



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Маја Б. Ђукић

**СТРУКТУРНА, ТЕОРИЈСКА И БИОЛОШКА
ИСПИТИВАЊА КОМПЛЕКСА
РУТЕНИЈУМА(II) СА ДЕРИВАТИМА
ИМИДАЗОЛА И ИЗОТИАЗОЛА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2021.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Maja B. Đukić

**STRUCTURAL, THEORETICAL AND
BIOLOGICAL INVESTIGATION OF
RUTHENIUM(II) COMPLEXES WITH
IMIDAZOLE AND ISOTHIAZOLE DERIVATIVES**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021.

Аутор
Име и презиме: Маја Ђукић
Датум и место рођења: 22.05.1987., Лесковац
Садашње запослење: Истраживач-сарадник на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: Структурна, теоријска и биолошка испитивања комплекса рутенијума(II) са дериватима имидазола и изотиазола
Број страница: 122
Број слика: 64
Број библиографских података: 221
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Хемија (54) – Неорганска хемија (546)
Ментор: др Зоран Д. Матовић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 23.01.2019.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: Наставно-научно веће Природно-математичког факултета: 870/XIV-2 датум 12.12.2018. године Веће за природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу: IV-01-18/11 датум 23.01.2019. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Др Зоран Д. Матовић, редовни професор, Природно-математички факултет Универзитет у Крагујевцу, Ужа научна област: Неорганска хемија 2. Др Биљана Петровић, ванредни професор, Природно-математички факултет Универзитет у Крагујевцу, Ужа научна област: Неорганска хемија 3. Др Матија Златар, научни сарадник, Институт за хемију, технологију и металургију Универзитет у Београду, Научна област: Хемија
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Др Срећко Трифуновић, редовни професор, председник комисије Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу Ужа научна област: Неорганска хемија 2. Др Бранимир Јованчићевић, редовни професор, члан комисије Хемијски факултет, Универзитет у Београду Ужа научна област: Примењена хемија 3. Др Ратомир Јелић, редовни професор, члан комисије Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу

Ужа научна област: Неорганска хемија

4. Др Матија Златар, виши научни сарадник, члан комисије

Институт за хемију, технологију и металургију, Универзитет у Београду

Ужа научна област: Хемија

5. Др Биљана Глишић, доцент, члан комисије

Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу

Ужа научна област: Неорганска хемија

Датум одбране дисертације:

Посвећено мојим најдражима

сестри, мами и тати

Јанку и Марти

ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација рађена је у Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу (део је пројекта који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Пројекат: III41010)) под менторским руководством др Зорана Д. Матовића, редовног професора, који је и предложио тему за овај рад. Искрено се захваљујем ментору на позиву да постанем део изузетне истраживачке групе, као и на идејама, саветима, указаној помоћи и подршци током писања радова и ове докторске дисертације.

Захваљујем се члановима комисије др Биљани Глишић, др Ратомиру Јелићу, др Срећку Трифуновићу, др Матији Златару и др Бранимиру Јованчићевићу на доприносу који су дали својим сугестијама и саветима приликом писања ове дисертације.

Захваљујем се мојим драгим колегиницама др Светлани Белошевић, др Емини Мркалић, др Марини Ђендић Серафиновић и др Марији Јермић на несебичној помоћи, безрезервној подршци, прелепим тренутцима и незаборавним конференцијама. Част је и привилегија бити ваша колегиница. Такође се захваљујем колегама Игњату Филиповићу и Марку Радовановићу на великој помоћи и подршци.

Велико хвала свим колегама са Института за хемију за незаборавне фестивале, дружења и несебичну помоћ током израде ове докторске дисертације.

Велико хвала мојој баки, уји, сестрама, браћи, родбини и мојим драгим пријатељима на огромној подршци током израде ове дисертације и шире.

Човек у животу може имати многа звања, а моје најлепше звање јесте Јанкова и Мартина тетка. Хвала им за сваки осмех који је у секунди решио сваки проблем и дао ми снагу да насмејана корачам напред ка новој победи.

И на крају бих цитирала величанствену Марију Кири, која каже: „Учили су ме да пут напретка није ни брз ни лак“. Мене су на свим мојим путевима увек пратили и подржавали моји најдражи: сестра, мама и тата. Њима дугујем највећу захвалност уз речи: Хвала вам до неба, хемисфере и много даље! Волим вас вечно и дан дуже!

... и ја ћу једног дана бити исти такав (као ти) хемичар... С.Ђ.

САДРЖАЈ

СКРАЋЕНИЦЕ

СПИСАК СЛИКА

СПИСАК ШЕМА

СПИСАК ТАБЕЛА

ИЗВОД

SUMMARY

1.	ОПШТИ ДЕО	1
1.1	Метали и њихова улога у медицини	2
1.2	О рутенијуму	5
1.3	Антитуморска активност рутенијума(II) комплекса	7
1.4	Имидазоли и изотиазоли као лиганди	9
1.5	Интеракције комплекса платинских метала са дезоксирибонуклеинском киселином	11
1.6	Интеракције комплекса платинских метала са протеинима	14
1.7	Компјутерска хемија	16
1.7.1	Молекулска механика (ММ)	17
1.7.2	Квантна механика (QM)	19
1.7.2.1	Ab-initio	19
1.7.2.2	DFT теорија – Теорија функционала густине	19
1.7.2.3	Семи-емпиријске методе	20
1.7.3	Молекулски докинг	21
2.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	22
2.1	Хемикалије и реагенси	23
2.2	Синтеза изотиазолских лиганада	23
2.3	Синтеза комплекса	23
2.3.1	Добијање $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-трис}(N\text{-метилимидазол})\text{рутенијум(II)}]\text{-дихлорид дихидрат}$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6)	24
2.3.2	Добијање $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-}(N\text{-пропилимидазол})\text{дихлоридо-рутенијум(II)}]$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$ (7)	24

2.3.3	Добијање [(η^6 - <i>p</i> -цимен)-(5-метиламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил]дихлоридорутенијум(II), [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)Cl ₂ (5-MA-3-PyCN-ITZ)]·H ₂ O (8)	24
2.3.4	Добијање [(η^6 - <i>p</i> -цимен)-(5-метиламино)-3-(4-метилпиперазин-1-ил)изотиазол-4-карбонитрил]дихлоридорутенијум(II), [Ru(η^6 - <i>p</i> -цимен)-Cl ₂ (5-MA-4-MPipCN-ITZ)] (9)	25
2.3.5	Добијање [(η^6 - <i>p</i> -цимен)-(5-метиламино)-3-морфолин-4-илизотиазол-4-карбонитрил]дихлоридорутенијум(II), [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)Cl ₂ (5-MA-3-MorphCN-ITZ)] (10)	25
2.3.6	Добијање [(η^6 - <i>p</i> -цимен)-(5-фениламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил]дихлоридорутенијум(II), [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)Cl ₂ (5-PhA-3-PyCN-ITZ)] (11)	26
2.3.7	Добијање [(η^6 - <i>p</i> -цимен)-3-морфолин-4-ил-5-(фениламино)изотиазол-4-карбонитрил]дихлоридорутенијум(II), [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)Cl ₂ (3-Morph-5-PhACN-ITZ)] (12)	26
2.4	Елементална микроанализа	27
2.5	Тачка топљења	27
2.6	Инфрацрвени спектри	27
2.7	Електронски апсорпциони спектри	27
2.8	NMR спектри (¹ H и ¹³ C)	27
2.9	Рендгенске структурне анализе	28
2.9.1	Рендгенска структурна анализа за 5-(метиламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил, 5-MA-3-PyCN-ITZ (1)	28
2.9.2	Рендгенска структурна анализа за 5-(метиламино)-3-(4-метилпиперазин-1-ил)изотиазол-4-карбонитрил, 5-MA-4-MPipCN-ITZ (2) ...	29
2.9.3	Рендгенска структурна анализа за 5-(метиламино)-3-морфолин-4-илизотиазол-4-карбонитрил, 5-MA-3-MorphCN-ITZ (3)	30
2.9.4	Рендгенска структурна анализа за 5-(фениламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил, 5-PhA-3-PyCN-ITZ (4)	31
2.9.5	Рендгенска структурна анализа за 3-морфолин-4-ил-5-(фениламино)изотиазол-4-карбонитрил, 3-Morph-5-PhACN-ITZ (5)	32

2.9.6	Рендгенска структурна анализа за $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6)	33
2.9.7	Рендгенска структурна анализа за $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$ (7)	34
2.9.8	Рендгенска структурна анализа за $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-PyCN-ITZ})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8)	35
2.9.9	Рендгенска структурна анализа за $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-MorphCN-ITZ})]$ (10)	36
2.9.10	Рендгенска структурна анализа за $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$ (11)	37
2.10	Флуоресцентна мерења	38
2.11	Спектрофотометријска мерења	39
2.12	Биолошки тестови	40
2.12.1	МТТ тестови	40
2.12.2	Третман ћелија за детекцију апоптозе	41
2.12.3	Annexin V-FITC/7-AAD и Annexin V-FLUOS (Annexin V-FITC/PI) тест за одређивање апоптозе и некрозе проточном цитометријом	41
2.12.4	Детекција апоптозе акридин-оранж/етиридијум-бромид двоструким бојењем	42
2.12.5	Детекција аутофагије акридин-оранж бојењем	42
2.12.6	Western blot	42
2.12.7	Анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом	43
2.13	Компјутерске методе	43
2.13.1	Квантна механика	43
2.13.2	Молекулски докинг	44
3.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	47
3.1	Синтеза и молекулске структуре синтетисаних једињења	48
3.1.1	Синтеза лиганата и одговарајућих комплекса рутенијума(II)	48
3.1.2	Молекулска структура лиганда 5-(метиламино)-3-пирролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил (5-MA-3-PyCN-ITZ) (1)	50
3.1.3	Молекулска структура лиганда 5-(метиламино)-3-(4-метилпиперазин-1-ил)изотиазол-4-карбонитрил (5-MA-4-MPipCN-ITZ) (2)	51

3.1.4	Молекулска структура лиганда 5-(метиламино)-3-морфолин-4-илизотиазол-4-карбонитрил (5-MA-3-MorphCN-ITZ) (3)	53
3.1.5	Молекулска структура лиганда 5-(фениламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил (5-PhA-3-PyCN-ITZ) (4)	54
3.1.6	Молекулска структура лиганда 3-морфолин-4-ил-5-(фениламино)изотиазол-4-карбонитрил (3-Morph-5-PhACN-ITZ) (5) ...	55
3.1.7	Молекулска структура комплекса $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-tris}(N\text{-метил имидазол)рутенијум(II)}]$ дихлорид дихидрат, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6)	57
3.1.8	Молекулска структура комплекса $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-}(N\text{-пропил имидазол)дихлоридрутенијум(II)}]$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$ (7)	58
3.1.9	Молекулска структура комплекса $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-}(5\text{-метиламино})\text{-}3\text{-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил}]\text{дихлоридрутенијум(II)}$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-PyCN-ITZ})]$ (8)	59
3.1.10	Молекулска структура комплекса $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-}(5\text{-метиламино})\text{-}3\text{-морфолин-4-илизотиазол-4-карбонитрил}]\text{дихлоридрутенијум(II)}$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-MorphCN-ITZ})]$ (10)	61
3.1.11	Молекулска структура комплекса $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-}(5\text{-фениламино})\text{-}3\text{-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил}]\text{дихлоридрутенијум(II)}$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{Cl}_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$ (11)	62
3.2	Спектрална анализа синтетисаних комплекса	63
3.3	Интеракције са ДНК	69
3.3.1	UV-Vis спектроскопија	70
3.3.2	Флуоресцентна спектроскопија	73
3.4	Интеракције са HSA	76
3.4.1	UV-Vis спектроскопија	76
3.4.2	Флуоресцентна спектроскопија	78
3.5	Биолошки тестови – антитуморска активност лиганада и комплекса	81
3.5.1	МТТ тест	81
3.5.2	Ћелијска смрт и њени типови	84

3.5.2.1	Анализа апоптозе као типа ћелијске смрти методом проточне цитометрије уз употребу Annexin-V тестова	85
3.5.2.2	Тест флуоресцентне микроскопије Акридин-оранж/етидијум-бромидом (АО/ЕВ)	87
3.5.2.3	Western blot анализа	88
3.5.2.4	Анализа ћелијског циклуса	89
3.6	Компјутерска хемија	92
3.6.1	Квантна механика (QM)	92
3.6.2	Молекулски докинг	94
4.	ЗАКЉУЧАК	107
5.	ЛИТЕРАТУРА	110
	БИОГРАФИЈА	122
	СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА	

СКРАЋЕНИЦЕ

A-549	Хумани карцином плућа
Å	Ангстрем
ADT	Auto-Dock Tools
AM1	Austin Model 1
АО	Акридин-оранж
GGA	Generalized Gradient Approximation (општа апроксимација градијента)
DMSO	Диметил сулфоксид
DMEM	Дулбеков модификовани игл медијум
ДНК	Дезоксирибонуклеинска киселина
DOX	Доксорубицин
DFT	Density Functional Theory (Теорија функционала густине)
ЕБ	Етидијум-бромид
imid	Имидазол
ind	Индазол
IR	Инфрацрвена спектроскопија
IC ₅₀	Концентрацију једињења која је неопходна за 50% инхибиције <i>in vitro</i>
KP1019	[indH][<i>trans</i> -RuCl ₄ (ind) ₂]
LCAO	Linear Combination of Atomic Orbitals (линеарна комбинација атомских орбитала)
LDA	Local Density Approximation (апроксимација локалне густине)
LSDA	Local Spin Density Approximation (апроксимација локалне спинске густине)
5-MA-3-PyCN-ITZ	5-(метиламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил
5-MA-4-MPipCN-ITZ	5-(метиламино)-3-(4-метилпиперазин-1-ил)изотиазол-4-карбонитрил
5-MA-3-MorphCN-ITZ	5-(метиламино)-3-морфолин-4-илизотиазол-4-карбонитрил
ММ	Молекулска механика

3-Morph-5-PhACN-ITZ	3-морфолин-4-ил-5-(фениламино)изотиазол-4-карбонитрил
MRC-5	Ћелијска линија нормалног хуманог феталног фибробласта плућа
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум бромид
MCF-7	Ћелијска линија хуманог аденокарцинома дојке
NAMI	Na[<i>trans</i> -RuCl ₄ -(DMSO)(imid)]
NAMI-A	[imidH][<i>trans</i> -RuCl ₄ (DMSO)(imid)]
NDDO	Neglect of Diatomic Differential Overlap (занемаривање диатомског диференцијалног преклапања)
NPA	Natural Population Analysis (Природна популациона анализа)
PARP	Поли-(ADP-рибоза) полимераза
PBS	phosphate-buffered saline (фосфатни пуфер)
5-PhA-3-PyCN-ITZ	5-(фениламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил
PM3	Параметријски метод 3
PM6	Параметријски метод 6
PDB	Protein Data Bank (Протеинска банка података)
RAPTA	[Ru(η^6 -арен)(PTA)X ₂], PTA = 1,3,5-триаза-7-фосфаадаммантан
RM1	Recife Model 1
SI	Индекс селективности
TMS	Тетраметилсилан
TSP	Триметилсилил пропанска киселина
UV-Vis	Ултраљубичаста видљива спектроскопија
FBS	Фетални говеђи серум
FITC	Флуоресцеин-изотиоцијанат
HeLa	Ћелијска линија хуманог аденокарцинома грлића материце
HSA	Хумани серум албумина
HT-29	Ћелијска линија хуманог аденокарцинома дебелог црева
HCT-116	Ћелијска линија хуманог аденокарцинома дебелог црева
CSD	The Cambridge Structural Database (база података)
QM	Квантна механика
¹ HNMR	Протонска нуклеарна магнетна резонанца

$^{13}\text{CNMR}$	Угљеник-13 нуклеарна магнетна резонаца
7-AAD	7-аминоактиномицин D
ε	Молски коефицијент апсорптивности ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
λ	Таласна дужина
ν	Таласни број
\hat{H}	Хамилтонијанов оператор
Ψ	Таласна функција
∇	Laplas-ов оператор

СЛИКЕ

Слика 1.	Цисплатина и проналазач њене антитуморске активности - Барнет Розенберг	3
Слика 2.	Структуре комплекса платине(II) са применом у медицини у лечењу туморских обољења	4
Слика 3.	Немачки хемичар Карл Ернест Клаус који је открио рутенијум	6
Слика 4.	Структуре NAMI, NAMI-A и KP1019 комплекса	7
Слика 5.	Структура RAPTA-C	8
Слика 6.	Структура имидазола. Стрелице показују позиције на којима се имидазол може дериватизовати	9
Слика 7.	Структура изотиазола. Стрелице показују позиције на којима се изотиазол може дериватизовати	10
Слика 8.	Приказ ДНК молекула са базама повезаним водоничним везама	11
Слика 9.	Везивање цисплатине за молекул ДНК преко N7 атома два суседна гуанина из истог ланца (интраланчани начин везивања)	12
Слика 10.	Механизам деловања цисплатине	13
Слика 11.	Албумин хуманог серума (HSA)	15
Слика 12.	Приказ функције потенцијалне енергије молекулске механике на примеру дипептида аланил-аланина	17
Слика 13.	Математички приказ укупне енергије једног система у молекулској механици	18
Слика 14.	Шематски приказ поступка испитивања цитотоксичности применом МТТ реагенса	40
Слика 15.	Докинг једињења у случају малих молекула уз употребу GOLD софтвера	45
Слика 16.	Валидација GOLD докинга применом 4KGC као примером	46
Слика 17.	Кристална структура и паковање 5-MA-3-PyCN-ITZ (1) лиганда	50
Слика 18.	Кристална структура и паковање 5-MA-4-PipCN-ITZ (2) лиганда	52
Слика 19.	Кристална структура и паковање 5-MA-3-MorphCN-ITZ (3) лиганда ..	53
Слика 20.	Кристална структура и паковање 5-PhA-3-PyCN-ITZ (4) лиганда	54
Слика 21.	Кристална структура и паковање 3-Morph-5-PhACN-ITZ (5) лиганда .	56

Слика 22.	Кристална структура и паковање $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ комплекса 6	57
Слика 23.	Кристална структура и паковање $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$ (7) комплекса	58
Слика 24.	Кристална структура и паковање $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-PyCN-ITZ})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8) комплекса	59
Слика 25.	Кристална структура и паковање $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-MorphCN-ITZ})]$ (10) комплекса	61
Слика 26.	Кристална структура комплекса $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$ (11) и кристално паковање	62
Слика 27.	Инфрацрвени спектри метил-имидазола (А) и пропил-имидазола (Б) као и одговарајућих комплекса (6) (В) и (7) (Г)	63
Слика 28.	Инфрацрвени спектри комплекса са изотиазолским лигандима $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-PyCN-ITZ})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8) (А), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-4-MPipCN-ITZ})]$ (9) (Б), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-MorphCN-ITZ})]$ (10) (В), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$ (11) (Г), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(3\text{-Morph-5-PhACN-ITZ})]$ (12) (Д) .	64
Слика 29.	Електронски апсорпциони спектри комплекса $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$ (7)	65
Слика 30.	Електронски апсорпциони спектри комплекса $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-PyCN-ITZ})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-4-MPipCN-ITZ})]$ (9) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-MorphCN-ITZ})]$ (10)	65
Слика 31.	Електронски апсорпциони спектри комплекса $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$ (11) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(3\text{-Morph-5-PhACN-ITZ})]$ (12)	66
Слика 32.	^1H и ^{13}C NMR спектри комплекса $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6) (горе) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$ (7) (доле)	67
Слика 33.	^1H и ^{13}C NMR спектри комплекса $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-PyCN-ITZ})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8) (а), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-4-MPipCN-ITZ})]$ (9) (б) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-MorphCN-ITZ})]$ (10) (в)	68

- Слика 34.** ^1H и ^{13}C NMR спектри комплекса $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$ (**11**) (А) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(3\text{-Morph-5-PhACN-ITZ})]$ (**12**) (Б) 69
- Слика 35.** Апсорпциони спектри комплекса **6** а) и **7** б) ($c = 4,0 \cdot 10^{-5}$ М) у одсуству и присуству растуће концентрације ДНК: $[\text{ДНК}]/[\text{комплекс}] = 0,0 - 1,0$ 70
- Слика 36.** Апсорпциони спектри лиганата **1 – 5** и комплекса **8 – 12** у одсуству и присуству растуће количине ДНК: $[\text{ДНК}]/[\text{комплекс}] = 0,0 - 1,0$ 72
- Слика 37.** График зависности $\log(F_0 - F)/F$ од $\log[Q]$ ($T = 296$ К) за комплексе **6** А) и **7** Б); Флуоресцентни спектри емисије ДНК у одсуству (испрекидана линија) и присуству (обојене пуне линије) комплекса **6** В) и **7** Г). На уметнутом дели слике в и г је Стерн-Волмеров график гашења флуоресценције ДНК у присуству комплекса 73
- Слика 38.** График зависности $\log(F_0 - F)/F$ од $\log[Q]$ ($T = 296$ К) за комплексе **6** А) и **7** Б); Флуоресцентни спектри емисије ДНК-ЕБ у одсуству (испрекидана линија) и присуству (обојене пуне линије) комплекса **6** В) и **7** Г). На уметнутом дели слике в и г је Стерн-Волмеров график гашења флуоресценције ДНК у присуству комплекса. 74
- Слика 39.** Флуоресцентни емисиони спектри ($\lambda_{\text{ex}} = 520$ nm) за ЕБ-ДНК у одсуству и присуству лиганата (**1 – 5**) и комплекса (**8 – 12**). Стрелица показује промену интензитета флуоресценције након пораста концентрације испитиваног једињења. На уметнутом делу слике приказани су графици зависности F_0/F од [лиганда или комплекса] 75
- Слика 40.** Апсорпциони спектри албумина хуманог серума са повећањем концентрације лиганата **1 – 5** и комплекса **8 – 12** на собној температури 77
- Слика 41.** Флуоресцентни емисиони спектри HSA у одсуству и присуству различитих концентрација лиганата **1 – 5** и комплекса **8 – 12**. Стрелица показује промену интензитета флуоресценције након пораста концентрације испитиваног једињења. На уметнутом делу слике приказани су графици зависности F_0/F од [лиганда или комплекса] 78

- Слика 42.** График HSA релативног интензитета флуоресценције на $\lambda_{em} = 350$ nm (%) у односу на r ($r = [\text{комплекс}]/[\text{HSA}]$) за лиганде **1 – 3** и њихове одговарајуће комплексе **8 – 10** 79
- Слика 43.** Графици зависности $\log(F_0 - F)/F$ од $\log[Q]$ за лиганде **1 – 5** и њихове одговарајуће комплексе **8 – 12** 80
- Слика 44.** Графички приказ цитотоксичних ефеката лиганада **1 – 3** и комплекса **8 – 10** на A-549, MCF-7, HeLa, HT-29 и MRC-5 ћелијским линијама након 48 h третмана утврђени МТТ тестом. Приказане вредности представљају средње вредности за најмање два независна експеримента 83
- Слика 45.** Цитотоксични ефекат лиганада **4** и **5** и комплекса **11** и **12** на HeLa, HCT 116 и MRC-5, након 24 и 48 h третмана утврђени МТТ тестом. Приказане вредности представљају средње вредности за најмање три независна експеримента 84
- Слика 46.** Анализа проточне цитометрије комплекса **6** и **7** применом Annexin V-FITC/7 ADD теста. Тачке на дијаграму показују проценат вијабилних Annexin V⁻7-AAD⁻ (доњи леви квадрант), рано апоптотичних Annexin V⁻7-AAD⁻ (доњи десни квадрант), касно апоптотичних Annexin V⁺7-AAD⁺ (горњи десни квадрант) и некротичних ћелија Annexin V⁻7-AAD⁺ у нетретираним HeLa ћелијама (контрола) и HeLa ћелијама третираним комплексима **6** и **7** 85
- Слика 47.** Анализа проточне цитометрије комплекса **10** наспрам *cis*-Pt применом Annexin V-FLUOS теста. Тачке на дијаграму показују проценат вијабилних Annexin V⁻7-AAD⁻ (доњи леви квадрант), рано апоптотичних Annexin V⁻7-AAD⁻ (доњи десни квадрант), касно апоптотичних Annexin V⁺7-AAD⁺ (горњи десни квадрант) и некротичних ћелија Annexin V⁻7-AAD⁺ у нетретираним HeLa ћелијама (контрола) и HeLa ћелијама третираним комплексом **10** 86
- Слика 48.** Анализа проточне цитометрије комплекса **11** и **12** применом Annexin V-FITC/7-ADD теста. Тачке на дијаграму показују проценат вијабилних Annexin V⁻7-AAD⁻ (доњи леви квадрант), рано

	апоптотичних Annexin V ⁺ 7-AAD ⁻ (доњи десни квадрант), касно апоптотичних Annexin V ⁺ 7-AAD ⁺ (горњи десни квадрант) и некротичних ћелија Annexin V ⁻ 7-AAD ⁺ у нетретираним НСТ116 ћелијама (контрола) и НСТ-116 ћелијама третираним комплексима 11 и 12	86
Слика 49.	Морфолошке промене HeLa ћелија приписане апоптози. Ћелије су третиране 48 h са IC ₅₀ концентрацијама комплекса 6 и 7 и обојене флуоресцентним бојама, акридин-оранж и етидијум-бромид. Оба комплекса изазивају апоптотске морфолошке промене. Вијабилне ћелије имају зелена језгра са организованом структуром. Ране апоптотичне ћелије су заобљене са јарко зеленом бојом. Касно апоптотичне ћелије имају јарко наранџаста до црвена језгра са кондензованим или фрагментираним хроматином	87
Слика 50.	Експресија апоптотских протеина испитивана Western blot анализом: 1. Контролни узорак; 2. Доксорубицин; 3. Комплекс 6 ; 4. Комплекс 7	88
Слика 51.	Графички приказ дензитометријских података експресије протеина који су добијени Western blot анализом и обрађени помоћу ImageJ http://imagej.nih.gov [216]. Експресија протеина који припадају апоптотичком сигналном путу у узорцима упоређена је са нетретираним узорцима и представљена је као проценат контроле. Дензитометрија експресије актина, који служи као унутрашња контрола, приказана је као мерена: 1. Контролни узорак; 2. Доксорубицин; 3. Комплекс 6 ; 4. Комплекс 7	89
Слика 52.	Анализа ћелијског циклуса. Хистограми представљају дистрибуцију ћелијског циклуса у нетретираним HeLa ћелијама (A) и ћелијама третираним 48 h са комплексима 6 (B) и 7 (B)	90
Слика 53.	Анализа ћелијског циклуса. Хистограми (A) и график (B) који представљају расподелу ћелијског циклуса у третираним HeLa ћелијама кроз различите фазе ћелијског циклуса након 48 h излагања еквитоксичним дозама (концентрације IC ₅₀) тестираног комплекса 10 и дисплатине заједно са контролним узорком	90

Слика 54.	Анализа ћелијског циклуса. Хистограми (А) и график (Б) који представљају расподелу ћелијског циклуса у нетретираним НСТ116 ћелијама (контрола) и ћелијама третираним комплексима 11 и 12	91
Слика 55.	Репрезентативне слике НСТ116 ћелија обојене акридин-оранжом: нетретиране (контрола) и третиране комплексима 11 и 12	92
Слика 56.	DFT оптимизоване структуре комплекса 9 (А) и 12 (Б)	94
Слика 57.	Доминантне конформације $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (А) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-PrIm})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (Б) комплекса везаних за ДНК додекамер; DNA- $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (Б) и DNA- $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-PrIm})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (Г) интеракције	95
Слика 58.	Најбољи конформер (AutoDock) комплекса 8 докованог на ДНК (лево) и главне ДНК-комплекс 8 интеракције (десно)	96
Слика 59.	Најбоља GOLD докинг МОРАС-МОZYМЕ РМ6 оптимизовна ДНК/(аква комплекс 8) структура (А); Преклапање МОРАС-МОZYМЕ РМ6 (зелени атоми) и КМ (g09) оптимизована рутенијум(II) координациона сфера са RMSD=1,051Å (Б)	99
Слика 60.	а) HSA са докованим реактивним врстама комплекса 8 и оријентације унетих конформација у простору Па шупљине за б) $[\text{Ru}(p\text{-сумене})\text{LCiH}]$ в) $[\text{Ru}(p\text{-сумене})\text{Cl}_2\text{H}]$ г) комплекс 8 д) $[\text{Ru}(p\text{-сумене})\text{LH}_2]$ и њ) $[\text{Ru}(p\text{-сумене})\text{H}_2]$	101
Слика 61.	Потенцијални ковалентно везани остаци унутар шупљине на домену Па HSA са докованим структурама реактивних врста комплекса 8 а) $[\text{Ru}(p\text{-сумене})\text{Cl}_2\text{L}]$ б) $[\text{Ru}(p\text{-сумене})\text{Cl}_2\text{H}]$ и в) $[\text{Ru}(p\text{-сумене})\text{LCiH}]$; г) GOLD модел Ru-H-O(GLU292) интеракција преко водоничне везе у случају врсте $[\text{Ru}(p\text{-сумене})\text{LCiH}]$	102
Слика 62.	Валидација AutoDock и AutoDock Vina везе са различитим ДНК (протеин) структурама као пример	103
Слика 63.	Најбољи погодак (AutoDock) хидролизованог комплекса (11) везаног за ДНК (лево) и основне ДНК-комплекс (11) интеракције (десно)	103
Слика 64.	ДНК-Лиганд интеракције везивања лиганда у главном жлебу	104

ШЕМЕ

Шема 1.	Синтеза комплекса 6 са метил-имидазолом (А) и 7 са пропил-имидазолом (Б)	48
Шема 2.	Синтеза лиганата изотиазолског типа	49
Шема 3.	Синтеза комплекса 8, 9 и 10 са метил-изотиазолским лигандима	49
Шема 4.	Синтеза комплекса 11 и 12 са фенил-изотиазолским лигандима	50
Шема 5.	Реакције хидролизе рутенијум(II) комплекса као и њихове реакције са аминокиселинама и нуклеинским базама укљученим у везивање са HSA и ДНК	97

ТАБЕЛЕ

Табела 1.	Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре 5-МА-3-РyCN-ITZ лиганда 1	28
Табела 2.	Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре 5-МА-4-MPipCN-ITZ лиганда 2	29
Табела 3.	Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре 5-МА-3-MorphCN-ITZ лиганда 3	30
Табела 4.	Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре 5-PhA-3-РyCN-ITZ лиганда 4	31
Табела 5.	Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре 3-Morph-5-PhACN-ITZ лиганда 5	32
Табела 6.	Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сyмене})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ комплекса 6	33
Табела 7.	Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сyмене})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$ комплекса 7	34
Табела 8.	Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сyмене})\text{Cl}_2(5\text{-МА-3-РyCN-ITZ})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ комплекса 8	35
Табела 9.	Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сyмене})\text{Cl}_2(5\text{-МА-3-MorphCN-ITZ})]$ комплекса 10	36
Табела 10.	Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сyмене})\text{Cl}_2(5\text{-PhA-3-РyCN-ITZ})]$ комплекса 11 ...	37
Табела 11.	Дужине, углови веза и торзиони углови за 5-МА-3-РyCN-ITZ (1)	51
Табела 12.	Параметри водоничних веза за лиганде 1, 2 и 3	51
Табела 13.	Дужине, углови веза и торзиони углови за 5-МА-4-MPipCN-ITZ (2)	52
Табела 14.	Дужине, углови веза и торзиони углови за 5-МА-3-MorphCN-ITZ (3)	53
Табела 15.	Дужине, углови веза и торзиони углови за 5-PhA-3-РyCN-ITZ (4)	55
Табела 16.	Параметри водоничних веза за лиганде 4 и 5	55
Табела 17.	Дужине, углови веза и торзиони углови за 3-Morph-5-PhACN-ITZ (5)	56
Табела 18.	Дужине веза и одабрани углови између веза за комплекс 6	57

Табела 19.	Дужине веза и избрани углови веза за комплекс 7	58
Табела 20.	Дужине веза, углови веза и торзиони углови за комплекс 8	60
Табела 21.	Параметри водоничних веза за комплексе 8 и 10	60
Табела 22.	Дужина веза, углови веза и торзиони углови за комплекс 10	61
Табела 23.	Дужина веза, углови веза и торзиони углови за комплекс 11	63
Табела 24.	Стерн-Волмерове константе (K_{sv}), константе везивања ДНК (K_b) и број везивних места (n) за комплексе 6 и 7	70
Табела 25.	Константе везивања испитиваних једињења за ДНК (K_b) израчунате из UV спектра и Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) и константе гашења (K_q) израчунате на основу флуорометријских спектра	71
Табела 26.	Стерн-Волмерове константе, константе гашења и параметри везивања (K_{sv} , K_q , K , n) HSA за лиганде 1 – 5 и комплексе 8 – 12	81
Табела 27.	IC ₅₀ вредности (μ M) тестираних лиганада и комплекса у односу на референтна једињења (<i>cis</i> -Pt и DOX)	82
Табела 28.	Поређење X-ray и DFT дужина веза [\AA] за комплексе 8 , 10 и 11	92
Табела 29.	ДНК-лиганд афинитети везивања (Vina) и везујуће слободне енергије (AutoDock) рутенијум(II) комплекса	95
Табела 30.	Резултати докинга $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{X}_2(\text{L})]$ (X= Cl или H ₂ O) и различитих лиганада за ДНК	96
Табела 31.	Резултати GOLD докинга за комплекс 8 и реактивне врсте са ДНК ...	98
Табела 32.	Резултати докинга (GOLD) за реактивне врсте комплекса 8 унутар HSA молекула	100
Табела 33.	Резултати докинга лиганда фенил-изотиазолског типа и одговарајућих комплекса са ДНК	102
Табела 34.	Главне интеракције лиганада и комплекса везане за ДНК макромолекуле	105

ИЗВОД

У оквиру ове докторске дисертације синтетисани су и окарактерисани комплекси рутенијума(II) са имидазолима ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$) и изотиазолима ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-PyCN-ITZ})]$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-4-MPipCN-ITZ})]$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-MorphCN-ITZ})]$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(3\text{-Morph-5-PhACN-ITZ})]$) као лигандима. Карактеризација новосинтетисаних једињења извршена је применом савремених спектроскопских метода анализе (^1H и ^{13}C NMR, IR и UV-Vis), као и стандардним методама (елементална микроанализа и тачка топљења). Рендгенском структурном анализом потврђене су структуре комплекса, као и изотиазолових лиганата 5-MA-3-PyCN-ITZ, 5-MA-4-MPipCN-ITZ, 5-MA-3-MorphCN-ITZ, 5-PhA-3-PyCN-ITZ и 3-Morph-5-PhACN-ITZ.

Снимањем емисионих флуоресцентних и апсорпционих спектра испитиване су интеракције лиганата и комплекса са ДНК који је изолован из грудне жлезде телета (СТ-DNA) и са албумином хуманог серума (HSA). Циљ испитивања интеракција са биолошким макромолекулима се огледа у одређивању могућих начина везивања и константи везивања. Након испитивања, потврђено је да се интеракција одвија преко статичког механизма гашења.

Применом МТТ теста цитотоксичности, као и метода за детекцију апоптозе и аутофагије, испитивана је *in vitro* биолошка активност лиганата и комплекса. Комплекс $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ показује највећу цитотоксичност, а најсензитивнија је HeLa ћелијска линија. Вестерн блот анализа и проточна цитометрија указују на апоптозу као примаран начин ћелијске смрти. Посматрајући ћелијски циклус, у S фази уочава се сличност у механизму деловања комплекса рутенијума(II) са агенсима из платинске групе метала.

Теоријска испитивања лиганата и комплекса су одрађена применом савремених метода компјутерске хемије. Структурне карактеристике комплекса (везе, углови и торзиони углови) који су оптимизовани применом теоријских модела B3LYP/def2-TZVP, B3LYP/SDD и M06 у комбинацији са SDD базним сетом, у складу су са експерименталним подацима добијеним рендгенском структурном анализом. Компјутерска молекулска симулација – докинг, је коришћена за испитивање интеракција између лиганата и комплекса са биолошким макромолекулима ДНК и HSA. Моделирање и симулација је базирана на аква врстама новосинтетисаних комплекса рутенијума(II), јер су хлоро комплекси слично цисплатини, мање реактивни. Докинг лиганата и комплекса чије су структуре одређене рендгенском структурном анализом, испитан је коришћењем AutoDock, AutoDock Vina и Gold софтвера. Уочено је слагање предвиђених и експерименталних резултата. Најбоље везана конформациона врста $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{L}(\text{H}_2\text{O})\text{H}]^{2+}$ је проверена применом МОРАС методе РМ6-MOZYME, при чему је потврђена ковалентна веза између рутенијума(II) и N(7) који потиче од dG7 нуклеотида. Интеракције између ДНК и лиганата или комплекса су утврђене помоћу Discovery Studio Visualizer, при чему су сва испитивана једињења у енергетски најповољнијој конформацији показала интеракције са DT5 из А ланца и DC18 из Б ланца ДНК. Коришћењем GOLD софтверског пакета, проучавано је

везивање лиганда и комплекса за HSA. Доковање је извршено на сваком активном месту HSA, а резултати указују да је глутамин-292 уобичајно место везивања у асоцијативном механизму везивања протеина.

SUMMARY

Within this PhD dissertation new complex compounds of ruthenium(II) were synthesized and characterized. Complexes contain coordinated imidazole type ligands ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$) or isothiazole type ligands ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-PyCN-ITZ})]$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-4-MpipCN-ITZ})]$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-MorphCN-ITZ})]$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$ and $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(3\text{-Morph-5-PhACN-ITZ})]$). Modern spectroscopic analytic methods (^1H NMR, ^{13}C NMR, IR and UV-Vis) and standard methods (elemental analysis and melting point) were employed in characterization of novel compounds. X-ray structural analysis was used to confirm structures of complexes and isolated ligands.

Fluorescent emission spectroscopy and absorption spectroscopy were utilized in examination of interactions of both ligands and complexes with calf thymus DNA (CT-DNA) and with human serum albumin (HSA). The purpose of looking into interactions with biological macromolecules is determining possible binding modes and binding constants. It was found that interactions happen via static quenching mechanism.

MTT cytotoxicity test and method for apoptosis and autophagy detection were used to examine *in vitro* biological activity of novel compounds. Complex $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ shows the highest cytotoxicity and the most sensitive was HeLa cell line. Western blot and flow cytometry analysis both point towards apoptosis as primary cell death mechanism. During observations of cell cycle in the S phase similarity was noticed between acting of ruthenium(II) complexes and acting of complexes that contain elements from platinum group of metals.

For theoretical examination of ligands and complexes, modern computational chemistry methods were applied. Structural properties of complexes (bonds, angles and torsions), which were optimized with theoretical models B3LYP/def2-TZVP, B3LYP/SDD and M06 in combination with SDD basis set, are in agreement with experimentally determined data gained through X-ray structural analysis. Molecular simulation – docking, was utilized for examination of interactions of ligands and complexes with DNA and HSA. Modelling and simulation were based on aqua species of novel ruthenium(II) complexes, because chloro complexes are less reactive, similar to the behavior of cisplatin. For the docking of ligands and complexes programs AutoDock, AutoDock Vina, and GOLD were used. Conformation of $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{L}(\text{H}_2\text{O})\text{H}]^{2+}$ species that showed the highest binding score was validated using MOPAC method PM6-MOZYME and it was determined that covalent bonding between ruthenium(II) and N(7) atom of dG7 nucleotide may occur. Program Discovery Studio Visualizer was used to visualize and inspect possible interactions and it was noted that in the most energetically favorable conformation interactions that form are with DT5 from A chain and DC18 from B chain of DNA. Program GOLD was used to study interactions of novel compounds with HSA molecule. Docking experiments were repeated for every possible binding place on the target molecule and results point to glutamine-292 as most probable binding residue in associative protein binding mechanism.

1. ОПШТИ ДЕО

1.1 Метали и њихова улога у медицини

Метали имају веома важну улогу у живим системима јер учествују у многобројним биолошким процесима. На пример, гвожђе, као саставни део молекула хемоглобина, учествује у транспорту кисеоника; цинк улази у састав многих ензима, а једна од многобројних улога му је и утицај на рад имунолошког система. Поред улоге у биолошким процесима, метали показују и лековита својства примењена чак неколико хиљада година пре нове ере. Медицинска неорганска хемија се користи готово 5000 година [1, 2]. Још 3500 година пре нове ере злато је коришћено у разним лековима у Арабији и Кини. Једињења гвожђа су се користила за лечење анемије, а његов оксид (рђа) као лек за импотенцију. 3000 година пре нове ере Египћани су користили бакар за стерилизацију воде, а 1500 година пре нове ере откривена су делотворна својства цинка у процесу зарастања рана. Многобројна једињења сребра примењивала су се за лечење инфекција, а арсенова једињења за лечење сифилиса. У доба ренесансе у Европи жива(II)хлорид се користио као диуретик [3].

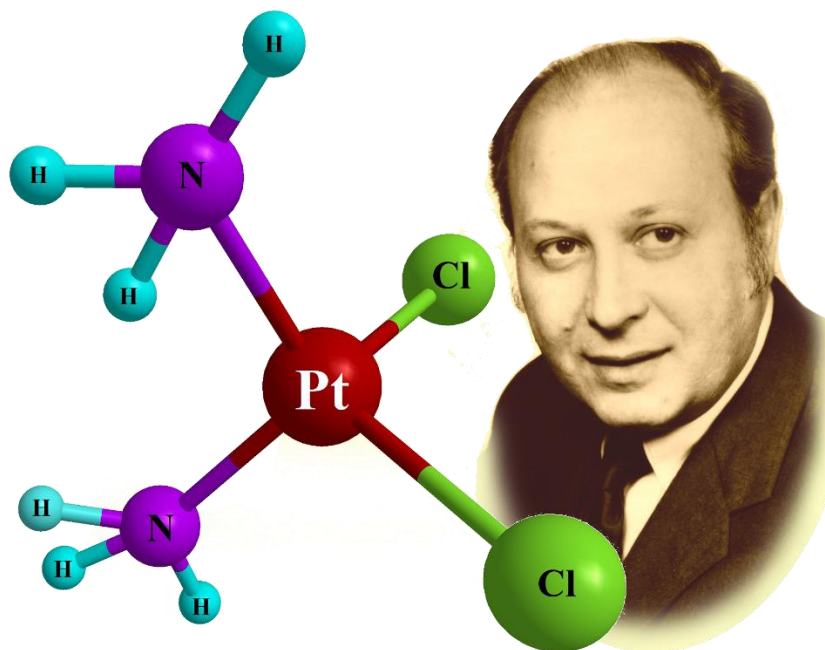
Поред позитивне стране примене метала у медицини, јавља се и она негативна – њихова висока токсичност, што доводи до питања: „Да ли их уопште треба примењивати у медицини“? Како је велики број био-есенцијалних метала присутних у организмима сисара, неопходан за нормално функционисање организама, док одступање од очекиваних концентрација истих, доводи до разних болести. Тако долазимо до закључка да је потребно успоставити равнотежу између терапијске користи са једне и штетних ефеката са друге стране.

Крајем прошлог века па све до данас, та равнотежа је и те како померена ка примени метала за лечење различитих врста болести. Широка је спектар примене једињења метала, а само неки од њих су: примена једињења бакра у лечењу Вилсонове болести [4], једињења цинка у лечењу херпеса [5], једињења волфрама код пацијената оболелих од сиде [6] и једињења злата у лечењу реуматоидног артритиса [7]. За успостављање равнотеже у организму користе се дијететски суплементи на бази калцијума, селена и мангана. Поред примене горе наведених једињења метала у лечењу, веома је важно споменути и њихову битну улогу у дијагностици где се користе као контраст реагенси, па се тако комплекси гвожђа(II), мангана(II) и гадолинијума(III) користе у спектроскопији магнетном резонансом [8], док се једињења на бази радиоактивних изотопа ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{57}Co , ^{67}Ga , ^{97}Ru и ^{103}Ru детектују у γ -сцинтилационим камерама [9].

Права експанзија у примени једињења метала за лечење великог броја болести догодила се након открића цисплатине 1968. године од стране америчког хемичара Барнета Розенберга (Barnett Rosenberg) [10].

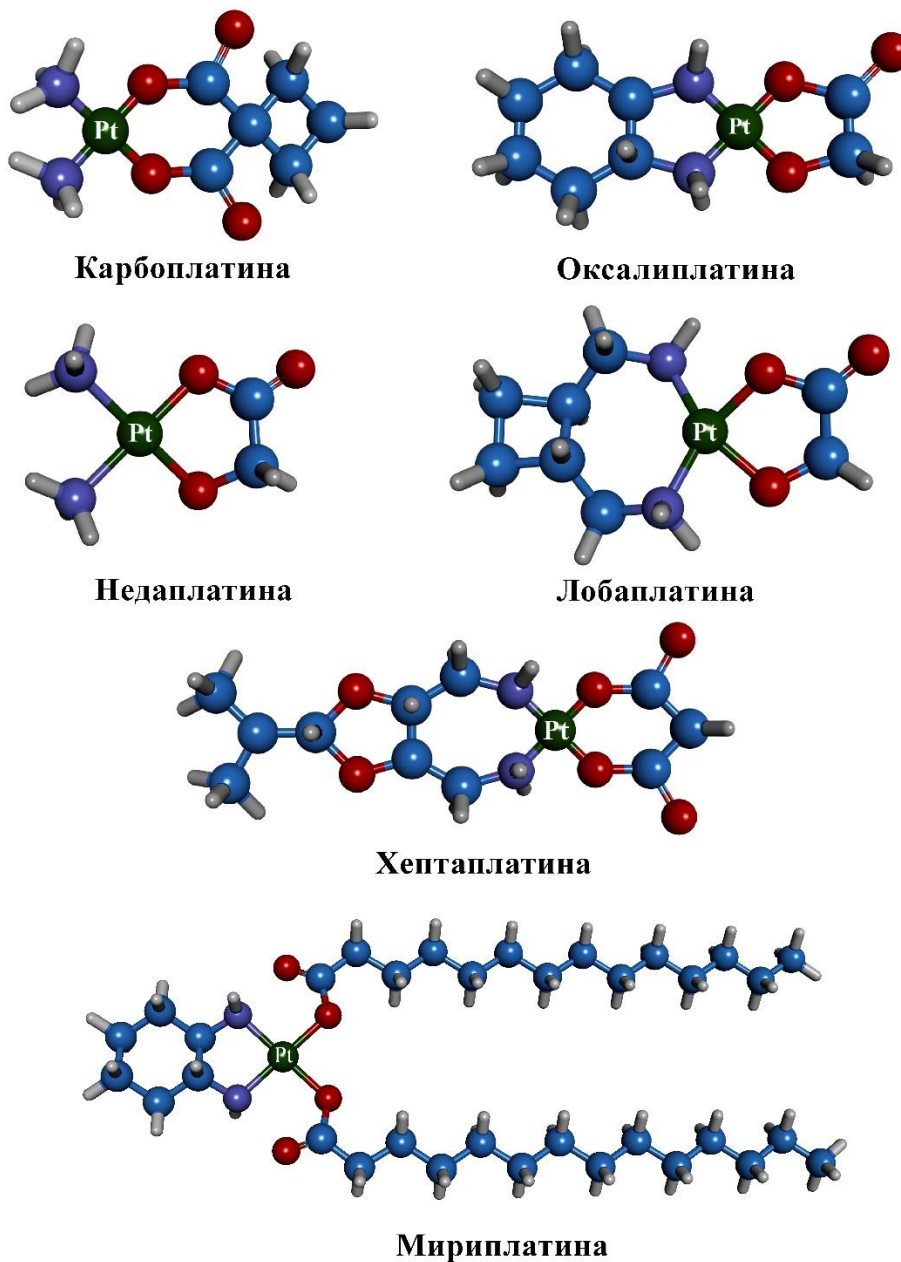
Розенбергови експерименти били су усмерени ка испитивању ефеката деловања електричног поља на процес раста бактерије *Escherichia coli*. Током самог испитивања приметио је да бактерије престају да се деле када се поставе у електрично поље. Главни „кривац“ за ову појаву била је *cis*-диаминдихлоридоплатина(II) (Слика 1). У реакцији између амонијум хлорида из пуфера и платинске електроде настало је једињење платине(II), познато као цисплатина, а које је заправо зауставило деобу ћелије блокирајући репликацију ДНК. Иако позната још од 1845. године, када је први пут синтетисана [10], о њеном антитуморском дејству први пут говоре Розенберг и сарадници 1970. године [10, 11], а у

медицини се први пут употребљава тек 1979. године. Од 1970. године па све до данас, цисплатина се користи у лечењу тумора јајника, тестиса, главе и врата, бешике, грлића материце и рака лимфома [12] и једно је од најпродаванијих хемотерапеутских средстава.



Слика 1. Цисплатина и проналазач њене антитуморске активности - Барнет Розенберг (извор фотографије en.wikipedia.org)

Иако је најпродаванија, са друге стране веома је токсична, а и њена примена је ограничена услед бројних недостатака као што су деловање на ограничен број тумора, затим доводи до мучнина, нарушава структуру коштане сржи, изазива проблеме са бубрезима и слухом [13, 14]. Ове и многе друге нуспојаве, натерале су научнике широм света да раде на проналажењу бољег лека који ће показивати већу ефикасност и мању токсичност у поређењу са цисплатином. Синтетисан је веома велики број нових комплекса платине који су подвргнути многобројним антитуморским испитивањима, али је само неколико њих, поред цисплатине, одобрено за употребу у медицинске сврхе лечења тумора. То су: карбоплатина (диаммин[1,1-циклобутандикарбоксилато(2)]-*O,O'*-платина(II)) (*carboplatin*) [15]; оксалиплатина (*cis*-димминциклохексаноксалатоплатина(II)) (*oxaliplatin*) [16]; недаплатина ([*cis*-диммин(гликолато-*O,O'*-платина(II))] (*nedaplatin*) [17]; хептаплатина (*cis*-малонато[(4*R*,5*R*)-4,5-bis(амино-метил)-2-изопропил-1,3-диоксолан]платина(II)) (*heptaplatin*) [18], лобаплатина (1,2-диаминометил-циклобутан-платина(II)-лактат) (*lobaplatin*) [19] и мириплатина (*cis*-[[(1*R*, 2*R*)-1,2-циклохександиамин-*N,N'*]bis(миристато)]платина(II)) [20] (Слика 2).



Слика 2. Структуре комплекса платине(II) са применом у медицини у лечењу туморских обољења

Поред комплекса платине, испитивана су и антитуморска својства новосинтетисаних једињења са јонима других прелазних метала, као што су: злато(I)/(III), рутенијум(II), осмијум(II), родијум(II)/(III), паладијум(II) и други.

Комплекси злата (I) су одавнина примењивани у лечењу реуматског артритиса, што је условило да се испитају и као антитуморски агенси. Веома добру антитуморску активност, како у *in vivo* тако и у *in vitro* условима, показали су тетраедарски комплекси злата(I) са фосфор-донорским лигандима [21]. До експанзије комплекса злата(III) и њиховог биолошког испитивања довела је чињеница да су они изоелектронски и изоструктурни са

платина(II) комплексима. Лака редукција и нестабилност ових комплекса у физиолошким растворима је ограничавала њихову примену [22]. Овај проблем је превазиђен синтезом комплекса злата(III) са тетраарилпорфиринским лигандима, полиаминима, бипиридином, терпиридином, фенантролином и њиховим дериватима, пептидима који садрже аминокиселину хистидин, дитиокарбаматима и другим лигандима који их стабилизују [23 - 25].

Динуклеарни комплекси родијума(II) због својих изузетних физичко-хемијских својстава и реактивности, припадају групи перспективних антитуморских комплекса [26 - 28]. Осим родијум(II) комплекса, испитивани су и родијум(III) комплекси који поред добре антитуморске активности показују још бољу антимикуробну активност [29, 30].

Активност вредну помена, нарочито због своје сличности са комплексима платине(II) показали су и комплекси паладијума(II) са моноетилфосфатним и диетилфосфатним лигандима [31]. У поређењу са цисплатином, неки комплекси паладијума(II) показали су значајне резултате и много бољу селективност: комплекси са 1,10-фенантролином [32, 33], комплекси са пиридинским, аминским, анилинским лигандима [31], као и са дитиокарбаматима [34], тиосемикарбазонима [34] и карбоксамидама [35, 36].

Медицинска неорганска хемија је доживела праву експанзију открићем цисплатине и њене антитуморске активности. Са порастом броја оболелих од различитих врста тумора [37], ова област привлачи велику пажњу научне јавности, а њени основни принципи су:

- Синтеза нових комплекса метала у циљу спречавања ензимске деградације агенаса;
- Комплексирање јонима метала који ће показати боље хидрофилне и хидрофобне особине у односу на некоординоване лиганде у циљу бољег транспорта кроз ткива;
- Синтеза нових агенаса на бази комплексних једињења метала, чија би активност била појачана комбиновањем особина лиганата и јона метала, а који ослобађају активну компоненту у жељеним органима.

Последњих деценија научници широм света, водећи се горе наведеним принципима, синтетишу и дизајнирају потенцијалне терапеутске агенсе на бази јона метала [38].

1.2 О рутенијуму

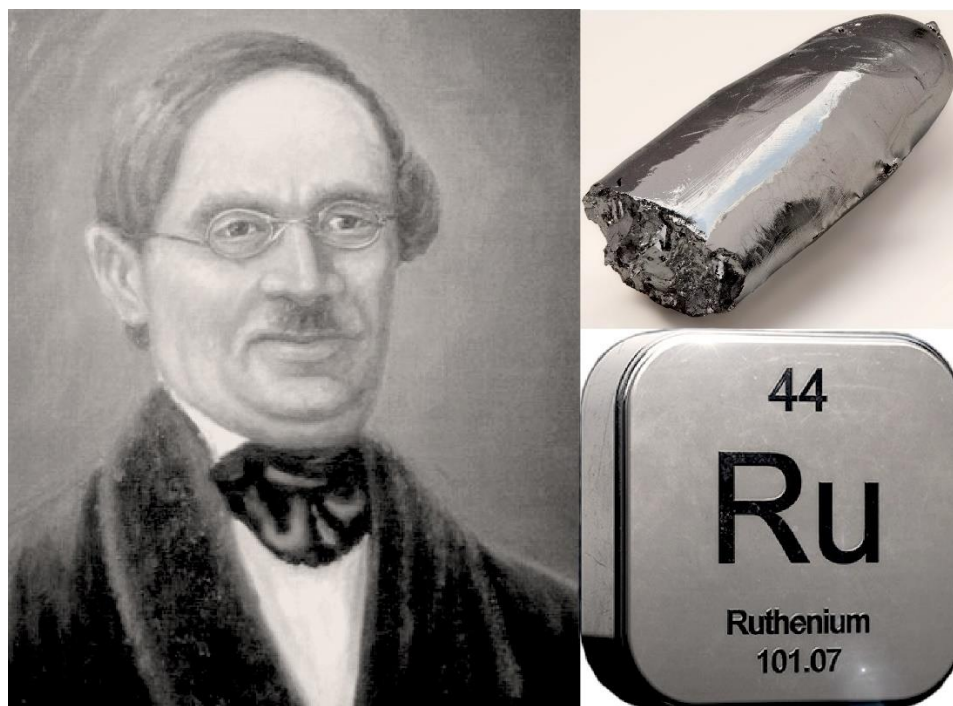
Рутенијум је прелазни метал осме групе пете периоде са редним бројем 44. Припада платинској групи метала. Најчешће се налази у платинским рудама, изразито је тврд, сребрно беле боје са сјајном површином.

Пут открића самог рутенијума пратило је низ преокрета. Пољски хемичар Једрзеј Снинадецки (Jędrzej Śniadecki, 1768 – 1838), 1808. године, најавио је откриће елемента са редним бројем 44, кога је назвао вестуим по астероиду званом Веста, док је радио на рудама платине из Јужне Америке [39, 40]. Међутим, нико од савремених хемичара није успео да потврди његово откриће и потврди нови елемент. Сличну судбину, двадесетак година

касније, доживео је немачки хемичар Готфрид Осан (Gottfried W. Osann, 1796 – 1866), 1828. године, који је, такође, тврдио да је открио елемент чији је редни број 44, али чије откриће није било потврђено.

Највише среће имао је руски хемичар, Карл Карлович Клаус (Карл Карлович Клаус 1796 – 1864), који је, 1844. године, открио нови елемент са редним бројем 44, издвојен из руда платине из Уралских планина у Русији [41]. Клаус је предложио име новооткривеног елемента по старолатинском имену за Русију, што је и прихваћено. Он је признат као проналазач рутенијума, чији је хемијски симбол Ru.

Рутенијум има седам стабилних изотопа: ^{96}Ru , ^{98}Ru , ^{99}Ru , ^{100}Ru , ^{101}Ru , ^{102}Ru и ^{104}Ru . Поред наведених стабилних изотопа, откривена су и 34 радиоактивна изотопа рутенијума [42]. Најстабилнији радиоактивни изотопи су ^{106}Ru , ^{103}Ru , ^{97}Ru са временом полураспада од 373,59; 39,26 и 2,9 дана.



Слика 3. Руски хемичар Карл Карлович Клаус који је открио рутенијум (извор фотографије pub.lib.ru, eu.wikipedia.org)

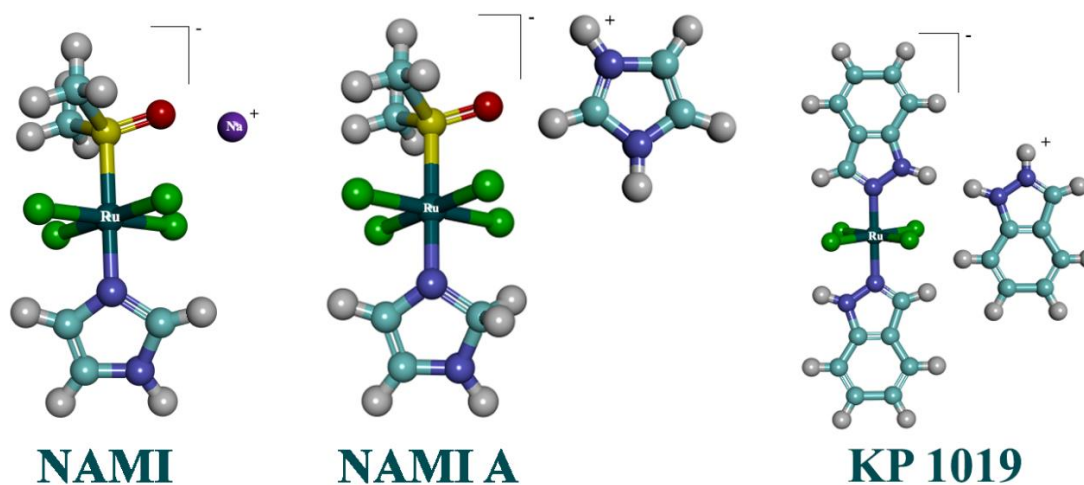
Електронска конфигурација рутенијума је $[\text{Kr}] 4d^7 5s^1$. Оксидациона стања рутенијума се крећу у интервалу од 0 до +8, али су синтетисана и једињења, у којима рутенијум има негативно оксидационо стање: -2 [41]. Најзаступљенија су једињења у којима рутенијум има оксидациона стања +2, +3 и +4. Ова једињења су доминантна у физиолошким растворима и показала су значајну антитуморску активност. Рутенијум у наведеним оксидационим стањима гради координациона једињења октаедарске геометрије. Изузетак су органометални комплекси рутенијума(II) која имају псеудооктаедарску геометрију (тзв. „piano stool” комплекси) [43].

Различит број електрона између рутенијума(II) и рутенијума(III) утиче на њихова хемијска својства. Попуњене три t_{2g} d орбитале чине једињења рутенијум(II) дијамагнетичним, а један неспарен електрон у t_{2g} d орбитали чине рутенијум(III) парамагнетичним [44]. Због тога су комплекси рутенијума(III) у односу на одговарајуће комплексе рутенијума(II) знатно инертнији.

1.3 Антитуморска активност рутенијум(II) комплекса

Откриће цисплатине као антитуморског агенса условило је праву експанзију истраживања у области синтезе клинички важних комплекса метала. Највећа пажња многих истраживачких група усмерена је ка металима платинске групе. Један од њих је и рутенијум, чија су једињења у последњој деценији показала антитуморску активност вредну помена. Упркос свом ниском цитотоксичном потенцијалу *in vitro*, многи комплекси рутенијума продужавају животни век [45]. Главна својства рутенијума која га чине погодним у медицинске сврхе су способност размене лиганата, широк опсег оксидационих стања и способност рутенијума да опонаша гвожђе у везивању за одређене биолошке молекуле [45]. Верује се да је ниска токсичност рутенијумових једињења последица његове способности да опонаша гвожђе у везивању за многе биомолекуле, укључујући серум трансферин и албумин. Брзорастуће ћелије рака имају већи афинитет према гвожђу, што доводи до прекомерне експресије трансферних рецептора на њиховим површинама, тако да се једињења рутенијума скупљају у туморским ћелијама [46], при чему се смањује токсичност рутенијумових једињења.

Најистакнутији примери комплекса рутенијума(III) који показују антитуморску активност су комплекси са имидазолским лигандима: $\text{Na}[\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{imid})]$, NAMI [47]; $[\text{imidH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{imid})]$, NAMI-A [48]; $[\text{indH}][\text{trans-RuCl}_4(\text{ind})_2]$, KP1019 [49] (Слика 4).



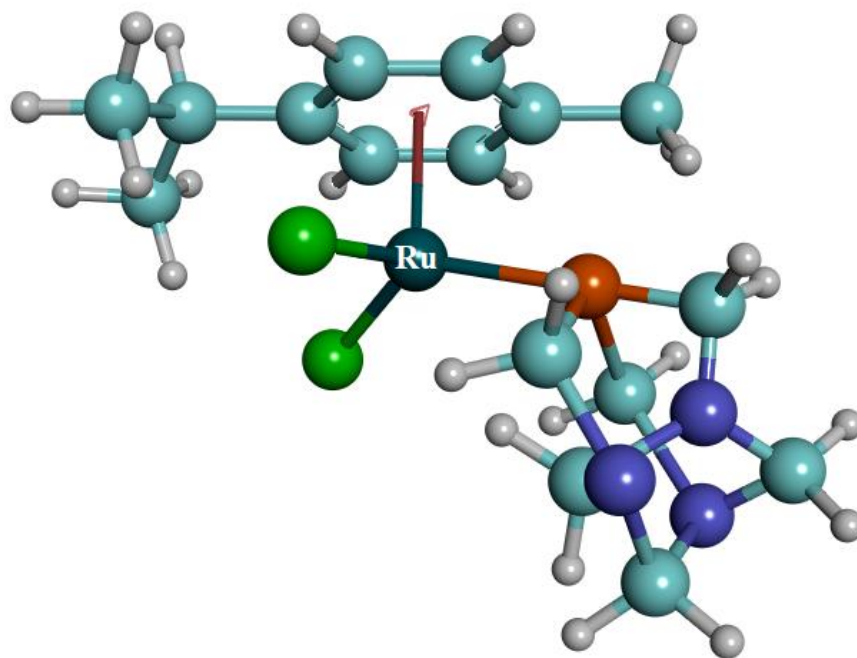
Слика 4. Структуре NAMI, NAMI-A и KP1019 комплекса

Сава (Gianni Sava) и сарадници су међу првима вршили испитивања антитуморски активног натријум-*trans*-рутенијум-тетрахлоридодиметилсулфоксид-имидазола познатијег као NAMI [50, 51]. Истраживањима су дошли до закључка да је NAMI једињење са

селективним антимагастатичким ефектом које не делује на ћелије примарног тумора [47], због чега ово једињење представља потенцијалан агенс за лечење чврстих туморских метастаза.

Након открића значајних антитуморских особина NAMI једињења, настављена су истраживања у сличном смеру. Имидазолијум-*trans*-DMSO-имидазол-тетрахлоридо рутенат(III), односно NAMI-A, је аналог NAMI комплекса у коме је Na^+ јон замењен са ImH^+ , а који има селективну антитуморску активност, чије деловање не зависи од типа примарног тумора и стадијума раста метастаза [52-54]. NAMI-A се ковалентно везује за ДНК, на чему се заснива механизам његовог антитуморског деловања [55]. Истраживања су показала да су NAMI и NAMI-A способни да спрече стварање метастаза и да инхибирају њихов раст, што их је чинило идеалним кандидатима за клиничка испитивања.

Последњу деценију све веће интересовање усмерено је на органометална једињења рутенијума(II) која показују изузетна цитотоксична својства како *in vitro*, тако и *in vivo* [56-58]. Представник ове групе, је RAPTA комплекс ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-арен})(\text{PTA})\text{Cl}_2]$, PTA = 1,3,5-триаза-7-фосфаадамтан), познатији као RAPTA-C [59] (Слика 5). Многобројна истраживања су открила да RAPTA-C, изазива оштећење ДНК у зависности од рН вредности: при рН карактеристичној за ћелије тумора долази до оштећења ДНК, док при рН карактеристичној за здраве ћелије, није откривено значајно оштећење [60, 61]. RAPTA-C је слабије цитотоксичан *in vitro*, али је веома селективан и ефикасан у метастазама *in vivo* [59-61]. Неактиван је на ћелијама примарних тумора [62], али је ефикасан у смањењу метастаза. Знатно инхибира напредовање рака код тестираних животиња, смањујући број и тежину чврстих метастаза, уз малу општу токсичност [62].

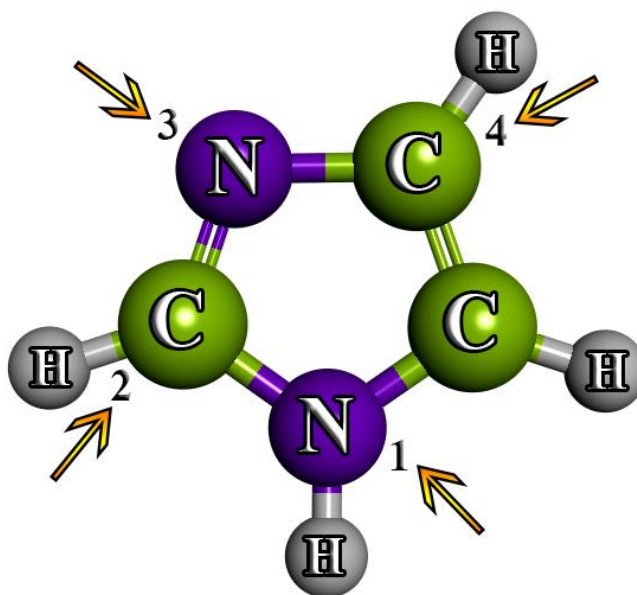


Слика 5. Структура RAPTA-C

1.4 Имидазоли и изотиазоли као лиганди

Имидазоли и изотиазоли припадају групи хетероцикличних једињења и то класи азола. Изграђени су од азотних хетероцикличних петочланих прстенова који садрже још један неугљенични атом као што су: сумпор и азот и имају две двоструке везе. Користе се као лиганди за синтезу многобројних комплексних једињења.

Имидазол је, по својој структури, петочлани хетероциклични прстен, који има два азотова атома у положајима 1- и 3-. Матично језгро имидазола се може дериватизовати на позицијама 1-, 2-, 3- или 4- стварајући тако 1-, 2-, 3- или 4-супституисане имидазолоне лиганде или, пак, може са другим функционалним групама градити мулти-функционалне лиганде (Слика 6). 1-Имидазоли се понашају као електронеутрални лиганди; док се, деривати имидазола, који садрже супституенте у положајима 2- или 4-, могу понашати и као неутрални и као анјонски лиганди, при чему амино -NH група имидазолског прстена мора бити депротонована, да би се добио имидазолов анјон [63]. Због тога су имидазол и његови деривати веома распрострањени у координационој хемији као лиганди у синтези комплексних једињења метала. У свом саставу могу садржати и функционалне групе које, поред хемијског, имају и велики биолошки значај. Због тога је имидазол саставни део значајних биомолекула, као што су неке аминокиселине, биотин и имидазолови алкалоиди. Агенси који у структури садрже имидазол имају широку примену у многим областима клиничке медицине. Поред свега наведеног, имидазол и његови деривати показују антифунгално и антибактеријско деловање [64].

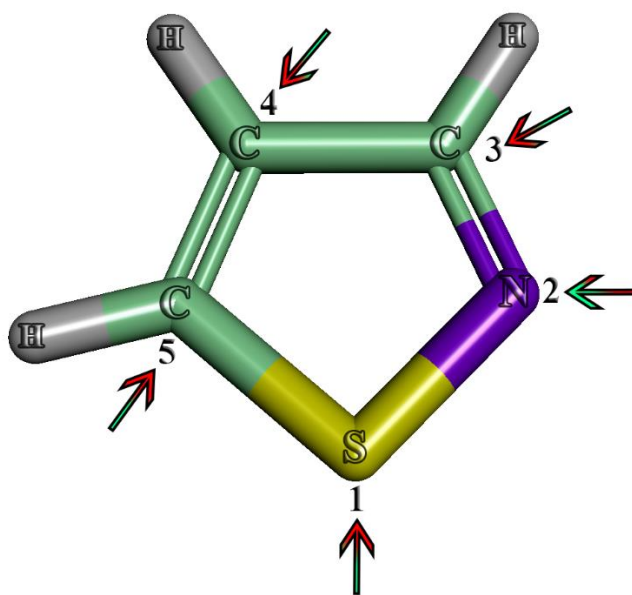


Слика 6. Структура имидазола. Стрелице показују позиције на којима се имидазол може дериватизовати

Дуги низ година, научници широм света су истраживали комплексна једињења прелазних метала са имидазолима и њиховим дериватима као лигандима. Матовић (Зоран Матовић) и сарадници су испитивали хемијска и биолошка својства комплексних једињења

прелазних јона метала, као што су злато(I), злато(III), платина(II) и родијум(III), са различитим имидазолским лигандима [65]. Дајсон (Paul Dyson) и сарадници су истраживали комплексе рутенијума(II) са лигандима имидазолског типа који су показали широк спектар цитотоксичне активности [66, 67]. Они су упоређивали комплексе рутенијума(II) са аренима (π -везани асени: бензен, *p*-цимен, толуен) и са различитим бројем имидазолових прстенова на којима су супституисане различите групе. Већу цитотоксичност су показали комплекси са дужим алкил ланцем, док се у случају истих имидазолових лиганата, примећује да већи број координованих имидазола узрокује већу цитотоксичност [66]. Такође, испитивана је и интеракција органо-металних једињења рутенијума(II) са имидазоловим лигандима са ДНК и протеинима [68], као и механизам ћелијске смрти помоћу проточне цитометрије [69, 70].

Изотиазол је први пут синтетисан 1956. године [71] и припада групи хетероцикличних једињења у чији састав улазе азот и сумпор. Познат је и као 1,2-тиазол, при чему се у положају 1- налази сумпор, а у положају 2- азот [72, 73]. У координационој хемији постоји велики број комплексних једињења са дериватима изотиазола као лигандима [74]. Изотиазолов прстен се може дериватизовати на свим положајима, што утиче на његова хемијска и биолошка својства (Слика 7).

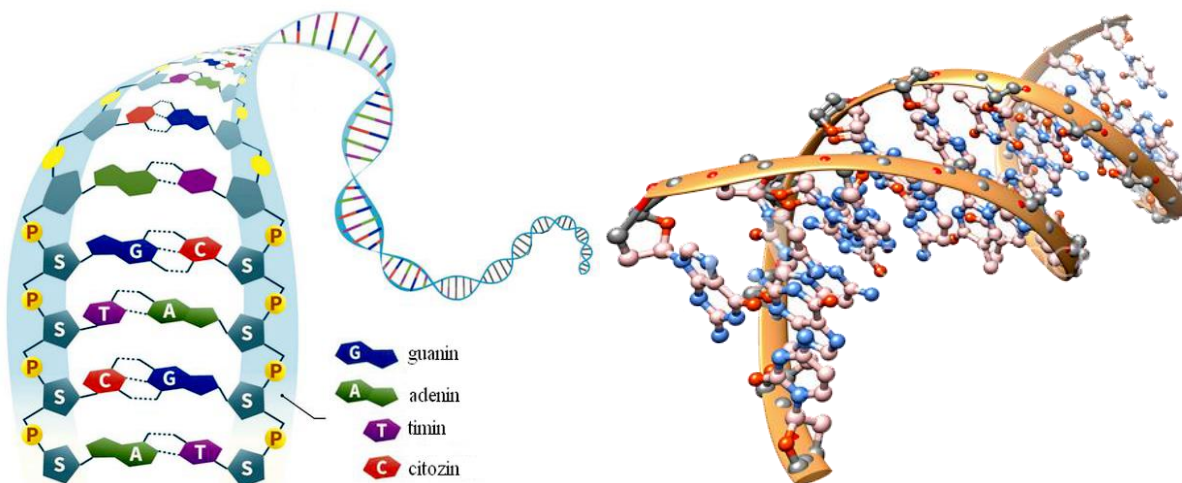


Слика 7. Структура изотиазола. Стрелице показују позиције на којима се изотиазол може дериватизовати

Изотиазоли су показали широк спектар корисних својстава због којих су истраживачи проучавали синтезу и хемијске трансформације његових деривата. Користе се у медицини, углавном, као антивирусни, антимикробни и фунгицидни агенси [75-78], док су подаци о антитуморској активности врло оскудни [79-82].

1.5 Интеракције комплекса платинских метала са дезоксирибонуклеинском киселином

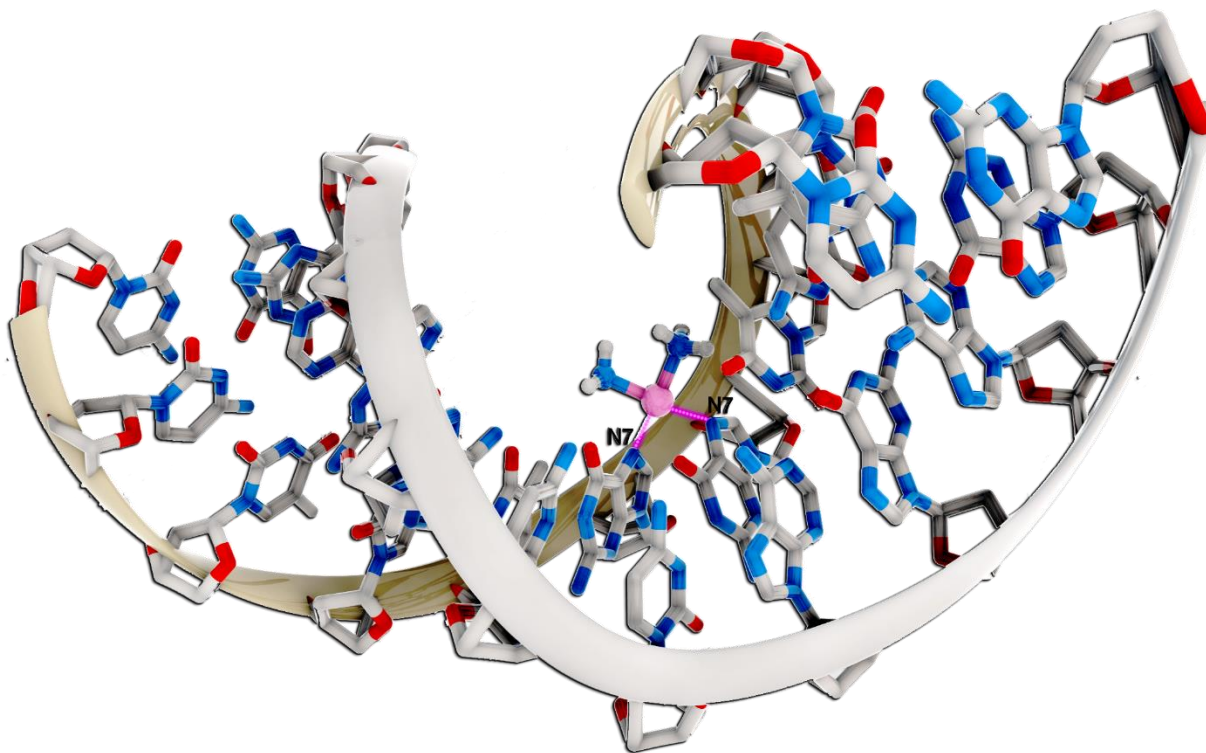
Дезоксирибонуклеинска киселина или ДНК је биополимер који садржи упутства за развој и правилно функционисање свих живих организама. ДНК молекул је веома дуг полимер који се састоји од великог броја нуклеотида који се понављају. Истраживања су показала да се највећи људски хромозом састоји од 440 милиона нуклеотида, односно 220 милиона парова [83]. ДНК молекул састављен је од два полинуклеотидна ланца који су спирално увијени један око другог. До овог открића дошли су Вотсон (James Watson) и Крик (Francis Crick) још давне 1953. године [84]. Колико је било значајно њихово откриће говори и чињеница да су за исто добили Нобелову награду за физиологију или медицину 1962. године. Дужина ДНК ланца када се мерење изврши у одређеном раствору, износи 2,2 до 2,6 nm [85], док је вертикална дужина сваког обртаја спирале 3,4 nm, а пречник 1,0 nm [84, 86]. Спирални ланац у структури ДНК се одржава у том облику захваљујући водоничним везама између пиримидинских и пуринских база које чине грађу ДНК [87]. Пиримидинске базе су цитозин и тимин, а пуринске базе чине гуанин и аденин. Оне су међусобно комплементарне, тј. аденин из једног ланца је увек у пару са тимином наспрамног ланца, док је гуанин увек у пару са цитозином. Пуринске и пиримидинске базе су међусобно повезане водоничним везама (Слика 8). Фосфодиестарским везама у молекулу ДНК су везани шећери (пентозе) и то између трећег и петог угљениковог атома пентозног прстена. Два комплементарна хеликсна ланца формирају основу ДНК молекула чија се ротација одвија у смеру супротном смеру казаљки на сату.



Слика 8. Приказ ДНК молекула са базама повезаним водоничним везама

Главна улога ДНК је пренос кодираних генетских података и захваљујући томе молекули који са њим реагују могу имати улогу биофизичких и терапеутских агенаса [88]. Велика је пажња усмерена ка испитивањима механизма деловања цисплатине, као биофизичког и терапеутског агенса са молекулом ДНК. На основу добијених резултата, закључено је да се цисплатина за ДНК може везати реверзибилно или иререверзибилно. Приликом реверзибилног везивања, јон платине(II) се ковалентно везује за атом азота из гуанина (N7), аденина (N7 и N1), цитозина (N3) и тимина (N3) (Слика 9) [89, 90].

Цисплатина са молекулом ДНК формира интраланчане и интерланчане везе. Интраланчане везе се формирају између метала и суседних молекула аденина и гуанина; метала и два суседна гуанина међусобно раздвојена базом и метала и суседних гуанина, док веза између цисплатине и два гуанина из два ланца представља интерланчану везу [91].

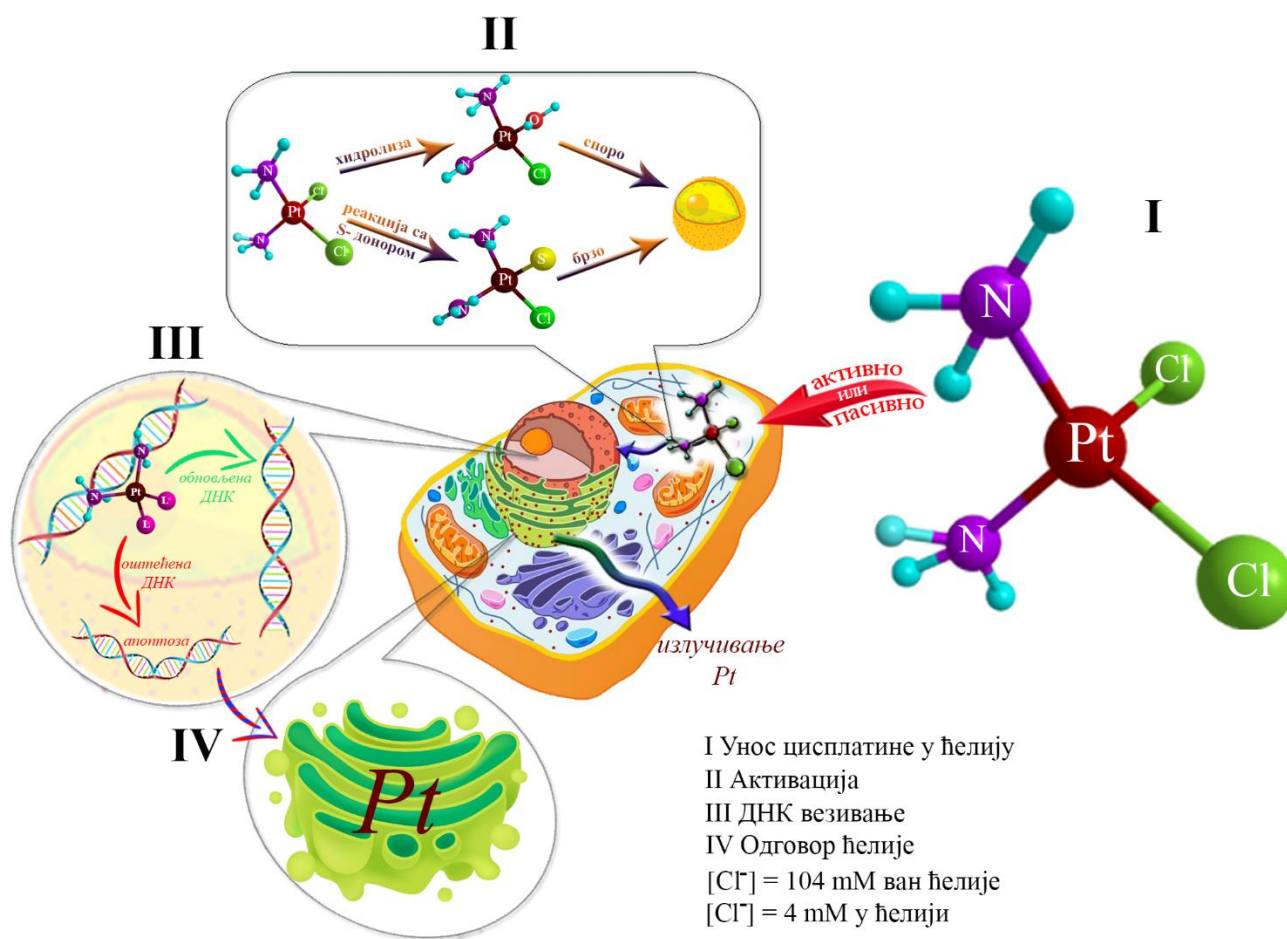


Слика 9. Везивање цисплатине за молекул ДНК преко N7 атома два суседна гуанина из истог ланца (интраланчани начин везивања)

Механизам деловања цисплатине одвија се тако што цисплатина пролази кроз ћелијску мембрану и унутар ћелије долази до хидролизе, односно супституције хлоридног јона (Слика 10). Са ДНК, као примарном биолошком метом директно интереагују хидролизоване јони, при чему се добијају адукти који су одговорни за активност цисплатине [92-94].

Сам механизам одвија се у четири фазе. Прва фаза представља улазак цисплатине у ћелију, тј. достављање ефектне концентрације једињења до тумора са циљем унапређења антитуморске терапије [95]. Друга фаза је активација, на коју, у великој мери, утиче концентрација јона хлорида. Уколико је концентрација јона хлорида у крви и екстрацелуларној течности већа од 100 mM, сматра се да је висока, и да спречава активацију цисплатине или да доводи до нежељене реакције директне супституције хлорида са сумпор-донорским биомолекулима. С друге стране, ниска концентрација хлоридних јона унутар ћелије фаворизује формирање активних хидролитичких врста, које граде платина-ДНК адукте [96].

Комплексна једињења платинске групе метала се у већини случајева понашају као пролекови (“prodrugs”), што им омогућава да пролазе кроз процесе трансформације *in vivo*, при чему ослобађају активне врсте са побољшаним физичко-хемијским, биофармацеутским и фармакокинетичким особинама [97]. Пошто се понашају као пролекови, то значи да први корак активације комплекса платине(IV) укључује редукцију *in vivo* са пратећим губитком аксијалних лиганата, при чему се генерише платина(II) центар који се везује за ДНК. Само везивање за ДНК је трећа фаза механизма деловања и резултат ове фазе јесте грађење водоничних веза [98] између комплекса и ДНК, што се остварује преко атома кисеоника из фосфатних група и атома азота из база. Четврта фаза представља одговор ћелије. Обновљена ДНК остаје у ћелији, док денатурирана ДНК изазива апоптозу и преко Голџијевог апарат се елиминише из ћелије.



Слика 10. Механизам деловања цисплатине

Интеракције комплекса рутенијума(II) са ДНК су привукле велику пажњу научне заједнице, а посебно развој нових структурних сонди ДНК и терапеутских средстава [99-102]. Истраживања се крећу у смеру разумевања основних биофизичких својстава комплекса, њихове способности везивања за ДНК и начин на који интерагују са њим. Тако, на пример, рутенијум(II) полипиридилни комплекси се нековалентно интерагују са ДНК

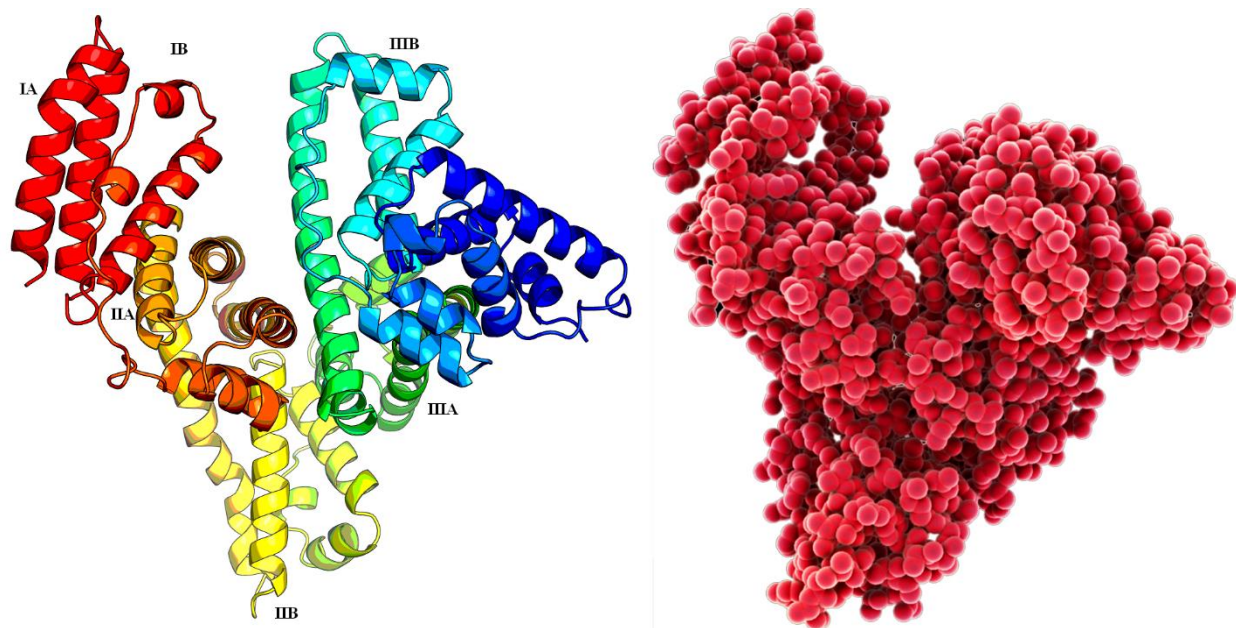
кроз електростатичке интеракције или интеркалацију [103-106]. Ови комплекси су се показали као обећавајући агенси због њихове високе интеркалације и афинитета ка молекулу ДНК [107-109]. Поред интеркалације, неки комплекси рутенијума(II) могу изазвати кондензацију ДНК [110]. Кондензација ДНК је индукована електростатичком неутрализацијом негативно наелектрисаног ланца ДНК са мултивалентним катјонима, а резултат је проширење ланца ДНК са променом секундарне и терцијарне структуре ДНК [111]. Сматра се да механизам кондензације ДНК помоћу интеркалирајућих рутенијум(II) комплекса није само због електростатичке неутрализације, већ и због високог афинитета ДНК да везује комплекс за себе [112].

Из платинске групе метала, испитиване су и интеракције комплекса паладијума(II) са ДНК [113]. Истраживања су показала да комплекси паладијума(II) интерагују са полинуклеотидима нековалентним везивањем, тј. интеркалирају се између ДНК полинуклеотидних ланаца. Применом UV-Vis апсорпционе спектрофотометрије доказано је да моноклеарни комплекси паладијума(II) интерагују ДНК, док је применом цикличне волтаметрије показано да је тип интеракције ових комплекса интеркалација [113].

1.6 Интеракције комплекса платинских метала са протеинима

Значај испитивања интеракција комплексних једињења метала и протеина је у томе, што су ове интеракције одговорне за различите ефекате јона метала у живим организмима [114]. Како би се на што бољи начин одредио молекуларни механизам активности метала, веома је важно утврдити природу њихове интеракције са биомолекулима на молекуларном нивоу. Како у састав протеина улазе аминокиселине у чијем саставу се налазе S- и N-донорске групе, основна реакција комплекса метала са протеинима заснива се на њиховом везивању са донорским групама у протеину. Веома важну улогу у читавом механизму имају транспортни протеини крвне плазме, мембрански транспортни протеини и бројни ензими.

Најзаступљенији транспортни протеин крвне плазме јесте албумин хуманог серума, односно HSA (Слика 11). То је једноланчани протеин који се састоји од три домена који формирају молекул [115, 116]. Сваки домен садржи по два поддомена који су спирални и умрежени дисулфидним мостовима. По један слободан тиол (Cys 34) и триптофан (Trp-214), као и седамнаест дисулфидних мостова налази се у оквиру једне аминокиселинске секвенце [117, 118]. HSA омогућава транспорт катјона метала, хормона и терапеутских агенаса. Супстрат се у молекулу албумина везује у хидрофобним шупљинама смештеним у поддоменима IIА и IIIА [119]. За унутрашњу флуоресценцију албумина одговоран је триптофан (Trp-214), који се налази у хидрофобној шупљини поддомена IIА [120]. Приликом интеракције HSA и комплексних једињења долази до промена у конформацији и начину везивања супстрата за албумин, што се приказује кроз промену интензитета флуоресценције [121].



Слика 11. Албумин хуманог серума (HSA)

Веома су значајни и металотионени који везују јоне тешких метала присутних у организму [122]. Многобројна истраживања су показала да су металотионени важни протеини са којима реагује платина(II) јон [122]. Наиме, индукција металотионена представља заштитни механизам против нефротоксичности коју изазивају платински комплекси, а само присуство металотионена у ћелијама тумора доводи до појаве резистенције на цисплатину [2]. Поред једињења платине, свакако треба споменути и комплексна једињења паладијума(II). Паладијум(II) јони се *in vivo* везују за молекуле металотионена јаким ковалентним везама, нарочито у бубрезима, док *in vitro* потпомажу неоксидативну олигомеризацију металотионена [122].

Органометални комплекси рутенијума(II), које је синтетисао Мегерс (Eric Meggers) су се показали као потенцијални инхибитори различитих киназа [123]. Показало се да комплекс рутенијума у хеморезистентним ћелијама меланома може активирати експресију p53 и индуковати апоптозу [124]. Истраживања су, такође, показала да се поједини комплекси рутенијума(II) везују за HSA водоничним везама и Ван дер Валсовим (Van der Waals) силама, изазивајући његову конформациону промену, при чему је сам процес везивања спонтан [125].

Цистеин катепсин протеазе су веома важна класа ензима за препознавање тумора, а из те класе се издвајају катепсин В и L. Линеарни комплекси злата(I) са тиолатним и фосфинским лигандима [126] као и динуклеарни комплекси паладијума(II) [127] доводе до инхибиције катепсина В.

И након толико година, поље науке које се бави истраживањима интеракција комплексних једињења прелазних метала са дезоксирибонуклеинском киселином и протеинима и даље остаје делимична мистерија. Будућа истраживања морају бити усмерена ка испитивању механизма деловања новосинтетисаних комплекса као потенцијалних антитуморских агенаса.

1.7 Компјутерска хемија

Вековима уназад хемичари се баве рачунањем, али поље које данас познајемо као „рачунарска“, тј. компјутерска хемија је производ дигиталног доба. Мартин Карплус (Martin Karplus), Мајкл Левит (Michael Levitt) и Ерије Варшел (Arieh Warshel) су освојили Нобелову награду за хемију 2013. године за рад који су урадили седамдесетих година, а којим су постављени темељи данашњим компјутерским моделима који комбинују принципе класичне и квантне физике како би се што детаљније описали хемијски процеси. Иако су 1995. године, три хемичара Пол Круцен (Paul Crutzen), Марио Молина (Mario Molina) и Френк Шервуд Роланд (Frank Sherwood Rowland) освојили Нобелову награду за хемију за конструкцију математичких модела који су користили термодинамичке и хемијске законе како би објаснили како се озон формира и распада у атмосфери, компјутерска хемија се није сматрала посебним пољем све до 1998. године [128]. Те године Валтер Кон (Walter Kohn) и Џон Попл (John Pople) добијају Нобелову награду за хемију за свој рад на теорији функционала густине и компјутерским методама у квантној хемији и од тада компјутерска хемија добија пуну пажњу научне заједнице као посебно поље науке које никако не треба занемарити.

Свакодневно, компјутациони хемичари покушавају да утичу на наше разумевање начина на који свет функционише, помажу произвођачима да дизајнирају продуктивније и ефикасније процесе, карактеришу нова једињења и материјале и помажу другим истраживачима да дођу до нових сазнања. Компјутерска хемија се, такође, користи за проучавање основних својстава атома, молекула и хемијских реакција, користећи квантну механику и термодинамику. Компјутациони хемичари користе математичке алгоритме, статистику и велике базе података да би интегрисали хемијску теорију и моделирање са експерименталним запажањима. Док једни стварају моделе и симулације физичких процеса, други користе статистику и методе анализе података да би дошли до жељених информација. Напредак у могућностима компјутерске визуализације омогућава хемичару да представи сложене анализе у лако разумљивом облику, а које могу да користе у дизајнирању експеримената и валидацији резултата.

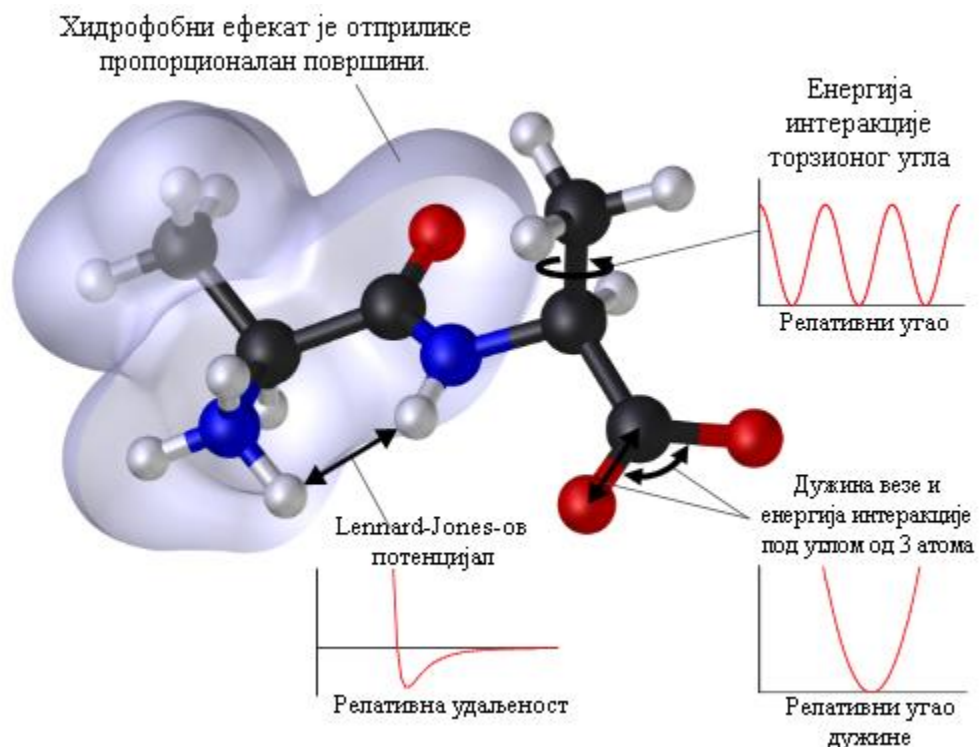
У хемији се рачунарске методе могу поделити на две велике групе:

- Молекулска механика [129] и
- Квантна механика [130].

Молекулска механика се заснива на законима класичне физике, при чему она занемарује утицај електрона и њене методе спадају у емпиријске методе. Квантна механика омогућава прецизније објашњење атомских и субатомских честица, као и већих система и то применом: *ab initio*, DFT прорачуна (Density Functional Theory - Теорија функционала густине) и семи-емпиријских метода.

1.7.1 Молекулска механика (ММ)

Молекулска механика је рачунарска метода која се заснива на законима класичне физике чије методе спадају у емпиријске методе. Молекул се у молекулској механици приказује као скуп кугли различитих величина, које представљају атоме, који су међусобно везани опругама које представљају везе. До промене енергије у односу на промену геометрије долази услед противљења веза процесу истезања или савијања у односу на њихове природне дужине. Молекулска механика користи механички модел како би открила геометрију молекула са минималном енергијом (Слика 12). Други назив за молекулску механику који се врло често користи јесте force field метода или метода поља силе јер су параметри и изражавање енергије одређени јачином поља.



Слика 12. Приказ функције потенцијалне енергије молекулске механике на примеру дипептида аланил-аланина

Применом математичког израза добија се вредност укупне енергије система у молекулској механици (Слика 13). Потенцијална енергија испитиваног система пропорционална је збиру различитих доприноса везивних и неvezивних интеракција. У везивне интеракције спадају истезање и сабијање веза, савијање углова веза и торзије (увијање углова веза), а у неvezивне спадају Кулонове (Coulomb) и Ван дер Валсове (van der Waals) интеракције.

$$\begin{aligned}
 U = & \sum_{i < j} \sum 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \\
 & + \sum_{i < j} \sum \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \\
 & + \sum_{\text{veze}} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{uglovi}} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 \\
 & + \sum_{\text{torzije}} k_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)]
 \end{aligned}$$

Слика 13. Математички приказ укупне енергије једног система у молекулској механици

Молекулска механика се користи за израчунавање геометрије и енергије великих и средњих молекула, као и за израчунавање полазних геометрија за даља израчунавања геометрије и енергије полимера. Молекулска механика је брза метода која не тражи хардверске компоненте високих перформанси и то су њене основне предности. Њен главни недостатак се огледа у томе да она не узима у обзир електроне и због тога не даје информације о облицима и енергијама молекулских орбитала и изгледу електронског спектра. Недостатак саме методе се огледа и у параметризацији поља. Уколико је параметризација поља урађена за један систем (скуп сличних једињења), она не може бити примењена на други систем.

1.7.2 Квантна механика (QM)

1.7.2.1 Ab-initio

Ab-initio (први принцип) представља методе које се заснивају на основним квантно-механичким принципима. Квантно-механички прорачуни се заснивају на решавању Шредингерове (Erwin Rudolf Josef Alexander Schrödinger) једначине. Различите врсте ab-initio метода се разликују на основу начина на који се приступа апроксимативном решавању Шредингерове једначине:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (1)$$

где је \hat{H} - Хамилтонијанов оператор, E - енергија атома или молекула, а Ψ - таласна функција.

Хамилтонијанов оператор, се за било који молекул који садржи M нуклеуса и N електрона без присуства електричног и магнетног поља, изражава преко израза:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \frac{1}{2} \sum_{A=1}^M \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (2)$$

где се први и други члан односе на кинетичку енергију електрона и језгара, трећи члан се односи на потенцијалну енергију електростатичких интеракција између електрона и језгара, четврти члан се односи на електростатичке интеракције (одбијање) електрона, док се пети члан односи на електростатичке интеракције (одбијање) језгара. Као збир других извода функције (у координатама картезијана) (3) изражава се Лапласов (Laplas) оператор ∇^2 (nabla):

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \quad (3)$$

Да би се решила Шредингерова једначина за системе који су сложенији од водоника, потребно је увести додатне апроксимације. Најзначајније апроксимације, које су у том случају уводе су: Борн-Опенхајмерова (Born-Oppenheimer), Хартри-Фокова (Hartree-Fock) и Линеарна комбинација атомских орбитала (LCAO).

1.7.2.2 DFT теорија – Теорија функционала густине

Теорија функционала густине се, први пут, спомиње у радовима Томаса и Фермија (Llewellyn Thomas и Enrico Fermi) 1920. године [131], који тврде да се енергија основног стања система у коме се крећу електрони изражава директно у односу на њихову густину. Скоро пола века касније, Хохенберг и Кон (Pierre Hohenberg и Walter Kohn) [132] развили су теорему из које се види да се енергија основног стања одређује на основу густине електрона $\rho(\mathbf{r})$:

$$E = E[\rho(\mathbf{r})] \quad (4)$$

Иако су наведене теорије прихваћене и добре, тек је Кон-Шамов приступ (Walter Kohn и Lu Jeu Sham) [133] доживео практичну употребу у оквиру Теорије функционала густине. У самој теорији потребно је увођење апроксимација за форму функционала, како би се добила таласна функција и енергија густине. Предност ове теорије огледа се у томе да укључује динамичке корелације иако измена није егзактна. Измењиво-корелациони функционали се деле у три групе:

1. функционали који се заснивају на апроксимацији локалне густине (LDA = Local Density Approximation) и локалне спинске густине (LSDA = Local Spin Density Approximation),
2. функционали који се засновају на апроксимацији генерализованог градијента (GGA = Generalized Gradient Approximation),
3. хибридни функционали,
4. meta-GGA функционали,
5. meta-хибридни функционали.

У оквиру ове докторске дисертације коришћени су хибридни функционали M06 [134] и B3LYP [135].

1.7.2.3 Семи-емпиријске методе

Харти-Фокова теорија представља полазну тачку за *ab initio* прорачуне, укључујући Харти-Фокове прорачуне и пост-Харти-Фокове прорачуне, код којих се сви интеграл директно израчунавају. Другачији приступ јавља се код семи-емпиријских метода код којих се уводе додатне апроксимације. Код ових метода, поједини интеграл се постављају на нулу, док су остали прилагођени експерименталним подацима, као што су енергије или геометрије. Методе су веома ефикасне, али имају ограничену употребу само на системе за које постоје параметри.

NDDO (Neglect of Diatomic Differential Overlap) апроксимација је главна апроксимација код семи-емпиријских модела. Њена главна улога је та што не дозвољава преклапања међу орбиталама које припадају различитим атомима. Емпиријским параметрима који служе за подешавање ових модела, могу се заменити квантно-механички двоелектронски интеграл $J_{\mu\nu}$ и $K_{\mu\nu}$. Циљ употребе емпиријских параметара је увођење ефеката корелације електрона у семи-емпиријске моделе, а у циљу добијања резултата који показују што веће слагање са експерименталним, као и *ab initio* резултатима. Осим што су ефекти корелације укључени, велика предност ових метода је брзина (јер не морају да се рачунају сви интеграл), као и могућност прорачуна на великим системима.

Најчешће коришћене семи-емпиријске методе су: AM1 (Austin Model 1), PM3 (Parametric Method 3), RM1 (Recife Model 1) и PM6 (Parametric Method 6). Применом наведених метода рачунају се термодинамичке особине, IR спектри, диполни моменти, молекулске орбитале, електростатички потенцијали, прелазна стања, геометрије, енергије

побуђених стања, као и оптимизација макромолекула који имају преко 15000 атома. У оквиру ове дисертације коришћен је РМ6 метод.

1.7.3 Молекулски докинг

Молекулски докинг представља компјутерску методу која се заснива на симулацији интеракција између рецептора и испитиваног лиганда. Рецептор је најчешће макромолекул познате кристалне структуре као што је протеин или дезоксирибонуклеинска киселина, док лиганд може бити испитивано једињење или неки други биоактивни молекул. Сам докинг се изводи везивањем испитиваног молекула за рецептор у различитим просторним положајима са циљем проналажења најбоље геометријске конформације у којој је минимална енергија везивања. Постоје ригидни и флексибилни докинг са три могуће комбинације: ригидни лиганд/ригидни рецептор, флексибилни лиганд/ригидни рецептор и флексибилни лиганд/флексибилни рецептор [136]. У ригидном докингу број степена слободe износи шест, а у флексибилном знатно више. Уколико је већи број степена слободe долази до повећања броја компјутерских прорачуна, што условљава примену логаритама који помажу у дефинисању оптималне интеракције [137]. Главна питања на која молекулски докинг треба да одговори су: Каква је структура комплекса, везаног лиганда и макромолекула? Колика је енергија везивања комплекса? Који је комплекс најстабилнији? Које би модификације лиганда довеле до бољег (или лошијег) везивања? На тачност добијених одговора утиче избор методологије примењеног докинга. Развијени су многобројни програми који користе алгоритме, једначине и друге параметре за одређивање афинитета везивања код молекулског докинга [138] а у овој тези су коришћени неки од широко заступљених софтвера: AutoDock [139], AutoDock Vina [140], GOLD [141] и Moe Dock [142].

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

2.1 Хемикалије и реагенси

Хемикалије које су коришћене комерцијално су доступне, високог аналитичког степена чистоће и нису пречишћаване пре употребе. Метанол, толуен, етил-ацетат, дихлорметан, D₂O, CDCl₃, NaOH, HCl, NaCl, Tris-HCl, PBS (фосфатни пуфер), DMSO-d₆, албумин хуманог серума (HSA), етидијум-бромид, ДНК изолован из тимуса телета (CT-DNA), метил-имидазол, пропил-имидазол и [Ru-(η^6 -*p*-сумене)Cl₂]₂ су комерцијално набављени од истог произвођача Sigma-Aldrich Chemie GmbH.

Све ћелијске линије на којима је испитивана цитотоксична активност синтетисаних једињења набављене су од American Type Culture Collection (ATCC): A-549 (хумани карцином плућа, ATCC CCL-185), MCF-7 (хумани аденокарцином дојке, ATCC HTB-22), HT-29 (хумани аденокарцином дебелог црева, ATCC HTB-38), HCT-116 (хумани карцином дебелог црева, ATCC CCL-247), HeLa (хумани аденокарцином грлића материце, ATCC CCL-2) и MRC-5 (нормални хумани фетални фибробласти плућа, ATCC CCL-171). Ћелије су гајене у Dulbecco модификованом Eagle медијуму (DMEM, Sigma-Aldrich) са 4,5% глукозе, додато је 10% феталног говеђег серума (FBS, Sigma Aldrich), а медијум је обогаћен антибиотиком и антимикотиком (Sigma-Aldrich). Температура гајења ћелија износила је 37 °C у атмосфери ваздуха који садржи 5% CO₂ и који је засићен воденом паром (100%). Густина ћелија (број ћелија по јединици запремине) и проценат одрживих ћелија изведени су као што је описано у процедури Богдановић (Гордана Богдановић) и сарадника [143].

2.2 Синтеза изотиазолских лиганата

Изотиазолски лиганди 5-(метиламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил (5-MA-3-PyCN-ITZ) (**1**), 5-(метиламино)-3-(4-метилпиперазин-1-ил)изотиазол-4-карбонитрил (5-MA-4-MPipCN-ITZ) (**2**), 5-(метиламино)-3-морфолин-4-илизотиазол-4-карбонитрил (5-MA-3-MorphCN-ITZ) (**3**), 5-(фениламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил (5-PhA-3-PyCN-ITZ) (**4**) и 3-морфолин-4-ил-5-(фениламино)изотиазол-4-карбонитрил (3-Morph-5-PhACN-ITZ) (**5**) су синтетисани према описаним процедурама Валентине Онис (Valentina Onnis) [144, 145]. Овде ће, као пример, бити приказана синтеза 5-МАРyCN-ITZ (**1**) лиганда: хладан раствор 3-амино-2-(метилтиокарбамил)-3-пиролидин-2-пропеннитрила (1,05 g; 5 mmol) у анхидрованом CHCl₃ (50 mL) је помешан са Br₂ (0,8 g; 5 mmol) и добијена смеша је мешана 1 h. Након тога, смеша је испрана раствором NaOH и водом. Лиганд је добијен рекристализацијом из циклохексана.

2.3 Синтезе комплекса

Комплекс [Ru(η^6 -*p*-сумене)(*N*-MeIm)₃]Cl₂·2H₂O (**6**) је синтетисан према пропису Малецког (Jan Grzegorz Małecki) [146], док су остали комплекси (**7** – **12**) синтетисани према процедури Вока (Carsten A. Vock) и сарадника [66] уз мање модификације код појединих комплекса.

2.3.1 Добијање $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-tris}(N\text{-метилимидазол})\text{рутенијум(II)}]\text{дихлорид дихидрат}$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6)

Смеша $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{Cl}_2]_2$ (0,122 g; 0,2 mmol) и N -метилимидазола (0,0954 mL; 1,2 mmol) је растворена у 19,74 mL метанола и рефлуктована 2 h на 65 °C. Након рефлуктовања, раствор је охлађен, процеђен и упарен до сува на собној температури. Жути кристали су добијени након додатка N,N -диметилформамида, при чему је раствор остављен у фрижидеру преко ноћи. Принос: 0,095 g (40,13%). Тачка топљења: 141 °C. Израчунато за $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_2\text{Ru}$ ($M = 588,54 \text{ g mol}^{-1}$): C, 44,90; H, 6,17; N, 14,28%; нађено: C, 44,75; H, 6,25; N, 14,12%. IR (KBr, $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$) 3136, 3116, 3099, 3047 (ν_{CH}), 2968, 2962 (ν_{CH}), 1646, 1621 ($\nu_{\text{C=N}}$), 1548, 1534, 1510 ($\nu_{\text{C=C}}$). UV-Vis (H_2O , $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 262(п) (2092), 302 (1361), 378 (814). $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 1,11 (d, 6H, 1-CH(CH₃)₂), 1,79 (s, 3H, 4-CH₃), 2,38 (sept, 1H, 1-CH(CH₃)₂), 3,75 (s, 9H, 3 x 1''-H₃), 5,76 (d, 2H, 2-H, 6-H), 6,02 (d, 2H, 3-H, 5-H), 6,86 (t, 3H, 3 x 4'-H), 7,21 (широк s, 3H, 3 x 5'-H), 7,64 (широк s, 3H, 3 x 2'-H). $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 19,85 (4-CH₃), 24,13 (1-CH(CH₃)₂), 32,96 (1-CH(CH₃)₂), 37,05 (3 x C-1''), 85,76 (C-2, C-6), 89,37 (C-3, C-5), 105,94 (C-4), 108,25 (C-1), 125,67 (3 x C-4'), 133,92 (3 x C-5'), 144,21 (3 x C-2'). [147]

2.3.2 Добијање $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-}(N\text{-пропилимидазол})\text{дихлоридорутенијум(II)}]$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$ (7)

Раствору $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{Cl}_2]_2$ (0,199 g; 0,326 mmol) у толуену (30 mL) додат је N -пропилимидазол (0,0756 mL; 0,652 mmol) на собној температури. Добијена смеша је загревана и рефлуктована 3 сата на 110 °C. Након рефлуктовања, раствор је охлађен и процеђен. Кристали жуте боје су добијени из толуена, при чему је раствор остављен у фрижидеру преко ноћи. Принос: 0,1095 g (40,32%). Тачка топљења: 198 °C. Израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{Cl}_2\text{Ru}$ ($M = 416,34 \text{ g mol}^{-1}$): C, 46,16; H, 5,81; N, 6,73%; нађено: C, 46,66; H, 5,69; N, 6,58%. IR (KBr, $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$) 3143, 3110, 3044 (ν_{CH}), 2958, 2931, 2874 (ν_{CH}), 1618 ($\nu_{\text{C=N}}$), 1533, 1520, 1498 ($\nu_{\text{C=C}}$). UV-Vis (H_2O , $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$): $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 254 (3005), 307 (1866), 393 (1124). $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 0,93 (t, 3H, 3''-H₃), 1,28 (d, 6H, 1-CH(CH₃)₂), 1,70-1,89 (m, 2H, 2''-H₂), 2,19 (sept, 3H, 4-CH₃), 2,97 (s, 1H, 1-CH(CH₃)₂), 3,85 (t, 2H, 1''-H₂), 5,24 (d, 2H, 2-H, 6-H), 5,44 (d, 2H, 3-H, 5-H), 6,88 (t, 1H, 4'-H), 7,32 (t, 1H, 5'-H), 7,90 (t, 1H, 2'-H). $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): $\delta(\text{ppm})$ 11,02 (C-3''), 18,51 (4-CH₃), 22,28 (1-CH(CH₃)₂), 23,92 (1-CH(CH₃)₂), 30,71 (C-2''), 49,89 (C-1''), 81,39 (C-2, C-6), 82,67 (C-3, C-5), 97,36 (C-4), 102,54 (C-1), 119,36 (C-4'), 132,16 (C-5'), 139,78 (C-2'). [147]

2.3.3 Добијање $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-}(5\text{-метиламино})\text{-}3\text{-пирролидин-}1\text{-илизотиазол-}4\text{-карбонитрил})\text{дихлоридорутенијум(II)}]$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{Cl}_2(5\text{-MA-}3\text{-PyCN-ITZ}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8)

Смеша $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{Cl}_2]_2$ (0,0998 g; 0,163 mmol) и 5-МА-3-РyCN-ITZ (1) (0,2082 g; 1 mmol) у толуену (15 mL) је рефлуктована 3 h на 110 °C. Након рефлуктовања, раствор је охлађен и процеђен, а затим је раствор упарен до запремине од ~ 5 mL. Наранџасти кристали су добијени додатком етил-ацетата. Принос: 0,076 g (14,28%). Тачка топљења: 174 °C. Израчунато за $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{ORuS}$ ($M = 532,48 \text{ g mol}^{-1}$): C, 44,44; H, 4,91; N, 10,91%; нађено: C, 44,23; H, 4,71; N, 10,78%. IR (KBr, $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$) 3407 (ν_{CH}), 2959, 2925 (ν_{CH}), 2235

($\nu_{C=N}$), 1580, 1524 ($\nu_{C=C}$). UV-Vis (CH₃OH, $c = 2 \cdot 10^{-3}$ M): λ_{max}/nm ($\epsilon/dm^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 342 (π) (1000), 428 (564). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,35 (d, 6H, CH₃), 1,82 (s, 3H, 4-CH₃), 1,95 (qui, 3'-H, 4'-H), 2,31 (s, 3H, 1''-CH₃), 2,92 (sept, 1H, 1-CH(CH₃)₂), 3,58 (t, 5'-H, 2'-H), 5,38 (d, 2H, 2-H, 6-H), 5,60 (d, 2H, 3-H, 5-H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 19,12 (-CH₃), 22,42 (1-CH(CH₃)₂), 25,56 (C-3', C-4'), 31,38 (C-1''), 33,14 (1-CH(CH₃)₂), 48,25 (C-5', C-2'), 80,59 (C-1'''), 81,50 (C-1^{IV}), 83,35 (C-1'''), 96,82 (C-2, C6), 98,86 (C-3, C-5), 101,26 (C-4), 102,85 (C-1). [148]

2.3.4 Добијање [(η^6 -*p*-цимен)-(5-метиламино)-3-(4-метилпиперазин-1-ил)изотиазол-4-карбонитрил]дихлоридорутенијум(II)],
[Ru(η^6 -*p*-суптене)Cl₂(5-МА-4-MPipCN-ITZ)] (9)

Смеша [Ru(η^6 -*p*-суптене)Cl₂]₂ (0,0998 g; 0,163 mmol) и 5-МА-4-MPipCN-ITZ (2) (0,2373 g; 1 mmol) у дихлорметану (15 mL) је рефлугована 3 h на 39 °C. Након рефлугована, раствор је охлађен и процеђен. Затим је раствор упарен до запремине од ~ 5 mL. Након неколико дана, раствор је процеђен, при чему се издваја зелени пудераст талог. Награђен комплекс је испран диетил етром и осушен на ваздуху. Принос: 0,064 g (11,84%). Тачка топљења: 137 °C. Израчунато за C₂₀H₂₈Cl₂N₅RuS (M = 542,51 g mol⁻¹): C, 44,28; H, 5,20; N, 12,91%; нађено: C, 44,09; H, 5,33; N, 12,65%. IR (KBr, ν_{max}/cm^{-1}) 3266 (ν_{CH}), 2961, 2935 (ν_{CH}), 2239, 2200 ($\nu_{C=N}$), 1565 ($\nu_{C=C}$). UV-Vis (CH₃OH, $c = 2 \cdot 10^{-3}$ M): λ_{max}/nm ($\epsilon/dm^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 390 (π) (406). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,36 (d, 6H, CH₃), 2,21 (s, 3H, 4-CH₃), 2,33 (s, 3H, 1^V-CH₃), 2,51 (t, 3'-H, 5'-H), 2,81 (sept, 1H, 1-CH(CH₃)₂), 2,99 (s, 3H, 1''-CH₃), 3,58 (t, 2'-H, 6'-H), 5,40 (d, 2H, 2-H, 6-H), 5,62 (d, 2H, 3-H, 5-H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 19,15 (-CH₃), 22,34 (1-CH(CH₃)₂), 31,36 (C-1''), 33,22 (1-CH(CH₃)₂), 46,10 (C-1^V), 47,50 (C-2', C-6'), 54,61 (C-3', C-5'), 87,49 (C-1'''), 97,94 (C-1^{IV}), 115,35 (C-2, C-6), 117,20 (C-3, C-5), 135,50 (C-4), 136,38 (C-1), 159,65 (C-5'''), 164,34 (C-2'''). [148]

2.3.5 Добијање [(η^6 -*p*-цимен)-(5-метиламино)-3-морфолин-4-илизотиазол-4-карбонитрил]дихлоридорутенијум(II)],
[Ru(η^6 -*p*-суптене)Cl₂(5-МА-3-MorphCN-ITZ)] (10)

Смеша [Ru(η^6 -*p*-суптене)Cl₂]₂ (0,0998 g; 0,163 mmol) и 5-МА-3-MorphCN-ITZ (3) (0,2242 g; 1 mmol) у толуену (15 mL) је рефлугована 3 h на 110 °C. Након рефлугована, раствор је охлађен, при чему се издвајају наранџасти кристали. Принос: 0,085 g (16,02%). Тачка топљења: 216 °C. Израчунато за C₁₉H₂₅Cl₂N₄ORuS (M = 529,46 g mol⁻¹): C, 43,10; H, 4,76; N, 10,58%; нађено: C, 43,41; H, 4,92; N, 10,46%. IR (KBr, ν_{max}/cm^{-1}) 3432 (ν_{CH}), 2969, 2923 (ν_{CH}), 2228 ($\nu_{C=N}$), 1567 ($\nu_{C=C}$). UV-Vis (CH₃OH, $c = 2 \cdot 10^{-3}$ M): λ_{max}/nm ($\epsilon/dm^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 337 (1118), 430 (654). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,36 (d, 6H, CH₃), 2,16 (s, 3H, 1''-CH₃), 2,32 (s, 3H, 4-CH₃), 2,92 (sept, 1H, 1-CH(CH₃)₂), 3,50 (t, 2'-H, 6'-H), 3,78 (t, 5'-H, 3'-H), 5,41 (d, 2H, 2-H, 6-H), 5,62 (d, 2H, 3-H, 5-H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 19,09 (-CH₃), 22,42 (1-CH(CH₃)₂), 31,38 (C-1''), 33,23 (1-CH(CH₃)₂), 48,00 (C-2', C-6'), 66,42 (C-3', C-5'), 80,59 (C-1'''), 83,45 (C-1^{IV}), 96,75 (C-2, C-6), 98,97 (C-3, C-5), 101,26 (C-4), 102,84 (C-1), 128,16 (C-5'''), 128,97 (C-2'''). [148]

2.3.6 Добијање [(η^6 -*p*-цимен)-(5-фениламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил]дихлоридорутенијум(II)],
[Ru(η^6 -*p*-суптене)Cl₂(5-PhA-3-PyCN-ITZ)] (11)

Смеша [Ru(η^6 -*p*-суптене)Cl₂]₂ (0,0998 g; 0,163 mmol) и 5-PhA-3-PyCN-ITZ (**4**) (0,2704 g; 1 mmol) у толуену (15 mL) је рефлукована 3 h на 110 °C. Након рефлуковања, раствор је охлађен и процеђен. Наранцасти кристали су добијени додатком етил-ацетата. Принос: 0,202 g (32,94%). Тачка топљења: 223 °C. Израчунато за C₂₄H₂₈Cl₂N₄RuS (M=576,54 g mol⁻¹): C, 50,00; H, 4,90; N, 9,72%; нађено: C, 50,36; H, 4,81; N, 9,88%. IR (KBr, ν_{max}/cm^{-1}) 3419 (ν_{CH}), 2962 (ν_{CH}), 2235 ($\nu_{C=N}$), 1558, 1533 ($\nu_{C=C}$). UV-Vis (CH₃OH, c = 2·10⁻³ M): λ_{max}/nm ($\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$): 429 (600). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,39 (d, 6H, CH₃), 2,00 (m, 3'-H, 4'-H), 2,36 (s, 3H, 4-CH₃), 2,96 (sept, 1H, 1-CH(CH₃)₂), 3,66 (m, 2'-H, 5'-H), 5,44 (d, 2H, 2-H, 6-H), 5,66 (d, 2H, 3-H, 5-H), 7,08-7,40 (m, 5-H, Ar). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 19,17 (-CH₃), 22,45 (1-CH(CH₃)₂), 25,60 (C-3', C-4'), 31,41 (1-CH(CH₃)₂), 48,38 (C-5', C-2'), 80,57 (C-1^{III}), 81,52 (C-1^{IV}), 83,46 (C-2^{III}), 96,75 (C-2, C-6), 99,14 (C-3, C-5), 101,23 (C-4), 102,96 (C-1), 118,74 (C-2^{II}, C-6^{II}), 124,36 (C-4^{II}), 129,59 (C-3^{II}, C-5^{II}), 139,43 (C-1^{II}), 156,54 (C-5^{II}). [149]

2.3.7 Добијање [(η^6 -*p*-цимен)-3-морфолин-4-ил-5-(фениламино)изотиазол-4-карбонитрил]дихлоридорутенијум(II)],
[Ru(η^6 -*p*-суптене)Cl₂(3-Morph-5-PhACN-ITZ)] (12)

Смеша [Ru-(η^6 -*p*-суптене)Cl₂]₂ (0,0998 g; 0,163 mmol) и 3-Morph-5-PhACN-ITZ (**5**) (0,2864 g; 1 mmol) у толуену (15 mL) је рефлукована 3 h на 110 °C. Након рефлуковања, раствор је охлађен, при чему се издваја наранцасти пудераст талог. Принос: 0,276 g (46,65%). Тачка топљења: 187 °C. Израчунато за C₂₄H₂₇Cl₂N₄ORuS (M = 591,54 g mol⁻¹): C, 48,73; H, 4,60; N, 9,47%; нађено: C, 48,58; H, 4,43; N, 9,65%. IR (KBr, ν_{max}/cm^{-1}) 3431 (ν_{CH}), 2854 (ν_{CH}), 2237 ($\nu_{C=N}$), 1558 ($\nu_{C=C}$). UV-Vis (CH₃OH, c = 2·10⁻³ M): λ_{max}/nm ($\epsilon/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}$): 431 (553). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1,39 (d, 6H, CH₃), 2,36 (s, 3H, 4-CH₃), 2,98 (sept, 1H, 1-CH(CH₃)₂), 3,56 (t, 2'-H, 6'-H), 3,82 (t, 3'-H, 5'-H), 5,47 (d, 2H, 2-H, 6-H), 5,66 (d, 2H, 3-H, 5-H), 7,11-7,42 (m, 5H, Ar). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 22,52 (-CH₃), 25,48 (1-CH(CH₃)₂), 31,46 (1-CH(CH₃)₂), 48,11 (C-2', C-6'), 66,40 (C-3', C-5'), 80,55 (C-1^{III}), 81,30 (C-1^{IV}), 83,57 (C-2^{III}), 96,73 (C-2, C-6), 99,27 (C-3, C-5), 101,52 (C-4), 103,36 (C-1), 118,99 (C-2^{II}, C-6^{II}), 124,82 (C-4^{II}), 129,72 (C-3^{II}, C-5^{II}), 139,18 (C-1^{II}), 147,91 (C-5^{II}) [149].

2.4 Елементална микроанализа

За новосинтетисане комплексе **6** – **12**, микроанализе за С, Н и N рађене су у Микроаналитичком одељењу Хемијског факултета, Универзитета у Београду.

2.5 Тачка топљења

Тачке топљење су мерене на Stuart апарату са тачношћу $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.6 Инфрацрвени спектри

За снимање инфрацрвених спектра свих комплекса, у области $400 - 4000\text{ cm}^{-1}$, коришћен је Perkin-Elmer FTIR спектрофотометар Spectrum One (KBr-техника).

2.7 Електронски апсорпциони спектри

Електронски апсорпциони спектри свих комплекса су снимљени применом UV-Vis спектрофотометра Cary 300 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Спектри комплекса **6** и **7** су снимљени у води као растварачу у концентрацији $1 \cdot 10^{-4}\text{ M}$, док су спектри за остале комплексе снимани у метанолу у концентрацији $2 \cdot 10^{-3}\text{ M}$.

2.8 NMR спектри (^1H и ^{13}C)

За снимање NMR спектра свих комплекса коришћен је Varian Gemini 200 MHz NMR спектрометар. Као растварачи коришћени су D_2O и CDCl_3 у присуству TSP (триметилсилил пропанска киселина) (за комплекс **6**) или TMS (тетраметилсилан) као референтног стандарда, а положаји сигнала су изражени као δ (ppm).

2.9 Рендгенске структурне анализе

2.9.1 Рендгенска структурна анализа за 5-(метиламино)-3-пирролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил, 5-МА-3-ПуCN-ITZ (**1**)

Кристалографски подаци монокристала лиганда **1** [148] су добијени коришћењем Rigaku (Oxford Diffraction) Gemini S дифрактометра са CCD детектором ($\lambda_{\text{MoK}\alpha} = 0,71073 \text{ \AA}$, монокроматор: графит) на 293 К. Софтверски пакети CrysAlisPro и CrysAlis RED [150] су коришћени за прикупљање и интеграцију података. Анализа интегрисаних података није открила распад. Подаци су кориговани за апсорпционе ефекте применом Multi-scan апсорпционе корекције [151]. Структура је решена и утачњавана применом SHELXT и SHELXL-2014/6 програма [152]. Сви прорачуни су извршени применом програма PLATON [153], MERCURY [154] је коришћен за графички приказ молекула комплекса, а све имплементирано у WinGX систем програма [155]. Утачњавање full-matrix методом најмањих квадрата извршено је минимизирањем ($F_o^2 - F_c^2$). Атоми различити од водоника су утачњавани анизотропно. Атоми водоника везани за угљеникове атоме у метил, метилен и метин групама су постављени у геометријски идеализоване положаје и утачњавани употребом „riding” модела, где су C–H(CH₃) = 0,96 Å са $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,5 U_{\text{eq}}(\text{C})$, C–H(CH₂) = 0,97 Å са $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,2 U_{\text{eq}}(\text{C})$ и C–H(CH) = 0,98 Å with $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,2 U_{\text{eq}}(\text{C})$. Положаји свих осталих водоникових атома су узети из ΔF мапе и утачњавани као „riding”, док је њихов U_{iso} рафинисан. Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања су дати у Табели 1.

Табела 1. Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре 5-МА-3-ПуCN-ITZ лиганда **1** [148]

Емпиријска формула	C₉H₁₂N₄S
Молекулска маса	208,29
Кристални систем, просторна група	Моноклинични, P2₁/n
a (Å), b (Å), c (Å)	5,0296 (5), 10,7663 (5), 19,2282 (13)
α, β, γ (°)	90, 93,837 (6), 90
Запремина јединичне ћелије (Å ³)	1038,88 (13)
Z	4
μ (mm ⁻¹)	0,28
Кристална форма, боја	призма, наранџаста
Димензије кристала (mm)	0,42 x 0,21 x 0,18
T _{min} , T _{max}	0,979, 1,000
Број измерених, независних и уочених рефлексија	3684, 1818, 1373
R _{int}	0,023
θ вредности (°)	$\theta_{\text{max}} = 25,0, \theta_{\text{min}} = 2,8$
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0,060, 0,158, 1,08
Број рефлексија	1818
Број параметара	132
Број ограничења	0
$\Delta\rho_{\text{max}}, \Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å ⁻³)	0,26, -0,25
CCDC број	1939951

2.9.2 Рендгенска структурна анализа за 5-(метиламино)-3-(4-метил пиперазин-1-ил)изотиазол-4-карбонитрил, 5-МА-4-МРipCN-ITZ (2)

Кристалнографски подаци монокристала лиганда **2** [148] су добијени коришћењем Rigaku (Oxford Diffraction) Gemini S дифрактометра са CCD детектором ($\lambda_{\text{MoK}\alpha} = 0,71073 \text{ \AA}$, монокроматор: графит) на 293 К. Софтверски пакети CrysAlisPro и CrysAlis RED [150] коришћени су за прикупљање и интеграцију података. Анализа интегрисаних података није открила распад. Подаци су кориговани за апсорпционе ефекте применом Multi-scan апсорпционе корекције [151]. Структура је решена и утачњавана применом SHELXT и SHELXL-2014/6 програма [152]. Сви прорачуни су извршени применом програма PLATON [153], MERCURY [154] је искоришћен за графички приказ молекула комплекса, а све имплементирано у WinGX систем програма [155]. Утачњавање full-matrix методом најмањих квадрата извршено је минимизирањем ($F_o^2 - F_c^2$). Атоми различити од водоника су утачњавани анизотропно. Атоми водоника везани за угљеникове атоме у метил, метилен и метин групама постављени су у геометријски идеализоване положаје и утачњавани употребом „riding” модела, где су C–H(CH₃) = 0,96 Å са $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,5 U_{\text{eq}}(\text{C})$, C–H(CH₂) = 0,97 Å са $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,2 U_{\text{eq}}(\text{C})$ и C–H(CH) = 0,98 Å with $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,2 U_{\text{eq}}(\text{C})$. Положаји свих осталих водоникових атома су узети из ΔF мапе и утачњавани као „riding”, док је њихов U_{iso} рафинисан. Основни кристалнографски подаци и параметри утачњавања су дати у Табели 2.

Табела 2. Основни кристалнографски подаци и параметри утачњавања структуре 5-МА-4-МРipCN-ITZ лиганда **2** [148]

Емпиријска формула	C₁₀H₁₅N₅S
Молекулска маса	237,33
Кристални систем, просторна група	Моноклинични, P2₁/n
a (Å), b (Å), c (Å)	10,2794 (9), 5,0985 (4), 22,9490 (18)
α, β, γ (°)	90, 96,137 (8), 90
Запремина јединичне ћелије (Å ³)	1195,9 (13)
Z	4
μ (mm ⁻¹)	0,25
Кристална форма, боја	призма, наранџаста
Димензије кристала (mm)	0,52 x 0,33 x 0,24
T _{min} , T _{max}	0,978, 1,000
Број измерених, независних и уочених рефлексија	3980, 2095, 1828
R _{int}	0,018
θ вредности (°)	$\theta_{\text{max}} = 25,0, \theta_{\text{min}} = 3,2$
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0,041, 0,100, 1,08
Број рефлексија	2095
Број параметара	151
Број ограничења	0
$\Delta\rho_{\text{max}}, \Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å ⁻³)	0,17, -0,17
CCDC број	1939952

2.9.3 Рендгенска структурна анализа за 5-(метиламино)-3-морфолин-4-илизотиазол-4-карбонитрил, 5-МА-3-MorphCN-ITZ (3)

Кристалнографски подаци монокристала лиганда **3** [148] су добијени коришћењем Rigaku (Oxford Diffraction) Gemini S дифрактометра са CCD детектором ($\lambda_{\text{MoK}\alpha} = 0,71073 \text{ \AA}$, монокроматор: графит) на 293 К. Софтверски пакети CrysAlisPro и CrysAlis RED [150] коришћени су за прикупљање и интеграцију података. Анализа интегрисаних података није открила распад. Подаци су кориговани за апсорпционе ефекте применом Multi-scan апсорпционе корекције [151]. Структура је решена и утачњавана применом SHELXT и SHELXL-2014/6 програма [152]. Сви прорачуни су извршени применом програма PLATON [153], MERCURY [154] је искоришћен за графички приказ молекула комплекса, а све имплементирано у WinGX систем програма [155]. Утачњавање full-matrix методом најмањих квадрата извршено је минимизирањем ($F_o^2 - F_c^2$). Атоми различити од водоника су утачњавани анизотропно. Атоми водоника везани за угљеникове атоме у метил, метилен и метин групама постављени су у геометријски идеализоване положаје и утачњавани употребом „riding” модела, где су C–H(CH₃) = 0,96 Å са $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,5 U_{\text{eq}}(\text{C})$, C–H(CH₂) = 0,97 Å са $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,2 U_{\text{eq}}(\text{C})$ и C–H(CH) = 0,98 Å with $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,2 U_{\text{eq}}(\text{C})$. Положаји свих осталих водоникових атома су узети из ΔF мапе и рафинисани као „riding”, док је њихов U_{iso} рафинисан. Основни кристалнографски подаци и параметри утачњавања су дати у Табели 3.

Табела 3. Основни кристалнографски подаци и параметри утачњавања структуре 5-МА-3-MorphCN-ITZ лиганда **3** [148]

Емпиријска формула	C₉H₁₂N₄OS
Молекулска маса	224,29
Кристални систем, просторна група	Триклинични, P1
a (Å), b (Å), c (Å)	5,0070 (3), 10,2188 (6), 11,5523 (8)
α, β, γ (°)	67,480 (6), 83,249 (5), 77,024 (5)
Запремина јединичне ћелије (Å ³)	531,74 (6)
Z	2
μ (mm ⁻¹)	0,28
Кристална форма, боја	призма, безбојна
Димензије кристала (mm)	0,58 x 0,33 x 0,27
T _{min} , T _{max}	0,993, 1,000
Број измерених, независних и уочених рефлексија	7801, 2531, 2082⁷
R _{int}	0,024
θ вредности (°)	$\theta_{\text{max}} = 29,3, \theta_{\text{min}} = 3,4$
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0,038, 0,098, 1,06
Број рефлексија	2531
Број параметара	141
Број ограничења	0
$\Delta\rho_{\text{max}}, \Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å ⁻³)	0,23, -0,23
CCDC број	1939953

2.9.4 Рендгенска структурна анализа за 5-(фениламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил, 5-PhA-3-PyCN-ITZ (4)

Кристаллографски подаци монокристала лиганда **4** [149] су добијени коришћењем Rigaku (Oxford Diffraction) Gemini S дифрактометра са CCD детектором ($\lambda_{\text{MoK}\alpha} = 0,71073 \text{ \AA}$, монокроматор: графит) на 293 К. Софтверски пакети CrysAlisPro и CrysAlis RED [150] коришћени су за прикупљање и интеграцију података. Анализа интегрисаних података није открила распад. Подаци су кориговани за апсорпционе ефекте применом Multi-scan апсорпционе корекције [151]. Структура је решена и утачњавана применом SHELXT [152] и SHELXL-2018/3 програма [156]. Сви прорачуни су извршени применом програма PLATON [153], MERCURY [154] је искоришћен за графички приказ молекула комплекса, а све имплементирано у WinGX систем програма [155]. Утачњавање full-matrix методом најмањих квадрата извршено је минимизирањем ($F_o^2 - F_c^2$). Атоми различити од водоника су утачњавани анизотропно. Атоми водоника везани за угљеникове атоме у метил, метилен и метин групама постављени су у геометријски идеализоване положаје и утачњавани употребом „riding” модела, где су C–H(CH₃) = 0,96 Å са $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,5 U_{\text{eq}}(\text{C})$, C–H(CH₂) = 0,97 Å са $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,2 U_{\text{eq}}(\text{C})$ и C–H(CH) = 0,98 Å with $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,2 U_{\text{eq}}(\text{C})$. Положаји свих осталих водоникових атома су узети из ΔF мапе и рафинисани као „riding”, док је њихов U_{iso} рафинисан. Основни кристаллографски подаци и параметри утачњавања су дати у Табели 4.

Табела 4. Основни кристаллографски подаци и параметри утачњавања структуре 5-PhA-3-PyCN-ITZ лиганда **4** [149]

Емпиријска формула	C₁₄H₁₄N₄S
Молекулска маса	270,35
Кристални систем, просторна група	Моноклинични, P2₁/n
a (Å), b (Å), c (Å)	8,8059 (4), 14,1157 (10), 11,1446 (8)
α, β, γ (°)	90, 106,619 (6), 90
Запремина јединичне ћелије (Å ³)	1327,42 (15)
Z	4
μ (mm ⁻¹)	0,24
Кристална форма, боја	призма, безбојна
Димензије кристала (mm)	0,57 x 0,31 x 0,27
T _{min} , T _{max}	0,960, 1,000
Број измерених, независних и уочених рефлексија	5986, 3060, 2128
R _{int}	0,028
θ вредности (°)	$\theta_{\text{max}} = 29,3, \theta_{\text{min}} = 2,4$
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0,052, 0,128, 1,03
Број рефлексија	3060
Број параметара	176
Број ограничења	0
$\Delta\rho_{\text{max}}, \Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å ⁻³)	0,26, -0,19
CCDC број	1985935

2.9.5 Рендгенска структурна анализа за 3-морфолин-4-ил-5-(фениламино)изотиазол-4-карбонитрил, 3-Morph-5-PhACN-ITZ (5)

Кристаллографски подаци монокристала лиганда **5** [149] су добијени коришћењем Rigaku (Oxford Diffraction) Gemini S дифрактометра са CCD детектором ($\lambda_{\text{MoK}\alpha} = 0,71073 \text{ \AA}$, монокроматор: графит) на 293 К. Софтверски пакети CrysAlisPro и CrysAlis RED [150] коришћени су за прикупљање и интеграцију података. Анализа интегрисаних података није открила распад. Подаци су кориговани за апсорпционе ефекте применом Multi-scan апсорпционе корекције [151]. Структура је решена и утачњавана применом SHELXT [153] и SHELXL-2018/3 програма [156]. Сви прорачуни су извршени применом програма PLATON [153], MERCURY [154] је искоришћен за графички приказ молекула комплекса, а све имплементирано у WinGX систем програма [155]. Утачњавање full-matrix методом најмањих квадрата извршено је минимизирањем ($F_o^2 - F_c^2$). Атоми различити од водоника су утачњавани анизотропно. Атоми водоника везани за угљеникове атоме у метил, метилен и метин групама постављени су у геометријски идеализоване положаје и утачњавани употребом „riding” модела, где су C–H(CH₃) = 0,96 Å са $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,5 U_{\text{eq}}(\text{C})$, C–H(CH₂) = 0,97 Å са $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,2 U_{\text{eq}}(\text{C})$ и C–H(CH) = 0,98 Å with $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1,2 U_{\text{eq}}(\text{C})$. Положаји свих осталих водоникових атома су узети из ΔF мапе и рафинисани као „riding”, док је њихов U_{iso} рафинисан. Основни кристаллографски подаци и параметри утачњавања су дати у Табели 5.

Табела 5. Основни кристаллографски подаци и параметри утачњавања структуре 3-Morph-5-PhACN-ITZ лиганда 5 [149]	
Емпиријска формула	C₁₄H₁₄N₄OS
Молекулска маса	286,35
Кристални систем, просторна група	Моноклинични, P2₁/c
a (Å), b (Å), c (Å)	5,3030 (5), 16,0618 (15), 15,9203 (13)
α, β, γ (°)	90, 97,619 (6), 90
Запремина јединичне ћелије (Å ³)	1344,1 (2)
Z	4
μ (mm ⁻¹)	0,24
Кристална форма, боја	призма, безбојна
Димензије кристала (mm)	0,59 x 0,27 x 0,21
T _{min} , T _{max}	0,893, 1,000
Број измерених, независних и уочених рефлексија	6309, 3095, 2118
R _{int}	0,030
θ вредности (°)	$\theta_{\text{max}} = 29,2, \theta_{\text{min}} = 2,5$
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0,047, 0,105, 1,01
Број рефлексија	3095
Број параметара	185
Број ограничења	0
$\Delta\rho_{\text{max}}, \Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å ⁻³)	0,22, -0,26
CCDC број	1985936

2.9.6 Рендгенска структурна анализа за $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-супене})(N\text{-MeIm})_3]Cl_2 \cdot 2H_2O$ (6)

Кристаллографски подаци монокристала комплекса 6 [147] су добијени коришћењем Oxford Diffraction Gemini S дифрактометра са CCD детектором ($\lambda_{MoK\alpha} = 0,71073 \text{ \AA}$, монокроматор: графит) на 293 К. Софтверски пакети CrysAlisPro и CrysAlis RED [150] су коришћени за прикупљање и интеграцију података. Подаци су кориговани за апсорпционе ефекте применом Нумеричке апсорпционе корекције засноване на Гаусијановој (Gaussian) интеграцији преко вишеструког кристалног модела [150]. Структура је решена и утачњавана применом SHELXT и SHELXL-2014/6 програма [152]. Софтвери ORTEP-3 [157] и MERCURY [154] су коришћени за графички приказ молекула комплекса, а WinGX је коришћен за припрему материјала за публикацију [155]. Утачњавање full-matrix методом најмањих квадрата извршено је минимизирањем ($F_o^2 - F_c^2$). Атоми различити од водоника су утачњавани анизотропно без геометријских или ADP ограничења. Атоми водоника везани за угљеникове атоме у метил групама су постављени у геометријски идеализоване положаје и утачњавани употребом „riding” модела: C-H = 0,96 \AA и $U_{iso}(\text{H}) = 1,5 U_{eq}(\text{C})$. Положаји свих осталих водоникових атома су узети из ΔF мапе и утачњавани као „riding”, док је њихов U_{iso} рафинисан. Основни кристаллографски подаци и параметри утачњавања су дати у Табели 6.

Табела 6. Основни кристаллографски подаци и параметри утачњавања структуре $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-супене})(N\text{-MeIm})_3]Cl_2 \cdot 2H_2O$ комплекса 6 [147]

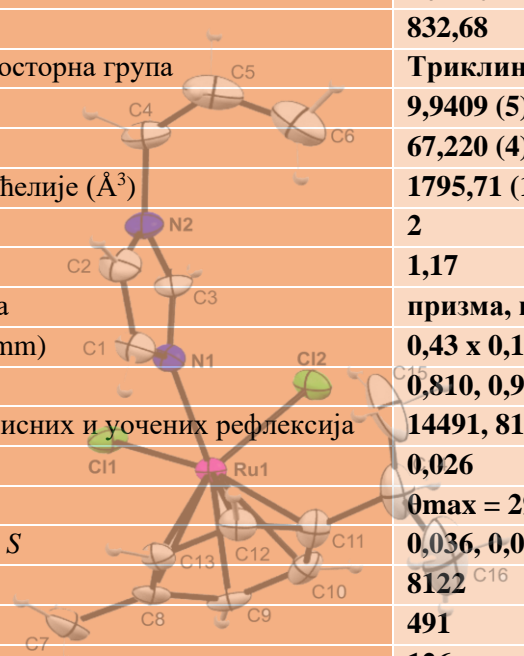
Емпиријска формула	C₂₂H₃₆Cl₂N₆O₂Ru
Молекулска маса	588,54
Кристални систем, просторна група	Моноклинични, P2₁/c
a (\AA), b (\AA), c (\AA)	8,61484 (15), 17,3362 (3), 18,2674 (3)
α , β , γ ($^\circ$)	90, 98,3299 (15), 90
Запремина јединичне ћелије (\AA^3)	2699,43 (8)
Z	4
μ (mm^{-1})	0,81
Кристална форма, боја	призма, жута
Димензије кристала (mm)	0,25 x 0,19 x 0,15
T _{min} , T _{max}	0,885, 0,910
Број измерених, независних и уочених рефлексија	10260, 4740, 4155
R _{int}	0,021
θ вредности ($^\circ$)	$\theta_{max} = 25,0$, $\theta_{min} = 3,0$
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$, wR(F ²), S	0,029, 0,070, 1,04
Број рефлексија	4740
Број параметара	372
Број ограничења	4
$\Delta\rho_{max}$, $\Delta\rho_{min}$ ($e \text{ \AA}^{-3}$)	0,34, -0,29
CCDC број	1835000

2.9.7 Рендгенска структурна анализа за $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-}PrIm)Cl_2]$ (7)

Применом Oxford Diffraction Gemini S дифрактометра са CCD детектором ($\lambda_{MoK\alpha} = 0,71073 \text{ \AA}$, монокроматор: графит) на 293 K добијени су кристалографски подаци монокристала комплекса **7** [147]. Софтверски пакети CrysAlisPro и CrysAlis RED [150] коришћени су за прикупљање и интеграцију података. Подаци су кориговани за апсорпционе ефекте применом аналитичке нумеричке апсорпционе корекције применом вишеструког кристалног модела [158]. Структура је решена и утачњавана применом SHELXT и SHELXL-2014/6 програма [152]. Софтвери ORTEP-3 [157] и MERCURY [154] су коришћени за графички приказ молекула комплекса, а WinGX је коришћен за припрему материјала за публикацију [155]. Утачњавање full-matrix методом најмањих квадрата извршено је минимизирањем ($F_o^2 - F_c^2$). Атоми различити од водоника су утачњавани анизотропно без геометријских или ADP ограничења. Атоми водоника везани за угљеникове атоме у метил групама постављени су у геометријски идеализоване положаје и утачњавани употребом „riding” модела: C-H = 0,96 \AA и $U_{iso} (H) = 1,5 U_{eq} (C)$. Водоникови атоми су третирани комбинацијом независног и ограниченог утачњавања. Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања су дати у Табели 7.

Табела 7. Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-}PrIm)Cl_2]$ комплекса **7** [147]

Емпиријска формула	$C_{32}H_{48}Cl_4N_4Ru_2$
Молекулска маса	832,68
Кристални систем, просторна група	Триклинични, <i>P</i> -1
<i>a</i> (\AA), <i>b</i> (\AA), <i>c</i> (\AA)	9,9409 (5), 13,0337 (5), 15,5195 (7)
α , β , γ ($^\circ$)	67,220 (4), 85,967 (4), 75,689 (4)
Запремина јединичне ћелије (\AA^3)	1795,71 (15)
<i>Z</i>	2
μ (mm^{-1})	1,17
Кристална форма, боја	призма, наранџаста
Димензије кристала (mm)	0,43 x 0,10 x 0,03
T_{min} , T_{max}	0,810, 0,964
Број измерених, независних и уочених рефлексija	14491, 8122, 5901
R_{int}	0,026
θ вредности ($^\circ$)	$\theta_{max} = 29,1$, $\theta_{min} = 2,5$
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$, $wR(F^2)$, <i>S</i>	0,036, 0,067, 0,98
Број рефлексija	8122
Број параметара	491
Број ограничења	126
$\Delta\rho_{max}$, $\Delta\rho_{min}$ ($e \text{ \AA}^{-3}$)	0,53, -0,35
CCDC број	1835001



2.9.8 Рендгенска структурна анализа за $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-сyтeнe})Cl_2(5\text{-}MA\text{-}3\text{-}PyCN\text{-}ITZ)]\cdot H_2O$ (8)

Кристалографски подаци монокристала комплекса **8** [148] су добијени коришћењем Rigaku (Oxford Diffraction) Gemini S дифрактометра са CCD детектором ($\lambda_{MoK\alpha} = 0,71073 \text{ \AA}$, монокроматор: графит) на 293 К. Софтверски пакети CrysAlisPro и CrysAlis RED [150] коришћени су за прикупљање и интеграцију података. Анализа интегрисаних података није указала на разлагање испитиваног једињења. Подаци су кориговани за апсорпционе ефекте применом Нумеричке апсорпционе корекције засноване на Гаусијановој (Gaussian) интеграцији [159] преко вишеструког кристалног модела. Структура је решена и утачњавана применом SHELXT и SHELXL-2014/6 програма [152]. Сви прорачуни су извршени применом програма PLATON [153], MERCURY [154] је искоришћен за графички приказ молекула комплекса, а све имплементирано у WinGX систем програма [155]. Утачњавање full-matrix методом најмањих квадрата извршено је минимизирањем ($F_o^2 - F_c^2$). Атоми различити од водоника су утачњавани анизотропно. Атоми водоника везани за угљеникове атоме у метил, метилен и метин групама постављени су у геометријски идеализоване положаје и утачњавани употребом „riding” модела, где су C–H(CH₃) = 0,96 Å са $U_{iso}(H) = 1,5 U_{eq}(C)$, C–H(CH₂) = 0,97 Å са $U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(C)$ и C–H(CH) = 0,98 Å with $U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(C)$. Положаји свих осталих водоникових атома су узети из ΔF мапе и утачњавани као „riding”, док је њихов U_{iso} рафинисан. Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања су дати у Табели 8.

Табела 8. Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-сyтeнe})Cl_2(5\text{-}MA\text{-}3\text{-}PyCN\text{-}ITZ)]\cdot H_2O$ комплекса **8** [148]

Емпиријска формула	C₁₉H₂₈Cl₂N₄ORuS
Молекулска маса	532,48
Кристални систем, просторна група	Триклинични, P1
a (Å), b (Å), c (Å)	8,498 (5), 10,123 (5), 14,094 (5)
α, β, γ (°)	102,726 (5), 94,308 (5), 102,265 (5)
Запремина јединичне ћелије (Å ³)	1146,2 (10)
Z	2
μ (mm ⁻¹)	1,02
Кристална форма, боја	призма, црвена
Димензије кристала (mm)	0,36 x 0,28 x 0,12
T _{min} , T _{max}	0,788, 0,915
Број измерених, независних и уочених рефлексија	7613, 4007, 3528
R _{int}	0,020
θ вредности (°)	$\theta_{max} = 25,0, \theta_{min} = 3,0$
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0,034, 0,075, 1,09
Број рефлексија	4007
Број параметара	372
Број ограничења	4
$\Delta\rho_{max}, \Delta\rho_{min}$ (e Å ⁻³)	0,59, -0,64
CCDC број	1939949

2.9.9 Рендгенска структурна анализа за $[Ru(\eta^6-p\text{-сумене})Cl_2(5\text{-МА-3-MorphCN-ITZ})]$ (**10**)

Применом Rigaku (Oxford Diffraction) Gemini S дифрактометра са CCD детектором ($\lambda_{MoK\alpha} = 0,71073 \text{ \AA}$, монохроматор: графит) на 293 К добијени су кристалографски подаци монокристала комплекса **10** [148]. Софтверски пакети CrysAlisPro и CrysAlis RED [150] су коришћени за прикупљање и интеграцију података. Анализа интегрисаних података није указала на разлагање испитиваног једињења. Подаци су кориговани за апсорпционе ефекте применом аналитичке Нумеричке апсорпционе корекције применом вишеструког кристалног модела [158]. Структура је решена и утачњавана применом SHELXT и SHELXL-2014/6 програма [152]. Сви прорачуни су извршени применом програма PLATON [153], MERCURY [154] је искоришћен за графички приказ молекула комплекса, а све имплементирано у WinGX систем програма [155]. Утачњавање full-matrix методом најмањих квадрата извршено је минимизирањем ($F_o^2 - F_c^2$). Атоми различити од водоника су утачњавани анизотропно. Атоми водоника везани за угљеникове атоме у метил, метилен и метин групама су постављени у геометријски идеализоване положаје и утачњавани употребом „riding” модела, где су C–H(CH₃) = 0,96 Å са $U_{iso}(H) = 1,5 U_{eq}(C)$, C–H(CH₂) = 0,97 Å са $U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(C)$ и C–H(CH) = 0,98 Å са $U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(C)$. Положаји свих осталих водоникових атома су узети из ΔF мапе и утачњавани као „riding”, док је њихов U_{iso} рафинисан. Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања су дати у Табели 9.

Табела 9. Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре $[Ru(\eta^6-p\text{-сумене})Cl_2(5\text{-МА-3-MorphCN-ITZ})]$ комплекса **10** [148]

Емпиријска формула	C₁₉H₂₆Cl₂N₄ORuS
Молекулска маса	530,47
Кристални систем, просторна група	Моноклинични, P2₁/n
a (Å), b (Å), c (Å)	12,5788 (3), 10,1246 (2), 17,3679 (4)
α, β, γ (°)	90, 90,126 (2), 90
Запремина јединичне ћелије (Å ³)	2211,89 (9)
Z	4
μ (mm ⁻¹)	1,06
Кристална форма, боја	призма, црвена
Димензије кристала (mm)	0,27 x 0,06 x 0,05
T _{min} , T _{max}	0,804, 0,950
Број измерених, независних и уочених рефлексија	9974, 3875, 3192
R _{int}	0,035
θ вредности (°)	θ_{max} = 25,0, θ_{min} = 3,5
R[F ² > 2σ(F ²)], wR(F ²), S	0,034, 0,080, 1,03
Број рефлексија	3875
Број параметара	288
Број ограничења	0
Δρ _{max} , Δρ _{min} (e Å ⁻³)	0,73, -0,59
CCDC број	1939950

2.9.10 Рендгенска структурна анализа за $[Ru(\eta^6-p\text{-сутене})Cl_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$ (**11**)

Применом Rigaku (Oxford Diffraction) Gemini S дифрактометра са CCD детектором ($\lambda_{MoK\alpha} = 0,71073 \text{ \AA}$, монохроматор: графит) на 293 K добијени су кристалографски подаци монокристала комплекса **11** [149]. Софтверски пакети CrysAlisPro и CrysAlis RED [150] су коришћени за прикупљање и интеграцију података. Анализа интегрисаних података није указала на разлагање испитиваног једињења. Подаци су кориговани за апсорпционе ефекте применом аналитичке Нумеричке апсорпционе корекције применом вишеструког кристалног модела [158]. Структура је решена и утачњавана применом SHELXT [152] и SHELXL-2018/3 програма [156]. Сви прорачуни су извршени применом програма PLATON [153], MERCURY [154] је искоришћен за графички приказ молекула комплекса, а све имплементирано у WinGX систем програма [155]. Утачњавање full-matrix методом најмањих квадрата извршено је минимизирањем ($F_o^2 - F_c^2$). Атоми различити од водоника су утачњавани анизотропно. Атоми водоника везани за угљеникове атоме у метил, метилен и метин групама су постављени у геометријски идеализоване положаје и утачњавани употребом „riding” модела, где су C–H(CH₃) = 0,96 Å са U_{iso}(H) = 1,5 U_{eq}(C), C–H(CH₂) = 0,97 Å са U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(C) и C–H(CH) = 0,98 Å са U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(C). Положаји свих осталих водоникових атома су узети из ΔF мапе и утачњавани као „riding”, док је њихов U_{iso} рафинисан. Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања су дати у Табели 10.

Табела 10. Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре $[Ru(\eta^6-p\text{-сутене})Cl_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$ комплекса 11 [149]	
Емпиријска формула	C₂₄H₂₈Cl₂N₄RuS
Молекулска маса	576,53
Кристални систем, просторна група	Триклинични, P1
a (Å), b (Å), c (Å)	7,3347 (5), 12,3344 (9), 14,6724 (10)
α , β , γ (°)	105,117 (6), 101,962 (6), 97,219 (6)
Запремина јединичне ћелије (Å ³)	1230,73 (16)
Z	2
μ (mm ⁻¹)	0,96
Кристална форма, боја	призма, наранџаста
Димензије кристала (mm)	0,44 x 0,04 x 0,04
T _{min} , T _{max}	0,825, 0,967
Број измерених, независних и уочених рефлексја	8537, 4326, 3821
R _{int}	0,024
θ вредности (°)	$\theta_{max} = 25,0$, $\theta_{min} = 2,9$
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$, wR(F ²), S	0,030, 0,065, 1,06
Број рефлексја	4326
Број параметара	296
Број ограничења	0
$\Delta\rho_{max}$, $\Delta\rho_{min}$ (e Å ⁻³)	0,32, -0,28
CCDC број	1985937

2.10 Флуоресцентна мерења

Снимањем емисионих флуоресцентних спектра испитиване су интеракције лиганда и комплекса са молекулима ДНК који је изолован из грудне жлезде телета (СТ-DNA) и са албумином хуманог серума (HSA). Флуоресцентни спектри су снимани на RF-1501 PC спектрофотометру (Shimadzu, Japan). Бидестилована вода је коришћена за припрему пуфера Tris-HCl и PBS (фосфатни пуфер). Раствор СТ-DNA је припреман у 10 mM Tris-HCl пуферу (pH = 7,4) за комплексе **6-10** [147, 148] и у 10 mM PBS пуферу за комплексе **11** и **12** [149]. Раствори су чувани на 4 °C максимално четири дана. Концентрација СТ-DNA по нуклеотиду је одређена UV апсорпцијом на 260 nm ($\epsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [160]. Чистоћа ДНК је одређена односом апсорбанци на 260 nm и 280 nm. Раствор је показао однос апсорбанци A_{260}/A_{280} изнад 1,80 што указује да је ДНК ослобођена од протеина [161]. Раствор HSA је припреман у 0,01 M PBS пуферу. Полазни раствори испитиваних једињења припремљени су у DMSO.

При испитивању интеракција између испитиваних једињења и СТ-DNA, концентрација СТ-DNA је била константна, док је концентрација испитиваних једињења варијала и то:

- [СТ-DNA] = $1,7 \cdot 10^{-4}$ M, [комплекси **6** и **7**] = 0 - $3,4 \cdot 10^{-5}$ M; ([комплекс]/[СТ-DNA] = 0,0 - 2,0),
- [СТ-DNA] = $1,8 \cdot 10^{-4}$ M, [лиганди **1** – **3**, комплекси **8** – **10**] = 0 - $2,0 \cdot 10^{-4}$ M ([комплекс]/[СТ-DNA] = 0,0 - 11,0),
- [СТ-DNA] = $2,2 \cdot 10^{-5}$ M, [лиганди **4** и **5**, комплекси **11** и **12**] = 0 - $1,3 \cdot 10^{-5}$ M ([комплекс]/[СТ-DNA] = 0,0 - 0,6).

Спектри су снимани на температури од 25 °C у опсегу таласних дужина од 550 - 700 nm са екситацијом на 323 nm, са ширином прореза између екситације и емисије 10 nm.

Испитиване су и компетитивне реакције између једињења и етидијум-бромида (3,8-диамино-5-етил-6-фенилфенантридинијум бромид, EB) везаног за СТ-DNA. Концентрација EB износила је:

- за комплексе **6** и **7** = $1,7 \cdot 10^{-4}$ M, [147]
- за лиганде **1** – **3** и комплексе **8** – **10** = $1,2 \cdot 10^{-4}$ M, [148]
- за лиганде **4** и **5** и комплексе **11** и **12** = $2,0 \cdot 10^{-5}$ M, [149]

док су концентрације испитиваних једињења и СТ-DNA исте као и при испитивању интеракција између испитиваних једињења и СТ-DNA. Температура и интервал спектра је исти као при интеракцијама једињење-СТ-DNA, а екстинција је износила 520 nm.

Флуоресцентни емисиони спектри HSA-испитивано једињење система су снимани у области 300 – 450 nm са екситацијом на 295 nm, при чему је концентрација HSA била константна ($2,0 \cdot 10^{-6}$ M), а концентрација комплекса променљива (0 – $1,6 \cdot 10^{-5}$ M). Ширина прореза између екситације и емисије је била 10 nm. Вредности Стерн-Волмерових константи K_{SV} , које се користе за утврђивање механизма гашења флуоресценције система

DNA-EB у присуству испитиваних једињења [121, 162], израчунате су коришћењем једначине (5):

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (5)$$

где F_0 и F представљају интензитет флуоресценције пре и после додатка комплекса, K_q -биомолекулска константа гашења, τ_0 -време живота флуорофоре у одсуству комплекса ($\tau_0 = 10^{-8}$ s) и $[Q]$ -концентрација лиганда и комплекса.

Применом једначине (6) израчуната је константа стабилности (K_a) и број везујућих места (n) за макромолекулу [147]:

$$\log (F_0 - F)/F = \log K_a + n \log [Q] \quad (6)$$

Вредност K_a се може добити из пресека праве $\log (F_0 - F)/F = f(\log [Q])$ са ординатом, а број везујућих места (n) из нагиба праве.

2.11 Спектрофотометријска мерења

Интеракције једињења са CT-DNA су испитиване и снимањем апсорпционих спектра, а у циљу одређивања могућих начина везивања лиганда и комплекса за молекулу ДНК, као и одређивања константи везивања. Концентрација испитиваних једињења је била константна, док је концентрација CT-DNA варијала и то:

- [комплекси **6** и **7**] = $1,2 \cdot 10^{-4}$ M, [CT-DNA] = 0 - $1,3 \cdot 10^{-5}$ M ([CT-DNA]/[комплекс] = 0,0 - 1,0) [147]
- [лиганди **1** - **3** и комплекси **8** - **10**] = $8,0 \cdot 10^{-5}$ M, [CT-DNA] = 0 - $1,7 \cdot 10^{-4}$ M ([CT-DNA]/[комплекс] = 0,0 - 2,2) [148]
- [лиганди **4** и **5** и комплекси **11** и **12**] = $4,0 \cdot 10^{-5}$ M, [CT-DNA] = 0 - $4,0 \cdot 10^{-5}$ M ([CT-DNA]/[комплекс] = 0,0 - 1,2) [149].

Апсорпциони спектри су снимани у опсегу таласних дужина од 200 до 500 nm.

Константе везивања [163] израчунате су на основу добијених података према једначини (7):

$$\frac{[DNA]}{\epsilon_a - \epsilon_f} = \frac{[DNA]}{\epsilon_b - \epsilon_f} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (7)$$

где су ϵ_f и ϵ_b екстинкциони коефицијенти слободног и везаног комплекса. Из калибрационе криве која је добијена снимањем апсорбанце изолованог комплекса различитих концентрација одређен је екстинкциони коефицијент, ϵ_f . Применом Ламберт-Беровог (Lambert-Beer) закона израчунат је екстинкциони коефицијент, ϵ_a као однос између измерене апсорбанце испитиваног раствора A_{obs} и концентрације комплекса у њему, $A_{obs} - A_{DNA} / [комплекс]$. Посебним експериментом су одређене апсорбанце ДНК, (A_{DNA}) за све испитиване концентрације ДНК. Резултати су приказивани графички као зависност $[CT-DNA] / (\epsilon_a - \epsilon_f)$ од $[CT-DNA]$. Вредност нагиба добијене праве износи $1 / (\epsilon_b - \epsilon_f)$ при чему је

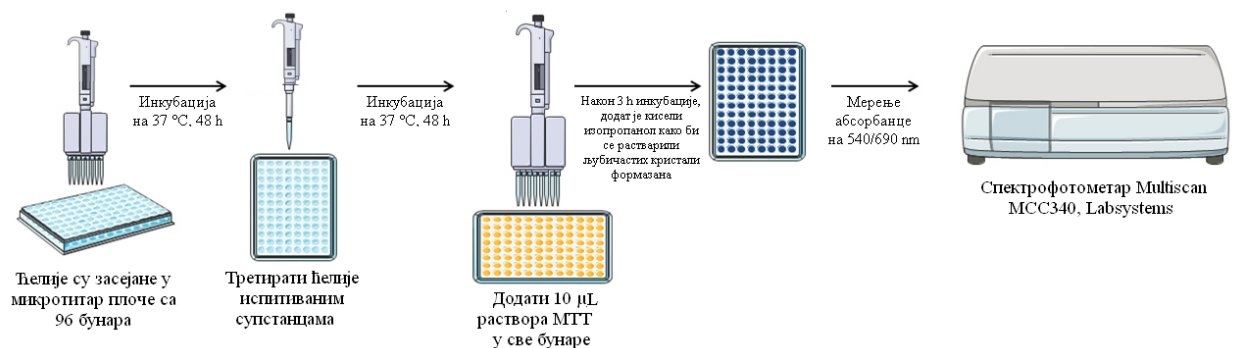
пресек са Y осом једнак $1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)$. Из односа нагиба и пресека добија се константа стабилности (везивања), K_b .

Снимањем апсорпционих спектра испитиване су и интеракције HSA са свим једињењима, осим комплекса **6** и **7** [148, 149]. Апсорпциони спектри HSA-испитивано једињење система су снимани у области 240 - 440 nm, при чему је концентрација HSA била константна ($2,0 \cdot 10^{-6}$ M), а концентрација једињења је била у опсегу од 0 до $1,6 \cdot 10^{-5}$ M. Константе стабилности (K_a) и број везујућих места (n) за макромолекул израчунате су применом једначине (6) [147].

2.12 Биолошки тестови

2.12.1 МТТ тестови

МТТ тест представља колориметријску методу којом се одређује проценат преживелих ћелија, тј. процењује инхибиција раста. Он се заснива на редукцији тетразолијумове соли (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолијумбромид) до формазана, до које долази услед интеракције са митохондријалном дехидрогеназом у вијабилним, метаболички активним ћелијама (Слика 14).



Слика 14. Шематски приказ поступка испитивања цитотоксичности применом МТТ реагенса [164]

У експоненцијалној фази раста туморске ћелије су засејане у микротитар плоче са 96 бунара (Costar) ($10 \cdot 10^3$ или $3 \cdot 10^3$ ћелија по бунару у 100 µL хранљивог медијума) и инкубиране 48 h. Испитиване супстанце и референтна једињења, доксорубицин и цисплатина, додавани су (10 µL/бунар) у све бунаре, осим контролних у концентрацијама које су десет пута веће од финалних и микроплоче су инкубиране 48 h на 37 °C, у атмосфери са 5% CO₂ и zasiћеном воденом паром. Као контрола су коришћени бунари који садрже ћелије без испитиваних супстанци. У све бунаре додат је МТТ 3 h пре краја инкубационог периода и то 10 µL раствора (5 mg/mL) у случају лигананда **1 – 3** и комплекса **6 – 10** [147, 148] или 100 µL раствора (0,5 mg/mL) за лиганде **4** и **5** и комплексе **11** и **12** [149]. У метаболички активним вијабилним ћелијама жути МТТ се редукује до љубичастог формазана, захваљујући активности митохондријалне дехидрогеназе. Након 3 h инкубације на 37 °C, кисели изопропанол (100 µL 0,04 M HCl у изопропанолу) је додат у све бунаре у случају једињења **1 – 3** и **6 – 10**, а за једињења **4, 5, 11** и **12** додат је 150 µL DMSO. После

неколико минута стајања на собној температури, како би се омогућило растварање љубичастих кристала формазана, апсорбанца је мерена на спектрофотометру (Multiscan MCC340, Labsystems) на 540/690 nm за једињења **1 – 3** и **6 – 10**, док је за једињења **4, 5, 11** и **12** мерење вршено на 590 nm применом апарата Zenyth 3100, Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria. Цитотоксичност је израчуната према доле наведеној формули (8), која показује да је количина раствореног формазана директно пропорционална броју живих ћелија:

$$(1-A \text{ узорка}/A \text{ контроле}) \times 100 \quad (8)$$

где је А измерена апсорбанца. Концентрација једињења која инхибира раст ћелија за 50% представља IC₅₀ вредност. Median effect анализом [165] су одређене IC₅₀ вредности испитиваних једињења које показују њихову активност. За сваку концентрацију једињења постављена су по два независна експеримента у квадрипликату (у по 4 бунарића) за једињења **1 – 3** и **6 – 10** [147, 148], док су за једињења **4, 5, 11** и **12** [149] рађена три независна експеримента у трипликату.

Додатно, степен селективности за једињења **4, 5, 11** и **12** је одређен израчунавањем индекса селективности (SI). Индекс селективности за ова једињења израчунат је дељењем IC₅₀ вредности за здраву ћелију (MRC-5) са IC₅₀ вредношћу на туморској ћелији. Индекс селективности мањи од 2 указује на општу токсичност једињења, док једињења са SI ≥ 2 показују селективну токсичност, а једињења са SI ≥ 3 високу селективну токсичност [166].

2.12.2 Третман ћелија за детекцију апоптозе

HeLa ћелије су засејане у микротитар плоче са 6 бунара концентрације 5·10⁵ ћелија/бунар. Ћелије су третиране доксорубицином као референтним једињењем и испитиваним једињењима током 48 h. Нетретиране ћелије су коришћене као контрола. Наведени узорци третираних и контролних ћелија су коришћени за детекцију апоптозе Вестерн блот (Western Blot) анализом. Применом *trypan blue dye-exclusion* теста [167] одређена је вијабилност.

2.12.3 Annexin V-FITC/7-AAD и Annexin V-FLUOS (Annexin V-FITC/PI) тест за одређивање апоптозе и некрозе проточном цитометријом

Врста ћелијске смрти проузроковане једињењима **6, 7, 11** и **12** [147, 149] је одређена коришћењем теста Annexin V-FITC/7-AAD (Beckman Coulter, USA). Према протоколу произвођача изведено је бојење. HeLa ћелије (за једињења **6** и **7**) или HCT-116 ћелије (за једињења **11** и **12**) у концентрацији 1·10⁵ третиране су концентрацијама еквивалентним IC₅₀ вредностима испитиваних једињења, или самим медијумом (контрола). Након инкубације у трајању од 48 h на 37 °C, уз 5% CO₂ и апсолутну влажност, ћелије су сакупљене, испране у PBS пуферу и ресуспендоване у хладном пуферу (везујући пуфер). Ћелије су обојене са 10 μL Annexin V-FITC и 20 μL 7-AAD и инкубиране у мраку на 4 °C у трајању од 15 минута, а након тога је у сваку епрувету додато по 400 μL пуфера. Проточни цитометар (Cytomics FC500, Beckman Coulter, USA) је коришћен за анализирање узорака. Компјутерски програм Flowing Software (<http://www.flowingsoftware.com/>) је коришћен за одређивање процента вијабилних (AnnV-/7AAD-), рано апоптотичних (AnnV+/7AAD-), касно апоптотичних

(AnnV+/7-AAD+) и некротичних ћелија (AnnV-/7-AAD+), а резултати су представљени као dot plot-ови.

Анализа једињења **10** [148] је вршена применом Annexin V-FLUOS теста. HeLa ћелије свих третираних узорака су сакупљене (800 обртаја/5 min, Megafuge 1.0R, Heraeus, Thermo Fisher Scientific) и ресуспендоване у 1 mL фосфатног пуфера (PBS, pH = 7,2). Ћелије су, затим, два пута испране у хладном фосфатном пуферу и ресуспендоване у везујућем пуферу, како би се постигла концентрација $1 \cdot 10^6$ ћелија/mL. Ћелијска суспензија (100 μ L) пребачена је у епрувете за културе и помешана са мешом 5 μ L Annexin V-FITC и 5 μ L пропидијум-јодида. Након лаганог вортексовања ћелија, као и инкубирања у трајању од 15 минута на 25 °C, у сваку епрувету је додато по 400 μ L везујућег пуфера и суспензије су анализирани након 1 h применом FACS Calibur E440 (Becton Dickinson) проточног цитометра. Резултати су представљени као проценат Annexin-V позитивних ћелија. Процент специфичне апоптозе је израчунат према процедури Бендер-а (Bender) [168].

2.12.4 Детекција апоптозе акридин-оранж/етидијум-бромид двоструким бојењем

За анализу типа ћелијске смрти коришћен је флуоресцентни тест двоструког бојења акридин-оранж и етидијум-бромид (АО/ЕВ) [169]. После третмана HeLa ћелија са IC₅₀ вредностима испитиваних комплекса **6** и **7**, 9 μ L HeLa ћелија ($5 \cdot 10^5$ ћелија/mL) је помешано са 1 μ L меше боја АО/ЕВ (АО: 100 mg/mL; ЕВ: 100 mg/mL). Флуоресцентне боје великом брзином допиру до ћелија, што условљава тренутну анализу морфологије ћелија на флуоресцентном микроскопу (Leica DM1000, Немачка). За снимање слика коришћена је 400 x Canon PC 1089 камера.

2.12.5 Детекција аутофагије акридин-оранж бојењем

НТС-116 ћелије су нанесене на стаклене поклопце и остављене преко ноћи да адхезирају. Након тога, ћелије су третиране испитиваним једињењима **11** и **12** [149] у концентрацијама које одговарају њиховим IC₅₀ вредностима или у медијуму (контрола), а затим инкубирани у трајању од 48 h на 37 °C, у атмосфери са 5% CO₂ и апсолутној влажности. После инкубације ћелије су обојене са 1 μ g/mL акридин-оранж-а (АО). Након 15 минута стајања у мраку, поклопци са ћелијама су испрани фосфатним пуфером, а ћелије су анализирани применом флуоресцентног микроскопа Olympus. Сlike су снимљене 100 x Canon PC 1089 камером.

2.12.6 Western blot

Вестерн блот анализа представља методу којом се протеини раздвајају под дејством електричног поља, након чега се њихова детекција врши помоћу специфичних антитела, а визуализација додавањем супстрата, при чему се емитује светлост. Bradford методом [170] се одређује концентрација протеина у ћелијском лизату у микротитар плочама са 96 бунара (ThermoLab Systems, Multiscan Accent spectrophotometer) користећи албумин говеђег серума као стандард. Коришћени су маркери молекулске масе протеина који су добијени од Amersham Biosciences. На гел је нанесено 50 μ g протеина по узорку и раздвојено у електричном пољу. Електрофоретским путем су пренесени протеини са гела на

поливинилиден дифлуорид (PVDF) мембрану Hybond-P (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL), а затим инкубирани са примарним антителима: анти-Bcl-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN), анти-поли (ADP-ribose) полимераза (PARP) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), анти-каспаза-3 (R&D Systems, Minneapolis, MN) и анти- α -, β - и γ -актин (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Детекција је извршена помоћу побољшаног хемилуминисцентног (ECL Plus) кита (Amersham Biosciences) који садржи секундарна антитела конјугована са пероксидазом. Помоћу ECL Plus detection система су развијени блотови, а хемилуминисцентни сигнал је детектован на Hyperfilm-у (Amersham Biosciences). Детектовани сигнали су развијени помоћу Kodak EX-OMAT II развијачем, а фотографије сигнала су добијене помоћу негатоскопа са Canon 1100D камером. Сlike експресије протеина су анализирани дензитометријски применом ImageJ компјутерског програма (NIH Image, <http://imagej.nih.gov>) [171]. Контролни узорак је коришћен за поређење експресије протеина у третираним узорцима. Microsoft Office Excel програм је коришћен за статистичку обраду резултата дензитометрије.

2.12.7 Анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом

HeLa ћелије су инкубирани са испитиваним једињењима у концентрацијама које одговарају IC₅₀ вредностима или у медијуму (контрола) 48 h на 37 °C, у атмосфери са 5% CO₂ и апсолутној влажности. Ћелије су сакупљене након инкубације, испране у PBS пуферу и коначно фиксиране у 1 mL леденог 70% етанола. Након целоноћне инкубације на 4 °C, ћелије су испране у PBS пуферу и третиране са RNaseA (500 μ g/mL PBS) у трајању од 30 минута на 37 °C. Затим је додато 5 μ L пропиридијум јодида (10 mg/mL PBS) у сваку епрувету и након 15 минута инкубације у мраку, ћелије су анализирани помоћу Cytomics FC500 флоуцитометра (Beckman Coulter, USA) за комплексе **6** и **7** [147], а за комплекс **10** [148] коришћен је FACS Calibur E440 (Becton Dickinson). Подаци су анализирани коришћењем Flowing софтвера и дистрибуција ћелијског циклуса је приказана хистограмима у случају комплекса **6** и **7**, а у случају комплекса **10** коришћен је Cell Quest софтвер [172] и резултати су представљени као проценат фаза ћелијског циклуса.

Комплекси **11** и **12** [149] су анализирани на ћелији HTC-116. Анализа ћелијског циклуса изведена је помоћу Cell Cycle Assay Kit-Green Fluorometric (Abcam) према упутствима произвођача. Укратко, HTC-116 ћелије су засејане у плочице са 24 бунара (2 · 10⁵ ћелија/бунар) и третиране испитиваним једињењима у концентрацијама које одговарају њиховим IC₅₀ вредностима или самом медијуму (контрола). Након 48 h ћелије су сакупљене за инкубацију, обојене са Nuclear Green и инкубирани током 45 минута на 37 °C у мраку, а затим испране 3 пута у DMEM-у и коначно ресуспендоване у 500 μ L PBS. Узорци су анализирани проточним цитометром Cytomics FC500. Подаци су анализирани помоћу FlowJo софтвера [173], а резултати су представљени хистограмима.

2.13 Компјутерске методе

2.13.1 Квантна механика

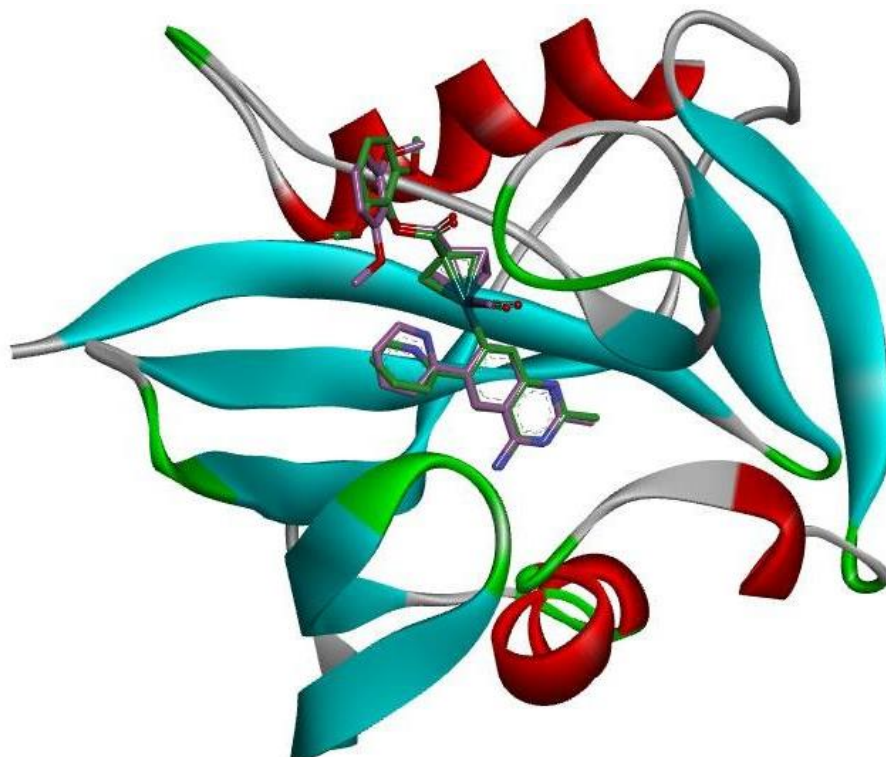
Геометрије испитиваних рутенијум(II) комплекса су оптимизоване помоћу Gaussian 09 D.01 програмског пакета [174], користећи Бекеов (Becke) хибридни измењиви трифункционални параметар у комбинацији са Ли-Јанг-Пар (Lee-Yang-Parr) корелационим

хибридним функционалом (B3LYP) [135] и M06 хибридни мета-измењиво-корелациони функционал [134]. Коришћени су базни сетови Алрич (Ahlrich) def2-TZVP [175] и SDD [176]. Оптимизације су рађене у спин-ограниченом формализму без ограничења симетрије. Сви прорачуни су изведени са толуеном (лиганди) или H₂O (комплекси) као растварачима коришћењем Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model (IEFPCM) солватационог модела који је имплементиран у Gaussian 09. Локални минимуми су постигнути у свим случајевима што је потврђено прорачуном фреквенција за сваку оптимизовану структуру. Почетне геометрије су узете или из експерименталних рендгенских структура (CSD - The Cambridge Structural Database) база података водећи се њиховим референтним ознакама) или су моделиране, док је конформација најниже енергије, која је добијена конформационом претрагом, додатно пре-оптимизована коришћењем семи-емпиријских метода (MOPAC2016 [177] користећи RM6-D3H4 Хамилтонијан [178]). Најбоље конформације, заједно са наелектрисањима атома, узете су за даље докинг симулације [147-149].

2.13.2 Молекулски докинг

Молекулски докинг лиганата и одговарајућих рутенијум(II) комплекса је симулиран применом тродимензионалне рендгенске структуре албумина хуманог серума (HSA = Human serum albumin.), PDB (Protein data bank) код 1HK1 [179] и 1O9X [180] (за лиганде **1 – 3** и комплексе **8 – 10** [148]) или дволанчане (ds) секвенце додекамера 5'-d(CCTCTG*GTCTCC)-3'*5'-d(GGAGACCAGAGG)-3' тродимензионалне рендгенске структуре Lippard ДНК дуплекса (PDB код 1AIO) [160] (за лиганде **4** и **5** и комплексе **6, 7, 11** и **12** [147, 149]). Докинг процеси су изведени помоћу софтвера AutoDock 4.2.6 [139] и AutoDock Vina [140] опремљеним графичким интерфејсом (GUI) Auto-DockTools (ADT 1.5.6rc3) [139] и GOLD пакет програма са модификованим параметрима за рутенијум(II) (Hermes и Gold) (GOLD за лиганде **1 – 3** и комплексе **8 – 10**), верзија 5.6.2 [141]. Детаљи о Autodock-у 4.2.6 и Gold докинг процедурама су описани у раније објављеној литератури [147, 181].

Потврда процене докинга са HSA потврђена је преко две рендгенске структуре: PDB код 1HK1 и 1O9X, као што је описано у литератури [147]. Докинг једињења у случају малог молекула инхибитора репарирајућег ензима 8-охо-dGTPase (MTH1) PDB код 3WHW [182] је урађен како би потврдио резултате добијене употребом GOLD софтвера (Слика 15).

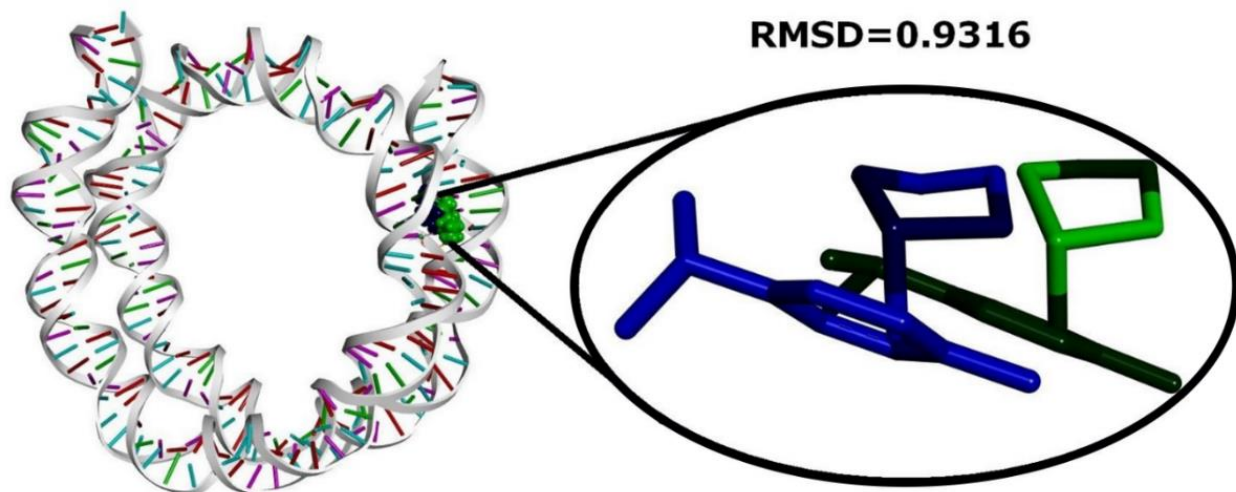


Слика 15. Докинг једињења у случају малих молекула уз употребу GOLD софтвера

Молекул HSA је ослобођен од молекула воде и рекристалисаних лиганата и додати су водоникови атоми и израчуната су Гастајгерова (Gasteiger) наелектрисања. За процес докинга лиганата и комплекса коришћене су њихове рендгенске структуре или матични макромолекули и оптимизовани квантно-механичким поступцима. Из Гаусијанових излазних фајли (output) узете су ".mol2" 3D фајле заједно са одговарајућим NPA наелектрисањима и даље коришћене у сврху доковања. Како се атом рутенијума налази у квазихелатном оквиру *p*-цимена при чему је додатно заштићен координованим молекулима воде и лигандима, не долази до директног утицаја централног јона метала на сам процес доковања, осим његовог парцијалног наелектрисања, које је већ убачено у лиганде. Због свега наведеног, рутенијум је замењен гвожђем чија је параметризација раније извршена у AutoDock програму задржавајући оригинална парцијална наелектрисања рутенијума. Применом Discovery Studio Visualizer v17.2.0.16349 програма [183] израчунате су и визуализоване рецептор-лиганд интеракције. Стандардна кутија величине 40 x 40 x 40 тачака (размак решетке 0,375 Å) је употребљена за докинг стандардног типа комплекса $[Ru(Ar)(L)(H_2O)_2]^{2+}$, где је DG6(N7) атом узет као центар.

Молекулски докинг лиганата **4** и **5**, као и комплекса **6**, **7**, **11** и **12** [147, 149], симулиран је на тродимензионалној структури додекамера Lippard ДНК (PDB код 1A1O). ДНК секвенца 5'-ССТСТGGTCTСС)-3' је креирана након уклањања 1,2-cis- $\{Pt(NH_3)_2\}^{2+}$ -d(GpG). Auto-DockTools (ADT) је коришћен за подешавања ДНК и испитиваних једињења: Гастајгерова наелектрисања су израчуната, вода је уклоњена и додати су сви водоникови атоми, а неполярни атоми водоника су припојени атомима угљеника. Pdbqt фајле су генерисане употребом Rasoon [184] уз задржавање оригиналних NPA наелектрисања. ADT

је такође коришћен за генерисање докинг улазних фајли. У докингу комплекса **6** и **7** коришћена је стандардна кутија величине 40 x 40 x 40 тачака (размак решетке 0,375 Å), док је у докинг експериментима за лиганде **4** и **5** и комплексе **11** и **12** употребљена кутија величине 60 x 60 x 60 тачака (размак решетке 0,375 Å), а мапе су центриране у два мања и један велики жљеб 1АЮ ДНК. Педесет прорачуна је генерисано применом Lamarckian Genetic Algorithm претраге. Коришћена су подразумевана подешавања која обухватају 150 насумично постављених индивидуа, максималан број од $2,5 \cdot 10^5$ евалуација и максималан број од $2,7 \cdot 10^4$ генерација. Стопа мутације износи 0,02, а слободна стопа 0,8. Слободне торзије су примењене за сва једињења, где год је било могуће. Параметри рутенијума који нису доступни у подразумеваном Autodock сету узети су из литературних података [185]. Процена доковања са новим сетом параметара који су примењени у AutoDock-у потврђена је са четири ДНК(Протеин)-RuL рендгенске структуре употребом PDB кодова 2BZH [186], 5LS8 [187], 6HWG [188] и 5LFX [189]. Процена молекулског докинга применом модификованог GOLD софтверског пакета у случају протеина потврђена је од стране Скортина (Giuseppe Sciortino) и сарадника [190]. Како је GOLD софтверски пакет потврђен само у случају протеина, изведен је мали део овог процеса у случају ДНК. У ту сврху, узет је део структуре ДНК (PDB код 4KGC [68г]) и један од комплекса рутенијума(II) READ-C који је координован за ДНК (Слика 16).



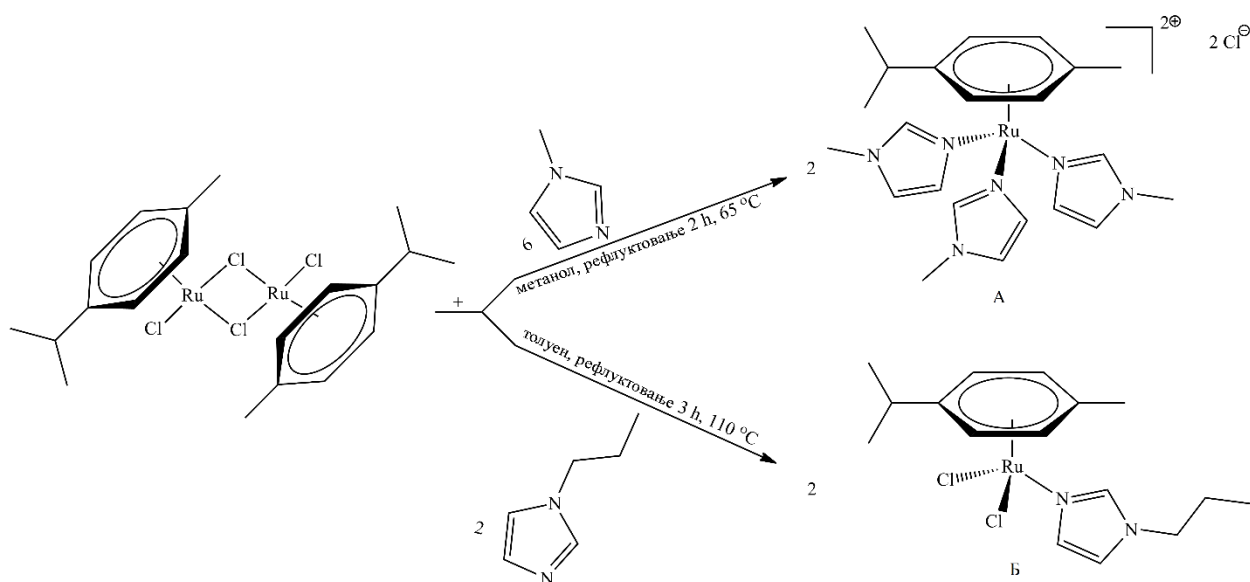
Слика 16. Валидација GOLD докинга применом 4KGC као примером

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

3.1 Синтеза и молекулске структуре синтетисаних једињења

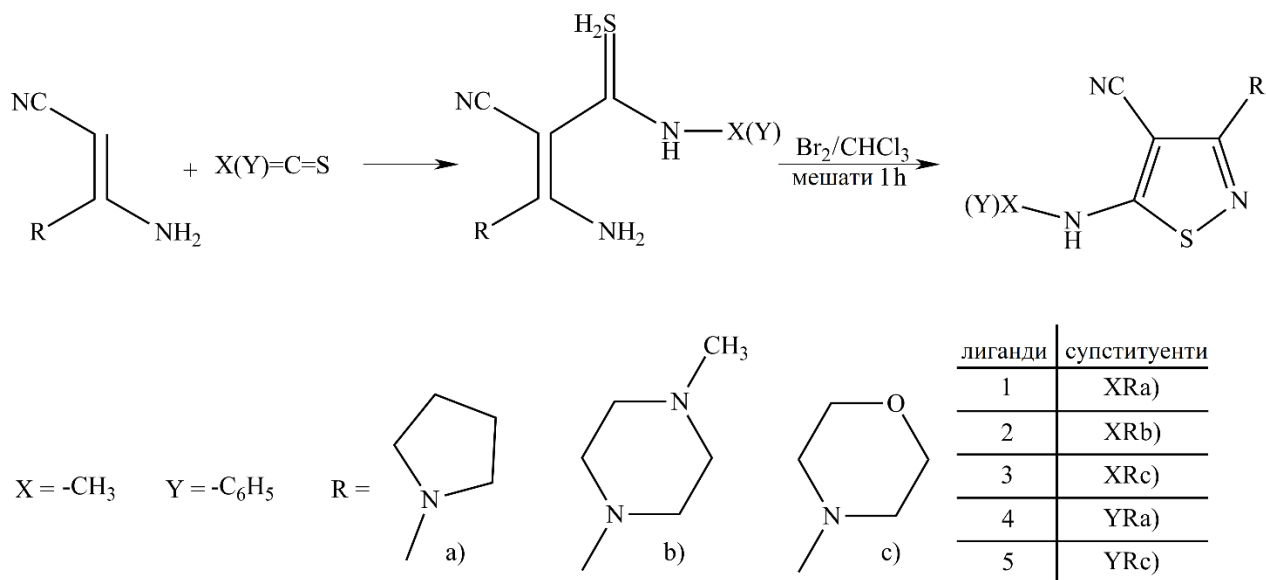
3.1.1 Синтеза лиганата и одговарајућих комплекса рутенијума(II)

У оквиру ове дисертације синтетисано је седам нових комплекса рутенијума(II) са имидазолима и изотиазолима као лигандима. [147-149] За синтезу свих комплекса као полазно једињење рутенијума(II), коришћен је $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-}cymene)\text{Cl}_2]_2$. Лиганди имидазолског типа, метил-имидазол и пропил-имидазол који су коришћени за синтезу комплекса **6** и **7** су комерцијално набављени. Комплекс **6** је синтетисан према пропису Малецког (Jan Grzegorz Malecki), док је комплекс **7** синтетисан према пропису Вока (Carsten A. Vock) и сарадника (прописи описани у Експерименталном делу) (Шема 1). [147] У комплексима лиганди су координовани за Ru(II) јон преко атома азота из имидазоловог прстена.



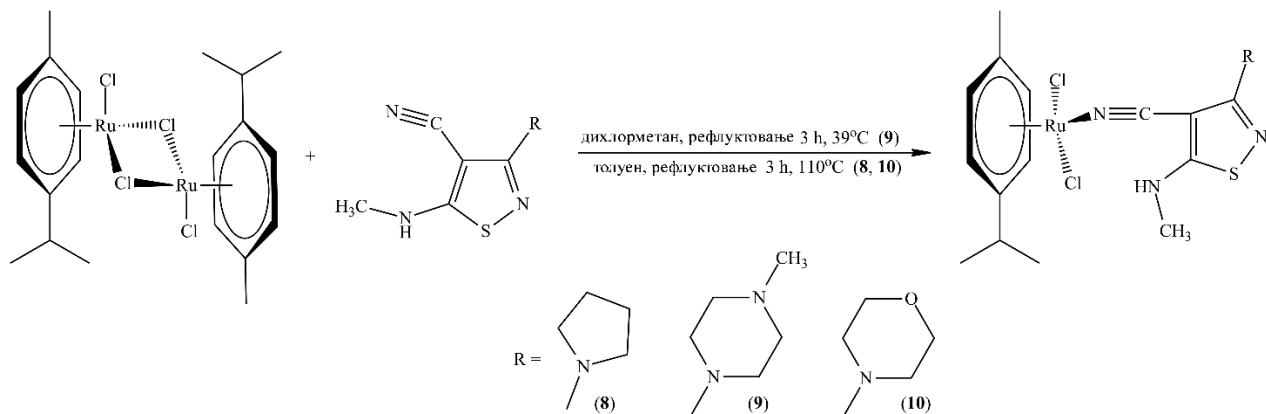
Шема 1. Синтеза комплекса **6** са метил-имидазолом (А) и **7** са пропил-имидазолом (Б)

Лиганди изотиазолског типа су синтетисани према раније описаним поступцима Онис (*Valentina Onnis*) и сарадника (видети Експериментални део [144, 145]). Изотиазолски лиганди су подељени у две подгрупе у зависности од супституента у положају 5 изотиазола. Тако су за синтезу комплекса **8**, **9** и **10** [148] коришћени лиганди код којих је за изотиазол на положају 5 везана амино-метил група, а за синтезу комплекса **11** и **12** [149] су коришћени лиганди код којих је на истом положају везана амино-фенил група (Шема 2).



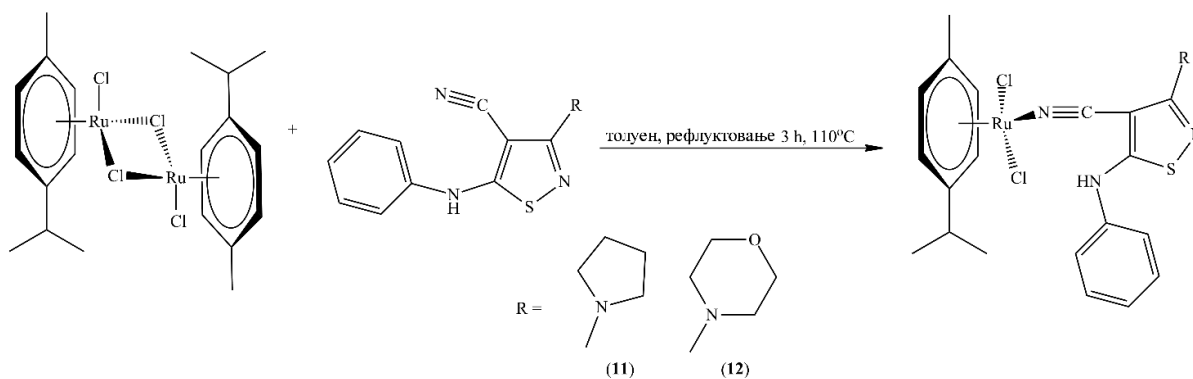
Шема 2. Синтеза лиганда изотиазолског типа

Комплекси са изотиазолским лигандима су синтетисани према пропису Вока (Carsten A. Vock) и сарадника (прописи описани у Експерименталном делу) [66] и подељени су у две подгрупе. У прву подгрупу спадају комплекси који у својој структури имају метил-изотиазолске лиганде пиролидина (**8**), пиперазина (**9**) и морфолина (**10**) [148]. Ови лиганди су за рутенијум(II) јон координовани преко азота из карбонитрилне групе $-\text{C}\equiv\text{N}$ (Шема 3).



Шема 3. Синтеза комплекса **8**, **9** и **10** са метил-изотиазолским лигандима

У другу подгрупу спадају комплекси који у својој структури имају фенил-изотиазолске лиганде пиролидина (**11**) и морфолина (**12**) [149]. Координација лиганда за рутенијум(II) јон је извршена на исти начин као и код претходне подгрупе, тј. преко азота карбонитрилне $-\text{C}\equiv\text{N}$ групе (Шема 4).

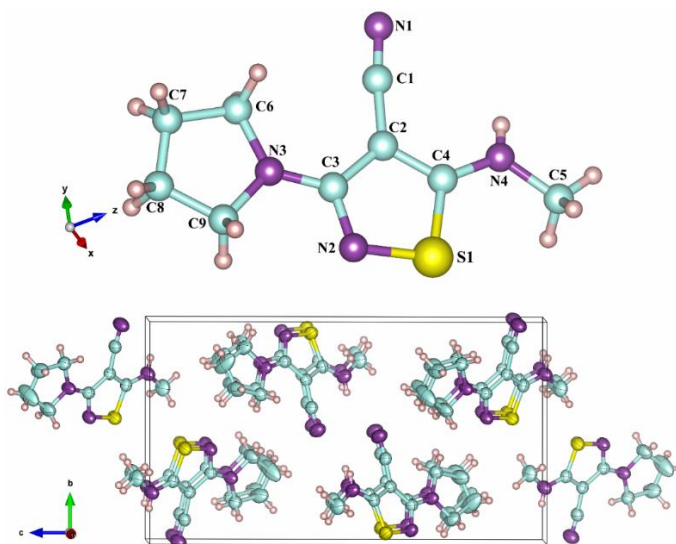


Шема 4. Синтеза комплекса **11** и **12** са фенил-изотиазолским лигандима

Карактеризација синтетисаних лиганата и комплекса је извршена применом рендгенске структурне анализе, IR, NMR и UV-Vis спектралне анализе.

3.1.2 Молекулска структура лиганда 5-(метиламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил (5-МА-3-РуCN-ITZ) (**1**)

Молекулска структура лиганда 5-(метиламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил (5-МА-3-РуCN-ITZ) (**1**) [148] и његово кристално паковање су приказани на Слици 17. Дужине и углови веза су дати у Табели 11. Моноклинична јединична ћелија кристалише у центросиметричној $P2_1/n$ просторној групи и сви асиметрични делови јединичних ћелија у кристалној структури садрже неутралне молекуле. Конформација лиганда може се потврдити кроз вредности двостраних углова датих у Табели 2, које указују да је део изотиазол-4-карбонитрила скоро савршено раван, као и пиролидински део, што потврђују вредности параметра попуте $q_2 = 0,118$ (5) Å, $\varphi_2 = -84$ (2)°. Димер лиганда је стабилизован са две водоничне везе између цијано групе једног молекула и амино групе другог молекула, чија дужина износи 2,33 Å (Табела 12.).



Слика 17. Кристална структура и паковање 5-МА-3-РуCN-ITZ (**1**) лиганда

Табела 11. Дужине, углови веза и торзиони углови за 5-МА-3-РyCN-ITZ (1).

Дужине веза [Å]		Углови веза [°]		Торзиони углови [°]	
S1—N2	1,659 (3)	N2—S1—C4	95,5 (1)	N2—S1—C4—N4	179,7 (3)
S1—C4	1,708 (3)	C3—N3—C6	127,6 (2)	C1—C2—C4—S1	179,8 (2)
N3—C3	1,340 (4)	C3—N3—C9	120,6 (3)	C4—S1—N2—C3	0,6 (3)
N3—C6	1,442 (4)	C6—N3—C9	111,8 (3)	S1—N2—C3—N3	177,8 (2)
N3—C9	1,462 (4)	C3—N2—S1	110,1 (2)	S1—N2—C3—C2	-0,8 (4)
N2—C3	1,329 (4)	C4—N4—C5	122,7 (3)		
N4—C4	1,336 (4)	N4—C4—S1	122,7 (2)		
N4—C5	1,450 (4)	C2—C4—S1	108,6 (2)		
N1—C1	1,141 (4)	N2—C3—N3	118,7 (3)		

Табела 12. Параметри водоничних веза за лиганде 1, 2 и 3.

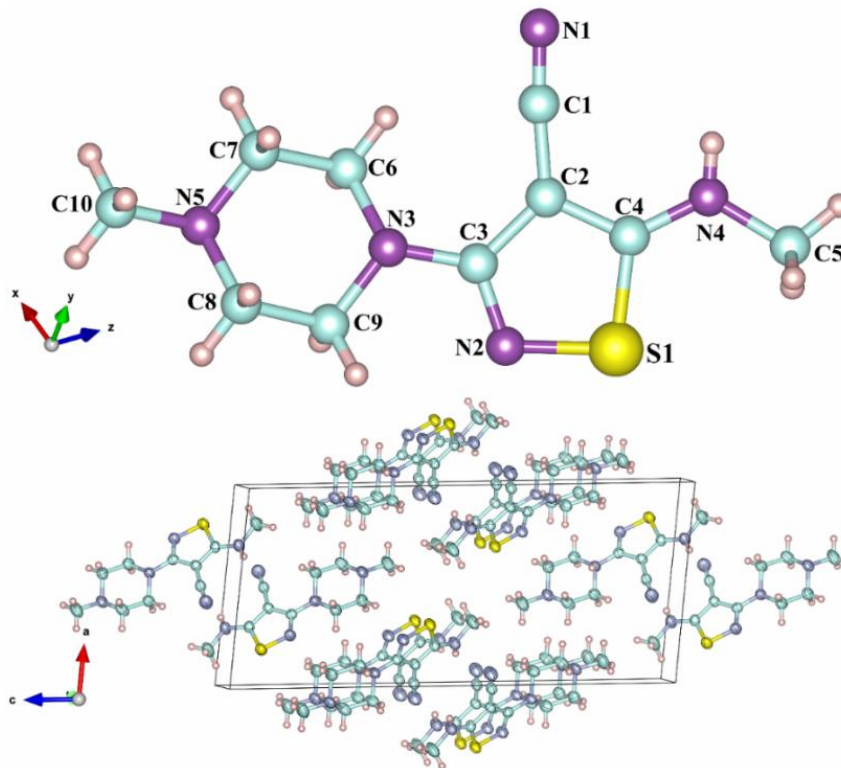
D—H···A	D—H (Å)	H···A (Å)	D···A (Å)	D—H···A (°)
		1		
N4—H4···N1 ⁱ	0,78 (3)	2,33 (3)	3,04 (4)	153,0 (3)
		2		
N4—H4···N1 ⁱⁱ	0,80 (2)	2,23 (2)	2,97 (3)	153,0 (2)
		3		
N4—H4···N1 ⁱⁱⁱ	0,79 (2)	2,24 (2)	3,01 (2)	161,3 (2)

Симетријске трансформације: (i) -x+1, -y+1, -z+1; (ii) -x+1, -y+2, -z+2; (iii) -x+2, -y+1, -z+1.

3.1.3 Молекулска структура лиганда 5-(метиламино)-3-(4-метилпиперазин-1-ил)изотиазол-4-карбонитрил (5-МА-4-MPipCN-ITZ) (2)

Молекулска структура лиганда 5-(метиламино)-3-(4-метилпиперазин-1-ил)изотиазол-4-карбонитрил (5-МА-4-MPipCN-ITZ) (2) [148] и његово кристално паковање су приказани на Слици 18. Дужине, углови веза и торзиони углови за ово једињење су дати у Табели 13. Моноклинична јединична ћелија кристалише у центросиметричној $P2_1/n$ просторној групи и сви асиметрични делови јединичних ћелија у кристалној структури садрже неутралне молекуле. Што се тиче конформације лиганда, она се може потврдити кроз вредности двостраних углова датих у Табели 12, које указују да је део изотиазол-4-

карбонитрила скоро савршено раван, док део метил-пиперазина заузима конформациони положај столице, што потврђују вредности параметра попуне $QT = 0,556 (2) \text{ \AA}$, $\theta_2 = 177,3 (2)^\circ$. Димер лиганда је стабилизован са две водоничне везе између цијано групе једног молекула и амино групе другог молекула чија дужина износи $2,23 \text{ \AA}$ (Табела 12).



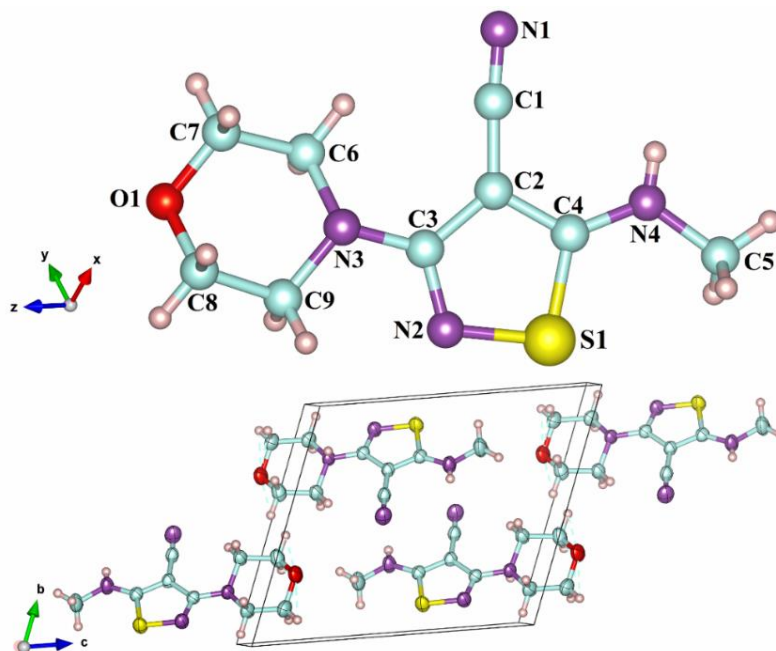
Слика 18. Кристална структура и паковање 5-МА-4-РiрCN-ITZ (2) лиганда

Табела 13. Дужине, углови веза и торзиони углови за 5-МА-4-МРiрCN-ITZ (2)

Дужине веза [\AA]		Углови веза [$^\circ$]		Торзиони углови [$^\circ$]	
S1—N2	1,658 (2)	N2—S1—C4	95,3 (9)	N2—S1—C4—N4	179,7 (2)
S1—C4	1,715 (2)	C3—N3—C6	121,1 (2)	C1—C2—C4—S1	177,7 (1)
N3—C3	1,368 (2)	C3—N3—C9	116,9 (2)	C4—S1—N2—C3	-0,9 (2)
N3—C6	1,457 (2)	C6—N3—C9	111,4 (2)	S1—N2—C3—N3	-174,1 (1)
N3—C9	1,456 (3)	C3—N2—S1	110,3 (1)	S1—N2—C3—C2	1,7 (2)
N2—C3	1,312 (2)	C4—N4—C5	122,5 (2)		
N4—C4	1,324 (2)	N4—C4—S1	123,3 (2)		
N4—C5	1,432 (3)	C2—C4—S1	108,1 (1)		
N1—C1	1,139 (3)	N2—C3—N3	119,0 (2)		

3.1.4 Молекулска структура лиганда 5-(метиламино)-3-морфолин-4-илизотиазол-4-карбонитрил (5-МА-3-MorphCN-ITZ) (3)

Молекулска структура лиганда 5-(метиламино)-3-морфолин-4-илизотиазол-4-карбонитрил (5-МА-3-MorphCN-ITZ) (3) [148] и његово кристално паковање су приказани на Слици 19. Дужине, углови веза и торзиони углови су дати у Табели 14. Триклинична јединична ћелија кристалише у $P\bar{1}$ просторној групи и сви асиметрични делови јединичних ћелија у кристалној структури садрже неутралне молекуле. Конформација лиганда је потврђена на основу вредности двостраних углова датих у Табели 14, које указују да је део изотиазол-4-карбонитрила скоро савршено раван, док део морфолина заузима конформациони положај столице, што потврђују вредности параметра попуте $QT = 0,552$ (2) Å, $\theta_2 = 174,3$ (2)°. Димер лиганда је стабилизован са две водоничне везе између цијано групе једног молекула и амино групе другог молекула чија вредност износи 2,24 Å (Табела 12.).



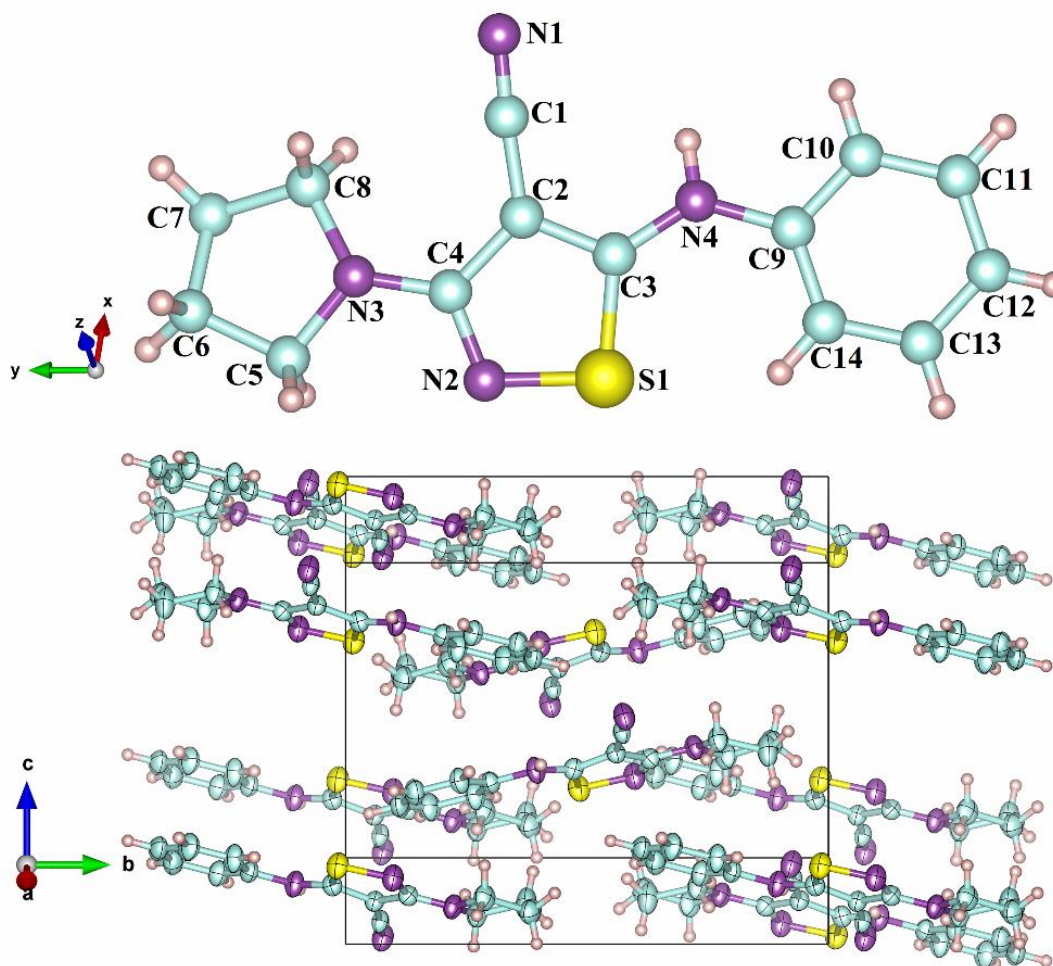
Слика 19. Кристална структура и паковање 5-МА-3-MorphCN-ITZ (3) лиганда

Табела 14. Дужине, углови веза и торзиони углови за 5-МА-3-MorphCN-ITZ (3)

Дужине веза [Å]		Углови веза [°]		Торзиони углови [°]	
S1—N2	1,665 (1)	N2—S1—C4	95,5 (6)	N2—S1—C4—N4	-179,8 (1)
S1—C4	1,719 (2)	C3—N3—C6	119,2 (1)	C1—C2—C4—S1	177,7 (1)
N3—C3	1,383 (2)	C3—N3—C9	114,9 (1)	C4—S1—N2—C3	-1,3 (1)
N3—C6	1,466 (2)	C6—N3—C9	112,2 (1)	S1—N2—C3—N3	-174,8 (1)
N3—C9	1,464 (2)	C3—N2—S1	110,1 (1)	S1—N2—C3—C2	1,8 (2)
N2—C3	1,321 (2)	C4—N4—C5	122,2 (2)		
N4—C4	1,330 (2)	N4—C4—S1	122,8 (1)		
N4—C5	1,439 (2)	C2—C4—S1	108,1 (1)		
N1—C1	1,144 (2)	N2—C3—N3	118,9 (1)		

3.1.5 Молекулска структура лиганда 5-(фениламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил (5-PhA-3-PyCN-ITZ) (4)

Молекулска структура лиганда 5-(фениламино)-3-пиролидин-1-илизотиазол-4-карбонитрил (5-PhA-3-PyCN-ITZ) **4** [149] и његово кристално паковање су приказани на Слици 20. Дужине и углови веза дати су у Табели 15. Моноклинична јединична ћелија кристалише у центросиметричној $P2_1/n$ просторној групи. Валидација конформације лиганда кроз вредности двостраних углова датих у Табели 15 указује да је део изотиазол-4-карбонитрила скоро савршено планаран, док вредност угла између равни прстена C2–C3–S1–N2–N4 и C9–C10–C11–C12–C13–C14, која износи $7,22^\circ$, показује одступање од планарне конформације. У пиролидинском делу вредности параметра попуне износе $q_2 = 0,330(2) \text{ \AA}$, $\varphi_2 = -130,7(4)^\circ$, што указује на увијену конформацију. Кристално паковање лиганда се састоји од двоструких N–H...N водоничних веза између димера који формирају слојеве дуж осе *b* (Табела 16).



Слика 20. Кристална структура и паковање 5-PhA-3-PyCN-ITZ (**4**) лиганда

Табела 15. Дужине, углови веза и торзиони углови за 5-PhA-3-PyCN-ITZ (4)

Дужине веза [Å]		Углови веза [°]		Торзиони углови [°]	
S1—N2	1,658 (2)	N2—S1—C3	95,7 (9)	C3—S1—N2—C4	0,8 (2)
S1—C3	1,720 (2)	C3—N4—C9	131,1 (2)	S1—N2—C4—N3	178,3 (2)
N4—C3	1,357 (3)	C4—N3—C8	125,2 (2)	S1—N2—C4—C2	-1,8 (2)
N4—C9	1,393 (3)	C4—N3—C5	120,3 (2)	C8—N3—C4—N2	-162,5 (2)
N3—C4	1,345 (3)	C8—N3—C5	111,8 (2)	C5—N3—C4—N2	-2,7 (3)
N3—C8	1,456 (3)	C4—N2—S1	110,3 (1)	C8—N3—C4—C2	17,7 (3)
N3—C5	1,461 (3)	C3—C2—C1	120,8 (2)	C5—N3—C4—C2	177,4 (2)
N2—C4	1,324 (2)	C3—C2—C4	111,6 (2)	C3—C2—C4—N2	2,2 (3)
N1—C1	1,144 (2)	C1—C2—C4	127,6 (2)	C1—C2—C4—N2	-175,8 (2)

Табела 16. Параметри водоничних веза за лиганде 4 и 5

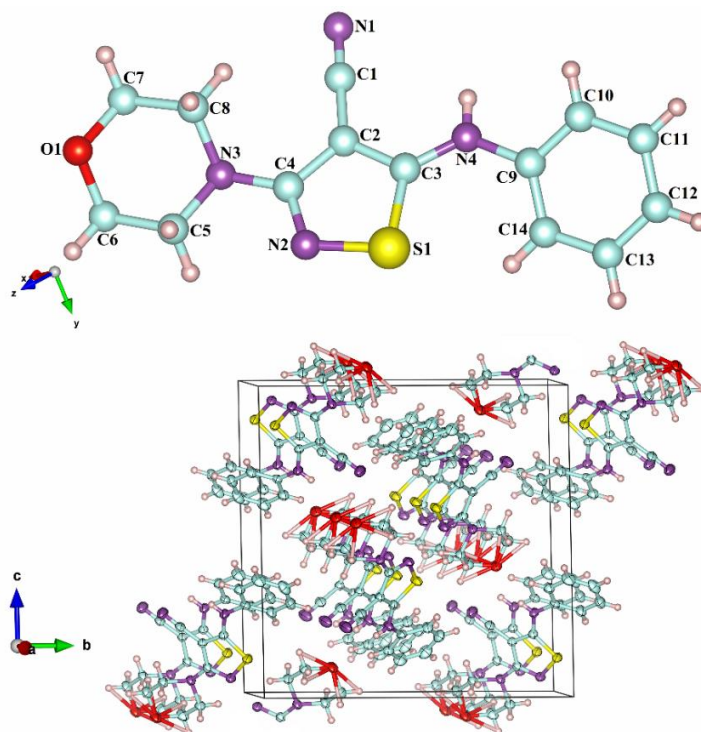
$D-H\cdots A$	$D-H$ (Å)	$H\cdots A$ (Å)	$D\cdots A$ (Å)	$D-H\cdots A$ (°)
4				
N4—H4 \cdots N1 ⁱ	0,85 (2)	2,33 (2)	3,09 (3)	150,3 (2)
5				
N4—H4 \cdots O1 ⁱⁱ	0,81 (2)	2,30 (2)	3,08 (2)	159,3 (2)

Симетријске трансформације: (i) $-x+2, -y+1, -z+1$; (ii) $x-1, -y+1/2, z-1/2$.

3.1.6 Молекулска структура лиганда 3-морфолин-4-ил-5-(фениламино)изотиазол-4-карбонитрил (3-Morph-5-PhACN-ITZ) (5)

Молекулска структура лиганда 3-морфолин-4-ил-5-(фениламино)изотиазол-4-карбонитрил (3-Morph-5-PhACN-ITZ) **5** [149] и његово кристално паковање су приказани на Слици 21. Дужине и углови веза дати су у Табели 17. Моноклинична јединична ћелија кристалише у центросиметричној $P2_1/c$ просторној групи. Валидација конформације лиганда кроз вредности двостраних углова датих у Табели 17 указује да је део изотиазол-4-карбонитрила скоро савршено планаран, док вредност угла између равни прстена C2—C3—S1—N2—N4 и C9—C10—C11—C12—C13—C14 која износи $27,1^\circ$ показује одступање од планарне конформације. У морфолинском делу вредности параметра попуне износе $QT = 0,559$ (2) Å, $\theta_2 = 2,12$ (2)°, што указује на конформацију столице. Кристално паковање

лиганда се састоји од интрамолекулских N—H...O водоничних веза између димера који формирају дугачке ланце (Табела 16).



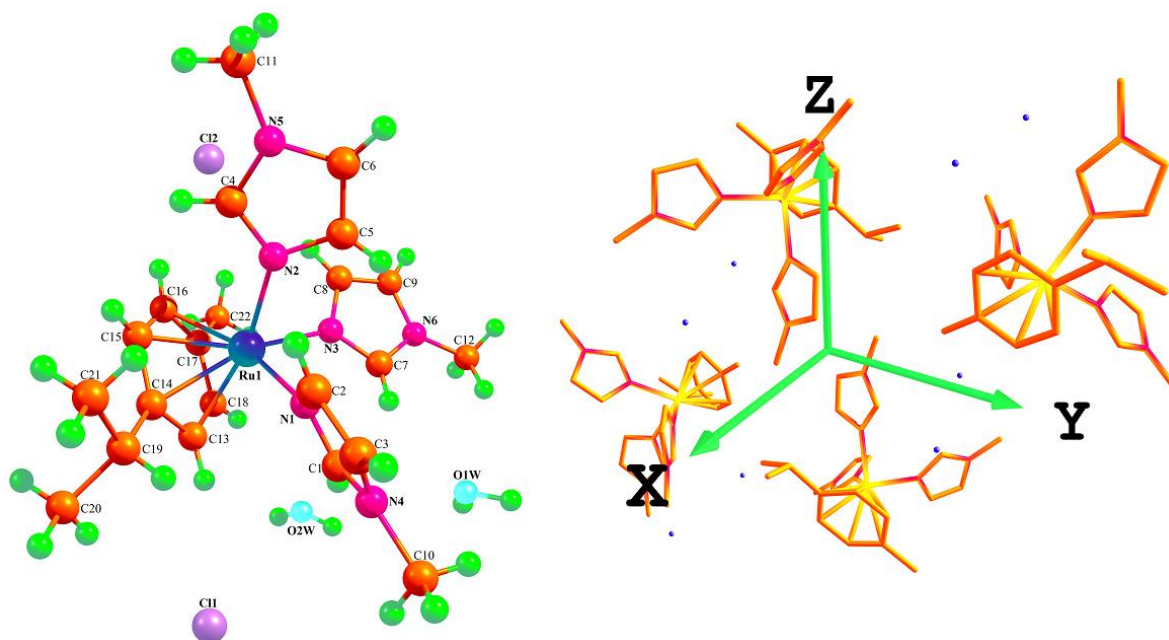
Слика 21. Кристална структура и паковање 3-Morph-5-PhACN-ITZ (5) лиганда

Табела 17. Дужине, углови веза и торзиони углови за 3-Morph-5-PhACN-ITZ (5)

Дужине веза [°]		Углови веза [°]		Торзиони углови [°]	
S1—N2	1,656 (2)	N2—S1—C3	95,1 (8)	C3—S1—N2—C4	0,6 (2)
S1—C3	1,719 (2)	C3—N4—C9	128,4 (2)	S1—N2—C4—N3	178,6 (1)
N4—C3	1,346 (2)	C4—N3—C8	117,3 (1)	S1—N2—C4—C2	0,0 (2)
N4—C9	1,410 (2)	C4—N3—C5	114,9 (2)	C8—N3—C4—N2	135,8 (2)
N3—C4	1,383 (2)	C8—N3—C5	110,8 (1)	C5—N3—C4—N2	3,0 (2)
N3—C8	1,460 (2)	C4—N2—S1	110,6 (1)	C8—N3—C4—C2	-45,7 (3)
N3—C5	1,467 (2)	C3—C2—C1	122,0 (2)	C5—N3—C4—C2	-178,6 (2)
N2—C4	1,313 (2)	C3—C2—C4	110,9 (2)	C3—C2—C4—N2	-0,7 (2)
N1—C1	1,140 (2)	C1—C2—C4	126,9 (2)	C1—C2—C4—N2	175,3 (2)
O1—C7	1,413 (2)	N1—C1—C2	178,7 (2)	C7—O1—C6—C5	59,1 (2)
O1—C6	1,429 (2)	N2—C4—N3	119,7 (2)	N3—C5—C6—O1	-56,8 (2)

3.1.7 Молекулска структура комплекса $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-tris}(N\text{-метилимидазол})\text{рутенијум(II)}]\text{дихлорид дихидрат}$,
 $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**6**)

Свака асиметрична јединица комплекса **6** [147] се састоји од једног катјона рутенијум-*p*-цимен-метил-имидазол, два хлоридна анјона и два молекула воде. Моноклинична јединична ћелија садржи двадесет јединица: четири катјона рутенијум-*p*-цимен-метил-имидазол, осам хлоридних анјона и осам молекула воде. У кристалној структури, лиганд се координује за рутенијум(II) јон преко доворског атома азота у имидазоловом прстену (Слика 22). Три метил-имидазола су координована за јон рутенијума(II). Вредности дужине веза Ru-N и Ru-Ar_{центроид} (π везе) сличне су са дужинама веза литературно познатих комплекса рутенијума(II) [66] и дате су у Табели 18 заједно са осталим дужинама и угловима веза. Имидазолони лиганди су распоређени у квази-*C*₃ симетричној конформацији пропелера око оса рутенијум-*p*-цимена.



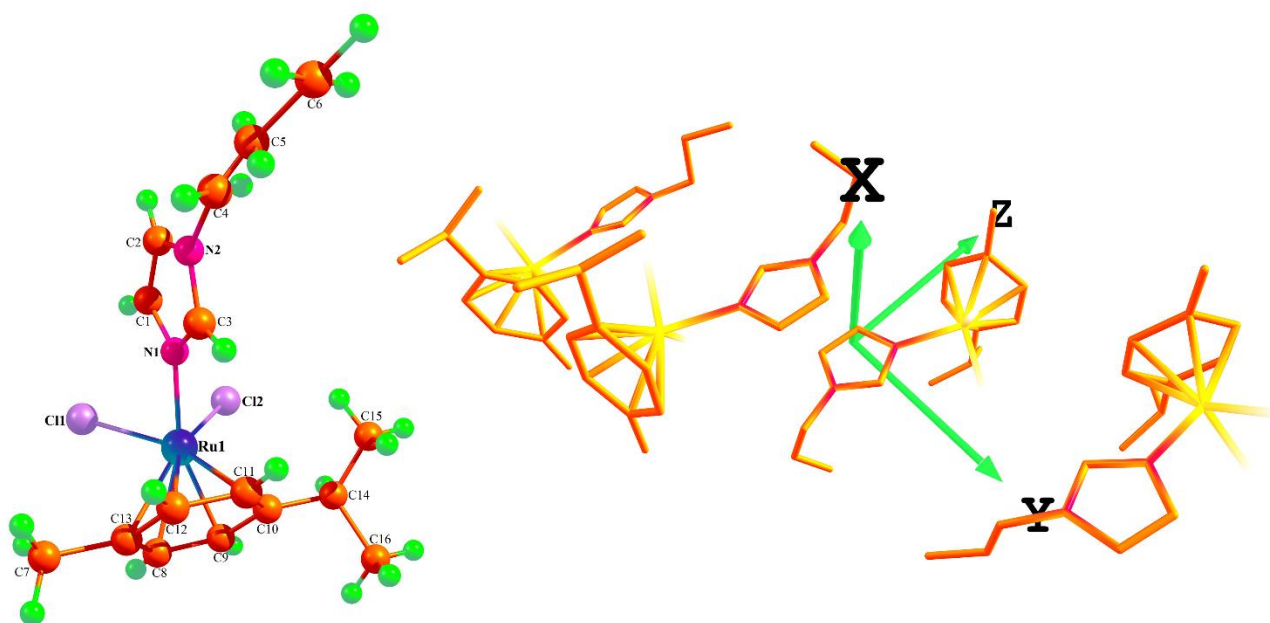
Слика 22. Кристална структура и паковање $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**6**) комплекса

Табела 18. Дужине веза и одабрани углови између веза за комплекс **6**

M-L дужине веза [Å]		Углови веза [°]	
Ru1-N1	2,111 (2)	N2-Ru1-N3	83,3 (7)
Ru1-N2	2,106 (2)	N2-Ru1-N1	84,9 (8)
Ru1-N3	2,108 (2)	N3-Ru1-N1	89,1 (8)
Ru1-C13	2,170 (3)	N1-Ru1-C14	90,2 (9)
Ru1-C14	2,209 (3)	N1-Ru1-C17	154,1 (9)
Ru1-C15	2,186 (3)	N2-Ru1-C13	155,9 (9)
Ru1-C16	2,186 (3)	N2-Ru1-C16	95,4 (9)
Ru1-C17	2,225 (3)	N3-Ru1-C14	158,3 (9)
Ru1-C18	2,172 (3)	N3-Ru1-C17	90,4 (9)

3.1.8 Молекулска структура комплекса $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-}(N\text{-пропилимидазол})\text{дихлоридорутенијум(II)}]$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$ (7)

Свака асиметрична јединица комплекса **7** [147] садржи два независна симетрична неутрална молекула рутенијум-*p*-цимен-пропил-имидазол. Лиганд пропил-имидазол је у кристалној структури комплекса, координован преко несупституисаног азот донорског атома имидазоловог прстена за рутенијум(II) јон. За рутенијум(II) јон, поред једног пропил-имидазола, координована су и два хлоридо лиганда (Слика 23). Вредности дужине веза Ru-N и Ru-Cl_{центроид} (π везе) су сличне одговарајућим дужинама веза комплексу **6** и литературно познатим комплексима [66] и дате су у Табели 19 заједно са осталим дужинама и угловима веза. Испитивањем кристалне структуре комплекса **7** уочено је да не садржи водоничне везе.



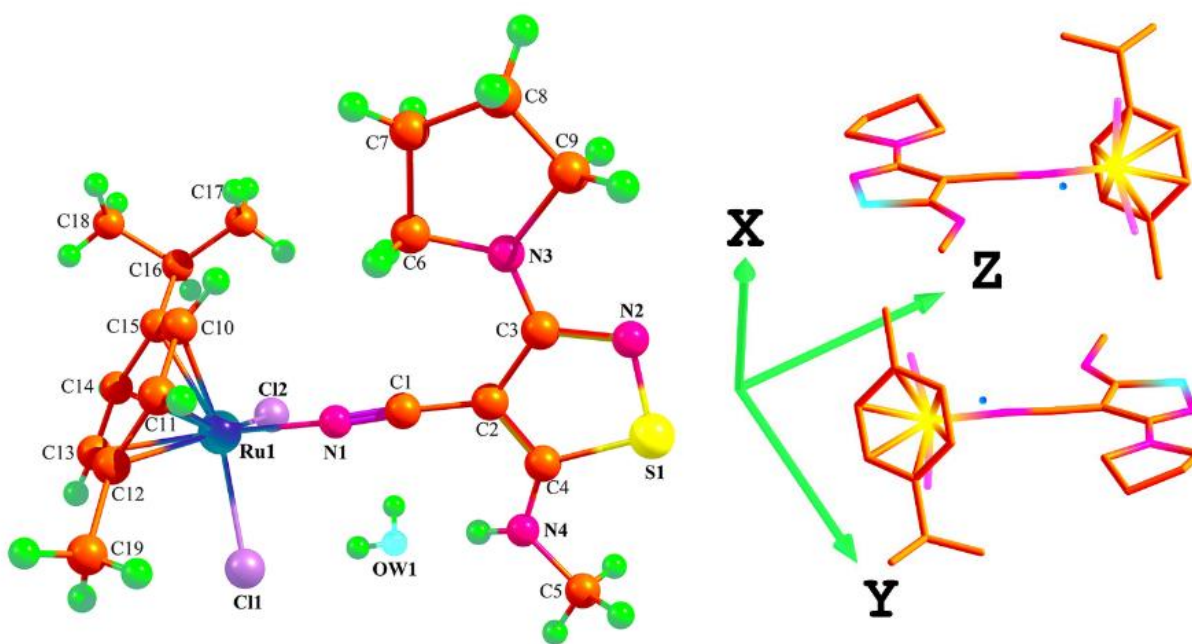
Слика 23. Кристална структура и паковање $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$ (7) комплекса

Табела 19. Дужине веза и изабрани углови веза за комплекс **7**

M-L дужине веза [Å]		Углови веза [°]	
Ru1-Cl1	2,416 (9)	Cl1-Ru1-Cl2	87,2 (3)
Ru1-Cl2	2,415 (8)	Cl1-Ru1-N1	86,4 (8)
Ru1-N1	2,107 (2)	Cl2-Ru1-N1	86,5 (7)
Ru1-C8	2,190 (3)	Cl1-Ru1-C8	88,6 (9)
Ru1-C9	2,163 (4)	Cl1-Ru1-C11	162,5 (11)
Ru1-C10	2,138 (3)	Cl2-Ru1-C10	87,0 (11)
Ru1-C11	2,180 (3)	Cl2-Ru1-C13	160,8 (11)
Ru1-C12	2,164 (3)	N1-Ru1-C12	90,9 (13)
Ru1-C13	2,183 (3)	N1-Ru1-C9	164,5 (11)

3.1.9 Молекулска структура комплекса $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-}(5\text{-метиламино})\text{-}3\text{-пирролидин-}1\text{-илизотиазол-}4\text{-карбонитрил}]\text{дихлоридорутенијум(II)}$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{Cl}_2(5\text{-МА-}3\text{-PyCN-ITZ})]$ (**8**)

Молекулска структура комплекса **8** [148] и његово кристално паковање су приказани на Слици 24. Дужине и углови веза, као и торзиони углови дати су у Табели 20. Комплекс **8** кристалише у триклиничном кристалном систему у $P\bar{1}$ просторној групи, при чему се свака асиметрична јединична ћелија састоји од два дела: једног неутралног рутенијум-*p*-цимен-метил-изотиазола и једног молекула воде. Лиганд је преко донорског атома азота из карбонилне групе $\text{-C}\equiv\text{N}$ координован за рутенијум(II) јон, за који су координована и два хлоридна јона. У кристалном паковању присутне су водоничне везе чије су вредности дате у Табели 21.



Слика 24. Кристална структура и паковање $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{Cl}_2(5\text{-МА-}3\text{-PyCN-ITZ})]$ (**8**) комплекса

Табела 20. Дужине веза, углови веза и торзиони углови за комплекс 8

M-L дужине веза [Å]		Углови веза [°]		Торзиони углови [°]	
Ru1—N1	2,064 (3)	Cl1—Ru1—Cl2	88,4 (4)	Ru1—C15—C16—C17	-68,4 (6)
Ru1—Cl1	2,412 (1)	N1—Ru1—Cl1	86,6 (8)	Ru1—C15—C10—C11	-54,1 (3)
Ru1—Cl2	2,423 (2)	N1—Ru1—Cl2	84,1 (8)	Ru1—C11—C12—C13	-53,1 (3)
Ru1—C10	2,158 (4)	N1—Ru1—C10	92,4 (1)	Ru1—C13—C12—C19	-123,6 (4)
Ru1—C11	2,183 (4)	N1—Ru1—C11	94,9 (1)	Ru1—C13—C14—C15	-53,9 (4)
Ru1—C12	2,210 (4)	N1—Ru1—C12	121,3 (1)		
Ru1—C13	2,160 (4)	N1—Ru1—C13	159,7 (2)		
Ru1—C14	2,154 (4)	N1—Ru1—C14	153,3 (2)		
Ru1—C15	2,190 (4)	N1—Ru1—C15	115,7 (15)		

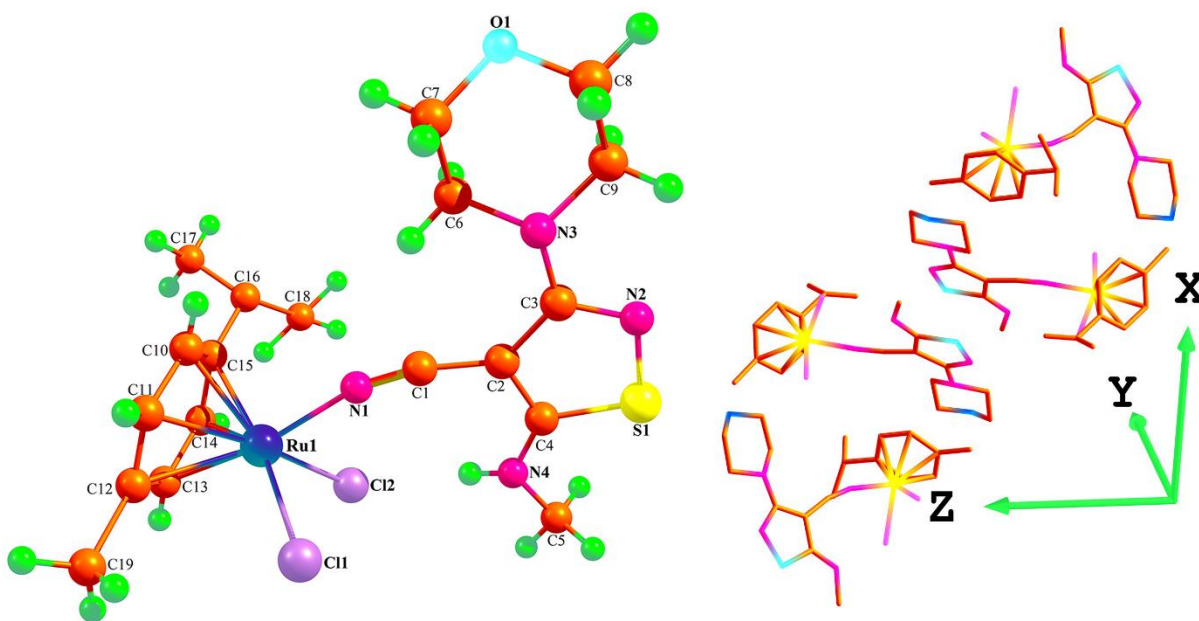
Табела 21. Параметри водоничних веза за комплексе 8, 10 и 11

<i>D—H···A</i>	<i>D—H</i> (Å)	<i>H···A</i> (Å)	<i>D···A</i> (Å)	<i>D—H···A</i> (°)
8				
N4—H4···OW1	0,79 (4)	2,05 (4)	2,81 (4)	161 (4)
OW1—H2···Cl1	0,77 (5)	2,40 (5)	3,17 (4)	169 (4)
OW1—H1···N2 ⁱ	0,79 (5)	2,40 (5)	3,09 (5)	148 (5)
10				
N4—H4···Cl2	0,79 (4)	2,48 (4)	3,26 (4)	170 (4)
11				
N4—H4···Cl2	0,79 (3)	2,99 (3)	3,71 (3)	154 (3)

Симетријске трансформације: (i) $-x+1, -y, -z+1$

3.1.10 Молекулска структура комплекса $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-}(5\text{-метиламино})\text{-}3\text{-морфолин-}4\text{-илизотиазол-}4\text{-карбонитрил}]\text{дихлоридорутенијум(II)}$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{Cl}_2(5\text{-МА-}3\text{-MorphCN-ITZ})]$ (**10**)

Молекулска структура комплекса **10** [148] и његово кристално паковање су приказани на Слици 25. Дужине и углови веза, као и торзиони углови дати су у Табели 22. Комплекс **10** кристалише у моноклиничном кристалном систему и $P2_1/n$ просторној групи. Лиганд је преко донорског азотовог атома из карбонилне групе $\text{-C}\equiv\text{N}$ координован за рутенијум(II) јон, за који су координована и два хлоридна јона. Кристална структура је стабилизована интрамолекулским водоничним везама између -NH група лиганда и хлоридног јона и њене вредности дате су у Табели 21.



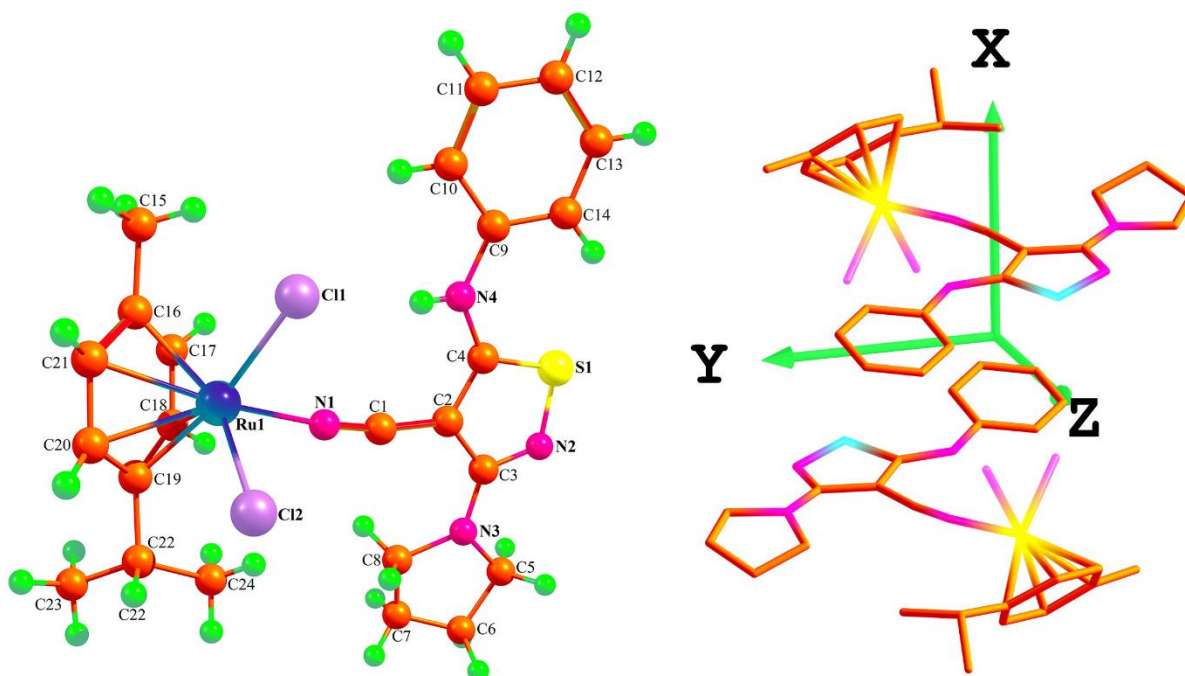
Слика 25. Кристална структура и паковање $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{Cl}_2(5\text{-МА-}3\text{-MorphCN-ITZ})]$ (**10**) комплекса

Табела 22. Дужина веза, углови веза и торзиони углови за комплекс **10**

M-L дужине веза [Å]		Углови веза [°]		Торзиони углови [°]	
Ru1—N1	2,059 (3)	Cl1—Ru1—Cl2	86,9 (6)	Ru1—C15—C16—C17	-177,6 (3)
Ru1—Cl1	2,395 (1)	N1—Ru1—Cl1	83,4 (9)	Ru1—C15—C10—C11	-54,5 (3)
Ru1—Cl2	2,422 (1)	N1—Ru1—Cl2	81,9 (8)	Ru1—C11—C12—C13	-52,1 (3)
Ru1—C10	2,154 (4)	N1—Ru1—C10	91,9 (1)	Ru1—C13—C12—C19	-123,9 (4)
Ru1—C11	2,166 (4)	N1—Ru1—C11	110,9 (1)	Ru1—C13—C14—C15	-55,4 (3)
Ru1—C12	2,218 (3)	N1—Ru1—C12	145,9 (1)		
Ru1—C13	2,175 (3)	N1—Ru1—C13	168,6 (1)		
Ru1—C14	2,147 (4)	N1—Ru1—C14	131,2 (1)		
Ru1—C15	2,194 (3)	N1—Ru1—C15	100,0 (1)		

3.1.11 Молекулска структура комплекса $[(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})\text{-}(5\text{-фениламино})\text{-}3\text{-пиролдин-1-илизотиазол-4-карбонитрил}]\text{дихлоридорутенијум(II)}$, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{Cl}_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$ (**11**)

Молекулска структура комплекса **11** [149] и његово кристално паковање су приказани на Сlici 26. Дужине и углови веза, као и торзиони углови дати су у Табели 23. Комплекс **11** кристалише у триклиничном кристалном систему и $P\bar{1}$ просторној групи, при чему свака асиметрична јединица садржи неутрални рутенијум(II)-*p*-цимен-фенил-изотиазол комплекс. Лиганд је преко донорског азотовог атома из карбонилне групе $\text{-C}\equiv\text{N}$ координован за рутенијум(II) јон, за који су координована и два хлоридна јона. Кристална структура је стабилизована интрамолекулским водоничним везама између -NH група лиганда и хлоридног јона, при чему су параметри водоничних веза за овај комплекс дате у Табели 21.



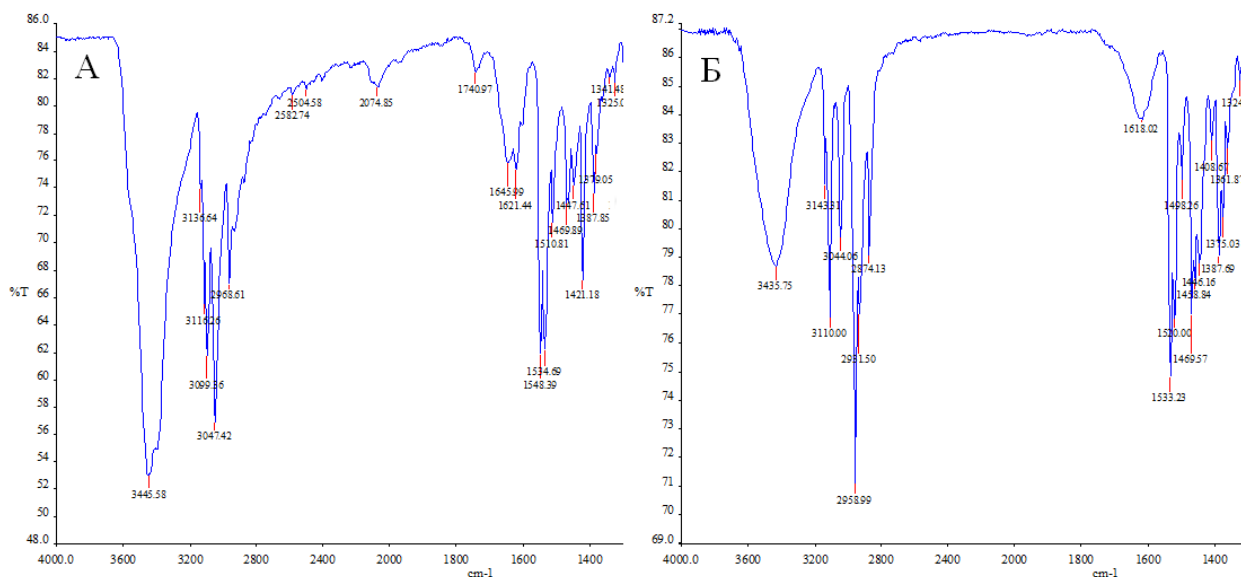
Слика 26. Кристална структура комплекса $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{Cl}_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$ (**11**) и кристално паковање

Табела 23. Дужина веза, углови веза и торзиони углови за комплекс 11

M-L дужине веза [Å]		Углови веза [°]		Торзиони углови [°]	
Ru1—N1	2,059 (2)	Cl1—Ru1—Cl2	88,6 (3)	Ru1—C21—C16—C17	54,5 (2)
Ru1—C18	2,150 (3)	N1—Ru1—Cl1	86,0 (7)	Ru1—C21—C16—C15	-123,6 (3)
Ru1—C20	2,159 (3)	N1—Ru1—Cl2	82,6 (7)	Ru1—C19—C18—C17	-54,9 (2)
Ru1—C19	2,176 (3)	N1—Ru1—C18	89,8 (1)	Ru1—C18—C17—C16	-52,5 (2)
Ru1—C21	2,190 (3)	N1—Ru1—C20	145,8 (1)	Ru1—C19—C22—C24	-58,7 (4)
Ru1—C17	2,195 (3)	N1—Ru1—C21	165,1 (1)		
Ru1—C16	2,211 (3)	C19—Ru1—Cl1	94,1 (8)		
Ru1—Cl1	2,409 (8)	C21—Ru1—Cl1	108,8 (8)		
Ru1—Cl2	2,428 (8)	C18—Ru1—Cl2	143,9 (9)		

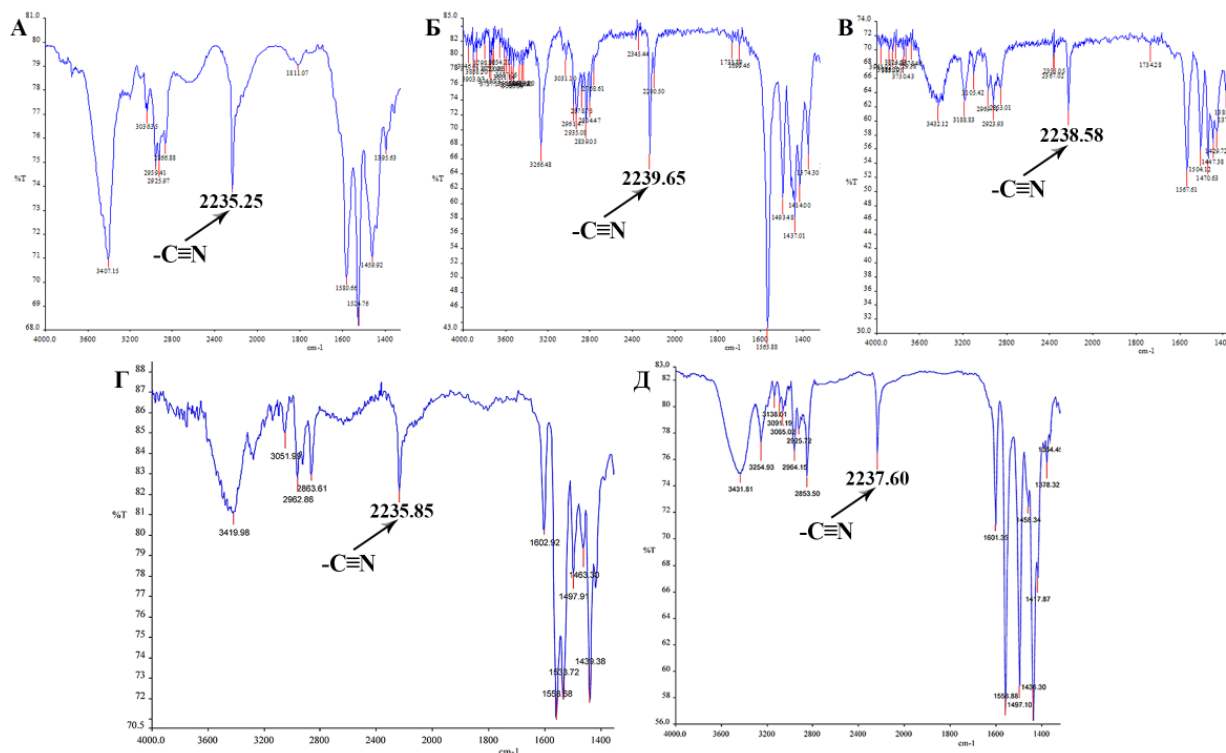
3.2 Спектрална анализа синтетисаних комплекса

Синтетисани комплекси рутенијума(II) додатно су карактерисани инфрацрвеном спектроскопијом. Код комплекса са имидазолним лигандима $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$ (7) [147] уочава се померање сигнала ка вишим вредностима ($1516\text{ cm}^{-1} > 1534\text{ cm}^{-1}$ (спектар А); $1509\text{ cm}^{-1} > 1533\text{ cm}^{-1}$ (спектар Б) у карактеристичном делу спектра за имидазоле, што указује на координацију лиганда за рутенијум(II) јон (Слика 27).



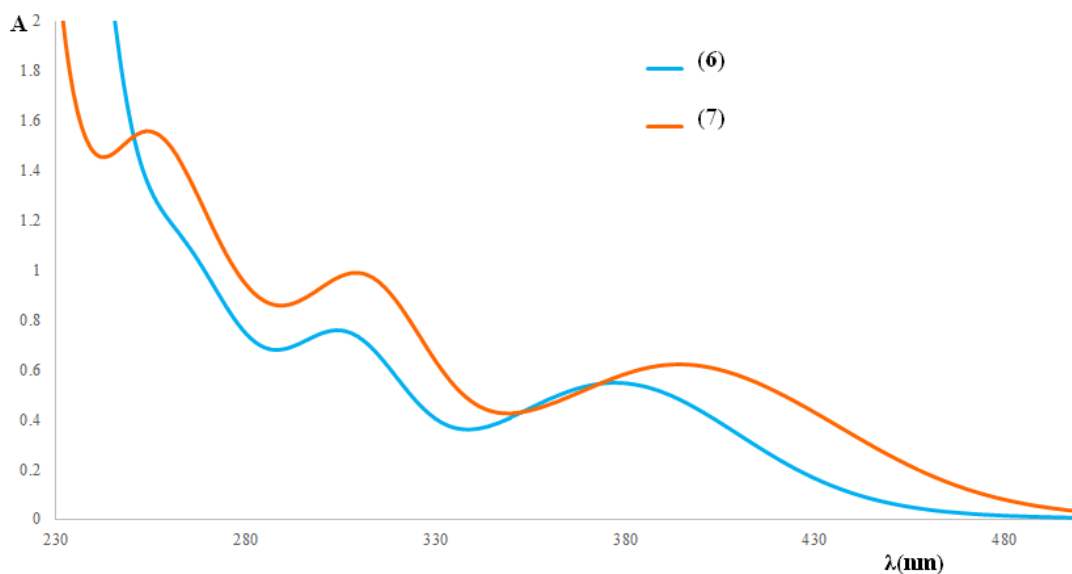
Слика 27. Инфрацрвени спектри комплекса 6 (А) и 7 (Б)

Комплекси са изотиазолским лигандима [Ru(η^6 -*p*-cymene)Cl₂(5-MA-3-PyCN-ITZ)] (**8**), [Ru(η^6 -*p*-cymene)Cl₂(5-MA-4-MPipCN-ITZ)] (**9**), [Ru(η^6 -*p*-cymene)Cl₂(5-MA-3-MorphCN-ITZ)] (**10**), [Ru(η^6 -*p*-cymene)Cl₂(5-PhA-3-PyCN-ITZ)] (**11**) и [Ru(η^6 -*p*-cymene)Cl₂(3-Morph-5-PhACN-ITZ)] (**12**) [148, 149] показују оштру траку у опсегу 2228-2239 cm⁻¹ (Слика 28) која одговара -C≡N групи. Ова трака доказује да је лиганд координован за рутенијум(II) јон преко донорског атома азота карбонилне групе у свим горе наведеним комплексима.



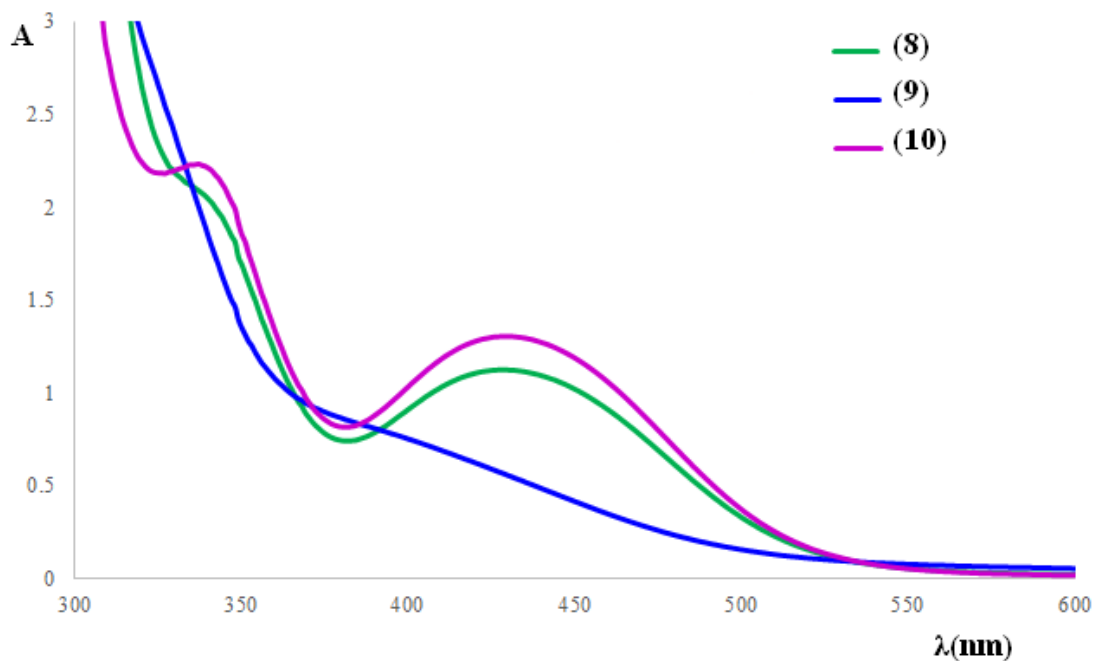
Слика 28. Инфрацрвени спектри комплекса са изотиазолским лигандима [Ru(η^6 -*p*-cymene)Cl₂(5-MA-3-PyCN-ITZ)] (**8**) (А), [Ru(η^6 -*p*-cymene)Cl₂(5-MA-4-MPipCN-ITZ)] (**9**) (Б), [Ru(η^6 -*p*-cymene)Cl₂(5-MA-3-MorphCN-ITZ)] (**10**) (В), [Ru(η^6 -*p*-cymene)Cl₂(5-PhA-3-PyCN-ITZ)] (**11**) (Г), [Ru(η^6 -*p*-cymene)Cl₂(3-Morph-5-PhACN-ITZ)] (**12**) (Д)

Комплекси са имидазолским лигандима су жуте боје, псеудооктаедарске геометрије тзв. „*piano stool*” и добро су растворни у води у којој су растварани за снимање електронских апсорпционих спектра. У електронским апсорпционим спектрима комплекса **6** и **7** уочавају се по три прелаза на сличним таласним дужинама, што се може приписати лигандима имидазоловог типа (Слика 29). Комплекс **7** има већу вредност моларне апсорптивности у односу на комплекс **6** [147] због присуства више угљеникових атома у супституенту.



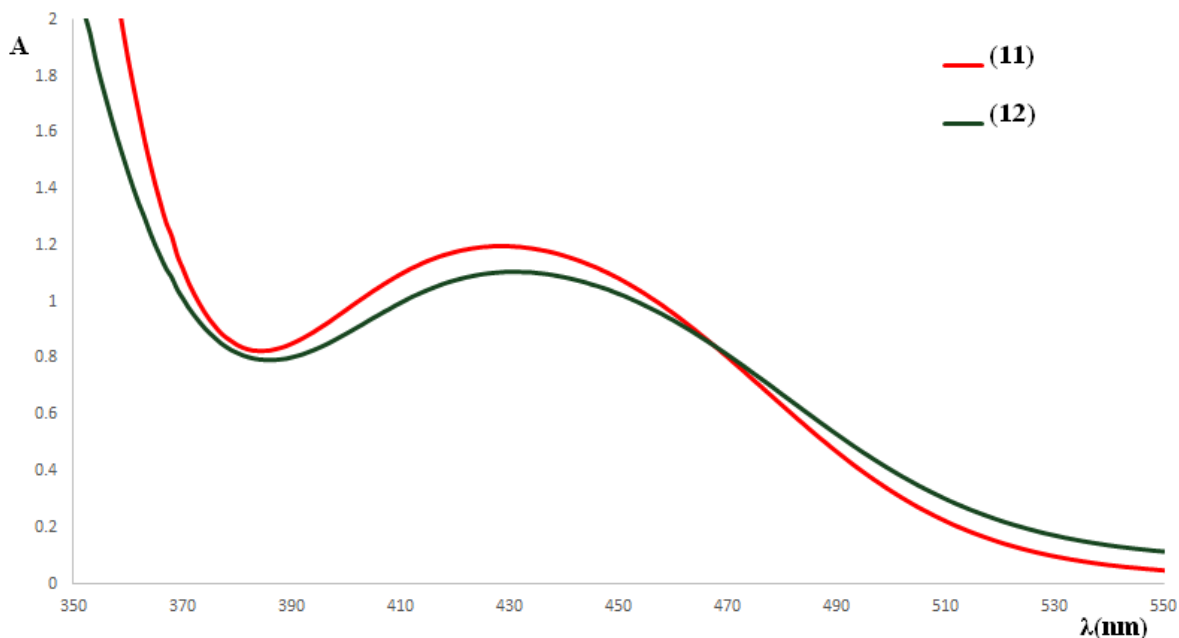
Слика 29. Електронски апсорпциони спектри комплекса $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-}cymene)(N\text{-}MeIm)_3]Cl_2 \cdot 2H_2O$ (6) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-}cymene)(N\text{-}PrIm)Cl_2]$ (7)

Електронски апсорпциони спектри комплекса са метил-изотиазоловим лигандима су снимани у метанолу. Код комплекса **8** и **10** уочена су два јасна прелаза на сличним таласним дужинама, док се код комплекса са метил-пиперазином **9** на 390 nm са вредношћу моларне апсорптивности $406 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Слика 30) [148].



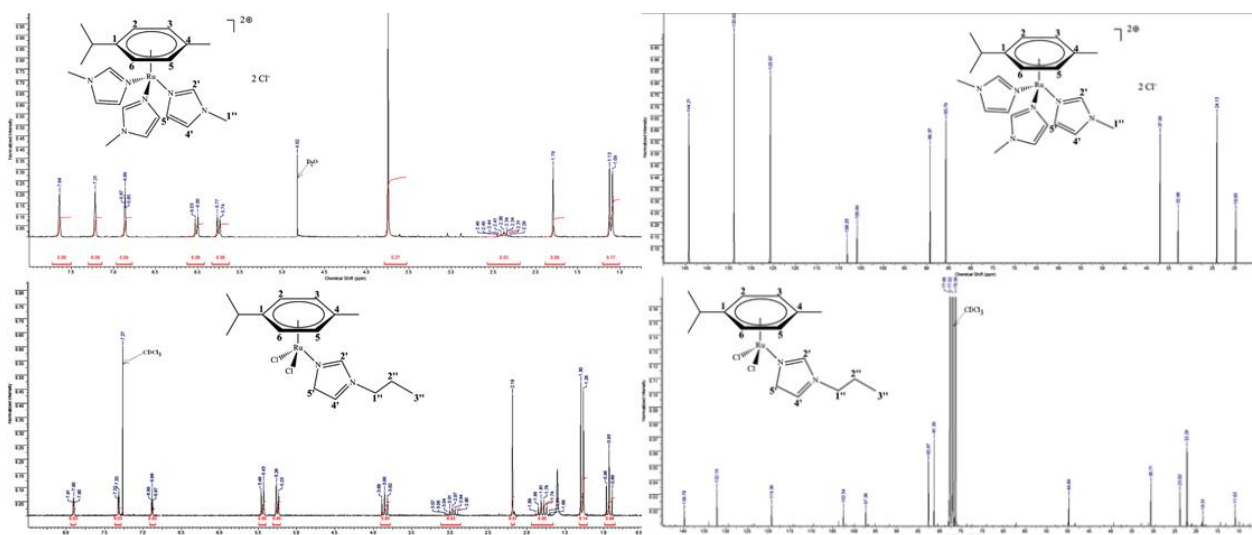
Слика 30. Електронски апсорпциони спектри комплекса $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-}cymene)Cl_2(5\text{-}MA\text{-}3\text{-}PyCN\text{-}ITZ)]$ (8), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-}cymene)Cl_2(5\text{-}MA\text{-}4\text{-}MPipCN\text{-}ITZ)]$ (9) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-}cymene)Cl_2(5\text{-}MA\text{-}3\text{-}MorphCN\text{-}ITZ)]$ (10)

Супротно наведеним комплексима, у спектру комплекса са фенил-изотиазолима као лигандима, појављује се један прелаз, чији је максимум на 429 nm за комплекс **11**, а за комплекс (**12**) на 431 nm (Слика 31). Спектри су снимани у метанолу, а вредности моларне апсорптивности износе: $6,0 \cdot 10^2 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ **11** и $5,5 \cdot 10^2 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ **12** [149].



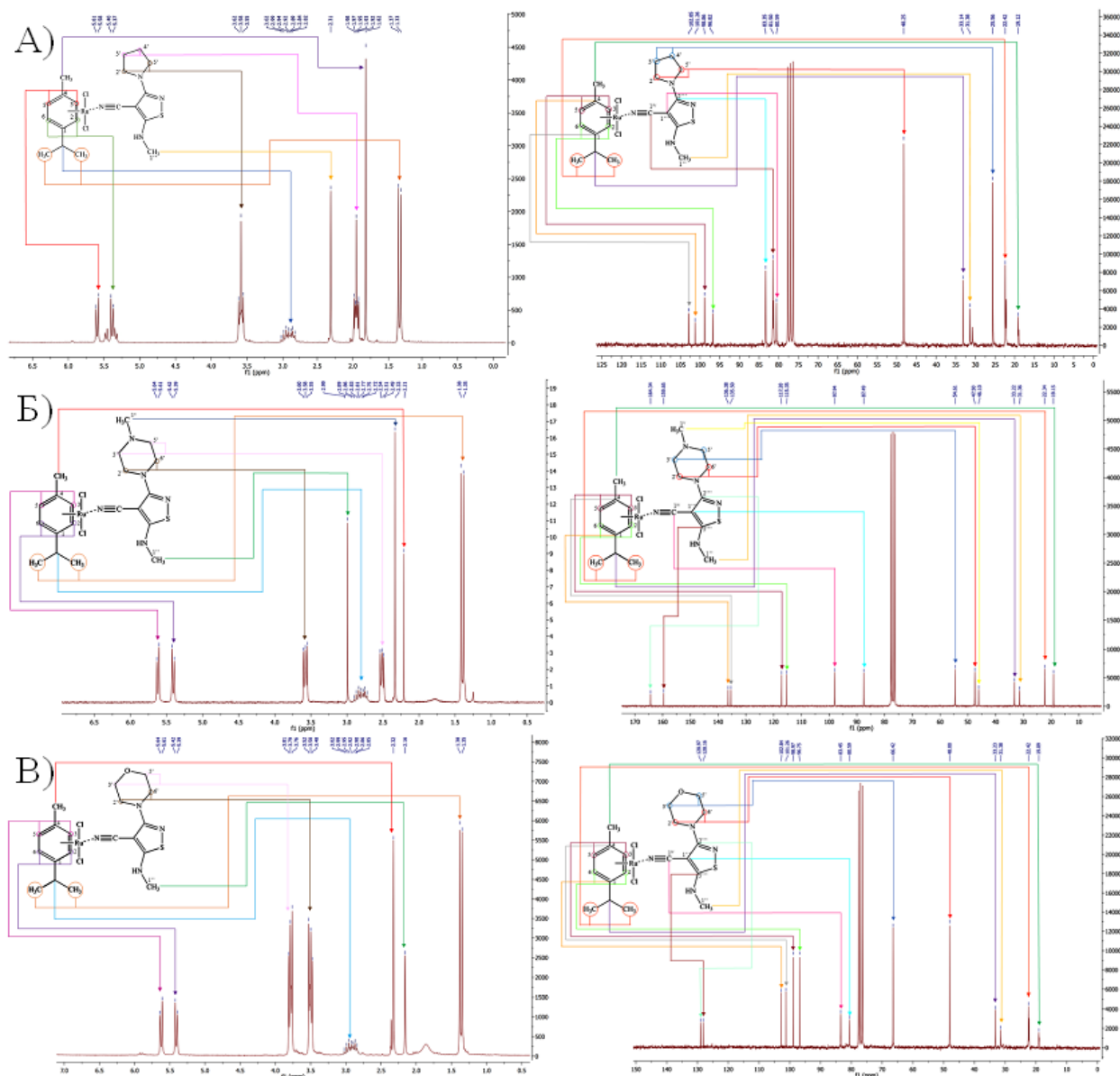
Слика 31. Електронски апсорпциони спектри комплекса $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$ (**11**) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cymene})\text{Cl}_2(3\text{-Morph-5-PhACN-ITZ})]$ (**12**)

NMR спектри су потврдили очекиване структуре комплекса **6** и **7** [147] при чему су сигнали спектра у сагласности са објављеним комплексима сличних структура [66, 146] (Слика 32). Примећене су мале разлике између комплекса **6** и комплекса сличне структуре $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cymene})(N\text{-MeIm})_3][\text{BF}_4]_2$ [1]. Важно је нагласити да је спектар за комплекс **6** сниман у D_2O , док је спектар $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cymene})(N\text{-MeIm})_3][\text{BF}_4]_2$ снимљен у деутерисаном ацетону. Што се тиче ^{13}C NMR спектра поређених комплекса, уочавају се мање промене које се огледају у томе да се код комплекса **6** сигнали померају ка већим фреквенцијама у распону од $\Delta\delta = 0,97 - 2,22$ ppm. За комплекс **7** код кога је за рутенијум(II) координован само један имидазол лиганд, у ^1H NMR спектру долази до померања сигнала ка нижим фреквенцијама у поређењу $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cymene})(N\text{-MeIm})_3][\text{BF}_4]_2$. ^{13}C NMR спектар комплекса **7** је веома сличан спектру $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cymene})\text{Cl}_2(N\text{-MeIm})]$ комплекса [66] који садржи исти број координованих лиганата имидазолског типа.



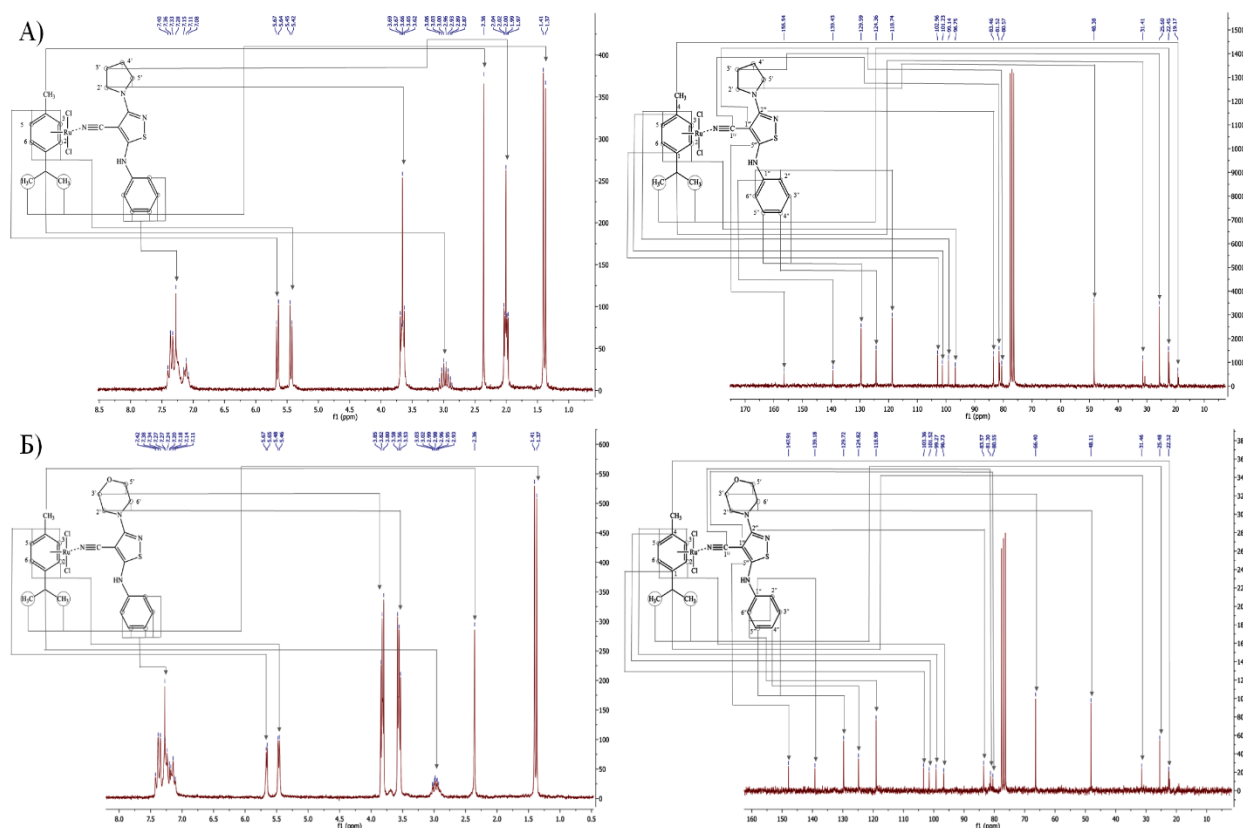
Слика 32. ^1H и ^{13}C NMR спектри комплекса $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**6**) (горе) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$ (**7**) (доле)

NMR спектри комплекса **8** – **10** [148] су снимљени у деутерисаном хлороформу, како би се потврдила координација метил-изотиазолских лиганата за рутенијум(II) јон (Слика 33). У ^1H спектру свих комплекса, оштар синглет који се јавља у интервалу 2,19-2,99 ppm потиче од метил групе, CH_3 . Код комплекса **9** и **10** уочавају се два триплета, који потичу од протона који припадају 4-метилпиперазину ($\delta = 2,51$ и $3,58$ ppm) и морфолину ($\delta = 3,50$ и $3,78$ ppm). У спектру комплекса **8** јавља се квинтет на $\delta = 1,95$ ppm, који се приписује пиролидинским протонима, док се у спектру комплекса **9** јавља додатни сигнал на $2,33$ ppm који потиче од метил групе 4-метилпиперазина. Сви остали сигнали у спектрима комплекса потичу од рутенијум-*p*-цимена.



Слика 33. ^1H и ^{13}C NMR спектри комплекса $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-PyCN-ITZ})]$ (**8**) (А), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-4-MPipCN-ITZ})]$ (**9**) (Б) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-MorphCN-ITZ})]$ (**10**) (В)

Координација лиганата фенил-изотиазолског типа за рутенијум(II), у комплексима **11** и **12** [149], потврђена је снимањем њихових NMR спектра у деутерисаном хлороформу (Слика 34). У ^1H спектрима оба комплекса, присутан је мултиплет у области 7,08 – 7,40 ppm (комплекс **11**) и у области 7,11 – 7,42 ppm (комплекс **12**), који се приписује протонима фенил групе. У спектру комплекса **11** уочена су два мултиплета који припадају протонима из пиролидина ($\delta = 1,97\text{-}2,04$ и $3,62\text{-}3,69$ ppm), док су у спектру комплекса **12** присутна два триплета на 3,56 и 3,82 ppm који потичу од протона морфолина. Сви остали сигнали припадају протонима рутенијум-*p*-цимена. ^{13}C NMR спектри оба комплекса показују одговарајући број сигнала у складу са на њиховом структуром.



Слика 34. ^1H и ^{13}C NMR спектри комплекса $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$ (**11**) А) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(3\text{-Morph-5-PhACN-ITZ})]$ (**12**) Б)

3.3 Интеракције са ДНК

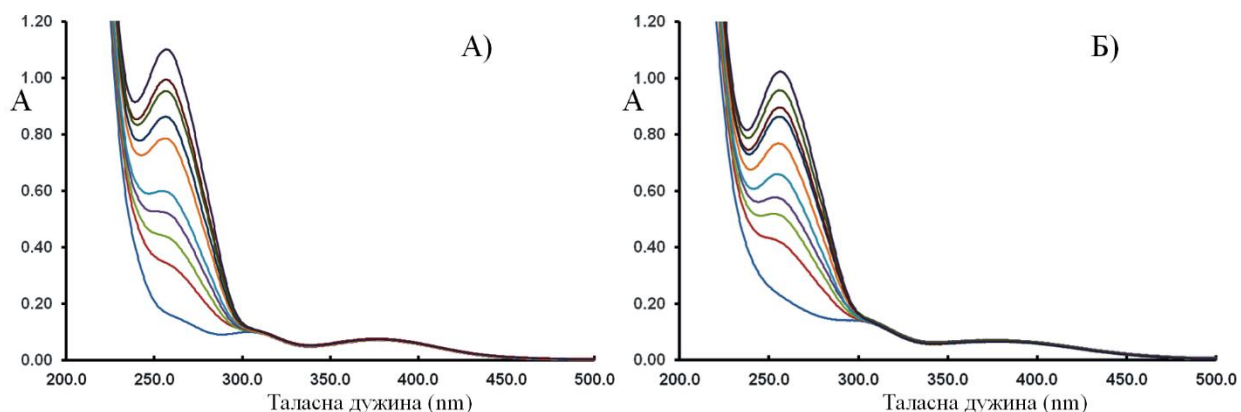
Одређивање интеракција између комплекса прелазних метала и ДНК је од изузетне важности у фармакологији приликом испитивања њихове антитуморске активности [191]. Ротлисбергер (Ursula Rothlisberger) и сарадници [68a] су открили да се аренски комплекси рутенијума лако везују за N7 атом азота гуанина из ДНК уз истовремено измењивање воде [68a]. Велика флексибилност ДНК омогућава брзо смештање комплекса рутенијума на одговарајућу позицију. Везивање комплекса прелазних метала за ДНК одвија се преко ковалентних и нековалентних веза (интеркалације, електростатичка или жлебна везивања) [191, 192]. Апсорпциона и емисиона спектроскопија су веома корисне методе за проучавање интеракција различитих једињења са ДНК [193]. Интеракцију комплекса метала са паровима база у ДНК обично прати хипохромно или хиперхромно померање [194], које се може приписати електростатичким интеракцијама или својству комплекса да одмота хеликоидну структуру ДНК [195, 196]. У оквиру ове дисертације, начин и јачина везивања лиганата и одговарајућих комплекса за ДНК проучавани су применом UV-Vis и флуоресцентних спектроскопских метода.

3.3.1 UV-Vis спектроскопија

Апсорпциона спектрофотометријска метода је коришћена за испитивање начина везивања комплекса и лиганата за ДНК и одређивања вредности константи везивања (K_b). Израчунате вредности за константу везивања (K_b), Стерн-Волмерову константу (K_{sv}) и број везивних места (n) дате су у Табели 24. За комплекс **6** и **7**, константе везивања су одређиване снимањем UV спектра, при константној концентрацији испитиваних једињења у одсуству или присуству ДНК при различитим $[ДНК]/[комплекс]$ односима. На Слици 35, приказане су спектралне промене у воденом раствору комплекса **6** и **7** са повећањем концентрације ДНК. У спектрима оба комплекса, долази до малих промена у положају апсорпционих максимума (~ 2 nm, плаво померање), што указује на њихово везивање за ДНК. Константе везивања (K_b) су израчунате применом једначине (3) дате у Експерименталном делу. На основу константи везивања, може се закључити да се оба комплекса са имидазолским лигандима умерено везују за ДНК. Вредност K_b комплекса **6** је мања у односу на вредност комплекса **7**, што указује да је афинитет комплекса (**6**) према ДНК слабији у односу на комплекс **7** [147].

Табела 24. Стерн-Волмерове константе (K_{sv}), константе везивања ДНК (K_b) и број везивних места (n) за комплексе **6** и **7**

Комплекс	У одсуству ЕВ				У присуству ЕВ			
	K_{sv} (M^{-1})	K_q ($M^{-1}s^{-1}$)	K_b (M^{-1})	n	K_{sv} (M^{-1})	K_q ($M^{-1}s^{-1}$)	K_b (M^{-1})	n
6	$3,7 \cdot 10^3$	$3,7 \cdot 10^{11}$	$1,4 \cdot 10^4$	1,1	$1,2 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^{11}$	$2,0 \cdot 10^3$	1,1
7	$3,6 \cdot 10^3$	$3,6 \cdot 10^{11}$	$1,7 \cdot 10^4$	1,2	$1,6 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^{11}$	$5,9 \cdot 10^3$	1,2



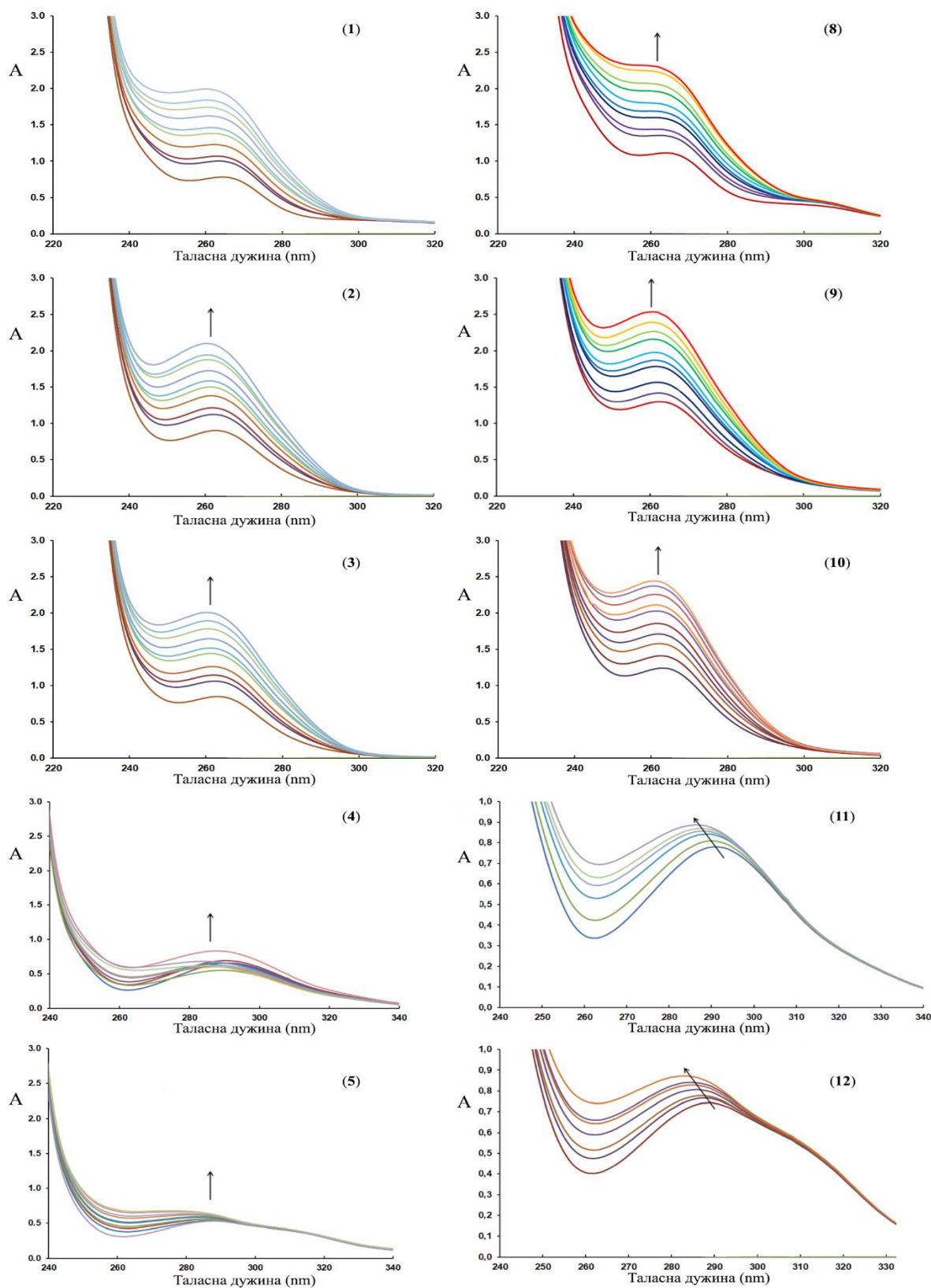
Слика 35. Апсорпциони спектри комплекса **6** А) и **7** Б) ($c = 4,0 \cdot 10^{-5}$ M) у одсуству и присуству растуће концентрације ДНК: $[ДНК]/[комплекс] = 0,0 - 1,0$.

Испитиване су и интеракције лиганата изотиазолског типа и одговарајућих комплекса са ДНК применом UV-Vis спектроскопије. Вредности за константе везивања (K_b) су дате у Табели 25. За сва испитивана једињења у присуству ДНК, повећање интензитета апсорпционог максимума на 264 nm (лиганди **1 - 3** и комплекси **8 - 10**) [148] и 290 nm (лиганди **4, 5** и комплекси **11, 12**) [149] (Слика 36) указује на интеркалативно везивање испитиваних једињења за ДНК [197]. Израчунате вредности за константу везивања (K_b)

показују да лиганд **3** и комплекс **11** имају највећи афинитет везивања за ДНК. Комплекс **10** има најмању константу везивања, иако у његов састав улази лиганд који је показао највећи афинитет ка везивању за ДНК.

Табела 25. Константе везивања испитиваних једињења за ДНК (K_b) израчунате из UV спектра и Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) и константе гашења (K_q) израчунате на основу флуорометријских спектра

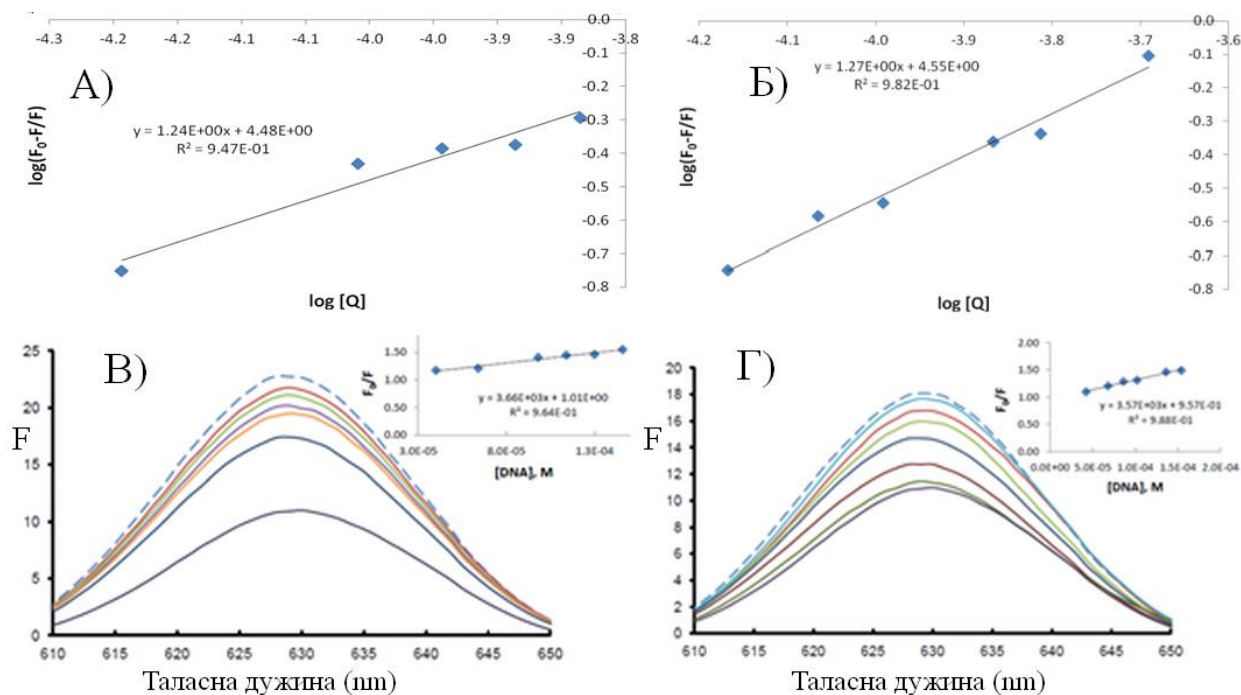
Једињење	У одсуству ЕВ	У присуству ЕВ	
	$K_b (M^{-1})$	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_q (M^{-1}s^{-1})$
1	$2,63 \cdot 10^4$	$5,39 \cdot 10^3$	$5,39 \cdot 10^{11}$
2	$3,67 \cdot 10^4$	$2,08 \cdot 10^3$	$2,08 \cdot 10^{11}$
3	$9,17 \cdot 10^4$	$1,80 \cdot 10^3$	$1,80 \cdot 10^{11}$
4	$3,18 \cdot 10^4$	$3,02 \cdot 10^4$	$3,02 \cdot 10^{12}$
5	$3,70 \cdot 10^4$	$3,41 \cdot 10^4$	$3,41 \cdot 10^{12}$
8	$4,97 \cdot 10^4$	$1,34 \cdot 10^3$	$1,34 \cdot 10^{11}$
9	$1,85 \cdot 10^4$	$1,50 \cdot 10^3$	$1,50 \cdot 10^{11}$
10	$1,04 \cdot 10^4$	$2,32 \cdot 10^3$	$2,32 \cdot 10^{11}$
11	$8,28 \cdot 10^4$	$3,57 \cdot 10^4$	$3,57 \cdot 10^{12}$
12	$4,54 \cdot 10^4$	$3,78 \cdot 10^4$	$3,78 \cdot 10^{12}$



Слика 36. Апсорпциони спектри лиганда **1 – 5** и комплекса **8 – 12** у одсуству и присуству растуће количине ДНК: $[\text{ДНК}]/[\text{комплекс}] = 0,0 - 1,0$

3.3.2 Флуоресцентна спектроскопија

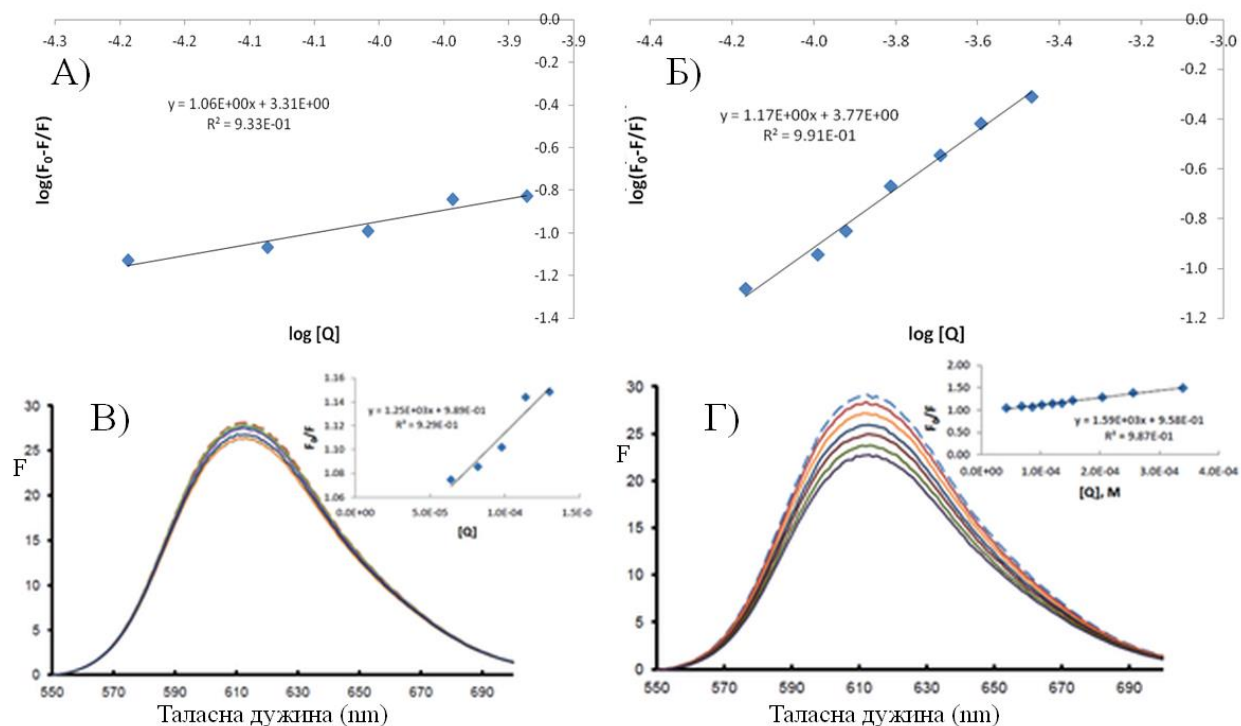
У циљу испитивања способности једињења да истисне етидијум бромид (ЕБ) из ЕБ-ДНК комплекса, испитиване су интеракције комплекса **6** и **7** са ДНК у присуству ЕБ, методом флуоресцентне спектроскопије. Етидијум бромид (3,8-диамино-5-етил-6-фенилфенантридинијум бромид) припада групи индикатора интеркалације, јер са нуклеинским киселинама гради флуоресцентне комплексе. Због тога се промене након додатка испитиваног једињења (укључујући и комплексе метала) уочене у флуоресцентном спектру ЕБ-ДНК система, користе за проучавање њихове интеракције са ДНК [198, 199]. Флуоресцентни емисиони спектри ДНК у одсуству и присуству комплекса **6** и **7** [147], снимани на собној температури, приказани су на Слици 37. Промене флуоресценције указују на везивање испитиваних комплекса за ДНК.



Слика 37. График зависности $\log(F_0 - F)/F$ од $\log[Q]$ ($T = 296$ K) за комплексе **6** А) и **7** Б); Флуоресцентни спектри емисије ДНК у одсуству (испрекидана линија) и присуству (обојене пуне линије) комплекса **6** В) и **7** Г). На уметнутом делу слике В и Г је Стерн-Волмеров график гашења флуоресценције ДНК у присуству комплекса

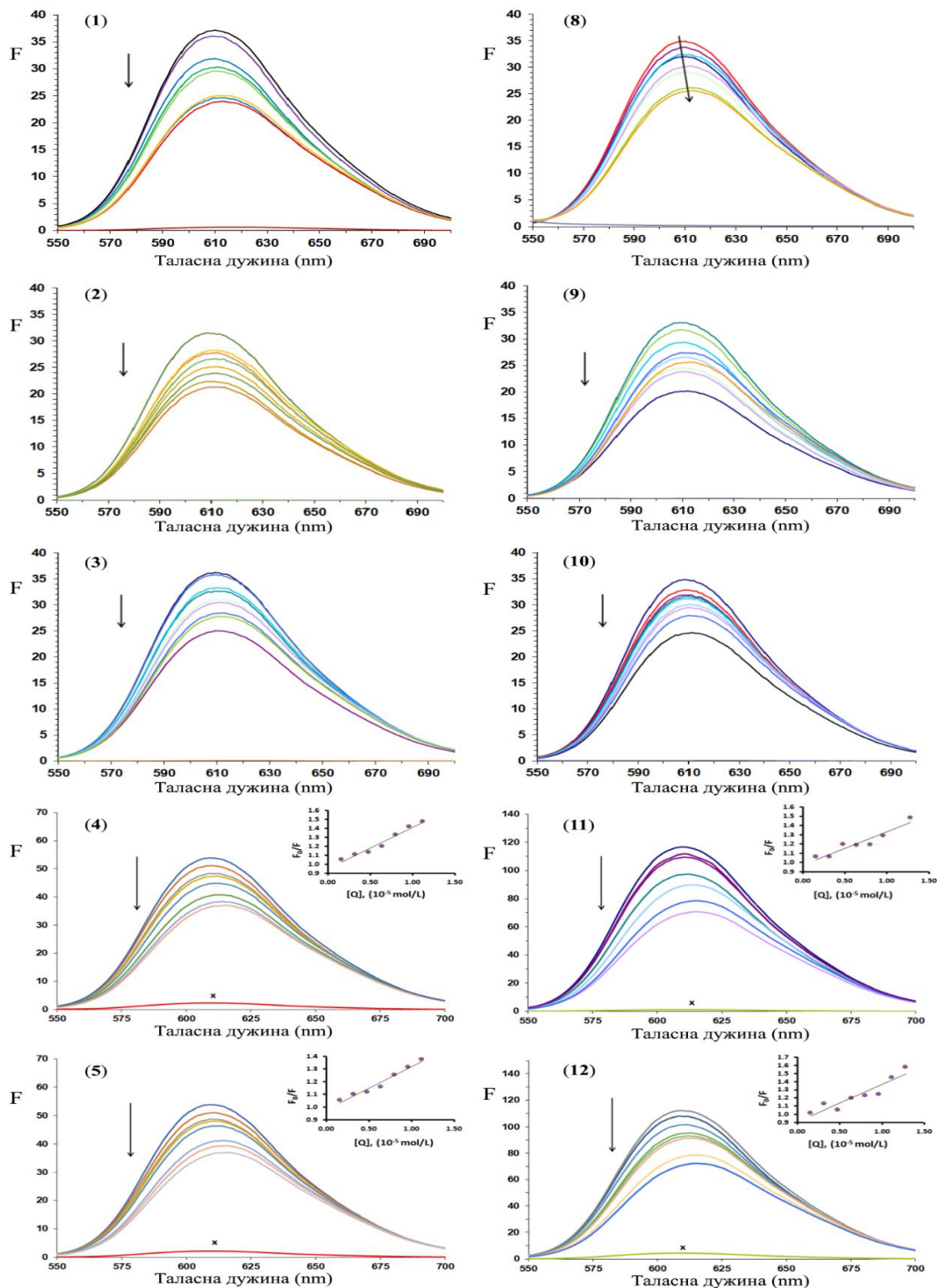
Емисиони спектри ЕБ-ДНК система у одсуству и присуству комплекса **6** и **7**, указују на значајно смањење интензитета емисије (Слика 38), што указује да испитивана једињења истискују ЕБ из ДНК, то значи да се испитивана једињења везују интеркалативно за ДНК. Посматрано гашење флуоресценције ЕБ-ДНК система за испитиване комплексе указује на истискивање ЕБ из ДНК-ЕБ комплекса од стране испитиваних једињења и интеркалативно везивање за ДНК. Вредности Стерн-Волмерових константи (K_{sv}) су дате у Табели 24. Ове вредности показују да је вероватни механизам гашења формирања комплекса између ДНК и испитиваних комплекса највероватније статички процес гашења. Константа гашења за комплекс **6** је нижа у односу за константу комплекса **7**, што се приписује мањој способности комплекса **6** да супституише ЕБ у ЕБ-ДНК комплексу. У Табели 24 дате су и константе

везивања комплекса у присуству ЕБ. Смањене вредности константи ДНК-комплекс система у присуству ЕБ може се објаснити конкуритивном интерференцијом. То значи да у наведеним случајевима постоји конкуренција између ЕБ и комплекса за исто везујуће место на ДНК. Вредности n су приближне јединици, што указује на једно везивно место новосинтетисаних комплекса рутенијума(II) за ДНК.



Слика 38. График зависности $\log(F_0-F)/F$ од $\log[Q]$ ($T = 296\text{ K}$) за комплексе **6** А) и **7** Б); Флуоресцентни спектри емисије ДНК-ЕБ у одсуству (испрекидана линија) и присуству (обојене пуне линије) комплекса (**6**) В) и (**7**) Г). На уметнутом дели слике В и Г је Стерн-Волмеров график гашења флуоресценције ДНК у присуству комплекса

Интеракције лиганда изотиазолског типа **1 – 5** и одговарајућих комплекса **8 – 12** [148, 149] са ДНК у присуству ЕБ су проучаване снимањем флуоресцентних емисионих спектра. Добијени резултати показују да се испитивана једињења везују за ДНК. Емисиони спектри ЕБ-ДНК система у одсуству и присуству испитиваних једињења су приказани на Слици 39. Интензитет флуоресценције ЕБ везаног за ДНК на 613 nm опада са порастом концентрације једињења. Примећено смањење интензитета флуоресценције указује на то да су молекули ЕБ измештени са места везивања ДНК и да су замењени испитиваним једињењима. Вредности Стерн-Волмерових константи (K_{sv}) су дате у Табели 25. Лиганд **3** и комплекс **8** имају најмање вредности за константе гашења, и у најмањој мери супституишу ЕБ из ЕБ-ДНК система. Као што се може видети у Табели 25, вредности K_q су веће од $10^{10}\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ што указује да је механизам гашења статистички процес.



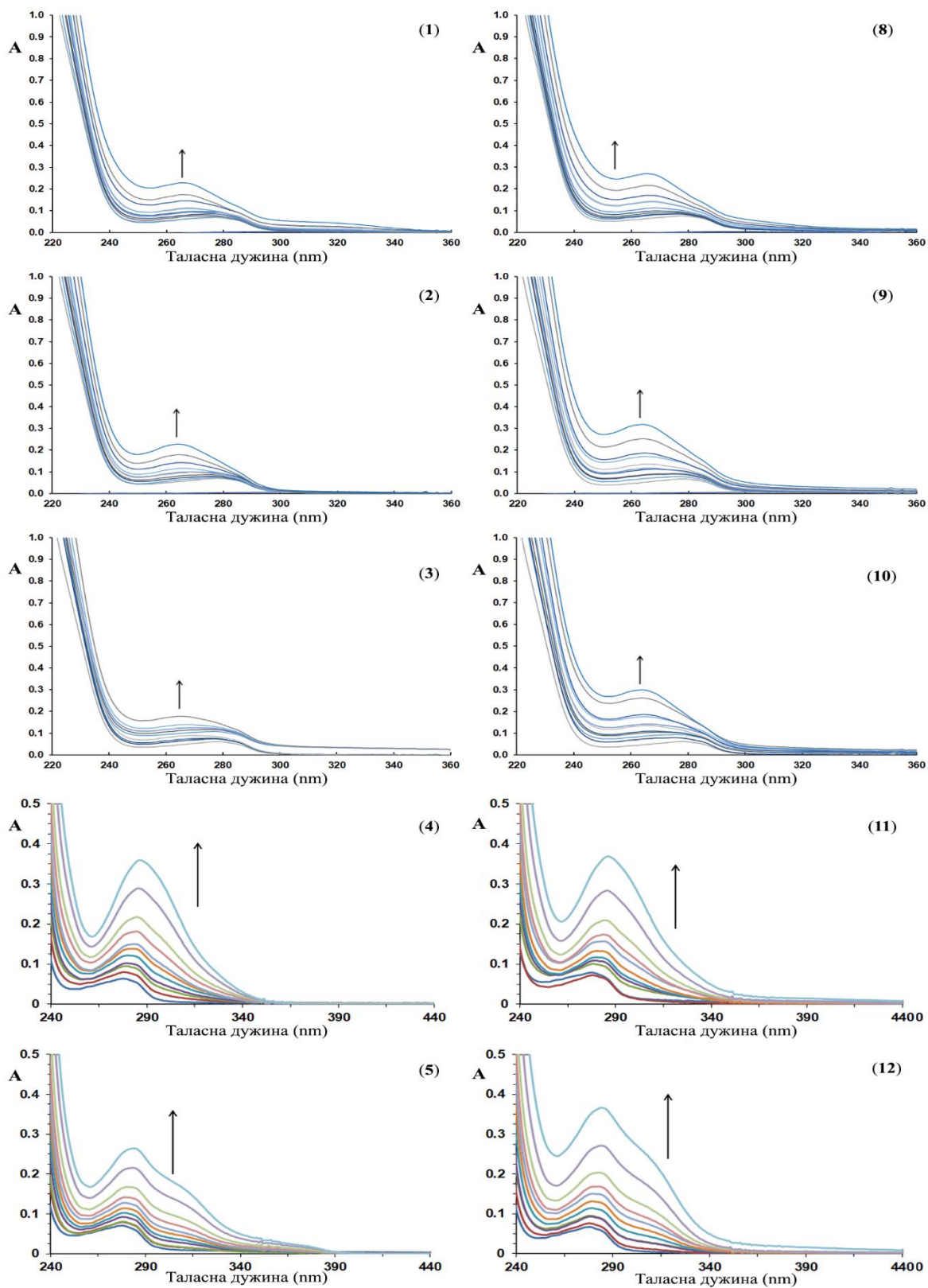
Слика 39. Флуоресцентни емисиони спектри ($\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$) за ЕБ-ДНК у одсуству и присуству лиганда (1 – 5) и комплекса (8 – 12). Стрелица показује промену интензитета флуоресценције након пораста концентрације испитиваног једињења. На уметнутом делу слике приказани су графици зависности F_0/F од [лиганда или комплекса]

3.4 Интеракције са HSA

Најважнија улога албумина је транспорт многобројних биолошки активних једињења (лекови, природни производи, јони метала, комплекси прелазних метала итд.) у крви. Истраживање интеракција између новосинтетисаних једињења и HSA је веома важно у циљу откривања њихове потенцијалне биолошке активности и даље адекватне примене. Степен везивања једињења за албумин одређује његову доступност у организму. Добро је познато да само невезани део једињења (лека) у плазми може слободно проћи кроз ћелијску мембрану и покаже позитивне фармаколошке ефекте [200]. Да би се испитале структурне промене HSA изазване додатком лиганда или комплекса и одредиле њихове константе везивања (K) и број везивних места (n) за овај биомолекул, снимани су апсорпциони и флуоресцентни спектри (за изотиазолске лиганде и њихове комплексе).

3.4.1 UV-Vis спектроскопија

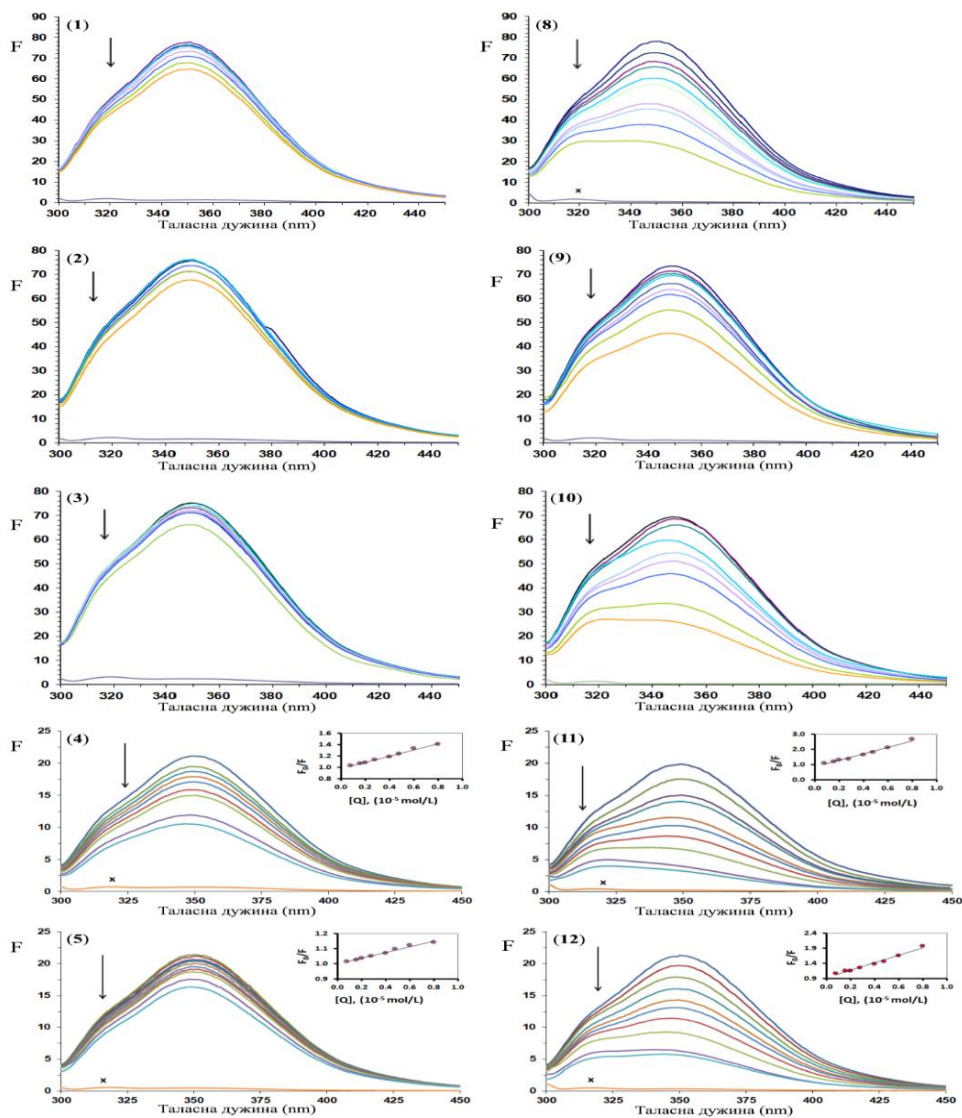
UV-Vis спектроскопија је једноставна метода за испитивање структурних промена HSA у присуству испитиваних једињења, као и одређивање врсте гашења. Гашење се обично догађа помоћу динамичког или статичког механизма. Колизијко (динамичко) гашење утиче само на побуђена стања флуорофоре и на тај начин не долази до промена у апсорпционим спектрима. Супротно томе, формирање комплекса основног стања може довести до поремећаја апсорпционог спектра флуорофоре [121]. За испитивање интеракција лиганда изотиазолског типа и њихових комплекса са албумином хуманог серума снимани су UV-Vis апсорпциони спектри у симулираним физиолошким условима (Слика 40). HSA има слаб апсорпциони максимум на око 280 nm због кумулативне апсорпције три ароматична аминокиселинска остатка (Trp, Tyr и Phe). Као што се са слике може видети, интензитет апсорпције на 280 nm расте са повећањем концентрације лиганда или комплекса [148, 149], што сугерише да је дошло до грађења комплекса између испитиваног једињења и HSA.



Слика 40. Апсорпциони спектри албумина хуманог серума са повећањем концентрације лиганда 1 – 5 и комплекса 8 – 12 на собној температури

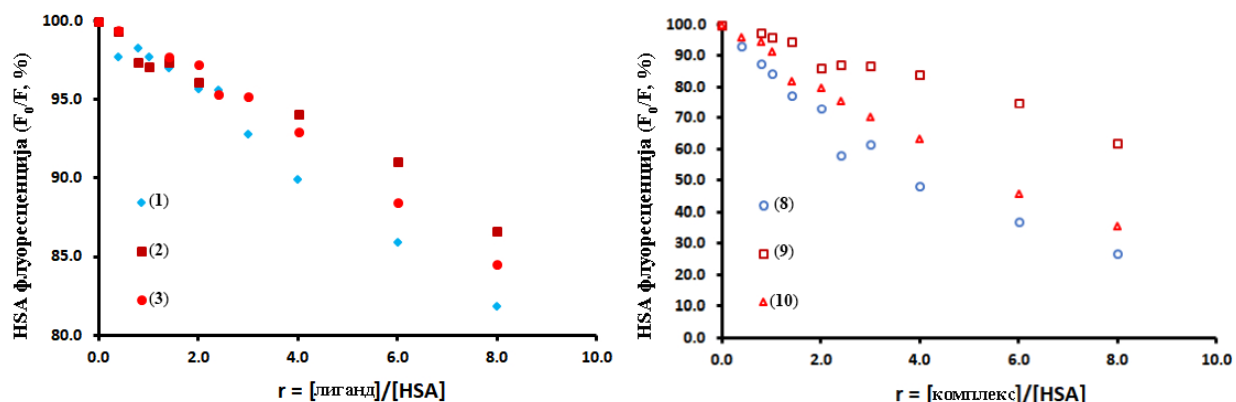
3.4.2 Флуоресцентна спектроскопија

Истраживање везивања једињења за различите биолошке молекуле се врло често заснива на примени методологије гашења флуоресценције. Гашење је сваки процес који смањује интензитет флуоресценције (реакције побуђеног стања, молекуларно преуређивање, пренос енергије и сл.). HSA раствори показују јаку флуоресценцију са максимумом око 350 nm, због остатка триптофана, када су побуђени на 295 nm [162]. Флуоресцентни спектри HSA са различитим концентрацијама лиганата **1 – 5** и одговарајућих комплекса **(8 – 12)** [148, 149] су приказани на Слици 41.



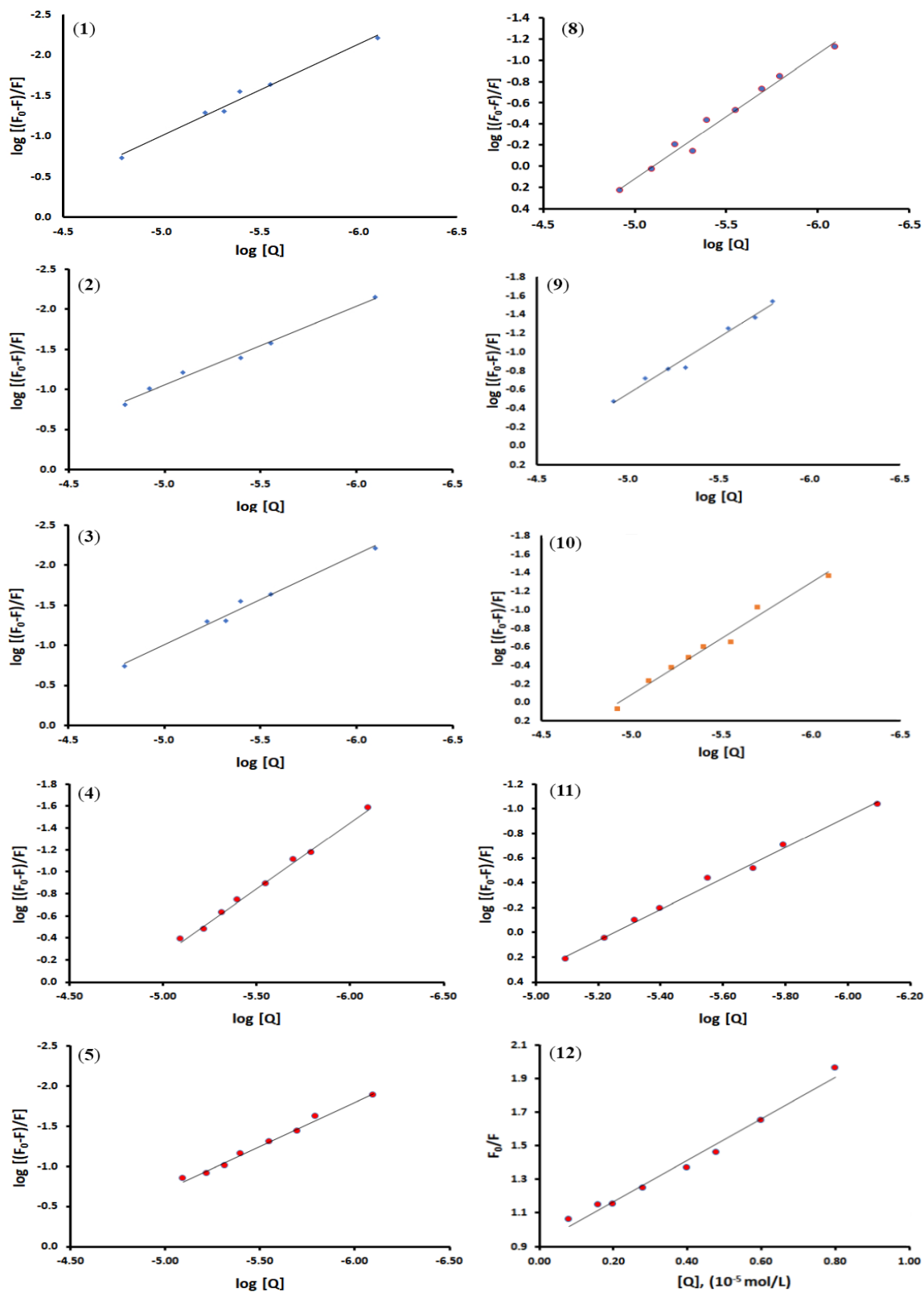
Слика 41. Флуоресцентни емисиони спектри HSA у одсуству и присуству различитих концентрација лиганата **1 – 5** и комплекса **8 – 12**. Стрелица показује промену интензитета флуоресценције након пораста концентрације испитиваног једињења. На уметнутом делу слике приказани су графици зависности F_0/F од [лиганда или комплекса]

Као што се види на Слици 41, додатком комплекса раствору HSA, интензитет флуоресценције HSA се постепено смањивао са повећањем концентрације комплекса. Овакав резултат доводи до закључка да комплекс може реаговати са HSA и угасити његову унутрашњу флуоресценцију (око 30-70 %, код комплекса **8 – 10** [148]). Додавање лиганда раствору HSA резултира гашењем флуоресценције до око 15-20 % (код лиганда **1 – 3**) од почетног интензитета флуоресценције HSA (Слика 42).



Слика 42. График HSA релативног интензитета флуоресценције на $\lambda_{em} = 350 \text{ nm}$ (%) у односу на r ($r = [\text{комплекс}]/[\text{HSA}]$) за лиганде **1 – 3** и њихове одговарајуће комплексе **8 – 10**

Применом једначине (6) (дате у Експерименталном делу), вредности за константу везивања (K) и број везивних места у албумину (n) за лиганде **1 – 5** и њихове одговарајуће комплексе **8 – 12** добијени су из пресека и нагиба графика зависности $\log(F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ (Слика 43).



Слика 43. Графици зависности $\log (F_0 - F)/F$ од $\log [Q]$ за лиганде 1 – 5 и њихове одговарајуће комплексе 8 – 12

Стерн Волмерове константе (K_{sv}) интеракција испитиваних једињења са албумином су израчунате према једначини (5) датој у Експреименталном делу и њихове вредности су приказане у Табели 26. Као што се може видети у тој табели, вредности константи гашења за испитивана једињења су веће од $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, што доводи до закључка да се интеракција лиганда и комплекса са албумином одвија преко статичког механизма гашења и, да долази до формирања новог конјугата између испитиваног једињења и HSA [181]. У Табели 26 су дате и вредности константе везивања (K) и број места везивања (n). Израчуната вредност n износи приближно један за сва испитивана једињења, што указује на постојање само једног везивног места у HSA. Упоређивањем вредности константе везивања лиганда и комплекса за HSA, уочава се већи афинитет ка везивању комплекса за албумин у односу на лиганде, што подразумева да HSA може омогућити лакши пренос комплекса до потенцијалних биолошких циљева.

Табела 26. Стерн-Волмерове константе, константе гашења и параметри везивања (K_{sv} , K_q , K , n) HSA за лиганде **1 – 5** и комплексе **8 – 12**

Једињење	$K_{sv} (\text{M}^{-1})$	$K_q (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K (\text{M}^{-1})$	n
1	$1,45 \cdot 10^4$	$1,45 \cdot 10^{12}$	$4,95 \cdot 10^4$	1,12
2	$7,17 \cdot 10^3$	$7,17 \cdot 10^{11}$	$7,28 \cdot 10^3$	0,98
3	$1,20 \cdot 10^4$	$1,20 \cdot 10^{12}$	$4,39 \cdot 10^4$	1,13
4	$5,52 \cdot 10^4$	$5,52 \cdot 10^{12}$	$6,32 \cdot 10^5$	1,21
5	$1,92 \cdot 10^4$	$1,92 \cdot 10^{12}$	$5,74 \cdot 10^4$	1,09
8	$1,47 \cdot 10^5$	$1,47 \cdot 10^{13}$	$1,04 \cdot 10^6$	1,17
9	$2,93 \cdot 10^4$	$2,93 \cdot 10^{12}$	$2,80 \cdot 10^5$	1,20
10	$7,71 \cdot 10^4$	$7,71 \cdot 10^{12}$	$4,60 \cdot 10^5$	1,16
11	$2,15 \cdot 10^5$	$2,15 \cdot 10^{13}$	$3,62 \cdot 10^6$	1,25
12	$1,24 \cdot 10^5$	$1,24 \cdot 10^{13}$	$1,04 \cdot 10^6$	1,19

3.5 Биолошки тестови – антитуморска активност лиганда и комплекса

3.5.1 MTT тест

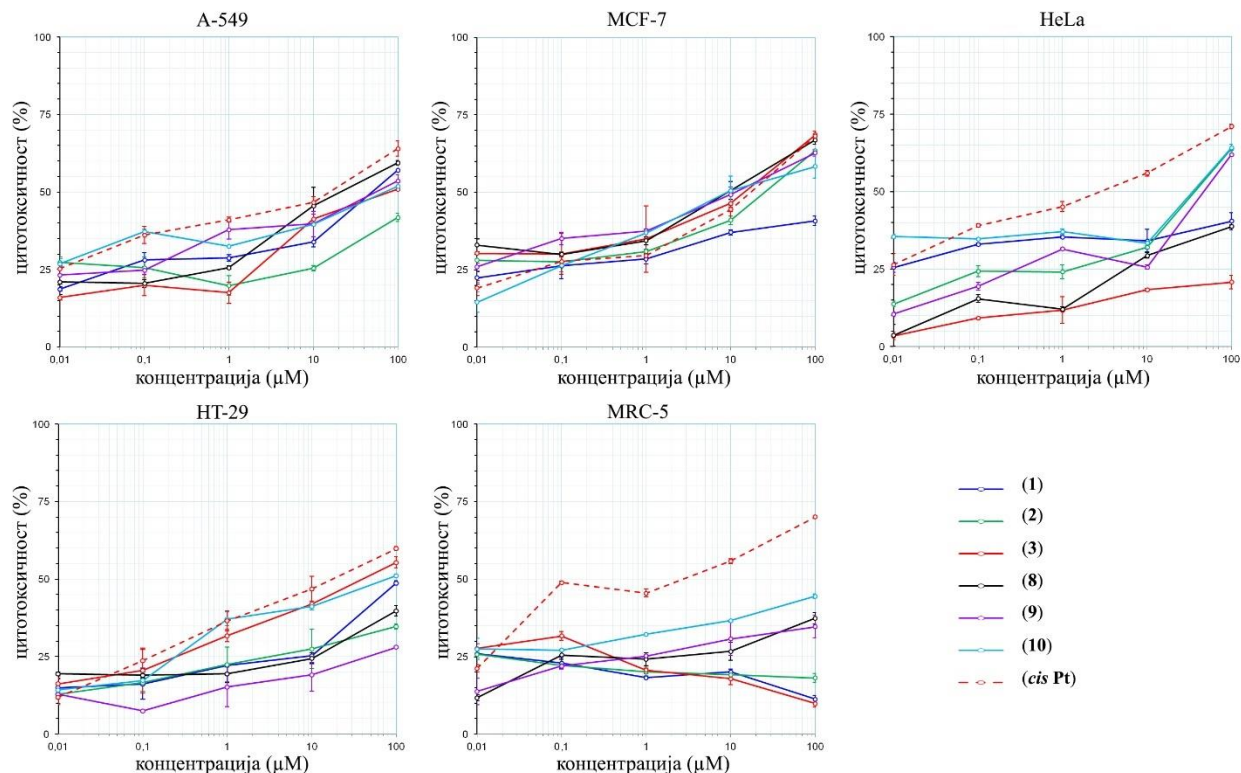
Антипролиферативна активност, односно цитотоксичност, испитивана је за све лиганде изотиазолског типа **1 – 5** [148] и све новосинтетисане комплексе са имидазолским и изотиазолским лигандима. За испитивање цитоотксичности примењен је *in vitro* колориметријски MTT тест. Пет туморских ћелијских линија и једна здрава ћелијска линија је коришћено за тестирање селективне цитотоксичности тестираних једињења. Коришћене су следеће ћелијске линије: А-549 – хумани карцином плућа, MCF-7 – хумани аденокарцином дојке, HeLa – хумани аденокарцином грлића материце, HT-29 – хумани

аденокарцином дебелог црева, НСТ-116 – хумани аденокарцином дебелог црева (коришћена само за лиганде **4** и **5** и комплексе **11** и **12** [149]) и MRC-5 нормални хумани фетални фибробласти плућа. Нетретиране ћелије су коришћене као контролни узорци, а као референтна једињења примењена су цисплатина (*cis*-Pt) и доксорубицин (DOX). IC₅₀ вредности изражене у μM концентрацији дате су у Табели 27 и представљају резултате испитивања цитотоксичности. По дефиницији IC₅₀ вредност представља ону концентрацију једињења која спречава раст ћелије за 50 % у односу на нетретиране ћелије.

Табела 27. IC₅₀ вредности (μM) тестираних лиганада и комплекса у односу на референтна једињења (*cis*-Pt и DOX)

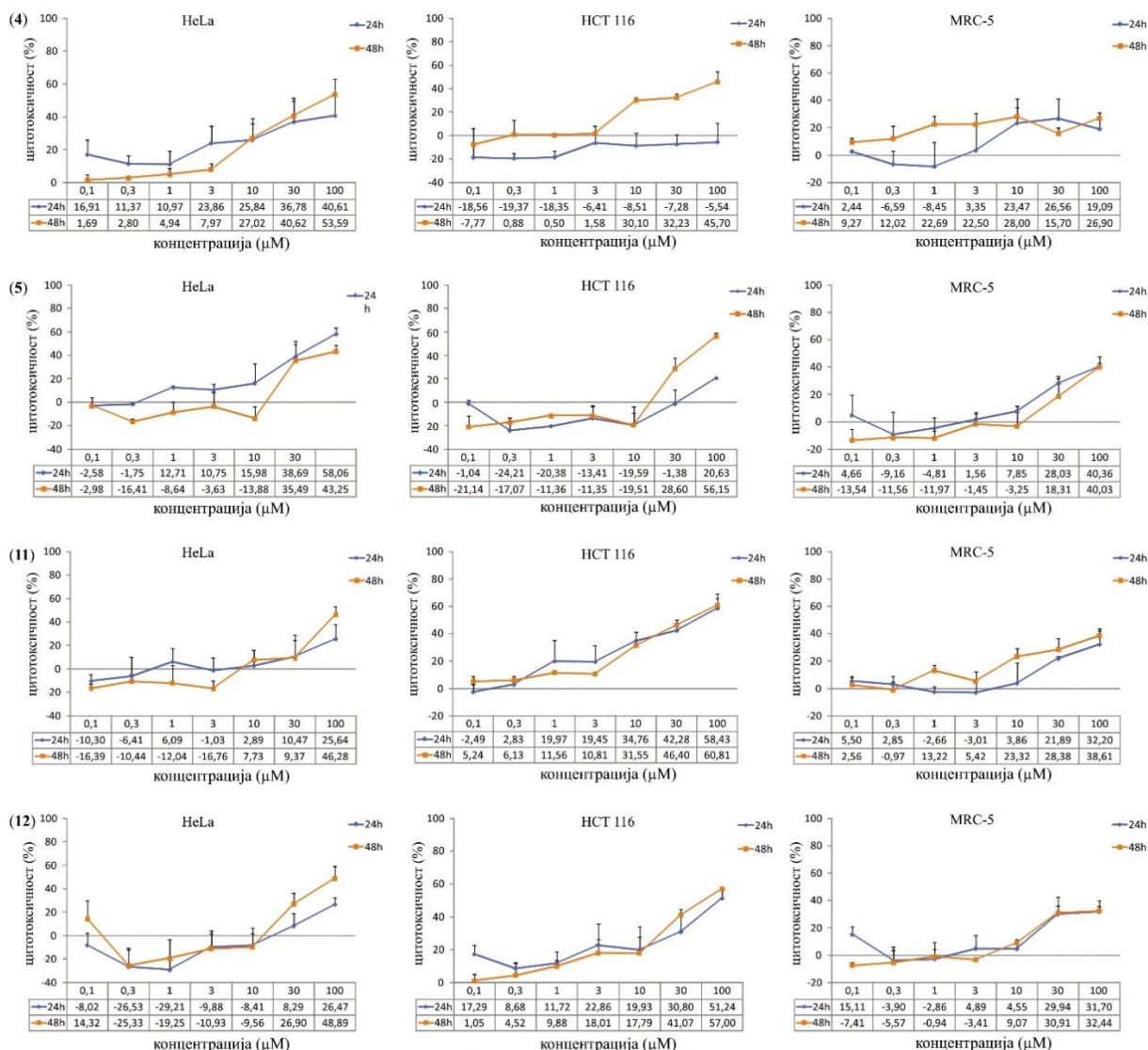
Једињење	Ћелијске линије					
	A-549	MCF-7	HeLa	HT-29	НСТ-116	MRC-5
1	90,25	>100	>100	>100	/	>100
2	>100	25,64	45,3	>100	/	>100
3	89,07	7,04	>100	42,48	/	>100
4	/	/	>100	/	>100	>100
5	/	/	77,43	/	>100	>100
6	48,55	>100	3,03	21,83	/	>100
7	38,99	42,72	4,21	28,39	/	>100
8	32,46	6,34	>100	>100	/	>100
9	18,15	7,98	31,45	>100	/	>100
10	28,14	13,59	5,94	51,73	/	>100
11	/	/	>100	/	59,12	>100
12	/	/	>100	/	95,91	>100
<i>cis</i> Pt	6,75	11,6	1,77	15,9	/	1,48
DOX	0,75	0,12	0,32	7,86	/	1,17

Резултати испитивања цитотоксичности лиганада и комплекса показали су да тестирана једињења смањују виталност свих испитиваних ћелија на начин који зависи од дозе (Слика 44 за лиганде **1** – **3** и комплексе **8** – **10** и Слика 45 за лиганде **4** – **5** и комплексе **11** и **12**) [148, 149]. Цитотоксични ефекти су линеарно зависни од концентрације испитиваних једињења. На основу IC₅₀ вредности издваја се лиганд 5-МА-3-MorphCN-ITZ (**3**), који је показао најбољу активност према MCF-7 ћелијској линији у односу на остале лиганде. Ако упоредимо IC₅₀ вредности свих комплекса, најбољу активност према HeLa ћелији показује комплекс [Ru(η⁶-*p*-cymene)(*N*-MeIm)₃]Cl₂·2H₂O (**6**) [147]. Како су новосинтетисани комплекси са различитим типовима лиганада а истим јоном метала, могу се поделити у три групе, при чему се може упоредити њихова цитотоксичност. Првој групи припадају комплекси [Ru(η⁶-*p*-cymene)(*N*-MeIm)₃]Cl₂·2H₂O (**6**) и [Ru(η⁶-*p*-cymene)(*N*-PrIm)Cl₂] (**7**), који показују најбољу активност у односу на остале комплексе, са посебном активношћу на HeLa ћелији, при чему се издваја комплекс **6** са метил-имидазолским лигандом. У другој групи се налазе комплекси са метил-изотиазолским лигандима, од којих се, по својој активности према HeLa ћелијској линији, издваја комплекс [Ru(η⁶-*p*-cymene)Cl₂(5-МА-3-MorphCN-ITZ)] (**10**). Ова група комплекса је специфична по томе што сви комплекси показују активност вредну помена и ка MCF-7 ћелијама. Трећу групу чине комплекси са фенил-изотиазолским лигандима који нису тестирани на свим ћелијским линијама, али на НСТ-116 ћелији ипак показују одређену активност.



Слика 44. Графички приказ цитотоксичних ефеката лиганата **1 – 3** и комплекса **8 – 10** на A-549, MCF-7, HeLa, HT-29 и MRC-5 ћелијским линијама након 48 h третмана утврђени МТТ тестом. Приказане вредности представљају средње вредности за најмање два независна експеримента

Као што се може видети из наведених IC_{50} вредности највећу осетљивост према свим испитиваним једињењима показала је HeLa ћелијска линија. Сва испитивана једињења су тестирана и на здравој MRC-5 ћелијској линији према којој нису показала дејство, што је добар показатељ да се она могу сматрати потенцијалним кандидатима за антитуморске агенсе.



Слика 45. Цитотоксични ефекат лигананда 4 и 5 и комплекса 11 и 12 на HeLa, HCT 116 и MRC-5, након 24 и 48 h третмана утврђени МТТ тестом. Приказане вредности представљају средње вредности за најмање три независна експеримента

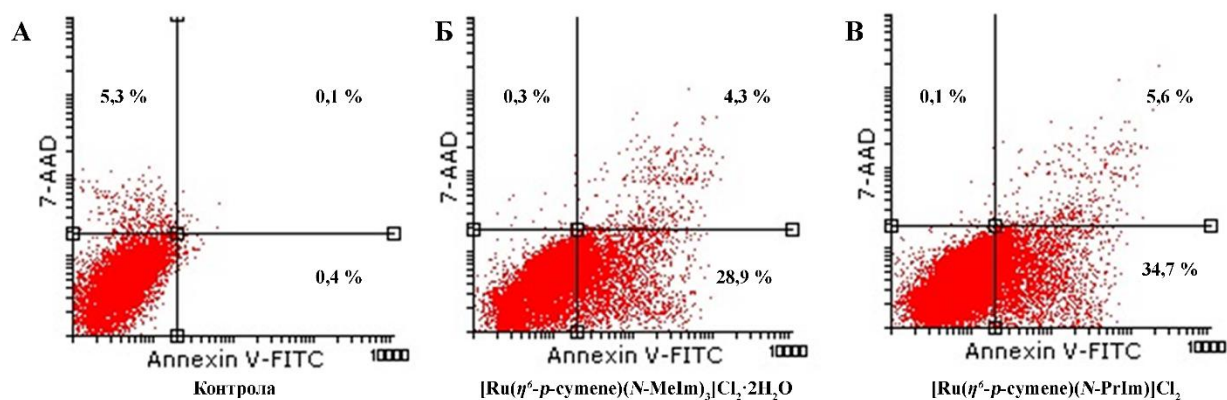
3.5.2 Ћелијска смрт и њени типови

Ћелијска смрт настаје услед деловања физичких и хемијских агенаса, микроорганизама или недостатка основних животних материја, што узрокује неповратно оштећење саме ћелије. Постоје неколико типова ћелијске смрти у зависности од морфолошких карактеристика и то су: апоптоза, некроза, аутофагија, корнификација, митотичка катастрофа и друге [201-205]. Апоптоза представља тип ћелијске смрти који се јавља у физиолошким и патолошким условима. Она представља „програмирану ћелијску смрт“, при чему ћелија користи енергију и активно учествује у процесу. Апоптоза се још може и назвати ћелијским самоубиством у оквиру којег ћелија трпи низ морфолошких промена, као што су: кондензација хроматина у једру и редукција запремине ћелије, при

чему мембрана остаје цела. Изузетно је важна функционалност целе мембране, јер се праћење заснива на морфолошким процесима. За регулисање апоптотских процеса Bcl-2 протеини имају кључну улогу. Равнотежа између про- и анти- апоптотских Bcl-2 протеина утичу на апоптозу, при чему су значајнији анти-апоптотски Bcl-2 протеини, чија активност у самом процесу може утицати на отпорност туморских ћелија на лекове [206-210]. Супротно апоптози, може се говорити о некрози као пасивном типу ћелијске смрти који се јавља у екстремно нефизиолошким условима. Код некрозе долази до бубрења ћелије, разарања цитоплазме и једра и на крају до запаљенске реакције као последица цурења интрацелуларног садржаја у ванћелијски простор. У оквиру ове дисертације испитивана је апоптоза као тип ћелијске смрти кроз примену метода проточне цитометрије, флуоресцентне микроскопије и Western blot анализе.

3.5.2.1 Анализа апоптозе као типа ћелијске смрти методом проточне цитометрије уз употребу Annexin-V тестова

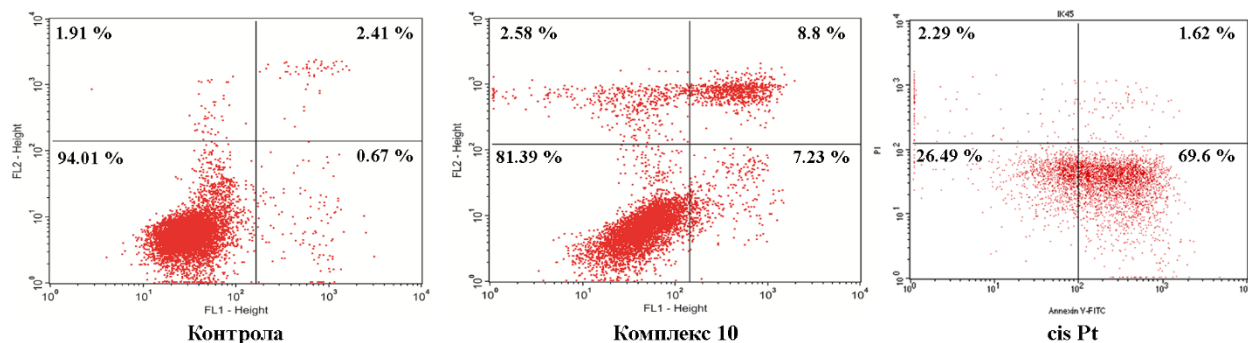
Апоптоза је програмирана ћелијска смрт и индикација апоптотичног процеса у туморским ћелијама је главни циљ антиканцерогене терапије [211]. Први знаци који указују на апоптозу јесу промене на мембрани ћелије. Annexin-V је молекул који је показао велики афинитет ка везивању за ћелијску мембрану и због тога се и користи за детекцију апоптотских ћелија [212]. За комплексе **6** и **7** бојење ћелија је извршено користећи Annexin-V конјунгован са флуоресцеин-изотијаџанатом (FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) (двоструко бојење). Анализа је показала да преовладавају ране апоптотске ћелије 28,9% и 34,7% када су третиране комплексима **6** и **7** (Слика 46) [147]. Само мали проценат ћелија био је у касној апоптози (4,3 и 5,6%), док је некроза била у занемарљивом проценту (0,3 и 0,1%).



Слика 46. Анализа проточне цитометрије комплекса **6** и **7** применом Annexin V-FITC/7 ADD теста. Тачке на дијаграму показују проценат вијабилних Annexin V-7-AAD⁻ (доњи леви квадрант), рано апоптотичних Annexin V⁺7-AAD⁻ (доњи десни квадрант), касно апоптотичних Annexin V⁺7-AAD⁺ (горњи десни квадрант) и некротичних ћелија Annexin V-7-AAD⁺ у нетретираним HeLa ћелијама (контрола) и HeLa ћелијама третираним комплексима **6** и **7**

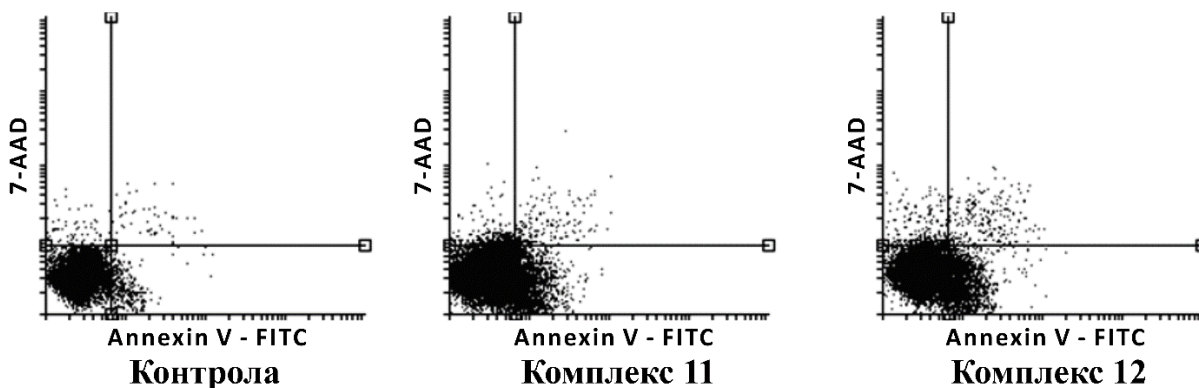
За комплекс **10** [148] бојење ћелија је извршено користећи Annexin-V-FLUOS тест на HeLa ћелијама. После 48 h већина ћелија је била апоптотична (рано апоптотичне ћелије 7,23% и касно апоптотичне ћелије 8,8%), док је занемарљив проценат некрозе. Такође, апоптотички одговор, приказан као проценат специфичне апоптозе (Слика 47), показује да

цисплатина умножава проценат HeLa ћелија које су позитивне на Annexin-V-FLUOS у поређењу са тестираним комплексом.



Слика 47. Анализа проточне цитометрије комплекса **10** наспрам *cis*-Pt применом Annexin V-FLUOS теста. Тачке на дијаграму показују проценат вијабилних Annexin V⁻7-AAD⁻ (доњи леви квадрант), рано апоптотичних Annexin V⁺7-AAD⁻ (доњи десни квадрант), касно апоптотичних Annexin V⁺7-AAD⁺ (горњи десни квадрант) и некротичних ћелија Annexin V⁻7-AAD⁺ у нетретираним HeLa ћелијама (контрола) и HeLa ћелијама третираним комплексом **10**

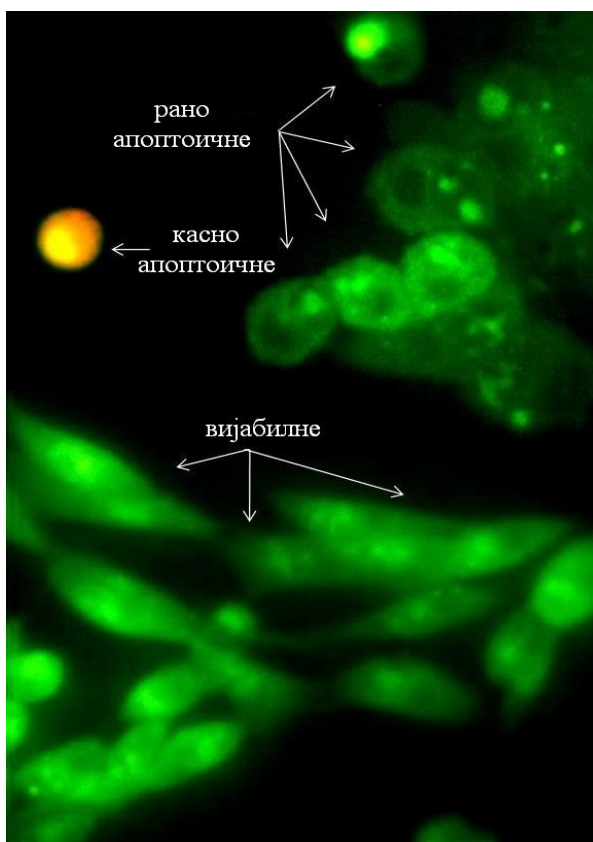
Комплекси **11** и **12** [149] такође показују апоптозу, што је и доказано бојењем НСТ-116 ћелија, користећи Annexin-V тест конјунгован са флуоресцеин-изотијацанатом (FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD) (двоструко бојење). Након 48 h, већина ћелија је рано апоптотична (22,98% **11** и 24,82% **12**), док је веома мали проценат касно апоптотичан или некротичан (Слика 48).



Слика 48. Анализа проточне цитометрије комплекса **11** и **12** применом Annexin V-FITC/7-ADD теста. Тачке на дијаграму показују проценат вијабилних Annexin V⁻7-AAD⁻ (доњи леви квадрант), рано апоптотичних Annexin V⁺7-AAD⁻ (доњи десни квадрант), касно апоптотичних Annexin V⁺7-AAD⁺ (горњи десни квадрант) и некротичних ћелија Annexin V⁻7-AAD⁺ у нетретираним НСТ116 ћелијама (контрола) и НСТ-116 ћелијама третираним комплексима **11** и **12**

3.5.2.2 Тест флуоресцентне микроскопије Акридин-оранж/етидијум-бромидом (АО/ЕБ)

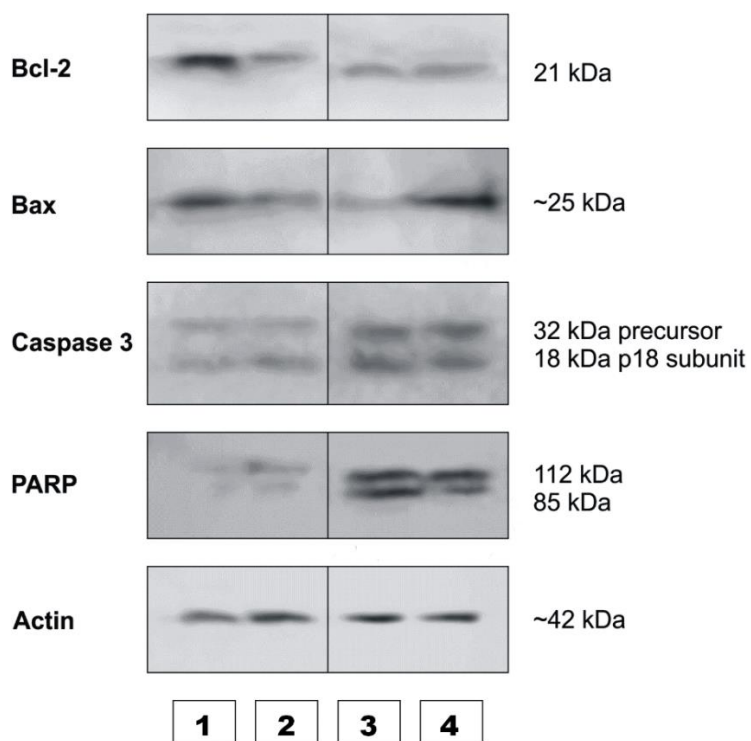
Метода флуоресцентне микроскопије је још једна метода за успешну потврду апоптозе [169]. Она се заснива на способности акридин-оранжа да улази у вијабилне и невијабилне ћелије, при чему се интеркалира у ДНК и емитује флуоресцентно зелено. Са друге стране, етидијум-бромид, када доспе у ДНК, емитује флуоресцентну наранџасту и улази само у невијабилне ћелије [213]. У зависности од ћелијске морфологије, изгледа једра и флуоресценције, разликују се: вијабилне, рано апоптотичне, касно апоптотичне и некротичне ћелије. Методом АО/ЕБ потврђено је да HeLa ћелије третиране испитиваним комплексима **6** и **7** показују апоптозу (Слика 49) [147].



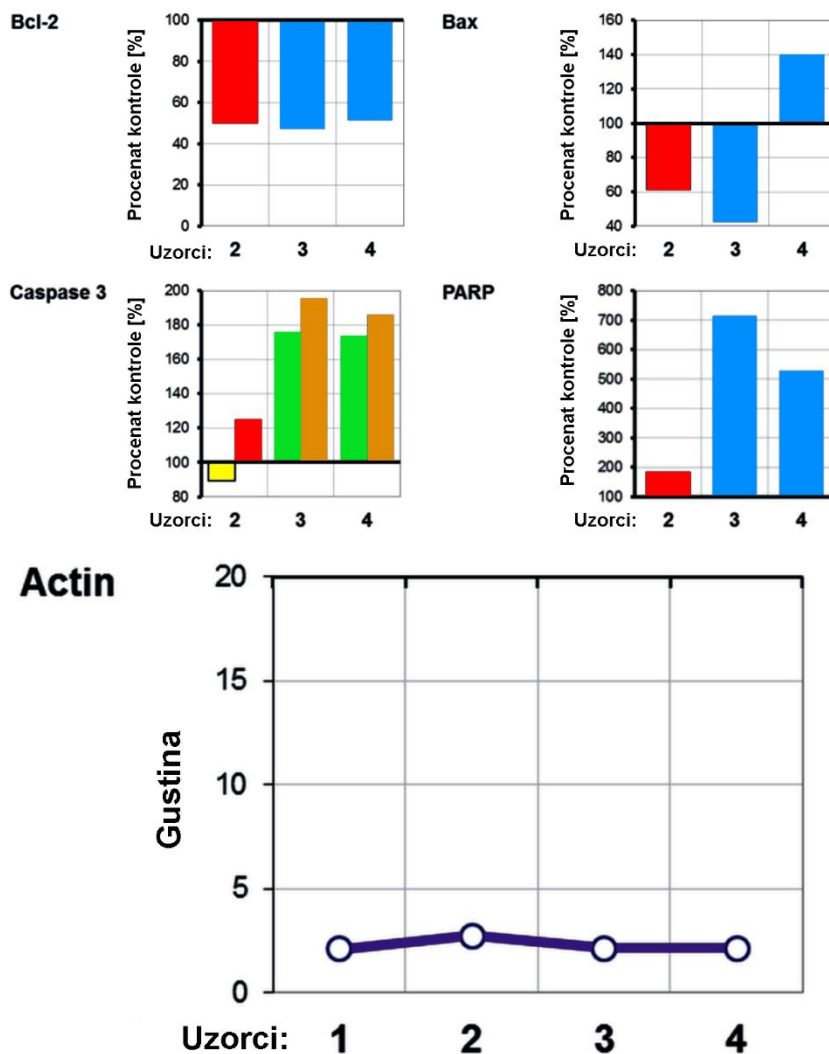
Слика 49. Морфолошке промене HeLa ћелија приписане апоптози. Ћелије су третиране 48 h са IC₅₀ концентрацијама комплекса **6** и **7** и обојене флуоресцентним бојама, акридин-оранж и етидијум-бромид. Оба комплекса изазивају апоптотске морфолошке промене. Вијабилне ћелије имају зелена језгра са организованом структуром. Ране апоптотичне ћелије су заобљене са јарко зеленом бојом. Касно апоптотичне ћелије имају јарко наранџаста до црвена језгра са кондензованим или фрагментираним хроматином

3.5.2.3 Western blot анализа

Western blot анализа је семи-квантитативна анализа која се заснива на праћењу промена нивоа про-апоптотских и анти-апоптотских протеина у испитиваним ћелијама. Резултати Western blot анализе су показали да комплекси **6** и **7**, утичу на експресију апоптотских протеина у третираним ћелијама (Слике 50 и 51) [147]. Експресија протеина Bcl-2 и Вах је смањена у односу на контролу у случају комплекса **6**. Експресија Вах протеина је била већа само за комплекс **7**, док и комплекс **6** и комплекс **7** показују благо повећање експресије каспазе-3 (Слике 50 и 51). Међутим, Western blot анализа је показала цепање поли-(ADP-рибоза) полимеразе (PARP) након третирања испитиваним комплексима (Слике 48 и 49). Експресија актина, као интерног стандарда, била је уједначена код оба комплекса, са варијацијама мањим од 5% у поређењу са контролним узорцима. Откривено цепање протеина PARP у узорцима HeLa ћелија третираних комплексима **6** и **7** потврђује спроведену апоптозу. Смањена експресија протеина Bcl-2 је примећена у узорцима и након третмана. Bcl-2 протеини су препознати као важне мете за лечење против рака [214, 215], а чињеница да оба испитивана комплекса показују смањење његове експресије, доводи до закључка да су и сами комплекси интересантни са фармаколошког становишта.



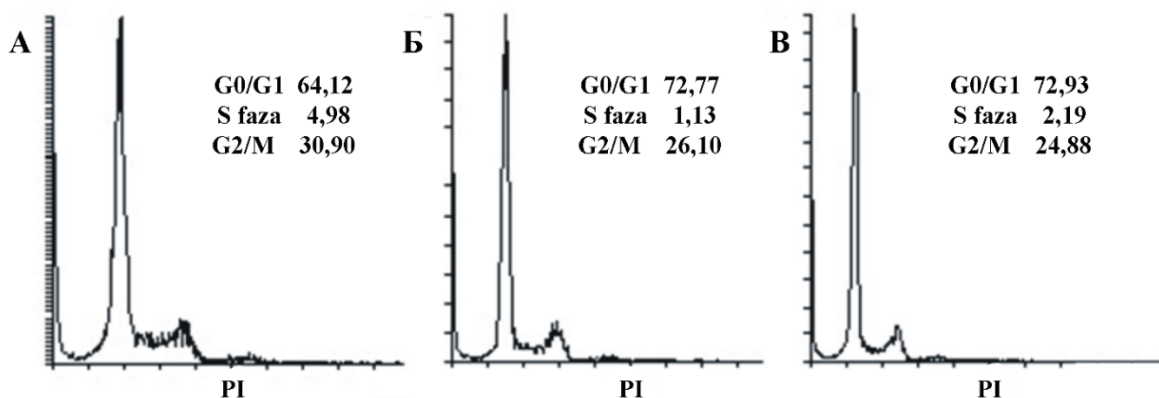
Слика 50. Експресија апоптотских протеина испитивана Western blot анализом: 1. Контролни узорак; 2. Доксорубицин; 3. Комплекс **6**; 4. Комплекс **7**



Слика 51. Графички приказ дензитометријских података експресије протеина који су добијени Western blot анализом и обрађени помоћу ImageJ <http://imagej.nih.gov> [216]. Експресија протеина који припадају апоптотичком сигналном путу у узорцима упоређена је са нетретираним узорцима и представљена је као проценат контроле. Дензитометрија експресије актина, који служи као унутрашња контрола, приказана је као мерена: 1. Контролни узорак; 2. Доксорубицин; 3. Комплекс 6; 4. Комплекс 7

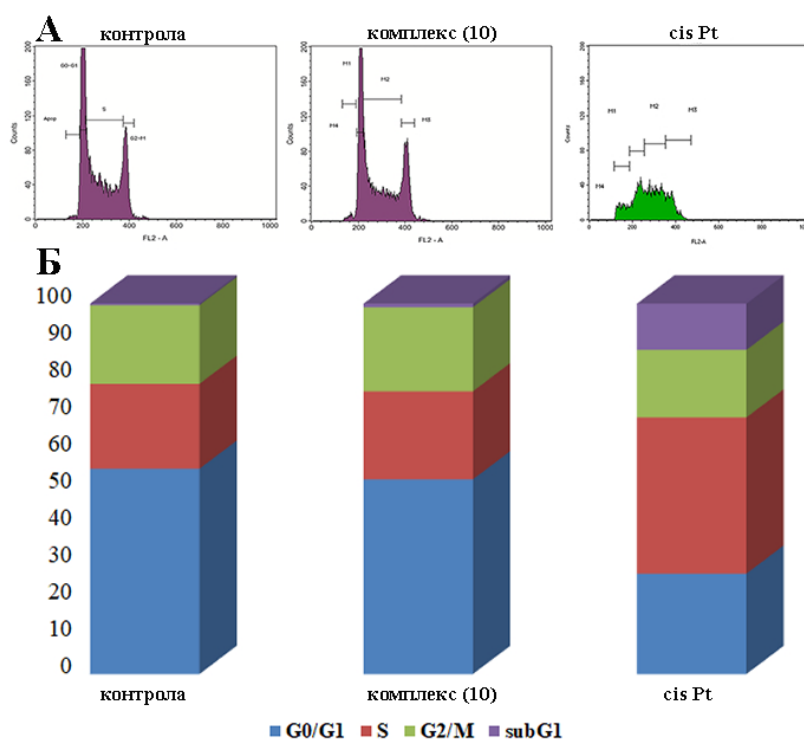
3.5.2.4 Анализа ћелијског циклуса

Анализа ћелијског циклуса показала је да комплекси 6 и 7 заустављају раст ћелија у G0/G1 фази ћелијског циклуса (72,77% за комплекс 6 и 72,93% за комплекс 7, у поређењу са 64,12% у контролном узорку) (Слика 52), смањујући истовремено проценат ћелија у S фази (1,13 и 2,19% за комплексе 6 и 7 и 4,98% за контролу) [147]. Заустављена синтеза ДНК доводи до инхибиције раста и коначно до индукције апоптозе.



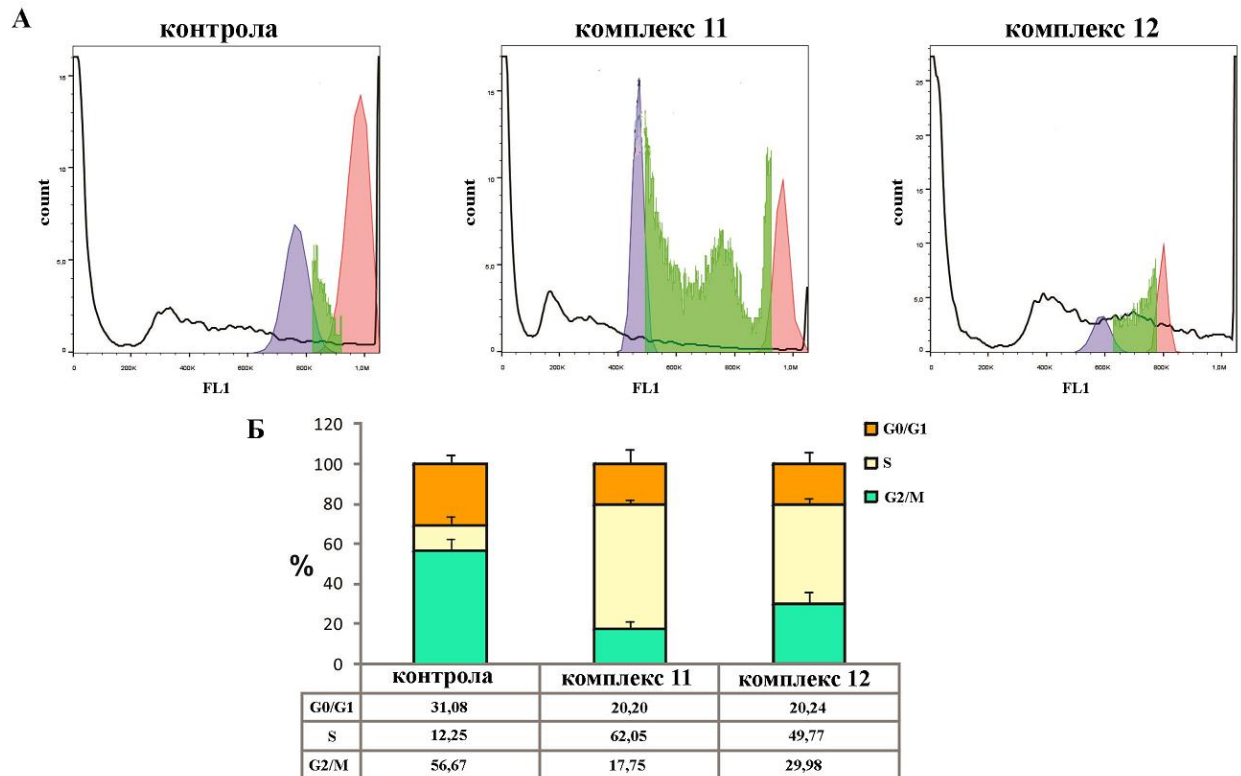
Слика 52. Анализа ћелијског циклуса. Хистограми представљају дистрибуцију ћелијског циклуса у нетретираним HeLa ћелијама (А) и ћелијама третираним 48 h са комплексима 6 (Б) и 7 (В)

Комплекс 10 и цисплатина, након 48 h третмана, смањили су проценат ћелија у G2/M фази за 40% и 10% у односу на контролу. И у фази G0/G1, комплекс 10 смањује проценат ћелија. Само цисплатина повећава проценат ћелија у S фази у односу на контролни узорак. Након излагања HeLa ћелија комплексу (10) установљено је да и комплекс 10 и цисплатина повећавају проценат апоптотских ћелија, у sub G1 фази ћелијског циклуса (Слика 53) [148].

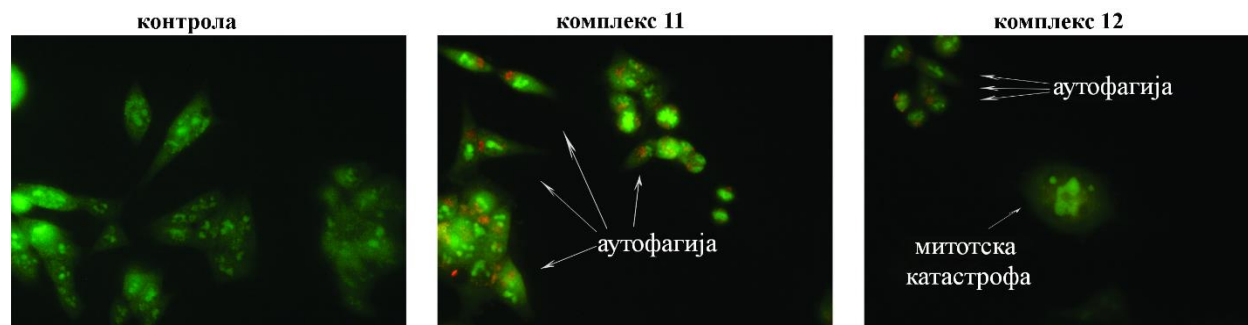


Слика 53. Анализа ћелијског циклуса. Хистограми (А) и график (Б) који представљају расподелу ћелијског циклуса у третираним HeLa ћелијама кроз различите фазе ћелијског циклуса након 48 h излагања еквитоксичним дозама (концентрације IC₅₀) тестираног комплекса 10 и цисплатине заједно са контролним узорком

Резултат испитивања ћелијског циклуса комплекса **11** и **12** показује да оба комплекса повећавају проценат ћелија у S фази (контрола: 12,25%; комплекс **11**: 62,05%; комплекс **12**: 49,77%, док се проценат ћелија у осталим фазама, нарочито у G2/M фази, смањило (Слика 54). Ови подаци указују на неуспех правилне репликације хромозома, вероватно услед оштећења ДНК. Примећено је повећање броја полиплоидних (> 4 N) ћелија у ћелијама третираним комплексом **12**, што указује на неуспешну сегрегацију хромозома, дефинисану као митотичка катастрофа [217]. Добро је познато да је ДНК основни акцепторски молекул агенаса на бази платине. Ова средства изазивају умрежавање ДНК што доводи до заустављања ћелијског циклуса и активирања механизма поправке. Ако се оштећења ДНК не могу поправити, ћелије су подвргнуте апоптози. Поред тога, Пуиг (P. E. Puig) и сарадници су показали да цисплатина може зауставити митотску активност туморских ћелија, али без инхибиције репликације ДНК, доводећи до појаве циновских полиплоидних ћелија [218]. Митотичка катастрофа суздржава ћелијску пролиферацију, услед чега долази до старења или утиче на преживљавање, што доводи до смрти апоптотске ћелије. Ћелије подвргнуте митотској катастрофи откривене су флуоресцентном микроскопијом након третирања НСТ-116 ћелија са комплексом **12** као циновске мултинуклеарне ћелије (Слика 55). На основу тога се може закључити да механизам деловања комплекса рутенијума(II) показује сличност са агенсима из платинске групе метала, посматрајући ћелијски циклус у S-фази [149].



Слика 54. Анализа ћелијског циклуса. Хистограми (А) и график (Б) који представљају расподелу ћелијског циклуса у нетретираним НСТ-116 ћелијама (контрола) и ћелијама третираним комплексима **11** и **12**



Слика 55. Репрезентативне слике НСТ-116 ћелија обојене акридин-оранжом: нетретиране (контрола) и третиране комплексима **11** и **12**

3.6 Компјутерска хемија

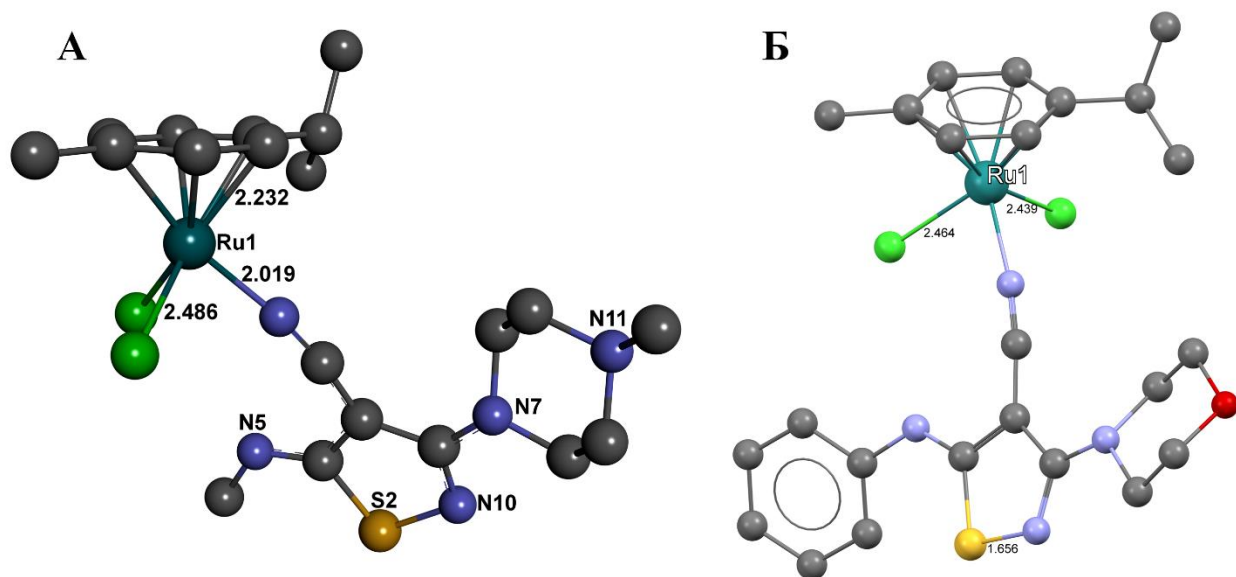
3.6.1 Квантна механика (QM)

Модерне методе компјутерске хемије су коришћене како би се новосинтетисани комплекси и теоријски испитали. Теорија функционала густине (DFT), имплементирана кроз Gaussian 09 са различитим теоријским моделима B3LYP/def2-TZVP, B3LYP/SDD и M06/SDD базним сетом, коришћена је за оптимизацију свих комплекса (Слика 56). Структурне карактеристике (везе, углови и торзиони углови) комплекса који су оптимизовани у складу су са експерименталним подацима добијеним рендгенском структурном анализом (Табела 28).

Табела 28. Поређење X-ray и DFT дужина веза [Å] за комплексе **8**, **10** и **11**^a

X-ray		DFT	
Комплекс 8			
Ru1—N1	2,064 (3)	Ru1—N25	2,025 (1)
Ru1—C10	2,158 (4)	Ru1—C5	2,225 (1)
Ru1—C11	2,183 (4)	Ru1—C21	2,193 (1)
Ru1—C12	2,210 (4)	Ru1—C6	2,228 (1)
Ru1—C13	2,160 (4)	Ru1—C42	2,262 (1)
Ru1—C14	2,154 (4)	Ru1—C29	2,232 (1)
Ru1—C15	2,190 (4)	Ru1—C43	2,216 (1)
Ru1—Cl1	2,412 (1)	Ru1—Cl2	2,487 (1)
Ru1—Cl2	2,423 (2)	Ru1—Cl4	2,514 (1)
S1—N2	1,670 (3)	S3—N9	1,802 (1)

КОМПЛЕКС 10			
Ru1—N1	2,059 (3)	Ru52—N32	2,022 (1)
Ru1—C10	2,154 (4)	Ru52—C1	2,219 (1)
Ru1—C11	2,166 (4)	Ru52—C2	2,232 (1)
Ru1—C12	2,218 (3)	Ru52—C3	2,224 (1)
Ru1—C13	2,175 (3)	Ru52—C4	2,259 (1)
Ru1—C14	2,147 (4)	Ru52—C5	2,197 (1)
Ru1—C15	2,194 (3)	Ru52—C6	2,227 (1)
Ru1—Cl1	2,395 (1)	Ru52—Cl53	2,512 (1)
Ru1—Cl2	2,422 (1)	Ru52—Cl54	2,487 (1)
S1—N2	1,663 (4)	S1—N2	1,797 (1)
КОМПЛЕКС 11			
Ru1—N1	2,059 (2)	Ru1—N5	2,059 (1)
Ru1—C18	2,150 (3)	Ru1—C12	2,152 (1)
Ru1—C20	2,159 (3)	Ru1—C15	2,164 (1)
Ru1—C19	2,176 (3)	Ru1—C11	2,211 (1)
Ru1—C21	2,190 (3)	Ru1—C7	2,181 (1)
Ru1—C17	2,195 (3)	Ru1—C10	2,183 (1)
Ru1—C16	2,211 (3)	Ru1—C18	2,190 (1)
Ru1—Cl1	2,409 (8)	Ru1—Cl2	2,439 (1)
Ru1—Cl2	2,428 (8)	Ru1—Cl3	2,464 (1)
S1—N2	1,655 (3)	S4—N8	1,656 (1)
^a [Å]			



Слика 56. DFT оптимизоване структуре комплекса **9** (A) и **12** (B)

3.6.2 Молекулски докинг

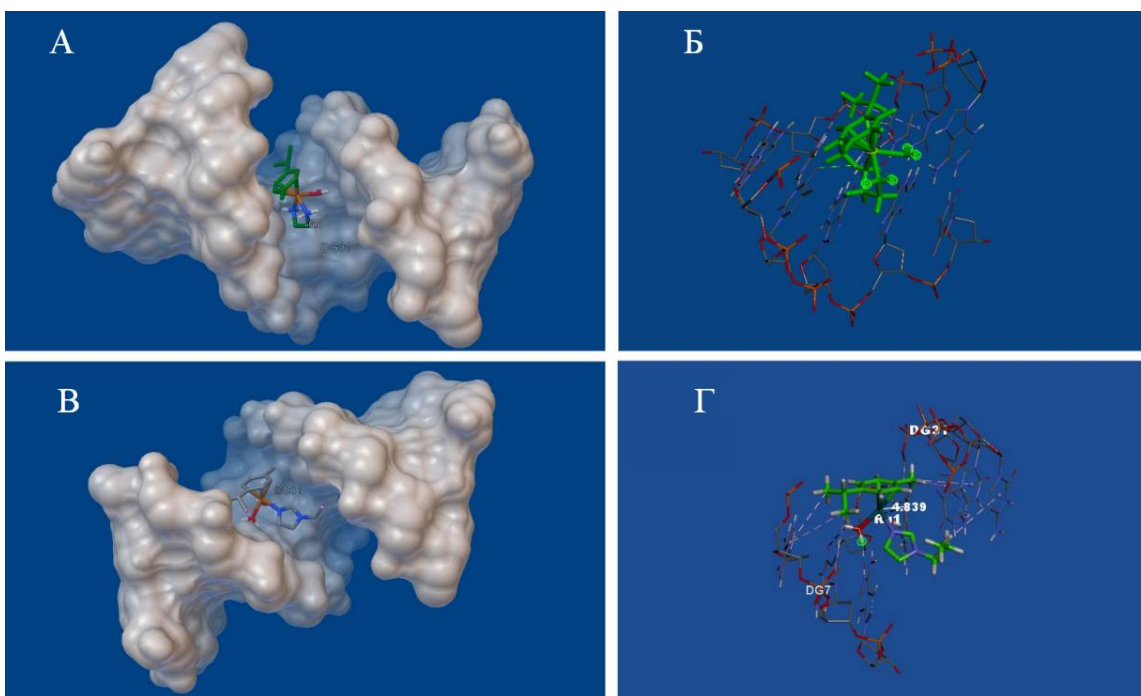
Докинг – компјутерска молекулска симулација је употребљена за испитивање интеракција између новосинтетисаних комплекса рутенијума(II) као и појединих лиганата са ДНК и HSA. Као и цисплатина, комплекси рутенијума(II) са имидазолима и изотиазолима као лигандима остају претежно у свом, мање реактивном, хлоридном облику при високим концентрацијама хлорида (као што је у људском крвотоку). При ниским концентрацијама хлорида (нпр. унутар људске ћелије), долази до хидролизе комплекса, тј. до супституције хлорида молекулом воде $Cl \leftrightarrow H_2O$ [59, 219], након чега аква комплекси реагују са ДНК и HSA. Због тога се моделирање и симулација базира на аква врстама новосинтетисаних комплекса рутенијума(II). За испитивање докинга комплекса и лиганата су коришћени софтвери AutoDock [139], AutoDock Vina [220] и Gold чија је структура одређена кристалографијом (PDB код 1AIO).

Резултати симулације комплекса рутенијума(II) са имидазоловим и етилендиаминским (поредбеним) лигандима су приказани у Табели 29. Уочава се слагање предвиђених и експерименталних резултата. Такође, истражена је природа интеракција између ДНК и најбољих конформера етилендиамина и *N*-пропилимидазола. Главно електростатичко привлачење између ДНК и комплекса **7** заснива се на WAT1—DG7(O6), WAT2—DG31(N7) and WAT2—DT32(O4) водоничним везама. Остале интеракције укључују π -алкил привлачење између алкил групе (*p*-цимена и *N*-пропилимидазола) и ароматичног језгра нуклеотида. Таква оријентација комплекса **7** према ДНК и Ru - N7 растојање од 4,839 Å (Слика 57) омогућава размену воде и N7 атома из гуанина [147].

Табела 29. ДНК-лиганд афинитети везивања (Vina) и везујуће слободне енергије (AutoDock) рутенијум(II) комплекса

Комплекси	Vina autodock ^a	AutoDock ^a
	Афинитети везивања ^a	$\Delta G_{\text{везивања}}^a$
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-benzene})(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	-5,5	-6,95
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	-6,0	-6,95
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{HIm})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	-6,7	-4,61
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-MeIm})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	-6,8	-5,23
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-EtIm})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	-6,8	-5,31
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-PrIm})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	-7,0	-5,42 (-5,77 [144])
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-BuIm})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$	-6,4	-4,85

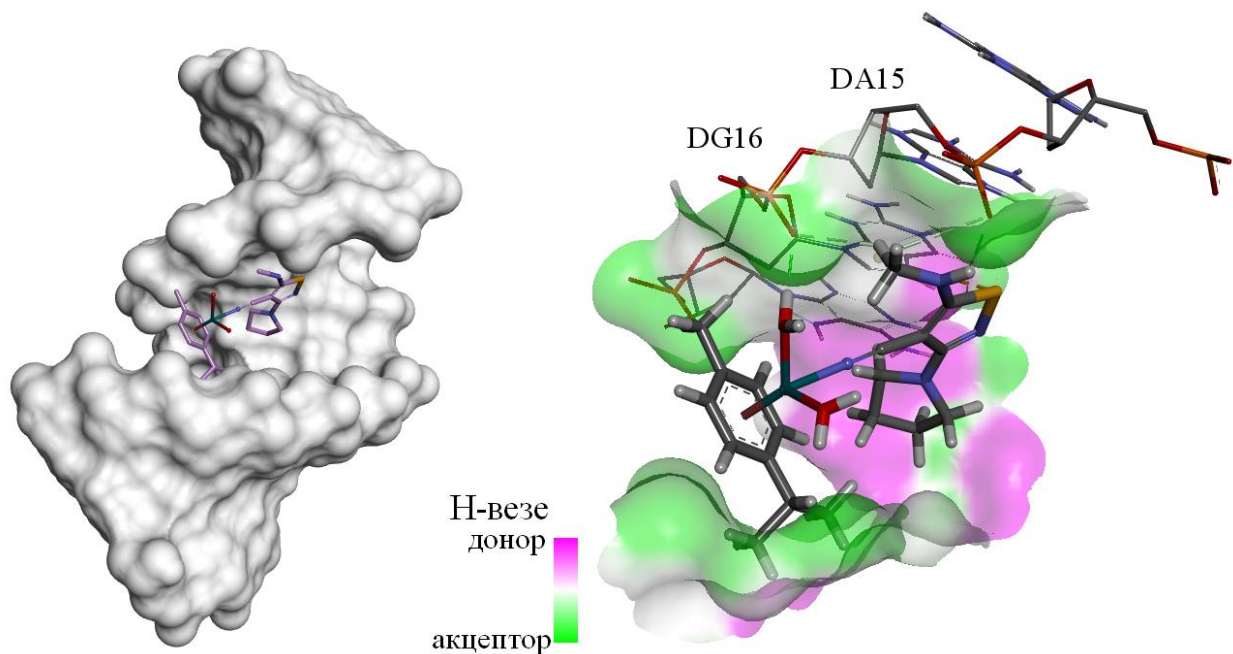
^a kcal mol⁻¹



Слика 57. Доминантне конформације $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (A) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-PrIm})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (B) комплекса везаних за ДНК додекамер; DNA- $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (B) и DNA- $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-PrIm})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (Г) интеракције

Лиганди метил-имидазолског типа **1** – **3** и њихови комплекси **8** – **10** су подвргнути симулацији везивања за ДНК и HSA. Очигледно је да подаци дати у Табели 30 доказују везивање за ДНК жлеб у случају комплекса **8**, што је у сагласности са испитивањима у

растворима. На Слици 58 приказани су општи положаји лиганда у ДНК жлебу, заједно са главним интеракцијама, у случају комплекса **8** [148].



Слика 58. Најбољи конформер (AutoDock) комплекса **8** докованог на ДНК (лево) и главне ДНК-комплекс **8** интеракције (десно)

Табела 30. Резултати докинга $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-сумене})\text{X}_2(\text{L})]$ ($\text{X} = \text{Cl}$ или H_2O) и различитих лиганата за ДНК

Лиганди и комплекси	ДНК		
	AutoDock		Vina
	ΔG^a	K_i^b	Affinity ^a
1	-3,90	1,38 ^c	-5,30
2	-4,11	974,64	-5,60
3	-4,27	745,49	-5,70
8	-7,00	7,36	-7,10
9	-6,75	11,30	-7,50
10	-6,40	20,32	-6,90

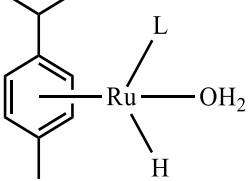
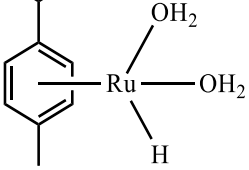
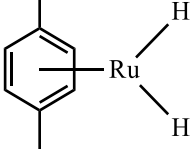
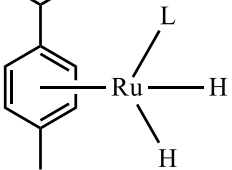
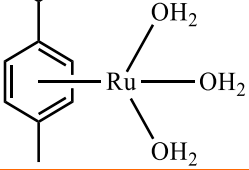
^a kcal mol⁻¹, ^b μM, ^c mM.

Софтвер Gold са истом модификованом датотеком параметара [190] коришћен је за докинг лиганада на ДНК додекамер, иако је превасходно намењен протеин-лиганд интеракцијама. Слободне енергије су добијене прорачунима применом квантне механике. Коришћене су активне врсте које би могле настати хидролитичким процесима унутар ћелије, приказане на Шеми 5 и резултати докинга (GoldScore fitness, H-bond и VdW индекси) дати су у Табели 31. Може се видети да [Ru(*p*-cymene)L(H₂O)H] комплексна врста има највише вредности GoldScore (46,89) и VdW индекс (41,55) са прилично високим H-bond индексом (7,80). Овакве вредности доводе до закључка да је ова врста врло вероватна када је у питању ковалентно везивање комплекса рутенијума(II) за ДНК [148].

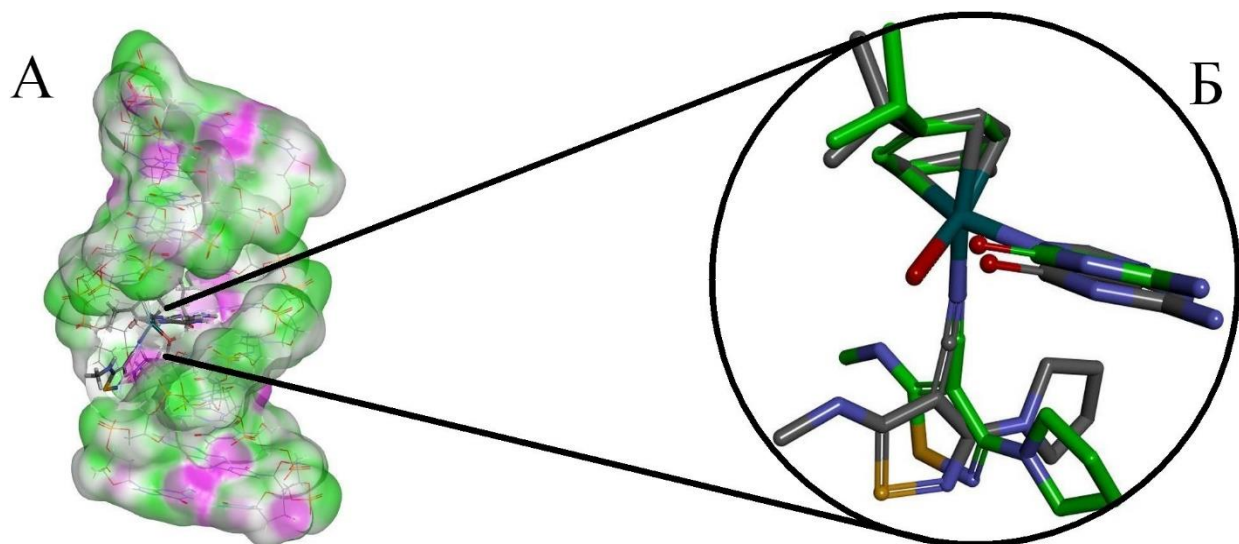
Hidroliza	ΔG_{react} (kcal mol ⁻¹)
1. [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-Cl ₂] + H ₂ O \longrightarrow [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-Cl-H ₂ O] ⁺ + Cl ⁻	17,864716
2. [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-Cl ₂] + H ₂ O \longrightarrow [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-Cl ₂ -H ₂ O] + L	6,553808
3. [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-Cl ₂] + 2H ₂ O \longrightarrow [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-(H ₂ O) ₂] ²⁺ + 2Cl ⁻	45,549468
4. [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-Cl-H ₂ O] ⁺ + H ₂ O \longrightarrow [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-(H ₂ O) ₂] ²⁺ + Cl ⁻	27,684752
5. [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-(H ₂ O) ₂] ²⁺ + H ₂ O \longrightarrow [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-(H ₂ O) ₃] ²⁺ + L	6,001796
HSA	
6. [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-Cl ₂ -H ₂ O] + GLU ⁻ \longrightarrow [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-Cl ₂ -GLU] ⁻ + H ₂ O	23,75
7. [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-Cl ₂] + GLU ⁻ \longrightarrow [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-Cl-GLU] + Cl ⁻	-0,16
8. [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-Cl-H ₂ O] ⁺ + GLU ⁻ \longrightarrow [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-Cl-GLU] + H ₂ O	-18,01
DNK	
9. [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-(H ₂ O) ₂] ²⁺ + GUA ⁻ \longrightarrow [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-(H ₂ O)-GUA] ⁺ + H ₂ O	-15,515368
10. [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-L-(H ₂ O) ₂] ²⁺ + GUA ⁻ \longrightarrow [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-(H ₂ O) ₂ -GUA] ⁺ + L	-15,655412
11. [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-(H ₂ O) ₃] ²⁺ + GUA ⁻ \longrightarrow [Ru(η^6 - <i>p</i> -cymene)-(H ₂ O) ₂ -GUA] ⁺ + H ₂ O	-21,657208

Шема 5. Реакције хидролизе рутенијум(II) комплекса као и њихове реакције са аминокиселинама и нуклеинским базама укљученим у везивање са HSA и ДНК (L – лиганд)

Табела 31. Резултати GOLD докинга за комплекс **8** и реактивне врсте са ДНК

Молекул	GoldScore	Н-веза	VdW	Најближи
$[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{L}(\text{H}_2\text{O})\text{H}]$ 	46,89	7,80	41,55	dG7
$[\text{Ru}(p\text{-cymene})(\text{H}_2\text{O})_2\text{H}]$ 	37,50	10,00	29,66	dG7
$[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{H}_2]$ 	38,98	9,80	29,21	dG7
$[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{LH}_2]$ 	30,88	2,23	28,98	dG7
$[\text{Ru}(p\text{-cymene})(\text{H}_2\text{O})_3]$ 	30,04	0,00	30,12	dG7

Најбоље везана конформациона врста $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{L}(\text{H}_2\text{O})\text{H}]^{2+}$ проверена је применом методе МОРАС [177] РМ6-МОZYМЕ за оптимизацију целокупног комплекса ДНК/Лиганд. На Слици 59 приказана је ковалентна веза рутенијума(II) и N(7) који потиче од dG7 нуклеотида.

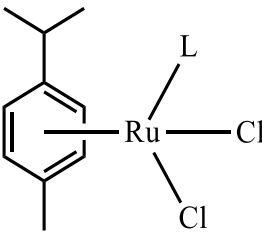
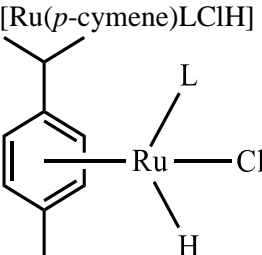
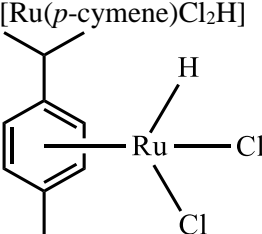
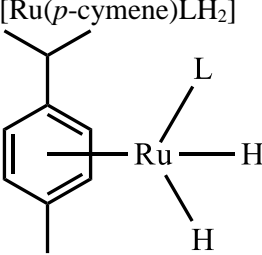
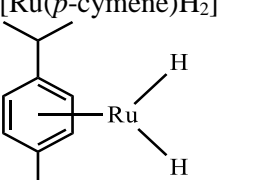


Слика 59. Најбоља GOLD докинг МОРАС-МОZYМЕ РМ6 оптимизовна ДНК/(аква комплекс **8**) структура (А); Преклапање МОРАС-МОZYМЕ РМ6 (зелени атоми) и QM (g09) оптимизована рутенијум(II) координациона сфера са RMSD=1,051Å (Б)

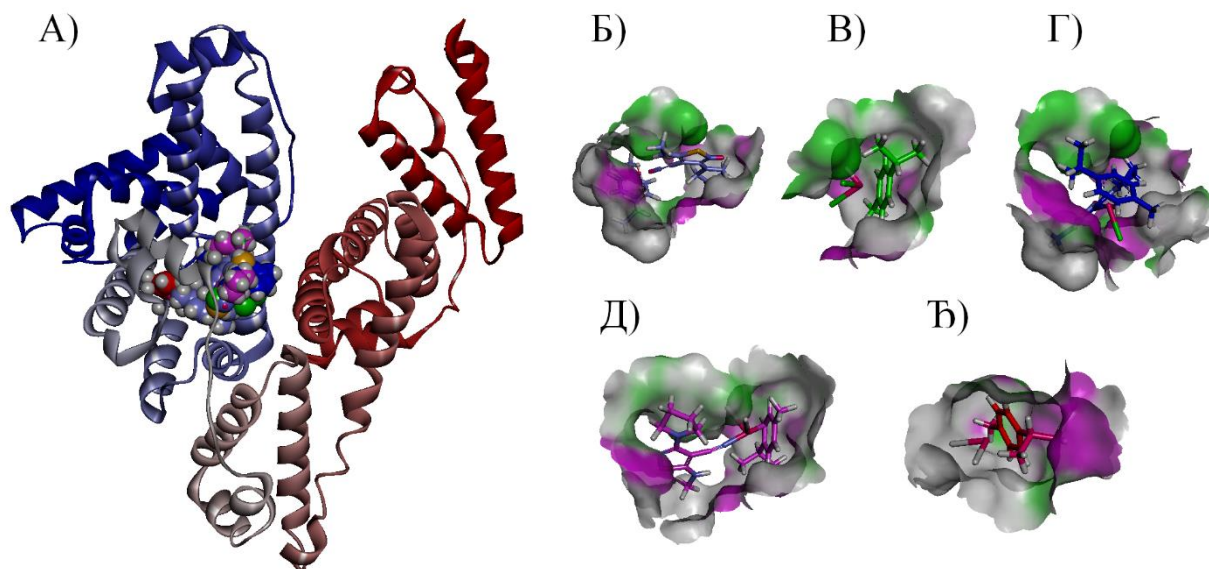
HSA је протеин плазме који везује широк спектар хидрофобних лиганата, укључујући масне киселине, билирубин и тироксин. Везивање молекула лиганата и комплекса за HSA је проучавано коришћењем GOLD софтверског пакета, при чему су површински изложени His-128, His-247, His-510 и Met-298 узети као места за координацију комплекса [221]. На основу резултата кинетичких студија које укључују два поступка везивања HSA (асоцијативни – спори и дисоцијативни – брзи), одабране су активне врсте за које се претпоставља да су могуће на основу квантно-механичких термодинамичких параметара за реакције дате у Шеми 5.

Сваки одлазећи лиганд замењен је водоником који симулира везујућу d-орбиталу рутенијума(II) (акцептор водоника). Доковање је извршено на сваком активном месту HSA и површински изложеном цистеину и хистидину и резултати су дати у Табели 32 и Слици 60. Веома је уочљиво да су активне врсте $[\text{Ru}(p\text{-сумене})\text{LCl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ и $[\text{Ru}(p\text{-сумене})\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})]$ мање активне према било ком хистидину или цистеину, а да је глутамин-292 уобичајно место везивања у асоцијативном механизму везивања протеина.

Табела 32. Резултати докинга (GOLD) за реактивне врсте комплекса 8 унутар HSA молекула

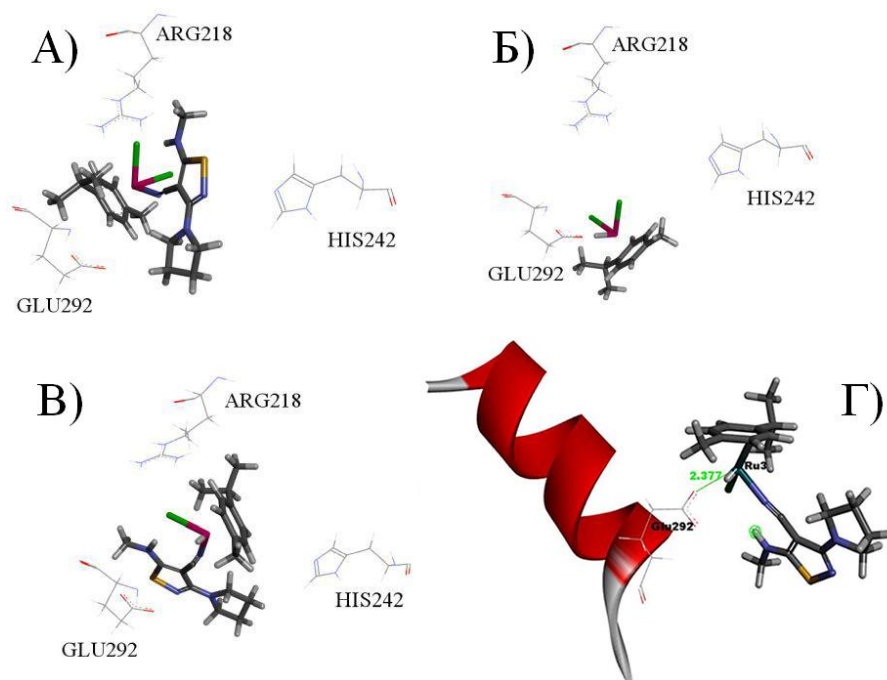
Молекул	Мета	GoldScore	H-веза	VdW	Најближи
	Dom IIa (t1*)	49,3654	0,0000	49,5057	GLU292
	Dom IIIa (t2)	48,9523	0,4555	49,2984	SER489
	Dom IIIb (t3)	36,4380	0,0000	38,0773	THR506
	Dom IIIb (t4)	43,0681	0,0000	43,1599	PHE502
	Dom Ib (t5)	45,9801	0,6552	45,9044	LYS190
	Dom IIa (t1)	49,8461	0,3433	50,1322	GLU292
	Dom IIIa (t2)	49,2353	0,3462	49,5917	/
	Dom IIIb (t3)	36,7335	0,0000	40,6313	ILE513
	Dom IIIb (t4)	36,9874	0,0000	40,5804	ILE513
	Dom Ib (t5)	46,4044	0,0000	51,6866	ILE142
	Dom IIb	54,9454	2,0000	54,5788	LYS313
	Dom IIa (t1)	42,4609	14,4529	28,0733	GLU292
	Dom IIIa (t2)	34,0275	0,0000	34,0612	/
	Dom IIIb (t3)	35,7300	0,0000	36,3749	VAL555
	Dom IIIb (t4)	36,1986	0,0000	36,7017	VAL555
	Dom Ib (t5)	37,3229	0,0000	37,5151	ARG117
	Dom IIa (t1)	54,9402	7,2973	50,6794	GLU292
	HIS9	45,3104	0,0000	47,6583	ASP259
	HIS67	42,3003	0,0000	45,8937	HIS67
	HIS146	52,8325	0,0000	52,8325	HIS146
	HIS288	47,2563	0,0000	50,7460	LYS195
	HIS440	54,3591	0,0000	57,0849	ARG218
	Dom IIa (t1)	20,9078	0,0000	21,6449	LEU260
	Dom Ib (t5)	20,6208	0,2706	20,4924	GLU132

*t1, t2, t3 and t4 означава тирозин ограничен унутар 1HK1 молекула



Слика 60. А) HSA са докованим реактивним врстама комплекса **8** и орјентације унетих конформација у простору Па шупљине за Б) $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{LClH}]$ В) $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2\text{H}]$ Г) комплекс **8** Д) $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{LH}_2]$ и Ђ) $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{H}_2]$

Резултати су наведени за везивање HSA GLU-292. Од свих реактивних врста, на основу вредности датих у Табели 21 издвајају се $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{LClH}]$, $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2\text{H}]$ и $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{LH}_2]$. Ипак, $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{LClH}]$ врста је изабрана јер има веће вредности у односу на $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2\text{H}]$ врсту и то Gold 49,8461 и VdW 50,1322. Докинг положаји у односу на остатке који би потенцијално могли ући у ковалентне интеракције унутар шупљине HSA на Па домену за комплекс **8** и неке реактивне врсте су приказане на Слици 61 [148].



Слика 61. Потенцијални ковалентно везани остаци унутар шупљине на домену Па HSA са докованим структурама реактивних врста комплекса **8** А) $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2\text{L}]$ Б) $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2\text{H}]$ и В) $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{LCiH}]$; Г) GOLD модел Ru-H-O(GLU292) интеракција преко водоничне везе у случају врсте $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{LCiH}]$

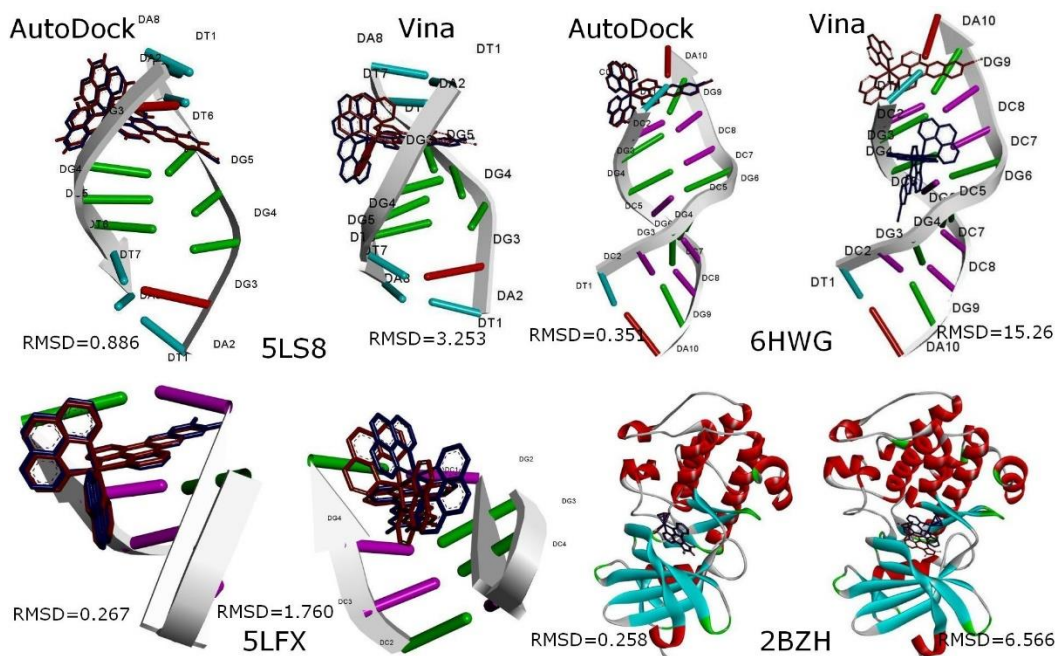
Симулацији везивања за ДНК и HSA методом молекулског докинга подвргнути су и лиганди и комплекси фенил-изотиазолског типа тј. лиганди **4** и **5** и комплекси **11** и **12** [149]. Наведени комплекси показују доста ниже ΔG вредности приликом везивања за мање удубљење него приликом везивања за веће удубљење. Само резултати најбољих конформера добијених докинг експериментом су приказани у Табели 33.

Табела 33. Резултати докинга лиганда фенил-изотиазолског типа и одговарајућих комплекса са ДНК

Једињење	AutoDock	Vina	Exp.[146]	
	$\Delta G^{[a]}$	$K_i^{[b]}$	Affinity ^[a]	$\Delta G^{[a]}$
4	-3,79	1,67 ^[c]	-6,80	-6,14
5	-3,71	1,90 ^[c]	-6,90	-6,23
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\mathbf{4})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	-6,82	10,06	-8,00	-6,71
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}(\mathbf{4})(\text{H}_2\text{O})]^+$	-5,38	113,50	-7,00	/
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\mathbf{5})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	-6,06	36,41	-8,10	-6,35
$[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}(\mathbf{5})(\text{H}_2\text{O})]^+$	-5,02	210,26	-7,60	/

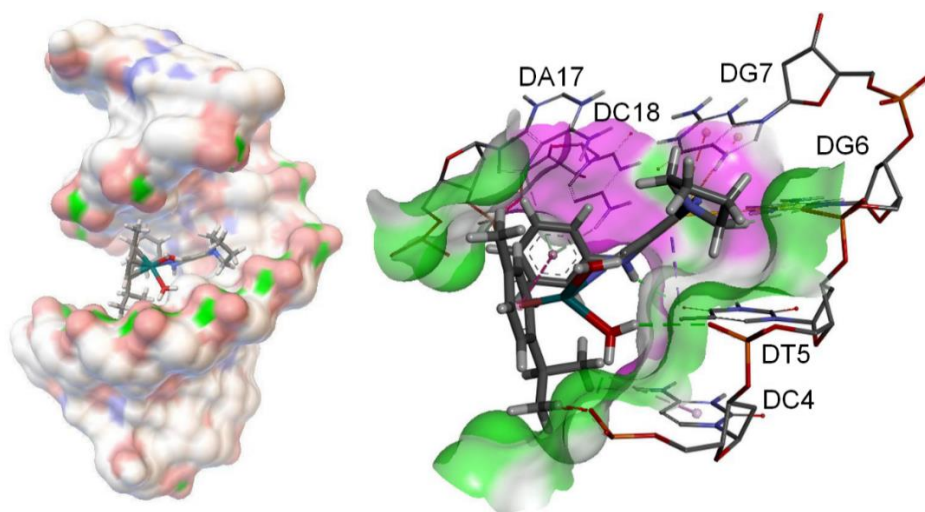
[a] kcal mol⁻¹. [b] μM . [c] mM.

Уочава се слагање између резултата добијених коришћењем Vina и AutoDock софтвера, међутим валидацијом резултата обављеном на неколико ДНК-Ru комплекса доказано је да је AutoDock метода која у овом случају даје боље резултате (Слика 62).



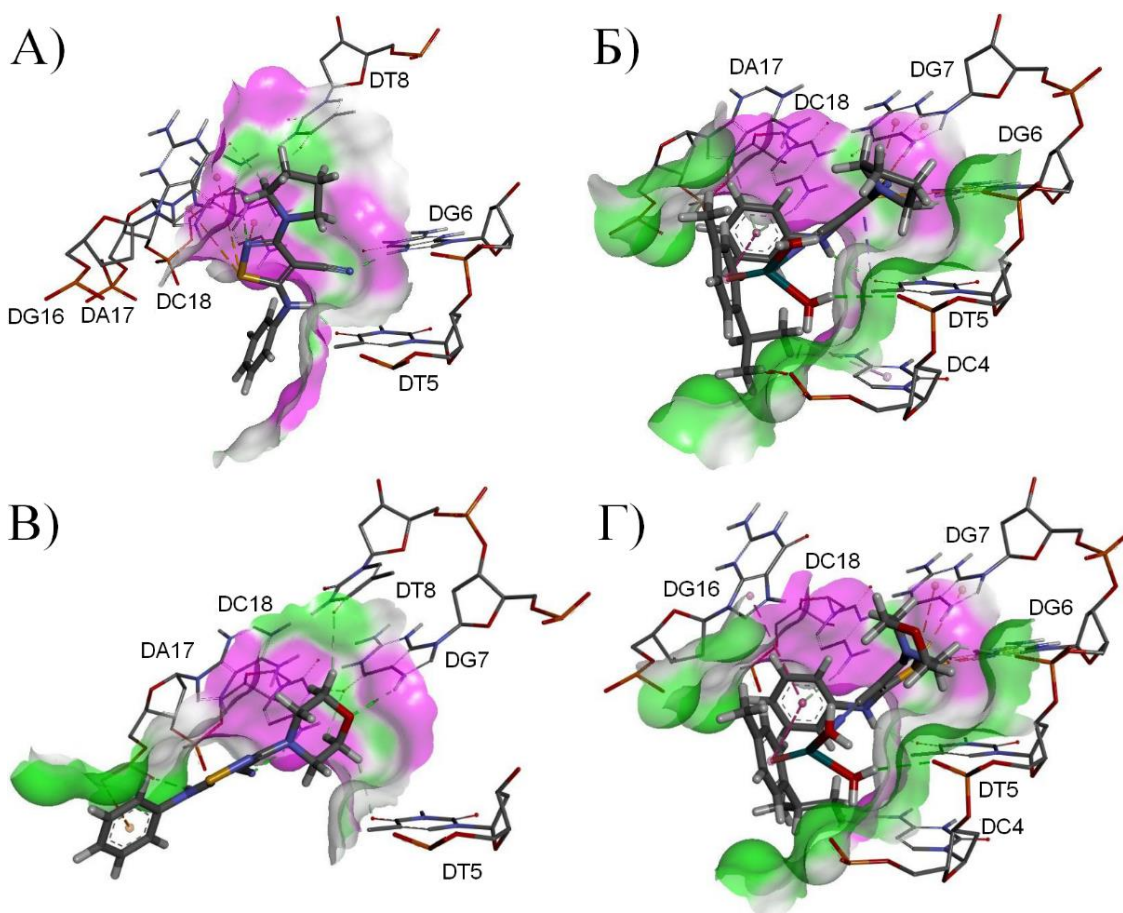
Слика 62. Валидација AutoDock и AutoDock Vina везе са различитим ДНК (протеин) структурама као пример

Треба напоменути да предвиђене и експериментално добијене ΔG вредности у случају *bis*-(аква) комплекса показују веома добро поклапање. Испитивана је и природа међумолекулских интеракција између ДНК и енергетски најповољнијих конформација докованих једињења (Слика 63).



Слика 63. Најбољи погодак (AutoDock) хидролизованог комплекса (11) везаног за ДНК (лево) и основне ДНК-комплекс (11) интеракције (десно)

Интеракције између ДНК и испитиваних једињења су утврђене помоћу Discovery Studio Visualizer (Слика 64, Табела 34). Сва испитивана једињења су у енергетски најповољнијој конформацији показала интеракције са DT5 из А ланца и DC18 из Б ланца ДНК. Карбонилна група тимина у DT5 се понаша као акцептор протона у водоничној вези са азотом фениламино групе у случају лиганда **4** и комплекса **11** и **12**, док у случају лиганда **5** иста карбонилна група показује интеракцију преко једног од екваторијално усмерених водоника морфолинске групе. Таква оријентација лиганда **5** омогућава да се фениламино група оријентира тако да преузима улогу донора протона у водоничној вези са фосфатном групом DA17. Амино група цитозина из DC18 као донор протона улази у интеракцију са ароматичним π електронским системом фениламино групе у случају комплекса **11** и **12**, док се иста амино група у случају интеракције са лигандом **5** понаша као донор протона према карбонилној групи. Лиганд **4** не показује знакове интеракције са амино групом цитозина из DC18 али је позициониран тако да је предвиђена интеракција између π електрона цитозина и сумпора у прстену изотиазола. Таква оријентација указује да карбонилна група у лиганду **4** остварује контакт као акцептор протона у водоничној вези са гуанином из DG6. У случају комплекса **11** и **12** координовани молекули воде граде водоничне везе са фосфатним остацима из DC4 и DT5 [149].



Слика 64. ДНК-Лиганд интеракције везивања лиганда у главном жлебу

Табела 34. Главне интеракције лиганда и комплекса везане за ДНК макромолекуле

Лиганд 4						Комплекс 11					
Тип ^[a]	Дист.	Од		До		Тип	Дист.	Од		До	
		Назив	Тип	Назив	Тип			Назив	Тип	Назив	Тип
НВ	1,85	1:НН:Н	Н-Don	A:DT5:O4	Н-Acc	НВ	1,91	3:Н2О:Н1	Н-Don	A:DC4:OP2	Н-Acc
НВ	1,99	A:DG6:H7	Н-Don	1:CN:N	Н-Acc	НВ	2,75	3:Н2О:Н2	Н-Don	A:DT5:OP2	Н-Acc
НВ	2,13	B:DA17:H6 2	Н-Don	1:ТА:N	Н-Acc	НВ	2,32	3:НН:Н	Н-Don	A:DT5:O4	Н-Acc
С НВ	2,5	1:PYR:H2	Н-Don	A:DT8:O4	Н-Acc	С НВ	2,21	3:PYR:H2	Н-Don	A:DG6:OP2	Н-Acc
С НВ	2,34	1:PYR:H2	Н-Don	B:DG16:O6	Н-Acc	S-X	3,04	3:ТА:S	S	A:DG7:N7	O,N,S
Pi-S	4,97	1:ТА:S	S	B:DA17	Pi-Orb	Pi-Don	3,15	B:DA17:H7	Н-Don	3:PHE-pi	Pi-Orb
Pi-S	5,71	1:ТА:S	S	B:DA17	Pi-Orb	Pi-Don	3,18	B:DC18:H4 2	Н-Don	3:PHE-pi	Pi-Orb
Pi-S	5,64	1:ТА:S	S	B:DC18	Pi-Orb	Pi-Sigma	3,85	A:DT5:C7	C-H	3:ТА-pi	Pi-Orb
						Pi-S	4,74	3:ТА:S	S	A:DG6	Pi-Orb
						Pi-S	5,08	3:ТА:S	S	A:DG6	Pi-Orb
						Pi-S	4,08	3:ТА:S	S	A:DG7	Pi-Orb
						Pi-S	4,55	3:ТА:S	S	A:DG7	Pi-Orb
						Pi-Pi TS	4,94	3:PHE-pi	Pi-Orb	3:pCym:PH E	Pi-Orb
						Pi-Alkyl	4,97	A:DC4	Pi-Orb	3:pCym:C	Alkyl
Лиганд 5						Комплекс 12					
Тип	Дист.	Од		До		Тип	Дист.	Од		До	
		Назив	Тип	Назив	Тип			Назив	Тип	Назив	Тип
НВ	2,04	2:НН:Н	Н-Don	B:DA17:OP 2	Н-Acc	НВ	2,08	4:НН:Н	Н-Don	A:DT5:O4	Н-Acc
НВ	2,24	A:DG7:H7	Н-Don	2:MOR:O	Н-Acc	НВ	2,62	4:Н2О:Н1	Н-Don	A:DT5:OP2	Н-Acc
НВ	2,04	B:DC18:H42	Н-Don	2:CN:N	Н-Acc	НВ	1,73	4:Н2О:Н2	Н-Don	A:DC4:OP2	Н-Acc
С НВ	2,41	2:MOR:H1	Н-Don	A:DG7:O6	Н-Acc	С НВ	2,46	4:MOR:H3	Н-Don	A:DG6:OP2	Н-Acc
С НВ	2,95	2:MOR:H2	Н-Don	A:DT8:O4	Н-Acc	Pi-Don	2,95	B:DC18:H4 2	Н-Don	4:PHE-pi	Pi-Orb
С НВ	2,62	2:MOR:H1	Н-Don	A:DT5:O4	Н-Acc	Pi-S	4,59	4:ТА:S	S	A:DG6	Pi-Orb
С НВ	2,35	2:MOR:H2	Н-Don	A:DG7:O6	Н-Acc	Pi-S	4,99	4:ТА:S	S	A:DG6	Pi-Orb

Pi-Anion	4,72	B:DA17:OP 1	(-)	2:PHE-pi	Pi-Orb	Pi-S	4,24	4:ITA:S	S	A:DG7	Pi-Orb
						Pi-S	4,78	4:ITA:S	S	A:DG7	Pi-Orb
						Pi-Pi TS	5,19	4:PHE-pi	Pi-Orb	4:pCym:PH E	Pi-Orb
						Pi-Pi TS	5,53	B:DG16	Pi-Orb	4:PHE-pi	Pi-Orb

[a] НВ – Воднична веза; С – Угљеник; S – Сумпор; Дон – Донор; Асс – Акцептор; TS – Т-облик; Orb – Орбитале; ITA – изотиазол; PYR – пирролидин; MOR – морфолин; PHE – фенил; pCym – *p*-цимен;

4. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове докторске дисертације синтетисани су нови комплекси рутенијума(II) са имидазолима и изотиазолима као лигандима: $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**6**), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$ (**7**), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-PyCN-ITZ}) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**8**), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-4-MPipCN-ITZ})]$ (**9**), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-MA-3-MorphCN-ITZ})]$ (**10**), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(5\text{-PhA-3-PyCN-ITZ})]$ (**11**) и $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(3\text{-Morph-5-PhACN-ITZ})]$ (**12**). За синтезу наведених комплекса коришћени су метил-имидазол и пропил-имидазол, као и изотиазолски лиганди 5-(метиламино)-3-пирилодин-1-илизотиазол-4-карбонитрил (**1**), 5-(метиламино)-3-(4-метилпиперазин-1-ил)изотиазол-4-карбонитрил (**2**), 5-(метиламино)-3-морфолин-4-илизотиазол-4-карбонитрил (**3**), 5-(фениламино)-3-пирилодин-1-илизотиазол-4-карбонитрил (**4**) и 3-морфолин-4-ил-5-(фениламино)изотиазол-4-карбонитрил (**5**). Карактеризација синтетисаних једињења је извршена применом спектроскопских метода анализе (^1H и ^{13}C NMR, IR и UV-Vis), као и применом елементалне микроанализе и одређивањем тачке топљења. Применом рендгенске структурне анализе одређене су структуре лиганда изотизолског типа (**1 – 5**) и новосинтетисаних комплекса **6, 7, 8, 10** и **11**. Имидазолски лиганди се за рутенијум(II) координују преко азота из имидазоловог прстена (комплекси **6** и **7**), док је координација изотиазолских лиганда остварена преко азота из карбонитрилне групе $\text{-C}\equiv\text{N}$ (комплекси **8 – 12**).

Развој неорганске медицинске хемије пружа велике шансе за употребу металних комплекса као лекова. Једињења која садрже јоне метала имају и наставиће да играју важну улогу у биомедицинској технологији. Развој антиканцерогених лекова комплекса платине постигнут је делимично на бази разумевања веза које комплекси платине остварују са ДНК. Комплекси рутенијума са антитуморском активношћу такође се интензивно изучавају. За дизајнирање нових лекова од виталног је значаја разумевање механизма интеракције ДНК са лековима. У циљу дефинисања механизма деловања новосинтетисаних лиганда и њихових комплекса са јонима рутенијума испитиване су њихове интеракције са ДНК флуоресцентном и апсорпционом спектроскопијом. Вредности константи везивања (K_b) и Стерн-Волмерових константи (K_{sv}) потврђују да ДНК има релативно снажну способност везивања са испитиваним једињењима. Израчунате вредности за константу везивања (K_b) показују да лиганд (**3**), $K_b = 9,17 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ и комплекс (**11**), $K_b = 8,28 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ имају највеће вредност константе везивања па су њихови афинитети да се вежу за ДНК највећи. За карактеризацију начина везивања између новосинтетисаних једињења и ДНК испитиване су интеракције са ДНК у присуству етидијум бромида (ЕБ). Резултати су показали да се испитивана једињења претежно везују интеркалативно за молекулу ДНК.

Серумски албумини су протеини који су укључени у транспорт јона метала, металних комплекса и лекова кроз крвоток. Степен везаности једињења за албумин одређује његову доступност за активно деловање. Испитивање интеракција између новосинтетисаних једињења и HSA је веома важно у циљу откривања њихове потенцијалне биолошке активности и даље примене. За истраживање структурних промена HSA у присуству новосинтетисаних лиганда или комплекса као и одређивање вредности константе везивања (K) и број везујућих места (n) за систем HSA – испитивано једињење снимани су апсорпциони и флуоресцентни спектри. Резултати испитивања су показали да долази до интеракције између испитиваних једињења и молекула HSA, при чему долази до нарушавања структуре HSA и формирања стабилних комплекса. Сви комплекси показују

добар афинитет везивања за албумин, на шта указују релативно високе вредности константи везивања (од $2,80 \cdot 10^5$ до $3,62 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$). Упоредивањем вредности константе везивања лиганата и комплекса за HSA, уочава се већи афинитет ка везивању комплекса за албумин у односу на лиганде. Број везујућих места (n) за сва испитивана једињења био је приближно један што указује да се новосинтетисани лиганди и њихови комплекси везују за једно везивно место на HSA.

Резултати испитивања цитотоксичности лиганата и комплекса показују смањену виталност ћелије применом тестираних једињења у зависности од дозе. На основу IC_{50} вредности, од свих тестираних лиганата издваја се лиганд 5-MA-3-MorphCN-ITZ (**3**), који показује снажно дејство према MCF-7 ћелијској линији, док се од комплекса издваја комплекс $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-MeIm})_3]Cl_2 \cdot 2H_2O$ (**6**) са најбољом активношћу према HeLa ћелији. Испитивана једињења нису показала дејство на здравој MRC-5 ћелијској линији, што доводи до закључка да се она могу сматрати потенцијалним кандидатима за антитуморске агенсе. Анализа ћелијског циклуса испитиваних једињења је показала да долази до заустављања раста ћелија у G0/G1 и G2/M фази ћелијског циклуса, чији је резултат инхибиција раста ћелија и индукција апоптозе. Сва испитивана једињења смањују проценат ћелија у S фази, осим комплекса **11** и **12**. Може се истаћи сличност механизма деловања који показују комплекси рутенијума(II) и антитуморски агенси на бази комплекса платине посматрајући ћелијски циклус у S фази.

Применом компјутерских метода теоријски су потврђени експериментално добијени резултати лиганата и комплекса рутенијума(II). Молекулски докинг лиганата и одговарајућих рутенијум(II) комплекса је коришћен како би се потврдиле интеракције са биолошким макромолекулима, тј. ДНК и HSA. Као резултат МОРАС-МОZYМЕ оптимизације целокупног система произилази закључак који указује на ковалентно везивање рутенијума(II) и N(7) dG7 нуклеотида.

Сходно свим приказаним резултатима у оквиру ове докторске дисертације, може се закључити да новосинтетисани комплекси рутенијума(II) показују задовољавајућу антитуморску активност, која се заснива на њиховим интеракцијама са биолошким макромолекулима. Добијени резултати могу бити од значаја у синтези нових комплекса рутенијума(II) и јона платинске групе метала, као потенцијалних агенаса у лечењу веома озбиљних туморских једињења.

5. ЛИТЕРАТУРА

- [1] H. E. Howard-Lock, C. J. L. Lock, In *Comprehensive Coordination Chemistry*, G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty, Eds. Pergamon: Oxford, Chapter 62.2, **6** (1987) 755-778.
- [2] P. J. Sadler, *Adv. Inorg. Chem.* **36** (1991) 1-48.
- [3] C. Orvig, M. J. Abrams, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2201-2204.
- [4] S. Lutsenko, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14** (2010) 211-217.
- [5] D. W. Hutchinson, *Antivir. Res.* **5** (1985) 193-205.
- [6] G.- S. Kim, D. A. Judd, C. L. Hill, R. F. Schinazi, *J. Med. Chem.* **37** (1994) 816-820.
- [7] Research Subcommittee of the Empire Rheumatism Council, *Ann. Rheum. Dis.* **19** (1960) 95-117.
- [8] R. C. Gamble, P. G. Schmidt, Contrast agents for NMR imaging, U.S. Patent 4728575 (1988).
- [9] C.- Y. Ke, C. J. Mathias, M. A. Green, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56** (2004) 1143-1160.
- [10] а) B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature* **205** (1965) 698-699;
б) B. Rosenberg, L. Van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature* **222** (1969) 385-386.
- [11] R. J. Kociba, S. D. Sleight, B. Rosenberg, *Cancer Chemoter. Rep.* **54** (1970) 325-328.
- [12] а) P. J. Loehrer, L. H. Einhorn, *Ann. Intern. Med.* **100** (1984) 704-713.
б) M. Morris, P. J. Eifel, J. Lu, P. W. Grigsby, C. Levenback, R. E. Stevens, M. Rotman, D. M. Gershenson, D.G. Mutch, *N. Engl. J. Med.* **340** (1999) 1137-1143.
в) P. G. Rose, B. N. Bundy, E. B. Watkins, J. T. Thigpen, G. Deppe, M. A. Maiman, D. L. Clarke-Pearson, S. N. Insalaco, *Engl. J. Med.* **340** (1999) 1144-1153.
г) H. M. Keys, B. N. Bundy, F. B. Stehman, L. I. Muderspach, W. E. Chafe, C. L. Suggs, J. L. Walker, D. Gersell, *N. Engl. J. Med.* **340** (1999) 1154-1161.
- [13] E. Wong, C.M. Giandomenico, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2451-2466.
- [14] R. Oun, Y. E. Moussa, N. J. Wheate, *Dalton Trans.* **47** (2018) 6645-6653.
- [15] A. H. Calvert, S. J. Harland, D. R. Newell, Z. H. Siddik, A. C. Jones, T. J. McElwain, S. Raju, E. Wiltshaw, I. E. Smith, J. M. Baker, M. J. Peckham, K. R. Harrap, *Cancer Chemoter Pharmacol.* **9** (1982) 140-147.
- [16] L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer* **7** (2007) 573-584.
- [17] S. Mabuchi, T. Kimura, *Chemother. Res. Pract.* **2011** (2011) 1-10.
- [18] C. -H. Choi, Y. -J. Cha, C. -S. An, K. -J. Kim, K. -C. Kim, S. -P. Moon, Z. H. Lee, Y. -D. Min, *Cancer Cell. Int.* **4** (2004) 6-17.
- [19] M. J. McKegae, *Exp. Opin. Invest. Drugs* **10** (2001) 119-128.
- [20] S. Kishimoto, K. Miyazawa, S. Fukushima, Y. Takeuchi, *Jpn. J. Cancer Res.* **91** (2000).
- [21] P. J. Barndard, S. J. Berners-Price, *Coord. Chem. Rev.* **251** (2007) 1889-1902.

- [22] C. F. Shaw, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2589-2600.
- [23] C.- M. Che, R. W.- Y. Sun, W.- Y. Yu, C.- B. Ko, N. Zhu, H. Sun, *Chem. Commun.* (2003) 1718-1719.
- [24] C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, A. Guerri, M. A. Cinellu, G. Minghetti, M. Corsini, C. Rosani, P. Zanello, M. Arca, *Inorg. Chem.* **47** (2008) 2368-2379.
- [25] S. Nobili, E. Mini, I. Landini, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Medicinal Research Reviews*, **30** (2010) 550-580.
- [26] F. A. Cotton, R. A. Walton, *Multiple Bonds Between Metal Atoms*, Clarendon Press, Oxford, (1993).
- [27] B. P. Esposito, S. B. Zyngier, A. R. Souza, R. Najjar, *Metal-Based Drugs* **4** (1997) 333-338.
- [28] B. P. Esposito, S. B. Zyngier, R. Najjar et al., *Metal-Based Drugs* **6** (1999) 17-18.
- [29] M. J. Cleare, P. C. Hydes, in H. Sigel, ed., *Metal Ions Biol. Syst.* **11** (1980) 1-62.
- [30] G. Mestroni, E. Alessio, A. Sessanta o Santi et al., *Inorg. Chim. Acta* **273** (1998) 62-71.
- [31] A. R. Kapdi, I. J. S. Fairlamb, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 4751-4777.
- [32] E. Gao, C. Liu, M. Zhu, H. Lin, Q. Wu, L. Liu, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **9** (2009) 356-368.
- [33] G. Zhao, H. Sun, H. Lin, S. Zhu, X. Su, *J. Inorg. Biochem.* **72** (1998) 173-177.
- [34] A. Garoufis, S. K. Hadjikakou, H. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.* **253** (2009) 1384-1397.
- [35] Z. D. Matović, E. Mrkalić, G. Bogdanović, V. Kojić, A. Meetsma, R. Jelić, *J. Inorg. Biochem.* **121** (2013) 134-144.
- [36] E. M. Mrkalić, R. M. Jelić, O. R. Klisurić, Z. D. Matović, *Dalton Trans.* **43** (2014) 15126-15137.
- [37] N. P. Farrell, "Uses of Inorganic Chemistry in Medicine", The Royal Society of Chemistry, London, Uk (1999).
- [38] a) Q. Zhou, T. W. Hambley, B. J. Kennedy, P. A. Lay, P. Turner, B. Warwick, J. R. Biffin, H. L. Regtop, *Inorg. Chem.* **39** (2000) 3742-3748;
6) E. Weder, T. W. Hambley, B. J. Kennedy, P. A. Lay, G. J. Foran, A. M. Rich, *Inorg. Chem.* **40** (2001) 1295-1302.
- [39] B. M. Blunden, A. Rawal, M. H. Stenzel, *Macromolecules* **47** (2014) 1646-1655.
- [40] A. Pastuszko et al, *J. Organomet. Chem.* **14** (2013) 745-746.
- [41] A. K. Sahu, D. K. Dash, K. Mishra, S. P. Mishra, R. Y., P. Kashyap, *Noble and Precious Metals - Properties, Nanoscale Effects and Applications*, Chapter 17 (2018).
- [42] J. Meija, T. B. Coplen, M. Berglund, W. A. Brand, P. De Bièvre, M. Gröning, N. E. Holden, J. Irrgeher, R. D. Loss, T. Walczyk, T. Prohaska, *Pure Appl. Chem.* **88** (2016) 265-291.

- [43] A. Levina, A. Mitra, P. A. Lay, *Metallomics* **1** (2009) 458-470.
- [44] a) H. Taube, *Surv. Prog. Chem.* **6** (1973) 1-46;
б) H. Taube, *Coord. Chem. Rev.* **26** (1978) 1-5.
- [45] G. Sava, A. Bergamo, *Int. J. Oncol.* **17** (2000) 353-65.
- [46] C. S. Allardyce, P. J. Dyson, *Platin. Met. Rev.* **45** (2001) 62-69.
- [47] R. Gagliardi, G. Sava, S. Pacor, G. Mestroni, E. Alessio, *Clin. Exp. Metastasis* **12** (1994) 93-100.
- [48] J. M. Rademaker-Lakhai, D. Van den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen, J. H. A. Schellens, *Clin. Cancer Res.* **10** (2004) 3717-3727.
- [49] M. A. Jakupec, V. B. Arion, S. Kapitza, E. Reisner, A. Eichinger, M. Pongratz, B. Marian, N. Graf von Keyserlingk, B. K. Keppler, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **43** (2005) 595-596.
- [50] G. Sava, S. Pacor, G. Mestroni, E. Alessio, *Anti-Cancer Drug.* **3** (1992) 25-31.
- [51] G. Sava, S. Pacor, G. Mestroni, E. Alessio, *Clin. Exp. Metastasis* **10** (1992) 273-280.
- [52] G. Sava, K. Clerici, I. Capozzi, M. Cocchietto, R. Gagliardi, E. Alessio, G. Mestroni, A. Perbellini, *Anti-Cancer Drug.* **10** (1999) 129-138.
- [53] G. Sava, R. Gagliardi, A. Bergamo, E. Alessio, G. Mestroni, *Anticancer Res.* **19** (1999) 969-972.
- [54] A. Bergamo, R. Gagliardi, V. Scarcia, A. Furlani, E. Alessio, G. Mestroni, G. Sava, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289** (1999) 559-564.
- [55] D. Pluim, R. C. A. M. van Waardenburg, J. H. Beijnen, J. H. M. Schellens, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **54** (2004) 71-78.
- [56] C. S. Allardyce, A. Dorcier, C. Scolaro, P. J. Dyson, *Organomet. Chem.* **19** (2005) 1-10.
- [57] A. Vessieres, S. Top, W. Beck, E. Hillard, G. Jaouen, *Dalton Trans.* (2006) 529-541.
- [58] Bioorganometallics, G. Jaouen, Ed. Wiley-VCH: Weinheim, Germany (2005).
- [59] C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurenczy, T. J. Geldbach, G. Sava, P. J. Dyson, *J. Med. Chem.* **48** (2005) 4161-4171.
- [60] A. Bergamo, A. Masi, P. J. Dyson, G. Sava, *Int. J. Oncol.* **33** (2008) 1281-1289.
- [61] C. S. Allardyce, P. J. Dyson, D. J. Ellis, S. L. Heath, *Chem. Commun.* **2** (2001) 1396-1397.
- [62] S. Chatterjee, S. Kundu, A. Bhattacharyya, C. G. Hartinger, P. J. Dyson, *J. Biol. Inorg. Chem.* **13** (2008) 1149-1155.
- [63] S.-S. Chen, *Cryst. Eng. Comm.* **18** (2016) 6543-6565.
- [64] L. D. Luca, *Curr. Med. Chem.* **13** (2006) 1-23.

- [65] a) G. Ponticelli, Z.D. Matović, V. D. Miletić, I. A. Efimenko, A. P. Kurbakova, D. J. Radanović, *Bull. Chem. Technol. Macedonia* **15** (1996) 9-14;
- б) Z. D. Matović, D. J. Radanović, G. Ponticelli, P. Scano, I. A. Efimenko, *Transition Met. Chem.* **19** (1994) 461-464;
- в) D. J. Radanović, Z. D. Matović, G. Ponticelli, P. Scano, I. A. Efimenko, *Transition Met. Chem.* **19** (1994) 646-650;
- г) I. A. Efimenko, A. P. Kurbakova, Z. D. Matović, G. Ponticelli, *Transition Met. Chem.* **19** (1994) 539-541;
- д) I. A. Efimenko, A. P. Kurbakova, Z. D. Matović, G. Ponticelli, *Transition Met. Chem.* **19** (1994) 640-642.
- [66] A. C. Vock, C. Sclaro, A. D. Phillips, R. Scopelliti, G. Sava, P. J. Dyson, *J. Med. Chem.* **49** (2006) 5552-5561.
- [67] M. Gras, B. Therrien, G. Suss-Fink, A. Casini, F. Edafe, P.J. Dyson, *J. Organomet. Chem.* **695** (2010) 1119-1125.
- [68] a) C. Gossens, I. Tavernelli, U. Rothlisberger, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 10921-10928;
- б) C. Gossens, I. Tavernelli, U. Rothlisberger, *J. Phys. Chem. A* **113** (2009) 11888-11891;
- в) Z. Ma, G. Palermo, Z. Adhireksan, B. S. Murray, T. von Erlach, P. J. Dyson, U. Rothlisberger, C. A. Davey, *Angew. Chem. Int. Ed.* **55** (2016) 7441-7444;
- г) Z. Adhireksan, G. E. Davey, P. Campomanes, M. Groessler, C. M. Clavel, H. Yu, A. A. Nazarov, C. H. F. Yeo, W. H. Ang, P. Dröge, U. Rothlisberger, P. J. Dyson, C. A. Davey, *Nat. Commun.* **5** (2014) 3462.
- [69] P. Nowak-Sliwinska, J. R. Beijnum, A. Casini, A. A. Nazarov, G. Wagnière, H. Bergh, P. J. Dyson, A. W. Griffioen, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 3895-3902.
- [70] C. M. Clavel, E. Păunescu, P. Nowak-Sliwinska, A. W. Griffioen, R. Scopelliti, P. J. Dyson, *J. Med. Chem.* **57** (2014) 3546-3558.
- [71] A. Adams, R. Slask, *Chem. Ind. (London)* **42** (1956) 1232.
- [72] J. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry* 5th Edition © 2010 Blackwell Publishing Ltd.
- [73] D. W. Brown, M. Sainsbury, *Product Class 15: Isothiazoles, Science of Synthesis*.
- [74] A. De Oliveira Silva, J. McQuade, M. Szostak, *Adv. Synth. Catal.* **361** (2019) 3050-3067.
- [75] Q.-F. Wu, B. Zhao, Z.-J. Fan, J.-B. Zhao, X.-F. Guo, D.-Y. Yang, N.-L. Zhang, B. Yu, T. Kalinina, T. Glukhareva, *RSC Adv.* **8** (2018) 39593-39601.
- [76] A. Garozzo, M. R. Pinizzotto, F. Guerrera, G. Tempera, A. Castro, E. Geremia, *Arch. Virol.* **135** (1994) 1-11.
- [77] V. Mishra, T. S. Chundawat, *Turk. J. Chem.* **43** (2019) 713-729.

- [78] K. I. Reddy, K. Srihari, J. Renuka, K. S. Sree, A. Chuppala, V. U. Jeankumar, J. P. Sridevi, K. S. Babu, P. Yogeewari, D. Sriram, *Bioorg. Med. Chem.* **22** (2014) 6552-6563.
- [79] I. Jęskowiak, M. Mączyński, J. Trynda, J. Wietrzyk, S. Ryng, *Bioorg. Chem.* **91** (2019) 103082-103090.
- [80] S. Rao Ambati, S. Gudala, A. Sharma, S. Penta, V. Loka Reddy, Y. Bomma, V. Rao, Janapala, S. Pola, *J. Heterocyclic Chem.* **54** (2017) 2333-2341.
- [81] C. V. N. S. Varaprasad, D. Barawkar, H. El Abdellaoui, S. Chakravarty, M. Allan, H. Chen, W. Zhang, J. Z. Wu, R. Tam, R. Hamatake, S. Lang, Z. Hong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 3975-3980.
- [82] B. Lippa, J. Morris, M. Corbett, T. A. Kwan, M. C. Noe, S. L. Snow, T. G. Gant, M. Mangiaracina, H. A. Coffey, B. Foster, E. A. Knauth, M. D. Wessel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 3444-3448.
- [83] S. G. Gregory et al., *Nature* **441** (2006) 315-321.
- [84] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **171** (1953) 737-738.
- [85] M. Mandelkern, J. Elias, D. Eden, D. Crothers, *J. Mol. Biol.* **152** (1981) 153-161.
- [86] J. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company (2002).
- [87] P. Yakovchuk, E. Protozanova, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **34** (2006) 564-74.
- [88] a) S. Neidle, *Nucleic Acid Structure and Recognition*, OUP, Oxford, UK, (2002).
b) D. S. Johnson, D. L. Boger, *Comprehensive Supramolecular Chemistry* (Eds.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle), Pergamon, Oxford **4** (1996).
- [89] S. E. Sherman, D. Gibson, A. H. Wang, S. J. Lippard, *Science* **230** (1985) 412-417.
- [90] D. J. Hodgson, *The Stereochemistry of Metal Complexes of Nucleic Acid Constituents*, in: S. J. Lippard (Ed.), *Progress in Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc. (2007) 211-254.
- [91] M. Crul, R. C. A. van Waardenburg, J. Beijnen, J. H. Schellens, *Cancer Treat. Rev.* **28** (2002) 291-303.
- [92] a) K. S. Lovejoy, R. C. Todd, S. Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105** (2008) 8902-8907;
b) L. S. Hollis, A. R. Amundsen, E. W. Stern, *J. Med. Chem.* **32** (1989) 128-36;
b) H. S. Feigelson, B. E. Henderson, *Carcinogenesis* **17** (1996) 2279-2284.
- [93] K. R. Barnes, A. Kutikov, S. J. Lippard, *Chem. Bio.* **11** (2004) 557-564.
- [94] a) S. Mukhopadhyay, C. M. Barnes, A. Haskel, S. M. Short, K. R. Barnes, S. J. Lippard, *Bioconjugate Chem.* **19** (2008) 39-49;
b) N. W. S. Kam, T. C. Jessop, P. A. Wender, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 6850-6851;

- в) M. Bottini, F. Cerignoli, M. I. Dawson, A. Magrini, N. Rosato, T. Mustelin, *Biomacromolecules* **7** (2006) 2259-2263;
- г) Y. Liu, D-C. Wu, W-D. Zhang et al. *Angew Chem. Int. Ed* **44** (2005) 4782-4785;
- д) N. W. S. Kam, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 6021-6026;
- ђ) T. W. Hambley, A. R. Battle, G. B. Deacon et al. *J. Inorg. Biochem.* **77** (1999) 3-12;
- е) G. L. Cohen, J. A. Ledner, W. R. Bauer, H. M. Ushay, C. Caravana, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 2487-2488.
- [95] D. P. Gately, S. B. Howell, *Br. J. Cancer* **67** (1993) 1171-1176.
- [96] P. M. Takahara, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 12309-12321.
- [97] Z. Qin, G. Ren, J. Yuan, H. Chen, Y. Lu, N. Li, Y. Zhang, X. Chen, D. Zhao, *Frontiers in Pharmacology* **10** (2020) 1485.
- [98] A. Fedier, C. Poyet, D. Perucchini, T. Boulikas, D. Fink, *Anti-Cancer Drug.* **17** (2006) 315-323.
- [99] L. Zeng, P. Gupta, Y. Chen, E. Wang, L. Ji, H. Chao, Z. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **46** (2017) 5771-5804.
- [100] M. Mital, Z. Ziora, *Coord. Chem. Rev.* **375** (2018) 434-458.
- [101] S. M. Meier-Menches, C. Gerner, W. Berger, C. G. Hartigner, B. K. Keppler, *Chem. Soc. Rev.* **47** (2018) 909-928.
- [102] A. K. Singh, D. S. Pandey, Q. Xu, P. Braunstein, *Coord. Chem. Rev.* **31** (2014) 31-56.
- [103] A. N. Boynton, L. Marcelis, A. J. McConnell, J. K. Barton, *Inorg. Chem.* **56** (2017) 8381-8389.
- [104] C. Griffith, A. S. Dayoub, T. Jaranatne, N. Alatrash, A. Mohamedi, K. Abayan, Z. S. Breitbach, D. W. Armstrong, F. M. MacDonnell, *Chem. Sci.* **8** (2017) 3726-3740.
- [105] A. N. Boynton, L. Marcélis, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **138** (2016) 5020-5023.
- [106] H. K. Saeed, P. J. Jarman, S. Archer, S. Sreedharan, I. Q. Saeed, L. K. McKenzie, J. A. Weinstein, N. J. Buurma, C. G. W. Smythe, J. A. Thomas, *Angew. Chem., Int. Ed.* **56** (2017) 12628-12633.
- [107] G. Li, L. Sun, L. Ji, H. Chao, *Dalton Trans.* **45** (2016) 13261-13276.
- [108] C. S. Burke, A. Byrne, T. E. Keyes, *Angew. Chem., Int. Ed.* **57** (2018) 12420-12424.
- [109] J. D. Knoll, C. Turro, *Coord. Chem. Rev.* **110** (2015) 282-283.
- [110] S. Zou, G. Li, T. W. Rees, C. Jin, J. Huang, Y. Chen, L. Ji, H. Chao, *Chem.-Eur. J.* **24** (2018) 690-698.
- [111] G. Li, R. Guan, L. Ji, H. Chao, *Coord. Chem. Rev.* **281** (2014) 100-113.

- [112] B. Yu, T. W. Rees, J. Liang, C. Jin, Y. Chen, L. Jia, H. Chao, *Dalton Trans.* **48** (2019) 3914-3921.
- [113] E. S. Koumoussi, M. Zampakou, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, C. M. Beavers, S. J. Teat, G. Psomas, T. C. Stamatatos, *Inorg. Chem.* **51** (2012) 7699-7710.
- [114] H. Mansouri-Torshizi, M. Saeidifar, A. Divsalar, A. A. Saboury, S. Shahraki, *Bull. Korean Chem. Soc.* **31** (2010) 435-441.
- [115] L. A. Ba, M. Doering, T. Burkholz, C. Jacob, *Metallomics* **1** (2009) 292-311.
- [116] T. Wang, B. Xiang, Y. Wang, C. Chen, Y. Dong, H. Fang, M. Wang, *Colloids. Surf. B: Biointerfaces* **65** (2008) 113-119.
- [117] P. A. Zunszain, J. Ghuman, T. Komatsu, E. Tsuchida, S. Curry, *BMC Struct. Biol.* **3** (2003) 6.
- [118] K. Yamasaki, T. Maruyama, U. Kragh-Hansen, M. Otagiri, *Biochim. Biophys. Acta* **1295** (1996) 147-157.
- [119] D. C. Carter, J. X. Ho, *Adv. Protein Chem.* **45** (1994) 153-203.
- [120] O. K. Abou-Zied, O. I. K. Al-shihi, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 10793-10802.
- [121] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. Springer, New York, (2006).
- [122] Q. Zhang, W. Zhong, B. Xing, W. Tang, Y. Chen, *J. Inorg. Biochem.* **72** (1998) 195-200.
- [123] E. Meggers, G. E. Atilla-Gokcumen, H. Bregman, J. Maksimoska, S. P. Mulcahy, N. Pagano, D. S. Williams, *Synlett* **8** (2007) 1177-1189.
- [124] K. S.M. Smalley, R. Contractor, N. K. Haass, A. N. Kulp, G. E. Atilla-Gokcumen, D. S. Williams, H. Bregman, K. T. Flaherty, M. S. Soengas, E. Meggers, M. Herlyn, *Cancer Res.* **67** (2007) 209-217.
- [125] Y. Liu, Q. Yu, C. Wang, D. Sun, Y. Huang, Y. Zhou, J. Liu, *Inorg. Chem. Comm.* **24** (2012) 104-109.
- [126] S. S. Gunatilleke, C. A. F. de Oliveira, J. A. McCammon, A. M. Barrios, *J. Biol. Inorg. Chem.* **13** (2008) 555-561.
- [127] C. R. Oliveira, C. M. V. Barbosa, F. D. Nascimento, C. S. Lanetzki, M. B. Meneghin, F. E. G. Pereira, E. J. Paredes-Gamero, A. T. Ferreira, T. Rodrigues, M. L. S. Queiroz, A. C. F. Caires, I. L. S. Tersariol, C. Bincoletto, *Chem. Biol. Interact.* **177** (2009) 181-189.
- [128] MLA style: The Nobel Prize in Chemistry 1995. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2020. Sat. 22 Feb 2020. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1995/summary/>
- [129] U. Berkert, N. L. Allinger, *Amer. Chem. Soc.* (1982) 339.
- [130] W. J. Hehre, L. Radom, R. Schleyer, J. A. Pople, "Ab initio molecular orbital theory", Wiley, New York (1986).
- [131] a) L. H. Thomas, *Proc. Camb. Phil. Soc.* **23** (1927) 542-548;
b) E. Y. Fermi, *Y. Phys.* **48** (1928) 73-79.
- [132] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.* **B 136** (1964) 864-871.
- [133] W. Kohn, L. J. Sham, *Phys. Rev.* **140** (1965) A1133-A1138.
- [134] Y. Zhao, D.G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **120** (2008) 215-241.
- [135] a) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 5648-5652;
b) C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **37** (1988) 785-789;
b) B. Miehlich, A. Savin, H. Stoll, H. Preuss, *Chem. Phys. Lett.* **157** (1989) 200-206.
- [136] S. F. Sousa, P. A. Fernandes, M. J. Ramos, *Proteins* **65** (2006) 15-26.
- [137] R. D. Taylor, P. J. Jewsbury, J. W. Essex, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **16** (2002) 151-166.

- [138] a) J. A. Capra, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, M. Singh, T. A. Funkhouser, *PLOS Comput. Biol.* **5** (2009) e1000585;
b) L. Heo, W.-H. Shin, M. S. Lee, C. Seok, *Nucleic acids res.* **42** (2014) W210-W214;
в) A. Roy, J. Yang, Y. Zhang, *Nucleic acids res.* **40** (2012) W471-W477.
- [139] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **30** (2009) 2785-2791.
- [140] O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **31** (2010) 455-461.
- [141] GOLD suite 5.6.2, <http://www.ccdc.cam.ac.uk/Solutions/csd-discovery/>
- [142] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, R. Taylor, *J. Mol. Biol.* **267** (1997) 727-748.
- [143] G. Bogdanović, J. Raletić-Savić, N. Marković, *Arch. Oncol.* **2** (1994) 181-184.
- [144] M. T. Cocco, V. Onnis, *Synthesis* (1993) 199-201.
- [145] M. T. Cocco, C. Congiu, A. Maccioni, V. Onnis, M. L. Schivo, A. De Logu, *Il Farmaco* **49** (1994) 137-140.
- [146] J. G. Małecki, *Struct. Chem.* **23** (2012) 461-472.
- [147] M. Djukić, M. S. Jeremić, R. Jelić, O. Klisurić, V. Kojić, Dimitar Jakimov, P. Djurdjević, Z. D. Matovića, *Inorganica Chimica Acta* **483** (2018) 359–370.
- [148] M. B. Đukić, M. S. Jeremić, I. P. Filipović, O. R. Klisurić, V. V. Kojić, D. S. Jakimov, R. M. Jelić, V. Onnis, Z. D. Matović, *Journal of Inorganic Biochemistry* **213** (2020) 111256.
- [149] M. B. Djukić, M. S. Jeremić, I. P. Filipović, O. R. Klisurić, R. M. Jelić, S. Popović, S. Matić, V. Onnis, Z. D. Matović, *ChemistrySelect* **5** (2020) 11489– 11502.
- [150] Oxford Diffraction, CrysAlis CCD and CrysAlis Red, including SCALE3 ABSPACK Oxford Diffraction, Abingdon, England, (2009).
- [151] R. H. Blessing, An empirical correction for absorption anisotropy, *Acta Crystallogr. A* **51** (1995) 33-38.
- [152] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A* **71** (2015) 3-8.
- [153] A. L. Spek, *J. Appl. Crystallogr.* **36** (2003) 7-13.
- [154] I. J. Bruno, J. C. Cole, P. R. Edgington, M. K. Kessler, C. F. Macrae, P. McCabe, J. Pearson, R. Taylor, *Acta Crystallogr. B* **58** (2002) 389-397.
- [155] L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **32** (1999) 837-838.
- [156] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. C* **71** (2015) 3-8.
- [157] L. J. Farrugia, *J. Appl. Cryst.* **30** (1997) 565.
- [158] R. C. Clark, J. S. Reid, *Acta Crystallogr. A* **51** (1995) 887-897.
- [159] P. Coppens, In *Crystallographic Computing*, ed. F. R. Ahmed, S. R. Hall, C. P. Huber, (1970) 255-270, Copenhagen: Munksgaard.
- [160] P. M. Takahara, A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *Nature* **377** (1995) 649-652.
- [161] H.-J. Yu, S.-M. Huang, L.-Y. Li, H.-N. Jia, H. Chao, Z.-W. Mao, J.-Z. Liu, L.-N. Ji, *J. Inorg. Biochem.* **103** (2009) 881-890.
- [162] J. R. Lakowicz, G. Weber, *Biochemistry* **12** (1973) 4161-4170.
- [163] A. Wolfe, G.H. Shimer Jr., T. Meehan, *Biochemistry* **26** (1987) 6392-6396.
- [164] N. Sharma, G. Arya, R. M. Kumari, N. Gupta, S. Nimesh, *Bio-protocol* **9** (2019) e3131.
- [165] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **65** (1983) 55-63.
- [166] A. Koch, P. Tamez, J. Pezzuto, D. Soejarto, *J. Ethnopharmacol.* **101** (2005) 95-99.
- [167] A. Doyle, J. B. Griffiths, D. G. Newell, *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* Ed. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, England (1995).

- [168] A. Bender, D. Opel, I. Naumann, R. Kappler, L. Friedman, D. Von Schweinitz, K.-M. Debatin, S. Fulda, *Oncogene* **30** (2011) 494-503.
- [169] D. Baskic, S. Popovic, P. Ristic, N. N. Arsenijevic, *Cell. Biol. Internat.* **30** (2006) 924-932.
- [170] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-254.
- [171] ImageJ, компјутерски програм. NIH image, <http://imagej.nih.gov>
- [172] BD CellQuest Pro Software; Becton, Dickinson and Company: San Hose, USA (2002).
- [173] FlowJo™ Software, Becton, Dickinson and Company (2019).
- [174] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearmark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT (2013).
- [175] F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7** (2005) 3297-3305.
- [176] a) A. Bergner, M. Dolg, W. Kuechle, H. Stoll, H. Preuss, *Mol. Phys.* **80** (1993) 1431-1441;
b) M. Kaupp, P. V. R. Schleyer, H. Stoll, H. Preuss, *J. Chem. Phys.* **94** (1991) 1360-1366;
в) M. Dolg, H. Stoll, H. Preuss, R.M. Pitzer, *J. Phys. Chem.* **97** (1993) 5852-5859.
- [177] MOPAC2016, J. J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, <http://OpenMOPAC.net> (2016).
- [178] J. Řezáč, P. Hobza, *J. Chem. Theory Comput.* **8** (2012) 141-151.
- [179] I. Petitpas, C. E. Petersen, C. Ha, A. A. Bhattacharya, P. A. Zunszain, J. Ghuman, N. V. Bhagavan, S. Curry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (2003) 6440-6445.
- [180] M. S. Jeremić, M. D. Radovanović, F. W. Heinemann, M. M. Vasojević, Z. D. Matović, *Polyhedron* **169** (2019) 89-101.
- [181] J. D. Berić, S. D. Stojanović, E. M. Mrkalić, Z. D. Matović, D. R. Milovanović, M. M. Sovrlić, R. M. Jelić, *Monats. Chem. - Chemical Monthly* **149** (2018) 2359-2368.
- [182] M. Streib, K. Kraeling, K. Richter, X. Xie, H. Steuber, E. Meggers *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53** (2014) 305-309.
- [183] Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio **17** (2) (2016).
- [184] S. Forli, R. Huey, M. E. Pique, M. F. Sanner, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *Nat. Protoc.* **11** (2016) 905-919.
- [185] Y. N. Nosova, D. S. Karlov, S. A. Pisarev, I. A. Shutkov, V. A. Palyulin, M. Baquie, E. R. Milaeva, P. J. Dyson, A. A. Nazarov, *J. Organomet. Chem.* **839** (2017) 91-97.
- [186] PDB ID: 2BZH; J. E. Debreczeni, A. Bullock, S. Knapp, F. von Delft, M. Sundstrom, C. Arrowsmith, J. Weigelt, A. Edwards, (2005) [10.2210/pdb2bzh/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb2bzh/pdb).
- [187] PDB ID: 5LS8; K. McQuaid, H. Abell, S. P. Gurung, D. R. Allan, G. Winter, T. Sorensen, D. J. Cardin, J. A. Brazier, C. J. Cardin, J. P. Hall, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **58** (2019) 9881-9885.
- [188] PDB ID: 6HWG; K. T. McQuaid, J. P. Hall, C. J. Cardin, (2019), [10.2210/pdb6hwg/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb6hwg/pdb).

- [189] PDB ID: 5LFX; J. P. Hall, S. P. Gurung, J. Henle, P. Poidl, J. Andersson, P. Lincoln, G. Winter, T. Sorensen, D. J. Cardin, J. A. Brazier, C. J. Cardin, *Chemistry* **23** (2017) 4981-4985.
- [190] G. Sciortino, J. Rodríguez-Guerra Pedregal, A. Lledós, E. Garribba, J.-D. Maréchal, J. Comput. Chem. **39** (2018) 42–51.
- [191] C.X. Zhang, S.J. Lippard, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7** (2003) 481-489.
- [192] Q. Zhang, J. Liu, H. Chao, G. Xue, L. Ji, *J. Inorg. Biochem.* **83** (2001) 49-55.
- [193] A.F. Tanious, D.Y. Ding, D.A. Patrick, C. Bailly, R.R. Tidwell, W.D. Wilson, *Biochemistry*, **39** (2000) 12091-12101.
- [194] Z.C. Liu, B.D. Wang, B. Li, Q. Wang, Z.Y. Yang, T. R. Li, Y. Li, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 5353-5361.
- [195] R.F. Pasternack, E.J. Gibbs, J.J. Villafranca, *Biochemistry* **22** (1983) 2406-2414.
- [196] G. Pratviel, J. Bernadou, B. Meunier, *Adv. Inorg. Chem.* **45** (1998) 251-312.
- [197] S. A. Tysoe, R. J. Morgan, A. D. Baker, T. C. Streckas, *J. Phys. Chem.* **97** (1993) 1707-1711.
- [198] K.C. Skyrianou, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, D.P. Kessissoglou, G. Psomas, *Polyhedron* **28** (2009) 3265–3271.
- [199] A. Tarushi, G. Psomas, C.P. Raptopoulou, D.P. Kessissoglou, *J. Inorg. Biochem.* **103** (2009) 898–905.
- [200] E.T. Peck, S. Hill, A.M. Williams, *Pharmacology for anaesthesia and intensive care*, 3rd edn. Cambridge University Press, New York, (2008).
- [201] L. Galluzzi, M. C. Maiuri, I. Vitale, H. Zischka, M. Castedo, L. Zitvogel, G. Kroemer, *Cell Death Differ.* **14** (2007) 1237-1243.
- [202] G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino, *Cell Death Differ.* **16** (2009) 3-11.
- [203] D. A. Nelson, E. White, *Genes & Dev.* **18** (2004) 1223-1226.
- [204] M. Leist, M. Jäättelä, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2** (2001) 589-598.
- [205] G. Kroemer, W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M. V. Blagosklonny, W. Malorni, R. A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata, G. Melino, *Cell Death Differ.* **12** (2005) 1463-1467.
- [206] S. Kumar, *Cell Death Differ.* **14** (2007) 32-43.
- [207] M. Vogler, D. Dinsdale, M. J. S. Dyer, G. M. Cohen, *Cell Death Differ.* **16** (2009) 360-367.
- [208] C. Adrain, S. J. Martin, *Sci. Signal.* **2** (2009) Article No. pe62.
- [209] S. E. Logue, S. J. Martin, *Biochem. Soc. Trans.* **36** (2008) 1-9.
- [210] R. Kim, M. Emi, K. Tanabe, Y. Uchida, K. Arihiro, *Eur. J. Surg. Oncol.* **32** (2006) 269-277.
- [211] R. Sy Wong, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **30** (2011) 87–100.
- [212] G. Koopman, C. P. Reutelingsperger, G. A. Kuijten, R. M. Keehnen, S. T. Pals, M. H. van Oers, *Blood* **84** (1994) 1415-1420.
- [213] G. Sava, S. Pacor, A. Bergamo, M. Cocchiello, G. Mestroni, E. Alessio, *Chem. Biol. Interact.* **95** (1995) 109-126.
- [214] L. Galluzzi, I. Vitale, J.M. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, T.M. Dawson, V.L. Dawson, W.S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D.R. Green, M.O. Hengartner, O. Kepp, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nuñez, M.E. Peter, M. Piacentini, D.C. Rubinsztein, Y. Shi, H.-U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, G. Kroemer, *Cell Death Differ.* **19** (2012) 107–120.

- [215] S. Fulda, K.M. Debatin, *Oncogene* **25** (2006) 4798–4811.
- [216] ImageJ, компјутерски програм. NIH Image, <http://imagej.nih.gov>
- [217] L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis et al., *Cell. Death. Differ.* **3** (2018) 486-541.
- [218] P. E. Puig, M. N. Guilly, A. Bouchot, N. Droin, D. Cathelin, F. Bouyer, L. Favier, F. Ghiringhelli, G. Kroemer, E. Solary, F. Martin, B. Chauffert. *Cell. Biol. Int.* **32** (2008) 1031-43.
- [219] F. Wang, H. Chen, S. Parsons, I.D.H. Oswald, J.E. Davidson, P.J. Sadler, *Chem. Eur. J.* **9** (2003) 5810–5820.
- [220] O. Trott, A.J. Olson, *J. Comput. Chem.* **31** (2010) 455–461.
- [221] W. Hu, Q. Luo, X. Ma, K. Wu, J. Liu, Y. Chen, S. Xiong, J. Wang, P.J. Sadler, F. Wang, *Chem. Eur. J.* **15** (2009) 6586–6594.

БИОГРАФИЈА



Маја Б. Ђукић је рођена 22.05.1987. године у Лесковцу. Основну школу завршила је у Пироту, где је уписала средњу Млекарску школу са домом ученика „др Обрен Пејић“ смер прехранбени техничар и завршила као најбољи ученик генерације 2005/2006. На Природно-математички факултет у Крагујевцу, група Хемија, смер заштита животне средине, уписала се школске 2006/2007. године, где је и дипломирала 2011. године са просечном оценом 9. Дипломски рад под називом *"Синтеза и карактеризација тетраденатног маламидо- N,N' -диацетато лиганда и одговарајућег $Pd(II)$ комплекса"* одбранила је 2011. године са оценом 10. Носилац је специјалног признања за 2011. годину за изузетан успех током студија од стране српског хемијског друштва. Докторске академске студије, модул Неорганска хемија, уписала је школске 2011/2012. године. Запослена је као истраживач-сарадник на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу. Активни је учесник многобројних фестивала као што су Ноћ истраживача, Велики научни парк, Ноћ музеја, где са великим ентузијазмом преноси деци своју љубав према хемији. Члан је српског хемијског друштва и српског кристалографског друштва.

СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

1. Списак научних радова из докторске дисертације објављених у часописима са SCI-листе:

- 1.1. **Maја Djukić**, Marija S. Jeremić, Ratomir Jelić, Olivera Klisurić, Vesna Kojić, Dimitar Jakimov, Predrag Djurdjević, Zoran D. Matović, Further Insights into Ruthenium(II) Piano-stool Complexes with N-Alkyl Imidazoles *Inorganica Chimica Acta*, 483(2018)359

DOI: 10.1016/j.ica.2018.08.031

ISSN: 0020-1693

IF = 2,433 за 2018. годину; 16/45; M22; област: Chemistry, Inorganic & Nuclear

- 1.2. **Maја B. Đukić**, Marija S. Jeremić, Ignjat P. Filipović, Olivera R. Klisurić, Vesna V. Kojić, Dimitar S. Jakimov, Ratomir M. Jelić, Valentina Onnis, Zoran D. Matović, Synthesis, characterization, HSA/DNA interactions and antitumor activity of new $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})Cl_2(L)]$ complexes, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 213 (2020) 111256

DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2020.111256

ISSN: 0162-0134

IF = 3,212 за 2019. годину; 10/45; M21; област: Chemistry, Inorganic & Nuclear

- 1.3. **Maја B. Djukić**, Marija S. Jeremić, Ignjat P. Filipović, Olivera R. Klisurić, Ratomir M. Jelić, Suzana Popović, Sanja Matić, Valentina Onnis, Zoran D. Matović, Ruthenium(II) Complexes of Isothiazole Ligands: Crystal Structure, HSA/DNA Interactions, Cytotoxic Activity and Molecular Docking Simulations, *Chemistry Select* 5 (2020) 11489-11502

DOI: 10.1002/slct.202002670

ISSN: 2365-6549

IF = 1,811 за 2019. годину; 111/177; M23; област: Chemistry, Multidisciplinary

2. Списак саопштења на националним (M64) конференцијама објављени у оквиру ове докторске дисертације

- 2.1. **M. B. Đukić**, M. Ćendić, Z. D. Matović, O. Klisurić, "Synthesis, characterization and crystal structure of complex $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})Cl_2(5\text{-MAPyCN-ITZ})]\cdot H_2O$ ", 22nd conference of the Serbian crystallographic society, 2015. Smederevo, Serbia, p62-63.

ISBN: 978-86-912959-2-9

- 2.2. **Maја B. Đukić**, Zoran D. Matović, "Synthesis and characterization of $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})Cl(N\text{-PrIm})_2][Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})]$ complex", Third conference of young chemists of Serbia, 2015, Belgrade, Serbia, p56.

ISBN: 978-86-7132-059-7

- 2.3. **Maја B. Đukić**, Zoran D. Matović, O. Klisurić, "Synthesis, characterization and crystal structure of complex $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})Cl_2(5\text{-MA-3-MorphCN-ITZ})]$ ", 23rd conference of the Serbian crystallographic society, 2016. Andrevlje, Serbia, p40-41.

ISBN: 978-86-912959-3-6

- 2.4. **Maја B. Đukić**, O. Klisurić, Zoran D. Matović, "Synthesis, characterization and crystal structure of $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-MeIm})_3]Cl_2\cdot 2H_2O$ complex", Fourth conference of young chemists of Serbia, 2016, Belgrade, Serbia, p51.

ISBN: 978-86-7132-064-1

- 2.5. **Maja B. Đukić**, O. Klisurić, Zoran D. Matović, “Synthesis, characterization and crystal structure of $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})Cl_2(5\text{-PhAPyCN-ITZ})]$ complex”, 25th conference of the Serbian crystallographic society, 2018. Bajina Bašta, Serbia, p48-49.

ISBN: 978-86-912959-4-3

3. **Списак осталих радова објављених у међународним часописима са SCI-листе**

- 3.1. Svetlana Belošević, Marina Ćendić, **Maja Djukić**, Miorad M. Vasojević, Auke Meetsma, Zoran D. Matović, “Crystal structure, configurational and density functional theory analysis of nickel(II) complexes with pentadentate 1,3-pd3a-type ligands” *Inorganica Chimica Acta* **399** (2013) 146-153.

DOI: 10.1016/j.ica.2013.01.014;

ISSN: 0020-1693

(IF = 1,991 за 2013. годину; 21/45; категорија: M22; област: Chemistry, Inorganic & Nuclear.

- 3.2. Danijela Lj. Stojković, Verica V. Jevtić, Gordana P. Radić, **Maja B. Đukić**, Ratomir M. Jelić, Milan M. Zarić, Marija V. Anđelković, Milena S. Mišić, Dejan D. Baskić, Srećko R. Trifunović, “Stereospecific ligands and their complexes. XXIV. Synthesis, characterization and some biological properties of Pd(II) and Pt(II) complexes with R₂-S,S-eddtyr“, *New Journal of Chemistry* **42** (2018) 3924-3935.

DOI: 10.1039/c7nj04437b;

ISSN: 1144-0546

(IF = 3,069 за 2018. годину; 66/172; категорија: M22; област: Chemistry, Multidisciplinary).

- 3.3. Milena D. Vukic, Nenad L. Vukovic, Ana Obradovic, Milos Matic, **Maja Djukic**, Edina Avdovic, “Redox status, DNA and HSA binding study of naturally occurring naphthoquinone derivatives”, *EXCLI Journal* **19** (2020) 48-70

DOI: 10.17179/excli2019-1859;

ISSN: 1611-2156

(IF = 2,837 за 2019. годину; 28/93; категорија: M22; област: Biology).

4. **Списак осталих саопштења на међународним (M34) и националним (M64) конференцијама штампаним у изводима:**

- 4.1. Marina Ćendić, **Maja B. Đukić**, Emina M. Mrkalić, Marija S. Jeremić, Zoran D. Matović, “Upravljanje komunalnim i industrijskim otpadom na teritoriji grada Kragujevca“ THE 6TH symposium chemistry and environmental protection – envirochem 2013 Vršac, Serbia, p154-155.

ISBN: 978-86-7132-052-8

- 4.2. Zoran D. Matović, Marina S. Ćendić, **Maja B. Đukić**, Svetlana K. Belošević, Auke Meetsma, Petra J. Van Koningsbruggen, “Synthesis and characterization of Nickel(II) complex with unsymmetrical pentadentate, H3pd3a ligand”, First International conference of young chemists of Serbia, 2012, Belgrade, Serbia, p56.

ISBN: 978-86-7132-050-4

- 4.3. **Maja B. Đukić**, Marina Ćendić, Zoran D. Matović, Svetlana K. Belošević, Olivera Klisurić, “Crystal structure and analysis of complex trans(O₆) [Ba(H₂O)₄][Ni(pddap)]·4H₂O“, 21st conference of the Serbian crystallographic society, 2014, Uzice, Serbia, p28-29.

ISBN: 978-86-912959-1-2

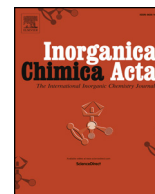
- 4.4. Anita Lazić, Kristina Gak, Nataša Valentić, Jelena Rogan, Lidija Radovanović, **Maja Đukić**, Zoran Matović, Nemanja Trišović, Study of the crystal structure and interactions of 5-(3- and 4-substituted)-5-methylhydantoins with human serum albumin and DNA, 56th meeting of the Serbian chemical society 2019, Niš, Serbia, p92.

ISBN: 978-86-7132-073-3

5. **Списак монографија (M42)**

- 5.1. Маја Ђукић, др Зоран Матовић, Систем квалитета – Водич за студенте хемије, *Природно-математички факултет Крагујевац, 2018.*

ISBN: 978-86-6009-053-1



Research paper

Further insights into ruthenium(II) piano-stool complexes with *N*-alkyl imidazoles

Maja Djukić^a, Marija S. Jeremić^a, Ratimir Jelić^b, Olivera Klisurić^c, Vesna Kojić^d,
Dimitar Jakimov^d, Predrag Djurdjević^e, Zoran D. Matović^{a,*}

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^c University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Physics, Trg Dositeja Obradovića 4, 21000 Novi Sad, Serbia

^d Oncology Institute of Vojvodina, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Put Doktora Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, Serbia

^e University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Internal Medicine, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

Ruthenium(II) complexes
Crystal structures
DNA interactions
QM
Docking
Apoptosis

ABSTRACT

Two piano-stool ruthenium(II) complexes $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-MeIm})_3]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**1**) and $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(N\text{-PrIm})\text{Cl}_2]$ (**2**) respectively have been synthesized and characterized by elemental, spectral and structural analysis. Crystal structures of (**1**) and (**2**) have been verified by X-ray diffraction analysis. Docking experiments toward DNA dodecamer have been done. Good ΔG binding values of the complexes with imidazole derivatives comparable with ethylene-diamine complex indicate a high potential of these compounds in the formation of DNA lesions and therefore their good cytotoxic status. The interaction of CT-DNA with ruthenium(II) complexes has been studied by means of absorption and fluorescence measurements. The binding constant, K_b and the Stern–Volmer quenching constant reveal that complex (**2**) binds well to CT-DNA. The cytotoxic activity of Ru(II) complexes with *N*-Rim (R = methyl or propyl) were evaluated by MTT assay. A-549, HT-29 and HeLa cells were sensitive to all compounds tested, while the breast carcinoma cell line MCF-7 was resistant only to the complex (**1**). Flow cytometric analysis and fluorescent microscopy showed that ruthenium(II) complexes in HeLa cells induce apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest and almost completely inhibit DNA synthesis. Western blot also demonstrated proteolytic cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) in HeLa cells after treatment with both tested substances.

1. Introduction

In recent years, ruthenium is very often seen in complexes with a specific activity toward cancer cells. There are a number of reviews in which the synthesis and the mechanisms of its action were reported [1–4].

The complex of Ru(III), NAMI-A (imidazolium [*trans*-tetrachloro (1*H*-imidazole)(*S*-dimethylsulfoxide)ruthenate(III)]) (Fig. 1) has undergone phase I of a clinical trial [5]. NAMI-A is a ruthenium-based compound with selective anti-metastatic activity as evidenced in experimental models of solid tumors [6]. However, further attention is directed to the RAPTA compounds ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-arene})(\text{PTA})\text{X}_2]$, PTA = 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) as representatives of Ru(II) compounds which show anti-tumor activity in vitro [7]. Further, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(\text{PTA})]$ (denoted as RAPTA-C) [8] has shown moderate effects on solid tumor metastases (Fig. 1) [5]. In recent years, attention

is directed toward organometallic ruthenium(II) compounds with imidazole ligands as well. Imidazoles are an important class of heterocyclic compounds and include many substances that are significant both biologically and chemically [9]. As can be seen in Dyson's papers, these complexes have shown a broad spectrum of cytotoxic properties in vitro as well as *in vivo* [10,11] (Fig. 1). They have compared the ruthenium (II) complexes coordinated with diverse ligands (investigating in case of certain ligands even their homology sequence) and different arene molecules (π -bonding arene: benzene, *p*-cymene, toluene). The various number of imidazole rings with different alkyl groups were used as well. A higher cytotoxicity showed a complex with longer alkyl chain ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}(N\text{-BuIm})_2][\text{Cl}]$ (compound **9b** in [10]) vs. $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}(N\text{-MeIm})_2][\text{Cl}]$ (compound **9a** in [10]) Further, if one compare cytotoxicity of the diverse ruthenium(II) complexes containing the same imidazole ligand (for example, *N*-Methylimidazole), it can be noticed that the higher number of coordinated imidazoles induce the

* Corresponding author.

E-mail address: zmatovic@kg.ac.rs (Z.D. Matović).

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.08.031>

Received 22 May 2018; Received in revised form 14 July 2018; Accepted 22 August 2018

Available online 27 August 2018

0020-1693/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.



Synthesis, characterization, HSA/DNA interactions and antitumor activity of new $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(\text{L})]$ complexes

Maja B. Đukić^a, Marija S. Jeremić^a, Ignjat P. Filipović^a, Olivera R. Klisurić^b, Vesna V. Kojić^c,
Dimitar S. Jakimov^c, Ratomir M. Jelić^d, Valentina Onnis^e, Zoran D. Matović^{a,*}

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Physics, Trg Dositeja Obradovića 4, 21000 Novi Sad, Serbia

^c Oncology Institute of Vojvodina, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Put Doktora Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, Serbia

^d University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^e Department of Life and Environmental Sciences, Unit of Pharmaceutical, Pharmacological and Nutraceutical Sciences, University of Cagliari, University Campus, S.P. n° 8, Km 0.700, I-09042 Monserrato (CA), Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Ruthenium(II) complexes
HSA interactions
DNA interactions
Molecular docking
Antiproliferation

ABSTRACT

Three new ruthenium(II) complexes were synthesized from different substituted isothiazole ligands 5-(methylamino)-3-pyrrolidine-1-ylisothiazole-4-carbonitrile (1), 5-(methylamino)-3-(4-methylpiperazine-1-yl)isothiazole-4-carbonitrile (2) and 5-(methylamino)-3-morpholine-4-ylisothiazole-4-carbonitrile (3): $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(\text{L1})]\cdot\text{H}_2\text{O}$ (4), $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(\text{L2})]$ (5) and $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(\text{L3})]$ (6). All complexes were characterized by IR, UV-Vis, NMR spectroscopy, and elemental analysis. The molecular structures of all ligands and complexes 4 and 6 were determined by an X-ray. The results of the interactions of CT-DNA (calf thymus deoxyribonucleic acid) and HSA (human serum albumin) with ruthenium (II) complexes reveal that complex 4 binds well to CT-DNA and HSA. Kinetic and thermodynamic parameters for the reaction between complex and HSA confirmed the associative mode of interaction. The results of Quantum mechanics (QM) modelling and docking experiments toward DNA dodecamer and HSA support the strongest binding of the complex 4 to DNA major groove, as well as its binding to Ila domain of HSA with the lowest ΔG energy, which agrees with the solution studies. The modified GOLD docking results are indicative for $\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{LCl}(\text{HSA}\text{-GLU292})$ binding and GOLD/MOPAC(QM) docking/modelling of DNA/Ligand ($\text{Ru}(\text{II})\text{-N}(7)\text{dG7}$) covalent binding. The cytotoxic activity of compounds was evaluated by MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay. Neither of the tested compounds shows activity against a healthy MRC-5 cell line while the MCF-7 cell line is the most sensitive to all. Compounds 3, 4 and 5 were about two times more active than cisplatin, while the antiproliferative activity of 6 was almost the same as with cisplatin. Flow cytometry analysis showed the apoptotic death of the cells with a cell cycle arrest in the subG1 phase.

1. Introduction

A significant contribution to the fight against malignancy was achieved using transition metal complexes. Probably the most significant among them is cisplatin, which has been used with more or less success for more than half a century [1]. Although efficient against the number of cancers, cisplatin also causes severe side-effects, which leads to e.g. peripheral neuropathy, hair loss, and myelotoxicity in patients [2]. Furthermore, for decades, chemists have been persistently working on the synthesis of new potentially bio-active metal complexes, changing either the structure of the ligand or the nature of the metal ion (Ru, Os, Fe, Cu ...). Ruthenium is very often seen in complexes with a

specific activity toward metastatic cancer cells. The reader may find more relevant intro about the anticancer activity of half-sandwich ruthenium(II) complexes in many reviews and papers in which the synthesis and the mechanisms of its action were reported [3–6]. Also, Ru(III) complexes such as NAMI-A ((ImH)[*trans*- $\text{RuCl}_4(\text{dmsO-S})(\text{Im})$], Im = imidazole) and KP1019 ((IndH)[*trans*- $\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2$], Ind = indazole) have undergone phase I of a clinical trial [7] (Fig. 1). Nevertheless, half-sandwich piano stool Ru(II) complexes have attracted greater interest in recent years for their antimetastatic and anticancer properties. RAPTA-C ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{PTA})\text{Cl}_2]$, where PTA = 1,3,5-triaza-7-phosphadamantane) [8] is anti-metastatic and anti-angiogenic agent able to form adducts with histone proteins [9].

* Corresponding author.

E-mail address: zmatovic@kg.ac.rs (Z.D. Matović).

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111256>

Received 23 July 2020; Received in revised form 8 September 2020; Accepted 10 September 2020

Available online 15 September 2020

0162-0134/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Inorganic Chemistry

Ruthenium(II) Complexes of Isothiazole Ligands: Crystal Structure, HSA/DNA Interactions, Cytotoxic Activity and Molecular Docking Simulations

Maja B. Djukić,^[a] Marija S. Jeremić,^[a] Ignjat P. Filipović,^[a] Olivera R. Klisurić,^[b] Ratomir M. Jelić,^[c] Suzana Popović,^[d] Sanja Matić,^[c] Valentina Onnis,^[e] and Zoran D. Matović^{✉[a]}

Two new neutral ruthenium(II) complexes $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(\mathbf{1})]$ (**3**) and $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})\text{Cl}_2(\mathbf{2})]$ (**4**) (**1** = 5-(phenylamino)-3-pyrrolidin-1-ylisothiazole-4-carbonitrile; **2** = 3-morpholin-4-yl-5-(phenylamino)isothiazole-4-carbonitrile) have been synthesized and characterized using elemental analysis, IR, UV-Vis and NMR spectroscopy. The crystal structure was confirmed for complex **3** and both ligands. Examination of the interactions of ligands and complexes with CT-DNA (Calf Thymus DNA), as well as with HSA (Human Serum Albumin) revealed that ligands and complexes could interact with CT-DNA through intercala-

tion and could bind strongly with HSA. Docking experiments toward DNA dodecamer indicate excellent accordance with experimental ΔG values. The cytotoxic activity of ligands and complexes was evaluated by MTT assay against HCT116 and HeLa tumoral cells. The complexes **3** and **4** showed good activity and selectivity on HCT116 cells. Neither of the tested compounds shows cytotoxic activity against a healthy MRC-5 cell line. Flow cytometry analysis showed the apoptotic death of the HCT116 cells with a cell cycle arrest in the S-phase.

1. Introduction

Some platinum drugs, such as Cisplatin, Oxaliplatin, and Carboplatin represent the best antitumor drugs of the last 45 years.^[1–3] However, they show many side-effects including the risk of infection, dehydration, kidney toxicity, and many other abnormalities.^[4] Also, many tumors show resistance to said drugs. That is why many research groups around the world have focused their research on syntheses of metal complexes that will show better antitumor activity with as few undesirable

effects as possible. The experience of last decades indicates ruthenium(II)-*p*-cymene complexes with various ligands as possible alternatives.^[5–8] Ruthenium(II) complexes are usually generally less toxic in comparison to Cisplatin so they have better potential as anticancer drugs.^[9,10] Half-sandwich piano stool Ru^{II} complexes have attracted great interest in recent years for their antimetastatic and anticancer properties. However, two of them are examined in more detail: RAED-C ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{en})\text{Cl}]^+$, where en = ethylenediamine) which is as cytotoxic as cisplatin targeting the DNA of chromatin^[11] and RAPTA-C ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(\text{PTA})\text{Cl}_2]$, where PTA = 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) which is anti-metastatic and anti-angiogenic agent able to form adducts with histone proteins.^[12] Isothiazoles, on the other hand, represent an important class of aromatic organic ligands with nitrogen and sulfur in the adjacent position (Figure 1). These two electronegative heteroatoms allow very easy coordination of the five-membered aromatic heterocycle for different metal ions.^[13] Isothiazole was

[a] M. B. Djukić, Dr. M. S. Jeremić, I. P. Filipović, Prof. Z. D. Matović

Department of Chemistry
Faculty of Science, University of Kragujevac
Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
E-mail: zmatovic@kg.ac.rs

[b] Prof. O. R. Klisurić

Department of Physics
Faculty of Sciences, University of Novi Sad
Trg Dositeja Obradovića 4, 21000 Novi Sad, Serbia

[c] Prof. R. M. Jelić, S. Matić

Department of Pharmacy
Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

[d] Dr. S. Popović

Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research
Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

[e] Prof. V. Onnis

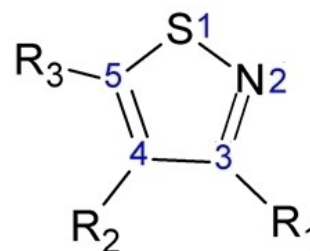
Department of Life and Environmental Sciences
Unit of Pharmaceutical, Pharmacological and Nutraceutical Sciences,
University of Cagliari
University Campus, S.P. n° 8, Km 0.700, I-09042 Monserrato (CA), Italy

Figure 1. Structure of substituted isothiazole (R1, R2 and R3 = various atomic groups which may be part of the substituted isothiazole).

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Маја Б. Ђукић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Структурна, теоријска и биолошка испитивања комплекса рутенијума(II) са дериватима имидазола и изотиазола

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу 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,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 17.11.2020. године,

Маја Ђукић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Маја Б. Ђукић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Структурна, теоријска, и биолошка испитивања комплекса рутенијума(II)
са дериватима имидазола и изотиазола

која је одбрањена на Природно-математичком факултету
Универзитета у Крагујевцу, 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 јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

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 _____, 17.11.2020. године,



потпис аутора

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