



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Марија А. Петровић

**ЕФЕКТИ НОВОСИНТЕТИСАНИХ КОМПЛЕКСА
ПЛАТИНЕ(IV) НА РАСТ И РАДИООСЕТЉИВОСТ
ЋЕЛИЈА ХУМАНИХ МАЛИГНИХ ТУМОРА *in vitro***

Докторска дисертација

Крагујевац, 2023.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Marija A. Petrović

**EFEKTI NOVOSINTETISANIH KOMPLEKSA PLATINE(IV)
NA RAST I RADIOOSETLJIVOST ĆELIJA HUMANIH
MALIGNIH TUMORA *in vitro***

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2023.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Marija A. Petrović

**THE EFFECTS OF NEWLY SYNTHESIZED PLATINUM(IV)
COMPLEXES ON GROWTH AND RADIOSENSITIZATION
OF HUMAN MALIGNANT TUMOR CELLS *in vitro***

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023.

I Аутор
Име и презиме: Марија Петровић
Даум и место рођења: 17.02.1980.године у Крагујевцу
Садашње запошљење: Универзитетски клинички центар у Крагујевцу
II Докторска дисертација
Наслов: Ефекти новосинтетисаних комплекса платине(IV) на раст и радиоосетљивост ћелија хуманих малигнух тумора <i>in vitro</i>
Број страница: 94
Број слика: 11 слика, 23 графикона, 16 табела
Број библиографских података: 199
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина, генетика
Ментор: Проф. др Данијела Тодоровић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
III Оцена и одбрана
Датум пријаве тезе: 09.11.2017.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-247/16, 04.04.2018.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Проф. др Марко Фолић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Клиничка фармација, председник 2. НС др сци. Сузана Поповић, научни сарадник Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан 3. НС др сци. Александра Ристић-Фира, научни саветник Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
<ol style="list-style-type: none"> 1. ВНС др сци. Сузана Поповић, виши научни сарадник Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник 2. Проф.др Марија Анђелковић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Медицинска биохемија, члан 3. НС др сци. Александра Ристић-Фира, научни саветник Института за нуклеарне науке „Винча“ Универзитета у Београду, члан
Датум одбране дисертације:

I Autor
Ime i prezime: Marija Petrović
Datum i mesto rođena: 17.02.1980.godine u Kragujevcu
Sadašnje zapošljenje: Univerzitetski klinički centar u Kragujevcu
II Doktorska disertacija
Naslov: Efekti novosintetisanih kompleksa platine(IV) na rast i radioosetljivost ćelija humanih malignih tumora in vitro
Broj stranica: 94
Broj slika: 11 slika, 23 grafikona, 16 tabela
Broj bibliografskih podataka: 199
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Medicina, genetika
Mentor: Prof. dr Danijela Todorović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu
III Ocena i odbrana
Datum prijave teze: 09.11.2017.
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske /umetničke disertacije: IV-03-247/16, 04.04.2018.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr Marko Folić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Klinička farmacija, predsednik 2. NS dr sci. Suzana Popović, naučni saradnik Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija, član 3. NS dr sci. Aleksandra Ristić-Fira, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke "Vinča" Univerziteta u Beogradu, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije:
<ol style="list-style-type: none"> 1. VNS dr sci. Suzana Popović, viši naučni saradnik Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija, predsednik 2. Prof.dr Marija Anđelković, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Medicinska biohemija, član 3. NS dr sci. Aleksandra Ristić-Fira, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke "Vinča" Univerziteta u Beogradu, član
Datum odbrane disertacije:

I Autor
Name and surname: Marija Petrovic
Date and place of birth: 17.02.1980.year, in Kragujevac
Current employment: University Clinical Center of Kragujevac
II Doctoral Dissertation
Title: The effects of newly synthesized platinum(IV) complexes on growth and radiosensitization of human malignant tumor cells in vitro
No. of pages: 94
No. of images: 11 pictures, 23 figures, 16 tables
No. of bibliographic data: 199
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine, genetics
Mentor: Prof. dr Danijela Todorović, Associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
III Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 09.11.2017.
Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic: IV-03-247/16, 04.04.2018.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr Marko Folić, Associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Clinical pharmacology, president 2. Dr sci. Suzana Popović, Assistant Research Professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Microbiology and immunology, member 3. Dr sci. Aleksandra Ristić-Fira, Full Research Professor of Institute for nuclear sciences "Vinča" University of Belgrade, member
Commission for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Dr sci. Suzana Popović, Associate Research Professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Microbiology and immunology, president 2. Prof. dr Marija Anđelković, Associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Medical biochemistry, member 3. Dr sci. Aleksandra Ristić-Fira, Full Research Professor of Institute for nuclear sciences "Vinča" University of Belgrade, member
Date of Dissertation Defense:

ЗАХВАЛНИЦА

Докторска дисертација „Ефекти новосинтетисаних комплекса платине(IV) на раст и радиоосетљивост ћелија хуманих малигних тумора in vitro“ је урађена у оквиру пројекта „Преклиничка тестирања биоактивних супстанци“ (ИИИИ41010) и пројекта „Радиосензитивност хуманог генома“ (ОИ 173046) које је финансирало Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

Највећу захвалност дугујем ментору Проф. др Данијели Тодоровић за професионалну и људску помоћ у свим фазама ове дисертације. Неизмерно сам јој захвална на стрпљењу и саветима током мог експерименталног и научног рада.

Члановима комисије, др Сузани Поповић, Проф. др Марији Анђелковић и др Александри Ристић-Фира захваљујем на корисним сугестијама и што су се радо прихватиле оцене овог рада.

Захваљујем се колегама са Института за хемију, Природно математичког факултета у Крагујевцу, Проф. др Срећку Трифуновићу, др Верици Јевтић и др Данијели Стојковић, који су синтетисали комплексе који су били предмет изучавања овог рада.

Такође се захваљујем колегиницама са Института за нуклеарне науке „Винча“, др Отилији Кета, Владани Петковић и др Лели Корићанац, које су учествовале у реализацији дела експеримената у вези са ефектима јонизујућег зрачења.

Велико хвала и Проф. др Дејану Баскићу и Проф. др Драгићу Банковићу на сарадњи, помоћи и корисним саветима, чиме су допринели квалитету ове тезе.

Огњен, Томислав и Татјана су моја покретачка снага. Хвала им на неизмерној љубави и разумевању.

Захвална сам родитељима на безрезервној подршци коју су ми пружили.

Ову тезу посвећујем мојој мајци.

САЖЕТАК

Циљ овог истраживања је да се испита директно цитотоксично дејство и потенцијални механизам деловања новосинтетисаних комплекса платине(IV) на више ћелијских линија хуманих тумора (карцинома плућа-A549, карцинома дојке-MCF-7 и меланома-НТВ140), као и диференцијална цитотоксичност у односу на нормалне, здраве фибробласте плућа-MRC-5. Резултати су упоређени са ефектима цисплатине (cis-Pt). Ћелије су третиране 24h након засејавања, а ефекти анализираних комплекса платине(IV) су праћени 6h, 24h и 48h након третмана концентрацијама у опсегу од 5-100 μ M. Комплекси платине(IV) показују временски и дозно зависну инхибицију раста испитиваних ћелија. Инхибиторни ефекти су веома изражени на A549 и MCF-7 ћелијским линијама, а слаби на НТВ140, због чега су ове ћелије искључене из даљих истраживања. Индекс селективности SI>3 указује на добру селективност комплекса према туморским ћелијама у односу на здраве MRC-5 ћелије. Анализирани комплекси имају статистички значајно антипролиферативно дејство на A549 и MCF-7 ћелијама. Третман IC50 вредностима испитиваних комплекса довео је до апоптотске ћелијске смрти. Процент апоптотских ћелија у третираним узорцима је статистички значајно већи у односу на контроле, достижући максимум 48h након третмана. Индукција апоптозе је повезана са променама у експресији проапоптотског Вах и антиапоптотског Bcl-2 протеина, као и њиховим међусобним односом. Комплекси платине заустављају ћелијски циклус у S фази. Третман A549 и MCF-7 ћелија 1Gy, 2Gy и 4Gy γ зрачења доводи до слабе инхибиције раста. Претретман ових радиорезистентних ћелија анализираним комплексима платине повећава осетљивост ћелија на γ зрачење.

Кључне речи: комплекси платине(IV), цисплатина, антитуморски ефекти, клоногено преживљавање, ћелијски циклус, апоптоза, јонизујуће зрачење

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the direct cytotoxic effect, as well as the potential mechanism of action of the newly synthesized platinum(IV) complexes on several human tumour cell lines (lung cancer-A549, breast cancer-MCF-7 and melanoma-HTB140), as well as the differential cytotoxicity compared to normal, healthy human fibroblasts-MRC-5. The results were compared with the effects of cisplatin (cis-Pt). The cells were treated 24h after seeding and the effects of the analysed platinum(IV) complexes were monitored 6h, 24h and 48h after treatment with concentrations in the range of 5-100 μ M. Platinum(IV) complexes show a time- and dose-dependent growth inhibition of all tested cells. The inhibitory effects are very pronounced on A546 and MCF-7 cell lines, and weak on HTB140 and therefore these cells were excluded from further research. The selectivity index $SI > 3$ indicates a good selectivity of the complex towards tumour cells compared to healthy MRC-5 cells. All analysed complexes showed statistically significant antiproliferative effect on A549 and MCF-7 cells. Treatment with IC50 concentrations of the tested platinum complexes led to apoptotic cell death. The percentage of apoptotic cells was statistically significantly higher compared to untreated controls, reaching a maximum 48h after treatment. Induction of apoptosis is associated with changes in the expression of proapoptotic protein Bax and antiapoptotic protein Bcl-2, as well as their mutual relationship. Platinum(IV) complexes arrested the cell cycle in the S phase. Treatment of A549 and MCF-7 cells with 1Gy, 2Gy and 4Gy of γ radiation results in weak growth inhibition. Pre-treatment of these radioresistant cells with analysed platinum(IV) complexes increases the sensitivity of cells to γ irradiation.

Key words: platinum(IV) complexes, cisplatin, antitumor effects, clonogenic survival, cell cycle, apoptosis, ionizing radiation

САДРЖАЈ

1. УВОД -----	1
1.1. Антитуморска активност цисплатине -----	1
<i>1.1.1. Хемијске карактеристике цисплатине</i> -----	2
<i>1.1.2. Механизам деловања цисплатине</i> -----	2
<i>1.1.2.1. Пролазак цисплатине кроз ћелијску мембрану</i> -----	3
<i>1.1.2.2. Индуkcија оксидационог стреса као механизам дејства цисплатине</i> -----	3
<i>1.1.2.3. Механизам деловања цисплатине на нивоу молекула ДНК</i> -----	5
1.2. Ћелијски циклус -----	6
<i>1.2.1. Ефекти цисплатине на ћелијски циклус</i> -----	8
1.3. Апоптоза -----	9
<i>1.3.1. Механизми апоптозе</i> -----	10
<i>1.3.2. Bcl-2 фамилија протеина</i> -----	11
<i>1.3.3. Поремећај регулације процеса апоптозе</i> -----	12
1.4. Резистенција и нежељени ефекти цисплатине -----	13
<i>1.4.1. Резистенција на цисплатину</i> -----	13
<i>1.4.2. Нежељени ефекти цисплатине</i> -----	14
1.5. Развој нових комплекса платине -----	15
<i>1.5.1. Комплекси(IV) платине</i> -----	16
<i>1.5.2. Комплекси платине са лигандима R₂edda-типа</i> -----	17
1.6. Примена јонизујућег зрачења у терапији канцера -----	19
<i>1.6.1. Биолошки ефекти јонизујућег зрачења</i> -----	19
<i>1.6.2. Комбиновани третмани малигних тумора хемиотерапеутицима и радиотерапијом</i> -----	21
<i>1.6.3. Значај одређивања радиобиолошких параметара у процени одговора тумора на јонизујуће зрачење</i> -----	21
2. ЦИЉ РАДА -----	23
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ -----	24
3.1. Материјал -----	24

3.1.1. Ђелијске линије	24
3.1.2. Раствори цисплатине (<i>cis-Pt</i>) и новосинтетисаних комплекса платине(IV), <i>pentyl-Pt</i> и <i>butyl-Pt</i>	25
3.1.3. Хемикалије	25
3.1.4. Пуфери	26
3.2. МЕТОДЕ	27
3.2.1. Гајење ћелија у култури	27
3.2.2. Одређивање броја вијабилних ћелија и времена њихове дупликације	27
3.2.3. Третман ћелија комплексима платине	28
3.2.4. Озрачивање ћелија у зрацима	28
3.2.5. Комбиновани третман ћелија комплексима платине и у зрацима	28
3.2.6. Микротетразолијум (MTT) есеј	29
3.2.7. Сулфородамин В (SRB) есеј	30
3.2.8. Тест пролиферације - инкорпорација бром-деоксиуридина (BrdU)	30
3.2.9. Клоногени есеј	31
3.2.10. Изоловање геномске ДНК	32
3.2.11. Агарозна гел електрофореза	32
3.2.12. Детерминација апоптозе и некрозе проточном цитометријом	33
3.2.13. Анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом	34
3.2.14. Western blot анализа протеина	34
3.2.15. Статистичка обрада података	35
4. РЕЗУЛТАТИ	36
4.1. Одређивање времена дупликације ћелија	36
4.2. Оптимизација експерименталних услова за <i>in vitro</i> раст ћелија	36
4.3. Цитотоксичност новосинтетисаних комплекса платине(IV) и <i>cis-Pt</i>	37
4.3.1. Одређивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса платине(IV) и <i>cis-Pt</i> помоћу MTT теста	37
4.3.2. Одређивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса платине(IV) и <i>cis-Pt</i> помоћу SRB теста	45
4.3.3. Упоредивање резултата цитотоксичности новосинтетисаних комплекса платине(IV) и <i>cis-Pt</i> добијених помоћу два колориметријска есеја: MTT и SRB теста	51
4.4. Ефекат третмана новосинтетисаним комплексима платине(IV) и <i>cis-Pt</i> на пролиферацију A549 и MCF 7 ћелија	53

4.5. Анализа ћелијске смрти туморских А549 и МСF-7 ћелија након третмана	
комплексима платине (IV) и cis-Pt -----	56
4.5.1. <i>Електрофоретска анализа геномске ДНК</i> -----	56
4.5.2. <i>Детекција и квантификација апоптотских ћелија методом</i>	
<i>проточне цитофлуорометрије</i> -----	57
4.5.3. <i>Анализа експресије протеина који учествују у индукцији процеса апоптозе</i> --	61
4.6. Ефекти третмана новосинтетисаним комплексима платине(IV)	
и cis-Pt на дистрибуцију ћелија по фазама ћелијског циклуса -----	62
4.7. Ефекти γ зрачења, примењеног самостално и у комбинацији са	
испитиваним комплексима платине, на инхибицију раста и преживљавање	
А549 и МСF-7 ћелија -----	63
4.7.1. <i>Ефекти γ зрачења, примењеног самостално и у комбинацији са</i>	
<i>испитиваним комплексима платине, на инхибицију раста А549 и</i>	
<i>МСF-7 ћелија</i> -----	64
4.7.2. <i>Ефекти γ зрачења, примењеног самостално и у комбинацији са</i>	
<i>испитиваним комплексима платине, на клоногено преживљавање А549</i>	
<i>и МСF-7 ћелија</i> -----	67
5. ДИСКУСИЈА -----	71
6. ЗАКЉУЧЦИ -----	81
7. ЛИТЕРАТУРА -----	83

1. УВОД

Цисплатина је један од најефикаснијих и најчешће примењиваних хемиотерапеутика широм света. Цисплатина и друга једињења заснована на платини су цитотоксични лекови који убијају туморске ћелије оштећујући једарну и митохондријску ДНК, инхибирајући репликацију ДНК и митозу и индукујући апоптотску ћелијску смрт (Florea and Busselberg, 2011). С друге стране, цисплатина може да реагује са другим ћелијским компонентама, као што су мембрански фосфолипиди и протеини, микрофиламенти цитоскелета, биомолекули који садрже тиол и протеини цитоплазме, што доводи до смрти ћелије. Нажалост, терапеутски ефекти цисплатине су често ограничени због отпорности - резистенције ћелија која се развија кроз промене у транспорту лекова, детоксикацији, поправци ДНК и активацији сигналних путева апоптозе. Цисплатина показује и значајне нежељене ефекте као што су изражена нефротоксичност, хепатотоксичност и неуротоксичност. Токсичност и резистенција на цисплатину су и даље главне препреке у терапији тумора заснованој на платини. Ово наводи истраживаче да синтетишу нове комплексе аналога цисплатине и других прелазних метала који показују боље ефекте, мању тосичност и резистенцију од цисплатине. Због тога је разумевање механизма деловања и отпорности тумора на овај хемиотерапеутик од пресудне важности у дефинисању стратегија у потрази за новим терапеутицима са побољшаним фармаколошким својствима.

1.1. Антитуморска активност цисплатине

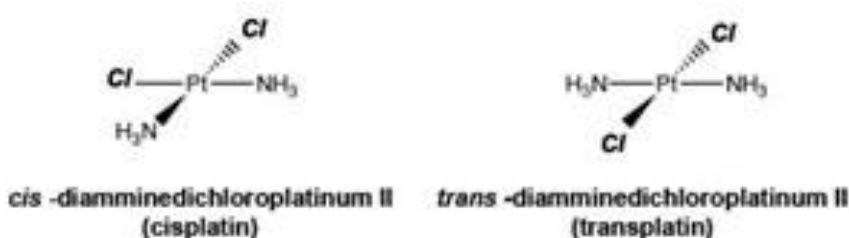
Клиничка употреба цисплатине [cis-diamminedichloroplatinum(II)] одобрена је 1978. године за лечење карцинома тестиса, а данас се налази у протоколима за терапију карцинома тестиса, оваријума, главе и врата, бешике, плућа, карцинома грлића материце, меланома и лимфома. Открићем антиканцерског дејства цисплатине шездесетих година прошлог века, отпочело је ново раздобље хемиотерапије. Иако је ово једињење синтетисао Реугон давне 1845. године, појачано интересовање за његове особине уследило је након случајног откриће Rozenberga и његових сарадника 1971. године. У току експеримента дошло је до формирања комплекса на платинској електроди, који је довео до инхибиције бактеријске деобе. Антиканцерско дејство цисплатине Rozenberg је потврдио и експериментима на мишјем саркому, након чега је цисплатина ушла у клиничку примену 1978. године као лек Platinol.

1.1.1. Хемијске карактеристике цисплатине

Цисплатина је жућкасти кристални прах, умерено растворљив у води, а растворљив у диметилпиримидину и N,N-диметилформаиду. То је неутрални, неоргански молекул са молекуларном тежином од 301,1 g/mol, густином од 3,74g/cm³ и тачком топљења од 270°C. Овај квадратно-планарни комплекс чини јон платине повезан

са две амино групе и два јона хлора (Слика 1). У молекулу цисплатине јони хлора су један поред другог. У комплексима метала платина може да постоји у оксидационим стањима +2 и +4. Амино групе представљају неодлазеће лиганде, а хлоридни јони су одлазећи (лабилни) лиганди. Присуство одлазећих група је од пресудне важности за биолошку активност цисплатине (Drobnik and Horacek, 1973). Када цисплатина уђе у ћелију, долази до замене два јона хлора са лабаво везаним молекулима воде, стварајући реактиван молекул који може да нападне молекул ДНК у једру.

Трансплатина је изомер код кога се јони хлора налазе један наспрам другог (Слика 1) и он изазива различите структурне промене у малигној ћелији од цисплатине. Недостатак фармаколошке активности трансплатине повезује се са формирањем различитих моноадуката који не мењају значајно стабилност и структуру ДНК ланца (Collucia and Natile, 2007).



Слика 1. Хемијска структура цисплатине и трансплатине (Petrović, Todorović, 2016)

1.1.2. Механизам деловања цисплатине

Цисплатина се примењује у терапији као разблажен раствор, у облику споре интравенске инфузије (упутство за лек Cisplatin, Pfizer). У крвотоку је концентрација хлорида релативно висока, па се цисплатина као неутрални молекул преноси до свих ткива и органа. У циркулацији се екстензивно везује за протеине плазме - албумине, трансферин, цистеин, при чему долази до инактивације велике количине примењеног лека (Nagai et al, 1996). Неколико сати након примене, 65-95% лека је везано за протеине плазме (Ivanov et al, 1998).

1.1.2.1. Пролазак цисплатине кроз ћелијску мембрану

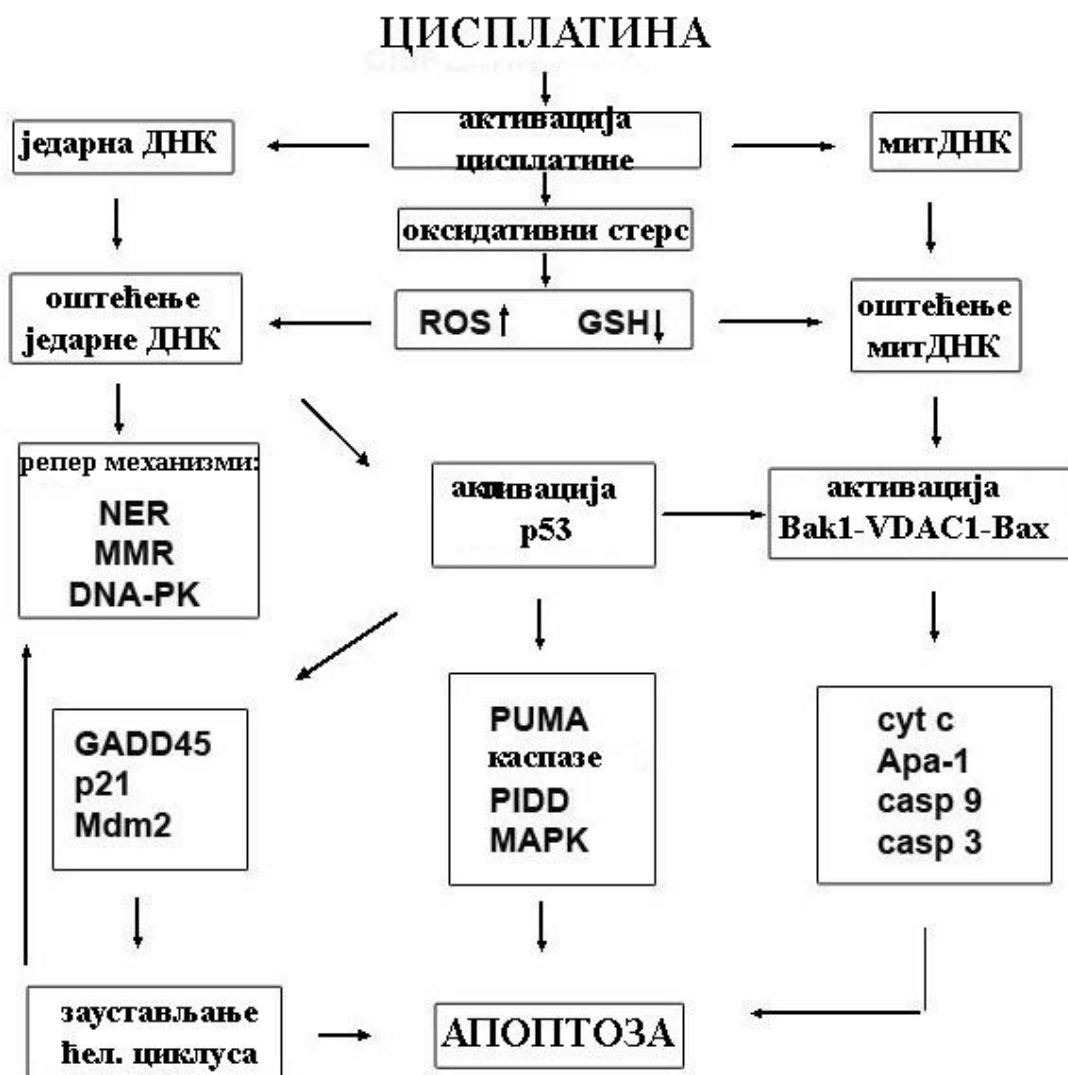
Цисплатина улази у ћелију пасивном дифузијом кроз ћелијску мембрану. Транспортер за бакар типа 1, Ctr1 (eng. copper transporter 1) доприноси уласку цисплатине у ћелију (Ishida et al, 2002). Истраживања су показала да мутације у гену CTR1 доводе до деградације мембранског транспортног протеина за бакар, што за последицу има смањени улазак цисплатине у ћелију и појаву резистенције на лечење

(Holzer et al, 2006). Транспортери за бакар имају значајну улогу и у избацивању цисплатине из ћелије. Гени АТР7А и АТР7В кодирају транспортере за бакар типа P, који су зависни од енергије коју обезбеђују из аденозин трифосфата. Њихова повећана експресија је повезана са резистенцијом на цисплатину *in vitro*, као и код неких малигнитета *in vivo* (Komatsu et al, 2000, Owatari et al, 2007, Kilari et al, 2016).

1.1.2.2. Индуkcија оксидационог стреса као механизам дејства цисплатине

Уласком у ћелију, где је концентрација хлорида релативно ниска, долази до активације цисплатине заменом хлоридних група молекулима воде. Створени моно- и диаква- деривати цисплатине се понашају као потентни електрофили, при чему су моноаква деривати реактивнији. Многе ћелијске компоненте, као што су микрофиламенти цитоскелета, РНК, пептиди и протеини који садрже тиол групу могу реаговати са цисплатином у цитоплазми. Реакција са глутатионом и металотионеином повећава инактивацију лека и доводи до појаве резистенције. Након завршене хидролизе, цисплатина долази до своје примарне мете-једарне ДНК. Нуклеусна ДНК је главно место где цисплатина испољава дејство, иако се само 1% интрацелуларне платине везују за њу (Fuertes et al, 2003)

Оксидативни стрес је један од најзначајнијих механизма укључених у цитотоксичност цисплатине. Цисплатина доводи до повећане продукције реактивних кисеоничних врста (РОС) које могу да доведу до смрти ћелије активацијом неколико сигналних механизма (Слика 2). У физиолошким условима у ћелији постоји равнотежа између стварања слободних радикала и система антиоксидативне заштите (глутатион, супероксид-дисмутаза и каталаза). Под одређеним условима долази до оксидације тиол групе у тиол радикале и повећања оксидативног стреса (Desoize and Madoulet, 2002). У условима оксидативног стреса повећана продукција РОС може довести до оштећења ћелијских протеина, липида и молекула ДНК, при чему се модификују и сигнални путеви укључени у преживљавање ћелије. У зависности од тежине и трајања изложености РОС, могу се активирати путеви за преживљавање ћелије или проапоптотски одговор ћелије. Цисплатина смањује интрацелуларну концентрацију глутатиона (GSH) чија је улога у митохондријама у регулацији унутрашње пермеабилности мембране. Смањење концентрације GSH доводи до формирања хидроксилних радикала и оксидативног стреса што за последицу има промену у транспорту Ca^{2+} и смањење мембранског потенцијала митохондрија (Saad et al, 2014). Реактивне кисеоничне врсте мењају међусобни однос Bcl-2 фамилије протеина, олакшавајући излазак цитохрома Ц из митохондрија, чиме се покреће унутрашњи пут апоптозе (Martindale and Holbrook, 2002) (Слика 2). Слободни радикали могу да покрену и спољашњи пут апоптозе активацијом Fas лиганда и стварањем апоптозома (Gupta et al, 2009). Стварање слободних радикала зависи од концентрације цисплатине и дужине трајања изложености (Brozovic et al, 2010). Веома високе концентрације реактивних врста доводе и до смрти ћелија по типу некрозе и аутофагије (Das et al, 2021).

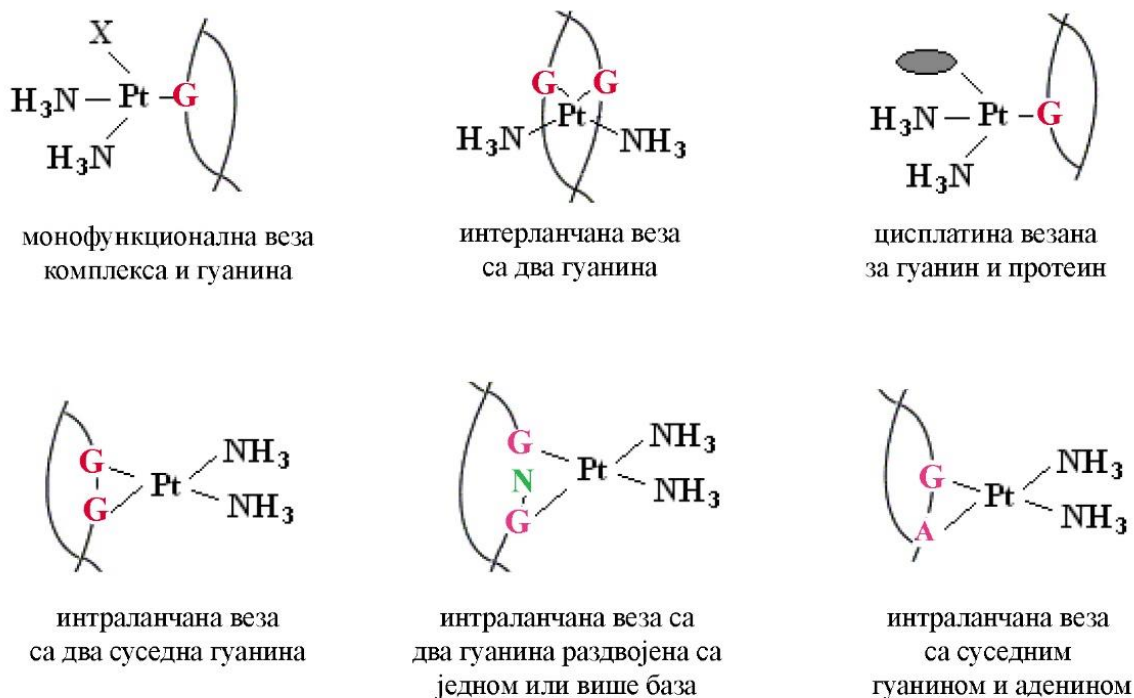


Слика 2. Молекуларни механизми деловања цисплатине

1.1.2.3. Механизам деловања цисплатине на нивоу молекула ДНК

Геномска ДНК је главна мета деловања цисплатине. Везивањем за молекуле ДНК цисплатина остварује своју антитуморску активност. Цисплатина се везује за молекуле ДНК у два корака. Прво се формира веза са азотом N7 гуанина, а затим са гуанином или аденином у истом или наспрамном ланцу. Када се цисплатина веже за базне парове који припадају истом ланцу молекула ДНК реч је о везивању унутар ланца (интраланчано везивање, *eng. intrastrand*), а када базни парови за које се веже цисплатина припадају суседним ланцима молекула ДНК реч је о везивању између ланаца (интерланчано везивање, *eng. interstrand*) (Слика 3). Према атомима N7 цисплатина има највећи афинитет и са њима формира велики број интраланчаних и интерланчаних веза, што доводи до дисторзије ланца ДНК (Baik et al, 2003). Најзаступљеније су везе цисплатине са два нуклеотида гуанина из различитих ланаца, 1,2-d(GpG), које чине око 70%) и веза са једним аденином и једним гуанином из различитих ланаца, d(ApG), које чине око 20% свих лезија (Payet et al, 1993). Све ове лезије доводе до увртања и раздвајања двоструког

хеликса ДНК и последичног губитка функције. На тај начин цисплатина инхибира репликацију и/или транскрипцију ДНК и активира одговарајуће путеве трансдукције сигнала који воде до активације апоптозе (Yen et al, 2005)



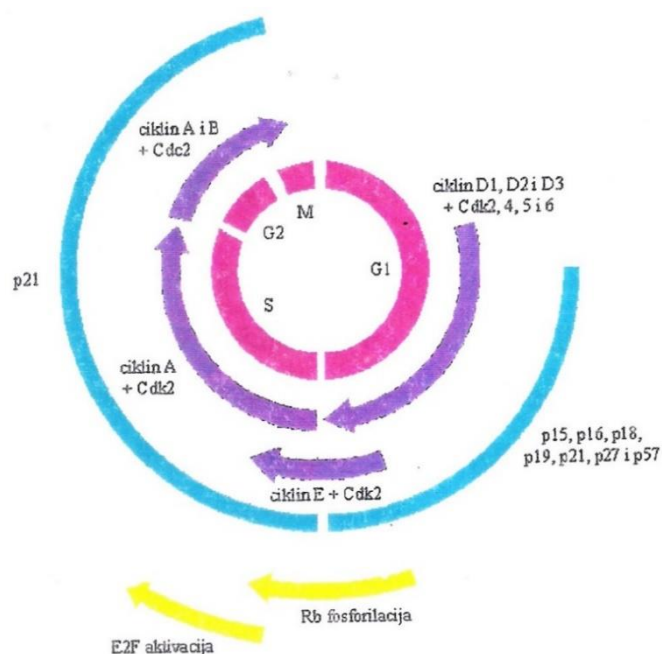
Слика 3. Шематски приказ веза које формирају комплекси цисплатине са ДНК

Протеини са НМГ доменом (eng. high mobility groups) везују се за молекулу ДНК за који је везана и цисплатина и доприносе повећаној цитотоксичности цисплатине. Ово су нехистонски протеини који учествују у организацији хроматина у једру и регулацији експресије гена. Истраживања су показала да ћелије у којима је ген за ове протеине мутиран (нефункционалан) су мање осетљиве на цисплатину (Wozniak and Blasiak, 2002). Везивање НМГ протеина за комплекс ДНК и цисплатине доводи до додатне дисторзије ланца ДНК и спречавања репликације и транскрипције, а са друге стране делују као транскрипциони фактори за индукцију апоптотске ћелијске смрти (Imamura et al, 2001, Yuan et al, 2004).

Централну улогу у механизму дејства многих хемиотерапеутика, па и цисплатине, има протеински продукт р53 гена (Слика 2). Протеин р53 је „чувар генома“, јер у одговору на оштећења на молекулу ДНК активира велики број других гена (р21/waf1, mdm2, GADD45 и друге) који воде до заустављања ћелијског циклуса и активације механизма који исправљају настала оштећења на молекулу ДНК (Siddik, 2003). С друге стране, р53 регулише апоптозу индуковану цисплатином помоћу неколико механизма: активацијом проапоптотских гена PUMA (Jeffers et al, 2003), каспаза (Salvesen and Dixit, 1997), PIDD (Lin et al, 2000), фамилије MAPK протеина (Dassari and Tchounwou, 2014), као и интеракцијом са Bcl-2 фамилијом протеина (Wang et al, 2013). Примарни механизам којим протеин р53 индукује апоптозу је преко транскрипционе активације и репресије циљних гена чији промотори садрже места за везивање р53.

1.2. Ћелијски циклус

Ћелијски циклус обухвата низ сложених биохемијских процеса који се одвијају у ћелији од момента њеног настанка па до деобе на две ћерке-ћелије. Сви ти процеси могу се груписати у 4 фазе ћелијског циклуса: G1, S, G2 и M фазу (Слика 4). У S фази ћелијског циклуса се одвијају процеси удвајања - репликације молекула ДНК, док се у М фази дешава ћелијске деоба - митоза. Фаза G1 је фаза која претходи репликацији и у овој фази се у ћелији синтетишу протеини неопходни за репликацију молекула ДНК. Фаза G2 претходи митози и ћелија се у овој фази припрема за деобу. Између две ћелијске деобе ћелија може да уђе у G0 фазу, у којој обавља функцију за коју је специјализована. Ћелија може остати у G0 фази привремено (неколико сати, дана, месеци или година) или трајно, у зависности од типа ћелија.



Слика 4. Регулација ћелијског циклуса

Ћелијски циклус је добро регулисан, што обезбеђује прецизно удвајање генетичког материјала у ћелији и његову дистрибуцију у ћеркама - ћелијама. У регулацији ћелијског циклуса важну улогу имају циклини и циклин-зависне киназе, Cdks (eng. Cyclin dependent kinases), који омогућују пролазак ћелије из једне фазе у другу (Слика 4). Циклини су протеини који се циклично синтетишу током ћелијског циклуса. Циклин зависне киназе су ензими који припадају серин/треонин киназама и формирају комплексе са циклинима. Фосфорилацијом кључних протеина ови комплекси индукују процесе у ћелијском циклусу. Активност Cdks контролишу њихови инхибитори, CDIs (eng. Cyclin dependent kinase inhibitors), који су подељени у две фамилије: INK4 фамилија (p15, p16, p18, p19 – инхибирају cdk4 cdk6) и CIP/Kip фамилија (p21, p27 p57 – инхибирају cdk-циклин комплекс).

Сви ови процеси су добро контролисани, а прелазак ћелије из једне фазе у другу омогућен је тек пошто су сви процеси карактеристични за претходну фазу у потпуности реализовани. У случају било каквог оштећења молекула ДНК долази до заустављања ћелијског циклуса и активирања контролних механизма (eng, checkpoints), који спречавају репликацију оштећене ДНК (G1 checkpoint), односно деобу оштећене ћелије (G2 checkpoint).

Сигнал за почетак ћелијског циклуса представља везивање фактора раста за трансмембранске рецепторе, чиме се сигнал преноси на цитоплазматске протеине и транскрипционе факторе у једру који покрећу ћелијски циклус (Vermeulen et al, 2003). Као одговор на почетни сигнал, долази до синтезе циклина D и уласка ћелије у G1 фазу. Циклин D се синтетише до краја G1 фазе, при чему формира комплексе са Cdk4 и Cdk6. Ови комплекси врше фосфорилацију протеина ретинобластома (pRb) који трпи конформационе промене и ослобађа транскрипциони фактор E2F-1, који је везан за pRb док је у хипофосфорилисаном стању. Циљни гени транскрипционог фактора E2F-1 су циклини A и E који се, након синтезе, везују за Cdk2 и формирају комплекс. Прелазак ћелије из G1 фазе у S се одиграва преко рестрикционе тачке: уколико су испуњени сви услови за репликацију молекула ДНК ћелија улази у S фазу, а ако нису, зауставља ћелијски циклус и активира контролне механизме (G1 checkpoint). Активира се синтеза протеина p53 и p21, који инхибирају синтезу циклина и Cdks који се синтетишу током G1 фазе, што доводи до заустављања ћелијског циклуса. Такође, долази до активирања репер механизма који покушавају да исправе настала оштећења. Међутим, уколико су оштећења непоправљива, активирају се механизми који воде ћелију у апоптозу (Lee et al, 2012, Lu et al 2015).

Након успешно реализоване S фазе, ћелија улази у G2 фазу ћелијског циклуса. У овој фази циклин B и Cdk1 формирају комплекс који је важан за улазак ћелије у митозу. Овај комплекс фосфорилише кључне молекуле (хистоне, нуклеарне ламине и РНК полимеразу II), који су неопходни за формирање деобног вретена, раздвајање хромозома и деобу ћелије. Било каква неправилност у сегрегацији хромозома активира контролне механизме (G2 checkpoint) који посредством фосфатазе Cdc25 доводе до инактивације Cdk1 и комплекса циклин B/ Cdk1 и заустављања ћелијског циклуса (Sanchez et al, 1997). Ћелија добија шансу да оштећење исправи и настави ка митози или се активирају механизми који воде ћелију у апоптозу (Chen et al, 2012)

1.2.1. Ефекти цисплатине на ћелијски циклус

Покушај поправке интер- и интра-ланчаних веза које настају везивањем цисплатине за молекула ДНК доводи до привременог застоја ћелијског циклуса. У зависности од дужине изложености, цисплатина доводи до пролазног заустављања ћелијског циклуса у S фази и застоја у G2 фази. Долази до фосфорилације контролних киназа Chk1 и Chk2, активацијом Cdc25C и њеном транслокацијом у цитоплазму што доводи до застоја у G2 фази (Siddik, 2003). Заустављањем ћелијског циклуса активирају се репер механизми који покушавају да исправе настала оштећења.

Лезије на молекулу ДНК изазване цисплатином препознају репарациони механизми задужени за поправку оштећења, а најважнији су репарација исечањем нуклеотида, NER (eng. Nucleotide excision repair) и репарација погрешно спарених база, MMR (eng. Mismatch excision repair).

Репарација исецањем нуклеотида, NER је механизам који укључује најмање 17 различитих протеина. Овај мултипротеински комплекс препознаје интраланчане везе и постепено исеца фрагменте дужине 27-29 базних парова, који садрже оштећење (Moggs et al, 1997). Реакција инцизије се дешава са обе стране лезије и укључује неколико протеинских фактора (XPA, RPA, XPC-HR23B, ERCC1/HPF, XPG). Ензим ДНК полимераза попуњава насталу празнину (Reardon et al, 1999) . Прекомерна експресија неких гена везаних за NER комплекс доводи до појаве резистенције на цисплатину (Wozniak et Blasiak, 2002).

Репарација погрешно спарених база, MMR је пост-репликативни механизам кога чини комплекс који је АТР зависан мултипротеински систем, важан за нормалан *in vivo* одговор ћелије на супстанце које оштећују ДНК (Toft et al, 1999). Комплекс MMR, кога чини бар пет протеина (MLH-1, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1) доводи до застоја у ћелијском циклусу. Уколико MMR протеини не успеју да изврше адекватну поправку, долази до активације апоптотске каскаде (Vaisman et al, 1998). Дефекти у функционисању овог механизма доводе до резистенције на неке антитуморске лекове, укључујући и цисплатину (Karran and Marinus, 1982).

1.3. Апоптоза

Апоптоза је облик програмиране ћелијске смрти, генски контролисан процес кога карактеришу морфолошке и биохемијске промене које се дешавају у ћелији по прецизно одређеном редоследу. Процес апоптозе се дешава нормално у организму и представља један од механизма за одржавање нормалног раста и ткивне хомеостазе. Овим процесом умиру појединачне ћелије, што је од значаја за одржавање равнотеже у живим системима. Такође, процесом апоптозе се из организма елиминишу и оштећене ћелије, као што су ћелије са оштећеном ДНК, ћелије са неадекватним митогеним сигнаlima, аутореактивне ћелије имуног система, инфективне ћелије итд. Апоптоза настаје спонтано, али и под утицајем различитих штетних физичких и хемијских агенаса. Поремећаји у регулацији овог процеса воде настанку различитих патолошких стања (аутоимуну поремећаји, неуродегенеративне болести, инфаркт миокарда и др.), укључујући и малигне болести (Saikumar et al, 1999).

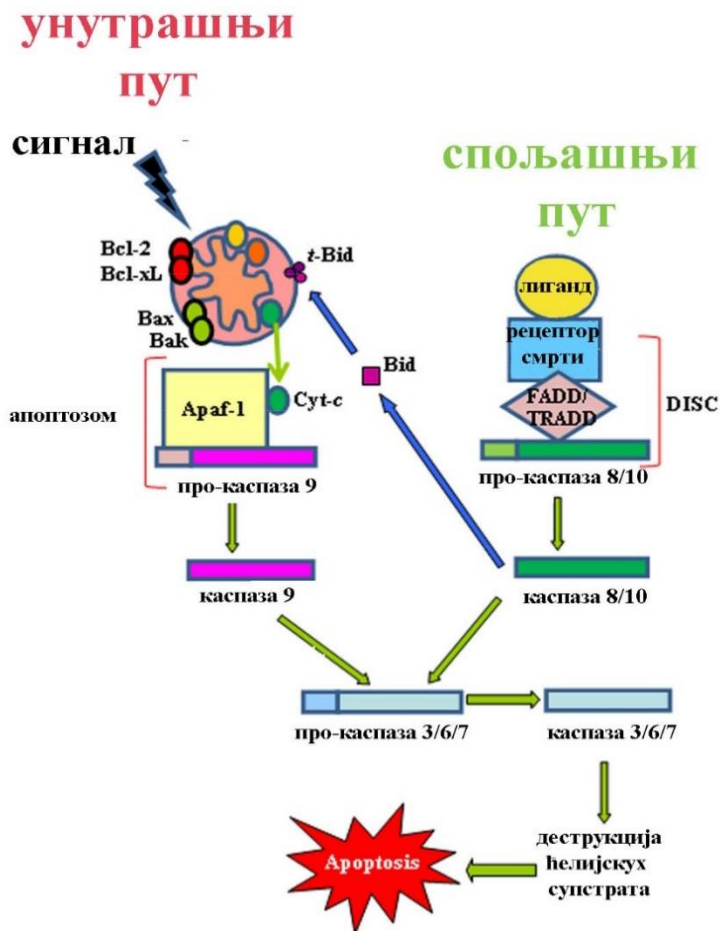
Прве морфолошке промене у ћелији у којој је активиран апоптотски програм су губитак међућелијских веза. Долази до кондензације цитоплазматичних протеина, због чега се волумен ћелије смањује. Једно добија изглед потковице због кондензације хроматина и пикнозе („скупљање једра“). Због активације ендонуклеаза у једру, молекули ДНК се фрагментишу најпре на дуге фрагменте (50-300kb), а затим и на олигонуклеозомске фрагменте величине 180-200 bp (Ristic-Fira et al, 2004). Ендоплазматични ретикулум је дилатиран и добро развијен, што указује на интензивну синтезу протеина. Промене на плазма мембрани обухватају екстернализацију фосфатидилсерина који ће се везати за рецепторе на фагоцитима (Paidassi et al, 2009). Балонирање плазма мембране (eng. blebbing) доводи до деструкције ћелије на апоптотска тела, која су окружена плазма мембраном и садрже делове цитоплазме и ћелијских органела. С обзиром да је интегритет мембране све време очуван, нема изливања садржаја ћелије у међућелијски простор, па, за разлику од некрозе, нема ни инфламаторне реакције. На крају, околне паренхимске ћелије и макрофаги ће фагоцитирати апоптотска тела и деградирати их у фаголизозомима.

Када ћелија прими сигнал за отпочињање апоптозе, долази до активирања бројних биохемијских процеса у ћелији. Пре свега, долази до синтезе или активације ензима који ће спровести апоптотки програм. У првом реду то су каспазе, ензими протеазе, који регулишу протеолизу током апоптотске смрти ћелије (Voice and Bouchier-Nayes, 2020). Каспазе имају цистеин у свом активном центру, а делују селективно из аспартата у протеинима. Оне се синтетишу као неактивни прекурсори, а активација ових ензима се дешава одвајањем веће (величине око 20 kD) и мање (чија је величина око 10 kD) субјединице које се затим повезују у облику активног хетеродимера. Прво се активирају тзв. иницијаторске каспазе (прокаспазе 2, 8, 9 и 10), а оне даље активирају егзекуторске каспазе (прокаспазе 3, 6 и 7). Каспазе делују на кључне протеине ћелије, као што су протеини који регулишу апоптозу, нуклеарне ламине и компоненте цитоскелета, ензиме-регулаторе ћелијског циклуса, ензиме који су укључени у поправку оштећења молекула ДНК и друге (Voice and Bouchier-Nayes, 2020).

1.3.1. Механизми апоптозе

Велики број сигнала из спољашње средине може да активира један од два основна механизма апоптозе – тзв. спољашњи пут апоптозе, који укључује рецепторе смрти, и унутрашњи, митохондријални пут (Tailor et al, 2008).

Спољашњи пут се покреће директним везивањем лиганда за рецепторе који се налазе на површини ћелијске мембране, као што су Fas, TNF рецептор или TRAIL рецептор или деловањем ензима цитотоксичних Т лимфоцита и NK ћелија (ензим перфорин и гранзим Б). То за последицу има конформационе промене интрацелуларних домена рецептора и регрутовање адаптерних и других протеина, тако да се формира протеински комплекс који индукује смрт DISC (eng. death inducing signaling complex). Са формирањем овог комплекса активирају се прокаспаза 8 и/или прокаспаза 10 које покрећу интраћелијску протеолитичку каскаду активирањем каспаза 3, 6 и 7, водећи ћелију у смрт (Finnberg and El-Deiry, 2008). Такође, активација каспаза 8 и 10 може узроковати активацију Bid протеина који са протеинима који припадају Bcl-2 фамилији узрокују ослобађање цитохрома Ц и других проапоптотских протеина из митохондрија у цитоплазму. Формира се апоптозом од прокаспаза 9 и адаптерног протеина Araf-1 (eng. Apoptosis protease-activating factor), активира каспаза 9 и, последично, ефекторске каспазе (каспаза 3) (Најга and Liu, 2004). На тај начин долази до појачања сигнала са рецептора и његове амплификације. Митохондријални пут се може активирати и сигнаlima који потичу из саме ћелије, као што су оштећење молекула ДНК, слободним радикалима или различитим хемиотерапеутицима. Ови сигнали из ћелије утичу на повећање пермеабилности митохондријалне мембране и ослобађања проапоптотских протеина у цитоплазму, који доводе до ћелијске смрти (Kroemer et al, 2007).



Слика 5. Спољашњи и унутрашњи пут активације процеса апоптозе (преузето и модификовано из: Pistrutto et al, 2016)

Инхибитори апоптозе су група структурално и функционално сличних протеина који су ендогени инхибитори каспаза. Они могу инхибирати каспазе везивањем за њихово активно место, стимулисањем деградације активних каспаза или просторним раздвајањем каспаза од својих супстрата (Wei et al, 2008).

1.3.2. Bcl-2 фамилија протеина

Процес апоптозе је активан, генски регулисан процес у коме учествује читав низ протеина. Важни регулатори процеса апоптозе су протеински производи фамилије BCL-2 гена (Leibowitz and Yu, 2010). Неки чланови ове фамилије су проапоптотски протеини, док су други антиапоптотски. Проапоптотски протеини стимулишу процес апоптозе и обухватају две подфамилије: BH123 (то су Bax и Bak) и BH3only протеини (Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad). BH3only протеини промовишу апоптозу тако што инактивирају антиапоптотске протеине, омогућавају агрегацију Bax и Bak протеина, што доводи до отпуштања интермембранских митохондријалних протеина у цитоплазму (Willis and Adams, 2005). Антиапоптотски протеини инхибирају, тј. спречавају апоптозу и то су Bcl2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-1, Bcl-2. Антиапоптотски протеини се налазе на спољашњој

митохондријалној мембрани, на спољашњој страни ендоплазматског ретикулума и нуклеарног омотача и они инхибирају апоптозу углавном тако што се везују за проапоптотске протеине. Међусобни однос између ове две групе протеина одређује реакцију ћелије према агенсима који индукују апоптозу (Deljanin et al, 2016).

И продукти других гена имају значајну улогу у регулацији процеса апоптозе. То је пре свега протеински продукт тумор супресорског гена, p53 који има одлучујућу улогу у заштити ћелије од малигне трансформације (Amaral et al, 2010). Активација апоптотског програма посредством p53 може да се одигра преко Fas рецептора, Bcl-2 фамилије протеина, као и преко цитохрома Ц из митохондрија (Oda et al, 2000). Продукт прото-онкогена С-МУС је транскрипциони фактор Мус, који има важну улогу у контроли ћелијског раста и вијабилности, али и у индукцији процеса апоптозе (Neiman et al, 2007). Протеински продукти С-МУС гена учествују у контроли ћелијског циклуса, регулишући ниво циклина D, A и E, и инхибитора циклин зависних киназа. Његова прекомерна експресија покреће апоптозу путем механизма који укључује ген p53.

1.3.3. Поремећај регулације процеса апоптозе

Апоптоза је механизам који омогућава уклањање оштећених ћелија које могу бити потенцијално опасне по организам. Избегавање апоптозе је једна од кључних особина малигно трансформисаних ћелија. Везу између канцерогенезе и апоптозе уочили су научници Кер, Вили и Кари седамдесетих година прошлог века (Kerr et al, 1972; Sankari et al, 2012).

Постоји низ молекуларних механизма који доводе до смањене осетљивости туморских ћелија на апоптозу. Први доказ поремећеног баланса проапоптотских и антиапоптотских протеина представља откриће повећане експресије BCL-2 гена (B cell lymphoma) у ћелијама фоликуларног лимфома (Tsujimoto et al, 1984)

Смањена експресија тумор супресорских гена такође доводи до поремећаја у регулацији апоптотске ћелијске смрти. Мутације p53 гена су присутне код више од 50% тумора (Zhu et al, 2020). Протеин p53 осим улоге у индукцији апоптозе као одговор на оштећење ДНК, има улогу и у регулацији ћелијског циклуса. Статус овог гена у ћелији одређује одговор на примењену терапију, тако да су тумори са мутацијом овог гена, резистентнији на хемиотерапију и зрачење (Ohnishi, 2005).

Поремећен баланс проапоптотских и антиапоптотских протеина омогућава преживљавање ћелија са оштећењем ДНК. Чланови Bcl-2 фамилије протеина су важни у процесу канцерогенезе као и у одговру туморских ћелија на зрачење и хемиотерапију. Антиапоптотски представник протеин Bcl-2 је први пут идентификован у фоликуларном лимфому B ћелија са транслокацијом 14-18. За испољавање фенотипа фоликуларног лимфома потребно је да постоје мутације и других онкогена. Висок ниво експресије Bcl-2 протеина представља негативан прогностички параметар у лечењу мултиплот мијелома и хроничне лимфоцитне левкемије (Bloem and Lockhorst, 1999). Мутације BAX гена повезане су са резистенцијом на лечење карцинома колона (Ramesh and Medema, 2020). С обзиром на кључну улогу Bcl-2 фамилије протеина у регулацији апоптозе, нове стратегије у синтези антиканцерских лекова усмерене су ка проналажењу агенаса који би мењали активност антиапоптотских представника. Инхибирње антиапоптотских протеина или повећање осетљивости на проапоптотске представнике могло би да активира пут ћелијске смрти.

1.4. Резистенција и нежељени ефекти цисплатине

1.4.1. Резистенција на цисплатину

Велики проблем у терапији цисплатином представља појава отпорности – резистенције ћелија на овај лек. У неким случајевима лек није делотворан од самог почетка терапије, док се у другим случајевима, након почетне успешне употребе лека, касније се развија резистенција, па терапијски ефекти цисплатине изостају (Florea and Busselberg, 2011).

Резистенција на цисплатину може да настане из више разлога. Пре свега, због промена у процесу пасивне дифузије лека кроз мембрану и смањеног уласка цисплатине у ћелију долази до смањане акумулација лека и изостанка терапијског ефекта. На ћелијској линији хуманог карцинома оваријума показано је да цисплатина може да смањи експресију транспортера бакра - Ctr1 (Holzer et al, 2004). И друга два транспортера бакра, АТР7А и АТР7В, су повезани са резистенцијом на цисплатину. Висок ниво експресије АТР7А и АТР7В воде ка резистенцији и могу се користити као параметри за процену терапијског одговора (Nakayama et al, 2001). Породица протеина одговорних за мултиплу резистенцију, MRP (eng. multidrug resistance-associated protein) је група мембранских транспортних протеина који такође учествују у стварању резистенције на цисплатину. Протеин MRP-2 има улогу у изласку цисплатине из резистентних ћелија (Guminski et al, 2006), па се може користити за предикцију одговора на терапију цисплатином (Yamasaki et al, 2011).

Један од разлога за појаву резистенције на цисплатину је и повећана инактивација једињењима у цитоплазми, која садрже тиол групу. У цитоплазми цисплатина реагује са једињењима која имају тиол групу, пре свега са глутатионом и металотинеинима. Глутатион-С-трансфераза катализује реакцију у којој се цисплатин везује са глутатионом и због тога не може да се веже са ДНК и оствари свој терапијски ефекат. У неким канцерским ткивима утврђена је позитивна корелација између резистенције на лечење и нивоа глутатиона у ћелији, као и експресије глутатион-С-трансферазе и других ензима укључених у метаболизам глутатиона (Jansen et al. 2002; Welsh et al, 2004). Металотионеини, породица ниско молекуларних протеина који имају висок садржај тиол група, везују цисплатину у цитоплазми и доводе до повећане инактивације лека у неким ћелијским линијама (Siegsmond et al, 1999, Meijer et al, 2000, Surowiak et al, 2007). На овај начин смањује се ниво цисплатине која може да интерреагује са геномском ДНК.

Промене у путевима за исправку оштећења на молекулима ДНК су важни у остваривању резистенције. Студије на ћелијским линијама карцинома тестиса и оваријума су показале да код ћелија које су имале добар одговор на терапију цисплатином постоји недостатак у репер механизму NER који је одговоран за исправљање оштећења на ДНК (Selvakumaran et al, 2003, Metzger et al, 2010). Ниво ERCC1 протеина, укљученог у препознавање оштећења и исецање неуклеотида, инверзно је повезан са одговором на хемиотерапију код тумора гастроинтестиналнох и неситноћелијског карцинома плућа (Olaussen et al, 2006, Sakamoto et al, 2001).

Резистенција на цисплатину настаје и као последица интраћелијских промена које спречавају цисплатину да реагује са ДНК, као и променама у синалним путевима који покрећу апоптотску каскаду.

Резистенција на цисплатину је мултифакторијалне природе, јер је у ћелији најчешће присутно више различитих механизма који узрокују отпорност на лек. Због тога неопходно је развити нове терапијске приступе и пронаћи нове лекове који су мање токсични, немају укрштenu резистенцију, а ефикаснији су од цисплатине.

1.4.2. Нежељени ефекти цисплатине

Ефикасност примене цисплатине је често ограничена појавом нежељених дејстава. Многе студије су потврдиле да цисплатина доводи до повећане продукције слободних радикала, због чега долази до бројних нежељених ефеката, као што су нефротоксичност, ототоксичност, хепатотоксичност, кардиотоксичност и неуротоксичност.

Главни пут излучивања цисплатине је преко бубрега где долази и до акумулације лека у већој мери него у другим органима. Код једне трећине пацијената јавља се оштећење тубулских ћелија, што се манифестује повећањем концентрације уреје и креатинина и поремећајем у балансу електролита (Hanigan and Devarajan, 2003). Проксимални тубулоцити су главно место дејства, а концентарција лека у овим ћелијама је пет пута виша него у серуму (Kuhlmann et al, 1997). Патолошке промене су најизраженије у С3 сегменту и узроковане су вишеструким механизмима, као што су оксидативни стрес, апоптоза, инфламација и фиброгенеза. Нефротоксичност је дозно-зависна (Liebertahl et al, 1996). Адекватан унос течности може да смањи количину монохидратисане форме, а делује и ренопротективно.

Цисплатина је најјачи ототоксични лек. Између 10% и 90% свих пацијената развиће неки степен оштећења слуха, а најосетљивија је педијатријска популација (Li et al, 2003, Samet et al, 2021). Ототоксичност је иререверзибилна, а повезана је са хипоалбуминемијом, применом других лекова, генетичким факторима, оштећењем бубрега и старошћу пацијената (Deavall et al, 2012). Терапијски приступ подразумева примену, локално или системски, антиоксидативних и антиинфлааторних лекова (Abd Rashid et al, 2021).

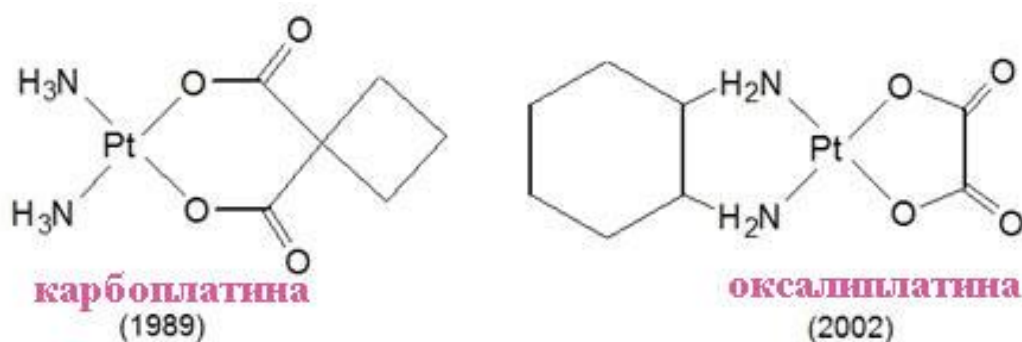
Високе дозе цисплатине могу да буду хепатотоксичне. Оксидативни стрес има важну улогу у оштећењу јетре цисплатином (Lu and Cederbaum, 2006). Смањени су нивои глутатиона и глутатион редуктазе, док су повишене глутатион пероксидаза, каталаза и гама-глутамил транспептидаза. Терапија цисплатином је повезана и са умереним порастом трансaminaза и билирубина (Iseri et al, 2007). Новије студије показују да примена високих доза селена и витамина Е делују заштитно на јетру (Liao et al, 2008).

Терапија цисплатином доводи до липидне пероксидације мембрана срчаних миоцита и повећања серумске концентрације лактат дехидрогеназе и креатин киназе. Аритмије и продужење *qt* интервала је примећено код угрожених пацијената (Yousef et al, 2009).

Цисплатина делује на дорзалне корене ганглија и доводи до пролазних и хроничних неуропатија које се често јављају код пацијената (Meier et al, 1999). Антиоксидативна средства могу да ублаже ова токсична нежељена дејства.

1.5. Развој нових комплекса платине

Због нежељених ефеката и резистенције неких тумора на цисплатину, данас су веома актуелна истраживања у којима се синтетишу нови комплексе аналога цисплатине и других прелазних метала који показују боље ефекте, мању токсичност и резистенцију од цисплатине. Иако су последњих година испитивани антитуморски ефекти већег броја комплекса платине, тек око 30 комплекса је испитивано у клиничким студијама (Fuertes et al, 2002), а у лечењу тумора се, осим цисплатине, једино употребљавају карбоплатина и оксалиплатина. Ови комплекси платине су представници друге генерације комплекса платине(II). Недаплатина, лобаплатина и хептаплатина су одобрене за лечење у појединим земљама Азије.



Слика 6. Хемијска структура карбоплатине и оксалиплатине

Карбоплатина је лек друге генерације платинских лекова, који се користи за лечење од 1989, и то за терапију карцинома оваријума. Примењује се интравенски, али у већим дозама од цисплатине. Два хлоридо лиганда замењена су бидентантним 1,1 циклобутанодикарбоксилатом, и зато је мање реактивна од цисплатине. Мање је изражена нефротоксичност и неуротоксичност, а изазива мијелосупресију што се манифестује неутропенијом, леукопенијом и тромбоцитопенијом (Zhang et al, 2020). Спектар активности је сличан са цисплатиним.

Оксалиплатина припада другој генерацији антитуморских платина(II) комплекса која се показала веома ефикасном у терапији колоректалног карцинома (Silva et al, 2005) и карцинома јајника (Passetto et al, 2006)

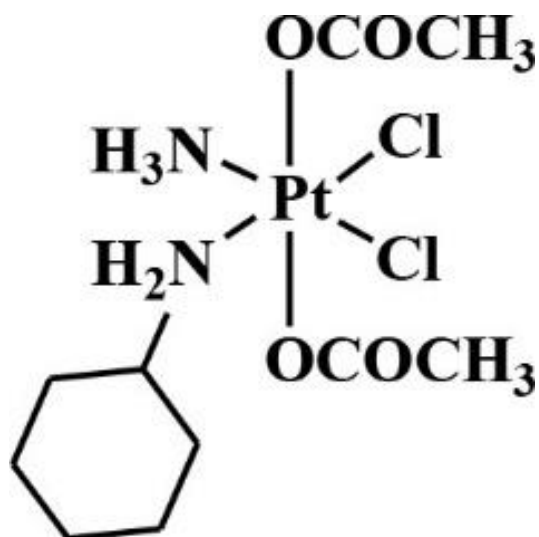
Недаплатина је у Јапану одобрена за лечење и користи се у терапији канцера главе и врата и тумора плућа (неситноћелијског и ситноћелијског). Има исти спектар активности као цисплатина и карбоплатина. Растворљивија је 10 пута у води од цисплатине и мање је токсична за бубреге и гастроинтестинални систем од карбоплатине (Zhang et al, 2017). Доводи до мијелосупресије.

Лобаплатина је платински комплекс треће генерације, регистрован је у Кини за лечење хроничне мијелоидне леукемије и иноперабилних карцинома дојке и плућа. Хептаплатина се у Кореји користи за лечење карцинома желуца. Нежељени ефекти су блажи него код цисплатине.

1.5.1. Комплекси(IV) платине

Комплекси платине(IV) имају октаедарну геометрију са шест места за везивање лигананда. Они су инертнији од комплекса платина(II). Због високе кинетичке стабилности и два нова места за лиганде којима се модификује липофилност, могу се применити и оралним путем. Када комплекс платине(IV) уђе у ћелију долази до редукције у платину(II) и то је активни облик лека. Променом аксијалног лиганда може се утицати на фармакокинетику лека (на механизам деловања и резистенцију). Биолошки активан лиганд може својим цитотоксичним својствима синергистички да делује са металним јоном (платином) у центру комплекса (Alessio et al 2013). Велики број комплекса платине(IV) је синтетисан уз помоћ различитих лигананда. Комплекси платине(IV) су показали цитотоксичну активност на различитим ћелијским линијама хуманих тумора, а само је сатраплатина у фази клиничког испитивања (Johnstone et al, 2016). Испитивања тетраплатине су напуштена у раној фази због велике неуротоксичности, док ипроплатина није показала значајне предности у поређењу са цисплатином (Varbanov et al, 2011).

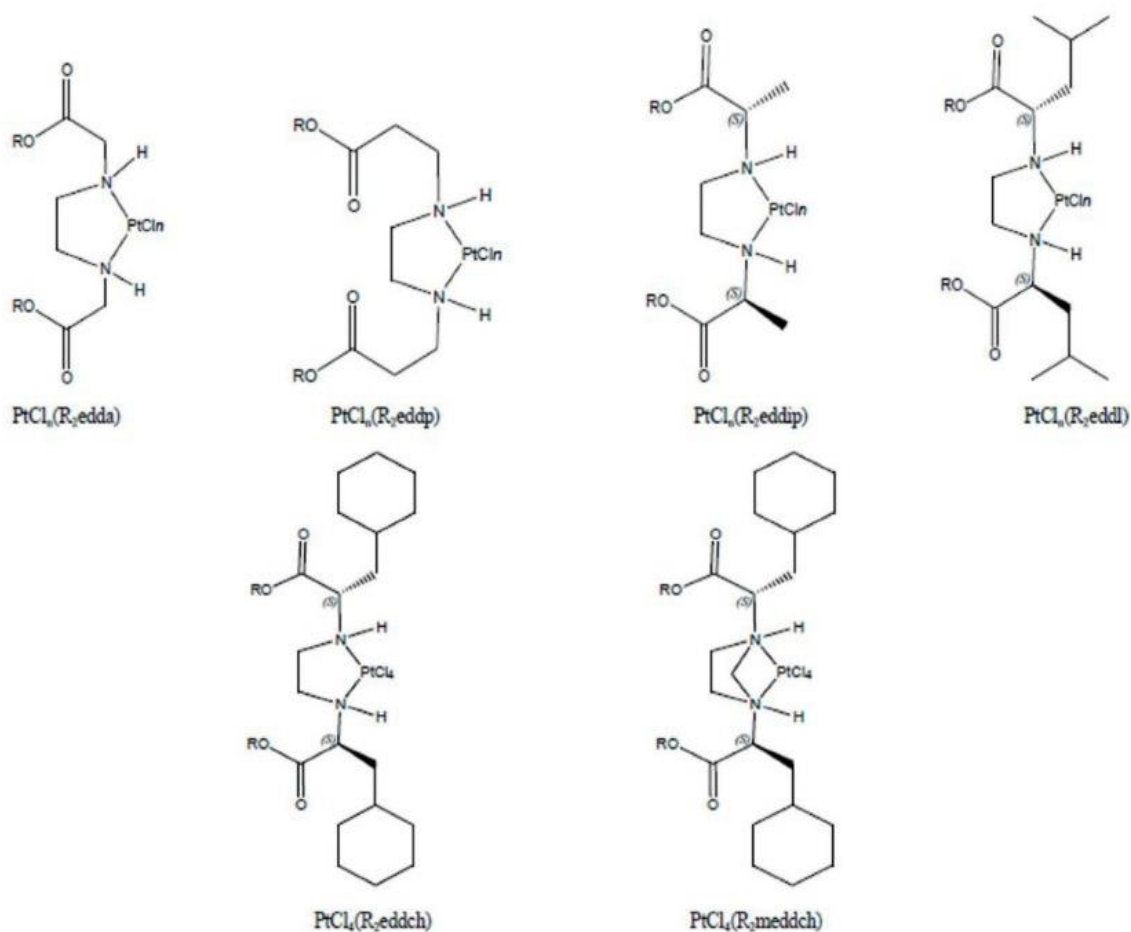
Сатраплатина (JM216) (Слика 7) је комплекс платине(IV) који може да се примењује оралним путем. Захваљујући својим аксијалним лигандима он је липофилнији и мање токсичан од цисплатине. Јединствен је по томе што су два стабилна лиганда, амин и циклохексамин асиметрично постављени што доприносу чвршћем везивању за ДНК ланац. Формира адукте са ДНК које не могу да препознају ММР протеини репер система (Fink et al, 1996), а постоје и докази да се за њих не везују НМГ1 протеини (Vaisman et al, 1999). Ове разлике у механизму деловања повезане су са цитотоксичношћу код неких ћелијских линија резистентних на цисплатину (ONeill et al, 1999, Martelli et al, 2006). Сатраплатина се показала ефикасном у терпији карцинома јајника, грлића материце и простате, а у току су клиничке студије које испитују њену примену у комбинацији са још неким цитостатицима (Abu-Surrah et al, 2006, Hager et al, 2016).



Слика 7. Сатраплатина

1.5.2. Комплекси платине са лигандима *R*₂edda-типа

Комплекси прелазних метала (Pt, Pd, Co, Au) са edda (етилендиамин-N,N'-диацетат) и сличним лигандима су интензивно пручавани претходних година. Edda-тип лиганда су група која обухвата велики број једињења која су етилендиамин или пропилендиамин дикарбоксилних киселина, као и њихови естерификовни деривати (Слика 8). У ову групу једињења убрајамо етилендиамин: -дисирћетне киселине (H₂edda), -ди(изо)пропанске киселине (H₂eddp, H₂ed dip), -ди-2-(3-циклохексил)-пропанске киселине (H₂eddch), -ди-2-(3-метил)-бутанске киселине (H₂eddv) и -ди-2-(4-метил)-пентанске киселине (H₂eddl). Киселине се координују тетрадентатно за јон метала, а њихови естерификовани деривати бидентатно. За све ове лиганде се у литератури користи скраћеница *R*₂edda-тип лиганда.



Слика 8. Структурне формуле комплекса платине са *R*₂edda-типом лиганда (Jurišević et al, 2016)

Први их је синтетисао Lui 1963.године и то платина(II) и платина(IV) комплексе са *R*₂edda-типом лиганда. Он је показао да платина(IV) гради стабилна једињења са edda лигандима и да постоји могућност формирања три изомера, при чему је фаворизован настањак *syn-cis* изомера (Jolley et al, 2001). У последњих двадесет година синтетисан је велики број комплекса платина(IV) са лигандима edda-типа, који су испољили цитотоксичност на већем броју ћелијских линија. Комплекси платине(IV) са eddp

естрима показали су цитотоксичну активност приближну цисплатини на ћелијским линијама мијелоидне леукемије K562, HeLa и U251 ћелијама астроцитома, док је цисплатина много јаче деловала на ћелијске линије карцинома плућа (A549) и липосаркома, где су ови комплекси тек у веома високим концентрацијама изазивали апоптозу (Kaludjerovic et al, 2005a; Kaludjerovic et al, 2005b; Kaludjerovic et al, 2008). Платина(IV) са eddl-типом лиганда на ћелијску линију леукемије (Јуркат) и K562 ћелије имала је ефекат који је упоредив са цисплатином, док је на ћелије карцинома колоне испољила снажније цитотоксично дејство од цисплатине (Vujic et al, 2012). Неколико естара ди-2-пропамске киселине је деловала цитотоксично на ћелије карцинома колоне и карцинома дојке (Stojkovic et al, 2014).

1.6. Примена јонизујућег зрачења у терапији канцера

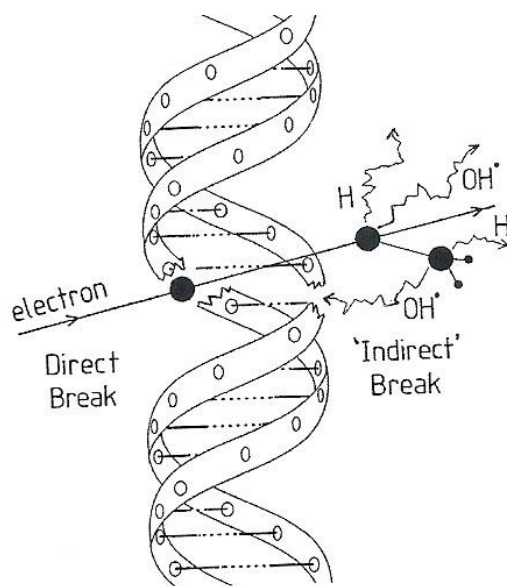
Радијациона онкологија је област медицине, која користи енергију у облику јонизујућег зрачења у циљу лечења тумора или смањења бола и других симптома код онколошких пацијената (палијативно). Јонизујуће зрачење које се користи у радиотерапији може бити електромагнетно (γ и X зраци) или корпускуларно (честично) (протони, β честице – електрони и позитрони, α честице и други јони) зрачење. Електромагнетно и корпускуларно зрачење при пролазу кроз материју избацују електроне из својих атомских орбита и стварају јонске парове, тј. врше јонизацију материје кроз коју пролазе, по чему је ово зрачење и добило име. Што је јонизација у датом волумену гушћа, односно што је већа количина апсорбоване енергије, то ће и оштећења бити израженија. Апсорбована доза је део енергије јонизујућег зрачења који апсорбује јединица масе озраченог ткива и то је физичка доза зрачења. Изражава се у јединици која се назива греј (1Gy). Међутим, исте дозе различитих врста јонизујућег зрачења не производе исте ефекте на изложено ткиво или организам. Зато уводимо и појам биолошке дозе зрачења која представља производ физичке дозе зрачења и релативне биолошке ефективности, RBE (eng. relative biological effectiveness) (Nias, 1998). RBE представља однос дозе референтног зрачења (γ или X) и дозе анализираниог зрачења (или комбинованог третмана) које под истим условима изазивају исти биолошки ефекат. Због разлике у депонованој енергији, разликују се и вредности RBE.

У радиотерапији се користе γ зраци и X зраци. Гама (γ) зрачење је електромагнетно зрачење кратке таласне дужине и велике продорне моћи. Најчешћи γ емитери који се данас користе у медицини су радиоактивни кобалт(^{60}Co), цезијум (^{137}Cs), натријум (^{24}Na), калијум (^{42}K), злато (^{198}Au) и гвожђе (^{59}Fe). Примењује се на два начина: као спољашња – телерадиотерапија, када се извор зрачења налази на одређеној удаљености од пацијента и као брахитерапија, када се извор зрачења поставља у непосредну близину тумора.

1.6.1. Биолошки ефекти јонизујућег зрачења

Под биолошким ефектима јонизујућег зрачења подразумевају се оштећења ћелија и ткива која могу настати на два начина: директном јонизацијом или индиректним дејством зрачења (Слика 9). При директном дејству јонизујућег зрачења на живу материју долази до јонизације атома, кидања хемијских веза и поремећаја структура у биолошким системима. При томе, степен оштећења је пропорционалан дози примењеног

зрачења (Nikjoo et al, 1999). Индиректно деловање јонизујућег зрачења подразумева продукцију слободних радикала. Наиме, с обзиром на то да вода чини највећи део живих организама, кратко време након озрачивања долази до јонизације воде и стварања великог броја слободних кисеоничних радикала (водоник пероксид, супероксидни анјон и хидроперокси радикал) (Azzam et al, 2012). Ови радикали могу да преживе довољно дуго и да дифундују у све делове живе материја изазивајући хемијске модификације и оштећења макромолекула. Овај тип оштећења сматра се најзначајнијим (Valerie et al, 2007).



Слика 9. Директно и индиректно дејство јонизујућег зрачења на молекул ДНК (Goodhead, 1999)

Директни ефекти јонизујућег зрачења су оштећења на молекулу ДНК и ћелијској мембрани, као и иницијација сигналних путева који покретају апоптозу (Mishra et al, 2004). Оштећења на молекулу ДНК подразумевају оштећење база (делеција базних парова) и једноланчане (енг. single strand breaks, SSBs) и дволанчане (енг. double strand breaks DSBs) прекиде ланца ДНК (Barnard et al, 2013). Једноланчани прекиди у молекулу ДНК узрокују локалну денатурацију у близини прекида, чиме ланац ДНК постаје лака мета за слободне радикале. Међутим, ове прекиде релативно брзо и лако поправљају репер механизми у ћелији, па имају мало удела у смрти ћелије. Најзначајнији су двоструки прекиди који су у корелацији са леталним дејством јонизујућег зрачења на ћелије (van Gent et al, 2001). У овом случају репер механизми нису тако ефикасни, па долази до прекида на хромозомима и последично до геномске нестабилности, хромозомских реаранжмана и малигне трансформације (Yang et al, 2004).

Треба нагласити да су организми на вишем ступњу еволутивног развоја осетљивији на јонизујуће зрачење. Такође, осетљивије су ћелије које се деле у односу на оне у интерфази, при чему су ћелије у мејози осетљивије од ћелија у митози. Познато је да се малигно трансформисане ћелије интензивно деле, као и да често имају мутације у генима који контролишу ћелијски циклус и апоптозу и учествују у исправкама оштећења на молекулу ДНК. Због тога малигне ћелије имају често повећану радиоосетљивост, што омогућава примену јонизујућег зрачења у терапијске сврхе.

1.6.2. Комбиновани третмани малигних тумора хемиотерапеутицима и радиотерапијом

Комбиновани третмани малигних тумора хемиотерапеутицима и конвенционалним, јонизујућим зрачењем су веома актуелно поље истраживања. Код неких тумора (плућа, главе и врата) цисплатина делује као радиосензитизатор (Gupta et al, 2011), док код других нема радиосензитизаторку активност или доводи до појаве изражених симптома токсичности код пацијената (Hazuka et al, 2014). Примена цисплатине заједно са јонизујућим зрачењем се користи у третману неких врста тумора. Клиничке студије са пацијентима са карциномом грлића материце показале су корист од заједничког третмана γ зрачења и цисплатине у смислу дужег преживљавања и дужег трајања периода ремисије (Keys et al, 1999, Rose et al, 1999). Радиотерапија и цисплатина се примењују у терапији иноперабилних тумора главе и врата (Marcu et al, 2003).

Претпоставља се да цисплатина доводи до инхибиције механизма за поправку оштећења на молекулу ДНК која су индукована јонизујућим зрачењем. Такође, нека истраживања показују да повећањем оксигенације хипоксичних ћелија се смањује радиорезистентност тако што долази до застоја у G2 фази ћелијског циклуса (Lawrence et al, 2003, Nakamoto et al, 1996). Истраживање синергистичког деловања јонизујућег зрачења и цисплатине на A549 ћелијама карцинома плућа, пружа доказе да цисплатина промовише проапоптотске сигналне путеве активирањем каспазе 3 и променом експресије Bcl-2 фамилије протеина (Liu et al, 2014). Међутим, тачан механизам синергистичног деловања јонизујућег зрачења и цисплатине још увек није у потпуности разјашњен.

1.6.3. Значај одређивања радиобиолошких параметара у процени одговора тумора на јонизујуће зрачење

Примена јонизујућег зрачења у лечењу различитих тумора треба да доведе до инхибиције раста малигних ћелија уз минимално оштећење здравог ткива у околини тумора. Одређивањем вредности различитих радиобиолошких параметара можемо проценити ефекте зрачења, али и комбинованих третмана зрачењем и хемиотерапеутицима на туморске ћелије.

Већ је поменут значај одређивања RBE вредности у радиотерапији, јер овај параметар представља релативну меру способности одређене врсте зрачења или комбинованог третмана зрачењем и хемиотерапеутиком да доведе до инхибиције раста туморских ћелија (Combs et al, 2012). Вредност RBE параметра, нормираног према ефекту γ зрачења од 2Gy (RBE(2Gy, γ)) је најчешће коришћени радиобиолошки параметар за упоређивање ефеката различитих врста зрачења.

Након озрачивања ћелија и оштећења на молекулу ДНК, у ћелијама се најпре активирају механизми који заустављају ћелијски циклус како би се настала оштећења поправила пре репликације (задржавање у G1 фази, eng. G1 arrest) или пре ћелијске деобе – митозе (задржавање у G2 фази, eng. G2 arrest). Уколико су оштећења велика, репер механизми ће активирати процесе који воде ћелију у апоптотску ћелијску смрт. Такође, неисправљена оштећења могу бити и фиксирана и даље пропагирана, што доводи до њиховог нагомилавања и геномске нестабилности (Kuerbitz et al, 1992). У зависности од

степен оштећења, ове ћелије могу да преживе зрачење и размножавају се још извесно време, али ће геномска нестабилност ипак довести до ћелијске смрти после неколико генерација. Због свега наведеног, у процени деловање зрачења на одређен тип туморских ћелија важно је проучити понашање ћелија током ћелијског циклуса и одредити проценат апоптозе која је индукована примењеним третманом. Подаци из литературе показују да је проценат апоптозе индуковане третманом у позитивној корелацији са радио-осетљивошћу анализираних ћелија (Aldridge and Radford, 1998). С друге стране, процена степена оштећења генома и губитка (репродуктивног капацитета ћелија одређује се мерењем фракције преживљавања на 2Gy, SF2 (eng. surviving fraction,). За одређивање вредности SF2 користи се клоногени есеј који одређује способност ћелија да формира колонију (клон) и након најмање 6 периода дуплирања после зрачења или комбинованог третмана. Овај радиобилошки параметар има велики значај у одређивању радио-осетљивости ћелија на јонизујуће зрачење: ћелије које имају $SF2 < 0,35$ су радио-осетљиве, док су ћелије са $SF2 > 0,35$ радиорезистентне (Salim et al, 2012). За процену ефеката комбинованих третмана користи се фактор повећања осетљивости, SER (eng. sensitizer enhancement ratio) (Meike et al, 2011) који указује на повећање радио-осетљивости ћелија третираних хемиотерапеутицима и јонизујућим зрачењем.

Коришћење радиобиолошких параметара представља један од основних приступа у формирању терапијске стратегије у лечењу малигних тумора.

2. ЦИЉ РАДА

На основу прелиминарних истраживања антитуморских ефеката новосинтетисаних комплекса платине(IV) и цисплатине на ћелијским линијама хуманих тумора, постављени су следећи конкретни задаци:

1. Пратити раст и одредити време дупликације хуманих ћелијских линија:
 - A549 – карцином плућа
 - MCF-7 – карцином дојке
 - HTB140 – меланом
 - MRC-5 – здрави фетални фибробласти плућа.
2. Испитати потенцијалну цитотоксичност новосинтетисаних комплекса платине(IV) са:
 - 1) *O,O'*-dipentyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate dihydrochloride dihydrate (у даљем тексту комплекс **pentyl-Pt**)
 - 2) *O,O'*-dibutyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)pentanoate dihydrochloride (у даљем тексту комплекс **butyl-Pt**)и упоредити са цитотоксичним ефектима *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (у даљем тексту **cis-Pt**) на ћелијске линије наведених тумора (MCF-7, A549, HTB140), као и селективност у њиховом дејству у односу на здраву ћелијску линију фибробласта плућа – MRC-5.
3. Испитати утицај комплекса **pentyl-Pt** и **butyl-Pt** на модулацију ћелијских функција:
 - 1) на пролиферативну активност ћелија током третмана,
 - 2) на индукцију апоптотске ћелијске смрти,
 - 3) на експресију протеина који учествују у регулацији апоптотске смрти
 - 4) на дистрибуцију ћелија по фазама ћелијског циклуса
4. Одредити радиобиолошке параметре који дефинишу ефикасност јонизујућег γ зрачења, као и комбинацију γ зрачења и комплекса **pentyl-Pt**, **butyl-Pt** и **cis-Pt** у елиминацији туморских ћелија.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Материјал

3.1.1. Ћелијске линије

За испитивање потенцијалног цитотоксичног дејства новосинтетисаних комплекса платине(IV) коришћене су хумане туморске ћелијске линије различитог порекла и инвазивности и то: карцинома плућа (A549), карцинома дојке (MCF-7) и малигног меланома (HTB-140), као и једна здрава ћелијске линија феталних хуманих фибробласта плућа (MRC-5). Све ћелијске линије набављене су из колекције ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, SAD).

Ћелијска линија A549 (ATCC®CCL-185™) представља ћелије хуманог аденокарцинома плућа. Ову ћелијску линију је први развио Giard са сарадницима, култивисањем ћелија из ткива тумора пацијента старог 58.година, оболелог од аденокарцинома плућа (Giard et al, 1973). То су алвеоларне базалне епителне ћелије које расту адхерентно у монослоју у *in vitro* условима. Ова ћелијска линија је категорисана као врста неситноћелијског карцинома плућа, који обухвата 85-88% свих карцином аплућа, мање је агресиван и спорије се шири.

Ћелијска линија хуманог карцинома дојке MCF-7 (ATCC®HTB-22™) је једна од најчешће коришћених ћелијских линија у испитивању антиканцерских агенаса. Добијена је 1973. године из плеуралне течности пацијенткиње са инвазивним дукталним карциномом дојке (Soule et al, 1973). То је монослојна, адхерентна, епителијална ћелијска линија позитивна на естрогенске и прогестеронске рецепторе. Ћелијска линија MCF-7 је слабо агресивна и сматра се да има низак метастатски потенцијал (Gest et al, 2013).

Хумане HTB140 (ATCC® Hs 294T) меланомске ћелије су изоловане 1969. године из меланома који је метастазирао у лимфни чвор. Ово су непигментисане ћелије меланома, звездастог и полигоналног облика (Creasey et al, 1979), које расту у монослоју у *in vitro* условима.

Хумана ћелијска линија MRC-5 (ATCC®CCL-171™) изведена је 1966. из нормалног плућног ткива 14-недељног мушког ембриона од стране Jacobs и сарадника (Jacobs et al, 1970). Ћелије су диплоидне, са кариотипом 46,XY. Расту у монослоју, причвршћене за подлогу суда у коме се одржавају.

3.1.2. *Раствори цисплатине (cis-Pt) и новосинтетисаних комплекса платине(IV), pentyl-Pt и butyl-Pt*

Комплекси платине(IV) са:

- O,O`-dipentyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N`-di-2-propanoate dihydrochloride dihydrate (у даљем тексту **pentyl-Pt**)
- O,O`-dibutyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N`-di-2-(4-methyl)pentanoate dihydrochloride (у даљем тексту **butyl-Pt**)

као комплекс платине(II) са:

- cis-diamminedichloroplatinum(II) (у даљем тексту **cis-Pt**)

синтетисани су на Институту за хемију, Природно математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Испитивана једињења су растворена у диметил-сулфоксиду (DMSO), у концентрацији од 100 mM (шток) и чувана у стерилној туби на 4°C. Непосредно пре третмана, једињења су у храњивом медијуму разблажена до радних концентрација. Финална концентрација DMSO у експериментима није прелазила 0,5% (v/v).

3.1.3. *Хемикалије*

Све хемикалије за гајење ћелија (RPMI, DMEM, FCS, пеницилин, стрептомицин, трипсин, неесенцијалне аминокиселине, L-glutanim) су производи фирме Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany. Од истог произвођача су и: трихлорсирћетне киселина (eng. trichloroacetic acid, TCA), Tris база, натријум бикарбонат, трипан плаво, етилен диамино тетра сирћетна киселина (eng. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), албумин говеђег серума (eng. bovine serum albumine, BSA), натријум додецил сулфат (eng. sodium dodecyl sulfate, SDS), натријум-деоксихолат, натријум ортованадат (Na₃VO₄), етилен гликол тетрасирћетна киселина (eng. ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA), акриламид, бисакриламид, глицин, β-меркаптоетанол, бром фенол плаво, глицерин, Tween 20, изопропанол, амонијум ацетат, етидијум бромид, сулфородамин Б (СРБ) и пропиридијум јодид (PI). Луминол и *p*-кумарична киселина, који улазе у састав ECL (eng. enhanced chemiluminescence) супстрата су производи Sigma Chemical Company.

Протеиназа К је производ фирме Promega Limited, Southampton, UK. Агароза је производ BRL, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD, USA, а комерцијална смеша ДНК фрагмената (100bp DNA Ladder) Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany.

Производи фирме SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany су: спермидин, антипаин, леупептин, апротинин, фенилметилсулфонил хлорид (PMSF), натријум пирофосфат, β-диглицерофосфат, натријум флуорид, дитиотреитол (DTT), N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED), dimetilsulfoksid (DMSO) и рибонуклеаза А.

Производи фирме Zorka Pharma, a.d., Шабац, Србија су: глицерол, сирћетна киселина, сумпорна киселина, формалдехид и метанол, а Гимза је производ Alkaloid a.d., Skopje, Macedonia.

Комерцијални комплет који је коришћен за тест пролиферације је BrdU ELISA Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, а комерцијални комплет за праћење

апоптозе на проточном цитометру је AnnexinV-FITC/7-AAD Kit, произвођача Beckman Coulter, Marseilles, France.

Зечја поликлонска антитета на Вах и Bcl-2 и секундарно козје анти-зечје IgG антителио које је обележено пероксидазом из рена (*eng.* horse-radish peroxidase, HRP) су производ фирме Cell Signaling Technology Inc. Danvers, Massachusetts, US, дојк је зечје поликлонско антителио на β -актин производ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany.

3.1.4. Пуфери

У експериментима су коришћени следећи пуфери:

- фосфатно пуферисани физиолошки раствор (*eng.* phosphate buffer saline, PBS), pH 7.4: 0,8% NaCl, 0,02% KH_2PO_4 , 0,29% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02% KCl
- глицински пуфер: 0,2M глицин, 0,2M NaOH
- дигестиони пуфер за изоловање ДНК: 100mM NaCl, 25mM EDTA, 10mM TRIS-HCl, 0,5% SDS у H_2O
- пуфер за узорке (за електрофорезу): 30% глицерол у 1xTBE
- TRIS-боратни пуфер (TRIS-borate buffer, TBE), pH8,3: 0,09M TRIS borate, 0,02M EDTA
- TE пуфер (TRIS-EDTA buffer), pH8,0: 10mM TRIS, 1mM EDTA у H_2O
- Пуфер за лизирање: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% Nonidet P-40 (NP-40), 0.1% SDS, 0.5% Na-deoksiholat, 1mM EDTA, 1mM EGTA i 1mM (Na_3VO_4)
- Пуфер за наливање узорака (2xProtein Loading Sample Buffer): 0,125M Tris-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 20% глицерол, 0,4% β -mercaptoethanol, 1% бромфенол плаво
- SDS пуфер за електрофорезу: 25 mM Tris-HCl, 0,1% SDS, 192 mM глицин
- Пуфер за трансфер: 25mM Tris-HCl, 192mM глицин, 20% метанол
- TBS пуфер: 1,5M NaCl, 0,2M Tris (pH 7,4)
- TBST пуфер: 0,1% Tween 20 у TBS пуферу

3.2. МЕТОДЕ

3.2.1. Гајење ћелија у култури

Ћелијске линије A549 и MCF-7 се одржавају у храњивој подлози RPMI 1640, а ћелијска линија малигног меланома и здравих фибробласта плућа у DMEM (*енгл.* Dulbecco's Modified Eagles Medium) подлози. Храњиве подлоге су чуване у фрижидеру, а пре употребе загреване до температуре 37°C. Подлога је стерилисана поступком „хладне стерилизације“ пропуштањем кроз мембрану са порама дијаметра 0,22 μm . Да би се добио комплетан медијум подлоге су обогаћене 10% феталним телећим серумом (*енгл.* Fetal Calf Serum, FBS), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ пеницилином, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ стрептомицином и L-

глутамином (финална концентрација 2mM). Ћелијске линије су пропагиране као монослојне у пластичним боцама („флаксовима“) величине 25 cm² (Nalgene, Nunc) до постизања конфлуентности од 80%, а затим су пресађиване. Ћелије су пасажиране у односу 1:4 до 1:5, два до три пута недељно. Током пресађивања, ћелијски монослој се испере стерилним фосфатним пуфером без калцијумових и магнезијумових јона (енгл. Phosphate Buffered Saline, PBS, pH=7,4), а затим третира трипсином. Након трипсинизације ћелије су бројане на инвертном микроскопу и засејаване у одговарајућој густини за даље експерименте или за даље умножавање и одржавање у култури.

3.2.2. Одређивање броја вијабилних ћелија и времена њихове дупликације

За одређивање броја живих ћелија у култури коришћен је тест бојења ћелија бојом трипан плаво, у коме живе, вијабилне ћелије остају необојене, док мртве ћелије због нарушеног интегритета ћелијске мембране пасивно преузимају боју и боје се плаво. Након испирања ћелијског монослоја PBS-ом и трипсинизације ћелија, у 20μL ћелијске суспензије је додато 30μL PBS-а и 50μL 0.4% раствора трипан плавог у PBS-у. Ћелије су затим бројане у Neubauerој комори за бројање - хеомцитометру, за сваки узорак на 10 поља (квадрата). Укупан број живих ћелија (N) у 1mL културе израчунава се по следећој формули:

$$N = (n/10) \times 5 \times 10^4 \text{ ćel/mL}$$

при чему је n број ћелија избројаних на 10 поља, 5 је фактор дилуције, а 10⁴ је коефицијент коморе. Вијабилност ћелија коришћених у експериментима је била већа од 90%.

За одређивање времена дупликације (Td) ћелија праћен је њихов раст до 4. дана у култури. Почетни број ћелија је био 5x10⁴ ћелија/mL. Свакодневно су праћене промене у броју ћелија. Време дупликације представља средњу вредност из три независна експеримента.

3.2.3. Третман ћелија комплексима платине

За тестове вијабилности и пролиферације, ћелијске линије су засађиване у микротитар плочама са 96 места (почетни број ћелија је био 5 x 10³ ћелија/бунару). Гајене су током 24h у инкубатору у стандардним условима, а затим је медијум одливен. У контролним бунарима замењен је медијум свежим медијумом, а у осталим бунарима ћелије су излагане третману pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt у трајању 6h, 24h или 48h. Коначне концентрације комплекса у третираним бунарима износиле су 5μM, 10μM, 25μM, 50μM и 100μM. Свака концентарција је тестирана у триплекату, за сва три времена, а на свака три третирана бунара остављена су три у које је додавана само храњива подлога (слепа проба).

За клоногени есеј и анализу апоптозе на проточном цитометру ћелије су расађиване у микротитар плоче са 6 отвора.

За остале анализе ћелије су гајене у „флаксовима“ величине 25 cm². Након 24h од засејавања, ћелије су третиране одговарајућим концентрацијама комплекса и даље инкубиране у CO₂ инкубатору.

3.2.4. Озрачивање ћелија γ зрацима

Озрачивање А549 и МСF-7 ћелија γ зрацима обављено је на ^{60}Co извору у Лабораторији за заштиту од зрачења и заштиту животне средине, на Институту за нуклеарне науке „Винча“ у Београду. Пластичне посуде са ћелијским монослојем, којима је претходно одливен медијум, су постављане под правим углом у односу на правац снопа. Ћелије су озрачене на собној температури дозама од 1Gy, 2Gy и 4Gy, при брзини дозе од 1 Gy/min.

3.2.5. Комбиновани третман ћелија комплексима платине и γ зрацима

За одређивање инхибиције раста ћелија након комбинованих третмана комплексима платине и γ зрацима, ћелије су гајене у микротитар плочама са 96 бунара. Након 24h од засејавања ћелије су третиране комплексима платине (pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt) у концентрацији која одговара њиховим IC50 вредностима. Контролним узорцима је само замењен медијум. Третман је трајао 24h након чега су ћелије озрачене γ зрацима у дозама од 1Gy, 2Gy и 4Gy. Након додатне инкубације у трајању од 6h, 24h или 48h одређена је инхибиција раста СРБ тестом. Сваки експеримент је урађен у трипликату и поновљен три пута.

За клоногени есеј, ћелије су расађиване у микротитар плоче са 6 бунара. Формиране су три групе узорака:

- 1) ћелије које су 24h након расађивања третиране pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt у концентрацијама од 5 μM до 100 μM ; 24h након тога одливен је медијум са комплексима и додат је свеж медијум, након чега су ћелије остављене у CO_2 инкубатору следећих 10 дана;
- 2) 24h након засејавања ћелије су третиране комплексима платине у концентрацијама које одговарају њиховим IC50 вредностима, а потом су озрачене γ зрацима дозама од 1Gy, 2Gy и 4Gy, свеж медијум је додат у сваки бунар и ћелије су остављене наредних 10 дана у CO_2 инкубатору;
- 3) 48h након засејавања ћелије су озрачене γ зрацима дозама од 1Gy, 2Gy и 4Gy и инкубиране наредних 10 дана у стандардним условима.

3.2.6. Микротетразолијум (МТТ) есеј

За одређивање ћелијске вијабилности коришћен је колориметријски МТТ тест, којим се индиректно одређује вијабилност ћелија. МТТ (3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid) је тетразолијумова со, жуте боје која се у метаболички активним ћелијама, под дејством ензима сукцинат-деhidрогеназе редукује у љубичасте кристале формазана. Број живих ћелија је директно пропорционалан количини створеног формазана (Mosmann, 1983) који се раствара у органским растварачима. Интензитет добијене боје се квантитативно мери на Elisa читачу.

За овај есеј ћелије су гајене у плочама са 96 отвора. Почетни број ћелија, за све анализираних ћелијске линије, је био 5×10^3 ћелија у 200 μL подлоге RPMI1640 (за A549 и MCF-7) или DMEM (за HTB140 и MRC-5) у сваком отвору. Ћелије су гајене у стандардним условима на 37°C , у влажној атмосфери $5\% \text{CO}_2$. Након 24 h од засејавања, ћелије су третиране pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt у концентрацијама $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ и $100\mu\text{M}$. Након истека инкубације са агенсима (6, 24 и 48h), медијум са агенсима је одливан, а у њих је додато по 100 μl чистог медијума са 15% раствором МТТ-а (5mg/ml у PBS-у). Плоче су инкубирани још 4 сата, а затим је медијум одливан и додато је у сваки отвор по 150 μl DMSO и 20 μl глицинског пуфера. Плоче су вортексоване, а затим је читавана оптичка густина на ELISA читачу (ELISA reader Zenyth 3100; Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals-Siezenheim, Austria) на таласној дужини од 595 nm.

Процент цитотоксичности израчунат је на основу формуле:

$$\% \text{ цитотоксичности} = \{1 - (A - A_{\text{сп}}) / (A_{\text{конт}} - A_{\text{сп}})\} \times 100$$

A- апсорбанца узорка ћелија које су расле у присуству различитих концентрација испитиваних комплекса;

A_{конт}- апсорбанца узорка ћелија које су расле само у храњивој подлози (контроле);

A_{сп}- апсорбана слепе пробе.

3.2.7. Сулфородамин В (SRB) есеј

Сулфородамин В (СРБ) тест је колориметријски тест који се заснива на мерењу укупног протеинског садржаја ћелија, који је пропорционалан броју ћелија. СРБ је боја која се у условима слабо киселе средине везује за базне аминокиселинске остатке у протеинима, и омогућава мерење укупног протеинског садржаја који је пропорционалан броју ћелија. Тест је изведен према процедури Skehan и сарадника (Skehan et al, 1990).

Процедура засејавања ћелија и инкубације је идентична као за МТТ есеј. Први корак је фиксација са 200 μL хладне 10% трихлор сирћетне киселине (ТСА). Плоче су остављене 1h на собној температури, а затим следи 5 пута испирање дестилованом водом и сушење. У сваки бунар је додато по 50 μL 0,4% раствора СРБ боје растворене у 1% сирћетној киселини. Након инкубације од 30мин на собној температури, вишак боје је уклоњен три пута испирањем са 250 μL 1% сирћетне киселине по бунару. Плоче су затим осушене на ваздуху. Везана боја је растворена додавањем 200 μL 10mM Tris-а. Плоче су стављене на шејкер 5 минута, а затим је мерена апсорбанца на Elisa читачу на таласној дужини од 550 nm (ELISA reader Zenyth 3100; Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals-Siezenheim, Austria).

Процент инхибиције раста ћелија је израчунат на основу формуле:

$$I(\%) = (1 - A_{\text{uzorka}} / \text{средња вредност } A_{\text{kontrola}}) \times 100$$

A_{uzorka} – апсорбанција узорка (третиране ћелије) на 550 nm

A_{kontrola} – апсорбанција контроле (нетретиране ћелије) на 550 nm.

СРБ тест је коришћен и за одређивање инхибиције раста ћелија након озрачивања ћелија γ зрацима, као и након комбинованих третмана (види поглавље 3.2.4. и 3.2.5.). Након одговарајућих третмана, СРБ тест је урађен на претходно описан начин.

3.2.8. Тест пролиферације - инкорпорација бром-деоксиуридина (BrdU)

Тест пролиферације је колориметријски тест који се заснива на мерењу инкорпорације пиримидинског аналога (аналога тимидина), 5-бром-2-деоксиуридина (BrdU) у току синтезе ДНК. Изведен је по упутству произвођача (BrdU ELISA Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Процедура засејавања ћелија и инкубације је идентична као за МТТ и СРБ есеј. Два сата пре истека инкубације са агенсима, у бунаре је додато по 10 μ L BrdU-раствор за обележавање (BrdU labeling solution), а затим су ћелије инкубиране до укупног времена од 6h, 24h и 48h. Следећи корак био је фиксирање са раствором из сета (Fix Denat) у трајању од 30 мин на собној температури (20°C). Затим је раствор аспиран, а фиксиране ћелије инкубиране са anti-BrdU-POD антителима, на собној температури током 90мин. Након тога, плоче су 3 пута испране да би се одстранила невезана антитела, а у сваки бунар додато је по 100 μ L супстрата. Након инкубације на собној температури у трајању од 15мин, реакција између супстрата и ензима се прекида додавањем 1M H₂SO₄, а затим се мери апсорбанца на Elisa читачу (ELISA reader Zenyth 3100; Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals-Siezenheim, Austria) на таласној дужини од 450 nm.

Процент инхибиције пролиферације израчунат је на основу формуле:

$$I(\%) = (1 - A/A_{\text{kont}}) \times 100$$

A - апсорбанца узорака ћелија које су расле у присуству различитих концентрација испитиваних комплекса;

A_{kont} - апсорбанца узорака ћелија које су расле само у храњивој подлози (нетретиране ћелије).

3.2.9. Клоногени есеј

Клоногени есеј је стандардни радиобиолошки есеј за праћење ефеката зрачења на преживљавање ћелија (Petrovic et al, 2006). Два дана пре зрачења, A549 и MCF-7 ћелије су засејаване у микротитар плоче са шест отвора. Након 24h, ћелије су третиране растворима pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt у концентрацији која одговара вредностима IC₅₀, а 24h касније, ћелије су озарачене γ зрацима у дози 1Gy, 2Gy и 4Gy. Време инкубирања је одређивано на основу критеријума од најмање шест периода дуплирања популације ћелија која се проучава. Након инкубационог периода од 14 дана, одливена је подлога, а ћелије су фиксиране хладним метанолом и обојене раствором Giemsa-е. Колоније су бројане под светлосним микроскопом. Бројане су колоније које садрже 50 и више ћелија. Способност ћелије да формира колонију која се може видети голим оком је доказ да је та ћелија задржала свој репродуктивни потенцијал након третмана токсичном супстанцом или након зрачења. Фракција преживљавања (енг. Survival Fraction, SF) је израчуната поређењем броја колонија у третираним узорцима са бројем ћелија у контролама.

број колонија

$$SF = \frac{\text{број колонија}}{\text{број засејаних ћелија} \times (PE/100)}$$

број засејаних ћелија x (PE/100)

SF - фракција преживљавања (енг. Survival Fraction)

PE - ефикасност засејавања (енг. Plating Efficiency, PE) и представља проценат ћелија у нетретираним узорцима који формирају колоније.

На основу података о преживљавању, одређени су радиобиолошки параметри: SF2 (фракција преживљавања ћелија озрачених дозом од 2Gy γ зрака), RBE (Релативна биолошка ефективност), SER (фактор повећања осетљивости ћелија на зрачење).

Вредност параметра RBE (енг. relative biological effectiveness) се дефинише као однос апсорбоване дозе референтног зрачења (γ или x) и апсорбоване дозе испитиваног зрачења или комбинованог третмана, која изазива исти ефекат. За комбиноване третмане у овом раду, RBE је одређена у односу на ефекат који производи доза од 2Gy γ зрачења. Одређена је и вредност фактора повећања осетљивости, SER (енг. sensitizer enhancement ratio) која представља однос SFagensa/SFkomb.tretmana.

3.2.10. Изоловање геномске ДНК

Геномска ДНК је изолована из културе А549 и MCF-7 ћелија које су биле изложене дејству pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt у концентрацији IC50, у трајању од 24h, као и из контролних, нетретираних ћелија. ДНК је изолована из приближно 1×10^6 ћелија. Сакупљене ћелије су ресуспендоване у 0,6mL дигестионог пуфера, коме је додата 0,5mg/mL RNasaA и инкубирано 2h на 55°C, а затим и 0.6mg/mL протеиназе К и инкубирано још 18h на 55°C. Екстракција ДНК је урађена три пута у присуству меше фенол / хлороформ / изоамил алкохол (25:24:1), а ДНК је исталожена 1/10 волумена 7,5М амонијум ацетата и 1 волуменом етанола током ноћи на +4°C. ДНК је сталожена центрифугирањем на 10000 rpm-а на +4°C, 10 минута. Пречишћена ДНК је растворена у 50 μ L ТЕ пуфера (10mM Tris/1mM EDTA, pH=8). Концентрација ДНК је одређена мерењем апсорбанце на 260 nm. Апсорбанцију од једне оптичке јединице (OD) даје 50 μ g/mL дволанчане ДНК. Узорци су затим анализирани електрофорезом на агарозном гелу.

3.2.11. Агарозна гел електрофореза

Техника електрофоретског раздвајања фрагмената ДНК на 2% гелу од агарозе је коришћена за анализу фрагмената ДНК А549 ћелија карцинома плућа и MCF-7 ћелија карцинома дојке, третираних IC50 концентрацијама pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt и ДНК изоловане из контролних ћелија. Растворено је 1.4g агарозе у 70mL 1xTBE пуфера загревањем у микроталасној пећници. Када се раствор агарозе охладио до 65°C, додат му је 0,5% етидидјум бромид, након чега је изливен у хоризонтални калуп за електрофорезу. Након хлађења и полимеризације гела, у отворе су нанети узорци: 20 μ g сваког узорка у 5 μ L пуфера за узорке. Електрофореза је извођена 5 минута на 150V, а након тога још 55 минута на 100V. Као стандард за одређивање непознате дужине фрагмената ДНК коришћена је комерцијална меша ДНК фрагмената познате дужине који се разликују у величини за по 100bp (100bp DNA Ladder). Раздвојени фрагменти ДНК су визуелизирани помоћу трансилуминатора под UV светлом и фотографисани.

Метода електрофорезе ДНК на агарозном гелу је коришћена за приказивање интернуклеозомалне фрагментације ДНК и лествичастог изгледа ДНК на гелу (енгл.

DNK ladder), што је један од показатеља апоптотске ћелијске смрти (Milosevic et al, 2002).

3.2.12. Детерминација апоптозе и некрозе проточном цитометријом

Апоптоза је тип програмиране ћелијске смрти коју карактеришу различите морфолошке промене, а једна од првих је транслокација фосфатифил серина са унутрашње стране мембране на спољашњу. Annexin-V је Ca^{2+} -зависни фосфолипид-везујући протеин са високим афинитетом везивања за фосфатидил-серин. Када је коњугован са флуорохромом, омогућује детекцију апоптотских ћелија методом проточне цитофлуориметрије. У каснијим фазама апоптозе и у некрози, долази до губитка интегритета ћелијске мембране, што омогућава бојама као што су FITC (флуоресцин изотиоцијанат) и 7AAD (7-амино-актиномицин Д) да уђу у ћелију и вежу се за ДНК. Двоструко бојење анексином и 7AAD омогућава разликовање живих, апоптотских и некротичних ћелија (Vermes et al, 1995).

За испитивање апоптозе је коришћен комерцијални комплет AnnexinV-FITC/7-AAD Kit (Beckman Coulter, Marseilles, France). Ћелије су гајене у микротитар плочама са 6 отвора и третиране растворима платинских комплекса у концентрацијама које одговарају њиховим IC50 вредностима. У отворе са контролним ћелијама, сипан је свеж медијум. Након инкубације у трајању од 6h, 24h и 48h, ћелије су испране PBS-ом и ресуспендоване у 500 μ L хладног пуфера (Binding Buffer). Узето је 100 μ l ћелијске суспензије са 5×10^5 ћелија и пребачено у тубу за проточну цитометрију. Затим је додато 10 μ l Annexin-V-FITC-а и 20 μ l 7AAD-а. Узорци су инкубирани 15 минута у мраку, а затим је у сваки од узорака додато по 400 μ l везујућег буфера (Binding Buffer) и анализирано је до 10 000 догађаја на проточном цитометру (Cytomics FC 500 Series flow cytometer, Beckman Coulter, Inc, CA, USA). Процентни ране и касне апоптозе и некрозе, анализирани су коришћењем Flowing софтвера (<http://www.flowingsoftware.com>). Живе ћелије су необележене (Annexin-V⁻/7AAD⁻), рано апоптотичне су Annexin-V⁺/7AAD⁻, касно апоптотичне су двоструко обојене (Annexin-V⁺/7AAD⁺), а некротичне су Annexin-V⁻/7AAD⁺. Резултати су представљени помоћу dot plot графика.

На основу података о броју апоптотских ћелија који је добијен Annexin V-FITC/7-AAD бојењем израчунат је и апоптотски индекс. Апоптотски индекс (AI) представља однос процента апоптозе третираних ћелија и контролних ћелија и даје нам информацију о броју апоптотских ћелија које су настале као последица третмана ћелија одређеним агенсом.

3.2.13. Анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом

За одређивање ефекта испитиваних комплекса платине на дистрибуцију ћелија по фазама ћелијског циклуса, коришћена је метода проточне цитометрије. Принцип ове методе заснива се на чињеници да ћелије у различитим фазама ћелијског циклуса садрже различиту количину ДНК. Пропидијум-јодид (PI) се уграђује у молекул ДНК и флуоресцира у наранџасто-црвеној боји, а интензитет флуоросценције је сразмеран количини ДНК у ћелији и даје информацију у којој фази ћелијског циклуса се ћелија налази (Yount et al, 1998).

Хумане А549 и МСF-7 ћелије су гајене у флашковима и 24h након расађивања су третиране pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt у концентрацијама које одговарају вредностима IC50 за сваку испитивану ћелијску линију или са свежом хранљивом подлогом, у случају контроле. Након 24h од третмана ћелије су трипсинизоване и испране у PBS-у (pH 7,4). Приближно 1×10^6 ћелија је фиксирано у хладном 70% етанолу, како би се омогућила пермеабилитетна ћелијске мемране и улазак боје у ћелију. Затим следи инкубација са 500 μg RnaseA, 30 минута на 37°C. На овај начин избегава се неселективно везивање боје и за РНК, тако да се целокупни пропиридијум јодид у наредном кораку везује селективно за ДНК. Након инкубације, ћелије су третиране пропиридијум јодидом у концентрацији од 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ у трајању од 30 минута, у мраку. Дистрибуција ћелија по фазама ћелијског циклуса и ДНК садржаја урађена је на проточном цитометру (Cytomics FC 500 Series flow cytometer, Beckman Coulter, Inc, CA, USA). Садржај ДНК је одређен коришћењем Flowing софтвера, за минимум 10 000 појединачних догађаја (ћелија) по узорку. Дистрибуција ћелија по фазама ћелијског циклуса представљена је хистограмски.

3.2.14. Western blot анализа протеина

Изолација укупних протеина из А549 и МСF-7 ћелија третираних током 24h IC50 концентрацијама pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt изведена је додавањем ћелијским суспензијама (око 1×10^6 ћелија) 200 μL пуфера за лизирање коме су, непосредно пре употребе додати фосфатазни (1mM натријум ортованадат (Na_3VO_4), натријум флуорид (NaF), бета-диглицерофосфат, натријум пирофосфат) и протеазни (по 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ леупептина, антипаин, PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride), спермидина и апопротинина) инхибитори. Ћелије су лизирани 1h на леду. Лизати су центрифугирани 20 минута на 1700g на температури од +4°C. Издвојен је супернатант и од њега је одвојено 15 μL за одређивање концентрације протеина, а у остатак је додат један волумен пуфера за наливање. Узорци су прокувани 5 минута на 100°C и остављени на -20°C до употребе. Концентрација протеина у узорцима је одређивана спектрофотометријски, методом по Lowry–ју (Waterborg and Matthews, 1984).

Протеини су раздвајани електрофорезом на полиакриламидном гелу у присуству детергента натријум додецил сулфата (енгл. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), који се састоји из два дела: 7,5% гел за концентровање узорака и 12% гел за раздвајање узорака, у SDS пуферу за електрофорезу. Узорци протеина (20 μg) су наношени у бунаре и раздвајани SDS-PAGE електрофорезом на апарату Mini Protein 3 Electrophoresis Cell system (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) при константном напону од 110V.

По завршетку раздвајања, први корак у имуноблот анализи (Western blot) јесте пренос протеина са полиакриламидног гела на мембрану од поливинилиден дифлуорида (енг. Polyvinylidene Difluoride, PVDF) (Immobilion-P Transfer Membrane, Millipore, Bedford, MA, SAD) и за то је коришћен систем Transblot Cell (Bio Rad Hercules, CA, USA). Пренос протеина је урађен у пуферу за трансфер, 24h на +4°C. Мембране су испране, а затим блокиране сат времена на собној температури у раствору за блокирање (5% обрано млеко у PBS-у) како би се смањило неспецифично везивање за PVDF мембрану. Мембране су током ноћи инкубирани са примарним антителима на Вах и Bcl-2 (Cell Signaling, Danvers, Mass, USA). Антитела су била разблажена у односу 1:1000 у пуферу PBST/BSA.

Након обилног испирања PBST пуфером, мембране су 2h на собној температури додатно инкубирани са секундарним козјим анти-зечјим антителима коњугованим са HRP (HRP, Cell Signaling). Секундарна антитела разблаживана су до концентрације 1:5000 у PBST/BSA. Након испирања, на мембране је наносен супстрат за хемилуминисценцију ECL (eng. enhanced chemiluminescence) и стављене су у касете за развијање. Сигнал је детектован ауторадиографски, а квантификација сигнала је вршена денситометријски, помоћу софтвера Image J Analysis PC Software (NIH, Bethesda, MD, USA).

3.2.15. Статистичка обрада података

Подаци добијени у овом истраживању су анализирани применом статистичког програма SPSS верзија 20. Правилност расподеле добијених вредности испитана је помоћу Kolmogorov-Smirnov или Shapiro-Wilk теста. За тестирање хипотезе средњих вредности континуалних варијабли које имају нормалну расподелу коришћен је Studentov t – тест, независни t – тест, упарени t – тест, односно ANOVA, док је за поређење варијабли који немају правилну расподелу коришћен One-Sample Kolmogorov Smirnov, Mann-Whitney, Wilcoxon тест и Kruskal-Wallis тест. Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0,05$ (*), средње значајна разлика када је $p < 0,01$ (**), док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0,001$ (***). Резултати експеримента су изражени као средња вредност \pm стандардна грешка (SE) и приказани табеларно и графички.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Одређивање времена дупликације ћелија

Време дупликације ћелија (T_d) одређено је на основу праћења раста и бројања ћелија до 4. дана после засејавања. Време дупликације свих испитиваних ћелија дато је у Табели 1.

	A549	MCF-7	HTB140	MRC-5
T_d (h)	48,5 ± 14,9	48,6 ± 6,4	32,7 ± 5,1	39,5 ± 5,6

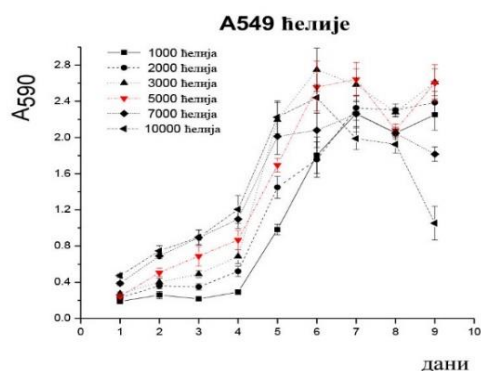
Табела 1. Време дупликације испитиваних ћелија израчунато на основу раста у култури до 4. дана после засејавања. Резултати представљају средњу вредност ± SD (стандардна девијација) из три независна експеримента.

4.2. Оптимизација експерименталних услова за *in vitro* раст ћелија

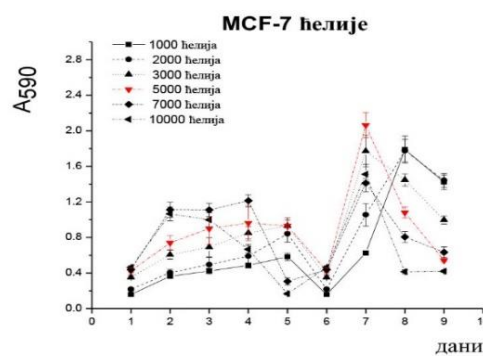
Колориметријски есеји показују линеарни однос између броја ћелија и апсорбанце за вредности мање од 1. У циљу дефинисања оптималног броја ћелија за колориметријске есеје, раст А549, МCF-7, НТВ140 и МRC-5 ћелија је праћен током 9 дана раста у култури помоћу МТТ теста. Ћелије су гајене у микротитар плочама са 96 бунара. Почетни број ћелија за сваку ћелијску линију је вариран у опсегу од 1000 ћелија/бунару до 10.000 ћелија/бунару (Графикон 1). На основу добијених резултата одлучено је да почетни број ћелија за све ћелијске линије буде 5×10^3 ћелија/бунару.

На основу криве раста ћелија одређена је и временска тачка која је најпогоднија за третман ћелија испитиваним агенсима. Пошто су све ћелије до 4. дана раста у култури у експоненцијалној фази, одлучено је да се ћелије третирају 24h након засејавања, а да третман траје најдуже до 48h, односно до 3 дана раста у култури.

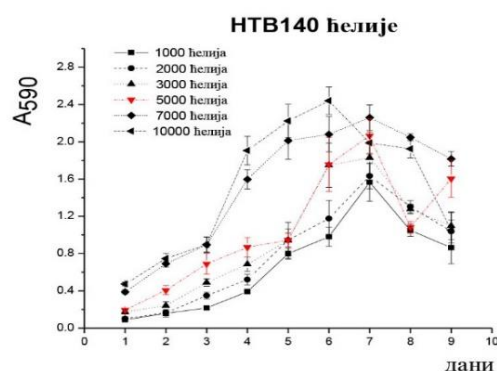
А



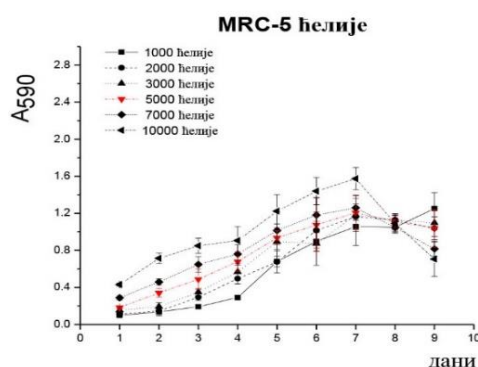
Б



В



Г



Графикон 1. Криве раста А) A549 ћелија карцинома плућа, Б) MCF-7 ћелија карцинома дојке, В) HTB140 ћелија меланома и Г) MRC-5 ћелија плућа, одређене помоћу MTT есеја. Резултати су добијени из три независна експеримента урађена у трипликату и приказани су као средња вредност \pm SE (стандардна грешка).

4.3. Цитотоксичност новосинтетисаних комплекса платине(IV) и cis-Pt

Цитотоксичност новосинтетисаних комплекса платине(IV), pentyl-Pt и butyl-Pt, као и цисплатине, cis-Pt, одређивана је коришћењем две методе: MTT и СРБ тестом. Наведеним комплексима третирана је једна хумана здрава ћелијска линија фибробласта плућа (MRC-5), као и три хумане туморске ћелијске линије: A549 карцинома плућа, MCF-7 карцинома дојке и HTB-140 ћелије меланома.

4.3.1. Одређивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса платине(IV) и cis-Pt помоћу MTT теста

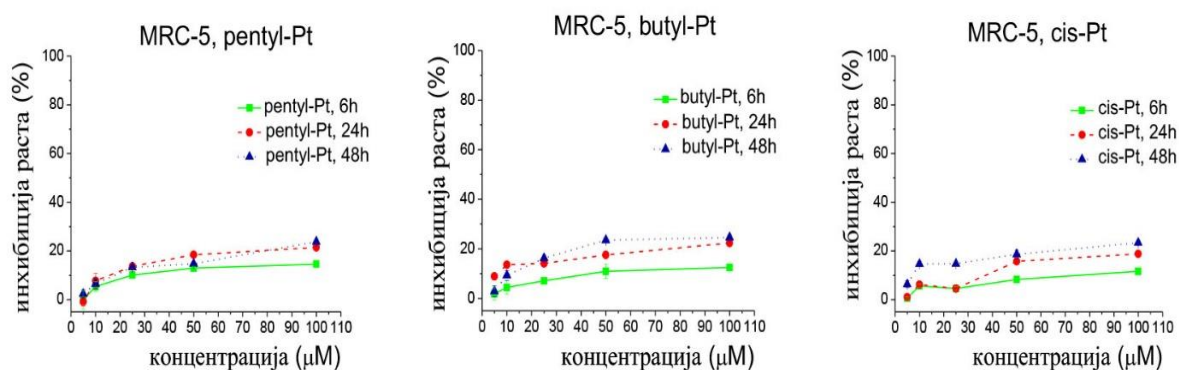
Цитотоксични потенцијал новосинтетисаних комплекса pentyl-Pt и butyl-Pt, као и cis-Pt, испитиван је коришћењем колориметријског MTT теста који се заснива на метаболичкој активности митохондријалних ензима, сукцинат дехидрогеназе. Након третмана наведеним комплексима у концентрацијама од 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M и 100 μ M у трајању од 6h, 24h и 48h, MTT тестом је одређена вијабилност ћелија једне

здраве (MRC 5) и три туморске (A549, MCF-7 и НТВ 140) ћелијске линије. Ефекат новосинтетисаних комплекса платине(IV) је упоређиван са ефектима cis-Pt у истој концентрацији, на истим ћелијским линијама.

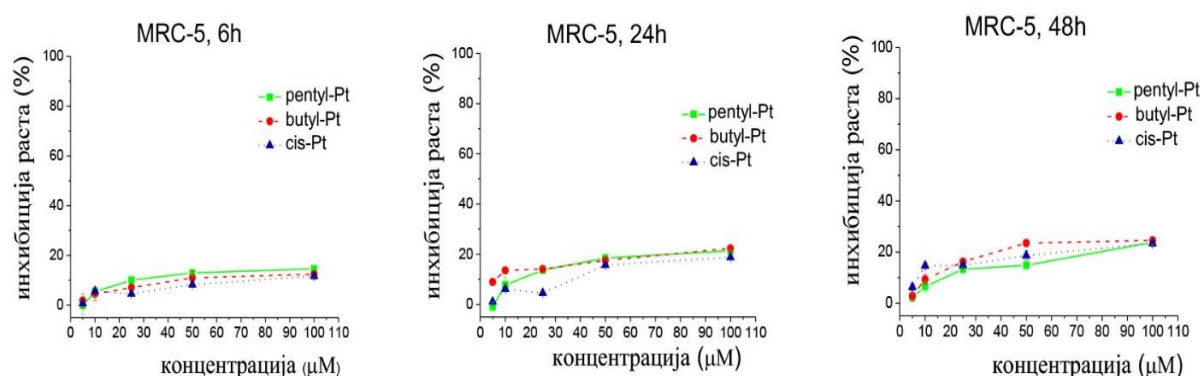
Pentyl-Pt и butyl-Pt, као и cis-Pt, испољавају дозно и временски зависне цитотоксичне ефекте на испитиваним ћелијским линијама.

Цитотоксични ефекти pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt на хуманим MRC-5 ћелијама фибробласта плућа (Графикон 2) су слаби и не прелазе 20% након третмана највишим концентрацијама (100 μ M) у трајању од 48h. Након третмана у трајању од 6h сви испитивани комплекси доводе до инхибиције раста мање од 10% ћелија. Дужи третмани у трајању од 24h и 48h имају мало израженији цитотоксични ефекат на здравим фибробластима, али и тада је проценат цитотоксичности до 20% и то са највишим примењеним дозама од 50 μ M и 100 μ M (Графикон 2).

A



B



Графикон 2. Дозно-зависне (A) и временски-зависне (B) криве раста MRC-5 ћелија добијене MTT тестом након третирања ћелија различитим концентрацијама испитиваних комплекса у трајању 6h, 24h и 48h. Резултати су представљени као средња вредност \pm SE (стандардна грешка).

Израчунате вредности IC50 су много више од 100 μ M и указују на веома слабу инхибицију раста MRC-5 ћелија испитиваним комплексима (Табела 2).

IC50 (μM)	6h	24h	48h
butyl-Pt	419,35 \pm 109,42	252,15 \pm 6,38	188,86 \pm 8,95
pentyl-Pt	328,63 \pm 39,03	216,18 \pm 3,63	212,77 \pm 10,27
cis-Pt	451,48 \pm 45,21	253,26 \pm 1,89	230,51 \pm 11,06

Табела 2. IC50 вредности за MRC-5 ћелије, израчунате на основу резултата МТТтеста (вредност $\mu\text{M} \pm \text{S.E.}$)

Третмани А549 ћелија хуманог карцинома плућа испитиваним агенсима доводе до дозно и временски зависне инхибиције раста (Графикон 3).

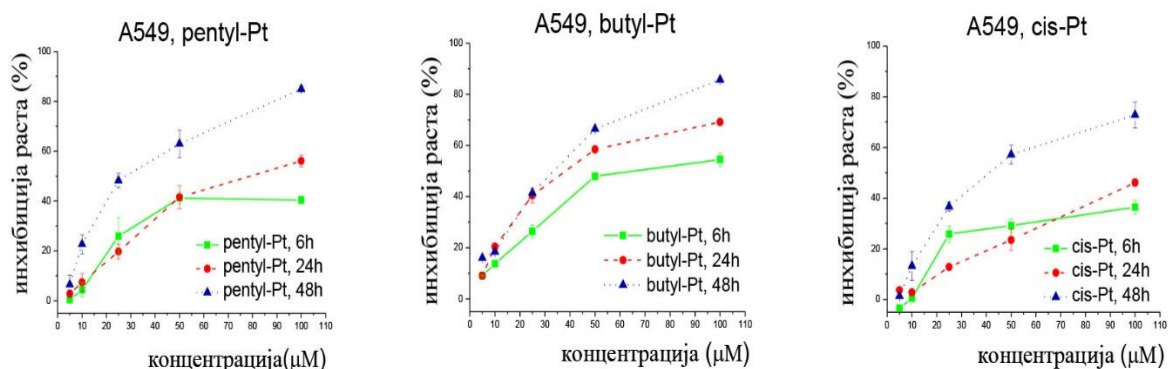
Третман А549 ћелија pentyl-Pt довео је до статистички значајне инхибиције раста ћелија (у односу на контролу) када су оне третиране концентрацијама већим од 25 μM , како после 6-часовног ($p < 0,01$), тако и тако и након 24-часовног третмана ($p < 0,001$). Третман pentyl-Pt у трајању од 48h у концентрацијама већим од 10 μM изазвао је статистички значајан цитотоксични ефекат према третираним у односу на нетретиране ћелије ($p < 0,001$).

Butyl-Pt је након 6h третмана концентрацијама од 10 μM и вишим испољила статистички значајан цитотоксични ефекат у односу на контроле ($p < 0,001$). Исти ефекат је постигнут и третманом 10 μM butyl-Pt у трајању од 24h ($p < 0,001$). Butyl-Pt је након 48h испољила статистички значајно већи цитотоксични ефекат у свим испитиваним концентрацијама у односу на нетретиране А549 ћелије ($p < 0,001$).

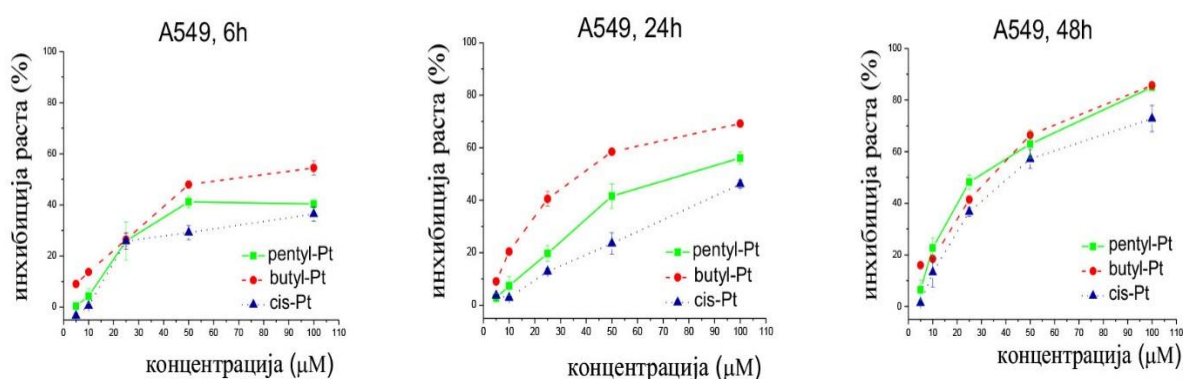
Примена cis-Pt у концентрацији од 25 μM и вишим довела је до статистички значајне инхибиције раста А549 ћелија ($p < 0,001$) након 6h, 24h и 48h (Графикон 3А) у односу на контроле.

Ако упоредимо ефекте појединачних комплекса на инхибицију раста А549 ћелија, видимо да најбољи ефекат има pentyl-Pt након краткотрајних третмана (до 6h), док након дужих третмана (24h и 48h) најјачи инхибиторни ефекат на раст А549 ћелија има butyl-Pt, затим pentyl-Pt, а најслабији цитотоксични ефекат је добијен након третмана cis-Pt (Графикон 3Б). Након инкубације у трајању од 6h, статистички значајна разлика ($p < 0,001$) постоји између сва три агенса, али само за високе концентрације (50 μM и 100 μM). Након 24-часовног третмана статистички значајна разлика ($p < 0,001$) у инхибицији раста ћелија постоји за сва три агенса у концентрацијама од 10 μM и вишим. Разлика у ефектима pentyl-Pt и butyl-Pt се губи након 48h трајања третмана, али су ефекти статистички значајно већи у односу на ефекте које остварује cis-Pt, посебно за концентрације од 25 μM и веће ($p < 0,001$).

A



B



Графикон 3. Дозно-зависне (A) и временски-зависне (B) криве раста A549 ћелија добијене МТТ тестом након третирања ћелија различитим концентрацијама испитиваних комплекса у трајању 6h, 24h и 48h. Резултати су представљени као средња вредност \pm SE (стандардна грешка).

Израчунате вредности IC₅₀, које представљају концентрацију агенса која инхибира преживљавање третираних ћелија за 50% (μM) после 6-, 24- и 48-часовног третмана, указују на висок цитотоксични ефекат испитиваних комплекса на A549 ћелијама (Табела 3).

IC ₅₀ (μM)	6h	24h	48h
butyl-Pt	77,94 \pm 2,69	39,19 \pm 0,74	35,03 \pm 0,41
pentyl-Pt	101,69 \pm 5,58	61,91 \pm 6,4	35,68 \pm 2,28
cis-Pt	119,15 \pm 5,1	109,51 \pm 13,28	58,37 \pm 4,7

Табела 3. IC₅₀ вредности за A549 ћелије, израчунате на основу резултата МТТ теста (вредност $\mu\text{M} \pm$ S.E.)

Индекс селективности (selectivity index, SI), чија вредност указује на селективност испитиваног агенса у антитуморској активности, израчунава се као однос IC50 вредности за здраве ћелије и IC50 вредности за туморске ћелије. Агенси који имају SI>3 су агенси са високом селективношћу. SI вредности за A549 ћелије, приказане у Табели 4, показују да испитивани комплекси платине имају добру селективност у односу на A549 ћелије карцинома плућа. Најбољу селективност у деловању показује butyl-Pt, док pentyl-Pt показује селективност у деловању само при третманима од 48h.

SI	6h	24h	48h
butyl-Pt	5,4	6,4	5,4
pentyl-Pt	3,2	3,5	5,9
cis-Pt	3,8	2,3	3,9

Табела 4. Индекс селективности (SI) испитиваних комплекса платине на A549 ћелијама карцинома плућа, израчунат на основу резултата МТТ теста.

Новосинтетисани комплекси платине(IV) испољавају дозно и временски зависну цитотоксичност према **MCF-7** ћелијама карцинома дојке (Графикон 4).

Већ након 6-часовног третмана, pentyl-Pt доводи до инхибиције раста MCF-7 ћелија (Графикон 4А). До статистички значајне инхибиција раста дошло је након третмана pentyl-Pt у дози од 10 μM ($p<0,05$), а још јачи ефекат је постигнут третманима са вишим концентрацијама (25 μM , 50 μM и 100 μM) pentyl-Pt ($p<0,001$) у односу на контролне, нетретиране ћелије. Након 24h, примена pentyl-Pt у концентрацијама већим од 25 μM показала је статистички значајно већу цитотоксичност у односу на нетретиране ћелије ($p<0,001$). Примена пентил платине током 48h у концентрацијама већим од 10 μM показала је статистички значајан цитотоксични ефекат према третираним ћелијама ($p<0,001$).

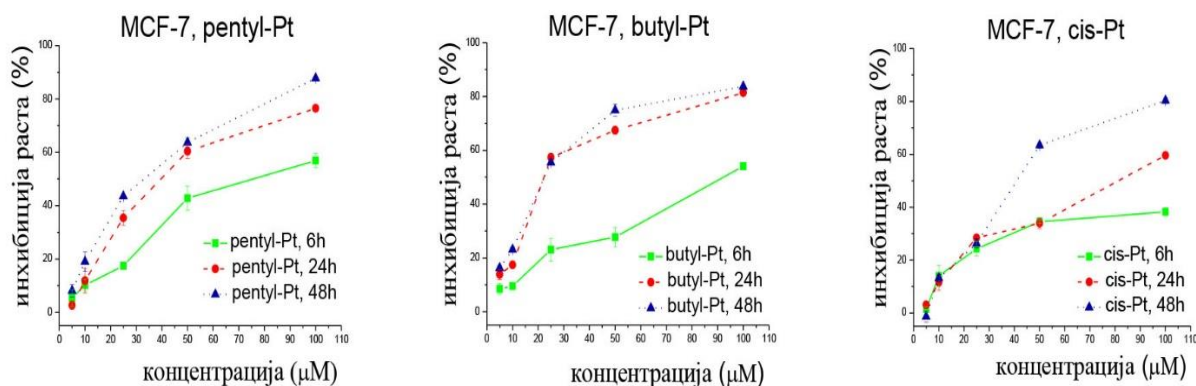
Butyl-Pt је након 6h испољила статистички значајан цитотоксични ефекат у концентрацијама од 10 μM ($p<0,001$), а након 24h и 48h све испитиване концентрације butyl-Pt доводе до статистички значајне инхибиције раста MCF-7 ћелија у односу на нетретиране ћелије ($p<0,001$) (Графикон 4А).

Након 6h часова, примена cis-Pt у концентрацији од 10 μM испољава статистички значајну цитотоксичност ($p<0,01$), а још израженији ефекти су добијени применом већих доза cis-Pt (25 μM , 50 μM и 100 μM) ($p<0,001$). Након 24h и 48h, cis-Pt је у дозама од 10 μM и вишим испољила статистички значајну цитотоксичност ($p<0,001$) (Графикон 4А).

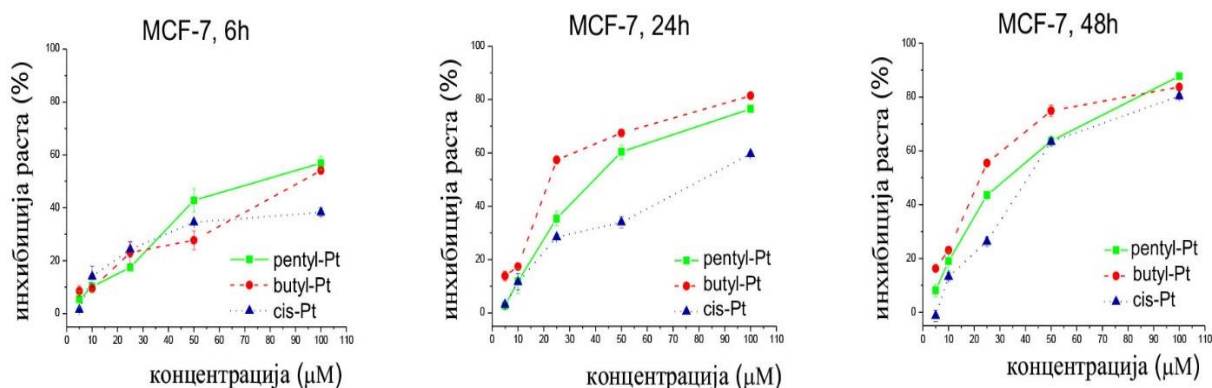
Ако упоредимо ефекте појединачних комплекса на инхибицију раста MCF-7 ћелија након 6-часовног третмана, видимо да ниске концентрације (5 μM , 10 μM и 25 μM) свих примењених агенаса остварују приближно исте ефекте на инхибицију раста ћелија карцинома дојке (Графикон 4Б). Третман pentyl-Pt у концентрацији од 50 μM у трајању од 6h остварује бољи цитотоксични ефекат у односу на butyl-Pt и cis-Pt ($p<0,001$), али исти третман butyl-Pt има статистички значајно јачи цитотоксични ефекат од cis-Pt ($p<0,01$). Након третмана концентрацијом од 100 μM у трајању од 6h, ефекти pentyl-Pt и butyl-Pt се не разликују ($p>0,05$) и статистички значајно су јачи од ефеката које постиже cis-Pt ($p<0,001$) (Графикон 4Б). Разлика између појединих агенаса је најизраженија након

24-часовног третмана: ефекти третмана агенсима чије су концентрације веће од 10 μ M су статистички значајно различити и то између butyl-Pt и pentyl-Pt ($p < 0,001$), butyl-Pt и cis-Pt ($p < 0,001$), као и између pentyl-Pt и cis-Pt ($p < 0,01$). Након третмана у трајању од 48h разлике у цитотоксичним ефектима између појединих агенаса се смањује, посебно након третмана високим дозама (100 μ M) (Графикон 4Б).

A



B



Графикон 4. Дозно-зависне (А) и временски-зависне (Б) криве раста MCF-7 ћелија добијене МТТ тестом након третирања ћелија различитим концентрацијама испитиваних комплекса у трајању 6h, 24h и 48h. Резултати су представљени као средња вредност \pm SE (стандардна грешка).

Израчунате вредности IC50 после 6-, 24- и 48-часовног третмана указују на висок цитотоксични ефекат испитиваних комплекса на MCF-7 ћелијама карцинома дојке, посебно новосинтетисаних pentyl-Pt и butyl-Pt након третмана дужим од 24h. (Табела 5).

IC50(μ M)	6h	24h	48h
butyl-Pt	89,62 \pm 11,72	31,67 \pm 0,88	29,01 \pm 0,81
pentyl-Pt	60,98 \pm 4,92	40,43 \pm 1,57	36,15 \pm 1,07
cis-Pt	114,52 \pm 3,45	78,95 \pm 1,99	54,56 \pm 1,02

Табела 5. IC50 вредности за MCF-7 ћелије, израчунате на основу резултата MTT теста (вредност μ M \pm S.E.)

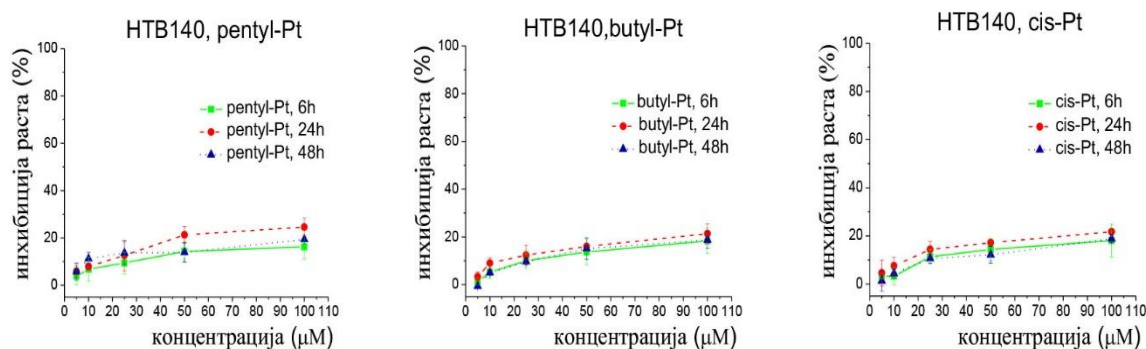
SI вредности за MCF-7 ћелије, приказане у Табели 6, показују да испитивани комплекси платине имају добру селективност у односу на MCF-7 ћелије карцинома дојке. Најбољу селективност у деловању показује butyl-Pt, а затим pentyl-Pt.

SI	6h	24h	48h
butyl-Pt	4,7	7,9	6,5
pentyl-Pt	5,4	5,3	5,9
cis-Pt	3,9	3,2	4,2

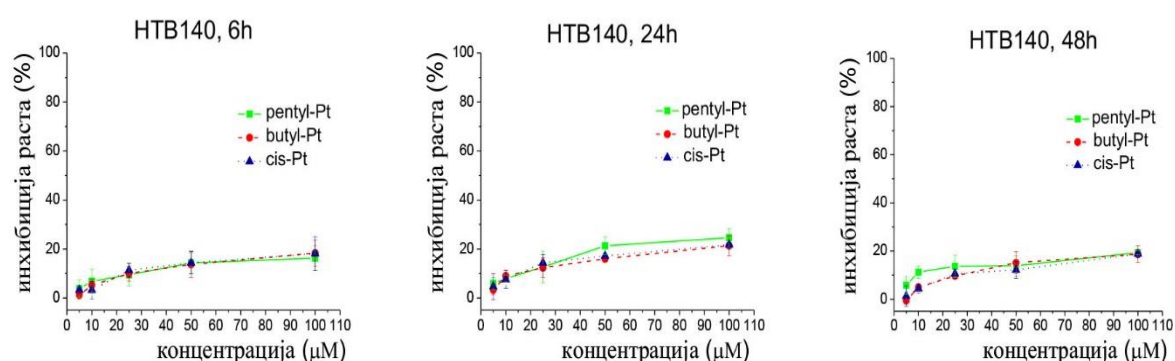
Табела 6. Индекс селективности (SI) испитиваних комплекса платине на MCF-7 ћелијама карцинома дојке, израчунат на основу резултата MTT теста..

Новосинтетисани комплекси платине(IV), као и cis-Pt, испољавају веома благу дозно и временски зависну цитотоксичност према **HTB140** ћелијама хуманог меланома (Графикон 5). Инхибиција раста ових ћелија не прелази 20% ни после дуготрајних третмана од 48h и највећом примењеном концентрацијом од 100 μ M (Графикон 5А). Такође, не постоје ни статистички значајне разлике између три примењена комплекса платине ($p > 0,05$) (Графикон 5Б).

A



B



Графикон 5. Дозно-зависне (A) и временски-зависне (B) криве раста НТВ140 ћелија добијене МТТ тестом након третирања ћелија различитим концентрацијама испитиваних комплекса у трајању 6h, 24h и 48h. Резултати су представљени као средња вредност ± SE (стандардна грешка).

Израчунате IC50 вредности су високе за сва три примењена агенса (IC50 > 100 µM), што указује на слабу осетљивост НТВ140 ћелија на комплексе платине (Табела 7).

IC50(µM)	6h	24h	48h
butyl-Pt	287,005 ± 104,45	249,11 ± 60,34	259,78 ± 69,11
pentyl-Pt	325,205 ± 83,06	203,61 ± 46,57	292,74 ± 3,12
cis-Pt	298,222 ± 130,204	233,95 ± 24,24	266,03 ± 20,01

Табела 7. IC50 вредности за НТВ140 ћелије, израчунате на основу резултата МТТ теста (вредност µM ± S.E.)

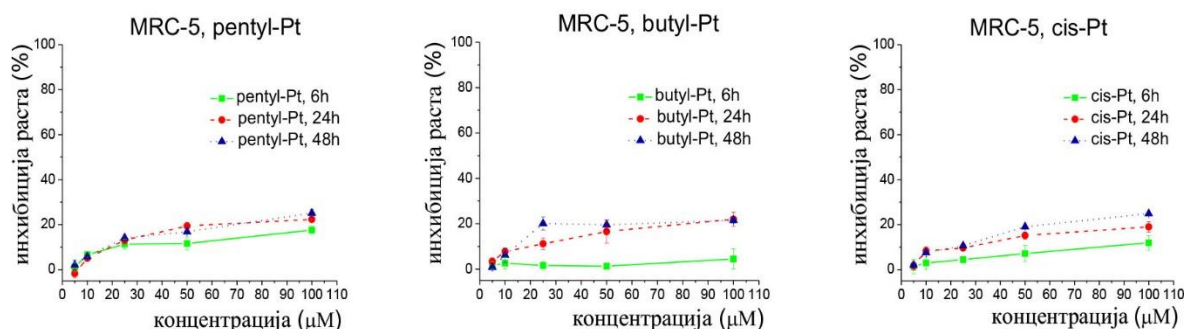
4.3.2. Одређивање цитотоксичности новосинтетисаних комплекса платине(IV) и cis-Pt помоћу СРБ теста

Сулфородамин Б (СРБ) је боја којом се боје протеини живих ћелија, тако да резултати теста не зависе од метаболичке активности ћелија, већ од укупне количине протеина. Због тога смо одлучили да у овом истраживању инхибицију раста ћелија након третмана испитиваним комплексима платине(IV) и cis-Pt пратимо и коришћењем СРБ колориметријског есеја, како би на крају упоредили резултате оба есеја (МТТ и СРБ) и што прецизније одредили цитотоксичност испитиваних агенаса.

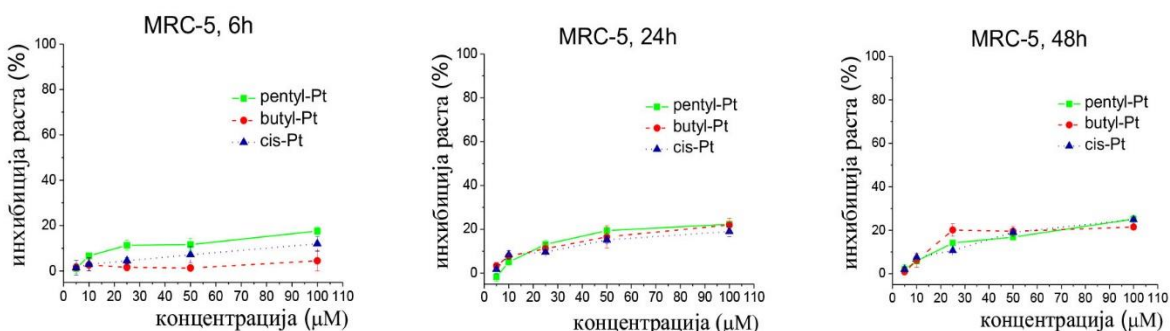
СРБ тестом је одређена вијабилност MRC-5, A549, MCF-7 и НТВ140 ћелија након третмана pentyl-Pt и butyl-Pt у концентрацијама од 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M и 100 μ M у трајању од 6h, 24h и 48h. Њихов ефекат је упоређиван са ефектима cis-Pt у истој концентрацији и истим временским тачкама.

Третман MRC-5 ћелија здравих хуманих фибробласта плућа не доводи до значајне инхибиције раста примењеним дозама агенаса у свим временским тачкама (Графикон 6).

А



Б



Графикон 6. Дозно-зависне (А) и временски-зависне (Б) криве раста MRC-5 ћелија добијене СРБ тестом након третирања ћелија различитим концентрацијама испитиваних комплекса у трајању 6h, 24h и 48h. Резултати су представљени као средња вредност \pm SE (стандардна грешка).

Израчунате IC₅₀ вредности, које су значајно веће од 100 μ M, потврђују резистентност ових ћелија на третман испитиваним агенсима.

IC50(μM)	6h	24h	48h
butyl-Pt	540,86 \pm 229,74	228,17 \pm 9,45	213,95 \pm 1,37
pentyl-Pt	293,91 \pm 27,37	201,35 \pm 11,31	194,77 \pm 8,64
cis-Pt	446,49 \pm 102,15	287,98 \pm 59,03	192,78 \pm 2,49

Табела 8. IC50 вредности за MRC-5 ћелије, израчунате на основу резултата СРБ теста (вредност $\mu\text{M} \pm \text{S.E.}$)

Третман **A549** ћелија хумаог карцинома плућа pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt довео је до дозно и временски зависне инхибиције раста (Графикон 7).

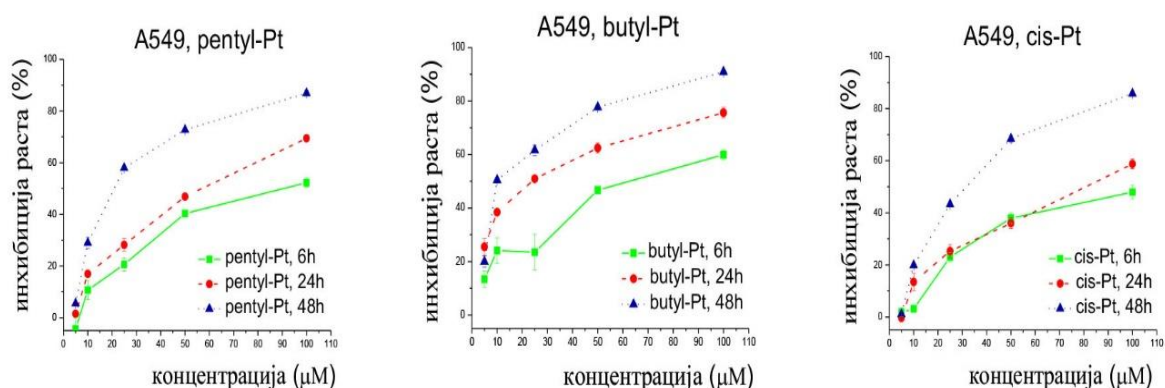
Након 6h, примена pentyl-Pt у концентрацијама од 25 μM и вишим концентрацијама испољила је статистички значајну цитотоксичност, како за концентрацију од 25 μM , ($p < 0,01$), тако и за концентрације 50 μM и 100 μM ($p < 0,001$). Третман pentyl-Pt током 24h и 48h концентрацијама већим од 10 μM изазвао је статистички значајно већи цитотоксични ефекат према третираним A549 ћелијама ($p < 0,001$) у односу на нетретиране, контролне ћелије (Графикон 7А).

Butyl-Pt је показала јако, статистички значајно ($p < 0,001$) цитотоксично дејство при свим примењеним концентрацијама (5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM и 100 μM) и у свим временским тачкама (након 6h, 24h и 48h) (Графикон 7А).

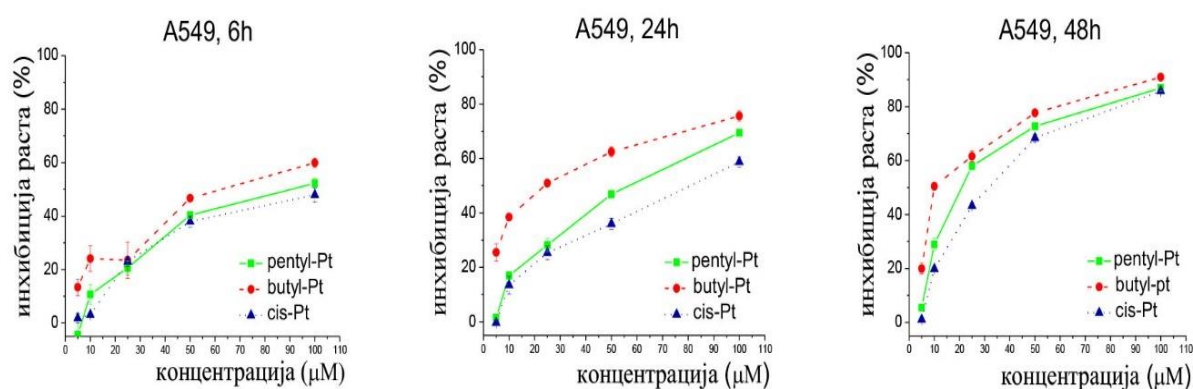
Шесточасовни третман cis-Pt у концентрацији од 25 μM и вишим испољила је статистички значајно већу цитотоксичност ($p < 0,001$) у односу на контроле. При дужим третманима cis-Pt (24h и 48h) статистички значајну цитотоксичност ($p < 0,001$) изазивају и ниже концентрације cis-Pt (10 μM и више) (Графикон 7А)

Ако упоредимо цитотоксичне ефекте појединих агенаса, можемо да закључимо да су најбољи ефекти постижу применом butyl-Pt у свим временским тачкама и та разлика у односу на pentyl-Pt и cis-Pt је статистички значајна за све примењене концентрације агенаса ($p < 0,001$). Након третмана у трајању од 6h, pentyl-Pt и cis-Pt испољавају сличан цитотоксични ефекат (Графикон 7Б). Међутим, статистички значајна ($p < 0,001$) разлика у инхибицији раста A549 ћелија између pentyl-Pt и cis-Pt је детектована након 24-часовног третмана високим концентрацијама (50 μM и 100 μM), као и након 48-часовног третмана нижим концентрацијама (до 50 μM) pentyl-Pt и cis-Pt (Графикон 7Б). Након 48-часовног третмана концентрацијом од 100 μM , разлика између pentyl-Pt и cis-Pt је статистички несигнификантна ($p > 0,05$) (Графикон 7Б).

A



B



Графикон 7. Дозно-зависне (А) и временски-зависне (Б) криве раста А549 ћелија добијене СРБ тестом након третирања ћелија различитим концентрацијама испитиваних комплекса у трајању 6h, 24h и 48h. Резултати су представљени као средња вредност ± SE (стандардна грешка).

Израчунате IC₅₀ вредности после 6-, 24- и 48-часовног третмана, указују на висок цитотоксични ефекат испитиваних комплекса на А549 ћелијама (Табела 9).

IC ₅₀ (µM)	6h	24h	48h
butyl-Pt	72,35 ± 2,48	31,83 ± 0,95	23,81 ± 0,46
pentil-Pt	85,24 ± 2,52	51,09 ± 0,98	29,39 ± 0,49
cis-Pt	92,71 ± 5,29	79,51 ± 3,11	47,13 ± 0,54

Табела 9. IC₅₀ вредности за А549 ћелије, израчунате на основу резултата СРБ теста (вредност µM ± S.E.)

Испитивани комплекси платине(IV), pentyl-Pt, butyl-Pt, као и cis-Pt имају селективно дејство: јачи цитотоксични ефекти су постигнути на туморским А549

ћелијама у односу на здраве нетуморске MRC-5 ћелије, на шта указује вредности израчунатог SI индекса (Табела 10). Најбоља селективност у деловању је добијена за butyl-Pt у свим временским тачкама.

SI	6h	24h	48h
butyl-Pt	7,5	7,2	8,9
pentyl-Pt	3,5	3,9	6,6
cis-Pt	4,8	3,6	4,1

Табела 10. Индекс селективности (SI) испитиваних комплекса платине на A549 ћелијама карцинома плућа, израчунат на основу резултата СРБ теста.

Резултати СРБ теста показују да испитивани агенси испољавају дозно и временски зависну цитотоксичност према MCF-7 ћелијама хуманог карцинома плућа (Графикон 8).

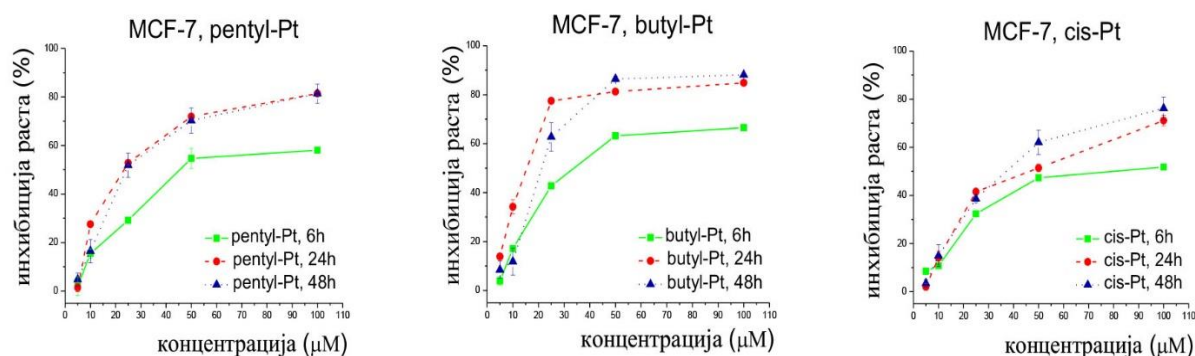
Pentyl-Pt има статистички значајно јаче цитотоксичне ефекте на MCF-7 ћелије у односу на контролне у свим концентрацијама већим од 10 μ M и у свим временским тачкама (Графикон 8А). За ниже концентрације pentyl-Pt (10 μ M) та значајност износи $p < 0,01$, а за веће концентрације $p < 0,001$.

У односу на нетретирание, контролне ћелије, butyl-Pt испољава статистички значајну ($p < 0,001$) инхибицију раста MCF-7 ћелија када су примењене концентрације 10 μ M и веће, у свим анализираним временским тачкама (Графикон 8А).

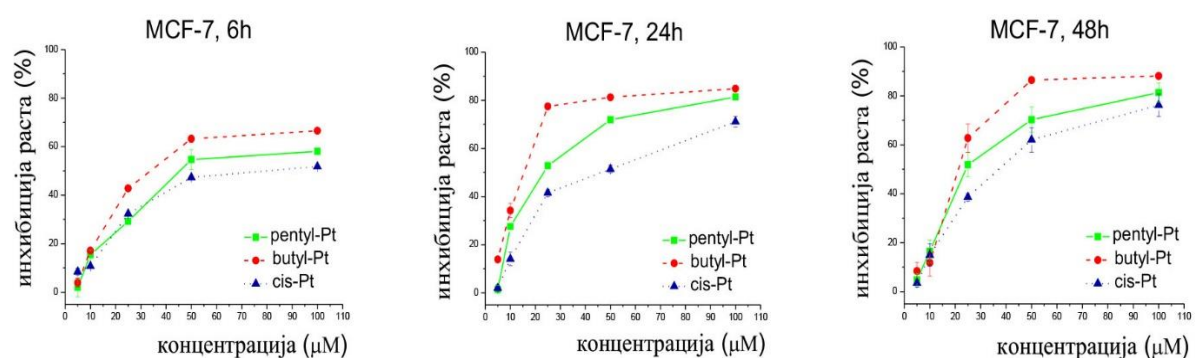
И примена cis-Pt у концентрацијама од 10 μ M и вишим испољава статистички значајно већу цитотоксичност ($p < 0,001$) у односу на контролне, нетретирание ћелије, у свим временским тачкама (Графикон 8А).

Ако упоредимо цитотоксичне ефекте појединих агенаса на инхибицију раста MCF-7 ћелија, можемо да закључимо да све примењене концентрације butyl-Pt доводе до статистички значајне ($p < 0,001$) инхибицију раста ћелија у односу на pentyl-Pt и cis-Pt и то у свим временским тачкама (6h, 24h и 48h) (Графикон 8Б). Pentyl-Pt има сличне ефекте као и cis-Pt када се примене концентрације до 100 μ M у трајању од 6h. Само концентрација pentyl-Pt од 100 μ M изазива статистички значајно већу инхибицију раста у односу на исту концентрацију cis-Pt при третману од 6h. Третмани у трајању од 24h и 48h доводе до статистички значајно ($p < 0,001$) јачих цитотоксичних ефеката pentyl-Pt у односу на cis-Pt, при свим примењеним концентрацијама (Графикон 8Б).

A



B



Графикон 8. Дозно-зависне (А) и временски-зависне (Б) криве раста МСF-7 ћелија добијене СРБ тестом након третирања ћелија различитим концентрацијама испитиваних комплекса у трајању 6h, 24h и 48h. Резултати су представљени као средња вредност ± SE (стандардна грешка).

Израчунате вредности IC₅₀ потврђују осетљивост МСF-7 ћелија карцинома дојке на третмане комплексима платине (Табела 11).

IC ₅₀ (µM)	6h	24h	48h
butyl-Pt	57,61 ± 0,52	33,43 ± 0,33	39,23 ± 2,07
pentyl-Pt	70,37 ± 2,18	44,91 ± 0,14	47,03 ± 3,92
cis-Pt	79,89 ± 0,47	59,69 ± 1,61	54,27 ± 3,11

Табела 11. IC₅₀ вредности за МСF-7 ћелије, израчунате на основу резултата СРБ теста (вредност µM ± S.E.)

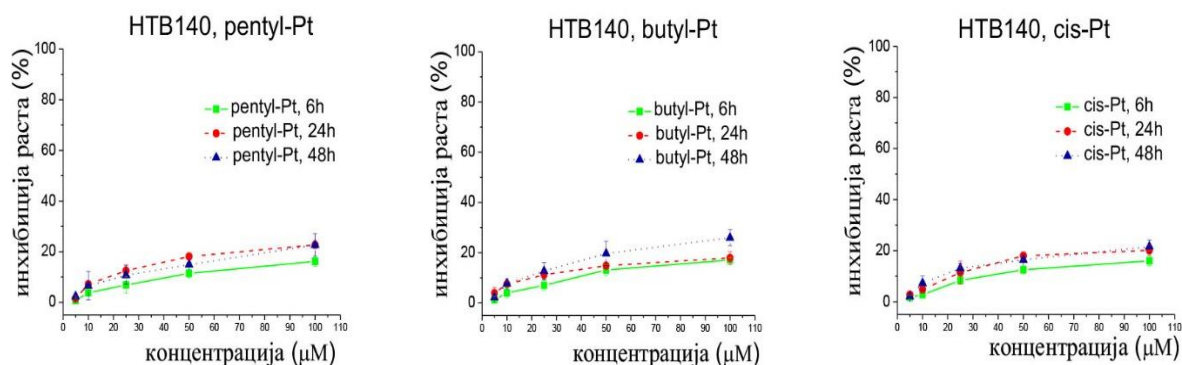
Индекс селективности SI указује на селективно дејство pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt према туморским МСF-7 ћелијама у односу на здраве МRC-5 ћелије (Табела 12).

SI	6h	24h	48h
butyl-Pt	9,4	9,8	8,0
pentyl-Pt	6,5	6,5	6,0
cis-Pt	5,6	4,8	3,6

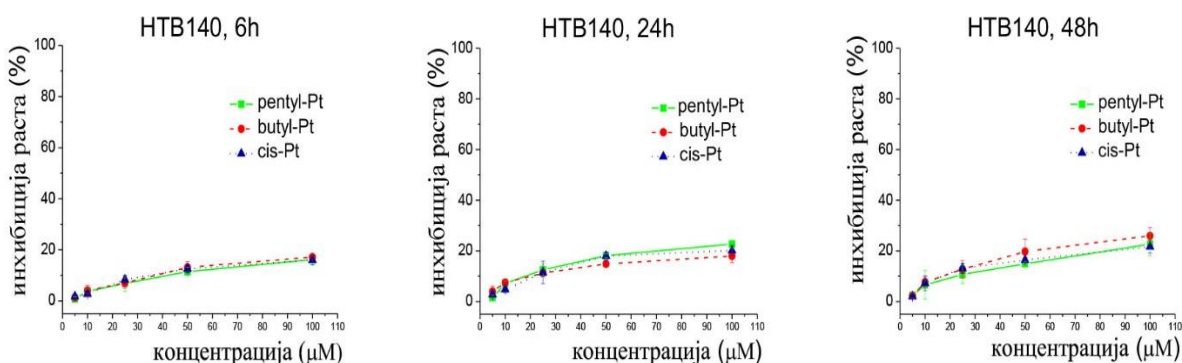
Табела 12. Индекс селективности (SI) испитиваних комплекса платине на MCF-7 ћелијама карцинома плућа, израчунат на основу резултата СРБ теста.

Иако је третман **НТВ140** ћелија хуманог меланома pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt довео до дозно и временски зависне инхибиције раста, та инхибиција је испод 20% при свим употребљеним концентрацијама и у свим временским тачкама (Графикон 9).

A



B



Графикон 9. Дозно-зависне (A) и временски-зависне (B) криве раста НТВ140 ћелија добијене СРБ тестом након третирања ћелија различитим концентрацијама испитиваних комплекса у трајању 6h, 24h и 48h. Резултати су представљени као средња вредност \pm SE (стандардна грешка).

Израчунате IC50 вредности, које су значајно веће од 100 μ M, потврђују резистентност НТВ140 ћелија на третман испитиваним агенсима (Табела 13).

IC50(μ M)	6h	24h	48h
butyl-Pt	282,807 \pm 20,4156	290,865 \pm 41,2322	187,169 \pm 30,334
pentyl-Pt	304,84 \pm 43,93	210,977 \pm 11,2963	228,325 \pm 41,2928
cis-Pt	303,766 \pm 32,9583	234,669 \pm 20,0724	229,318 \pm 27,5456

Табела 13. IC50 вредности за НТВ140 ћелије, израчунате на основу резултата СРБ теста (вредност μ M \pm S.E.)

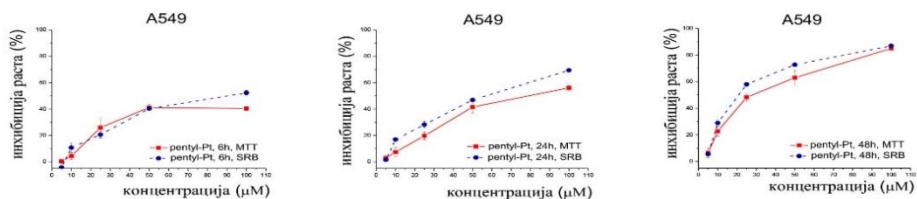
С обзиром да се вредности цитотоксичности добијене помоћу МТТ и СРБ теста поклапају, одлучено је да се НТВ140 ћелије, због своје резистентности према испитиваним агенсима, не користе у даљим истраживањима.

4.3.3. Упоредивање резултата цитотоксичности новосинтетисаних комплекса платине(IV) и cis-Pt добијених помоћу два колориметријска есеја: МТТ и СРБ теста

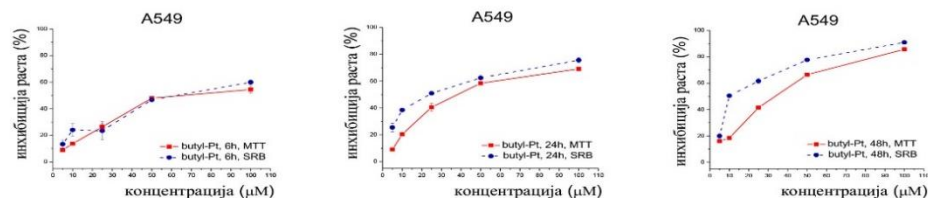
Упоредјујући резултате добијене помоћу два колориметријска есеја, МТТ и СРБ теста, уочавамо да постоји слична цитотоксична активност испитиваних агенаса са малим одступањима (Графикон 10 и 11).

Више вредности цитотоксичности су добијене у експериментима са СРБ тестом у односу на вредности добијене МТТ тестом, како за А549 ћелије (Графикон 10), тако и за МСF-7 ћелије (Графикон 11). С обзиром да се помоћу МТТ теста детектују метаболички активне ћелије, а помоћу СРБ теста укупни садржај протеина у живим ћелијама, ова одступања су била очекивана. Оно што је важно је да је исти тренд повећања цитотоксичности добијен и помоћу једног и помоћу другог есеја, што је потврда да испитивани агенси имају значајне цитотоксичне ефекте на А549 и МСF-7 ћелијама, па су ове две ћелијске линије изабране за даље експерименте.

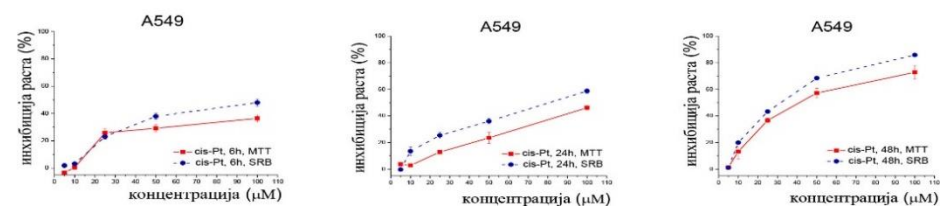
Pentyl-Pt



Butyl-Pt

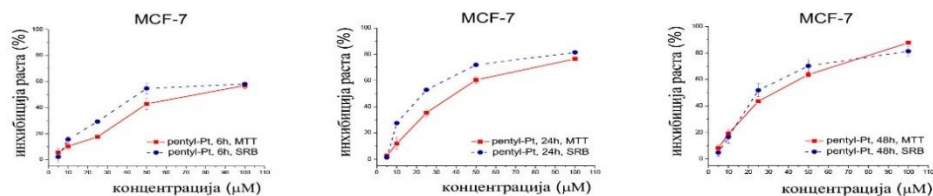


Cis-Pt

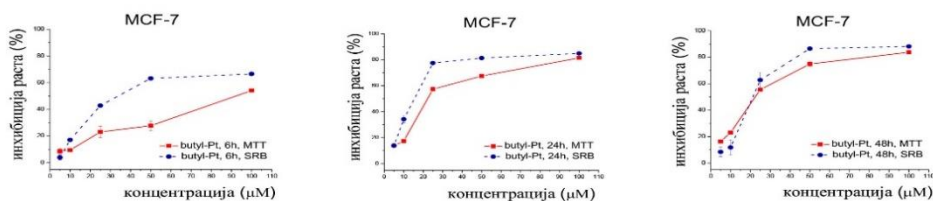


Графикон 10. Поређење дозно-зависних кривих, добијених помоћу МТТ и СРБ теста након третмана А549 ћелија испитиваним агенсима, *pentyl-Pt*, *butyl-Pt* и *cis-Pt* у трајању од 6h, 24h и 48h. Резултати су представљени као средња вредност \pm SE.

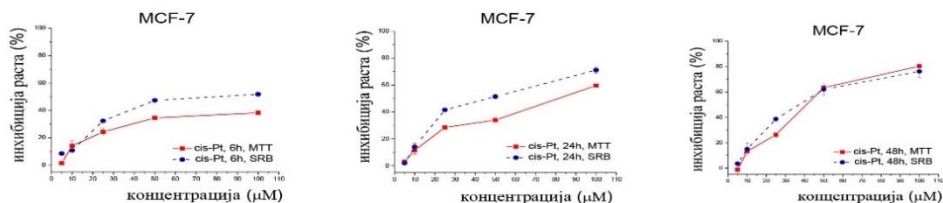
Pentyl-Pt



Butyl-Pt



Cis-Pt



Графикон 11. Поређење дозно-зависних кривих, добијених помоћу МТТ и СРБ теста након третмана МСФ-7 ћелија испитиваним агенсима, *pentyl-Pt*, *butyl-Pt* и *cis-Pt* у трајању од 6h, 24h и 48h. Резултати су представљени као средња вредност \pm SE.

4.4. Ефекат третмана новосинтетисаним комплексима платине(IV) и cis-Pt на пролиферацију А549 и MCF 7 ћелија

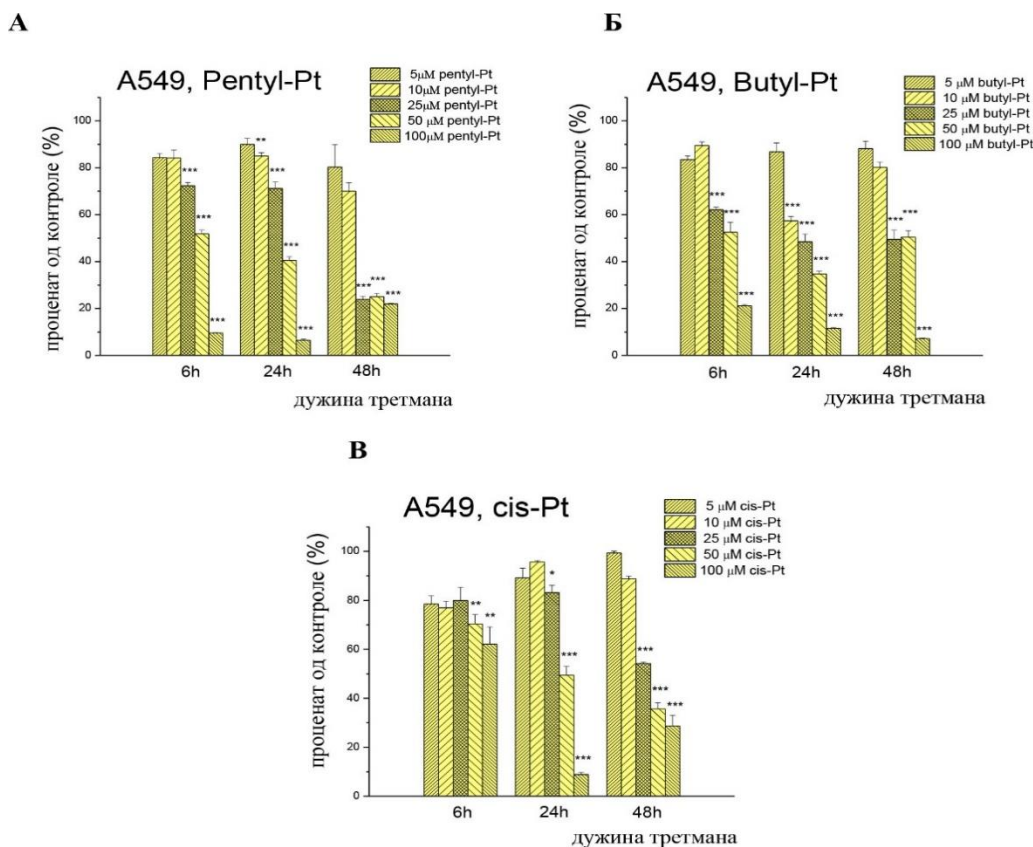
Пролиферативни капацитет хуманих А549 ћелија карцинома плућа и MCF-7 ћелија карцинома дојке праћен је после третмана pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt у истим временским тачкама у којима је анализирана и ћелијска вијабилност (6h, 24h и 48h након третмана).

Сви испитивани агенси доводе до дозно зависног смањења пролиферативне активности А549 ћелија (Графикон 12).

Пролиферативна активност А549 ћелија је након 6h инкубације у присуству ниских концентрација pentyl-Pt и butyl-Pt (5 μ M и 10 μ M), као и у присуству cis-Pt (5 μ M, 10 μ M и 25 μ M) је високо очувана. Значајно смањење је детектовано у узорцима третираним 25 μ M, 50 μ M и 100 μ M pentyl-Pt (Графикон 12А) и butyl-Pt (Графикон 12Б) ($p < 0,001$), као и великим концентрацијама cis-Pt (50 μ M и 100 μ M) ($p < 0,01$) (Графикон 12В). Ако упоредимо сва три комплекса, можемо да закључимо да је највеће смањење пролиферативне активности након третмана у трајању од 6h изазвао третман високим концентрацијама pentyl-Pt.

Након продужетка третмана до 24h, pentyl-Pt (Графикон 12А) и butyl-Pt (Графикон 12Б) у концентрацијама већим од 10 μ M доводе до статистички значајног смањења пролиферативне активности А549 ћелија ($p < 0,001$), при чему и даље pentyl-Pt показује најјачи ефекат (Графикон 12). И третман cis-Pt, концентрацијама од 25 μ M ($p < 0,05$) и концентрацијама од 50 μ M и 100 μ M ($p < 0,001$) (Графикон 12В), доводи до статистички значајног смањења пролиферације ових ћелија након 24h, али је то смањење значајно мање него у случају третмана pentyl-Pt и butyl-Pt.

Након 48h инкубације са високим дозама (25 μ M, 50 μ M и 100 μ M) сва три комплекса (pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt) статистички значајно смањење пролиферације А549 ћелија је присутно, с тим што butyl-Pt задржава дозно и временски зависну тенденцију, а код третмана високим концентрацијама (100 μ M) pentyl-Pt и cis-Pt долази до умереног опоравка ћелија (Графикон 12А, Б, В).



Графикон 12. Пролиферативна активност A549 ћелија после третмана pentyl-Pt (A), butyl-Pt (Б) и cis-Pt (В) у опсегу концентрација од 5μM до 100μM у трајању од 6h, 24h и 48h. Резултати добијени из три независна експеримента представљају проценат од контроле и представљени су као средња вредност ± SE.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

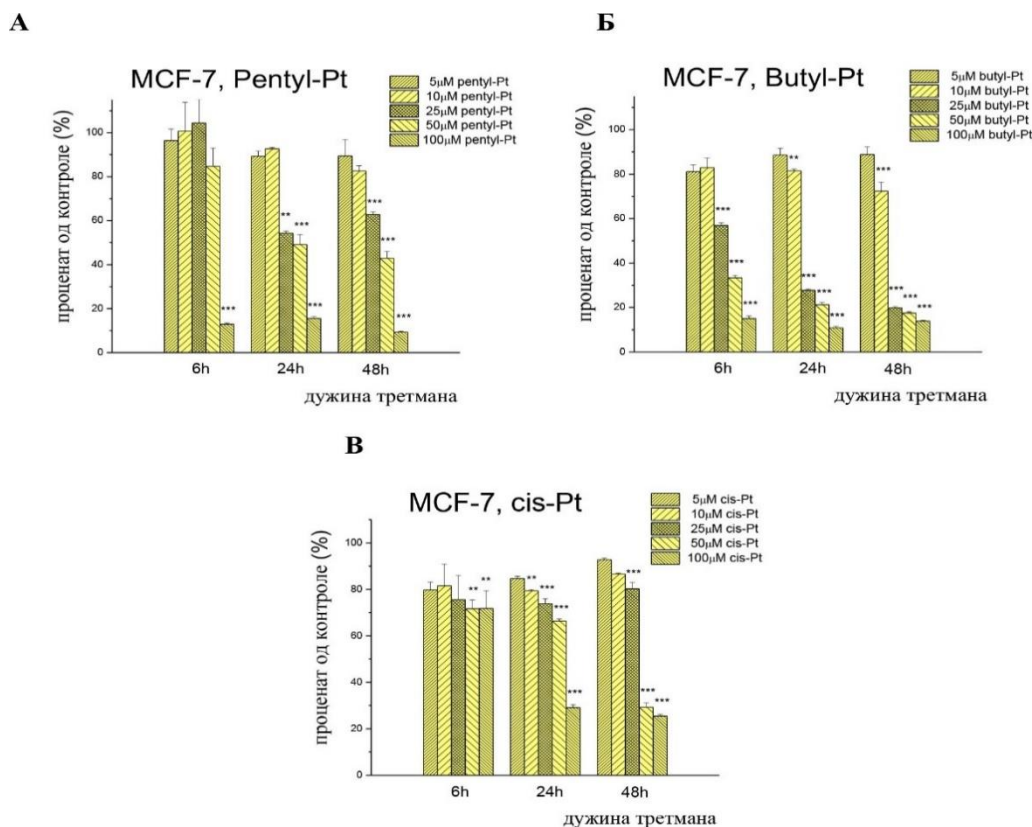
Пролиферативна активност MCF-7 ћелија опада након третмана pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt у свим испитиваним временским тачкама (Графикон 13).

Након 6-часовног третмана, најслабији ефекат на пролиферативну активност MCF-7 ћелија има pentyl-Pt: само концентрација од 100μM pentyl-Pt довела је до статистички значајног смањења пролиферативне активности ($p < 0,001$) (Графикон 13A). Најјачи ефекат има butyl-Pt након третмана у трајању од 6h концентрацијама од 25μM, 50μM и 100μM ($p < 0,001$) (Графикон 13Б). Третман у трајању од 6h 50μM и 100μM cis-Pt довео је до статистички значајног ($p < 0,01$), али мањег смањења пролиферативне активности (Графикон 13В).

Након 24h, и третман концентрацијама од 25μM ($p < 0,01$), 50μM и 100μM ($p < 0,001$) pentyl-Pt доводи до статистички значајног смањења пролиферације MCF-7 ћелија. Међутим, све примењене концентрације butyl-Pt и cis-Pt, изузев најмање (5μM, $p > 0,05$) изазвале су статистички значајно смањење пролиферативна активност MCF-7 ћелија (10μM, $p < 0,01$; 25μM, 50μM и 100μM, $p < 0,001$).

Продужење трајања третмана на 48h довело је до веома изражене дозно зависне инхибиције пролиферације. Pentyl-Pt и cis-Pt (Графикон 13A и 13Б) у концентрацијама од 25μM, 50μM и 100μM доводе до статистички значајног смањења пролиферације ($p < 0,001$), мада су ефекти ових концентрација pentyl-Pt јачи од ефеката cis-Pt примењене

у истим концентрацијама. Најбољи ефекат је постигнут применом butyl-Pt у опсегу концентрација од 10 μ M до 100 μ M: смањење пролиферативне активности MCF-7 ћелија у овом случају је статистички веома значајно ($p < 0,001$) (Графикон 13В) и значајно веће од смањења другим комплексима (pentyl-Pt и cis-Pt).



Графикон 13. Пролиферативна активност MCF-7 ћелија после третмана pentyl-Pt (А), butyl-Pt (Б) и cis-Pt (В) у опсегу концентрација од 5 μ M до 100 μ M у трајању од 6h, 24h и 48h. Резултати добијени из три независна експеримента представљају проценат од контроле и представљени су као средња вредност \pm SE.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.5. Анализа ћелијске смрти туморских A549 и MCF-7 ћелија након третмана комплексима платине (IV) и cis-Pt

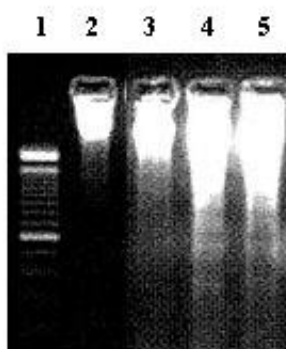
Пошто су резултати претходних експеримената показали да сви испитивани комплекси имају цитотоксично дејство на хуманим A549 ћелијама карцинома плућа и MCF-7 ћелијама карцинома дојке, следећим експериментима смо показали тип ћелијске смрти до које доводе испитивани комплекси, pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt.

Ефекат комплекса платине на индукцију ћелијске смрти A549 и MCF 7 ћелија одређиван је помоћу три различите методе: а) електрофоретском анализом ДНК изоловане из третираних ћелија, б) цитофлуориметријском анализом помоћу Annexin V-FITC/7-AAD бојења и в) „western blott“ анализом експресије проапоптотског протеина BAX и антиапоптотског протеина BCL2.

4.5.1. Електрофоретска анализа геномске ДНК

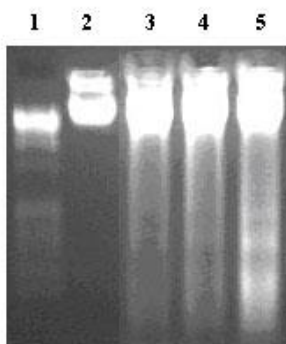
Ћелије су 24h након засејавања третиране концентрацијама које одговарају вредностима IC50 за сваку ћелијску линију (A549 и MCF-7), а дужина трајања третмана је 24h. Након тога је изолована геномска ДНК и анализирана на агарозном гелу.

Геномска ДНК изолована из A549 ћелија третираних *cis*-Pt, као и комплексима платине(IV) показује присуство „лествичастог“ низа фрагмената ДНК, карактеристичних за апоптотску ћелијску смрт (Слика 10).



Слика 10. Геномска ДНК изолована из хуманих A549 ћелија карцинома плућа третираних IC50 концентрацијама *cis*-Pt (узорак 3), *pentyl*-Pt (узорак 4) и *butyl*-Pt (узорак 5) у трајању од 24h. Узорак 1 – 100bp маркер; узорак 2 – ДНК контролних, нетретираних ћелија.

Геномска ДНК изолована из MCF-7 ћелија третираних *cis*-Pt, *pentyl*-Pt и *butyl*-Pt такође показује присуство „лествичастог“ низа фрагмената ДНК, карактеристичних за апоптотску ћелијску смрт (Слика 11).



Слика 11. Геномска ДНК изолована из хуманих MCF-7 ћелија карцинома дојке третираних IC50 концентрацијама *cis*-Pt (узорак 3), *pentyl*-Pt (узорак 4) и *butyl*-Pt (узорак 5) у трајању од 24h. Узорак 1 – 100bp маркер; узорак 2 – ДНК контролних, нетретираних ћелија.

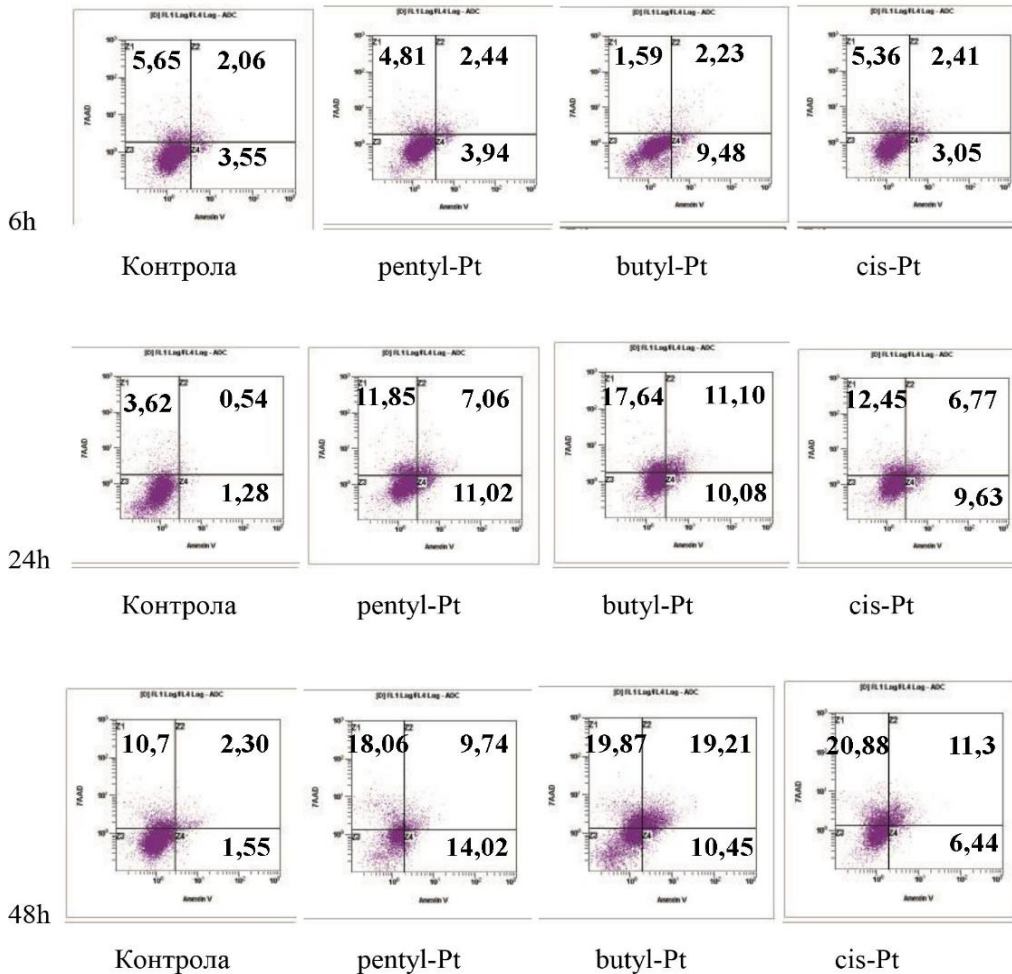
На основу добијених резултата анализе геномске ДНК изоловане из третираних ћелија, закључено је да један део ћелија након третмана умире апоптотском ћелијском смрћу.

4.5.2. Детекција и квантификација апоптотских ћелија методом проточне цитофлуорометрије

Да би потврдили и употпунили добијене резултате, индукција процеса апоптозе је анализирана помоћу методе проточне цитофлуориметрије у узорцима обојеним Annexin V-FITC/7-AAD. Ћелије су након 24h раста у култури третиране испитиваним комплексима у трајању 6h, 24h и 48h, при концентарцијама које одговарају њиховим IC50 вредностима, након чега су обојене и анализирани на проточном цитометру. Резултати су приказани као „dot plot“ графици и хистограми (Графикон 14 и 15).

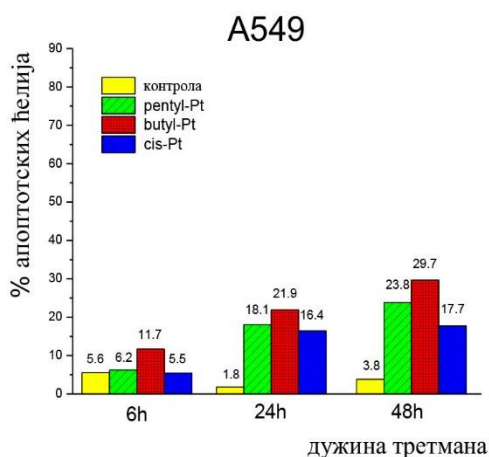
Процент А549 ћелија које подлежу апоптотској ћелијској смрти након третмана комплексима платине у трајању од 6h је низак (pentyl-Pt: 6,24%; butyl-Pt: 11,71%; cis-Pt: 5,46%) (Графикон 14 и 15А). Након 24-часовног третмана долази до повећања броја ћелија које су у апоптози (pentyl-Pt: 18,08%; butyl-Pt: 21,90%; cis-Pt: 16,40%), али је детектован и повећан број некротичних ћелија (Графикон 14 и 15А). Добијени резултати показују да третмани новосинтетисаним једињењима платине доводе до повећања броја апоптотских ћелија, како у односу на контролне ћелије, тако и у односу на дужину трајања третмана. Такође, након 24-часовног третмана А549 ћелија, новосинтетисани комплекси платине(IV) су остварили бољи ефекат на индукцију процеса апоптозе од cis-Pt. Након 48-часовног третмана комплексима платине, број апоптотских ћелија у узорцима се повећава (pentyl-Pt: 23,76%; butyl-Pt: 29,66%; cis-Pt: 17,74%), док је проценат некротичних ћелија остао исти као и након третмана од 24h (Графикон 14 и 15А). У Табели 14 приказане су вредности апоптотског индекса за све анализирани узорке. Апоптотски индекс (AI) представља однос процента апоптозе третираних ћелија и контролних ћелија и израчунат је на основу података о броју апоптотских ћелија који је добијен Annexin V-FITC/7-AAD бојењем. Вредности апоптотског индекса потврђују да комплекси платине индукују апоптотску ћелијску смрт А549 ћелија карцинома плућа, а најбоље ефекте на индукцију апоптозе остварују након третмана од 24h (Табела 14).

A549 ћелије

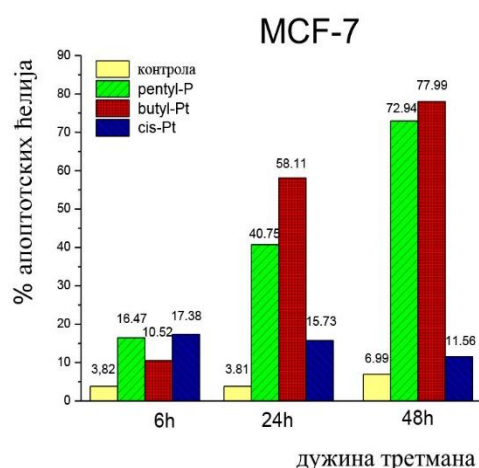


Графикон 14. Ефекти IC50 концентрација *pentyl-Pt*, *butyl-Pt* и *cis-Pt* на индукцију апоптотске ћелијске смрти код A549 ћелија након третмана у трајању од 6h, 24h и 48h, анализирани проточном цитометријом, употребом Annexin V/7-AAD бојења. На сваком графику је представљена дистрибуција ћелија по квадрантима код контролних, нетретираних и третираних ћелија. У доњем левом квадранту су живе ћелије (Annexin V⁻/7-AAD⁻), у доњем десном квадранту су ћелије у раној апоптози (Annexin V⁺/7-AAD⁻), у горњем десном су ћелије у касној апоптози (Annexin V⁺/7-AAD⁺), а у горњем левом квадранту су некротичне ћелије (Annexin V⁻/7-AAD⁺).

A



Б



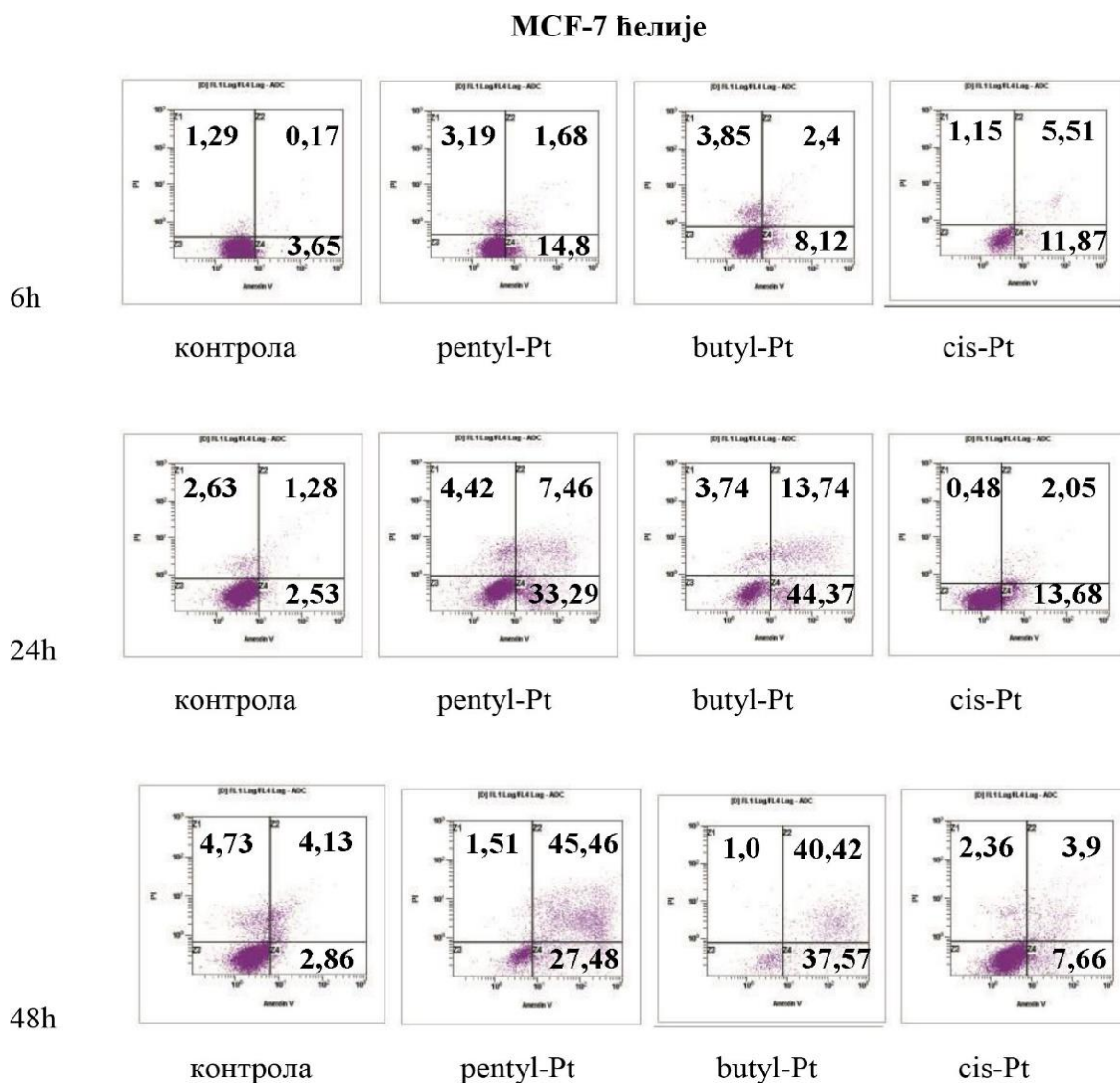
Графикон 15. Процент апоптотских ћелија након 6-, 24- и 48-часовног третмана A549 (A) и MCF-7 (Б) ћелија IC50 концентрацијама pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt.

	A549			MCF-7		
	6h	24h	48h	6h	24h	48h
контрола	1	1	1	1	1	1
Pentyl-Pt	1,11	9,93	6,17	4,31	10,69	10,43
Butyl-Pt	2,09	12,03	7,71	2,75	15,25	11,16
Cis-Pt	0,97	9,01	5,42	4,55	4,13	1,65

Табела 14. Апоптотски индекс (AI) A549 ћелија карцинома плућа и MCF-7 ћелија карцинома дојке

Процент MCF-7 ћелија које подлежу процесу апоптозе након третмана концентрацијама које одговарају IC50 вредностима комплекса платине након 6h износи 16,47% за третман pentyl-Pt, 10,52% за третман butyl-Pt и 17,38% за третман cis-Pt (Графикон 16 и 15Б). Након 24h, третман MCF 7 ћелија pentyl-Pt и butyl-Pt доводи до значајног повећања броја апоптотских ћелија који износи 40,75% за pentyl-Pt и 58,11% за butyl-Pt. Оба комплекса платине имају бољи ефекат на индукцију апоптозе од cis-Pt (15,73%) (Графикон 16 и 15Б). Број некротичних ћелија је и након 24-часовног третмана мали и не разликује се значајно од броја некротичних ћелија након 6-часовног третмана. Након 48-часовног третмана pentyl-Pt, број апоптотских ћелија је порастао на 72,94%, односно након третмана butyl-Pt на 77,99%. Оба комплекса имају бољи ефекат на индукцију апоптотске ћелијске смрти од cis-Pt (11,56%) (Графикон 15Б). Број некротичних ћелија је низак у свим анализираним узорцима и не разликује се од узорака

добијених након 6- и 24-часовног третмана. Вредности апоптотског индекса потврђују да комплекси платине индукују апоптотску ћелијску смрт MCF-7 ћелија карцинома дојке, а најбоље ефекте на индукцију апоптозе остварују након третмана од 24h (Табела 14).

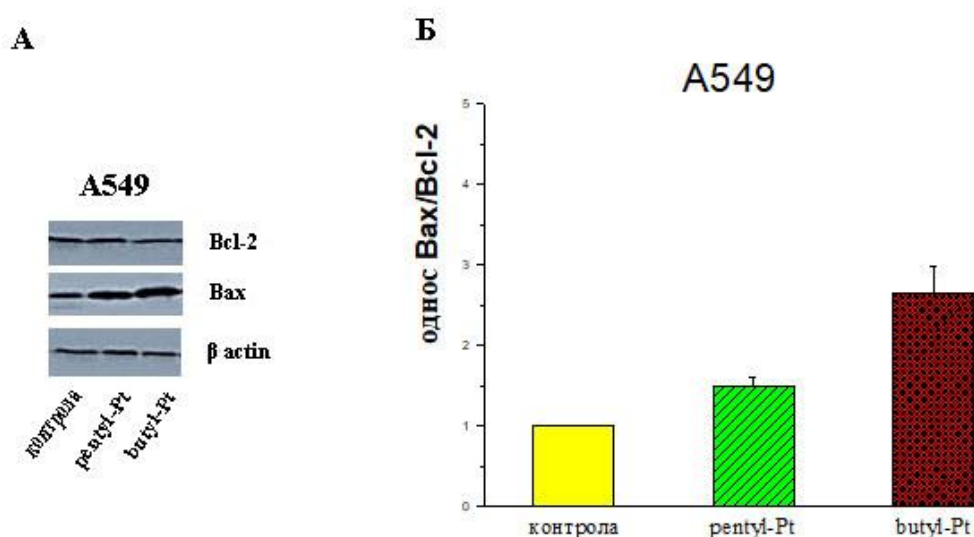


Графикон 16. Ефекти IC50 концентрација pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt на индукцију апоптотске ћелијске смрти код MCF-7 ћелија након третмана у трајању од 6h, 24h и 48h, анализирани проточном цитометријом, употребом Annexin V/7-AAD бојења. На сваком графику је представљена дистрибуција ћелија по квадрантима код контролних, нетретираних и третираних ћелија. У доњем левом квадранту су живе ћелије (Annexin V-/7-AAD-), у доњем десном квадранту су ћелије у раној апоптози (Annexin V+/7-AAD-), у горњем десном су ћелије у касној апоптози (Annexin V+/7-AAD+), а у горњем левом квадранту су некротичне ћелије (Annexin V-/7-AAD+).

4.5.3. Анализа експресије протеина који учествују у индукцији процеса апоптозе

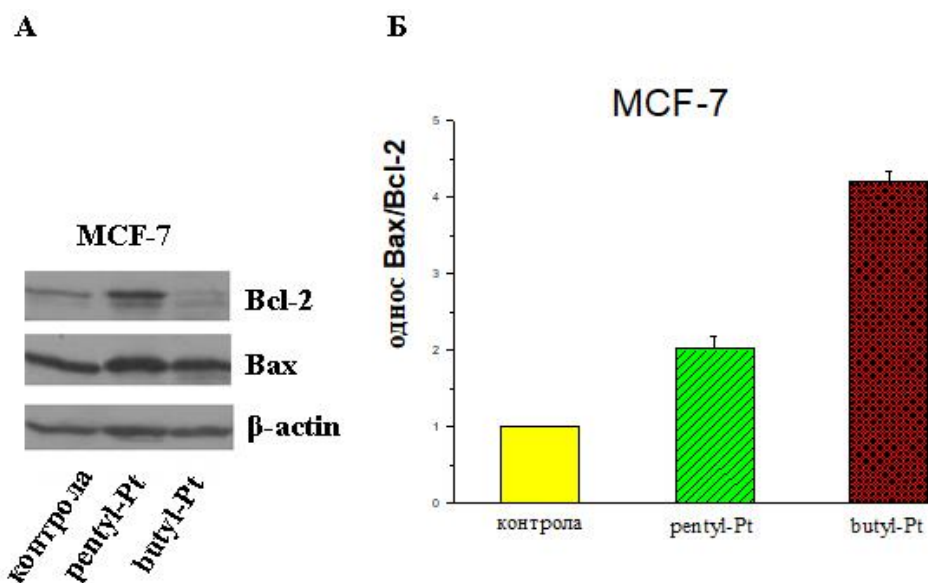
Апоптоза, као тип ћелијске смрти коју индукују испитивани комплекси платине, доказана је и одређивањем нивоа експресије протеина карактеристичних за овај процес. Хумане А549 ћелије карцинома плућа и МСF-7 ћелије карцинома дојке третиране су 24h након расађивања IC50 концентрацијама pentyl-Pt и butyl-Pt и инкубиране 24h, након чега је урађена „Western blot“ анализа експресије протеина који имају важну улогу у процесу апоптозе: проапоптотског протеина Вах и антиапоптотског протеина Вcl-2. Одређен је и однос ова два протеина, Вах/Вcl-2, који се у процесу апоптозе повећава.

Анализом експресије Вах и Вcl-2 протеина у А549 ћелијама третираним испитиваним комплексима платине показано је да се ниво антиапоптотског протеина Вcl-2 смањује 24h након третмана, док се ниво проапоптотског протеина Вах повећава у односу на контролне, нетретиране узорке (Графикон 17А). Такође, однос анализираних протеина Вах/Вcl-2 расте (Графикон 17Б), што јасно указује да третман А549 ћелија комплексима платине доводи до апоптотске ћелијске смрти.



Графикон 17. Експресија протеина карактеристичних за апоптозу (А) и графички приказ денситометријске анализе односа експресије Вах/Вcl-2 (Б) у нетретираним и третираним А549 ћелијама. Ћелије су третиране IC50 концентрацијама pentyl-Pt и butyl-Pt и инкубиране 24h након третмана.

Још израженија промена у експресији анализираних протеина детектована је у узорцима МСF-7 ћелија третираним новосинтетисаним комплексима платине. Третман у трајању од 24h изазвао је смањење нивоа антиапоптотског протеина Вcl-2 и повећање нивоа проапоптотског протеина Вах у односу на нетретиране узорке (Графикон 18А), уз повећање односа Вах/Вcl-2 (Графикон 18Б).

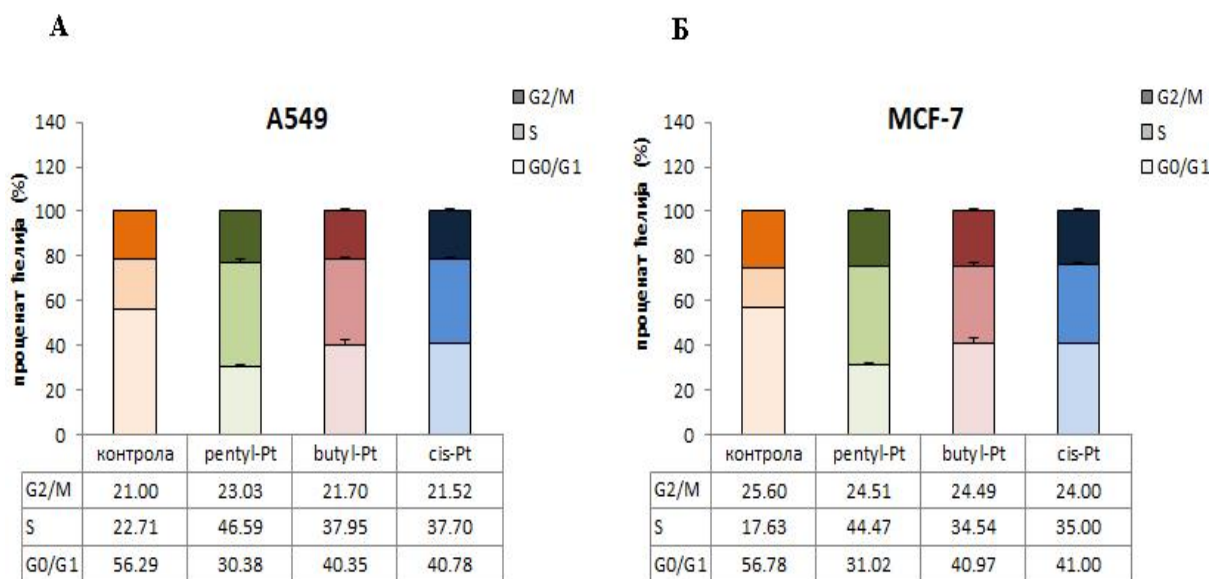


Графикон 18. Експресија протеина карактеристичних за апоптозу (А) и графички приказ дензитометријске анализе односа експресије Bax/Bcl-2 (Б) у нетретираним и третираним MCF-7 ћелијама. Ћелије су третиране IC50 концентрацијама pentyl-Pt и butyl-Pt и инкубиране 24h након третмана.

4.6. Ефекти третмана новосинтетисаним комплексима платине(IV) и cis-Pt на дистрибуцију ћелија по фазама ћелијског циклуса

С обзиром да су резултати експеримената показали да третмани комплексима платине доводе до смањења пролиферативне активности A549 и MCF-7 ћелија, претпостављено је да то смањење може бити последица промена на нивоу ћелијског циклуса, па је анализирана дистрибуција ћелија по фазама ћелијског циклуса методом проточне цитофлуориметрије. Ефекти третмана IC50 концентрацијама pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt у трајању од 24h испитивани су на A549 ћелијама карцинома плућа и MCF-7 ћелијама карцинома дојке, третираним 24h након засејавања. Резултати су представљени као проценат ћелија у G0/G1, S и G2/M фази ћелијског циклуса (Графикон 19А и Б).

Третман A549 ћелија pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt довео је до акумулације ћелија у S фази ћелијског циклуса (46,59% за pentyl-Pt, 37,90% за butyl-Pt, 37,70% за cis-Pt у поређењу са 22,71% за контролне ћелије) (Графикон 19А). Истовремено је дошло до смањења броја ћелија у G0/G1 фази (56,29% за контролне ћелије у поређењу са 30,38% за pentyl-Pt, 40,35% за butyl-Pt, и 40,78% за cis-Pt) (Графикон 19А). Такође, третман MCF-7 ћелија довео је до акумулације ћелија у S фази ћелијског циклуса у односу на контролне ћелије (44,47% за pentyl-Pt, 34,54% за butyl-Pt и 35,00% за cis-Pt у односу на 17,63% за контролне ћелије) (Графикон 19Б). Истовремено, број ћелија у G0/G1 фази је смањен након третмана у односу на нетретиране ћелије (31,02% за pentyl-Pt, 40,97% за butyl-Pt, 41,00% за cis-Pt у поређењу са 56,78% за контролне ћелије) (Графикон 19Б).



Графикон 19. Дистрибуција A549 и MCF-7 ћелија по фазама ћелијског циклуса 24h након третмана IC50 концентрацијама pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt. Добијене вредности су изражене као проценат у односу на контролу.

4.7. Ефекти γ зрачења, примењеног самостално и у комбинацији са испитиваним комплексима платине, на инхибицију раста и преживљавање A549 и MCF-7 ћелија

Комбиновани третмани малигнух тумора хемиотерапеутицима и конвенционалним, јонизујућим зрачењем имају за циљ ефикасно превазилажење резистенције на третман. Цисплатина код неких тумора (плућа, врата и главе) делује као радиосензитизатор (Gupta et al, 2011), док код других тумора нема радиосензитизаторску активност или изазива изражене симптоме токсичности код пацијената (Hazuka et al, 1994). Због тога је одлучено да у овој дисертацији буде испитиван антитуморски ефекат не само појединачних третмана новосинтетисаним комплексима платине и цисплатине, већ и комбиновани третмани ових агенаса са γ зрачењем.

4.7.1. Ефекти γ зрачења, примењеног самостално и у комбинацији са испитиваним комплексима платине, на инхибицију раста A549 и MCF-7 ћелија

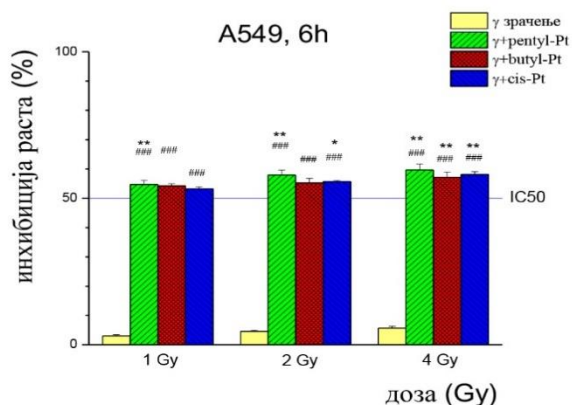
Ефекти појединачних и комбинованих третмана γ зрачењем и испитиваним комплексима платине (pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt) праћени су помоћу СРБ теста. СРБ тест, према подацима из литературе, показује већу осетљивост и бољу линеарност у односу на МТТ тест (Keopers et al, 1991). Примењене дозе γ зрачења су 1Gy, 2Gy и 4Gy, а концентрације комплекса платине при комбинованим третманима су одговарале IC50 вредностима за сваки испитивани комплекс.

Ниске дозе γ зрачења, примењене у овим експериментима (1Gy, 2Gy и 4Gy) нису изазвале значајну инхибицију раста A549 ћелија у свим анализираним временским

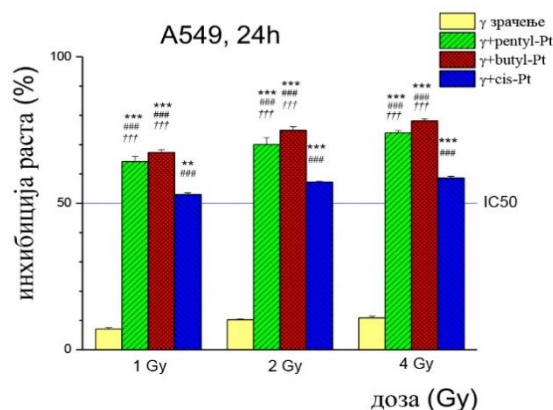
тачкама (6h, 24h и 48h). Добијени ниво инхибиције раста ћелија није прешла 20% при озрачивању ћелија дозом од 4Gy у трајању од 48h (Графикон 20).

Инхибиције раста A549 ћелија након комбинованог третмана pentyl-Pt и γ зрачења статистички је значајно већа ($p < 0,01$) од појединачног третмана pentyl-Pt за све три примењене дозе зрачења већ након 6h инкубације након третмана (Графикон 20А). После 24h (Графикон 20Б), као и након 48h инкубације (Графикон 20В), комбиновани третмани pentyl-Pt и γ зрачења су индуковали много већу инхибицију раста ћелија него појединачни третмани ћелија A549 са IC50 концентрацијом pentyl-Pt ($p < 0,001$). Добијени ниво инхибиције раста ћелија након комбинованог третмана butyl-Pt и γ зрачењем у дози од 1Gy и 2Gy није се значајно разликовао од нивоа инхибиције ћелија који је индуковала само butyl-Pt, 6h након третмана; само је доза од 4Gy γ зрачења у комбинацији са IC50 концентрацијом butyl-Pt изазвала статистички значајну инхибицију раста ($p < 0,01$) ћелија у односу на третман само butyl-Pt (Графикон 20А). Међутим, дужи комбиновани третмани (IC50 butyl-Pt + 1Gy, 2Gy и 4Gy γ зрачења) у трајању од 24h и 48h довели су до статистички значајне инхибиције раста у свим узорцима (Графикон 20Б и 20В). Након 6-часовног комбинованог третмана ћелија IC50 концентрацијом cis-Pt и γ зрачења дошло је до статистички значајне инхибиције раста и то са дозом од 2Gy ($p < 0,05$), као и са дозом од 4Gy ($p < 0,01$) (Графикон 20А). Значајнија инхибиција раста добијена је након 24-часовног комбинованог третмана cis-Pt и 1Gy γ зрачења ($p < 0,01$), а још значајнија након комбинованих третмана cis-Pt и 2Gy ($p < 0,001$) и 4Gy ($p < 0,001$) (Графикон 20Б), као и након 48-часовних комбинованих третмана у свим узорцима (Графикон 20В). Новосинтетисани комплекси платине(IV) имају боље ефекте у комбинацији са γ зрацима на инхибицију раста ћелија A549 него комбиновани третман са cis-Pt ($p < 0,001$). Откривена инхибиција раста зависила је од времена и дозе гама зрачења за све комплексе на бази платине. Међутим, не постоји статистички значајна разлика између ефеката комбинованих третмана butyl-Pt и γ зрака и pentyl-Pt и γ зрака на инхибицију раста A549 ћелија ($p > 0,05$).

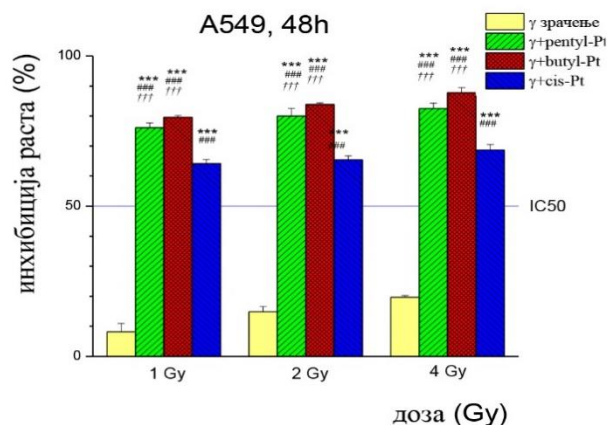
A



Б



В



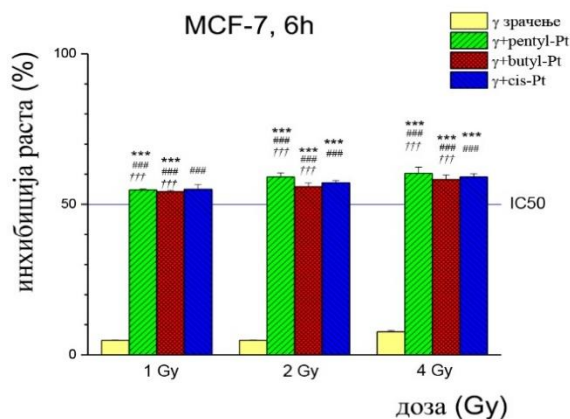
Графикон 20. Инхибиција раста A549 ћелија одређена СРБ тестом 6h (A), 24h (Б) и 48h (В) након третмана γ зрачењем примењеног самостално или у комбинацији са IC50 концентрацијама комплекса платине (pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt). Добијене вредности су изражене као проценат у односу на контролне узорке. Резултати добијени из три независна експеримента су приказани као средња вредност \pm SE.

- статистичка значајност комбинованих третмана у односу на третмане IC50 кону. комплекса; † - статистичка значајност комбинованих третмана γ зрачења и pentyl-Pt и butyl-Pt у односу на третман γ зрачењем и cis-Pt; # - статистичка значајност комбинованих третмана γ зрачења и pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt у односу на третман γ зрачењем (, †, # - $p < 0,05$; **, ††, ## - $p < 0,01$; ***, †††, ### - $p < 0,001$)

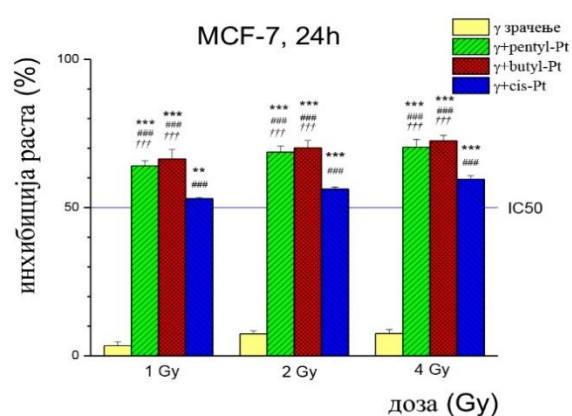
Комбиновани третмани MCF-7 ћелија карцинома дојке IC50 концентрацијама новосинтетисаних комплекса платине(IV) и γ зрачења (1Gy, 2Gy и 4Gy) довели су до статистички веома значајне ($p < 0,001$) инхибиције раста ових ћелија у односу на ефекте које су остварили само комплекси платине, у свим анализираним временским тачкама (6h, 24h и 48h) (Графикон 21). Комбиновани третмани cis-Pt и 1Gy γ зрачења нису довели до статистички значајне ($p > 0,05$) инхибиције раста ових ћелија након 6-часовног третмана, али су дозе од 2Gy и 4Gy у комбинацији са cis-Pt изазвале статистички значајно повећање инхибиције раста ћелија ($p < 0,001$) и у тој временској тачки (Графикон 21A). Након 24-часовног комбинованог третмана, инхибиција раста је статистички значајно већа како након примене cis-Pt и 1Gy γ зрачења ($p < 0,01$) тако и након примене

cis-Pt и 2Gy и 4Gy γ зрачења ($p < 0,001$) (Графикон 21Б). Комбиновани третман у трајању од 48h довео је до статистички веома значајне инхибиције раста у свим узорцима ($p < 0,001$) (Графикон 21В). И у овом случају, новосинтетизовани комплекси платине(IV) имали су боље ефекте у комбинацији са γ зрацима на инхибицију раста ћелија MCF-7 него комбиновани третман са cis-Pt ($p < 0,001$). Не постоји статистички значајна разлика између ефеката комбинованих третмана butyl-Pt и γ зрака и pentyl-Pt и γ зрака на инхибицију раста MCF-7 ћелија ($p > 0,05$).

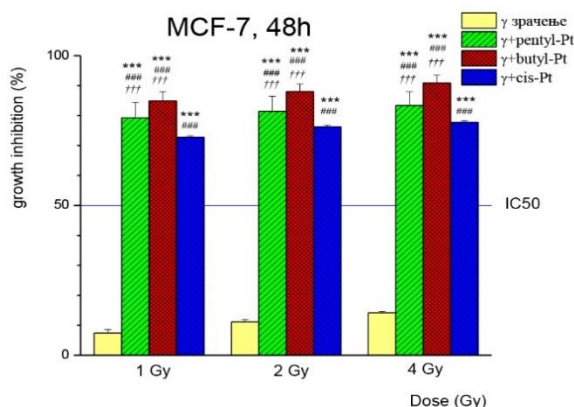
А



Б



В



Графикон 21. Инхибиција раста MCF-7 ћелија одређена СРБ тестом 6h (А), 24h (Б) и 48h (В) након третмана γ зрачењем примењеног самостално или у комбинацији са IC50 концентрацијама комплекса платине (pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt). Добијене вредности су изражене као проценат у односу на контролне узорке. Резултати из три независна експеримента су приказани као средња вредност \pm SE.

- статистичка значајност комбинованих третмана у односу на третмане IC50 концент. комплекса; † - статистичка значајност комбинованих третмана γ зрачења и pentyl-Pt и butyl-Pt у односу на третман γ зрачењем и cis-Pt; # - статистичка значајност комбинованих третмана γ зрачења и pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt у односу на третман γ зрачењем (, †, # - $p < 0,05$; **, ††, ## - $p < 0,01$; ***, †††, ### - $p < 0,001$)

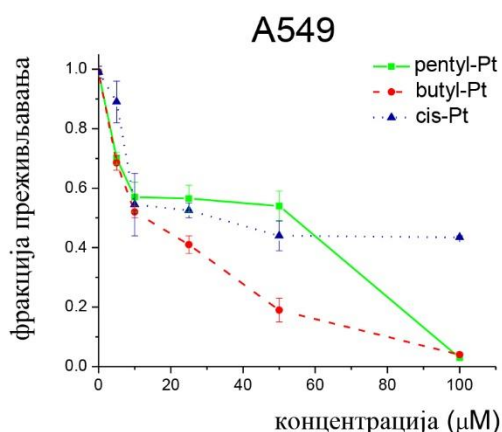
4.7.2. Ефекти γ зрачења, примењеног самостално и у комбинацији са испитиваним комплексима платине, на клоногено преживљавање A549 и MCF-7 ћелија

Клоногени есеј се користи да би се проценило преживљавање ћелија након третмана антитуморским лековима и γ зрачења, 14 дана након појединачних или комбинованих третмана. Овим есејом се мери способност ћелија да формирају колоније најмање 6 деоба након третмана зрачењем. Формиране колоније су доказ да су ћелије задржале свој репродуктивни потенцијал и након третмана. Уз помоћ клоногеног есеја израчунате су фракције преживљавања SF (види поглавље Материјал и методе) и конструисане криве преживљавања за обе испитиване ћелијске линије (Графикон 22 и 23).

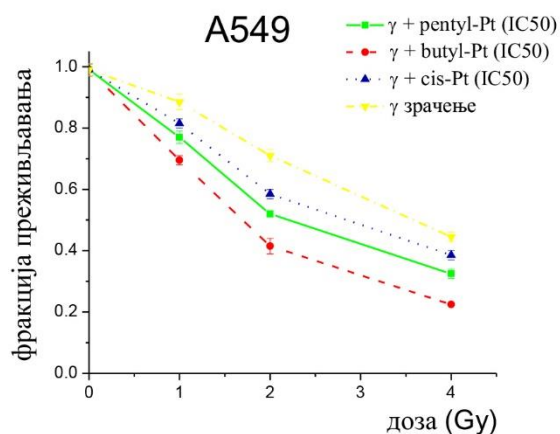
Појединачни третмани комплексима платине (pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt) доводе до дозно зависног смањења фракције преживљавања A549 ћелија 14 дана након третмана (Графикон 22А). Сва три агенса имају сличан ефекат на преживљавање ових ћелија када се примене самостално у концентрацијама од 5 μ M и 10 μ M. Међутим, концентрације од 25 μ M и 50 μ M доводе до статистички значајне разлике ($p < 0,001$) у вредностима SF, при чему се најбољи ефекат постиже butyl-Pt у односу на pentyl-Pt и cis-Pt. Концентрација од 100 M butyl-Pt и pentyl-Pt доводи до великог смањења вредности SF, статистички значајног у односу на cis-Pt ($p < 0,001$). Примена γ зрачења такође доводи до дозно зависног пада вредности SF (Графикон 22Б). Комбиновани третмани A549 ћелија IC50 вредностима концентрација pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt и дозама од 1Gy, 2Gy и 4Gy γ зрачења довели су до још јачег одговора ћелија у односу на само зрачење. Дошло је до смањења вредности SF (Графикон 22Б), што указује на дозно зависно смањење преживљавања A549 ћелија. При томе, најбољи ефекат је остварен применом γ зрачења и butyl-Pt (статистичка значајност у односу на γ зрачење: $p < 0,001$, у односу на pentyl-Pt: $p < 0,001$ и cis-Pt: $p < 0,001$), затим применом γ зрачења и pentyl-Pt (статистичка значајност у односу на γ зрачење: $p < 0,001$, а у односу на cis-Pt: $p < 0,001$) (Графикон 22Б). Cis-Pt у комбинацији са γ зрачењем такође је довела до статистички значајног смањења фракције преживљавања ($p < 0,01$).

Ефекти појединачних и комбинованих третмана праћен је и на MCF-7 ћелијама карцинома дојке. Појединачни третмани pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt имају јак ефекат на преживљавање ових ћелија, 14 дана након третмана. Ефекти концентрације pentyl-Pt и butyl-Pt од 25 μ M, 50 μ M и 100 μ M су статистички значајно већи у односу на ефекте које постижу исте концентрације cis-Pt ($p < 0,001$), док се ефекти butyl-Pt и pentyl-Pt разликују статистички значајно ($p < 0,001$) само за концентрације од 10 μ M и 25 μ M (Графикон 23А). Преживљавање MCF-7 ћелија након третмана само γ зрачењем опада дозно-зависно (Графикон 23Б). Међутим, пре-третман ћелија IC50 концентрацијама комплекса платине доводи до смањења вредности SF, односно до смањења преживљавања MCF-7 ћелија. Најјачи ефекат је постигнут применом γ зрачења и butyl-Pt (статистичка значајност у односу на γ зрачење: $p < 0,001$, у односу на pentyl-Pt: $p < 0,05$ и cis-Pt: $p < 0,001$), затим применом γ зрачења и pentyl-Pt (статистичка значајност у односу на γ зрачење: $p < 0,001$, а у односу на cis-Pt: $p < 0,01$), док cis-Pt у комбинацији са γ зрачењем није довела до статистички значајног смањења фракције преживљавања ($p > 0,05$) (Графикон 22Б).

A

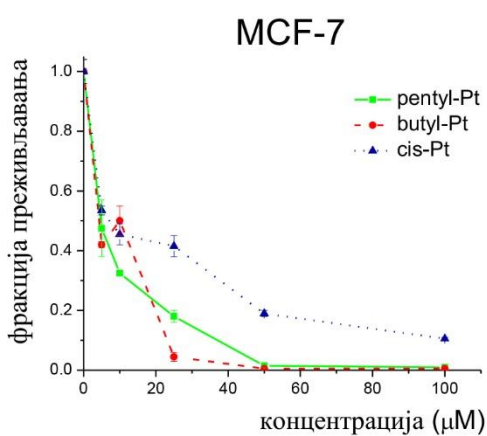


Б

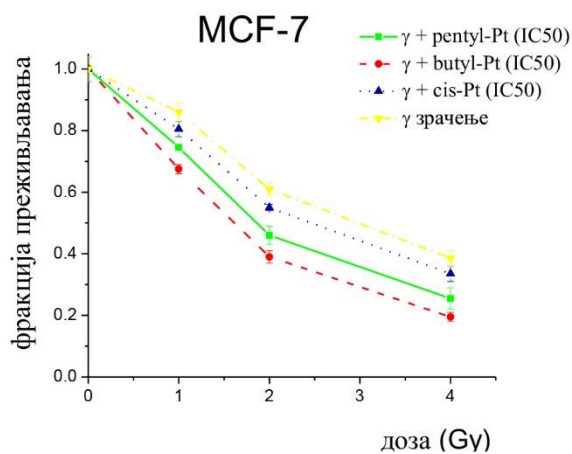


Графикон 22. Клоногено преживљавање A549 ћелија 14 дана након третмана комплексима платине у растућим концентрацијама (5-100µM) (A) као и након третмана γ зрачењем (1Gy, 2Gy и 4Gy) и комбинованим третманима истих доза γ зрачењем и IC50 вредностима концентрација комплекса платине (B). Резултати из три независна експеримента су приказани као средња вредност ± SE.

A



Б



Графикон 23. Клоногено преживљавање MCF-7 ћелија 14 дана након третмана комплексима платине у растућим концентрацијама (5-100µM) (A) као и након третмана γ зрачењем (1Gy, 2Gy и 4Gy) и комбинованим третманима истих доза γ зрачењем и IC50 вредностима концентрација комплекса платине (B). Резултати из три независна експеримента су приказани као средња вредност ± SE.

На основу вредности фракције преживљавања на 2Gy (SF2), одређене су и вредности других радиобиолошких параметара: фактора повећања осетљивости, SER(2Gy) и релативне биолошке ефикасности, RBE(2Gy). Вредности свих радиобиолошких параметара након примене само γ зрачења или у комбинацији са IC50 концентрацијама комплекса платине за A549 ћелије дате су у Табели 15, а за MCF-7 ћелије у Табели 16.

Вредности параметра SF2 за A549 ћелије које су само озрачене γ зрацима износи 0,71, што ове ћелије сврстава у ред радио-резистентних ћелија. При комбинованим третманима са комплексима платине вредности SF2 опадају што указује на повећање осетљивости ових ћелија на γ зрачење применом комплекса платине. Најјачи ефекат је остварен у комбинацији са butyl-Pt (SF2=0,41), а затим са pentyl-Pt (SF2=0,52) и cis-Pt (SF2=0,58) (Табела 15). И више вредности параметра SER2Gy у узорцима који су третирани и зрачењем и комплексима платине указују на повећање осетљивости A549 ћелија на зрачење примењеним комплексима. Вредности параметра RBE, који представља однос апсорбоване дозе γ зрачења и апсорбоване дозе комбинованог третмана која изазива исти биолошки ефекат, расту при свим комбинованим третманима, највише при третману γ зрачења и butyl-Pt (RBE2=1,79), а затим са pentyl-Pt (RBE2=1,41) и cis-Pt (RBE2=1,24).

	<i>SF2</i>	<i>SER(2Gy)</i>	<i>RBE(2Gy)</i>
<i>γ зрачење</i>	0,71		1,00
<i>γ + pentyl-Pt(IC50)</i>	0,52	1,37	1,41
<i>γ + butyl-Pt(IC50)</i>	0,41	1,73	1,79
<i>γ + cis-Pt(IC50)</i>	0,58	1,22	1,24

Табела 15. Радиобиолошки параметри за A549 ћелије карцинома плућа

Радиобиолошки параметри су одређени и за MCF-7 ћелије (Табела 16). Вредност параметра SF2 износи 0,61 и указује на радио-резистентну природу ових ћелија. Међутим, након комбинованих третмана вредности SF2 параметра опадају (са butyl-Pt: SF2=0,39, са pentyl-Pt: SF2=0,46, а са cis-Pt: SF2=0,55), а расту вредности SER2 (са butyl-Pt: SER2=1,57, са pentyl-Pt: SER2=1,33, а са cis-Pt: SER2=1,11) и RBE2 (са butyl-Pt: RBE2=1,57, са pentyl-Pt: RBE2=1,28, а са cis-Pt: RBE2=1,13), указујући на повећање радио-осетљивости MCF-7 ћелије при комбинованим третманима (Табела 16).

	<i>SF2</i>	<i>SER(2Gy)</i>	<i>RBE(2Gy)</i>
<i>γ зрачење</i>	0,61		1,00
<i>γ + penti-Pt(IC50)</i>	0,46	1,33	1,28
<i>γ + butyl-Pt(IC50)</i>	0,39	1,57	1,57
<i>γ + cis-Pt(IC50)</i>	0,55	1,11	1,13

Табела 16. Радиобиолошки параметри за MCF-7 ћелије карцинома дојке.

5. ДИСКУСИЈА

Од открића цисплатине као лека који се користи у терапији тумора, спроводе се интензивна истраживања великог броја потенцијалних хемиотерапеутика који у свом саставу садрже платину или неки други прелазни метал (рутенијум, паладијум, злато и друге). Комплекси платине су посебно интересантни с обзиром да се цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина користе у више од 50% терапијских протокола у лечењу онколошких пацијената (Wheate et al, 2010), а више од 30 платина(II) и платина(IV) комплекса се налазе у некој фази клиничких испитивања (Ndagi et al, 2017).

Геномска ДНК је главна ћелијска мета за цисплатину. Када комплекс платине уђе у ћелију, долази до замене хлоридних лиганата водом и стварања реактивних катјонских комплекса. Платина, као метални центар комплекса, остварује своје дејство везивањем за макромолекуле, нуклеинске киселине и протеине. Цисплатина се везује за ДНК и формира интер- и интра-ланчане везе и адукте које спречавају репликацију и транскрипцију и активирају сигналне путеве, што заједно доводи до инхибиције ћелијског раста, заустављања ћелијског циклуса и активацији апоптозе (Fuertas et al, 2003, Yen et al, 2005). Важну улогу у остваривању ефеката платине имају лиганди који су везани за њу. Поред тога што лиганди утичу на хидрофилност и липофилност (самим тим и лакши транспорт кроз крвне судове и ћелијске мембране), они утичу и на реактивност комплекса. Када су лиганди лако одлазеће групе, доступност активних места комплекса је већа и платина тада лакше ступа у интеракцију са различитим макромолекулама и ефикасније остварује своје ефекте (Quiroga, 2012). Структурном модификацијом лиганда могуће је побољшати липофилност, лакше допремити лек до жељеног ткива и повећати преузимање лека у ћелију (Qin et al, 2017; Huang et al, 2017).

Познато је да је примена цисплатине лимитирана због нежељених ефеката и појаве резистенције на терапију (Florea 2011). Да би се смањили нежељени ефекти и побољшала клиничка примена цисплатине синтетисан је велики број различитих аналога. Већина њих није нашла своју клиничку примену из различитих разлога: због недовољне акумулације лека унутар ћелије, цитотоксичних ефеката на здрава, нетуморска ткива, због развоја резистенције на лек, незадовољавајуће фармакокинетику итд (Ali et al, 2013). Све ово је навело истраживаче да синтетишу једињења која ће имати бољу активност и селективност према малигним ћелијама и што мање нежељених ефеката. Платина(IV) комплекси су добри кандидати да превазиђу ове проблеме (Fahmy, 2022). Они су стабилнији, могу се примењивати оралним путем и имају додатна места за везивање лиганда у односу на цисплатину и платина(II) комплексе. Посебно су интересантно поље истраживања комплекси платина(IV) са edda-типом лиганда. Интензивна истраживања комплекса платине са лигандима edda-типа (етилендиамин-N,N'-диацетат) и њиховим дериватима почела су након што је показано да ови комплекси имају хидролитичко дејство на молекул ДНК и значајну антитуморску активност на различитим ћелијским линијама карцинома јајника (Davies et al, 2002). Етилендиамин-N,N'-диацетат (edda) је тетрадентатни лиганд који поседује по два донорска атома азота и кисеоника. Из овог молекула изведен је велики број лиганата

(eddp, eddip, (S,S)eddp, eddl, eddch и други). Комплекси платине(IV) са edda-типом лиганда су показали антитуморску активност *in vitro*. У зависности од типа ћелија, њихова антитуморска активност је већа (Vujić et al, 2012), мања (Stojković et al, 2014; Dimitrijević et al, 2013) или слична (Kaludjerovic et al, 2005) активности цисплатине.

Прелиминарни резултати испитивања цитотоксичних ефеката новосинтетисаних платина(IV) комплекса са лигандима O,O'-dipentyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoate dihydrochloride dihydrate (у тексту **pentyl-Pt**) и O,O'-dibutyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl)pentanoate dihydrochloride (у тексту **butyl-Pt**) на различитим туморским ћелијским линијама показали су да ови агенси остварују исте или боље ефекте од цисплатине (Stojković et al, 2014; Dimitrijević et al, 2013). Због свега наведеног циљ овог истраживања је испитивање ефеката наведених новосинтетисаних комплекса платине(IV) на вијабилност и пролиферативну активност туморских ћелија различитог порекла и инвазивности, као и ефекти на експресију протеина који учествују у индукцији апоптоске ћелијске смрти и регулацији ћелијског циклуса.

У овом истраживању коришћене су три хумане туморске ћелијске линије: A549 ћелије карцинома плућа, MCF-7 ћелије карцинома дојке и НТВ140 ћелије меланома, као и једна здрава хумана ћелијска линија, MRC-5, фибробласта плућа. Први експерименти у овом раду су урађени како би се дефинисао раст ћелија и одредили оптимални услови за извођење одговарајућих есеја.

Ћелијска линија A549 се широко користи као модел аденокарцинома плућа, јер су то добро окарактерисане и високо пролиферативне ћелије. Такође, A549 ћелије су осетљиве на дејство цисплатине (Sarin et al, 2017) и других комплекса платине(II) (Qin et al, 2016) и платине(IV) комплекса (Wang et al, 2022). У експериментима описаним у овом раду праћен је раст A549 ћелија у култури до 9 дана након засејавања. Добијени резултати показују да A549 ћелије достижу максимум раста између 5. и 6. дана од засејавања, после чега се број ћелија у монослоју полако смањује (Графикон 1А). Време дупликације ових ћелија је $48,5 \pm 14,9h$, а оптималан број ћелија по бунару приликом засађивања је 5×10^3 .

Хумана MCF-7 је ћелијска линија експримира естрогенски рецептор алфа (ER- α) (Lippman and Bolan, 1975). Ћелије такође експримирају прогестеронске, андрогене и глукокортикоидне рецепторе (Horwitz et al, 1975), што их чини значајним модел системом у медицинским истраживањима. Ове ћелије су слабо осетљиве на дејство цисплатине (Rimoldi et al, 2017). У експериментима описаним у овом раду је показано да MCF-7 ћелије расту у монослоју, а максимум раста постижу 4. дана раста у култури. Након тога њихов број у монослоју нагло опада до 6. дана, после чега се култура опоравља до 8. дана, након чега поново опада број ћелија у монослоју (Графикон 1Б). Време дупликације ових ћелија износи $48,6 \pm 6,4h$, а оптималан број ћелија по бунару је 5×10^3 .

Хумане НТВ140 ћелије су резистентне на дејство цисплатине. Праћење раста ових ћелија у култури до 9. дана након засејавања је показало да ове ћелије достижу максимум раста 6. дана након засејавања после чега долази до смањења броја ћелија у монослоју (Графикон 1В). Време дупликације ових ћелија је $32,7 \pm 5,1h$, а оптималан почетни број ћелија по бунару је 5×10^3 .

Хумана MRC-5 ћелијска линија је способна за 42-46 удвостручења популације пре почетка старења културе. У нашим експериментима је показано да је време дупликације ових ћелија $39,5 \pm 5,6h$. Ћелије су у експоненцијалној фази раста до 7. дана од засејавања, а након тога се њихов број у монослоју смањује (Графикон 1Г).

Раст анализираних ћелија у култури је праћен у плочама од 96 бунара помоћу МТТ теста, мерењем апсорбанце на 595nm. С обзиром да је апсорбанца линеарно зависна од броја ћелија у монослоју за вредности апсорбанце мање од 1 (Van de Loosdrecht et al, 1994), изабрана је највећа густина ћелија при којој апсорбанца не прелази вредност 1 током првих 4 дана раста у култури, а то је густина од 5×10^3 ћелија/бунару. Ова вредност је иста за све изабране ћелијске линије, за све колориметријске, ELISA есеје. Такође, на основу резултата раста ћелија у култури одлучено је да се третмани и есеји изводе најдуже до 4. дана раста у култури, када су све изабране ћелијске културе у експоненцијалној фази раста. Ћелије су третиране 24h након засејавања, а есеји су урађени најкасније 48h након третмана.

У нашем истраживању, главни циљ је био да окарактеришемо ћелијски одговор А549 ћелија, MCF-7 ћелија и НТВ140 ћелија на третман новосинтетисаним комплексима pentyl-Pt и butyl-Pt и да га упоредимо са одговором на третман cis-Pt. Такође, упоређени су ћелијски одговори туморских ћелија са одговором једне здраве ћелијске линије, MRC-5. Ћелије су третиране 6h, 24h и 48h концентрацијама комплекса платине од 5, 10, 25, 50 и 100 μ M, а за процену инхибиције раста користили смо МТТ и СРБ тест. С обзиром да се МТТ тест заснива на метаболичкој активности ћелије, односно способности митохондријалног ензима, сукцинат-деhidрогеназе да жуту тетразолијумску со редукује у плаво-пурпурни формаган, резултати овог теста зависе од метаболичке активности и броја ћелија у монослоју, али и дужине ћелијске инкубације (Vistica et al, 1991). С друге стране, сулфородамин Б (СРБ) је боја која се везује за ћелијске протеине у цитоплазми, али не и за ћелијски дебрис (Skehan et al, 1990) и не зависи од метаболичке активности ћелије, а веза између измерене апсорбанце и броја ћелија у монослоју је линеарна у ширем опсегу него за МТТ есеј (Heselerberger et al, 1996). Резултати ових истраживања су показали да сви анализирани комплекси платине (pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt) инхибирају раст свих примењених ћелијских линија и да постоје мала одступања у резултатима МТТ и СРБ теста. Наиме, пошто СРБ детектује само протеине у ћелији, а МТТ зависи од метаболичке активности ћелија, вредности инхибиције раста су веће када се примени МТТ него СРБ тест, али је тренд повећања цитотоксичности исти за оба есеја.

Као мера цитотоксичне активности испитиваних комплекса платине коришћена је вредност параметра IC50, који представља концентрацију агенса која инхибира преживљавање третираних ћелија за 50%, а који је израчунат на основу резултата МТТ и СРБ есеја за сваки анализирани комплекс. Као што је показано у поглављу Резултати, третман комплексима платине је довео до временски и дозно зависне инхибиције раста свих анализираних ћелијских линија. Међутим, здраве MRC-5 ћелије и меланомске НТВ140 ћелије су показале најмању инхибицију раста која није била већа од 20%, а вредности IC50 за обе ћелијске линије су биле веће од 100 μ M, што указује на резистентност ових ћелијских линија на деловање cis-Pt, али и новосинтетисаних комплекса платине(IV), pentyl-Pt и butyl-Pt. Резултати из литературе су показали да је MRC-5 ћелијска линија резистентна на деловање cis-Pt (Michalak et al, 2021), али и других платина(II) (Melounková et al, 2021) и платина(IV) (Paunovic et al. 2022) комплекса, као и комплекса других прелазних метала (Oliveira et al, 2019). Иако се cis-Pt користи у лечењу меланома, појава резистенције током терапије је један од главних узрока неуспеха хемиотерапијског лечења пацијената (Ge et al, 2016; Li et al, 2018). Истраживања су показала да резистенција на cis-Pt и друге платинске комплексе може бити последица мутација у p53 гену који има важну улогу у механизму дејства cis-Pt (Siddik, 2003; Agudo-Lopez et al, 2017). Најосетљивије су ћелије карцинома плућа А549, како на деловање cis-Pt, тако и на деловање pentyl-Pt и butyl-Pt. Ови резултати нису неочекивани, с обзиром да се дисплатина и користи у лечењу карцинома плућа, а постоје

подаци и о добрим ефектима других новосинтетисаних комплекса платине и прелазних метала на цитотоксичност ових ћелија (Dimitrijevic et al, 2013; Arsenijevic et al, 2017). Ако упоредимо ефекте два новосинтетисана комплекса, pentyl-Pt и butyl-Pt, можемо да закључимо да butyl-Pt има боље антитуморско дејство на A549 ћелијама у односу на pentyl-Pt, у свим временским тачкама и свим примењеним концентрацијама, а да оба новосинтетисана агенса имају јачи цитотоксични ефекат од ефекта cis-Pt. Иако у литератури постоје подаци који указују на резистентност карцинома дојке на cis-Pt и њене деривате (He et al, 2017), наши резултати указују на осетљивост MCF-7 ћелија, како на деловање cis-Pt, тако и на деловање pentyl-Pt и butyl-Pt. Вредности IC50 указују да и на овим ћелијама butyl-Pt остварује боље антитуморске ефекте од pentyl-Pt, али су новосинтетисани комплекси платине(IV) ефикаснији у инхибицији раста MCF-7 ћелија од cis-Pt. Међутим, ако упоредимо ове две ћелијске линије, резултати добијени на A549 ћелијама указују да су ове ћелије осетљивије на деловање испитиваних агенаса него MCF-7 ћелије.

На основу добијених резултата одлучено је да из наредних истраживања искључимо HTB140 ћелије због њихове изражене резистенције у односу на све примењене третмане.

Значајан параметар у анализи антитуморских ефеката новосинтетисаних комплекса има и индекс селективности (SI) (Katsuno et al, 2015). Овај параметар указује на селективно дејство испитиваног агенса према туморским ћелијама у односу на здраве ћелије, посебно оне са високим пролиферативним капацитетом, као што су фибробласти и матичне ћелије. Зато је један од циљева овог истраживања било и израчунавање вредности SI туморских A549 и MCF-7 ћелија у односу на здраве фибробласте плућа, MRC-5 ћелије. Резултати су показали да сви испитивани агенси показују добру селективност у антитуморском деловању према A549 и MCF-7 ћелијама у односу на здраве MRC-5 ћелије. Највише је изражена селективност butyl-Pt према MCF-7 ћелијама карцинома дојке, док је нешто нижа селективност добијена код карцинома плућа. Иако вредности SI параметра указују да pentyl-Pt има нижу селективност од butyl-Pt код обе туморске ћелијске линије, високе вредности овог параметра указују на веома добру селективност оба новосинтетисана комплекса платине(IV) и њихов значајан антитуморски потенцијал. Крајчиновић и сардници су показали да платина(IV) комплекси са edda-типом лиганда показују селективност у деловању према K562 ћелијама мијелоидне леукемије у односу на здраве ћелије, при чему су ови агенси били селективнији од цисплатине (Крајчиновић et al, 2008).

Анализиране ћелијске линије су пролиферативно најактивније у првих 96h од засејавања, када се налазе у експоненцијалној фази раста. То је био један од разлога због чега су ћелије третиране и анализиране у том периоду. Да би одредили антипролиферативне ефекте pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt на A549 и MCF-7 туморским ћелијама, праћена је инкорпорација 5-бром-2-деоксиуридина у молекула ДНК током репликације. Резултати су недвосмислено показали да новосинтетисани комплекси платине(IV), pentyl-Pt и butyl-Pt, као и cis-Pt, показују антипролиферативно дејство на обе испитиване ћелијске линије (Графикон 12 и 13). Ово смањење пролиферативне активности је дозно и временски зависно и статистички значајно за сва три примењена агенса, у свим примењеним концентрацијама и у свим анализираним временским тачкама. Када се упореде резултати добијени за инхибицију раста и пролиферативну активност третираних ћелија, можемо да закључимо да је слабија инактивација раста ћелија него пролиферативна активност. Ово се може објаснити чињеницом да су третмани pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt довели до репродуктивне, али не и метаболичке смрти ћелија (Muschel et al, 1998).

На основу резултата тестова цитотоксичности и пролиферације ћелија закључено је да pentyl-Pt и butyl-Pt доводе до смањења броја живих ћелија A549 карцинома плућа и MCF-7 карцинома дојке у култури. То смањење је значајно веће у односу на смањење које изазива cis-Pt. На основу података из литературе о апоптотској смрти ћелија до које доводи третман цисплатином (Tanida et al, 2012), претпостављено је да један део испитиваних ћелија третираних новосинтетисаним комплексима платине(IV), pentyl-Pt и butyl-Pt, бива елиминисан управо процесом апоптозе. Апоптоза је облик програмиране ћелијске смрти и захвата појединачне ћелије. За разлику од некрозе, у којој долази до оштећења и руптуре ћелијске мембране, што за последицу има инфламацију и оштећење околног ткива, апоптоза је добро контролисан процес који не изазива штетне последице на околно ткиво. Због тога је пожељно да агенси који се користе у терапији тумора у што већем проценту индукују управо апоптотску ћелијску смрт. Коришћење апоптозе као биолошког маркера је једна од основних стратегија у проучавању антитуморских ефеката новосинтетисаних лекова. Молекуларни механизми који контролишу процес апоптозе повезани су са другим ћелијским механизмима, као што су регулација ћелијског циклуса, пролиферације и диференцијације, геномске стабилности и ћелијског метаболизма (Tanida et al, 2012).

За детекцију апоптозе су доступне бројне методе. Свака од њих има своје предности и недостатке, па је препоручљиво користити неколико метода да би се потврдила апоптоза.

Један од првих биохемијских процеса који се јавља у процесу апоптозе је фрагментација ДНК на фрагменте величине 180-200bp (eng. DNA ladder). Због тога је одлучено да анализирамо геномску ДНК изоловану из третираних A549 и MCF-7 ћелија. Електрофоретском анализом узорака ДНК из A549 и MCF-7 ћелија третираних IC50 концентрацијама испитиваних агенаса (pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt) показано је присуство лествичастих трака карактеристичних за процес апоптозе (Слика 10 и 11).

Како би потврдили добијене резултате и квантификовали апоптотске ћелије у третираним узорцима, користили смо методу проточне цитофлуориметрије. Третиране A549 и MCF-7 ћелије смо обојили Annexin V-FITC/7-AAD, 6h, 24h и 48h након третмана IC50 концентрацијама испитиваних агенаса. Резултати су показали да сви примењени третмани изазивају повећање броја апоптотских ћелија и код A549 ћелија и код MCF-7 ћелија (Графикон 15). У обе анализиране ћелијске линије третман butyl-Pt је индуковао највећи проценат апоптозе, а третман pentyl-Pt је био ефикаснији од третмана cis-Pt. Међутим, проценат индуковане апоптозе је значајно већи код MCF-7 ћелија у односу на A549 ћелије. Такође, проценат некротичних ћелија је значајно мањи у узорцима MCF-7 ћелија него у A549 ћелијама, указујући на пожељнији механизам деловања комплекса платине на MCF-7 ћелије карцинома дојке него на A549 ћелије карцинома плућа. Процент некротичних ћелија након двадесетчетворочасовног и четрдесетосмочасовног третмана новисинтетисаним комплексима је био значајно већи него у контролним ћелијама, што се може објаснити чињеницом да у третираним узорцима, ћелије које су у касној апоптози улазе у процес секундарне некрозе. Платина(IV) комплекси који су испитивани на ћелијама хуманог астроцитома су примарно довели до смрти ћелије по типу некрозе (Kaluderović et al, 2005). У литератури постоје подаци о платина(IV) комплексима са различитим аксијалним лигандима који поред апоптозе, у значајном проценту индукују и некрозу код MCF-7 ћелија (Spector et al, 2021).

Способност цисплатине да доведе до апоптотске ћелијске смрти је већ описана у ћелијским културама тумора плућа (Yuan et al, 2015), али и код ћелија тумора простате (Moffatt et al, 1999), желуца (Bao et al, 2014) и мокраћне бешике (Ma et al, 2010). Такође

и други платински комплекси индукују апоптозу код различитих ћелијских линија (Vujić et al, 2012; Arsenijević et al, 2012; Wang et al, 2016).

Познато је да велики број протеина регулише процес апоптозе (Pistritto et al, 2016). Протеински продукти фамилије BCL-2 гена су важни регулатори апоптозе. Продукти ових гена делују или као стимулатори (Bax, Bad, Bak, Bik и други) или као инхибитори (Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1 и други) процеса апоптозе (Tanida et al, 2012). Ови протеини стварају међусобно хетеродимере или хомодимере и њихов међусобни однос одређује одговор ћелије на агенсе који индукују апоптотску ћелијску смрт. Резултати наших истраживања показују да оба новосинтетисана агенса, pentyl-Pt и butyl-Pt, доводе до смањења експресије антиапоптотског протеина Bcl-2, 24h након третмана A549 и MCF-7 ћелија, као и до повећања нивоа проапоптотског протеина Bax (Графикон 17 и 18). У исто време, однос анализираних протеина Bax/Bcl-2 расте, што јасно потврђује да је третман A549 и MCF-7 ћелија pentyl-Pt и butyl-Pt индуковао апоптотску ћелијску смрт. Нарушена равнотежа између проапоптотског и антиапоптотског протеина покреће механизам апоптозе који ћелије уводи у смрт. Однос између проапоптотског и антиапоптотских протеина је важан показатељ ћелијске вијабилности. Велики број антиканцерских агенаса делује на ове протеине уводећи ћелију у апоптозу (Pore et al, 2013). Suntharalingam и сарадници су показали да циспалтина и новосинтетисани платина(II) комплекс [Pt(BDI^{QQ})]Cl индукују апоптозу променом нивоа експресије проапоптотског Bax протеина код A549 ћелија карцинома плућа и A2780 ћелија карцинома оваријума (Suntharalingam et al, 2014).

Поремећаји у регулацији ћелијског циклуса такође могу да доведу до смањења пролиферативне активности и до смрти ћелија. Свака фаза ћелијског циклуса је регулисана контролним механизмима који спречавају репликацију ДНК и деобу оштећених ћелија. Застој у ћелијском циклусу омогућава контролним механизмима да поправе оштећење, а уколико то није могуће, покреће се апоптотски процес. Због тога смо пратили дистрибуцију A549 и MCF-7 ћелија по фазама ћелијског циклуса након третмана pentyl-Pt, butyl-Pt и cis-Pt концентрацијама које одговарају вредностима IC50 за сваки комплекс. Сви третмани су изазвали нагомилавање ћелија у S фази ћелијског циклуса, при чему је број ћелија у G0/G1 фази смањен, а број ћелија у G2/M фази скоро непромењен (Графикон 19). Контролни механизми који заустављају ћелијски циклус у S фази (S контролна тачка) спречавају репликацију ДНК у оштећеним ћелијама, као и прелазак у следећу фазу ћелијског циклуса, а самим тим спречавају и ћелијску деобу. Прогресија кроз S фазу ћелијског циклуса је омогућена координисаном акцијом циклина A и E и циклин-зависне киназе Cdk2. Инхибиција ових циклина и циклин-зависних киназа резултује у акумулацији ћелија у S фази (Grana et al, 1995). Резултати наших истраживања су у складу са резултатима BrdU есеја, и показују да третмани комплексима платине инхибирају синтезу ДНК и ћелијску пролиферацију. Подаци из литературе показују да цисплатина може да заустави ћелијски циклус у S или у G2/M фази. Третман A549 ћелија цисплатином зауставља ћелијски циклус у S (Yuan et al, 2015; Suntharalingam et al, 2014), али и у G2/M фази (Wang et al, 2016). Лазих и сарадници су синтетисали октаедарни платина(IV) комплекс са edda-типом лиганда који има сличну цитотоксичну активност као цисплатина, али другачијим механизмом деловања. Овај комплекс доводи до застоја ћелијског циклуса у G0/G1 фази, не доводи до покретања апоптотске каскаде, већ узрокује оштећење ћелијске мембране и некрозу (Lazić et al, 2012). Платина(IV) комплекс који су синтетисали Huang и сарадници је довео до нагомилавања A549 ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса (Huang et al, 2017).

Концепт комбиновања различитих терапеутика у циљу повећања њихове ефикасности и превазилажења резистенције данас је веома заступљен у терапеутској

практи. Због тога смо у овом раду применили и комбиноване третмане туморских A549 и MCF-7 ћелија комплексима платине и јонизујућим, γ зрачењем.

Јонизујуће зрачење се примењује у терапији великог броја тумора, али са извесним ограничењима (DeSantis et al, 2014). Јонизујуће зрачење доводи до оштећења ДНК и повећава интраћелијску акумулацију слободних радикала (ROS) (Kawamura et al, 2018). Реактивна једињења кисеоника ступају у реакцију са протеинима, масним киселинама, нуклеотидима и другим молекулима доводећи до реакција пероксидације и смрти ћелије (Su et al, 2019). Оштећења која настају на молекулу ДНК под дејством јонизујућег зрачења јесу једноланчани и дволанчани прекиди, као и оштећење база и шећера у нуклеотидима. Подаци из литературе показују да је број дволанчаних прекида на молекулу ДНК у директној корелацији са степеном преживљавања ћелија (Belli et al, 2002). Оштећења на молекулу ДНК активирају репер механизме у ћелији, који могу да исправе оштећења, водећи ка радиорезистенцији тумора. Јонизујуће зрачење оштећује и здраве ћелије које се налазе у окружењу тумора, што представља озбиљан проблем, посебно када се ту налазе витални органи. Због тога је једна од стратегија у лечењу тумора комбинована терапија хемиотерапеутицима и радиотерапија, која има за циљ повећање осетљивости туморских ћелија на зрачење (радиосензитизери) и заштиту околног ткива од штетних ефеката зрачења (радиопротектори).

Подаци из литературе који се односе на радиосензитизаторну улогу цисплатине су контрадикторни. Неке студије показују да цисплатина појачава антитуморске ефекте јонизујућег зрачења код ћелијских линија тумора простате (Geldof et al, 1999), тумора плућа (Liu et al, 2014) и тумора главе и врата (Zhang et al, 2009), али има и података који указују на слабу радиосензитизаторну улогу (Stewart et al, 1994; Blanke et al, 1995) или указују на високу токсичност (Hazuka et al, 1994). Зато је један од циљева овог рада био да се испита утицај новосинтетисаних комплекса платине (IV), pentyl-Pt и butyl-Pt, као и ефекти cis-Pt на осетљивост A549 ћелија карцинома плућа и MCF-7 ћелија карцинома дојке на γ зрачење. Добијени резултати су показали да γ зрачење, примењено самостално, доводи до слабе инхибиције раста обе проучаване ћелијске линије (Графикон 20 и 21), 6h, 24h и 48h након озрачивања.

Квалитет и квантитет оштећења изазваних комбинованим третманима комплексима платине и γ зрачењем је одређен упоредним мерењем ћелијске вијабилности и преживљавања. Процена ћелијске радио-осетљивости је урађена одређивањем радиобиолошких параметара за дозу од 2Gy, фракције преживљавања (SF2), релативне биолошке ефективности (RBE(2Gy)) и фактора повећања осетљивости (SER(2Gy)).

За процену ћелијске вијабилности после комбинованих третмана користили смо СРБ тест. Овај тест показује већу осетљивост и бољу линеарност од МТТ теста, а крајњи продукт је стабилан и не захтева временски прецизно одређено време мерења апсорбанце. Комбиновани третмани IC50 концентрацијама комплекса платине и γ зрачења (1Gy, 2Gy и 4Gy) довели су до значајне инхибиције раста третираних ћелија у односу на ефекте који су остварили појединачни третмани, у свим анализираним временским тачкама. Најслабије ефекте при комбинованим третманима са γ зрачењем је остварила cis-Pt, а најбољи ефекти су постигнути у комбинацији са butyl-Pt.

Поред проучавања ћелијске вијабилности, праћено је и клоногено преживљавање A549 и MCF-7 ћелија, 14 дана након појединачних и комбинованих третмана комплексима платине и γ зрачењем (Графикон 22 и 23). Циљ ових експеримената је да утврди да ли новосинтетисани комплекси платине, pentyl-Pt и butyl-Pt, као и cis-Pt, утичу на повећање радио-осетљивости анализираних ћелијских линија ако се апликују пре

озрачивања, а ефекти прате у временској тачки која је оптимална за процену ефеката зрачења. Клоногени есеј мери способност ћелије да формира велику колонију (већу од 50 ћелија) или клон након најмање 6 деоба, што представља доказ да је та ћелија задржала свој репродуктивни потенцијал и након примењеног третмана (Petrović et al, 2006). С обзиром да је време дупликације и А549 и MCF-7 ћелија око 48h (Табела 1), клоногено преживљавање је праћено након 14 дана. Резултати показују да појединачни третмани комплексима платине, као и озрачивање γ зрацима, доводе до смањења клоногеног преживљавања, при чему butyl-Pt остварује поново најбоље ефекте у односу на pentyl-Pt и cis-Pt при свим појединачним третманима. Међутим, претретман ћелија IC50 концентрацијама комплекса платине доводи до смањења клоногеног преживљавања анализираних ћелија након озрачивања γ зрацима. Само cis-Pt у комбинацији са γ зрачењем није довела до статистички значајног смањења клоногеног преживљавања MCF-7 ћелија.

Критеријум за сврставање ћелија у групу радиорезистентних или радиосензитивних је вредност фракције преживљавања ћелија после озрачивања дозом од 2 Gy (SF2). Ћелије које имају SF2<0,35 су радио-осетљиве ћелије, а оне које имају SF2>0,65 су изразито радиорезистентне (McIlwath et al, 1994; Petrovic et al, 2006.). Према подацима из литературе, А549 ћелије припадају групи радиорезистентних ћелија са вредностима SF2 од 0,74 (Pan et al, 2009). Друге ћелијске линије не-ситноћелијског карцинома плућа имају SF2 и од 0,21 што их сврстава у групу радиосензитивних ћелија (Pan et al, 2009). Резултати наших истраживања су слични: добијене SF2 вредности за А549 ћелије су 0,71 што потврђује њихов радиорезистентни карактер. Ћелијске линије карцинома дојке такође имају широк опсег вредности SF2. Хумане MCF-7 ћелије карцинома дојке су на граници радиорезистентности са вредностима SF2 од 0,61. У литератури постоје подаци да радиорезистентност туморских ћелија може да буде много већа. На пример, ћелије карцинома мокраћне бешике имају вредност SF2 од чак 0,98 (Sangar et al, 2004), док хумане меланомске ћелије HTB140 имају SF2 од 0,96 (Petrovic et al, 2006). Резултати наших истраживања су показали да новосинтетисани комплекси платине(IV) као и cis-Pt, повећавају радиосензитивност и А549 (Табела 15) и MCF-7 ћелија (Табела 16). Вредности SF2 се смањују, а вредности RBE се повећавају. У том смислу, поново је butyl-Pt остварила најјачи ефекат, а cis-Pt најслабији. Вредности фактора повећања радиосензитивности (SER) потврђују да испитивани агенси повећавају осетљивост на γ зрачење, што све заједно указује на смањење резистентности и повећања ефикасности радиотерапије.

Испитивања антитуморске активности новосинтетисаних комплекса платине(IV) у *in vitro* условима указала су на њихов антитуморски потенцијал према ћелијама карцинома плућа и дојке. Ови комплекси су показали бољу антитуморску активност у односу на цисплатину. Такође, новосинтетисани комплекси су испољили значајно селективно дејство у односу на здраве хумане фибробласте, боље него што остварује цисплатина. Индукција апоптозе и заустављање ћелијског циклуса пре репликације ДНК (у S фази) је основни механизам цитотоксичности ових комплекса. Такође, pentyl-P и butyl-Pt повећавају осетљивост ћелија карцинома плућа и карцинома дојке на зрачење, што за последицу може имати смањење примењене дозе зрачења након претретмана комплексима платине(IV) и последично мање нежељених ефеката и слабију радиорезистентност.

6. ЗАКЉУЧЦИ

1. Изучавањем карактеристика испитиваних ћелија, добијени су подаци о динамици раста ових ћелија у култури.

- Хумане А549 ћелије карцинома плућа гајене у култури постижу максималан раст и конфлуентност између 5. и 6. дана од засејавања; време дупликације ових ћелија износи $48,5 \pm 14,9h$.
- Хумане MCF-7 ћелије карцинома дојке гајене у култури постижу максималан раст и конфлуентност 4. дана од засејавања; време дупликације ових ћелија износи $48,6 \pm 6,4h$.
- Хумане НТВ140 ћелије меланома гајене у култури постижу максималан раст и конфлуентност 6. дана од засејавања; време дупликације ових ћелија износи $32,7 \pm 5,1h$.
- Хумане, здраве MRC-5 ћелије плућа гајене у култури постижу максималан раст и конфлуентност 7. дана од засејавања; време дупликације ових ћелија износи $39,5 \pm 5,6h$.

2. Новосинтетисани комплекси платине(IV), pentyl-Pt и butyl-Pt, као и cis-Pt, показују дозно и временски зависну инхибицију раста хуманих А549 ћелија карцинома плућа, MCF-7 ћелија карцинома дојке, НТВ140 ћелија малигног меланома и здравих MRC-5 фибробласта.

- Вредности IC50 за сва три анализирана комплекса указују на велику осетљивост А549 и MCF-7 ћелија на примењене третмане. Најјача инхибиција раста обе ћелијске линије је постигнута третманом butyl-Pt, а најслабија применом cis-Pt.
- Вредности IC50 за сва три анализирана комплекса указују на слабу осетљивост НТВ140 ћелија на примењене третмане, па су ове ћелије, као резистентне, искључене из даљих истраживања.
- Сви испитивани комплекси су показали велику селективност према анализираним туморским ћелијама у односу на здраве MRC-5 ћелије.

3. Пролиферативна активност А549 и MCF-7 ћелија опада након третмана. Смањење пролиферације је дозно и временски зависно за све примењене дозе и у свим временским тачкама.

4. У третираним туморским ћелијама сви испитивани комплекси су индуковали апоптотску ћелијску смрт.

- Комплекси су изазвали фрагментацију молекула ДНК, карактеристичну за процес апоптозе.
- Цитофлуориметријском анализом је показано да је након третмана дошло до екстернализације фосфатидил серина и везивања анексина, што је карактеристично за апоптотске ћелије.
- Третман је довео до промена у нивоу експресије Bcl-2 и Вах протеина, карактеристичних за апоптозу.

5. Третман А549 и MCF-7 ћелија доводи до заустављања ћелијског циклуса и акумулације ћелија у S фази ћелијског циклуса.

6. Третман А549 и МСF-7 ћелија γ зрачењем доводи до благе инхибиције раста ових ћелија.

- А549 ћелије карцинома плућа спадају у групу радиорезистентних ћелија са вредношћу SF2 од 0,71.
- МСF-7 ћелије карцинома дојке су такође радиорезистентне са вредношћу SF2 од 0,61.

7. Претретман ћелија испитиваним комплексима платине(IV), pentyl-Pt и butyl-Pt, као и cis-Pt, доводи до повећања инхибиције раста γ зрачењем свих испитиваних ћелија.

8. Новосинтетисани комплекси платине(IV) и cis-Pt повећавају радиосензитивност испитиваних ћелија на γ зрачење.

- Промена радиосензитивности се огледа кроз промену вредности радиобиолошких параметара SF2, RBE(2Gy) и SER(2Gy).
- Најјача радиосензитивност обе ћелијске линије је постигнута претретманом butyl-Pt, а најслабија применом cis-Pt.

7. ЛИТЕРАТУРА

Abd Rashid N, Abd Halim SAS, Teoh SL, Budin SB, Hussan F, Adib Ridzuan NR, Abdul Jalil NA. The role of natural antioxidants in cisplatin-induced hepatotoxicity. *Biomed Pharmacother*, 2021;144:112328.

Abu-Surrah AS, Kettunen M. Platinum group antitumor chemistry: design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin. *Curr Med Chem*, 2006;13(11):1337-1357.

Agudo-López A, Prieto-García E, Alemán j, Pérez C, Díaz-García CV, Parrilla-Rubio L, Cabrera S, Navarro-Ranninger C, Cortés-Funes H, López-Martín JA, Agulló-Ortuño MT. Mechanistic added value of a trans-Sulfonamide-Platinum-Complex in human melanoma cell lines and synergism with cis-Platin. *Mol Cancer*, 2017;16:45-55.

Aldridge DR, Radford IR. Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines. *Cancer Res*, 1998;58(13):2817-2824.

Alessio M, Zanellato I, Bonarrigo I, Gabano E, Ravera M, Osella D. Antiproliferative activity of Pt(IV)-bis(carboxylato) conjugates on malignant pleural mesothelioma cells. *J Inorg Biochem*, 2013;129:52-57.

Ali I, Wani WA, Saleem K, Haque A. Platinum compounds: a hope for future cancer chemotherapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013;13(2):296-306.

Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med*, 2010;9(45):145-152.

Arsenijević M, Milovanović M, Volarević V, Čanović D, Arsenijević N, Soldatović T, et al. Cytotoxic properties of platinum(IV) and dinuclear platinum(II) complexes and their ligand substitution reactions with guanosine-5'-monophosphate *Transition Met Chem*, 2012;37:481-488.

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):807-817.

Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett*, 2012;327(1-2):48-60.

Baik MH, Friesner RA, Lippard SJ. Theoretical study of cisplatin binding to purine bases: why does cisplatin prefer guanine over adenine? *J Am Chem Soc*, 2003;125(46):14082-14092.

Bao A, Li Y, Tong Y, Zheng H, Wu W, Wei C. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and cisplatin synergistically induce apoptosis and cell cycle arrest in gastric cancer cells. *Int J Mol Med*, 2014;33(5):1177-84.

Barnard S, Bouffler S, Rothkamm K. The shape of the radiation dose response for DNA double-strand break induction and repair. *Genome Integr*, 2013;4(1):1.

Belli M, Saporita O, Tabocchini MA. Molecular targets in cellular response to ionizing radiation and implications in space radiation protection. *J Radiat Res (Tokyo)*, 2002;43 Suppl:13-19.

Blanke C, Ansari R, Mantravadi R, Gonin R, Tokars R, Fisher W et al. Phase III trial of thoracic irradiation with or without cisplatin for locally advanced unresectable non-small-cell lung cancer: a Hoosier Oncology Group protocol. *J Clin Oncol*, 1995;13:1425-1429.

Bloem A, Lockhorst H. Bcl-2 antisense therapy in multiple myeloma. *Pathol Biol (Paris)*, 1999;47(2):216-220.

Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020;1867(6):118688.

Brozovic A, Ambriović-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol*, 2010;40(4):347-359.

Camet ML, Spence A, Hayashi SS, Wu N, Henry J, Sauerburger K, Hayashi RJ. Cisplatin Ototoxicity: Examination of the Impact of Dosing, Infusion Times, and Schedules In Pediatric Cancer Patients. *Front Oncol*, 2021;11:673080.

Chen T, Stephens PA, Middleton FK, Curtin NJ. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discov Today*, 2012;17(5-6):194-202.

Coluccia M, Natile G. Trans-platinum complexes in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 2007;7(1):111-123.

Combs SE, Zipp L, Rieken S, Habermehl D, Brons S, Winter M, Haberer T, Debus J, Weber KJ. In vitro evaluation of photon and carbon ion radiotherapy in combination with chemotherapy in glioblastoma cells. *Radiat Oncol*, 2012;7:9.

Creasey AA, Smith HS, Hackett AJ, Fukuyama K, Epstein WL, Madin SH. Biological properties of human melanoma cells in culture. *In Vitro*, 1979;15(5):342-50.

Das S, Shukla N, Singh SS, Kushwaha S, Shrivastava R. Mechanism of interaction between autophagy and apoptosis in cancer. *Apoptosis*, 2021;26(9-10):512-533.

Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, 2014;740:364-378.

Davies SM, Wong PN, Battle AR, Haddad G, McKeage MJ, Hambley TB. Examination of the effects of oxidation and ring closure on the cytotoxicities of the platinum complexes of N-(2-hydroxyethyl) ethane-1,2-diamine and ethane-1,2-diamine-N,N'- diacetic acid. *J Inorg Biochem*, 2002;91(1):205-211.

Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol*, 2012;2012:645460.

Deljanin M, Nikolic M, Baskic D, Todorovic D, Djurdjevic P, Zaric M, Stankovic M, Todorovic M, Avramovic D, Popovic S. Chelidonium majus crude extract inhibits migration and induces cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell lines. *J Ethnopharmacol*, 2016;190:362-371.

DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 2014;64(4):252-271.

Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002;42(3):317-325.

Dimitrijevic D, Glodjovic V, Radic G, Garcia-Granda S, Menendez-Taboada L, Milovanovic M, Volarevic V, Arsenijevic N, Bogdanovic G, Trifunovic S. Synthesis, characterization and cytotoxicity of novel platinum(IV) complexes with some esters of ethylenediamine-N, N'-di-S,S-(2,2'-dibenzyl) acetic acid. Crystal structure of O,O'-dipropyl-ethylenediamine- N, N'-di-S,S-(2,2'-dibenzyl)acetate dihydrochloride. *Inorganica Chimica Acta*, 2013;402:83-89.

Drobník J, Horáček P. Specific biological activity of platinum complexes. Contribution to the theory of molecular mechanism. *Chem Biol Interact*, 1973;7(4):223-229.

Fahmy SA, Ponte F, Grande G, Fawzy IM, Mandour AA, Sicilia E, Azzazy HME. Synthesis, Characterization and Host-Guest Complexation of Asplatin: Improved In Vitro Cytotoxicity and Biocompatibility as Compared to Cisplatin. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Feb 21;15(2):259

Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehmé A, Christen RD, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res*, 1996;56(21):4881-4886.

Finnberg N, El-Deiry WS. TRAIL death receptors as tumor suppressors and drug targets. *Cell Cycle*, 2008;7(11):1525-8.

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):1351-1371.

Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*, 2011;3:1351-1371.

Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev*, 2003;103(3):645-62.

Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev*, 2003;103:645-662.

Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Pérez JM. Novel concepts in the development of platinum antitumor drugs. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2002;2(4):539-551.

Ge R, Liu L, Dai W, Zhang W, Yang Y, Wang H, Shi Q, Guo S, Yi X, Wang G, Gao T, Luan Q, Li C. Xeroderma Pigmentosum Group A Promotes Autophagy to Facilitate Cisplatin Resistance in Melanoma Cells through the Activation of PARP1. *J Invest Dermatol*, 2016;136(6):1219-1228.

Geldof AA, Kruit A, Newling DW, Slotman BJ. Synergism between cisplatin and radiotherapy in an in vitro prostate tumor cell line. *Anticancer Res*, 1999;19:505-508.

Gest C, Joimel U, Huang L, Pritchard LL, Petit A, Dulong C, Buquet C, Hu CQ, Mirshahi P, Laurent M, Fauvel-Lafève F, Cazin L, Vannier JP, Lu H, Soria J, Li H, Varin R, Soria C. Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *BMC Cancer*, 2013;13:63.

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 1973;51(5):1417-23.

Goodhead DT. Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations. *J Radiat Res*, 1999;40:1-13.

Grana X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*, 1995;11:211-219.

Guminski AD, Balleine RL, Chiew YE, Webster LR, Tapner M, Farrell GC, Harnett PR, Defazio A. MRP2 (ABCC2) and cisplatin sensitivity in hepatocytes and human ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2006;100(2):239-246.

Gupta S, Kass GE, Szegezdi E, Joseph B. The mitochondrial death pathway: a promising therapeutic target in diseases. *J Cell Mol Med*, 2009;13(6):1004-1033.

Gupta S, Koru-Sengul T, Arnold SM, Devi GR. Low-dose fractionated radiation potentiates the effects of cisplatin independent of the hyper-radiation sensitivity in human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2011;10(2):292-302.

Hager S, Ackermann CJ, Joerger M, Gillessen S, Omlin A. Anti-tumour activity of platinum compounds in advanced prostate cancer-a systematic literature review. *Ann Oncol*, 2016;27(6):975-984.

Hajra KM, Liu JR. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis*, 2004;9(6):691-704.

Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther*, 2003;1:47-61.

Haselberger K, Peterson DC, Thomas DGT, Darling JL. Assay of anticancer drugs in tissue culture: comparison of a tetrazolium-based assay and a protein binding dye assay in short-term cultures derived from human malignant glioma. *Anticancer Drugs*, 1996;7:331-338.

Hazuka MB, Crowley JJ, Bunn PA, O'Rourke M, Braun TJ, Livingston RB. Daily low-dose cisplatin plus concurrent high-dose thoracic irradiation in locally advanced unresectable non-small-cell lung cancer: results of a phase II Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 1994;12:1814-1820.

He M, Chao L, You YP. PRPS1 silencing reverses cisplatin resistance in human breast cancer cells. PRPS1 silencing reverses cisplatin resistance in human breast cancer cells. *Biochem Cell Biol*, 2017;95(3):385-393.

Holzer AK, Katano K, Klomp LW, Howell SB. Cisplatin rapidly down-regulates its own influx transporter hCTR1 in cultured human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res*, 2004;10(19):6744-6749.

Holzer AK, Manorek GH, Howell SB. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol*, 2006;70(4):1390-1394.

Horwitz KB, Costlow ME, McGuire WL. MCF-7; a human breast cancer cell line with oestrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids*, 1975;26(6):p785-95.

Huang X, Huang R, Gou S, Wang Z, Wang H. Anticancer Platinum(IV) Prodrugs Containing Monoaminophosphonate Ester as a Targeting Group Inhibit Matrix Metalloproteinases and Reverse Multidrug Resistance. *Bioconjug Chem*, 2017;28(4):1305-1323.

Imamura T, Izumi H, Nagatani G, Ise T, Nomoto M, Iwamoto Y, Kohno K. Interaction with p53 enhances binding of cisplatin-modified DNA by high mobility group 1 protein. *J Biol Chem*, 2001;276(10):7534-7540.

Işeri S, Ercan F, Gedik N, Yüksel M, Alican I. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. *Toxicology*, 2007;230(2-3):256-264.

Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002;99(22):14298-14302.

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):14721-14730.

Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*, 1970;227:168-170.

Jansen BA, Brouwer J, Reedijk J. Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs. *J Inorg Biochem*, 2002;89(3-4):197-202.

Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, Yang C, Wang J, Brennan J, MacLean KH, Han J, Chittenden T, Ihle JN, McKinnon PJ, Cleveland JL, Zambetti GP. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell*, 2003;4(4):321-328.

Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem Rev*, 2016;116(5):3436-3486.

Jolley JN, Yanovsky AI, Kelland LR, Nolan KB. Synthesis and antitumour activity of platinum(II) and platinum(IV) complexes containing ethylenediamine-derived ligands having alcohol, carboxylic acid and acetate substituents. Crystal and molecular structure of [PtL₄CL₂].H₂O where L₄ is ethylenediamine-N,N'-diacetate. *J Inorg Biochem*, 2001;83(2-3):91-100.

Jurisevic M, Radosavljevic G, Arsenijevic A, Milovanovic M, Gajovic N, Djordjevic D, Milovanovic J, Stojanovic B, Ilic A, Sabo T, Kanjevac T. Platinum complexes with edda ethylenediamine n,n diacetate ligands as potential anticancer agents. *Ser J Exp Clin Res*, 2016;17(4):285-295.

Kaludjerović GN, Miljković D, Momčilović M, Djinović VM, Mostarica Stojković M, Sabo TJ, Trajković V. Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int J Cancer*, 2005a;116(3):479-486.

Kaludjerović GN, Dinović VM, Juranić ZD, Stanojković TP, Sabo TJ. Activity of some platinum(II/IV) complexes with O,O-n-butyl-and O,O-n-pentyl-ethylenediamine-N,N'-di-3-propanoate and halogeno ligands against HeLa and K562 cell lines and human PBMC. *J Inorg Biochem*, 2005b;99(2):488-496.

Kaludjerovic,G. Schmidt,H. Schwieger,S. Wagner,C. Paschke,R. Dietrich,A. Mueller,T. Steinborn D. Platinum(IV) complexes with ethylenediamine-N, N'-diacetate diester (R₂edda)

ligands: Synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity. *Inorganica Chimica Acta*, 2008;36:1395–1404.

Karran P, Marinus MG. Mismatch correction at O6-methylguanine residues in *E. coli* DNA. *Nature*, 1982;296(5860):868-869.

Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, Hooft van Huijsduijnen R, Kaneko T, Kita K, Mowbray CE, Schmatz D, Warner P, Slingsby BT. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov*, 2015;14(11):751-758.

Kawamura K, Qi F, Kobayashi J. Potential relationship between the biological effects of low-dose irradiation and mitochondrial ROS production. *J Radiat Res*, 2018;59(2):91–97.

Keepers Y.P., Pizao P.E., Peters G.J., van Ark-Otte J., Winograd B., Pinedo H.M. 1991. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur J Cancer*, 27(7): 897-900.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972;26:39-257.

Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, Muderspach LI, Chafe WE, Suggs CL 3rd, Walker JL, Gersell D. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N Engl J Med*, 1999;340(15):1154-1161.

Kilari D, Guancial E, Kim ES. Role of copper transporters in platinum resistance. *World J Clin Oncol*, 2016;7(1):106-113.

Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen ZS, Terada K, Furukawa T, Yang XL, Gao H, Miura N, Sugiyama T, Akiyama S. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res*, 2000;60(5):1312-1316.

Krajcinovic BB, Kaluđerović GN, Steinborn D, Schmidt H, Wagner C, Žižak ŽS, Juranić ZD, Trifunović SR, Sabo T. Synthesis and in vitro antitumoral activity of novel O,O'-di-2-alkyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoate ligands and corresponding platinum(II/IV) complexes. *J Inorg Biochem*, 2008;102(4):892-900.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 2007;87(1):99-163.

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992;89(16):7491-7495.

Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant*, 1997;12(12):2478-2480.

Lawrence TS, Blackstock AW, McGinn C. The mechanism of action of radiosensitization of conventional chemotherapeutic agents. *Semin Radiat Oncol*, 2003;13(1):13-21.

Lazić JM, Vucićević L, Grgurić-Sipka S, Janjetović K, Kaluderović GN, Misirkić M, Gruden-Pavlović M, Popadić D, Paschke R, Trajković V, Sabo TJ. Synthesis and in vitro anticancer activity of octahedral platinum(IV) complexes with cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-N,N'-diacetate-type ligands. *ChemMedChem*. 2010 Jun 7;5(6):881-9.

Lee IH, Kawai Y, Fergusson MM, Rovira II, Bishop AJ, Motoyama N, Cao L, Finkel T. Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress. *Science*, 2012;336(6078):225-228.

Leibowitz B, Yu J. Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther*. 2010 Mar 15;9(6):417-422.

Li Y, Womer RB, Silber JH. Predicting cisplatin ototoxicity in children: the influence of age and the cumulative dose. *Eur J Cancer*, 2004;40(16):2445-2451.

Li Y, Zhang J, Liu Y, Zhang B, Zhong F, Wang S, Fang Z. MiR-30a-5p confers cisplatin resistance by regulating IGF1R expression in melanoma cells. *BMC Cancer*, 2018;11:18(1):404.

Liao Y, Lu X, Lu C, Li G, Jin Y, Tang H. Selection of agents for prevention of cisplatin-induced hepatotoxicity. *Pharmacol Res*, 2008;57(2):125-131.

Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol*, 1996;270(4 Pt 2):F700-8.

Lin Y, Ma W, Benchimol S. Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet*, 2000;26(1):122-127.

Lippman ME and Bolan G. Oestrogen -responsive human breast cancer in long term tissue culture. *Nature*, 1975;256(5518):p592-593.

Liu M, Ma S, Liu M, Hou Y, Liang B, Su X, Liu X. Synergistic killing of lung cancer cells by cisplatin and radiation via autophagy and apoptosis. *Oncology Lett*, 2014;7:1903-1910.

Lu M, Boschetti C, Tunnacliffe A. Long Term Aggresome Accumulation Leads to DNA Damage, p53-dependent Cell Cycle Arrest, and Steric Interference in Mitosis. *J Biol Chem*, 2015;290(46):27986-8000.

Lu Y, Cederbaum AI. Cisplatin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1. *Toxicol Sci*, 2006;89(2):515-523.

Ma Y, Yu WD, Trump DL, Johnson CS. 1,25D3 enhances antitumor activity of gemcitabine and cisplatin in human bladder cancer models. *Cancer*, 2010;116(13):3294-303.

Marcu L, van Doorn T, Olver I. Cisplatin and radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer--a review of their cooperation. *Acta Oncol*, 2003;42(4):315-325.

Martelli L, Di Mario F, Ragazzi E, Apostoli P, Leone R, Perego P, Fumagalli G. Different accumulation of cisplatin, oxaliplatin and JM216 in sensitive and cisplatin-resistant human cervical tumour cells. *Biochem Pharmacol*, 2006;72(6):693-700.

Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*, 2002;192(1):1-15.

McIlwrath A.J., Vasey P.A., Ross G.M. Cell cycle arrest and radiosensitivity of human tumor cell lines: Dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. *Cancer Res*, 1994;54:3718-3722.

Meijer C, de Vries EG, Marmioli P, Tredici G, Frattola L, Cavaletti G. Cisplatin-induced DNA-platination in experimental dorsal root ganglia neuropathy. *Neurotoxicology*, 1999;20(6):883-887.

Meijer C, Timmer A, De Vries EG, Groten JP, Knol A, Zwart N, Dam WA, Sleijfer DT, Mulder NH. Role of metallothionein in cisplatin sensitivity of germ-cell tumours. *Int J Cancer*, 2000;85(6):777-781.

Meike S, Yamamori T, Yasui H, Eitaki M, Matsuda A, Morimatsu M, Fukushima M, Yamasaki Y, Inanami O. A nucleoside anticancer drug, 1-(3-C-ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (TAS106), sensitizes cells to radiation by suppressing BRCA2 expression. *Mol Cancer*, 2011;10:92.

Melounková L, Syková M, Jirásko R, Jambor R, Havelek R, Peterová E, Honzíček J, Vinklárěk J. Heterobimetallic platinum(ii) complexes with increased cytotoxicity against ovarian cancer cell lines. *New J Chem*, 2021;45:19506-19514.

Metzger R, Bollschweiler E, Hölscher AH, Warnecke-Eberz U. ERCC1: impact in multimodality treatment of upper gastrointestinal cancer. *Future Oncol*, 2010;6(11):1735-1749.

Michalak M, Lach MS, Borska S, Nowakowski B, Umezawa K, Suchorska WM. DHMEQ enhances the cytotoxic effect of cisplatin and carboplatin in ovarian cancer cell lines. *Am J Cancer Res*, 2021;11(12):6024-6041.

Milosević J, Kanazir S, Medić-Mijacević L, Pejanović V, Stokić Z, Konjević G, Rakić L, Ruzdijić S. Sulfinosine-induced cell growth inhibition and apoptosis in human lung carcinomas in vitro. *Invest New Drugs*, 2002;20(3):229-40.

Mishra KP. Cell membrane oxidative damage induced by gamma-radiation and apoptotic sensitivity. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2004;23(1):61-66.

Moffatt KA, Johannes WU, Miller GJ. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and platinum drugs act synergistically to inhibit the growth of prostate cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 1999;5(3):695-703.

Moggs JG, Szymkowski DE, Yamada M, Karran P, Wood RD. Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts. *Nucleic Acids Res*, 1997;25(3):480-491.

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.

Muschel RJ, Soto DE, McKenna WG, Bernhard EJ. Radiosensitization and apoptosis. *Oncogene*, 1998;17:3359-3363.

Nagai N, Okuda R, Kinoshita M, Ogata H. Decomposition kinetics of cisplatin in human biological fluids. *J Pharm Pharmacol*, 1996;48(9):918-924.

Nakamoto S, Mitsuhashi N, Takahashi T, Sakurai H, Niibe H. An interaction of cisplatin and radiation in two rat yolk sac tumour cell lines with different radiosensitivities in vitro. *Int J Radiat Biol*, 1996;70(6):747-753.

Nakayama K, Miyazaki K, Kanzaki A, Fukumoto M, Takebayashi Y. Expression and cisplatin sensitivity of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) in human solid carcinoma cell lines. *Oncol Rep*, 2001;8(6):1285-1287.

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.

Nias AHW. An introduction to radiobiology. 2nd Edition edition: John Wiley & Sons. 1998.

Nieminen AI, Partanen JI, Klefstrom J. c-Myc blazing a trail of death: coupling of the mitochondrial and death receptor apoptosis pathways by c-Myc. *Cell Cycle*, 2007;6(20):2464-2472.

Nikjoo H, Munson JR, Bridges AB. RBE-LET relationships in mutagenesis by ionizing radiation. *J Radiat Res*, 1999;40:85-105.

Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, 2000;102(6):849-862.

Ohnishi T. The role of the p53 molecule in cancer therapies with radiation and/or hyperthermia. *J Cancer Res Ther*, 2005;1(3):147-150.

Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC; IALT

Bio Investigators. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*, 2006;355(10):983-991.

Oliveira CG, Romero-Canelón I, Silva MM, Coverdale JPC, Maia PIS, Batista AA, Castelli S, Desideri A, Sadler PJ, DeFlon VM. Palladium(II) complexes with thiosemicarbazones derived from pyrene as topoisomerase IB inhibitors. *Dalton Trans*, 2019;48:16509-16517.

O'Neill CF, Koberle B, Masters JR, Kelland LR. Gene-specific repair of Pt/DNA lesions and induction of apoptosis by the oral platinum drug JM216 in three human ovarian carcinoma cell lines sensitive and resistant to cisplatin. *Br J Cancer*, 1999;81(8):1294-1303.

Owatari S, Akune S, Komatsu M, Ikeda R, Firth SD, Che XF, Yamamoto M, Tsujikawa K, Kitazono M, Ishizawa T, Takeuchi T, Aikou T, Mercer JF, Akiyama S, Furukawa T. Copper-transporting P-type ATPase, ATP7A, confers multidrug resistance and its expression is related to resistance to SN-38 in clinical colon cancer. *Cancer Res*, 2007;67(10):4860-4868.

Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Arlaud GJ, Frchet P. How phagocytes track down and respond to apoptotic cells. *Crit Rev Immunol*, 2009;29(2):111-130.

Pan Y, Li WX, Li JM, Zhu JQ, Liang YQ, Guo AL. Correlation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit expression to radiosensitivity of non-small cell lung cancer cell lines. *Ai Zheng*, 2009;28(7):714-717.

Pasetto LM, D'Andrea MR, Brandes AA, Rossi E, Monfardini S. The development of platinum compounds and their possible combination. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006;60(1):59-75.

Paunović MG, Matić MM1, Obradović AD, Jevtić VV, Stojković DLJ, Ognjanović BI. Antiproliferative, antimigratory, and prooxidative potential of novel platinum(IV) complexes and resveratrol on breast cancer (MDA-MB-231) and choriocarcinoma (JEG-3) cell lines. *Drug Dev Res*, 2022;83(3):688-698.

Payet D, Gaucheron F, Sip M, Leng M. Instability of the monofunctional adducts in cis-[Pt(NH₃)₂(N⁷-N-methyl-2-diazapyrenium)Cl](²⁺)-modified DNA: rates of cross-linking reactions in cis-platinum-modified DNA. *Nucleic Acids Res*, 1993;21(25):5846-5851.

Petrović I, Ristić-Fira A, Todorović D, Valastro L, Cirrone P, Cuttone G. R adiological analysis of human melanoma cells on the 62 MeV CATANA proton beam. *Int J Radiat Biol*, 2006, 82(4):251-265.

Pfizer. Cisplatin 1mg/ml. Dostupno na https://www.alims.gov.rs/doc_file/lekovi/pil/515-01-02060-16-001.pdf. Poslednji put posećeno 01.06.2022.

Pistritto G, Trisciuglio D, Cecil C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 2016;8(4):603-619.

Pore MM, Hiltermann TJ, Kruyt FA. Targeting apoptosis pathways in lung cancer. *Cancer Lett*, 2013;332(2):359-68

Qin JL, Qin QP, Wei ZZ, Yu YC, Meng T, Wu CX, Liang YL, Liang H, Chen ZF. Stabilization of c-myc G-Quadruplex DNA, inhibition of telomerase activity, disruption of mitochondrial function and tumor cell apoptosis by platinum(II) complex with 9-amino-oxoisoaporphine. *Eur J Med Chem*, 2016;124:417-427.

Qin X, Fang L, Chen F, Gou S. Conjugation of platinum(IV) complexes with chlorambucil to overcome cisplatin resistance via a "joint action" mode toward DNA. *Eur J Med Chem*, 2017;137:167-175.

Quiroga, AG. Understanding trans platinum complexes as potential antitumor drugs beyond targeting DNA. *J Inorg Biochem*, 2012;114:106–112.

Ramesh P, Medema JP. BCL-2 family deregulation in colorectal cancer: potential for BH3 mimetics in therapy. *Apoptosis*, 2020;25(5-6):305-320.

Reardon JT, Vaisman A, Chaney SG, Sancar A. Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res*, 1999;59(16):3968-3971.

Rimoldi I, Facchetti L, Lucchini G, Castiglioni E, Marchiano S, Ferri N. In vitro anticancer activity evaluation of new cationic platinum(II) complexes based on imidazole moiety. *Bioorg Med Chem*, 2017;25:1907-1913.

Ristic-Fira A, Petrovic I, Todorovic D, Koricanac L, Vujicic M, Demajo M, Sabini G, Cirrone P, Cuttone G. Inactivation of HTB63 human melanoma cells by irradiation with protons and gamma rays. *Oncol Rep*, 2004;12(6):1323-1328.

Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, Maiman MA, Clarke-Pearson DL, Insalaco S. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med*, 1999;340(15):1144-1153.

Saad SY, Najjar TA, Alashari M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004;31(12):862-867.

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med*, 1999;107(5):489-506.

Sakamoto M, Kondo A, Kawasaki K, Goto T, Sakamoto H, Miyake K, Koyamatsu Y, Akiya T, Iwabuchi H, Muroya T, Ochiai K, Tanaka T, Kikuchi Y, Tenjin Y. Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray. *Hum Cell*, 2001;14(4):305-315.

Salim H, Akbar NS, Zong D, Vaculova AH, Lewensohn R, Moshfegh A, Viktorsson K, Zhivotovsky B. miRNA-214 modulates radiotherapy response of non-small cell lung cancer cells through regulation of p38MAPK, apoptosis and senescence. *Br J Cancer*, 2012;107(8):1361-1373.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 1997;91(4):443-446.

Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnica-Worms H, Elledge SJ. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*, 1997;277(5331):1497-5017.

Sangar VK, Cowan R, Margison GP, Hendry JH, Clarke NW. An evaluation of gemcitabines differential radiosensitising effect in related bladder cancer cell lines. *Br J Cancer*, 2004;90(2):542-548.

Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M. Apoptosis in cancer--an update. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012;13(10):4873-4878.

Sarin N, Engel F, Kalyda GV, Mannewitz M, Cinati JJr, Rothweiler F, Michaelis M, Saafan H, Ritter CA, Jaehde U, Frotschi R. Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arresr. *PLOS ONE*, 2017;12(7):e0181081.

Selvakumaran M, Pisarcik DA, Bao R, Yeung AT, Hamilton TC. Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res*, 2003;63(6):1311-1316.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 2003;22(47):7265-79

Siegsmund MJ, Marx C, Seemann O, Schummer B, Steidler A, Toktomambetova L, Köhrmann KU, Rassweiler J, Alken P. Cisplatin-resistant bladder carcinoma cells: enhanced expression of metallothioneins. *Urol Res*, 1999;27(3):157-163.

Silva MJ, Costa P, Dias A, Valente M, Louro H, Boavida MG. Comparative analysis of the mutagenic activity of oxaliplatin and cisplatin in the Hprt gene of CHO cells. *Environ Mol Mutagen*, 2005;46(2):104-115.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancerdrug screening. *J Natl Cancer Inst*, 1990;82(13):1107-1112.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1973;51(5):1409-1416.

Spector D, Krasnovskaya O, Pavlov K, Erofeev A, Gorelkin P, Beloglazkina E, Majouga A. Pt(IV) prodrugs with NSAIDs as axial ligands. *Int J Mol Sci*, 2021;22(8):3817.

Sreewart DJ, Molepo JM, Eapen L, Montpetit VA, Goel R, Wong PT, et al. Cisplatin and radiation in a treatment of tumors of the central nervous system: pharmacological considerations and results of early studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1994;28:531-542.

Stojkovic D, Jevtic V, Radic G, Dacic D, Curcic M, Markovic S, Djinic VM, Petrovic V, Trifunovic S. Synthesis, characterization and in vitro antiproliferative activity of platinum(IV) complexes with some O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N, N'-di-2-propanoic acid against colon cancer (HCT- 116) and breast cancer (MDA-MB-231) cell lines. *J Mol Struct*, 2014;1062:21–28.

Su LJ, Zhang JH, Gomez H. et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev*, 2019;2019:1-13.

Suntharalingam K, Wilson JJ, Lin W, Lippard SJ. A dual-targeting, p53-independent, apoptosis-inducing platinum(II) anticancer complex, [Pt(BDI(QQ))]Cl. *Metallomics*, 2014;6(3):437-443.

Surowiak P, Materna V, Maciejczyk A, Pudelko M, Markwitz E, Spaczyński M, Diemel M, Zabel M, Lage H. Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome. *Virchows Arch*, 2007;450(3):279-285.

Tanida S, Mizoshita T, Ozeki K, Tsukamoto H, Kamiya T, Kataoka H, Sakamuro D, Joh T. Mechanisms of cisplatin-induced apoptosis and of cisplatin sensitivity: potential of BIN1 to act as a potent predictor of cisplatin sensitivity in gastric cancer treatment. *Int J Surg Oncol*, 2012;ID 862879:1-8.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008;9(3):231-241.

Toft NJ, Winton DJ, Kelly J, Howard LA, Dekker M, te Riele H, Arends MJ, Wyllie AH, Margison GP, Clarke AR. Msh2 status modulates both apoptosis and mutation frequency in the murine small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999;96(7):3911-3915.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 1984;226(4678):1097-1099.

Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC, Hamilton TC, Chaney SG. The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res*, 1998;58(16):3579-3585.

Vaisman A, Lim SE, Patrick SM, Copeland WC, Hinkle DC, Turchi JJ, Chaney SG. Effect of DNA polymerases and high mobility group protein 1 on the carrier ligand specificity for translesion synthesis past platinum-DNA adducts. *Biochemistry*, 1999;38(34):11026-11039.

Valerie K, Yacoub A, Hagan MP, Curiel DT, Fisher PB, Grant S, Dent P. Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Mol Cancer Ther*, 2007;6(3):789-801.

Van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocytes mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods*, 1994;174:311-320.

van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*, 2001;2(3):196-206.

Varbanov H, Valiahdi SM, Legin AA, Jakupec MA, Roller A, Galanski MS, Keppler BK. Synthesis and characterization of novel bis(carboxylato)dichloridobis(ethylamine)-platinum(IV) complexes with higher cytotoxicity than cisplatin. *Eur J Med Chem*, 2011;46(11):5456-5644.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 1995;184(1):39-51.

Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*, 2003;36(3):165-175.

Vujić JM, Kaluderović GN, Zmejkovski BB, Milovanović M, Volarević V, Arsenijević N, Stanojković TP, Trifunović SR. Stereospecific ligands and their complexes. Part X: Synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity of platinum(IV) complexes with O,O' -dialkyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N' -di-2-(4-methyl)pentanoate ligands. *Inorganica Chimica Acta*, 2012;390:123–128.

Wang H, Zhu X, Huang J, Chen P, Han S, Yan X. Nedaplatin sensitization of cisplatin-resistant human non-small cell lung cancer cells. *Oncol Lett*, 2016;11(4):2566-2572.

Wang JQ, Du ZW, Gao XF, Wu M, Zhang YC, Pan Y, Wang Q, Zhang GZ. [The effect of Bcl-2 gene silencing on the sensitivity of cell line A549 to chemotherapeutic drugs]. *Zhonghua*, 2013;36(3):191-197.

Wang X, Liu Z, Wang Y, Gou S. Platinum(IV) Prodrugs with cancer stem cell inhibitory effects on lung cancer for overcoming drug resistance. *J Med Chem*, 2022;65(11):7933–7945.

Waterborg JH, Matthews HR. The lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*, 1984;1:1-3

Wei Y, Fan T, Yu M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008;40(4):278-288.

Welsh C, Day R, McGurk C, Masters JR, Wood RD, Köberle B. Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int J Cancer*, 2004;110(3):352-361.

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.

Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 2005;17(6):617-25

Woźniak K, Błasiak J. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta Biochim Pol*, 2002;49(3):583-596.

Yamasaki M, Makino T, Masuzawa T, Kurokawa Y, Miyata H, Takiguchi S, Nakajima K, Fujiwara Y, Matsuura N, Mori M, Doki Y. Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in chemoresistance and clinical outcome in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 2011;104(4):707-713.

Yang N, Galick H, Wallace SS. Attempted base excision repair of ionizing radiation damage in human lymphoblastoid cells produces lethal and mutagenic double strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, 2004;3(10):1323-1334.

Yen HC, Tang YC, Chen FY, Chen SW, Majima HJ. Enhancement of cisplatin-induced apoptosis and caspase 3 activation by depletion of mitochondrial DNA in a human osteosarcoma cell line. *Ann N Y Acad Sci*, 2005;1042:516-522.

Yen HC, Tang YC, Chen FY, Chen SW, Majima HJ. Enhancement of cisplatin-induced apoptosis and caspase 3 activation by depletion of mitochondrial DNA in a human osteosarcoma cell line. *Ann N Y Acad Sci*, 2005;1042:516-522.

Yount GL, Haas-Kogan DA, Levine KS, Aldape KD, Israel MA. Ionizing radiation inhibits chemotherapy-induced apoptosis in cultured glioma cells: implications for combined modality therapy. *Cancer Res*, 1998;58(17):3819-3825.

Yousef MI, Saad AA, El-Shennawy LK. Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. *Food Chem Toxicol*, 2009;47(6):1176-1183.

Yuan F, Gu L, Guo S, Wang C, Li GM. Evidence for involvement of HMGB1 protein in human DNA mismatch repair. *J Biol Chem*, 2004;279(20):20935-20940.

Yuan Z, Guo W, Yang J, Li L, Wang M, Lei Y, Wan Y, Zhao X, Luo N, Cheng P, Liu X, Nie C, Peng Y, Tong A, Wei Y. PNAS-4, an Early DNA damage response gene, induces S phase

arrest and apoptosis by activating checkpoint kinases in lung cancer cells. *J Biol Chem*, 2015;290(24):14927-44.

Zhang F, Wang Y, Wang ZQ, Sun P, Wang DS, Jiang YX, Zhang DS, Wang FH, Xu RH, Li YH. Efficacy and safety of cisplatin-based versus nedaplatin-based regimens for the treatment of metastatic/recurrent and advanced esophageal squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Dis Esophagus*, 2017;30(2):1-8.

Zhang L, Zheng CY, Cao JH, Luo SL. Efficacy of paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab for cervical cancer: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2020;99(24):e20558.

Zhang N, Erjala K, Kumala J, Qui X, Sundvall M, Elenius K, Genman R. Concurrent cetuximab, cisplatin and radiation for squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro. *Radiother Oncol*, 2009;92:388-392.

Zhu G, Pan C, Bei JX, Li B, Liang C, Xu Y, Fu X. Mutant p53 in Cancer Progression and Targeted Therapies. *Front Oncol*, 2020;10:595187.

БИОГРАФИЈА

Др Марија Петровић (рођена Радосављевић) је рођена у Крагујевцу 1980. године. Медицински факултет у Крагујевцу је уписала 1998. године, наставила школовање на Медицинском факултету у Београду, где је дипломирала 2006. године са просечном оценом 9,00.

Последипломске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу на смеру Клиничка и експериментална фармакологија уписала школске 2006/2007 године, а усмени докторски испит положила у јуну 2010. године са оценом 9.

Од 2008. године запослена у Служби за лабораторијску дијагностику Клиничког центра Крагујевац. У октобру 2014. године положила специјалистички испит из Клиничке биохемије на Медицинском факултету у Крагујевцу.

БИБЛИОГРАФИЈА

Рад из докторске тезе:

1. **Petrović M**, Popovic S, Baskic D, Todorovic M, Đurđević P, Ristic-Fira A, Keta O, Petkovic V, Koricanac L, Stojkovic D, Jevtic V, Trifunovic S, Todorovic D. Efficacy effects of newly synthesized platinum(IV) complexes on cytotoxicity and radiosensitization of human tumor cells in vitro. *Anticancer Res*, 2020;40:5001-5013. **M23=3; IF=2,480**

Радови у часописима са SCI листе:

1. Stojković DLj, Jevtić VV, Radić GP, Todorović DV, **Petrović M**, Zarić M, Nikolić I, Baskić D, Trifunović SR. Stereospecific ligands and their complexes. XXII. Synthesis and antitumor activity of palladium(II) complexes with some esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-(2,2'-di(4-hydroxy-benzyl))-acetic acid. *J Inorg Biochem*, 2015;143:111-6. **M21=8; IF=3.205**
2. Jankovic SM, Kostic M, **Radosavljevic M**, Jovanovic S. Costs of Rheumatoid Arthritis in a Balkan Country (Serbia). *Eur Polit Soc*, 2009; 23(1):135-138 **M22=5; IF=0,678**
3. Jankovic SM, Kostic M, **Radosavljevic M**, Tesic D, Stefanovic-Stoimenov N, Stevanovic I, Rakovic S, Aleksic J, Folic M, Aleksic A, Mihajlovic I, Biorac N, Borlja J. and Vuckovic R. Cost-effectiveness of four immunomodulatory therapies for relapsing-remitting multiple sclerosis: a Markov model based on data from a Balkan country in socio-economic transition. *Vojnosanit Pregl* 2009;66(7):556-62. **M23=3; IF=0,199**
4. Jankovic SM, Aleksic J, Rakovic S, Aleksic A, Stevanovic I, Stefanovic-Stoimenov N, **Radosavljevic M**, Kostic M, Tesic D, Petrovic B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and risk of gastrointestinal bleeding among patients on hemodialysis. *J Nephrol* 2009;22(4):502-7. **M23=3; IF=1.252**

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

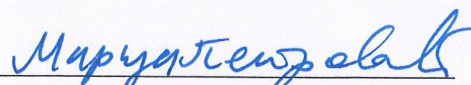
„Ефекти новосинтетисаних комплекса платине(IV) на раст и радиоосетљивост ћелија хуманих малигнух тумора *in vitro*“

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, 02.12.2022. године.


потпис аутора

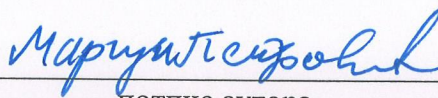
**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

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

„Ефекти новосинтетисаних комплекса платине(IV) на раст и радиоосетљивост ћелија
хуманих малигнух тумора *in vitro*“

истоветне.

У Крагујевцу, 02.12.2022. године.



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Марија Петровић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

„Ефекти новосинтетисаних комплекса платине(IV) на раст и радиоосетљивост ћелија хуманих малигнух тумора *in vitro*“

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

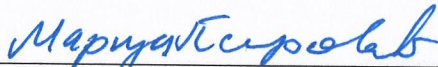
не дозвољавам¹

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

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 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, 02.12.2022. године.


потпис аутора

јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

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/](http://creativecommons.org.rs/)