Ispitivanje protutumorskog djelovanja kompleksa metala i fenil-funkcionaliziranog piridil-triazolilidena in vitro

Gržan, Tena

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:586257

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Tena Gržan

Ispitivanje protutumorskog djelovanja kompleksa metala i fenil-funkcionaliziranog piridil-triazolilidena *in vitro*

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

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

.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

Ispitivanje protutumorskog djelovanja kompleksa metala i fenil-funkcionaliziranog piridil-triazolilidena *in vitro*

Tena Gržan

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Iako je u posljednjih nekoliko desetljeća učinjen velik napredak u rasvjetljavanju mehanizama nastanka zloćudnih bolesti i poboljšanju dijagnostičkih mogućnosti, tumori i dalje predstavljaju jedan od najvećih zdravstvenih problema današnjice. Kemoterapija je jedna od terapija koje se koriste u liječenju tumora. No, bez obzira na njenu uspješnost u liječenju pojednih vrsta tumora, neželjene popratne pojave i pojava otpornosti tumora na kemoterapiju i dalje predstavljaju najveće izazove. U cilju smanjenja ili nadvladavanja navedenih nedostataka postoji stalna potreba za sintetiziranjem novih spojeva. Organometalni kompleksi na bazi različitih metala i kompozicija liganada pokazali su već protutumorska djelovanja. U ovom istraživanju korištenjem metode MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid) ispitana je razina citotoksičnosti dvanaest kompleksa: [(aren)M(fenil-functionalizirani piridil-1,2,3-triazol-5-iliden)klor] (M = iridij, osmij ili rutenij, aren = η(5)-1,2,3,4,5-pentametilciklopentadienil ili η(6)-p-cimen) na ljudskim stanicama karcinoma vrata maternice (HeLa). Kompleks s iridijem nazvan ABB43 pokazao je povećanu citotoksičnost, veću i od citostatika široke primjene, cisplatine. Citotoksičnost ABB43 je ispitana na još nekoliko tumorskih linija stanica različitog porijekla i na normalnoj staničnoj liniji. Povećana razina citotoksičnog učinka na tumorskim staničnim linijama u odnosu na normalnu staničnu liniju upućuje na potencijalno korištenje kompleksa kao protutumorskog lijeka. Protočnim je citometrom pokazano da ABB43 zaustavlja stanični ciklus u fazi S/G2 i inducira apoptozu. Specifičnom inhibicijom ili poticanjem sinteze staničnog glutationa (GSH) utvrđeno je da GSH igra ulogu u odgovoru stanica na stres izazvan tretmanom ABB43.

(41 stranica, 7 slika, 4 tablice, 64 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: organometalni kompleksi, otpornost na lijekove, iridij, glutation

Voditeljica rada: dr. sc. Anamaria Brozović, viši znanstveni suradnik

Suvoditeljica rada: dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Maja Matulić, izv. prof., dr.sc. Dubravka Hranilović, izv. prof. dr.sc Mirna Ćurković Perica, prof.

Zamjena: doc. dr.sc. Inga Marijanović

Rad prihvaćen: 4. veljače 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology Graduation Thesis

Investigation of metal based phenyl-functionalized pyridyl-triazolylidenes for their antitumor activity *in vitro*

Tena Gržan
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Although there has been a great progress in elucidating the mechanisms of malignant diseases and the improvement in diagnostic methods, cancers remain one of the biggest health problem today. One of the cancer therapies is chemotherapy. However, despite its success in treating certain types of cancer, the resistance and the unwanted side effects are still representing the greatest challenges to this treatment. In order to reduce or overcome the above disadvantages there is a continuous need to synthesize new compounds. Organometallic complexes based on different metals and ligands have already showed anticancer activities. This research investigated the cytotoxic activity of twelve compounds: [(arene)M(phenyl-functionalized pyridyl-1,2,3-triazol-5-ylidene)chlor] (M = iridium, osmium or ruthenium, arene = 1,2,3,4,5-pentamethylcyclopentadienyl or p-cymen) in human cervix carcinoma cell line (HeLa) using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assays. Iridium(III) compound ABB43 showed higher cytotoxicity, even than cisplatin, the widely used cytostatic. ABB43 cytotoxicity was investigated in several other tumor cell lines and normal cell line. Higher cytotoxicity levels in tumor cell lines in regard to normal cell line indicate the potential use of the complex as anticancer drug. It was showen by flow cytometry that ABB43 blocks the S/G2 phase of the cell cycle and induces apoptosis. Specific inhibitors or stimulators of the synthesis of cellular glutathione (GSH) have showed that GSH plays a role in the cell response to stress caused by ABB43 treatment.

(41 pages, 7 figures, 4 tables, 64 references, original in: Croatian)

Key words: organometallic complexes, drug resistance, iridium, glutathione

Supervisor: Dr. Anamaria Brozović, Senior Research Associate

Assistant supervisor: Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Maja Matulić, Assoc. Prof., Dr. Dubravka Hranilović, Assoc. Prof., Dr. Mirna Ćurković Perica, Prof.

Replacement: Dr. Inga Marijanović, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 4th February 2016

ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Anamariji Brozović na prenesenom znanju, potpori, trudu i pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela i savjetima tijekom pisanja diplomskog rada.

Izrazila bih zahvalnost dr.sc. Maji Osmak i suvoditeljici dr.sc. Maji Matulić na kritičkom osvrtu na prijavnicu teme diplomskog rada.

Također sam zahvalna djelatnicima Laboratorija za genotoksične agense na susretljivosti pri snalaženju u novom laboratoriju. Hvala i mojim prijateljima i kolegama Mihaeli, Valentini i Franji.

Te naposljetku, ali ne i manje važno, zahvaljujem svojoj obitelji (roditeljima, sestri, braći, baki, djedu i teti) na pruženoj ljubavi, razumijevanju i financijskoj potpori tijekom studija. Od srca hvala i mom dečku i njegovoj obitelji.

SADRŽAJ

1. UVOD.....1

1.1. Temeljne karakteristike tumora.....1

1.2. Mehanizmi otpornosti tumorskih stanica na kemoterapeutike.....4

1.2.1. Smanjeno nakupljanje citostatika u stanici.....4

1.2.2. Inaktivacija citostatika vezanjem na glutation (GSH).....5

1.2.3. Povećana sposobnost popravka DNA.....6

1.2.4. Smanjena indukcija programirane stanične smrti.....6

1.2.5. Povećana adhezija na izvanstanični matriks putem integrina.....8

1.3. Cisplatina-kemoterapeutik s atomom metala.....9

1.4. Organometalni kompleksi.....11

1.4.1. Organoiridijski(III) kompleksi.....12

1.5. Reaktivne kisikove vrste.....14

2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....17

3. MATERIJALI I METODE.....18

3.1. Materijali.....18

3.2. Određivanje staničnog ciklusa pomoću protočne citometrije.....23

3.3 Određivanje vrste stanične smrti pomoću protočne citometrije.....23

3.4. Određivanje citotoksičnosti organometalnih kompleksa testom MTT.....22

4. REZULTATI.....25

4.1. Citotoksičnost novosintetiziranih spojeva metala i fenil-funkcionaliziranih piridil-triazolilidena.....25

4.2. Antitumorski potencijal kompleksa ABB43.....26

4.3. Kompleks ABB43 zaustavlja stanični ciklus u fazi S/G2 i potiče apoptozu.....27

4.4. Glutation je uključen u obranu stanice od citotoksičnog djelovanja kompleksa ABB43.....29

5.RASPRAVA.....30

6.ZAKLJUČAK.....33

7.LITERATURA.....34

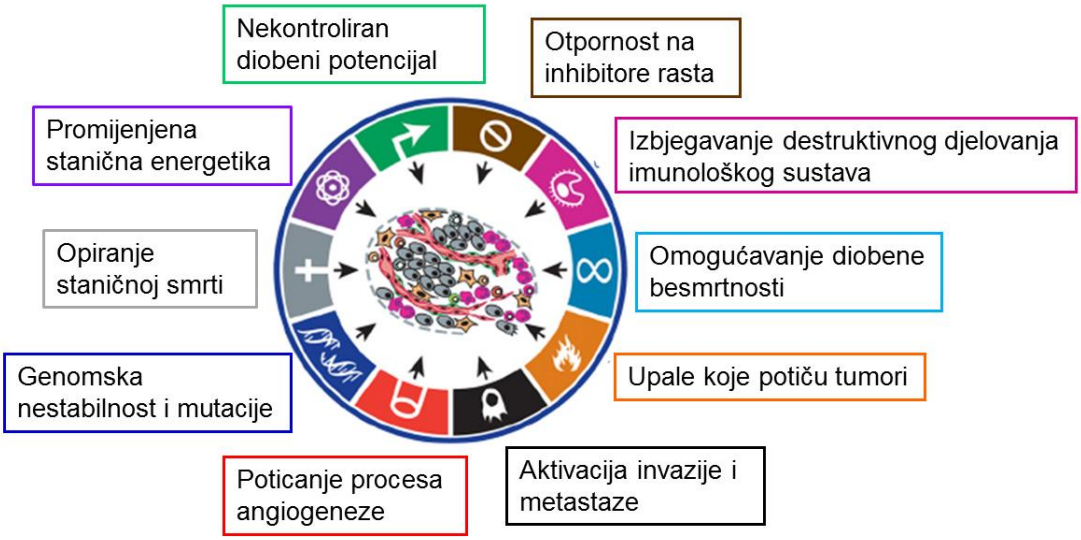
ŽIVOTOPIS.....41

1. UVOD

1.1. Temeljne karakteristike tumora

Tumori ili novotvorevine su nakupine promijenjenih stanica u organizmu za koje je svojstvena nekontrolirana dioba. Maligni, za razliku od benignih tumora, imaju sposobnost širenja stanica tumora iz mjesta nastanka u druge dijelove organizma, što je proces poznat pod nazivom metastaziranje tumora. Spomenuto širenje stanica, naseljavanje i rast u novim nišama ključno je za ometanje normalnog funkcioniranja organa, koje dovodi to smrti bolesnika. Tumori se povezuju s procesom starenja jer duži životni vijek čovjeka povećava vjerojatnost nakupljanja mutacija odgovornih za pokretanje karcinogenog procesa. Tijekom karcinogeneze normalna se stanica transformira u tumorsku kao rezultat staničnih, genetičkih i epigenetičkih promjena koje dovode do nekontrolirane stanične diobe čime nastaje maligna tvorba (Pecorino, 2012).

Mutacije u genima koji igraju važnu ulogu u staničnoj diobi i staničnoj smrti će dovesti do toga da stanica izgubi kontrolu nad staničnom diobom. Uz to, mutacije u genima koji igraju ulogu u stvaranju i grananju novih krvnih žila, održavanju dužine telomera, promjenama u staničnoj energetici, promjenama koje omogućuju otpornost tumorskih stanica na štetno djelovanje stanica imunološkog sustava i promjenama koje omogućuju sposobnost invazije i metastaziranja u nova područja organizma, doprinose rastu, razvoju i širenju tumora (Slika 1) (Hanahan i Weinberg 2011). One mogu nastati djelovanja mutagenih čimbenika koji mogu biti biološke (onkovirusi), fizikalne (UV, gama zračenje) ili kemijske (različiti lijekovi, mutageni spojevi) prirode. Mutageni spojevi mogu djelovati na nekoliko načina: 1) stvaranjem točkastih mutacija u slijedu molekule DNA, primjerice formiranjem kovalentnih veza baza ili oksidiranjem baza, 2) utišavanjem ili aktiviranjem mikroRNA koje kontroliraju ekspresiju mnogih gena te 3) oštećenjima na kromosomskoj razini, primjerice stvaranjem dvolančanih lomova koji uzrokuju inverzije, delecije i translokacije segmenata DNA (Pecorino, 2012).



Slika 1. Karakteristike tumorskih stanica koje ih razlikuju od normalnih stanica, a koje su ciljevi antitumorskih lijekova (preuzeto i prevedeno iz Hanahan i Weinberg 2011).

U aktiviranju karcinogeneze ključne su mutacije kod dvije skupine gena: u onkogenima koji potiču stvaranje tumora te u tumor-supresor genima koji inhibiraju rast i stvaranje tumora. Najčešće, mutacija jednog alela nekog onkogena, koja povećava njegovu ekspresiju i mutacije oba alela nekog tumor-supresor gena, koje utišavaju njegovu ekspresiju ili stvaraju nefunkcionalne proteine, esencijalne su promjene koje vode u nekontroliranu diobu i stvaranje novotvorevina (Pecorino, 2012). Međutim, točkaste mutacije nisu jedine promjene koje aktiviraju karcinogenezu. Poznati su primjeri u kojima amplifikacije ili translokacije onkogena mogu uzrokovati njihovu prekomjernu ekspresiju i stvaranje tumora (Cooper i Hausman 2003). Karcinogenezu mogu pokrenuti i onkomiri, male nekodirajuće molekule mikroRNA koje se vežu za određene komplementarne mRNA i aktiviraju njihovu degradaciju. Degradacijom primarnih transkripata određenih gena, posttranskripcijski utišavaju njihovu ekspresiju. Onkomiri koji imaju protumorski učinak povećavaju ekspresiju, dok onkomiri koji imaju tumorsupresorki učinak utišavaju se u tumorskim stanicama (Esquela-Kerscher i Slack 2006). Konvencionalne terapije tumora u koje svrstavamo kemoterapiju i radioterapiju ciljaju svojstvo brze diobe stanica tumora oštećujući DNA i/ili blokirajući sintezu DNA. One su učinkovite u ciljanju različitih vrsta tumora, i široko se primjenjuju u njegovu liječenju. Nekoliko je glavnih kategorija kemoterapeutika: antimetaboliti, organski lijekovi te alkilirajući spojevi i lijekovi bazirani na platini. Antimetabolički lijekovi su sintetički analozi staničnih molekula (primjerice purina i

pirimidina) koje, inkorporirajući se u rastući lanac DNA, sprječavaju daljnju replikaciju. Isto tako, postoje analozi koji inhibiraju sintezu RNA te tako suprimiraju staničnu diobu. U skupini organskih lijekova najprimjenjivaniji u liječenju tumora su doksorubicin koji se interkalira u DNA sprječavajući proces replikacije, te prirodni alkaloidi vinkristin i vinblastin koji sprječavaju slaganje mikrotubula i taksol koji onemogućava depolimerizaciju mikrotubula. Posljedica njihovog djelovanja je poremećena funkcija diobenog vretena. Primarni mehanizam djelovanja alkilirajućih spojeva i spojeva na bazi platine je stvaranje DNA adukata, što rezultira oštećenjem DNA i pokretanjem stanične smrti (Pecorino 2012). O cisplatini, koordinacijskom metalnom protutumorskom lijeku bit će više riječi u potpoglavlju 1.3.

1.2. Mehanizmi otpornosti tumorskih stanica na kemoterapeutike

Jedan od najvećih problema uspješne kemoterapije je pojava otpornosti tumora na korištene lijekove, a vrlo često i lijekove koji se nisu koristili tijekom terapije (tzv. križna otpornost). Otpornost na citostatike može biti primarna (tzv. urođena) koja je nastala tijekom karcinogeneze ili sekundarna (tzv. stečena) koja se razvija tijekom ili nakon primjene terapije. Mehanizmi otpornosti stanice na citostatike su različiti te mogu uključivati: 1) smanjeno nakupljanje citostatika u stanici zbog smanjenog ulaska i/ili zbog pojačanog izbacivanja citostatika pomoću membranskih pumpi za izbacivanje, 2) smanjeno vezanje citostatika na ciljne molekule koje se može postići: smanjenom metaboličkom aktivacijom citostatika, enzimatskom inaktivacijom citostatika metilacijom, vezanjem na zaštitne molekule u citoplazmi (npr. glutation (GSH)) i povećanom ekspresijom ili mutacijom ciljnih molekula, 3) povećana sposobnost popravka i/ili tolerancije oštećenja molekule DNA, 4) otpornost na indukciju apoptoze te 5) povećana adhezija na izvanstanični matriks putem integrina (Gillet i Gottesman 2010).

1.2.1. Smanjeno nakupljanje citostatika u stanici

ABC (*engl*. ATP-binding cassette) transporteri ili pumpe velika su grupa transmembranskih proteina koji, u ovisnosti o ATP-u, izbacuju različite vrste stranih kemijskih tvari (tzv. ksenobiotika) iz stanice, onemogućavajući na taj način njihovo nakupljanje i potencijalno štetno djelovanje. Povećana im je ekspresija u normalnim stanicama jetre, bubrega, krvno-moždane barijere i placente budući da ti organi imaju u organizmu zadatak obrane od ksenobiotika, te su nužno potrebni za njihovo izbacivanje iz stanica (Leslie i sur. 2005). Unutar C obitelji grupe proteina ABC, nalazi se transporteri MRP (engl. multidrug resistance proteins) koji su uključeni u sprječavanje nakupljanja antitumorskih lijekova i to je osnova za stvaranje otpornosti tumorskih stanica na različite antitumorske lijekove (Sodani 2007). Takav je npr. P-glikoprotein, specifičan za nastanak otpornosti na 5-fluorouracil, aktinomicin D, bisantren, dasatinib, daunorubicin, digoksin, docitaksel, doksorubicin, epirubicin, etopozid, irinotekan, mitoksantron, paklitaksel, tenipozid, topotekan, vinblastin, vinkristin, vindezin i vinorelbin, kao i cMOAT (*engl.* canalicular multispecific organic anion transporter 1) uključen u nastanak otpornosti na karboplatinu, cisplatinu, doksorubicin, epirubicin, etopozid, irinotekan, metotreksat,

mitoksantron, paklitaksel, sakvenivir, SN-38, sulfinpirazon, topotekan, vinblastin i vinkristin (Ween i sur 2015). Transporteri MRP mogu izbacivati slobodne ksenobiotike, konjugate ksenobiotika s glutationom, glukuronatom, sulfatom ili slobodne i neutralne organske spojeve u kotransportu s reduciranim glutationom. Navedeni transporteri su sposobni izbaciti široki spektar kemijskih spojeva različitih struktura i svojstava, a u nekim slučajevima različiti transporteri izbacuju iste ksenobiotike (Sodani 2007).

1.2.2. Inaktivacija citostatika vezanjem na glutation (GSH)

Glutation (GSH) je stanični tripeptid koji tiolnom grupom cisteina reducira toksične reaktivne vrste te obnavlja sulfhidrilne grupe staničnih proteina. Prilikom oksidacije, dvije molekule GSH se spajaju disulfidnom vezom i nastaje oksidirani oblik glutationa (GSSG). GSH je prisutan u animalnim stanicama u visokim koncentracijama, a smanjenje omjera GSH/GSSG indikator je oksidativnog stresa (Lushchak 2012). Enzim glutation reduktaza katalizira regeneraciju reduciranog oblik glutationa pomoću molekule nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH). Povećana razina GSH često je povezana stvaranjem otpornosti na organometalne komplekse (Heffeter i sur. 2008).

Glutation-S-transferaze (GST) pripadaju obitelji detoksifikacijskih proteina faze II koji kataliziraju stvaranje konjugata između staničnih ili unešenih elektrofila i staničnog glutationa. Stvaranjem konjugata inaktiviraju se elektrofili koji u aktivnom obliku oštećuju stanične makramolekule (Townsend i Tew 2003). Iako se konjugacijom sprječava štetno djelovanja elektrofila, oni se ipak izbacuju iz stanica membranskim transporterima MRP1 i MRP2, jer može doći do njihove reaktivacije spontano ili uslijed enzimatske hidrolize (Smitherman i sur. 2004). Još jedna izrazito važna uloga proteina GST klasa *pi* i *mu* je interakcija s kinazama JNK (*engl.* jun nuclear kinase) i ASK1 (*engl*. apoptosis signal regulating kinase 1) uključenih u put MAPK (*engl.* mitogen-activated protein kinase) što u konačnici rezultira inhibicijom apoptoze (Townsend i Tew 2003). Protein iz obitelji GST, GSTP1-1 (*engl.* glutathione S-transferase P1-1) prekomjerno je eksprimiran u većini tumorskim staničnih linija, što korelira s otpornosti tih staničnih linija na antitumorske lijekove (Laborde 2010).

1.2.3. Povećana sposobnost popravka DNA

Sustavi popravka DNA nužni su za prepoznavanje nastalih mutacija i njihovo uklanjanje i stoga je njihova primarna uloga zaštita od stvaranja karcinogenih stanica. Kao što je navedeno u potpoglavlju 1.1. konvencionalna terapija tumora je usmjerena na oštećenje i onemogućavanje replikacije molekule DNA. Takvi učinci uzrokuju zastoj u staničnom ciklusu, a oštećenja pokreću programiranu staničnu smrt (Pecorino 2012). Utvrđeno je da dugoročni tretman ne-malih stanica karcinoma pluća cisplatinom pojačava ekspresiju sustava za popravak DNA. Na taj način tumorske stanice odgovaraju na prekomjerno oštećenje DNA nastalo djelovanjem kemoterapeutika i njihov odgovor predstavlja jedan od mehanizama na kojem se temelji otpornost tumorskih stanica na kemoterapeutike (Oliver i sur. 2010).

1.2.4. Smanjena indukcija programirane stanične smrti

Tumorske stanice, kako bi preživjele povećana oštećenja u DNA i aktivaciju onkogena, moraju razviti način kako spriječiti mogućnost aktivacije programirane stanične smrti. U mnogim vrstama tumora učestala je deletirajuća mutacija tumor supresora p53 koja sprječava pokretanje apoptoze, a koja često razvije tijekom karcinogeneze, prije početka liječenja antitumorskim lijekovima (Pecorino 2012).

Apoptoza je programirana stanična smrt za čiju ranu fazu je karakteristično smanjenje staničnog volumena i kondenzacija kromatina (tzv. piknoza). U kasnijoj fazi svojstvena je fragmentacija jezgre, fragmentacija DNA, odvajanje dijelova stanice okruženih membranom (tzv. apoptotska tjelešca) i naposljetku fagocitoza apoptotskih tjelešca koju vrše makrofagi ili susjedne stanice. Ova vrsta stanične smrti ne uzrokuje upalu, a brza fagocitoza ne ostavlja vremena za sekundarnu nekrozu. S druge strane, pri nekrozi ili tzv. neprogramiranoj staničnoj smrti stanična membrana postaje propusna, a stanični sadržaj izlijeva se u okolinu stanice uzrokujući upalu (Elmore 2007). Pri nekrozi tumorskih stanica, nastali upalni odgovor potiče dodatno okupljanje imunoloških stanica u tumorskom mikrookolišu, koje otpuštanjem faktora rasta potiču daljnji tumorski rast i preživljenje (Grivennikov i sur. 2010).

Signal za pokretanje apoptoze može doći iz staničnog okoliša ili može nastati unutar stanice. Ovisno o lokaciji signala (unutar ili izvan stanice) pokreću se zasebni unutarstanični molekularni putevi, koji nizvodno završavaju aktivacijom proteolitičkih enzima tzv. kaspaza.

Kaspaze su u stanici prisutne u inaktivnom obliku (prokaspaze) koje se aktiviraju samocijepanjem te cijepanjem drugih vrsta kaspaza aktiviraju i pojačavaju početni apototski signal, što u konačnici rezultira degradacijom unutarstaničnih proteina. U mnogim vrstama tumorskih stanica kaspaze su prisutne u aktivnoj formi (Pecorino 2012). Međutim, prekomjerna ekspresija inhibitorne molekule IAP (*engl.* inhibitor of apoptosis protein) suprimira njihovu aktivnost (Hunter i sur. 2007).

Signali koji pokreću vanjski put apoptoze (tzv. receptorski put apoptoze) molekule su poput TNF (*engl.* tumor necrosis factor) koja se veže na receptor TNF te ligand FAS (*engl.* apoptosis stimulating fragment), vezan za membranu druge stanice, koji se veže na receptor FAS (tzv. receptor smrti) (Chicheportiche i sur. 1997). Nakon vezanja signalne molekule na receptor, nastaju konformacijske promjene koje izlažu citoplazmatske domene receptora tzv. domene smrti na koje se vežu adaptorski proteini, kao što su FADD (*engl.* FAS-associated death domain protein) (Wajant 2002) ili TRADD (*engl.* TNF receptor-associated death domain protein) (Hsu, 1995). Spomenuti adaptorski proteini regrutiraju prokaspazu 8 preko zajedničkih efektorskih domena smrti DED (*engl.* death effector domain), i omogućavaju njihovo agregiranje koji vodi do autocijepanja i aktivacije kaspaza 8. Kaspaza 8 svojstvena je za vanjski put apoptoze, a pokreće amplificirajuću aktivaciju nizvodnih efektorskih kaspaza koje cijepaju unutarstanične proteine (Kischkel i sur. 1995). Utvrđeno je da je ekspresija kaspaza 8 genetički ili epigenetički utišana u malim stanicama tumora pluća (Hopkins-Donaldson 2003) i stanicama neuroblastoma (Eggert i sur. 2000), dok su mutacije u genu za receptor FAS pronađene u stanicama melanoma (Ivanov 2003). Spomenute mutacije onemogućuju pokretanje vanjskog puta apoptoze u navedenim tumorima čime oni stječu otpornost na pokretanje programirane stanične smrti (Pecorino 2012).

Signali za pokretanje unutrašnjeg puta (tzv. mitohondrijskog puta) apoptoze mogu biti oštećenja u DNA, koje stanica svojim mehanizmima popravka ne može ukloniti ili neki drugi stanični stres poput hipoksije, deplecije nukleotida, neravnoteže redoks statusa stanice itd. Proteini iz obitelji Bcl-2 (*engl.* B-cell lymphoma 2) imaju središnju ulogu u reguliranju unutrašnjeg puta apoptoze te se s obzirom na svoju funkciju dijele na anti- i pro-apoptotske. Pro-apoptoski proteini aktiviraju apoptozu procesom koji se naziva propusnost vanjske membrane mitohondrija (*engl.* mitohondrial outer membrane permeabilization, MOMP). Inicijalna kaspaza unutarnjeg puta, kaspaza 9, u svom inaktivnom stanju nalazi se u međumembranskom prostoru mitohondrija. Grupa pro-apoptotskih proteina (primjerice Puma, Bad) (Shamas-Din i sur. 2013) aktiviraju drugu skupinu pro-apoptoskih proteina koji stvaraju

poru u vanjskoj membrani mitohondrija pri čemu prokaspaza 9 i citokrom *c* izlaze u citoplazmu. Jednom kad se citokrom *c* otpusti u citoplazmu, on stvara kompleks s Apaf-1 (*engl.* apoptotic protease activating factor 1) koji se naziva apoptosom, koji potom regrutira prokaspaze 9 interakcijama domena CARD (*engl.* caspase activation and recruitment domains) Apaf-1 i prokaspaze 9. Na taj način se molekule prokaspaze 9 grupiraju oko tog kompleksa i cijepanjem se međusobno aktiviraju. Kaspaza 9 je svojstvena za unutrašnji put apoptoze te aktivira nizvodne kaspaze 3, 6 i 7 (Chinnaiyan 1999) (Slika 2). U nekim tumorskim stanicama je primijećena povećana ekspresija antiapoptotskih faktora i smanjena ekspresija pro-apoptskih faktora čime tumor postaje otporan na kemoterapiju, a takva promjenjena ekspresija apoptotskih faktora može postojati i prije upotrebe kemoterapeutika (Pecorino, 2012).

1.2.5. Povećana adhezija na izvanstanični matriks putem integrina

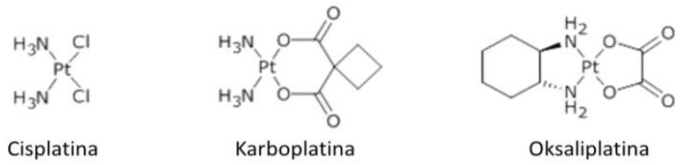
Integrini su obitelj transmembranskih proteina koji se sastoje od kombinacije podvrsta α i β podjedinica, a uloga im je povezivanje različitih komponenata ekstracelularnog matriksa (ECM) i unutarstaničnog citoskeleta. Promjene konformacija ovih heterodimernih receptora mogu biti uzrokovane signalima izvan stanice ili unutar stanice, a ovisno o vrsti primljenog signala izravno i neizravno se mijenja jačina adhezije stanice za izvanstanični matriks. Stanice adhezijama integrina za komponente izvanstaničnog matriksa osiguravaju preživljavanje stanice. Ukoliko se te veze prekinu pokreće se vrsta programirane stanične smrti koja se naziva anoikis (Cooper i Hausman, 2003). Pokazano je da kod tumorskih stanica karcinoma dojke tretiranih citotoksičnim spojevima vezanje integrina za fibronektin i laminin smanjuje indukciju apoptoze. Osim toga, integrini mogu spriječiti pokretanje vanjskog puta apoptoze, što je jedan od načina stvaranja otpornosti na apoptozu induciranu stanicama imunološkog sustava (Aoudjit i Vuori 2012).

1.3. Cisplatina - kemoterapeutik s atomom metala

Cis-diamindikloroplatina (tzv. cisplatina) je spoj baziran na metalu platini koji se već otprilike 40 godina primjenjuje u preko 50% liječenja različitih epitelnih tumora (Lippert 1999) (Slika 2). Mono- i bi- hidrirani oblici cisplatine izraziti su elektrofili koji stvaraju kovalentne veze s purinima između ili unutar lanca DNA te stvaraju veze između DNA i proteina (Siddik, 2003). Adukti DNA i cisplatine ometaju procese replikacije i transkripcije koji vode u stanični zastoj i potencijalno u staničnu smrt (Sedletska i sur.). Hidrirana cisplatina može stvarati kovalentne veze s metioninima i cisteinima staničnih peptida, polipeptida, GSH i metalotioneina (Boulikas i Vougiouka 2003).

Unatoč početnim, dobrim rezultatima u terapiji pacijenata cisplatinom, u tijeku i nakon terapije se najčešće razvija otpornost, što onemogućava daljnje korištenje tog protutumorskog lijeka. Čimbenci koji mogu doprinijeti stjecanju otpornost tumorskih stanica na cisplatinu su: povećanje ekspresije membranskog transportera MRP2 (Cui i sur. 1999), smanjenje ekspresije transportera CTR1 (*engl.* copper transport protein 1) koji unose cisplatinu u stanicu, povećana ekspresija proteina uključenih u mehanizme popravka, onemogućavanje pokretanja stanične smrti te povećana razina staničnog GSH-a i GST (Shen i sur. 2012).

Jedan od najvećih nedostataka cisplatine su brojne popratne pojave: oštećenje bubrega, perifernih živaca, sluha, a također se javljaju probavni problemi, umor mišića i hemoragija (Lippert 1999). Molekularni mehanizam koji uzrokuje oštećenja bubrega i slušnog aparata cisplatinom temeljen je na povećanom stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta (*engl.* reactive oxygen species, ROS) i reakciji s detoksificirajućim enzimima (Karasawa i Steyger 2015). Osim toga, cisplatina se pokazala neučinkovitom za liječenje određenih vrsta tumora kao npr. za tumor debelog crijeva i tumor dojke. U svrhu smanjenja popratnih pojava izazvanih korištenjem cisplatine, a zadržavanja njene efikasnosti u terapiji, sintetizirani su novi spojevi s atomom platine kao npr. karboplatina i oksaliplatina (Slika 2).Ti su spojevi, danas lijekovi, pronašli svoju primjenu bilo kao dodatne opcije u liječenju tumora glave i vrata, ovarija i pluća (karboplatina kao manje citotoksična) (O'Dwyer i sur. 1999) ili se pak primjenjuju kod onih tumora kod kojih cisplatina nije bila uspješna kao npr. kod tumora debelog crijeva (oksaliplatina; vrlo različita kemijska svojstva i djelovanje u stanici u odnosu na cisplatinu) (Slika 2) (De Gramont i sur. 2000).



Slika 2. Kemijske strukture cisplatine, karboplatine i oksaliplatine (Preuzeto iz www.chemgeo.unijena.de)

1.4. Organometalni kompleksi

Potaknuti terapijskim uspjehom cisplatine i u cilju prevladavanja njezinih nedostataka, istraživači modeliraju, a potom sintetiziraju organometalne komplekse koristeći se znanjima o kemijskim svojstvima različitih organskih skupina (liganada) i središnjeg atoma metala (tzv. racionalni dizajn). Organometalni kompleksi se definiraju kao spojevi koji imaju barem jednu kovalentnu vezu između atoma metala i ugljika (Gasser i sur. 2011). Karakterizira ih središnji atoma metala koji je koordinacijskim vezama povezan s organskim ligandima. Koordinacijske veze nastaju doniranjem nepodijeljenog elektronskog para atoma liganda atomu metala. Monodentatni ligandi imaju jedan donorski atom kojim stvara jednu koordinacijsku vezu sa središnjim metalom, dok bidentatni ligandi stvaraju dvije koordinacijske veze s atomom metala (Burdge, 2009).

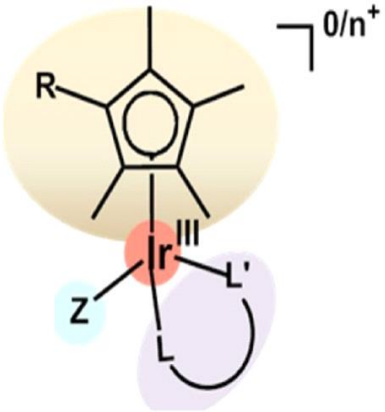
Štetno djelovanje organometalnih kompleksa u stanici može se temeljiti na povezivanju metala kovalentnim ili nekovalentnim vezama za ciljne molekule u stanici (DNA i/ili proteini), svojstvu metala da potiče stvaranje ROS-a u stanici ili biološkim učincima liganda, dok je u tom slučaju uloga metal u povezivanju liganda (Martins i sur. 2014). Odabir liganada utječe na svojstva organometalnih kompleksa: sposobnost izmjenjivanja liganda, katalitička svojstva (npr. stopa hidrolize), redoks svojstva, relativnu lipofilnost, nenabijenost, kinetičku stabilnost. Ta svojstva doprinose protutumorskoj aktivnosti (Gasser i sur. 2011). Isto tako, važno je i oksidacijsko stanje središnjeg metala. Naime, u tumorskom mikrookolišu, pri uvjetima niske razine kisika i niskog pH, atomi metala se reduciraju, što uzrokuje njihovu aktivaciju. Na taj način organometalni kompleksi se selektivno aktiviraju u tumorskom mikrookolišu, dok u zdravom tkivu ostaju u internom oksidativnom stanju (Anilanmert 2012). Brojne kombinacije u kompoziciji organometalnih kompleksa te veliki broj stereoizomera pojedinačnih kompleksa omogućuju istraživačima kreiranje kompleksa čija svojstva su poželjna za različite primjene. Isprva su se organometalni kompleksi koristili samo kao katalizatori, a kasnije se počelo istraživati i njihovo protutumorsko djelovanje. Organometalni kompleksi na bazi brojnih metala, primjerice osmija, iridija, rutenija i rodija, pokazali su protutumorske učinke (Zhao i Lin 2005). Mehanizmi njihovog djelovanja se intenzivno istražuju, a neki kompleksi na bazi rutenija (NAMI-A i KP1019) i galija su već ušli u klinička istraživanja (Martins i sur. 2014).

Mehanizmi djelovanja organometalnog kompleksa na redoks status stanice uključuje izravno produciranje ROS-a, inhibiranje detoksifikacijskih enzima koji neutraliziraju ROS i reguliranje nekoliko signalnih puteva ovisnih o ROS-u. U tumorskim stanicama, povišenjem razine ROS-a dolazi do narušavanja krhke redoks ravnoteže što rezultira staničnom smrti (Jungwirth i sur. 2011).

1.4.1. Organoiridijski(III) kompleksi

U kompleksu Ir(III) formule: [(η^5-Cp*)Ir(C^N)Cl]0/n+, klor (Cl) se lako supstituira s nukleofilnim mjestom, Cp* predstavlja ligand pentametilciklopentadienil koji stabilizira organometalni kompleks i potiče supstituciju liganda Z (iona klora), a bidentatni ligand povezan atomima ugljika i dušika (C^N) za atom iridija, za razliku od neutralnog N^N bidentatnog liganda, pokazuje veću hidrofobnost, što omogućuje lakši ulazak u stanice te jači protutumorski učinak (Slika 3). U literaturi Ir(III) kompleksi su se navodili kao biološki inertni, međutim utvrđeno je da se njihova reaktivnost može povisiti ovisno o vrsti vezanih liganda. Naime, negativno nabijeni C^N bidentatni ligand i pentametilciklopentidienil (bogat elektronima) olakšavaju stvaranje hidrolizirani oblik kompleksa (Ir-H20). Ovaj je spoj reaktivniji od nehidroliziranog koji je zadržao svoju Z grupu ili od Ir-OH oblika. Piridin kao Z ligand je manje sklon hidrolizi pa ostaje dulje biološki inertan što omogućava ulazak u jezgru i interakciju s DNA prije nego li ga citoplazmatski GSH detoksificira. Osim što mogu reagirati s DNA, primijećeno je da kompleksi Ir(III) kataliziraju prenošenje hidrida iz NADH (*engl.* nicotinamide adenine dinucleotide-hydrogen) na molekulu kisika, pri čemu nastaje vodikov peroksid (Liu i sur. 2014). Utvrđeno je da pojedini kompleksi Ir(III) imaju dva mehanizma štetnog djelovanja: a) interakcija s DNA i b) poticanje stvaranja ROS-a u mitohondrijima tumorskih stanica (Novohradsky 2014).

Utvrđeno je da dodatne modifikacije, kao primjerice fenilna ili bifenilna skupina (R skupina) vezana za Cp*, povećavaju antitumorsko djelovanje kompleksa navedene opće formule. Smatra se da spomenute skupine povećavaju hidrofobnost kompleksa, kojom se poboljšava sposobnost ulaska takvog kompleksa u stanice te imaju ulogu u ostvarivanju interakcija sa ciljanim makromolekulama (npr. interkalacijom kompleksa u DNA ili stvaranja DNA adukata) (Liu i Sadler 2014).



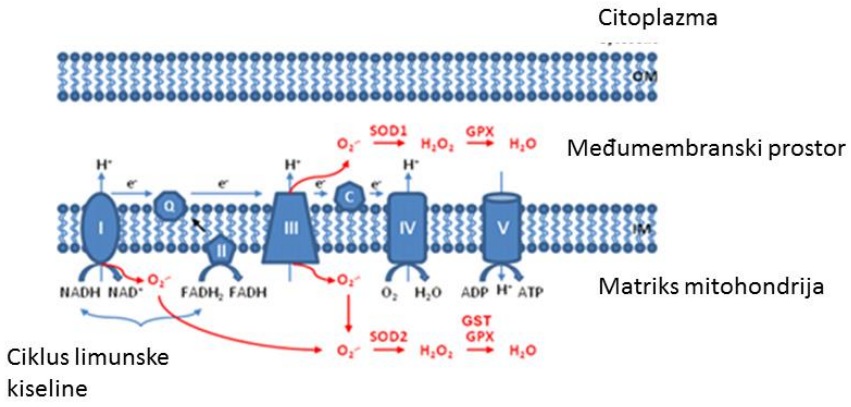
Slika 3. Ir(III) kompleksi opće formule $[(Cp^*)Ir(L^\wedge L')Z]^{0/n+}$. Piridin umjesto atoma klora povećava citotoksičnost, negativno nabijeni C^N (u odnosu na C^C) bidentatni ligand također povećava antitumoska svojstva. R grupe: fenilna i bifenilna skupina povećavaju hidrofobnost (Liu i Sadler 2014).

1.5. Reaktivne kisikove vrste

Brojni novosintetizirani organometalni kompleksi, koji se istražuju u svrhu citotoksičnog učinka na tumorske stanice, potiču stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta čime dolazi do narušavanja labilne redoks ravnoteže stanica i induciranja stanične smrti. Reaktivne kisikove vrste (ROS) su nestabilne i reaktivne kemijske vrste koji imaju nespareni elektron kao hidroksilni anion (OH•) i superoksidni anion (O_2-) te vodikov peroksid (H_2O_2), koji nije radikal, ali svojim raspadom može stvoriti dva izuzetno reaktivna hidroksilna aniona (Pelicano i sur, 2004). Također, postoje reaktivne vrste s dušikom, sumporom i kloridnim ionom. Te vrste čine tek manji udio u ukupnoj količini reaktivnih vrsta koje nastaju u stanici (Sosa i sur. 2013).

U stanici ROS primarno nastaje u dvije reakcije: a) oksidacijom NADPH uz djelovanje enzima NADPH oksidaze (NOX) i b) izlaženja elektrona iz kompleksa I i III transportnog lanca elektrona u mitohondriju. U tim reakcijama molekula kisika se nepotpuno reducira što znači da primi samo jedan elektron i postane superoksidni anion (Slika 4) (Li i sur. 2013). Od ukupne količine kisika koje sudjeluju u transportnom lancu elektrona kao primatelji elektrona, 0.2 do 2% molekula O_2 se na spomenuti način nepotpuno reducira (Madamanchi i Runge 2007).

U mitohondriju se nalaze više vrsta enzima koji detoksificiraju ROS. Superoksid dismutaza 1 (SOD1) u međumembranskom prostoru i superoksid dismutaza 2 (SOD2) u matriksu mitohondrija prevode superoksidni anion u vodikov peroksid, koji se potom reducira do vode djelovanjem enzima glutation peroksidaze (GPx), peroksiredoksina (PRx), katalaze i GST-a (Slika 4) (Li i sur. 2013). U slučajevima kad detoksifikacijski enzimi ne mogu neutralizirati sve nastale vodikove perokside, višak H_2O_2 reagira s ionom Fe^{2+} i pri tom nastanu hidroksilni anioni koji oksidiraju lipide, proteine i DNA. U mitohondriju spomenuta oksidativna oštećena narušavaju procese sinteze ATP-a, ali i druge mitohondrijske metaboličke procese što može potaknuti apoptozu (Schieber i Chandel 2014). Također, prekomjerno oksidativno oštećenje jezgrine DNA i nakupljanje krivo smotanih proteina u endoplazmatskom retikulumu, nakon čega dolazi do izbacivanje Ca^{2+} iona, također su signali za pokretanje unutarnjeg puta apoptoze (Jungwirth i sur. 2011.) Oksidativni stres je povezan sa širokim spektrom bolesti i patoloških stanja poput tumora, neurodegenerativnih, autoimunih, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i s ubrzanim procesom starenja (Ray i sur. 2012).



Slika 4. Mjesto i proces nastanka superoksidnog aniona u mitohondriju i njegova postupna detoksifikacija pomoću detoksifikacijskih enzima. Kratice: SOD1- superoksid dismutaza 1, SOD2- superoksid dismutaza 2, GPX- glutation peroksidaza, GST- glutation-S-transferaza (Preuzeto i prilagođeno prema Li i sur. 2013)

Međutim, važno je napomenuti da ROS nisu isključivo toksični nusprodukti staničnog metabolizma, već i fiziološke signalne molekule koje reguliraju unutarstanične signalne puteve (Schieber i Chandel 2014). Naime, vodikov peroksid oksidativno mijenja cisteinske ostatke proteina, što uzrokuje alosteričke modifikacije proteina i posljedično promjene njihovih funkcija. Na taj se način modulira aktivnost različitih signalnih puteva koji su uključeni u procese diferencijacije, staničnog preživljenja, metabolizma, apoptoze, stanične diobe, protuupalnog odgovora, odgovora na DNA oštećenje i homeostaze željeza (Ray i sur. 2012). Utvrđeno je da se nakon indukcije signalnih puteva faktora rasta EGF (*engl.* epidermal growth factor) (Bae i sur. 1997) i PDGF (*engl*. platelet-derived growth factor) (Sundaresan i sur. 1995) lokalno poveća razina vodikovog perokida, djelovanjem oksidaza NOX (*engl*. NADPH oxidase). PTP1B (*engl.* protein-tyrosine phosphatase 1B) defosforilira tirozine citoplazmatske domene receptora EGF (Adachi i sur. 1996). Vodikov peroksid oksidira fosfataze tirozin kinaznih receptora EGF-a i PDGF-a. Oksidacijom se inaktiviraju fosfataze, što utječe na povišenje razine fosforilacije tirozin kinaznih receptora i posljedično se pojačava aktivnost nizvodnih proteina. Fosfataze mogu povratiti svoju funkciju djelovanjem tioredoksina i inhibirati daljnju aktivnost ovih signalnih puteva (Schieber i Chandel 2014).

Istraživanja su pokazala da je u tumorskim stanicama povećana razina ROS-a u odnosu na normalne stanice. Povišene razine ROS-a nastaju uslijed povećane metaboličke aktivnosti, poremećaja u radu mitohondrija te aktivnosti onkogena i putevima faktora rasta preko aktivnosti enzima NOX. Povišene razine ROS-a su potrebne za rast i razvoj tumora zbog njihove važne uloge u već spomenutom reguliranju staničnih signalnih puteva (Pelicano i sur. 2004, Schieber i Chandel 2014). S druge strane, kako bi se zaštitile od štetnog utjecaja ROS-a, tumorske stanice uobičajeno imaju povišenu ekspresiju detoksifikacijskih enzima (Trachootham i sur. 2009), dok se kisikove vrste potrebne za pojačanje signalnih puteva stvaraju samo lokalno u stanici. Uz to, stanice tumora preusmjeravaju glikolitički put u put pentoza fosfata pri kojem nastaje NADPH, molekula koja služi za regeneriranje GSH potrebnog za detoksifikaciju ROS-a (Sosa i sur. 2013).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je:

a) ispitati potencijalno antitumorsko djelovanje novosintetiziranih kompleksa metala i fenil-funkcionaliziranog piridil-triazolilidena,

b) izdvojiti kompleks zadovoljavajućeg terapeutskog indeksa i analizirati njegov citotoksični učinak i na druge tumorske stanice kako bi se utvrdio razmjer njegovog citotoksičnog djelovanja te analizirati potencijalno protutumorsko djelovanje usporedbom preživljenja različitih tumorskih staničnih linija u odnosu na preživljenje normalne stanične linije i

c) odrediti mehanizam citotoksičnog djelovanja izabranog kompleksa.

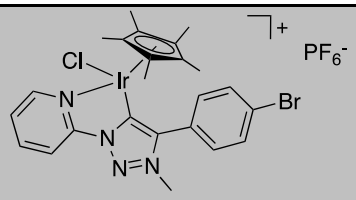
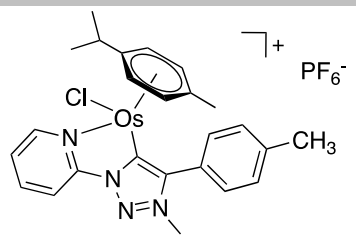
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U sklopu ovog diplomskog rada korištene su sljedeće adherentne stanične linije ljudskog podrijetla: stanice karcinoma vrata maternice (HeLa), ne-male stanice karcinoma pluća (H460), stanice karcinoma grkljana (HEp2) i stanična sublinija HEp2 otporna na karboplatinu (7T), stanice karcinoma dojke (MDA-MB-435), stanice kolorektalnog karcinoma (HCT-116) te keratinociti (stanice kože). Sve stanične linije uzgajane su u mediju DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), s 10% fetalnog goveđeg seruma (FCS). Stanice su rasle u inkubatoru pri 37 °C, u atmosferi određene vlažnosti i mješavine zraka i 5% CO_2. Za održavanje stanica u kulturi, svaka stanična linija je rasađivana dva puta tjedno.

Dvanaest kompleksa metala i fenil-funkcionaliziranih piridil-triazolilidena ispitivani u eksperimentima ovog diplomskog rada (Tablica 1.), sintetizirani su postupkom „klik kemije“ na Fakultetu za kemiju i kemijsku tehnologiju Sveučilišta u Ljubljani pod voditeljstvom prof. dr. sc. Janeza Košmrlja. Kompleksi su otopljeni u dimetil sulfoksidu i čuvani pri -20 °C.

Tablica 1. Oznake i puni kemijski nazivi ispitivanih kompleksa metala i fenil-funkcionaliziranih piridil-triazolilidena.

Oznaka kompleksa	**Struktura i puni kemijski naziv kompleksa**
ABB14	 4-(4-bromofenil)-3-metil-1-(piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazolij kloro(pentametilciklopentadienil)iridij(III) heksafluorofosfat(V)
ABB19	

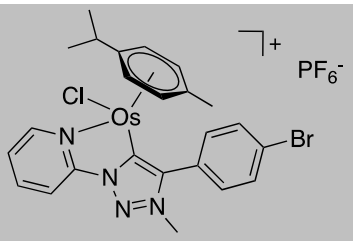
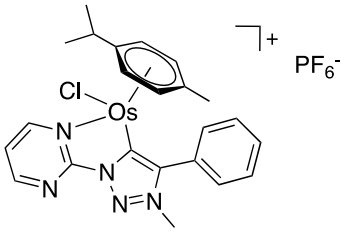
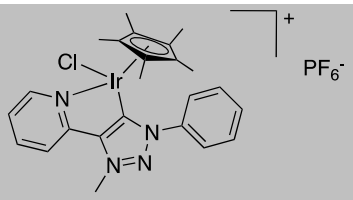
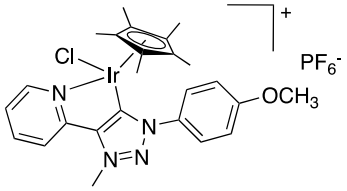
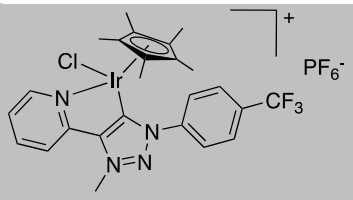
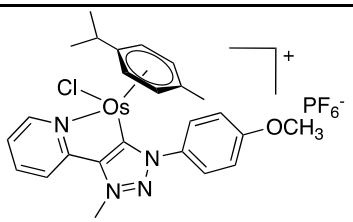
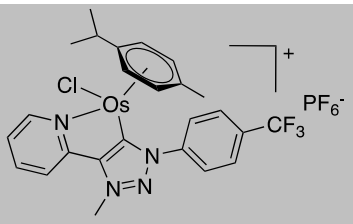
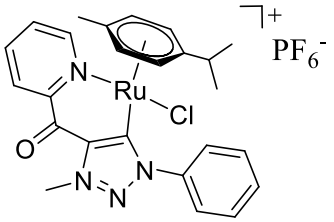
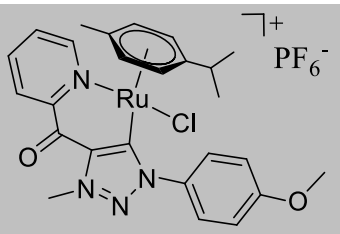
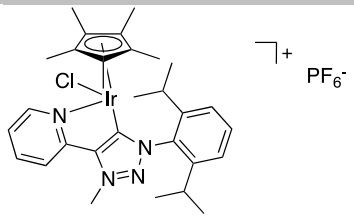
	3-metil-1-(piridin-2-il)-4-(*p*-tolil)-1*H*-1,2,3-triazolij kloro(*p*-cimen)osmij(II) heksafluorofosfat(V)
ABB22	 4-(4-bromofenil)-3-metil-1-(piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazolij kloro(*p*-cimen)osmij(II) heksafluorofosfat(V)
ABB33	 3-metil-4-phenil-1-(pirimidin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazolij kloro(*p*-cimen)osmij(II) heksafluorofosfat(V)
ABB43	 3-metil-1-fenil-4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazolij kloro(pentametilciklopentadienil)iridij(III) heksafluorofosfat(V)
ABB44	 1-(4-metoksifenil)-3-metil-4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazolij kloro(pentametilciklopentadienil)iridij(III) heksafluorofosfat(V)
ABB45	 3-metil-4-(piridin-2-il)-1-(4-(trifluorometil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazolij kloro(pentametilciklopentadienil)iridij(III) heksafluorofosfat(V)

ABB53	 1-(4-metoksifenil)-3-metil-4-(piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazolium kloro(*p*-cimen)osmij(II) heksafluorofosfat(V)
ABB54	 3-metil-4-(piridin-2-il)-1-(4-(trifluorometil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazolij kloro(*p*-cimen)osmij(II) heksafluorofosfat(V)
AB603	 3-metil-1-fenil-4-(pikolinoil)-1*H*-1,2,3-triazolium chloro(*p*-cimen)rutenij(II) heksafluorofosfat(V)
AB604	 1-(4-metoksifenil)-3-metil-4-(pikolinoil)-1*H*-1,2,3-triazolij kloro(*p*-cimen)rutenij(II) heksafluorofosfat(V)
SH590	 1-(2,6-diizopropilfenil)-3-metil-4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazolij kloro(pentametilciklopentadienil)iridij(III) heksafluorofosfat(V)

Tablica 2. Popis kemikalija i plastičnog posuđa s njihovim proizvođačima korištenih u eksperimentalnom dijelu ovog rada.

Naziv	Proizvođač	Naziv	Proizvođač
Tripsin	Invitrogen, SAD	Cisplatina	Sigma-Aldrich, Njemačka
Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (*engl.* Dulbecco's Modified Eagle's medium, DMEM)	Invitrogen, SAD	Propidij jodid	Sigma-Aldrich, Njemačka
Fetalni goveđi serum (*engl*. fetal calf serum, FCS)	Invitrogen, SAD	L- butionin sulfoksimin (BSO)	Sigma-Aldrich, Njemačka
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid (MTT)	Chemicon International Inc., SAD	T-25 i T-75 bočice za uzgoj stanica	Falcon Becton Dickinson, SAD
Dimetilsulfoksid (DMSO)	Kemika, Hrvatska	Plastične epruvete (15 i 50 mL)	Falcon Becton Dickinson, SAD
RNAza A	Sigma-Aldrich, Njemačka	Pločice za uzgoj adherentnih stanica s 96 bunarića	Falcon Becton Dickinson, SAD
N-acetil cistein (NAC)	Sigma-Aldrich, Njemačka	Pločice za uzgoj adherentnih stanica s 96 bunarića	Falcon Becton Dickinson, SAD
FITC-aneksin V	BD Pharmingen, SAD	Pločice za uzgoj adherentnih stanica s 96 bunarića	Falcon Becton Dickinson, SAD

3.2. Određivanje staničnog ciklusa pomoću protočne citometrije

Za određivanje pojedinih faza staničnog ciklusa stanice su nasađene u koncentraciji 5 x 10^5 stanica/10 mL po Petrijevoj zdjelici (10 cm). Nakon 24 sata stanice su ostavljene netretirane ili su tretirane određenom koncentracijom ABB43. Nakon 24, 48 i 72 sati tretmana medij iznad stanica je sakupljen u zasebno označene epruvete. Stanice koje su još bile prihvaćene za podlogu su tripsinizirane, a zatim sakupljene u odgovarajuće epruvete. Nakon centrifugiranja tijekom 5 minuta na 1200 rpm-a, supernatant je dekantiran, a stanice su 2 puta isprane hladnim fosfatnim puferom (PBS-om). Na suhi stanični talog dodano je 200 µL PBS-a u kojem su stanice dobro resuspendirane. Potom, uz lagano vorteksiranje dodano je kap po kap hladnog 95%-nog etanola ukupnog volumena 3 mL. Uzorci su pohranjeni pri -20 °C. Prije provedbe analize uzoraka na protočnom citometru pripremljene su otopine RNAse A (0.1 µg/µL) i propidij jodid (PI) (50 µg/ mL). Uzorci su izvađeni iz zamrzivača (-20 °C) i centrifugirani 5 minuta na 1500 okretaja/min na sobnoj temperaturi. Supernatanti su oprezno dekantirani, a uzorci su ostavljeni 2 minute na ledu. Nakon toga su isprani dva puta PBS-om uz centrifugiranje tijekom 5 minuta na 1200 okretaja/mino. Između svakog centrifugiranja PBS je dekantiran, a talog stanica je ostavljen kratko u ledu. Potom je talog stanica resuspendiran u 200 µL prethodno pripremljene otopine RNAse A, i inkubiran u vodenoj kupelji (37 °C) 20 minuta. Prije mjerenja, suspenziji stanica je uz resuspendiranje dodano 200 µL otopine propidij jodida, a zatim je suspenzija stanica prebačena u epruvete za protočni citometar stavljene u led i u zamračeni prostor do mjerenja. Nakon 30 minuta, uzorci su analizirani na protočnom citometru (FACS Calibur, BD Biosciences, SAD). Dobiveni rezultati analizirani su u programu FCS Express 5 (De Novo Software, SAD).

3.3. Određivanje stanične smrti pomoću protočne citometrije

Kako bismo utvrdili vrstu stanične smrti inducirane kompleksom ABB43 koristili smo metodu bojanja stanica aneksinom V i propidij jodidom čiju smo fluorescenciju mjerili protočnim citometrom. Za određivanje stanične smrti stanice su nasađene u Petrijeve zdjelice (promjera 6 cm) u koncentraciji 1.9 x 10^5/mL po zdjelici. Nakon 24 sata, stanice su tretirane određenim koncentracijama kompleksa ABB43. Kao pozitivna kontrola za staničnu smrt korišten je jednosatni tretman stanica s cisplatinom (100 µM) nakon kojeg su stanice isprane te im je dodano 5 mL DMEM-a. Nakon 72 sata prvo je sakupljen medij iz svake Petrijeve

zdjelice kako bismo skupili i mrtve stanice koje se nalaze u mediju u zasebnu plastičnu epruvetu, a stanice koje su još rasle na podlozi su tripsinizirane i potom sakupljene i izbrojane na brojaču stanica. Stanična suspenzija je centrifugirana 5 minuta na 1200 rpm-a. Nakon uklanjanja supernatanta, stanice su isprane hladnim PBS-om te su ponovno centrifugirane pod istim uvjetima. Nakon uklanjanja PBS-a talog stanica je resuspendiran u PBS-u na način da je svaka stanična suspenzija sadržavala 10^5 stanica koje su zatim prebačene u polistirenske epruvete za protočni citometar. U svaki uzorak je dodano 0.5 mL 1x pufera koji veže aneksin (*engl*. annexin binding buffer, ABB), nakon čega je slijedilo centrifugiranje 10 minuta na 1200 rpm-a i izlijevanje supernatanta. Otopine aneksina V obilježenog s fluorescentnom bojom FITC (BD Pharmingen, SAD) i propidij jodida (50 µg/mL) su pripremljene u mraku. Tretirani uzorci i jedna netretirana kontrola inkubirane su u 100 µL unaprijed pripremljene otopine aneksina (40x razrijeđen) V i PI (5 µg/mL) u 1xABB-a po uzroku. Druga netretirana kontrola je inkubirana samo u 100 µL otopine aneksina V (konačno 40 x razrijeđen), a treća netretirane kontrola samo u 100 µL otopine PI (5 µg/mL), dok je četvrtoj netretiranoj kontroli dodano 100 µL isključivo 1xABB-a. Svi uzorci su inkubirani 15 minuta pri sobnoj temperaturi u mraku. Potom je dodano još po 400 µL 1xABB-a i uzorci su analizirani na protočnom citometru (FACS Calibur, BD Biosciences, SAD).

3. 4. Određivanje citotoksičnosti organometalnih kompleksa testom MTT

Test MTT temelji se na redukciji tetrazolijske boje MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid) u ljubičasto obojani netopljivi formazan (nastaju kristali formazana) djelovanjem staničnog enzima oksidoreduktaze ovisne o NAD(P)H. . Ljubičasto obojenje je indikator sposobnosti metaboliziranja supstrata što je karakteristika živih stanica. Intenzitet obojenja kvantificira se mjerenjem apsorbancije koja korelira s brojem metabolički aktivnih stanica.

Nakon tripsinizacije stanica i resuspendiranja stanica u mediju DMEM s FSC, stanice u staničnoj suspenziji su izbrojane korištenjem brojača stanica (Z™ Series COULTER COUNTER®, Beckman Coulter, UK). U pločice za uzgoj adherentnih stanica s 96 bunarića nasađeno je po bunariću 2.5-3.5 x 10^3 stanica/180 µL (ovisno o vrsti stanica). Samo su keratinociti nasađivani u koncentraciji 4-5 x 10^3 stanica/180 µL. Važno je paziti da se jedan bunarić ostavi prazan kako bi služio za pripremi slijepe probe. Nakon 24 sata stanice su ili prvo predtretirane određenim kompleksima od interesa, a zatim tretirane odabranim

organometalnim kompleksom ili su odmah tretirane organometalnim kompleksima. 72 sata nakon kontinuiranog tretmana, medij u kome su rasle stanice se ukloni iz pločice. U svaki bunarić se doda 40 μL matične otopine MTT konačne koncentracije 0.5 mg/mL u kojoj se stanice inkubiraju narednih 3-4 sata. Kako bi se otopili kristali formazana u svaki bunarić se dodaje 170 μL DMSO, pločica se stavlja na tresilicu (Vibromix 301 EVT, Tehtnica, Slovenija) oko 15 minuta kako bi nastala obojena otopina kristala bila ujednačena i svi kristali otopljeni. Intenzitet obojenja se mjerio spektrofotometrom mikrotitarskih pločica pri valnoj duljini 600 nm (Start fax 2100, Awareness Technology, SAD).

Za određivanje uloge glutationa u odgovoru HeLa stanica na djelovanje kompleksa ABB43, stanice su 16 sati prije tretmana ABB43, predtretirane specifičnim inhibitorom sinteze glutationa, L-butionin sulfoksiminom (BSO; 5 μM). Poznato je da je pri korištenju navedenih uvjeta razina glutationa je gotovo nedetektibilna (neobjavljeni rezultati). 24 sata nakon nasađivanja stanice su tretirane različitim koncentracijama ABB43. Druga pločica s HeLa stanicama je 24 sata nakon nasađivanja predtretirana s prekursorom u sintezi glutationa, N-acetil cisteinom (5 mM). Nakon 2 sata stanice su tretirane različitim koncentracijama ABB43, a nakon 72 sata je izmjerena apsorbancija kao što je prethodno opisano. Eksperimenti su izvedeni barem tri puta u kvadriplikatima. Statistička analiza podataka napravljena je u korištenjem student t-testa.

4. REZULTATI

4.1. Citotoksičnost novosintetiziranih kompleksa metala i fenil-funkcionaliziranih piridil-triazolilidena

U grupi dr.sc. Košmrlja (Sveučilište Ljubljana) sintetizirano je 26 kompleksa metala (iridija, rutenija ili osmija) s fenil-funkcionaliziranim piridil triazolidenom. Novosintetizirani organometalni kompleksi razlikuju se, osim u korištenom metalu, i u dodatnim skupinama vezanim za fenil bidentatnog liganda: trifluorometilnoj grupi ($-CF_3$), metoksi grupi ($-OCH_3$), bromidnoj grupi (-Br), cijano grupi (-CN), nitro grupi ($-NO_2$), dvijema izopropilnim grupama ($-CH(CH_3)_2$), metilnoj grupi (-CH3) i etilnoj grupi ($-CH_2CH_3$) ili nemaju dodatne skupine na fenilu te u vrsti monodentatnog liganda koji je bio 1,2,3,4,5-pentametilciklopentadienil ili *p*-cimen. 12 novosintetiziranih kompleksa nije se moglo otopiti u preporučenim otapalima (H_2O, etanol ili DMSO). Korištenjem metode MTT i HeLa stanica kao eksperimentalnog sustava, ispitana je citotoksičnost 13 kompleksa solubilnih u preporučenim otapalima. Određene su vrijednosti IC_{50} (koncentracija spoja kod koje je preživjelo 50% stanica) pojedinih spojeva, što je prikazano u tablici 3. Rezultati pokazuju da su kompleksi SH590, ABB43 i ABB44 izrazito citotoksični. Nadalje, ABB14, ABB19, ABB22, ABB45, AB603, AB604, ABB33 su umjereno toksični, a ABB53 i ABB54 pokazuju izrazito nisku razinu citotoksičnosti. Da bi se vidjelo je li visoka citotoksičnost novosintetiziranih kompleksa fenomen vezan samo za jednu tumorsku staničnu liniju ili kompleksi imaju potencijal šireg (mogućeg antitumorskog) djelovanja, kompleks ABB43 je izabran za daljnja ispitivanja citotoksičnosti na širem spektru različitih tumorskih i jedne normalne linije stanica.

Tablica 3. Koncentracije metala i fenil-funkcionaliziranih piridil-triazoliliden kompleksa pri kojima je preživjelo 50% (IC_{50} vrijednost) tretiranih HeLa stanicama

Kompleks	**IC_{50} (μM)**	**Kompleks**	**IC_{50} (μM)**
ABB14	28.52 ± 8.56	**ABB45**	45.02 ± 3.07
ABB19	33.01 ± 6.34	**ABB53**	89.41 ± 13.80
ABB22	24.42 ± 5.56	**ABB54**	100.88 ± 11.61

Kompleks	IC_{50} (µM)	Kompleks	IC_{50} (µM)
ABB33	52.81 ± 5.97	**AB603**	42.75 ± 7.07
ABB43	7.33 ± 0.28	**AB604**	35.49 ± 3.30
ABB44	17.52 ± 0.64	**SH590**	2.01 ± 0.28

4.2. Antitumorski potencijal kompleksa ABB43

Mogući antitumorski potencijal novosintetiziranog kompleksa ABB43 ispitivali smo korištenjem metode MTT. Nekoliko različitih vrsta ljudskih tumorskih (HeLa, H460, HCT-166, HEp2, 7T i MDA-MB-435) i jednu normalnu staničnu liniju (keratinocite) (Tablica 4) tretirali s različitim koncentracijama kompleksa ABB43. Rezultati pokazuju da su sve tumorske stanične linije osjetljivije na ABB43 u odnosu na keratinocite što ga čini vrlo interesantnim za daljnja istraživanja. Nadalje, vrijednosti IC_{50} ABB43 kompleksa su vrlo slične za stanice karcinoma dojke (MDA-MB-435), stanice kolorektalnog karcinoma (HCT-116) i ne-male stanice karcinoma pluća (H460). Nešto manju citotoksičnost ABB43 kompleks je pokazao na stanicama karcinoma grkljana (HEp2) i HEp2 staničnoj subliniji otpornoj na karboplatinu (7T) (Tablica 4).

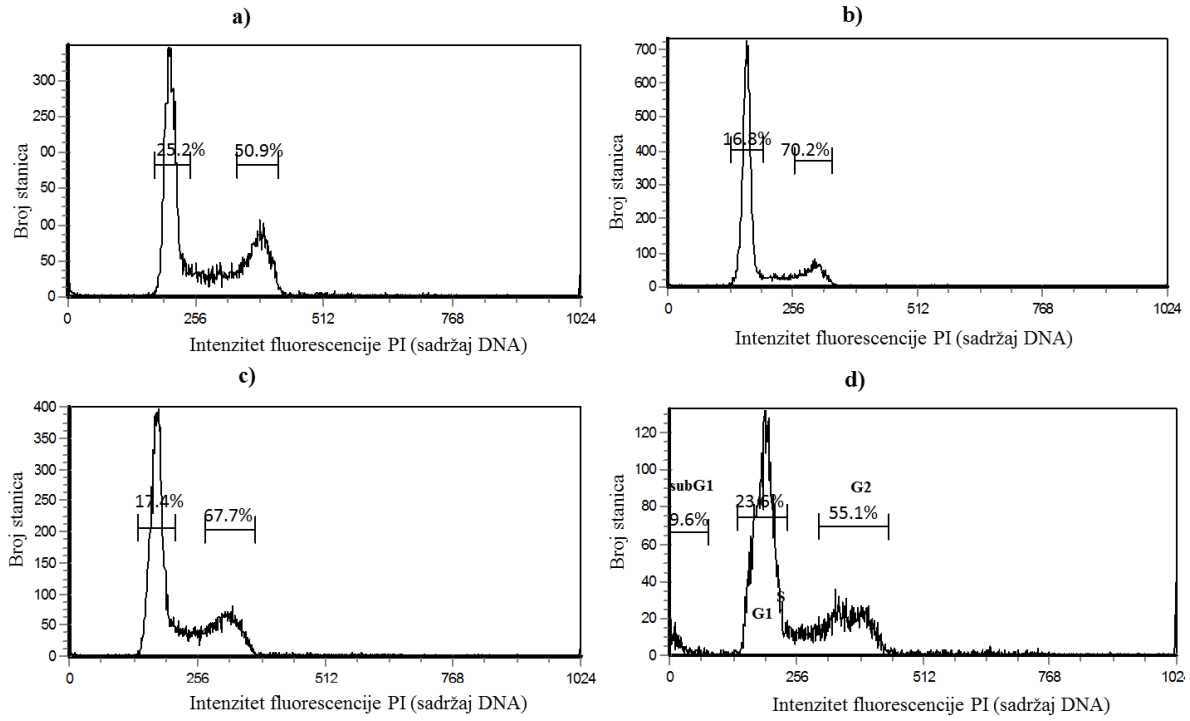
Tablica 4. Koncentracije kompleksa ABB43 pri kojima je preživjelo 50% (IC_{50} vrijednost) različitih vrsta staničnih linija.

Stanične linije	HeLa	H460	HCT-116	HEp2	7T	MDA-MB-435	keratinociti
ABB43 (IC_{50}, µM)	7.3 ± 0.3	5.8 ± 0.24	6.5 ±0.8	13.3 ± 1.2	22.4 ± 0.9	9.8 ± 4.5	>100

4.3. Kompleks ABB43 zaustavlja stanični ciklus u fazi G1/S i potiče apoptozu

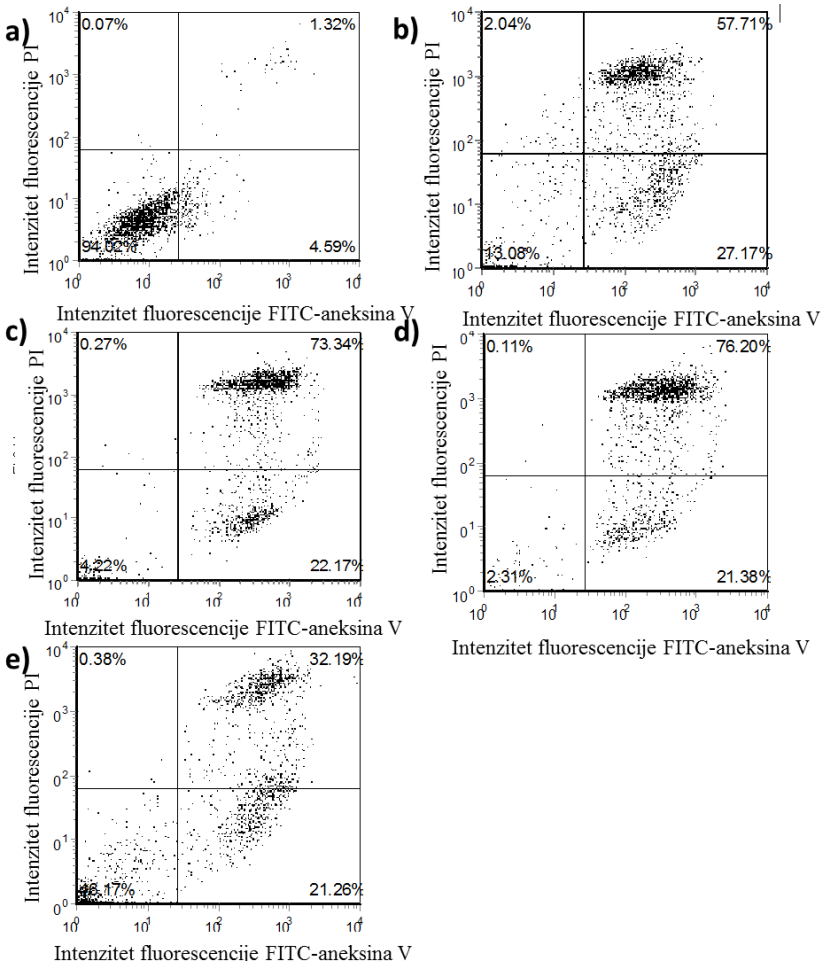
Na temelju dobivenih podataka o citotoksičnosti kompleksa ABB43 i njegovom antitumorskom potencijalu, zanimalo nas je dalje na koji način kompleks ABB43 pokreće proces stanične smrti. Točnije, da li kompleks ABB43 u HeLa stanicama aktivira programiranu staničnu smrt ili se radi o smrti stanice koja nije specifično regulirana aktivacijama točno određenih događaja u stanici. Poznato je da aktivaciji apoptoze prethode promjene staničnog ciklusa. Tijekom staničnog ciklusa, stanica prolazi nekoliko ključnih točaka u kojima se provjerava jesu li ispunjeni svi uvjeti da stanica nastavi dalje kroz stanični ciklus ili je nužan zastoj kako bi došlo do popravka nastalog oštećenja.

Kako bismo utvrdili što se događa nakon djelovanja kompleksa ABB43 pratili smo stanični ciklus. HeLa stanice su tretirane ABB43 kompleksom tijekom 24-72 sata, sakupljene, obojane PI i analizirane korištenjem protočnog citometra. Rezultati pokazuju povećano nakupljanje stanica u S i G2 fazi pri tretmanu ABB43 tijekom 24-72 sata (5 b-d) u usporedbi sa netretiranim stanicama (5 a). ABB43 (5 μM) je zaustavio stanice u fazi S/G2 staničnog ciklusa (Slika 5 b-d) što je nadalje pratilo povećanje broja stanica s vremenom u subG1 frakciji koja predstavlja stanice u apoptozi.



Slika 5. Kompleks ABB43 zaustavlja stanični ciklus fazi S/G2. HeLa stanice su 24 sata nakon nasađivanja bile netretirane (a) ili tretirane s 5 µM ABB43 te sakupljene nakon 24 sata (b), 48 sata (c) i 72 sata (d). Eksperiment je ponovljen tri puta. Prikazan je reprezentativni rezultat.

Da bi se utvrdilo rezultira li nakupljanje stanica u fazi S/G2 staničnog ciklusa nizom reguliranih događaja koji vode u apoptozu ili se radi o nekrozi, HeLa stanice su tretirane različitim koncentracijama kompleksa ABB43 tijekom 72 sata. Rezultati pokazuju da ABB43 potiče apoptozu i da je količina stanica u apoptozi proporcionalna povećanju koncentracije kompleksa (Slika 6 b-d) Stanice tretirane cisplatinom korištene su kao pozitivna kontrola s obzirom da je iz literature poznato da cisplatina inducira apoptozu (Brozović i sur. 2009).

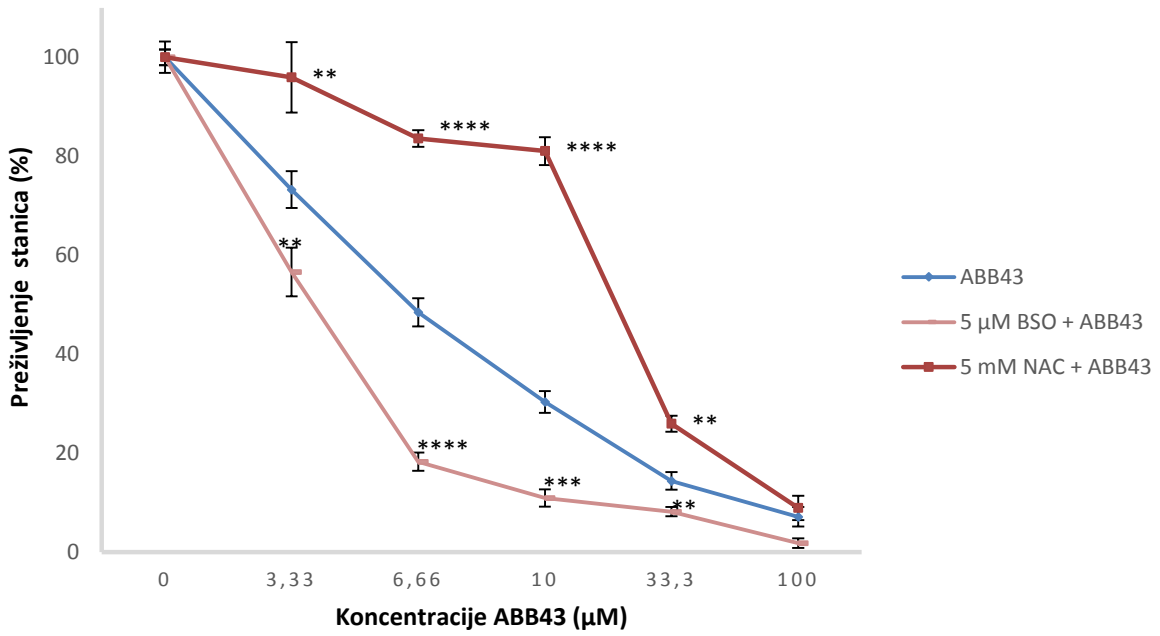


Slika 6. Kompleks ABB43 inducira programiranu staničnu smrt. Stanice HeLa su netretirane (a) ili tretirane s 0.5 µM (b), 5 µM (c), i 50 µM (d) koncentracijom kompleksa ABB43 tijekom 72 sata. Kao pozitivna kontrola za indukciju apoptoze HeLa stanice su tretirane 1 sat

s 100 µM cisplatinom (e). Eksperiment je ponovljen tri puta. Prikazan je reprezentativni rezultat.

4.4. Uloga glutationa u obrani stanica od citotoksičnog djelovanja kompleksa ABB43

Uloga glutationa, ključne molekule u stanici uključene u detoksifikaciju spojeva s metalom i regulaciju redoks statusa stanice, ispitana je korištenjem specifičnog inhibitora sinteze glutationa, L-butionin sulfoksimina (BSO) i specifičnog prekursora u sintezi glutationa, N-acetil cistein (NAC). Za ispitivanje uloge glutationa pri djelovanju ABB43 izabrane su HeLa stanice koje su se pokazale osjetljive na njegov citotoksičan učinak. Mjerenjem preživljenja stanica metodom MTT pokazano je da su stanice s niskom razinom glutationa (stanice koje su predtretirane BSO-om) znatno osjetljivije na djelovanje kompleksa ABB43 u odnosu na stanice koje nisu predtretirane BSO-om (Slika 7). Nadalje, stanice s povećanom razinom glutationa (stanice predtretirane NAC-om) su znatno manje osjetljive na citotoksičan učinak kompleksa ABB43 u odnosu na stanice koje su tretirane samo s ABB43. Ti rezultati ukazuju da glutation igra važnu ulogu u obrani stanice od citotoksičnog djelovanja ABB43 kompleksa.



Slika 7. Preživljenje HeLa stanica nakon tretmana samo s ABB43 (3.33-100 µM) (svijetlo plava krivulja), dodatnog predtretmana L-butionin sulfoksiminom-inhibitorom sinteze glutationa (5 µM, ružičasta krivulja), N-acetil cisteinom-prekursorom u sintezi glutationa (5

mM, crvena krivulja) prije tretmana ABB43 (3.33-100 μM). Legenda: **** P<0.0001, *** P između 0.0001 i 0.001, ** P između 0.001 i 0.01.

5. RASPRAVA

Mehanizam djelovanja organometalnih kompleksa u stanici ovisi o ligandima koji su koordinacijski vezani, vrsti metala i njegovom oksidacijskom stanju. Organometalni kompleksi na bazi metala osmija, iridija, rutenija, zlata, kobalta, željeza i rodija pokazali su protutumorske učinke te se mehanizmi njihovog djelovanja intenzivno istražuju (Martins i sur. 2014).

Triazolilideni su N-heterociklički karbeni u kojima jedan atom ugljika ima dva nesparena elektrona. U literaturi se navodi primjena različitih varijanti triazolilidena kao liganda prijelaznih metala u više katalitičkih reakcija. Njihova poželjna svojstva su bogastvo elektrona, sklonost doniranja elektrona i stvaranje vrlo stabilne veze sa središnjim metalom, tako da se tek manji udio karbena odvaja od kompleksa (Glorius 2007). Njihova uloga u sklopu organometalnih kompleksa kao doprinositelja potencijalnom protutumorskom djelovanju se tek treba ispitati.

Od svih ispitivanih fenil-funkcionaliziranih triazolilidena u sklopu ovog diplomskog rada, SH590 i ABB43 su pokazali najveću razinu citotoksičnosti na stanicama HeLa. Zanimljivo, ova dva kompleksa se strukturno razlikuju samo u dvije izopropilne skupine vezane za fenil kompleksa SH590 (2,6-diizopropilfenil), što upućuje na potencijalnu važnost kemijskih svojstava i bioloških učinka tih skupina na toj poziciji u citotoksičnom djelovanju kompleksa SH590.

U usporedbi s IC_{50} cisplatine koja se učestalo upotrebljava u liječenju tumora (13.3 $\pm$ 2.52 μM) (Hafiza i Latifah 2014), ABB43 (7.33 $\pm$ 0.28 μM) je citotoksičniji za stanice HeLa. Slično je pokazano i usporedbom s drugim Ir(III) spojevima, točnije Ir(III) polipiridin indol kompleksima koji su znatno citotoksičniji za stanice HeLa od cisplatine (Lau i sur. 2009). Međutim, osim što moraju pokazivati klinički relevantnu citotoksičnost za tumorske stanice, organometalni kompleksi koji se istražuju u svrhu potencijalne primjene u liječenju tumora ne smiju pokazivati znatnu toksičnosti za normalne tipove stanica. Kompleks ABB43 je pokazao izrazito mali citotoksični učinak za normalne stanice (IC_{50} > 100 μM) u odnosu na tumorske stanice, pa je izabran za ispitivanje mehanizma citotoksičnog odnosno protutumorskog

djelovanja. U navedenim ispitivanjima su korištene stanice HeLa koje su se pokazale osjetljive na citotoksično učinke ABB43.

Naši rezultati ukazuju da ABB43 zaustavlja stanice u fazi S/G2 staničnog ciklusa i inducira programiranu staničnu smrt (apoptozu) u stanicama HeLa. Iz literature je poznato da kompleks formule: [Os(η(6)-*p*-cimen)(NMe2-fenilazopiridin)I]PF6 zaustavljaju ne-male stanice karcinoma pluća u fazi S staničnog ciklusa i pokreće unutarnji put apoptoze (van Rijt i sur. 2014). Točan mehanizam kojim ABB43 pokreće apoptozu još se mora utvrditi.

Dosadašnja istraživanja organometalnog kompleksa triazenid (p-cimen) Ru(II) kompleksa pokazala su da ne dolazi do značajnih interakcija s dvolančanom DNA. Nadalje, pokazano je da neki od tih kompleksa induciraju stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta te isto tako da je glutation uključen u odgovor stanica na stres izazvan tretmanom stanica organometalnim kompleksima (Brozovic i sur. 2014, Vajs i sur. 2015). Stoga je eksperimentalni dio ovog rada prvo usmjeren na potencijalno toksično djelovanje ABB43 kroz narušavanje redoks ravnoteže stanice. Uloga GSH u odgovoru stanica na djelovanje ABB43 može biti detoksifikacijska i/ili stabilizacija redoks sustava stanice. Inhibitor L-butionin sulfoksimin suprimira djelovanje enzima koji sudjeluje u sintezi GSH, pa se u stanici smanjuje razina GSH (Drew i Miners 1984). Ukoliko GSH ima ulogu u suprimiranju toksičnog djelovanja ABB43, dodatni tretman BSO bi trebao povećati osjetljivost HeLa stanica na štetno djelovanje ABB43 odnosno smanjiti postotak njihovog preživljenja u usporedbi sa HeLa stanicama tretiranima samo kompleksom. Eksperimentalno je utvrđeno (Liu i sur. 2014) da se pri predtretmanu L-BSO-om (5 μM) u kombinaciji s tretmanom Ir(III) kompleksima u odnosu na tretman samo s Ir(III) kompleksima IC_{50} vrijednosti tumorske stanične linije A2780 dvostruko smanjuju . Naši rezultati (Slika 7) potvrđuju teorijska predviđanja i navedene eksperimentalne rezultate (Liu i sur. 2014). Kao dodatnu potvrdu interakcije staničnog GSH s našim kompleksom napravili smo test MTT nakon predtretmana stanica HeLa N-acetilcisteinom (NAC), prekursorom za sintezu staničnog glutationa, koji također može svojom sulfhidrilnom grupom izravno inaktivirati ROS-e. U ovom smo eksperimentu očekivali povećano preživljenje stanica tretiranih NAC-om i ABB43 u odnosu na tretman samo s kompleksom. Yan i suradnici (2013) navode značajno smanjenje citotoksičnosti ispitivanog kompleksa na tumorskim stanicama u kombinaciji s predtretmanom NAC-a odnosno povećano preživljenje stanica što je istovjetno našim rezultatima (Slika 7). Opaženi učinak NAC-a pripisuju stvaranju ROS-a što potkrepljuju i smanjenom aktivnosti signalnih puteva posredovanih kisikovim vrstama u prisutnosti NAC-a i kompleksa u odnosu na njihovu aktivnost kod stanica tretiranih samo

kompleksom. Kako bi se utvrdilo ima li glutation ulogu u detoksifikaciji kompleksa ili stabilizaciji redoks sustava ili su obje uloge zastupljene, potrebno je provesti dodatna istraživanja, primjerice predtretman s antioksidansom (npr. traksolom). Još egzaktnije, analizom stvaranja ROS-a pomoću protočnog citometra mogli bismo utvrditi je li toksičnost našeg kompleksa bazirana na stvaranju ROS-a ili je u pitanju neki drugi mehanizam.

Protutumorska djelovanja kompleksa na bazi rutenija (NAMI-A i KP1019), galija i titanija ispituju se u kliničkim istraživanjima (Martins i sur. 2014). NAMI-A i KP1019 su prošli prvu fazu kliničkog istraživanja i trenutno se ispituju u drugoj fazi (Antonarakis i Emadi 2010). Kompleksi analizirani u ovom radu, ABB43 i SH590, pokazuju citotoksične učinke koji su klinički relevantni. ABB43, osim jake citotoksičnosti pokazuje i selektivnu citotoksičnost prema tumorskim stanicama što je jedan od preduvjeta za daljnja ispitivanja. Iz rezultata ovog rada SH590 i ABB43 se ističu kao potencijalni kandidati za klinička ispitivanja protutumorskog djelovanja. Međutim, da bi stekli taj status, potrebno je provesti daljnje analize mehanizama njihovog djelovanja na tumorske stanice i potencijalne učinke za druge normalne stanice *in vitro* te na životinjskim modelima *in vivo*.

6. ZAKLJUČAK

Od 12 ispitivanih kompleksa metala i fenil-funkcionaliziranog piridil-triazolilidena, kompleksi ABB43 i SH590 su pokazali, korištenjem ljudskih stanica karcinoma vrata maternice, klinički relevantnu citotoksičnost, veću i od one pokazane kod tretiranja široko korištenom cisplatinom. Spoj ABB43 ne pokazuje selektivnu toksičnost za nekoliko različitih vrsta tumorskih stanica (H460, HCT-116 i MDA-MB-435, HEp2) što ukazuje da detektirana toksičnost nije usko vezan za jednu vrstu tumora. Toksični učinak ABB43 kod normalne stanične linije je vrlo mali što je nužna karakteristika da bi se kompleks uopće razmatrao i dalje istraživao u svrhu primjene u liječenju tumora. Ispitivanja ukazuju da ABB43 svojim djelovanjem zaustavlja stanični ciklus u fazi S/G2 i pokreće apoptozu. Ustanovljena je korelacija između razine reduciranog staničnog glutationa (GSH) i stupnja citotoksičnosti ABB43, odnosno što je manje GSH bilo u stanici, to je citotoksičnost našeg spoja bila veća i obrnuto. Iz toga zaključujemo da je GSH uključen u odgovor stanica na stres izazvan tetmanom ABB43 što može biti povezano sa stvaranjem kisikovih reaktivnih vrsta posredstvom ABB43. Iz rezultata ovog rada ABB43 se ističe kao potencijalni kandidat za klinička ispitivanja, međutim potrebna su daljnja istraživanja njegovih mehanizama i učinaka na tumorskim i normalnim stanicama te na modelima eksperimentalnih životinja *in vivo*.

7. LITERATURA

Adachi M., Fischer E. H., Ihle J., Imai K., Jirik F., Neel B., Pawson T., Shen S., Thomas M., Ullrich A., Zhao Z. (1996): Mammalian SH2-containing protein tyrosine phosphatases. Cell **85**: 15.

Anilanmert B. (2012): Therapeutic organometallic compounds. U: Gallelli L. (ur.), Pharmacology. Europe/China, InTech, str. 651-680.

Antonarakis E.S., Emadi A. (2010): Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? Cancer Chemotherapy and Pharmacology **66**: 1-9.

Aoudjit F., Vuori K. (2012): Integrin signaling in cancer cell survival and chemoresistance. Chemotherapy Research and Practice 2012: 283181.

Bae Y. S., Kang S. W., Seo M. S., Baines I. C., Tekle E., Chock P. B., Rhee S. G. (1997): Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. Journal of Biological Chemistry **272**: 217-221.

Brozovic A., Damrot J., Tsaryk R., Helbig L., Nikolova T., Hartig C., Osmak M., Roos W.P., Kaina B., Fritz G. (2009): Cisplatin sensitivity is related to late DNA damage processing and checkpoint control rather than to the early DNA damage response. Mutation Research **670**: 32-41.

Brozovic A., Stojanovic N., Ambriovic Ristov A., Brozovic Krijan A., Polanc S., Osmaka M (2014): 3-Acetyl-bis(2-chloro-4-nitrophenyl)triazene is a potent antitumor agent that induces oxidative stress and independently activates the stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase pathway. Anti-Cancer Drugs **25**: 289-295.

Boulikas T., Vougiouka M. (2003): Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. Oncology Reports **10**: 166316-82.

Burdge J. R. (2009): Chemistry. McGraw-Hill Higher Education, USA.

Chicheportiche Y., Bourdon P. R., Xu H., Hsu Y. M., Scott H., Hession C., Garcia I., Browning J. L. (1997): TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. Journal of Biological Chemistry **272**: 32401-32410.

Chinnaiyan A.M. (1999): The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. Neoplasia**1**: 5-15.

Cooper G. M., Hausman R. E. (2003): The cell: a molecular approach, 3rd edition, Sinauer Associates, Sunderland.

Cui Y., Konig J., Buchholz U., Spring H., Leier I., Keppler D. (1999): Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. Molecular Pharmacology **55**: 929-937.

De Gramont A., Figer A., Seymour M., Homerin M., Hmissi A., Cassidy J., Boni C., Cortes-Funes H., Cervantes A., Freyer G., Papamichael D., Le Bail N., Louvet C., Hendler D., de Braud F., Wilson C., Morvan F., Bonetti A. (2000): Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. Journal of Clinical Oncology **18**: 2938-2947.

Drew R., Miners J. O. (1984): The effects of buthionine sulphoximine (BSO) on glutathione depletion and xenobiotic biotransformation. Biochemical Pharmacology **33**: 2989-2994.

Eggert A., Grotzer M. A., Zuzak T .J., Wiewrodt B. R., Ikegaki N., Brodeur G. M. (2000): Resistance to TRAIL-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. Medical and Pediatric Oncology **35**: 603-607.

Elmore S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic Pathology **35**: 495-516.

Esquela-Kerscher A., Slack F. J. (2006): Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nature Reviews Cancer **6**: 259-69.

Glorius F. (2007): N-Heterocyclic Carbenes in Catalysis-An Introduction. Topics Organometallic Chemistry **21**: 1-20.

Gao P., Zhang H., Dinavahi R., Li F., Xiang Y., Raman V., Bhujwalla Z. M., Felsher D. W., Cheng, L., Pevsner, J., Lee L. A., Semenza G. L., Dang C. V. (2007): HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. Cancer Cell **12**: 230-238.

Gasser G., Ott I., Metzler-Nolte N. (2011): Organometallic anticancer compounds. Journal of Medical Chemistry Perspective **54**: 3-25.

Gillet J. P., Gottesman M. M. (2010): Mechanisms of multidrug resistance in cancer. Methods in Molecular Biology **596**: 47-76.

Grivennikov S. I., Greten F. R., Karin M. (2010): Immunity, inflammation, and cancer. Cell **140**: 883-99.

Hafiza W. A., Latifah S. Y. (2014): Potential implications of GRP58 expression and susceptibility of cervical cancer to cisplatin and thymoquinone-based therapy. OncoTargets and Therapy **7**: 1375-1387.

Hanahan D., Weinberg R. A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. Cell **144**: 646-674.

Heffeter P., Jungwirth U., Jakupec M., Hartinger C., Galanski M., Elbling L., Micksche M., Keppler B., Berger W. (2008): Resistance against novel anticancer metal compounds: differences and similarities. Drug Resistance **11**: 1-16.

Hopkins-Donaldson S., Ziegler A., Kurtz S., Bigosch C., Kandioler D., Ludwig C., Zangemeister-Wittke U., Stahel R. (2003): Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. Cell Death Differentiation **10**: 356-364.

Hsu H., Xiong J., Goeddel D. V. (1995): The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. Cell **81**: 495-504.

Hunter A. M., LaCasse E. C., Korneluk R. G. (2007): The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. Apoptosis **12**: 1543-1568.

Ivanov V. N., Bhoumik A., Ronai Z. (2003): Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. Oncogene **22**: 3152-3161.

Jungwirth U., Kowol C. R., Keppler B. K., Hartinger C. G., Berger W., Heffeter P. (2011): anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes. Antioxidants and Redox Signaling **15**: 1085-1127.

Karasawa T., Steyger P. (2015): An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. Toxicology Letters **237**: 219-27.

Kischkel F. C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P. H., Peter M. E. (1995): Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. The EMBO Journal **14**: 5579–5588.

Laborde E. (2010): Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. Cell Death and Differentiation **17**: 1373-1380.

Lau J. S., Lee P. K., Tsang K. H., Ng C. H., Lam Y. W., Cheng S. H., Lo K. K. (2009): Luminescent cyclometalatediridium(III) polypyridine indole complexes; synthesis, photophysics,electrochemistry, protein-binding properties, cytotoxicity, and cellular uptake. Inorganic Chemistry **48**: 708-718.

Leslie E. M., Deeley R. G., Cole S. P. (2005): Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. Toxicology and Applied Pharmacology **204**: 216-237.

Li X., Fang, P., Mai J., Choi E. T., Wang H., Yang X. (2013): Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. Journal of Hematology and Oncology **6**: 19.

Lippert B. (1999): Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich.

Liu Z., Romero-Canelón I., Qamar B., Hearn J. M., Habtemariam A., Barry, N. P. E., Pizarro A. M., Clarkson G. J., Sadler P. J. (2014): The Potent Oxidant Anticancer Activity of Organoiridium Catalysts. Angewandte Chemie (International Ed. in English) **53**: 3941-3946.

Liu Z., Sadler P. J. (2014): Organoiridium Complexes: Anticancer Agents and Catalysts. Accounts of Chemical Research **47**: 1174-1185.

Lushchak V. I. (2012): Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. Journal of Amino Acids. 26.

Martins P., Marques M., Coito L., Pombeiro A. J., Baptista P. V., Fernandes A. R. (2014): Organometallic compounds in cancer therapy: past lessons and future directions. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry **14**: 1199-1212.

Novohradsky V., Zerzankova L., Stepankova J., Kisova A., Kostrhunova H., Liu Z., Sadler P. J., Kasparkova J., Brabec V. (2014): A dual-targeting, apoptosis-inducing organometallic half-sandwich iridium anticancer complex. Metallomics **6**: 1491-501.

O'Dwyer P. J., Stevenson J. P., Johnson S. W. (1999): Clinical Status of Cisplatin, Carboplatin, and Other Platinum-Based Antitumor Drugs. U: Lippert B. (ur.) Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Zürich, Verlag Helvetica Chimica Acta, str. 31-73.

Oliver T. G., Mercer K. L., Sayles L. C., Burke J. R., Mendus D., Lovejoy K. S., Cheng M. H., Subramanian A., Mu D., Powers S., Crowley D., Bronson R. T., Whittaker C. A., Bhutkar A., Lippard S. J., Golub T., Thomale J., Jacks T., Sweet-Cordero E. A. (2010): Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. Genes & Development **24**: 837-52.

Pecorino L. (2012) Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics, Oxford university press, Oxford.

Pelicano H., Carney D., Huanga P., (2013):ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. Ageing Research Reviews **12**: 376-390.

Ray P. D., Huang B. W., Tsuji Y. (2012): Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. Cell Signal **24**: 981-990.

Schieber M., Chandel N.S. (2014): ROS function in redox signaling and oxidative stress. Current Biology. 24: R453-462

Shamas-Din A., Kale J., Leber B., Andrews, D. W. (2013): Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 5.

Sedletska Y., Giraud-Panis M. J., Malinge J. M. (2005): Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: Importance of apoptotic pathways. Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents **5**: 251-265.

Siddik Z. H. (2003): Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene **22**: 7265-7279.

Smitherman, P. K., Townsend, A. J., Kute, T. E., Morrow, C. S., (2004): Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2) in alkylating agent detoxification: MRP2 potentiates glutathione S-transferase A1-1-mediated resistance to chlorambucil cytotoxicity. J. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. **308**: 260-267.

Sodani K., Patel A., Kathawala R. J., Chen Z. S. (2012): Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. Chinese Journal of Cancer **31**: 58–72.

Sosa V., Moliné T., Somoza R., Paciucci R., Kondoh H., LLeonart M. E. (2013): Oxidative stress and cancer: An overview. Ageing Research Reviews **12**: 376–390.

Sundaresan M., Yu Z., Ferrans V., Irani K., Finkel, T. (1995): Requirement for generation of H2O2 for platelet-derived growth factor signal transduction. Science **270**: 296-299.

Townsend D. M., Tew K. D. (2003): The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. Oncogene **22**: 7369-7375.

Trachootham D., Alexandre J., Huang P. (2009): Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? Nature Reviews Drug Discovery **8**: 579-591.

Vajs J., Steiner I., Brozovic A., Pevec A., Ambriović-Ristov A., Matković M., Piantanida I., Urankar D., Osmak M., Košmrlj J. (2015): The 1,3-diaryltriazenido(p-cymene)ruthenium(II) complexes with a high in vitro anticancer activity. Journal of Inorganic Biochemistry **153**: 42-8.

van Rijt S. H., Romero-Canelón I., Fu Y., Shnyder S. D., Sadler P. J. (2014): Potent organometallic osmium compounds induce mitochondria-mediated apoptosis and S-phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells. Metallomics. **6**: 1014-1022.

Wajant H. (2002): The Fas signaling pathway: more than a paradigm. Science 296: 1635-1636.

Ween M. P., Armstrong M. A., Oehler M. K., Ricciardelli C. (2015): The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. Critical Reviews in Oncology/Hematology **96**: 220-56.

Yan K.-H., Yao C.-J., Hsiao C.-H., Lin K.-H., Lin Y.-W., Wen Y.-C., Liu C. C., Yan M.-D., Chuang S-E., Lai G.-M., Lee L.-M. (2013): Mefloquine exerts anticancer activity in prostate

cancer cells via ROS-mediated modulation of Akt, ERK, JNK and AMPK signaling. Oncology Letters **5**: 1541-1545.

Zhao G., Lin H. (2005): Metal complexes with aromatic N-containing ligands as potential agents in cancer tretment. Current Medicinal Chemistry- Anticancer Agents. **5**: 137-147.

Izvor slike s interneta:

http://www.chemgeo.unijena.de/Institute/Institut+f%C3%BCr+Anorganische+und+Analytische+Chemie/Prof_+W_+Weigand+/Research.htmL

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10.2.1992. godine u Zagrebu. VII. gimnaziju sam završila 2010. godine, a iste godine upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovnom-matematičkom fakultetu u Zagrebu s izvanrednim uspjehom na ispitu biologije državne mature.

Tijekom studija bila sam demonstratorica na kolegiju Zoologija u akademskoj godini 2010./2011. te na kolegiju Evolucijska biologija u akademskoj godini 2014./2015. U manifestaciji „Noć biologije“ sudjelovala sam i kreirala radionice u akademskoj godini 2010./2011. na Zavodu za zoologiju pod naslovom „Čudesni svijet kukaca“, 2011./2012. na Zavodu za mikrobiologiju „Olimpijske bakterije“ te 2014./2015. na Zavodu za molekularnu biologiju „Ne bojte se mraka, već UV zraka“. Laboratorijsku stručnu praksu sam odradila u Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za molekularnu i staničnu biologiju naučivši osnovne molekularno-biološke metode u radu s kvascima. Također sam volontirala na Biološkom odsjeku u Laboratoriju za evolucijsku biologiju tijekom akademske godine 2014./2015. gdje sam naučila i uvježbala izvođenje raznih molekularno-bioloških metoda. Dobitnica sam stipendije za izvrsnost Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2014./2015. Izuzetno sam zainteresirana za područja: molekularna biologija tumora, mehanizmi otpornosti na protutumorske lijekove, epigenetika i evolucija.