу C8 (Табела 17) (258). *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Saccharomyces cerevisiae* су били осетљивији на комплексе C5, C7 и C8 (МИС и МВС, односно МФС су били испод 250 µg/ml) у односу на динуклеарне комплексе Pd(II) са пиперазинским дериватима, чији је МИС био око 325 µg/ml (259). Такође, комплекси Pd(II) са тиосалицилном киселином (165) и са ди-алкил естрима (260) су имали слабији ефекат на *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* и *Candida albicans* у односу на комплекс C8.

Из наведених истраживања је јасно да антимикуробна активност комплекса Pd(II) зависи од врсте лиганда. Новосинтетисани комплекси са диазинским лигандима поседују ограничен антимикуробни потенцијал који би се могао побољшати накнадним хемијским модификацијама.

5.4. Потенцијални молекулски механизми антитуморске активности комплекса C2

На основу резултата добијених тестовима цитотоксичности *in vitro*, може се закључити да је међу испитиваним комплексима, динуклеарни комплекс Pt(II), означен као C2, показао најзначајнији дозно и временски зависан цитотоксички ефекат, и то на 4T1 ћелијама мишјег и MDA-MB 468 ћелијама хуманог карцинома дојке. Познато је да се антитуморска активност новосинтетисаних и модификованих комплекса Pt заснива на различитим механизмима дејства, укључујући проапоптотски и антипролиферативни ефекат (104, 212-217). Наредни циљ студије био је да се испитају потенцијални механизми антитуморске активности комплекса C2, односно да се анализира његов ефекат на механизме ћелијске смрти и пролиферацију ћелија карцинома дојке.

Дисрегулација апоптозе је један од критичних догађаја у малигној трансформацији ћелије и представља важну мету у развоју антитуморске терапије (261). Осим тога, механизам дејства цисплатине, као широко примењиваног хемиотерапеутика, у основи се заснива на оштећењу DNK и следственом покретању апоптотског програма (262). Након излагања 4T1 и MDA-MB 468 ћелија у трајању од 12 h, детектован је значајан дозно-зависан проапоптотски ефекат комплекса C2, који се огледао у повећаном проценту пре свега раноапоптотичних (*Annexin V*⁺PI⁻) ћелија у поређењу са нетретираним ћелијама (Слика 14, Слика 15). Овај ефекат је, иако нешто слабији, био аналоган очекиваном ефекту цисплатине (Слика 14, Слика 15). Примери претходно описаних комплекса Pt са значајним проапоптотским дејством нарочито на ћелије карцинома дојке су бројни, попут динуклеарног комплекса са 1,7 фенантролином (213), или моонуклеарног комплекса Pt(II) са лигандом 6,6'-bis (NH-*benzimidazol-2-yl*)-2,2'-*bipyridine*-ом (263). Осим тога, ћелијска смрт индукована цисплатином не одговара увек класичној апоптози, већ у зависности од дозе и ћелијског статуса то може бити дисрегулисан апоптотски програм, или чак некроза (264). Иако је реч о два морфолошки и биохемијски потпуно различита облика смрти ћелије, механизми апоптозе и некрозе могу бити паралелно покренути у истом ткиву или култури ћелија (264). У складу са тим, након третирања ћелија комплексом C2, уочен је мали проценат некротичних 4T1, али не и MDA-MB 468 ћелија, што је одговарало ефекту цисплатине (Слика 14 и Слика 15).

Сходно покретању апоптозе у туморским ћелијама, добро је документовано да комплекси Pt, укључујући цисплатину, утичу на заустављање ћелијског циклуса и следствену инхибицију пролиферације туморских ћелија. Тако на пример, динуклеарни комплекс са NH₃ групама као лигандима, као и комплекс [$\{Pt(2,2\text{-diMe-1,3-pd})Cl\}_2(\mu\text{-pz})\}^{2+}$, индукују застој ћелијског циклуса CT26 ћелија мишјег карцинома колона у G2/M фази (217). Сличан ефекат на заустављање ћелијског циклуса у G2/M фази показао је и динуклеарни комплекс Pt(II) са 1,7 фенантролином као мостним лигандом, на линијама ћелија хуманог и мишјег карцинома дојке, MDA-MB 231 и 4T1 (213). Анализа ефекта комплекса C2 на ћелијски циклус 4T1 и MDA-MB 468 ћелија након експозиције у трајању од 12 h и дози од 30 μ M, је показала да испитивани комплекс, слично цисплатини, индукује акумулацију ћелија карцинома дојке у суб-G1 фази (Графикон 15). Детекција ћелија у суб-G1 фази методом проточне цитометрије указује на њихов

апоптотични фенотип који карактерише смањен садржај ДНК што је последица фрагментације и ослобађања ДНК из ћелије, као и морфолошких промена које укључују кондензацију једра (265). Добијени резултати су у складу са подацима из литературе који су документовали ефекат малих доза цисплатине на акумулацију ћелија хумане промијелоцитне леукемије, HL-60, у суб-G1 фази, што указује на њихову апоптозу и потенцијално некрозу (266). Проапоптотски ефекат комплекса C2 додатно је документован детекцијом повећања експресије iRNK за синтезу каспазе 3 у 4T1 ћелијама (Графикон 16А).

Активирана каспаза 3 је главни ефекторски молекул програмиране ћелијске смрти укључен у протеолитичку разградњу различитих супстрата у ћелији, што за последицу има морфолошке промене типичне за апоптозу (267). Апоптоза ћелије може бити покренута у одговору на сигнале из екстраћелијског простора или различитим догађајима унутар саме ћелије. Индукција унутрашњег или митохондријског пута апоптотског програма може бити последица деловања бројних стимулуса, укључујући примену хемиотерапије или радиотерапије у лечењу тумора (267). Након ослобађања из митохондрија, цитохром c, заједно са каспазом 9, учествује у формирању протеинског комплекса унутрашњег пута апоптозе који се назива апоптозом. Апоптозом учествује у следственој активацији ефекторске каспазе 3 (267). Ефекат комплекса C2 на повећање експресије iRNK за каспазу 9, сугерише да испитивани комплекс индукује апоптозу унутрашњим путем (Графикон 16Б). Добијени резултати су у складу са претходно описаним ефектом цисплатине на покретање унутрашњег пута апоптотског програма (268).

Поред некрозе и апоптозе, један од алтернативних начина ћелијске смрти је некроптоза, која представља облик програмиране некрозе. Главни молекули који учествују у регулацији некроптозе су протеин киназе RIPK 1 и RIPK 3 (269, 270). Један од најчешћих индуктора некроптозе је TNF који се везује за свој рецептор на површини ћелијске мембране, TNFR1, при чему се на унутрашњој површини ћелијске мембране формира иницијални комплекс у чији састав улази и RIPK 1. Уколико се каспазе активирају у ћелији, она умире процесом апоптозе. Међутим, уколико је активност киназа блокирана, ћелија потенцијално умире процесом некроптозе. RIPK 1 активира RIPK 3 и тако настаје комплекс назван некрозом, који следствено индукује фосфорилацију протеина MLKL, његову олигомеризацију и следствену дестабилизацију мембране ћелије (269-271). Експресија iRNK за RIPK1 киназу је била повећана у 4T1 ћелијама након третмана цисплатином или комплексом C2 (Графикон 16В), па се може претпоставити да испитивани комплекс потенцијално може индуковати некроптозу као алтернативни начин ћелијске смрти (272). У студији сличног дизајна показано је да комплекс Pt(II), trans-[PtCl₂(2-hepy)₂] [2-hepy=2-(2-hydroxyethyl) pyridine] индукује апотозу, али истовремено и некроптозу туморских матичних ћелија, што је документовано повећаном експресијом гена за MLKL протеине (273).

Потенцијални антипролиферативна активност комплекса C2 испитана је на 4T1 ћелијама мишјег карцинома дојке анализом ефекта на експресију молекула укључених у регулацију ћелијског циклуса. Циклин D3 и циклин E представљају кључне регулаторе деобе ћелије, а означени су и као важни прогностички маркери за прогресију карцинома дојке (274, 275) Ћелије којима недостају циклини D су отпорне на већину онкогених стимуланса, што указује на потенцијално важну улогу ових молекула у настанку и прогресији тумора (276). Осим тога, показано је да циклин E представља потенцијалну

терапијску мету, чија би инхибиција могла да спречи појаву резистенције на хемиотерапију различитих тумора (277). Слично цисплатини, комплекс С2 је значајно смањио експресију iRNK за синтезу циклина D3, као и проценат 4T1 ћелија које експримирају циклин Е у поређењу са нетретираним ћелијама (Графикон 17А, 17Б). У складу са овим резултатима, студија сличног дизајна је документовала да комплекс Pt(IV) са алкил дериватима тиосалицилне киселине, PtCl₂(S-*pr*-thiosal)₂, испољава антипролиферативни ефекат на BCL1 (енгл. *mouse B cell leukemia lymphoma*) ћелијама, што се између осталог огледа у смањењу експресије циклина D3 и циклина Е (278).

У складу са смањењем експресије циклина D3 и циклина Е је и ефекат комплекса С2 на повећање експресије iRNK за синтезу инхибитора p27 (Графикон 17В). Молекул p27 је важан инхибитор ћелијског циклуса, експримиран и у нормалним и у туморским ћелијама, који регулише G1 фазу ћелијског циклуса везујући се за комплекс циклин Е-Cdk2 и инхибирајући на тај начин активност киназе (279). У истраживању *Zhao* и сарадника је показано да промена локализације инхибитора p27 из једра у цитоплазму, може бити узрок резистенције ћелија карцинома дојке на циљану анти-HER2 терапију (280). Поред тога, познато је да повећана експресија p27 утиче на активацију апоптотског програма туморских ћелија, укључујући ћелије карцинома дојке (281), што је у складу са ефектом комплекса С2 на индукцију апоптозе 4T1 ћелија.

Транскрипциони фактор с-Мус представља један од кључних молекула укључених у регулацију пролиферације, диференцијације и смрти ћелије. Аберантна експресија с-Мус је детектована у многим тумора, а испитивања антитуморског ефекта инхибитора с-Мус веома актуелна. Тако је у недавној претклиничкој студији документован антипролиферативни и проапоптотски ефекат новог инхибитора с-Мус, MUCi975, на TNBC ћелијама нарочито у комбинацији са доцетакселом или доксорубицином (282). с-Мус стимулише пролиферацију ћелије директно активирајући комплексе циклина и Cdks, али и фосфорилацијом и следственом деградацијом инхибитора ћелијског циклуса, као што је p27 (283). Стога се може рећи да је антипролиферативна и проапоптотска активност комплекса С2 одговарала ефекту испитиваног комплекса на смањење експресије iRNK за с-Мус, што је даље у складу са ефектима на смањење експресије циклина D3 и циклина Е, односно повећање експресије инхибитора p27 (Графикон 17).

Важна компонента сигналног пута PI3K/AKT који регулише есенцијалне процесе раста, деобе и смрти ћелије је протеин киназа АКТ. Сходно томе, киназа АКТ је актуелна мета за развој терапије различитих тумора, укључујући карцином дојке (284, 285). Тако је на пример, истовремена примена инхибитора киназе АКТ, капивасертиба и паклитаксела у претклиничкој студији показала значајну антитуморску активност према TNBC (285). Комплекс С2 је, слично цисплатини, значајно смањио проценат 4T1 ћелија које експримирају фосфорилисани и активирани облик протеин киназе АКТ, pAKT, што даље говори у прилог антипролиферативном ефекту испитиваног комплекса (Графикон 18). Такође је показано је да сигнални пут PI3K/AKT делује на пролиферацију ћелија повећањем експресије с-Мус, као и ефектима на циклине, Cdks и инхибиторе Cdks (286, 287). Комплекс С2 редукује проценат pAKT позитивних 4T1 ћелија, што би могло да претходи смањењу експресије с-Мус, циклина D3 и циклина Е, као и повећању експресије инхибитора p27 (Графикон 18). Додатно, сигнални пут PI3K/AKT игра кључну улогу у преживљавању ћелије, односно блокирању апоптозе, што између осталог укључује инхибицију каспазе 9 и каспазе 3 (288, 289). На основу тога, смањена експресија pAKT у 4T1 ћелијама након излагања комплексу С2 може бити одговорна за

проапоптотску активност документовану повећањем експресије iRNK за каспазу 9 и каспазу 3 (Графикон 17 и Графикон 18). На основу свих ових резултата, чини се да је кључни ефекат комплекса C2 на ћелије карцинома дојке проапоптотски.

5.5. Ефекат комплекса C2 на прогресију мишјег карцинома дојке

С обзиром на значајну антитуморску активност комплекса C2 детектовану тестовима *in vitro*, даље је испитана његова активност на прогресију мишјег карцинома дојке и преживљавање мишева. Након инокулације 4Т1 ћелија и појаве палпабилног тумора, мишеви су третирани комплексом C2 или цисплатином сваког другог дана у укупно 8 доза. За разлику од очекиваног ефекта цисплатине на инхибицију прогресије тумора и преживљавање мишева, комплекс C2 није утицао на раст тумора ни у једној од тестираних концентрација, што је било у супротности са значајним цитотоксичким ефектом испитиваног комплекса *in vitro* (Графикон 19А). Осим смањеног морталитета који је детектован 18-тог дана експеримента код мишева третираних мањом дозом комплекса C2, такође се уочава и то да испитивани комплекс није значајно утицао на преживљавање мишева са тумором (Графикон 19Б). Из добијених података се може закључити да је очекивани антитуморски ефекат *in vivo* изостао.

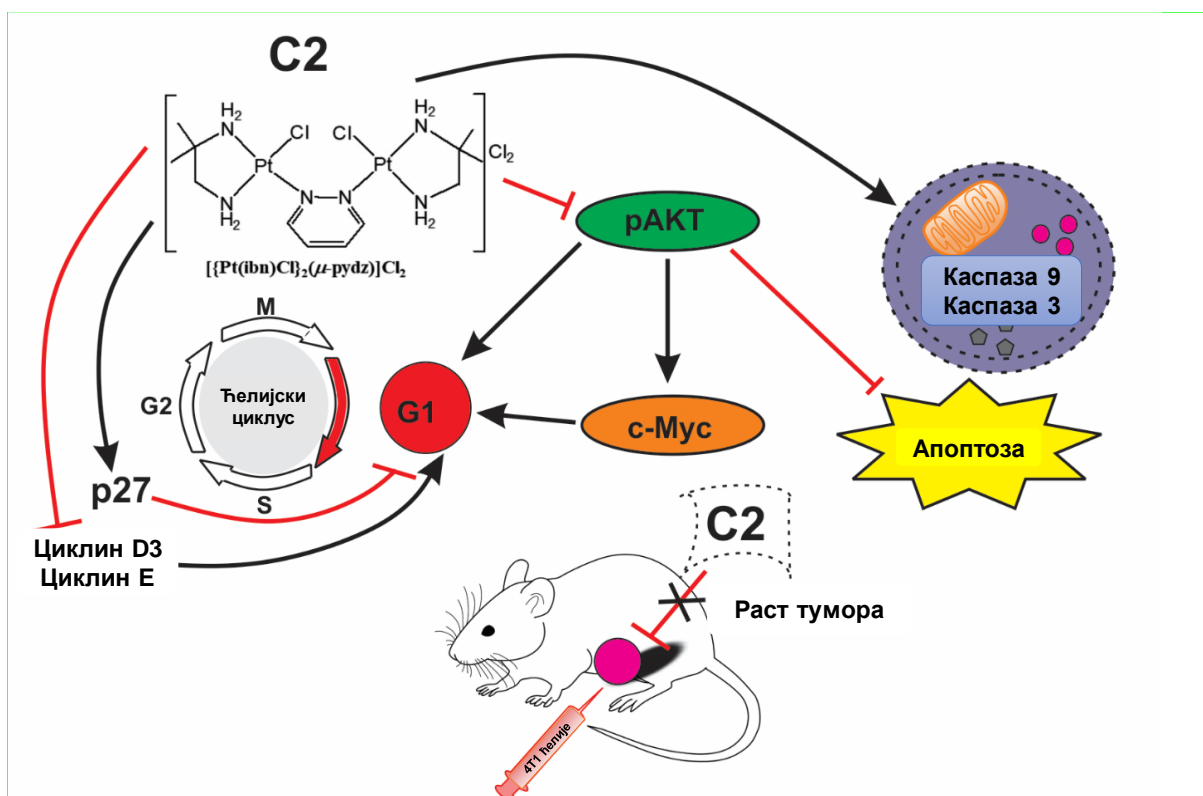
Претпоставља се да постоји више разлога којима се може објаснити неслагање између *in vitro* и *in vivo* антитуморске ефикасности комплекса C2. Најпре, вредност K_a за комплекс C2 указује да се овај комплекс најслабије од свих тестираних комплекса везује за молекулу BSA. Слабе, углавном електростатичке везе које комплекс C2 формира са транспортним протеином, као и везивање за нетранспортно место, су потенцијани узроци отежаног транспорта кроз крвоток и смањеног допремања до туморских ћелија. Друге студије су показале да недостатак антитуморске активности комплекса метала може бити последица интеракција са албумином серума (290). Поред тога, инактивација комплекса Pt(II) *in vivo* може бити последица њихове деградације у биолошки неактивна једињења уз помоћ глутатиона или другим још увек недовољно испитаним метаболичким путевима (291, 292).

Генерално, резултати ове студије су указали на значајан потенцијал динуклеарних комплекса Pt(II) са пиридазином као мостним лигандом и динуклеарних комплекса Pd(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима за развој антитуморске и потенцијално антимикробне терапије, као и потребу за даљим хемијским модификацијама у циљу побољшања њихове биолошке активности, нарочито ефеката *in vivo*.

6. ЗАКЉУЧЦИ

У оквиру овог научног истраживања синтетисани су динуклеарни комплекси Pt(II) са пиридазином као мостним лигандом (C1 – C4) и динуклеарни комплекси Pd(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима (C5 – C8), анализирани су њихове структурне особине, и испитани механизми интеракције са биомолекулима као што су DNA, BSA и HSA. Испитивање антитуморске активности тестираних комплекса, а нарочито комплекса Pt(II), на различитим туморским ћелијама мишјег и хуманог порекла, указало је на значајан туморицидни потенцијал, као и потенцијално мању токсичност у поређењу са цисплатином као конвенционалним хемиотерапеутиком. Осим тога, испитивани комплекси су показали умерен антибактеријски и антигљивични ефекат у зависности од врсте микроорганизма, али и њихове хемијске структуре.

Комплекс $[\{Pt(ibn)Cl\}_2(\mu-pydz)]Cl_2$, означен као C2, показао је највећу дозно и временски зависну цитотоксичку активност *in vitro*, нарочито на ћелијама мишјег и хуманог карцинома дојке. C2 је доминантно индуковао апоптозу ћелија карцинома дојке. Утицај C2 на експресију различитих молекула укључених у регулацију ћелијског циклуса и смрти ћелија карцинома дојке, указао је на антипролиферативни ефекат испитиваног комплекса. Насупрот томе, ефекат C2 на раст мишјег карцинома дојке *in vivo* је изостао, што се потенцијално може објаснити slabим везивањем испитиваног комплекса за нетранспортно место протеина и његовим ограниченим допремањем у туморско ткиво (Слика 16).



Слика 16. Динуклеарни комплекс $[\{Pt(ibn)Cl\}_2(\mu-pydz)]Cl_2$, означен као C2, показује антитуморску активност тако што индукује апоптозу и смањује пролиферацију ћелија мишјег карцинома дојке *in vitro*. Комплекс C2 покреће унутрашњи пут апоптозе 4Т1 ћелија што је документовано повећањем експресије каспазе 9 и каспазе 3. Истовремено, комплекс C2 остварује антипролиферативни ефекат тако што смањује експресију

регулатора ћелијског циклуса циклина Е и циклина D3, док повећава експресију инхибитора p27. Коначно, комплекс C2 показује проапоптотски и антипролиферативни ефекат тако што смањује експресију pAKT и следствено c-Myc онкогена, укључених у регулацију пролиферације и смрти ћелија. Међутим, инхибиторни ефекат C2 на раст тумора *in vivo* је изостао.

Закључак је изведен на основу следећих резултата истраживања:

- Структура и стабилност синтетисаних динуклеарних комплекса Pt(II) и Pd(II) потврђена је помоћу неколико метода
- Динуклеарни комплекси Pt(II) нису добри интеркалатори и остварују слабе интеракције са биомолекулима попут DNK, BSA и HSA, које доминантно одговарају електростатичким везама. У поређењу са другим испитиваним комплексима Pt(II), а насупрот израженој цитотоксичности, C2 формира најслабије везе са биомолекулима
- Динуклеарни комплекси Pd(II) се потенцијално везују за DNK путем интеркалације, док са BSA доминантно остварују електростатичке везе. Међу испитиваним комплексима Pd(II), комплекс C8 формира најјаче везе са молекулом DNK, док се комплекс C6 најинтензивније везује за молекул BSA
- Међу испитиваним комплексима Pt(II), комплекс C2 испољава значајан дозно и временски зависан цитотоксички ефекат на ћелијама мишићних карцинома дојке (4T1) и плућа (LLC1). Комплекси C1 и C2 показују значајну туморицидну активност на MDA-MB 468 ћелијама хуманог карцинома дојке, уз потенцијално мању токсичност у поређењу са цисплатином
- Међу испитиваним динуклеарним комплексима Pd(II), комплекси C7 и C8 испољавају већу туморицидну активност, нарочито на линијама ћелија хуманог карцинома дојке (MDA-MB 468), као и меланома (A375), уз потенцијално мању токсичност у поређењу са цисплатином. Изражена туморицидна активност комплекса C8 показана је на ћелијама хуманог аденокарцинома плућа (A549) и посебно ћелијама A375 хуманог меланома где је кореспондирала са ефектом цисплатине
- Динуклеарни комплекси Pt(II) показују слабу до умерену антимикуробну активност у зависности од врсте микроорганизама. Испитивани комплекси су показали умерен антибактеријски ефекат на неколико врста *Gram*-позитивних бактерија, а нарочито на *Rhodococcus equi* и *Streptococcus pneumoniae*, док су комплекси C1, C2 и C3 показали антигљивични ефекат на квасницу *Candida albicans*
- Динуклеарни комплекси Pd(II) показују слаб до умерен антимикуробни ефекат који зависи од врсте микроорганизама, али и од хемијске структуре тестираних комплекса, с обзиром да комплекс C8 показује највећи антимикуробни потенцијал. Сви испитивани комплекси су цитотоксични за *Gram*-позитивну бактерију *Rhodococcus equi*, док су C6, C7 и C8 показали антибактеријско дејство на врстама *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus saprophyticus*. Комплекс C7 и посебно комплекс C8 су показали значајну антифунгалну активност против кваснице *Candida albicans*
- Комплекс C2 индукује унутрашњи пут апоптозе ћелија карцинома дојке што је документовано повећаним процентом раноапоптотичних ћелија, као и повећаном експресијом каспазе 3 и каспазе 9 у третираним туморским ћелијама
- Комплекс C2 подстиче акумулацију ћелија карцинома дојке у суб-G1 фази ћелијског циклуса што указује на апоптозу туморских ћелија
- Комплекс C2 инхибира пролиферацију ћелија мишићег карцинома дојке тако што утиче на експресију регулатора ћелијског циклуса, односно смањује експресију

циклина D3 и циклина E, а повећава експресију инхибитора циклин зависних киназа p27

- Комплекс C2 смањује експресију онкогена c-Myc и pAKT, укључених у регулацију пролиферације и смрти туморских ћелија
- Комплекс C2 не утиче на смањење раста мишјег карцинома дојке што може бити последица слабог везивања комплекса за нетранспортно место протеина, отежаног транспорта кроз крвоток и следствено лимитираног допремања у туморско ткиво

7. ЖИТЕПАТЫПА

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3): 209–49.
2. Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front Pharmacol* 2018; 9:1300.
3. World Health Organization. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infection, including tuberculosis. World Health Organization (WHO), Geneva, 2017. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12>
4. Czarnomys R, Radomska D, Szewczyk OK, Roszczenko P, Bielawski K. Platinum and Palladium Complexes as Promising Sources for Antitumor Treatments. *Int J Mol Sci* 2021;22(15):8271.
5. Abbas Z, Rehman S. Chapter 6: An Overview of Cancer Treatment Modalities. In: *Neoplasia* by Editor Shahzad H. IntechOpen 2018;139–57.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74.
7. Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022;23(1):74–88.
8. Hu Q, Huang T. Regulation of the Cell Cycle by ncRNAs Affects the Efficiency of CDK4/6 Inhibition. *Int J Mol Sci* 2023;24(10):8939.
9. 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.
10. Schirripa A, Sexl V, Kollmann K. Cyclin-dependent kinase inhibitors in malignant hematopoiesis. *Front Oncol* 2022;12:916682.
11. Rizzolio F, Lucchetti C, Caligiuri I, Marchesi I, Caputo M, Klein-Szanto AJ, Bagella L, Castronovo M, Giordano A. Retinoblastoma tumor-suppressor protein phosphorylation and inactivation depend on direct interaction with Pin1. *Cell Death Differ* 2012;19(7):1152–61.
12. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ* 2022;29(5):946–60.
13. Matheson CJ, Backos DS, Reigan P. Targeting WEE1 Kinase in Cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2016;37(10):872–81.
14. Pappou EP, Ahuja N. The role of oncogenes in gastrointestinal cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2010;(Suppl 1):S2–S15.
15. Brown G. Oncogenes, Proto-Oncogenes, and Lineage Restriction of Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci* 2021;22(18):9667.
16. Gramling MW, Eischen CM. Suppression of Ras/Mapk pathway signaling inhibits Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death Differ* 2012;19(7):1220–7.
17. Bretones G, Delgado MD, León J. Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta* 2015;1849(5):506–16.
18. Madden SK, Dantas de Araujo A, Gerhardt M, Fairlie DP, Mason JM. Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc. *Molecular Cancer* 2021;20(1):3.
19. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer* 2019;18(1):26.

20. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004;30(2):193–204.
21. Song M, Bode AM, Dong Z, Lee MH. AKT as a Therapeutic Target for Cancer. *Cancer Res* 2019;79(6):1019–31.
22. Laplante M, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *J Cell Sci* 2013;126(Pt 8):1713–9.
23. Song J, Salek-Ardakani S, So T, Croft M. The kinases aurora B and mTOR regulate the G1-S cell cycle progression of T lymphocytes. *Nat Immunol* 2007;8(1):64–73.
24. Tharin Z, Richard C, Derangère V, Ilie A, Arnould L, Ghiringhelli F, Boidot R, Ladoire S. PIK3CA and PIK3R1 tumor mutational landscape in a pan-cancer patient cohort and its association with pathway activation and treatment efficacy. *Sci Rep* 2023;13(1):4467.
25. Kim TJ, Lee JW, Song SY, Choi JJ, Choi CH, Kim BG, Lee JH, Bae DS. Increased expression of pAKT is associated with radiation resistance in cervical cancer. *Br J Cancer* 2006;94(11):1678–82.
26. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res* 2019;29(5):347–64.
27. Del Re DP, Amgalan D, Linkermann A, Liu Q, Kitsis RN. Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease. *Physiol Rev* 2019;99(4):1765–817.
28. Mandelkow R, Gümbel D, Ahrend H, Kaul A, Zimmermann U, Burchardt M, Stope MB. Detection and Quantification of Nuclear Morphology Changes in Apoptotic Cells by Fluorescence Microscopy and Subsequent Analysis of Visualized Fluorescent Signals. *Anticancer Res* 2017;37(5):2239–44.
29. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495–516.
30. Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, Müllbacher A, Anel A, Simon MM. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol* 2004;167(3):457–68.
31. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(4):a008656. Erratum in: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7(4):a026716.
32. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 2006;13(9):1423–33.
33. Rathore R, McCallum JE, Varghese E, Florea AM, Büsselberg D. Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). *Apoptosis* 2017;22(7):898–919.
34. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ* 2018;25(1):65–80.
35. Cahyadi A, Ugrasena IDG, Andarsini MR, Larasati MCS, Aryati A, Arumsari DK. Relationship between Bax and Bcl-2 Protein Expression and Outcome of Induction Phase Chemotherapy in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2022;23(5):1679–85.
36. Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J* 2009;23(6):1625–37.
37. Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer* 2015;112:957–62.
38. Loreto C, La Rocca G, Anzalone R, Caltabiano R, Vespasiani G, Castorina S, Ralph DJ, Celtek S, Musumeci G, Giunta S, Djinovic R, Basic D, Sansalone S. The role of intrinsic

- pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. *Biomed Res Int*. 2014;2014:616149.
39. Neophytou CM, Trougakos IP, Erin N, Papageorgis P. Apoptosis Deregulation and the Development of Cancer Multi-Drug Resistance. *Cancers (Basel)* 2021;13(17):4363.
 40. Amjad MT, Chidharla A, Kasi A. Cancer Chemotherapy. 2023. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
 41. Anand U, Dey A, Chandel AKS, Sanyal R, Mishra A, Pandey DK, De Falco V, Upadhyay A, Kandimalla R, Chaudhary A, Dhanjal JK, Dewanjee S, Vallamkondu J, Pérez de la Lastra JM. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes Dis* 2022;10(4):1367–401.
 42. Cree IA, Charlton P. Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. *BMC Cancer* 2017;17(1):10.
 43. Kondo N, Takahashi A, Ono K, Ohnishi T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *J Nucleic Acids* 2010;2010:543531.
 44. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. *Dalton Trans* 2018;47: 6645–53.
 45. Ciccolini J, Serdjabi C, Peters GJ, Giovannetti E. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;78(1):1–12.
 46. Maksimovic V, Pavlovic-Popovic Z, Vukmirovic S, Cvejic J, Mooranian A, Al-Salami H, Mikov M, Golocorbin-Kon S. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Mol Biol Rep* 2020;47(6):4699–708.
 47. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3(5):330–8.
 48. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreira PI. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem* 2009;16(25):3267–85.
 49. Fauzee NJ. Taxanes: promising anti-cancer drugs. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;12(4):837–51.
 50. Moudi M, Go R, Yien CY, Nazre M. Vinca alkaloids. *Int J Prev Med* 2013;4(11):1231–5.
 51. Einhorn LH, Donohue JP. Combination chemotherapy in disseminated testicular cancer: the Indiana University experience. *Semin Oncol* 1979;6:87–93.
 52. Feldman SA, Assadipour Y, Kriley I, Goff SL, Rosenberg SA. Adoptive Cell Therapy-Tumor-Infiltrating Lymphocytes, T-Cell Receptors, and Chimeric Antigen Receptors. *Semin Oncol* 2015;42(4):626–39.
 53. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* 2020;20(11):651–68.
 54. DeVita VT Jr, Chu E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* 2008; 68(21):8643–53.
 55. Zahavi D, Weiner L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies (Basel)* 2020;9(3):34.
 56. Maloney DG, Grillo-López AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles TM, Dallaire BK, Wey K, Royston I, Davis T, Levy R. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90(6):2188–95.
 57. Sotelo MJ, García-Paredes B, Aguado C, Sastre J, Díaz-Rubio E. Role of cetuximab in first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20(15):4208–19.

58. Jeyakumar A, Younis T. Trastuzumab for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer: Clinical and Economic Considerations. *Clin Med Insights Oncol* 2012;6:179–87.
59. Shiravand Y, Khodadadi F, Kashani SMA, Hosseini-Fard SR, Hosseini S, Sadeghirad H, Ladwa R, O'Byrne K, Kulasinghe A. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Curr Oncol* 2022;29(5):3044–60.
60. Dalakas MC. Neurological complications of immune checkpoint inhibitors: what happens when you 'take the brakes off' the immune system. *Ther Adv Neurol Disord* 2018;11:1756286418799864.
61. Jagielska B, Ozdowska P, Gepner K, Kubala S, Siedlecki JA, Sarnowski TJ, Sarnowska E. Cardiotoxicity danger in immunotherapy. *IUBMB Life* 2020;72:1160–7.
62. Clotman K, Janssens K, Specenier P, Weets I, De Block CEM. Programmed Cell Death-1 Inhibitor-Induced Type 1 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:3144–54.
63. Huang R, Wang Q, Zhang X, Zhu J, Sun B. Trastuzumab-cisplatin conjugates for targeted delivery of cisplatin to HER2-overexpressing cancer cells. *Biomed Pharmacother* 2015;72:17–23.
64. D'Arienzo A, Verrazzo A, Pagliuca M, Napolitano F, Parola S, Viggiani M, Caputo R, Puglisi F, Giuliano M, Del Mastro L, Arpino G, De Laurentiis M, Montemurro F. Toxicity profile of antibody-drug conjugates in breast cancer: practical considerations. *EClinicalMedicine* 2023;62:102113.
65. Li X, Lu J, Kan Q, Li X, Fan Q, Li Y, Huang R, Slipicevic A, Dong HP, Eide L, Wang J, Zhang H, Berge V, Goscinski MA, Kvalheim G, Nesland JM, Suo Z. Metabolic reprogramming is associated with flavopiridol resistance in prostate cancer DU145 cells. *Sci Rep* 2017;7(1):5081.
66. Lacrima K, Valentini A, Lambertini C, Taborelli M, Rinaldi A, Zucca E, Catapano C, Cavalli F, Gianella-Borradori A, Maccallum DE, Bertoni F. *In vitro* activity of cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (Seliciclib, R-roscovitine) in mantle cell lymphomas. *Ann Oncol* 2005;16(7):1169–76.
67. Braal CL, Jongbloed EM, Wilting SM, Mathijssen RHJ, Koolen SLW, Jager A. Inhibiting CDK4/6 in Breast Cancer with Palbociclib, Ribociclib, and Abemaciclib: Similarities and Differences. *Drugs* 2021;81(3):317–31.
68. Dhillon S. Palbociclib: first global approval. *Drugs* 2015;75:543–51.
69. Thill M, Schmidt M. Management of adverse events during cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK4/6) inhibitor-based treatment in breast cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2018;10:1758835918793326.
70. Roberts PJ, Bisi JE, Strum JC, Combest AJ, Darr DB, Usary JE, Zamboni WC, Wong KK, Perou CM, Sharpless NE. Multiple roles of cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:476–87.
71. Smyth LM, Tamura K, Oliveira M, Ciruelos EM, Mayer IA, Sablin MP. Capivasertib, an AKT Kinase Inhibitor, as Monotherapy or in Combination with Fulvestrant in Patients with AKT1E17K-Mutant, ER-Positive Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2020;26(15):3947–57.
72. Jabbarzadeh Kaboli P, Salimian F, Aghapour S, Xiang S, Zhao Q, Li M, Wu X, Du F, Zhao Y, Shen J, Cho CH, Xiao Z. Akt-targeted therapy as a promising strategy to overcome drug resistance in breast cancer - A comprehensive review from chemotherapy to immunotherapy. *Pharmacol Res* 2020;156:104806.
73. Peng Y, Wang Y, Zhou C, Mei W, Zeng C. PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway? *Front Oncol* 2022;12:819128.

74. Wood LW, Shillitoe EJ. Effect of a caspase inhibitor, zVADfmk, on the inhibition of breast cancer cells by herpes simplex virus type 1. *Cancer Gene Ther* 2011;18(10):685–94.
75. Dhani S, Zhao Y, Zhivotovsky B. A long way to go: caspase inhibitors in clinical use. *Cell Death Dis* 2021;12(10):949.
76. Ho D, Lowenstein EJ. Fowler's Solution and the Evolution of the Use of Arsenic in Modern Medicine. *Skinmed* 2016;14(4):287–9.
77. 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.
78. Paprocka R, Wiese-Szadkowska M, Janciauskiene S, Kosmalski T, Kulik M, Helmin-Basa A. Latest developments in metal complexes as anticancer agents. *Coord Chem Rev* 2022. 452:214307.
79. Desoize B. Metals and metal compounds in cancer treatment. *Anticancer Res* 2004;24(3a):1529–44.
80. Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)* 2011;3(1):1351–71.
81. McFarland SA, Mandel A, Dumoulin-White R, Gasser G. Metal-based photosensitizers for photodynamic therapy: the future of multimodal oncology? *Curr Opin Chem Biol* 2020;56:23–7.
82. Ali KA, Abd-Elzaher MM, Mahmoud K. Synthesis and anticancer properties of silver(I) complexes containing 2,6-Bis(substituted)pyridine derivatives. *Int J Med Chem* 2013;2013:256836.
83. Bertolasi V, Rana BK, Nandy A, Bielawski CW, Saha KD, Dinda J. Novel Gold(I)– and Gold(III)–N-Heterocyclic Carbene Complexes: Synthesis and Evaluation of Their Anticancer Properties. *Organometallic* 2014;33(10):2544–8.
84. Hussain A, AlAjmi MF, Rehman MT, Amir S, Husain FM, Alsalmeh A, Siddiqui MA, AlKhedhairi AA, Khan RA. Copper(II) complexes as potential anticancer and Nonsteroidal anti-inflammatory agents: *In vitro* and *in vivo* studies. *Sci Rep* 2019;9(1):5237.
85. Rafique S, Idrees M, Nasim A, Akbar H, Athar A. Transition Metal Complexes as Potential Therapeutic Agents. *Biotechnol Mol Biol Rev* 2010;5(2):38–45.
86. Melnik M, Mikuš P. Structural Aspects of Monomeric Platinum Coordination Complexes *MSA* 2014;5:512–47.
87. Muhammad N, Guo Z. Metal-Based anticancer chemotherapeutic agents. *Curr Opin Chem Biol* 2014;19:144–53.
88. Brabec V, Kasparikova J. Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist Updat* 2005;8(3):131–46.
89. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965;205:698–9.
90. Rosenberg B, Van Camp L. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. *Cancer Res* 1970;30(6):1799–802.
91. Rosenberg B. Platinum coordination complexes in cancer chemotherapy. *Sci Nat* 1973;60(9):399–406.
92. Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer* 1998;34(10):1522–34.
93. Dilruba S, Kalayda GV. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;77(6):1103–24.

94. Buß I, Hamacher A, Sarin N, Kassack MU, Kalayda GV. Relevance of copper transporter 1 and organic cation transporters 1-3 for oxaliplatin uptake and drug resistance in colorectal cancer cells. *Metallomics* 2018;10(3):414–25.
95. Shu X, Xiong X, Song J, He C, Yi C. Base-Resolution Analysis of Cisplatin-DNA Adducts at the Genome Scale. *Angew Chem Int Ed Engl* 2016;55(46):14246–49.
96. Suchánková T, Kubíček K, Kašpárková J, Brabec V, Kozelka J. Platinum-DNA interstrand crosslinks: molecular determinants of bending and unwinding of the double helix. *J Inorg Biochem* 2012;108:69–79.
97. Veclani D, Tolazzi M, Cerón-Carrasco JP, Melchior A. Intercalation Ability of Novel Monofunctional Platinum Anticancer Drugs: A Key Step in Their Biological Action. *J Chem Inf Model* 2021;61(9):4391–9.
98. Grant Collins J, Wheate NJ. Potential adenine and minor groove binding platinum complexes. *J Inorg Biochem* 2004;98(10):1578–84.
99. Murade CU, Shubeita GT. A fluorescent reporter on electrostatic DNA-ligand interactions. *Biomed Opt Express* 2021;13(1):159–67.
100. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids* 2010;2010:201367.
101. Kumar S, Tchounwou PB. Molecular mechanisms of cisplatin cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Oncotarget* 2015;6(38):40734–46.
102. Xu Y, Ma HB, Fang YL, Zhang ZR, Shao J, Hong M, Huang CJ, Liu J, Chen RQ. Cisplatin-induced necroptosis in TNF α dependent and independent pathways. *Cell Signal* 2017;31:112–23.
103. Brabec V, Kasparkova J, Menon V, Farrell N. Polynuclear platinum complexes. Structural diversity and DNK binding. *Metallo-Drugs: Development and Action of Anticancer Agents*, Chapter 2. De Gruyter 2018;43–8.
104. Arsenijevic M, Milovanovic M, Jovanovic S, Arsenijevic N, Markovic BS, Gazdic M, Volarevic V. *In vitro* and *in vivo* anti-tumor effects of selected platinum(IV) and dinuclear platinum(II) complexes against lung cancer cells. *J Biol Inorg Chem* 2017;22(6):807–17.
105. Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev* 2012;64(3):706–21.
106. Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans* 2010;39(35):8113–27.
107. Danişman-Kalındemirtaş F, Kariper İA, Erdemir G, Sert E, Erdem-Kuruca S. Evaluation of anticancer effects of carboplatin-gelatin nanoparticles in different sizes synthesized with newly self-assembly method by exposure to IR light. *Sci Rep* 2022;12(1):10686.
108. Ibrahim A, Hirschfeld S, Cohen MH, Griebel DJ, Williams GA, Pazdur R. FDA drug approval summaries: oxaliplatin. *Oncologist* 2004;9(1):8–12.
109. Rothenberg ML, Oza AM, Bigelow RH, Berlin JD, Marshall JL, Ramanathan RK, Hart LL, Gupta S, Garay CA, Burger BG, Le Bail N, Haller DG. Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J Clin Oncol* 2003;21(11):2059–69.
110. Mi Q, Shu S, Yang C, Gao C, Zhang X, Luo X, Bao C, Zhang X, Niu J. Current Status for Oral Platinum (IV) Anticancer Drug Development. *Int j med phys clin eng radiat oncol* 2018;7:231–47.
111. Kelland L. Broadening the clinical use of platinum drug-based chemotherapy with new analogues: satraplatin and picoplatin. *Expert Opin Investig Drugs* 2007;16(7):1009–21.

112. Avramović N, Ignjatović N, Savić A. Platinum and ruthenium complexes as promising molecules in cancer therapy. *Srp Arh Celok Lek* 2019;147(1–2): 105–9.
113. Boulikas T. Clinical overview on Lipoplatin: a successful liposomal formulation of cisplatin. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(8):1197–218.
114. Rosa NMP, Ferreira FHDC, Farrell NP, Costa LAS. TriplatinNC and Biomolecules: Building Models Based on Non-covalent Interactions. *Front Chem* 2019;7:307.
115. Rossof AH, Slayton RE, Perlia CP. Preliminary clinical experience with cis-diamminedichloroplatinum (II) (NSC 119875, CACP). *Cancer* 1972;30:1451–6.
116. Martín M. Platinum compounds in the treatment of advanced breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2001;2(3):190–208.
117. Sledge GW Jr, Loehrer PJ Sr, Roth BJ, Einhorn LH. Cisplatin as first-line therapy for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1988;6(12):1811–4.
118. Icli F, Akbulut H, Onur H, Yalcin B, Demirkazik A, Senler FÇ. Adjuvant oral etoposide plus cisplatin (EoP) following sequential doxorubicin/cyclophosphamide (AC) and docetaxel (T) in early breast cancer patients with 4 or more positive lymph nodes (10 years follow-up). *Breast* 2011;20(2):155–7.
119. Icli F, Akbulut H, Uner A, Yalcin B, Baltali E, Altinbas M, Coşkun S, Komurcu S, Erkisi M, Demirkazik A, Senler FC, Sencan O, Büyükcelik A, Boruban C, Onur H, Zengin N, Sak SD. Cisplatin plus oral etoposide (EoP) combination is more effective than paclitaxel in patients with advanced breast cancer pretreated with anthracyclines: a randomised phase III trial of Turkish Oncology Group. *Br J Cancer* 2005 28;92(4):639–44.
120. Lekakis L, Tryfonopoulos D, Pistamatzi N, Panopoulos C, Koumakis G, Demiri S, Efremidis A. Salvage chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil in metastatic breast cancer. Particular activity against liver metastases. *Anticancer Res* 2012;32(5):1833–7.
121. Elserafi MM, Zeeneldin AA, Abdelsalam IM, Nassar HR, Moneer MM, Buhoush WH. First-line paclitaxel and cisplatin used sequentially or in combination in metastatic breast cancer: A phase II randomized study. *J Egypt Natl Canc Inst* 2018;30(1):13–20.
122. Vassilomanolakis M, Koumakis G, Barbounis V, Demiri M, Panopoulos C, Chrissohoou M, Apostolikas N, Efremidis AP. First-line chemotherapy with docetaxel and cisplatin in metastatic breast cancer. *Breast* 2005;14(2):136–41.
123. Ozkan M, Berk V, Kaplan MA, Benekli M, Coskun U, Bilici A, Gumus M, Alkis N, Dane F, Ozdemir NY, Colak D, Dikilitas M. Gemcitabine and cisplatin combination chemotherapy in triple negative metastatic breast cancer previously treated with a taxane/anthracycline chemotherapy; multicenter experience. *Neoplasma*. 2012;59(1):38–42.
124. Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, Pegram MD, Howell SB, Slamon DJ. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1994;9(7):1829–38.
125. Pegram M, Hsu S, Lewis G, Pietras R, Beryt M, Sliwkowski M, Coombs D, Baly D, Kabbinnavar F, Slamon D. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 1999;18(13):2241–51.
126. Merkul E, Sijbrandi NJ, Muns JA, Aydin I, Adamzek K, Houthoff HJ, Nijmeijer B, Van Dongen GAMS. First platinum(II)-based metal-organic linker technology (Lx®) for a plug-and-play development of antibody-drug conjugates (ADCs). *Expert Opin Drug Deliv* 2019;16(8):783–93.
127. Pandey JGP, Balolong-Garcia JC, Cruz-Ordinario MVB, Que FVF. Triple negative breast cancer and platinum-based systemic treatment: a meta-analysis and systematic review. *BMC Cancer* 2019;19(1):1065.

128. Berrada N, Delalogue S, André F. Treatment of triple-negative metastatic breast cancer: toward individualized targeted treatments or chemosensitization? *Ann Oncol* 2010;21(7):30–5.
129. Blum JL, Flynn PJ, Yothers G, Asmar L, Geyer CE Jr, Jacobs SA, Robert NJ, Hopkins JO, O'Shaughnessy JA, Dang CT, Gómez HL, Fehrenbacher L, Vukelja SJ, Lyss AP, Paul D, Brufsky AM, Jeong JH, Colangelo LH, Swain SM, Mamounas EP, Jones SE, Wolmark N. Anthracyclines in Early Breast Cancer: The ABC Trials-USOR 06-090, NSABP B-46-I/USOR 07132, and NSABP B-49 (NRG Oncology). *J Clin Oncol* 2017;35(23):2647–55.
130. Costa RLB, Gradishar WJ. Triple-Negative Breast Cancer: Current Practice and Future Directions. *J Oncol Pract* 2017;13(5):301–3.
131. von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, Blohmer JU, Jackisch C, Paepke S, Gerber B, Zahm DM, Kümmel S, Eidtmann H, Klare P, Huober J, Costa S, Tesch H, Hanusch C, Hilfrich J, Khandan F, Fasching PA, Sinn BV, Engels K, Mehta K, Nekljudova V, Untch M. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014;15(7):747–56.
132. Abu-Surrah AS, Kettunen M. Platinum group antitumor chemistry: Design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin. *Curr Med Chem* 2006;13:1337–57.
133. Abu-Surrah A, Al-Sa'doni H, Abdalla M. Palladium-based chemotherapeutic agents: Routes toward complexes with good antitumor activity. *Cancer Ther* 2008;6:1.
134. Carneiro TJ, Martins AS, Marques MPM, Gil AM. Metabolic Aspects of Palladium(II) Potential Anti-Cancer Drugs. *Front Oncol* 2020;10:59097.
135. Valentini A, Conforti F, Crispini A, De Martino A, Condello R, Stellitano C, Rotilio G, Ghedini M, Federici G, Bernardini S, Pucci D. Synthesis, oxidant properties, and antitumoral effects of a heteroleptic palladium(II) complex of curcumin on human prostate cancer cells. *J Med Chem* 2009;52(2):484–9.
136. Ulukaya E, Ari F, Dimas K, Ikitimur EI, Guney E, Yilmaz VT. Anti-cancer activity of a novel palladium(II) complex on human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Med Chem* 2011;46(10):4957–63.
137. Huq F, Tayyem H, Beale P, Yu JQ. Studies on the activity of three palladium(II) compounds of the form: trans-PdL₂Cl₂ where L=2-hydroxypyridine, 3-hydroxypyridine, and 4-hydroxypyridine. *J Inorg Biochem* 2007;101(1):30–5.
138. Feizi-Dehnaeybi M, Dehghanian E, Mansouri-Torshizi H. A novel palladium(II) antitumor agent: Synthesis, characterization, DFT perspective, CT-DNA and BSA interaction studies via *in-vitro* and *in-silico* approaches. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2021;249:119215.
139. Nogueira L, Tracey AT, Alvim R, Reisz P, Scherz A, Coleman JA, Kim K. Developments in Vascular-Targeted Photodynamic Therapy for Urologic Malignancies. *Molecules* 2020;25(22):5417.
140. Ethirajan M, Chen Y, Joshi P, Pandey RK. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* 2011;40(1):3406–2.
141. Vojtek M, Marques MPM, Ferreira IMPLVO, Mota-Filipe H, Diniz C. Anticancer activity of palladium-based complexes against triple-negative breast cancer. *Drug Discov Today* 2019;24(4):1044–58.
142. Dehghan Esmatabadi MJ, Bozorgmehr A, Hajjari SN, Sadat Sombolestani A, Malekshahi ZV, Sadeghizadeh M. Review of new insights into antimicrobial agents. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2017;63(2):40–8.

143. Sarkar P, Yarlagadda V, Ghosh C, Haldar J. A review on cell wall synthesis inhibitors with an emphasis on glycopeptide antibiotics. *Medchemcomm* 2017;8(3):516–33.
144. Hooper DC. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 2001;32 Suppl 1:S9–S15.
145. Frazier AD, Champney WS. Impairment of ribosomal subunit synthesis in aminoglycoside-treated ribonuclease mutants of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 2012;194(12):1033–41.
146. Vázquez-Laslop N, Mankin AS. How Macrolide Antibiotics Work. *Trends Biochem Sci*. 2018;43(9):668–84.
147. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms* 2020;8(11):1716.
148. Hardie KR, Fenn SJ. JMM profile: rifampicin: a broad-spectrum antibiotic. *J Med Microbiol* 2022;71(8).
149. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 2016;4(2):10.
150. World Health Organization. Antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. World Health Organization (WHO), Geneva, 2019. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240000193>
151. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81.
152. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol* 2019;10:539.
153. Claudel M, Schwarte JV, Fromm KM. New Antimicrobial Strategies Based on Metal Complexes. *Chemistry* 2020;2(4):849–99.
154. Gasser G, Metzler-Nolte N. The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Curr Opin Chem Biol* 2012;16(1–2):84–91.
155. Tkacheva V, Sharutin V, Sharutina OK, Shlepotina NM, Kolesnikov OL, Shishkova Yu S, Peshikova MV. Tetravalent Platinum Complexes: Synthesis, Structure, and Antimicrobial Activity. *Russ J Gen Chem* 2020;90(4):655–9.
156. Chlumsky O, Purkrtova S, Michova H, Sykorova H, Slepicka P, Fajstavr D, Ulbrich P, Viktorova J, Demnerova K. Antimicrobial Properties of Palladium and Platinum Nanoparticles: A New Tool for Combating Food-Borne Pathogens. *Int J of Mol Sci* 2021;22(15):7892.
157. Vaidya MY, McBain AJ, Butler JA, Banks CE, Whitehead KA. Antimicrobial Efficacy and Synergy of Metal Ions against *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Planktonic and Biofilm Phenotypes. *Sci Rep* 2017; 7(1):5911.
158. Cho KH, Park EJ, Osaka T, Park S. The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochim Acta* 2005;51(5):956–60.
159. Itohiya H, Matsushima Y, Shirakawa S, Kajiyama S, Yashima A, Nagano T, Gomi K. Organic resolution function and effects of platinum nanoparticles on bacteria and organic matter. *PLoS ONE* 2019;14(9):e0222634.
160. Elhusseiny AF, Hassan HH. Antimicrobial and antitumor activity of platinum and palladium complexes of novel spherical aramides nanoparticles containing flexibilizing

- linkages: structure-property relationship. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2013;103:232–45.
161. Lunagariya MV, Thakor KP, Varma RR, Waghela BN, Pathak C, Patel MN. Correction: Synthesis, characterization and biological application of 5-quinoline 1,3,5-trisubstituted pyrazole based platinum(II) complexes. *Medchemcomm* 2018;9(2):383–4. Erratum for: *Medchemcomm* 2017;9(2):282–98.
 162. Sharma NK, Ameta RK, Singh M. From Synthesis to Biological Impact of Pd (II) Complexes: Synthesis, Characterization, and Antimicrobial and Scavenging Activity. *Biochem Res Int* 2016;2016:4359375.
 163. Guerra W, de Andrade Azevedo E, de Souza Monteiro AR, Bucciarelli-Rodriguez M, Chartone-Souza E, Nascimento AM, Fontes AP, Le Moyec L, Pereira-Maia EC. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of three palladium(II) complexes of tetracyclines. *J Inorg Biochem* 2005;99(12):2348–54.
 164. Juribašić M, Molčanov K, Kojić-Prodić B, Bellotto L, Kralj M, Zani F, Tušek-Božić L. Palladium(II) complexes of quinolinylaminophosphonates: synthesis, structural characterization, antitumor and antimicrobial activity. *J Inorg Biochem* 2011;105(6):867–79.
 165. Radić GP, Glođović VV, Radojević ID, Stefanović OD, Čomić LR, Ratković ZR, Valkonen A, Rissanen K, Trifunović RS. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl derivatives of thiosalicylic acids: Crystal structure of the bis(S-benzyl-thiosalicylate)–palladium(II) complex, [Pd(S-bz-thiosal)₂]. *Polyhedron* 2012;31(1): 69–76.
 166. Komeda S, Kalayda GV, Lutz M, Spek AL, Yamanaka Y, Sato T, Chikuma M, Reedijk J. New isomeric azine-bridged dinuclear platinum(II) complexes circumvent cross-resistance to cisplatin. *J Med Chem* 2003;46(7):1210–9.
 167. Živković MD, Ašanin DP, Rajković S, Djuran MI. Hydrolysis of the amide bond in N-acetylated L-methionylglycine catalyzed by various platinum(II) complexes under physiologically relevant conditions. *Polyhedron* 2011;30: 947–52.
 168. Rajković S, Živković DM, Djuran IM. Reactions of Dinuclear Platinum(II) Complexes with Peptides. *Curr Protein Pept Sci.* 2016; 17 (2): 95–105.
 169. Ašanin DP, Živković MD, Rajković S, Waržajtis B, Rychlewska U, Djuran MI. Crystallographic evidence of anion π interactions in the pyrazine bridged {[Pt(en)Cl]₂(μ -pz)}Cl₂ complex and a comparative study of the catalytic ability of mononuclear and binuclear platinum(II) complexes in the hydrolysis of N-acetylated L methionylglycine, *Polyhedron* 2013;51: 255–62.
 170. Torres E, DiLabio GA. A (Nearly) Universally Applicable Method for Modeling Noncovalent Interactions Using B3LYP. *J Phys Chem Lett* 2012;3(13):1738–44.
 171. Franich AA, Živković MD, Milovanović J, Arsenijević D, Arsenijević A, Milovanović M, Djuran MI, Rajković S. In vitro cytotoxic activities, DNA- and BSA-binding studies of dinuclear palladium(II) complexes with different pyridine-based bridging ligands. *J Inorg Biochem* 2020;210:111158.
 172. Živković MD, Rajković S, Glišić BĐ, Drašković NS, Djuran MI. Hydrolysis of the amide bond in histidine- and methionine-containing dipeptides promoted by pyrazine and pyridazine palladium(II)-aqua dimers: Comparative study with platinum(II) analogues. *Bioorg Chem* 2017;72:190–8.
 173. Tikhomirov R, Demidov V, Kasyanenko N. Study of DNA interaction with cobalt disulfophthalocyanine. *J Phys* 2018; Conf. Ser. 1038:012026.

174. Galindo-Murillo R, Cheatham TE. Ethidium bromide interactions with DNA: an exploration of a classic DNA-ligand complex with unbiased molecular dynamics simulations. *Nucleic Acids Res* 2021;49(7):3735–47.
175. Lakowicz JR. 2006. Introduction to Fluorescence: In Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed: Springer New York Publishing, NY, USA, 2006.
176. Bi S, Pang B, Zhao T, Wang T, Wang Y, Yan L. Binding characteristics of salbutamol with DNA by spectral methods. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2013;111:182–7.
177. Bayly CI, Cieplak P, Cornell WD, Kollman PA. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J Phys Chem* 1993;97(40):10269–80.
178. Drew HR, Wing RM, Takano T, Broka C, Tanaka S, Itakura K, Dickerson RE. Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78(4):2179–83.
179. Bujacz A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2012;68(Pt 10):1278–89.
180. Wang ZM, Ho JX, Ruble JR, Rose J, Rüker F, Ellenburg M, Murphy R, Click J, Soistman E, Wilkerson L, Carter DC. Structural studies of several clinically important oncology drugs in complex with human serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(12):5356–74.
181. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 2009;30(16):2785–91.
182. Dassault Systemes BIOVIA. Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San Diego, 2016.
183. Danciu C, Oprean C, Coricovac DE, Andreea C, Cimpean A, Radeke H, Soica C, Dehelean C. Behaviour of four different B16 murine melanoma cell sublines: C57BL/6J skin. *Int J Exp Pathol* 2015;96(2):73–80.
184. Potez M, Trappetti V, Bouchet A, Fernandez-Palomo C, Güç E, Kilarski WW, Hlushchuk R, Laissue J, Djonov V. Characterization of a B16-F10 melanoma model locally implanted into the ear pinnae of C57BL/6 mice. *PLoS One* 2018;13(11):e0206693.
185. Avram S, Coricovac DE, Pavel IZ, Pinzaru I, Ghiulai R, Baderca F, Soica C, Muntean D, Branisteanu DE, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Dehelean CA. Standardization of A375 human melanoma models on chicken embryo chorioallantoic membrane and Balb/c nude mice. *Oncol Rep* 2017;38(1):89–99.
186. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis* 2010;32(1–2):35–48.
187. Cailleau R, Olivé M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 1978;14(11):911–5.
188. Jung KH, Lee JH, Park JW, Kim DH, Moon SH, Cho YS, Lee KH. Targeted therapy of triple negative MDA-MB-468 breast cancer with curcumin delivered by epidermal growth factor-conjugated phospholipid nanoparticles. *Oncol Lett* 2018;15(6):9093–100.
189. DuPré SA, Redelman D, Hunter KW Jr. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int J Exp Pathol*. 2007;88(5):351–60.
190. Schrörs B, Boegel S, Albrecht C, Bukur T, Bukur V, Holtsträter C, Ritzel C, Manninen K, Tadmor AD, Vormehr M, Sahin U, Löwer M. Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. *Front Oncol* 2020;10:1195.

191. Wang G, Zhang X, Liu X, Zheng J. Co-culture of human alveolar epithelial (A549) and macrophage (THP-1) cells to study the potential toxicity of ambient PM_{2.5}: a comparison of growth under ALI and submerged conditions. *Toxicol Res (Camb)* 2020;9(5):636–51.
192. Stankevicius V, Kuodyte K, Schweigert D, Bulotiene D, Paulauskas T, Daniunaite K, Suziedelis K. Gene and miRNA expression profiles of mouse Lewis lung carcinoma LLC1 cells following single or fractionated dose irradiation. *Oncol Lett* 2017;13(6):4190–200.
193. Zhang K, Na T, Wang L, Gao Q, Yin W, Wang J, Yuan BZ. Human diploid MRC-5 cells exhibit several critical properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Vaccine* 2014;32(50):6820–7.
194. 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.
195. Bostan M, Petrică-Matei GG, Ion G, Radu N, Mihăilă M, Hainăroșie R, Brașoveanu LI, Roman V, Constantin C, Neagu MT. Cisplatin effect on head and neck squamous cell carcinoma cells is modulated by ERK1/2 protein kinases. *Exp Ther Med* 2019;18(6):5041–51.
196. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018;2018 (6).
197. Parhamifar L, Andersen H, Moghimi SM. Lactate Dehydrogenase Assay for Assessment of Polycation Cytotoxicity. *Methods Mol Biol* 2019;1943:291–9.
198. Egger AE, Rappel C, Jakupec MA, Hartinger CG, Heffeter P, Keppler BK. Development of an experimental protocol for uptake studies of metal compounds in adherent tumor cells. *J Anal At Spectrom* 2009;24(1):51–61.
199. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* 2017;7:4271.
200. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST reading guide for broth microdilution V 3.0. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2021.
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/MIC_testing/Reading_guide_BMD_v_3.0_2021.pdf
201. Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J, the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document E.DEF 7.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. Copenhagen: EUCAST/AFST, 2017.
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAS_T_E_Def_7_3_1_Yeast_testing_definitive.pdf
202. International Standard, ISO 20776–1. Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices—Part 1: Broth Micro-Dilution Reference Method for Testing the *In Vitro* Activity of Antimicrobial Agents Against Rapidly Growing Aerobic Bacteria Involved in Infectious Diseases. 2nd ed. International Organization for Standardization; Geneva, Switzerland, 2019.
203. Kolarevic S, Milovanović D, Avdović M, Oalde M, Kostić J, Sunjong K, Nikolić B, Knežević-Vukčević J, Vuković-Gaćić B. Optimisation of the microdilution method for detection of minimum inhibitory concentration values in selected bacteria. *Bot Serbica* 2016;40(1): 29–36.

204. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 2007;42(4):321–4.
205. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 1997;272(42):26159–65.
206. Lakshmanan I, Batra SK. Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. *Bio Protoc* 2013;3(6):e374.
207. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* 2016; 2016(11).
208. Kim KH, Sederstrom JM. Assaying Cell Cycle Status Using Flow Cytometry. *Curr Protoc Mol Biol* 2015;111:28.6.1–28.6.11.
209. Jurisevic M, Arsenijevic A, Pantic J, Gajovic N, Milovanovic J, Milovanovic M, Pantić J, Jovanović I, Sabo T, Radosavljević DG, Arsenijević N. The organic ester *O,O'*-diethyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl) propanoate dihydrochloride attenuates murine breast cancer growth and metastasis. *Oncotarget* 2018;9(46):28195–212.
210. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014;740:364–78.
211. Huang D, Savage SR, Calinawan AP, Lin C, Zhang B, Wang P, Starr TK, Birrer MJ, Paulovich AG. A highly annotated database of genes associated with platinum resistance in cancer. *Oncogene* 2021;40(46):6395–405.
212. Živković MD, Kljun J, Ilić-Tomić T, Pavić A, Veselinović A, Manojlović DD, Runić Nikodinović, Turel I. A new class of platinum(II) complexes with the phosphine ligand pta which show potent anticancer activity. *Inorganic Chem Front* 2018;5:39–53.
213. Marković N, Zarić M, Živković MD, Rajković S, Jovanović I, Arsenijević N, Čanović P, Ninković MS. Novel Platinum(II) Complexes Selectively Induced Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells *In Vitro*. *ChemistrySelect* 2019;4 (44): 12971–7.
214. Franich AA, Živković MD, Čočić D, Petrović B, Milovanović M, Arsenijević A, Milovanović J, Arsenijević D, Stojanović B, Djuran MI, Rajković S. New dinuclear palladium(II) complexes with benzodiazines as bridging ligands: interactions with CT-DNA and BSA, and cytotoxic activity. *J Biol Inorg Chem* 2019;24(7):10.
215. Franich AA, Živković MD, Ilić-Tomić T, Đorđević IS, Nikodinović-Runić J, Pavić A, Janjić GV, Rajković S. New minor groove covering DNA binding mode of dinuclear Pt(II) complexes with various pyridine-linked bridging ligands and dual anticancer-antiangiogenic activities. *J Biol Inorg Chem* 2020;25(3):395–409.
216. Konovalov B, Franich AA, Jovanović M, Jurisević M, Gajović N, Jovanović M, Marić V, Jovanović I, Živković MD, Rajković S. Synthesis, DNA-/bovine serum albumin-binding affinity, and cytotoxicity of dinuclear platinum (II) complexes with 1, 6-naphthyridine-bridging ligand. *Appl Organomet Chem* 2020;35(3):e6112.
217. Vasić I, Rajković S, Arsenijević A, Milovanović M, Arsenijević N, Milovanović J, Živković MD. *In vitro* and *in vivo* activity of series of cationic dinuclear Pt(II) complexes. *J Inorg Biochem* 2021;225:111619.
218. Rajković S, Ašanin DP, Živković MD, Djuran ID. Synthesis of different pyrazine-bridged platinum(II) complexes and 1-H NMR study of their catalytic abilities in the hydrolysis of the N-acetylated L-methionylglycine. *Polyhedron* 2013;65:42–7.
219. Rajković S, Rychlewska U, Warżajtis B, Ašanin DP, Živković MD, Djuran MI. Disparate behavior of pyrazine and pyridazine platinum(II) dimers in the hydrolysis of histidine-

- and methionine-containing peptides and unique crystal structure of $\{[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]_2(\mu\text{-pydz})\}\text{Cl}_2$ with a pair of $\text{NH}\cdots\text{Cl}\cdots\text{HN}$ hydrogen bonds supporting the pyridazine bridge. *Polyhedron* 2014;67: 279–85.
220. Senerovic L, Zivkovic M D, Veselinovic A, Pavic A, Djuran M I, Rajkovic S. Synthesis and Evaluation of Series of Diazine-Bridged Dinuclear Platinum(II) Complexes through *in Vitro* Toxicity and Molecular Modeling: Correlation between Structure and Activity of Pt(II) Complexes. *J Med Chem* 2015;58(3):1442–51.
 221. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(8):573–84.
 222. Lazarević T, Rilak A, Bugarčić Ž. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *Eur J Med Chem* 2017;142:8–31.
 223. Shahabadi N, Mohammadi S, Alizadeh R. DNA Interaction Studies of a New Platinum(II) Complex Containing Different Aromatic Dinitrogen Ligands. *Bioinorg Chem Appl* 2011;2011:429241.
 224. Englert K, Hendi R, Robbs PH, Rees NV, Robinson APG, Tucker JHR. Cisplatin adducts of DNA as precursors for nanostructured catalyst materials. *Nanoscale Adv* 2020; 2(10):4491–7.
 225. Dhar S, Nethaji M, Chakravarty AR. Effect of charge transfer bands on the photo-induced DNA cleavage activity of [1-(2-thiazolylazo)-2-naphtholato]copper(II) complexes. *J Inorg Biochem* 2005;99(3):805–12.
 226. Strothkamp KG, Stothkamp RE. Fluorescence Measurements of Ethidium Binding to DNA. *J Chem Educ* 1994;71(1): 77–80.
 227. Konovalov B, Živković MD, Milovanović JZ, Djordjević DB, Arsenijević AN, Vasić IR, Janjić GV, Franich A, Manojlović D, Skrivanj S, Milovanović MZ, Djuran MI, Rajković S. Synthesis, cytotoxic activity and DNA interaction studies of new dinuclear platinum(II) complexes with an aromatic 1,5-naphthyridine bridging ligand: DNA binding mode of polynuclear platinum(II) complexes in relation to the complex structure. *Dalton Trans* 2018;47(42):15091–102.
 228. Komeda S, Moulaei T, Woods KK, Chikuma M, Farrell NP, Williams LD. A third mode of DNA binding: Phosphate clamps by a polynuclear platinum complex. *J Am Chem Soc* 2006 D;128(50):16092–103.
 229. Garbett NC, Hammond NB, Graves DE. Influence of the amino substituents in the interaction of ethidium bromide with DNA. *Biophys J* 2004;87(6):3974–81.
 230. Recio Despaigne AA, Da Silva JG, Da Costa PR, Dos Santos RG, Beraldo H. ROS-Mediated Cytotoxic Effect of Copper(II) Hydrazone Complexes against Human Glioma Cells. *Molecules* 2014;19(11):17202–20.
 231. Qi Y-Y, Liu Y-X, Gan Q, Xiong Y-H, Mao Z-W, Le X-Y. Three new mixed- ligand copper(II) complexes containing glycyl-l-valine and N,N-aromatic heterocyclic compounds: Synthesis, characterization DNA interaction, cytotoxicity and antimicrobial activity. *Appl Organomet Chem* 2018;32(3): e4126.
 232. Larsen MT, Kuhlmann M, Hvam ML, Howard KA. Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. *Mol Cell Ther* 2016;4:3.
 233. Ivanov AI, Christodoulou J, Parkinson JA, Barnham KJ, Tucker A, Woodrow J, Sadler PJ. Cisplatin binding sites on human albumin. *J Biol Chem* 1998;273(24):14721–30.
 234. Topalá T, Bodoki A, Oprean L, Oprean R. Bovine Serum Albumin Interactions with Metal Complexes. *Clujul Med.* 2014;87(4):215–9.
 235. Ascenzi P, Fasano M. Allostery in a monomeric protein: the case of human serum albumin. *Biophys Chem* 2010;148(1–3):16–22.

236. Shi JH, Pan DQ, Wang XX, Liu TT, M. Jiang M, Wang Q. Characterizing the binding interaction between antimalarial artemether (AMT) and bovine serum albumin (BSA): Spectroscopic and molecular docking methods. *J Photochem Photobiol B, Biol* 2016;162:14–23.
237. Shi JH, Zhou KL, Lou YY, Pan DQ. Multi-spectroscopic and molecular modeling approaches to elucidate the binding interaction between bovine serum albumin and darunavir, a HIV protease inhibitor. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2018;188:362–71.
238. Psomas G, Kessissoglou DP. Quinolones and non-steroidal anti-inflammatory drugs interacting with copper(II), nickel(II), cobalt(II) and zinc(II): structural features, biological evaluation and perspectives, *Dalton Trans* 2013;42(18) 6252–76.
239. Rajendiran V, Karthik R, Palaniandavar M, Stoeckli-Evans H, Periasamy VS, Akbarsha MA, Srinag BS, Krishnamurthy H. Mixed-ligand copper(II)-phenolate complexes: effect of coligand on enhanced DNA and protein binding, DNA cleavage, and anticancer activity. *Inorg Chem* 2007;46(20) 8208–21.
240. Vignesh G, Arunachalam S, Vignesh S, James RA. BSA binding and antimicrobial studies of branched polyethyleneiminecopper(II)bipyridine/phenanthroline complexes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2012;96:108–16.
241. Zhang SL, Damu GL, Zhang L, Geng RX, Zhou CH. Synthesis and biological evaluation of novel benzimidazole derivatives and their binding behavior with bovine serum albumin. *Eur J Med Chem* 2012;55:164–75.
242. Jayabharathi J, Thanikachalam V, Venkatesh Perumal M. Mechanistic investigation on binding interaction of bioactive imidazole with protein bovine serum albumin-a biophysical study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2011;79(3):502–7.
243. Abdelhameed AS, Alanazi AM, Bakheit AH, Darwish HW, Ghabbour HA, Darwish IA. Fluorescence spectroscopic and molecular docking studies of the binding interaction between the new anaplastic lymphoma kinase inhibitor crizotinib and bovine serum albumin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2017;171:174–82.
244. Espósito BP, Najjar R. Interactions of antitumoral platinum-group metallodrugs with albumin. *Coordin Chem Rev* 2002;232(1-2):137–49.
245. Bielawska A, Popławska B, Surazyński A, Czarnomysy R, Bielawski K. Cytotoxic efficacy of a novel dinuclear platinum(II) complex in human breast cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2010;643(1):34–41.
246. Dimitrijević Stojanović MN, Franich AA, Jurišević MM, Gajović NM, Arsenijević NN, Jovanović IP. Platinum(II) complexes with malonic acids: Synthesis, characterization, *in vitro* and *in vivo* antitumor activity and interactions with biomolecules. *J Inorg Biochem* 2022;231:111773.
247. Halder S, Peng SM, Lee GH, Chatterjee T, Mukherjee A, Dutta S, Sanyal U, Bhattacharya S. Synthesis, structure, spectroscopic properties and cytotoxic effect of some thiosemicarbazone complexes of palladium. *New J Chem* 2008;32:105–14.
248. Hernández W, Paz J, Carrasco F, Vaisberg A, Spodine E, Manzur J, Hennig L, Sieler J, Blaurock S, Beyer L. Synthesis and Characterization of New Palladium(II) Thiosemicarbazone Complexes and Their Cytotoxic Activity against Various Human Tumor Cell Lines. *Bioinorg Chem Appl* 2013;2013:52470.
249. Özerkan D, Ertik O, Kaya B, Kuruca SE, Yanardag R, Ülküseven B. Novel palladium (II) complexes with tetradentate thiosemicarbazones. Synthesis, characterization, *in vitro* cytotoxicity and xanthine oxidase inhibition. *Invest New Drugs* 2019;37(6):1187–97.
250. Bharadwaj A, Rastogi A, Pandey S, Gupta S, Sohal JS. Multidrug-Resistant Bacteria: Their Mechanism of Action and Prophylaxis. *Biomed Res Int* 2022;2022:5419874.

251. Lemire J, Harrison J, Turner, R. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:371–84.
252. Frei A, Verderosa AD, Elliott AG, Zuegg J, Blaskovich MAT. Metals to combat antimicrobial resistance. *Nat Rev Chem* 2023;7(3):202–24.
253. Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2004;38(6):864–70.
254. Solmaz U, Gumus I, Binzet G, Celik O, Balci GK, Dogen A, Arsian H. Synthesis, characterization, crystal structure, and antimicrobial studies of novel thiourea derivative ligands and their platinum complexes. *J Coord Chem* 2018;71(2):200–18.
255. Kushev D, Gorneva G, Enchev V, Naydenova E, Popova J, Taxirov S, Maneva L, Grancharov K, Spassovska N. Synthesis, cytotoxicity, antibacterial and antitumor activity of platinum(II) complexes of 3-aminocyclohexanespiro-5-hydantoin. *J Inorg Biochem* 2002;89(3-4):203–11.
256. Ajibade PA, Idemudia OG. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Studies of Pd(II) and Pt(II) Complexes of Some Diaminopyrimidine Derivatives. *Bioinorg Chem Appl* 2013;2013:549549.
257. Huigens RW 3rd, Abouelhassan Y, Yang H. Phenazine Antibiotic-Inspired Discovery of Bacterial Biofilm-Eradicating Agents. *Chembiochem* 2019;20(23):2885–902.
258. Raković RI, Radojević DI, Mladenović GK, Popovska Jovičić DB, Petrović S, Čanović PP, Čomić LjR, Čanović SP, Bogojevski J. Antimicrobial, antioxidant and DNA-binding studies of palladium(II) complexes with different chelate ligands containing nitrogen donor atoms. *J Serb Chem Soc* 2018;83 (11) S347–9.
259. Ait-Ramdane-Terbouche C, Terbouche A, Khalfaoui M, Douib CL, Lakhdari H, Lerari D, Bachari K, Mezaoui D, Guégan J, Hauchard D. Synthesis, characterization and molecular modeling of binuclear Pd(II) and Ir(IV) complexes with bis [4-hydroxy-6-methyl-3-((1E)-N-[2-(ethylamino)ethyl]ethanimid. *J Mol Struct* 2018;1170(2):119–30.
260. Ilić RD, Vujić MJ, Radojević ID, Stefanović OD, Čomić RLj, Banković DD, Trifunović RS. Stereospecific ligands and their complexes. Part VIII. Antimicrobial activity of palladium(II) complexes with *O,O'*-dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid. *Hem Ind* 2012; 66 (3) 349–55.
261. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci* 2018;19(2):448.
262. Rabik CA and Dolan ME: Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007;33:9–23.
263. Yılmaz I, Akar OR, Erkisa M, Selvi S, Şengül A, Ulukaya E. Highly Promising Antitumor Agent of a Novel Platinum(II) Complex Bearing a Tetradentate Chelating Ligand. *ACS Med Chem Lett* 2020;11(5):940–8.
264. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Review Mol Pharmacol* 2001;59(4):657–63.
265. Plesca D, Mazumder S, Almasan A. DNA damage response and apoptosis. *Methods Enzymol* 2008;446:107–22.
266. Velma V, Dasari SR, Tchounwou PB. Low Doses of Cisplatin Induce Gene Alterations, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia Cells. *Biomark Insights* 2016;11:113–21.
267. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ* 2017;24:1380–9.
268. Park MS, De Leon M, Devarajan P. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(4):858–65.

269. Feoktistova M, Leverkus M. Programmed necrosis and necroptosis signalling. *FEBS J* 2015;282(1):19–31.
270. Weinlich R, Oberst A, Beere HM, Green DR. Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;18:1273–6.
271. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhoutet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(2):135–47.
272. Degtarev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 2008;4:313–21.
273. Aztopal N, Karakas D, Cevatemre B, Ari F, Iysel C, Daidone MG, Ulukaya E. A trans-platinum(II) complex induces apoptosis in cancer stem cells of breast cancer. *Bioorg Med Chem* 2017;25(1):269–76.
274. Chi Y, Huang S, Liu M, Guo L, Shen X, Wu J. Cyclin D3 predicts disease-free survival in breast cancer. *Cancer Cell Int* 2015;15:89.
275. Keyomarsi K, Tucker SL, Buchholz TA, Callister M, Ding Y, Hortobagyi GN, Bedrosian I, Knickerbocker C, Toyofuku W, Lowe M, Herliczek TW, Bacus SS. Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(20):1566–75.
276. Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, Geng Y, Yu Q, Bhattacharya S, Bronson RT, Akashi K, Sicinski P. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 2004;118(4):477–91.
277. Pang W, Li Y, Guo W, Shen H. Cyclin E: a potential treatment target to reverse cancer chemoresistance by regulating the cell cycle. *Am J Transl Res* 2020;12(9): 5170–87.
278. Silconi ZB, Rosic V, Benazic S, Radosavljevic G, Mijajlovic M, Pantic J, Ratkovic ZR, Radic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, Arsenijevic N, Milovanovic J. The Pt(S-prthiosal)₂ and BCL1 Leukemia Lymphoma: Antitumor Activity *In Vitro* and *In Vivo*. *Int J Mol Sci* 2022;23(15):8161.
279. Chu I, Sun J, Arnaout A, Kahn H, Hanna W, Narod S, Sun P, Tan CK, Hengst L, Slingerland J. p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. *Cell* 2007;128(2):281–94.
280. Zhao H, Faltermeier CM, Mendelsohn L, Porter PL, Clurman BE, Roberts JM. Mislocalization of p27 to the cytoplasm of breast cancer cells confers resistance to anti-HER2 targeted therapy. *Oncotarget* 2014;5(24):12704–14.
281. Katayose Y, Kim M, Rakkar AN, Li Z, Cowan KH, Seth P. Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 1997;57(24):5441–5.
282. Tang M, O'Grady S, Crown J, Duffy MJ. MYC as a therapeutic target for the treatment of triple-negative breast cancer: preclinical investigations with the novel MYC inhibitor, MYCi975. *Breast Cancer Res Treat* 2022;195(2):105–15.
283. García-Gutiérrez L, Delgado MD, León J. MYC Oncogene Contributions to Release of Cell Cycle Brakes. *Genes (Basel)* 2019;10(3):244.
284. Sarwar M, Syed Khaja AS, Aleskandarany M, Karlsson R, Althobiti M, Ødum N, Mongan NP, Dizayi N, Johnson H, Green AR, Ellis IO, Rakha EA, Persson JL. The role of PIP5K1α/pAKT and targeted inhibition of growth of subtypes of breast cancer using PIP5K1α inhibitor. *Oncogene* 2019;38:375–89.
285. Schmid P, Abraham J, Chan S, Wheatley D, Brunt AM, Nemsadze G, Baird RD, Park YH, Hall PS, Perren T, Stein RC, Mangel L, Ferrero JM, Phillips M, Conibear J, Cortes J, Foxley A, de Bruin EC, McEwen R, Stetson D, Dougherty B, Sarker SJ, Prendergast A, McLaughlin-Callan M, Burgess M, Lawrence C, Cartwright H, Mousa K, Turner NC.

- Capivasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Therapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: The PAKT Trial. *J Clin Oncol* 2020;38(5):423–33.
286. Tsai WB, Aiba I, Long Y, Lin HK, Feun L, Savaraj N, Kuo MT. Activation of Ras/PI3K/ERK pathway induces c-Myc stabilization to upregulate argininosuccinate synthetase, leading to arginine deiminase resistance in melanoma cells. *Cancer Res* 2012;72(10):2622–33.
287. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2003; (3):590–603.
288. Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 2003;22:8983–98.
289. Liu R, Chen Y, Liu G, Li C, Song Y, Cao Z, Li W, Hu J, Lu C, Liu Y. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell Death Dis* 2020;11(9):797.
290. Sanghvi CD, Olsen PM, Elix C, Peng SB, Wang D, Chen ZG, Shin DM, Hardcastle KI, MacBeth CE, Eichler JF. Antitumor properties of five-coordinate gold(III) complexes bearing substituted polypyridyl ligands. *J Inorg Biochem* 2013;128:68–76.
291. Moretto J, Chauffert B, Ghiringhelli F, Aldrich-Wright JR, Bouyer F. Discrepancy between *in vitro* and *in vivo* antitumor effects of a new platinum(II) metallointercalator. *Invest New Drugs* 2011;29:1164–76.
292. Kemp S, Wheate NJ, Pisani MJ, Aldrich-Wright JR. Degradation of bidentate-coordinated platinum(II)-based DNA intercalators by reduced L-glutathione. *J Med Chem* 2008;51(9):2787–94.

СКРАЋЕНИЦЕ

AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
B3LYP	<i>Becke, 3-parameter, Lee–Yang–Parr</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAR	<i>Chimeric Antigen Receptor</i>
CDDP	<i>cis-diamminedichloroplatinum(II), Cisplatin</i>
Cdks	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
CKIs	<i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitors</i>
CT-DNK	<i>Calf Thymus-DNK</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte-Associated protein 4</i>
CTR	<i>Cooper Transporter</i>
DBS	<i>Drug Binding Site</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagles Medium</i>
DMF	<i>Dimethylformamide</i>
D₂O	<i>Deuterium Oxide</i>
EtBr	<i>3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridium bromide, Ethidium Bromide</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
en	<i>ethylenediamine</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
HER-2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy</i>
iRNK	<i>informaciona Ribonukleinska kiselina</i>
ibn	<i>isobutylenediamine</i>
LDH	<i>Lactate Dehydrogenase</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MBC	<i>Minimal Bactericidal Concentration</i>
MCL	<i>Mantle Cell Lymphoma</i>
MFC	<i>Minimal Fungicidal Concentration</i>
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
MLKL	<i>Mixed Lineage Kinase domain-Like protein</i>
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OD	<i>Optical Density</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol 3-Phosphate</i>
PD-1	<i>Programmed Cell Death 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Cell Death Ligand 1</i>
pz	<i>pyrazine</i>
pm	<i>pyrimidine</i>
pydz	<i>pyridazine</i>
phz	<i>phenazine</i>
1,2-pn	<i>1,2-propylenediamine</i>
1,3-pd	<i>1,3-propylenediamine</i>

1,3-pnd	<i>1,3-pentanediamine</i>
RNK	<i>Ribonukleinska kiselina</i>
RIPK	<i>Receptor-Interacting serine/threonine-protein Kinase</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SDA	<i>Sabourand Dextrose Agar</i>
TIL	<i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>
TNBC	<i>Triple Negative Breast Cancer</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFR1	<i>Tumour Necrosis Factor Receptor 1</i>
TRAIL R	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
TSP	<i>sodium 3-(trimethylsilyl)propionate</i>
UV-vis	<i>Ultraviolet-visible</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

БИОГРАФИЈА

Сања Зорнић је рођена 08.08.1976, у Крагујевцу. Медицински факултет је уписала школске 1995/96. године у Крагујевцу, а 1998. године наставила студије на Медицинском факултету у Београду, где је дипломирала школске 2001/02. године са просечном оценом 9.14.

Од 2003. до 2006. године је радила као професор стручних предмета у Медицинској школи “Сестре Нинковић” у Крагујевцу. Докторске академске студије из области Имунологија, инфекција и инфламација је уписала 2005. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Од 2006. године ради у Универзитетском клиничком центру Крагујевац, на Инфективној клиници, као клинички лекар.

2011. године је завршила Специјалистичке студије из Микробиологије са паразитологијом на Медицинском факултету Универзитета у Београду, са одличном оценом. Од тада до данас ради као специјалиста Микробиологије са паразитологијом у Универзитетском клиничком центру Крагујевац, на Одељењу за микробиологију.

2021. године је завршила Студије уже специјализације из области Бактериологија на Медицинском факултету Универзитета у Београду и одбранила рад под називом „Резистенција на антибиотике изолата *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* у Клиничком центру Крагујевац у двогодишњем периоду (2018-2020)”, чиме је стекла звање субспецијалисте Бактериологије. Усмени испит на Докторским академским студијама је положила у децембру 2021. године са оценом 10. У новембру 2022. године је пријавила докторску дисертацију са темом “Антитуморска и антимикробна активност новосинтетисаних комплекса платине(II) и паладијума(II)”.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Zornić S**, Simović Marković B, Franich AA, Janjić GV, Jadranin MB, Avdalović J, Rajković S, Živković MD, Arsenijević NN, Radosavljević GD, Pantić J. Characterization, modes of interactions with DNA/BSA biomolecules and anti-tumor activity of newly synthesized dinuclear platinum(II) complexes with pyridazine bridging ligand. *J Biol Inorg Chem* 2023. doi.org/10.1007/s00775-023-02030-0. (M21)
2. **Zornić S**, Simović Marković B, Franich AA, Živković MD, Luković B, Arsenijević NN, Radosavljević GD, Rajković S, Pantić J. Synthesis, characterization, DNA/BSA-binding affinity and biological activity of dinuclear palladium(II) complexes with aromatic *N*-heterocyclic bridging ligand. *J Coord Chem* 2024. doi.org/10.1080/00958972.2023.2301402 (M23)
3. Luković B, Gajić I, Dimkić I, Kekić D, **Zornić S**, Pozder T, Radosavljević S, Opavski N, Kojić M, Ranin L. The first nationwide multicenter study of *Acinetobacter baumannii* recovered in Serbia: emergence of OXA-72, OXA-23 and NDM-1-producing isolates. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020;9(1):101. doi: 10.1186/s13756-020-00769-8. (M21)

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Антитуморска и антимикробна активност новосинтетисаних комплекса платине(II) и паладијума(II)

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 16.01.2024. године.



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

**Антитуморска и антимикробна активност новосинтетисаних комплекса
платине(II) и паладијума(II)**

истоветне.

У Крагујевцу, 16.01.2024. године.



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Сања Зорнић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Антитуморска и антимикробна активност новосинтетисаних комплекса платине(II) и паладијума(II)

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹
припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе

под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 16.01.2024. године



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>