

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



Ивана Р. Раковић

**ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНЕ И АНТИОКСИДАТИВНЕ  
АКТИВНОСТИ ПАЛАДИЈУМ(II) КОМПЛЕКСА**

Докторска дисертација

Ментор: Проф. др Предраг Чановић

Крагујевац, 2021. године

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES



Ivana R. Raković

**TESTING OF ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY  
OF PALLADIUM(II) COMPLEX**

Doctoral Dissertation

Mentor: Prof. dr Predrag Canović

Kragujevac, 2021. godine

## Идентификациона страница докторске дисертације

<b>Аутор</b>
Име и презиме: Ивана Раковић
Датум и место рођења: 12.08.1983. године, Крагујевац
Садашње запослење: Асистент на Факултету медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
<b>Докторска дисертација</b>
Наслов: Испитивање антимикробне и антиоксидативне активности паладијум(II) комплекса
Број страница: 156
Број слика: 36
Број табела: 15
Број схема: 4
Број библиографских података: 393
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Имунологија
Ментор: Проф. др Предраг Чановић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
<b>Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: 19.12.2017.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-353/15 од 17.05.2018.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњеност услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"><li>1. <b>Проф. др Владимир Јаковљевић</b>, редовни професор, Универзитет у Крагујевцу - Факултет медицинских наука, за ужу научну област Физиологија, председник;</li><li>2. <b>Проф. др Драган Микић</b>, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област Инфективне болести, члан;</li><li>3. <b>Проф. др Марија Миловановић</b>, ванредни професор Универзитет у Крагујевцу - Факултет медицинских наука, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.</li></ol>
Комисија за оцену и одбране докторске дисертације:
<ol style="list-style-type: none"><li>1. <b>Др Ивана Радојевић</b>, доцент, Универзитет у Крагујевцу - Природно-математички факултет, за ужу научну област Микробиологија, председник;</li><li>2. <b>Проф. др Славиша Станковић</b>, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет, за ужу научну област Биологија микроорганизама, члан;</li><li>3. <b>Проф. др Оливера Милошевић-Ђорђевић</b>, редовни професор, Универзитет у Крагујевцу - Факултет медицинских наука и Природно-математички факултет, за уже научне области Генетика и Еволуција, члан;</li><li>4. <b>Др Јована Богојески</b>, доцент Универзитет у Крагујевцу - Природно-математички факултет, за ужу научну област Неорганска хемија, члан;</li><li>5. <b>Др Биљана Поповска-Јовичић</b>, доцент, Универзитет у Крагујевцу - Факултет медицинских наука, за ужу научну област Инфективне болести, члан.</li></ol>
Датум одбране дисертације:

## Identifikaciona stanica doktorske disertacije

Author
Name and surname: Ivana Raković
Date and place of birth: 12.08.1983., Kragujevac
Current employment: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Doctoral Dissertation
Title: Testing of antimicrobial and antioxidative activity of palladium(II) complex
No. of pages: 156
No. of images: 36
No. of tables: 15
No. of schemes: 4
No. of bibliographic data: 393
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Immunology
<b>Mentor:</b> Prof. dr Predrag Čanović, Full professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 19.12.2017.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: IV-03-353/15; 17.05.2018.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:  <ol style="list-style-type: none"><li>1. <b>Prof. dr Vladimir Jakovljević</b>, Full professor of University of Kragujevac - Faculty of Medical Sciences, scientific field of Physiology, president;</li><li>2. <b>Prof. dr Dragan Mikić</b>, Full professor of Medical Faculty, Military Medical Academy, University of Defence, Belgrade, scientific field of Infectious diseases, member;</li><li>3. <b>Prof. dr Marija Milovanović</b>, Associate professor of University of Kragujevac - Faculty of Medical Sciences, scientific field of Microbiology and immunology, member.</li></ol>
Commission for evaluation and defense of doctoral:  <ol style="list-style-type: none"><li>1. <b>Dr Ivana Radojević</b>, Assistant professor of University of Kragujevac - Faculty of Science, scientific field of Microbiology, president;</li><li>2. <b>Prof. dr Slaviša Stanković</b>, Full professor of University of Belgrade - Faculty of Biology, scientific field of Biology of microorganisms, member;</li><li>3. <b>Prof. dr Olivera Milošević-Djordjević</b>, Full professor of University of Kragujevac - Faculty of Medical Sciences and Faculty of Science, scientific field of Genetics, and Genetics and Evolution, member;</li><li>4. <b>Dr Jovana Bogojeski</b>, Assistant professor of University of Kragujevac - Faculty of Science, scientific field of Inorganic chemistry, member;</li><li>5. <b>Dr Biljana Popovska-Jovičić</b>, Assistant professor of University of Kragujevac - Faculty of Medical Sciences, scientific field of Infective diseases, member.</li></ol>
Date of Dissertation Defense:

Срдачно се захваљујем ментору проф. др Предрагу Чановићу на разумевању, подршци и помоћи у изради ове Докторске дисертације.

Захваљујем се члановима Комисије, проф. др Оливери Милошевић Ђорђевић, проф. др Славиши Станковић, доц. др Ивани Радојевић, доц. др Јовани Богојески и доц. др Биљани Поповској Јовичић, који су читањем рукописа овог рада својим саветима помогли да рад добије на стручности, јасноћи и квалитету.

Посебно се захваљујем доц. др Ивани Радојевић на несебичној помоћи приликом израде антимикуробног и антиоксидативног дела испитивања које је спроведено под њеним надзором у Лабораторији за микробиологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета. Овај део истраживања се делом финансирао са средстава пројеката Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (грант ИИИ41010 и ОИ173032) на којима је др Ивана Радојевић у периоду рада била руководилац пројектних задатака.

Доц. др Вери Дивац и вишем научном сараднику др Марку Живановићу се захваљујем на дивној сарадњи и заједничком раду.

Породици хвала на љубави и разумевању.

## АПСТРАКТ

**Увод:** Основни циљ докторске дисертације је био синтеза комплекса паладијума(II) са различитим азот и селен донорским лигандима и испитивање њихове антимикуробне, антибиофилм, антиоксидативне активности, интеракције са молекулом ДНК, генотоксична и антитуморска активност. У ери микробне резистенције, наведена истраживања су имала за циљ проналажење антимикуробног лека са ширим спектром деловања који ће имати минимум нежељених ефеката. Од медицинског значаја је и проналажење потенцијалног антитуморског лека.

**Материјал и методе:** Приказана је синтеза и карактеризација 7 комплекса Pd(II) са различитим азот и селен донорским лигандима, стандардним аналитичким методама. Антимикуробна активност је испитивана микродилуционом методом са ресазурином, а антибиофилм активност на формираном биофилму, методом са кристал виолетом. Коришћен је широк спектар различитих микроорганизама (Грам-позитивне, Грам-негативне бактерије, квасци, филаментозне гљиве), при чему се водило рачуна да су подједнако заступљени стандарди и изолати, нарочито патогени. За испитивање антиоксидативне активности коришћен је тест капацитета неутралисања DPPH радикала. Интеракције награђених комплекса са СТ-ДНК праћене су апсорбционом и флуоресцентном методом као и мерењем вискозности раствора, док су интеракције са BSA испитиване флуоресцентном методом. Извршена је симулација молекула докинг методом. Генотоксична активност комплекса Pd(II) у култивисаним хуманим лимфоцитима испитивана је коришћењем Комет теста. Цитотоксична активност новосинтетисаних једињења је испитивана помоћу МТТ колориметријске технике.

**Резултати:** Тестирани азот-донорски лиганди и одговарајући комплекси Pd(II) показали су селективну и ограничену антимикуробну активност. Комплекси Pd(II) са селен донорским лигандима, **C5** и **C7** показали су најзначајнију активност према бактерији *Pseudomonas aeruginosa*, при чему су активности биле боље у односу на позитивну контролу. Активности боље или у рангу позитивних контрола показује и комплекс **C5**, на филаментозним гљивама *Trichoderma viridae* ATCC 13233 и врстама рода *Aspergillus*, као и комплекс **C7** на биофилму *P. aeruginosa*. Значајну антиоксидативну активност Pd(II) комплекса са азот-донорским лигандима показује само **C4**, док се од комплекса Pd(II) са селен донорским лигандима значајно истиче **C6** комплекс.

Испитивани комплекси Pd(II) умерено интерагују са молекулом СТ-ДНК и BSA, нешто већи афинитет показују према молекулу BSA. Селен донорски комплекси Pd(II) су показали већи степен интеракције у односу на азот донорске комплексе Pd(II). Подједнако су заступљени „minor groove“ и интеркалација као начини везивања са молекулом СТ-ДНК. Највећи генотоксични ефекат показује комплекс C7, а најмањи C5. Комплекс C6 је показао најзначајнију антитуморску активност.

**Закључак:** У времену раста микробне резистенције и стопе обољевања од малигних болести, проналазак потенцијалног лека са мало споредних ефеката и широког спектра дејства је циљ бројних истраживачких група широм света. Ово *in vitro* истраживање издваја комплекс C5 као најмање генотоксичан, са изразитом антимикуробном активношћу према одређеним микроорганизмима, и комплекс C6 са изразитом антиоксидативном и цитотоксичном активношћу. Сходно томе, истраживања за оба комплекса су оправдана и подстичу наставак истраживања у области примене комплекса метала као лекова.

**Кључне речи:** комплекси Pd(II), азот и селен донорски лиганди, антимикуробна, антибиофилм, антиоксидативна активност, СТ-ДНК и BSA, генотоксичност, цитотоксичност

## ABSTRACT

**Introduction:** The main goal of the doctoral dissertation was the synthesis of the palladium(II) complexes with different nitrogen and selenium donor ligands and examining their antimicrobial, antibiotic, and antioxidant activities, interactions with DNA molecules, genotoxic and antitumor activity. In an era of microbial resistance, the research cited was aimed at finding an antimicrobial drug with a wider range of effects that would have minimal side effects. It is also of medical importance to find a potential antitumor drug.

**Materials and methods:** Standard analytical methods show the synthesis and characterization of 7 Pd(II) complexes with different nitrogen and selenium donor ligands. Antimicrobial activity was tested by a microdilution method with resazurin, and antibiofilm activity was tested on the formed biofilm, a method with crystal violet. A wide range of microorganisms (Gram-positive, Gram-negative bacteria, yeasts, filamentous fungi) were used, ensuring that standards and isolates were equally represented, especially pathogens. A test of the capacity to neutralize DPPH radicals was used to test antioxidant activity. Interactions of synthesized complexes with CT-DNA were examined using the absorption and fluorescent method as well as measuring the viscosity of the solution, while interactions with BSA were examined using a fluorescent method. A simulation of the docking molecules was performed. The genotoxic activity of complexes Pd(II) in cultivated human lymphocytes was tested using Komet tests. Cytotoxic activity of newly synthesized compounds was tested using an MTT colourimetric technique.

**Results:** Tested nitrogen donor ligands and corresponding Pd(II) complexes showed selective and limited antimicrobial activity. Complexes Pd(II) with selenium donor ligands, **C5** and **C7** showed the most significant activity towards the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, where activities were better than the positive control. Activities better or in the rank of positive controls are shown in the case of **C5** complex, on the filamentous fungus *Trichoderma viridae* ATCC 13233 and the species of *Aspergillus*, as well as in the case of the **C7** complex on the biofilm *P. aeruginosa*. Significant antioxidant activity of the Pd(II) complexes with nitrogen donor ligands exhibits only **C4**, while the **C6** complex of the Pd(II) complexes with selenium donor ligands is significantly highlighted. The examined Pd(II) complexes moderately interact with the CT-DNA and BSA molecules, with a slightly higher affinity towards the BSA molecule. Selenium donor Pd(II) complexes showed greater interaction than nitrogen donor Pd(II) complexes. "Minor groove" and intercalation are equally represented as ways of



binding to the CT-DNA molecule. The biggest genotoxic effect shows the **C7** complex and the smallest **C5**. **C6** complex demonstrated the most significant antitumor activity.

**Conclusion:** At a time of growth of microbial resistance and rates of malignant diseases, finding a potential drug with few side effects and a wide range of effects is the goal of numerous research groups around the world. This *in vitro* research singles out complex **C5** as the least genotoxic, with a distinct antimicrobial activity towards certain microorganisms, and complex **C6** with distinctive antioxidant and cytotoxic activity. Consequently, research for both complexes is justified and encourages continued research in the field of the application of metal complexes as medicines.

**Keywords:** Pd(II) complexes, nitrogen and selenium donor ligands, antimicrobial, antibiofilm, antioxidant activity, CT-DNA and BSA, genotoxic, cytotoxic activity

# САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Изазови данашњице.....	1
1.2. Антимикробна активност.....	2
1.2.1. Антимикробна стратегија у ери резистенције.....	2
1.2.2. Механизам дејства антимикробних једињења и резистенција микроорганизама.....	4
1.2.3. Развој нових антимикробних једињења на бази једињења јона метала .....	10
1.3. Биофилм.....	23
1.4. Слободни радикали и антиоксидативна активност.....	25
1.5. Интеракције комплекса са молекулом ДНК.....	28
1.6. Генотоксична активност.....	30
1.7. Комплекси метала и антитуморска активност.....	33
1.7.1. Резистенција на дејство антитуморских лекова.....	37
1.7.2. Механизам антитуморског деловања.....	38
1.7.3. Комплекси паладијума као антитуморски агенси.....	40
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ.....	43
2.1. Главни циљ истраживања.....	43
2.2. Посебни циљеви истраживања.....	43
2.3. Хипотезе.....	44
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	45
3.1. Реагенси и раствори.....	45
3.2. Поступак синтезе лиганата.....	47
3.3. Поступак синтезе комплекса.....	48
3.4. Анализе и методе мерења.....	50
3.4.1. Елементална микроанализа.....	50
3.4.2. Инфрацрвена спектроскопија.....	50
3.4.3. Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија.....	51
3.4.4. Масена спектроскопија.....	51
3.4.5. рН мерења.....	51
3.4.6. Инструменти.....	51

3.5. <i>In vitro</i> антимикуробни тест .....	52
3.5.1. Тест супстанце и микроорганизми .....	52
3.5.2. Суспензије микроорганизама .....	53
3.5.3. Микродилуциона метода .....	54
3.6. <i>In vitro</i> антибиофилм активност .....	55
3.6.1. Тест супстанце и микроорганизми .....	55
3.6.2. Суспензије микроорганизама .....	55
3.6.3. Tissue culture plate test (ТСР) тест .....	55
3.7. Антиоксидативна активност .....	56
3.7.1. Тест капацитета неутралисања DPPH радикала .....	56
3.8. Интеракције паладијум(II)-комплекса са ДНК и серум албумином .....	57
3.8.1. Интеракције паладијум(II)-комплекса са ДНК .....	57
3.8.2. Интеракције паладијум(II)-комплекса са серум албумином .....	59
3.8.3. Симулације молекулског докинга .....	59
3.9. <i>In vitro</i> генотоксична активност .....	60
3.9.1. Кошет тест .....	60
3.10. <i>In vitro</i> антитуморска активност .....	61
3.10.1. Испитиване ћелијске линије .....	61
3.10.2. МТТ тест .....	62
3.11. Статистичка анализа .....	64
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА .....	65
4.1. Синтеза и карактеризација комплекса .....	65
4.2. <i>In vitro</i> антимикуробна активност паладијум(II) комплекса .....	66
4.3. <i>In vitro</i> антибиофилм активност паладијум(II) комплекса .....	83
4.4. <i>In vitro</i> антиоксидативна активност паладијум(II) комплекса .....	87
4.5. Интеракције паладијум(II) комплекса са ДНК и серум албумином .....	91
4.5.1. Интеракције испитиваних паладијум(II) комплекса са ДНК .....	92
4.5.2. Интеракције комплекса паладијум(II) са серум албумином .....	100
4.5.3. Докинг молекула .....	103
4.6. <i>In vitro</i> генотоксична активност паладијум(II) комплекса .....	107
4.7. <i>In vitro</i> антитуморска активност паладијум(II) комплекса .....	114

5. ЗАКЉУЧАК .....	117
6. ЛИТЕРАТУРА .....	120



# 1. УВОД

## 1.1. Изазови данашњице

Према подацима Светске здравствене организације после кардиоваскуларних болести највећи узрочник смрти су различите врсте карцинома од којих највећу смртност показује канцер плућа [1]. Иза карцинома, по броју умрлих, следе вирусне инфекције, попут ХИВ-а. Такође, појава нових вируса попут COVID-19, H1N1, SARS, MERS и др. који одузимају све већи број живота на планети, указује на чињеницу да ће управо вирусне инфекције бити главни узрочник смрти у будућности [2]. Сваке године билиони евра се троше широм света на лечење ових болести, што указује на чињеницу да су истраживања у области проналаска ефикасних, са мање споредних ефеката и економичнијих лекова, неопходна у данашњем времену.

Тренутна ситуација показује да су у савременој медицини главни изазови:

- 1) резистенција микроорганизама која је постала светски проблем
- 2) употреба лекова која драматично расте, на супрот чињеници да темпо којим се откривају нови се драматично успорава
- 3) дијагностиковање све већег броја болести које захтевају проналажење нових лекова.

Процењује се да ће се број смртних случајева узрокованих резистентним микроорганизмима повећати на 10 милиона до 2050. године, премашујући број смртних случајева од карцинома [3].

Која је улога прелазних метала у овој причи? Још од давнина се једињења гвожђа користе у лечењу анемије, сребро је познато по антибактерицидном дејству, док се једињења литијума користе код различитих облика депресија. Ова слика добија нови изглед са Росенберговим открићем да једињење познато као цисплатина поседује антиканцерогено дејство [4]. Цисплатина је у данашњим медицинским протоколима хемиотерапије врло честа. Након открића цисплатине, истраживања у области примене једињења прелазних метала у медицинске сврхе су експлодирала. Поред интензивне употребе одређених једињења прелазних метала у хемиотерапији, истраживања показују да једињења прелазних метала могу да буду ефикасна и као анти-ХИВ и анти-маларични агенси, а такође показују и друга антимикуробна дејства. Може се закључити да су истраживања у области примене прелазних метала вишеструко оправдана јер су активна против болести које односе милионе људских живота широм планете сваке године.

## 1.2. Антимикробна активност

### 1.2.1. Антимикробна стратегија у ери резистенције

Микроорганизме изазваче болести називамо патогеним микроорганизмима. Квантитативна мера способности да микроорганизам изазове инфекција назива се вируленција [5]. Патогени микроорганизми се разликују у односу на непатогене због поседовања једног или више фактора вируленције. Фактори су способност микроорганизма да уђе у домаћина, да буде инвазиван, да има могућности адхеренције и колонизације, да продукује токсине, способност избегавања имунског одговора и друго [6].

Открићем првих антибиотика драматично се променио квалитет човековог живота. По први пут је било могуће ефикасно контролисати инфективне болести. Нажалост рутинска употреба антибиотика за контролу инфекција наметнула је развој резистенције у популацијама микроорганизма и њихову отпорност на антибиотике на које су били осетљиви само пар деценија уназад.

Појава резистенције микроорганизма отпорних на лекове постала је велики светски клинички проблем. Упркос чињеници да се увелико користе нови савремени антибиотици, вишеструка отпорност на лекове (eng. multiple drug resistance - MDR) остаје велики изазов савремене медицине. Сходно томе, намеће се хитна потреба за проналажењем других лекова и метода у лечењу инфекција изазваних микроорганизмима. Бионеорганска хемија развија алтернативе за борбу против микробиолошке резистенције. Бионеорганска стратегија има неколико механизма деловања:

- 1) стратегија заснована на малим комплексима метала,
- 2) модификовани макромолекули на бази метала,
- 3) наночестице метала и оксида метала,
- 4) и друге [7].

Живот у ери резистенције као последицу има да употреба сигурног, економичног и ефикасног антибиотика више готово да није могућа. Штавише, MDR инфекције су један од најозбиљнијих узрока смртности пацијената са трауматским лезијама и након операције. Дуга листа сојева отпорних на лекове укључује *Acinetobacter baumannii* и *Enterobacteriaceae*, вишеструко резистентне сојеве (сулфонамид, пенцилин и ванкомицин) *Staphylococcus aureus*, макролид отпорна *Streptococcus pyogenes*, пеницилин отпорне *Streptococcus pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*, вишеструко

резистентна *Mycobacterium tuberculosis* и неколико других [8,9,10]. Истовремено се суочавамо са повећањем отпорности на лекове за најотпорније патогене организаме (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *Enterobacter* врсте). Смртни исходи повезани са MDR-ом сваке године односе милионе живота [11]. Међутим, фармацеутска индустрија, научне институције, глобалне агенције и националне владе још увек не улажу довољно средстава за развој и производњу нове генерације антибиотика.

Потенцијалне негативне последице стављају друштво у опасност од ризика ширења тешких MDR инфекција. Штавише, епидемиолошки докази указују на све већу улогу загађења ваздуха, у ширењу резистентних микроорганизама. Загађен ваздух је смеша која се састоји од хемијских токсичних једињења, честица материја (eng. particulate matter – PM), микробиолошких загађивача и друго. Удисање високо патогених бактерија или вируса, који би могли бити транспортовани PM-ом додатни је фактор који повећава глобално опасност по животну средину [12,13].



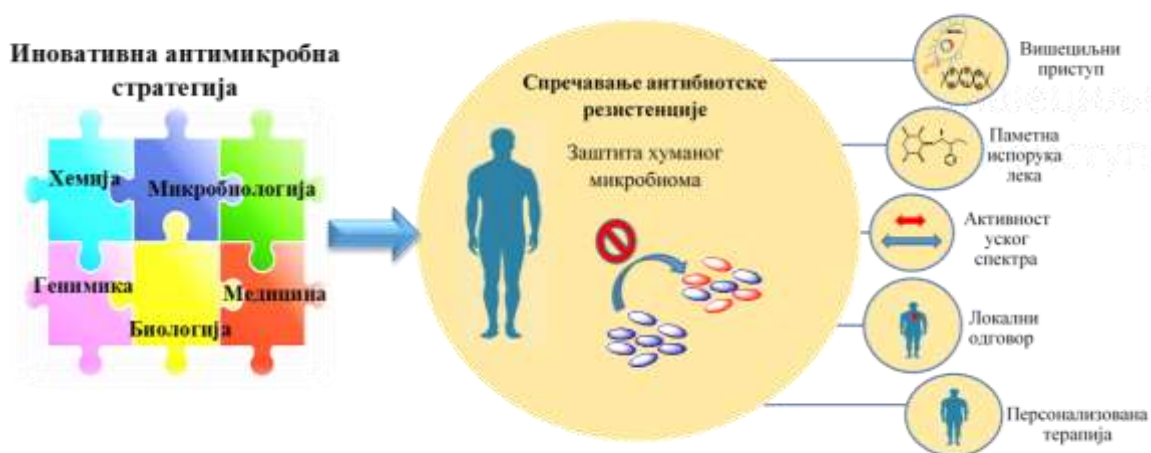
Слика 1. Развој антимикробних лекова последњих 100 година

Будућност изгледа посебно мрачно јер је развој нових антибактеријских лекова знатно успорен. Празан простор у иновацијама јавља се због потешкоћа у проналажењу алтернативних механизма деловања антибиотика. Гледано уназад, према историји открића антибиотика први антибиотици су били изоловани из ћелија микроорганизама - златно доба (Слика 1). Следи медицинско хемијска ера у којој долази до развоја синтетичких антибиотика, након чега се суочавамо са ером резистенције у којој се ми сада налазимо [11].



За антибактеријске лекове најчешћи механизми деловања заснивају се на инхибицији синтезе ћелијског зида код бактерија, нарушавању функција мембране, инхибицији синтезе нуклеинских киселина и протеина, инхибицији метаболизма фолата и тд [14,15].

У ери резистенције развој нових лекова је усмерен на дизајнирање супстанци које ће се циљано везивати у одговарајућем микроорганизму. Тај нови модел више се не задржава само на антибиотицима већ се спектар проширује на различите комбинације у проналаску најбољег лека са циљаним дејством и без резистенције (Слика 2) [16-18].



Слика 2. Стратегија развоја савремених антимикуробних лекова

### 1.2.2. Механизам дејства антимикуробних једињења и резистенција микроорганизма

Антимикуробна активност антибиотика заснована је на томе да антибиотик омета важне биохемијске процеса у микроорганизму што резултира инхибицијом раста и деобе ћелија и на крају доводи углавном до ћелијског смрти [14,15]. Микроорганизми попут бактерија или гљивица, имају механизме да се одупру дејству антибиотика и да развију резистенцију. Они могу стећи отпорност на антибиотике мутацијама у генима и њиховим хоризонталним преносом (Слика 3) [7]. Бактерије су у стању да успоставе отпорност на антибиотике кроз спонтану мутацију, али се сматра да без других механизма, попут хоризонталног, а затим и вертикалног преноса гена, тај процес би био знатно успорен [19]. Хоризонтални пренос гена је примарни механизам одговоран за ширење

резистенције на антибиотике међу бактеријама. У хоризонтални трансфер гена укључена су три основна процеса: трансформација, трансдукција и коњугација. Хоризонтални пренос гена игра важну улогу у еволуцији бактерија. ДНК улази у ћелије примаоца помоћу транспортних система ДНК повезаних са мембраном, а ти системи омогућавају улазак само једноланчане ДНК. Међутим, недавне студије су откриле и нови тип природне бактеријске трансформације у којој се дволанчана ДНК преузима у цитоплазму, чиме се допуњују постојеће методе преноса ДНК међу бактеријама. Откриће трансформације плазида која је зависна од контакта ћелије-ћелија имплицира присуство додатног/их механизма/а трансформације. Неки прегледи литературе сумирају тренутна сазнања са нагласком на недавним истраживањима у погледу потпуног разумевања механизма хоризонталног преноса гена. Та сазнања ће обезбедити основу за праћење и контролу резистенције на више лекова [20].

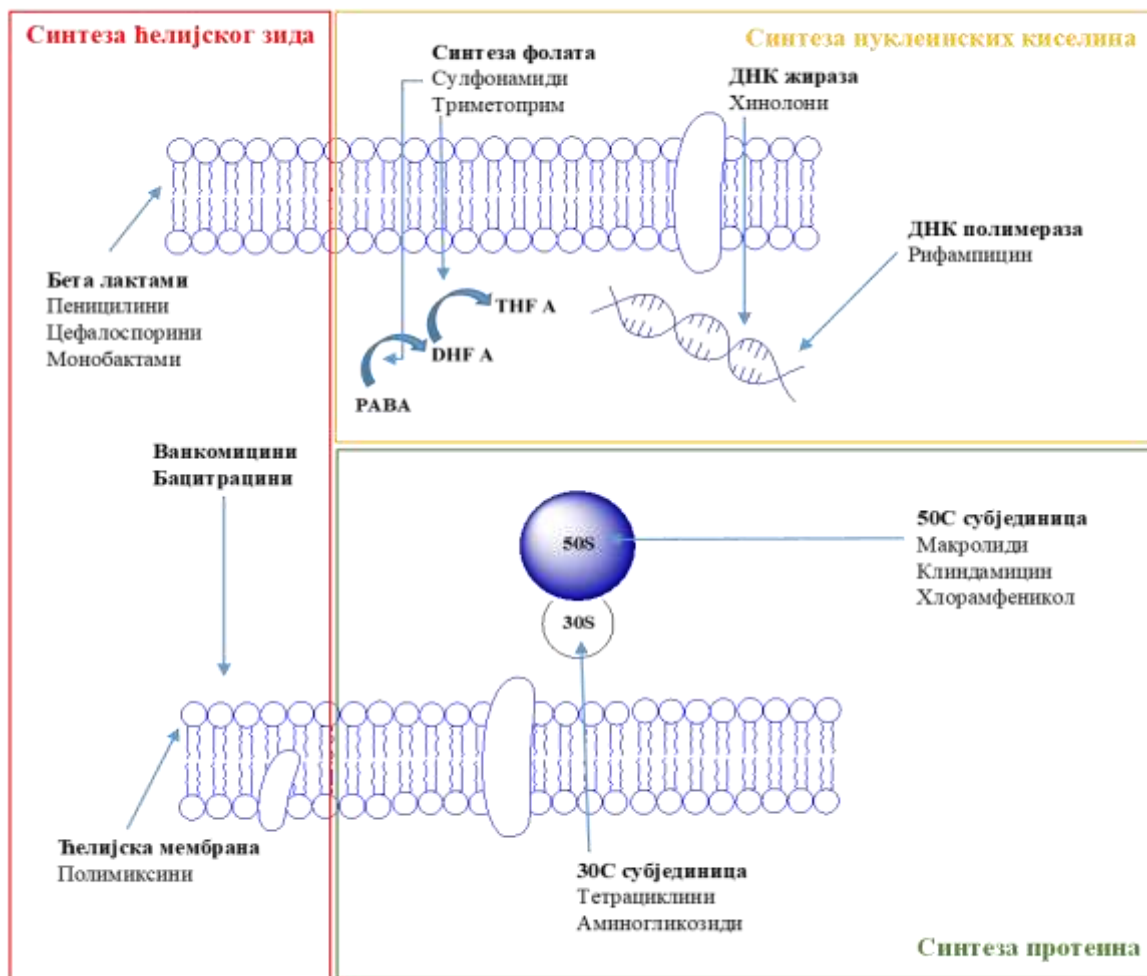
Резистенција постоји готово за све до сада развијене класе антибиотика при чему се резистенција на антибиотик развија у просеку 50 година након прве употребе [17].



Слика 3. Механизми резистенције код микроорганизама

Неки истраживачи су показали да постоји различити спектар механизма којима се ћелијски зид бактерија мења и адаптира у присуству липофилних једињења. Повећање или смањење његове хидрофилности узрокује промену пропустљивости при чему се отежава или олакшава пролазак различитих супстанци. Ако се липофилна једињења акумулирају ћелијска мембрана може да промени свој састав, а самим тим и функције. Неки од механизма за заштиту ћелије од негативних ефеката липофилних једињења на ћелијску мембрану су повећање хидрофилности *S*-слоја, промену конфигурације фосфолипида из *cis* у *trans*, или прелазак масних киселина у засићену форму при чему се врши реструктуирање фосфолипидног двослоја, активно излучивање из ћелије, код Грам-негативних бактерија промену липополисахарида у спољашњем омотачу, па затим повећање повезаности конституената ћелијског зида и др. [21].

Како антибактеријски лекови имају различита циљна места деловања, тако и бактерије дају свој одговор на њихово деловање (Слика 4).



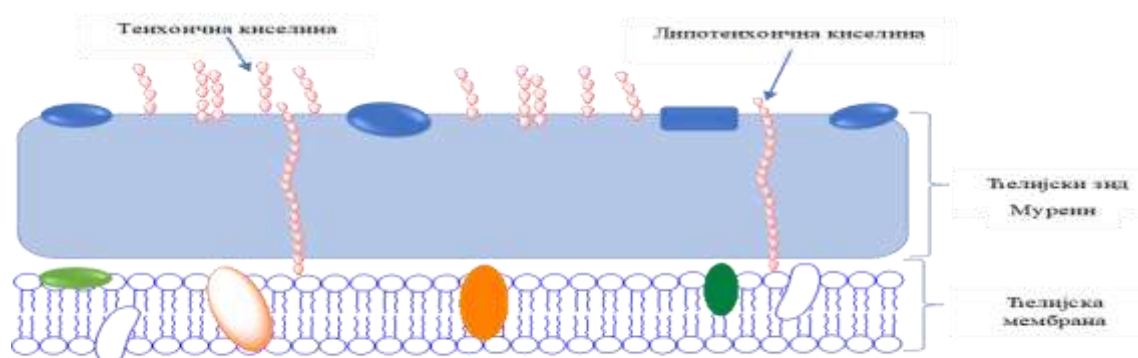
Слика 4. Механизми деловања различитих антибиотика на бактеријску ћелију

Разлог томе је и чињеница да постоји више механизма уз чију помоћ се јавља резистентност бактерија на лекове. Ти лекови могу бити и сродни, али и удаљени по хемијској структури. Неки од механизма резистенције су и детаљно разјашњени, као што је инактивација лека ензимском деструкцијом, промене у пропустљивости ћелијске мембране, мењање циљног ензима и/или метаболичког пута, мењање структуре рибозома итд [14,22].

Велики број истраживача последњих деценија ради у области антимикуробне активности различитих супстанци као и на проналажењу нових компоненти које се могу применити у борби против различитих микроорганизама и инфекција које изазивају. Међу испитиваним супстанцама које показују одређено или пак значајно антимикуробно деловање су и комплекси прелазних метала.

Микроорганизми, изазивачи инфекција, различити су по грађи својих ћелија. Рецимо, основне разлике се уочавају код гљива које имају еукариотску грађу ћелије, док су бактерије са прокариотском грађом. Због тога и механизми антимикубног деловања зависе првенствено од карактеристика циљних микроорганизама. Код бактерија зависи и од типа грађе ћелијског омотача, јер постоји суштинска разлика у дебљини пептидогликанског слоја код Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија [15].

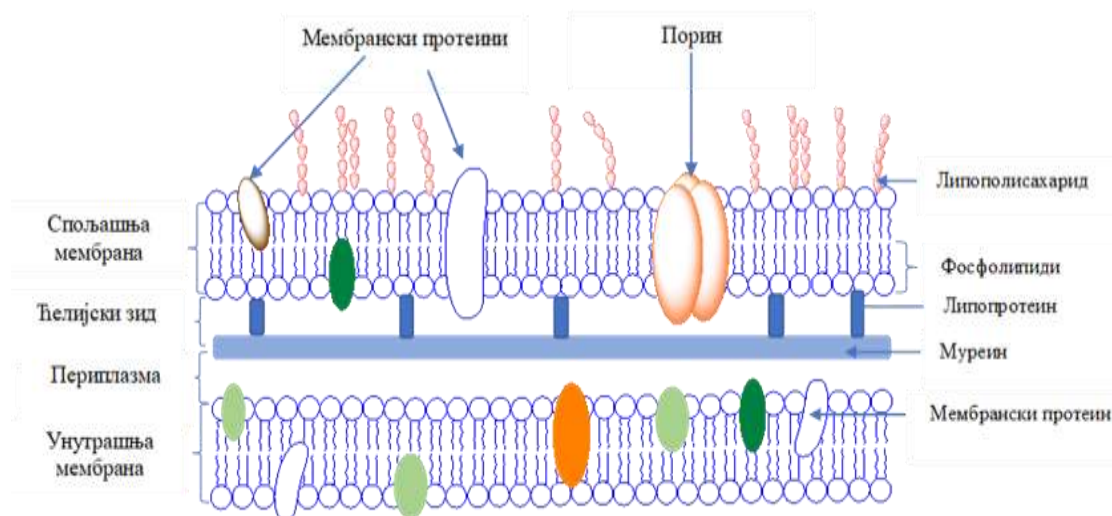
Дебели ћелијски омотач Грам-позитивних бактерија је сложена структура изграђена од пептидогликана (20-80 nm) (Слика 5). Осим овог слоја ћелијски зид Грам-позитивних бактерија изграђен је и од теихоичне киселине (полисахарид састављен од рибитол-фосфата и алкохола глицерола повезаних фосфодиестарским везама), липотеихоичне киселине, полисахарида и протеина [15]. Због присуства теихоичне киселине на површини ћелијског зида је негативно наелектрисање. Ова сложена структура ипак не представља значајну баријеру за антибактеријске лекове [23,24].



**Слика 5.** Грађа ћелијског зида Грам-позитивних бактерија

За разлику од њих, Грам-негативне бактерије имају тањи ћелијски зид који је знатно сложенији по хемијском саставу (Слика 6). Ове бактерије имају значајно тањи пептидогликански слој (7-8 nm). Осим овог слоја, оне имају и спољашњу мембрану, која се налази изнад пептидогликанског слоја, а која је изграђена од фосфолипидног двослоја, али и липопотеина и липополисахарида. Спољашња мембрана код ових бактерија има вишеструке функције. Хидрофобни молекули не могу да прођу кроз спољашњу мембрану ћелијског омотача Грам-негативних бактерија, зато што он представља баријеру за молекуле веће од 600 Da. То је један од разлога што Грам-негативне бактерије поседују већу отпорност у односу на Грам-позитивне бактерије на дејство различитих антимикубних супстанци [25]. Велики утицај на отпорност према антибактеријским лековима даје и њихово негативно наелектрисање са спољашње стране омотача. Оно спречава фагоцитозу као један од основних одбрамбених акција домаћина према

патогену. Негативно наелектрисање утиче и на деловање неких антимикуробних супстанци као што су пеницилин, детерџенти, тешки метали и одређене боје [24,26].



Слика 6. Грађа ћелијског зида Грам-негативних бактерија

Споменута циљна места где се врши утицај на бактеријске ћелије су и ћелијска мембрана и цитоплазма ћелије. Ћелијска мембрана је изграђена од фосфолипидног двослоја у коме су уроњени различити протеини. Липофилна једињења интерагују са фосфолипидним двослојем што доводи до промене у структури и функцији. Уколико се активно једињење акумулира унутар ћелије, ћелијска мембрана губи интегритет при чему се дешавају различите промене активности ензима. Антибактеријске супстанце, уколико уђу у ћелију, могу деловати, на различите процесе у ћелији. Антибактеријски лекови могу да ометају или да потпуно инхибирају репликацију, да утичу на коагулацију цитоплазматског садржаја, на акумулацију слободних радикала. Сви наведени процеси могу да изазову дисбаланс у метаболизму ћелије као и поремећај јонске хомеостазе [21].

Велики број гљива може бити изазивач инфекција и озбиљна претња по здравље. Иако неке од гљива живе у симбиози са човеком, или су присутне у његовој околини, код човека постоје различите реакције на присуство гљива. Код неких, гљиве могу да изазову алергијске реакције првенствено на њихове протеине. Људи реагују на токсине код гљива али гљиве могу да изазову и микозе - гљивичне инфекције. Раст броја тешких гљивичних инфекција бележи се од друге половине прошлог века. На ту појаву утичу бројни фактори. Неки од утицаја је повећање броја особа са смањеним стеченим имунским одговором. Стечена имунодефицијенција може бити последица употребе имуносупресива или хемиотерапеутика, али и неких вирусних инфекција. Значајан

фактор повећања гљивичних инфекција код људи је и повећана употреба антибиотика са широким спектром деловања [27].

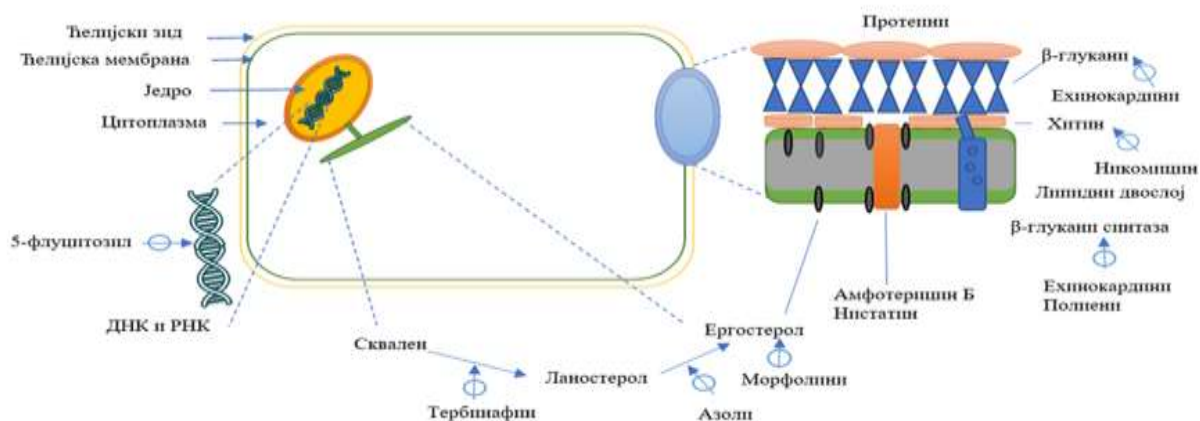
Гљиве се по грађи разликују од бактерија. Грађа ћелија гљива је знатно сложенија од бактеријских ћелија првенствено зато што су оне еукариотски организми. Неке од ових гљива су са ћелијама овалног облика, каквог су на пример квасци. У ту групу спадају родови *Rhodotorula*, *Saccharomyces* и *Candida*. Припадници ових родова су често присутни у људском организму као нормални становници нашег тела или се налазе у нашој околини и често их уносимо храном при чему они не узрокују инфекције у нашем телу. Али у условима смањеног имунског одговора нпр. при различитим инфекцијама кад смо под дејством антибактеријских лекова или других хемиотерапеутика, могу да изазову гљивичне инфекције. Такве патогене називамо опортунистичким и ту могу да се уброје и врсте квасаца из свакодневне људске употребе, као што су *Saccharomyces cerevisiae* и *C. albicans* који су нормални становници нашег тела и са другим врстама из рода *Candida* изазивају више десетина хиљада болничких инфекција годишње [28,29]. Инвазивна кандидијаза је у новије време постала четврта најчешћа инфекција у САД и Европи [30], при чему је стопа смртности код ових обољења врло висока, близу 40% [31]. Код људи је *C. albicans* најчешћи патоген међу гљивама, а често се као патогени јављају и друге врсте из рода *Candida* (*C. glabrata*, *C. parapsilosis* и *C. krusei*) [30]. Сви наведени подаци указују на потребу проналажења нових антимицотика.

Друге гљиве, као на пример представници рода *Aspergillus*, су вишећелијски организми. Њихово тело, мицелија, изграђено је од гранатих нити које се зову хифе. Иако су једноћелијске гљиве као и вишећелијске еукариоти, постоје разлике у грађи њихових ћелија. То се првенствено огледа у грађи ћелијског зида. Ћелијски зид гљива је карактеристична структура и састоји се углавном од глукана, хитина и гликопротеина. У ћелијском зиду квасаца, хитина нпр. има у нешто мањем проценту него код вишећелијских гљива. Преглед истраживања који се односи на компоненте ћелијског зида код различитих гљива као и могућ утицај антифунгалних лекова на те структуре описали су Garcia-Rubio и сарадници [32].

Механизми антифунгалног деловања су комплекснији због саме грађе ћелија гљива. Додатни проблем је што због постојања сличности ћелија гљива са хуманим и анималим ћелијама, антифунгални лекови испољавају токсично дејство. Пример за то је амфотерицин Б такозвани „златни стандард“ за лечење микоза, који се користи због високе ефикасности, упркос тешким нежељеним токсичним ефектима [33]. Овом леку биомембране су примарна мета, како у фармаколошки пожељним, тако и у токсичним споредним ефектима [34].

Компоненте ћелијског зида гљива нису присутне код људи и зато је он структура и у новије време одлична мета за антифунгалну терапију. Неки аутори су разматрали састав и синтезу, утицај компоненти ћелијског зида у интеракцији гљива – домаћин, али и улози ћелијског зида као мете за антифунгалну терапију код квасаца (*Candida*) и филаментозних гљива (*Aspergillus*) [35,36].

Сви наведени разлози указују на потребе да се ради на откривању како нових, тако и безбедних, антифунгалних агенаса. Механизми деловања антифунгалних лекова се огледају у неколико основних праваца као што су повећање пропустљивости ћелијске мембране, при чему се врши нарушавање њеног интегритета, у инхибицији синтезе ћелијског зида, инхибицији синтезе нуклеинских киселина или инхибицији ћелијске деобе митозе (Слика 7).



Слика 7. Механизми антифунгалног деловања

### 1.2.3. Развој нових антимикуробних једињења на бази једињења јона метала

Микроорганизми су, као што је наведено, развили бројне одбрамбене механизме на дејство разних антимикуробних супстанци. То је довело до пораста инфекција изазваних резистентним или мање осетљивим микроорганизмима. Такође, опортунистичке инфекције изазване гљивама *C. albicans* и *A. species* су у све већем порасту, што је навело многе научнике на проналажење нових антимикуробних агенаса који се могу ефикасно применити у борби против инфекција.

Један од најперспективнијих приступа у борби против резистенције антимикуробних једињења се заснива на дизајнирању нових лекова и терапијских

стратегија, који истовремено користе више механизма деловања. Развој нових антимикробних агенаса иде у правцу мултифункционалности што би захтевало више истовремених мутација гена у истој микробној ћелији, што је мало вероватно. Бионеорганска хемија нуди одређена решења у коришћењу једињења метала као потенцијалних антимикробних једињења, која показују активност против сојева отпорних на постојеће лекове. Комплекси метала представљају занимљиву алтернативу конвенционалним лековима. Постоји разноликост у дизајнирању нових једињења метала у борби против микоорганизама, на пример Вернерова класична комплексна једињења, затим метали координовани за био-макромолекуле, метални оксиди или кооришћење неорганских наночестица. Дизајнирање координационих једињења као потенцијалних антимикробних лекова даје широк спектар јер постоји велики број метала који би имали потенцијал, а постоји и огроман број лиганата који би могли да се комбинују са металима у проналаску идеалног лека [7].

У литератури су представљени бројни мали комплекси метала који испољавају антимикробну активност. Коришћене су углавном две стратегије, или су познати антибиотици координовани са металом, или су синтетисана потпуно нова једињења. Како су комплексна једињења углавном позитивно наелектрисана њихова предност је електростатичко везивање са негативно наелектрисаним ћелијским компонентама и молекулима. Укључивање метала у биолошке структуре са познатим антимикробним средством омогућава стварање лекова са ширим спектром активности и новим путевима деловања, који могу заобићи постојеће путеве резистенције.

Овај приступ има три главна циља:

- 1) стварање обрнутог механизма микробне резистенције
- 2) развој нових лекова са механизмом деловања непознатог патогеним бактеријама
- 3) смањење токсичности металног јона стварањем координационог комплекса [37].

У поређењу са њиховим родитељским органским једињењима, металоантибиотици обично показују појачану антимикробну активност, посебно против сојева отпорних на антибиотике. Други приступ укључује развој нових комплекса метала који може да садржи врло разнолике лиганде. Иако су једињења метала показала велики потенцијал као антимикробни агенси, њихови механизми деловања нису до краја разјашњени. Комплекси метала могу ступити у интеракцију са



различитим врстама биомакромолекула, укључујући ДНК, РНК, протеине и липиде. Са друге стране метали могу бити изразито токсични по човеков организам, при чему механизам токсичности зависи од врсте метала, као и од врсте координованог лиганда [38]. Једна од најопсежнијих студија механизма токсичности метала повезана је са њиховом редокс активношћу што доводи до оксидације протеина, липида или оксидације ДНК. Штавише, метали могу довести до структурних модификација које условљавају деформацију биомакромолекула и губљење њихове функције. Метали такође могу угрозити интегритет ћелијске мембране или довести до слабљења хемиосмотског потенцијала мембране. Комплекси метала могу довести до оштећења ДНК које доводи до ћелијске смрти. Да би се сви нежељени ефекти ефикасно превазишли, антимикуробна средства на бази метала могу комбиновати више механизма акције и синергијског деловања ради повећања њихове ефикасности против микроорганизама отпорних на лекове, а смањења негативних ефеката.

Приликом испитивања антимикуробне активности комплекса метала, треба узети у обзир следеће факторе:

- 1) природу метала
- 2) природу лиганда
- 3) хелатни ефекат (комплекси са хелатним лигандима показују повећану антимикуробну ефикасност)
- 4) нуклеарност метала у комплексу (динуклеарни комплекси су обично активнији од мононуклеарних)
- 5) укупно наелектрисање комплекса (антимикуробна ефикасност се често повећава следећим редом: анјонски < неутрални < катјонски комплекс)
- 6) природу јона у спољашњој координационој сфери [39].

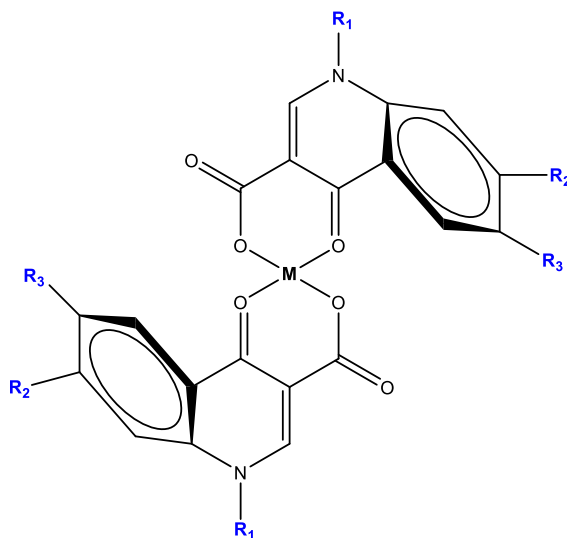
Наведени фактори су услов за добро дизајнирање комплекса метала који ће да испољи добру активност и мало споредних ефеката.

### **1.2.3.1. Метали координовани са антибиотицима**

#### **1.2.3.1.1. Комплекси метал-хинолон**

Хинолони су група синтетичких антибактеријских лекова који садрже 4-оксо-1,4-дихидроксихинолински скелет. Своју активност испољавају прекидом репликације ДНК. Хинолони инхибирају активност две есенцијалне топоизомеразе типа II, ДНК жиразе и топоизомеразе IV, ензима који су повезани са ДНК [40].

Комплексирањем хинолона са јонима метала може се постићи синергијска антимикробна активност. Структура комплекса метала са хинолоном приказана је на Слици 8.



Слика 8. Структура комплекса метала са хинолоном

Услед присуства атома кисеоника и азота у њиховој структури, хинолони се могу координовати за јон метала монодентатно или полидентатно. Они такође могу бити мостни лиганди при чему формирају полинуклеарне комплексе [41]. Последњих 10 година је публиковано више хиљада радова на ови тему, међу којима доминирају комплекси метала са 4-хинолоном. Комплекси хинолона су синтетисани са Mg(II), Ca(II), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Ag(I), Ce(III), Pd(II), Pt(II), Bi(III), Zr(IV), Au(III) [42-53]. Описани комплекси су углавном неутрални, мононуклеарни метал-хинолонски комплекси, мада су описани и динуклеарни или полимерни комплекси. Потом су испитиване интеракције између ДНК и метал-хинолонских комплекса. Високе вредности константе везивања су дали металоантибиотици, доминантан је интеркалативни начин везивања за разлику од хинолин-ДНК интеракције која је типично електростатичка [39,43,54]. Већина публикованих једињења овог типа поседује умерену антимикробну активност, сличну координованом антибиотику [41]. Неколико публикација описује комплексе Co(II), Ag(I), Ni(II), Cu(II) и Zr(IV) са антимикробном активношћу већом од слободног лиганда [39,48,52,55,56]. Комплекси Mg(II), Ni(II) и Zn(II) са гатифлоксацином (четврта генерација хинолона) показали су се одлични у отклањању проблема са метицилин резистентним сојевима неких бактерија (MRSA - Methicillin-resistant *S. aureus*) [57].

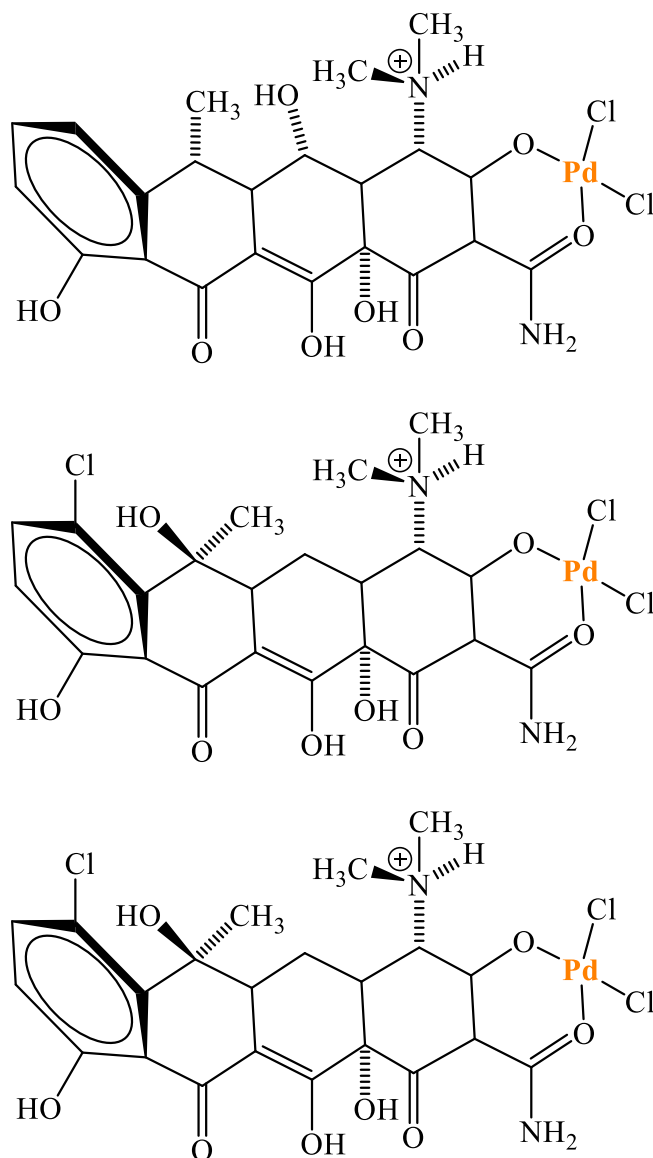
### 1.2.3.1.2. Комплекси метал-тетрациклин

Тетрациклини су група најчешће коришћених антимикуробних средстава са широким спектром деловања против и Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија. Механизам деловања испољавају кроз координацију за јоне метала у организму. Након акумулације у ћелијама тетрациклин се везује за Mg(II) јоне као бидентатни лиганд. Комплекс Mg-тетрациклин инхибира синтезу протеина везивањем за рибозоме микроорганизама и спречава додавање нових аминокиселина у пептидном ланцу [58]. Резистенција на тетрациклине је ретка и испољава се углавном кроз три механизма: појачано излучивање антибиотика, које смањује његову интрацелуларну концентрацију, синтезу протеина који штите од дејства тетрациклина или ензимском модификацијом лека [59]. Тетрациклини имају занимљиву структуру са много потенцијалних места за координацију јона метала (Слика 9).

Комплекси Pd(II) са антибиотцима из групе тетрациклина (тетрациклин, доксициклин, хлортетрациклин) су испитивани на тетрациклин осетљиве и резистентне бактеријске сојеве. Показано је да комплекс Pd(II) са тетрациклином показује 16 пута бољу антимикуробну активност на резистентни сој *Escherichia coli* HB101/pBR322 у односу на тетрациклин [60].

Антимикуробна активност Fe(III) и Co(II) комплекса са ампицилином и хлортетрациклином проучавана је против *E. coli*, *S. aureus* и *K. pneumonia* [61]. Утврђено је да су комплекси активнији од слободних лиганада. Исти аутори су предложили да се уведу метал-антибиотички комплекси јер су 50% активнији против резистентних врста од обичних антибиотика.

За тетрациклин-Pt(II) комплекс који је синтетизовао Chartone-Souza са сарадницима [60] је утврђено да је ефикасан као тетрациклин у инхибицији раста два соја *E. coli* K12RC 712 и *E. coli* ATCC 25922. Откривено је да је комплекс шест пута јачи против тетрациклин отпорних бактеријских сојева. Други Pt(II) комплекс са доксициклином је двоструко активнији од слободног антибиотика против *E. coli* [62].



Слика 9. Комплекси паладијума(II) са антибиотцима из групе тетрациклина (тетрациклин, доксициклин и хлортетрациклин)

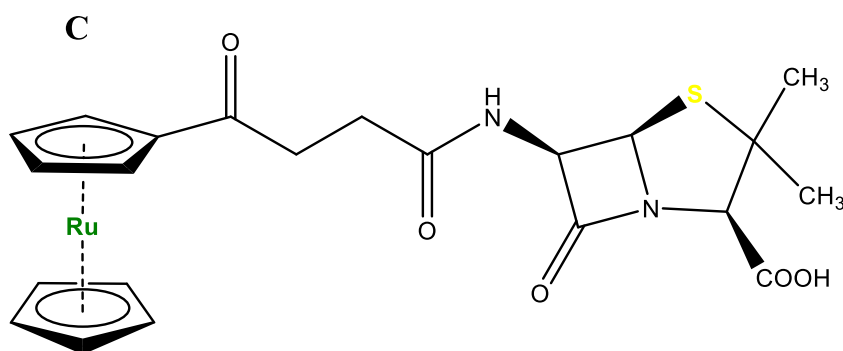
### 1.2.3.1.3. Метал-аминогликозидни комплекси

Аминогликозиди су бројна група антибиотика која укључује амикацин, гентамицин, канамицин, неомицин, нетилмицин, паромомицин, стрептомицин и др. Активност аминогликозида доводи до инхибиције синтезе протеина иреверзибилним везивањем лека на рибозоме. Резистенција на ову групу антибиотика настаје због појаве ензима који модификују аминогликозиде [59]. Модификовани аминогликозиди губе способност везивања рибозома и тиме инхибирају синтезу протеина. Додатни механизам резистенције је повезан са мутацијама рРНК [59]. Да би се превазишла резистенција, развијена је серија неомицин-Zn(II) комплекса у групи Spiccia и сарадника [63].

#### 1.2.3.1.4. Метал- $\beta$ -лактам комплекси

$\beta$ -лактам антибиотици су велика група лекова међу којима су пеницилини, цефалоспорини, карбапенеми, за које је карактеристично поседовање  $\beta$ -лактамског прстена. Активност ових једињења се испољава инхибицијом ћелијског зида. Ефикасност ових антибиотика зависи од њихове способности да доспеју и вежу се за пеницилин-везујући протеин (ПБП). Отпорност на  $\beta$ -лактаме обично настаје због хидролизе антибиотика  $\beta$ -лактамазом, модификацијом ПБП-а или због ћелијске пермеабилности [59].

Да би се превазишла резистенција антибиотика ове групе, 6-амино-пеницилинска киселина је координована у органометалнирутеноценил (Слика 10) [64].



Слика 10. Структура рутеноцен комплекса са  $\beta$ -лактамом

Антибактеријске студије новосинтетизованих комплекса показале су приметан антибактеријски ефекат против Грам-позитивних MSSA (methicillin-sensitive *S. aureus*), MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*), *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* и 12 клиничких изолата и сојева из рода *Staphylococcus*. Додавање рутеноценил дела у 6-аминопеницилинску киселину показао је много већу активност од самог антибиотика или 6-аминопеницилна киселина-фероцен деривата [60]. Такође, комплекси Cu(II), Zn(II), Cd(II), Fe(III) и Ni(II) са цефиксимом, полусинтетичким цефалоспорином, су синтетизовани [65]. Њихова антимикуробна активност против бактеријских врста *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus vulgaris* и *P. aeruginosa* као и гљива *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizoctonia bataticola* и *C. albicans*, била је већа од самог антибиотика, а код једињења Fe(III) је била најизраженија.

### 1.2.3.1.5. Метал-сулфонамидни комплекси

Сулфонамиди су широко коришћени као антимикуробна једињења. Њихова активност се заснива на инхибицији ензима дихидроптероат синтетазе код бактерија, као и инхибицији синтезе нуклеинске киселине и синтезе фолне киселине код других микроорганизама [66]. Сулфонамиди поседују слободне или супституисане аминок групе, што им омогућава везивање за јоне метала. Координацијом са металима се мења фармакологија и токсикологија сулфонамидног лиганда. Комплекси метала (Fe(III), Fe(II), Zn(II), Cd(II), Cu(II)) са сулфаметролом су синтетисани и тестирана је њихова антибактеријска и антифунгална активност [67]. Комплекси су тестирани на Грам-позитивним бактеријама *S. aureus*, *B. subtilis*, Грам-негативним бактеријама *Salmonella typhimurium* и *E. coli*, квасцу *C. albicans* и филаментозној гљиви *Aspergillus fumigatus*. Резултати су показали да комплекси метала показују обећавајуће антимикуробне активности, супериорније од коришћених референтних антибиотика хлорамфеникола, цефалотина и циклохексимида.

### 1.2.3.2. Нови комплекси метала и антимикуробна активност

#### 1.2.3.2.1. Ag комплекси

Сребро има добро познат токсични ефекат на микроорганизме [68]. Ag(I) комплекси који садрже различите лиганде (било 2,2'-бипиридин (bpy) или 1,10-фенантролин (phen) и/или тиоуреу) показују антимикуробну активност против бактерија *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *M. tuberculosis*, филаментозних гљива (*A. niger*, *Penicillium citrinum*) и квасаца (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *C. albicans*, *C. tropicalis*) [69,70]. Ag(I) комплекс са фенантролинским лигандом поседује значајне активности против Грам-негативних бактерија и плесни и умерену против квасца. Насупрот, Ag(I) комплекс са бипиридинским лигандима има знатно мању активност против тестираних бактерија и плесни а нема активност према квасцу [69]. Ово се може објаснити повећањем липофилности комплекса Ag(I)-phen. Биолошка активност ових комплекса се може приписати њиховој склоности да супституишу лиганде из своје координационе сфере биолошким макромолекулама, као што су протеини и ДНК. Сматра се да комплекси Ag(I) инхибирају раст бактерија и гљива везујући се за протеине који садрже сумпор. Њихова антимикуробна активност зависи од брзине реакције размене лиганда. Додатно, када слободни лиганд (нпр. phen) постане доступан из реакција

супституције, може деловати као хелатор за други јон метала битан за физиологију микроорганизама.

#### 1.2.3.2.2. Ru комплекси

Комплекси рутенијума су важна група комплекса метала у развоју нових антибактеријских лекова због њихове добро познате интеракције са ДНК. Проучавана је антимикробна активност серије мононуклеарних Ru(II) полипиридил комплекса на неколико различитих Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија [71]. Ови комплекси су били неактивни против Грам-негативних бактерија (*E. coli*), међутим, показали су значајну активност против Грам-позитивних бактерија *Bacillus subtilis* и *S. aureus*, укључујући и неколико *Candida* отпорних сојева. Време потребно да се убије *S. aureus* са најактивнијим Ru једињењем је било релативно брзо у поређењу са неким антибиотицима који се користе за лечење *S. aureus* инфекције. Ru(II) комплекс који садржи *N*-фенил супституисан диазафлуорен, био је активан против MRSA и није испољавао одређена токсична својства [72]. Овај комплекс имао је много јаче антибактеријско дејство од самог лиганда. Аутори су сугерисали да добра активност против MRSA може бити повезана са оштећењем ДНК које је узроковано формирањем реактивних врста кисеоника. Ru(II) једињења са фосфином/диимином/пиколином такође су 150 пута била ефикаснија у третману *M. tuberculosis* него слободни лиганди и активнији од рифампицина, са високом селективношћу и ниском цитотоксичношћу према хуманим ћелијама [73,74]. Два мононуклеарна комплекса рутенијума са лигандима дериватима фенантролина су била активна против *S. aureus* и MRSA, као и *E. coli*, *P. aeruginosa* [75]. Такође, подједнако су били активни против Грам-позитивних сојева, и имали су сличан афинитет везивања за ДНК. Ru комплекси интерагују са ДНК и протеинима. Уопштено, мононуклеарни полипиридил Ru(II) комплекси су ефикасни антимикробни агенси са МИК (минимална инхибиторна концентрација) вредношћу мањом у поређењу са тренутном коришћеним антибиотицима. Због потенцијала који имају као ови агенси и неразвијене резистенције они су обећавајућа алтернатива постојећим лековима [76]. Њихова активност се може додатно повећати након фотоактивације.

### 1.2.3.2.3. Cu комплекси

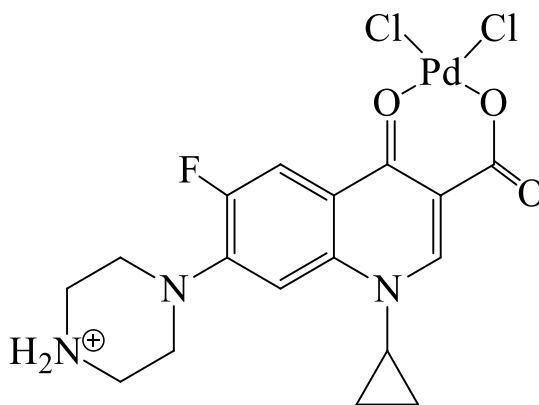
Слободни јони бакра су токсични за бројне бактерије и гљивице, тако да су бројна једињења синтетисана координацијом јона бакра са органским молекулима, како би се повећала њихова антимикуробна својства и активност. Антибактеријска активност динуклеарних Cu(II) комплекса са тиофен/фуран карбоксаимидима је велика против *E. coli* [77]. Проучавани комплекси су показали већу активност против *E. coli* од слободног лиганда. Cu(II) јодидни комплекси са 2,9- диметил-1,10-фенантролином и трис(аминометил)фосфаном:  $P(CH_2N(CH_2CH_2)_2NCH_3)_3$ ,  $P(CH_2N(CH_2CH_2)_2O)_3$  и  $P(CH_2N(CH_3)CH_2CH_2OH)_3$  показали су изузетну активност против соја *S. aureus* и диплоидне *C. albicans* [78]. Серија CuI и CuNCS комплекса са dmp и трис(аминометил)фосфином изведена из морфолина ( $P(CH_2N(CH_2CH_2)_2O)_3$ ) или тиоморфолина ( $P(CH_2N(CH_2CH_2)_2S)_3$ ) такође показују високу антимикуробну активност против обе наведене врсте микроорганизама [79]. Такође, Cu(I) комплекси са дериватима фосфина 2. и 3. генерације флуорохинолона (тј. ципрофлоксацин, норфлоксацин, левофлоксацин) интензивно су проучавани као потенцијални антимикуробни лекови. Истраживања су показала највећу активност фосфин деривата флуорохинолона, што сугерише да ово врста хемијске модификације појачава антибактеријску активност и смањује отпорност на флуорохинолоне код неколико резистентних сојева [80,81].

### 1.2.3.2.4. Pd комплекси

Велики број новосинтетисаних комплекса Pd(II) су показали значајну антибактеријску активност, као и утицај на раст и метаболизам различитих група микроорганизама.

Вирулентни сој *M. tuberculosis* показао је значајну осетљивост према комплексима Pd(II) са флуорохинолоном (Слика 11). Осим Pd(II) и други метали су показали значајну антимикуробну активност у комплексима са флуорохинолонима и другим биолошки активним молекулима. Активност тих комплекса била је увек већа у поређењу са лигандима који су коришћени за координовање [50].





Слика 11. Комплекс Pd(II) са флуорохинолоном

Неки аутори су испитивали антимикуробну активност различитих комплекса награђених између метала Ti(IV), Y(III), Ce(IV) и Pd(II) са моксифлоксацином (антибиотик из групе флуорохинолона). Резултати те судије су показали да је антимикуробна активност била највећа код Pd(II) комплекса. Активност овог комплекса је била посебно изражена према *P. aeruginosa* и била је већа и од активности лиганда, у овом случају позитивне контроле, моксифлоксацина. Да комплекс Pd(II) са моксифлоксацином има бољу антибактеријску активност него сви остали комплекси: Ti(IV), Y(III), Ce(IV) закључили су Sadeek и сарадници [82].

Други аутори су тестирали комплексе Pd(II) са стероидним тиосемикарбазонима. Тестирање је вршено на неколико бактеријских сојева, при чему се показало да ови комплекси имају већу антимикуробну инхибицију у односу на своје слободне лиганде. Најбољу антибактеријску активност према *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. pyogenes* и *S. aureus* показао је комплекс Pd(II) са цикопентил стероидним тиосемикарбазоном. Та активност је била боља од позитивне контроле, у овом случају амоксицилина [83].

Истраживања вршена на комплексима Pd(II) чији су лиганди били деривати тиосемикарбазона су показале добру антимикуробну инхибицију на бактеријама *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. flexneri* и гљиви *C. albicans* [84]. Међутим, нека истраживања показују супротан резултат. У својој студији Акбар и сарадници су истражили различите антимикуробне активности (антивирусну, антибактеријску и антифунгалну) Pd(II) комплекса са различитим азот и сумпор донорским лигандима, Шифовим базама и лековима. Резултати су показали да комплекси Pd(II) не дају значајну активност према тестираним бактеријама иако нпр. Шифове базе показују јаку антимикуробну активност у поређењу са референтним стрептомицином и нистатином [85].

Једно истраживање показало је да комплекси Pd(II) са тетрациклинима показују

мању антимикуробну активност у односу на комплексе Pd(II) са фенил супституисаним бипиридинским лигандом [86].

Антимикуробна испитивања Pd(II) комплекса са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине показују високу антифунгалну активност, при чему је активност награђеног комплекса била боља од референтног антимикутика, у овом случају флуконазола. Неке од најосетљивијих врста су *A. fumigatus*, *A. flavus* и *A. restrictus*. Раст ових гљива из рода *Aspergillus* био је успорен у опсегу концентрација 7,8 - 500  $\mu\text{g/mL}$  комплекса паладијума [87].

И други комплекси Pd(II) такође су показали значајну антифунгалну активност. Васић и сарадници су синтетисали комплексе са алкил естрима (S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-2-карбоксилне киселине. Овако награђени комплекси показују добру антигљивичну активност, такође према врстама из рода *Aspergillus*. Исти комплекси су показали умерену, ограничену и селективну антибактеријску активност према *E. coli* [88]. Према стандардном соју *P. aeruginosa* ATCC 27853 Pd(II) комплекс са *meso*-1,2-дифенил-етилендиамин-N,N'-ди-3-пропанске киселине показао је изражену антибактеријску активност (МИК=15,63  $\mu\text{g/mL}$ ) [89]. Изражену антибактеријску активност показао је и Pd(II) комплекс са 7-бромо-хинолин-8-олом [Pd(BrQ)<sub>2</sub>]. Активност на *P. mirabilis* била је чак 250 пута већа од активности позитивне контроле, тетрациклина према истој бактерији [90].

И друга истраживања показују значајну ефикасност неких комплекса Pd(II) са тиодиаминима на врстама из рода *Aspergillus*. Ова истраживања показала су да су више концентрације испитиваних комплекса показале већу антимикуробну активност [91]. Тестиране су патогене и потенцијално патогене филаментозне гљиве *A. fumigatus*, *A. flavus* и *A. niger*, а као позитивна контрола коришћен је амфотерицин Б.

Бројне студије су показале да је антимикуробна активност тестираних Pd(II) комплекса боља од њихових слободних лиганда [92-95]. Њихова већа активност може бити последица реакција које се могу објаснити Овертоновим концептом и Твидијевом теоријом хелатирања. Овертонов концепт пропустљивости ћелијске мембране, указује да липидни слој око ћелије допушта пролаз само липосолубилних материја кроз мембрану. Када се лиганд веже за метал повећа се његова липосолубилност што резултира тиме да се повећава и антимикуробна активност једињења. Поларност металног јона, услед поделе позитивног наелектрисања између металног јона и лиганда, се смањује кад се награди комплекс. Врши се повећање делокализације  $\pi$ -електрона дуж целог хелатног прстена. Све то повећава липофилност награђеног комплекса која му омогућава пролазак кроз

липидне делове ћелијске мембране. Поред тога, уједно се врши и блокирање места где се везује метал за неки од микробних ензима [96].

Када се бира одговарајући лиганд за дизајнирање новог фармакотерапеутика основно је да се добро проуче његове особине јер оне у великој мери одређују какве ће хемијске и биолошке особине да поседује наглађени комплекс. Често се дешава да лиганд карактерише слаба липофилност, при чему се лек слабије акумулира у ћелији. Слаба липофилност лиганда знатно ограничава и терапеутску примену комплекса. Као што је наведено липофилност има кључну улогу у биолошким процесима (адсорпцији, интеракцији са одговарајућим ћелијским рецепторима, транспорту кроз ћелијску мембрану). Та особина лиганда је врло битна за испољавање биолошке активности. Из тог разлога се при дизајнирању нових биолошки активних једињења врши пажљиви одабир лигандног система. Променама одређених хемијских група могу се предвидети хемијска и биолошка својства (нпр. растворљивост, липофилност, механизми деловања и резистенција) новог терапеутика [97].

#### 1.2.3.2.5. Други јони метала

Данас се развијају нови приступи коришћења метало-комплекса као антимикробних агенаса. Тако су синтетисани и испитивани галијум комплекси који активност испољавају везујући гвожђе у *P. aeruginosa* и нарушавајући на тај начин метаболизам микроорганизама [98]. Галијум комплекс има систем испоруке такозваног тројанског коња, који након уласка у организам се везује за гвожђе и омета метаболизам микроорганизама.

У другим студијама, стабилни органометални иридијум 1,2-диамински комплекси су синтетисани и њихова антибактеријска активност је била тестирана на *S. aureus* [99]. Комплекс овог метала је имао јаку активност при чему је проценат уништених ћелија *S. aureus* био 99% за неколико сати. Изванредна активност органометалних Ir (III) једињења у комбинацији са одсуством хемолитичке активности и одсуством цитотоксичности, као и без штетних токсиколошких ефеката код мишева до дозе од 5 mg/kg, чине ову серију комплекса обећавајућим решењем за хитно растући проблем резистенције на лекове.

Серија комплекса торијума са лигандима бидентатним Шифовим базама била је синтетисана и њихова антимикробна активност на бактеријама *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* и гљивама *C. tropicalis* и *A. niger* је испитивана, при чему је ефекат антибактеријског деловања био сличан референтном антибиотику амоксицилину [100].

### 1.3. Биофилм

Развој резистенције на антибиотике испољен је кроз различите механизме, а један од њих је и формирање биофилмова [101,102,103].

Способност формирања биофилма је универзална особина микроорганизама и развила се зато што пружа предност у преживљавању. Некада је важило да микроорганизми живе усамљени нпр. у планктону, али се данас биофилмови сматрају обликом живота микроорганизама који је много заступљенији. Биофилмови могу да се формирају у природном, али и у медицинском и индустријском окружењу. Биофилм се може састојати од различитих микроорганизама, као што су бактерије, гљиве, алге, протозое, али и неких материја као што су соли или муљ. Врло често када су у питању инфекције јављају се једноспецијски биофилмови [104,105].

Хроничне рецидивирајуће инфекције су врло често изазване бактеријама које формирају биофилм. Такве инфекције су последњих деценија у великом порасту. Употреба антибиотика и биоцида код таквих врста инфекција изазваних бактеријама у форми биофилма скоро и да не даје резултате. Утврђено је да ефекат антимикуробних агенаса и антибиотика на бактерије у биофилму је слаб и да бактерије показују 10 до 1000 пута већу резистенцију [101].

Costerton и сарадници 1978. године су дефинисали биофилм као структурну заједницу бактеријских ћелија везаних за неживе или живе површине и уроњене у полимерни матрикс које саме стварају [106]. Нова дефиниција је мало проширена и по њој, биофилм представља сесилну заједницу микроорганизама који су иреверзибилно везани за чврсту површину и међусобом, помоћу екстрацелуларних полисахаридних полимера коју су сами створили [107].

Формирање биофилма се врши на различитим површинама. Битно је да су те површине у контакту са течностима, нпр. површина меких ткива, биомедицински импланти, контактна сочива и тд. [108]. Формирање биофилма се дешава у неколико фаза и врло је сложен процес. Основне фазе се могу свести на четири процеса реверзибилну адхезију, иреверзибилну адхезију, матурацију и одвајање.

Реверзибилна адхезија је иницијални процес у коме се врши првобитно везивање бактеријских ћелија за контактну површину slabим интеракцијама [109]. У почетку формирања биофилма се неутралише површински напон, који одбија приближене бактерије и спречава везивање за подлогу. То се постиже кондиционирањем површине [110]. На површину се адсорбују органске и неорганске супстанце обезбеђујући повољан филм за ћелијско везивање [111]. Процесом продукције екзополисахарида који луче

прилепљени микроорганизми започиње се друга фаза у формирању која се означава као иреверзибилна адхезија. Лучење екстрацелуларне полимерне супстанце (ЕПС) олакшава везивање микроорганизама за површину. Површину везаног микроорганизма окружује ЕПС и тако спречава исушивање и обезбеђује заштиту биофилма од утицаја антибиотика, антитела, белих крвних зрнаца, биоцида, детерџената... [108,112]. Након тога започиње раст ћелија и формирање микроколонија. Ова фаза води у накнадно слепљивање ћелија и до усложњавања грађе биофилма [113]. Сазревање или матурација биофилма представља развој биофилма који је резултат адхеренције нових ћелија као и раста већ везаних ћелија. Ако су околности повољне за раст и агломерацију, биофилм се развија у организовану структуру. Последња фаза у формирању јесте одвајање бактерија. Од зрелих биофилмова врши се одвајање и ширење микроорганизама на нове области. Ослобођене ћелије могу да остану у околини и наставе живот у планктонској форми, а могу се пренети до других локација где ће отпочети формирање новог биофилма [114].

Постоје различите методе у контроли стварања биофилмова и оне укључују коришћење различитих физичких, хемијских и биолошких метода. У употреби су често хемијски агенси (оксидациона и неоксидациона средства). Хлор, озон, јод, водоник пероксид су само неки од оксидационих средстава који се често користе. Од неоксидационих често се користе ањонске и нејоногене површински активне материје, кватернарна амонијумова једињења, формалдехид [110,115].

Антибиофилм активност комплекса различитих метала, а међу њима и паладијума није често испитивана. Изузетну антибиофилм активност показали су комплекси  $\text{Cu(II)}$  против клиничког изолата MRSA. Ови тестирани комплекси  $\text{Cu(II)}$  показали су значајну активност против биофилма и били су бољи у његовом уклањању од ванкомицина, антибиотика који се тренутно користи у лечењу MRSA инфекција [116].

Испитан је и ефекат  $\text{Zn(II)}$  тиосалицилатног комплекса на биофилмове *S. aureus* MDR и одређена је његова бактерицидна активност при концентрацији од чак 0,125  $\mu\text{g/mL}$  [117].

Паладијум у облику појединачних раствора металних јона показује врло ефикасну антибиофилм активност. Његово деловање је јако против биофилмова *E. faecium*, *K. pneumoniae* и *A. baumannii* [118].

Нека истраживања су показала антибиофилм ефекте полисулфонских мембрана које су модификоване наночестицама 1,2,3-триазола и паладијума. Утврђено је да су 1,2,3-триазол и наночестице паладијума инхибирали раст *P. aeruginosa* и у аеробним и у анаеробним условима. Уочено је смањење раста бактерија заједно са смањењем количине

укупних полисахарида у матриксу биофилма код монокултурних врста као и смањење концентрације протеина и полисахарида унутар матрикса биофилма мешовитих врста [119].

Мултифункционални биолошки активни материјали са инкорпорираним наночестицама паладијума су показали високе антибиофилм перформансе и могућности у биомедицинској примени. Овако направљени материјал успешно је спречавао стварање биофилма код бактерија *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* и *K. pneumoniae* [120].

Неке од студија описале су антибиофилм и анти-QS (Quorum sensing) активност комплекса Pd(II) на бази тиазолинил-пиколинамида против *P. aeruginosa* и *Serratia marcescens*. Комплекси Pd(II) су показали анти-QS активност и вршили су инхибицију производње пиоцијанина и неких других фактора вируленције посредованих QS код ове две бактерије. На катетерима обложеним Pd(II) спречено је формирање биофилма. Ова студија показује да комплекси Pd(II) на бази тиазолинил-пиколинамида могу бити обећавајућа стратегија за борбу против уринарних инфекција при употреби катетера [121].

#### 1.4. Слободни радикали и антиоксидативна активност

Атомске, јонске или молекулске врсте које имају један или више неспарених електрона у атомској или молекулској орбитали називају се слободни радикали. Због неспарених електрона ове врсте су нестабилне а ови електрони се сматрају и узроком високе и неселективне реактивности слободних радикала.. Настају простом оксидацијом или редукцијом атома или молекула, као и хомолитичким раскидањем између атома исте, или сличне електронегативности [122].

У људском организму слободни радикали се стварају у току метаболичких процеса. У слободне радикале се убрајају реактивне кисеоничне врсте, реактивне азотне врсте и реактивне сумпорне врсте. Све оне настају и као производи великог броја нормалних ћелијских оксидативних процеса. Реактивне кисеоничне врсте су најбројније и међу њима су супероксидни ањон радикал, хидроксил радикал, хидропероксил радикал и водоник пероксид. Реактивне врсте кисеоника се формирају у митохондријама у процесу ћелијског дисања или многим ензимским и другим реакцијама [122-125].

Реактивне кисеоничне врсте (reactive oxygen species - ROS) могу настати у неутрофилима и макрофагима као продукти метал-катализоване реакција. Могу настати и као последица јонизујућег зрачења, различитих загађења околине, као резултат

физиолошких и патолошких и бројних других процеса [126,127]. ROS и биолошким системима, показују особине и токсичних и корисних једињења [128]. Учествују у развоју имунског система организма за одбрану од патогена и тако испољавају позитивно дејство [129]. Одржавање равнотеже између ова два супротна дејства ROS-а битан је аспект за функционисање ћелијских и биохемијских процеса.

Хемијске врсте које продукују реактивне врсте кисеоника индуковањем оксидативног стреса или инхибицијом антиоксидативног система одбране називају се прооксиданси [130]. Улогу прооксиданаса у биолошким системима имају углавном реактивне кисеоничне и азотне врсте. Метали са променљивом валенцом (гвожђе, бакар) испољавају директну прооксидативну активност [131]. У присуству јона гвожђа одвија се Фентонова реакција уз продукцију хидроксил радикала.

У живој ћелији најосетљивије мете за слободне радикале су ДНК, протеини и биолошке мембране. Хидроксил-радикал је једна од реактивних врста кисеоника која највише оштећује биолошке системе. Он се формира декомпозицијом водоник-пероксида, реакцијом која је кализована присуством јона гвожђа, бакра и других прелазних метала (Фентонова реакција). Хидроксил радикал реагује са молекулом ДНК, односно нуклеинским базама, и те формације су добри иницијатори оксидативног стреса у организму и потенцијални узрочници канцерогенезе [132].

Оксидативни стрес представља процес прекомерне производње слободних радикала који превазилази одбрамбене капацитете организма. Све то доводи до оштећења важних биомолекула као што су нуклеинске киселине, аминокиселине, протеина и др. Одржавањем равнотеже између настанка реактивних врста кисеоника (прооксиданаса) и деловања антиоксидативних система одбране одржава се нормално функционисање биолошких система (тзв. редокс хомеостаза). Померање равнотеже у било ком правцу може довести до оштећења ћелија али и организма у целини. Ако расте количина прооксиданаса настаје оксидативни стрес, док ако расту количине антиоксиданаса настаје редуктивни стрес [133,134].

Аеробни организми *in vivo* непрекидно стварају слободне радикале и реактивне врсте кисеоника и зато је присуство антиоксиданаса у овим организмима од виталног значаја због заштите ћелија и ткива, јер у супротном долази до великог броја обољења [135]. Антиоксиданси присутни у малим количинама у одговарајућој подлози која се лако оксидује, значајно инхибирају или потпуно спречавају оксидацију истог материјала [136]. Антиоксиданси, како природни, тако и синтетички су тема многих истраживања. Заступљено је мишљење да су једињења са оксидативним особинама одлична средства за инхибицију прекомерног настанка реактивних кисеоничних врста. Иако неке студије

доведе у питање дугорочну примену антиоксиданаса, последице његовог недовољног уноса су очигледне. Забележени су бројни примери успешног коришћења антиоксиданаса за ублажавање патолошких последица оксидативног стреса.

Антиоксиданси у биолошким системима инхибирају реакције оксидације (нпр. превентивни антиоксиданси у реакцији инхибиције грађења слободних липидних радикала), делују као редукциона средства и преводе водоник-пероксид у стабилна једињења, елиминишу дејство синглетних облика кисеоника, делују синергистички са другим антиоксидансима, делују као хелатори јона прелазних метала и као инхибитори прооксидативних ензима [136-138]. Аеробни организми су током еволуције развили сложене антиоксидативне системе заштите, а све у циљу да се супротставе токсичном деловању ROS-а. Заштитни системи се могу поделити на унутрашње (ендогене) и спољашње (егзогене). Ендогени ензими међу којима се налазе каталаза, глутатион-пероксидаза и супероксид дисмутаза, затим металопротеини и то на бази бабра и гвожђа, као и антиоксиданси који не испољавају ензимску активност нпр. коензим Q10, ретинол и уреа сви спадају у унутрашње системе заштите. Ако се једињења уносе у организам путем исхране или употребом суплемената она су представљена као антиоксиданси који спадају у егзогене системе заштите [139].

Ако се равнотежа између продукције реактивних врста и система заштите наруши тада се ремети и интегритет и функционалност ћелије, али и организма у целини. Све набројано доводи до патолошких стања као што су малигне болести, дијабетес, кардиоваскуларна обољења, неуродегенеративне болести (Вилсонова болест, Паркинсонова болест и др.), болести бубрега, јетре, итд. [140]. ROS су главни узрочници инфаркта миокарда, артеросклерозе и исхемичне деменције [141-143].

Паладијум спада у серију прелазних метала и може да учествује у редокс реакцијама. У студији коју је спровео Liu са сарадницима, утврђено је да паладијум јони не могу да замене гвожђе у Фентоновој реакцији, али да паладијумови јони повећавају стварање хидроксил радикала када се додају Фентоновом систему. Такође додавање паладијум јона Фентоновом систему узрокује повећање деградације ДНК [132].

Комплекси Pd(II) са нуклеобазама (*cis*-[PdCl<sub>2</sub>(cyt)(gua)], *cis*-[PdCl<sub>2</sub>(cyt)(ad)], *cis*-[PdCl<sub>2</sub>(ad)(gua)]) су показали значајну антиоксидативну активност. Електрон-привлачни ефекат Pd(II) јона олакшава ослобађање водоника са нуклеобаза и омогућава стабилизацију 2,2'-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) радикала [144].

Машковић и сарадници су испитујући антиоксидативну активност комплекса паладијума са бидентатним N,N'-лигандима, установили да комплекси показују исту или



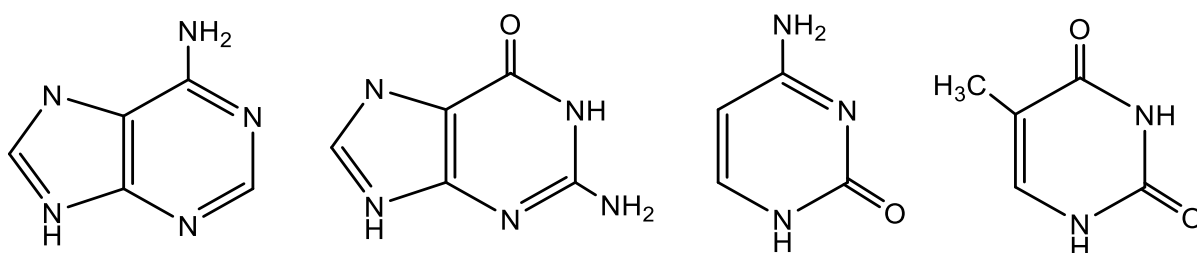
незнатно нижу антиоксидативну активност у поређењу са одговарајућим стандардима галном киселином, аскорбинском киселином и бутилованим хидрокситолуеном [145].

Комплекси Pd(II) који поседују добру антимикуробну активност, а притом показују способност неутрализације слободних радикала могли би се користити у медицинске сврхе [146].

## 1.5. Интеракције комплекса са молекулом ДНК

Бионеорганска хемија има за циљ да разјасни механизам деловања комплекса јона метала у биолошким системима. Нуклеинске киселине представљају генетски материјал ћелије и врло често су препознате као физиолошка мета за везивање лека. Из тог разлога значајно је проучавање интеракција комплексних једињења и молекула ДНК. ДНК контролише преношење кодираних генетских података, што подразумева репликацију, транскрипцију или обраду РНК и преводјење у протеине. Везивање комплекса метала за молекулу ДНК иницираће прекидање одређених функција које обавља молекулу ДНК. Комплекси метала се најчешће везују за одређена места у нуклеинским киселинама, попут атома кисеоника из фосфатних група или атома кисеоника и азота из пуринских и пиримидинских база. Због тога, дизајн и синтеза комплекса прелазних метала који интерагују са ДНК привлаче све већу пажњу због своје потенцијалне примене као метало-лекова, алата у молекуларној биологији, регулатора експресије гена [147-149].

У молекулу ДНК постоје четири различите врсте азотних база (аденин, гуанин, цитозин и тимин), које могу обезбедити координациона места за везивање са комплексима метала (Слика 12) [150].



Слика 12. Структура азотних база у молекулу ДНК

Механизам интеракције комплекса метала са ДНК молекулом може бити:

- 1) Везивање ковалентним везама - централни јон метала се директно везује за азотну базу. Овај процес се одвија у два ступња, први ступањ је хидролиза комплекса метала и формирање аква комплекса. Аква комплекс је изузетно реактиван и подлеже нуклеофилном нападу *N*-атома пуринске базе.
- 2) Интеркалацијом – волуминозни комплекси не могу да граде ковалентне везе са азотним базама, али лиганди везани за централни јон метала могу да се интеркалирају између база у молекулу ДНК јаким  $\pi$ - $\pi$  интеракцијама.
- 3) Електростатичким везивањима – фосфатни остатак молекула ДНК је негативно наелектрисан. Када позитивно наелектрисани комплекси дођу у контакт са молекулом ДНК они га привлаче електростатичким силама.

Знатан број комплекса Pd(II) је показао активност на ћелијским линијама резистентним према цисплатини, па се претпоставља да имају другачији механизам везивања за ДНК од цисплатине. Показано је да је ДНК примарна унутарћелијска мета многих потенцијалних паладијумових антиканцерогених лекова. Комплекси паладијума у интеракцији са ДНК могу оштетити малигне ћелије блокирајући њихову деобу што доводи до ћелијске смрти [151]. Паладијумски комплекси у реакцији са ДНК молекулом се везују за *N7* атом гуанина, формирајући класичне унакрсне везе између ланаца ДНК које су одговорне за оштећење ћелија.

Комплекси Pd(II) [Pd(phen)Cl<sub>2</sub>] и [Pd(bipy)Cl<sub>2</sub>] испитивани су у интеракцији са базама у молекулу ДНК. У оба случаја добијени су бинуклеарни комплекси код којих су Pd(II) јони координовани једним phen или bipy лигандом и координовани преко *N3* и *N9* атоми аденина. Ово је потврђено кристалном структуром комплекса [Pd<sub>2</sub>(phen)<sub>2</sub>(ade)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>·4.5H<sub>2</sub>O и [Pd<sub>2</sub>(bipy)<sub>2</sub>(ade)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O, као и <sup>1</sup>H NMR спектроскопијом [152].

Истраживани комплекси Pd(II) интерагују са полинуклеотидима углавном нековалентним везивањем, тачније интеркалирају се у молекул ДНК. Тако, у случају мононуклеарног комплекса Pd(II) са пиридил-диоксим лигандом је показано да се интеракција углавном одвија кроз интеркалацију [153].

Типичан „хипохромни” ефекат који је уочен код интеракције комплекса Pd(II) јона са флавоноидом-кверцетином као лигандом указује да се овај комплекс не везује за СТ-ДНК путем интеркалације, већ се веже електростатичким интеракцијама, које би могле да доведу до конформационих промена СТ-ДНК, а самим тим и променама у експресији

гена [154].

Испитивани комплекси Pd(II) са 1,10-фенантролином и бутилдитиокарбаматом показују обећавајуће резултате на основу *in vitro* испитивања цитотоксичности. Такође ови комплекси интерагују са молекулом ДНК. Комплекси Pd(II) са 2,2'- бипиридином и етилдитиокарбаматом су показали бољу цитотоксичност у односу на његов аналог Pt(II). Друге студије су указале да је начин везивања комплекса за ДНК могућ путем интеркалације планарног 2,2'- бипиридинског лиганда, при чему и водоничне везе могу учествовати у овим интеракцијама [155].

Насупрот већини паладијумових комплекса који се везују за ДНК путем интеркалације постоје и Pd(II) комплекси где је Pd везан за ДНК кординативном ковалентном везом. Јачина везивања за ДНК зависи од лабилности лиганда везаног за централни јон метала [156]. Kalaivani и сарадници су установили електростатички начин привлачења комплекса Pd(II) [157].

Katsarou и Hadjiliadis су испитивали тернарне системе Pd(II) са нуклеобазама-нуклеозидима и пептидима. Pd(II) комплекси *trans*-структуре, то јест *trans*-Cl<sub>2</sub>Pd(glyglyOH)<sub>2</sub> и *trans*-Pd(glyvalOH)<sub>2</sub>, показују селективност са додекануклеотидом [d(CGCGAATTCGCG)]<sub>2</sub>, нападајући прво G4, а затим G2 базе додекамера, као и у случају Pd(aq)<sup>2+</sup> врсте. То указује на интраланчано везивање GNG(G2G3G4)(N7-N7) Pd(II) са додекамер дуплексом [158].

## 1.6. Генотоксична активност

Због значајног повећања употребе једињења елемената платинске групе од половине прошлог века повећан је и број различитих истраживања мутагених својстава њихових комплексних једињења. Још 1996. поједини истраживачи су вршили испитивање координационих комплекса платине, паладијума и родијума применом тест система *Salmonella*/микрозом (Ames тест). У овом тесту, при излагању комплексима платине стопе спонтаних мутација су порасле за одређене факторе. Истим тестом се показало да су аналогна једињења родијума знатно мање мутагена, а да паладијум није показао мутагени ефекат [159].

Друге студије су упоређивале и процењивале генотоксични потенцијал неких соли платине и паладијума у ћелијама сисара и бактерија, коришћењем микронуклеус теста на хуманим лимфоцитима, као и бактеријског SOS хроматеста. Карбоплатина, цисплатина, трансплатина, Pt(IV) и Pt(II) изазвали су значајно повишену генотоксичност у обе врсте

теста. Поједина једињења Pt(IV), Pt(II) и Pd(II) нису биле генотоксичне ни у једном тесту [160].

У другим студијама се пратио утицај и диметилсулфоксид (DMSO) као растварача супстанци. За евалуацију генотоксичног ефекта коришћен је бактеријски SOS хроматест на *E. coli* PQ37. Применом овог теста показано је да DMSO може да мења генотоксичност неких једињења у односу на то да ли су растворени у њему или у води као растварачу. Уколико се дода 3,2% DMSO као растварач једињењу родијума или р-пропиолактона значајно ће се повећати њихова генотоксичност. Међутим, генотоксични ефекти цисплатине су се значајно смањили када је додат DMSO. Дакле, иако DMSO није у самом овом тесту генотоксичан, он може да омета одговоре теста. Показано је и да р-пропиолактон и цисплатина у комбинацији дају прекомерно адитивни синергизам у генотоксичности, као и једињење родијума и цисплатине. Једињења паладијума сама по себи нису била у овом тесту генотоксична, а нису ни повећавала генотоксичност других испитиваних једињења [161].

У другој студији су праћени токсични и генотоксични ефекти честица метала платинске групе проучавањем њиховог утицаја на две различите врсте организама (маховина и пацови). Токсични и генотоксични ефекти одређивани су проценом раста биљака, преживљавања и патологије животиња и утицаја на ДНК у оба модела. Резултати код маховине су показали значајно смањење дужине биљке и биомасе како се концентрација честица повећавала. Хистолошком и патолошком анализом животињског модела утврђене су различите промене као што су: вакуолизација, инклузија еозинофила у надбубрежним жлездама, скупљање гломерула у бубрегу и повећање беле пулпе у слезини. Код оба модела откривено је оштећење ДНК. Акумулација честица у биљним ткивима на свим нивоима била је пропорционална концентрацији [162].

Неке студије су упоређивале комплекс платине са стабилним лигандом са идентичним комплексом паладијума, у погледу њихове способности да изазову оштећење ДНК у две ћелијске линије лимфома мишева, Комет тестом. Очекивало се да ће тестиране хемикалије узроковати унакрсне везе између ланаца ДНК, зато је дужина репа „комете“ узета као мера оштећења ДНК. Откривено је да је платински комплекс био подједнако генотоксичан за обе ћелијске линије, док је паладијумски комплекс био много токсичнији само за одређене ћелијске линије које су биле дефицијентне за поправку ексцизије нуклеотида. Способност комплекса паладијума да индукује унакрсне везе између ланаца ДНК није се одразила на његову генотоксичност. Претпоставља се да комплекси Pd(II) са пиранозидима изазивају конформационе промене двоструке спирале различите од оних које изазива цисплатина [163].

Стандардне линије хуманих лимфобластоидних ТК6 ћелија коришћене су за испитивање мутагеног и генотоксичног ефекта укључујући и Комет тест. Резултати добијени за амонијум-тетрахлоропаладата(II) показују да је ово једињење генотоксично при две највеће тестиране концентрације (1000 и 2500 M). Насупрот томе, растворљивост амонијум-хексахлоропаладата(II) ограничила је његову максималну концентрацију третмана на 400 M. У оквиру опсега концентрација који је могао да се тестира, третмани са овим једињењем нису били генотоксични [164].

Ипак, Migliore и сар. су известили да је паладијум дихлорид изазвао благи, али позитиван пораст микронуклеуса у хуманим лимфоцитима периферне крви. Примећена промена није била довољна да се закључи о механизму којим ово једињење индукује микронуклеусе. Исти аутори су такође известили да паладијум дихлорид није изазвао оштећење ДНК у хуманим лимфоцитима применом Комет теста [165]. Постоје и друге студије једињења Pd(II) Комет тестом, али су ова једињења била новосинтетизовани деривати са потенцијалном антитуморском активношћу [166].

Проучавана су три нова комплекса паладијума и њихов потенцијални антитуморски ефекат и генотоксичност. Тест спроведен на туморским ћелијама и нормалним ћелијским линијама указује на значајну цитотоксичност комплекса, која је већа у туморским него у нормалним ћелијама. Смртоносне дозе су упоредиве са онима код стандардних хемиотерапеутских лекова на бази метала (карбоплатина и оксалиплатина). Један од комплекса паладијума има способност да индукује апоптозу у туморским ћелијама. Тај процес се покреће услед интеракције овог комплекса са секундарном структуром ДНК у третираним ћелијама. Тест генотоксичности показао је да је ниво оштећења ДНК изазваних са друга два једињења био значајно виши у туморским ћелијама, као и у нормалним ћелијама [167].

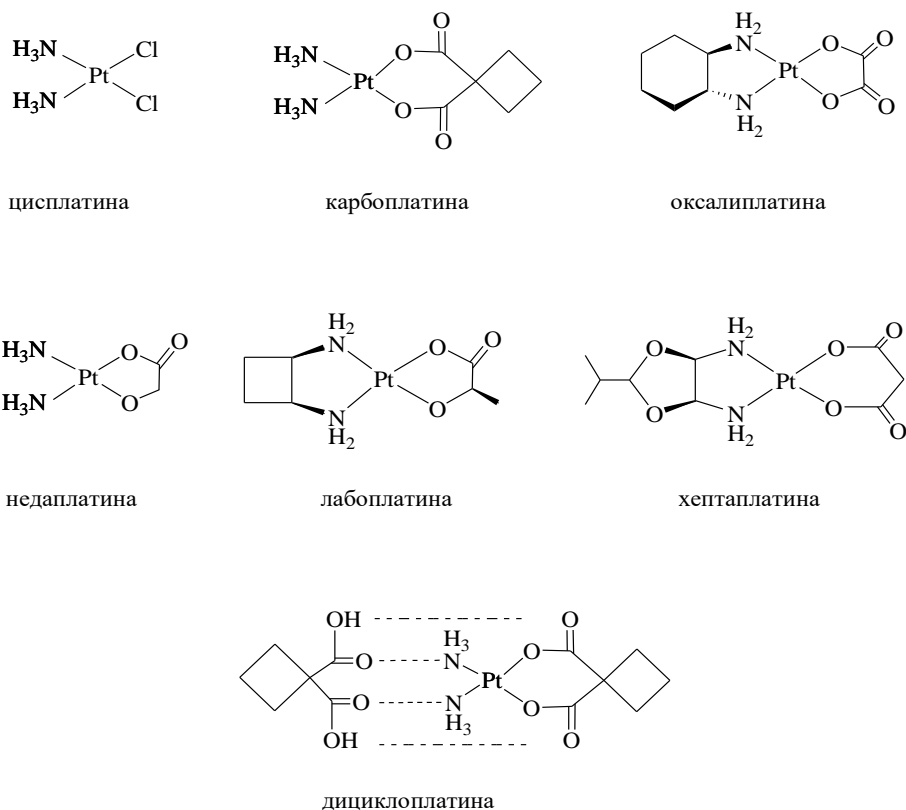
Упоредне студије о генотоксичној активности цисплатине и морфозола, првог представника нове класе катјон-анјонских комплекса паладијума, спроведене су коришћењем хуманих лимфоцита. Резултати истраживања активности унакрсног повезивања ДНК-ДНК показали су да су оба проучавана једињења показала двофазни однос доза-ефекат, при чему је морфозол изазвао 6 пута смањење процента ДНК у репу комете, док је цисплатина изазвала само 2 пута смањење. Морфозол, изазива унакрсне везе ДНК и протеина и ствара реактивне врсте кисеоника, при чему је ефикаснији од цисплатине. Механизам генотоксичног ефекта морфозола на ДНК остаје слабо истражен [168].

Испитивани су генотоксични ефекти неких комплекса Pd(II) и Pt(II) анализом степена оштећења ДНК применом Комет теста. Тест идентификује једноланчане и

дволанчане прекиде на ДНК. Комплекс Pd(II) је произвео значајан генотоксични ефекат у концентрацији 2,5 до 5  $\mu\text{M}$  са дозно зависним ефектом. Од 10  $\mu\text{M}$  генотоксични ефекат је мање изражен. Смањење оштећења ДНК са повећањем концентрације комплекса може бити последица очигледне цитотоксичности на овој ћелијској линији. Генотоксични ефекти Pd(II) су већи него код блеомицина (позитивне контроле) и комплекса Pt(II). Оба комплекса (Pd(II) и Pt(II)) нису испољила генотоксичне ефекте на нормалним фибробластима у тестираним концентрацијама (2,5 - 10  $\mu\text{M}$ ) док је цисплатина индуковала прекиде молекула ДНК у истом опсегу концентрација [169].

### **1.7. Комплекси метала и антитуморска активност**

Након открића антитуморског својства цисплатине (Слика 13) од стране Розенберга, 1965. год. долази до клиничког успеха овог једињења као лека против карцинома [170-172]. Након овог успеха, више од 4000 једињења платине је тестирано као потенцијални лекови против карцинома, што је довело до одобрења широм света за употребу два друга комплекса Pt(II) – карбоплатине и оксалиплатине (Слика 13) које је одобрила ФДА 1989. и 2002. године. Карбоплатина и оксалиплатина су „блокбастер“ лекови који доносе 128 милиона долара и 1862 милиона долара годишње од продаје (подаци из 2011. године).



**Слика 13.** Структурне формуле неких комплекса Pt(II) који се користе као антитуморски лекови

Међутим, споредни ефекти су такође пратиоци лечења карцинома комплексима Pt(II), као што су: повраћање, мучнина, крварење, опадање косе, оштећење коже, оштећење бубрега, срца, нервног система. Отуда постоји потреба да се алтернативно дизајнирају лекови против карцинома на бази метала који могу да превазиђу проблеме резистенције и нежељених ефеката [173-175].

Низ својстава која карактеришу јоне метала омогућавају примену њихових једињења у лечењу канцера, али и многих других болести, најчешће у облику комплексних једињења. Још једна од особина коју поседују је могућност комбиновања различитих оксидационих стања јона метала са разноврсним класама лиганда, што је дало многобројне могућности, у виду великог броја новосинтетизованих једињења, научницима широм света да што више истражују комплексна једињења која у последње време дају веома добре резултате у терапији канцера [176].

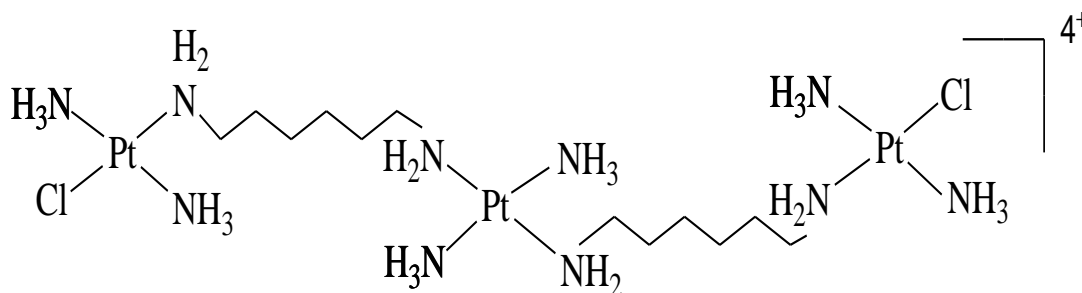
На Слици 14 су приказане одређене особине метала и лиганда које се могу користити у дизајну нових метало-комплексних једињења.



Слика 14. Особине метала и лиганда при дизајну метало-комплексних једињења

Крајем 80-тих година прошлог века, Фарел са сарадницима долази на идеју да би недостаци цисплатине могли да се превазиђу синтезом полинуклеарних комплекса Pt(II). У том циљу синтетисали су неколико комплекса у којима су два молекула трансплатине или цисплатине повезане алифатичним ланцем различите дужине [177-179].

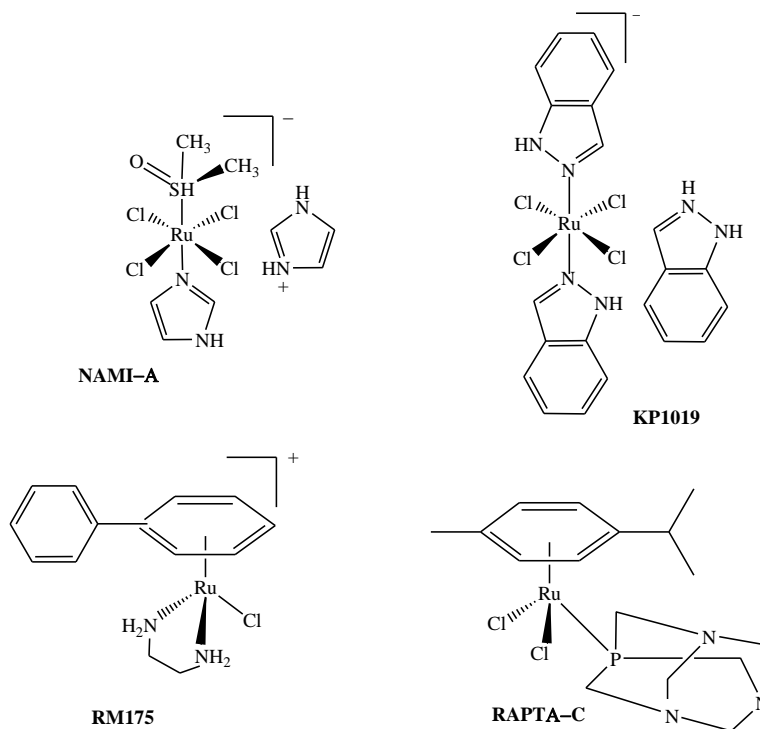
Добијени динуклеарни комплекси Pt(II) имају веће позитивно наелектрисање у односу на мононуклеарне комплексе Pt(II), што доводи до јачих електростатичких интеракција између молекула ДНК и комплекса, чиме је олакшано везивање. Флексибилност алифатичног ланца у динуклеарном комплексу, такође, омогућава боље везивање са ДНК. Међутим, само један од до сада синтетисаних полинуклеарних комплекса Pt(II), комплекс BBR3464, прошао је прву фазу клиничких испитивања, али због показане нестабилности у крви није прошао другу фазу испитивања (Слика 15) [180-183].



Слика 15. Структурна формула комплекса BBR3464



Како би се добио цитостатик са бољим карактеристикама од цисплатине, уследиле су синтезе и испитивања комплекса других јона метала. Комплекси који су, до сада, показали најбоље резултате су комплекси Ru(II/III) [184]. Alessio са својим сарадницима синтетисао комплекс означен као NAMI-A, који је прошао прву и другу фазу клиничких испитивања (Слика 16) [185].



**Слика 16.** Структурне формуле Ru(II/III) комплекса који су показали значајну антитуморску активност

Синтетисани комплекс Ru(III), са ознаком KP1019, такође је прошао прву фазу клиничких испитивања [186,187].

Поред тога, органометални арена комплекси Ru(II) показали су обећавајуће цитотоксичне карактеристике.

Цисплатина, други комплекси Pt(II), полинуклеарни комплекси Pt(II), као и већина комплекса Ru(II/III), цитотоксичност испољавају везивањем за молекулу ДНК [185,188]. Последњих година развијена је нова група комплекса јона метала који цитотоксичност испољавају везујући се за одређене протеине или ензиме, а не за ДНК [174, 185, 189]. Ови комплекси су показали неколико бољих карактеристика у поређењу са цисплатином и њој сличним комплексима. У ову групу спадају комплекси злата, Au(III).

Јон Au(III) је изоелектронски са јоном Pt(II) и гради комплексе са квадратно-планарном геометријом, па представља доброг кандидата за синтезу комплекса који би могли да покажу боље антитуморске особине од комплекса Pt(II) [190]. Комплекси Au(III)

који су аналози комплекса Pt(II) су нестабилни на светлости и лако подлежу деградацији. За комплексна једињења Au(III) карактеристично је да при физиолошким условима лако подлежу редукцији до елементарног злата.

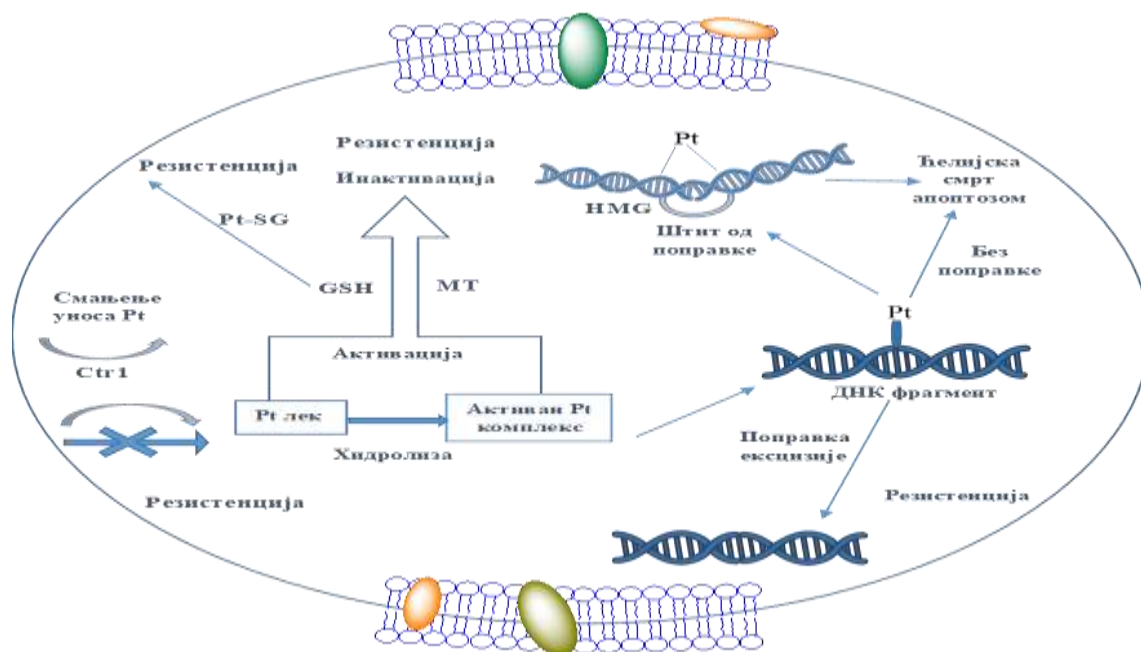
Последњих пар година интензивно се испитују комплекси Os(II), Ir(III) и Rh(III), који испољавају активност тако што се везују за специфичне протеине. Неки од ових комплекса показали су обећавајуће резултате као цитостатици [173].

Пошто је канцер водећа болест у свету по броју смртних исхода, проналажење ефикасне терапије је од кључног интереса. Постоји велика вероватноћа да лек за канцер може да буде једињење неког јона метала, тако да су истраживања у овој области сврсисходна и од великог значаја.

### 1.7.1. Резистенција на дејство антитуморских лекова

Као главни циљ лечења карцинома применом хемиотерапеутика је индукција апоптозе туморских ћелија након излагања антитуморском лековима. Цисплатина је показала добру ефикасност према различитим врстама канцера, али код већине пацијената се развила резистенција на хемиотерапију. Цисплатина индукује апоптозу, а резистенција се развија када туморске ћелије не успеју да се подвргну апоптози у правим клиничким концентрацијама лека. Одређене врсте тумора као што су тумор панкреаса, колоректални и напредни хормонски канцери простате не реагују довољно ефикасно на цисплатину [191]. Успешном лечењу карцинома се супроставља и резистенција, она може бити присутна и пре примене терапије (примарна или урођена) или се може развити приликом саме терапије (секундарна или стечена). Резистенција се развија услед геномске нестабилности канцерске ћелије, која променом генома стиче способност адаптације на присуство лека, па даљим умножавањем формира доминантну популацију резистентних ћелија. Смањена акумулација лека у ћелији, повећана репарација оштећења ДНК, цитосолна инактивација цисплатине, смањена осетљивост на апоптотски одговор и недостаци у путевима који воде у ћелијску смрт, најчешћи су механизми који доводе до појаве резистенције [191-195].

Схематски приказ дејства и механизма резистенције на платину унутар малигних ћелија (Схема 1). Упадљива карактеристика схеме је број механизма отпорности малигних ћелија према платинским комплексима. Комплексирање са сумпор лигандима као што су металотионеин или глутатион, или избацивање платине из ДНК и поправка оштећења ланца ДНК су механизми резистенције на цисплатину.

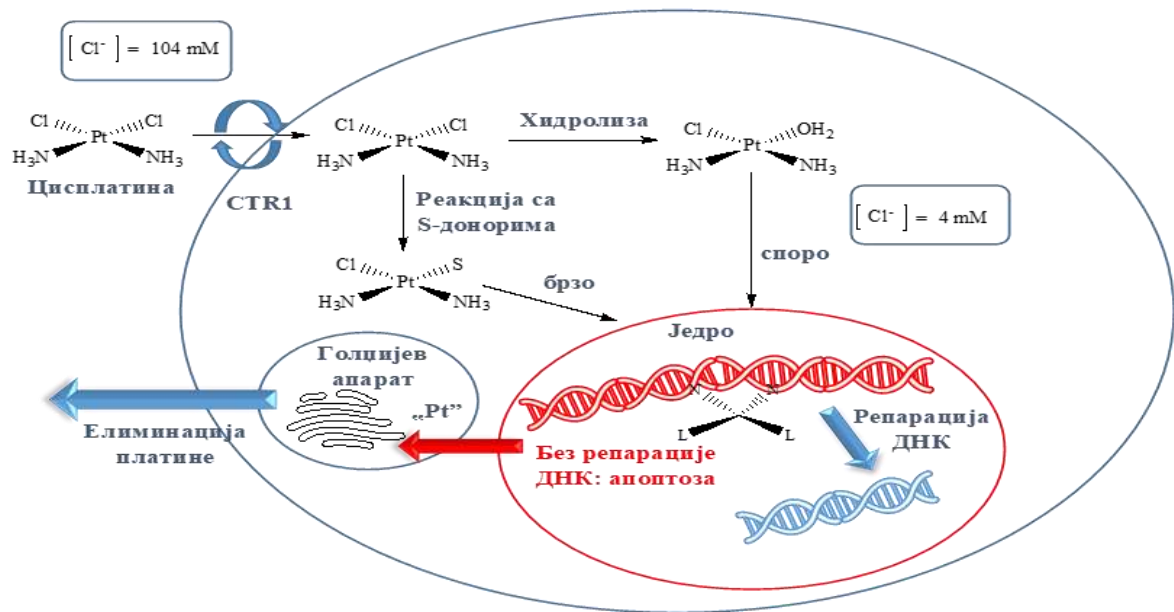


**Схема 1.** Схематски приказ унутар ћелијских процеса цисплатине укључујући механизме резистенције ћелије који могу учинити лек неефикасним

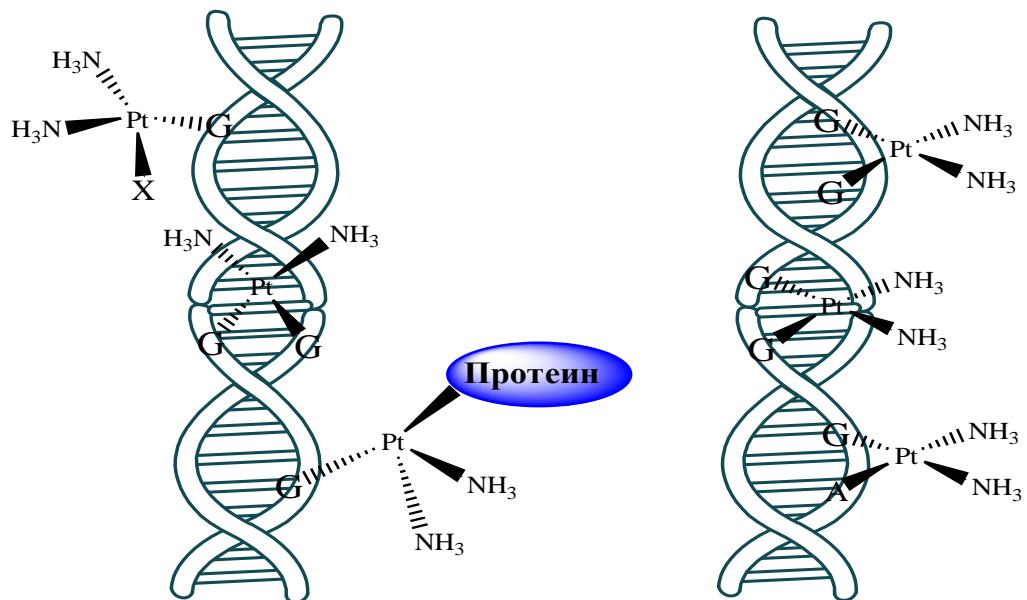
### 1.7.2. Механизам антитуморског деловања

Цисплатина антитуморско дејство испољава везујући се за ДНК молекулу и спречавајући његову репликацију (Слика 17) [192, 196- 200]. Када комплекс платине уђе у ћелију у којој је ниска концентрација хлоридних јона, долази до хидролизе, односно супституције једног хлоридног лиганда молекулом воде. Настали комплекс подлеже даљој супституцији у којој долази до замене молекула воде атомом азота из пуринских или пиримидинских база ДНК хеликса. Установљено је да се цисплатина ковалентно везује за атом азота на положају 7. пуринских база, градећи монофункционалне адукте, интер- и интраланчане унакрсне везе између ДНК (Слика 18) [201,202]. Најчешћи тип ДНК оштећења су интраланчане унакрсне везе (тзв. crosslinkers), док су оштећења ДНК праћена одмотавањем ДНК хеликса, као и савијањем и прекидањем ДНК ланаца [202].

Примарни ДНК адукти створени интраланчаним унакрсним везивањем одговорни су за активацију апоптозе. Siddik дефинише апоптозу као серију програмиране ћелијске смрти која може настати услед стварања ДНК адуката [203].



Слика 17. Различити начини координовања комплекса цисплатине за молекул ДНК



Слика 18. Могући начини координације компекса цисплатине са молекулом ДНК

Апоптоза представља активан, уређен и генски регулисан процес који доводе до смрти ћелије без ослобађања ћелијског садржаја у околна ткива, па самим тим спречава стварање запаљенског одговора организма. Ћелије које су у процесу програмиране ћелијске смрти пролазе кроз низ значајних морфолошких промена. Ћелије губе запремину, цитоплазма постаје гушћа, а органеле постају густо распоређене. Смежуравање ћелије последица је разарања ламинина и актинских филамената цитоскелета. Апоптотске ћелије се услед тих промена цитоскелета заокругљују. У исто време разара се ћелијски матрикс, фрагментише се једро и распарчава молекул ДНК. Следи бубрење ћелијске мембране и одвајање делова ћелије у апоптотска телашца. Телашца садрже цитоплазму и густо спаковане органеле, као и фрагменте једра. Излагање фосфатидил-серина на спољашњој површини ћелијске мембране представља рани догађај у процесу и служи као „поједи ме“ сигнал за околне фагоците, који га препознају рецепторима за обрасце оштећења. Околне ћелије и ткивни макрофаги препознају овакве ћелије, фагоцитују их и на безбедан начин уклањају [204-207].

За разлику од апоптозе, некроза је непожељан, пасиван тип ћелијске смрти који се испољава у нефизиолошким условима, односно при екстремним варијацијама физиолошких услова. Представља неконтролисани процес који настаје након већег оштећења ћелије изазваног различитим физичко-хемијским агенсима који оштећују ћелијску мембрану доводећи до њене руптуре. Некроза започиње бубрењем органела и читаве ћелије, при чему долази до деструкције ћелијских структура и губитка интегритета ћелијске мембране која је праћена ослобађањем цитоплазматског садржаја са лизозомским ензимима у околно ткиво и покретањем запаљенске реакције [204,205,208].

### 1.7.3. Комплекси паладијума као антитуморски агенси

Енглески хемичар Вилиам Х. Воластон (William H. Wollaston) је радом посвећеним процесима пречишћавања платине дошао до открића паладијума (1803. година). Он је 1805. године говорио о особинама новог метала и могућностима изоловања паладијума из сирове платине. Паладијум је добио име у част астероида који је тада откривен, Палас (Pallas) [209].

Паладијум припада платинској групи метала тј. другој серији прелазних метала. Најчешће се јавља у својим једињењима у оксидационом стању +2. Pd(II) је мека Луисове (Lewis) киселине и има тенденцију да формира јаче везе са азот или сумпор донорским

лигандима (меке Луисове базе), него са кисеоником као доносним атомом (тврда Луисова база).

У природи га има јако мало, најчешће у комбинацији са другим елементима из платинске групе. Примењује се најчешће као катализатор у аутомобилској индустрији, у петрохемији за реакције хидрогенизације/деhidрогенизације, као и за краковање нафте. Примену налази у стоматологији (за прављење круница и мостова за зубе), за израду накита (нпр. белог злата који је легура злата обезбојена додатком паладијума), израду сатова, хируршких инструмената и за израду електричних контаката.

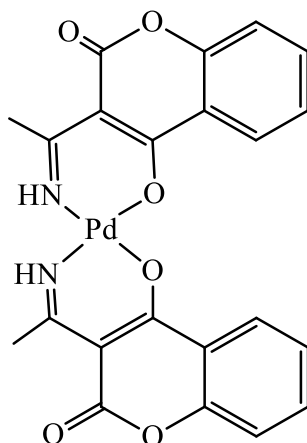
Као прелазни метал паладијум гради комплексна једињења. Комплексе са оксидационим стањем +4 ретко гради и нестабилни су.  $d^8$  електронска конфигурација углавном даје једињења са оксидационим стањем +2, које је изоелектронско са Pt(II) јоном, због чега ова два јона имају јако сличне хемијске особине. Комплекси Pd(II) јона су квадратно-планарне структуре ( $dsp^2$  хибридизација) и дијамагнетични су. За комплексе Pd(II) је карактеристично да су термодинамички и кинетички лабилнији од аналогних комплекса Pt(II). Реакције хидролизе и измене лиганата се код комплекса Pd(II) одигравају чак  $10^5$  пута брже него одговарајући комплекси Pt(II), што овим комплексима даје мању перспективу за антитуморску активност а самим тим и већу токсичност [199,210,211].

Због своје лабилности комплекси Pd(II) имају ограничену употребу у медицини, међутим ови комплекси су последњих година интензивно проучавани. Велика реактивност комплекса Pd(II) углавном условљава нижу антитуморску активност од цисплатине [199,210]. Ограничена антитуморска активност ових комплекса последица је брзе хидролизе и процеса који доводе до дисоцијације и формирања веома реактивних врста, па комплекси немају могућност да непромењени достигну своје фармаколошке мете. Управо, стварањем великог броја врста након уласка комплекса паладијума у организам, омогућено је везивање тих врста са другим биомолекулима присутним у организму, чиме је повећан ризик од неповољних ефеката на биохемијске процесе у ћелији.

Да би се смањила реактивност паладијумовог јона он се координује са различитим хелатним лигандима, што има за циљ стабилизацију металног јона [212]. У зависности који лиганд се искористи за координацију са паладијум јоном може се мењати антитуморска активност комплекса, односно успех лека [213,214]. Лиганд мора да испуни неке одређене карактеристике тј. не треба да буде изразито лабилан како би лек задржао своју фармаколошку активност до места деловања.

Данас се једињења паладијума у медицини користе у лечењу брзорастућег канцера простате и то користећи радиоактивни изотоп  $^{103}\text{Pd}$  [215,216].

Поједини комплекси Pd(II) показују антитуморску активност једнаку са цисплатином или карбоплатином. Већу антитуморску активност, и до 7800 пута, испољавали су испитивани кумарински комплекси Pd(II) (Слика 19) у односу на карбоплатину на ћелијама A549, HeLa и K562 [217,218]. Овим се потврђује да употреба волуминозних лиганата утиче на стабилност паладијум јона што условљава бољу цитотоксичност тих комплекса.



Слика 19. Дериват Pd(II) са кумарином

Комплекси Pd(II) са неутралним *N*-донорским лигандима, као што су деривати пиридина [219,220] деривати пиразола [221] анилина, амина,  $\alpha$ -диимина, лиганата природних производа [222], као и 1,10-фенантролина [175,223] интензивно су испитивани и показали су активност сличну активности платинских комплекса. Антитуморску активност ових комплекса додатно побољшава и стварање водоничних веза због присутних амино-група, што омогућава јачу интеракцију металног јона са фрагментима нуклеинских киселина који садрже *N*-донорске лиганде.

## 2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ

### 2.1. Главни циљ истраживања

Синтеза и испитивање потенцијалне антимикуробне, антибиофилм и антиоксидативне активности, интеракције са молекулом СТ-ДНК и албумином, генотоксичне и цитотоксичне активности комплекса Pd(II) и њихових одговарајућих лиганата.

Тестирани комплекса Pd(II) су:

1. [Pd(terpy)Cl]Cl - терпиридинхлоридопаладијум(II)-хлорид
2. [Pd(en)Cl<sub>2</sub>] - етилендиаминдихлоридопаладијум(II)
3. [Pd(ImCH<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub>]-*(N-(1,3-диизопропил-4,5-диметилимидазол-2-илидин)-N',N''-диметилетилендиамин)дихлоридопаладијум(II)*
4. [Pd(dach)Cl<sub>2</sub>] - 1,2-диаминоциклохександихлоридопаладијум(II)
5. [Pd(L5)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (L5 = 5-(фенилселанилметил)-дихидрофуран-2(3H)-он)
6. [Pd(L6)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (L6 = 2-метил-5-(фенилселанилметил)-тетрахидрофуран)
7. [Pd(L7)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (L7 = 2,2-диметил-3-(фенилселанилметил)-тетрахидро-2H-пиран)

### 2.2. Посебни циљеви истраживања

1. Одређивање минималне инхибиторне (МИК) и минималне бактерицидне (МБК) односно фунгицидне концентрације (МФК) испитиваних комплекса и њихових лиганата.
2. Одређивање биофилм инхибиторне концентрације (БИК) оних комплекса и/или лиганата који показују одређен степен антимикуробне активности.
3. Одређивање антиоксидативне активности испитиваних комплекса и лиганата одређивањем IC<sub>50</sub>.
4. Испитивање интеракције изучаваних комплекса са СТ-ДНК и утврђивање стабилности награђеног производа.
5. Испитивање интеракције изучаваних комплекса са говеђим серум албумином, утврђивање стабилности награђеног производа.



6. Испитивање генотоксичне активности Pd(II) комплекса у култивисаним хуманим лимфоцитима коришћењем Комет теста.
7. Испитивање цитотоксичне активности Pd(II) комплекса на линији малигнух ћелија НСТ-116 одређивањем IC50 вредности.

### 2.3. Хипотезе

1. Комплекси Pd(II) показује исту или већу антимицробну активност у односу на лиганде и позитивне контроле (антибиотике).
2. Комплекси Pd(II) који имају добру антимицробну активност имаће добру и антибиофилм активност.
3. Комплекси Pd(II) имају значајну антиоксидативну активност, која је већа од одговарајућег лиганда и од позитивне контроле.
4. Комплекси Pd(II) интерагују са молекулом СТ-ДНК, при чему граде стабилне производе.
5. Комплекси Pd(II) интерагују са молекулом албумина, при чему граде стабилне производе.
6. Комплекси Pd(II) показују већи генотоксични ефекат у односу на негативну контролу.
7. Комплекси Pd(II) показују бољу цитотоксичну активност према НСТ-116 ћелијама у поређењу са лигандима.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. Реагенси и раствори

Дихлорометан, пиридин, фенилселенил-хлорид, хлороводонична киселина (HCl), натријум-хидрогенкарбонат ( $\text{NaHCO}_3$ ), натријум-сулфат ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), метанол, етанол, паладијум(II)-хлорид ( $\text{PdCl}_2$ ), натријум-хидроксид (NaOH), тетраhydroфуран (THF), *n*-хексан, деутерисани хлороформ ( $\text{CDCl}_3$ ), деутерисани диметилсулфоксид ( $\text{DMSO-}d_6$ ), СТ-ДНК (ДНК изолована из тимуса говечета), фосфатни пуфер (PBS), етидијум бромид (ЕБ), говеђи серум албумин (BSA) набављени су од Fluka, Merck или Sigma-Aldrich,  $\text{PdCl}_2$  (Strem Chemicals) и коришћени су без предходног пречишћавања.

За припрему раствора коришћена је бидестилована вода.

Хемикалије корићене за антимикробна, антибиофилм и антиоксидативна испитивања су:

- ✓ Етанол, Метанол, Ацетон, Глацијална сирћетна киселина, Натријум хлорид (Зорка фарм, Шабац) – растварање, дезинфекција, фиксирање микроорганизама;
- ✓ Кристал виолет (Acros, Београд), Ресазурин (Alfa Aesar GmbH & Co., KG, Karlsruhe, Germany) - индикатори раста бактерија;
- ✓ Антибиотици тетрациклин, доксициклин (Галеника А.Д., Београд), цефтриаксон (Галеника А.Д., Београд) и ванкомицин (Лек фармацевтска дружба, Д.Д. Словенија), флуконазол (Pfizer Inc., USA), кетоконазол (Хемофарм А.Д.) и амфотерицин Б (Chiesi Pharmaceuticals GmbH, Austria) – позитивне контроле;
- ✓ Диметилсулфоксид (DMSO) (Centrohem, Stara Pazova) – растварач, негативна контрола;
- ✓ 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA) – реагенс за одређивање антиоксидативне активности;
- ✓ Аскорбинска киселина (Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA) – позитивна контрола;
- ✓ Амонијум-сулфат, калијум-дихидрогенфосфат, магнезијум сулфат, натријум-дихидрогенцитрат (Centrohem, Stara Pazova) – за прављење пуфера.

Физиолошки раствор коришћен у овом раду направљен је растварањем 8,5 g натријум хлорид ( $\text{NaCl}$ ) у 1000 mL дестиловане воде.

За потребе истраживања коришћене су дехидратисане подлоге (Торлак, Београд, Србија и Merck GmbH, Darmstadt, Germany). Подлоге су растваране у дестилованој води

(dH<sub>2</sub>O), према инструкцијама произвођача. Одређивање рН подлога и њихова стерилизација вршена је по упутству произвођача. Коришћене су следеће подлоге:

- Хранљиви агар (ХА), (Торлак, Београд) –култивација микроорганизама (пептон 15 g, месни екстракт 3 g, натријум хлорид (NaCl) 5 g, дикалијум хидроген фосфат (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,3 g, агар 18 g).
- Сабоурауд декстрозни агар (СДА), (Торлак, Београд) – за изоловање и култивацију гљива. (Декстроза 40 g, Пептон Торлак 10 g, Агар 20 g).
- Сабоурауд декстрозни бујон (СДБ), (Торлак, Београд) – неселективна подлога за изоловање, култивацију и тестирање гљива (Декстроза 20 g, Казеин пептон 5 g, Пептонски хидролизат животињског ткива 5 g). Ниска рН вредност (приближно 5,6) погодна за раст гљивица, посебно дерматофита и незнатно инхибиторна за контаминирајуће бактерије у клиничким узорцима.
- Милер-Хинтон бујон (МХ), (Торлак, Београд) - стандардизована подлога (Месни екстракт 2 g, Казеин хидролизат 17,5 g, скроб 5 g). Прописана од стране Националног комитета за клиничке лабораторијске стандарде Америке. Користи се за тестирање антибактеријске активности најчешће антибиотика, пошто обезбеђује оптималне услове за већину брзо растућих аеробних и факултативно анаеробних бактерија.

Хемикалије коришћене за генотоксичну активност:

- ✓ Агароза нормалне тачке топљења – (Agarose nma, Sigma).
- ✓ Агароза ниске тачке топљења – (Agarose low AppliChem).
- ✓ Етидијум бромид– (Ethidium bromid,e Serva).
- ✓ RPMI медијум – (RPMI medium 500ml, Gibco).
- ✓ Хистопак – (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich).
- ✓ EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) – (EDTA, 200g, CENTROHEM).
- ✓ TRITON X – (TRITON X-100, Fisher BioReagents).
- ✓ TRIS Base – (TRIS BASE, Fisher BioReagents).
- ✓ Диметилсулфоксид – (DMSO, CENTROHEM).
- ✓ NaOH; NaCl; TRIS HCL; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; KCl; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O.

### 3.2. Поступак синтезе лиганата

Лиганди **L1** – 2,2',6',2''-терпиридин (terpy), **L2** – етилендиамин (en) и **L3** – *trans*-1,2-диаминоциклохексан (dach) набављени су од Fluka, AcrosOrganics или Sigma-Aldrich и коришћени су без предходног пречишћавања.

Лиганд **L4** – (*N*-(1,3-диизопропил-4,5-диметилимидазолин-2-илидин)-*N*',*N*'--диметилетилендиамин (DMEAIm<sup>iPr</sup>) је синтетисан по раније публикованом поступку [224].

Лиганди **L5**, **L6** и **L7** (**L5** = 5-(фенилселенилметил)-дихидрофуран-2(3H)-он), **L6** = 2-метил-5-(фенилселенилметил)-тетрахидрофуран и **L7** = 2,2-диметил-3-(фенилселенилметил)-тетрахидро-2H-пиран) синтетисани су по претходно публикованом поступку [225]. У раствор 4-пентенске киселине, хекс-5-ен-2-ола или 5-метил-4-хексен-1-ол (1 mmol, 0,1 g) у 5 mL сувог дихлорометана, додата је еквимоларна количина пиридина (0,079 g). Затим је чврст PhSeCl (1,1 mmol, 0,212g) додат у реакциону смешу, и реакција је текла уз мешање на собној температури до растварања PhSeCl (за **L5** 30 минута, **L6** је добијен тренутно). Реакција је праћена TLC хроматографијом и визуалном дисколорацијом (од наранџасте или до бледо жуте). Добијени раствор је испран са 2M HCl, засићен воденим раствором NaHCO<sub>3</sub>. Након сушења преко Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, органски слој је концентрован и пречишћен од трагова дифенил диселенида хроматографијом на силика гел колони.

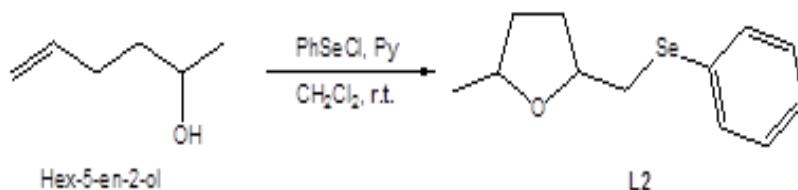


Схема 2. Схематски приказ синтезе лиганата

Добијени лиганди су окарактерисани стандардним аналитичким методама (UV-Vis, IR и NMR), добијени подаци се слажу са литературним [225].

### 3.3. Поступак синтезе комплекса

Комплекси Pd(II) јона **C1–C4** са горе поменутих лигандама **L1–L4** синтетисани су модификацијом претходно описаних метода [224, 226–228].

Комплекси  $[\text{Pd}(\text{terpy})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (**C1**),  $[\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}_2]$  (**C2**) и  $[\text{Pd}(\text{dach})\text{Cl}_2]$  (**C3**) добијени су додавањем кап-по-кап раствора лиганда: terpy (0,653 g; 2,8 mmol у 10 mL метанола) или en (0,168 g; 2,8 mmol у 10 mL метанола) или dach (2,8 mmol у 10 mL метанола), у врућ раствор  $[\text{PdCl}_4]^{2-}$ . Раствор  $[\text{PdCl}_4]^{2-}$  добијен је претходно рефлуковањем PdCl<sub>2</sub> (0,5 g, 2,8 mmol) у смеши 10 mL H<sub>2</sub>O и 3 mL концентроване HCl, након чега је бистар раствор процеђен. рН раствора је пажљиво подешена између 4,5–5,0 додатком NaOH. Добијени жути раствор је мешан неколико сати на 50 °C. Добијени раствор је остављен на собној температури до појаве чврсте жуте супстанце [226–228].

Комплекс  $[\text{Pd}(\text{DMEAIm}^{\text{iPr}})\text{Cl}_2]$  (**C4**) добијен је додавањем дихлоро[(1,2,5,6-η)-1,5-циклооктадиен]паладијума  $[\text{Pd}(\text{COD})\text{Cl}_2]$  (0,100 g, 0,338 mmol) у раствор лиганда DMEAIm<sup>iPr</sup> у 12 mL THF, при чему је реакциона смеша остављена да се меша преко ноћи на 40 °C. Добијени црвени талог је процеђен и осушен у вакуму. Производ је сакупљен као чврста бордо супстанца. Црвени кристали добијени су из смеше CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/n-хексан [224].

Комплекси  $[\text{Pd}(\text{L5})_2\text{Cl}_2]$  и  $[\text{Pd}(\text{L6})_2\text{Cl}_2]$  (**C5** и **C6**) добијени су растварањем одговарајућих лиганда **L5** и **L6** (0,3 mmol, 0,077 g) у 10 mL смеше растварача EtOH/MeOH (4:1) и брзим мешањем након додатка PdCl<sub>2</sub> (0,33 mmol, 0,058 g) у вишку. Смеша је мешана на 40 °C, 4 дана за комплекс **C5** и 5h за комплекс **C6**. Након комплексирања, боја се променила из тамно браон до жуте (комплекс **C5**) и тамно црвене (комплекс **C6**). Након филтрације, раствор је концентрован спорим испаравањем, а добијена чврста супстанца је осушена на ваздуху и рекристалисана из етанола [229].

Комплекс  $[\text{Pd}(\text{L7})_2\text{Cl}_2]$  **C7** добијен је додавањем вишка PdCl<sub>2</sub> (0,33 mmol, 0,058 g) у смешу лиганда **L7** (0,3 mmol, 0,081 g) и растварача EtOH/MeOH (4:1). Добијена смеша је мешана 5 h на 40 °C. Боја раствора се променила из тамно браон до тамноцрвене. Талог је филтриран, а раствор је концентрован спорим испаравањем. Добијена чврста супстанца је сакупљена, осушена на ваздуху и рекристалисана из етанола [230].

Чистоћа добијених комплекса потврђена је елементарном анализом, IR (инфрацрвена спектроскопија), UV-Vis спектрофотометријом и <sup>1</sup>H NMR спектроскопијом и у сагласности је са литературним подацима.

**Комплекс [Pd(terpy)Cl]Cl·3H<sub>2</sub>O (C1):**

Израчунато за **C1** = C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>Pd (Mr = 410,59): C, 43,88; H, 2,70; N, 10,23. Добијено: C, 43,64; H, 2,55; N, 10,20 %.

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8,29 (d, 2H), 8,18 (d, 2H), 8,09 (s, 2H), 7,97 (d, 2H), 7,48 (t, 2H), 7,27 (dd, 1H) ppm.

UV/vis [H<sub>2</sub>O; λ<sub>max</sub>, nm]: 249, 277, 326, 344 nm

Принос: 0,977 g (85 %);

**Комплекс [Pd(en)Cl<sub>2</sub>] (C2):**

Израчунато за **C2** = C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>Pd (Mr = 237,42): C, 10,12; H, 3,40; N, 11,80. Добијено: C, 9,98; H, 3,42; N, 11,12 %.

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 2,68–2,79 (m, enCH<sub>2</sub>) ppm.

Принос: 0,543 g (81,65 %);

**Комплекс [Pd(dach)Cl<sub>2</sub>] (C3):**

Израчунато за **C3** = C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>Pd (Mr = 291,51): C, 29,88; H, 6,27; N, 8,71. Добијено: C, 30,10; H, 6,18; N, 8,67 %.

<sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 1,17–1,62 (m, dachCH<sub>2</sub>), 1,76–2,08 (m, dachCH<sub>2</sub>), 2,45–2,61 (m, dachCH<sub>2</sub>).

Принос: 0,772 g (94,6%);

**Комплекс [Pd(DMEAI<sup>i</sup>Pr)Cl<sub>2</sub>] (C4):**

Израчунато за **C4** = C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>Pd (Mr = 443,75): C, 40,60; H, 6,81; N, 12,63. Добијено: C, 40,59; H, 6,78; N, 12,26.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ = 5,30 (sept, 2H, J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, CHMe<sub>2</sub>), 2,73 (t, 2H, J<sub>HH</sub> 7,3 Hz, C=NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2,35 (t, 2H, J<sub>HH</sub> 7,3 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 2,75 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,05 (s, 6H, CCH<sub>3</sub>), 1,65 (d, 6H, J<sub>HH</sub> 7,0 Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,52 (d, 6H, J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz; CDCl<sub>3</sub>): δ = 152,6 (N<sub>2</sub>C=N), 120,7 (CMe), 68,2 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 53,7 (C=NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 51,3 (N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 48,8 (CHMe<sub>2</sub>), 22,7 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 22,0 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 10,09 (CCH<sub>3</sub>) ppm.

Израчунато за (C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>Pd) C: 40,60; H: 6,81; N: 12,63. Добијено: C: 40,59; H: 6,78; N: 12,26.

**Комплекс [Pd(L5)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (C5):**

Израчунато за **C5** = C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Se<sub>2</sub>Pd (Mr = 687,67): C, 38,42; H, 3,52; O, 9,31. Добијено: C, 39,05; H, 3,22; O, 9,78;

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>; δ, ppm): 7,90 (m, 2H, Ph), 7,45 (m, 3H, Ph), 4,72–4,95 (m, 1H, CHO), 3,83–3,98 (m, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>Se), 3,32–3,45 (m, 1H, CH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>Se), 1,84–2,13 и 2,3–2,64 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta$ , ppm): 175,42, 133,49, 130,58, 130,08, 128,82, 84,35, 29,93, 28,71, 28,3.

ESI-MS:  $[\text{M}-\text{Cl}]^+$  : Израчунао: 652,9456; Нађено: 652,9457

Принос: 0,196 g, 95%

#### **Комплекс $[\text{Pd}(\text{L6})_2\text{Cl}_2]$ (C6):**

Израчунао за **C6** =  $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{O}_2\text{Se}_2\text{Pd}$  ( $M_r = 687,76$ ): C, 41,91; H, 4,69; O, 4,65. Нађено: C, 41,21; H, 4,28; O, 4,78;

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta$ , ppm): 7, 90 (m, 2H, Ph), 7,38 (m, 3H, Ph), 3,85–4,4 (m, 2H, 2CHO), 3,87–4,01 (m, 1H,  $\text{CH}_a\text{H}_b\text{Se}$ ), 3,6–3,78 (m, 1H,  $\text{CH}_a\text{H}_b\text{Se}$ ), 1,42–1,82 и 1,85–2,20 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ), 1,16 и 1,26 (d,  $J = 5\text{Hz}$ , 6H,  $\text{CH}_3$  *cis/trans* изомери).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta$ , ppm): *cis/trans* изомери: 133,16 /133,26, 129,06/129,20, 128,82/128,99, 126,54/126,58, 76,64/77,28, 75,21/75,87, 37,31/37,79, 32,77/33,23, 31,25/32,16, 21,04/21,21

Израчунао за ESI-MS:  $[\text{M}-\text{Cl}]^+$  :Израчунао.: 652,8728; Нађено: 652,8719.

Принос: 0,161 g, 78%

#### **Комплекс $[\text{Pd}(\text{L7})_2\text{Cl}_2]$ (C7):**

Израчунао за **C7** =  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{Cl}_2\text{O}_2\text{PdSe}_2$  ( $M_r = 715,81$  g/mol): C, 43,63; H, 5,07. Нађено: C, 43,70; H, 5,20.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ;  $\delta$ , ppm): 7,94 (m, 2H, Ph), 7,39 (m, 3H, Ph), 3,59–3,72 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$  and 1H,  $\text{CHSe}$ ), 1,7–1,9 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ), 1,216 и 1,251 (2s, 2x3H, 2 $\text{CH}_3$ );

MS:  $m/z = 715,09$

Принос: 0,148 g, 69%

### **3.4. Анализе и методе мерења**

#### **3.4.1. Елементална микроанализа**

Елементалне микроанализе (C, H, N, S) су урађене на апарату Vario III CHNOS Elemental Analyzer на Хемијском факулету Универзитета у Београду.

#### **3.4.2. Инфрацрвена спектроскопија**

Инфрацрвени спектри синтетисаних лиганада и одговарајућих Pd(II) комплекса су снимљени помоћу спектрофотометра Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу.

### 3.4.3 Нуклеарно-магнетно-резонанционна спектроскопија

Снимање нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра синтетисаних једињења извршено је помоћу спектрофотометра Varian Gemini-200 NMR на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу користећи D<sub>2</sub>O (за синтетисане лиганде) и CDCl<sub>3</sub> и DMSO-*d*<sub>6</sub> (за одговарајуће комплексе Pd(II)) као раствараче. Хемијска померања су дата у односу на триметилсилан (TMS), употребом DDS као инертног стандарда.

### 3.4.4. Масена спектроскопија

Масена спектроскопија изведена је на систему Waters SYNAPT G2-Si/nanoACQUITY UPLC.

### 3.4.5. рН мерења

рН мерења су вршена на Mettler Delta 350 дигиталном рН-метру са резолуцијом ± 0.01 mV, са комбинованом стакленом електродом. Ова електрода је калибрисана помоћу стандардног раствора пуфера (рН= 4, 7 и 9) набављених од Sigma Aldrich.

### 3.4.6. Инструменти

Апарати и инструменти коришћени у овом истраживању су:

- ✓ Суви стерилизатор (Instrumentaria, Загреб) за стерилизацију лабораторијског посуђа;
- ✓ Аутоклав (VX-55 Systec, Немачка) за стерилизацију дестиловане воде, физиолошког раствора, хранљивих подлога, пластичног прибора, отпадног материјала;
- ✓ Инкубатор (Сутјеска) за раст микроорганизама под оптималним условима;
- ✓ Ламинарна комора (F8-42 Termovent) за рад под стерилним условима;
- ✓ Спектрофотометар (Iskra, Крањ, Словенија) и Читач микротитарских плоча (ELISA - RT-2100C, Rayto, Shenzhen, China) за квантитативну анализу узорака;
- ✓ Аналитичка вага (OHAUS Corporation Pioneer USA) за прецизно мерење физичких величина;



- ✓ Водено купатило (Inako, Загреб, Хрватска/Vk6ERN) за одвијање хемијских реакција на повишеној температури;
- ✓ Водено купатило за соникацију (Aquasonic 250 HT Ultrasonic Cleaner, VWR International, Radnor, Pensilvaniја, SAD) за соникацију супстанци;
- ✓ рН-метар (inoLab 7110, Немачка) за прецизно одређивање рН вредности;
- ✓ Вортекс (VELP, Scientifica, Italy) и Ротациона мешалица (PSU-20I, Енглеска) за мешање и растварање, хомогенизацију узорака, техничке потребе;
- ✓ McFarland дензитометар (DEN-1, BioSan, Latvia) за одређивање густине суспензије микроорганизама;
- ✓ Ротациони шејкер за техничке потребе.

### **3.5. *In vitro* антимикуробни тест**

#### **3.5.1. Тест супстанце и микроорганизми**

Тестиране супстанце (лиганди и одговарајући комплекси) су растворене у диметилсулфоксиду, а потом разблажене течним хранљивим медијумима при чему су добијени 10% раствори. Антибиотици, тетрациклин, цефтриаксон и ванкомицин су растворени у Милер-Хинтон (МХ) бујону, док су антигљивични лекови флуконазол, кетоконазол и амфотерицин Б растворени у Сабоурауд декстрозном (СБ) бујону.

Антимикуробна активност лиганата и комплекса одређена је тестирањем 20 врста микроорганизама (Табела 1). Тестирања су вршена на 10 врста патогених бактерија, укључујући 5 стандардних сојева и 5 клиничких изолата. Такође, антигљивична активност је одређена тестирањем 7 врста филаментозних гљива и 3 квасца. Клинички изолати патогених бактерија обезбеђени су из колекције микроорганизама Института за јавно здравље, Крагујевац, Србија. Остале микроорганизме обезбедила је Лабораторија за Микробиологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, где су спроведена истраживања. Колекција изолата и АТСС стандардних врста је чувана у мешавини на  $-80^{\circ}\text{C}$ , на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу у подлози са у 20% (v/v) глицерола и хранљивог бујона.

**Табела 1.** Списак тестираних микроорганизама коришћених у одређивању антимицробне активности испитиваних лиганада и одговарајућих Pd(II) комплекса

<b>Бактерије</b>	<b>Гљиве</b>
<b>Грам-позитивне бактерије</b>	<b>Квасци</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
<b>Грам-негативне бактерије</b>	<b>Филаментозне гљиве</b>
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	<i>Penicillium italicum</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Mucor mucedo</i> ATCC 52568
<i>Escherichia coli</i>	<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170
<i>Salmonella enterica</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305
	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404

### 3.5.2. Суспензије микроорганизама

Криогене културе су засејаване на коси ХА и СБА и инкубиране 24 h на 37°C за бактерије, 48 h на 26°C за квасце и 7-14 дана на 26°C за филаментозне гљиве. Направљене су секундарне културе које су инкубиране на истим подлогама. Овакве културе су коришћене за прављење суспензија микроорганизама које су се користиле у тестирању.

Бактеријске суспензије и суспензије квасаца су припремљене тако што су колоније микроорганизама старе 24 h, узимане директно са хранљиве подлоге и суспендоване у 5 mL стерилног физиолошког раствора. Густина почетне суспензије је подешавана коришћењем дензитометра (DEN-1, BioSan), при чему је вршено упоређивање са 0,5 Mc Farland стандардом [231]. Десетострука разблажења почетне суспензије су додатно припремљена у стерилном 0,85% физиолошком раствору до концентрације од приближно  $10^6$  CFU/mL. Суспензије спора гљива су припремљене од свежих зрелих култура (старе 3-7 дана) које су расле на 27°C на СБА агару. Споре су суспендоване у 5 mL стерилног физиолошког раствора и спектрофотометријски на 530 nm је измерена замућеност раствора (турбидитет). Суспензије су се затим даље разблаживале до приближно  $10^6$  CFU/mL према процедури препорученој од NCCLS [232].

### 3.5.3. Микродилуциона метода

Антимикробна активност лиганата и њихових одговарајућих Pd(II) комплекса тестирана је одређивањем минималне инхибиторне концентрације (МИК) и минималне микробицидне концентрације (ММК) употребом микротитрационих плоча уз помоћ ресазурина [233].

Коришћена је плоча са 96 отвора у које је стављено по 100  $\mu\text{L}$  хранљиве подлоге, МХ бујон за бактерије и СД бујон за гљиве. По 100  $\mu\text{L}$  раствора испитиваних једињења почетне концентрације 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  је додато у први ред микротитрационе плоче. Двоструким разблаживањем коришћењем мултиканалне пипете добијени су раствори концентрација у области од 1000 до 7,81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Затим је додавано по 10  $\mu\text{L}$  суспензија бактерија, квасца или спора гљива. Тестирана једињења су испитана при концентрацији бактерија од  $10^5$  CFU/mL, и концентрацији квасца и спора гљива од  $10^3$  CFU/mL. На крају у сваки отвор додат је ресазурин. Ресазурин као индикатор ћелијског раста у периоду инкубације из плаво-љубичасте боје под утицајем оксидоредуктаза живе ћелије прелази у резорурфин розе флуоросцентне боје (Схема 3) [234]. Тако припремљене плоче су инкубиране на 37°C 24 сата за бактерије, на 28°C 48 сати и 72 сата за гљиве.

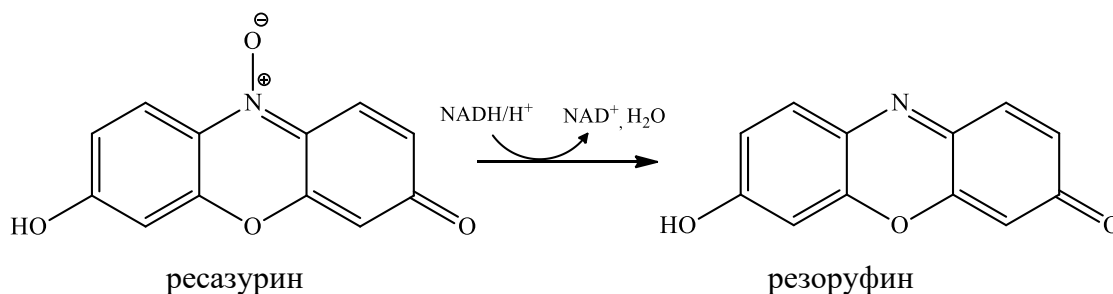


Схема 3. Прелазак ресазурина у резорурфин

Минимална инхибиторна концентрација (МИК) је дефинисана као најнижа концентрација испитиваних супстанци на којој није дошло до промене боје ресазурина из плаве у ружичасту. Код гљива МИК представља најнижу концентрацију испитиваних једињења која спречава раст мицелије. Резултати су читавани визуелно. Минимална микробицидна концентрација (ММК) је одређена пресејавањем 10  $\mu\text{L}$  узорка из отвора у којима није уочен раст на плочаст агар (ХА за бактерије и СД за гљиве). Концентрација на којој после периода инкубације није уочен раст на агару дефинисана је као ММК.

Антибиотици (тетрацилин, цефтриаксон, ванкомицин) и антигљивични лекови (кетоконазол, флуконазол и амфотерицин Б) су коришћени као позитивне контроле.

Концентровани диметилсулфоксид је бактерицидан, па је зато постављена контрола растварача којом је потврђено да 10% диметилсулфоксид нема утицаја на раст микроорганизама. Концентрација диметилсулфоксида у експерименту се додатно смањује серијом двоструких разблажења, тако да је концентрација растварача била 5% и нижа. Сваки експеримент садржи контролу раста која подразумева присуство и раст бактерија без тестиране супстанце, контролу стерилности која подразумева одсуство живих бактерија, негативну контролу (растварач) и позитивну контролу која подразумева присуство комерцијалног антибиотика.

### **3.6. *In vitro* антибиофилм активност**

#### **3.6.1. Тест супстанце и микроорганизми**

Тестиране супстанце растворене су у диметилсулфоксиду а потом разблажене течним хранљивим медијумом МН бујоном при чему су добијени 10% раствори. Антибиотици су такође растворен у МН бујону.

Антибиофилм активност комплекса **C1** и лиганда **L1** је одређена испитивањем на 3 врсте бактерија (*S. aureus* ATCC 25923, *P. mirabilis* ATCC 12453 и *P. aeruginosa* ATCC 27853), јер су они показали значајно већи ниво антимицробне активности у поређењу са другим тестираним комплексима. Такође је испитана антибиофилм активност комплекса **C5** и **C7**, као и лиганда **L5** и **L7** на 3 врсте бактерија (*S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* и *P. aeruginosa*).

#### **3.6.2. Суспензије микроорганизама**

Бактеријске суспензије су припремљене тако што су колоније узимане директно са подлоге и суспендоване у 5 mL стерилног физиолошког раствора. Густина почетне суспензије је подешавана коришћењем дензитометра (DEN-1, BioSan), при чему је вршено упоређивање са 1,0 Mc Farland стандардом и није вршено даље разблаживање суспензија.

#### **3.6.3. Tissue culture plate test (TCP) тест**

Антибиофилм активности испитиваних супстанци су одређене методом коју су описали Christensen и сарадници [235]. То је најчешће коришћена метода за испитивање антибиофилм активности на формираном биофилму. Формирање биофилма је урађено по методи О'Тооле и Колтер (1998) са неким модификацијама [236].

Коришћене су полистиренске плоче са равним дном и 96 отвора у које је стављено по 100  $\mu\text{L}$  хранљиве подлоге, Mueller-Hinton бујона за бактерије у сваки отвор. Затим је 10  $\mu\text{L}$  свеже бактеријске суспензије додато у сваки отвор. Инокулисане плоче су инкубиране на 37°C 24 сата за Грам-негативне и 48 сати за Грам-позитивне бактерије. По 100  $\mu\text{L}$  из раствора испитиваних комплекса (концентрације 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) је додато у први ред плоче. Затим су направљена серијска двострука разблажења за сваки следећи ред која су додавана одвојено коришћењем муктиканалне пипете. Након 24 сата инкубације садржај сваке од плоча се одбаци, а отвори испирају са 200  $\mu\text{L}$  раствора пуфера (0,15 М амонијум-сулфат, 0,1 М калијум-дихидрогенфосфат, 0,001 М магнезијум-сулфат и 0,034 М натријум-дихидрогенцитрат) због уклањања слободних бактерија. Биофилмови обојене су са кристал виолетом (0,1% w/v) и инкубирани на собној температури 20 минута. Вишак боје је испран са дејонизованом водом, а плоче су фиксиране са 200  $\mu\text{L}$  раствора етанол-ацетон (4:1). Оптичке густине обојених ћелија бактерија одређене су са микро ELISA читачем плоча на таласној дужини од 630 nm. Биофилм инхибиторна концентрација (БИК) је дефинисана као најнижа концентрација сваког комплекса на којој је инхибирано формирање биофилма. Сваки тест је укључивао контролу формирања биофилма. Само бујон или бујон са растворима комплекса служили су као контрола због провере стерилности и неспецифичног везивања медијума. Сви тестови спроведени су у дупликату и биофилм инхибиторна концентрација је била константна. Тетрациклин, ванкомицин и цефтриаксон су коришћени као позитивне контроле.

### **3.7. Антиоксидативна активност**

#### **3.7.1. Тест капацитета неутралисања DPPH радикала**

Способност Pd(II)-комплекса са неким лигандима да неутралишу 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) слободне радикале процењена је коришћењем методе описане од стране Такао и сарадника [237]. Тест се базира на размени водоникових атома или електрона између молекула антиоксиданта хемијског комплекса и DPPH радикала у раствору [238].

Метанолни раствор DPPH (2 mL, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) додаван је испитиваним растворима у метанолу (2 mL) у различитим концентрацијама (62,5-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Раствор има тамно розе боју, а у току реакције мења боју у светлије нијансе розе боје, па чак и у жуту. Што

је промена боје израженија то тестирано једињење има већу антиоксидативну активност. Након 30 минута у тами на собној температури, апсорбанца је очитана на спектрофотометру на 517 nm. Метанол је коришћен као контрола, док је аскорбинска киселина коришћена као стандард. Експеримент је спроведен у трипликату а резултати су представљени као средње вредности  $\pm$  стандардне девијације. Антиоксидативна активност изражена је као проценат инхибиције, а израчуната је коришћењем следеће једначине:

$$\text{Активност неутрализације радикала (\%)} = 100 \times [(A_{\text{контрола}} - A_{\text{узорак}}) / A_{\text{контрола}}]$$

при чему је  $A_{\text{контрола}}$  апсорбанца контроле, а  $A_{\text{узорак}}$  апсорбанца тестираног узорка.

IC50 вредност је ефективна концентрација хемијске супстанце на којој је неутралисано 50% DPPH радикала. Наведена вредност добијена је са графика који приказује неутралишућу активност (%) наспрам концентрације узорка. Ниска IC50 вредност указује на јаку способност екстракта да се понаша као DPPH неутрализатор.

## **3.8. Интеракције паладијум(II)-комплекса са ДНК и серум албумином**

### **3.8.1. Интеракције паладијум(II)-комплекса са ДНК**

Афинитет везивања Pd(II)-комплекса у молекулу ДНК испитиван је применом апсорпционе и флуоресцентне спектроскопије. Основни раствор СТ-ДНК припремљен је у PBS пуферу, који је дао однос UV апсорбанци на 260 nm и 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) био између 1,8 и 1,9, што указује да је ДНК била ослобођена протеина, и концентрација је измерена помоћу UV апсорбанце на 260 nm ( $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [239]. UV-Vis спектри снимљени су на Perkin-Elmer Lambda 35 или 25 спектрофотометру са двоструким снопом, користећи кварцне кивете дужине 1 mm (3 mL). Флуоресцентна мерења изведена су на RF-1501 PC спектрофлуориметру (Shimadzu, Japan). Флуоресцентни спектри снимљени су у опсегу 550–750 nm при екситацији на 527 nm у свим случајевима. Екситациони и емисиони прорези су били 10 nm.

### 3.8.1.1. Апсорпциона спектроскопска мерења

Интеракције испитиваних комплекса Pd(II) са ДНК су проучаване Uv-Vis спектрофотометријски у циљу одређивања константе везивања ( $K_b$ ). Фосфатни пуфер (0,01 М, рН = 7,4) је коришћен за апсорпциона мерења. Серија раствора комплекс-ДНК је припремљена мешањем раствора комплекса константне концентрације са инкрементима ДНК полазног раствора.

Константа везивања,  $K_b$ , одређује се праћењем промена апсорбанце на одговарајућој таласној дужини након додавања ДНК раствора растуће концентрације на основу следеће једначине (1):

$$[\text{ДНК}]/(\epsilon_A - \epsilon_f) = [\text{ДНК}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)] \quad (1)$$

$K_b$  се израчунава из односа нагиба и одсечка праве  $[\text{ДНК}]/(\epsilon_A - \epsilon_f) = f([\text{ДНК}]$ ), где је  $[\text{ДНК}]$  концентрација ДНК,  $\epsilon_A = A_{\text{obsd}}/[\text{комплекс}]$ ,  $\epsilon_f$  је екстинкциони коефицијент некоординованог комплекса, а  $\epsilon_b$  је екстинкциони коефицијент координованог комплекса [240].

### 3.8.1.2. Флуоресцентна мерења

Интеракције комплекса са ДНК су испитиване и флуоресцентном спектроскопијом. Интензитет флуоресценције је мерен на таласној дужини ексцитације 527 nm, а флуоресцентне емисије на 612 nm. Ширина ексцитационог и емисионог прореза (10 nm) и брзина снимања су константне за све експерименте. Интеракције комплекса са ДНК су проучаване у присуству ЕБ да би се утврдило да ли комплекс може да замени ЕБ из његовог ДНК-ЕБ комплекса. ДНК-ЕБ комплекс је припремљен мешањем 10  $\mu\text{M}$  ЕБ и 10  $\mu\text{M}$  ДНК (рН=7,4). Могући ефекти везивања комплекса за ДНК су проучавани снимањем промене флуоресцентног емисионог спектра након додавања раствора комплекса у раствор ДНК-ЕБ. Пре мерења систем је инкубиран на собној температури у току 5 минута. Емисија раствора је снимана у области од 550 до 750 nm.

Степен интеракције комплекса Pd(II) и ДНК молекула одређује се израчунавањем Стерн-Волмерове (Stern-Volmer) константе ( $K_{sv}$ ) применом Стерн-Волмерове једначине (2):

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2)$$

где су  $I_0$  и  $I$  интензитети емисије у одсуству и присуству комплекса,  $[Q]$  је укупна концентрација комплекса,  $K_{sv}$  је Стерн-Волмерова константа, која се може добити из нагиба праве зависности  $I_0/I$  од концентрације комплекса  $[Q]$  [241,242].

### 3.8.1.3. Мерење вискозитета

Вискозности ДНК раствора су одређиване након додавања раствора комплекса Pd(II) различитих концентрација. Време протока је мерено дигиталном штоперицом. За сваки узорак је мерење поновљено три пута, а затим је израчунато просечно време протока. Подаци су анализирани као  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  у односу на  $r$ , где је  $\eta$  вискозитет ДНК у присуству комплекса, а  $\eta_0$  је вискозност само ДНК у пуферском раствору. Вискозности су израчунате на основу посматраног времена протока за растворе који садрже ДНК ( $t$ ) кориговано за време протока само пуфера ( $t_0$ ),  $\eta = (t - t_0)/t_0$ .

### 3.8.2. Интеракције палладијум(II)-комплекса са серум албумином

Интеракције комплекса Pd(II) са говеђим серум албумином (BSA) су испитиване флуоресцентном спектроскопијом снимањем спектра у опсегу 300 - 500 nm на ексцитационој таласној дужини од 295 nm. Ефекат везивања испитиваних комплекса за протеин је посматран на основу смањења емисионог интензитета албумина (2  $\mu$ M) после додатка комплекса.

Флуоресценција протеина је последица природних флуорофора као што су триптофан, тирозин и фенилаланин. Промене у флуоресценцији говеђеј серум албумина (BSA) коришћене су за праћење интеракција са комплексима Pd(II). Интеракција BSA са поменути комплексима испитивана је праћењем смањења флуоресценције BSA на 363 nm са повећањем концентрације Pd(II)-комплекса C5 и C6 (0,0–10,0  $\mu$ M).

Подаци о степену интеракције испитиваних комплекса и BSA, могу се такође добити на основу Стерн-Волмерове (Stern-Volmer) једначине, једначина (2) [243].

### 3.8.3. Симулације молекулског докинга

Полазне структуре испитиваних комплекса пре докинга су оптимизоване на па $\omega$ B97XD теоријском нивоу у комбинацији са def2-TZVP основног сета. [244,245]. Добијене структуре окарактерисане су као минима рачуњањем и испитивањем



вибрационих фреквенција на истом теоријском нивоу. За ову врсту прорачуна коришћен је програм GAUSSIAN [246]. Почетне тродимензионалне структуре (3D) ДНК које представљају канонску В-ДНК (PDB: 1BNA), ДНК са интеркалационим јазом, цепом (PDB: 1Z3F) и говеђи серум албумин (PDB: 4F5S), као и структуре тирозил-*t*РНК синтетазе (TyrRS; PDB: 1JJ) и топоизомеразе II ДНК гиразе (DNA Gyr; PDB: 2XCT) бактерије *S. aureus*, узете су из „Protein Data Bank“ базе података (PDB; <http://www.rcsb.org>) [247].

Молекули воде, лиганди и хетероатоми су уклоњени уколико су присутни у узорку. У ригидној структури ДНК, BSA, TyrRS и флексибилној структури ДНК Gyr, једињења су докингована коришћењем „Molegro Virtual Docker“ (MVD, verzija 2013.6.0.1) [248]. Компјутерски прорачуни за активна места везивања вршени су са мрежном резолуцијом од 0.3 Å. Докинг према BSA је изведен преко MVD генерисане шупљине, близу остатка Trp-213, за ДНК Gyr бактерије *S. aureus* око ципрофлоксацина, а за TyrRS бактерије *S. aureus* око лиганда SB-239629. Параметри процедуре докинга су: максималан број итерација 1500, величина популације 50, енергетски праг 100,00 kcal/mol и максимални број корака 300. Максимална популација од 100 и максимални број понављања од 10000 је коришћен у сваком низу. Алгоритам претраге је био MolDock SE са подешеним бројем низова на 100, а број генерисаних поза је био 5. MVD функције описале су процену испитиваних комплекса и ДНК/BSA/ДНК Gyr/TyrRS интеракција: MolDock, Docking, Rerank, и H-bond [248]. Вредности Molegro функција су релативно процењиване. Пет најбољих поза је задржано. Докинговане позе са ДНК фрагментима су визуализоване употребом молекуларног графичког програма CHIMERA (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

### **3.9. *In vitro* генотоксична активност**

#### **3.9.1. Комет тест**

Генотоксичност је испитивана Комет тестом према протоколу Singh и сарадника уз незнатне модификације [249].

Периферна венска крв прикупљена је од три здрава донора старости 41, 38 и 37 година, који нису били изложени познатом мутагену најмање 6 месеци. Суспензија лимфоцита је третирана са три нова комплекса Pd(II) са селен донорским лигандима, у 4 различите концентрације (1, 10, 20 и 40 µg/ml) током пола сата на 37°C. Након периода

инкубације, виталност ћелија је испитана тестом Трипан плаво. Третиране ћелије су суспендоване у 100  $\mu\text{l}$  1%-не агарозе ниске тачке топљења (LMPA, од енгл. low melting point agarose). Ресуспендовани садржај је наносен на положену микроскопску плочицу у количини од 90  $\mu\text{l}$ , а затим је инкубиран на 4°C током 5 минута. Плочице су затим пренесене у припремљен ледени раствор за лизу на pH=10 током 2 сата (2,5 М NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tris, 1% тритон X-100, 10% DMSO). Плочице су затим држане у електрофоретском пуферу (10 М NaOH, 200 mM EDTA) на 4°C током 30 минута. Електрофореза је извршена на 25 V и 300 mA током 30 минута на 4°C, након чега су плочице потопљене у неутралишући пуфер (0,4 М Tris-HCl, pH 7,5) 3 пута по 5 минута и бојене са 50  $\mu\text{l}$  етидијум бромидом током 10 минута. Негативне контроле (без третмана) и позитивне контроле третиране су водоник-пероксидом ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , у финалној концентрацији 10  $\mu\text{g/ml}$ ), су паралелно укључене.

Ћелије су анализирани на микроскопу (Nikon E 50i) при увећању од 400x. Анализирани су по 100 ћелија по донору (по 50 ћелија са сваке од дуплираних плочица). Ћелије су визуелно класификоване у 5 група на основу ДНК оштећења: класа 0 – без оштећења, класа 1 – ниско оштећење, класа 2 – средње оштећење, класа 3 – високо оштећење, класа 4 – тотална деструкција [250]. Индекс генетичког оштећења (Genetic damage index, GDI) израчунат је применом формуле:

$$\text{GDI} = \frac{\text{класа 1} + 2 \times \text{класа 2} + 3 \times \text{класа 3} + 4 \times \text{класа 4}}{\text{класа 0} + \text{класа 1} + \text{класа 2} + \text{класа 3} + \text{класа 4}}$$

### 3.10. *In vitro* антитуморска активност

#### 3.10.1. Испитиване ћелијске линије

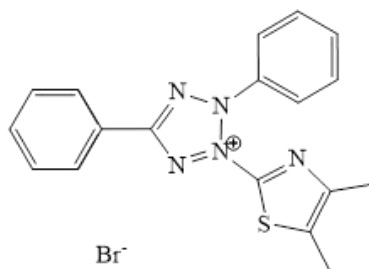
За испитивање цитотоксичне активности на ћелијама канцера помоћу МТТ теста, коришћена је НСТ-116 ћелијска линија обезбеђена од стране American Tissue Culture Collection (Manassas, VA, USA).

Радни раствори су припремљени у диметилсулфоксиду у концентрацији од 100 mM и разблажени до крајњих концентрација (0,1, 1, 10, 50, 100 и 500  $\mu\text{M}$ ) у DMEM медијуму за третман ћелија (процент DMSO у третману са највишом концентрацијом био је 0.5 %, дакле нетоксичан за ћелије). Ћелије су култивисане у медијуму DMEM, допуњеном са 10% феталним говеђим серумом (FBS), антибиотцима 100 IU/mL

пеницилина, 100 µg/mL стрептомицина, у Т75 фласку, у контролисаној атмосфери од 5% CO<sub>2</sub> на 37 °C. Сви експерименти су рађени при 70 до 80 % конфлуентности ћелија.

### 3.10.2. МТТ тест

МТТ тест је метода којом се индиректно одређује вијабилност ћелија [251-253]. МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (Слика 20) је кристал жуте боје, растворљив у води, који због позитивног наелектрисања лако пролази кроз ћелијску мембрану.



Слика 20. Структура МТТ

У метаболички активним ћелијама се МТТ редукује до нерастворних љубичастих кристала формазана. Митохондријална редуктаза (сукцинат-деhidрогеназа), активна само у живим ћелијама, катализује ову реакцију, па је редукција првобитног једињења до формазана директно пропорционална броју живих ћелија (Схема 4).



Схема 4. Жути МТТ се митохондријском редуктазом претвара у љубичасти формазан

Ћелије у експоненцијалној фази раста прикупљене су из флашка. Број ћелија је одређен уз искључење мртвих ћелија тј. ћелија обојених Трипан плаво бојом на хемоцитометру. Трипан плава боја може да прође само кроз оштећену ћелијску мембрану невијабилних ћелија и боји цитоплазму, док је код вијабилних ћелија ова могућност искључена. На тај начин се под микроскопом лако може одредити број вијабилних ћелија у датој запремини суспензије ћелија.

Ефекат испитиване супстанце се одређује поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму (негативна контрола) и интензитета који дају ћелије у третману испитиваном супстанцом. Настали формазан се раствара диметилсулфоксиду и интензитет боје се одређује спектофотометријски на 550 nm.

За засејавање ћелија коришћене су микротитар плоче са 96 бунарића ( $10^4$  ћелија по бунарићу), и након 24 h преинкубације, третиране са по 100  $\mu\text{L}$  раствора сваке концентрације испитиваних супстанци. Медијум за култивацију са одговарајућом количином испитиваних једињења, али без ћелија коришћен је као слепа проба. Вијабилност култивисаних ћелија одређена је МТТ тестом [251]. На крају периода третмана (24 h и 72 h), додато је по 25  $\mu\text{L}$  МТТ (концентрације 5 mg/mL у PBS- од енг. Phosphate saline buffer) и 100  $\mu\text{L}$  свеже припремљеног медијума уз додатну инкубацију од 2 h на 37 °C. Након инкубације, бунарићи су аспирирани, а љубичасти формазан формиран у ћелијама је растворен у 150  $\mu\text{L}$  DMSO по бунарићу, и мерена је апсорбанца на 550 nm на Rayto 96-well plate ELISA читачу, RT-2100C.

Ефекти на вијабилност ћелија су рачунати као однос апсорбанце третираних узорака подељено са апсорбанцом контролних узорака (нетретиране ћелије) и помножено са 100 ради изражавања у процентима вијабилних ћелија. Подаци су изражени као средње вредности два независна експеримента, што је спроведено употребом статистичког софтверског пакета SPSS (Чикаго, Илиноис). Цитотоксични ефекти су изражени као  $\text{IC}_{50}$  вредност (доза која смањује вијабилност ћелија за 50%), што је израчунато из дозних криви компјутерским програмом CalcuSyn v 2.1.

Процент мртвих ћелија је израчунат помоћу формуле:

$$\% \text{ цитотоксичности} = 100 - ((\text{Е}-\text{Б})/(\text{К}-\text{Б}) \times 100);$$

где је: Е-отвор са испитиваним супстанцама; Б-слепа проба (бленк); К-отвор са нетретираним ћелијама.

$\text{IC}_{50}$  концентрација се дефинише као концентрација супстанце која за 50% инхибира ћелијско преживљавање у односу на нетретирану контролу.

### 3.11. Статистичка анализа

У опису и анализи података коришћене су дескриптивне и математичко-аналитичке статистичке методе.

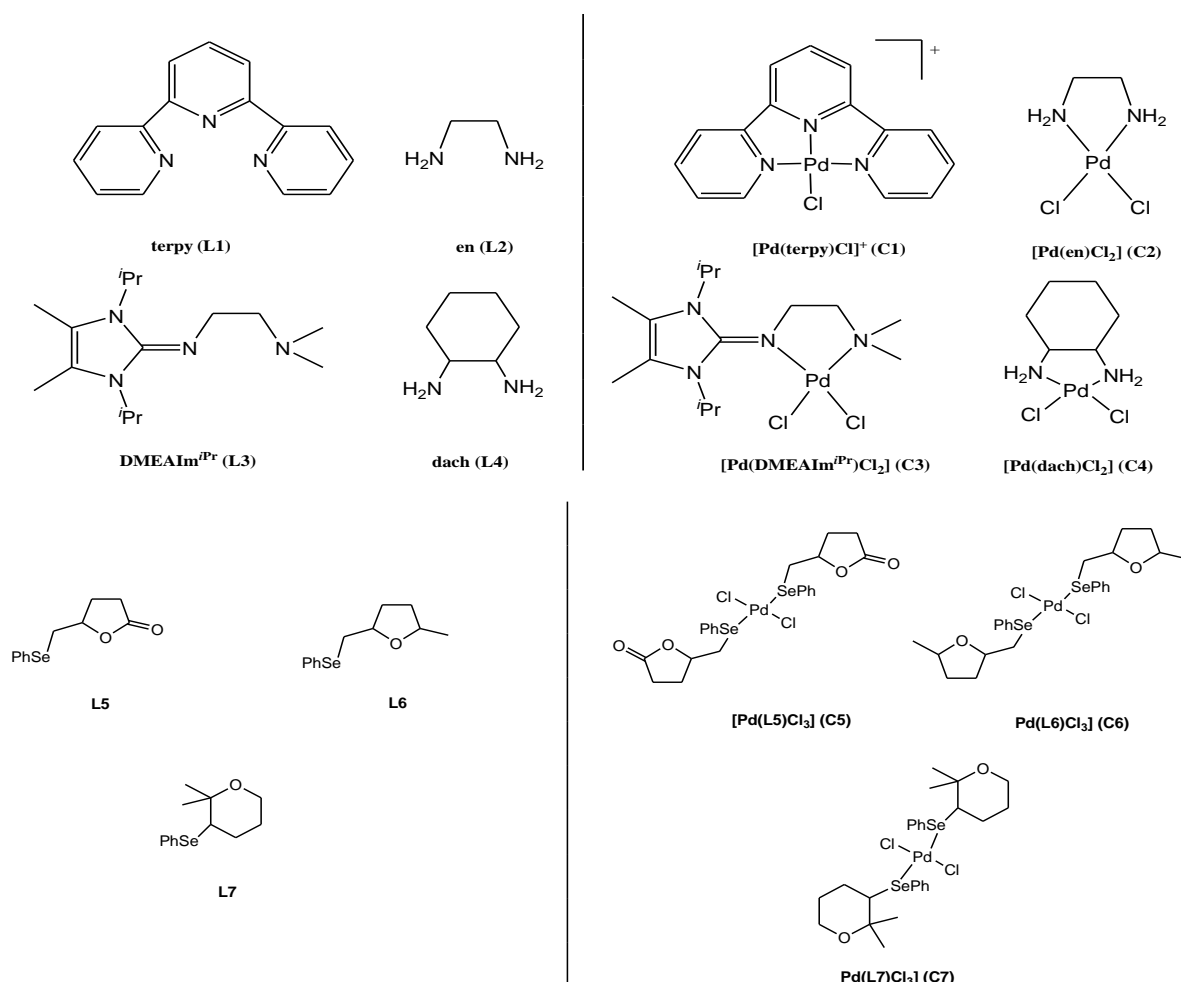
Подаци су обрађени коришћењем Microsoft Excel-а (Redmond, Washington, DC, USA) и SPSS статистичком програму, верзија 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Резултати су приказани табеларно и графички. Резултати су читавани у дупликату и трипликату при чему су константни резултати прихваћени као такви, а код резултата који то нису одређена је средња вредност  $\pm$  стандардна девијација. Код анализа две групе података коришћени су *Student*-ови *t* тестови, а за већи број група ANOVA. За све коришћене статистичке тестове вредности  $p \leq 0,05$  сматране су статистички значајним.

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### 4.1. Синтеза и карактеризација комплекса

Комплекси Pd(II) са различитим азот и селен донорским лигандима, коришћени за даља испитивања у оквиру ове докторске дисертације. Синтетисани су у задовољавајуће добрим приносима (преко 80%), директном реакцијом између PdCl<sub>2</sub> или [PdCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> или [Pd(COD)Cl<sub>2</sub>] и одговарајућег лиганда у односу 1:1. Као растварач коришћена је вода, етанол, тетраhydroфуран или метанол. Све синтезе су изведене у сарадњи са истраживачким групама Института за хемију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Структура комплекса Pd(II) је приказана на Слици 21.



Слика 21. Структура лиганда и комплекса Pd(II) у дисертацији

Pd(II) комплекси су окарактерисани стандардним аналитичким методама (елементална микроанализа, IR и NMR спектроскопијом и масеном спектрометријом).

Добијени подаци указују да је приликом синтезе свих комплекса као производ реакције добијено жељено комплексно једињење у високом приносу.

## 4.2. *In vitro* антимикуробна активност паладијум(II) комплекса

*In vitro* испитивање антимикуробне активности Pd(II) комплекса са азот и селен донорским лигандима, одређена је тестирањем на укупно 18 микроорганизмима (бактеријама, квасцима и филаментозним гљивама). Резултати испитивања антимикуробне активности приказани су у табелама (Табела 2, 3, 5, 6). У табели 4 и 6 приказане су вредности МИК и ММК за антибиотике: тетрациклин, цефтриаксон и ванкомицин и антигљивичне лекове: флуконазол, кетоконазол и амфотерицин Б који су коришћени као позитивне контроле. За извођење експеримената као растварач коришћен је 10% диметилсулфоксид за који је утврђено да не инхибира раст испитиваних микроорганизама.

Интензитет антимикуробне активности варира у зависности од врсте микроорганизама и типа испитиваног једињења. МИК и ММК вредности за испитиване Pd(II) комплексе биле су у опсегу од <0,49 до >1000 µg/mL, односно од 15,63 до >1000 µg/mL за комплексе Pd(II) са селен донорским лигандима.

Када су у питању комплекси **C1**, **C2**, **C3** и **C4** и лиганди **L1** и **L4**, лиганд **L1** је испољио исту или мало бољу антимикуробну активност, посебно према квасцима и филаментозним гљивама, у односу на комплекс **C1**. Комплекс **C4** показао је бољу активност него **L4** лиганд када су у питању бактерије, али су резултати обрнути када су у питању квасци и филаментозне гљиве. Комплекси **C2** и **C3** нису могли да се пореде са одговарајућим лигандима зато што су **L2** и **L3** били испарљиви и нестабилни за овакву врсту испитивања.

Комплекс **C1** показао је значајно већу антимикуробну активност у односу на **C2**, **C3** и **C4**. Антигљивична активност комплекса **C1** била је боља од његове антибактеријске активности. Вредности МИК-а за **C1** за квасце и филаментозне гљиве кретао се у опсегу од <0,49 до 15,63 µg/mL, док су вредности МИК-а за бактерије кретале између 0,98 и 31,25 µg/mL. Грам-позитивне бактерије су показале већу осетљивост на **C1** комплекс од Грам-негативних бактерија, са вредностима МИК-а од 15,62, односно 31,25 µg/mL. Изузетак је био *P. mirabilis* ATCC 12453 са МИК 0,98 µg/mL. Комплекси **C2** – **C4** показали су сличну активност према Грам-позитивним и Грам-негативним бактеријама. Од тестираних комплекса, само је **C1** показао антимикуробну активност упоредиву са

позитивним контролама. Комплекс **C1** са одговарајућим лигандом **L1** је имао бољу антимикробну активност према стандардном и клиничком соју *B. subtilis* у односу на цефтриаксон. Ово једињење је показало јачу активност према *P. aeruginosa* ATCC 27853 и другим Грам-негативним бактеријама у поређењу са ванкомицином.

Осим комплекса **C1**, чија се антимикотична активност поклапала са флуконазолом, остали комплекси су показали умерену и ниску активност према већини квасаца и филаментозних гљива у поређењу са позитивним контролама. Најосетљивији према комплексу **C1** и лиганду **L1** био је *P. italicum* (MIC <0,49 µg/mL). Њихов ефекат на *P. italicum* поклапао се са активношћу кетоконазола.

Нема разлике у антимикробној активности комплекса Pd(II) са селен донорским лигандима између Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија. Комплекси **C5** и **C7** имају најзначајнију активност према бактерији *P. aeruginosa* (стандард и изолат), бољу од контроле. Комплекс **C7** има значајну активност према стандарду и изолату бактерије *S. aureus*. Комплекс **C5** има значајну активност према филаментозним гљивицама (*T. viridae* ATCC 13233 и врстама из рода *Aspergillus*), а активност је у опсегу или боља од позитивне контроле (Табеле 5 и 6).



**Табела 2.** Резултати антимикробна активност лиганда L1 и Pd(II) комплекса C1 и C2

Тестиране супстанце/врсте	L1		C1		C2	
	МИК <sup>a</sup>	ММК <sup>b</sup>	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Bacillus subtilis</i>	7,81	7,81	15,62	15,62	500	500
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	31,25	31,25	15,62	15,62	500	500
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	7,81	31,25	15,62	62,5	250	>500
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	0,98	125	0,98	125	500	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	31,25	250	31,25	125	250	250
<i>Escherichia coli</i>	15,63	31,25	31,25	62,55	500	500
<i>E. coli</i> ATCC 25922	15,63	15,63	31,25	31,25	>500	>500
<i>Salmonella enterica</i>	31,25	62,5	31,25	31,25	250	250
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1,96	3,91	7,81	7,81	500	1000
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3,91	15,63	15,62	15,62	1000	>1000
<i>Saccharomyces boulardii</i>	3,91	3,91	7,81	7,81	500	1000
<i>Penicillium italicum</i>	<0,49	<0,49	<0,49	<0,49	1000	1000
<i>P. chrysogenum</i>	1,96	1,96	15,63	31,25	500	1000
<i>Mucor mucedo</i> ATCC 52568	1,96	1,96	15,63	15,63	1000	>1000
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233	1,96	1,96	15,63	31,25	1000	1000
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170	0,98	1,96	15,63	31,25	1000	>1000
<i>A. fumigatus</i> ATTC 204305	1,96	1,96	15,63	15,63	1000	1000
<i>A. niger</i> ATCC 16404	1,96	3,91	15,63	62,5	1000	1000

<sup>a</sup>МИК-минимална инхибиторна концентрација (µg/mL);

<sup>b</sup>ММК- минимална микробицидна концентрација (µg/mL), нт-није тестирано

**Табела 3.** Резултати антимикробна активност лиганда **L4** и Pd(II) комплекса **C3** и **C4**

Тестиране супстанце/врсте	C3		L4		C4	
	МИК <sup>a</sup>	ММК <sup>b</sup>	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Bacillus subtilis</i>	250	500	>500	>500	500	500
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	250	500	>500	>500	250	500
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	250	500	>500	>500	250	500
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	500	500	>500	>500	500	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	500	500	>500	>500	250	500
<i>Escherichia coli</i>	500	500	>500	>500	500	500
<i>E. coli</i> ATCC 25922	500	500	>500	>500	500	500
<i>Salmonella enterica</i>	500	500	>500	>500	500	500
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	250	1000	250	500	500	500
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	500	1000	250	500	500	1000
<i>Saccharomyces boulardii</i>	500	1000	125	250	125	500
<i>Penicillium italicum</i>	500	1000	250	250	500	500
<i>P. chrysogenum</i>	250	500	250	250	250	500
<i>Mucor mucedo</i> ATCC 52568	1000	1000	500	500	500	1000
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233	1000	1000	250	250	1000	1000
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170	500	1000	500	500	500	500
<i>A. fumigatus</i> ATTC 204305	1000	1000	500	500	1000	1000
<i>A. niger</i> ATCC 16404	1000	>1000	500	500	500	>1000

<sup>a</sup>МИК-минимална инхибиторна концентрација (µg/mL);

<sup>b</sup>ММК- минимална микробицидна концентрација (µg/mL), нт-није тестирано

**Табела 4.** Резултати антимикробне активности позитивних контрола

Тестиране супстанце/врсте	Тетрациклин		Цефтриаксон		Ванкомицин	
	МИК <sup>а</sup>	ММК <sup>б</sup>	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Bacillus subtilis</i>	0,98	1,96	31,25	31,25	1,96	1,96
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1,96	15,63	31,25	31,25	0,98	1,96
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<0,49	1,96	1,96	3,91	0,49	0,98
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	15,62	31,25	< 0,98	< 0,98	31,25	31,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	7,81	62,5	7,81	15,62	250	>250
<i>Escherichia coli</i>	1,96	3,91	< 0,98	< 0,98	125	125
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,98	3,91	< 0,98	< 0,98	125	250
<i>Salmonella enterica</i>	0,49	3,91	<0,49	<0,49	250	250
Тестиране супстанце/врсте	Флуконазол		Кетоконазол		Амфотерицин Б	
	МИК <sup>а</sup>	ММК <sup>б</sup>	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	31,25	500	<0,49	< 0,49	<0,098	0,39
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	31,25	62,5	1,96	1,96	<0,098	<0,098
<i>Saccharomyces boulardii</i>	7,81	31,25	1,96	1,96	<0,098	<0,098
<i>Penicillium italicum</i>	250	500	<0,49	<0,49	<0,098	1,56
<i>P. chrysogenum</i>	1000	1000	31,25	62,5	0,195	0,39
<i>Mucor mucedo</i> ATCC 52568	250	250	7,81	7,81	<0,098	0,39
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233	500	1000	62,5	125	0,78	1,56
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170	500	500	<0,49	1,96	0,39	0,78
<i>A. fumigatus</i> ATCC 204305	1000	1000	62,5	125	0,195	0,195
<i>A. niger</i> ATCC 16404	1000	1000	31,25	62,5	0,195	0,39

<sup>а</sup>МИК-минимална инхибиторна концентрација (µg/mL);

<sup>б</sup>ММК- минимална микробицидна концентрација (µg/mL), нт-није тестирано

**Табела 5.** Резултати антимикробне активности лиганда **L5**, **L6** и Pd(II) комплекса **C5** и **C6**

Тестиране супстанце/врсте	L5		C5		L6		C6	
	МИК <sup>a</sup>	ММК <sup>b</sup>	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК <sup>a</sup>	ММК <sup>b</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	>1000	>1000	500	500	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Staphylococcus aureus</i>	>1000	>1000	125	500	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>1000	>1000	125	250	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	>1000	62,5	125	250	1000	1000	1000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	500	500	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	500	500	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>1000	>1000	500	500	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Salmonella enterica</i>	>1000	>1000	500	500	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Rhodothorula mucilaginosa</i>	500	1000	250	500	500	1000	500	1000
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Saccharomyces boulardii</i>	>1000	>1000	250	500	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Mucor mucedo</i>	1000	1000	500	1000	500	1000	1000	1000
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233	1000	>1000	500	500	500	1000	1000	>1000
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170	1000	>1000	500	1000	1000	>1000	1000	>1000
<i>A. fumigatus</i> ATCC 1022	1000	>1000	250	250	1000	>1000	500	>1000
<i>A. niger</i> ATCC 16404	1000	>1000	250	500	1000	>1000	1000	>1000

<sup>a</sup>МИК-минимална инхибиторна концентрација ( $\mu\text{g/mL}$ );

<sup>b</sup>ММК- минимална микробицидна концентрација ( $\mu\text{g/mL}$ ), нт-није тестирано

**Табела 6.** Резултати антимикробне активности лиганда **L7**, Pd(II) комплекса **C7** и позитивних контрола

Тестиране супстанце/врсте	L7		C7		Доксициклин / Флуконазол	
	МИК <sup>a</sup>	ММК <sup>b</sup>	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	>1000	>1000	1000	1000	1,953	31,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000	>1000	62,5	125	0,45	7,81
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>1000	>1000	62,5	125	0,224	3,75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250	1000	15,63	62,5	250	1000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	62,5	125	62,5	125
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	>1000	>1000	500	500	7,81	15,63
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	500	500	15,63	62,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>1000	>1000	500	500	15,63	31,25
<i>Salmonella enterica</i>	>1000	>1000	1000	1000	15,63	31,25
<i>Rhodothorula mucilaginosa</i>	500	1000	250	500	31,25	500
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>1000	>1000	250	1000	7,81	31,25
<i>Saccharomyces boulardii</i>	>1000	>1000	500	1000	31,25	62,5
<i>Mucor mucedo</i>	1000	1000	1000	1000	250	250
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233	1000	>1000	1000	1000	500	1000
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170	1000	>1000	1000	1000	500	500
<i>A. fumigatus</i> ATCC 1022	500	>1000	1000	>1000	1000	1000
<i>A. niger</i> ATCC 16404	1000	>1000	1000	>1000	1000	1000

<sup>a</sup>МИК-минимална инхибиторна концентрација (µg/mL);

<sup>b</sup>ММК- минимална микробицидна концентрација (µg/mL), нт-није тестирано

Антимикробна резистенција (АМР) је стално растући проблем и велика је претња здрављу глобалне популације. Центри за контролу и превенцију болести и Светска здравствена организација проценили су да би до 2050. године милиони људи могли да умру због резистентних микробних инфекција, што би могло довести до нове пандемије [3,254]. Развој резистенције на антибиотике испољен је кроз различите механизме (формирање биофилмова, елиминације антибиотика ефлуксним пумпама, мутације циљаних гена, смањену пропустљивост ћелија и тд.) [16,255-257]. Потреба за алтернативама које се могу користити као активни антимикробици постоји већ дуже време [258]. Повећани пренос заразних микроорганизама, нарочито резистентних на постојеће антибиотике, довео је до интересовања за употребу метала као антимикробних и/или биоцидних агенаса [38]. Легуре паладијума су често истраживане као потенцијални материјали за употребу нпр. привремени имплантати за спречавање инфекција код кардиоваскуларних болести [259]. Паладијум као средство у медицинској употреби нпр. премази на катетерима, се третира као супстанца која поседује антимикробна својства и смањује ризик за бактеријске инфекције и преношење истих [260]. Истраживања показују да комплекси паладијума, показују антимикробну ефикасност против патогена [261].

Из свих наведених разлога антимикробна активност лиганата и одговарајућих Pd(II) комплекса испитана је на одабраним врстама бактерија и гљива. Антимикробно дејство је тумачено на основу вредности МИК и ММК. Интензитет антимикробне активности варира у зависности од врсте микроорганизама и типа испитиваног једињења. Ранија истраживања су показала да Pd(II) комплекси показују значајно бољу антимикробну активност у поређењу са одговарајућим лигандима [87,92,262]. МИК и ММК вредности за испитиване Pd(II) комплексе биле су у опсегу од <0,49 до >1000 µg/mL. Ранија истраживања показала су да интензитети антимикробних активности варирају у зависности од врсте микроорганизама, као и од типа и концентрације испитиваног једињења [87-89].

Комплекси су углавном показивали већу активност од одговарајућих лиганата, што је у складу са хелатном теоријом и Овертоновим концептом [96].

У поређењу са структурно сличним лигандима *N,N*-донорског типа и одговарајућих комплекса Pd(II), лиганд **L1** и комплекс **C1** су показали сличну или бољу антибактеријску активност, посебно према Грам-негативној бактерији *P. mirabilis*, док су активности према *E. coli* сличне или нешто ниже. Остали лиганди и комплекси нису показали значајну антибактеријску активност.

Претходна истраживања показала су да комплекси углавном показују нижу антигљивичну активност [90,263] али су Pd(II) комплекси са дериватима тиосалицилне киселине показали значајно бољу антифунгалну активност у односу на позитивну контролу, флуконазол. У поређењу са дериватима тиосалицилне киселине и одговарајућим Pd(II) комплексима, лиганд **L1** је показао значајно бољу активност према свим врстама из рода *Aspergillus*, док је комплекс **C1** показао нешто нижу антигљивичну активност. Такође, у поређењу са овим једињењима, лиганд **L1** и комплекс **C1** су показали значајно бољу антифунгалну активност према *C. albicans* [87]. Неки комплекси паладијума показују антибактеријску активност и то и против Грам-негативних (*E. coli* и *P. aeruginosa*) и Грам-позитивних (*S. aureus* и *B. subtilis*) бактерија, при чему је активност израженија код Грам-позитивних, што је случај и у нашем истраживању. Овај тип комплекса не показује ефикасност против гљива *C. albicans* и *A. niger*. Разлог може да се тражи у различитим методама јер је ово истраживање спроведено диск дифузионом методом и мерењем зона инхибиције [264].

Patil и сар. [265] дали су преглед антимикуробне активности N-хетероцикличних комплекса различитих метала међу којима је и паладијум у периоду 2015-2020. Истраживачи у различитим студијама су синтетисали низ бидентатних пиридин-функционалних Pd комплекса са различитим супституентима (R = метил, фенил и терт-бутил) при чему је испитана њихова антимикуробна активност. Након координације са паладијумом, добијени NHC–Pd (N-хетероциклични карпемски комплекси) комплекси показују значајне антимикуробне активности са минималним инхибиторним концентрацијама (МИК) у микромоларном опсегу [265]. Генерално, као и у нашем истраживању, Грам-позитивне бактерије су инхибиране при ниским микромоларним концентрацијама деривата, док су, за разлику од тога, примећене значајно ниже ефикасности према Грам-негативним бактеријама. Сматра се да је биолошка активност ових једињења последица како бројних супституената, тако и оптичке изомерије NHC–Pd комплекса [266]. Patil и сар. су из прегледа литературе закључили да NHC–Pd показују значајан антимикуробни потенцијал, иако је тај потенцијал ипак мањи од оног добијеног са сребром и златом [265].

Из тог разлога јавила су се и истраживања комплекса NHC–Pd који су добијени из одговарајућег комплекса NHC–Ag(I) [267]. Његов антибактеријски потенцијал према Грам-негативним бактеријама *E. coli* и Грам-позитивним бактеријама *S. aureus* био је низак у поређењу са комплексом NHC–Ag(I) и/или у поређењу са стандардним антибиотиком ампицилином. Одговарајућа со бензимидазолијума није показала никакву инхибицију раста [267]. Ово истраживање се делимично поклапа са нашим где од

тестираних комплекса, **C1** показује антимикуробну активност упоредиву са позитивним контролама. Овај комплекс, али и његов лиганд **L1**, има бољу антимикуробну активност према стандардном и клиничком соју *B. subtilis* у односу на цефтриаксон, и према *P. aeruginosa* ATCC 27853 и другим Грам-негативним бактеријама у поређењу са ванкомицином. Комплекси **C5** и **C7** су показали најзначајнију активност према бактерији *P. aeruginosa* (стандард и изолат). Те активности **C5** и **C7** су биле боље од позитивне контроле. Комплекс **C7** је имао и значајну активност према *S. aureus*.

Остала истраживања ове врсте показују различите ефекте, како због разлике у методи која се користи (диск дифузиона) тако и због велике разноврсности новосинтетисаних молекула који се користе као лиганди.

Комплекс Pd(II) јона са 7-бромо-хинолин-8-олом [Pd(BrQ)<sub>2</sub>] је показао чак 250 пута већу активност на *P. mirabilis* у односу на позитивну контролу, тетрациклин [90]. Garoufis и сарадници [268] су испитивали антимикуробну и антибактеријску активност комплекса Pd(II) са различитим лигандима (сумпор и азот доносним лигандима, Шифовим базама и лековима као лигандима). Шифове базе показују јачу антимикуробну активност у поређењу са стандардним лековима стрептомицином и нистатином, њихови комплекси са Pd(II) нису показали значајну активност према тестираним бактеријама [269].

Антибактеријска активност нових стероидних тиосемикарбазона и њихових комплекса Pd(II) тестирана је *in vitro* диск дифузионом методом на две Грам-позитивне и две Грам-негативне бактерије. Резултати су показали да су стероидни комплекси бољи инхибитори и Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија у поређењу са стероидним тиосемикарбазонима. Једно једињење од тестираних има антибактеријску активност која је иста као код амоксицилина као позитивне контроле [270]. *In vitro* антибактеријска активност стероидних тиосемикарбазона и њихових металних комплекса такође је показала да су метални комплекси бољи антибактеријски агенси у односу на тиосемикарбазоне [271]. Pd(II) комплекси са тиосемикарбазонима (TSC) поседују релевантна биолошка својства против вируса, бактерија и малигних ћелија. Конкретно, једињења где бочни ланац TSC носи *N*-хетероциклични прстен у одређеном положају они имају добре антинеопластичне активности и снажну склоност ка хелацији метала. Зато њихово координовање за прелазним јоном би требало да повећа њихову активност, што се може уочити код неких комплекса Pd(II)TSC, који су били активнији од самог лиганда [272].

У нашем истраживању нисмо могли код свих комплекса да упоредимо разлике у антимикуробном деловању са одговарајућим лигандима из техничких разлога, што је



објашњено у материјали методама, као и у делу резултати. Онде где је било могуће то испитати, резултати су били различити. **L1** је имао исту или бољу антимикуробну активност у поређењу са **C1** у зависности од тестираног микроорганизма, док је, иако је та активност била генерално ограничена, **C4** уопштено био антимикуробно ефикаснији од свог лиганда **L4**. **C5** и **C7** су уопштено деловали јаче од својих лиганда, док се код **C6** та разлика у деловању не уочава.

TSC лиганд се координује за Pd(II) моно- [273] или бидентатно [274], као додатни лиганд у координационој сфери може бити присутан неки *N*-хетероцикл [275], фосфин [157,274-277] или арсин [278]. Овако награђени комплекси поред антитуморског дејства показали су значајну антимикуробну активност [68].

За лиганде и комплексе типа  $[M(L1-L2)_2]$  (где је  $M = Pd(II)$ ; 1 и 2; и  $M = Ni(II)$ ; 3 и 4) исто је испитана антимикуробна активност против патогених микроба диск дифузионом методом. Сви лиганди и комплекси показују значајне антибактеријске и антимикуробне активности али су те активности у свим случајевима биле и до 10 пута мање у односу на исте или сличне концентрације позитивних контрола (ципрофлоксацина и флуконазола). Активност инхибиције раста бактерија и гљива била је боља код комплекса у односу на лиганде, а комплекси паладијума су имали бољи антибактеријски и антифунгални ефекат од комплекса никла одговарајућих лиганда [279].

Неки паладијумски комплекси попут овде испитиваних **C2** и **C6**, исто као и Pd(II) комплекс са алкил фенилдитиокарбамат, показују да имају слабу или немају никакву антимикуробну активност на свим испитиваним микроорганизмима [280]. Сви наведени резултати указују на специфичност метала према бактеријама [281]. Међутим, због различитих експерименталних метода у наведеним студијама, различитих метала у комплексима и различитих тест микроорганизма не могу се извести директни закључци из резултата испитивања [281-283].

Kawakami и сар. су испитали антимикуробну ефикасност низа метала, укључујући платину и паладијум, и открили да су ови метали ефикасни против *E. coli* [284]. Паладијум је такође показао значајну антимикуробну ефикасност већу од неких других тестираних метала, против *S. aureus* и *E. coli* [285]. Ова истраживања нису у сагласности са нашим јер код нас паладијумски комплекси не испољавају ту јачину активности на поменутих врстама, нарочито не на *E. coli*.

Ferreira и сарадници су такође испитивали антимикуробну активност комплекса Ni, Pd и Pt. Различити метали изазвали су различите антифунгалне реакције против *A. flavus*, *A. niger*, и *A. parasiticus*. Најактивнији су били комплекси Pd(Lx)<sub>2</sub> против *A. flavus*, док је

*A. niger*, био осетљивији на  $\text{Ni(Lx)}_2$ .  $\text{Pt(L16)}_2$  је био најактивнији на *A. parasiticus*. Све активности су ипак биле блиске али су се и 10 пута ниже када је промењен лиганд [286]. Комплекс **C5** је у сагласности са наведеним истраживањем и он има значајну активност према филаментозним гљивицама (*T. viridae* ATCC 13233 и врстама из рода *Aspergillus*) и та активност је у опсегу позитивне контроле или боља.

Manav и сар. [287] и Shasheen и сар. [288] су проценили антибактеријска својства комплекса  $\text{Pt(IV)}$  и  $\text{Pd(II)}$ . У њиховом истраживању ниједан од три  $\text{Pt(IV)}$  комплекса није показао ни на једној тестираној врсти значајно антибактеријско својство [287]. Насупрот томе,  $\text{Pd(II)}$  комплекси су показали умерену до значајну активност уколико се она пореди са стандардом имипенем [288] као што је то случај за неке од резултата нашег истраживања.

Низу хетеролептичних  $\text{Pd(II)}$  дитиокарбамата са различитим монодентатним фосфанима, тестирана је антимикуробна активност на *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *S. aureus* и *B. subtilis*. Комплекси паладијума су у овом истраживању деловали умерено, што је у сагласности са великим делом наших резултата. Изведено је неколико закључака у правцу односа структуре и активности:

1. дужина алкил група дитиокарбаматних лиганда игра важну улогу у антибактеријској активности (дужи ланци имају већу активност),
2. гломазни супституенти повећавају липофилност и зато, помажу пропустљивости кроз ћелијску мембрану бактерије, и
3. супституенти који повлаче електроне изазивају слабије антибактеријске одговоре [289, 290].

Ajibade и сар. су проценили антимикуробна својства комплекса са различитим сулфадиазинима за  $\text{M(II)=Co}$ ,  $\text{Cu}$ ,  $\text{Pd}$ , и  $\text{Pt}$ . Сви комплекси метала, као и лиганд сулфадиазин су показали позитиван ефекат при диск дифузионој методи где је код свих исказана одређена зона инхибиције при концентрацији од 40 mg/mL. Паладијумски комплекси у овом истраживању делују значајно и испољавају зону инхибиције до 25 mm. Најзначајнији ефекат даје комплекс кобалта са зоном инхибиције од 27 mm на *E. coli*, што није велика разлика. Уколико се посматра МИК паладијумски комплекси делују на бактерије у концентрацијама 10-20 mg/mL, а ММК је већи од 20 mg/mL. Такође се може видети да су комплекси са *N*-етил-*N*-фенил дитиокарбаматом активнији од комплекса са *N*-метил-*N*-фенил дитиокарбаматом. Генерално, у овом истраживању комплекси метала имају много већу антимикуробну активност од слободног сулфадиазинског лиганда [291].

*In vitro* антибактеријска активност комплекса [Pd(L)(Cl)] чији је лиганд на бази оксима, испитана је на великом броју патогених бактерија и гљива и утврђена антимикробна ефикасност једињења паладијума је обећавајућа [292].

Резултати нашег истраживања су у сагласности са раније спроведеним истраживањима [229]. Забележене вредности МИК и ММК у овој студији се слажу са вредностима објављеним за сличан сет микроорганизама. Они су били третирани Pd(II) комплексима са сумпор и азот донорским лигандима и Шифовим базама као лигандима [268].

Уопштено, као и код нас, и у другим истраживањима показана је значајно мања антигљивична активност комплекса Pd(II) [90,263]. Само је студија из 2012. године показала да комплекси Pd(II) са дериватима тиосалицилне киселине као лигандима имају значајно већу антигљивичну активност према врстама из рода *Aspergillus* у поређењу са позитивном контролом флуконазолом [87].

Низ комплекса Pd(II) и Zn(II) са *bipy* или *rhen* у пиридиламинима или бензизотиазолином или сахаринатом испитани су са аспекта антимикробних својстава. Комплекси су најактивнији против бактерија (*E. coli*, *S. aureus* и *S. pyogenes*) и гљива (*C. albicans* и *A. niger*), при чему се у овом истраживању појачане активности приписују и присуству метала и хетероаромата, односно бензизотиазолината и сахарината. Сматра се да код комплекса веће величине (молекуларна тежина) постоји боља антимикробна активност због веће пропусности кроз микробни ћелијски зид [293], што се као резултат и закључак ретко среће у истраживањима.

У новије време интезивирано је истраживање наноматеријала и опште је познато да њихово понашање зависи од величине и састава честица, мада сами ефекти малих разлика у величини према биолошким ћелијама нису добро истражени. Наночестице паладијума (Pd NP) се испитују и са аспекта антимикробног капацитета и њихове корисности као циљних антимикробних једињења. Adams и сар. су синтетисали Pd NP у три различите ограничене величине и испитали инхибиторни ефекат Pd NP и Pd(II) јона на *E. coli* и *S. aureus* током 24 сата. Резултати указују да су Pd NP много више инхибиторне према *S. aureus* него према *E. coli*, иако су све величине токсичне за оба организма. Уочена је значајна разлика у зависности антимикробне активности од величине и она се разликовала од тестираног микроорганизама. Величина Pd NP коришћених у тестовима била је у распону од 1–3 nm, а ћелије *S. aureus* су сфере површине од приближно 3 nm<sup>2</sup>, док ћелије *E. coli*, имају површину од приближно 11 nm<sup>2</sup>. Ако је величина једини фактор који се узима у обзир при антимикробном деловању 0,1 nm NP би лакше ступила у интеракцију са ћелијама *E. coli* него са ћелијама *S. aureus*,

имајући у виду величину и сферична ограничења. Али коришћењем мањих NP 2–3 nm у овој студији, места реакције паладијума на *S. aureus* постале би засићене много брже и при много нижим концентрацијама него на *E. coli* [294].

Претпоставља се да интеракције у површини између ћелијских зидова и *E. coli* су ометене типом ћелијског зида. Спољашња мембрана Грам-негативних бактерија, састављена од асиметричног двослоја липополисахарид - фосфолипид, бактерија пружа значајну препреку антимикуробним једињењима [295]. Антибиотици нпр. могу продрети у Грам-негативне ћелије само кроз путеве посредоване липидима и дифузне поре [296]. Састав спољне мембране Грам-негативних бактерија наспрам ћелијског зида Грам-позитивних бактерија заснованих првенствено на пептидогликану може значајно утицати на способност метала да се вежу за бактеријске површине [297]. Показано је да ћелијски зидови Грам-позитивних бактерија делују као хелатори метала, а показало се да различити прелазни елементи оксидационог стања +2 варирају у ефикасности везивања за омотаче ћелија *E. coli* [298,299].

Антимикуробна активност зависи и од присуства редукционих средстава, што у већини бактерија чине тиоли мале молекулске масе. Код већине Грам-негативних бактерија тиолни молекул је глутатион, док је код Грам-позитивних бактерија (укључујући *S. aureus*) присутан бацилитиол [300]. Код комплекса, координацијом јона Pd(II) са органским лигандима, долази до повећања липофилности, што се одражава на побољшан пролазак комплекса до циљаног места у бактеријској ћелији. Међутим, липополисахариди који се налазе на спољашњем делу ћелијског зида Грам-негативних бактерија, су хидрофилни и представљају додатну баријеру за хидрофобне супстанце. Због сложеније структуре ћелијског зида, Грам-негативне бактерије поседују генерално већу отпорност на дејство различитих антимикуробних супстанци у односу на Грам-позитивне бактерије [21,23,25]. Такође, оксидационо стање јона метала, број и врста донорских атома, као и њихова релативна диспозиција у лиганду, један су од главних фактора који одређују биолошку активност једињења. Све је у сагласности са нашим истраживањем где генерално постоји разлика у деловању између Грам-позитивних у односу на Грам-негативне бактерије.

Неколико студија је показало антимикуробну ефикасност паладијума у јонском облику или у комбинацији са неким другим металом попут злата или платине, и показало се и да њихови комплекси инхибирају бактеријске патогене [301-303].

Pd NP постају јонизоване током испитивања токсичности, а *E. coli* као и друге Грам-негативне бактерије, може користити ефлуксне пумпе за уклањање токсичних једињења из ћелије што значајно доприноси проблему стечене резистенције бактеријска

на антибиотике [304]. Различити токсични ефекти паладијума и њихових комплекса на бактерије могу бити последица различитих механизма (исцрпљивање антиоксиданата, оштећење ДНК-а, оштећена функција мембране и/или ометање асимилације хранљивих материја) [38]. Комплекс паладијума са 1,6-бис(бензимидазол-2-ил)-3,4-дитахексаном показује механизме токсичности код бактерија због везивања метала што доводи до оштећења ДНК, узрокујући ћелијску смрт. Иако је хемија паладијума врло слична хемији платине, комплекси паладијума се разликују од платине у неколико аспеката. Паладијум показује већу склоност размени лиганда, што је око  $10^5$  пута више од платине. Дисоцијација лиганда ствара активне врсте метала које могу лако ступити у интеракцију са другим једињењима, па су комплекси паладијума токсични због веће реактивности [305].

За улазак у цитоплазму у великим количинама, уместо поремећаја мембране, паладијум може изазвати токсични ефекат, па би тада мања величина ћелије и фундаментално различита својства ћелијског зида Грам-позитивног *S. aureus* у односу на Грам-негативну *E. coli* могла да га учине осетљивијим на Pd NP [294].

Активност Pd(II) јона као инхибитора ензима такође је добро проучена. Познато је да Pd(II) јон инхибира креатин киназу, сукцинат дехидрогеназу и многе друге уобичајене ензимске процесе у прокариотским и еукариотским ћелијама [306] чиме се може објаснити антимикуробна активност његових комплекса, без уочљивих разлика у деловању код различитих група микроорганизама (Грам-позитивне и Грам-негативне бактерије, квасци, филаментозне гљиве), што се може уочити и у нашем истраживању код неких комплекса.

У студији Vaidya и сар. повећање антимикуробне активности зависи од концентрације тестираних супстанци. Примећено је и да најелектронегативнији метали дају и најбоље антимикуробне резултате. Претпоставља се да то може бити резултат велике електронегативности металних јона које јако привлаче негативно наелектрисане бактерије. Резултат ових јако привлачних сила може довести до повећаних интеракција јона бактерија-метал, што доводи до веће антимикуробне ефикасности, а тиме и до повећане ћелијске смрти [118]. Комбинација паладијума са сребром против *E. faecium* показује добру синергистичку комбинацију. Разлог може бити тај што су јони метала били у растворима, док друга истраживања укључују испитивање антимикуробне ефикасности метала у облику наночестица или комплекса, што је случај у нашем истраживању, а познато је да облик метала утиче на антимикуробни механизам деловања [118]. Паладијум, поред злата и платине показује најефикаснију антимикуробну активност у облику појединачних раствора металних јона. У студији је мерена активност и бакра и

сребра мерењем зоне инхибиције и одређивањем МИК-а. Деловање је изражено на *E. faecium*, *K. pneumoniae* и *A. baumannii*. Аутори ове студије препоручују коришћење у формулацијама где је потребно интензивно чишћење одређених површина. Синергистичке комбинације паладијума са златом и платином, појединачно, препоручују за коришћење у облику антимикробних или биоцидних комбинација, посебно против наведених патогена [118].

И у другим студијама антимикробна механичка активност метала зависи од његових хемијских својстава (на пример селективност донорских атома, потенцијала редукције), које управљају њиховом реактивношћу у бактеријским ћелијама. Према томе, употреба антимикробних агенаса у комбинацији може додатно повећати њихову антимикробну ефикасност стварањем синергистичког ефекта [307]. Зато се наше истраживање проширило и на комплексе Pd(II) са селен донорским лигандима.

Претрагом литературе нису нађена испитивања антимикробног потенцијала паладијума са селеном. Уопште антимикробни тестови селенита су ретки и спорадични. Нађено је да Na-селенит има инхибиторни ефекат на *Helicobacter pylori* [308]. Комплекс Se(IV) и витамина А испитан је као антимикробни агенс за неке врсте бактерија и гљивица при чему је уочена значајна инхибиција. Антимикробна активност селен-ОХ комплекса испитана је на *E. coli*, *S. epidermidis* као и гљива *A. niger* и *A. flavus*. Утврђено је да витамин А има најнижу активност док је комплекс селена био потентнији него оригинални хелат по својим инхибицијским својствима [309]. Неколико органоселенових једињења је до сада пријављено као антимикробни агенси [264,310-314].

Није показан антибактеријски ефекат Na-селенита на врсте *B. subtilis*, *B. mycoides*, *E. coli* и *P. species*. На чврстим подлогама Na-селенит не инхибира раст бактерија али може утицати на инхибиторно дејство антибиотика на бактеријски раст. Осетљивост бактерија на антибиотике се повећава у присуству селена и то је најочитије у концентрацији од 10 mg/ml натријум селенита. Повећан инхибиторни ефекат антибиотика у присуству натријум селенита у медијуму потврђује се и у течној култури свих испитиваних врста. Тај резултат је последица динамике смањивања густине популације и ниже количине екстрацелуларних протеина. У присуству Na-селенита расте инхибиторни ефекат ампицилина и стрептомицина [315].

Peng и сар. су закључили да 36 nm Se има мању токсичност од селенита или селенометионина са већом величином честица, али и да сви ови облици Se имају сличну способност да повећају ниво селено ензима. Закључили су да величина наночестица игра важну улогу у биолошкој активности [316].

Исто као код паладијума и код селена се у новије време интензивирају истраживања везана за наночестице селена (SeNP). Оне представљају безбедне облике есенцијалног микронутријента селена и у великој мери се користе у биотехнологији и биомедицини. Антибактеријска својства SpSeNP-а, добијеног коришћењем екстракта ћелија микроалге, *Spirulina platensis*, потврђена су квалитативно и квантитативно, против изазивача кварења хране (*S. aureus* и *Salmonella typhimurium*), при чему је антибактеријска активност била у корелацији и повећавала се са смањењем величине SpSeNP-ова. То је доказано микроргафијом ћелија *S. typhimurium* третираних SpSeNP-овима при чему је доказано и озбиљно деловање наночестица на уништавање бактеријске ћелије а то уништавање је било временски зависно [317]. Забележено је и да мање величине честица доводе до мање вредности МИК-а за *S. typhimurium* и *S. aureus* [317,318]. Али што је већа концентрација SeNP-а, већи је и инхибиторни ефекат на различитим бактеријама [319]. Сматра се и да је оштећење ћелијске мембране *S. typhimurium* узроковано повећањем активности оксидативних ензима након третмана са SpSeNP-ова и повећањем генерације реактивних врста кисеоника [317,320].

И у другим истраживањима је утврђено да постоји чврста веза између величине наночестице и њихове биолошке активност [321]. Наночестице мање величине имају додатну површину подручја којим ступају у интеракцију са ћелијском мембраном бактерије па тако имају већу интеракцију која може довести до повећања пенетрације кроз спољне мембране и уласка наночестице у ћелије [322]. Најмање наночестице имају јаче антибактеријско деловање против *E. coli* и *S. aureus* [323] јер због своје величине могу доћи до нуклеарног садржаја.

Антибактеријска активност Se-NP је утврђена и на *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *Streptococcus epidermidis*. Резултати су показали да SeNP испољавају антибактеријску активност зависно од дозе код свих тестираних бактерија. SeNP показује значајан ефекат против *S. epidermidis* и *S. aureus* [324]. Различита истраживања претпостављају да би селен на површини ћелијске мембране бактерије могао да омета пенетрацију других ћелијски значајних молекула, као и само дусање [325].

Антимикробни утицај SpSeNP-а у истраживању ElSaied и сар. [317] је био значајнији од оног који су пријавили Fardsadegh и Jafarizadeh-Malmiri [326]. Сматра се да разлика потиче због методологије производње самих честица. Слаби резултати зона инхибиције према *S. aureus* и њихово непостојање код *S. typhimurium* може бити и последица интеракције липида екстракта биљке из које су добијене наночестице са ћелијском мембраном Грам-позитивне бактерије, или непропусности баријере липополисахарида и одсуство теихоичне киселине унутар ћелијског зида Грам-

негативније бактерије [327]. У нашем истраживању активност комплексе Pd(II) са селен донорским лигандима на врстама *S. aureus* и *Salmonella enterica* је такође била ограничена или је није било.

### 4.3. *In vitro* антибиофилм активност паладијум(II) комплекса

Комплекс, **C1** и лиганд **L1** су коришћени за испитивање антибиофилм активности на већ формираном биофилму јер су показали значајни степен антимицробне активности у односу на **C2**, **C3**, **C4** комплексе. *In vitro* антибиофилм активност Pd(II) комплекса и одговарајућег лиганда испитивана је на 3 врсте бактерија (Табела 7). Закључак је да су испитивана једињења показала ниску и умерену антибиофилм активност. Комплекс Pd(II) са терпиридином као лигандом показао је већу активност од цефтриаксона према *S. aureus* ATCC 25923 и ванкомицина према *P. mirabilis* ATCC 12453. У Табели 8 приказана је антибиофилм активност комплекса **C5**, **C7**, као и њихових одговарајућих лиганда **L5** и **L7** и контроле тетрациклина. Одређен је ефекат на формирану биофилм 3 одабране врсте бактерија (Табела 8). Резултати показују да нема уочљивих разлика у деловању комплекса и лиганда. Негде комплекси показују слабији ефекат на формирану биофилм поменутих бактерија у односу на лиганде, а негде је обрнута ситуација. Комплекс **C7** је показао најбољи ефекат на испитивани биофилм *P. aeruginosa* (БИК50 је 125 µg/ml) и тај ефекат је бољи од контроле тетрациклина. БИК50 за **L5** је био у опсегу 690,8 - >1000 µg/ml, док је за **L7** био је у опсегу 780-1000 µg/ml.



**Табела 7.** Ефекат лиганда **L1**, одговарајућег комплекса **C1** и позитивних контрола на формирани биофилм изабраних бактерија

Тестиране супстанце	L1		C1		Тетрациклин		Цефтриаксон		Ванкомицин	
	БИК50*	БИК90	БИК50	БИК90	БИК50	БИК90	БИК50	БИК90	БИК50	БИК90
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	570	>1000	420,4	>1000	156	250	230,7	>1000	784,6	>1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>1000	>1000	>1000	>1000	156	305	116,2	>1000	733,8	>1000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	630	>1000	248,6	530	250	300	475,4	>1000	62,6	>1000

\* БИК 50/90– биофилм инхибиторне концентрације ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) – вредности представљају најнижу концентрацију тестираних супстанци и антибиотика (тетрациклина, цефтриаксона и ванкомицина) које показују антибиофилм активност 50-90% инхибиције

**Табела 8.** Ефекат лиганда **L5** и **L7**, одговарајућих комплекса **C5** и **C7** и позитивне контрола на формирани биофилм изабраних бактерија

Тестиране супстанце	L5	C5	L7	C7	Тетрациклин
	БИК50*	БИК50	БИК50	БИК50	БИК50
<i>Staphylococcus aureus</i>	768,27	500	1000	>1000	156
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>1000	>1000	780	>1000	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	690,8	>1000	1000	125	746

\* БИК50 – биофилм инхибиторне концентрације ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) - представљају најнижу концентрацију тестираних супстанци и антибиотика (тетрациклина) које показују антибиофилм активност 50% инхибиције

Бактерије имају способност стварања биофилмова на абиотичким и биотичким подлогама, што може бити проблематично ако се јаве на нпр. катетерима, потенцијално доводећи до повећања ризика од инфекција што може довести до повећања броја морбидитета и морталитета пацијената [328].

У основи антибиофилм активности различитих сусптанци јесте систем за препознавање quorum sensing-a (QS) код бактерија отпорних на више лекова, као што је *P. aeruginosa*. Ове бактерије сматрају се одговорне за развој резистенције на антибиотике али су у исто време значајни тест објекти за откривање антимикуробних лекова.

Пошто су комплекси **C2**, **C3**, **C4** и **C6** показали слабу антимикуробну активност микродилуционом методом, за испитивање антибиофилм активности на већ формираном биофилму изабрани су комплекси **C1** и лиганд **L1**, као и **C5**, **C7** и њихови одговарајући лиганди **L5** и **L7**. Резултати показују да негде комплекси показују јачи а негде слабији ефекат на формирану биофилм бактерија (Табела 7, 8).

Quorum sensing (QS) представља систем комуникације између бактеријских ћелија који олакшава њихово колективно понашање као одговор на промене које се дешавају у њиховом окружењу и завистан је од густине ћелија [329]. Сигнални молекули који се јављају у QS-у, познати су и као аутоиндуцери (AI), а производе их многе бактеријске ћелије. При великој густини бактерија, ови мали сигнални молекули комуницирају и координирају колективно понашање регулишући неколико активности, као што су стварање биофилма, производња фактора вируленције, покретљивост и отпорност на антибиотике модулирајући транскрипцију неколико гена [330,331].

Неколико QS система присутно је код различитих бактерија. *P. aeruginosa* поседује три међусобно повезана QS система, названих las, rhl и pqs, који се разликују на основу хемијске природе аутоиндуцера који у њима учествују. Сигнални молекули активирају одговарајуће сродне протеинске рецепторе (LasR, RhR, и PqsR) што регулише активности више гена одговорних за вируленцију и стварање биофилма. Ови QS системи могу модулирати активности система па су нпр. rhl и pqs позитивно регулисане [332]. *P. aeruginosa* синтетише *N*-(3-оксододеканоил)-хомосерин лактон као AHL аутоиндуктор, и веже се за LasI/LasR сродни рецептор па модулира експресију више гена одговорних за производњу различитих фактора вируленције и формирање биофилма. Зато се LasR антагонисти користе као агенси за лечење инфекција изазваних бактеријама попут *P. aeruginosa* [333,334].

Паладијум, поред злата и платине показује најефикаснију антимикуробну активност у облику појединачних раствора металних јона. Деловање је изражено и

против биофилма за *E. faecium*, *K. pneumoniae* и *A. baumannii*. Ово истраживање указује на потенцијал употребе јона паладијума, као биоцидне формулације против биофилмова бактерија [118]. У нашој студији комплекс **C1** Pd(II) са терпиридином као лигандом показао је већу активност од цефтриаксона према *S. aureus* ATCC 25923 и ванкомицина према *P. mirabilis* ATCC 12453.

У студији Sabir и сар. синтетисан је низ нових селеноуреа и тиоуреа са дихидропиrol-2-он-ом (DHP) аналога који је LasR антагониста. У овом истраживању деривати селена са DHP су показали значајно боље активности QS инхибиције од одговарајућих аналога сумпора. Најефикаснији од њих је инхибирао las QS систем за 53% и 81%. Већина једињења има инхибицију LasR QS која је дозно зависна. Једињења која садрже селен су знатно ефикаснији инхибитори у односу на одговарајуће аналоге који садрже сумпор, највероватније због присуства оба селена (вероватно и катјонског NH<sub>2</sub><sup>+</sup>). Већина аналога селена смањује раст третираног *S. aureus*, при чему неки од њих показују снажну активност са МИК-ом 15,6 μМ. Резултати студије Sabir и сар. су показали да је присуство селена од суштинског значаја за QS инхибицију против *P. aeruginosa* али и за антибактеријско деловање против Грам-позитивне *S. aureus*. Зато се сматра да су ова органоселенова једињења са двоструким дејством, као QS инхибитори код Грам-негативних (*P. aeruginosa*) и антибактерициди код Грам-позитивних бактерија (*S. aureus*) [335]. Наша студија показује да комплекс Pd(II) са селен донорским лигандом **C7** показује најбољи ефекат на испитиваном биофилму *P. aeruginosa* (БИК50 је 125 μg/ml) и тај ефекат је бољи од контроле тетрациклина што је у сагласности са предходно наведеним.

#### 4.4. *In vitro* антиоксидативна активност комплекса паладијум(II)

DPPH је стабилан слободни радикал који се често користи за детекцију капацитета неутралисања радикала у хемијској анализи. Резултати капацитета неутралисања DPPH радикала изражене као IC50 дате су у Табели 9. Вредности показују умерене до значајних активности у зависности од испитиваних комплекса.

Комплекси, **C1** и **C3** и лиганд **L1** показују прооксидативну активност, док лиганд **L4** и комплекс **C4** показују антиоксидативну активност. Комплекс **C4** има значајно бољу антиоксидативну активност у односу на **L1**, али је она мања у односу на позитивну контролу, аскорбинску киселину (Табела 9). **C2** није тестиран јер је слабо растворан у метанолу у коме је тестирана активност, а **L2** и **L3** су испарљиви и нестабилни за овакву врсту испитивања.

Антиоксидативна активност свих новосинтетисаних комплекса (**C5**, **C6** и **C7**) је значајна при чему се са својом активношћу истиче **C6** комплекс (Табела 9).

**Табела 9.** Капацитет неутралисања радикала лиганда **L4**, комплекса **C4-C7** и позитивне контроле изражене као IC50

Тестиране супстанце	IC50 <sup>a</sup>
L4	3050,58±42,86
C4	83,36±1,02
C5	79,75 ± 2,83
C6	11,27 ± 0,12
C7	128,38 ± 2,82
Аскорбинска киселина <sup>b</sup>	5,25

<sup>a</sup>Средња вредност ± стандардна девијација изражена у µg/mL

<sup>b</sup>Позитивна контрола

Антиоксидативна активност лиганда **L5**, **L6** и **L7** је испитана и они показују антиоксидативну активност која није дозно зависна, па се није могла израчунати IC50. Дозе на којој они испољавају 50% своје активности код њих се креће у рангу 62,50 – 250 µg/mL. Резултати су приказани у Табели 10.

**Табела 10.** Антиоксидативна активност лиганала **L5**, **L6** и **L7** изражена као проценат инхибиције за тестиране концентрације ранга (500 - 15,63  $\mu\text{g/mL}$ )

Концентрација лиганда	L5 (%)*	L6 (%)	L7(%)
500	49 $\pm$ 0,15	53 $\pm$ 0,1	52 $\pm$ 0,16
250	52 $\pm$ 0,05	<b>50<math>\pm</math>0,06</b>	49 $\pm$ 0,06
125	52 $\pm$ 0,05	53 $\pm$ 0,14	49 $\pm$ 0,06
62,5	<b>50<math>\pm</math>0,1</b>	49 $\pm$ 0,15	<b>50<math>\pm</math>0,06</b>
31,25	49 $\pm$ 0,15	52 $\pm$ 0,1	49 $\pm$ 0,17
15,63	46 $\pm$ 0,1	46 $\pm$ 0,06	46 $\pm$ 0,05

\*Вредности антиоксидативне активности изражене су као % инхибиције (средња вредност $\pm$ стандардна девијација) за дате концентрације лиганата ( $\mu\text{g/mL}$ )

Истраживањем доступне литературе, примећено је да нема великог броја истраживања везаног за проучавање антиоксидативне активности Pd(II) комплекса. Нека од претходних истраживања показала су да Pd(II) комплекси показују бољу антиоксидативну активност од комплекса никла и платине [336]. Pd(II) комплекс са 2-хидрокси-4-метоксибензалдехид-4-фенилтиосемикарбазоном показује бољу антиоксидативну активност од одговарајућих комплекса Ni(II) и Cu(II) са истим лигандом, као и витамина C [337]. Друга су показала да Pd(II) комплекси показују нижу способност хватања радикала од одговарајућих лиганата [171]. Такође, показане су антиоксидативне активности сличне аскорбинској киселини, посебно за паладијум хлоридне комплексе са два о-хлоробензиламинска лиганда, Pd<sub>2</sub>CBA (C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>Pd) [146]. Машковић и сарадници су показали да Pd(II) комплекси са *N,N'*-лигандима имају вишу антиоксидативну активност од бутилованог хидрокситолуена, али нижу од аскорбинске киселине [145]. Pd(II) комплекси са лигандима *N,N*-донорског типа у нашој студији нису показали значајну антиоксидативну активност, са изузетком **C4** чија је IC<sub>50</sub> била око 80  $\mu\text{g/mL}$ , за разлику од комплекса који су испитивани у горе наведеним студијама. Међутим један од новосинтетисаних комплекса Pd(II) са селен донорским лигандом **C6** је показао значајну активност и та активност је била упоредива са активностима паладијумских комплекса у горе наведеним студијама али и за позитивном контролом, аскорбинаском киселином.

Неки комплекси паладијума показују антиоксидативну активност у вредностима 94,49, 72,36 и 70,79% за различите комплексе (Pd<sub>2</sub>, Pd<sub>3</sub> и Pd<sub>4</sub>). Ако се упореде са контролом (аскорбинском киселином) може се закључити да је Pd<sub>2</sub> снажан антиоксиданс, јер је у блиском контролном опсегу [146], што је у сагласности у овом истраживању код комплекса **C6**.

Нека једињења паладијума су испитана са аспекта активности уклањања слободних радикала користећи четири различите концентрације (50-200  $\mu\text{g/mL}$ ) и аскорбинске киселине као стандарда. Утврђено је да активност уклањања радикала комплекса Pd(II) зависи од концентрације, при чему је већа антиоксидативна активност је примећена при већој концентрацији (200  $\mu\text{g/mL}$ ) [338]. Резултати показују да је антиоксидативна активност код два комплекса већа од активности стандарда, а за друга два, мања или упоредива са стандардом. Међу овим испитиваним једињењима једно једињење показује одличну антиоксидативну активност, што се може приписати природи некоординаног азота пиримидинског прстена која даје више електрона и планарној структури фенил групе у његовој структури [339]. Ово истраживање је делимично сагласно са нашим резултатима. Насупрот овом, у нашем истраживању код комплекса **C5** антиоксидативна активност линеарно опада са растом концентрације. Код **C4**, **C6** и **C7** активност расте са растом концентрације али је раст значајан код **C7** где је IC50 близу 130  $\mu\text{g/mL}$ . И у нашем истраживању комплекс **C6** има деловање у блиском опсегу деловања аскорбинске киселине као стандарда.

Шест нових хетеролептичких комплекса Pd(II) који су синтетисани са мешовитим лигандом показало је такође добру активност уклањања радикала у поређењу са стандардом (аскорбинска киселина). И код овог истраживања активност уклањања радикала расте са повећањем концентрације, а највећа активност је примећена при концентрацији од 200  $\mu\text{g/mL}$  [340]. И друга истраживања указују на то да структура и својства инхибитора играју значајну улогу у показивању антиоксидативне активности и да повећање процента активности често је у корелацији са повећањем концентрације једињења. То се примећује и у истраживању Jagadeesh и сар. [341] где комплекс паладијума има вредност IC50 од 670  $\mu\text{g/mL}$  што је значајно већа вредност од оних који су добијени у нашем истраживању.

И аутори Iysel и сар. [342], су дошли до сличних резултата. Са повећањем концентрације комплекса повећава се и антиоксидативна активност испитана DPPH методом. Присуство лиганда који донирају водоник може да укаже на способност комплекса да имају антиоксидативна својства. Генерално, активност комплекса за уклањање радикала била је ниска у поређењу са оном код стандардних једињења, слично као и у нашем истраживању. Лиганд који садржи киселу NH групу, има већу антиоксидативну активност и то је највероватније последица могућности давања водоника са NH, слободним радикалима DPPH. У овом истраживању међутим уочена је нижа антиоксидативна активност у комплексима у поређењу са одговарајућим лигандом

под истим експерименталним условима што није у сагласности са нашим истраживањем. Аутори Icel и сар. су мишљења да способност давања Н лиганда значајно опада координацијом. Уочена антиоксидативна активност комплекса може бити и последица смањења радикалног карактера DPPH преносом атома водоника из лиганда, а не донацијом електрона [342].

За разлику од предходно наведене студије Icel и сар. у истраживању Tetteh и сар. [144] показано је да се антиоксидативна активност лиганда након комплексирања паладијумом, значајно повећава, што је у сагласности са нашим резултатима. Tetteh и сар. приписују овај ефекат преносу електрона између јона Pd(II) и лиганда, што се уочава кроз померање протона у  $^1\text{H}$  NMR спектру. Лиганд након комплексирања лакше отпушта водоников јон што резултира смањењу DPPH радикала [343,344].

Органоселенова једињења привукла су значајну пажњу као биолошки активна једињења због ниске токсичности и антиоксидативних својстава селена [345-347]. Као антиоксиданс, селен делује као битан елемент неколико редокс ензима, попут ензима глутатион пероксидазе, неопходног за катализацију неколико метаболичких процеса у телу [348]. Једињења која садрже селен и паладијум одвојено врше мултифункционалне ефекте на ћелије. Док једињења која садрже селен обично испољавају антиоксидативна својства, једињења која садрже Pd(II) су цитотоксична и прооксидативна. Зато је истражен биолошки ефекат бицикличног једињења селена са хидантоином, Hid-Se и његовог  $(\text{Hid-Se})_2\text{Pd}$  комплекса. Hid-Se и  $(\text{Hid-Se})_2\text{Pd}$  су показали прооксидативни и цитотоксични карактер. У свим изведеним експериментима  $(\text{Hid-Se})_2\text{Pd}$  се показао активнијим, односно ова супстанца је имала већи прооксидативни ефекат и цитотоксичност [349]. У нашем истраживању овај резултат је сагласан са резултатима за паладијумове комплексе са лигандима *N,N*-донорског типа, **C1** и **C3** као и лиганд **L1**. Они показују прооксидативну активност. За разлику од њих комплекси Pd(II) са селен донорским лигандима испитивани у овој тези нису показали ове резултате, већ су као и своји лиганди са добром антиоксидативном активношћу. Основ неслагања се може наћи у различитим методама испитивања, а постоји могућност различитог деловања лиганда у овим комплексима.

Неки аутори пријављују да комплекс Pd(II) показује највећу антиоксидативну активност ( $\text{IC}_{50} \approx 730 \mu\text{g/mL}$ ) која је четири пута већа од стандардног антиоксиданса  $\alpha$ -токоферола ( $\text{IC}_{50} \approx 3000 \mu\text{g/mL}$ ) [350]. Треба имати на уму да аскорбинска киселина као стандард је више уобичајена у овим тестовима при чему је њена  $\text{IC}_{50} \approx 5 \mu\text{g/mL}$ , и одмах се види да овакви резултати и поређења нису адекватни. У нашем истраживању вредност

IC50 око 3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  се уочила код **L4** и она је оцењена као врло слаба. IC50 свих комплекса који показују антиоксидативну активност у нашем истраживању је у рангу 11–130  $\mu\text{g}/\text{mL}$  што би се могло оценити као изузетно јака активност уколико би нам позитивна контрола била  $\alpha$ -токоферола (3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) као код Boutarfaia и сар. [350].

Комплексима Pd(II) који су синтетисани коришћењем 4-хидроксибензоеве киселине, одређене су вредности IC50 које су добијене из различитих експерименталних тестова. Ове вредности међутим потврђују да комплекси у овом раду поседују одлична антиоксидативна дејства, која су боља од стандарда аскорбинске киселине. Уочено је да је антиоксидативна активност слободног лиганда мање ефикасна што се поклапа са резултатима добијеним у овој дисертацији. Комплекси Pd(II) са трифенилфосфином као додатним лигандом показују боље активности од оних који садрже трифениларзин [351].

У многим истраживањима биолошких активности различитих Pd(II) комплекса, али и селена, уочено је да величина значајно утиче на активност једињења. Из тог разлога у скорије време се и акценат истраживања антиоксидативног потенцијала усмерио ка наночестицама. Зелено синтетисане наночестице паладијума процењене су квантификавањем активности уклањања DPPH слободних радикала. И у овом истраживању су резултати показали да се проценат уклањања DPPH линеарно повећава са повећањем концентрације наночестица са 1 на 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  и да врло брзо достиже скоро 83% при 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Позитивна контрола аскорбинске киселине показала је 94% активности али за више него дупло већу концентрацију од 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [352].

*In vitro* антиоксидативно својство синтетисаних наночестица Se (SeNP) добијених путем хемијске редукционе методе користећи аскорбинску киселину (витамин C) и поливинил алкохол (PVA) или хитозан (CS) као стабилизаторе, процењено је истим тестом за уклањање радикала који је коришћен и у овој тези. IC50 вредности наночестица биле су значајно мање, односно активност је била већа, код PVA пресвучених SeNP [324].

#### **4.5. Интеракције паладијум(II)комплекса са ДНК и серум албумином**

Нуклеинске киселине представљају основни генетски материјал сваке ћелије па према томе можемо их сматрати метом за многе унутарћелијске интеракције [173, 174, 176]. Начин интеракције комплекса прелазних метала са молекулом ДНК зависи од структуре комплекса, наелектрисања, као и типа инертног лиганда. Доказано је да геометрија лиганда, као и комплекса, утиче на начин везивања између комплекса и



молекула ДНК [353]. Комплекси прелазних метала могу да реагују са ДНК преко нековалентних (интеркалација, везивање за мали или велики жлеб, ...) или ковалентних интеракција, супституцијом лабилног лиганда са азотовим атомом из гуанина ДНК [354-356]. Комплекси јона прелазних метала који при физиолошким условима могу да раскидају фосфоестарске везе, нарушавајући при томе структуру ланца ДНК, привлаче све већу пажњу због своје потенцијалне примене као метало-лекови. Проучавање интеракција комплекса јона прелазних метала са ДНК, има за циљ да нам укаже да ли промена у синтези нових лиганда и комплекса могу да дају боље резултате у интеракцији. На основу тога могу да се развију нове стратегије дизајна потенцијалних лекова.

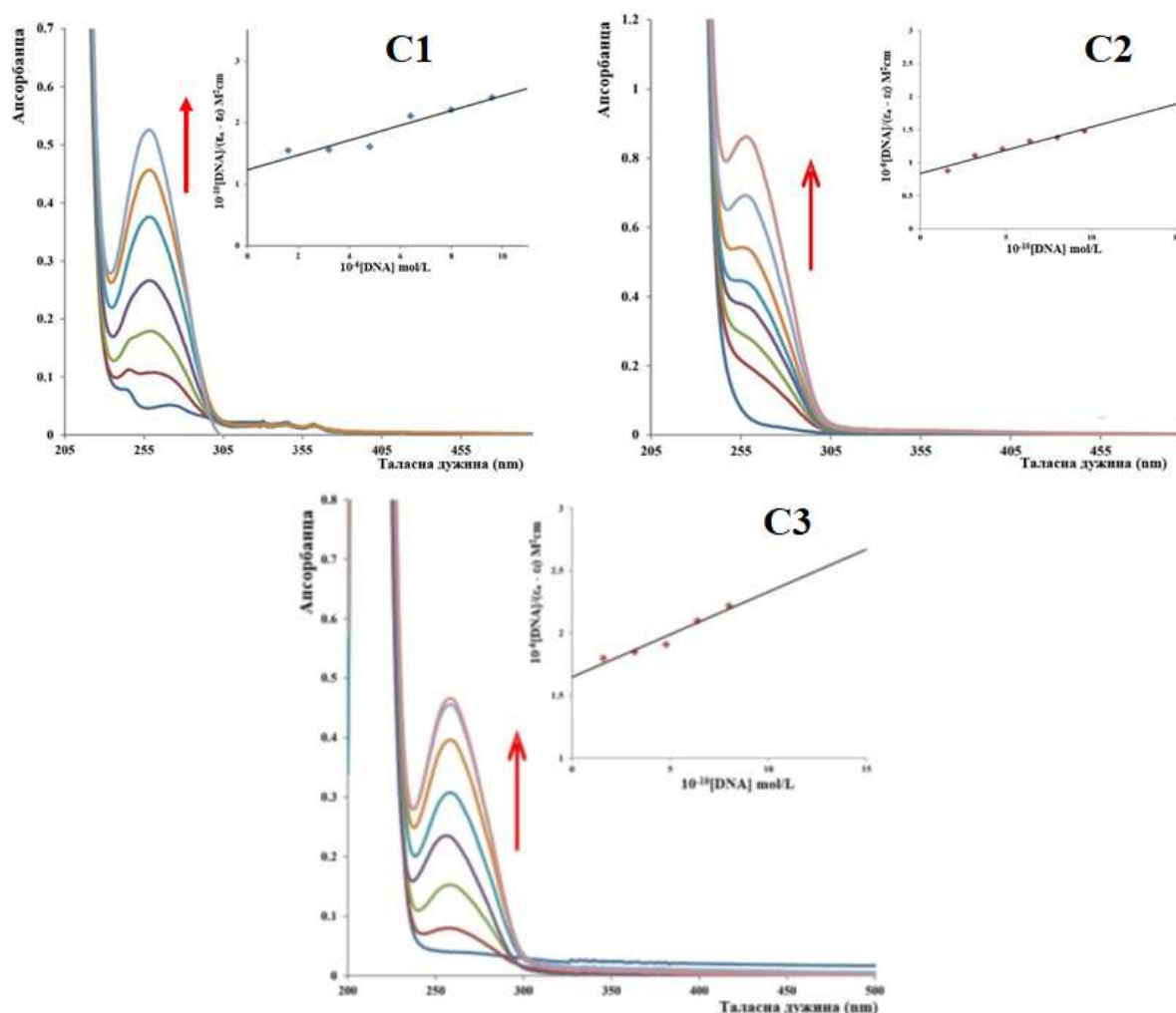
Протеини су веома заступљени у нашем организму, а серум албумин је најчешћи протеин у крвној плазми и има значајну улогу у транспорту јона метала и комплекса кроз крвни систем до ћелија и ткива [357]. Испитивање интеракција између серум албумин протеина и комплекса прелазних метала као лекова је од великог значаја, јер ове интеракције могу довести до смањења или повећања биолошке активности лека, као и до појаве нових начина транспорта ових комплекса [358]. Такође, испитивање интеракције између комплекса метала и протеина је од значаја и за боље разумевање транспорта и метаболизма јона метала у организму.

#### **4.5.1. Интеракције испитиваних паладијум(II) комплекса са ДНК**

##### **4.5.1.1. Апсорпциона мерења**

Интеракције Pd(II) комплекса са СТ-ДНК су испитане UV-Vis титрацијом. UV-Vis спектри комплекса [Pd(terpy)Cl]Cl, [Pd(en)Cl<sub>2</sub>], [Pd(DMEAIm<sup>iPr</sup>)Cl<sub>2</sub>] и [Pd(dach)Cl<sub>2</sub>] (C1-C4) снимани су на собној температури, коришћењем константних концентрација комплекса (10 μmol/L) у PBS пуферу, у одсуству и присуству различитих концентрација раствора СТ-ДНК (0–20 μmol/L) [359]. Добијене спектралне промене приказане су на Сликама 22, 23. Интензитет апсорпције комплекса може се смањивати (хипохромизам) или повећавати (хиперхромизам) са малим померањем апсорпционог максимума (батохромизам) након додавања раствора ДНК [359,360]. Додатком ДНК у испитивани раствор комплекса уочен је у свим испитиваним случајевима значајан хиперхромни ефекат са појавом новог апсорпционог максимума на 258 или 257 nm, али без уочених промена у опсегу 300–500 nm (Слика 22). Друге зависности су биле сличне и дале су

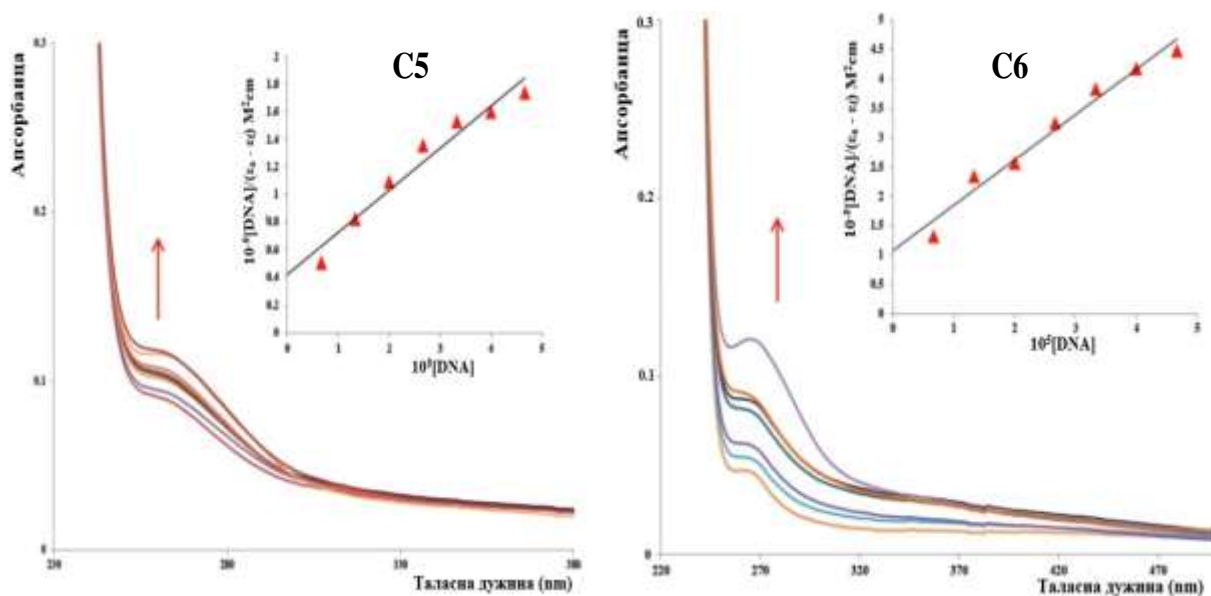
значајна хиперхромна померања са појавом новог сигнала у UV-Vis спектрима, што јасно указује да долази до интеракције између комплекса и СТ-ДНК [361,362].



**Слика 22.** Апсорпциони спектри комплекса **C1**, **C2** и **C4** у 0,01 М PBS пуферу после додавања раствора ДНК. [комплекс] = 10  $\mu$ М, [ДНК] = 0-20  $\mu$ М. Стрелица указује на промену апсорбанце са повећањем концентрације ДНК. Уметнути графици: зависност  $[\text{ДНК}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  од [ДНК]

Снимањем UV-Vis спектра комплекса **C5** и **C6** при константним концентрацијама (8  $\mu$ mol/L) у PBS пуферу, у одсуству и присуству различитих концентрација СТ-ДНК раствора (0-40  $\mu$ mol/L), добијени су слични резултати (Слика 23). Хиперхромни ефекат је примећен након додавања раствора СТ-ДНК на таласној дужини од око 260 nm. Добијени резултати указују да постоји интеракција између комплекса и молекула ДНК. Поред тога, примећено је померање апсорпционог максимума од неколико nm, које указује да је дошло до стабилизације ДНК ланца под утицајем комплекса. Примећени хиперхромни ефекат, као и померање максимума, може указати на интеракције између ароматичних хромофора комплекса и ароматичних хромофора у ланцу ДНК [153,363].

Међутим, тачан тип интеракција између комплекса и ланца ДНК се не може одредити искључиво на основу UV-Vis спектроскопије.



**Слика 23.** Апсорпциони спектри комплекса **C5** и **C6** у 0,01 М PBS пуферу после додавања раствора ДНК. [комплекс] = 10  $\mu$ М, [ДНК] = 0-20  $\mu$ М. Стрелица указује на промену апсорбанце са повећањем концентрације ДНК. Уметнути графици: зависност  $[\text{ДНК}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  од  $[\text{ДНК}]$

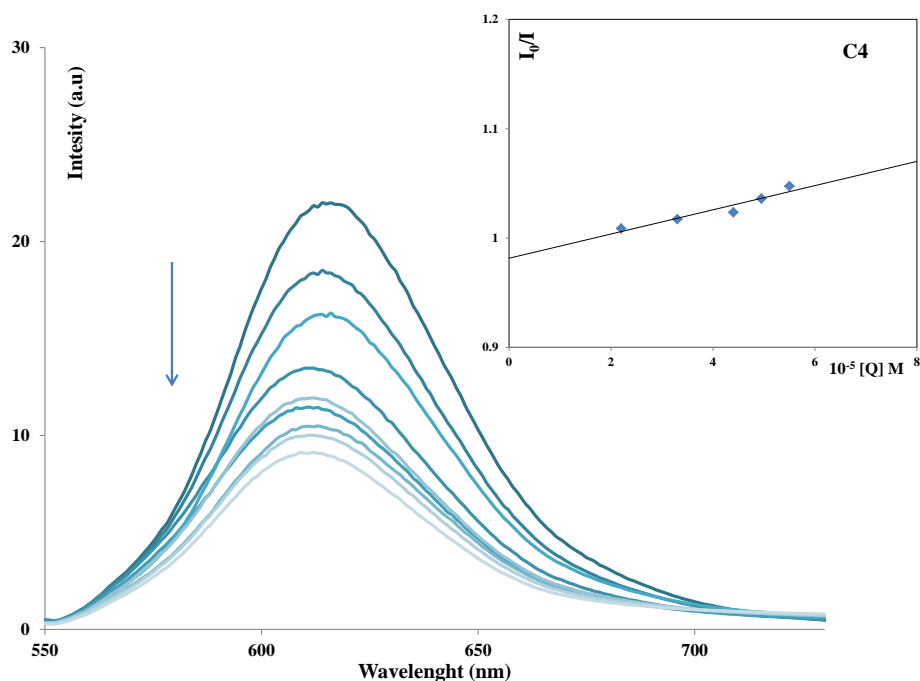
Константе везивања комплекса ( $K_b$ ) одређене су праћењем промена у апсорпцији на одговарајућој таласној дужини након додатка растућих концентрација ДНК коришћењем једначине 1 (материјал и методе 3.8.1.1.) а добијени резултати су приказани у Табели 11.

#### 4.5.1.2. Флуоресцентна мерења

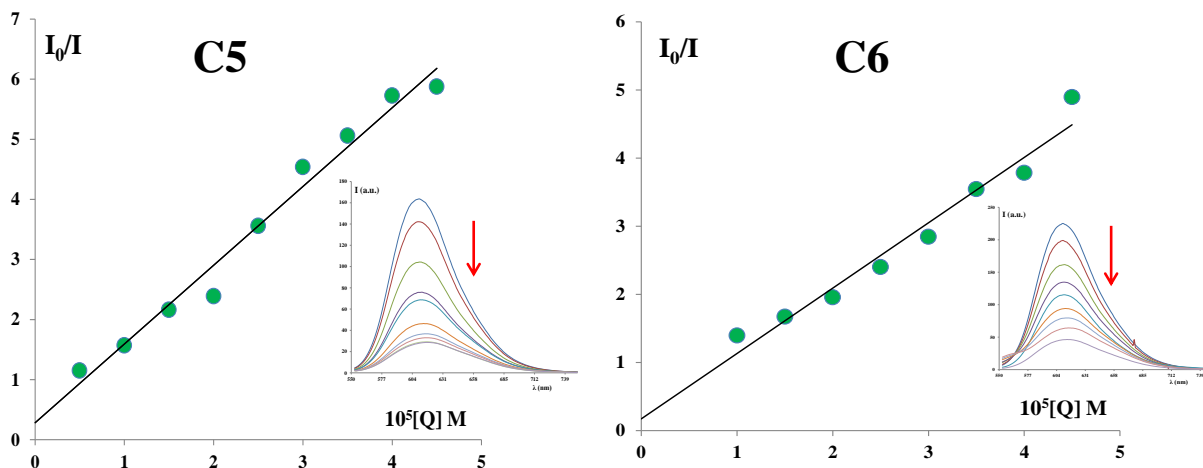
На основу апсорпционих мерења, утврђено је да испитивани комплекси ефикасно интерагују са молекулом ДНК, али сама апсорпциона мерења нису довољна да би се потврдио начин интеракције између комплекса и ланца ДНК. Мерења флуоресценције су додатно урађена како би се потврдила интеракција између испитиваних комплекса и молекула ДНК. Етидијум бромид (ЕБ) је молекул који као слободан показује мали интензитет флуоресценције. Међутим, етидијум бромид је класичан интеркалатор који показује значајан интензитет флуоресценције на око 600 nm када се интеркалира између ланца ДНК [153,364]. Уколико се молекул ЕБ из ЕБ-ДНК пара истисне другим

молекулом, флуоресценција се смањује, тј. гаси. Промене које уочавамо у ЕБ-ДНК спектрима након додатка различитих концентрација комплекса се користе за испитивање интеракција између комплекса и ДНК. Уколико испитивани комплекс може да интеркалира у ланац ДНК јаче од етидијум бромид, он ће га заменити у ланцу ДНК, што доводи до смањења интензитета флуоресценције ЕБ-ДНК пара [365,366].

Значајно смањење интензитета емисије на 612 nm након додатка растућих концентрација комплекса **C1–C4**, показује да долази до конкуренције у везивању испитиваног комплекса и ЕБ за ланац ДНК (Слика 24). Такође, значајно смањење интензитета емисије на ~ 610 nm уочено је након додатка растућих концентрација комплекса **C5** и **C6**, што указује на конкуренцију у везивању за ДНК ових комплекса и етидијум бромид (Слика 25). Смањење интензитета флуоресценције, намеће закључак да су комплекси у стању да истисну молекул ЕБ из комплекса ЕБ-ДНК и да могу значајно да интерагују са молекулом ДНК.



**Слика 24.** Емисиони спектар ЕБ-ДНК у присуству комплекса **C4**. [ЕБ]= 10  $\mu\text{mol/L}$ , [ДНК]= 10  $\mu\text{mol/L}$ , [комплекс]= 0-20  $\mu\text{mol/L}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 612 \text{ nm}$ . Стрелице показују гашење флуоресценције након додавања раствора комплексе растуће концентрације. Уметнут график: зависности  $I_0/I$  од концентрације  $[Q]$



**Слика 25.** Зависност  $I_0/I$  од концентрације  $[Q]$  ( $Q$  = комплекс). Уметнут график: Емисиони спектри ЕБ-ДНК у присуству комплекса **C5** и **C6**.  $[EB] = 10 \mu\text{mol/L}$ ,  $[ДНК] = 10 \mu\text{mol/L}$ ,  $[\text{комплекс}] = 0\text{-}10 \mu\text{mol/L}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 527 \text{ nm}$ . Стрелице показују промене у интензитету емисије након додавања растуће концентрације комплекса

Стерн-Волмерове константе за комплексе **C1–C6** су израчунате из графика зависности  $I_0/I$  од  $[Q]$ , коришћењем Стерн-Волмерове једначине, једначина 2 (материјал и методе 3.8.1.2.), добијене вредности су приказане у Табели 11. На основу вредности добијених константи  $K_{sv}$  може се закључити да испитивани комплекси интерагују са СТ-ДНК, што је у сагласности са UV-Vis спектроскопским мерењима.

**Табела 11.** Константе везивања ( $K_b$ ) и Стерн–Волмерове константе ( $K_{sv}$ ) за интеракцију комплекса **C1-C4** и ДНК

Испитивани комплекси	$K_b$ [ $M^{-1}$ ]	$K_{sv}$ [ $M^{-1}$ ]
Комплекс <b>C1</b>	$(10 \pm 0,1) \times 10^5$	$(8,6 \pm 0,1) \times 10^4$
Комплекс <b>C2</b>	$(8,7 \pm 0,1) \times 10^4$	$(5,3 \pm 0,1) \times 10^4$
Комплекс <b>C3</b> <sup>[230]</sup>	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^4$
Комплекс <b>C4</b>	$(3,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^4$

Испитивани комплекси **C1-C4** показују да умерено интерагују са молекулом ДНК, што се закључује на основу добијених вредности константи (Табела 11) реда величине  $10^4$ .

У Табели 12 приказане су добијене вредности константе  $K_b$  за испитиване **C5** и **C6** и структурно сличне комплексе.

**Табела 12.** Добијене вредности константи за интеракције испитиваних и структурно сличних Pd(II) комплекса са молекулом ДНК

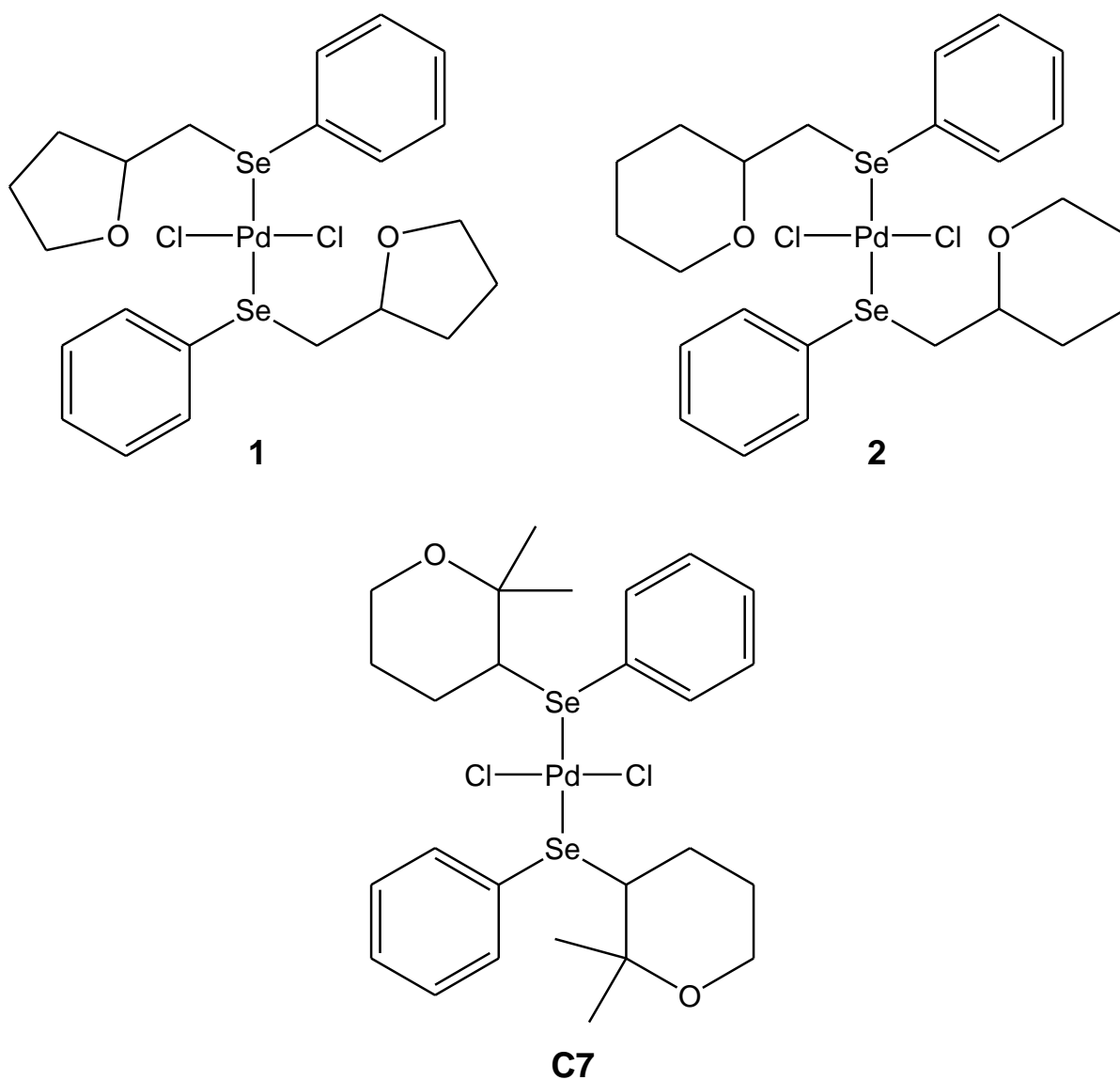
Комплекс	ДНК				Реф.
	$K_b$ [ $M^{-1}$ ]	$K_{sv}$ [ $M^{-1}$ ]	$K_{bin}$ [ $M^{-1}$ ]	$n$	
<b>C5</b>	$(7,5 \pm 0,1) \times 10^5$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^5$	$(5,0 \pm 0,1) \times 10^7$	1,6	
<b>C6</b>	$(8,0 \pm 0,1) \times 10^5$	$(9,6 \pm 0,1) \times 10^5$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^7$	1,5	
<b>1</b>	$(5,2 \pm 0,1) \times 10^5$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^5$			[230]
<b>2</b>	$(4,4 \pm 0,1) \times 10^5$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^5$			[230]
<b>C7</b>	$(3,9 \pm 0,1) \times 10^5$	$(0,9 \pm 0,1) \times 10^5$			[230]

За разлику од **C1-C4** комплекса испитивани **C5** и **C6** показују значајно већи афинитет за везивање са молекулом ДНК, ред величине добијених константи је  $10^5$ . Комплекс **C6** показује незнатно већи афинитет за везивање у односу на испитивани **C5** комплекс. Такође, испитивани комплекси **C5** и **C6** боље интерагују са комплексом ДНК него раније испитивани структурно слични комплекси **1**, **2** и **C7** (структура комплекса приказана је на Слици 26). ЕБ, који је класичан интеркалатор за ДНК има нижу вредност константе  $K_b$  ( $K_b = (1,23 \pm 0,07) \times 10^5 M^{-1}$ ) у поређењу са испитиваним комплексима, Табела 12 [230,362].

Добијени резултати на основу флуоросцентних мерења могу да се искористе и за одређивање броја места за везивање за ланац ДНК ( $n$ ), као и равнотежне константе везивања  $K_{bin}$  а на основу Scatchard [367] једначине:

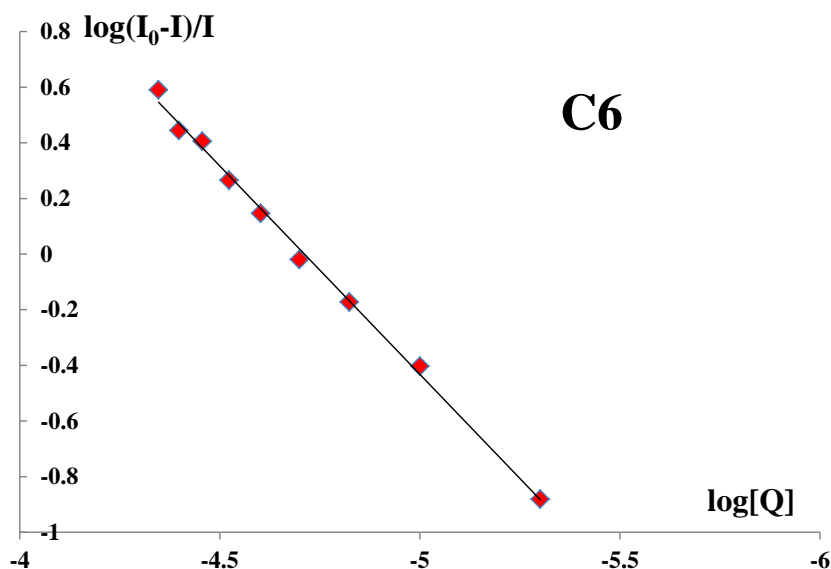
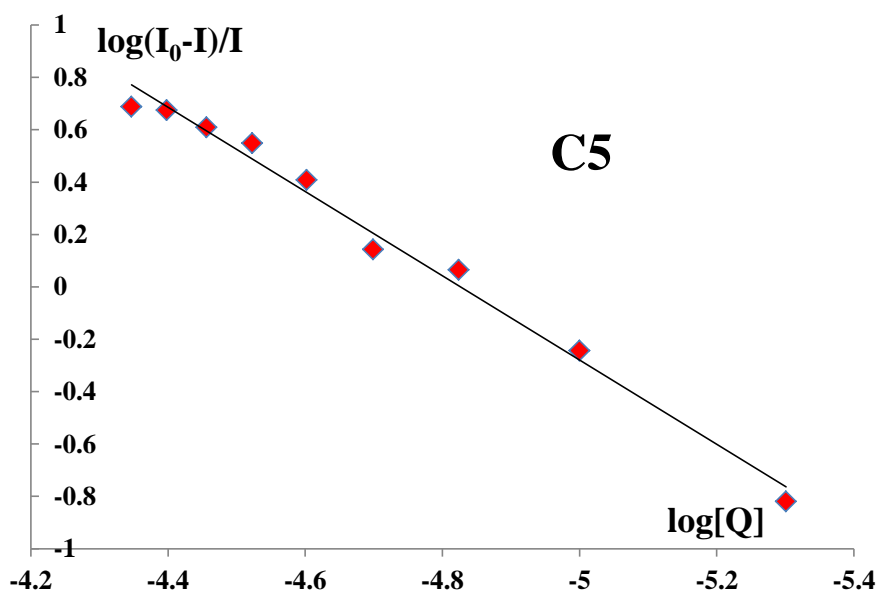
$$\log[(I_0-I)/I] = \log K_{bin} + n \log [Q] \quad (S1)$$

Консанта  $K_{bin}$  и  $n$  су одређени на основу графика зависности  $\log (I_0-I)/I$  од  $\log [Q]$ , где су  $I_0$  и  $I$  интензитети емисије у одсуству и присуству комплекса,  $[Q]$  је укупна концентрација комплекса. Добијене вредности константе  $K_{bin}$  и  $n$  су приказане у Табели 12, а график зависности  $\log [(I_0-I)/I]$  од  $\log [Q]$  за интеракцију испитиваних **C5** и **C6** и ДНК у присуству ЕБ;  $Q = C5$  или **C6** на Слици 27.



Слика 26. Структура изабраних комплекса Pd(II) са селен донорским лигандом

Вредности  $n$  од 1,5 и 1,6 указују на једно место везивања комплекса за молекул ДНК. На основу добијених вредности константи, можемо претпоставити да је интеркалација највероватнији начин интеракције између испитиваних комплекса и молекула СТ-ДНК.



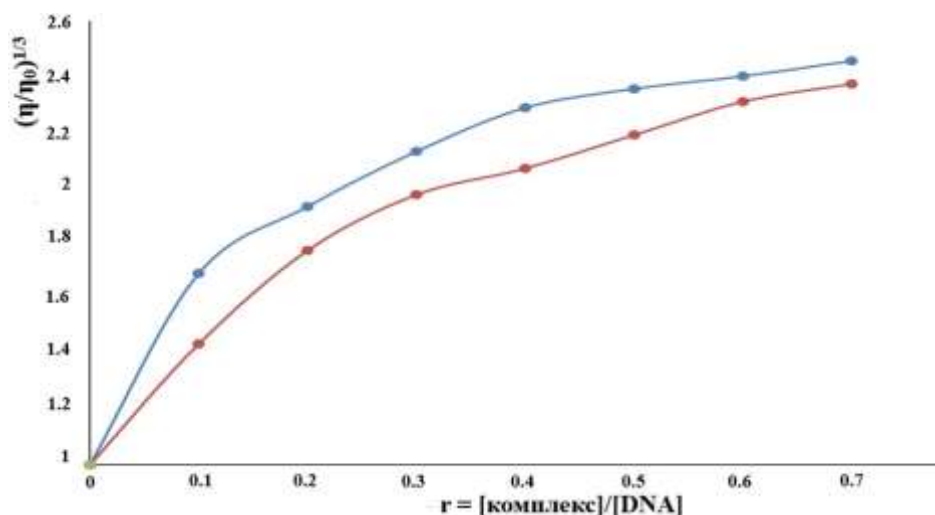
Слика 27. График зависности  $\log [(I_0-I)/I]$  од  $\log [Q]$  за интеракцију испитиваних C5 и C6 и ДНК у присуству ЕБ;  $Q = C5$  или C6

#### 4.5.1.3. Мерење вискозности

Како би се потврдила интеракција синтетисаних комплекса са молекулом ДНК, мерена је вискозност раствора ДНК у присуству и одсуству растућих концентрација комплекса C5 и C6 (Слика 28). Додавање растућих концентрација комплекса C5 и C6 (до  $r = 1,0$ ) у раствор СТ-ДНК ( $0,01 \text{ mmol/L}$ ), довело је до повећања релативне вискозности ДНК, која је била најизраженија након додавања комплекса C6. У класичној интеркалацији, једињење се умеће између базних парова ДНК, што доводи до повећања



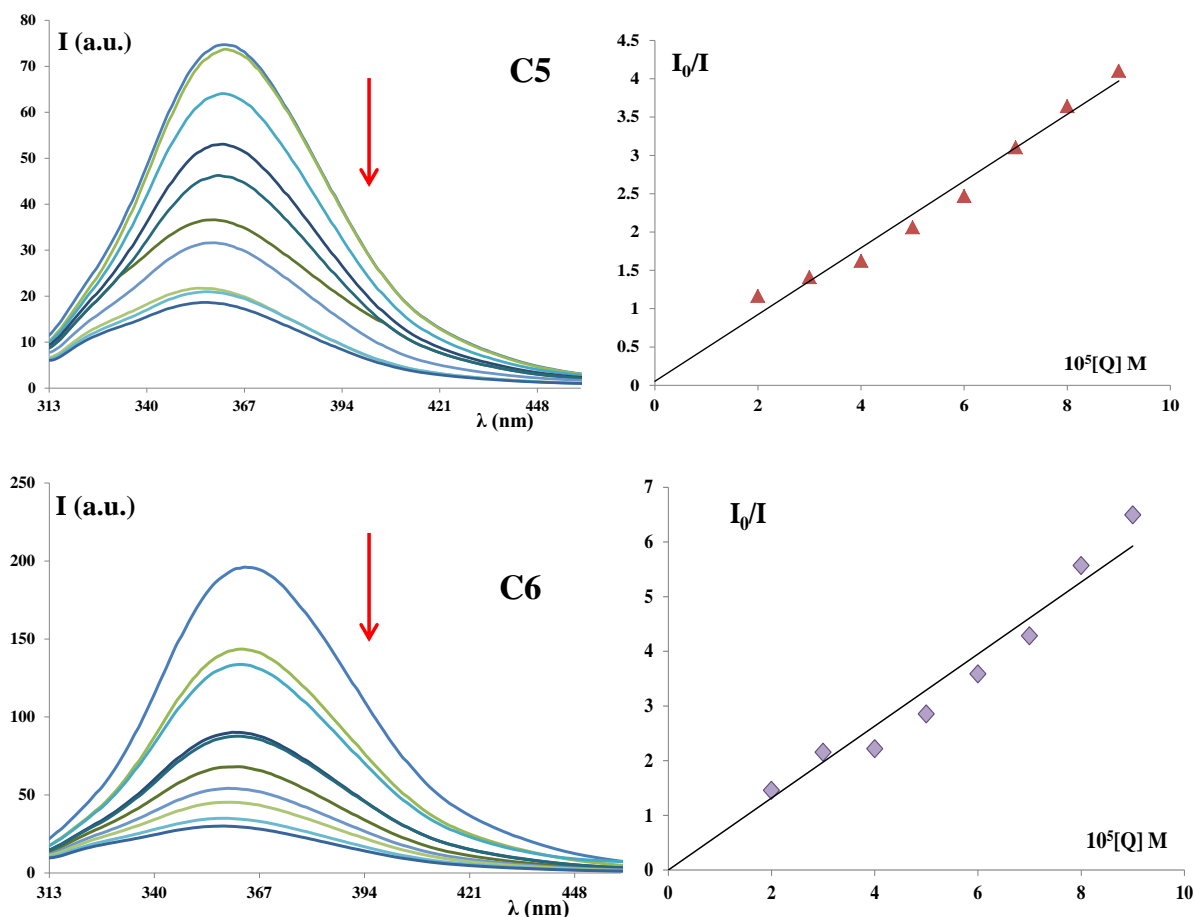
дужине ланца ДНК, а самим тим и повећања вискозности. Јачина интеракције је обично пропорционална са повећањем вискозности ДНК. Сходно томе, пораст вискозности за комплексе **C5** и **C6** је још један доказ интеркалације са молекулом ДНК, највероватније између фенилне групе комплекса и пуринских или пиримидинских база молекула ДНК.



**Слика 28.** Релативни вискозитет  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  раствора СТ-ДНК у 0,01 mmol/L раствору фосфатног пуфера (фосфатни пуферски систем=0,01 mol/L,  $C_{\text{NaCl}} = 0,137$  mol/L,  $C_{\text{KCl}} = 0,0027$  mol/L, pH=7,4) у присуству различитих концентрација ( $r$ ) комплекса **C5** и **C6**

#### 4.5.2. Интеракције комплекса паладијум(II) са серум албумином

Говеђи серум албумин (BSA) је погодан модел за испитивање јер је структурно сличан људском серум албумину (HSA) [368,369]. Раствор говеђег серум албумина показује интензивну флуоресцентну емисију на  $\lambda_{\text{em,max}} = 352$  nm, када је ексцитован на 295 nm. Додавањем комплекса **C5** и **C6** у раствор серум албумина може се уочити смањење флуоресценције на око  $\lambda = 363$  nm, што је приказано на Слици 29. Смањење флуоресценције може се приписати променама у терцијарној структури протеина насталим као последица промена окружења триптофана у серум албумину због везивања протеина за комплекс [369].



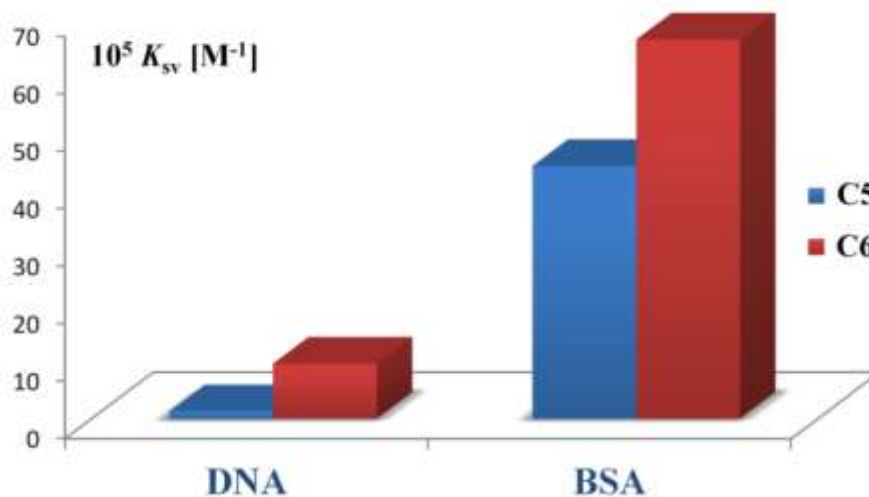
**Слика 29.** Емисиони спектри серум албумина у присуству комплекса **C5** и **C6** [серум албумин]=2  $\mu\text{M}$ , [комплекс]=0-10  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}=295 \text{ nm}$ . Стрелице показују промене интензитета након додавања раствора комплекса растуће концентрације. Убачени график: Зависност  $I_0/I$  од концентрације  $[Q]$  ( $Q$ =комплекс), са ■ означене су експериментално добијене тачке, пуне линије представљају линеарну зависност

Вредности Стерн–Волмерових константи ( $K_{\text{sv}}$ ) за интеракције комплекса **C5** и **C6** са серум албумином су одређене коришћењем Стерн–Волмерове једначине (2), где је  $I_0$  почетни интензитет флуоресценције триптофана у албумину,  $I$  је интензитет флуоресценције триптофана у албумину после додавања комплекса, а  $[Q]$  је концентрација комплекса. Вредност константе  $K_{\text{sv}}$  се може израчунати из линеарне зависности  $I_0/I$  од  $[Q]$  (Слика 29). На основу добијених података одређени су број места за везивање за ланац ДНК ( $n$ ), као и равнотежне константе везивања  $K_{\text{bin}}$  а на основу Scatchard [367] једначине (3). Добијене вредности константи приказане су у Табели 13.

**Табела 13.** Константе везивања испитиваних комплекса **C5** и **C6** са BSA

Комплекси	BSA		
	$K_{sv}[M^{-1}]$	$K_{bin}[M^{-1}]$	$n$
<b>C5</b>	$(4,4 \pm 0,1) \times 10^6$	$(3,6 \pm 0,1) \times 10^{12}$	2,4
<b>C6</b>	$(6,6 \pm 0,1) \times 10^6$	$(4,8 \pm 0,1) \times 10^8$	1,6

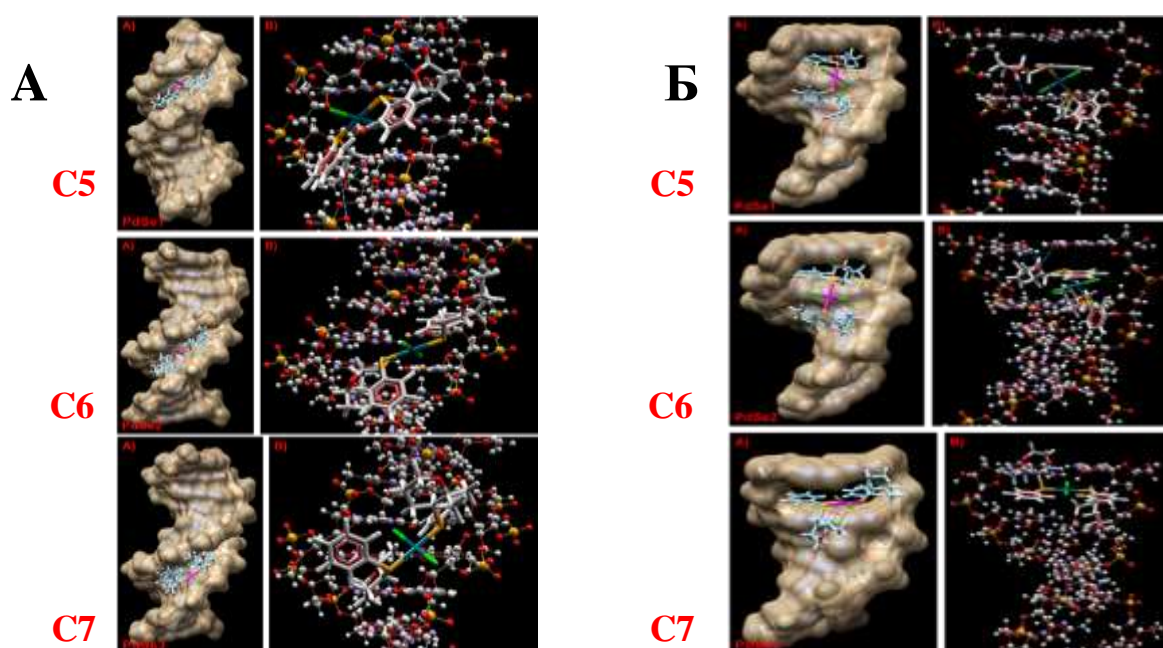
Може се приметити да испитивани комплекси Pd(II) са селен донорским лигандима врло добро интерагују и показују висок афинитет везивања за серум албумин (Табела 13). Графички приказ добијених вредности константи  $K_{sv}$  за испитиване комплексе са ДНК и серум албумином (Слика 30). Добијени подаци указују да испитивани комплекси поседују висок афинитет везивања за ДНК и серум албумин. Са слике се може видети да комплекси **C5** и **C6** имају већи афинитет везивања за серум албумин у односу на ДНК (Табеле 13, Слика 30). На основу добијених података може се закључити да је највероватнији механизам интеракција испитиваних комплекса са молекулом ДНК интеркалација. Нешто већи афинитет везивања за молекуле ДНК и серум албумин показује комплекс **C6** у поређењу са комплексом **C5**.

**Слика 30.** Вредности  $K_{sv}$  за испитиване комплексе са BSA или СТ-ДНК

### 4.5.3. Докинг молекула

Симулације тј. докинг молекула су моћни алати за одређивање компатибилности између комплекса и циљних молекула за везивање комплекса (у нашем случају, ДНК и BSA), и њиховог начина интеракције. Ови резултати се могу упоредити са експерименталним добијеним резултатима и додатно потврдити већ одређен начин интеракције између комплекса и биомолекула.

Доковањем испитиваних **C5-C7** комплекса и молекула ДНК добијени су резултати приказани на Слици 31.

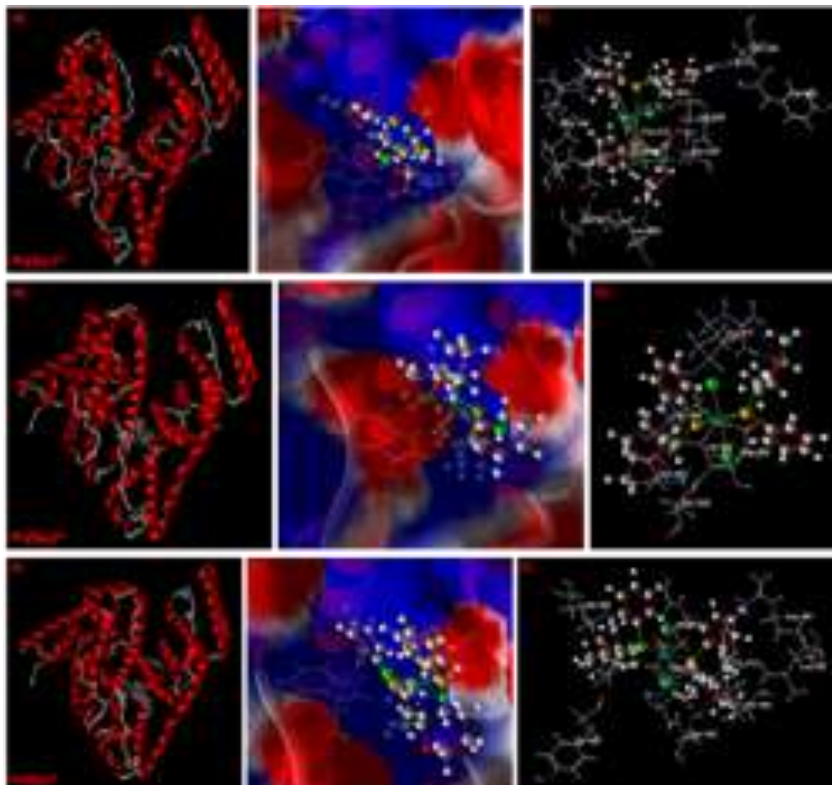


**Слика 31.** Интеракције испитиваних комплекса и молекула ДНК према начину везивања, А - где је фаворизован „minor groove“ начин везивања, Б - где је фаворизована интеркалација као начин везивања

На основу резултата добијених молекулским доковањем испитиваних комплекса може се видети да комплекси показују врло сличну способност интеракције са оба фрагмента ДНК, при чему је **C5** бољи интеркалатор, док су **C6** и **C7** показали као бољи „minor groove“. Генерално, везивање за оба фрагмента ДНК следи редослед **C6 > C5 > C7**, што је у складу са експерименталним испитивањима интеракције комплекса и ДНК. (материјал и методе 3.8.3.).

Докинг молекула испитиваних комплекса и BSA показује да се комплекс **C7** доминантно везује за субдомен ПА (место везивања I) BSA протеина, што је у складу са експерименталним подацима (материјал и методе 3.8.3) према којима је са повећањем

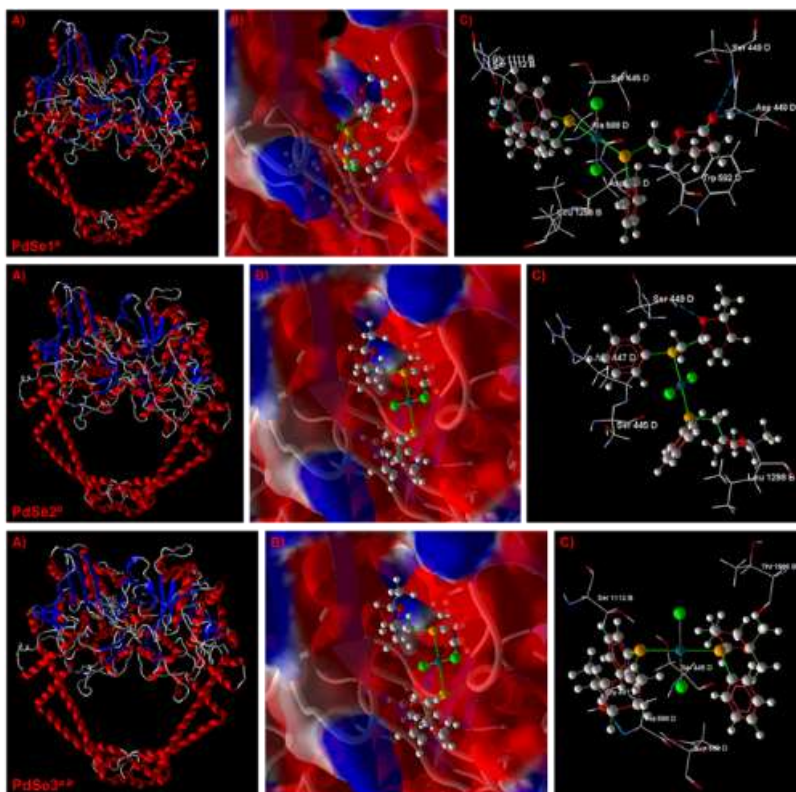
количине комплекса примећено гашење флуоресценције због интеракције између комплекса и Trp-213 из протеина. Резултати интеракције између испитиваних комплекса и Trp-213 протеина приказани су на Слици 32.



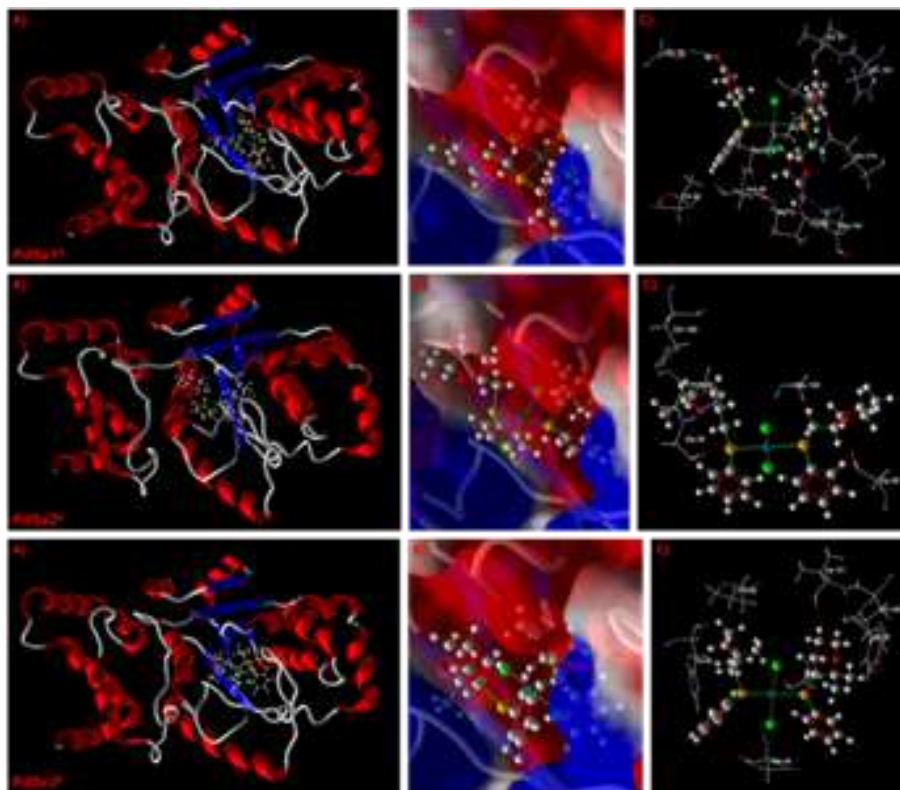
**Слика 32.** Резултати молекулског доковања за комплекс **C7** и BSA. Сlike лево приказују интеракције комплекса и молекула BSA као целине. Сlike у средини приказују улазак комплекса у унутрашњост протеина. Слика десно приказује везивање комплекса за одговарајућу аминокиселину. Плавим цртицама су приказане водоничне везе.

Молекулски докинг показује да сви испитивани комплекси добро улазе у шупљину која се налази на месту везивања I BSA протеина. Најистакнутије интеракције су уочене са аминокиселинским остацима Ser-453(H), Tyr-340, Gln-220(H), Val-343(H), Asp-450, Arg-194, Leu-197, Arg-198, Trp-213, Ser-201, Leu-480(H), Ser-343 са комплексом **C5**, Arg-217(H), Val-342, Leu-454, Ser-343(H), Asp-450, Ser-453 са комплексом **C6** и Leu-197, Val-342, Ser-343(H), Ser-453(H), Trp-213, Arg-198, Asp-450, Lys-294, Tyr-340, Gln-220(H), Arg-217 у случају комплекса **C7**. Такође уочено је и формирање водоничних веза, ова врста везе доприноси додатној стабилизацији формираног лека (BSA - комплекс) и сматра се једним од главних фактора за успешан транспорт лека кроз тело. Добијени резултати извођењем симулација молекуларног докинга су у добром складу са резултатима добијеним у експерименталним испитивањима везивања албумина и прате редослед **C6 > C5 ≥ C7**.

Топоизомераза II ДНК гиразе [370] и тирозил-тРНК синтетаза [371] представљају циљни ензиме за везивање нових антибактеријских агенаса. ДНК топоизомераза катализује промене у топологији ДНК које су неопходне за опстанак ћелије. ДНК жиразе је топоизомераза типа II која може увести негативне supercoils у ДНК потрошњом АТП-а. Неопходна је за све бактерије, али је нема код виших еукариота, што је чини привлачном метом за антимикуробне агенсе [372]. TyrRS припада аминокиселин-тРНК синтетазама (aaRSs) и одговорна је за катализу ковалентног везивања аминокиселина за одговарајућу тРНК. Дакле, инхибиција aaRS утиче на раст ћелија због њихове кључне улоге у процесу биосинтезе протеина. Резултати молекуларног докинга испитиваних комплекса и ДНК Gyг/TyrRS су приказани на Сликама 33 и 34.



**Слика 33.** Резултати молекулског доковања за ДНК Gyг и комплексе C5-C7. Сlike лево приказују спољашње везе између комплекса и ДНК Gyг. Сlike у средини приказују улазак у ДНК Gyг и интеракцију комплекса унутар молекула. Слика десно приказује везивање молекула за одређене аминокиселине у ДНК Gyг.



**Слика 34.** Резултати молекуларног доковања за TygRS ДНК и комплексе **C5-C7**. Сlike лево приказују спољашње везе између комплекса и TygRS ДНК. Сlike у средини приказују улазак у TygRS ДНК и интеракцију комплекса унутар молекула. Слика десно приказује везивање молекула за одређене аминокиселине у TygRS ДНК

Добијени резултати интеракције испитиваних комплекса са TygRS ДНК и ДНК Гур показују следећи редослед везивања комплекса **C6 > C5 > C7**. Резултати су у складу са експериментално добијеним резултатима (материјал и методе 3.8.3.). Сумирајући резултате, може се закључити да је комплекса **C6** показао најбољу способност везивања. У случају ДНК Гур уочене су следеће интеракције са аминокиселинским остацима; Trp-592(D), Asp-589(D), Ser-449(D)(H), Asp-448(D)(H), Ser-445(D), Leu-1298(B), Ala-588(D), Gly-1111(B), Ser-1112(B)(H) са комплексом **C5**, Leu-1298(B)(H), Ser-445(D), Arg-447(D), Ser-449(D)(H) са комплексом **C6** и Thr-1296(B), Gly-441(D), Ser-445(D), Asp-589(D), Ala-588(D)(H), Ser-1112(B) за комплекс **C7**). Што се тиче TygRS протеина, аминокиселине укључене у интеракције са проучаваним комплексима које треба истаћи су Gly-49(H), Thr-42, Val-191, Gln-190, Cys-37, Ala-39, Asn-124(H), Gly-72, Asp-40(H), Thr-75(H), Gln-174, Gly-38 са комплексом **C5**, Gln-190, Cys-37(H), Gly-38(H), Gly-193, Gly-49 са комплексом **C6** и Asp-40, Val-191, Tyr-36, Gln-190, Gly-38, Pro-53, His-50у случају **C6** комплекса.

Нека од ранијих истраживања су показала да мононуклеарни комплекси Pd(II) са лигандима који у својој структури садрже *bis*-пиразолпиридин показују сличну активност према молекулу СТ-ДНК и BSA као и наши испитивани комплекси [373]. *Bis*(триазинил)пиридински комплекси Pd(II), такође показују врло сличан ефекат везивања са молекулом СТ-ДНК као и испитивани комплекси [374].

Последњих неколико година интензивно се испитују динуклеарни комплекси Pd(II), као и мешовити комплекси који поред Pd(II) садрже и други јон метала а најчешће Pt(II) као сродан метал паладијуму. Наведена истраживања показују да полинуклеарни комплекси имају бољу тенденцију да реагују са молекулима СТ-ДНК и BSA у односу на мононуклеарне комплексе. Примећено је да је подједнако заступљена и интеркалација као и „*minor groove*“ начин везивања [375-377].

#### 4.6. *In vitro* генотоксична активност паладијум(II) комплекса

Генотоксична активност је испитивана код новосинтерисаних комплексе Pd(II) са селен донорским лигандима у лимфоцитима периферне крви здравих донора *in vitro*. Лиганди **L5**, **L6**, **L7** и комплекси **C5**, **C6**, **C7** у свим тестираним концентрацијама показују генотоксични ефекат у односу на негативну контролу. Када се посматрају лиганди и комплекси међусобно постоји статистички значајна разлика у деловању на различитим концентрацијама ( $p < 0,05$ ). Генотоксични ефекти који су дозно зависни уочавају се код **C5** и **L5**, док се не уочавају код комплекса **C6**, **C7**, и лиганда **L6**, **L7** при концентрацијама већим од 1  $\mu\text{g/ml}$ . У концентрацији од 1  $\mu\text{g/ml}$  **C5** и **L5** показују исто деловање, док при већим тестираним концентрацијама постоји статистички значајна разлика у деловању комплекса и лиганда, комплекс показује већу генотоксичност. За **C6** и **L6** и **C7** и **L7** не постоји статистички значајна разлика у деловању ни у једној испитиваној концентрацији. Највећи генотоксични ефекат показује комплекс **C7**, а најмањи **C5**. Генотоксични ефекти нових комплекса Pd(II) са селен донорским лигандима приказани су у Табели 14, а дистрибуција класа ћелија након третмана на Слици 35.



**Табела 14.** Генотоксични ефекти нових комплекса Pd(II) са селен донорским лигандима у култивисаним хуманим лимфоцитима применом Комет тест

Третман	Конц. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Донор	Број анал. ћелија	Дистрибуција ћелијске класе 0-4					GDI (грешка $\pm$ СД)
				0 ( $<5\%$ )	1 (5–20%)	2 (20–40%)	3 (40–95%)	4 ( $>95\%$ )	
Негативна контола	0	1	100	75	19	6	/	/	0.31
		2	100	78	12	10	/	/	0.32
		3	100	75	20	5	/	/	0.30
				76.00	17.00	7.00			0.31 $\pm$ 0.01
Позитивна контрола	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1	100	6	16	27	12	39	2,62
		2	100	/	11	20	14	55	3,13
		3	100	/	3	25	24	48	3,17
				2.00	10.00	24.00	16.67	47.33	2.97 $\pm$ 0.31*
C5	1	1	100	40	7	17	15	21	1.70
		2	100	13	37	34	4	12	1.65
		3	100	10	35	24	14	17	1.93
				21.00	26.33	25.00	11.0	16.67	1.76 $\pm$ 0.15*
	10	1	100	19	3	20	16	42	2.59
		2	100	1	27	30	18	24	2.37
		3	100	8	20	27	21	24	2.33
			9.33	16.67	25.67	18.33	30.00	2.43 $\pm$ 0.14*	
	20	1	100	13	6	22	16	43	2.70
		2	100	9	6	20	34	31	2.72
		3	100	/	13	37	16	34	2.71
			7.33	8.33	26.33	22.00	36.00	2.71 $\pm$ 0.01*	
40	1	100	2	14	27	10	47	2.86	
	2	100	7	7	21	27	38	2.82	
	3	100	/	13	32	17	38	2.80	
		3.00	11.33	26.67	18.00	41.00	2.83 $\pm$ 0.03*		

\*статистички значајна разлика и поређењу са ћелијама негативном контроле (ANOVA, \*p < 0,05)

Табела 14. - наставак

Третман	Конц. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Донор	Број анал. ћелија	Дистрибуција ћелијске класе 0-4					GDI (грешка $\pm$ СД)
				0 ( $<5\%$ )	1 (5–20%)	2 (20–40%)	3 (40–95%)	4 ( $>95\%$ )	
L5	1	1	100	10	37	35	7	11	1.72
		2	100	9	39	34	5	13	1.74
		3	100	7	51	20	10	12	1.69
				8.67	42.33	29.67	7.33	12.00	1.72 $\pm$ 0.02*
	10	1	100	3	34	33	15	15	2.05
		2	100	/	37	34	18	11	2.03
		3	100	6	37	27	11	19	2.00
			3.00	36.00	31.33	14.67	15.00	2.03 $\pm$ 0.02*	
	20	1	100	/	24	44	20	12	2.20
		2	100	2	36	28	9	25	2.19
		3	100	/	24	43	17	16	2.25
			0.67	28.00	38.33	15.33	17.67	2.21 $\pm$ 0.03*	
40	1	100	2	32	26	15	25	2.29	
	2	100	/	21	38	16	25	2.45	
	3	100	2	29	28	13	28	2.36	
		1.33	27.33	30.67	14.67	26.00	2.37 $\pm$ 0.08*		
C6	1	1	100	22	28	18	13	19	1.79
		2	100	22	19	21	13	25	2.00
		3	100	11	29	36	4	20	1.93
			18.33	25.33	25.00	10.00	21.33	1.90 $\pm$ 0.11*	
	10	1	100	3	33	31	19	14	2.08
		2	100	2	33	29	8	28	2.27
3		100	2	21	49	4	24	2.27	
		2.33	29.00	36.33	10.33	22.00	2.21 $\pm$ 0.11*		

\*статистички значајна разлика и поређењу са ћелијама негативном контроле (ANOVA, \*p &lt; 0,05)

Табела 14. - наставак

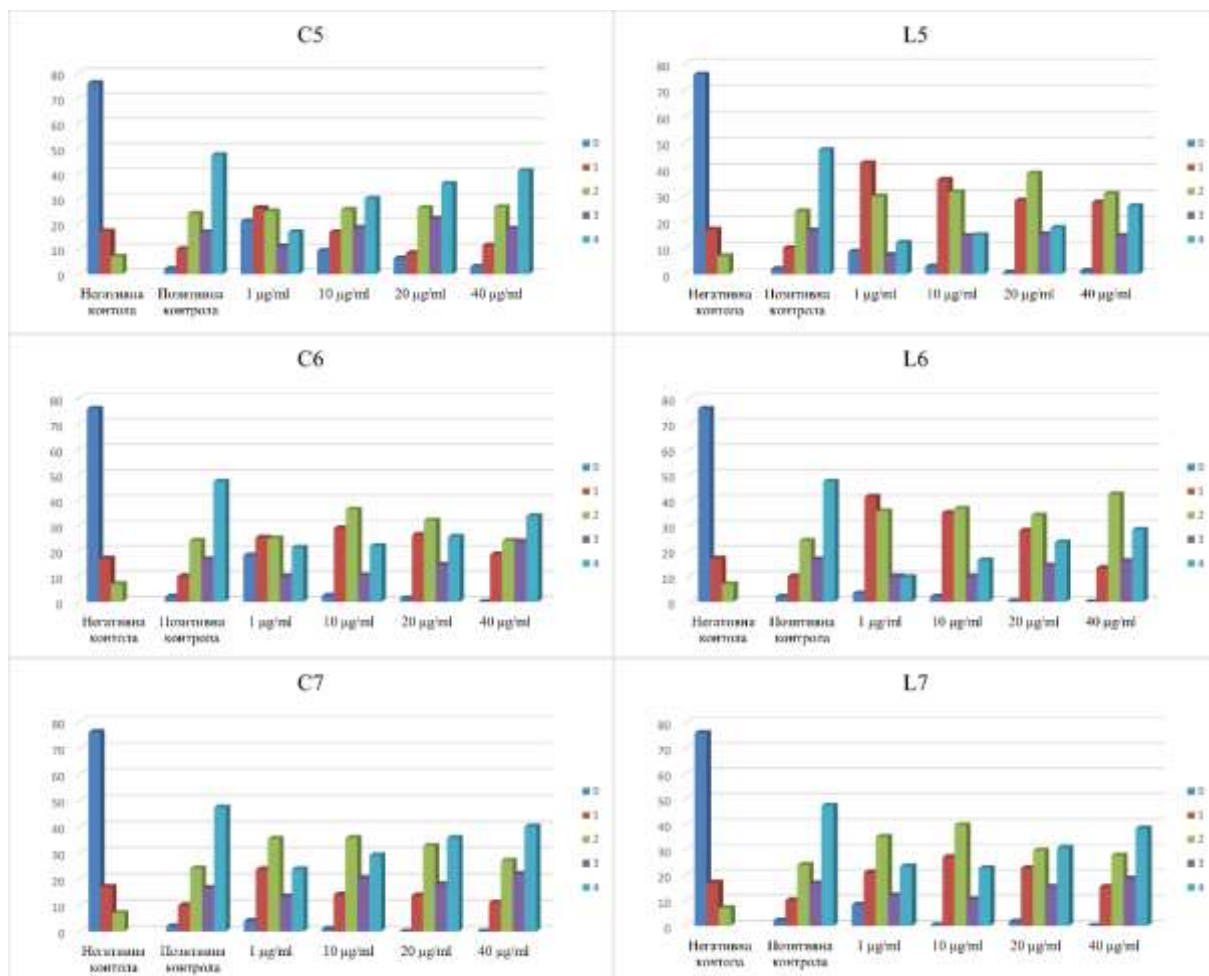
Третман	Конц. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Донор	Број анал. ћелија	Дистрибуција ћелијске класе 0-4					GDI (грешка $\pm$ СД)	
				0 ( $<5\%$ )	1 (5–20%)	2 (20–40%)	3 (40–95%)	4 ( $>95\%$ )		
С6	20	1	100	3	33	26	15	23	2.22	
		2	100	/	25	38	15	22	2.34	
		3	100	1	21	32	14	32	2.55	
					1.33	26.33	32.00	14.67	25.67	2.37 $\pm$ 0.17*
	40	1	100	/	18	30	25	27	2.61	
		2	100	/	18	21	25	36	2.79	
3		100	/	20	21	21	38	2.77		
				0.00	18.67	24.00	23.67	33.67	2.72 $\pm$ 0.10*	
L6	1	1	100	/	39	42	10	9	1.89	
		2	100	6	44	33	7	10	1.71	
		3	100	4	41	32	13	10	1.84	
					3.33	41.33	35.67	10.00	9.67	1.81 $\pm$ 0.09*
	10	1	100	3	43	28	6	20	1.97	
		2	100	/	32	44	11	13	2.05	
		3	100	3	30	38	13	16	2.09	
					2.00	35.00	36.67	10.00	16.33	2.04 $\pm$ 0.06*
	20	1	100	/	22	42	13	23	2.37	
		2	100	1	31	28	13	27	2.34	
		3	100	/	31	32	17	20	2.26	
					0.33	28.00	34.00	14.33	23.33	2.32 $\pm$ 0.06*
40	1	100	/	10	48	15	27	2.59		
	2	100	/	18	40	15	27	2.51		
	3	100	/	12	39	18	31	2.68		
				0.00	13.33	42.33	16.00	28.33	2.59 $\pm$ 0.08*	
С7	1	1	100	/	21	39	16	24	2.46	
		2	100	2	30	30	11	27	2.31	
		3	100	10	20	37	13	20	2.13	
				4.00	23.67	35.33	13.33	23.67	2.3 $\pm$ 0.16*	

\*статистички значајна разлика и поређењу са ћелијама негативном контроле (ANOVA, \*p &lt; 0,05)

Табела 14. - наставак

Третман	Конц. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Донор	Број анал. ћелија	Дистрибуција ћелијске класе 0-4					GDI (грешка $\pm$ СД)	
				0 ( $<5\%$ )	1 (5–20%)	2 (20–40%)	3 (40–95%)	4 ( $>95\%$ )		
С7	10	1	100	/	14	33	21	32	2.71	
		2	100	3	18	30	21	28	2.53	
		3	100	/	10	44	19	27	2.63	
					1.00	14.00	35.67	20.33	29.00	2.62 $\pm$ 0.09*
	20	1	100	/	11	31	21	37	2.84	
		2	100	/	24	30	11	35	2.57	
		3	100	/	6	37	22	35	2.86	
					0.00	13.67	32.67	18.00	35.67	2.76 $\pm$ 0.16*
	40	1	100	/	12	22	23	43	2.97	
2		100	/	14	25	20	41	2.88		
3		100	/	7	34	23	36	2.88		
				0.00	11.00	27.00	22.00	40.00	2.91 $\pm$ 0.05*	
L7	1	1	100	21	17	22	13	26	2.06	
		2	100	4	25	38	10	23	2.23	
		3	100	/	21	45	13	21	2.34	
					8.33	21.00	35.00	12.00	23.33	2.21 $\pm$ 0.14*
	10	1	100	/	27	45	12	16	2.17	
		2	100	1	27	36	12	24	2.31	
		3	100	/	27	38	7	28	2.36	
					0.33	27.00	39.67	10.33	22.67	2.28 $\pm$ 0.10*
	20	1	100	/	29	32	8	31	2.41	
		2	100	5	18	25	21	31	2.55	
		3	100	/	21	32	17	30	2.56	
					1.67	22.67	29.67	15.33	30.67	2.51 $\pm$ 0.08*
40	1	100	/	19	32	18	31	2.61		
	2	100	/	15	25	25	35	2.80		
	3	100	/	12	26	13	49	2.99		
				0.00	15.33	27.67	18.67	38.33	2.80 $\pm$ 0.19*	

\*статистички значајна разлика и поређењу са ћелијама негативном контроле (ANOVA, \*p &lt; 0,05)



Слика 35. Дистрибуција класа ћелија након третмана комплексима и лигандима у тестираним концентрацијама

Досадашња истраживања су показала да различита једињења паладијума или показују или не показују различити степен генотоксичности. То може зависити од самог облика паладијума, од осетљивости коришћених тестова, врста ћелија организма на којима је тестирање спроводи као и од услова под којима се тестира врши (нпр. различитих концентрација).

Ранија истраживања су показала да једињења паладијума  $\text{PdCl}_2$ ,  $\text{K}_2\text{PdCl}_4$ ,  $\text{Pd}(\text{NH}_3)_2\text{J}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$  нису била генотоксична применом микронуклеус теста (МНТ) на хуманим лимфоцитима [160,165] нити у бактеријском SOS хромотесту [160]. Насупрот томе, иста студија показује да карбоплатина, цисплатина, трансплатина и  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  изазивају значајну генотоксичност у МНТ и SOS хромотесту [160].

Једињења паладијума у бактеријском SOS хромотесту на *E. coli* PQ37, сама по себи нису била генотоксична. На њихову токсичност није утицао додаток DMSO-а и она нису повећавала степен генотоксичности и других испитиваних једињења, међу којима су једињења родијума, цисплатине и *p*-пропиолактона [161].

Комплекси платине и паладијума са селен донорским лигандима када се тестирају на ћелијској линији хеморагичног тумора јетре, нормалним матичним ћелијама јетре и ћелијама хепатоцелуларног карцинома имали су генотоксичне ефекте [378]. Поред тога, комплекси платине изазвали су више оштећења ДНК нормалних ћелија у поређењу са једињењима паладијума, али је оштећење туморских ћелија генерално било слично код оба метала. Такође, комплекси платине су изазвали већи антипролиферативни ефекат од комплекса паладијума [378].

Након излагања наночестицама паладијума, ћелије хуманог меланома (A375) почињу апоптозу на начин који зависи од дозе и дужине третмана, при чему се повећава количина реактивних врста кисеоника [379]. Комплекси паладијума се активно везују за пуринске и пиримидинске базе [380,381]. Једињење паладијума  $(C_5H_{12}NO)_2[PdCl_4]$  тестирано у култури лимфоцита периферне крви здравих донатора било је ефикасније у изазивању унакрсних веза између ланаца ДНК, од цисплатине, ефикасније је индуковао формирање ROS-а, док су оба једињења изазвала унакрсно повезивање ДНК са протеинима [168].

Kruszewski и сарадници испитивали су цитотоксичност комплексних једињења платине и паладијума на основу њихове способности да индукују унакрсно везивање ДНК молекула, које је мерено модификованим Комета тестом. Истраживање је показало да комплекси паладијума изазивају дозно зависно успоравање миграције ДНК молекула, израженије од комплекса платине, али се то није одразило на њихову токсичност. Ови резултати указују да испитивана једињења могу да изазову различиту врсту оштећења ДНК. Показано је да оштећење ДНК изазвано једињењем Pd(II) може бити другачије од оног које је изазвано комплексом Pt(II) [163]. И резултати студије са амонијум тетрафлоропалатом потврђују мишљење да је Pd(II) генотоксични облик паладијума [164].

Све наведено се поклапа са добијеним резултатима у овом истраживању. Неслагања са литературним изворима могу се објаснити различитим тестовима који су коришћени, а који и иначе дају различит степен осетљивости при добијању резултата.

#### 4.7. *In vitro* антитуморска активност паладијум(II) комплекса

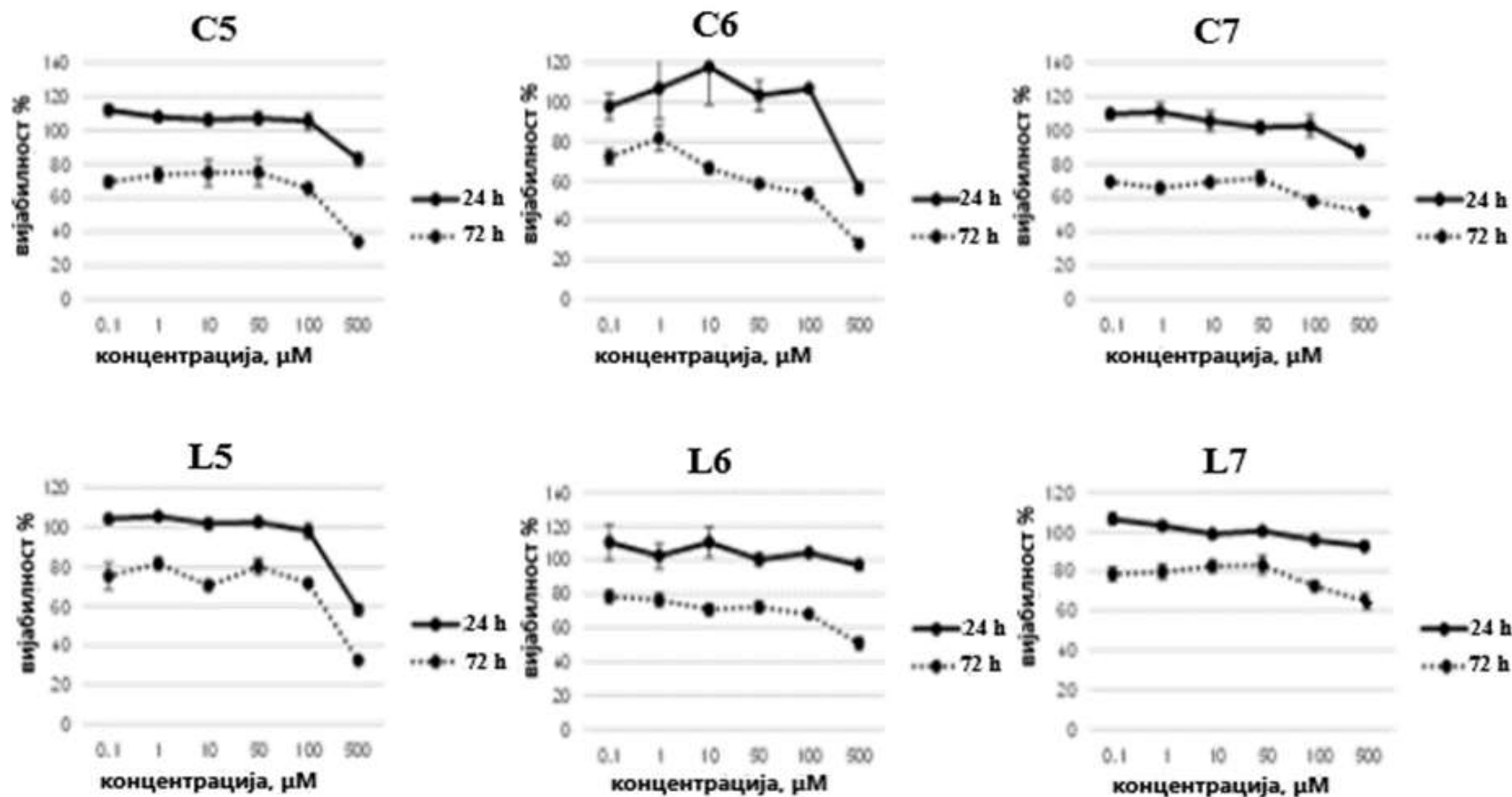
Цитотоксична активност испитиваних комплекса (C5, C6 и C7) и одговарајућих лиганата је испитивана на ћелијској линији HCT-116 колоректалног карцинома путем МТТ теста након 24 и 48 сати тестирања. Резултати су представљени у процентима вијабилних ћелија (Слика 36), док су цитотоксични ефекти изражени у IC50 вредностима (Табела 15). Тестиране супстанце смањују вијабилност ћелија на дозно и временски зависан начин и показују умерену цитотоксичну активност HCT-116 ћелија. Према добијеним резултатима, ефекти на ћелије карцинома показани су са IC50 већим од 500  $\mu\text{M}$  након 24 сата тестирања, док су неки третмани показали значајан цитотоксичан ефекат након 72 сата. Примећено је да комплекс C6 показује најзначајнији ефекат на испитиваној ћелијској линији, са IC50 мањом од 100  $\mu\text{M}$ .

Табела 15. IC50 вредности ( $\mu\text{M}$ ) испитиваних супстанци

Једињење	IC50 [ $\mu\text{M}$ ]	
	HCT-116	
	24h	72h
L5	>500	>500
L6	>500	238.35
L7	>500	>500
C5	>500	218.78
C6	>500	81,85
C7	>500	>500

Инхибиторна активност приказана као 50%-тна инхибиторна концентрација троструког експеримента

Mansuri-Torshizi са сарадницима је синтетисао бипиридинске комплексе Pd(II) са селенитом и телуритом, при чему је утврђено да су селенитни комплекси бољи цитотоксични агенси у односу на телуритне комплексе и цисплатину. Овде је утврђено да се комплекс  $[\text{bipy}]\text{Pd}(\text{SeO}_3)$  везује за ДНК помоћу ковалентне координационе везе [382].



Слика 36. Способност преживљавања ћелијске линије НСТ-116 24 h и 72 h после третмана различитим концентрацијама испитиваних Pd(II) комплекса одређивана МТТ тестом. Резултати експеримената приказани су у односу на контролу (Средња вредност ± СГ)



Од једињења која су структурно слична једињењима представљеним у дисертацији урађена је антитуморска активност лиганата 2-(фенилселанилметил)оксолана и 2-(фенилселанилметил)оксана, као и одговарајућих комплекса Pd(II) и Pt(II) на ћелијама канцера колоне НСТ-116 и ћелијама канцера дојке MDA-MB-231. Органоселенови лиганди нису показали значајан цитотоксичан ефекат, иако поседују добру антиоксидативну активност. Комплекс Pt(II) са 2-(фенилселанилметил)оксоланом показао је бољи цитотоксичан ефекат у односу на комплексе Pd(II) на ћелијама канцера колоне НСТ-116 и ћелијама канцера дојке MDA-MB-231, при чему је утврђено да је петочлана циклична етарска група повољнија од шесточлане [383]. Сахарин, или његов анјонски облик сахаринат, има добар афинитет за бројне јоне прелазних метала. Овај се лиганд користи у комбинацији са *N*-хетероциклима, као што су пиридини и терпиридини, да би се добили антиканцерогени агенси. Нека истраживања показују да ови комплекси могу да изазову апоптозу и некрозу, као и цепање ДНК у одабраним тестираним ћелијама канцера [384-389].

Полинуклеарни Pd(II) комплекси (ди- и тринуклеарни) су синтетисани да изазову продужено оштећење ДНК, спречавајући на тај начин било који механизам поправке да изазове резистенцију у туморским ћелијама. Полинуклеарни Pd(II) комплекси са полиаминима такође су тестирани на различитим ћелијским линијама рака. Иако имају обећавајући ефекат у поређењу са многим лековима на бази платине, ниједно од ових једињења још није ушло у клиничка испитивања. Прихваћено је да је начин деловања Pd(II) комплекса као цитотоксичних агенаса сличан оном који је описан за њихове структурне аналоге Pt(II), али је мало вероватно да се односи структуре и активности могу успешно упоредити.

Спермински Pd(II) динуклеарни комплекси показују добре ефекте на ћелијама канцера дојке и резистентног карцинома јајника [390,391]. Показало се да је њихов механизам интеракције с ДНК специфичан и да изазивају изобличење и локалну денатурацију структуре ДНК с ослобађањем неких база гуанина. ДНК ланци се делимично отварају и омогућавају везивање паладијума унутар ланаца ДНК [392].

Норспермидински (тринуклеарни) комплекси Pd(II) узети су у обзир због њиховог антинеопластичног потенцијала. Норспермидин је природни триамин али није присутан код људи и има антинеопластичне активности против различитих типова тумора код мишева. Овај комплекс Pd(II) је био ефикаснији од свог Pt(II) аналога, и изазивао је инхибицију раста и смрт ћелија у различитим ћелијским линијама рака. Ова једињења смањила малигност ћелија рака дојке [393].

## 5. ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата у докторској дисертацији, могу се извести следећи закључци:

### 1. Синтеза и карактеризација комплекса паладијума(II) :

- Састав награђених комплекса Pd(II) са азот и селен донорским лигандима је потврђен на основу резултата елементалне микроанализе при чему је утврђено да су експериментално нађене вредности процентуалне заступљености за угљеник, азот и водоник у сагласности са израчунатим вредностима.
- Структура синтетисаних комплекса утврђена је на основу нуклеарно-магнетно-резонанционе ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR), IR спектроскопије, и масене спектрометрије.

### 2. Испитивања *in vitro* антимикуробне активности синтетисаних комплекса:

- Тестирани азот-донорски лиганди и одговарајући комплекси Pd(II) показали су селективну и ограничену антимикуробну активност.
- Изузетак је комплекс C1 са одговарајућим лигандом L1, чији су ефекти према бактеријама *B. subtilis* и *P. aeruginosa* ATCC 27853 били бољи у односу на позитивну контролу. Исти комплекс и лиганд су такође показали и значајну активност према *P. italicum*.
- Интензитет антимикуробне активности за Pd(II) комплексе са селен донорским лигандима варира, при чему комплекси C5 и C7 показују вишу антимикуробну активност у односу на полазне лиганде. Не постоји разлика у антимикуробној активности тестираних једињења између Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија. Комплекси Pd(II) са селен донорским лигандима (комплекси C5 и C7) показали су најзначајнију активност према бактерији *P. aeruginosa*, при чему су активности биле боље у односу на позитивну контролу. Комплекс C7 показује значајну активност и према *S. aureus* (стандарду и изолату). Комплекс C5 делује и на филаментозне гљиве (*T. viridae* ATCC 13233 и врстама из рода *Aspergillus*) и то, боље или у рангу позитивне контроле.

### **3. Испитивање антибиофилм активности паладијума(II) комплекса:**

- Комплекс **C1** је показао вишу антибиофилм активност према *S. aureus* ATCC 25923 и *P. mirabilis* ATCC 12453 у поређењу са неким позитивним контролама.
- Комплекс **C7** је показао најбољи ефекат на испитивани биофилм *P. aeruginosa* (БИК50 је 125 µg/ml) и тај ефекат је бољи од контроле тетрациклина.

### **4. Испитивања антиоксидативне активности комплекса паладијума(II):**

- Од тестираних азот-донорских лиганата и њихових комплекса Pd(II) само **L4** и **C4** показују антиоксидативну активност. Комплекс **C4** има значајну антиоксидативну активност и она је неупоредиво већа од активности коју показује лиганд **L4**.
- Антиоксидативна активност свих Pd(II) комплекса са селен донорским лигандима (**C5**, **C6** и **C7**) је значајна при чему се са својом активношћу истиче **C6** комплекс.

### **5. Интеракција синтетисаних комплекса Pd(II) са молекулом СТ-ДНК и серумским албумином (BSA):**

- Интеракције комплекса Pd(II) са молекулом ДНК изолованим из крављег тимуса (СТ-ДНК), испитиване су абсорпционим (UV-Vis) и емисионим методама, мерењем вискозности и докинг методом.
- Испитивања показују да комплекси поседују добру способност за интеракцију са молекулом СТ-ДНК као и са молекулом BSA. Комплекси са селен донорским лигандима показују већи афинитет за интеракцију са молекулом СТ-ДНК у односу на комплексе са азот донорским лигандима. Уочено је да комплекси боље интерагују са молекулом BSA у односу на молекул СТ-ДНК.
- Докинг студија је показала да је заступљен и minor groove и интеркалација као начин везивања.

## 6. Испитивања *in vitro* генотоксичне активности паладијум(II) комплекса:

- Постоји статистички значајна разлика у деловању комплекса и лиганда на различитим концентрацијама. Дозно зависни генотоксични ефекти уочавају се код **C5** и **L5**, док се не уочавају код комплекса **C6**, **C7**, и лиганда **L6**, **L7** при концентрацијама већим од 1 µg/ml.
- Највећи генотоксични ефекат показује комплекс **C7**, а најмањи **C5**.

## 7. Испитивања *in vitro* антитуморске активности комплекса паладијума(II):

- Комплекси Pd(II) са селен донорским лигандима **C5**, **C6** и **C7** су испитивани *in vitro* на ћелијској линији НСТ-116 колоректалног карцинома. Комплекси Pd(II) са селен донорским лигандима показују бољу антитуморску активност према туморској линији НСТ 116, у поређењу са одговарајућим лигандима, што се може приписати координацији лиганда за Pd(II).
- Комплекс **C6** је показао најзначајнију антитуморску активност, па се може узети у обзир за даља испитивања на другим туморским линијама, као и *in vivo* испитивања.

У дисертацији може се издвојити комплекс Pd(II) са селен донорским лигандом **C5** као најмање генотоксичан, са изразитом антимикуробном активношћу према *P. aeruginosa*, и значајним деловањем на филаментозним гљивама (*T. viridae* ATCC 13233 и врстама из рода *Aspergillus*) која су боља или у рангу позитивних контрола. Овај комплекс се на даље може разматрати као потенцијални антимикуробни терапеутик. Издваја се и комплекс Pd(II) са селен донорским лигандом **C6** са изразитом антиоксидативном и цититооксичном активношћу, па и њега такође треба разматрати у правцу потенцијалног хемотерапеутика.

## 6. ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization. The top 10 causes of death, 2020. Доступно на: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. Dodds W. Disease now and potential future pandemics. In: Dodds W ed. *The World's Worst Problems*, Switzerland: Springer Nature; 2019. p. 31-44.
3. World Health Organization. *Antimicrobial resistance Global Report on Surveillance*. Доступно на: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/?sequence=1>
4. Lippert B. *Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*. Zürich: John Wiley & Sons, 1999.
5. Levinson WE, Jawetz E. *Medical Microbiology and Immunology: Examination and Board Review (Lange Medical Book Series)*. 2 ed. London: Prentice Hall, 1992.
6. Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal KS. *Medical Microbiology*. St. Louis: Mosby Year Book, 1994.
7. Regiel-Futyra A, Dąbrowski JM, Mazuryk O, Śpiewak K, Kyzioł A, Pucelik B, et al. Bioinorganic antimicrobial strategies in the resistance era. *Coordination Chemistry Reviews*. 2017; 351: 76-117.
8. Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res*. 2005; 36(6): 697-705.
9. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010; 74(3): 417-33.
10. Willyard C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature*. 2017; 543(7643): 15.
11. O'Neill J. *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations*. London: Resistance, 2016.
12. Miyata R, van Eeden SF. The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011; 257(2): 209-26.
13. Wang F, Liu F, Liu H. Effect of exposure to staphylococcus aureus, particulate matter, and their combination on the neurobehavioral function of mice. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2016; 47: 175-181.

14. Švabić-Vlahović M, Savić B, Ranin L, Đukić S, Berger-Jekić O, Nedeljković M. *Medicinska mikrobiologija*. Beograd: Savremena administracija, 2008.
15. Denyer SP, Stewart GS. Mechanisms of action of disinfectants. *International biodeterioration & biodegradation*. 1998; 41(3-4): 261-8.
16. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13(1): 42-51.
17. Brooks BD, Brooks AE. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014; 78: 14-27.
18. Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*. 2016; 529(7586): 336-43.
19. Salverda MLM, Koomen J, Koopmanschap B, Zwart MP, de Visser JAGM. Adaptive benefits from small mutation supplies in an antibiotic resistance enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114(48): 12773-8.
20. Sun D. Pull in and Push Out: Mechanisms of Horizontal Gene Transfer in Bacteria. *Front Microbiol*. 2018; 9: 2154.
21. Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev*. 1995; 59(2): 201-22.
22. B. Karakašević. *Mikrobiologija i parazitologija*. Beograd: Medicinska knjiga, 1987.
23. Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J Agric Food Chem*. 2007; 55(15): 6300-8.
24. Eaton P, Fernandes JC, Pereira E, Pintado ME, Xavier Malcata F. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*. 2008; 108(10): 1128-34.
25. Nevas M, Korhonen AR, Lindström M, Turkki P, Korkeala H. Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *J Food Prot*. 2004; 67(1): 199-202.
26. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology: an introduction*. 7th ed. California: Pearson Education, 2002.
27. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *FARMAKOLOGIJA Rang Dale Ritter Data Status*. 5th ed. Beograd: Data Status, 2005.
28. Pérez-Torrado R, Querol A. Opportunistic Strains of *Saccharomyces cerevisiae*: A Potential Risk Sold in Food Products. *Front Microbiol*. 2016; 6: 1522.

29. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(1): 133-63.
30. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2013; 62(1): 10-24.
31. Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(9): 719-27.
32. Garcia-Rubio R, de Oliveira HC, Rivera J, Trevijano-Contador N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Front Microbiol.* 2020; 10: 2993.
33. Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J, et al. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med.* 2002; 347(25): 2020-9.
34. Grela E, Zdybicka-Barabas A, Pawlikowska-Pawlega B, Cytrynska M, Wlodarczyk M, Grudzinski W, et al. Modes of the antibiotic activity of amphotericin B against *Candida albicans*. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 17029.
35. Heitman J. Cell biology. A fungal Achilles' heel. *Science.* 2005; 309(5744): 2175-6.
36. Cortés JCG, Curto MÁ, Carvalho VSD, Pérez P, Ribas JC. The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. *Biotechnol Adv.* 2019; 37(6): 107352.
37. Santos AF, Brotto DF, Favarin LRV, Cabeza NA, Andrade GR, Batistote M, et al. Study of the antimicrobial activity of metal complexes and their ligands through bioassays applied to plant extracts. *Rev. bras. farmacogn.* 2014; 24: 309–15.
38. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology.* 2013; 11(6): 371-84.
39. Psomas G, Kessissoglou DP. Quinolones and non-steroidal anti-inflammatory drugs interacting with copper (II), nickel (II), cobalt (II) and zinc (II): structural features, biological evaluation and perspectives. *Dalton transactions.* 2013; 42(18): 6252-76.
40. Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol.* 2009; 2(1): 40-61.
41. Singh R, Debnath A, Masram DT, Rathore D. Synthesis and biological activities of selected quinolone-metal complexes. *Res. J. Chem. Sci.* 2013;3: 83–94.

42. Drevensek P, Kosmrlj J, Giester G, Skauge T, Sletten E, Sepčić K, et al. X-Ray crystallographic, NMR and antimicrobial activity studies of magnesium complexes of fluoroquinolones - racemic ofloxacin and its S-form, levofloxacin. *J Inorg Biochem.* 2006; 100(11): 1755-63.
43. Uivarosi V. Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: an update. *Molecules.* 2013; 18(9): 11153-97.
44. Sultana N, Arayne MS, Rizvi SB, Haroon U, Mesaik MA. Synthesis, spectroscopic, and biological evaluation of some levofloxacin metal complexes. *Medicinal Chemistry Research.* 2013; 22(3): 1371-7.
45. Das M, Das S, Patnaik AK. Ion-solvent interaction of cobalt complexes of levofloxacin and their pharmaceutical study. *Chem. Sci. Rev. Lett.* 2014; 3(11): 454-61.
46. Feio MJ, Sousa I, Ferreira M, Cunha-Silva L, Saraiva RG, Queirós C, et al. Fluoroquinolone-metal complexes: a route to counteract bacterial resistance? *J Inorg Biochem.* 2014; 138: 129-43.
47. Tarushi A, Polatoglou E, Kljun J, Turel I, Psomas G, Kessissoglou DP. Interaction of Zn(II) with quinolone drugs: structure and biological evaluation. *Dalton Trans.* 2011; 40(37): 9461-73.
48. Debnath A, Mogha NK, Masram DT. Metal complex of the first-generation quinolone antimicrobial drug nalidixic acid: structure and its biological evaluation. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015; 175(5): 2659-67.
49. Rusu A, Hancu G, Tóth G, Vancea S, Toma F, Mare AD, et al. New silver complexes with levofloxacin: Synthesis, characterization and microbiological studies. *Journal of Molecular Structure.* 2016; 1123: 384-93.
50. Vieira LM, de Almeida MV, Lourenço MC, Bezerra FA, Fontes AP. Synthesis and antitubercular activity of palladium and platinum complexes with fluoroquinolones. *Eur J Med Chem.* 2009; 44(10): 4107-11.
51. Patel MN, Gandhi DS, Parmar PA. DNA interaction and in-vitro antibacterial studies of fluoroquinolone based platinum (II) complexes. *Inorganic Chemistry Communications.* 2012; 15: 248-51.
52. Zordok WA, El-Shwiniy WH, El-Attar MS, Sadeek SA. Spectroscopic, thermal analyses, structural and antibacterial studies on the interaction of some metals with ofloxacin. *Journal of Molecular Structure.* 2013; 1047: 267-76.
53. Refat MS. Synthesis and characterization of norfloxacin-transition metal complexes (group 11, IB): spectroscopic, thermal, kinetic measurements and biological activity.



- Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2007; 68(5): 1393-405.
54. Li MT, Sun JW, Sha JQ, Wu HB, Zhang EL, Zheng TY. An unprecedented Ag–pipemidic acid complex with helical structure: Synthesis, structure and interaction with CT-DNA. *Journal of Molecular Structure*. 2013; 1045: 29-34.
  55. Soayed AA, Refaat HM, El-Din DA. Metal complexes of moxifloxacin–imidazole mixed ligands: Characterization and biological studies. *Inorg. Chim. Acta* 2013; 406: 210–30.
  56. Soayed AA, Refaat HM, El-Din DA. Characterization and biological activity of Pefloxacin–imidazole mixed ligands complexes. *Inorganica Chimica Acta*. 2014; 421: 59-66.
  57. Sultana N, Naz A, Arayne MS, Mesaik MA. Synthesis, characterization, antibacterial, antifungal and immunomodulating activities of gatifloxacin–metal complexes. *Journal of Molecular Structure*. 2010; 969(1-3): 17-24.
  58. Paixão DA, Marzano IM, Jaimes EHL, Pivatto M, Campos DL, Pavan FR, et al. Novel copper(II) complexes with hydrazides and heterocyclic bases: Synthesis, structure and biological studies. *J Inorg Biochem*. 2017; 172: 138-46
  59. Byarugaba DK. Mechanisms of antimicrobial resistance. In: Kariuki S ed. *Antimicrobial resistance in developing countries*, New York: Springer; 2010. p. 15-26
  60. Guerra W, de Andrade Azevedo E, de Souza Monteiro AR, Bucciarelli-Rodriguez M, Chartone-Souza E, Nascimento AM, et al. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of three palladium(II) complexes of tetracyclines. *J Inorg Biochem*. 2005; 99(12): 2348-54.
  61. Skiba J, Rajnisz A, de Oliveira KN, Ott I, Solecka J, Kowalski K. Ferrocenyl bioconjugates of ampicillin and 6-aminopenicillanic acid--synthesis, electrochemistry and biological activity. *Eur J Med Chem*. 2012; 57: 234-9.
  62. Guerra W, Silva IR, Azevedo EA, Monteiro AR, Bucciarelli-Rodriguez M, Chartone-Souza E, et al. Three new complexes of platinum (II) with doxycycline, oxytetracycline and chlortetracycline and their antimicrobial activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2006; 17: 1627-33.
  63. Kong B, Joshi T, Belousoff MJ, Tor Y, Graham B, Spiccia L. Neomycin B-cyclen conjugates and their Zn(II) complexes as RNA-binding agents. *J Inorg Biochem*. 2016; 162: 334-42.

64. Lewandowski EM, Skiba J, Torelli NJ, Rajnisz A, Solecka J, Kowalski K, et al. Antibacterial properties and atomic resolution X-ray complex crystal structure of a ruthenocene conjugated  $\beta$ -lactam antibiotic. *Chemical Communications*. 2015; 51(28): 6186-9.
65. Pillai MS, Latha SP. Designing of some novel metallo antibiotics tuning biochemical behaviour towards therapeutics: synthesis, characterisation and pharmacological studies of metal complexes of cefixime. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2016; 20: S60-6
66. Sabale PM, Kaur P, Patel Y, Patel J, Patel R. Metalloantibiotics in therapy: an overview. *J Chem Pharm Res*. 2012; 4(11): 4921-36.
67. Sharaby CM, Amine MF, Hamed AA. Synthesis, structure characterization and biological activity of selected metal complexes of sulfonamide Schiff base as a primary ligand and some mixed ligand complexes with glycine as a secondary ligand. *Journal of Molecular Structure*. 2017; 1134C 208-16.
68. Medici S, Peana M, Nurchi VM, Lachowicz JI, Crisponi G, Zoroddu MA. Noble metals in medicine: Latest advances. *Coordination Chemistry Reviews*. 2015; 284: 329-50.
69. Aslam S, Isab AA, Alotaibi MA, Saleem M, Monim-ul-Mehboob M, Ahmad S, et al. Synthesis, spectroscopic characterization, DFT calculations and antimicrobial properties of silver (I) complexes of 2, 2'-bipyridine and 1, 10-phenanthroline. *Polyhedron*. 2016; 115: 212-8.
70. Segura DF, Netto AV, Frem RC, Mauro AE, da Silva PB, Fernandes JA, et al. Synthesis and biological evaluation of ternary silver compounds bearing N, N-chelating ligands and thiourea: X-ray structure of  $[\{Ag (bpy)(\mu-tu)\}_2](NO_3)_2$  (bpy= 2, 2'-bipyridine; Tu= thiourea). *Polyhedron*. 2014; 79: 197-206.
71. Bolhuis A, Hand L, Marshall JE, Richards AD, Rodger A, Aldrich-Wright J. Antimicrobial activity of ruthenium-based intercalators. *Eur J Pharm Sci*. 2011; 42(4): 313-7.
72. Lam PL, Lu GL, Hon KM, Lee KW, Ho CL, Wang X, et al. Development of ruthenium(II) complexes as topical antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Dalton Trans*. 2014; 43(10): 3949-57.
73. Pavan FR, Poelhsitz GV, Barbosa MI, Leite SR, Batista AA, Ellena J, et al. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: inorganic compounds as agents against tuberculosis. *Eur J Med Chem*. 2011; 46(10): 5099-107.

74. Pavan FR, Poelhsitz GV, da Cunha LV, Barbosa MI, Leite SR, Batista AA, et al. In vitro and in vivo activities of ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes (SCAR) against *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 2013; 8(5): e64242.
75. Gorle AK, Feterl M, Warner JM, Primrose S, Constantinoiu CC, Keene FR, et al. Mononuclear Polypyridylruthenium(II) Complexes with High Membrane Permeability in Gram-Negative Bacteria-in particular *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry*. 2015; 21(29): 10472-81.
76. Li F, Collins JG, Keene FR. Ruthenium complexes as antimicrobial agents. *Chem Soc Rev*. 2015; 44(8): 2529-42.
77. Aktan E, Gündüzalp AB, Özmen ÜÖ. Structural, physicochemical characterization, theoretical studies of carboxamides and their Cu (II), Zn (II) complexes having antibacterial activities against *E. coli*. *Journal of Molecular Structure*. 2017; 1128: 775-84.
78. Starosta R, Stokowa K, Florek M, Król J, Chwiłkowska A, Kulbacka J, et al. Biological activity and structure dependent properties of cuprous iodide complexes with phenanthrolines and water soluble tris (aminomethyl) phosphanes. *Journal of inorganic biochemistry*. 2011; 105(8): 1102-8.
79. Starosta R, Bykowska A, Kyzioł A, Płotek M, Florek M, Król J, et al. Copper(I) (pseudo)halide complexes with neocuproine and aminomethylphosphines derived from morpholine and thiomorpholine - in vitro cytotoxic and antimicrobial activity and the interactions with DNA and serum albumins. *Chem Biol Drug Des*. 2013; 82(5): 579-86.
80. Bykowska A, Starosta R, Komarnicka UK, Ciunik Z, Kyzioł A, Guz-Regner K, et al. Phosphine derivatives of ciprofloxacin and norfloxacin, a new class of potential therapeutic agents. *New Journal of Chemistry*. 2014; 38(3): 1062-71.
81. Komarnicka UK, Starosta R, Guz-Regner K, Bugła-Płoskońska G, Kyzioł A, Jeżowska-Bojczuk M. Phosphine derivatives of sparfloxacin—synthesis, structures and in vitro activity. *Journal of Molecular Structure*. 2015; 1096: 55-63.
82. Sadeek SA, El-Shwiniy WH, El-Attar MS. Synthesis, characterization and antimicrobial investigation of some moxifloxacin metal complexes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2011; 84(1): 99-110.
83. Asiri AM, Khan SA. Palladium(II) complexes of NS donor ligands derived from steroidal thiosemicarbazones as antibacterial agents. *Molecules*. 2010; 15(7): 4784-91.

84. Kizilcikli I, Kurt YD, Akkurt B, Genel AY, Birteksöz S, Otük G, et al. Antimicrobial activity of a series of thiosemicarbazones and their Zn(II) and Pd(II) complexes. *Folia Microbiol (Praha)*. 2007; 52(1): 15-25.
85. Akbar Ali M, Mirza AH, Butcher RJ, Tarafder MT, Keat TB, Ali AM. Biological activity of palladium(II) and platinum(II) complexes of the acetone Schiff bases of S-methyl- and S-benzylthiocarbamate and the X-ray crystal structure of the [Pd(asm)<sub>2</sub>] (asm=anionic form of the acetone Schiff base of S-methylthiocarbamate) complex. *J Inorg Biochem*. 2002; 92(3-4):141-8.
86. Patel MN, Dosi PA, Bhatt BS. Interaction of palladium (II) coordination compounds with calf thymus DNA and their antibacterial activity. *Inorganic Chemistry Communications*. 2012; 21: 61-4.
87. Radić GP, Glođović VV, Radojević ID, Stefanović OD, Čomić LR, Ratković ZR, et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium (II) complexes with some alkyl derivatives of thiosalicylic acids: crystal structure of the bis (S-benzylthiosalicylate)-palladium (II) complex, [Pd (S-bz-thiosal) <sub>2</sub>]. *Polyhedron*. 2012; 31(1): 69-76.
88. Vasić GP, Glodjović VV, Radojević ID, Stefanović OD, Čomic LJ. R., Djinović VM, et al. Stereospecific ligands and their complexes. V. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium (II) complexes with some alkyl esters of (S, S)-ethylenediamine-N, N'-di-2-propanoic acid. *Inorganica Chimica Acta*. 2010; 363: 3606-10.
89. Radić GP, Glođović VV, Ratković ZR, Novaković SB, Garcia-Granda S, Roces L, et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of novel platinum (IV) and palladium (II) complexes with meso-1, 2-diphenyl-ethylenediamine-N, N'-di-3-propanoic acid—Crystal structure of H<sub>2</sub>-1, 2-dpheddp• 2HCl• H<sub>2</sub>O. *Journal of Molecular Structure*. 2012; 1029: 180-6.
90. Potočňák I, Drweesh SA, Farkasová V, Lüköová A, Sabolová D, Radojević ID, et al. Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. Part IX: Synthesis, structures, spectra, in vitro antimicrobial and anti-tumor activities and DNA binding of Pd (II) complexes with 7-bromo-quinolin-8-ol. *Polyhedron*. 2017; 135: 195-205.
91. Mishra AK, Kaushik NK. Synthesis, characterization, cytotoxicity, antibacterial and antifungal evaluation of some new platinum (IV) and palladium (II) complexes of thiodiamines. *Eur J Med Chem*. 2007; 42(10): 1239-46.

92. Prasad KS, Kumar LS, Revanasiddappa HD, Vijay B, Jayalakshmi B. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of Cu (II), Co (II), Ni (II), Pd (II) and Ru (III) complexes with clomiphene citrate. *Chem. Sci. J.* 2011; 28: 1.
93. Samota MK, Seth G. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of palladium (II) and platinum (II) complexes with 2-substituted benzoxazole ligands. *Heteroatom Chemistry: An International Journal of Main Group Elements.* 2010; 21(1): 44-50.
94. Ramappa PG, Somashekharappa KG. *Journal of Chemical Sciences.* New Delhi: Indian Academy of Sciences, 1994.
95. Nawrot-Modranka J, Nawrot E. Synthesis, spectroscopy and alkylating properties of Pd(II) complexes of phosphorohydrazones of coumarin and chromone with potential antibacterial activity. *Acta Pol Pharm.* 2007; 64(5): 429-34.
96. Kirubavathy SJ, Velmurugan R, Parameswari K, Chitra S. Synthesis, characterization and biological evaluation of Cu (II), Co (III) and Fe (III) complexes of 2-benzoyl-3-(nitrophenyl) quinoxaline. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 2014; 5(6): 2508.
97. Tetko IV, Jaroszewicz I, Platts JA, Kuduk-Jaworska J. Calculation of lipophilicity for Pt (II) complexes: experimental comparison of several methods. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 2008; 102(7): 1424-37.
98. BANIN, Ehud, et al. The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-Pseudomonas therapeutic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 2008, 105.43: 16761-6.
99. Karpin GW, Morris DM, Ngo MT, Merola JS, Falkinham III JO. Transition metal diamine complexes with antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). *MedChemComm.* 2015; 6(8): 1471-8.
100. Mishra N, Poonia K, Sharma N, Soni SK, Kumar D. Synthesis and characterization of thorium (IV) complexes of 2-aminothiazole and their evaluation as effective antimicrobial and antioxidant agents. *Polyhedron.* 2016; 120: 196-204.
101. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001; 9(1): 34-9.
102. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2(2): 114-22.
103. Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2017; 307(8): 481-9.

104. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* 2005; 13(1): 7-10.
105. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2(2): 95-108.
106. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am.* 1978; 238(1): 86-95.
107. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 167-93.
108. Milanov D, Ašanin R, Vidić B, Petrović J, Krnjajić D. Biofilm – organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. *Arhiv veterinarske medicine.* 2008; 1: 5–15.
109. Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 155-66.
110. Dreeszen PH. Biofilm: The key to understanding and controlling bacterial growth in automated drinking water systems. Waterford: Edstrom Industries, 2003.
111. Characklis WG. Bioengineering report: fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnology and Bioengineering.* 1981; 23(9): 1923-60.
112. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of applied bacteriology.* 1993; 75(6): 499-511.
113. Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International journal of food microbiology.* 1998; 42(1-2): 9-27.
114. Deibel V, Schoeni J. Biofilms: forming a defense strategy for the food plant. *Food Saf. Mag,* 2002.
115. Steinberg D, Feldman M, Ofek I, Weiss EI. Cranberry high molecular weight constituents promote *Streptococcus sobrinus* desorption from artificial biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2005; 25(3): 247-51.
116. Beeton ML, Aldrich-Wright JR, Bolhuis A. The antimicrobial and antibiofilm activities of copper(II) complexes. *J Inorg Biochem.* 2014; 140: 167-72.
117. Nayak M, Singh AK, Prakash P, Kant R, Bhattacharya S. Structural studies on thiosalicylate complexes of Zn (II) & Hg (II). First insight into Zn (II)-thiosalicylate complex as potential antibacterial, antibiofilm and anti-tumour agent. *Inorganica Chimica Acta.* 2020; 501: 119263.
118. Vaidya MY, McBain AJ, Butler JA, Banks CE, Whitehead KA. Antimicrobial efficacy and synergy of metal ions against *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in planktonic and biofilm phenotypes. *Scientific reports.* 2017; 7(1): 1-9.

119. Cheng H, Xie Y, Villalobos LF, Song L, Peinemann KV, Nunes S, et al. Antibiofilm effect enhanced by modification of 1,2,3-triazole and palladium nanoparticles on polysulfone membranes. *Sci Rep.* 2016; 6: 24289.
120. Murugesan B, Sonamuthu J, Samayanan S, Arumugam S, Mahalingam S. Highly biological active antibiofilm, anticancer and osteoblast adhesion efficacy from MWCNT/PPy/Pd nanocomposite. *Applied Surface Science.* 2018; 434: 400-11.
121. Rajkumar D, Rubini D, Sudharsan M, Suresh D, Nithyanand P. Novel thiazolinylnicotinamide based palladium (II) complex-impregnated urinary catheters quench the virulence and disintegrate the biofilms of uropathogens. *Biofouling.* 2020; 36(3): 351-67.
122. Halliwell B, Kaur H, Ingelman-Sundberg M. Hydroxylation of salicylate as an assay for hydroxyl radicals: a cautionary note. *Free radical biology & medicine.* 1991; 10(6): 439-41.
123. Halliwell B, Gutteridge, JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* In: Halliwell B. and Gutteridge JMC ed. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford: University Press; 1999. p. 1-25.
124. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3th ed. New York: Oxford University Press, 1999.
125. Lü JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(4): 840-60.
126. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 160(1): 1-40.
127. Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 1994; 65(1): 27-33.
128. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008; 4(2): 89-96.
129. Kotchoni SO, Gachomo EW. The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *J Biosci.* 2006; 31(3): 389-404.
130. Lane N. A unifying view of ageing and disease: the double-agent theory. *J Theor Biol.* 2003; 225(4): 531-40.
131. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984; 219(1): 1-14.

132. Liu TZ, Lin TF, Chiu DT, Tsai KJ, Stern A. Palladium or platinum exacerbates hydroxyl radical mediated DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23(1): 155-61.
133. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; 30(6): 620-50.
134. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc.* 1998; 75(2): 199-212.
135. G.M. Nikolić, R.S. Nikolić, B.Lj. Milić, J.M. Čanadanović-Brunet. Primena metode elektroske spinske rezonance za proučavanje antioksidativnih svojstava prirodnih fenolnih jedinjenja. *Acta Fac. Med. Naiss.* 1998; 15: 183–188.
136. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun.* 1990; 9(1): 1-32.
137. Khlebnikov AI, Schepetkin IA, Domina NG, Kirpotina LN, Quinn MT. Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg Med Chem.* 2007; 15(4): 1749-70.
138. Kancheva VD. Phenolic antioxidants—radical-scavenging and chain-breaking activity: A comparative study. *European Journal of Lipid Science and Technology.* 2009; 111(11): 1072-89.
139. Puglia CD, Powell SR. Inhibition of cellular antioxidants: a possible mechanism of toxic cell injury. *Environmental health perspectives.* 1984; 57: 307-11.
140. Martinet W, Knaapen MW, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 2002; 106(8): 927-32.
141. Brude IR, Drevon CA, Hjermann I, Seljeflot I, Lund-Katz S, Saarem K, et al. Peroxidation of LDL from combined-hyperlipidemic male smokers supplied with omega-3 fatty acids and antioxidants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17(11): 2576-88.
142. Groves JT. Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr Opin Chem Biol.* 1999; 3(2): 226-35.
143. Kromhout D. Fatty acids, antioxidants, and coronary heart disease from an epidemiological perspective. *Lipids.* 1999; 34(27): 31.



144. Tetteh S, Dodoo DK, Appiah-Opong R, Tuffour I. Spectroscopic characterization, in vitro cytotoxicity, and antioxidant activity of mixed ligand palladium (II) chloride complexes bearing nucleobases. *Journal of Inorganic Chemistry*. 2014; 1: 7.
145. Mašković JM, Mašković PZ, Koval'chuk TV, Loginova NV, Trifunović SR. Thermal Analysis, Antioxidant and in vitro Antimicrobial Activity of Palladium (II) Complexes with N, N'-Ethylenediamine Bidentate Ester Ligands. *Der Chemica Sinica*, 2018; 9(1): 535-43.
146. Sharma NK, Ameta RK, Singh M. Curcumin Mediated Attenuation of Carbofuran Induced Oxidative Stress in Rat Brain. *Biochem Res Int*. 2016;2016:7637931.
147. Lu J, Sun Q, Li JL, Jiang L, Gu W, Liu X, et al. Two water-soluble copper(II) complexes: synthesis, characterization, DNA cleavage, protein binding activities and in vitro anticancer activity studies. *J Inorg Biochem*. 2014; 137: 46-56.
148. Baskaran S, Krishnan MM, Arumugham MN, Kumar R. DFT analysis and DNA binding, cleavage of copper(II) complexes. *J. Mol. Liq*. 2016; (221): 1045–53.
149. Neidle S. *Nucleic Acid Structure and Recognition*. New York: Oxford University Press, 2002.
150. Perrin LC, Prenzler PD, Cullinane C, Phillips DR, Denny WA, McFadyen WD. DNA targeted platinum complexes: synthesis, cytotoxicity and DNA interactions of cis-dichloroplatinum(II) complexes tethered to phenazine-1-carboxamides. *J Inorg Biochem*. 2000; 81(1-2): 111-7.
151. Li VS, Choi D, Wang Z, Jimenez LS, Tang MS, Kohn H. Role of the C-10 Substituent in Mitomycin C-1–DNA Bonding. *Journal of the American Chemical Society* 1996; 118(10): 2326-31.
152. Gao EJ, Yin HX, Zhu MC, Sun YG, Gu XF, Wu Q, et al. Study on the interaction of a palladium complex with DNA. *Journal of Structural Chemistry*. Ren, J. *Struct. Chem*. 2008; 49: 1048–54.
153. Koumoussi ES, Zampakou M, Raptopoulou CP, Psycharis V, Beavers CM, Teat SJ, et al. First palladium(II) and platinum(II) complexes from employment of 2,6-diacetylpyridine dioxime: synthesis, structural and spectroscopic characterization, and biological evaluation. *Inorg Chem*. 2012; 51(14): 7699-710.
154. Ahmadi SM, Dehghan G, Feizi MAH, Dolatabadi JEN. In Vitro Studies on Calf Thymus DNA interaction with Quercetin-Palladium (II) Complex. 2011 International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. 2011; (5): 110–3.

155. Islami-Moghaddam M, Mansouri-Torshizi H, Divsalar A, Saboury AA. Synthesis, characterization, cytotoxic and DNA binding studies of diimine Platinum(II) and Palladium(II) complexes of short hydrocarbon chain ethyldithiocarbamate ligand. *J. Iran. Chem. Soc.* 2009; (6): 552–69.
156. Mansuri-Torshizi H, Ghadimy S, Akbarzadeh N. Synthesis, characterization, DNA binding and cytotoxic studies of platinum(II) and palladium(II) complexes of the 2,2'-bipyridine and an anion of 1,1-cyclobutanedicarboxylic acid. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2001; 49(12): 1517-20.
157. Kalaivani P, Prabhakaran R, Ramachandran E, Dallemer F, Paramaguru G, Renganathan R, et al. Influence of terminal substitution on structural, DNA, protein binding, anticancer and antibacterial activities of palladium(II) complexes containing 3-methoxy salicylaldehyde-4(N) substituted thiosemicarbazones. *Dalton Trans.* 2012; 41(8): 2486-99.
158. Katsarou E, Charalambopoulos C, Hadjiliadis N. Ternary Complexes of cis-(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PtCl<sub>2</sub> (cis-DDP) With Guanosine (guo), Cytidine (cyd) and the Aminoacids Glycine (gly), L-Alanine (ala), L-2-Aminobutyric Acid (2-aba), L-Norvaline (nval) and L-Norleucine (nleu). *Met Based Drugs*. 1997; 4(6): 339-43.
159. Bünger J, Stork J, Stalder K. Cyto- and genotoxic effects of coordination complexes of platinum, palladium and rhodium in vitro. *Int Arch Occup Environ Health*. 1996; 69(1): 33-8.
160. Gebel T, Lantsch H, Plessow K, Dunkelberg H. Genotoxicity of platinum and palladium compounds in human and bacterial cells. *Mutat Res*. 1997; 389(2-3): 183-90.
161. Gebel T, Koenig A. Impact of dimethyl sulfoxide and examples of combined genotoxicity in the SOS chromotest. *Mutat Res*. 1999; 444(2): 405-11.
162. Gagnon ZE, Newkirk C, Hicks S. Impact of platinum group metals on the environment: a toxicological, genotoxic and analytical chemistry study. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2006; 41(3): 397-414.
163. Kruszewski M, Bouzyk E, Oldak T, Samochocka K, Fuks L, Lewandowski W, et al. Differential toxic effect of cis-platinum(II) and palladium(II) chlorides complexed with methyl 3,4-diamine-2,3,4,6-tetra-deoxy- $\alpha$ -L-lyxo-hexopyranoside in mouse lymphoma cell lines differing in DSB and NER repair ability. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2003; 1(1):11.

164. Guillaumet E, Creus A, Farina M, Sabbioni E, Fortaner S, Marcos R. DNA-damage induction by eight metal compounds in TK6 human lymphoblastoid cells: results obtained with the alkaline Comet assay. *Mutat Res.* 2008; 654(1): 22-8.
165. Migliore L, Frenzilli G, Nesti C, Fortaner S, Sabbioni E. Cytogenetic and oxidative damage induced in human lymphocytes by platinum, rhodium and palladium compounds. *Mutagenesis.* 2002; 17(5): 411-7.
166. Akdi K, Vilaplana RA, Kamah S, Navarro JA, Salas JM, González-Vílchez F. Study of the biological effects and DNA damage exerted by a new dipalladium-Hmtpo complex on human cancer cells. *J Inorg Biochem.* 2002; 90(1-2): 51-60.
167. Miklásová N, Fischer-Fodor E, Lönnecke P, Schrepler MP, Virag P, Tatomir C, et al. Antiproliferative effect and genotoxicity of novel synthesized palladium complexes with organoarsenic ligands. *J Inorg Biochem.* 2009; 103(12): 1739-47.
168. Grekhova AK, Gorbacheva LB, Ivanova NA, Efimenko IA, Osipov AN. Comparative studies on the genotoxic activity of a new palladium (II) acidocomplex vs cisplatin in human blood lymphocytes in vitro. *Biomed Khim.* 2013; 59(1): 107-14.
169. Matesanz AI, Jimenez-Faraco E, Ruiz MC, Balsa LM, Navarro-Ranninger C, León IE. Mononuclear Pd(ii) and Pt(ii) complexes with an  $\alpha$ -N-heterocyclic thiosemicarbazone: cytotoxicity, solution behaviour and interaction versus proven models from biological media. *Inorg. Chem. Front.* 2018; 1(73): 5.
170. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature.* 1965; 205: 698-9.
171. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature.* 1969; 222(5191): 385-6.
172. Rosenberg B, Van Camp L, Grimley EB, Thomson AJ. The inhibition of growth or cell division in Escherichia coli by different ionic species of platinum(IV) complexes. *J Biol Chem.* 1967; 242(6): 1347-52.
173. Barry NP, Sadler PJ. 100 years of metal coordination chemistry: from Alfred Werner to anticancer metallodrugs. *Pure and Applied Chemistry.* 2014; 86(12): 1897-910.
174. Ronconi L, Sadler PJ. Using coordination chemistry to design new medicines. *Coordination Chemistry Reviews.* 2007; 251(13-14): 1633-48.
175. Gao E, Liu C, Zhu M, Lin H, Wu Q, Liu L. Current development of Pd (II) complexes as potential antitumor agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly current medicinal chemistry-anti-cancer agents).* 2009; 9(3): 356-68.
176. Sadler PJ. In *Metals in Medicine*. VA: University Science Books, 2007

177. Cox JW, Berners-Price SJ, Davies MS, Qu Y, Farrell N. Kinetic analysis of the stepwise formation of a long-range DNA interstrand cross-link by a dinuclear platinum antitumor complex: evidence for aquated intermediates and formation of both kinetically and thermodynamically controlled conformers. *J Am Chem Soc.* 2001; 123(7): 1316-26.
178. Farrell N, Appleton TG, Qu Y, Roberts JD, Fontes AP, Skov KA, et al. Effects of geometric isomerism and ligand substitution in bifunctional dinuclear platinum complexes on binding properties and conformational changes in DNA. *Biochemistry.* 1995; 34(47): 15480-6.
179. Berners-Price SJ, Davies MS, Cox JW, Thomas DS, Farrell N. Competitive reactions of interstrand and intrastrand DNA-Pt adducts: A dinuclear-platinum complex preferentially forms a 1,4-interstrand cross-link rather than a 1,2 intrastrand cross-link on binding to a GG 14-mer duplex. *Chemistry.* 2003; 9(3): 713-25.
180. Farrell NP, De Almeida SG, Skov KA. Bis(platinum) complexes containing two platinum cis-diammine units. Synthesis and initial DNA-binding studies *Journal of the American Chemical Society.* 110: 5018-9.
181. Sessa C, Capri G, Gianni L, Peccatori F, Grasselli G, Bauer J, et al. Clinical and pharmacological phase I study with accelerated titration design of a daily times five schedule of BBR3464, a novel cationic triplatinum complex. *Ann Oncol.* 2000; 11(8): 977-83.
182. Manzotti C, Pratesi G, Menta E, Di Domenico R, Cavalletti E, Fiebig HH, et al. BBR 3464: a novel triplatinum complex, exhibiting a preclinical profile of antitumor efficacy different from cisplatin. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(7): 2626-34.
183. Pratesi G, Perego P, Polizzi D, Righetti SC, Supino R, Caserini C, et al. A novel charged trinuclear platinum complex effective against cisplatin-resistant tumours: hypersensitivity of p53-mutant human tumour xenografts. *Br J Cancer.* 1999; 80(12): 1912-9.
184. Wang F, Chen H, Parsons S, Oswald ID, Davidson JE, Sadler PJ. Kinetics of aquation and anation of ruthenium(II) arene anticancer complexes, acidity and X-ray structures of aqua adducts. *Chemistry.* 2003; 9(23): 5810-20.
185. Alessio E. *Bioinorganic Medicinal Chemistry.* Weinheim: Wiley-VCH, 2011.
186. Bergamo A, Sava G. Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy. *Dalton Trans.* 2007; (13): 1267-72.
187. Hartinger CG, Jakupec MA, Zorbas-Seifried S, Groessl M, Egger A, Berger W, et al. KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and

- results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chem Biodivers.* 2008; 5(10): 2140-55.
188. Barry NP, Sadler PJ. Exploration of the medical periodic table: towards new targets. *Chem Commun (Camb).* 2013; 49(45): 5106-31.
189. Ronconi L and Sadler JP. Using coordination chemistry to design new medicines. *Coord. Chem. Rev.* 2007; 251: 1633.
190. Housecroft C and Sharp AG. *Inorganic Chemistry*. 4th ed. England: Book & E-Book, 2001.
191. Aldossary SA. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. *Biomed. Pharmacol. J.* 2019; 12: 7–15.
192. Chu G. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J Biol Chem.* 1994; 269(2): 787-90.
193. Kelland LR. Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs.* 2000; 59(4):1-8; discussion 37-8.
194. Fuertes MA, Alonso C, Pérez JM. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev.* 2003; 103(3): 645-62.
195. Rebutti M, Michiels C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. *Biochem Pharmacol.* 2013; 85(9): 1219-26.
196. Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer.* 1998; 34(10): 1522-34.
197. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer.* 1993; 67(6): 1171-6.
198. Wang K, Lu J, Li R. The events that occur when cisplatin encounters cells. *Coordin. Chem. Rev.* 1996; 151: 53–88.
199. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev.* 1999; 99(9): 2467-98.
200. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57(8-9): 1229-35.
201. Bertini I, Gray HB, Lippard SJ, Valentine JZ. *Bioinorganic Chemistry*. , California: University Science Books, 1994.
202. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007; 7(1): 3-18.

203. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003; 22(47): 7265-79.
204. Thatte U, Dahanukar S. Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs*. 1997; 54(4): 511-32.
205. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*. 2002; 31(4): 214-23.
206. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16(6): 2129-44.
207. Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med*. 2001; 40(4): 275-84.
208. Nanji AA, Hiller-Sturmhöfel S. Apoptosis and necrosis: two types of cell death in alcoholic liver disease. *Alcohol Health Res World*. 1997; 21(4): 325-30.
209. The Chemist. Palladium Element Facts. Доступно на:  
<https://www.chemicool.com/elements/palladium.html>
210. Butour JL, Wimmer S, Wimmer F, Castan P. Palladium(II) compounds with potential antitumour properties and their platinum analogues: a comparative study of the reaction of some orotic acid derivatives with DNA in vitro. *Chem Biol Interact*. 1997; 104(2-3): 165-78.
211. Ruiz J, Lorenzo J, Sanglas L, Cutillas N, Vicente C, Villa MD, et al. Palladium(II) and platinum(II) organometallic complexes with the model nucleobase anions of thymine, uracil, and cytosine: antitumor activity and interactions with DNA of the platinum compounds. *Inorg Chem*. 2006; 45(16): 6347-60.
212. Navarro-Ranninger C, Pérez JM, Zamora F, González VM, Masaguer JR, Alonso C. Palladium (II) compounds of putrescine and spermine. Synthesis, characterization, and DNA-binding and antitumor properties. *J Inorg Biochem*. 1993; 52(1): 37-49.
213. Ray S, Mohan R, Singh JK, Samantaray MK, Shaikh MM, Panda D, et al. Anticancer and antimicrobial metallopharmaceutical agents based on palladium, gold, and silver N-heterocyclic carbene complexes. *J Am Chem Soc*. 2007; 129(48): 15042-53.
214. Storr T, Thompson KH, Orvig C. Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry. *Chem Soc Rev*. 2006; 35(6): 534-44.
215. Stone NN, Stock RG. Complications following permanent prostate brachytherapy. *Eur Urol*. 2002; 41(4): 427-33.
216. Potters L, Cao Y, Calugaru E, Torre T, Fearn P, Wang XH. A comprehensive review of CT-based dosimetry parameters and biochemical control in patients treated with

- permanent prostate brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 50(3): 605-14.
217. Budzisz E, Keppler BK, Giester G, Woźniczka N, Kufelnicki A, Nawrot B. Synthesis, crystal structure, theoretical calculation and cytotoxic effect of new Pt(ii), Pd(ii) and Cu(ii) complexes with pyridine-pyrazoles derivatives. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2004; 4412–19.
218. Budzisz E, Krajewska U, Różalski M. Cytotoxic and proapoptotic effects of new Pd(II) and Pt(II)-complexes with 3-ethanimidoyl-2-methoxy-2H-1,2-benzoxaphosphinin-4-ol-2-oxide. *Pol J Pharmacol.* 2004; 56(4): 473-8.
219. Zhao G, Lin H, Yu P, Sun H, Zhu S, Su X, et al. Ethylenediamine-palladium(II) complexes with pyridine and its derivatives: synthesis, molecular structure and initial antitumor studies. *J Inorg Biochem.* 1999; 73(3): 145-9.
220. Huq F, Tayyem H, Beale P, Yu JQ. Studies on the activity of three palladium(II) compounds of the form: trans-PdL<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> where L=2-hydroxypyridine, 3-hydroxypyridine, and 4-hydroxypyridine. *J Inorg Biochem.* 2007; 101(1): 30-5.
221. Al-Allaf TA, Rashan LJ. Cis and trans-platinum and palladium complexes: a comparative study review as antitumour agents. *Boll Chim Farm.* 2001; 140(3): 205-10.
222. Kapdi AR, Fairlamb IJ. Anti-cancer palladium complexes: a focus on PdX<sub>2</sub>L<sub>2</sub>, palladacycles and related complexes. *Chem Soc Rev.* 2014; 43(13): 4751-77.
223. Zhao G, Sun H, Lin H, Zhu S, Su X, Chen Y. Palladium(II) complexes with N,N'-dialkyl-1,10-phenanthroline-2,9-dimethanamine: synthesis, characterization and cytotoxic activity. *J Inorg Biochem.* 1998; 72(3-4): 173-7.
224. Bogojeski J, Volbeda J, Freytag M, Tamm M, Bugarčić ŽD. Palladium(II) complexes with highly basic imidazolin-2-imines and their reactivity toward small biomolecules. *Dalton Trans.* 2015; 44(39): 17346-59.
225. Bugarčić ZM, Mojsilović BM, Divac VM. Facile pyridine-catalyzed phenylselenoetherification of alkenols. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical.* 2007; 272(1-2): 288-92.
226. Karkalić R, Bugarčić ŽD. Synthesis and Reactivity of [PdCl(terpy)]Cl. *Monatsh. Chem.* 2000; 131: 819-24.
227. Hohmann H, Van-Eldik R. Rate and equilibrium data for substitution reactions of diaqua (ethylenediamine) palladium (II) with chloride in aqueous solution. *Inorganica chimica acta.* 1990; 174(1): 87-92.

228. Wimmer FL, Wimmer S, Castan P, Cros S, Johnson N, Colacio-Rodriguez E. The antitumor activity of some palladium (II) complexes with chelating ligands. *Anticancer research*. 1989; 9(3): 791-3.
229. Bugarčić ZM, Divac VM, Kostić MD, Janković NŽ, Heinemann FW, Radulović NS, et al. Synthesis, crystal and solution structures and antimicrobial screening of palladium (II) complexes with 2-(phenylselanylmethyl) oxolane and 2-(phenylselanylmethyl) oxane as ligands. *Journal of inorganic biochemistry*. 2015; 143: 9-19.
230. Divac VM, Mijatović A, Kostić MD, Bogojeski J. The interaction of organoselenium trans-palladium (II) complexes toward small-biomolecules and CT-DNA. *Inorganica Chimica Acta*. 2017; 466: 464-9.
231. Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56(1): 60-76.
232. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi: Proposed Standard M38-P. NCCLS: Wayne, 1998.
233. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007; 42(4): 321-4.
234. Banfi E, Scialino G, Monti-Bragadin C. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52(5): 796-800.
235. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 1985; 22(6): 996-1006.
236. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*. 1998; 30(2): 295-304.
237. Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1994; 58(10): 1780-3.



238. Sánchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*. 2002; 8(3): 121-37.
239. Meadows KA, Liu F, Sou J, Hudson BP, McMillin DR. Spectroscopic and photophysical studies of the binding interactions between copper phenanthroline complexes and RNA. *Inorganic Chemistry*. 1993; 32(13): 2919-23.
240. Wolfe A, Shimer Jr GH, Meehan T. Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA. *Biochemistry*. 1987; 26(20): 6392-6.
241. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3th ed. New York: Springer, 2006.
242. Lakowicz JR, Weber G. Quenching of fluorescence by oxygen. Probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry*. 1973; 12(21): 4161-70.
243. Patra A, Sen S, Sarkar S, Zangrando E, Chattopadhyay P. Syntheses, crystal structures, and DNA-binding of some nickel (II) complexes of 1, 3-bis (2-pyridylmethylthio) propane and pseudohalides. *Journal of Coordination Chemistry*. 2012; 65(23): 4096-107.
244. Weigend F, Häser M, Patzelt H, Ahlrichs R. RI-MP2: optimized auxiliary basis sets and demonstration of efficiency. *Chemical physics letters*. 1998; 294(1-3): 143-52.
245. Weigend F, Ahlrichs R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2005; 7(18): 3297-305.
246. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR et al. *Gaussian 09, Revision C.0. Electronic Supplementary Material (ESI) for Chemical Science: Wallingford, 2010.*
247. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The protein data bank. *Nucleic acids research*. 2000; 28(1): 235-42.
248. Thomsen R, Christensen MH. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of medicinal chemistry*. 2006; 49(11): 3315-21.
249. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 1988; 175(1): 184-91.
250. Collins A, Koppen G, Valdiglesias V, Dusinska M, Kruszewski M, Møller P, et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. *Mutation research/reviews in mutation research*. 2014; 759: 27-39.

251. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983; 65(1-2): 55-63
252. Kaludjerović GN, Miljković D, Momcilović M, Djinović VM, Mostarica Stojković M, Sabo TJ, et al. Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int J Cancer*. 2005; 116(3): 479-86.
253. Petrović A, Milutinović MM, Petri ET, Živanović M, Milivojević N, Puchta R, et al. Synthesis of Camphor-Derived Bis(pyrazolylpyridine) Rhodium(III) Complexes: Structure-Reactivity Relationships and Biological Activity. *Inorg Chem*. 2019; 58(1): 307-19.
254. Kadri SS. Key Takeaways From the U.S. CDC's 2019 Antibiotic Resistance Threats Report for Frontline Providers. *Crit Care Med*. 2020; 48(7): 939-45.
255. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002; 34(5): 634-40.
256. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*. 2006;119(6 Suppl1):S3-10.
257. Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2016; 387(10014): 176-87.
258. Arai T, Harino H, Ohji M, Langston WJ. *Ecotoxicology of antifouling biocides*. Japan: Springer, 2009.
259. Woodward BF. Analysis: Palladium in Temporary and Permanently Implantable Medical Devices. *Platinum Metals Rev*. 2012; 56(3): 213.
260. Chandra S, Tyagi M, Agrawal S. Spectral and antimicrobial studies on tetraaza macrocyclic complexes of Pd-II, Pt-II, Rh-III and Ir-III metal ions. *J. Saudi. Chem*. 2010; 15(1): 49-54.
261. Zalevskaya O, Gur'eva Y, Kutchin A, Hansford KA. Antimicrobial and Antifungal Activities of Terpene-Derived Palladium Complexes. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9(5): 277.
262. Dimitrijević D, Radić G, Jevtic V, Mišić M, Baskić D, Trifunović SR. Stereospecific ligands and their complexes. XX. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of ethylenediamine-N,N'-di-S,S-(2,2'-dibenzyl)acetic acid. *Mol. Struct*. 2014; 1071: 128-132.

263. Burmudžija AZ, Muškinja JM, Kosanić MM, Ranković BR, Novaković SB, Đorđević SB, et al. Cytotoxic and Antimicrobial Activity of Dehydrozingerone based Cyclopropyl Derivatives. *Chem Biodivers*. 2017; 14: 8.
264. Sharma N, Kumar S, Maurya IK, Bhasin KK, Verma A, Wangoo N, et al. Synthesis, structural analysis, antimicrobial evaluation and synergistic studies of imidazo[1,2-a]pyrimidine chalcogenides. *RSC Adv*. 2016; 6: 114224–34.
265. Patil SA, Hoagland AP, Patil SA, Bugarin A. *N*-heterocyclic carbene-metal complexes as bio-organometallic antimicrobial and anticancer drugs, an update (2015-2020). *Future Med Chem*. 2020;12(24): 2239-75.
266. Choo KB, Mah WL, Lee SU, Lee WL, Cheow YL. Palladium complexes of bidentate pyridine *N*-heterocyclic carbenes: optical resolution, antimicrobial and cytotoxicity studies. *Appl. Organometal. Chem*. 2017; 32(8): e4377.
267. Haque RA, Haziz UF, Amirul AA, Shaheeda N, Razali MR. Synthesis of a palladium(II) complex of a *N*-heterocyclic carbene via transmetalation: crystal structure and antibacterial studies. *Transit. Met. Chem*. 2016; 41: 775–81.
268. Garoufis A, Hadjikakou SK, Hadjiliadis N. Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents. *Coord. Chem. Rev*. 209; 253(9-10): 1384-97.
269. Akbar Ali M, Mirza AH, Butcher RJ, Tarafder MT, Keat TB, Ali AM. Biological activity of palladium(II) and platinum(II) complexes of the acetone Schiff bases of *S*-methyl- and *S*-benzylthiocarbamate and the X-ray crystal structure of the [Pd(asmc)<sub>2</sub>] (asmc=anionic form of the acetone Schiff base of *S*-methylthiocarbamate) complex. *J Inorg Biochem*. 2002; 92(3-4): 141-8.
270. Asiri AM, Khan SA. Palladium(II) complexes of NS donor ligands derived from steroidal thiosemicarbazones as antibacterial agents. *Molecules*. 2010; 15(7): 4784-91.
271. Khan SA, Saleem K, Khan Z. Synthesis, structure elucidation and antibacterial evaluation of new steroidal -5-en-7-thiazoloquinoxaline derivatives. *Eur J Med Chem*. 2008; 43(10): 2257-61.
272. Matesanz AI, Leitao I, Souza P. Palladium(II) and platinum(II) bis(thiosemicarbazone) complexes of the 2,6-diacetylpyridine series with high cytotoxic activity in cisplatin resistant A2780cisR tumor cells and reduced toxicity. *J Inorg Biochem*. 2013; 125: 26-31.
273. Jagadeesh M, Rashmi HK, Subba Rao Y, Sreenath Reddy A, Prathima B, Uma Maheswari DP, et al. Synthesis and spectroscopic characterization of 3,4-

- difluoroacetophenone-thiosemicarbazone and its palladium(II) complex: evaluation of antimicrobial and antitumour activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2013; 115: 583-7.
274. Hernández W, Paz J, Carrasco F, Vaisberg A, Spodine E, Manzur J, et al. Synthesis and Characterization of New Palladium(II) Thiosemicarbazone Complexes and Their Cytotoxic Activity against Various Human Tumor Cell Lines. *Bioinorg Chem Appl.* 2013; 2013: 524701.
275. Gómez N, Santos D, Vázquez R, Suescun L, Mombrú A, Vermeulen M, et al. Synthesis, structural characterization, and pro-apoptotic activity of 1-indanone thiosemicarbazone platinum(II) and palladium(II) complexes: potential as antileukemic agents. *ChemMedChem.* 2011; 6(8): 1485-94.
276. Matesanz AI, Hernández C, Rodríguez A, Souza P. 3,5-diacetyl-1,2,4-triazol bis(4N-substituted thiosemicarbazone) palladium(II) complexes: synthesis, structure, antiproliferative activity and low toxicity on normal kidney cells. *J Inorg Biochem.* 2011; 105(12): 1613-22.
277. Kalaivani P, Prabhakaran R, Dallemer F, Poornima P, Vaishnavi E, Ramachandran E, et al. DNA, protein binding, cytotoxicity, cellular uptake and antibacterial activities of new palladium(II) complexes of thiosemicarbazone ligands: effects of substitution on biological activity. *Metallomics.* 2012; 4(1): 101-13.
278. Prabhakaran R, Kalaivani P, Poornima P, Dallemer F, Huang R, Vijaya Padma V, et al. Synthesis, DNA/protein binding and in vitro cytotoxic studies of new palladium metallothiosemicarbazones. *Bioorg Med Chem.* 2013; 21(21): 6742-52.
279. Satheesh CE, Raghavendra Kumar P, Sharma P, Lingaraju K, Palakshamurthy BS, Raja Naika H. Synthesis, characterisation and antimicrobial activity of new palladium and nickel complexes containing Schiff bases. *InorganicaChimica Acta.* 2016; 442: 1-9.
280. Yeo CI, Tiekink ERT, Chew J. Insights into the Antimicrobial Potential of Dithiocarbamate Anions and Metal-Based Species. *Inorganics.* 2021; 9: 48.
281. Onwudiwe DC, Ekennia AC. Synthesis, characterization, thermal, antimicrobial and antioxidant studies of some transition metal dithiocarbamates. *Res. Chem. Intermed.* 2017; 43: 14.
282. Ekennia AC, Onwudiwe DC, Osowole AA. Spectral, thermal stability and antibacterial studies of copper, nickel and cobalt complexes of N-methyl-N-phenyl dithiocarbamate. *J. Sulfur Chem.* 2015; 36: 96-104.

283. Ekennia AC, Onwudiwe DC, Osowole AA, Olasunkanmi LO, Ebenso EE. Synthesis, biological, and quantum chemical studies of Zn(II) and Ni(II) mixed-ligand complexes derived from N,N-disubstituted dithiocarbamate and benzoic acid. *J. Chem.* 2016; 1-12.
284. Kawakami H, Yoshida K, Nishida Y, Kikuchi Y, Sato R. Antibacterial properties of metallic elements for alloying evaluated with application of JIS Z 2801:2000. *ISIJ International.* 2008; 48(9): 1299-304.
285. Yasuyuki M, Kunihiro K, Kurissery S, Kanavillil N, Sato Y, Kikuchi Y. Antibacterial properties of nine pure metals: a laboratory study using *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Biofouling.* 2010; 26(7): 851-8.
286. Ferreira IP, de Lima GM, Paniago EB, Takahashi JA, Pinheiro CB. Synthesis, characterization and antifungal activity of new dithiocarbamate-based complexes of Ni(II), Pd(II) and Pt(II). *Inorg. Chim. Acta* 2014; 423: 443–9.
287. Manav N, Mishra AK, Kaushik NK. In vitro antitumour and antibacterial studies of some Pt(IV) dithiocarbamate complexes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2006; 65(1): 32-5.
288. Shaheen F, Badshah A, Gielen M, Dusek M, Fejfarova K, de Vos D et al. Synthesis, characterization, antibacterial and cytotoxic activity of new palladium(II) complexes with dithiocarbamate ligands: X-ray structure of bis(dibenzyl-1-S:S'-dithiocarbamato)Pd(II). *J. Organomet. Chem.* 2007; 692: 3019–26.
289. Khan H, Badshah A, Murtaz G, Said M, Rehman ZU, Neuhausen C, et al. Synthesis, characterization and anticancer studies of mixed ligand dithiocarbamate palladium(II) complexes. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(9): 4071-7.
290. Khan H, Badshah A, Said M, Murtaza G, Sirajuddin M, Ahmad J et al. Synthesis, structural characterization and biological screening of heteroleptic palladium(II) complexes. *Inorg. Chim. Acta* 2016; 447: 176–82.
291. Ajibade PA, Idemudia OG, Okoh AI. Synthesis, characterization and antibacterial studies of metal complexes of sulfadiazine with N-alkyl-N-phenyldithiocarbamate. *Bull Chem. Soc. Ethiop.* 2013; 27: 77–84.
292. Bandyopadhyay N, Das M, Samanta A, Zhu M, Lu L, Naskar JP. Promising Antimicrobial Activity of an Oxime Based Palladium(II) Complex. *ChemistrySelect* 2017; 2(1):230-40.
293. Al-Janabi ASM, Kadhim MM, Al-Nassiry AIA, Yousef, TA. Antimicrobial, computational, and molecular docking studies of Zn (II) and Pd (II) complexes derived from piperidine dithiocarbamate. *Appl. Organomet. Chem.* 2021; 35: e6108.

294. Adams CP, Walker KA, Obare SO, Docherty KM. Size-dependent antimicrobial effects of novel palladium nanoparticles. *PLoS One*. 2014; 9(1): e85981.
295. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003; 67(4): 593-656.
296. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1794(5): 808-16.
297. Kotrba P, Macek T, Mackova M. Potential for biosorption technology. In: Kotrba P, Mackova M, Macek M, ed. *Microbial Biosorption of Metals*. Dordrecht: Springer; 2011. p. 7-17.
298. Marquis RE, Mayzel K, Carstensen EL. Cation exchange in cell walls of gram-positive bacteria. *Can J Microbiol*. 1976; 22(7): 975-82.
299. Beveridge TJ, Koval SF. Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12. *Appl Environ Microbiol*. 1981; 42(2): 325-35.
300. Newton GL, Rawat M, La Clair JJ, Jothivasan VK, Budiarto T, Hamilton CJ, et al. Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in *Bacilli*. *Nat Chem Biol*. 2009; 5(9): 625-7.
301. Saygun O, Agalar C, Aydinuraz K, Agalar F, Daphan C, Saygun M, et al. Gold and gold-palladium coated polypropylene grafts in a *S. epidermidis* wound infection model. *J Surg Res*. 2006; 131(1): 73-9.
302. Mishra AK, Mishra SB, Manav N, Saluja D, Chandra R, Kaushik NK. Synthesis, characterization, antibacterial and cytotoxic study of platinum (IV) complexes. *Bioorg Med Chem*. 2006; 14(18): 6333-40.
303. Adam AMA, Refat M, Mohamed MAEM. Synthesis and spectroscopic characterizations of noble metal complexes (gold, silver, platinum) in the presence of selenium, and their biological applications as antibacterial, antifungal, and anticancer. *Res. Chem. Intermediat*. 2015; 41: 965-1000.
304. Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol*. 2000; 60(4): 457-70.
305. Roberts JJ, Thomson AJ. The mechanism of action of antitumor platinum compounds. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1979; 22: 71-133.
306. Liu TZ, Le SD, Bhatnagar RS. Toxicity of palladium. *Toxicol Lett* 1979; 4: 469-73.
307. Aslan, HG, Ozcan S, Karacan N. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of salicylaldehyde benzenesulfonylhydrazone (Hsalbsmh) and its Nickel(II), Palladium(II), Platinum(II), Copper(II), Cobalt(II) complexes. *Inorg. Chem. Commun*. 2011; 14(9): 1550-3.

308. Narayanan A, Nair MS, Muiyarakandy MS, Amalaradjou MA. Inhibition and Inactivation of Uropathogenic *Escherichia coli* Biofilms on Urinary Catheters by Sodium Selenite. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(6): 1703.
309. Atta AH, El-Shenawy AI, Koura FA, RefatMS. Synthesis and Characterization of Some Selenium Nanometric Compounds: Spectroscopic, Biological and Antioxidant Assessments. *World Journal of Nano Science and Engineering.* 2014; 4(2): 58-69.
310. Pietrella D. Antimicrobial activity of organoselenium compounds. In:Santi C ed. *Organoselenium Chemistry: Between Synthesis and Biochemistry.* Sharjah: Bentham Books; 2014 p. 328–44.
311. Sancineto L, Mariotti A, Bagnoli L, Marini F, Desantis J, Iraci N, et al. Design and Synthesis of DiselenoBisBenzamides (DISeBAs) as Nucleocapsid Protein 7 (NCp7) Inhibitors with anti-HIV Activity. *J Med Chem.* 2015; 58(24): 9601-14.
312. Sancineto L, Piccioni M, De Marco S, Pagiotti R, Nascimento V, Braga AL, et al. Diphenyl diselenide derivatives inhibit microbial biofilm formation involved in wound infection. *BMC Microbiol.* 2016; 16(1): 220.
313. Sartori G, Jardim NS, Marcondes Sari MH, Dobrachinski F, Pesarico AP, Rodrigues LC et al. Antiviral Action of Diphenyl Diselenide on Herpes Simplex Virus 2 Infection in Female BALB/c Mice. *J Cell Biochem.* 2016; 117(7): 1638-48.
314. Pietka-Ottlik M, Burda-Grabowska M, Woźna M, Walenska J, Kaleta R, Zaczyńska E et al. Synthesis of new alkylated and methoxylated analogues of ebselen with antiviral and antimicrobial properties. *ARKIVOC.* 2017; 546–56.
315. Vasić S, Radojević I, Pešić N, Čomić LJ. Influence of sodium selenite on the growth of selected bacteria species and their sensitivity to antibiotics. *Kragujevac J Sci.* 2011; 33: 55-61.
316. Peng D, Zhang J, Liu Q, Taylor EW. Size effect of elemental selenium nanoparticles (Nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity. *J Inorg Biochem.* 2007; 101(10): 1457-63.
317. ElSaied BEF, Diab AM, Tayel AA, Alghuthaymi MA, Moussa SH. Potent antibacterial action of phycosynthesized selenium nanoparticles using *Spirulina platensis* extract. *Green Processing and Synthesis.* 2021; 10(1): 49-60.
318. Dong Y, Zhu H, Shen Y, Zhang W, Zhang L. Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against *Vibrio Natriegens*. *PLoS One.* 2019; 14(9): e0222322.
319. Khiralla GM, El-Deeb BA. Antimicrobial and antibiofilm effect of selenium nanoparticles on some foodborne pathogens. *LWT.* 2015; 63(2): 1001–7.

320. Geoffrion LD, Hesabizadeh T, Medina-Cruz D, Kasper M, Taylor P, Vernet-Crua A, et al. Naked Selenium Nanoparticles for Antibacterial and Anticancer Treatments. *ACS Omega*. 2020; 5(6): 2660-9.
321. Huang F, Long Y, Liang Q, Purushotham B, Swamy MK, Duan Y. Safed musli (*Chlorophytum borivilium* L.) callus-mediated biosynthesis of silver nanoparticles and evaluation of their antimicrobial activity and cytotoxicity against human colon cancer cells. *J Nanomater*. 2019; 1: 1-8.
322. Lee HJ, Song JY, Kim BS. Biological synthesis of copper nanoparticles using *Magnolia kobus* leaf extract and their antibacterial activity. *J Chem Technol Biotechnol*. 2013; 88(11): 1971-7.
323. Martínez-Castañón GA, Nino-Martinez N, Martinez-Gutierrez F, Martinez-Mendoza JR, Ruiz F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J Nanopart Res*. 2008; 10(8): 1343-8.
324. Boroumand S, Safari M, Shaabani E, Shirzad M, Faridi-Majidi R. Selenium nanoparticles: synthesis, characterization and study of their cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity. *Materials Research Express*. 2019; 6(8): 0850d8.
325. Mulla NA, Otari SV, Bohara RA, Yadav HM, Pawar SH. Rapid and size-controlled biosynthesis of cytocompatible selenium nanoparticles by *Azadirachta indica* leaves extract for antibacterial activity. *Mater Lett*. 2020; 264: 127353.
326. Fardsadegh B, Jafarizadeh-Malmiri H. Aloe vera leaf extract mediated green synthesis of selenium nanoparticles and assessment of their in vitro antimicrobial activity against spoilage fungi and pathogenic bacteria strains. *Green Process Synth*. 2019; 8(1): 399-407.
327. Man NYT, Knight DR, Stewart SG, McKinley AJ, Riley TV, Hammer KA. Spectrum of antibacterial activity and mode of action of a novel tris-stilbene bacteriostatic compound. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 6912.
328. Grace AN, Pandian, K. Quinolone Antibiotic-Capped Gold Nanoparticles and Their Antibacterial Efficacy Against Gram Positive and Gram Negative Organisms. *J. Bionanoscience*. 2007; 1(2): 96-105.
329. Pappenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2016; 14(9): 576-88.
330. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005; 21: 319-46.
331. Schuster M, Greenberg EP. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol*. 2006; 296(2-3): 73-81.



332. Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1997; 179(10): 3127-32.
333. Gilbert KB, Kim TH, Gupta R, Greenberg EP, Schuster M. Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Mol Microbiol.* 2009; 73(6): 1072-85.
334. Heurlier K, Déneraud V, Haenni M, Guy L, Krishnapillai V, Haas D. Quorum-sensing-negative (lasR) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* avoid cell lysis and death. *J Bacteriol.* 2005; 187(14): 4875-83.
335. Sabir S, Yu TT, Kuppusamy R, Almohaywi B, Iskander G, Das T, et al. Novel Seleno- and Thio-Urea Containing Dihydropyrrol-2-One Analogues as Antibacterial Agents. *Antibiotics (Basel).* 2021; 10(3): 321.
336. Kumar, V. Asha, et al. Synthesis, characterization, antimicrobial and antioxidant activity of 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde-4-phenylthiosemicarbazone and its Pd (II), Ni (II) and Cu (II) complexes having heterocyclic bases. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 152-164.
337. Kumar, V. Asha, et al. Synthesis, characterization, antimicrobial and antioxidant activity of 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde-4-phenylthiosemicarbazone and its Pd (II), Ni (II) and Cu (II) complexes having heterocyclic bases. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 152-164.
338. Kalaivani P, Prabhakaran R, Kaveri M, Huang R, R. Staples, K. Synthesis, spectral, X-ray crystallography, electrochemistry, DNA/protein binding and radical scavenging activity of new palladium(II) complexes containing triphenylarsine. *Inorganica Chimica Acta*. Amsterdam: Elsevier Science, 2013.
339. Khan SZ, Khan Z, Ahmad I, Khan S, Khan SM. Ahmed M et al. Structural features, anticancer, antioxidant and anti-acetylcholinesterase studies of [(DTCs)(PAr<sub>3</sub>)PdCl] *Inorganic Chemistry Communications* 2021; 123: 108316.
340. Khan SZ, Rehman Z, Butler IS, Belanger-Gariepy F. New ternary palladium(II) complexes: Synthesis, characterization, *in vitro* anticancer and antioxidant activities *Inorganic Chemistry Communications* 2019; 105: 140–6.
341. Jagadeesh M, Lavanya M, Kalangi SK, Sarala Y, Ramachandraiah C, Varada Reddy A. Spectroscopic characterization, antioxidant and antitumour studies of novel bromo substituted thiosemicarbazone and its copper(II), nickel(II) and palladium(II) complexes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015; 135: 180-4.
342. Icel C, Yilmaz VT, Kaya Y, Samli H, Harrison WT, Buyukgungor O. New palladium(II) and platinum(II) 5,5-diethylbarbiturate complexes with 2-

- phenylpyridine, 2,2'-bipyridine and 2,2'-dipyridylamine: synthesis, structures, DNA binding, molecular docking, cellular uptake, antioxidant activity and cytotoxicity. Dalton Trans. 2015; 44(15): 6880-95. 344.
343. Choudhary A, Sharma R, Nagar M, Mohsin M, Meena HS. Synthesis, characterization and antioxidant activity of some transition metal complexes with terpenoid derivatives, Journal of the Chilean Chemical Society. 2011; 56(4): 911–7.
344. Al-Amiery AA, Kadhum AA, Mohamad AB. Antifungal and antioxidant activities of pyrrolidone thiosemicarbazone complexes. Bioinorg Chem Appl. 2012;2012:795812.
345. Mugesh G, du Mont WW, Sies H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. Chem Rev. 2001;101(7):2125-79.
346. Reich HJ, Hondal RJ. Why Nature Chose Selenium. ACS Chem Biol. 2016;11(4):821-41.
347. Jain VK, Priyadarsini KI. Organoselenium Compounds in Biology and Medicine: Synthesis, Biological and Therapeutic Treatments. London: Royal Society of Chemistry, 2017.
348. Mugesh G, Singh HB. Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: Glutathione peroxidase activity. Chem. Soc. Rev.2000; 29: 347–57.
349. Živanović MN, Košarić JV, Šmit B, Šeklić DS, Pavlović RZ, Marković SD. Novel seleno-hydantoin palladium(II) complex - antimigratory, cytotoxic and prooxidative potential on human colon HCT-116 and breast MDA-MB-231 cancer cells. Gen Physiol Biophys. 2017; 36(2): 187-196.
350. Boutarfaia A, Bechki L, Lanez T, Lanez E, Kadri M. Synthesis, Antioxidant Activity, and Determination of Binding Parameters of Meso-Tetra-4-Actophenyl-Porphyrin and its Palladium (II) Complex with Superoxide Anion Radicals. Current Bioactive Compounds.2020; 16(7) : 15.
351. Ayyannan G, Veerasamy P, Mohanraj M, Raja G, Manimaran A, Velusamy M, et al. Biological evaluation of organometallic palladium(II) complexes containing 4-hydroxybenzoic acid (3-ethoxy-2-hydroxybenzylidene)hydrazide: Synthesis, structure, DNA/protein binding, antioxidant activity and cytotoxicity. Applied Organometal. Chem. 2017; 31(e3599): 13.
352. Arya A, Gupta K, Chundawat TS. In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Biogenically Synthesized Palladium and Platinum Nanoparticles Using *Botryococcus braunii*. Turk J Pharm Sci. 2020;17(3):299-306.
353. Anu MMD, Pilla SI, Chellappa J, Bennie RB, Subramanian S, Kumar SD. Design,

- synthesis, characterization and DNA interaction of new Schiff base metal complexes. *J Chem Pharm Res.* 2015; 7: 105–16.
354. Keene FR, Smith JA, Collins JG. Metal complexes as structure-selective binding agents for nucleic acids. *Coord Chem Rev.* 2009; 253: 2021–35.
355. Fanelli M, Formica M, Fusi V, Giorgi L, Micheloni M, Paoli P. New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents. *Coord Chem Rev.* 2016; 310: 41–79.
356. Icel C, Yilmaz VT, Ari F, Ulukaya E, Harrison WT. trans-Dichloridopalladium(II) and platinum(II) complexes with 2-(hydroxymethyl)pyridine and 2-(2-hydroxyethyl)pyridine: synthesis, structural characterization, DNA binding and in vitro cytotoxicity studies. *Eur J Med Chem.* 2013; 60: 386-94.
357. Tan C, Liu J, Li H, Zheng W, Shi S, Chen L, et al. Differences in structure, physiological stability, electrochemistry, cytotoxicity, DNA and protein binding properties between two Ru(III) complexes. *J Inorg Biochem.* 2008; 102(2): 347-58.
358. Y. Wang, H. Zhang, G. Zhang, W. Tao, S. Tang, J. Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *Journal of Luminescence.* 2007; 126(1): 211-8.
359. Long EC, Barton JK. On demonstrating DNA intercalation. *Accounts Chem. Res.* 1990; 23(9): 271–3.
360. Milutinović MM, Bogojeski JV, Klisurić O, Scheurer A, Elmroth SK, Bugarčić ŽD. Synthesis and structures of a pincer-type rhodium(iii) complex: reactivity toward biomolecules. *Dalton Trans.* 2016; 45(39): 15481-91.
361. Raković RI, Radojević DI, Mladenović GK, Popovska Jovičić DB, Petrović S, Čanović PP, et al. Antimicrobial, antioxidant and DNA-binding studies of palladium(II) complexes with different chelate ligands containing nitrogen donor atoms. *Journal of the Serbian Chemical Society.* 2018; 83(11): 1229-42.
362. Raković I, Bogojeski J, Mladenović K, Petrović A, Divac V, Mihailović K, et al. Synthesis, Characterization and Biological Studies of Organoselenium trans-Palladium(II) Complexes. *Med Chem.* 2021; 17(9): 1007-022.
363. Rizvi MA, Zaki M, Afzal M, Mane M, Kumar M, Shah BA, et al. Nuclear blebbing of biologically active organoselenium compound towards human cervical cancer cell (HeLa): in vitro DNA/HSA binding, cleavage and cell imaging studies. *Eur J Med Chem.* 2015; 90: 876-88.

364. Dhar S, Nethaji M, Chakravarty AR. Effect of charge transfer bands on the photo-induced DNA cleavage activity of [1-(2-thiazolylazo)-2-naphtholato]copper(II) complexes. *J. Inorg. Biochem.* 2005; 99(3): 805-12.
365. Dimiza F, Fountoulaki S, Papadopoulou AN, Kontogiorgis CA, Tangoulis V, Raptopoulou CP, et al. Non-steroidal antiinflammatory drug-copper(II) complexes: structure and biological perspectives. *Dalton Trans.* 2011; 40(34): 8555-68.
366. Dimiza F, Perdih F, Tangoulis V, Turel I, Kessissoglou DP, Psomas G. Interaction of copper(II) with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and diclofenac: synthesis, structure, DNA- and albumin-binding. *J Inorg Biochem.* 2011; 105(3): 476-89.
367. Topalá T, Bodoki A, Oprean L, Oprean R. Bovine Serum Albumin Interactions with Metal Complexes. *Clujul Med.* 2014; 87(4): 215-9.
368. Zheng K, Liu F, Li YT, Wu ZY, Yan CW. Synthesis and structure elucidation of new  $\mu$ -oxamido-bridged dicopper(II) complexes showing in vitro anticancer activity: Evaluation of DNA/protein-binding properties by experiment and molecular docking. *J Inorg Biochem.* 2016; 156: 75-88.
369. Wang F, Huang W, Dai ZX. Spectroscopic investigation of the interaction between riboflavin and bovine serum albumin. *J. Mol. Struct.* 2008; 875: 509-14.
370. Khan T, Sankhe K, Suvarna V, Sherje A, Patel K, Dravyakar B. DNA gyrase inhibitors: Progress and synthesis of potent compounds as antibacterial agents. *Biomed Pharmacother.* 2018; 103: 923-38.
371. Xiao ZP, Ma TW, Liao ML, Feng YT, Peng XC, Li JL, et al. Tyrosyl-tRNA synthetase inhibitors as antibacterial agents: synthesis, molecular docking and structure-activity relationship analysis of 3-aryl-4-arylamino-furan-2(5H)-ones. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(10): 4904-14.
372. Gibson EG, Bax B, Chan PF, Osheroff N. Mechanistic and Structural Basis for the Actions of the Antibacterial Gepotidacin against *Staphylococcus aureus* Gyrase. *ACS Infect Dis.* 2019; 5(4): 570-81.
373. Čočić D, Jovanović S, Radisavljević S, Korzekwa J, Scheurer A, Puchta R, et al. New monofunctional platinum(II) and palladium(II) complexes: Studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interaction, and cytotoxic activity. *J Inorg Biochem.* 2018; 189: 91-102.
374. Jovanović-Stević S, Radisavljević S, Scheurer A, Čočić D, Šmit B, Petković M, et al. Bis(triazinyl)pyridine complexes of Pt(II) and Pd(II): studies of the nucleophilic

- substitution reactions, DNA/HSA interactions, molecular docking and biological activity. *J Biol Inorg Chem.* 2021; 26(5): 625-37.
375. Ćočić D, Jovanović S, Nišavić M, Baskić D, Todorović D, Popović S, et al. New dinuclear palladium(II) complexes: Studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interactions and cytotoxic activity. *J Inorg Biochem.* 2017; 175: 67-79.
376. Ćočić D, Jovanović-Stević S, Jelić R, Matić S, Popović S, Djurdjević P, et al. Homo- and hetero-dinuclear Pt(II)/Pd(II) complexes: studies of hydrolysis, nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interactions, DFT calculations, molecular docking and cytotoxic activity. *Dalton Trans.* 2020; 49(41): 14411-31.
377. Jovanović S, Obrenčević K, Bugarčić ŽD, Popović I, Žakula J, Petrović B. New bimetallic palladium(ii) and platinum(ii) complexes: studies of the nucleophilic substitution reactions, interactions with CT-DNA, bovine serum albumin and cytotoxic activity. *Dalton Trans.* 2016; 45(31): 12444-57.
378. Miklašová N, Fischer-Fodor E, Lönnecke P, Tomuleasa CI, Virag P, Schrepler MP, et al. Antiproliferative effect of novel platinum(II) and palladium(II) complexes on hepatic tumor stem cells in vitro. *Eur J Med Chem.* 2012; 49: 41-7.
379. Alarifi S, Ali D, Alkahtani S, Almeer RS. ROS-Mediated Apoptosis and Genotoxicity Induced by Palladium Nanoparticles in Human Skin Malignant Melanoma Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 8439098.
380. Tikhomirov AG, Ivanova NA, Erofeeva OS, Gorbacheva LB, Efimenko IA. Interaction of Palladium(II) Acido Complexes with DNA. *Russian Journal of Coordination Chemistry* 2003; 29: 489–93.
381. Kas'yanenko NA, Levykina EV, Erofeeva OS, Ivanova NA, Efimenko IA. Effects of palladium acido complexes [Ln]<sub>m</sub>[PdX<sub>4</sub>] on the conformation of DNA in vitro. *Journal of Structural Chemistry.* 2009; 10(50): 1034–44.
382. Mansuri-Torshizi H, Mital R, Srivastava TS, Parekh H, Chitnis MP. Synthesis, characterization, and cytotoxic studies of alpha-diimine/1,2-diamine platinum(II) and palladium(II) complexes of selenite and tellurite and binding of some of these complexes to DNA. *J Inorg Biochem.* 1991; 44(4): 239-47.
383. Radenković N, Kostić MD, Đorđević NZ, Dolicanin ZC, Soldatović TV, Živanović MN, et al. Synthesis of new Pt(II) complex bearing organoselenium ligands and evaluation of cytotoxic activity of some structurally related Pd(II) complexes, *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* 2020; 39: 59–64.

384. Ulukaya E, Ari F, Dimas K, Ikitimur EI, Guney E, Yilmaz VT. Anti-cancer activity of a novel palladium(II) complex on human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(10): 4957-63.
385. Ulukaya E, Ari F, Dimas K, Sarimahmut M, Guney E, Sakellaridis N, et al. Cell death-inducing effect of novel palladium(II) and platinum(II) complexes on non-small cell lung cancer cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011; 137(10): 1425-34.
386. Icel C, Yilmaz VT. DNA binding and cleavage studies of two palladium(II) saccharinate complexes with terpyridine. *DNA Cell Biol.* 2013; 32(4): 165-72.
387. Coskun MD, Ari F, Oral AY, Sarimahmut M, Kutlu HM, Yilmaz VT, et al. Promising anti-growth effects of palladium(II) saccharinate complex of terpyridine by inducing apoptosis on transformed fibroblasts in vitro. *Bioorg Med Chem.* 2013; 21(15): 4698-705.
388. Ari F, Ulukaya E, Sarimahmut M, Yilmaz VT. Palladium(II) saccharinate complexes with bis(2-pyridylmethyl)amine induce cell death by apoptosis in human breast cancer cells in vitro. *Bioorg Med Chem.* 2013; 21(11): 3016-21.
389. Kacar O, Adiguzel Z, Yilmaz VT, Cetin Y, Cevatemre B, Arda N, et al. Evaluation of the molecular mechanisms of a palladium(II) saccharinate complex with terpyridine as an anticancer agent. *Anticancer Drugs.* 2014; 25(1): 17-29.
390. Fiuza SM, Holy J, Batista de Carvalho LA, Marques MP. Biologic activity of a dinuclear Pd(II)-spermine complex toward human breast cancer. *Chem Biol Drug Des.* 2011; 77(6): 477-88.
391. Tummala R, Diegelman P, Fiuza SM, Batista de Carvalho LA, Marques MP, Kramer DL, et al. Characterization of Pt-, Pd-spermine complexes for their effect on polyamine pathway and cisplatin resistance in A2780 ovarian carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2010; 24(1): 15-24.
392. Corduneanu O, Chiorcea-Paquim AM, Diculescu V, Fiuza SM, Marques MP, Oliveira-Brett AM. DNA interaction with palladium chelates of biogenic polyamines using atomic force microscopy and voltammetric characterization. *Anal Chem.* 2010; 82(4): 1245-52.
393. Silva TM, Andersson S, Sukumaran SK, Marques MP, Persson L, Oredsson S. Norspermidine and novel Pd(II) and Pt(II) polynuclear complexes of norspermidine as potential antineoplastic agents against breast cancer. *PLoS One.* 2013; 8(2): e55651.

## БИОГРАФИЈА

Ивана (Радисав) Раковић је рођена 12. 08. 1983. године у Крагујевцу. Основну школу и Медицинску школу са домом ученика „Сестре Нинковић“ завршила је са одличним успехом. Интегрисане академске студије медицине на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписала је 2002. године, а завршила 2009. године са просечном оценом 8,35 (осам и 35/100). Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфламација и инфекција уписала је школске 2011/12. Усмени докторски испит је положила у октобру 2013. године. Докторску тезу под називом „Испитивање антимикробне и антиоксидативне активности паладијум(II) комплекса“, пријавила је маја 2018. год. На Факултету медицинских наука запослена је од 2012. године прво у звању сарадника у настави за ужу научну област Инфективне болести, а од 2019. године као асистент. На Клиници за инфективне болести КЦ Крагујевац запослена је од 2013. године. Марта 2019. године положила је специјалистички испит на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу из области медицине Инфектологија са оценом пет (5). Активно учествује у извођењу практичног дела наставе на свим студијским програмима као и у организацији рада катедре за Инфективне болести. Била је ангажована као истраживач на јуниор пројекту „Анализа фактора значајних у диференцијалној дијагнози узрочника фебрилних стања непознате етиологије”. Активно учествује на симпозијумима, као и домаћим и међународним конгресима са тематиком инфективне патологије. Аутор је и коаутор већег броја научних публикација од којих је 5 радова у научним часописима са SCI листе (M22-1, M23-4) и 8 радова у часописима националног значаја.

## БИБЛИОГРАФИЈА

### Списак радова

#### РАД У ИСТАКНУТОМ МЕЂУНАРОДНОМ ЧАСОПИСУ (M22):

1. **Rakovic I**, Bogojeski J, Mladenovic K, Petrovic A, Divac V, Mihailovic K, Popovska-Jovicic B, Kostic M, Canovic P, Milivojevic N, Zivanovic M, Radojevic I. Synthesis, Characterization and Biological Studies of Organoselenium trans-Palladium(II) Complexes. Medicinal Chemistry 2021;17 (9):1007-1022.

#### РАД У МЕЂУНАРОДНОМ ЧАСОПИСУ (M23):

1. **Raković R. I.**, Radojević D. I., Mladenović G. K., Popovska Jovičić D. B., Petrović S., Čanović P. P, Čomić R. LJ., Čanović S. P, Bogojeski V. J. Antimicrobial, antioxidant and DNA-binding studies of palladium(II) complexes with different chelate ligands containing nitrogen donor atoms. Journal of the Serbian Chemical Society. 2018; 83 (11): 1229-42.
2. D. Radojević, K. Mladenović, Lj. Čomić, **I. Raković**, O. Milošević-Djordjević, D. Grujičić, A. Marković, J. Tubić Vukajlović, G. Djelić, M. Topuzović and N. Mihailović Unexplored biological properties and phytochemical characterization of methanolic extracts of achillea ageratifolia subsp. serbica (nyman) heimerl. The Journal of Animal and Plant Sciences, doi:10.36899/JAPS.2022.2.0457.  
<http://www.thejaps.org.pk/Volume/2022/32-02/29.php>
3. Sekulic Markovic S, **Rakovic I**, Petrovic S, Petrovic Rodic D, Zornic N, Popovska Jovicic B. Generalised lymphadenopathy in a patient with fever of unknown origin as a differential diagnostic challenge - case report. Journal of the Pakistan Medicinal Association. 2021; 71 (5): 1489-1492.
4. Popovska-Jovičić B, Čanović P, Gajović O, **Raković I**, Mijailović. Fever of unknown origin: Most frequent causes in adults patients. Vojnosanitiski Pregled 2016; 73(1): 5-8.



**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Ивана Р. Раковић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Испитивање антимикуробне и антиоксидативне активности паладијум(II) комплекса

која је одбрањена на Факултету медицинских наука 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, 16.12.2021 године,

Ивана Раковић

потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Ивана Р. Раковић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Испитивање антимикробне и антиоксидативне активности паладијум(II) комплекса

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

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 дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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 - делим под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делим под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 10.12.2021. године,

Ивана Јакобчић

потпис аутора

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