



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Душан С. Ђоћић

**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И  
БИОЛОШКА АКТИВНОСТ  
ДИНУКЛЕАРНИХ ПЛАТИНА(II) И  
ПАЛАДИЈУМ(II) КОМПЛЕКСА СА  
АЗОТ-ДОНОРСКИМ МОСТНИМ  
ЛИГАНДИМА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2022



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF SCIENCE

Dušan S. Čović

**SYNTHESIS, CHARACTERISATION AND  
BIOLOGICAL ACTIVITY OF DINUCLEAR  
PLATINUM(II) AND PALLADIUM(II)  
COMPLEXES WITH NITROGEN-DONOR  
BRIDGING LIGANDS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2022

<b>Аутор</b>
Име и презиме: <b>Душан С. Ђоћић</b>
Датум и место рођења: <i>06.04.1991., Крушевац, Република Србија</i>
Садашње запослење: <i>Истраживач-сарадник (научна област: хемија), Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>
<b>Докторска дисертација</b>
Наслов: <b><i>Синтеза, карактеризација и биолошка активност динуклеарних платина(II) и паладијум(II) комплекса са азот-донорским мостним лигандима.</i></b>
Број страница: 148
Број слика: 119
Број библиографских података: 220
Установа и место где је рад израђен: <i>Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>
Научна област (УДК): <i>546, Хемија – Неорганска хемија</i>
<b>Ментор:</b> <i>др Биљана Петровић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>
<b>Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: 26.06.2019.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: одлука бр. IV-01-804/3 датум 09.10.2019. године.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. др Биљана Петровић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: неорганска хемија, ментор</li> <li>2. др Сања Гргурић Шипка, редовни професор, Хемијски факултет, Универзитет у Београду, ужа научна област: неорганска хемија, председник комисије</li> <li>3. др Снежана Рајковић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: неорганска хемија, члан комисије</li> </ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. др Сања Гргурић Шипка, редовни професор, Хемијски факултет, Универзитет у Београду, ужа научна област: неорганска хемија, председник комисије</li> <li>2. др Снежана Јовановић-Стевић, виши научни сарадник, Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу, научна област: хемија, члан комисије</li> <li>3. др Ратомир Јелић, редовни професор, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: неорганска хемија, члан комисије</li> <li>4. др Сузана Поповић, виши научни сарадник, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, научна област: медицинске науке, члан комисије</li> <li>5. др Снежана Рајковић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: неорганска хемија, члан комисије</li> </ol>
Датум одбране дисертације:

*ПОСВЕЋЕНО СЕБИ*

## ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација урађена је у Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу и део је пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Пројекат бр. 451-03-9/2021-14/200122).

Првенствено бих желео да се захвалим ментору, проф. Биљани Петровић, у осмишљавању и вођењу ове Докторске дисертације, као и свим колегама из групе проф. Биљане Петровић, а посебну захвалност дугујем Снежи Јовановић-Стевић на свим сугестијама и предлозима везаним за ову докторску дисертацију.

Захваљујем се свим члановима комисије на сугестијама и коментарима који су допринели да Дисертација добије свој коначан облик.

Такође, бескрајно сам захвална породици на безусловној подршци током докторских студија.

Душан Ћоћић

## АПСТРАКТ

У оквиру ове дисертације описана је синтеза и карактеризација динуклеарних комплекса Pd(II) и/или Pt(II) са азот-донорским мостним (пиразол, 4,4'-бипиридин, *tpdm* = дериват бензен-1,4-диамин) и инертним (етилендиамин, 2,2'-бипиридин, диаминоциклохексан) лигандима, који поседују различите  $\pi$ -акцепторске и  $\sigma$ -донорске карактеристике. Структуре комплекса потврђене су различитим аналитичким методама (елементална микроанализа, UV-Vis, IR,  $^1\text{H}$  NMR, MALDI-TOF и ESI-MS спектрометрија), а за одговарајуће аква аналоге комплекса одређене су  $pK_a$  вредности. Резултати испитивања нуклеофилних супституционих реакција са биолошки релевантним нуклеофилима показали су да у зависности од нуклеофила у процесу супституције може доћи до нарушавања структуре динуклеарног комплекса. Редослед реактивности динуклеарних комплекса зависи од врсте јона метала који улазе у састав, као и од структурних и електронских карактеристика инертних и мостних лиганда, док је реактивност сумпор-донорских нуклеофила (тиоуреа, L-цистеин, L-метионин, глутатион) у свим случајевима била већа у односу на азот-донорске (L-хистидин, гуанозин-5'-монофосфат). Резултати испитивања интеракција са ДНК показали су да комплекси имају способност да се вежу интеркалацијом и/или за мали жљеб ДНК хеликса. Испитивањем интеракција са говеђим серумским албумином (BSA) добијене су умерене до високе вредности за константе везивања (реда величине  $10^3$ - $10^5$   $\text{M}^{-1}$ ), док је молекулским докингом потврђено везивање комплекса за структурни домен I (под-домен IIА) протеина. Резултати биолошких испитивања показали су да комплекси поседују значајну цитотоксичну активност на одабраним хуманим ћелијским линијама аденокарцинома грлића материце (HeLa), карцинома дојке (MDA-MB-231), меланома (HTB140) и карцинома плућа (H460)), као и да механизам цитотоксичног деловања јако зависи од структуре динуклеарног комплекса.

## КЉУЧНЕ РЕЧИ

- Динуклеарни комплекси Pd(II) и/или Pt(II)
- Биомолекули
- Кинетика
- Механизам
- ДНК
- BSA
- Цитотоксичност
- Компјутерска хемија
- Молекулски докинг

## ABSTRACT

This dissertation describes the synthesis and characterization of dinuclear Pd(II) and/or Pt(II) complexes with nitrogen-donor bridging (pyrazole, 4,4'-bipyridine, tpdm = benzene-1,4-diamine derivative) and inert (ethylenediamine, 2,2'-bipyridine, diaminocyclohexane) ligands, that have different  $\pi$ -acceptor and  $\sigma$ -donor characteristics. The structures of these complexes were confirmed by various analytical methods (elemental microanalysis, UV-Vis, IR,  $^1\text{H}$  NMR, MALDI-TOF and ESI-MS spectrometry). The  $pK_a$  values for the corresponding aqua analogues of dinuclear complexes were determined as well. The results of the investigation of nucleophilic substitution reactions with biologically relevant nucleophiles showed that, depending on the type of the nucleophile, the structure of dinuclear complexes may be disturbed in the substitution process. The order of reactivity of dinuclear complexes depends on the type of metal ions as well as on the structural and electronic characteristics of inert and bridging ligands. Additionally, the reactivity of sulfur-donor nucleophiles (thiourea, L-cysteine, L-methionine, glutathione) in all cases was higher than the reactivity of nitrogen-donors (L-histidine, guanosine-5'-monophosphate). The results of the investigation of the interactions with DNA have shown that complexes can bind by intercalation and/or by minor groove binding to DNA helix. High values of binding constants (range  $10^3$ - $10^5$ ) were obtained for the interactions of complexes with bovine serum albumin (BSA), while molecular docking confirmed the binding of complexes to structural domain I (sub-domain IIA) of the protein. The results of biomedical studies showed that complexes possess significant cytotoxic activity on selected cell lines (HeLa, MDA-MB-231, HTB140, H460), and that the mechanism of the cytotoxic activity of dinuclear complexes strongly depends on their structure.

## KEY WORDS

- Dinuclear Pd(II) and/or Pt(II) complexes
- Biomolecules
- Kinetics
- Mechanism
- DNA
- BSA
- Cytotoxicity
- Computational chemistry
- Molecular docking

## САДРЖАЈ

УВОД.....	1
1) ОПШТИ ДЕО	
1.1) Улога јона метала у медицини.....	3
1.2) Антитуморска активност комплекса Pt(II), Pt(IV) и Pd(II).....	4
1.3) Полинуклеарни комплекси Pt(II) као антитуморски агенси.....	11
1.4) Нуклеофилне супституционе реакције комплексних једињења.....	14
1.5) Супституционе реакције квадратно-планарних комплекса.....	17
ЗАДАТАК РАДА.....	21
2) ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	
2.1) Реагенски и раствори.....	22
2.2) Инструменталне методе.....	23
2.3) Синтеза комплекса.....	23
2.4) Одређивање константе киселости комплекса.....	26
2.5) Кинетичка мерења.....	26
2.6) <sup>1</sup> H NMR мерења.....	27
2.7) HPLC мерења.....	27
2.8) Методе компјутерске хемије.....	28
2.9) Испитивање интеракција комплекса са ДНК апсорпционом методом.....	28
2.10) Испитивање интеракција комплекса са ДНК флуориметријском методом..	28
2.11) Испитивање интеракција комплекса са ДНК мерењем вискозности.....	29
2.12) Испитивање интеракција комплекса са BSA флуориметријском методом..	29
2.13) Термодинамички параметри везивања.....	30
2.14) Симулација молекулског докинга.....	30
2.15) Биолошка испитивања.....	31
2.15.1) Ћелијске линије.....	31
2.15.2) Припремање раствора комплекса.....	31
2.15.3) МТТ тест.....	32
2.15.4) Кологени тест.....	32
2.15.5) Проточна цитометријска анализа.....	33
2.15.6) Annexin V-FITC/7-ADD тест.....	33
2.15.7) Детекција аутофагије помоћу акридин-оранжа.....	33
2.15.8) Анализа апоптских и аутофагних протеина.....	33
2.15.9) Анализа ћелијског циклуса.....	34
2.15.10) Процена митотичке катастрофе.....	34
3) РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	
3.1) Динуклеарни комплекси Pd(II): Резултати испитивања хидролизе, нуклеофилних супституционих реакција, ДНК/BSA интеракција и цитотоксичне активности.....	35
3.1.1) Одређивање константе киселости диаква комплекса 1.1a-1.6a.....	35
3.1.2) Испитивање супституционих реакција комплекса 1.1-1.6.....	38
3.1.3) Испитивање интеракција комплекса 1.1-1.6 са ДНК апсорпционом методом.....	61
3.1.4) Испитивање интеракција комплекса 1.1-1.6 са ДНК емисионом методом.....	64
3.1.5) Испитивање интеракција комплекса 1.1-1.6 са BSA емисионом методом.....	65
3.1.6) Резултати молекулског докинга.....	68
3.1.7) Испитивање цитотоксичне активности комплекса 1.1-1.6 према HeLa, MDA-MB-231 и MRC-5 ћелијским линијама.....	75



3.2) Динуклеарни комплекси Pt(II): Резултати испитивања хидролизе, нуклеофилних супституционих реакција и молекулског докинга са ДНК/BSA.....	79
3.2.1) Одређивање константе киселости диаква комплекса 2.2а-2.3а.....	79
3.2.2) Испитивање супституционих реакција комплекса 2.1-2.4.....	81
3.2.3) Резултати молекулског докинга.....	93
3.3) Хомо- и хетеро-динуклеарни Pt(II)/Pd(II) комплекси: Резултати испитивања хидролизе, нуклеофилних супституционих реакција, ДНК/BSA интеракција и цитотоксичне активности.....	100
3.3.1) Одређивање константе киселости диаква комплекса 3.1а-3.3а.....	100
3.3.2) Испитивање супституционих реакција комплекса 3.1-3.3.....	104
3.3.3) Испитивање интеракција комплекса 3.1-3.3 са ДНК апсорпционом методом.....	112
3.3.4) Испитивање интеракција комплекса 3.1-3.3 са ДНК емисионом методом.....	114
3.3.5) Испитивање интеракција комплекса 3.1-3.3 са ДНК мерењем вискозности.....	115
3.3.6) Испитивање интеракција комплекса 3.1-3.3 са BSA емисионом методом.....	116
3.3.7) Термодинамички параметри везивања.....	122
3.3.8) Резултати молекулског докинга.....	123
3.3.9) Испитивање цитотоксичне активности комплекса 3.1-3.3 према НТВ14, Н460 и MRC-5 ћелијским линијама.....	127
3.3.9.1) Кологени тест.....	128
3.3.9.2) Механизам ћелијске смрти.....	129
4) ЗАКЉУЧАК.....	133
ЛИТЕРАТУРА.....	135
ПРИЛОЗИ.....	144
БИОГРАФИЈА.....	148

## СКРАЋЕНИЦЕ

7-AAD	- 7-аминоактиномицином Д
2,2'-bipy	- 2,2'-бипиридин
4,4'-bipy	- 4,4'-бипиридин
5-FU	- флуороурацил
5'-GMP	- гуанозин-5'-монофосфат
2-pic	- 2-метилпиридин
АО	- акридин-оранж
BBR3464	- триплатин-тетранитрат
BSA	- говеђи серумским албумин
B3LYP	- теоријски функционал
Bcl2	- протеински генетички код
Balb/c	- албино имунодефициран лабораторијски миш
CDDP	- цисплатина
CHCA	- $\alpha$ -цијано-4-хидроксицинаминска киселина
L-Cys	- L-цистеин
dien	- диетилентриамин
dppe	- 1,2-bis(дифенилфосфино)етан
dach	- 1,2-диаминоциклохексан
def2-SVP	- теоријски базисни скуп
DMF	- N,N – диметилформаид
ДНК	- дезоксирибонуклеинска киселина
DMEM	- Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	- диметилсулфоксид
en	- етилендиамин
ESI-MS	- електроспреј јонизациона масена спектрометрија
ЕВ	- етидијум-броид
ФДА	- Америчка управа за храну и лекове
FW	- Израчуната молекулска маса
GI <sub>50</sub>	- половина максималне вредност инхибиције раста
GSH	- глутатион
HTB140	- ћелијска линија меланома
H460	- ћелијска линије карцинома плућа
HMG1	- протеин велике покретљивости групе 1

HEPES	- N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етансулфонска киселина
Hoe	- Hoechst 33258 - 4-[6-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1H-бензимидазол-2-ил]-1H-бензимидазол-2-ил]фенол трихидрохлорид
L-His	- L-хистидин
h	- Планкова константа ( $6,6261 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-1}$ )
HeLa	- аденокарцином грлића материце
ibn	- изобутилендиамин
IR	- инфрацрвена спектроскопија
IC <sub>50</sub>	- концентрација која инхибира преживљавање 50% ћелија
JM216	- сатраплатина
K <sub>b</sub>	- константа везивања за ДНК
K <sub>SV</sub>	- Стерн-Волмерова константа
k <sub>q</sub>	- константа брзине „гашења” флуоресценције
K	- константа везивања за BSA
k <sub>obsd</sub>	- константа брзине реакције <i>pseudo</i> -првог реда
LC <sub>50</sub>	- концентрација која изазива смрт 50% ћелија
MALDI-TOF	- ласерска десорпциона/јонизациона масена спектрометрија
L-Met	- L-метионин
MDA-MB-231	- ћелијска линија карцинома дојке
MRC-5	- ћелијска линија нетрансформисаних хуманих фибробласта
MTT	- 3(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид
NMR	- нуклеарна магнетна резонанца
N	- Авогадрова константа ( $6,0221 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )
n	- број везивних места за BSA
pz	- пиразин
PBS	- фосфатни пуфер
PI	- пропиридијум-јодид
PE	- однос броја колонија и броја засејаних ћелија
PHK	- рибонуклеинска киселина
R	- гасна константа ( $8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )
sac	- сахарин
S(-)C <sub>2</sub> N-dmpa	- медроксипрогестерон ацетат
SI	- индекс селективности
SE	- фракција преживљавања
TCCD	- трансплатина

terpy	- терпиридин
tpbd	- N,N,N',N'- <i>tetrakis</i> -(2-пиридилметил)бензен-1,4-диамин
Tu	- тиоуреа
TGI	- вредност укупне инхибиције раста
$pK_a$	- логаритамска вредност константе киселости
UV-Vis	- спектроскопија у ултраљубичастом и видљивом делу спектра
$\Delta G^\ddagger$	- промена слободне енергије активирања
$\Delta H^\ddagger$	- промена енталпије активирања
$\Delta S^\ddagger$	- промена ентропије активирања
$\Delta V^\ddagger$	- промена запремине активирања
$\Delta G^0$	- промена стандардне слободне енергије
$\Delta H^0$	- промена стандардне енталпије
$\Delta S^0$	- промена стандардне ентропије

## УВОД

Канцер представља болест неконтролисаног раста абнормалних ћелија различитих органа или ткива, које као такве могу прећи своје уобичајене границе и проширити се на суседне органе. Последњи процес обољења назива се метастаза и у већини случајева главни је узрок смртног исхода.<sup>1</sup> Канцер је други узрочних смрти у свету, а према подацима Светске здравствене организације један од шест оболелих случајева од канцера заврши се смртним исходом. У 2020. години од канцера је оболело око 19,3 милиона људи, а према проценама Светске здравствене организације до 2040. године тај број ће достићи 30,2 милиона оболелих.<sup>2</sup> Канцерогена обољења плућа, простате, стомака и јетре спадају у најчешћа обољења код мушке популације, док од канцера дојке, дебелог црева, плућа, грлића материце и штитне жлезде најчешће оболева женска популација. Успешна терапија против канцера је веома захтеван процес употребе цитостатика и/или радиотерапије, често у комбинацији са оперативним захватом.

Међу цитостатикима посебно место заузимају лекови на бази једињења платине. Наиме, открићем антиканцерогеног дејства једињења *cis*-диамминдихлоридоплатина(II), познатијег као *цисплатина* или CDDP (*cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]), од стране Б. Росенберга 1965. године,<sup>3</sup> област медицинске неорганске хемије добија на великом значају. Ово је иначе био први цитостатик на бази платине који је одобрен за медицинску употребу од стране Америчке управе за храну и лекове (ФДА; 1978. године). Маханизам дејства CDDP базиран је на формирању Pt-ДНК једињења, које даље изазива апоптозу абнормалних ћелија.<sup>4</sup> CDDP, након хидролизе, привлачи полианјонски нуклеотид ДНК формирајући Pt-ДНК комплекс, пре свега успостављањем 1,2-интраланчане (унутарланчане) везе са N7 атомом гуанина и аденина,<sup>5,6</sup> што у значајној мери доводи до дисторзије хеликоидне структуре ДНК. CDDP се унутар организма не везује само за ДНК, већ поседује могућност везивања и за протеине, нарочито оне који у себи садрже атоме сумпора и селена. Претпоставља се да се мање од 10% CDDP ковалентно везује за ДНК, док се 75% – 85% везује за протеине, што узрокује значајне токсичне ефекте укључујући нефротоксичност,<sup>7,8</sup> неуротоксичност,<sup>9</sup> ототоксичност,<sup>10</sup> оштећење кошчаног ткива и повраћање. Да би се превазишло токсично дејство и проширио спектар дејства, неколико аналога CDDP је клинички евалуирано као потенцијални антиканцерогени агенси. Као резултат ових истраживања дошло је до развоја друге и треће генерације Pt(II) антиканцерогених агенаса.

*Карбоплатина*, једињење друге генерације, је мање токсична од CDDP због присуства дианјонске *bis*-карбоксилато одлазеће групе, која успорава хидролизу комплекса. Она се првенствено користи за третирање рака јајника, главе, врата, ендотермијума, грлића материце, тестиса, дојке, плућа и бешике.<sup>11</sup> Метастазирани колоректални канцери третирају се *оксалиплатином*, комплексом треће генерације. Поред ових једињења која су одобрена у свету, *недаплатина*, *лобаплатина* и *хептаплатина* регионално се користе у Јапану, Јужној Кореји и Кини.

Након дугогодишњег истраживања у овом пољу дошло се до закључка да многи аналози *цисплатине* не показују значајнију клиничку предност у односу на већ постојеће. Ова чињеница допринела је да се истраживања у области медицинске неорганске хемије усмере на испитивање некласичних мултинуклеарних Pd(II) и Pt(II) комплекса.<sup>12</sup> Овоме је допринело и откриће потенцијалне активности тринуклеарног Pt(II) комплекса, познатог као BBR3464, у коме су јони Pt(II) повезани алкендиаминским ланцима. Ово једињење тренутно је у предклиничкој фази истраживања, а његово тестирање нарочито је фокусирано на канцерогеним ћелијама резистентним према

*цисплатини*.<sup>13</sup> Генерално, мултинуклеарни комплекси Pd(II) и/или Pt(II) убрајају се у нову класу антикарценогених агенаса, који се разликују у односу на своје мононуклеарне аналоге и у погледу везивања за ДНК молекуле. То везивање се, пре свега, односи на 1,3- и 1,4-интерланчане (међуланчане) везе са ДНК ланцом,<sup>14</sup> при чему публиковани резултати показују да полинуклеарни комплекси са азолима као мостним лигандима смањују дисторзију ДНК хеликса.<sup>15</sup>

Наиме, дизајнирање погодног цитостатика из групе комплексних једињења захтева исцрпна хемијска и медицинска истраживања. Под хемијским истраживањем, поред синтезе и карактеризације комплекса, подразумевају се и испитивање интеракција са биолошки ревалантим микро- (нуклеотиди, азот- и сумпор-донорске аминокиселине, пептиди) и макро-молекулима (ДНК и транспортни протеини), понашање комплекса у физиолошким условима и симулације понашања једињења у присуству макромолекула помоћу различитих рачунарских техника. На основу хемијских испитивања могу се добити и резултати о брзини и механизму деловања комплекса, који у комбинацији са биомедицинским истраживањима могу проценити антитуморски потенцијал једињења.

У оквиру ове докторске дисертације испитивано је укупно тринаест динукларних комплекса Pt(II) и Pd(II), од којих је седам хомонуклеарних Pd(II), пет хомонуклеарних Pt(II) и један хетеронуклеарни Pt(II)/Pd(II) комплекс. Резултати ових испитивања публиковани су у оквиру три научна рада у познатим међународним часописима.

## 1) ОПШТИ ДЕО

### 1.1) Улога јона метала у медицини

Јони метала имају важну улогу у биолошким системима. Метали 1. и 2. групе Периодног система су важни структурни елементи, али учествују и у одржавању наелектрисања и осмотског баланса. Јони прелазних метала који имају јединствено оксидационо стање, као што је Zn(II), такође имају структурну улогу, док прелазни метали који постоје у више оксидационих стања обично служе као носачи електрона. Међу њима значајну улогу имају јони гвожђа и јони бакра у транспорту кисеоника, гвожђе у хемоглобину, а бакар у хемоцианину.<sup>16</sup>

Добро је познато да недостатак неких јона метала може довести до болести попут пернициозне анемије (која је резултат недостатка гвожђа), успоравање раста (услед недовољног уноса цинка) и срчаних обољења код новорођенчади (услед недостатка бакра). Неки јони метала, попут олова и живе, су јако токсични. Истовремено, неки есенцијални јони метала могу бити токсични уколико су присутни у већим концентрацијама.<sup>17</sup> С тим у вези, лечење болести узрокованих неадекватном функцијом јона метала у организму представља важан аспект медицине, фармације, биохемије, молекуларне биологије и медицинске хемије.

Са друге стране, неки јони метала користе се као фармацеутски производи и дијагностички агенси, јер поседују јединствене карактеристике које укључују редокс активност, различите начине везивања и различиту реактивност према органским супстратима. Међу њима, комплексна једињења, било као лекови или про-лекови, постају веома интересантна у медицинској хемији. Употреба јона метала у лечењу је позната од давнина, али концепт примене савремених медицинско-хемијских приступа се значајно развио након Розенберговог открића антитуморског дејства *цисплатине*.<sup>3</sup> Данас, поље примене јона метала у медицини описује медицинска неорганска хемија, која се пре свега заснива на откривању и развоју нових фармацеутских агенаса на бази комплексних једињења. У те агенсе убрајају се „метални” лекови, у којима је комплекс јона метала сам по себи активни агенс, као и агенси који не садрже јон метала, али могу да делују на природне биомолекуле који садрже метал, као и да утичу на транспорт метала у биолошким системима.

Неорганска хемија у медицини може се потенцијално базирати на два феномена. Један подразумева да биомолекули представљају лиганде који имају способност да се координују за јоне метала у некој од својих форми, а други се заснива на особини јона метала да у неким од својих једињења могу сами по себи бити контраст агенси.<sup>18</sup> Под контрастним агенсима првенствено се мисли на радионуклеотиде у радиоимуноосликавању и радиоимунотерапији. Овде је важно нагласити разлику између метало-једињења као хемиотерапеутских агенаса, чија основна функција јесте уништавање ћелија, и метало-агенса који делују по фармакодинамичком механизму, тј. чији механизам акције мора бити у основи реверзибилан и/или кратког дејства.<sup>19</sup>

Примена неорганских једињења у медицини захтева детаљно испитивање њиховог понашања у воденим растворима, укључујући фармакокинетику (испитивање кинетике реакција са биомолекулима који поседују релевантне донорске атоме), њихов метаболички процес, интрацелуларно понашање и ефекат агенса на циљану мету. Променом лиганада унутар координационе сфере и/или геометрије једињења могу се систематски подешавати кинетичке и термодинамичке особине комплекса према

биолошким рецепторима. За једињења која садрже јоне тешких метала (као на пример јоне Au(I), Au(III), Pt(II), Cu(II)) примена у фармакологији представља компромис између њихове токсичности и терапеутске активности. Токсичност најчешће произилази из процеса метаболизма или као последица неподобних интеракција са протеинима. Са друге стране, терапеутска или дијагностичка примена једињења захтева детаљна истраживања особина комплекса са хемијског и биолошког аспекта. Детаљно познавање односа између јона метала и биомолекула пружа бесконачно различите могућности да се утиче на својства, реактивност и коначно биолошки ефекат једињења у датом контексту. Даља испитивања у овој области показала су да јони метала, у различитим биолошким системима и различитом координационом окружењу, могу имати веома различит утицај на биолошке процесе. Многобројни публиковани резултати су потврдили значајан напредак у коришћењу комплекса јона прелазних метала као лекова за лечење различитих болести.<sup>20</sup>

## 1.2) Антитуморска активност комплекса Pt(II), Pt(IV) и Pd(II)

Године 1969, Барнет Росенберг, Лорета Ван Камп и Томас Кригас објавили су научни рад који описује антипролиферативну активност неорганског једињења једноставне структуре, данас познатог као *цисплатина*.<sup>3</sup> Ово откриће означава почетак развоја нове области у пољу савремене медицине. Наиме, први биолошки експерименти са *цисплатином* (након што су уочене морфолошке промене у бактеријама) били су на мишевима, а клиничка испитивања на људима почела су 1971. године. ФДА је лек одобрила 1978. године, што је рекордно брза процедура одобравања према данашњим стандардима.<sup>21</sup> Коначно, успех овог једињења подстакао је истраживања која су захтевала интензивну сарадњу и повезаност, пре свега, биологије и неорганске хемије, како би се детаљно разјаснио механизам деловања цисплатине и како би се синтетисала нова, потенцијално успешнија једињења. У ширем смислу, откриће да је неоргански комплекс изазвао значајан биолошки ефекат инспирисало је бројна даља истраживања. С тим у вези, комплекси Pt(II) су данас међу најчешће коришћеним лековима за лечење рака. Као што је претходно напоменуто, три диаминска комплекса Pt(II) одобрена су за клиничку употребу,<sup>22,23,24</sup> а неколико других је у различитим фазама клиничког испитивања (Табела 1). Тренутно је у многобројним истраживањима акценат на смањењу токсичности ових комплекса према здравим ћелијама, смањењу појаве резистенције и повећању спектра ћелија рака на које делују. Последњих година фокус истраживања обухватио је и међудејство комплекса и имунолошког система.<sup>25</sup> Наиме, у неким случајевима примећено је да агенси на бази јона метала изазивају изразито јаке имунолошке реакције.

Већина агенаса данас се прво тестира на различитим ћелијским линијама по одговарајућем модел систему. Тако добијени *in vitro* подаци пролиферације или студије о формирању ћелијских колонија дају корисне информације о цитотоксичном дејству. Једињења са добрим потенцијалом се даље испитују *in vivo* методама. Потом, фаза I клиничких испитивања подразумева процену граничне токсичности агенса и може се остварити са релативно малим бројем пацијената. Фаза II клиничких испитивања обично процењује ефикасност једног агенса на различитим обољењима, укључујући велики број пацијената. Ова испитивања могу трајати дуго, док се не добије статистички значајан број података. Фаза III клиничких испитивања процењује ефикасност агенса у комбинованом режиму третирања, пошто се сама хемиотерапија често изводи у комбинацији са другим агенсима.<sup>26,27</sup>



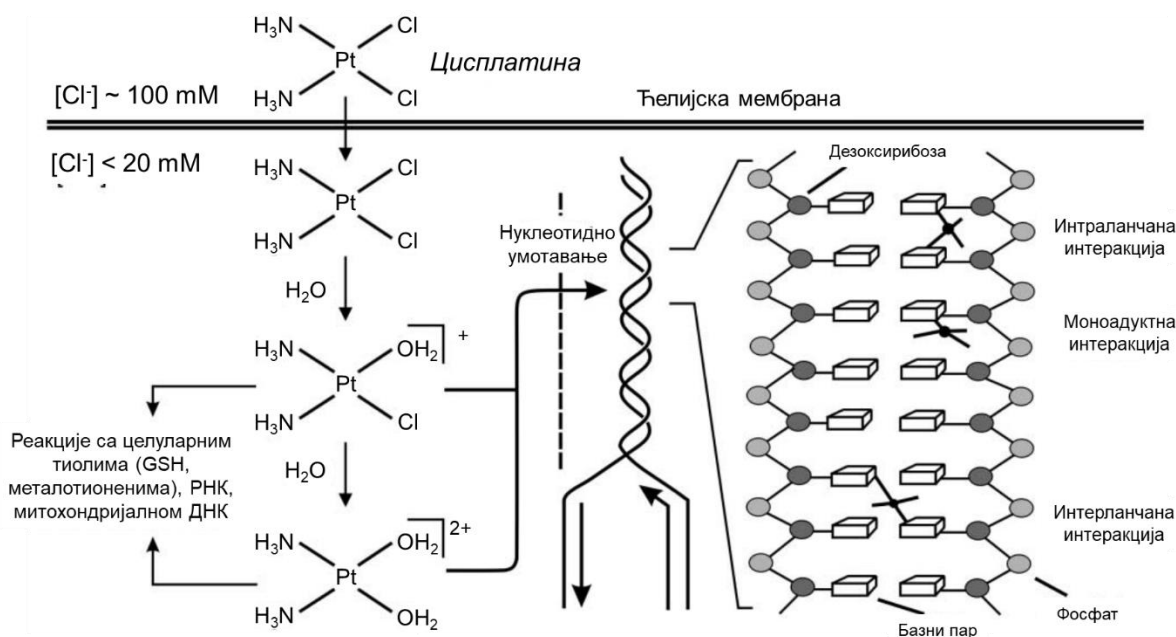
Цисплатина се користи самостално или у комбинацији са другим хемиотерапеутским лековима у случају карцинома бешике, тестиса, грлића материце, метастазираниог карцинома јајника, плућа, малигног мезотелиома, карцинома сквамозних ћелија главе и врата, неуробластома, тумора мозга и рака једњака.<sup>28</sup> Типичне дозе у односу на величину третираног тумора су у опсегу од 20 mg/m<sup>2</sup> до 100 mg/m<sup>2</sup>, у периоду од пет дана. Упркос овим чињеницама, и даље је број успешно третираних канцера *цисплатином* ограничен.<sup>29,30</sup>

Табела 1. Антитуморски комплекси Pt(II) и Pt(IV) и њихов клинички статус.<sup>31,32,33,34,35</sup>

Назив	Структурна формула	Назив	Структурна формула
Цисплатина <sup>*</sup>		Недаплатина <sup>±</sup>	
Карбоплатина <sup>*</sup>		Зениплатина <sup>±</sup>	
Хептаплатина <sup>+</sup>		Енлоплатина <sup>±</sup>	
Оксалиплатина <sup>*</sup>		Лобаплатина <sup>#</sup>	
Пикоплатина (AMD 473)		Спироплатина (TNO-6) <sup>×</sup>	
JM-11 <sup>±</sup>		PAD <sup>±</sup>	
Циклоплатам <sup>±</sup>		JM216 <sup>°</sup>	
Ароплатина (1-NDDP) <sup>±</sup>			
BBR-3464 <sup>×</sup>			

<sup>\*</sup>Одобрено од ФДА; <sup>+</sup>Одобрено у Јужној Кореји; <sup>#</sup>Одобрено у Кини; <sup>±</sup>Није прошао фазу I; <sup>×</sup>Није прошао фазу II; <sup>°</sup>Није прошао фазу III; <sup>±</sup>У II фази испитивања; <sup>#</sup>Напуштена испитивања

Крајња мета комплекса Pt(II), као антитуморског агенса, јесте ДНК, при чему награђени Pt(II)-ДНК производ покреће деактивацију процеса репликације ДНК и на крају апоптозу (програмирана ћелијска смрт) (Слика 1). Комплекси са молекулом ДНК могу генерално интераговати иреверзибилно ковалентним везивањем или различитим нековалентним интеракцијама, као што су електростатичке, везивање за мали или велики жљеб ДНК хеликса и интеркалацијом.<sup>36</sup> Досадашњи публиковани резултати довели су до закључка да адукти са ДНК не утичу директно на ћелијску смрт, већ узрокују ћелијску смрт кроз даље ефекте које постижу, као што су интеракција са протеинима и процес ћелијске сигнализације. У суштини, препозната су два главна пута којима подлеже третирана ћелија хемиотерапеутским агенсом: (1) репарација оштећења, или (2) иницијација процеса апоптозе. Оштећење ДНК од стране агенса у многим случајевима посредовано је p53 процесом,<sup>37</sup> односно оштећење ДНК од стране *цисплатине* стимулише апоптозу преко p53-зависног процеса, али је код извесног броја ћелијских линија уочен и p53-независни процес.<sup>38,39</sup> Током самог p53 процеса настаје p53 протеин, чија је главна улога у сузбијању тумора, регулишући сувише брзе и неконтролисане ћелијске деобе (пролиферација).<sup>40</sup>

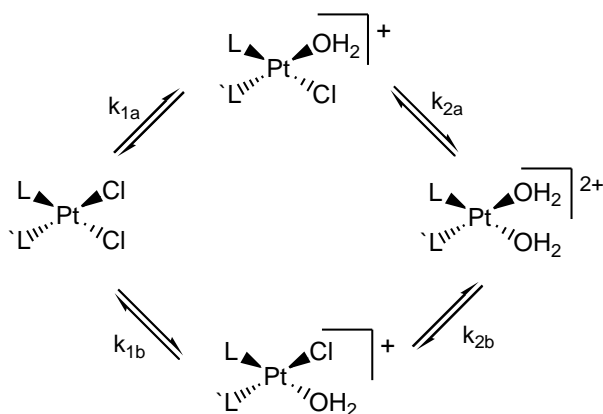


Слика 1. Предложени механизам деловања *цисплатине*.

Резистентност на *цисплатину* је вишестрана и последица је комбинације више фактора, као што су смањење ћелијске акумулације *цисплатине*, повећање количине излучене платине из ћелије, повећање цитоплазматичне детоксикације (повећање лучења деактивирајућих целуларних тиола, као што је глутатион) и унапређивање механизма репарације/толеранције Pt-ДНК адукта.<sup>41,42</sup> Показало се да је ћелијска акумулација *цисплатине* сложен процес, јер постоје индиције о присуству и пасивног и активног дифузионог пута.<sup>43</sup> Резултати испитивања на различитим ћелијским линијама значајно су помогли разумевању и превазилажењу резистенције.<sup>44,45</sup> Важно откриће у овом пољу представљало је да се резистентност на *цисплатину* може превазићи употребом једињења са другачијим аминским лигандима, као што је на пример

1,2-диаминоциклохексан (dach). Стога су многобројна истраживања била усмерена на испитивање утицаја структуре аминских лиганата на активност комплекса платине.<sup>24</sup>

Најважнији корак у везивању *цисплатине* за ДНК је аквација Pt-Cl везе. Уствари, успешно формирање Pt-ДНК комплекса захтева претходну хидролизу CDDP у активнији аква облик. У крвотоку, због високе концентрације хлоридних јона (~100 mM), процес хидролизе је сузбијен.<sup>46</sup> Међутим, унутар цитоплазме, где је концентрација хлоридних јона испод 20 mM, долази до делимичне или потпуне хидролизе CDDP, при чему настају одговарајуће моно- или ди-аква честице,  $cis-[PtCl(NH_3)_2(H_2O)]^+$  и  $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$  (Шема 1).



Шема 1. Хидролиза Pt(II) комплекса, (где је L = L' = NH<sub>3</sub> у случају *цисплатине*, а L = NH<sub>3</sub> и L' = 2-пиколин у случају AMD 473 комплекса).

Промена аминских лиганата у структури комплекса може значајно утицати на брзину хидролизе и  $pK_a$  вредност насталих аква честица. Добро је познато да су аква комплекси веома реактивни, док су хидроксо комплекси релативно инертни. Упоредна истраживања на комплексима JM216 и *пикоплатином* ( $cis-[PtCl_2(NH_3)(2-pic)]$ ), (Табела 1), најбоље показују ефекте различитих аминских лиганата на брзину хидролизе и додатно на  $pK_a$  вредност тако добјених аква комплекса.<sup>47</sup> За моноаква аналог комплекса JM216,  $pK_a$  вредности које су последица депротонације молекула воде у *trans* положајима у односу на координоване групе NH<sub>3</sub> и *c*-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NH<sub>2</sub> су релативно исте (Табела 1), док је брзина хидролизе хлоридног јона у *trans* положају у односу на *c*-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NH<sub>2</sub> групу двоструко бржа у односу на хидролизу хлоридног јона смештеног у *trans* положају у односу на NH<sub>3</sub> групу истог комплекса.<sup>48</sup> Такође, стерно окружење може значајно утицати на брзину хидролизе лиганда и  $pK_a$  вредност. На пример, код комплекса AMD473, брзина хидролизе хлоридног јона који је у *trans* положају у односу на amino групу (*cis* у односу на 2-пиколин) је око четири пута мања у односу на аналогни комплекс са 3-пиколином као инертним лигандом.<sup>49</sup> Вредност за  $pK_a$  у случају AMD473 комплекса је за ~0,3 јединице нижа од  $pK_a$  вредности за *цисплатину*, односно у физиолошким условима у случају овог комплекса може се очекивати већи проценат инертних хидроксо честица. Ова особина, заједно са кинетичким подацима, чини AMD473 комплекс мање реактивним унутар ћелије.

Истраживања су показала да хидролиза *цисплатине* представља важан корак у интеракцији комплекса са ДНК. Моноаква честице сматрају се најчешћим реактантима

са ДНК молекулом, иако неки резултати указују на важност интеракција диаква честице *цисплатине* ( $cis-[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ ).<sup>50</sup> Са друге стране, хидролиза *карбоплатине* укључује супституцију хелатно везаног циклобутан-1,1-дикарбоксилата из координационе сфере, тако да је процес хидролизе очекивано спорији. Наиме, у киселој средини тај процес представља сукцесивну супституцију карбоксилата.<sup>51</sup> Са кинетичког аспекта, у циљу креирања еквитоксичног и еквивалентног ефекта *карбоплатине* и *цисплатине*, потребна је значајно већа доза *карбоплатине* да би дошло до платинизације еквивалена ДНК у поређењу са *цисплатином* за исти процес. Из тог разлога клиничка доза *карбоплатине* је у опсегу 800–900 mg/m<sup>2</sup>.<sup>52</sup> Ова особина одражава се и на смањење нефротоксичности *карбоплатине*, јер се инертнија *карбоплатина* може излучити непромењена.

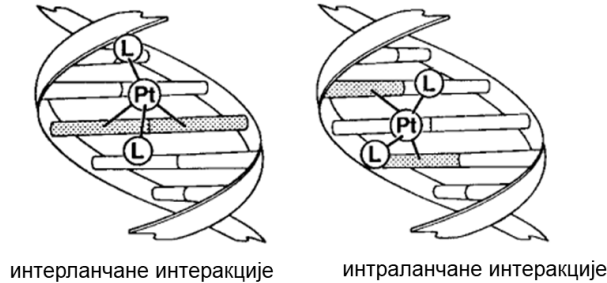
Након формирања одговарајућих хидролитичких честица, комплекси се даље везују за ДНК хеликс на различите начине. Формирање производа везивањем комплекса Pt(II) за N7 атом гуанина праћена је затварањем прстена и формирањем стабилног интерланчаног d(GG) хелата.<sup>53</sup> Доказано је да је d(GG) хелат важан ћелијски адукт. Селективност Pt(II) комплекса према d(GG) секвенци повезана је са великом електронском густином на тим местима у ДНК молекулу (најлакше оксидована места унутар ДНК молекула) и као таква та места су изразито нуклеофилна, иако је примећено да могу да се формирају и d(AG) (али не и d(GA)) хелати. Детаљан увид у особине d(GG) хелата остварен је захваљујући добијеним кристалографским структурама d(CCTCTG\*G\*TCTCC)\*d(GGAGACCAGAGG).<sup>54</sup> Истраживањем интеракција Pt(II) комплекса и претходно наведеног ДНК фрагмента уочена је дисторзија квадратно-планарне координационе сфере комплекса, при чему се Pt(II) јон налази на око 1 Å изнад равни G базних парова.<sup>55</sup>

Као што је већ наведено, комплекси Pt(II) најчешће формирају адукте са ДНК молекулом преко гуанина, и то путем d(GG) 1,2-интраланчаних и d(GC) интерланчаних интеракција (Слика 2). Интеракције које су мање заступљене су 1,2-интраланчане између аденина и гуанина (код d(AG) адукта), као и 1,3-интраланчане интеракције између Pt(II) комплекса и два гуанина између којих је један базни пар, d(GNG). Да би се два суседна гуанина истог ДНК хеликса везала интраланчано, а уз то и одржала квадратно-планарна геометрија Pt(II) комплекса, потребно је да се превазиђу значајне стерне рестрикције. Молекулска и биолошка истраживања потврдила су да је главни ефекат за бифункционално интраланчано везивање комплекса са ДНК савијање хеликса ка малом жљебу, при чему је измерено да је типично савијање хеликса за око ~30–35°. <sup>56</sup> Интерланчане интеракције такође узрокују савијање ДНК хеликса.<sup>57</sup> Истраживања су показала да је комплекс Pt(II) смештен у малом жљебу и да су цитозини d(GC) базних парова укључени у формирање интерланчаних интеракција, при чему настаје Z-форма ДНК молекула,<sup>58,59,60</sup> што је веома неуобичајена структура. Међутим, интраланчана веза антитуморски неактивног комплекса *трансплатине*, TCCD ( $trans-[PtCl_2(NH_3)_2]$ ) формира се између гуанина и комплементарног цитозина истог базног пара.<sup>61,62</sup> Комплекс TCCD стерно није у могућности да формира 1,2-интраланчане везе са ДНК и зато се ова особина наводи као главни разлог неактивности овог комплекса. Најзаступљеније интеракције TCCD и ДНК хеликса су типови интерланчаних интеракција (Слика 2).

### Бифункционални адукти интеракције ДНК и *cis*-Pt(II) комплекса



### Бифункционални адукти интеракције ДНК и *trans*-Pt(II) комплекса



Слика 2. Приказ међуланчаних интеракција *cis*- и *trans*-Pt(II) комплекса са ДНК.

Производи *цисплатине* и ДНК молекула могу бити препознати од стране многобројних одбрамбених протеина,<sup>63,64,65</sup> који се генерално могу поделити у две групе: (1) протеини који у првом кораку директно препознају место за које се везује комплекс Pt(II) и (2) протеини који се везују за место где је претходно био везан Pt(II) комплекс. Оштећење ДНК индуковано *цисплатином* може бити препознато и од стране протеина који садрже тзв. домене високе мобилности (HMG). Тачна функција ових екстрахромозомалних ДНК везујућих протеина је и даље под истраживањем, али оно што се зна јесте да они имају велики афинитет према необичним, неканонским ДНК структурама, као што су крстасти ДНК хелиски.<sup>66</sup> До сада је потврђено да је заједничка особина свих протеина који садрже HMG домене њихова способност да савију ДНК молекул. Неколико HMG протеина препознају *цисплатина*-ДНК производе, али не и клинички неефективне производе *трансплатине* или производе монофункционалног [PtCl(dien)]<sup>+</sup> комплекса и ДНК молекула. Овакав начин препознавања довео је до претпоставке да протеини са афинитетом да се вежу за оштећену ДНК од стране *цисплатине* могу довести до заштите полинуклеотида од ћелијске репарације.<sup>67</sup>

Интеракција између Pt(II) комплекса и сумпор-донорске аминокиселине из групе тиоетара (L-Met) сматра се процесом који доводи до инактивације антиканцерогене активности комплекса. Метаболит [Pt(Met)<sub>2</sub>], уочен у урину пацијената третираних *цисплатином*, релативно је неактивни комплекс, који у раствору може да постоји у облику три диастереоизомера, сваки као дериват два геометријска изомера.<sup>68</sup> Геометријски *cis*-изомер доминира у односу на *trans*-изомер (87:13). Процес интраконверзије између ова два облика је јако спор ( $t_{1/2}$  за конверзију *cis* у *trans* је 24,4 сата, а *trans* у *cis* 3,2 сата на 310 К). Међутим, производ ког кога је L-Met координован само преко атома сумпора, на супрот производу где је награђен S,N-хелат, може учествовати у процесу супституције са N7 атомом гуанина.<sup>69,70</sup> Миграција Pt(II) комплекса на молекул ДНК (N7 атом гуанина) преко пептида или протеина који садрже

L-Met је на овај начин могућа. Тако је, на пример, стабилан монофункционални производ типа [Pt(en)(G)(L-Met-S)] изолован и окарактерисан.<sup>71</sup> Са друге стране, изражен *trans*-ефекат координованог атома сумпора може повећати нестабилност хемијске везе са азот-донорским лигандом у *trans* положају и тако омогућити Pt(II) комплексу да брже реагује са нуклеотидима.<sup>72</sup>

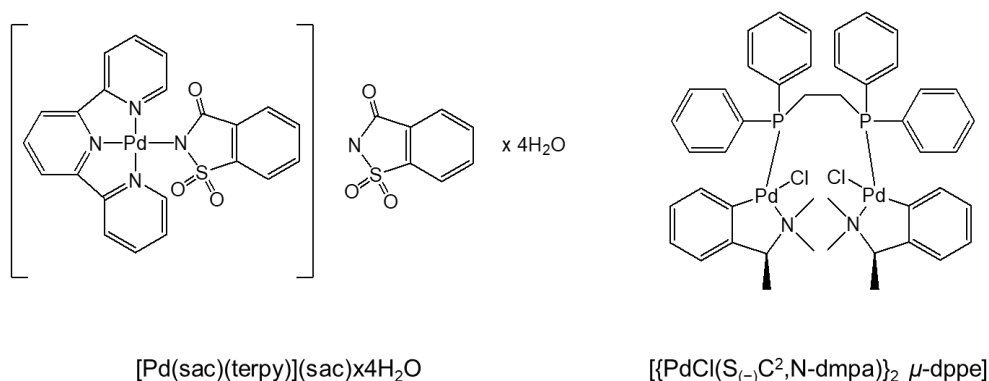
Пошто карбоплатина (Табела 1) спорије подлеже хидролизи,<sup>73</sup> испитивање реакције са L-Met значајно је помогло разумевању процеса активације овог комплекса. Наиме, у реакцији карбоплатине са L-Met у води настаје стабилан интермедијер отвореног прстена након дехелатизације једне карбоксилне групе инертног лиганда циклобутан-1,1-дикарбоксилата ( $t_{1/2}$  је 28 сати на 310 K). Овај интермедијер је стабилизован формирањем интермолекуларске водоничне везе, а детектован је у урину пацијената након третмана карбоплатином.<sup>74</sup>

Везивање Pt(II) комплекса за атом сумпора који потиче из тиолата је иреверзибилан процес. Реакција између *цисплатине* и интрацелуларних тиола, као што је глутатион (трипептид  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly), доводи до инактивирања дејства комплекса, а може бити узрок и појаве резистенције.<sup>75</sup> Такође је важно напоменути да у реакцији Pt(II) комплекса и сумпор-донорских лиганата долази до директне супституције хлорида, без претходне хидролизе комплекса.<sup>76,77</sup> Евантуално, везивање тиолата може узроковати и супституцију аминских лиганата.<sup>78</sup> Уочено је и прекомерно излучивање глутатиона унутар ћелија отпорних на *цисплатину*, што сугерише да се Pt(II)-глутатион комплекс излучује из ћелије као вид одбрамбеног механизма.<sup>79</sup> Појава резистентности на *цисплатину* код неких ћелија објашњава се и формирањем мостова између протеинских ланаца металотионеина путем цистеинских аминокислотних остатака тих ланаца. Тако, третирање *цисплатином* води ка индукцији металотионеина (нпр. у јетри) који могу да вежу и деактивирају Pt(II) комплексе. Такође треба напоменути да неактивна *трансплатина* реагује знатно брже са металотионеинима у односу на хемиотерапеутски активну *цисплатину*.<sup>80</sup> Генерално, особина да се Pt(II) јон лако везује за сумпор-донорске лиганде довела је до примене неких једињења сумпора као агенса у третирању токсичности *цисплатином*.<sup>81</sup>

Комплекси Pt(IV) су октаедарске геометрије и поседују мању реактивност у односу на квадратно-планарне комплексе Pt(II). На основу досадашњих истраживања претпоставља се да се комплекси Pt(IV), при физиолошким условима и у присуству редукционих агенса у организму, редукују до комплекса Pt(II), који затим испољавају своју антитуморску активност.<sup>4</sup> На основу ове чињенице, неки комплекси Pt(IV) могу се примењивати орално у хемиотерапији. Неколико комплекса Pt(IV) ушло је у клиничка испитивања, од којих сатраплатина<sup>82</sup> није прошла III фазу клиничких испитивања, ормаплатина (тетраплатина)<sup>83</sup> није прошла I фазу клиничких испитивања, док је ипроплатина<sup>84</sup> у II фази клиничких испитивања. Главни разлози за одустајање од примене поменутих комплекса Pt(IV) у хемиотерапији су веома мала антитуморска активност и нежељени споредни ефекти у I и II фази клиничких испитивања.

Изразита сличност у хемијским и структурним карактеристикама комплексних једињења јона Pt(II) и Pd(II) довело је до интезивних истраживања Pd(II) комплекса као потенцијалних антиканцерогених једињења.<sup>85</sup> Комплекси Pd(II) показали су повољну цитотоксичну активност и упркос већој лабилности у поређењу са Pt(II) аналогама.<sup>86,87</sup> *In vivo* стабилност Pd(II) антитуморских комплекса зависи од координованих инертних (као што су дитиокарбамати, полидентатни линеарни амини и сл.) и лабилних лиганата.<sup>88,89</sup> У циљу побољшања антинеопластичног дејства, као и смањења токсичног дејства, синтетисани су и испитивани различити моно- и полинуклеарни Pd(II)

комплекси,<sup>88</sup> као и хетеронуклеарни Pt(II)/Pd(II) (динуклеарни или тринуклеарни).<sup>90</sup> Насупрот мононуклеарним једињењима, полинуклеарни комплекси могу да интерагују са ДНК преко неколико везивних места. На Слици 3 приказане су структуре два Pd(II) комплекса који су показали потенцијално антитуморско дејство на основу резултата *in vivo* истраживања.



Слика 3. Структуре Pd(II) комплекса који су показали потенцијалну антитуморску активност.

Комплекс  $[Pd(sac)(terpy)](sac)x4H_2O$  је испитиван над Balb/c хелијским линијама и показао је благи токсични профил у односу на паклитаксел, као и мању токсичност у односу на *цисплатину*.<sup>91</sup> У случају динуклеарног комплекса  $[[PdCl(S_{(-)}C^2,N-dmpa)]_2 \mu-dppe]$ , лабораторијски мишеви над којима је тестиран показали су поремећај пермеабилитације митохондријалне мембране, док је код ксенографских мишева уочено смањење броја лимфних чворова и абиметастатички ефекат.<sup>92</sup>

### 1.3) Полинуклеарни комплекси Pt(II) као антитуморски агенси

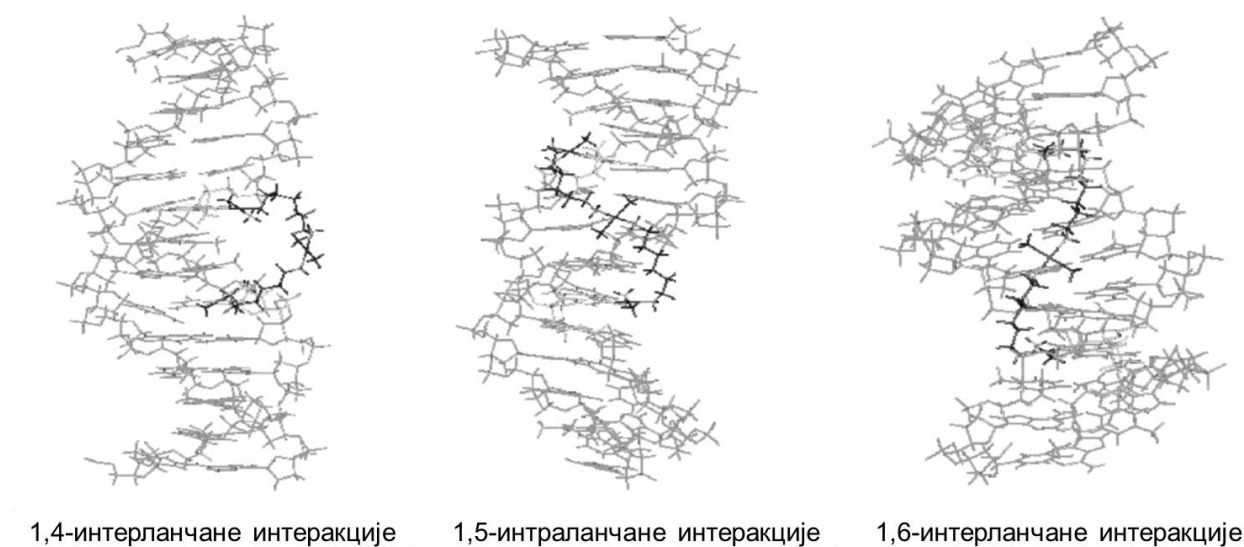
Пошто структурни аналози *цисплатине* дају сличне производе у интеракцији са ДНК као и сама *цисплатина*, није изненађујуће да долази и до сличних биолошких последица. Наиме, дошло се до претпоставке да развој једињења која су структурно различита од *цисплатине* може, на основу формирања различитих типова Pt-ДНК адукта, довести до проналаска комплекса са спектром клиничке активности која је комплементарна датом комплексу и различита од клиничке активности изазване *цисплатином*.<sup>93,94,95,96</sup> Поред многобројних мононуклеарних, полинуклеарни (динуклеарни и тринуклеарни) комплекси Pt(II) су међу највише проучаваним комплексима од једињења некласичне структуре. Ова класа комплекса, као целина, представља нову групу антиканцерогених једињења. Први пример ове класе једињења, који је ушао у фазу клиничких испитивања (у јуну 1998. године), јесте BBR3464 (Табела 1). Структура овог комплекса је изузетно флексибилна и способна да награди серију различитих производа у току интеракције са ДНК, који се разликују по броју награђених веза (бифункционално до тетрафункционално везивање) и геометрији (поседују хлоридне јоне *cis* или *trans* до мостног лиганда).<sup>97</sup> Овако добијени производи између ДНК и полинуклеарних комплекса детаљно су испитивани и претпоставља се да су

управо ови процеси интеракција одговорни за њихову антитуморску активност.<sup>98,99</sup> Публиковани резултати су показали да присуство наелектрисања и хетероатома унутар мостног лиганда, који потенцијално могу да награде водоничне везе, доводи до повећања цитотоксичности комплекса у односу на „једноставне“ динуклеарне системе. Сама структура VBR3464 значајна је по присуству централног Pt(II) јона метала, који доприноси повећаном афинитету према ДНК молекулу кроз интеракције електростатичке природе. На основу тих особина, VBR3464 је цитотоксичан у 10–100 пута нижим моларним концентрацијама од *цисплатине* и показује активност према ћелијским линијама резистентним на *цисплатину*.<sup>100</sup> Профил антитуморске ефикасности последица је његове јединствене структуре и окарактерисан је према различитим хуманим туморима (нпр. јајника) и ксенографтима отпорним на *цисплатину*.<sup>101</sup> Важно је напоменути да VBR3464 такође доследно показује високу антитуморску активност у ксенографту хуманог тумора окарактерисаном као мутантни р53.<sup>102</sup> Ова важна особина сугерише да би нови агенси могли да нађу употребу у третирању преко 60% типова канцера код којих је уочен мутантни р53. Додатно, за разлику од *цисплатине*, тринуклеарни комплекс је показао велику ефикасност у индуковању апоптозе на ћелијским линијама карцинома плућа које садрже мутагени р53. Анализа ћелијског циклуса показала је концентрациону зависност смањења G2/M од стране VBR3464 комплекса.<sup>13</sup> У клиничким испитивањима фазе I, 47 пацијената, од којих сви претходно нису имали успеха у стандардним третманима солидних тумора, третирано је у Великој Британији, Италији и Швајцарској на основу три различита распореда.<sup>103,104</sup> У испитивању фазе I у комбинацији са 5-FU, примећен је делимичан одговор код карцинома дојке.<sup>105</sup> Студије фазе II показале су делимичне одговоре код карцинома јајника и плућних ћелија резистентних на *цисплатину*.<sup>106,107</sup> Истраживања фармакологије ћелије показала су повећану ћелијску апсорпцију наелектрисаних полинуклеарних једињења платине у поређењу са *цисплатином*.<sup>108,109</sup> Повећана апсорпција није довољна да објасни повећану цитотоксичност VBR3464. Код полинуклеарних комплекса платине преовладавају ДНК оштећења услед интер- и интраланчаних интеракција дугог домета, где места јона метала везаног за ДНК могу бити раздвојена са највише четири базна пара. Последице структурне и конформационе промене унутар ДНК хеликса су такође различите.

Хидролитички профил Pt(II) комплекса са монофункционалном координационом сфером  $[PtCl(amine)_3]^+$  (као на пример, мононуклеарни комплекси  $[PtCl(dien)]^+$  или  $[PtCl(NH_3)_3]^+$ ) разликује се од хидролитичког профила *цисплатине*.<sup>110</sup> Константа брзине хидролизе је компатибилна, али је константа брзине реверзибилне анације значајно већа, тако да равнотежна константа хидролизе фаворизује формирање хлоро комплекса.<sup>111</sup> За динуклеарни диаква комплекс  $[trans-Pt(H_2O)(NH_3)_2 \mu-(H_2N(CH_2)_6NH_2)]^{4+}$   $pK_a$  вредност ( $pK_a = 5,62$ ) је значајно нижа у односу на  $pK_a$  вредност  $cis-[PtCl(H_2O)(NH_3)_2]^+$  ( $pK_a = 6,41$ ). За тринуклеарни комплекс VBR3464 константа брзине хидролизе компатибилна је са динуклеарним аналогом, док је константа брзине анације мања, што значи да постоји знатно већи проценат аква честица (~30%) у тачки хидролитичке равнотеже. Вредност  $pK_a$  од 5,62 за аква комплекс идентична је као код динуклеарног аналога. На основу израчунатих равнотежних и дисоцијативних константи, при физиолошким условима, максимална толерантна доза комплекса VBR3464 код пацијената одговара вредностима од  $1,8 \times 10^{-8}$  M. Даље, при интрацелуларној концентрацији хлорида од 22,7 mM, комплекс VBR3464 је 98,7% у дихлоро форми у тачки хидролитичке равнотеже. У крвотоку, при концентрацији хлорида од 103 mM, само 0,3% комплекса налази се у аква облику.<sup>112</sup>



Везивање полинуклеарних Pt(II) комплекса за ДНК је веома брзо и окарактерисано је присуством интраланчаних интеракција, које одвијају хеликс плазматичног ДНК (типичан за бифункционално ДНК везивање).<sup>113,114</sup> Уочен је афинитет везивања за места ДНК хеликса где доминира секвенца једног dG или d(GG), а симулације молекулског докинг моделирања указују на различите производе интеракција BBR3464 са ДНК укључујући 1,4-(G,G) и 1,6-(G,G) интерланчане, као и 1,5-(G,G) интраланчане интеракције, које су сличне у енергији (Слика 4).



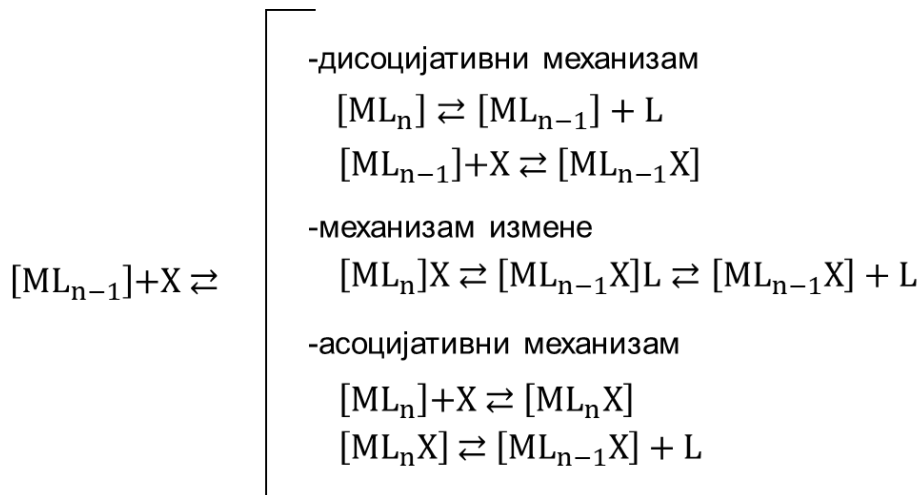
Слика 4. Најчешће структуре добијене молекулским моделирањем између ДНК и BBR3464.<sup>115</sup>

Као последица позитивног наелектрисања полинуклеарних Pt(II) комплекса, које може бити у опсегу од +2 до +4, није изненађујуће да се везивање за ДНК дешава знатно брже у односу на *цисплатину*. Везивање полиаминских динуклеарних комплекса је брже и у односу на BBR3464, што указује на преасоцијацију или електростатичке интеракције пре ковалентног везивања. Конформационе промене карактеристичне за В→А и В→Z транзицију ДНК молекула уочене су у случају поли(dG)\*поли(dC) и поли(dG-dC)\*поли(dG-dC) модификација код свих полинуклеарних Pt(II) комплекса.<sup>116,117,118,119</sup> Способност одржавања нетипичних ДНК конформација у раствору је јединствена карактеристика полинуклеарних једињења платине. Теоријски се претпоставља да је индукована А-конформација *in vivo* контролни механизам за ДНК везивне протеине који учествују у транскрипцији ДНК молекула.<sup>120</sup> Биолошка функција Z-ДНК и даље није најјасније дефинисана,<sup>121</sup> али је познато да се Z-ДНК формира при појави РНК полимеразе у процесу ДНК транскрипције.<sup>122</sup> Конформациона промена у А-или Z-форму ДНК хеликса од стране полинуклеарних Pt(II) комплекса вероватно има значајне ефекте на функцију ДНК молекула. Антитела, који би требало да делију на *цисплатина*-ДНК адукте, не препознају ДНК адукте динуклеарних или тринуклеарних комплекса. Једна интересантна и потенцијално значајна чињеница је да комплекс BBR3464 у везивању преферира једноланчане у односу да дволанчане ДНК молекуле.<sup>124</sup> Упоредивање једноланчаних ДНК, РНК и дволанчаних ДНК молекула указује да је реакција BBR3464 са једноланчаним ДНК и РНК значајно бржа у односу на дволанчане

ДНК молекуле, и да као производ настаје бројно више адуката комплекс-ДНК и комплекс-РНК. Везивање ВВР3464 за различите конформације нуклеинских киселина указује на могућност да адукти једноланчаних ДНК и РНК могу играти важну улогу у различитој антитуморској ефикасности у поређењу са *цисплатином*. Једноланчани ДНК присутан је током транскрипције, репликације, рекомбинације и репарације, и бива препознат од стране различитих једноланчаних ДНК везујућих протеина. Кинетика реакције хеликса  $d(5'-A_1T_2ATGTA_7CATAT-3')$  са обележеним  $^{15}N$  атомом у [ $\{trans-PtCl(NH_3)_2\}_2\mu-(H_2N(CH_2)_6NH_2)]^{4+}$  и ВВР3464 указује на формирање 1,4-интерланчаних интеракција.<sup>123,124</sup> Уочена је и иницијална преасоцијација или електростатичко везивање у интеракцији са ДНК одмах након мешања раствора ДНК и комплекса. Ови необични ефекти су јединствени за ову класу антиканцерогених комплекса. Као што је већ наведено, динуклеарни интраланчани адукти оштећују ДНК конформацију на начин који се разликује од дистрозије узроковане интеракцијом са *цисплатином*.<sup>125,126,127</sup> Савијање ДНК молекула од стране интерланчаних интеракција није директно и за око  $\sim 10-12^\circ$  је мање него у случају *цисплатине*, што је примећено и за одмотавање ДНК хеликса ( $9^\circ$  у односу на  $13^\circ$  узроковано *цисплатином*). Као резултат, истраживања су потврдила слабо препознавање ДНК адукта од стране НМГ1 протеина.<sup>128</sup> Испитивани су и ВВР3464 интраланчани адукти који су показали локалну конформациону дисторзију, али без стабилног хеликс завоја,<sup>129</sup> тако да интраланчани ДНК адукти од стране ВВР3464 комплекса могу представљати блокаду за ДНК и РНК полимеразе. Углавном, ДНК интерланчане интеракције могу бити ефективнија оштећења него интраланчани адукти у терминацији ДНК и РНК синтезе код туморских ћелија, а самим тим и вероватнији кандидати за генотоксично оштећење неопходно за антитуморски ефекат ВВР3464.<sup>130</sup> Додатно, интерланчани производи представљају нарочити изазов за репарацију од стране ензима, јер укључују оба ланца ДНК, и не могу да се регенеришу коришћењем информација комплементарних ланаца за ресинтезу.<sup>131</sup> Ови налази указују да ова структурно различита једињења дају профил ДНК оштећења који се значајно разликује од ДНК оштећења узрокованих *цисплатином* и њеним аналозима. Пошто се протеини који иначе служе у санирању оштећеног ДНК хеликса од стране *цисплатине* не везују за ДНК хеликс оштећен од стране полинуклеарних комплекса, сугерише се да је мало вероватно да полинуклеарни комплекси своју антитуморску активност испољавају преко истих процеса као и *цисплатина*. Дакле, претпоставка да је за антитуморско дејство комплекса платине неопходна структура слична структури *цисплатине* више не важи, тако да се до нових цитостатички активних једињења може доћи једино проучавањем нових структура, изучавањем њиховог хидролитичког профила, интеракција са ДНК и серумским албумин протеинима, експериментално и/или *in silico*, као и изучавањем кинетике њихових супституционих реакција са биолошки релевантним молекулима (пре свега са азот- и сумпор-донорима).

#### 1.4) Нуклеофилне супституционе реакције комплексних једињења

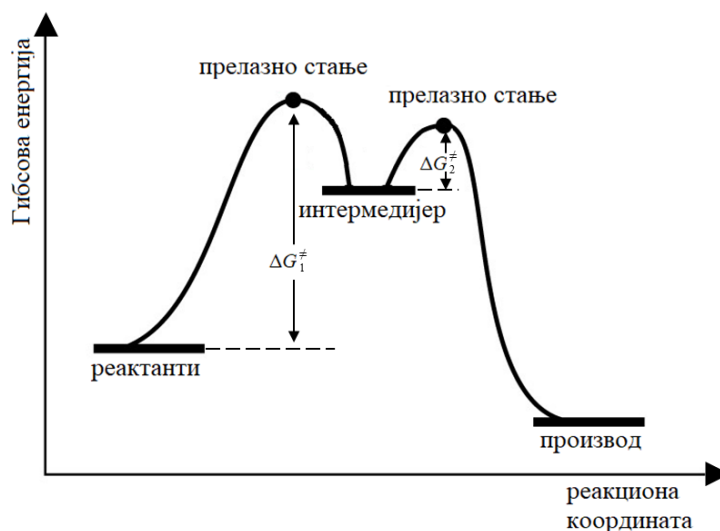
Нуклеофилне супституционе реакције комплексних једињења одигравају се на три начина: по дисоцијативном (D) механизму (код кога интермедијер има координациони број за један мање од полазног комплекса), асоцијативном (A) механизму (код кога интермедијер има координациони број за један више од полазног комплекса) и по механизму измене (I) (код кога се не формира интермедијер, већ само прелазно стање) (Шема 2).<sup>132</sup>



Шема 2. Механизми нуклеофилних супституционих реакција комплексних једињења (L представља одлазећи, а X улазни лиганд).

Код механизма измене, у идеалном случају, формирање везе између јона метала и улазног лиганда дешава се истовремено са процесом раскидања везе између јона метала и одлазећег лиганда. Међутим, у оквиру овог механизма могу да постоје тзв. механизам дисоцијативне размене ( $I_d$ ), код кога је процес раскидања везе између јона метала и одлазећег лиганда за нијансу спорији, и механизам асоцијативне размене ( $I_a$ ), код кога је процес формирања везе између јона метала и улазног лиганда за нијансу спорији.

Дијаграм на Слици 5 показује енергетску разлику између реактанта, прелазног стања, насталих интермедијера и производа реакције, као и Гибсову енергију активирања,  $\Delta G^\ddagger$ . Интермедијер се у неким случајевма може само детектовати, а у неким ситуацијама чак и изоловати из реакционог система.



Слика 5. Енергетски дијаграм промене Гибсове слободне енергије реакције супституције

Промена енталпије активирања и промена ентропије активирања,  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$ , добијене из температурске зависности константе брзине реакције, омогућавају

одређивање механизма супституције. Ејрингова једначина (1) управо даје зависност између константе брзине хемијске реакције, температуре и поменутих активационих параметара:

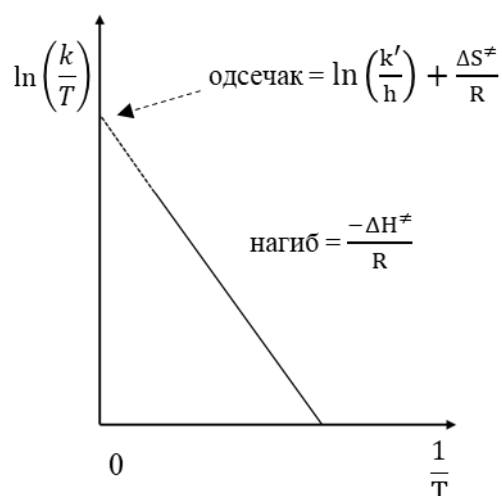
$$k = \frac{k'T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} = \frac{k'T}{h} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}} \quad (1)$$

или њен логаритамски облик, једначина (2):<sup>133</sup>

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \frac{-\Delta H^\ddagger}{RT} + \ln\left(\frac{k'}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (2)$$

у којој је  $k$ -константа брзине,  $T$ -температура,  $\Delta H^\ddagger$ -енталпија активирања,  $\Delta S^\ddagger$ -ентропија активирања,  $R$ -гасна константа,  $k'$ -Болцманова константа и  $h$ -Планкова константа.

Из логаритамског облика Ејрингове једначине зависност  $\ln(k/T)$  од  $1/T$  (Ејрингов дијаграм) је линеарна, а активациони параметри,  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$ , могу се одредити из нагиба и одсечка праве, као што је приказано на Слици 6.



Слика 6. Линеарна зависност Ејрингове једначине

Вредности за  $\Delta S^\ddagger$  су од посебног значаја за разликовање асоцијативног и дисоцијативног механизма супституције. Негативне вредности за  $\Delta S^\ddagger$  указују на асоцијативни механизам, што је последица смањења неуређености система након што се улазни лиганд веже за полазни комплекс. У супротном, позитивне вредности за  $\Delta S^\ddagger$  указују на дисоцијативни механизам, јер се раскидањем везе између јона метала и одлазећег лиганда повећава неуређеност система.

Зависност константе брзине хемијске реакције од притиска, дата Ван Хофовом једначином (3), омогућава израчунавање вредности за запремину активирања,  $\Delta V^\ddagger$ :

$$\frac{d(\ln k)}{dP} = \frac{-\Delta V^\ddagger}{RT} \quad (3)$$

или интеграљењем, једначина (4):

$$\ln \left( \frac{k_{(P_1)}}{k_{(P_2)}} \right) = \frac{-\Delta V^\ddagger}{RT} (P_1 - P_2) \quad (4)$$

у којој је  $k$ -константа брзине,  $P$ -притисак,  $\Delta V^\ddagger$ -запремина активирања,  $R$ -гасна константа и  $T$ -температура.

Вредности за  $\Delta V^\ddagger$  најпоузданије могу да дефинишу реакциони механизам. Наиме, негативне вредности за  $\Delta V^\ddagger$  указују на асоцијативни, а позитивне вредности указују на дисоцијативни механизам супституције.

### 1.5) Супституционе реакције квадратно-планарних комплекса

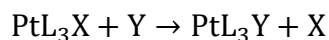
Јони метала  $d^8$  електронске конфигурације (Rh(I), Ir(I), Pt(II), Pd(II), Au(III)) обично граде комплексе квадратно-планарне геометрије, док у случају Ni(II) јона комплекси могу бити и тетраедарски. Већина кинетичких испитивања квадратно-планарних система рађена је на комплексима Pt(II) јона који реагују довољно споро. Експериментални подаци за комплексе Pd(II) и Au(III) јона указују на сличност механизма супституције, док је, са друге стране, кинетика структурно аналогних комплекса различита.

Генерално, на основу великог броја публикованих резултата може се потврдити да се нуклеофилне супституционе реакције квадратно-планарних Pt(II) комплекса првенствено дешавају по асоцијативном механизму ( $A$  или  $I_a$ ). Негативне вредности за  $\Delta S^\ddagger$  и  $\Delta V^\ddagger$  у Табели 2 подржавају ову претпоставку.

Табела 2. Активациони параметри за супституционе реакције квадратно-планарних комплекса Pt(II).<sup>134</sup>

Реактанти	$\Delta H^\ddagger$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S^\ddagger$ [J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta V^\ddagger$ [cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> ]
[Pt(dien)Cl] <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O	+84	-63	-10
[Pt(dien)Cl] <sup>+</sup> + [N <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	+65	-71	-8,5
<i>trans</i> -[PtCl <sub>2</sub> (PEt <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] + py	+14	-25	-14
<i>trans</i> -[PtCl(NO <sub>2</sub> )(py) <sub>2</sub> ] + py	+12	-24	-9

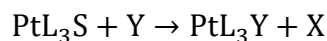
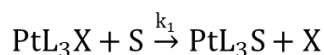
У општем случају, процес супституције лиганда X помоћу лиганда Y у квадратно-планарном комплексу може се приказати на следећи начин:



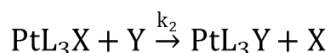
Израз за брзину ове реакције указује да се супституција одиграва на основу два реакциона пута, као што је приказано у једначини (5):

$$\text{брзина} = -\frac{d[\text{PtL}_3\text{X}]}{dt} = k_1[\text{PtL}_3\text{X}] + k_2[\text{PtL}_3\text{X}][\text{Y}] \quad (5)$$

при чему  $k_1$  представља константну брзине солволитичког пута:



док  $k_2$  представља константу брзине директне нуклеофилне супституције.



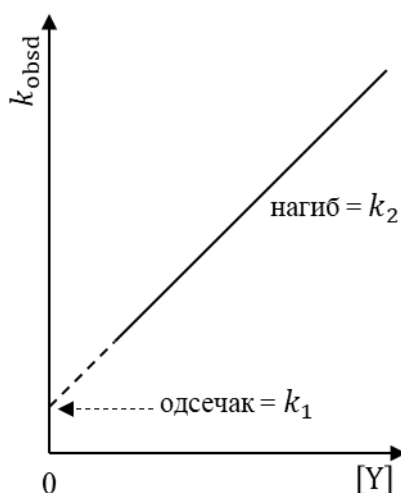
Реакције супституције најчешће се изучавају под условима реакција *pseudo*-првог реда, где је концентрација лиганда Y најмање 7-10 пута већа у односу на концентрацију полазног комплекса. У том случају претходну једначину (5) можемо преформулисати у облик једначине (6):

$$\text{брзина} = -\frac{d[\text{PtL}_3\text{X}]}{dt} = k_{\text{obsd}}[\text{PtL}_3\text{X}] \quad (6)$$

где је  $k_{\text{obsd}}$  константа брзине реакције *pseudo*-првог реда. Веза ове константе са константама  $k_1$  и  $k_2$  дата је једначином (7):

$$k_{\text{obsd}} = k_1 + k_2[\text{Y}] \quad (7)$$

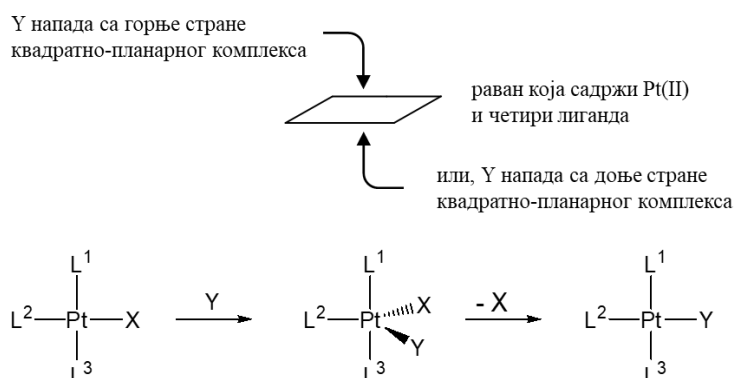
С тим у вези, изучавањем серије реакција супституције комплекса са различитим концентрацијама улазног лиганда Y могу се одредити вредности за  $k_1$  и  $k_2$ , Слика 7.<sup>135</sup>



Слика 7. Одређивање вредности константи  $k_1$  и  $k_2$  на основу зависности константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији концентрације улазног лиганда Y

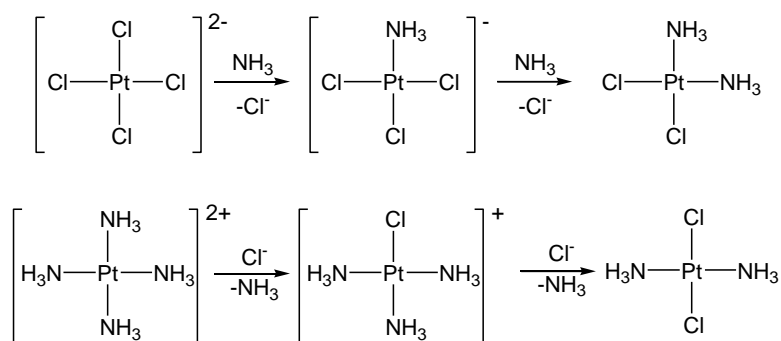
Већина реакција супституције квадратно-планарних комплекса Pt(II) је стереоселективна: улазни лиганд заузима координационо место које је претходно

припадало одлазећој групи. Такође, механизам A или I<sub>a</sub> укључује формирање интермедијера са координационим бројем 5. Задржавање исте стереохемије комплекса током супституције приказано је на Слици 8.



Слика 8. Иницијални напад улазног лиганда на Pt(II) комплекс и формирање интермедијера тригонално-бипирамидалне геометрије.

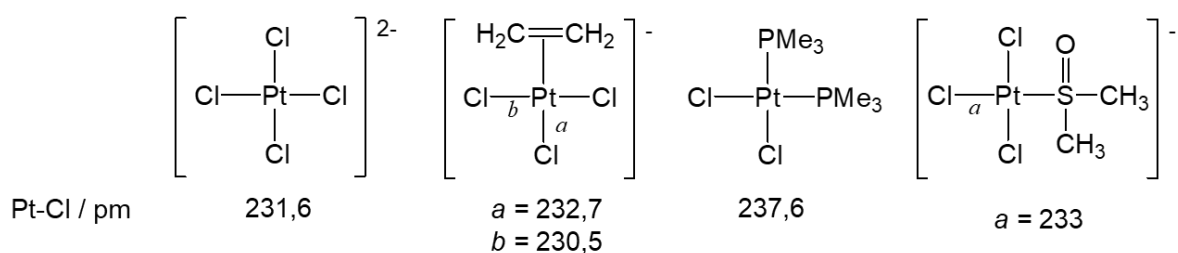
Процес супституције лиганда у квадратно-планарном комплексу одређује природа инертног лиганда. Овај феномен се назива *trans*-ефекат и кинетичке је природе. Он подразумева да неки инертни лиганд фаворизује супституцију лиганда који је њему у *trans* положају. *Trans*-ефекат је најбоље илустрован на примеру синтезе *cis*- и *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] комплекса:



*Trans*-ефекат хлоридног јона већи је од *trans*-ефекта NH<sub>3</sub>, тако да уколико се у раствор комплекса [PtCl<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> сукцесивно додаје NH<sub>3</sub> долази до формирања *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. У другом случају, када се раствору комплекса [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sup>2+</sup> сукцесивно додају хлориди, гради се *trans*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], јер први координовани хлоридни јон, услед јачег *trans*-ефекта у односу на већ координоване молекуле NH<sub>3</sub>, фаворизује супституцију NH<sub>3</sub> лиганда у *trans* положају.

Поред *trans*-ефекта, за комплексе квадратно-планарне геометрије везује се и појам *trans*-утицај.<sup>134</sup> Наиме, *trans*-утицај је термодинамичке природе и односи се на структуру квадратно-планарног комплекса у његовом основном стању. У квадратно-планарним комплексима примећена је значајна разлика у дужинама хемијских веза са лигандима који су координовани у *trans* положају (L-M-L'), јер у процесу формирања тих веза (M-L и M-L') учествују исте орбитале јона метала (*d*<sub>z<sup>2</sup> и *p*<sub>z</sub>, уколико L и L' се простиру на *z*-оси). Појава *trans*-утицаја установљена је на основу података рендгенске структурне анализе комплекса, као и на основу података добијених NMR и вибрационом</sub>

спектроскопијом структурно сличних квадратно-планарних комплекса. Резултати за серију квадратно-планарних Pt(II) комплекса приказани су на Слици 9.<sup>134</sup>



Слика 9. Илустрација *trans*-утицаја за серију Pt(II) комплекса.

Одређивање механизма неке хемијске реакције захтева избор одговарајуће експерименталне методе. Избор методе пре свега зависи од брзине хемијске реакције која се изучава, као и од физичко-хемијских особина реактанта или производа реакције. Најчешће се у току експеримента прати промена концентрације једног од учесника реакције у одређеном временском интервалу. У ту сврху могу се користити директне или индиректне методе. Директне методе су методе које директно мере промену концентрације неког од учесника реакције (волуметријске или гравиметријске), док индиректне методе прате неку особину супстанце која пропорционално зависи од концентрације (апсорпција светлости на одређеној таласној дужини, оптичка ротација, електрична проводљивост, итд.).

Поред тога, у зависности од брзине реакције која се изучава, експерименталне методе могу се поделити на методе за споре и методе за брзе реакције (Табела 3).

Табела 3. Експерименталне методе за изучавање реакција.<sup>136</sup>

Методе	$t_{1/2}$ [s]
Гравиметрија	$10^4$
Волуметрија	$10^3$
UV-Vis спектрофотометрија	$10^2$
„Stopped-flow” спектрофотометрија	$10^{-3}$
Скок притиска	$10^{-6}$
NMR спектроскопија	$10^{-6}$
Скок температуре	$10^{-7}$
Електрохемијске	$10^{-8}$
Пулсна радиолитиза и флаш фотолизиса	$10^{-9}$
Апсорпција ултразвука	$10^{-9}$
Флуоресцентна спектрофотометрија	$10^{-10}$



## ЗАДАТАК РАДА

Предмет ове докторске дисертације су синтеза и карактеризација серије динуклеарних комплекса Pd(II) и/или Pt(II) са различитим азот-донорским мостним лигандима, испитивање њихових супституционих реакција са биолошки важним сумпор- и азот-донорским нуклеофилима, испитивање интеракција комплекса са ДНК и серумским албуминима (BSA), укључујући молекулски докинг и биомедицинска испитивања. Задаци у оквиру ових истраживања могу се поделити у три групе:

- Синтеза динуклеарних комплекса Pd(II) опште формуле  $[\{Pd(N-N)Cl\}_2(\mu-L)](ClO_4)_2$  (N-N = етилендиамин, 2,2'-бипиридин или *trans*-(±)-1,2-диаминоциклохексан; L = пиразин или 4,4'-бипиридин), испитивање њихових супституционих реакција са тиоуреом, L-метионином, L-цистеином, L-хистидином и гуанозин-5'-монофосфатом, испитивање интеракција са биомолекулима ДНК и BSA *in vitro* и *in silico* методама, као и испитивање цитотоксичне активности.

- Испитивање супституционих реакција динуклеарних комплекса Pt(II) опште формуле  $[\{Pt(N-N)Cl\}_2(\mu-L)]Cl_2$  (N-N = етилендиамин, 1,2-пропилендиамин, изобутилендиамин или *trans*-(±)-1,2-диаминоциклохексан, L = пиразин), са тиоуреом, L-метионином, глутатионом, L-хистидином и гуанозин-5'-монофосфатом, као и *in silico* испитивања њихових интеракција са ДНК и BSA.

- Синтеза и карактеризација хомо- и хетеро-динуклеарних комплекса Pt(II) и Pd(II),  $[Pt_2(tpbd)Cl_2]Cl_2$ ,  $[Pd_2(tpbd)Cl_2]Cl_2$  и  $[PdPt(tpbd)Cl_2]Cl_2$  (tpbd = N,N,N',N'-*tetrakis*-(2-пиридилметил)бензен-1,4-диамин), испитивање супституционих реакција ових комплекса са тиоуреом, L-метионином, глутатионом и гуанозин-5'-монофосфатом, *in vitro* и *in silico* испитивања интеракција са ДНК и BSA, и испитивање цитотоксичне активности.

## 2) ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

### 2.1) Реагенси и раствори

При синтези комплекса коришћене су полазне соли  $K_2PdCl_4$  (Sigma Aldrich),  $PdCl_2$  (Acros Organics) и  $K_2PtCl_4$  (Sigma Aldrich). Лиганди, коришћени у синтези комплекса, су 2,2'-бипиридин (2,2'-bipy) (Sigma Aldrich), 4,4'-бипиридин (4,4'-bipy) (Sigma Aldrich), етилендиамин (en) (Merck), *trans*-(±)-1,2-диаминоциклохексан (dach) (Acros Organics), (±)-1,2-пропилендиамин (1,2-pn) (Sigma Aldrich), изобутилендиамин (ibn) (Sigma Aldrich), пиразин (pz) (Sigma Aldrich), као и лиганд синтетисан према раније публикованој процедури,  $N,N,N',N'$ -*tetrakis*-(2-пиридилметил)бензен-1,4-диамин (tpbd).<sup>137</sup>

Аква аналози одговарајућих комплекса добијени су додавањем  $AgClO_4$  (Acros Organics) у количини еквивалентној количини хлоридних јона у раствору. Настали талог  $AgCl$  из раствора одстрањен је помоћу „Millipore” филтера (Watman Puradisc, 0,2  $\mu m$ ). С обзиром да се перхлоратни јони не координују за  $Pd(II)$  и  $Pt(II)$  јоне,<sup>138</sup> одређивање константи стабилности ових комплекса извршено је у присуству  $NaClO_4$ . Добијање аква комплекса изведено је у киселој средини, а рН вредност 2 подешена је помоћу  $HClO_4$ . Јонска јачина раствора подешена је додатком 100 mM  $NaClO_4$ . У даљем тексту аква аналози одговарајућих комплекса обележавани су поред назива комплекса суфиксом „а”.

Приликом MALDI-TOF спектрометријске анализе мала количина комплекса **1.1-1.6** растворена је у диметилформаиду (DMF) (Sigma Aldrich) и помешана са 5  $\mu l$  5 mg ml<sup>-1</sup> воденог раствора  $\alpha$ -цијано-4-хидроксицинаминске киселине (CHCA), која садржи ацетонитрил ( $\phi = 50\%$ ). Одређена запремина овог раствора, концентрације 1  $\mu l$  постављена је у хидрофобни MALDI суд и раствор је осушен на ваздуху. Сваки спектар је добијен у моду позитивног јонског рефлектора, са око 800 удара ласера, што покрива опсег од 100 до 1000 m/z.

Кинетичка мерења су проучавана спектрофотометријски, праћењем промене апсорбанце на одређеној таласној тужини (тзв. радна таласна дужина) у функцији времена. Кинетика је изучавана са нуклеофилима: тиоуреа (Tu), глутатион (GSH), L-метионин (L-Met), L-хистидин (L-His), L-цистеин (L-Cys) и гуанозин-5'-монофосфат (5'-GMP) (Acros Organics). Раствори за кинетичка мерења припремани су у 25 mM 4-(2-хидроксиетил)-1-пиперазинетансулфонска киселина (HEPES) пуферу (pH = 7,2) (Sigma Chemicals Co.) уз додатак NaCl (40 - 50 mM), ради сузбијања спонтане хидролизе комплекса. Радна таласна дужина за свако кинетичко мерење одређена је снимањем спектралних промена у опсегу од 220 до 500 nm након мешања раствора комплекса и нуклеофила, а дефинисана је као вредност таласне дужине на којој долази до највеће промене у апсорпцији са временом.

Интеракције комплекса са макромолекулима ДНК (Sigma Chemicals Co.) и говеђим серумским албумином (BSA) (Sigma Chemicals Co.) у фосфатном (PBS) пуферу (pH = 7,4) (Sigma Aldrich) изучаване су спектрофотометријски и спектрофлуориметријски помоћу етидиум-бромид (EB) (Sigma Chemicals Co.) и Hoechst 33258 (4-[6-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1H-бензимидазол-2-ил]-1H-бензимидазол-2-ил]фенол трихидрохлорид) (Sigma Chemicals Co.). За ова испитивања припремљен је основни раствор BSA концентрације 2  $\mu M$ , док је полазни раствор ДНК имао однос апсорбанце на 260 nm и 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) у опсегу од 1,8-1,9, указујући да систем не садржи

контаминирајуће протеине. Концентрација ДНК раствора одређена је на основу вредности апсорбанце на 260 nm ( $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).<sup>139</sup>

Све остале хемикалије коришћене су без претходног пречишћавања. У циљу спречавања могућих повреда на раду или штетних последица по здравље, сви експерименти су извођени уз коришћење заштитне опреме и уз максималну предострожност.

## 2.2) Инструменталне методе

Карактеризација комплексних једињења извршена је помоћу различитих инструменталних метода: елементалном микроанализом (Euro EA Elemental Analyzer 3000), IR (Perkin-Elmer FTIR 31725) и  $^1\text{H}$  NMR (Varian Gemini 2000, 200 MHz) спектроскопијом, MALDI-TOF (4800 Plus MALDI TOF/TOF, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA опремљеним са 200 Hz, 355 nm Nd/YAG ласером) и ESI-MS масеном спектрометријом (Waters Quadrupole-TOF Synapt 2G са електроспреј јонизатором). Спектрофотометријске титрације одговарајућих аква комплекса проучаване су помоћу Perkin Elmer Lambda 35 спектрофотометра. Потенциометријске титрације извођене су у титрационом суду са дуплим зидовима на  $298 \pm 1 \text{ K}$  уз константан проток азота помоћу 848 Titrino plus аутоматског титратора (Metrohm), који је опремљен стакленом електродом (Metrohm 6.0258.010) и мешалицом 801 (Metrohm). Кинетичка мерења су проучавана спектрофотометријски помоћу UV-Vis спектрофотометра (Perkin Elmer Lambda 35) и „stopped-flow” методом (Applied Photophysics SX20) за брзе реакције. Интеракције комплекса са макромолекулима ДНК и BSA проучаване су спектрофотометријски (Perkin Elmer Lambda 35) и спектрофлуориметријски (Shimadzu RF-1501).

## 2.3) Синтеза комплекса

Нови комплекси **1.1-1.6** су синтетисани према модификованој процедури, већ објављеној у литератури,<sup>140,141</sup> полазећи од мононуклеарних аналога  $[\text{Pd}(\text{N-N})\text{Cl}_2]$ , (N-N = 2,2'-bipy, dach, en). Суспензија мононуклеарног комплекса  $[\text{Pd}(\text{N-N})\text{Cl}_2]$ , (100 mg, 0,299 mmol за N-N = 2,2'-bipy; 100 mg, 0,343 mmol за N-N = dach; 100 mg, 0,421 mmol за N-N = en) у DMF укапавана је у раствор  $\text{AgClO}_4$  у DMF при моларном односу 1:1. Смеша је мешана преко ноћи у мраку на собној температури. После уклањања  $\text{AgCl}$  талога филтрацијом, добијени светло жути раствор  $[\text{Pd}(\text{N-N})\text{Cl}(\text{DMF})]\text{ClO}_4$  (N-N = 2,2'-bipy, dach, en) коришћен је за синтезу динуклеарних комплекса. Раствор мостног лиганда (pz и 4,4'-bipy) у DMF укапаван је у претходно добијен раствор мононуклеарног комплекса  $[\text{Pd}(\text{N-N})\text{Cl}(\text{DMF})]\text{ClO}_4$  (N-N = 2,2'-bipy, dach, en) у моларном односу 2:1 (комплекс:мостни лиганд). Ова смеша мешана је на собној температури 3 сата. Након упаравања, добијени производ испран је диетилетром и сушен на ваздуху. Резултати карактеризације комплекса **1.1-1.6** приказани су у наставку.<sup>142</sup>

Комплекс **1.1**<sup>142</sup>

Принос: (85 mg, 65%). Аналитички израчунато за  $\text{Pd}_2\text{Cl}_4\text{O}_8\text{N}_6\text{C}_{24}\text{H}_{20}$  (%) (FW = 875,10): N, 9,60; C, 32,94; H, 2,30. Нађено: N, 9,57; C, 33,03; H, 2,29.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 200 MHz).  $^1\text{H}$  NMR ( $\delta$ , ppm): 7,30–7,42 (m, H5/H5'), 7,80–7,90 (m, H4/H4'), 8,12–8,20 (d,

H3/H3'), 8,50–8,60 (d, H6/H6'), 9,01 (s pzCH). IR (KBr, 4000–300 cm<sup>-1</sup>): 1662 (C=N); 1080 (перхлоратни контра јон). MALDI-TOF: [Pd(2,2'-bipy)Cl]<sup>+</sup> (m/z = 297,45), [Pd(2,2'-bipy)(pz)Cl]<sup>+</sup> (m/z = 377,55), [Pd(2,2'-bipy)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup> (m/z = 453,45), 2[Pd(2,2'-bipy)Cl]<sup>+</sup> (m/z = 594,90), [Pd<sub>2</sub>(2,2'-bipy)<sub>2</sub>(pz)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (m/z = 676,05), {[Pd<sub>2</sub>(2,2'-bipy)<sub>2</sub>(pz)Cl<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (m/z = 775,50).

#### Комплекс **1.2**<sup>142</sup>

Принос: (77 mg, 57%). Аналитички израчунато за Pd<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>O<sub>8</sub>N<sub>6</sub>C<sub>16</sub>H<sub>32</sub> (%) (FW = 791,10): N, 10,62; C, 24,29; H, 4,08. Нађено: N, 10,58; C, 24,24; H, 4,09. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 200 MHz). <sup>1</sup>H NMR (δ, ppm): 1,17–1,62 (m, dachCH<sub>2</sub>, C4, C5), 1,76–2,08 (m, dachCH<sub>2</sub>, C3, C6), 2,45–2,61 (m, dachCH, C1, C2), 9,01 (s pzCH). IR (KBr, 4000–300 cm<sup>-1</sup>): 3185, 3281 (N-H); 1561 (C-N); 1089 (перхлоратни контра јон). MALDI-TOF: [Pd(dach)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (m/z = 335,74), [Pd(dach)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup> (m/z = 369,83), [Pd(dach)<sub>2</sub>(pz)]<sup>+</sup> (m/z = 414,48), [Pd(dach)<sub>2</sub>(pz)Cl]<sup>+</sup> (m/z = 449,93), {[Pd<sub>2</sub>(dach)<sub>2</sub>(pz)Cl<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (m/z = 691,65).

#### Комплекс **1.3**<sup>142</sup>

Принос: (85 mg, 59%). Аналитички израчунато за Pd<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>O<sub>8</sub>N<sub>6</sub>C<sub>8</sub>H<sub>20</sub> (%) (FW = 682,93): N, 12,31; C, 14,07; H, 2,95. Нађено: N, 12,28; C, 14,02; H, 2,96. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 200 MHz). <sup>1</sup>H NMR (δ, ppm): 2,68–2,79 (m, enCH<sub>2</sub>), 9,01 (s pzCH). IR (KBr, 4000–300 cm<sup>-1</sup>): 3209, 3285 (N-H); 1563 (C-N); 1089 (перхлоратни контра јон). MALDI-TOF: [Pd(en)(pz)Cl]<sup>+</sup> (m/z = 281,65), [Pd(en)<sub>2</sub>(pz)Cl]<sup>+</sup> (m/z = 341,30), [Pd<sub>2</sub>(en)<sub>2</sub>(pz)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (m/z = 483,20), {[Pd<sub>2</sub>(en)<sub>2</sub>(pz)Cl<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (m/z = 582,65).

#### Комплекс **1.4**<sup>142</sup>

Принос: (71 mg, 50%). Аналитички израчунато за Pd<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>O<sub>8</sub>N<sub>6</sub>C<sub>30</sub>H<sub>24</sub> (%) (FW = 951,20): N, 8,84; C, 37,88; H, 2,54. Нађено: N, 8,86; C, 37,80; H, 2,55. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 200 MHz). <sup>1</sup>H NMR (δ, ppm): 7,28–7,40 (m, H5/H5'), 7,81–7,92 (m, H4/H4'), 8,12–8,20 (m, H3/H3'), 8,50–8,60 (d, H6/H6'), 8,20–8,30 (m, 4,4'-bipy, CH<sub>β</sub>), 8,97–9,05 (m, 4,4'-bipy, CH<sub>α</sub>). IR (KBr, 4000–300 cm<sup>-1</sup>): 1615 (C-N); 1088 (перхлоратни контра јон). MALDI-TOF: [Pd(bipy)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup> (m/z = 455,60), 2[Pd(bipy)Cl]<sup>+</sup> (m/z = 599,0), [Pd<sub>2</sub>(2,2'-bipy)<sub>2</sub>(4,4'-bipy)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (m/z = 752,30).

#### Комплекс **1.5**<sup>142</sup>

Принос: (82 mg, 55%). Аналитички израчунато за Pd<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>O<sub>8</sub>N<sub>6</sub>C<sub>22</sub>H<sub>36</sub> (%) (FW=867,21): N, 9,69; C, 30,47; H, 4,18. Нађено: N, 9,70; C, 30,40; H, 4,19. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 200 MHz). <sup>1</sup>H NMR (δ, ppm): 1,27–1,62 (m, dachCH<sub>2</sub>, C4, C5), 1,76–2,09 (m, dachCH<sub>2</sub>, C3, C6), 2,45–2,61 (m, dachCH, C1, C2), 8,20–8,30 (m, 4,4'-bipy, CH<sub>β</sub>), 8,87–9,01 (m, 4,4'-bipy, CH<sub>α</sub>). IR (KBr, 4000–300 cm<sup>-1</sup>): 3185, 3281 (N-H); 1614 (C-N); 1089 (перхлоратни контра јон). MALDI-TOF: [Pd(dach)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (m/z = 335,40), [Pd(dach)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup> (m/z = 370,20), [Pd(dach)(4,4'-bipy)Cl]<sup>+</sup> (m/z = 413,60), {[Pd<sub>2</sub>(dach)<sub>2</sub>(4,4'-bipy)Cl<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (m/z = 767,70).

#### Комплекс **1.6**<sup>142</sup>

Принос: (78 mg, 49%). Аналитички израчунато за Pd<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>O<sub>8</sub>N<sub>6</sub>C<sub>14</sub>H<sub>24</sub> (%) (FW = 759,03): N, 11,07; C, 22,15; H, 3,19. Нађено: N, 11,10; C, 22,09; H, 3,20. <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 200 MHz). <sup>1</sup>H NMR (δ, ppm): 2,65 (s, enCH<sub>2</sub>), 8,20–8,30 (m, 4,4'-bipy, CH<sub>β</sub>), 8,87–9,01 (m, 4,4'-bipy, CH<sub>α</sub>). IR (KBr, 4000–300 cm<sup>-1</sup>): 3187, 3209 (N-H); 1611 (C-N); 1087 (перхлоратни контра јон). MALDI-TOF: [Pd(4,4'-bipy)Cl]<sup>+</sup> (m/z = 297,63), [Pd(en)(4,4'-bipy)Cl]<sup>+</sup> (m/z = 359,30), [Pd<sub>2</sub>(en)<sub>2</sub>(4,4'-bipy)Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (m/z = 560,13), {[Pd<sub>2</sub>(en)<sub>2</sub>(4,4'-bipy)Cl<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (m/z = 659,58).

Динуклеарни комплекси Pt(II) јона **2.1-2.4** синтетисани су према публикованој процедури,<sup>143</sup> полазећи од мононуклеарних аналога, [Pt(N-N)Cl<sub>2</sub>] (N-N = en, 1,2-pn, ibn, dach).<sup>144,145,146</sup> Раствор одговарајућег мононуклеарног комплекса у DMF третиран је са 0,98 еквивалента AgNO<sub>3</sub> да би се наградио [Pt(N-N)Cl(DMF)]<sup>+</sup> дериват. Раствору AgNO<sub>3</sub> (49,26 mg, 0,29 mmol) у 5 ml DMF додата је суспензија [Pt(N-N)Cl<sub>2</sub>] (0.30 mmol) у 10 ml DMF. Овај раствор је мешан преко ноћи у мраку. Добијени талог AgCl уклоњен је филтрацијом, а бледо жути раствор комплекса [Pt(N-N)Cl(DMF)]NO<sub>3</sub> коришћен је као полазни материјал за добијање комплекса **2.1-2.4**. Раствор мостног лиганда пиразина (pz) (10,01 mg, 0,15 mmol) укапаван је у раствор комплекса [Pt(N-N)Cl(DMF)]NO<sub>3</sub>. Смеша је мешана 24 сата на собној температури у мраку, после чега је растварач уклоњен, а талог испран етром. Добијени производи растворени су у минималној количини воденог раствора (0,5 M) LiCl и остављени преко ноћи у мраку. Бледо жути производи динуклеарних комплекса **2.1-2.4** су након тога испрани метанолом, потом етром и сушени на ваздуху. Овако добијени комплекси окарактерисани су елементалном микроанализом и <sup>1</sup>H NMR спектроскопијом, при чему су резултати показали добро слагање са већ објављеним подацима.<sup>143</sup>

Нови комплекси **3.1** и **3.2** су синтетисани на основу модификоване публиковане процедуре.<sup>147</sup> Полазне соли, K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> (156 mg, 0,48 mmol) за **3.1**, K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (200 mg, 0,48 mmol) за **3.2**, растворене су у 25 ml 0,01 M HCl и помешане са раствором који садржи 0,24 mmol мостног лиганда tpbd (tpbd = N,N,N',N'-*tetrakis*-(2-пиридилметил)бензен-1,4-диамин), такође раствореног у 25 ml 0,01 M HCl. Ова смеша је рефлуктована 24 сата, а потом филтрирана. Добијени талог је након тога испран водом, етанолом, диетилетром и сушен под вакуумом. Нов комплекс **3.3** је синтетисан према следећој процедури: раствору који садржи 100 mg (0,24 mmol) K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> у 12,5 ml 0,01 M HCl додат је раствор мостног лиганда tpbd (0,24 mmol у 25 ml 0,01 M HCl). Ова смеша је рефлуктована 24 сата након чега је додато 78 mg (0,24 mmol) K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> раствореног у 25 ml 0,01 M HCl. Смеша је потом рефлуктована још 24 сата и филтрирана. Добијени талог је испран водом, етанолом, диетилетром и сушен под вакуумом. Резултати карактеризације комплекса **3.1-3.3** приказани су у наставку:<sup>148</sup>

#### Комплекс **3.1**<sup>148</sup>

Принос (154,59 mg, 61%). Аналитички израчунато за Pd<sub>2</sub>C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>Cl<sub>4</sub> (%) (FW = 823,92): C 43,56, H 3,41, N 10,16. Нађено: C 42,88, H 3,74, N 10,02. ESI-MS [Pd<sub>2</sub>C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (m/z<sup>+</sup>-Cl) 788,9518. IR (KBr, 4000–450 cm<sup>-1</sup>): 3036 (w, =C–H); 2970 (w, –C–H); 1769 (m, C=N); 1506 (m, C=C); 1246 (s, C–N); 1193 (s, C–C). <sup>1</sup>H NMR (DMF, δ, ppm): 8,74 (d, 4H), 8,23 (t, 4H), 7,90 (s, 4H), 7,52 (m, 4H), 6,01 (d, 4H), 5,40 (d, 4H).

#### Комплекс **3.2**<sup>148</sup>

Принос (128,26 mg, 53%). Аналитички израчунато за Pt<sub>2</sub>C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>Cl<sub>4</sub> (%) (FW = 1002,04): C 35,87, H 2,81, N 8,34. Нађено: C 35,67, H 2,94, N 8,22. ESI-MS [Pt<sub>2</sub>C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (m/z<sup>+</sup>-Cl) 967,0720. IR (KBr, 4000–450 cm<sup>-1</sup>): 3049 (w, =C–H); 2929 (w, –C–H); 1610 (m, C=N); 1517 (s, C=C); 1351 (m, C–N); 1284 (m, C–C). <sup>1</sup>H NMR (DMF, δ, ppm): 8,93 (d, 4H), 8,29 (m, 4H), 8,15 (s, 4H), 7,87 (m, 4H), 5,98 (d, 4H), 5,57 (d, 4H).

#### Комплекс **3.3**<sup>148</sup>

Принос (97,08 mg, 44%). Аналитички израчунато за PdPtC<sub>30</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>Cl<sub>4</sub> (%) (FW = 912,98): C 39,34, H 3,08, N 9,18. Нађено: C 39,11, H 3,22, N 9,05. ESI-MS [PdPtC<sub>30</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (m/z<sup>+</sup>-Cl) 878,0148. IR (KBr, 4000–450 cm<sup>-1</sup>): 3065 (w, =C–H); 2970

(w, -C-H); 1767 (m, C=N); 1507 (m, C=C); 1246 (s, C-N); 1193 (s, C-C). <sup>1</sup>H NMR (DMF, δ, ppm): 8,91 (d, 4H), 8,26 (t, 4H), (m, 4H), 7,52 (m, 4H), 6,01 (d, 4H), 5,40 (d, 4H).

## 2.4) Одређивање константе киселости комплекса

Кисело-базне особине комплекса испитиване су рН-метријском титрацијом у 0,1 М NaClO<sub>4</sub> средини. Промене рН вредности праћене су спектрофотометријском или потенциометријском методом. Спектрофотометријске и потенциометријске титрације изведене су додатком NaOH на температури од 298 К. За спектрофотометријску титрацију припремљен је полазни раствор од 250 ml испитиваног комплекса. За повећање рН вредности од 2-3 коришћен је чврст NaOH, док је за даље повећање рН вредности коришћен стандардни раствор NaOH (0,1143 М). Након сваког додатка титранта сниман је спектар узорка од 3 ml, који је потом одбачен, да би се избегло *in situ* таложење хлорида. Спектрални подаци су анализирани као зависност апсорбанце у односу на рН вредност, на одређеној таласној дужини.<sup>141</sup> Вредности константе стабилности аква комплекса одређене су помоћу једначине (8):

$$y = a + (b - a) / \left( \frac{1 + 2,718 * ((x - pK_{a1})/m) + (c - b) / (1 + 2,718 * ((x - pK_{a1})/n))}{1 + 2,718 * ((x - pK_{a1})/n)} \right) \quad (8)$$

Параметар *a* представља вредност апсорбанце на почетку титрације, *b* је апсорбанца током титрације, *c* апсорбанца на крају титрације, параметри *m* и *n* коришћени су за оптимизацију титрационе криве, *y* представља промену апсорбанце, а *x* се односи на рН вредност. Полазни раствор за потенциометријску титрацију био је 10,00 ml, а пре сваке титрације раствору је додаван стандардни раствор HClO<sub>4</sub> (0,0998 М) да би се достигла рН вредност око 2. Пре сваке титрације, стаклена електрода је калибрисана пуферским растворима рН 4, 7 и 10 (ВОЕСО), при чему је калибрациони нагиб био > 97%. Све пробе су титроване додавањем 0,01 ml стандардног раствора NaOH (0,1000 М) до промене рН у опсегу од 3,0 до 11,0. Константе стабилности аква комплекса израчунате су помоћу програма Nurequad2006<sup>149,150</sup> Вредности стандардне девијације мерења приказане су у заградама у Табели 20. Дистрибуциони дијаграм конструисан је на основу добијених вредности константи помоћу HYSS2009 програма.<sup>151</sup>

## 2.5) Кинетичка мерења

У овом раду изучаване су супституционе реакције комплекса **1.1-1.6** са нуклеофилима Tu, L-Met, L-Cys, L-His и 5'-GMP, комплекса **2.1-2.4** са нуклеофилима Tu, GSH, L-Met, L-His и 5'-GMP и комплекса **3.1-3.3** са нуклеофилима Tu, L-Met, GSH и 5'-GMP. Реакције комплекса **1.1-1.6** су изучаване „stopped-flow” методом на три различите температуре (288, 298 и 308 К), док су реакције комплекса **2.1-2.4** изучаване UV-Vis спектрофотометријски на 310 К. Реакције комплекса **3.1** праћене су „stopped-flow” методом на 288, 298 и 310 К, а реакције комплекса **3.2** UV-Vis спектрофотометријски на 298 К. У случају хетеронуклеарног комплекса **3.3**, први супституциони корак проучаван је „stopped-flow” методом, а други UV-Vis

спектрофотометријски. За реакције које су праћене на три различите температуре одређени су активациони параметри  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$ . Све реакције изучаване су као реакције *pseudo*-првог реда, односно концентрација нуклеофила у свим случајевима била је најмање десет пута већа од концентрације комплекса. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , израчунате су као средња вредност два до три независна кинетичка UV-Vis спектрофотометријска снимања, или три до пет снимања „stopped-flow” техником. Вредности за константе брзине реакције *pseudo*-првог реда израчунате су на основу једначине (9), праћењем промене апсорпције раствора  $A_t$  са временом  $t$  на одговарајућој радној таласној дужини:

$$\ln(A_t - A_\infty) = \ln(A_0 - A_\infty) - k_{\text{obsd}}t \quad (9)$$

Зависност  $\ln(A_t - A_\infty)$  од времена  $t$  је линеарна, тако да се из нагиба праве добија вредност за  $k_{\text{obsd}}$ . Вредност  $A_\infty$  представља апсорпцију раствора након 8-10 полувремена реакције. Константе брзине реакције другог реда,  $k$ , израчунате су из нагиба линеарне зависности константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , у односу на концентрацију нуклеофила према једначини (10):

$$k_{\text{obsd}} = k_i[\text{Nu}] + k_{-i}[\text{Cl}^-] \quad (10)$$

у којој  $k_i$  представља константу брзине директне, а  $k_{-i}$  константу брзине повратне реакције  $i$ -ог степена супституције.

Познавање вредности константе брзине хемијске реакције на најмање три различите температуре омогућава одређивање осталих термодинамичких параметара активирања. Промена енталпије активирања и промена ентропије активирања ( $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$ ) израчунати су применом логаритамског облика Ејрингове једначине (2).

## 2.6) $^1\text{H}$ NMR мерења

Реакције комплекса **1.1** (2 mM) са лигандима Tu, L-Met, L-Cys, L-His и 5'-GMP (8 mM), и комплекса **2.1** (2 mM) са лигандима Tu, GSH, L-Met, L-His и 5'-GMP (8 mM) изучаване су  $^1\text{H}$  NMR спектроскопијом на  $\text{pD} = 5,45$  ( $\text{pD} = \text{pH} + 0,45$ )<sup>152</sup> и 295 K. Раствори комплекса и лиганда припремани су одвојено у 300  $\mu\text{l}$  D<sub>2</sub>O пре сваког мерења. Сва хемијска померања дата су у односу на триметилсилилпропионску киселину.

## 2.7) HPLC мерења

При HPLC мерењу коришћена је изократска метода са водом као мобилном фазом. Систем је калибрисан мешом ацетонитрила и воде у различитим моларним односима. Калибрација је завршена када је само вода текла кроз колону (проток: 1  $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ ). Реакције комплекса **2.2** и **2.3** (5 mM) са 5'-GMP (10 mM) и реакција комплекса **2.2** (5 mM) са GSH (5 mM) изучаване су овом методом. За сваку реакцију раствори комплекса и лиганда припремани су у 25 mM HEPES пуферу уз додаток 50 mM NaCl. Након

припреме, раствори су термостатирани у термоблоку на 310 К. У различитим временским интервалима узорак од 20  $\mu\text{l}$  реакционе смеше убризгаван је у колону.

## 2.8) Методе компјутерске хемије

У овим испитивањима коришћен је B3LYP функционал<sup>153</sup> за оптимизацију геометрије и израчунавање фреквенције система. У свим случајевима примењен је def2-SVP базисни скуп.<sup>154</sup> Рачунањем фреквенције, крајње геометрије су окарактерисане као енергетски минимуми. Релативне енергије кориговане су помоћу „zero-point“ вибрационе енергије (ZPE). Утицај воде као растварача изучаван је применом „CPCM” формала<sup>155</sup> на истом нивоу теорије (B3LYP/def2-SVP). Ови рачуни урађени су помоћу Gaussian 09 програмског пакета.<sup>156</sup>

## 2.9) Испитивање интеракција комплекса са ДНК апсорпционом методом

Испитивање начина везивања комплекса са ДНК вршена су апсорпционом спектроскопском анализом раствора који садржи константну концентрацију комплекса ( $1 \times 10^{-5}$  М) и различиту концентрацију ДНК у опсегу од  $1,0 \times 10^{-6}$  М до  $1,5 \times 10^{-5}$  М (однос [ДНК]/[комплекс] = 0,1-1,5). Апсорпција је мерена у опсегу између 200 - 500 nm за комплексе **1.1-1.6** на 310 К, а за комплексе **3.1-3.3** на три различите температуре (289, 303 и 310 К). Сви испитивани раствори били су припремани у пуферском раствору (0,01 М PBS, pH = 7,4). Вредност за константу везивања ( $K_b$ ) одређује се применом Волф-Шимерове једначине (11):<sup>157</sup>

$$[\text{ДНК}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f) = [\text{ДНК}]/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/[K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)] \quad (11)$$

у којој је [ДНК] концентрација ДНК,  $\varepsilon_a$  екстинкциони коефицијент комплекса при датој ДНК концентрацији,  $\varepsilon_f$  и  $\varepsilon_b$  су екстинкциони коефицијенти само комплекса и комплекса када је комплетно везан за ДНК. Однос [ДНК]/( $\varepsilon_a - \varepsilon_f$ ) и [ДНК] је линеаран, где  $1/(\varepsilon_f - \varepsilon_b)$  и  $1/[K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)]$  представљају нагиб и одсечак. Вредност за  $K_b$  израчунава се из односа нагиба и одсечка.

## 2.10) Испитивање интеракција комплекса са ДНК флуориметријском методом

У циљу испитивања способности синтетизованих комплекса да изместе етидијум-бромид (ЕВ) или Hoechst 33258 (Ное) из ЕБ-ДНК или Ное-ДНК комплекса вршена су флуоресцентна мерења. За комплексе **1.1-1.6** испитиван је утицај етидијум-бромида, а за комплекс **3.1-3.3** утицај етидијум-бромида и Hoechst 33258 на везивање испитиваних комплекса за ДНК. Од полазних раствора ДНК ( $2 \times 10^{-3}$  М), ЕБ ( $2 \times 10^{-3}$  М) и Ное ( $3 \times 10^{-4}$  М) направљене су серије раствора у којима су концентрација ДНК ( $2,5 \times 10^{-5}$  М) и ЕВ или Ное ( $2,5 \times 10^{-5}$  М) биле константне, док је концентрација комплекса варирана у опсегу од 0 до  $5 \times 10^{-5}$  М. Флуоресцентни спектри за серију раствора ДНК-ЕБ-комплекс снимани су у опсегу од 550 до 700 nm на таласној дужини ексцитације од 527 nm, а за



серију раствора ДНК-Ное-комплекс у опсегу 360 - 600 nm при екситацији од 346 nm. Испитивани комплекси нису показивали флуоресценцију у датим условима, док су контролни раствори били ЕВ-ДНК или Ное-ДНК. Добијени спектрални подаци анализирани су применом Стерн-Волмерове једначине (12):<sup>158</sup>

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q] \quad (12)$$

у којој су  $I_0$  и  $I$  интензитети емисије у одсуству и у присуству комплекса,  $[Q]$  је концентрација комплекса, а  $K_{SV}$  је константа смањења („гашења”) флуоресценције.

Вредност за  $K_{SV}$  добијена је из нагиба графика линеарне зависности  $I_0/I$  у односу на  $[Q]$ . Утицај унутрашњег филтера је неутрализован корекцијом оба интензитета флуоресценције (екситационе и емисионе светлости) коришћењем једначине (13):

$$I_{cor} = I_{obs} \times e^{(A_{ex}+A_{em})/2} \quad (13)$$

у којој је  $I_{cor}$  кориговани, а  $I_{obs}$  измерени интензитет флуоресценције, док  $A_{ex}$  и  $A_{em}$  представљају апсорбанцу комплекса на таласној дужини екситације и емисије.

## 2.11) Испитивање интеракција комплекса са ДНК мерењем вискозности

За ову анализу коришћен је вискозиметар термостатиран на  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Промена вискозитета ДНК раствора мерена је у присуству растуће концентрације комплекса **3.1-3.3**. Подаци су представљени као  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  у односу на  $r$ , где је  $\eta$  вискозитет ДНК раствора у присуству комплекса, а  $\eta_0$  вискозитет само ДНК раствора у пуферу (PBS). Вредности вискозитета израчунате су мерењем времена за које раствор који садржи ДНК протекне кроз капилару ( $t$ ), кориговано са временом протока само пуферског раствора ( $t_0$ ),  $\eta = (t-t_0)/t_0$ . Сваки раствор анализиран је шест пута, при чему је средња вредност узета за коначно време протока.

## 2.12) Испитивања интеракција комплекса са BSA флуориметријском методом

Ова мерења су вршена одржавањем константне концентрације BSA ( $2 \times 10^{-6}$  M), а варирањем концентрације изучаваних комплекса у опсегу од  $2 \times 10^{-6}$  M до  $6 \times 10^{-6}$  M (однос  $[BSA]/[\text{комплекс}] = 1 - 30$ ). Таласна дужина екситације била је 285 nm. Емисиони спектри су снимани у опсегу од 320 - 500 nm за комплексе **1.1-1.6** на 310 K, а за комплексе **3.1-3.3** на три различите температуре (289, 303 и 310 K). Резултати су анализирани применом Стерн-Волмерове једначине (14):

$$I_0/I = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (14)$$

$$K_{SV} = k_q\tau_0 \quad (15)$$

у којој  $I_0$  и  $I$  представљају интензитете флуоресценције BSA у одсуству ( $I_0$ ) и у присуству комплекса,  $[Q]$  представља концентрацију комплекса,  $K_{sv}$  и  $k_q$  су Стерн-Волмерова константа стабилности и константа брзине „гашења” флуоресценције. Константа  $k_q$  израчуната је применом једначине (15), у којој је  $\tau_0$  временска константа за BSA у одсуству комплекса (10 ns за BSA). За статичке интеракције „гашења” флуоресценције, узимајући у обзир слична и независна места везивања за биомолекул, равнотежа између слободних и молекула у интеракцији за комплексе **1.1-1.6** дата је Скетчардовом једначином (16):<sup>159</sup>

$$(\Delta I/I_0)/[Q] = nK - K \Delta I/I_0 \quad (16)$$

у којој је  $K$  константа везивања (интеракције), а  $n$  број везивних места по молекулу албумина. Константа  $K$  се може израчунати из нагиба Скетчардове функције  $(\Delta I/I_0)/[Q]$  у односу на  $\Delta I/I_0$ , а вредност за  $n$  из односа одсечка и нагиба Скетчардове једначине. Константа везивања и број везивних места за интеракције комплекса **3.1-3.3** са BSA израчунате су применом Хилове једначине (17):<sup>160</sup>

$$\log[(I_0 - I)/I] = \log K + n \log[Q] \quad (17)$$

у којој  $I_0$  и  $I$  представљају интензитете флуоресценције BSA у одсуству и у присуству комплекса,  $K$  је константа везивања,  $n$  број везивних места по молекулу албумина, а  $[Q]$  концентрација комплекса.

### 2.13) Термодинамички параметри везивања

Да би се одредила природа интеракција између биомолекула и комплекса **3.1-3.3**, израчунати су термодинамички параметри коришћењем Ван’т Хофове једначине (18) изведене из једначине (19), применом одговарајућих термодинамичких функција базираних на температурним ефектима:<sup>161</sup>

$$\ln K_b = -(\Delta H^0/RT) + (\Delta S^0/R) \quad (18)$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT \ln K_b \quad (19)$$

$\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$  и  $\Delta G^0$  су промена стандардне енталпије, ентропије и слободне енергије,  $K$  је константа везивања на одговарајућој температури  $T$ , а  $R$  је универзална гасна константа.

### 2.14) Симулације молекулског докинга

Структурне координате фрагмената канонског ДНК (PBD код 1BNA)<sup>162</sup> и инктеркалационог ДНК (PBD код 1Z3F),<sup>163</sup> као и BSA (PBD код 4F5S)<sup>164</sup> узете су из „Protein Data Bank” (PDB; <http://www.rcsb.org>). 1BNA представља кристалну структуру

синтетичког ДНК додакамера, док 1Z3F представља кристалну структуру 6 базних парова ДНК фрагмента са интеркалираним антикарценогеним агенсом елиптицином. Молекули воде, лиганди и хетероатоми су уклоњени уколико су били присутни. Оптимизација структуре испитиваних комплекса урађена је према поступку описаном у методама компјутерске хемије. Координатна мрежа везивног места подешена је на 0,3 Å. Параметри докинг процедуре били су следећи: величина популације 50, максимални број понављања 1500, енергетска граница 100,00 и максимални број корака 300. Максимална популација од 100 и максимални број понављања од 10000 коришћени су за сваки корак, где су 5 најбољих резултата задржани на основу MolDock SE алгоритма. За симулацију је коришћен програм Molegro Virtual Docker (MVD, верзија 2013.6.0.1), а процена интеракција испитиваних комплекса са ДНК/BSA молекулима вршена је на основу MVD функција: MolDock, Docking, Rerank и Hbond.<sup>165</sup> Резултати су визуализовани коришћењем CHIMERA (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) молекулско графичког програма. Величине MVD функција анализирани су релативно (бездимензионалне величине).

## **2.15) Биолошка испитивања**

### **2.15.1) Ћелијске линије**

У испитивањима су коришћене хумане ћелијске линије аденокарцинома грлића материце (HeLa), карцинома дојке (MDA-MB-231), меланома (HTB140) и карцинома плућа (H460). Као контролна група коришћена је ћелијска линија нетрансформисаних хуманих фибробласта плућа (MRC-5). Све ћелијске линије добијене су из „American Type Culture Collection” (ATCC). Ћелије HeLa, MDA-MB-231 и MRC-5 култивисане су у DMEM медијуму (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium), док су ћелије HTB140 и H460 култивисане у RPMI-1640 медијуму (Roswell Park Memorial Institute Medium). Оба медијума су суплементирана са 10% феталног говеђег серума (fetal bovine serum, FBS) инактивисаног топлотом, 100 U ml<sup>-1</sup> пеницилина и 100 µg ml<sup>-1</sup> стрептомицина, као и 0,1 mM неесенцијалних аминокиселине и 2 mM L-глутамин. Ћелије су култивисане у фласковима T-25 (Greiner Bio-One) у инкубатору на температури од 37°C, у атмосфери ваздуха засићеног воденом паром и обогаћеног 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.15.2) Припремање раствора комплекса**

Серија комплекса **1.1-1.6** растворена је у диметилсулфоксиду (DMSO) (Fisher Scientific) до концентрације 40 mM, филтрирана пре коришћења и разблажена ћелијским медијумом (DMEM) до различитих радних концентрација (0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM и 100 µM), тако да коначна концентрација DMSO у ћелијској култури није прелазила 0,5%. Сви раствори припремљени су на дан третирања ћелија. Комплекси **3.1-3.3** растворени су у диметилформамиду (DMF) (Sigma Aldrich) до концентрације од 15 mM и чувани на температури од +4°C. Серија раствора комплекса накнадно је разблажена помоћу DMEM или RPMI-1640 у зависности од врсте третираних ћелијских линија. Коначна концентрација DMF у ћелијској култури није прелазила 0,5%.

### 2.15.3) МТТ тест

Цитотоксичност комплекса испитивана је помоћу колориметријског *МТТ* теста.<sup>166</sup> Жута тетразолијумова со, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид (МТТ) прелази у карактеристичан љубичасти формазан услед активности митохондријалне редуктазе у метаболички активним ћелијама. Стога, МТТ тест показује одрживи ћелијски метаболизам, пре него ћелијску смрт или пролиферацију. Ћелије су засејане у микротитар плоче са 96 бунара, и то HeLa и MDA-MB-231 у густини од  $5 \times 10^3$  ћелија по бунару, НТВ140 и Н460  $4 \times 10^3$  ћелија по бунару и MRC-5 у густини од  $3 \times 10^3$  ћелија по бунару, и остављене да адхерирају преко ноћи. Ћелије су третиране са шест различитих концентрација комплекса или су инкубиране само са медијумом (контрола) током 48 сати. *Цисплатина* је коришћена као позитивна контрола, док је у неким експериментима коришћен рапамицин (R), индуктор аутофагије. Свеже припремљени МТТ раствор ( $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) је додат у нултом времену (након адхеренције ћелија) и на крају инкубације од 48 сати, а потом су ћелије инкубиране још 4 сата. По истеку времена МТТ раствор је уклоњен, а кристали формазања растворени у  $150 \mu\text{l}$  DMSO. Апсорбанца је измерена на 590 nm на читачу Zenyth 3100 (Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria). Сви експерименти поновљени су најмање три пута у трипликату. Степен цитотоксичности (C[%]) је израчунаван по формули:  $C[\%] = (T_c - T) \times 100 / T_c$ . На основу ових вредности, интерполацијом у софтверу GraphPad Prism 83a израчуната је вредност IC<sub>50</sub>, односно концентрација агенса која инхибира преживљавање 50% ћелија у односу на контролу (нетретиране ћелије). За једињења **3.1-3.3** приказана су три параметра: GI<sub>50</sub>, TGI и LC<sub>50</sub>. Параметар GI<sub>50</sub> је концентрација комплекса при којој је  $100 \times (T - T_0) / (T_c - T_0) = 50$  и односи се на ефекат инхибиције раста третираних ћелија. Вредност TGI је концентрација испитиваних комплекса при којој је  $100 \times (T - T_0) / (T_c - T_0) = 0$  и односи се на цитостатички ефекат. Вредност LC<sub>50</sub> је концентрација комплекса где је  $100 \times (T - T_0) / (T_c - T_0) = -50$ , а односи се на ефекат цитотоксичности. У овим формулама *T* представља оптичку густину тест бунара након 48 сати, *T*<sub>0</sub> оптичку густину у нултом времену (када је комплекс додат), а *T*<sub>c</sub> је оптичка густина у контролним бунарима (ћелије инкубиране само у медијуму). Додатно, израчунат је и индекс селективности (SI), који представља однос IC<sub>50</sub> вредности за здраву ћелијску линију и IC<sub>50</sub> за туморску ћелијску линију, за комплексе **3.1-3.3**.

### 2.15.4) Кологени тест

Ћелије НТВ140 и Н460 су засејане у плоче са 6 бунара, са иницијалним бројем од 200 ћелија по бунару, у дупликату, и остављене да адхерирају преко ноћи. Затим су ћелије третиране са пет различитих концентрација комплекса **3.2** (1 - 100  $\mu\text{M}$ ) или инкубиране само у медијуму (контрола). Ћелије су остављене да формирају колоније на температури од 37°C, у атмосфери ваздуха засићеног воденом паром и обогаћеног 5% CO<sub>2</sub>, уз регуларно додавање медијума сваки четврти дан. Након 15 дана ћелије су испране PBS пуфером, фиксиране метанолом, обојене са 10% Gimesa-ом, сликане, а колоније су пребројане под светлосним микроскопом. Као колоније су сматране групе од минимум 50 ћелија. Фракција преживљавања (SE) израчуната је према формули: број формираних колонија након третирања / (број засејаних ћелија  $\times$  PE), где је PE однос броја колонија и броја засејаних ћелија.

### 2.15.5) Проточна цитрометријска анализа

Ћелије НТВ140 и Н460 су засејане у микротитар плоче са 24 бунара, у густини од  $1 \times 10^5$  ћелија по бунару. Након инкубације у току ноћи, ћелије су третиране само медијумом (RPMI-1640) (контрола) или комплексом **3.2** у концентрацији која одговара  $IC_{50}$  вредности за дату ћелијску линију, у периоду од 48 сати. По завршетку инкубације ћелије су трипсинизоване и припремљене у складу са одговарајућим есејом. Сваки експеримент изведен је у трипликату. Узорци су анализирани на проточном цитометру Cytomics FC500.

### 2.15.6) Annexin V-FITC/7-ADD тест

Тип ћелијске смрти одређен је помоћу Annexin V-FITC/7-ADD теста према упутству произвођача. Након третмана ћелије су прикупљене, испране PBS пуфером и ресуспендоване у 100 $\mu$ l леденог Binding buffer-a. Потом су ћелије обојене са 10  $\mu$ l Annexin V-FITC и 20  $\mu$ l 7-AAD и инкубиране у мраку на температури од +4°C. После 15 минута 400  $\mu$ l Binding buffera додато је у сваку епрувету. Узорци су одмах анализирани на проточном цитометру. Подаци од најмање 10000 ћелија прикупљени су за сваку групу, а проценатна заступљеност различитих ћелијских популација (вијабилне, некротичне, рано и касно апоптотичне ћелије) одређена је помоћу Flowing Software (<http://www.flowingsoftware.com/>).

### 2.15.7) Детекција аутофагије помоћу акридин оранжа

Детекција аутофагије извршена је помоћу рН-сензитивне боје, акридин-оранжа (АО). При неутралном рН АО емитује зелену флуоресценцију, а у киселим везикулама, карактеристичним за аутофагију, АО бива протонован и емитује јаку црвену флуоресценцију. Према томе, живе ћелије које садрже киселе везикулске органеле емитоваће и зелену и црвену флуоресценцију. Прикупљене ћелије инкубиране су са АО (1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) у периоду од 15 минута у мраку, а затим опране и ресуспендоване у 300  $\mu$ l PBS-a. Узорци су анализирани на проточном цитометру, а подаци обрађени помоћу Flowing Software-a, и приказани као проценат црвених/зелених ћелија.

### 2.15.8) Анализа апоптских и аутофагних протеина

Да би се утврдио тип ћелијске смрти коју изазивају комплекси **3.1-3.3**, анализиран је однос Bcl2/Bax и проценат експресије активне каспазе 3, као и ниво експресије p62 протеина за потврду аутофагије. Третиране ћелије су прикупљене, испране PBS пуфером и фиксирани и пермеабилizовани коришћењем Fixation Permeabilization Kit-a (eBioscience). Затим су узорци појединачно инкубирани са примарним anti-Bcl-2 (Life technologies), anti-Bax (Santa Cruz Biotech. Inc) или anti-cleaved-caspase-3 (Cell signaling Technology) антителима у периоду од 20 минута, а онда опране PBS пуфером, да би се уклонила невезана антитела. Након тога, узорци су инкубирани са секундарним антителима коњугованим са флуорофором FITC (Abcam) у мраку 20 минута. Узорци

обојени са FITC коњугованим anti-p62 антителом (Abcam) инкубирани су 30 минута. Након прања и ресуспендовања у PBS, узорци су анализирани на проточном цитометру. Подаци су анализирани помоћу Flowing Software-а. Нивои Bcl2, Bax и p62 изражени су кроз средњу вредност интензитета флуоресценције, док је активирана каспаза 3 изражена кроз проценат ћелија у којима је присутна.

### **2.15.9) Анализа ћелијског циклуса**

За анализу ћелијског циклуса после третмана комплексима **1.1-1.6** и **3.1-3.3** коришћена је боја пропидиум-јодид (PI). Метода се заснива на способности PI да се интеркалира у молекуле ДНК, а интензитет његове црвене флуоресценције одражава садржај ДНК који се разликује у различитим фазама ћелијског циклуса. Прикупљене ћелије су опране PBS пуфером и фиксирани помоћу 70% етанола током ноћи на +4°C. Након тога, ћелије су испране, инкубирани са RNase-A (500 µg ml<sup>-1</sup> PBS) 30 минута на 37°C и обојене са 5 µl PI (10 mg ml<sup>-1</sup> PBS) 15 минута у мраку. ДНК садржај праћен је помоћу проточне цитометрије, а резултати су анализирани помоћу Flowing Software. Подаци су представљени у виду хистограма.

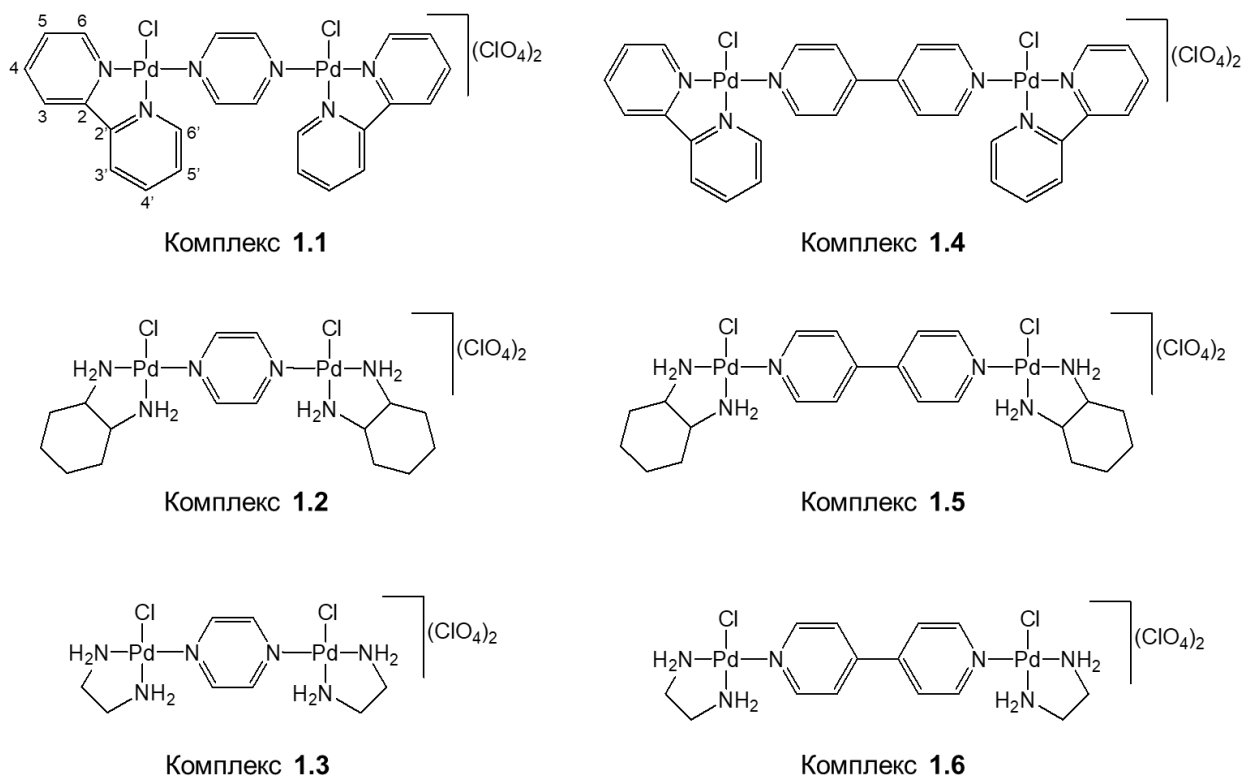
### **2.15.10) Процена митотичке катастрофе**

Након 48 сати третмана комплексом **3.2** у концентрацији која одговара IC<sub>50</sub> вредности, ћелије су обојене са 1 µg ml<sup>-1</sup> АО (акридин оранж) и 1 µg ml<sup>-1</sup> ЕВ (етидијум бромид) и одмах посматране под флуоресцентним микроскопом (Leica DM 1000, Leica Microsystems). Такође, ћелије су посматране и инвертним микроскопом (Optech Optical Technology). Сlike су снимљене фото апаратом (Canon PC 1089).

### 3) РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

#### 3.1) Динуклеарни комплекси Pd(II): Резултати испитивања хидролизе, нуклеофилних супституционих реакција, ДНК/BSA интеракција и цитотоксичне активности

Шест нових Pd(II) комплекса  $[\{Pd(2,2'-bipy)Cl\}_2(\mu-pz)](ClO_4)_2$  (**1.1**),  $[\{Pd(dach)Cl\}_2(\mu-pz)](ClO_4)_2$  (**1.2**),  $[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu-pz)](ClO_4)_2$  (**1.3**),  $[\{Pd(2,2'-bipy)Cl\}_2(\mu-4,4'-bipy)](ClO_4)_2$  (**1.4**),  $[\{Pd(dach)Cl\}_2(\mu-4,4'-bipy)](ClO_4)_2$  (**1.5**) и  $[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu-4,4'-bipy)](ClO_4)_2$  (**1.6**), структурне формуле приказане на Слици 10, синтетисано је и окарактерисано елементалном микроанализом, IR,  $^1H$  NMR и MALDI-TOF масеном спектроскопијом (подаци су сумирани у поглављу 2.3).<sup>142</sup> Комплекси су дизајнирани са циљем испитивања утицаја различитих мостних лиганата (pz и 4,4'-bipy) на карактеристике серије комплекса са алифатичним (dach, en) и ароматичним (2,2'-bipy) инертним лигандима.

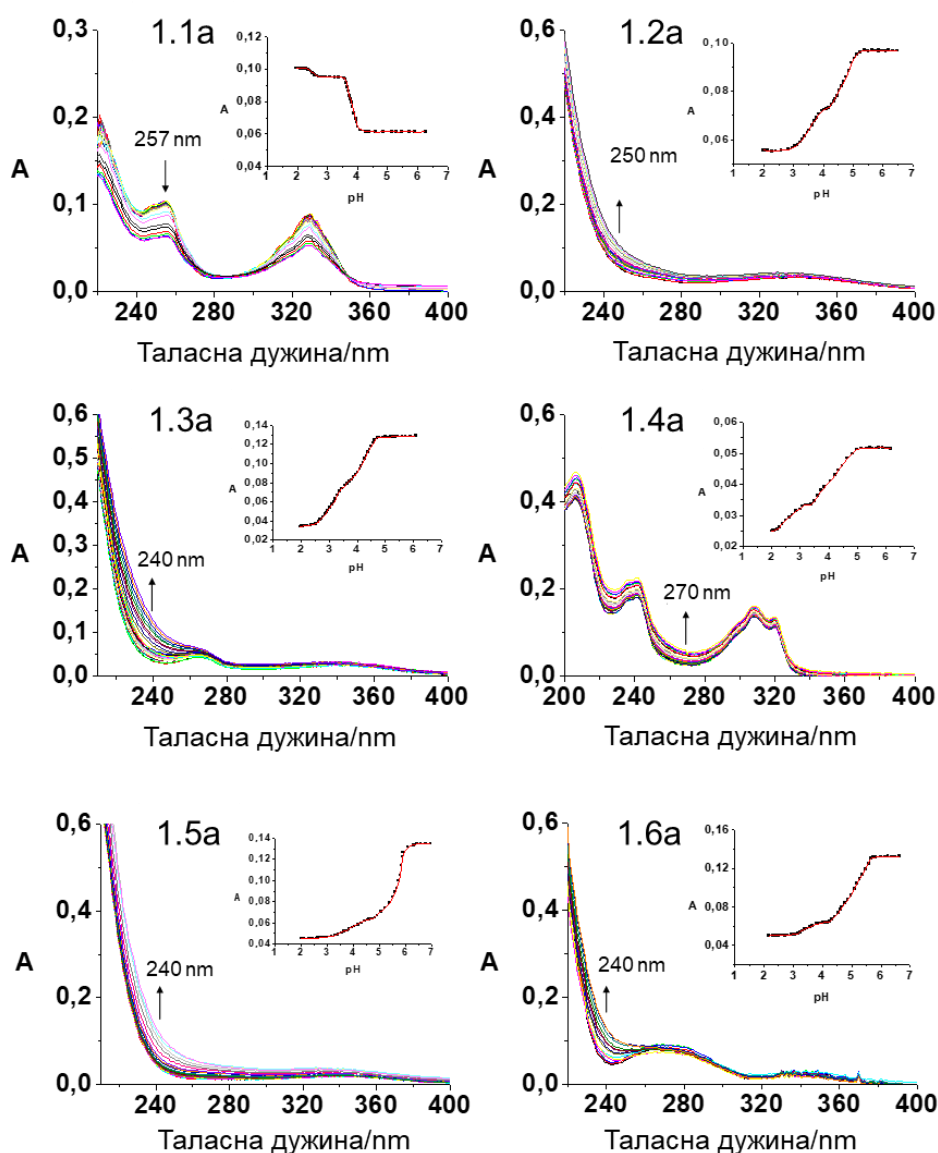


Слика 10. Структурне формуле комплекса **1.1-1.6**.<sup>142</sup>

#### 3.1.1) Одређивање константе киселости диаква комплекса **1.1a-1.6a**

Хидролиза јона прелазних метала уско је повезана са њиховом потенцијалном антитуморском активношћу. Наиме, као што је наведено у Општем делу, успешност

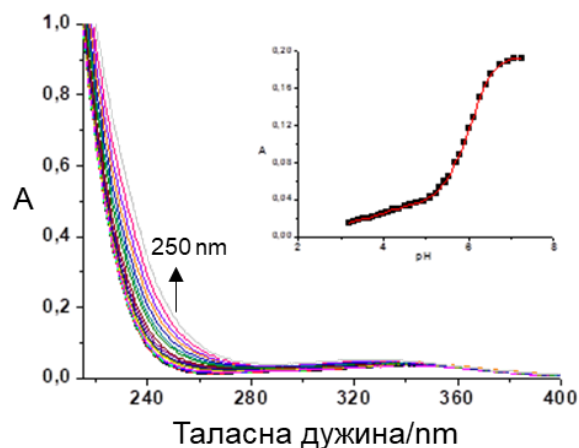
комплекса јона прелазних метала као антиканцерогених агенаса зависи од њихове способности да интерагују са ДНК. У већини случајева комплекси, при физиолошким условима, подлежу хидролизаци формирајући одговарајуће аква комплексе, који се даље могу трансформисати у различите хидролитичке производе. Из тог разлога је приликом испитивања потенцијалне антитуморске активности комплекса неопходно изучавање процеса хидролизе комплекса, као и одређивање стабилности награђених хидролитичких производа. Одређивање  $pK_a$  вредности, односно хидролиза комплекса **1.1a-1.6a**, изучавана је спектрофотометријски, титрацијом стандардним раствором NaOH (0,1143 M) на температури од 298 K у 0,1 M воденом раствору NaClO<sub>4</sub>. Спектралне промене добијене током титрације диаква комплекса **1.1a-1.6a** приказане су на Слици 11.



Слика 11. UV-Vis спектри диаква комплекса **1.1a-1.6a** у рН опсегу од 2 до 7 на 298 K у 0,1 M NaClO<sub>4</sub>. Уметнути график: однос апсорбанце у функцији од рН на одређеној таласној дужини.<sup>142</sup>



Додатно, одређене су и  $pK_a$  вредности диаква комплекса  $[\text{Pd}(\text{dach})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  (Слика 12), ради упоређивања киселости мононуклеарних и динуклеарних Pd(II) комплекса који садрже исти инертни лиганд.  $pK_a$  вредности за остала два мононуклеарна комплекса (са 2,2'-bipy и en као инертним лигандом) узете су из већ објављених резултата.<sup>145,167</sup>



Слика 12. UV-Vis спектри комплекса  $[\text{Pd}(\text{dach})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  у рН опсегу од 2 до 7 на 298 К у 0,1 М  $\text{NaClO}_4$ . Уметнути график: однос апсорбанце у функцији од рН на одређеној таласној дужини.<sup>142</sup>

Добијени подаци анализирани су применом једначине (8), а израчунате  $pK_a$  вредности приказане су у Табели 4.

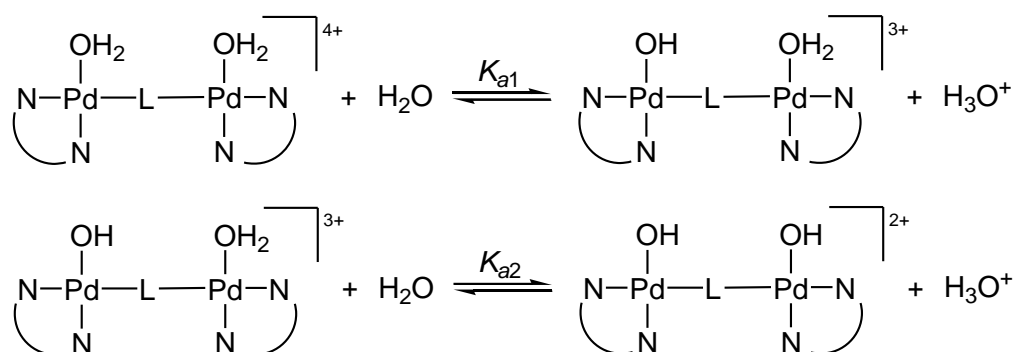
Табела 4.  $pK_a$  вредности диаква комплекса **1.1a** – **1.6a**.<sup>142</sup>

Комплекс	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$
<b>1.1a</b>	$2,45 \pm 0,01$	$3,79 \pm 0,05$
<b>1.2a</b>	$3,55 \pm 0,02$	$4,78 \pm 0,03$
<b>1.3a</b>	$3,05 \pm 0,01$	$4,23 \pm 0,05$
<b>1.4a</b>	$2,55 \pm 0,02$	$4,10 \pm 0,02$
<b>1.5a</b>	$3,85 \pm 0,03$	$5,63 \pm 0,05$
<b>1.6a</b>	$3,65 \pm 0,02$	$5,14 \pm 0,03$
$[\text{Pd}(2,2'\text{-bipy})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	$3,91^a$	-
$[\text{Pd}(\text{dach})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	$5,85 \pm 0,05$	-
$[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	$5,60^b$	-

<sup>a</sup> Референца [170]

<sup>b</sup> Референца [145]

Укупан процес депротонације динуклеарних аква комплекса **1.1a-1.6a** може се представити процесима који су приказани на Шеми 3.



Шема 3. Депротонација динуклеарних комплекса **1.1a-1.6a**  
(N-N = 2,2'-bipy, dach или en, а L = pz или 4,4'-bipy).<sup>142</sup>

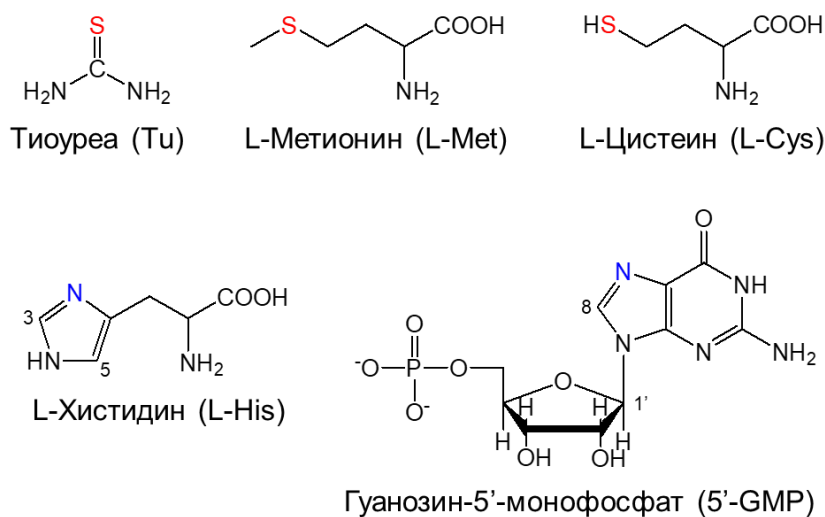
Добијени резултати за комплексе са пиразином (pz) као мостним лигандом указују да аква комплекс **1.1a** има најмању, а аква комплекс **1.2a** највећу  $pK_a$  вредност (Табела 4). Овакав редослед киселости може се повезати са особинама инертног лиганда. Наиме,  $\pi$ -акцепторски ефекат 2,2'-bipy лиганда у случају комплекса **1.1a** додатно стабилизује насталу хидроксо честицу, што доводи до смањења  $pK_a$  вредности. Са друге стране, dach лиганд, који поседује већи  $\sigma$ -донорски капацитет у односу на етилендиамин (en), смањује електрофилност јона метала, што се одражава на повећање  $pK_a$  вредности.<sup>142</sup> У случају комплекса са 4,4'-bipy мостним лигандом, промена  $pK_a$  вредности прати исти редослед:  $pK_a$  (**1.4a**) <  $pK_a$  (**1.6a**) <  $pK_a$  (**1.5a**), (Табела 4). Добијени резултати такође указују да комплекси са пиразином као мостним лигандом имају нижу  $pK_a$  вредност у односу на комплексе са 2,2'-bipy лигандом (Табела 4). Ова карактеристика може се објаснити  $\pi$ -акцепторским карактеристикама pz лиганда, који узрокује повећање електрофилности јона метала, а самим тим и киселости комплекса.<sup>142</sup>

Вредности за  $pK_{a1}$  за све динуклеарне комплексе ниже су од  $pK_{a1}$  вредности одговарајућих мононуклеарних аналога (Табела 4). Ова особина се, такође, доводи у везу са  $\pi$ -акцепторским особинама мостних лиганда (pz и 4,4'-bipy).<sup>91</sup>

Вредности за другу константу депротонације,  $pK_{a2}$ , за сваки испитивани динуклеарни комплекс, веће су од вредности за први корак депротонације,  $pK_{a1}$ . Наиме, након депротонације првог молекула воде укупно наелектрисање комплекса смањује се са 4+ на 3+, што узрокује смањену тенденцију за даљу депротонацију.<sup>141,168</sup>

### 3.1.2) Испитивање супституционих реакција комплекса 1.1-1.6

Супституционе реакције комплекса **1.1** са нуклеофилима Tu, L-Met, L-Cys, L-His и 5'-GMP (Слика 13) испитиване су помоћу <sup>1</sup>H NMR спектроскопије у D<sub>2</sub>O на 295 K. Уочена хемијска померања током анализе приказана су у Табели 5.

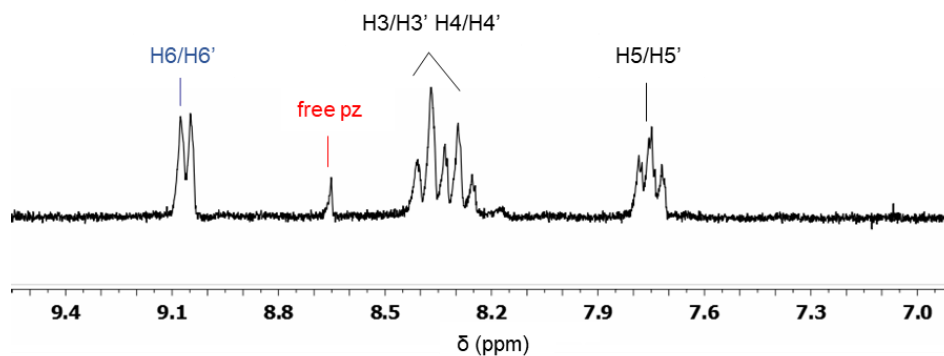


Слика 13. Структурне формуле нуклеофила.<sup>142</sup>

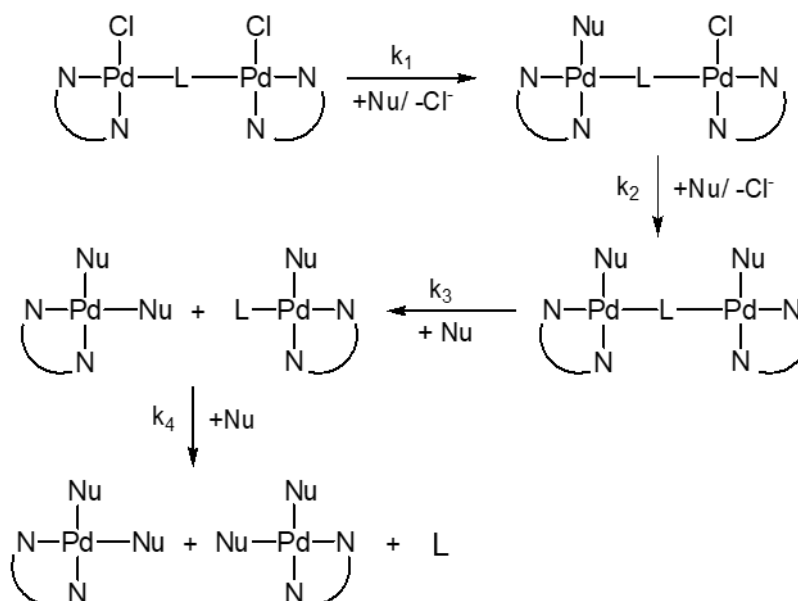
Табели 5. Карактеристична хемијска померања ( $\delta$ ) слободних и координованих нуклеофила са комплексом **1.1**.<sup>142</sup>

Честице	$\delta$ (H6/H6')	$\delta$ (CH3)	$\delta$ (CH)	$\delta$ (CH2)	$\delta$ (H5)	$\delta$ (H1')	$\delta$ (H8)	CH <sub>free</sub> (pz)	CH <sub>coord</sub> (pz)
Tu									
Tu-(Pd)	9,06							8,66	
L-Met		2,15							
L-Met-(Pd)	9,01	2,88						8,66	
L-Cys			4,00	3,03					
L-Cys-(Pd)	9,05		4,15	3,20				8,66	
L-His					7,25				
L-His-(Pd)	8,70				7,41				8,98
5'-GMP						5,90	8,12		
5'-GMP-(Pd)	8,70					6,17	8,61		9,01

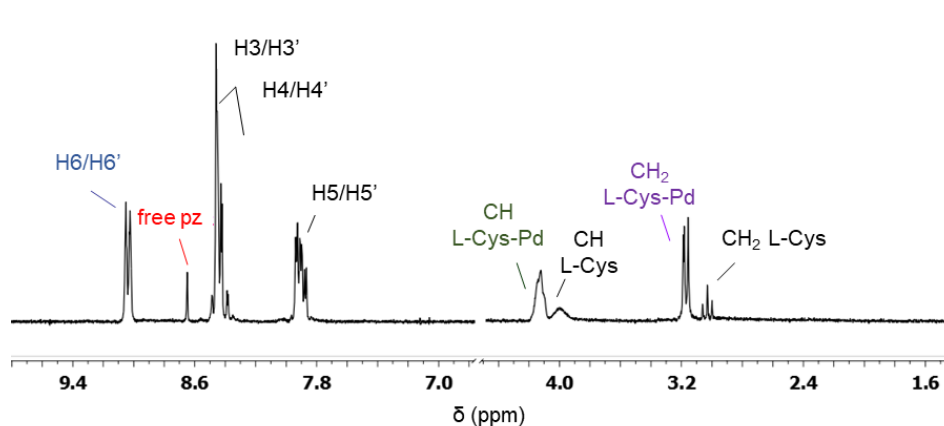
Додатак Tu у вишку раствору комплекса **1.1** у D<sub>2</sub>O индукује појављивање новог сигнала у <sup>1</sup>H NMR спектру 24 сата након почетка реакције (Слика 14). Као што се може приметити појављује се дублет на 9,06 ppm, који потиче од H6/H6' протона супституисаног мононуклеарног [Pd(2,2'-bipy)(Tu)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> комплекса.<sup>169,170</sup> Поред тога, у спектру је доминантан и сигнал на 8,66 ppm који потиче од протона слободног пиразина (free pz).<sup>171</sup> Ови резултати недвосмислено указују да након координације Tu за Pd(II) јон долази до раскидања обе Pd(II)-пиразин везе у динуклеарном **1.1** комплексу, као што је приказано на Шеми 4. Исти механизам супституције потврђен је и за реакције комплекса са L-Met и L-Cys (Слике 15 и 16).



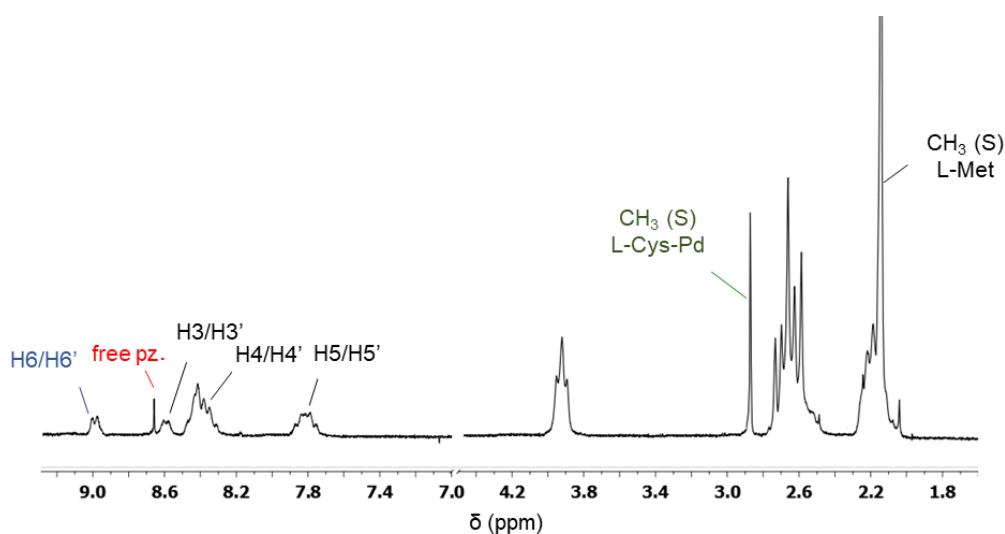
Слика 14.  $^1\text{H}$  NMR спектар комплекса **1.1** (2 mM) након додатка Tu (8 mM) на рН = 5,0 и 295 К, снимано 24 сата након почетка реакције.<sup>142</sup>



Шема 4. Супституционе реакције динуклеарних комплекса **1.1-1.6** са сумпор-донорским нуклеофилима (N-N = 2,2'-bipy, dach или en, L = pz или 4,4'-bipy, Nu = Tu, L-Met или L-Cys).<sup>142</sup>

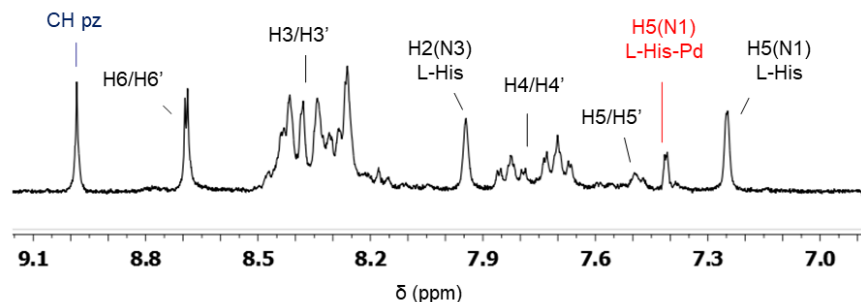


Слика 15.  $^1\text{H}$  NMR спектар комплекса **1.1** (2 mM) након додатка L-Cys (8 mM) на pH = 5,0 и 295 K, снимано 24 сата након почетка реакције.<sup>142</sup>

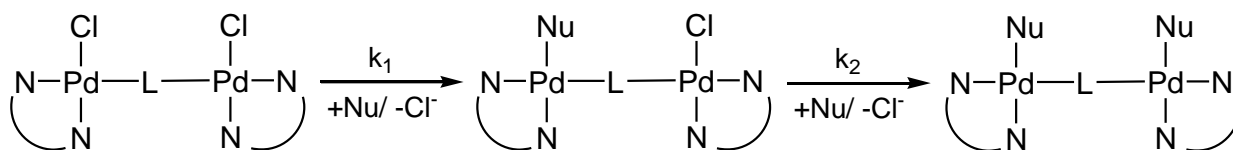


Слика 16.  $^1\text{H}$  NMR спектар комплекса **1.1** (2 mM) након додатка L-Met (8 mM) на pH = 5,0 и 295 K, снимано 24 сата након почетка реакције.<sup>142</sup>

$^1\text{H}$  NMR спектар добијен током изучавања супституционе реакције комплекса **1.1** (2 mM) са L-His (8 mM) на pH = 5,0 приказан је на Слици 17. Наиме, L-His може да се координује за јоне метала преко N1 и N3 атома имидазоловог прстена.<sup>172</sup> Везивање аминокиселине за Pd(II) јон преко N1 атома узрокује померање сигнала од 7,25 ppm (некоординован лиганд) на 7,41 ppm (координован лиганд).<sup>173</sup> Одсуство сигнала на око 9 ppm, који одговара супституисаном мононуклеарном Pd(II) комплексу, и одсуство сигнала протона слободног пирозина (на  $\delta = 8,66$  ppm) указује да се супституција одиграва по механизму приказаном на Шеми 5.

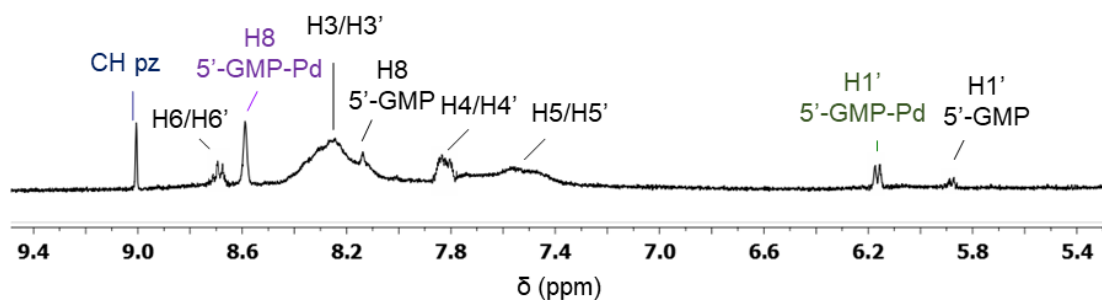


Слика 17.  $^1\text{H}$  NMR спектар комплекса **1.1** (2 mM) након додатка L-His (8 mM) на  $\text{pH} = 5,0$  и 295 K, снимано 24 сата након почетка реакције.<sup>142</sup>



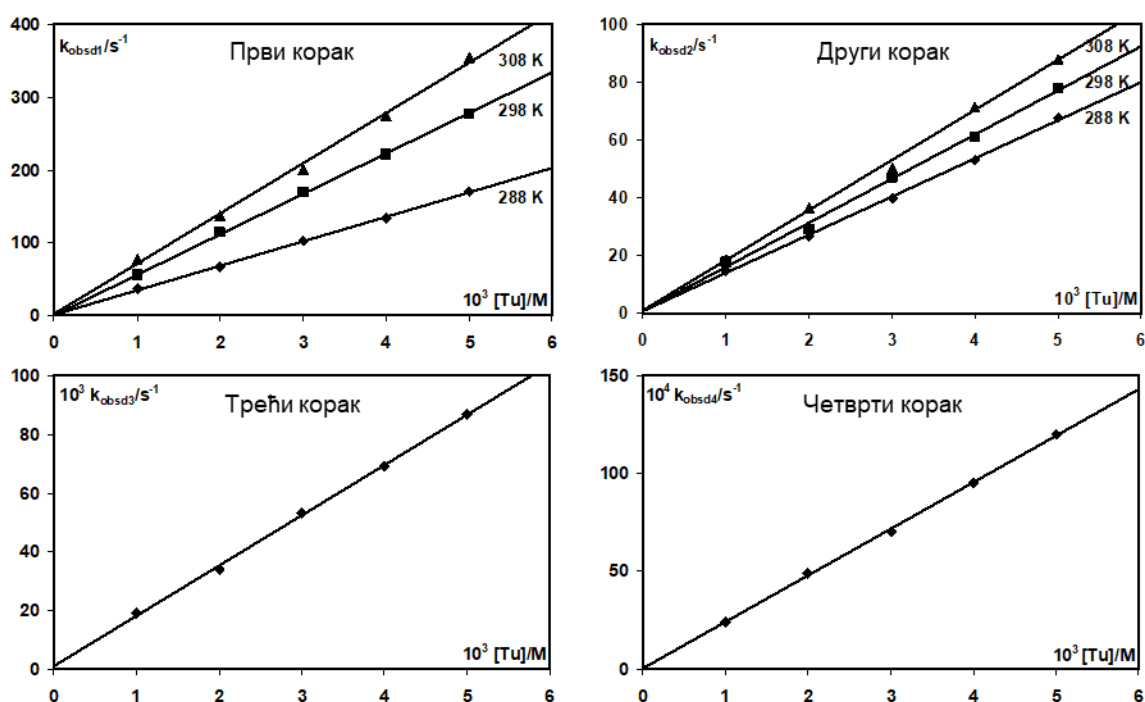
Шема 5. Супституционе реакције динуклеарних комплекса **1.1-1.6** са азот-донорским нуклеофилима ( $\text{N-N} = 2,2'$ -bipy, dach или en,  $\text{L} = \text{pz}$  или  $4,4'$ -bipy,  $\text{Nu} = \text{L-His}$  или  $5'$ -GMP).<sup>142</sup>

$^1\text{H}$  NMR спектар супституционе реакције између комплекса **1.1** (2 mM) и  $5'$ -GMP (8 mM) приказан је на Сlici 18, а предложени реакциони механизам приказан је на Шеми 5. У  $^1\text{H}$  NMR спектру слободног (некоординованог)  $5'$ -GMP јављају се сигнали на 5,90 ppm ( $\text{H1}'$ ) и 8,12 ppm ( $\text{H8}$ ). Након координације  $5'$ -GMP за Pd(II) јон ови сигнали се појављују на 6,17 ppm ( $\text{H1}'$ ) и 8,62 ppm ( $\text{H8}$ ). Одсуство синглета на 8,66 ppm, који одговара протону некоординованог пиразина, потврђује процес супституције приказан на Шеми 5 и формирање производа  $[\{\text{Pd}(2,2'\text{-bipy})(5'\text{-GMP})\}_2(\mu\text{-pz})]^{2+}$ .

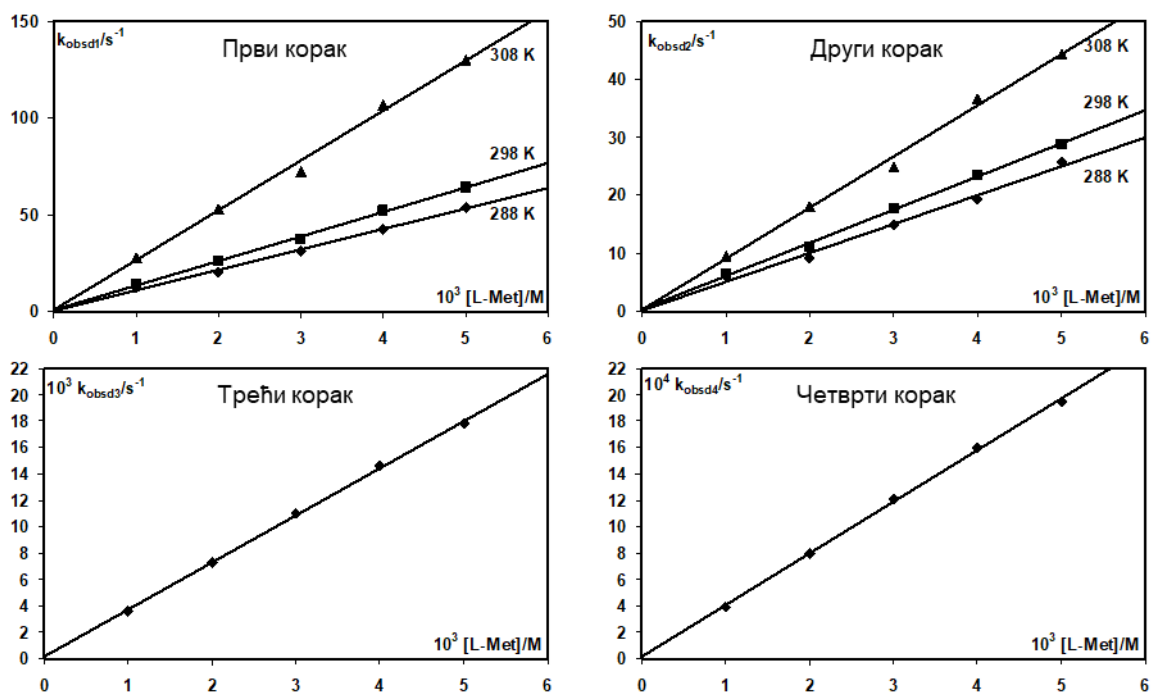


Слика 18.  $^1\text{H}$  NMR спектар комплекса **1.1** (2 mM) након додатка  $5'$ -GMP (8 mM) на  $\text{pH} = 5,0$  и 295 K, снимано 24 сата након почетка реакције.<sup>142</sup>

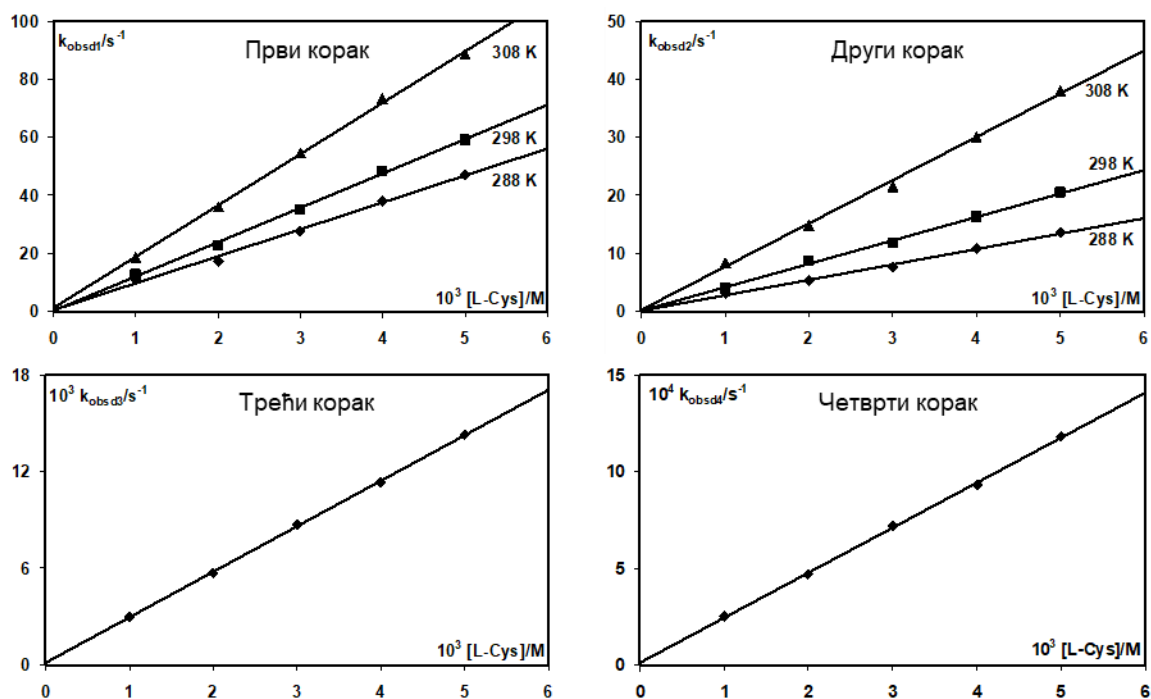
Супституционе реакције комплекса **1.1-1.6** (Слици 10) са нуклеофилима Tu, L-Met, L-Cys, L-His и 5'-GMP (Слика 13) изучаване су и спектрофотометријски, праћењем промене апсорбанце на одговарајућој радној таласној дужини у функцији времена. Сви експерименти су извођени на рН 7,2 (25 mM Нерес пуфер) у присуству 40 mM NaCl, у циљу сузбијања спонтане хидолизе комплекса. Резултати испитивања су показали да се супституционе реакције ових комплекса са сумпор-донорским нуклеофилима (Tu, L-Met и L-Cys) одигравају у четири узастопна корака, док се супституционе реакције са азот-донорским нуклеофилима (L-His и 5'-GMP) дешавају у два узастопна корака. Предложени реакциони механизми представљени су на Шемама 4 и 5. Прва два корака у процесу супституције изучавани су „stopped-flow” техником, док су трећи и четврти праћени UV-Vis спектрофотометријом. Добијене вредности за константе брзине реакције *pseudo*-првог реда за сваки корак  $k_{obsd(i)}$  (једначина (10)) линеарно зависе од концентрације одговарајућег нуклеофила, што је приказано на Сликама 19-42.



Слика 19. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације Tu и температуре за реакције супституције комплекса **1.1** на рН 7,2 (25 mM Нерес, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>

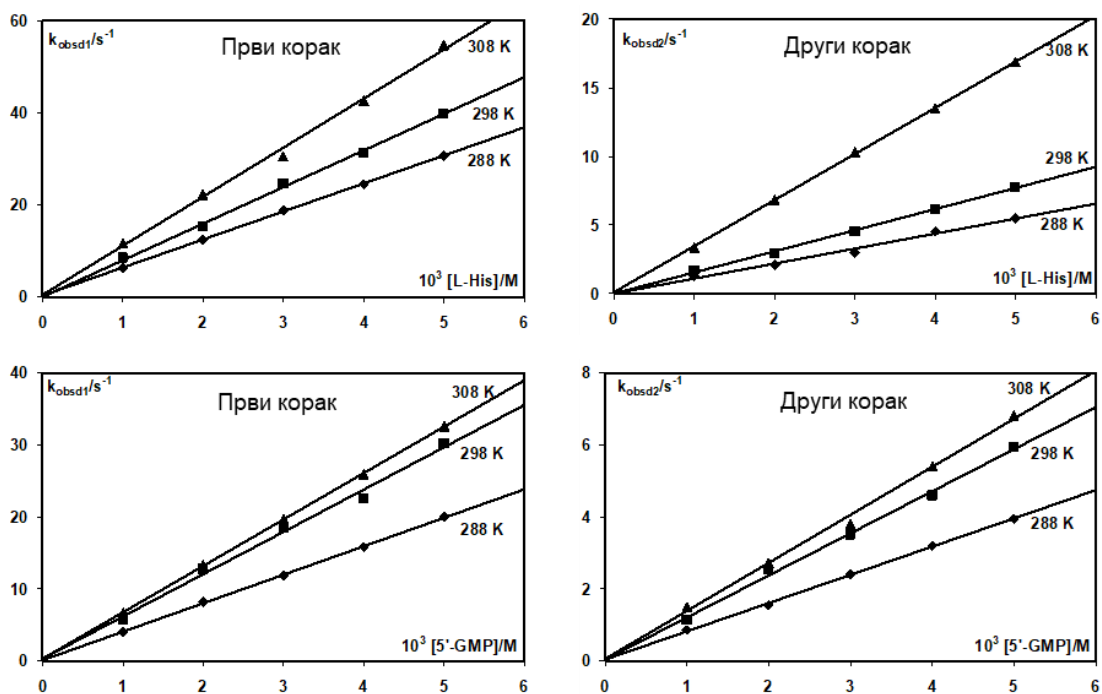


Слика 20. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације L-Met и температуре за реакције супституције комплекса **1.1** на pH 7,2 (25 mM HEPES, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>

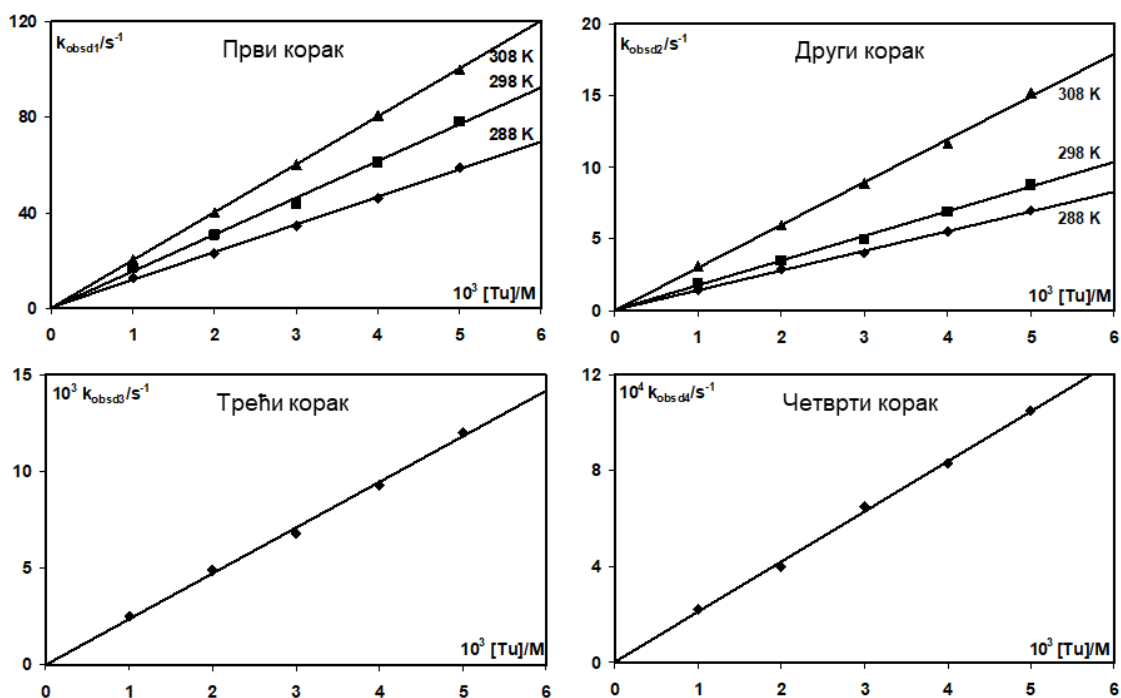


Слика 21. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације L-Cys и температуре за реакције супституције комплекса **1.1** на pH 7,2 (25 mM HEPES, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>

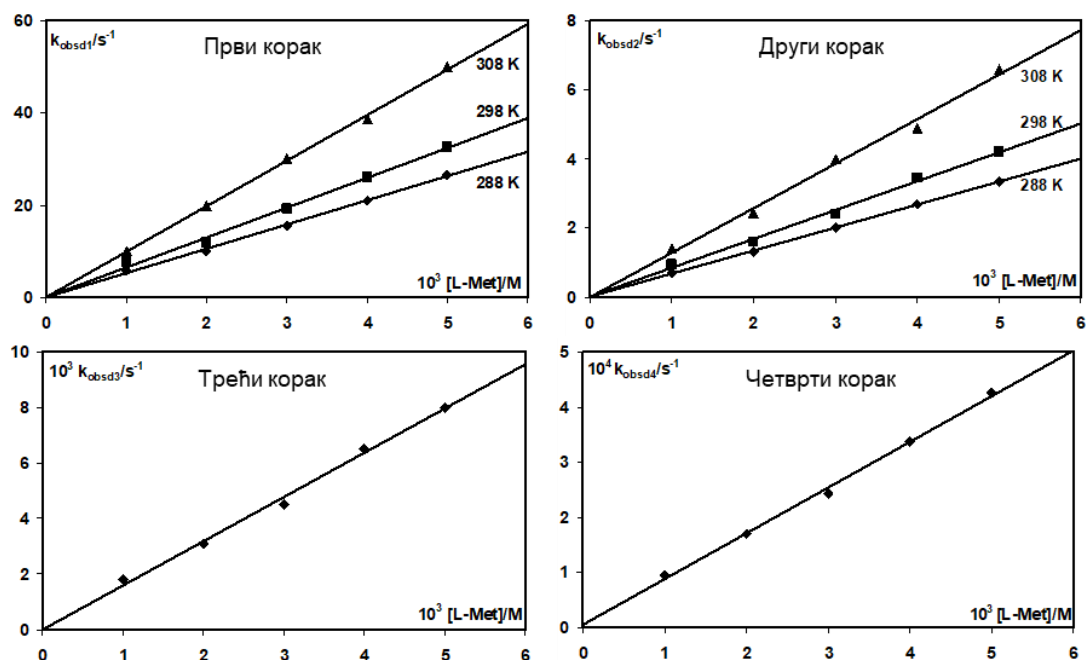




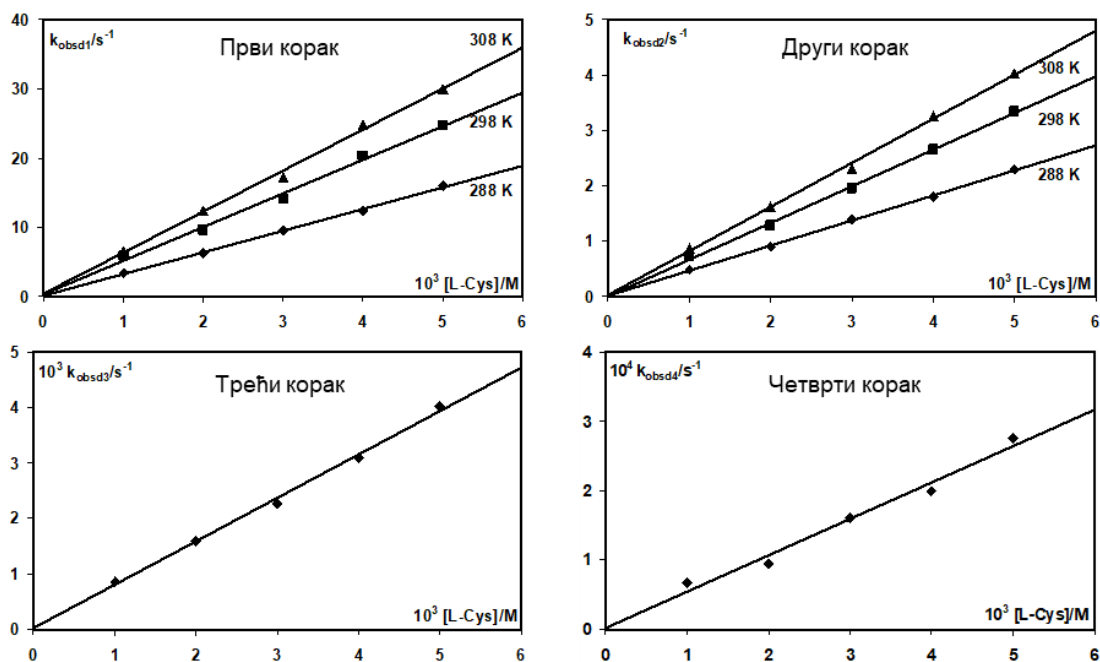
Слика 22. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације нуклеофила (L-His и 5'-GMP) и температуре за реакције супституције комплекса **1.1** на рН 7,2 (25 mM HEPES, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



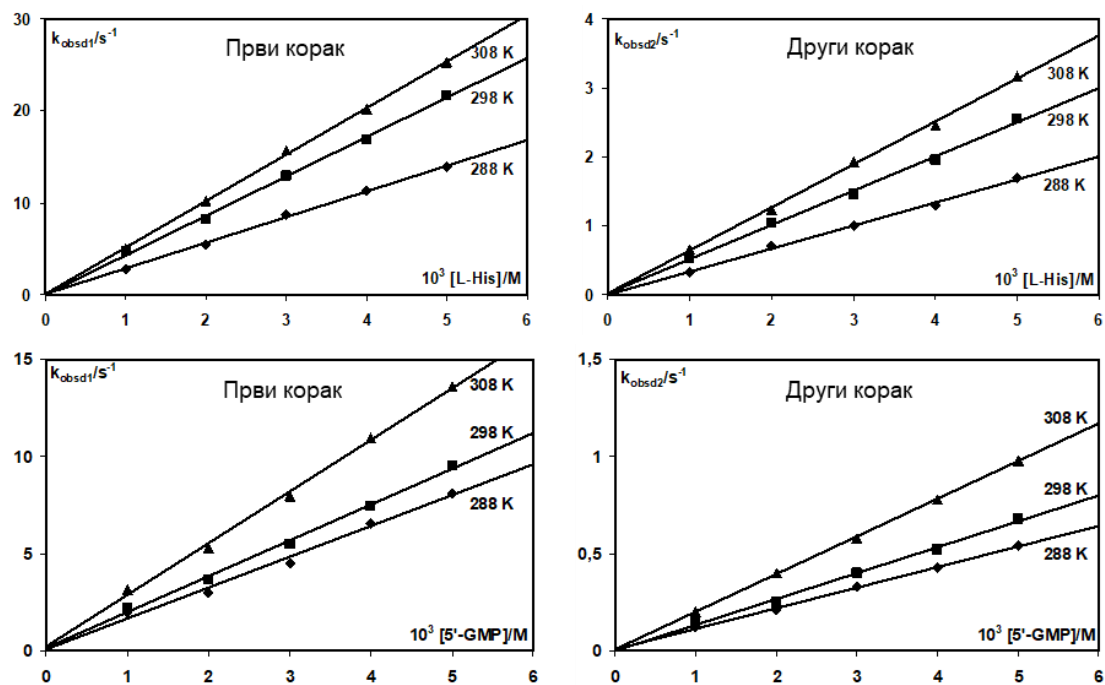
Слика 23. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације Ту и температуре за реакције супституције комплекса **1.2** на рН 7,2 (25 mM HEPES, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



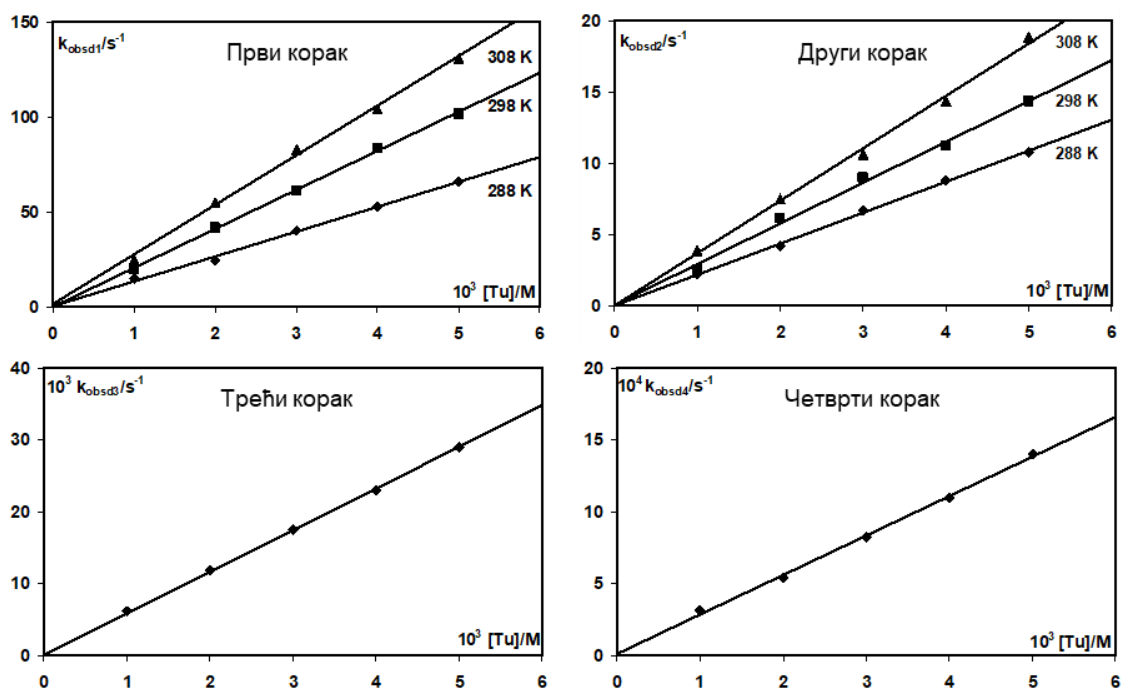
Слика 24. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације L-Met и температуре за реакције супституције комплекса **1.2** на pH 7,2 (25 mM Hepes, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



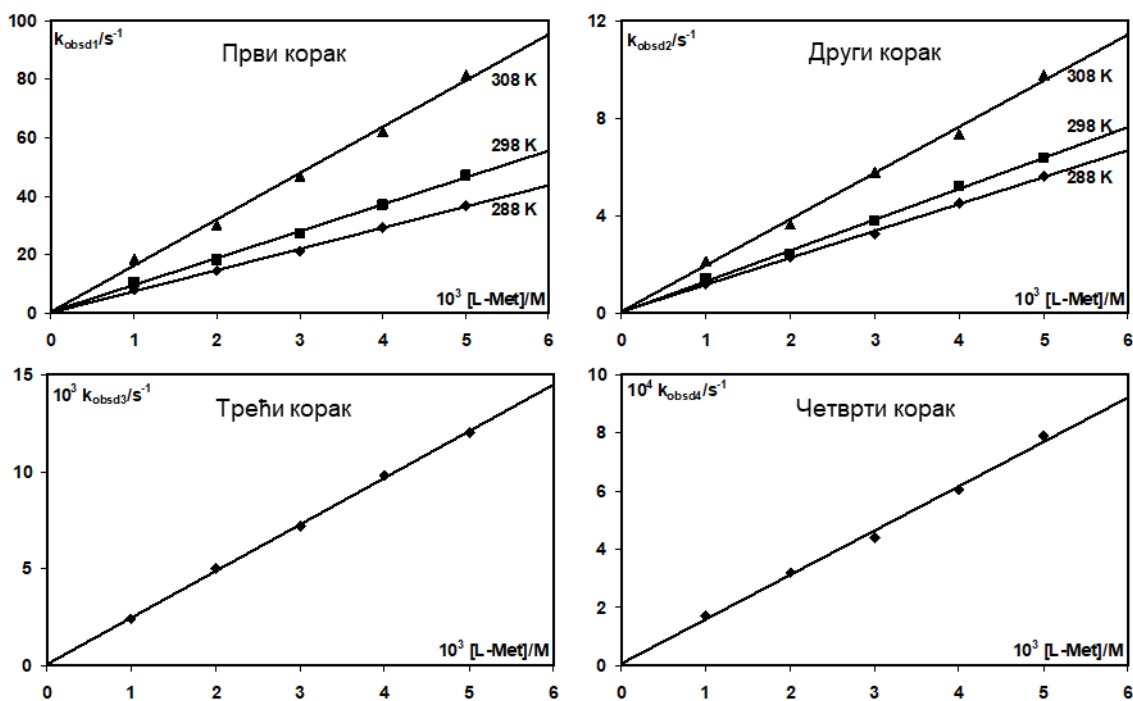
Слика 25. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације L-Cys и температуре за реакције супституције комплекса **1.2** на pH 7,2 (25 mM Hepes, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



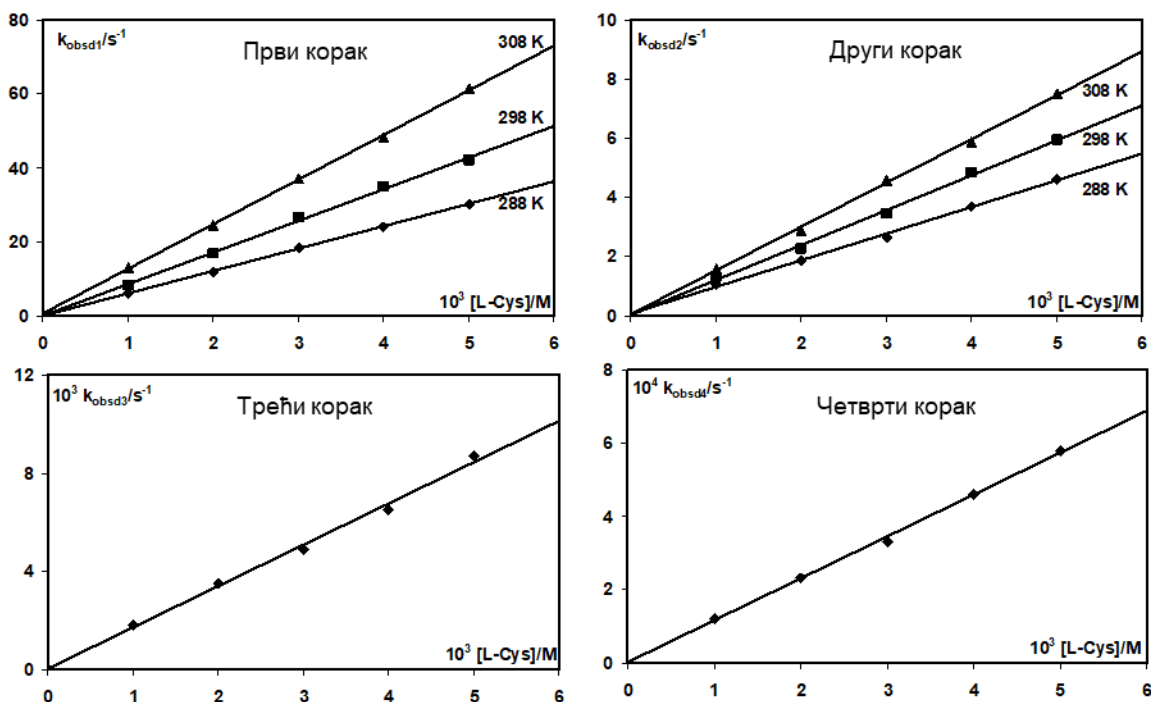
Слика 26. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације нуклеофила (L-His и 5'-GMP) и температуре за реакције супституције комплекса **1.2** на рН 7,2 (25 mM HEPES, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



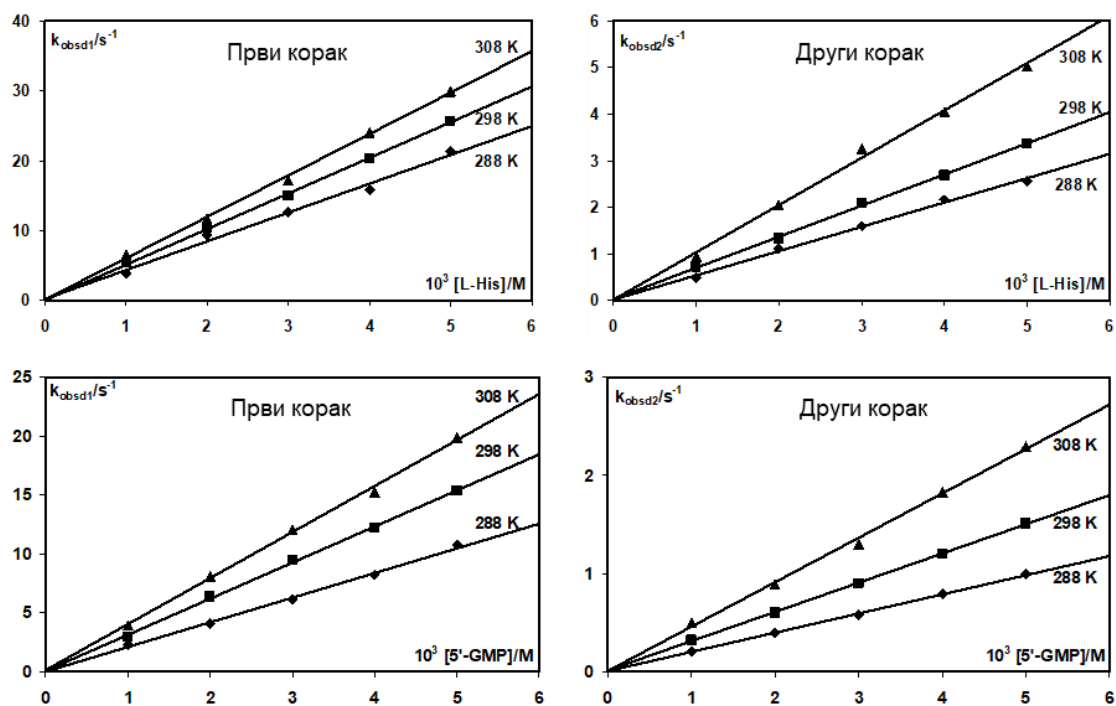
Слика 27. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације Ту и температуре за реакције супституције комплекса **1.3** на рН 7,2 (25 mM HEPES, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



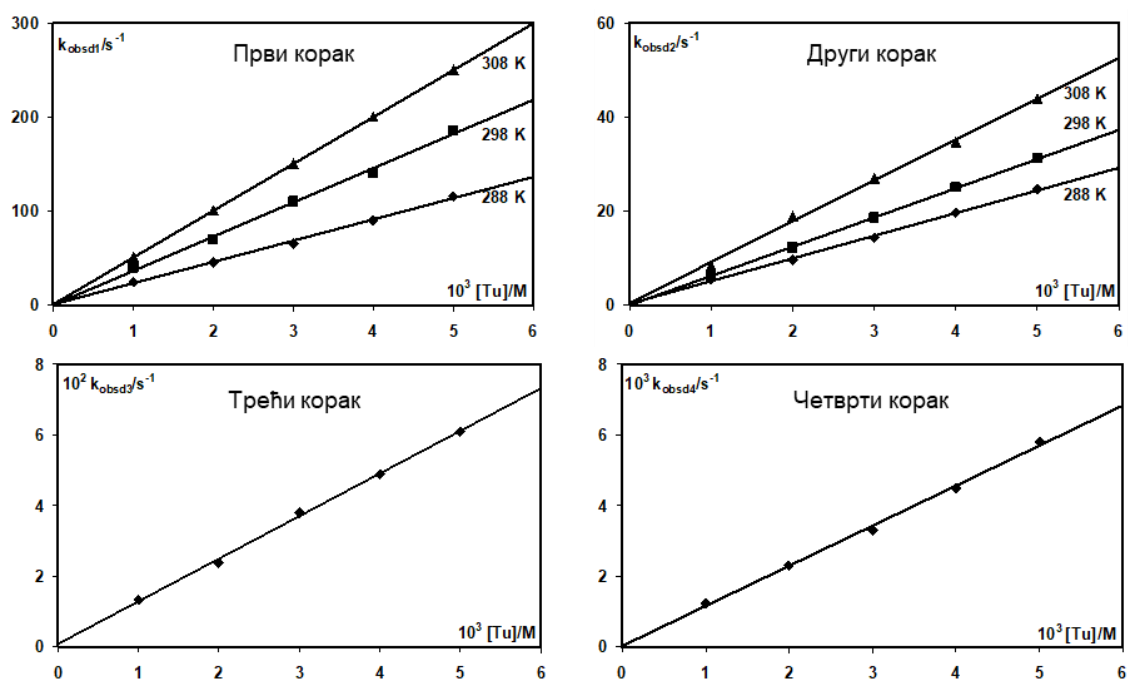
Слика 28. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације L-Met и температуре за реакције супституције комплекса **1.3** на pH 7,2 (25 mM Hepes, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



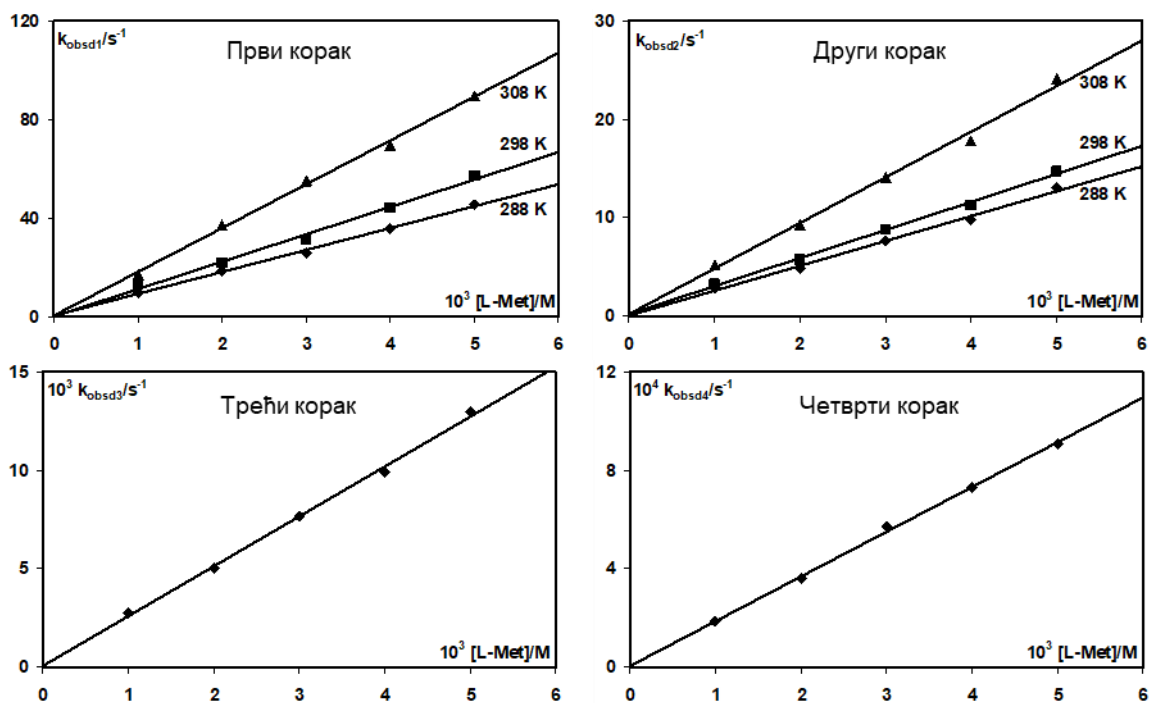
Слика 29. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације L-Cys и температуре за реакције супституције комплекса **1.3** на pH 7,2 (25 mM Hepes, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



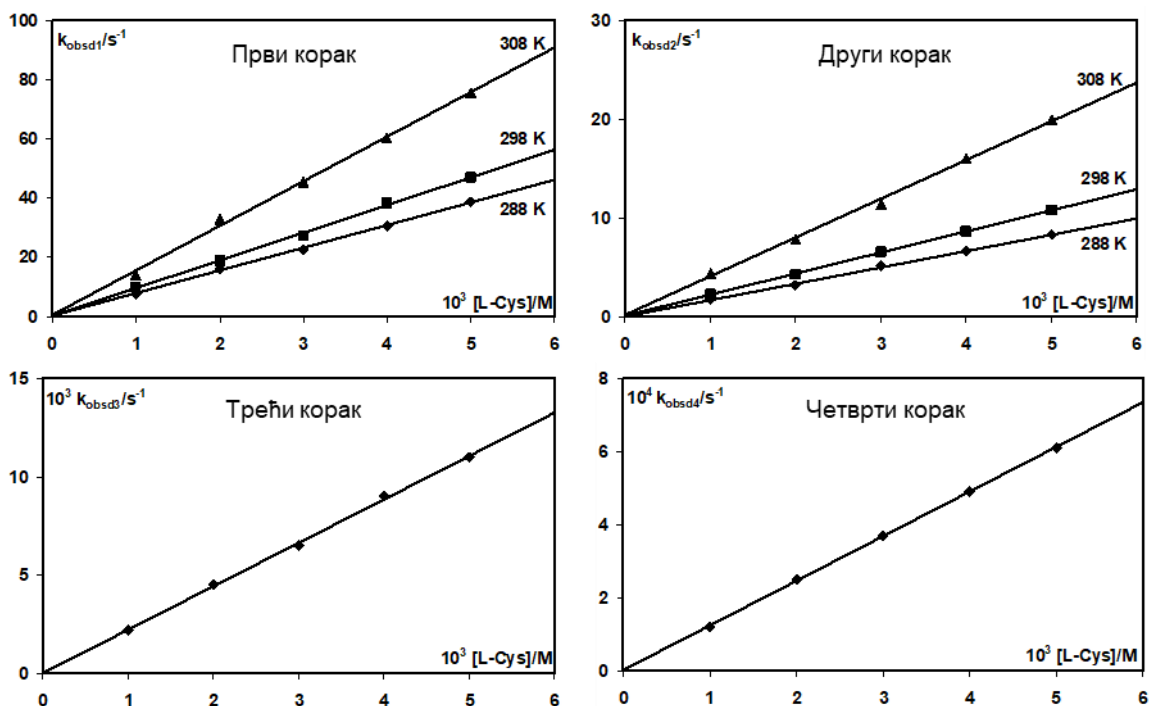
Слика 30. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације нуклеофила (L-His и 5'-GMP), и температуре за реакције супституције комплекса **1.3** на рН 7,2 (25 mM Нерес, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



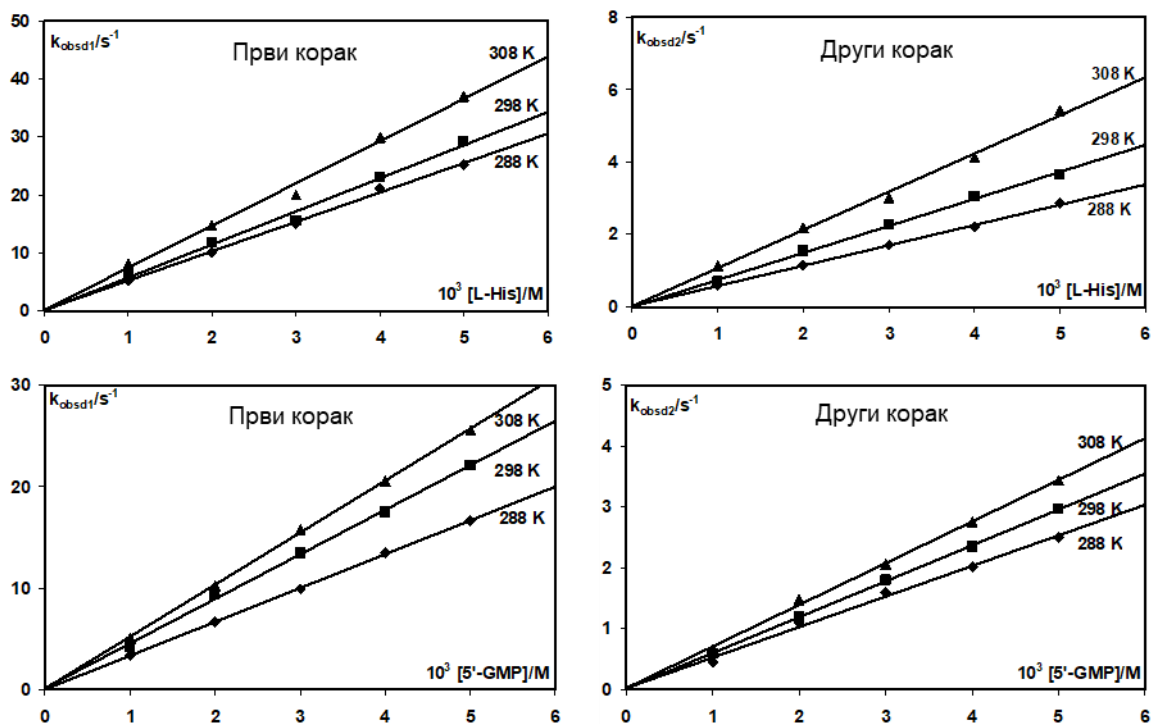
Слика 31. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације Tu и температуре за реакције супституције комплекса **1.4** на рН 7,2 (25 mM Нерес, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



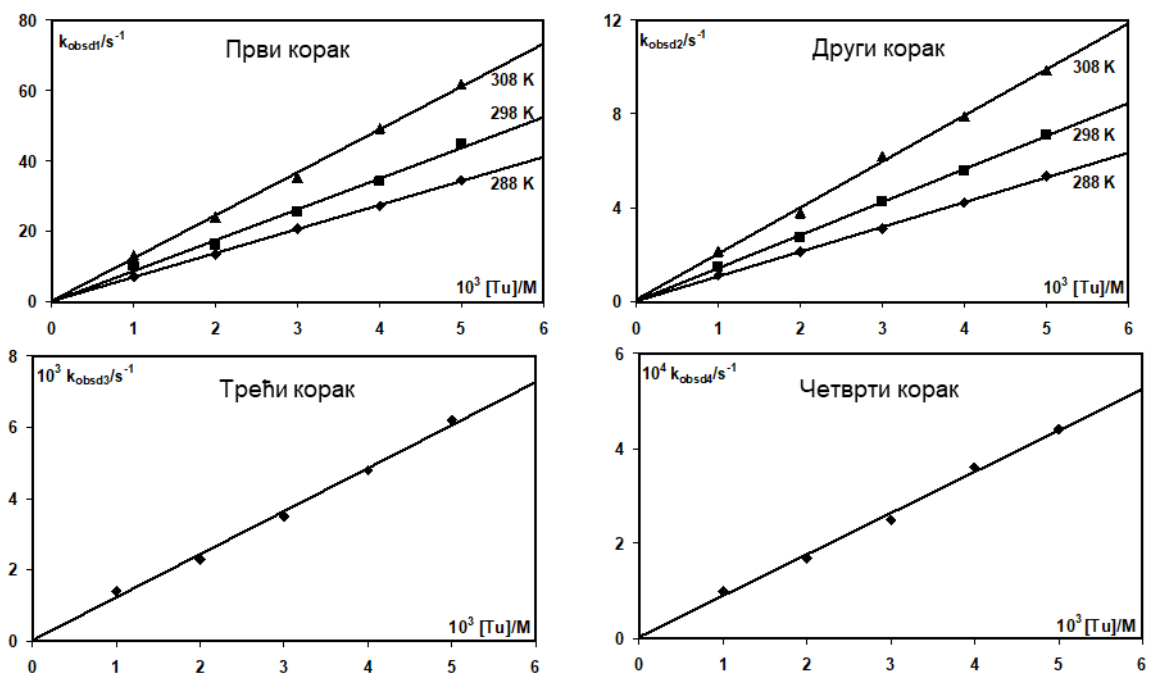
Слика 32. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације L-Met и температуре за реакције супституције комплекса **1.4** на рН 7,2 (25 mM HEPES, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



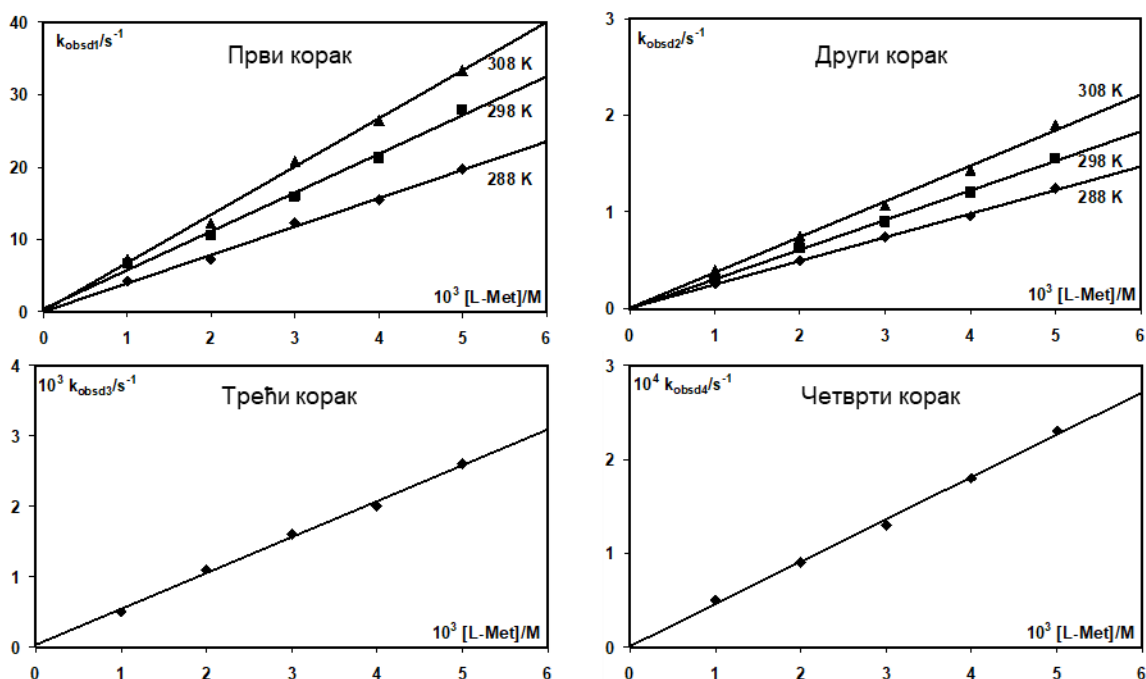
Слика 33. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације L-Cys и температуре за реакције супституције комплекса **1.4** на рН 7,2 (25 mM HEPES, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



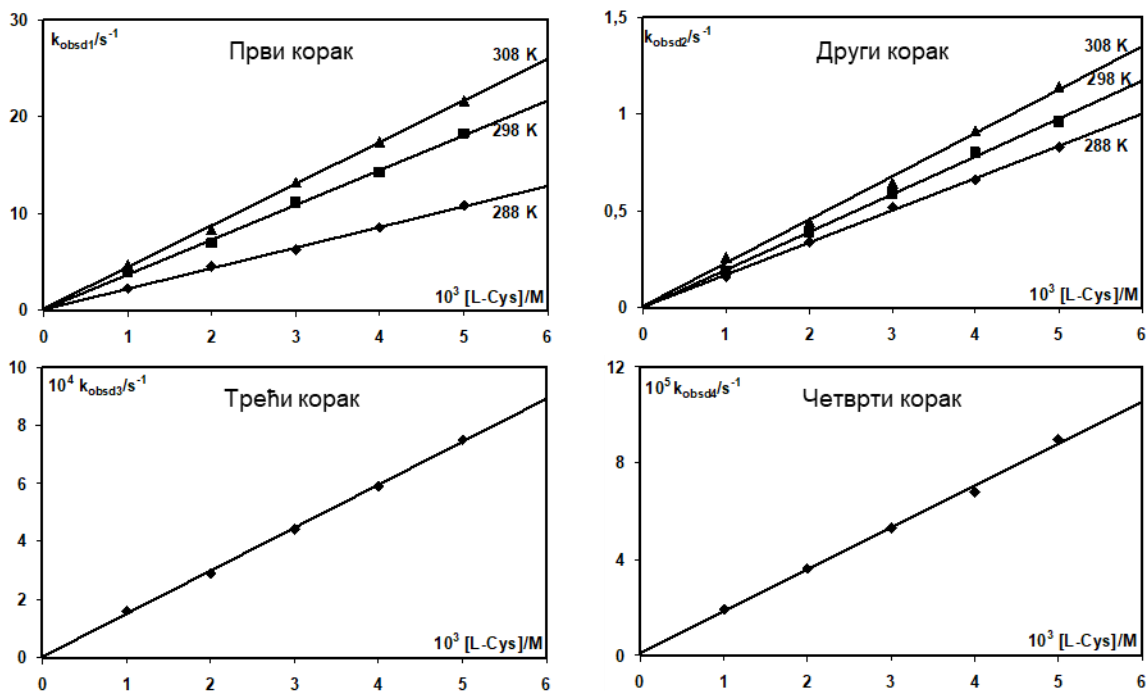
Слика 34. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације нуклеофила (L-His и 5'-GMP) и температуре за реакције супституције комплекса **1.4** на рН 7,2 (25 mM HEPES, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



Слика 35. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације Ту и температуре за реакције супституције комплекса **1.5** на рН 7,2 (25 mM HEPES, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>

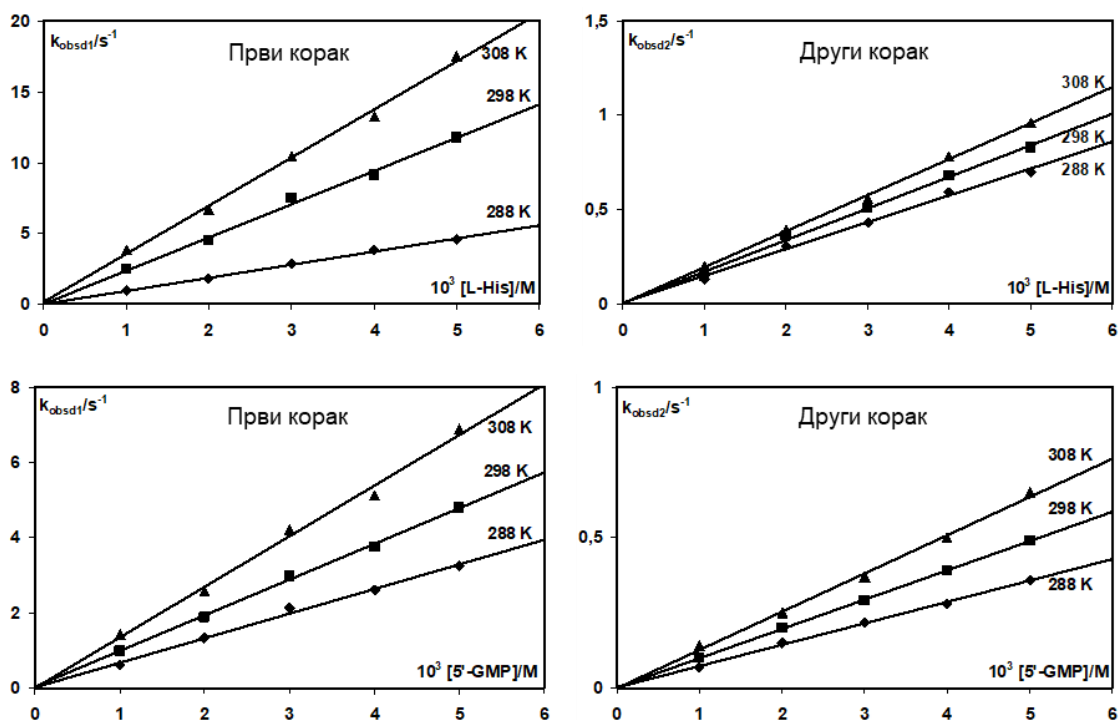


Слика 36. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације L-Met и температуре за реакције супституције комплекса **1.5** на pH 7,2 (25 mM Hepes, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>

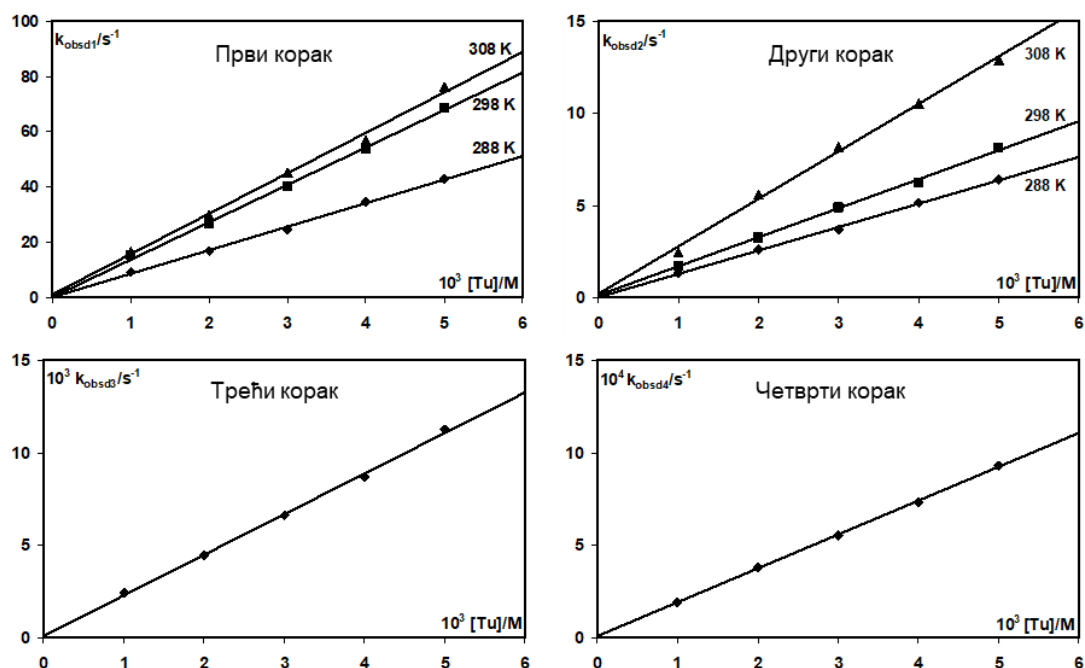


Слика 37. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације L-Cys и температуре за реакције супституције комплекса **1.5** на pH 7,2 (25 mM Hepes, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>

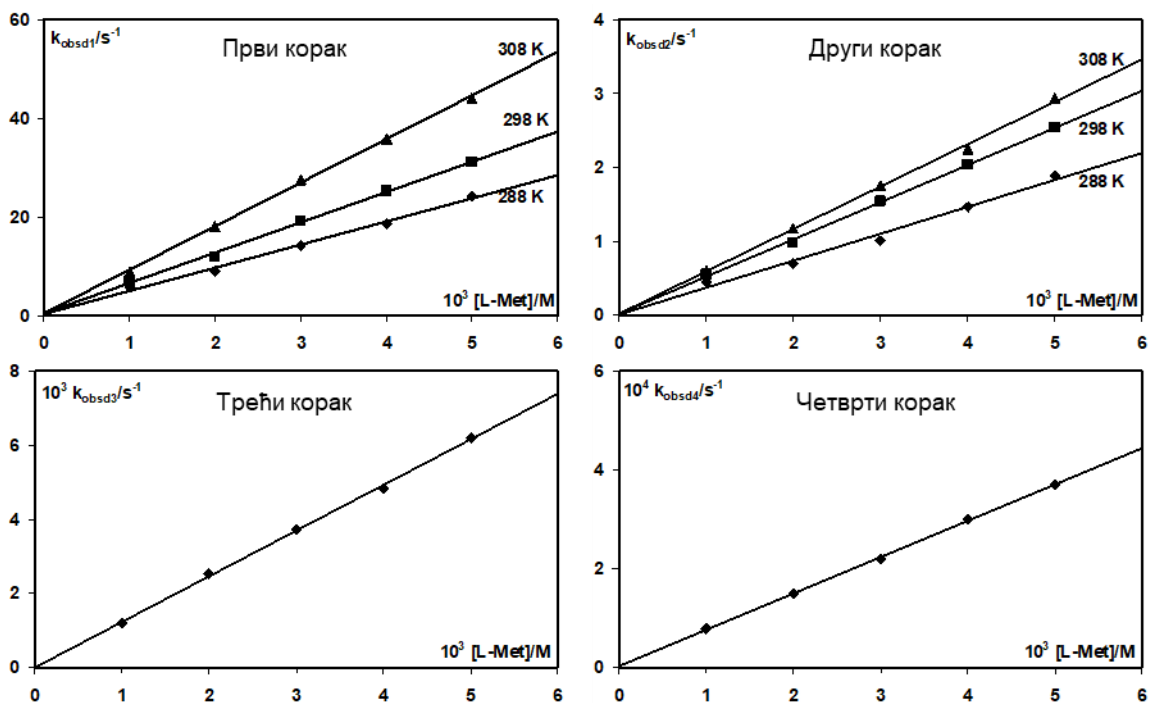




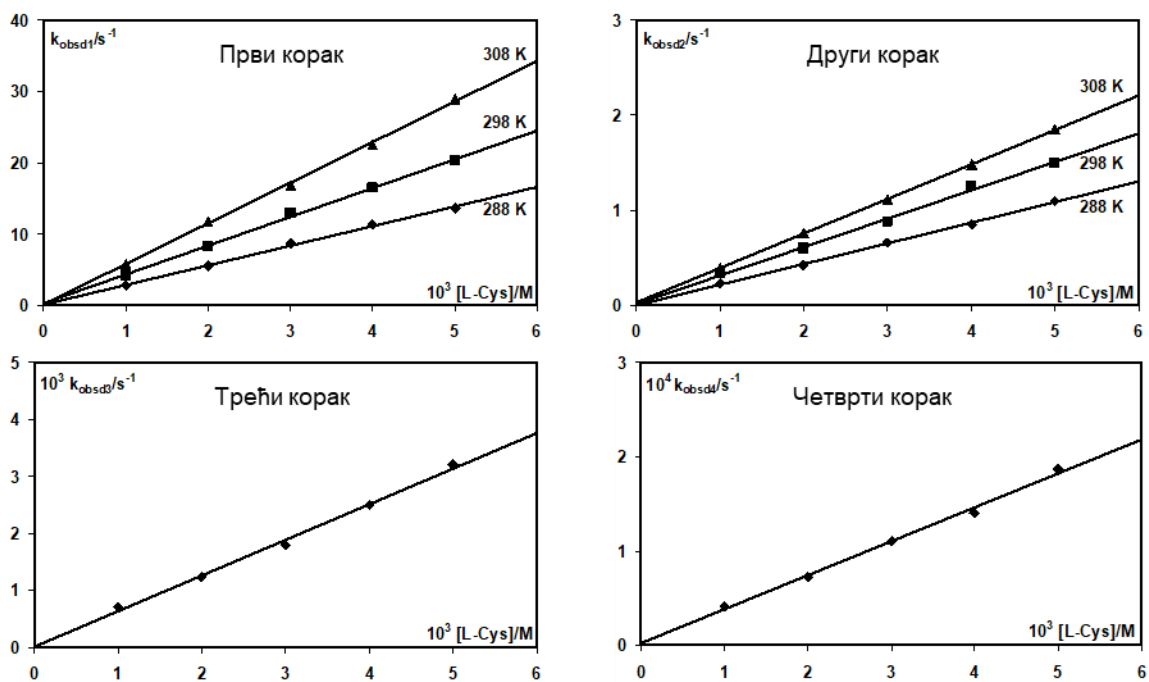
Слика 38. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације нуклеофила (L-His и 5'-GMP) и температуре за реакције супституције комплекса **1.5** на рН 7,2 (25 mM HEPES, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



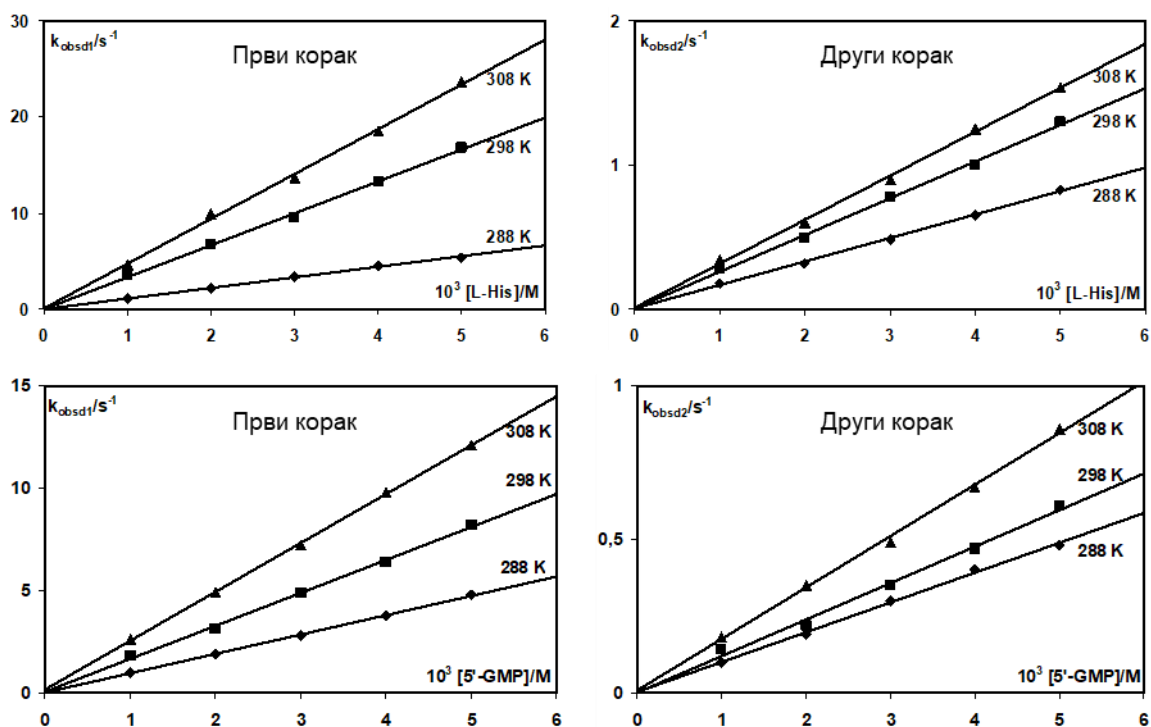
Слика 39. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације Ту и температуре за реакције супституције комплекса **1.6** на рН 7,2 (25 mM HEPES, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



Слика 40. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације L-Met и температуре за реакције супституције комплекса **1.6** на pH 7,2 (25 mM Hepes, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



Слика 41. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације L-Cys и температуре за реакције супституције комплекса **1.6** на pH 7,2 (25 mM Hepes, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>



Слика 42. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације нуклеофила (L-His и 5'-GMP) и температуре за реакције супституције комплекса **1.6** на рН 7,2 (25 mM Hepes, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>

Константе брзине реакције другог реда израчунате су применом једначине (10), а вредности су сумиране у Табели 6.

Табели 6. Константе брзине реакције другог реда за процесе супституције комплекса **1.1-1.6** са нуклеофилима Tu, L-Met, L-Cys, L-His и 5'-GMP на pH 7,2 (25 mM Hepes, 40 mM NaCl).<sup>142</sup>

	T [K]	k <sub>1</sub> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	k <sub>2</sub> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	k <sub>3</sub> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	k <sub>4</sub> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
<b>Комплекс 1.1</b>					
Tu	288	33518 ± 500	13200 ± 300	-	-
	298	55100 ± 600	15300 ± 500	17,1 ± 0,3	2,38 ± 0,04
	308	69000 ± 500	17300 ± 500	-	-
L-Met	288	10500 ± 400	5000 ± 100	-	-
	298	12600 ± 300	5700 ± 100	3,57 ± 0,06	0,39 ± 0,01
	308	25800 ± 400	8800 ± 100	-	-
L-Cys	288	9200 ± 400	2700 ± 100	-	-
	298	11800 ± 300	4100 ± 100	2,82 ± 0,03	0,23 ± 0,01
	308	17800 ± 300	7400 ± 200	-	-
L-His	288	6080 ± 50	1090 ± 70	-	-
	298	7900 ± 200	1530 ± 40	-	-
	308	10600 ± 400	3360 ± 40	-	-
5'-GMP	288	3960 ± 50	790 ± 30	-	-
	298	5900 ± 300	1170 ± 40	-	-
	308	6440 ± 50	1330 ± 40	-	-
<b>Комплекс 1.2</b>					
Tu	288	11600 ± 300	1380 ± 30	-	-
	298	15300 ± 500	1720 ± 60	2,34 ± 0,07	0,209 ± 0,005
	308	20000 ± 100	2980 ± 70	-	-
L-Met	288	5200 ± 200	664 ± 7	-	-
	298	6400 ± 300	840 ± 40	1,58 ± 0,07	0,083 ± 0,003
	308	9900 ± 200	1280 ± 7	-	-
L-Cys	288	3130 ± 90	454 ± 7	-	-
	298	4900 ± 200	660 ± 10	0,78 ± 0,03	0,052 ± 0,004
	308	5900 ± 200	800 ± 20	-	-
L-His	288	2800 ± 70	330 ± 10	-	-
	298	4300 ± 100	490 ± 20	-	-
	308	5060 ± 90	620 ± 20	-	-
5'-GMP	288	1600 ± 100	106 ± 2	-	-

	298	1850 ± 70	133 ± 5	-	-
	308	2660 ± 90	194 ± 2	-	-
<b>Комплекс 1.3</b>					
	288	13100 ± 500	2470 ± 50	-	-
Tu	298	20500 ± 300	2900 ± 100	5,69 ± 0,04	0,274 ± 0,007
	308	2600 ± 800	3700 ± 100	-	-
	288	7200 ± 300	1100 ± 30	-	-
L-Met	298	9200 ± 300	1260 ± 40	2,40 ± 0,04	0,152 ± 0,007
	308	15800 ± 700	1900 ± 80	-	-
	288	6030 ± 50	900 ± 30	-	-
L-Cys	298	8600 ± 300	1180 ± 40	1,68 ± 0,07	0,114 ± 0,003
	308	1200 ± 200	1480 ± 40	-	-
	288	4100 ± 300	520 ± 20	-	-
L-His	298	5050 ± 70	670 ± 10	-	-
	308	5900 ± 200	1010 ± 40	-	-
	288	2090 ± 80	195 ± 3	-	-
5'-GMP	298	3070 ± 70	298 ± 3	-	-
	308	3900 ± 100	450 ± 10	-	-
<b>Комплекс 1.4</b>					
	288	22600 ± 700	4800 ± 100	-	-
Tu	298	36200 ± 1000	6210 ± 60	12,1 ± 0,3	1,13 ± 0,03
	308	49740 ± 60	8700 ± 200	-	-
	288	8900 ± 300	2500 ± 100	-	-
L-Met	298	11100 ± 600	2840 ± 90	2,53 ± 0,09	0,18 ± 0,04
	308	17700 ± 600	4600 ± 200	-	-
	288	7600 ± 200	1650 ± 30	-	-
L-Cys	298	9400 ± 200	2140 ± 30	2,21 ± 0,04	0,122 ± 0,005
	308	15000 ± 500	3900 ± 100	-	-
	288	5100 ± 100	560 ± 10	-	-
L-His	298	5700 ± 300	740 ± 20	-	-
	308	7300 ± 400	1050 ± 40	-	-
	288	3330 ± 30	500 ± 20	-	-
5'-GMP	298	4400 ± 100	589 ± 6	-	-
	308	5130 ± 70	690 ± 20	-	-

<b>Комплекс 1.5</b>					
	288	6800 ± 90	1050 ± 30	-	-
Tu	298	8700 ± 400	1410 ± 20	1,21 ± 0,06	0,087 ± 0,004
	308	12200 ± 400	1960 ± 60	-	-
	288	3900 ± 100	244 ± 6	-	-
L-Met	298	5300 ± 300	305 ± 7	0,51 ± 0,02	0,045 ± 0,002
	308	6600 ± 300	370 ± 10	-	-
	288	2130 ± 60	166 ± 4	-	-
L-Cys	298	3600 ± 100	195 ± 5	0,148 ± 0,003	0,017 ± 0,001
	308	4300 ± 100	220 ± 10	-	-
	288	920 ± 30	142 ± 6	-	-
L-His	298	2300 ± 100	168 ± 6	-	-
	308	3400 ± 100	191 ± 4	-	-
	288	650 ± 30	71 ± 2	-	-
5'-GMP	298	950 ± 20	97 ± 1	-	-
	308	1350 ± 70	127 ± 4	-	-
<b>Комплекс 1.6</b>					
	288	8500 ± 200	1270 ± 30	-	-
Tu	298	13400 ± 300	1580 ± 40	2,19 ± 0,05	0,183 ± 0,003
	308	14700 ± 600	2580 ± 90	-	-
	288	4700 ± 200	360 ± 20	-	-
L-Met	298	6200 ± 200	510 ± 10	1,23 ± 0,02	0,073 ± 0,001
	308	8800 ± 200	570 ± 10	-	-
	288	2750 ± 90	217 ± 6	-	-
L-Cys	298	4100 ± 100	290 ± 10	0,62 ± 0,02	0,036 ± 0,002
	308	5700 ± 100	364 ± 2	-	-
	288	1100 ± 40	160 ± 4	-	-
L-His	298	3300 ± 100	255 ± 8	-	-
	308	4700 ± 100	305 ± 8	-	-
	288	940 ± 10	97 ± 3	-	-
5'-GMP	298	1610 ± 50	119 ± 6	-	-
	308	2400 ± 30	168 ± 5	-	-

На основу резултата који су приказани у Табели 6, може се закључити да реактивност комплекса са пиразином као мостним лигандом опада у низу: **1.1 > 1.3 > 1.2.**

Овакав редослед реактивности доводи се у везу са особинама инертних лиганата (2,2'-bipy, en и dach). Наиме, познато је да  $\pi$ -акцепторске особине 2,2'-bipy лиганда повећавају електрофилност јона метала, што објашњава највећу реактивност **1.1** комплекса. Са друге стране,  $\sigma$ -донорски ефекат en лиганда у случају комплекса **1.3** повећава електронску густину на јону метала, што за последицу има смањену реактивност овог комплекса. Комплекс **1.2** је најмање реактиван, због израженог позитивног индуктивног ефекта циклохексановог прстена dach лиганда.<sup>174,175</sup> Још један разлог мање реактивности комплекса **1.2** у поређењу са комплексом **1.3** је свакако и већа волуминозност dach лиганда, тако да је нуклеофилима отежан прилаз јону метала у процесу супституције. Реактивност комплекса са 4,4'-bipy мостним лигандом опада у низу: **1.4** > **1.6** > **1.5**. Овакав редослед реактивности је такође у сагласности са електронским и структурним карактеристикама инертних лиганата, као што је објашњено у случају комплекса са пиразином. Поређењем реактивности комплекса који поседују исти инертни (2,2'-bipy, en и dach), а различит мостни лиганд, добијени су следећи резултати: **1.1** > **1.4**, **1.2** > **1.5** и **1.3** > **1.6**. Наиме, комплекси са пиразином као мостним лигандом су реактивнији у односу на комплексе са 4,4'-bipy лигандом. Ова карактеристика може се објаснити  $\pi$ -акцепторским особинама pz лиганда, услед кога се повећава електрофилност јона метала, а самим тим и реактивност комплекса.<sup>142</sup>

Реактивност нуклеофила у свим случајевима опада у низу: Tu > L-Met > L-Cys > L-His > 5'-GMP. Сумпор-донорски нуклеофили (Tu, L-Met и L-Cys) су показали значајно већу реактивност у односу на азот-донорске (L-His и 5'-GMP). Тиоуреа је најреактивнија, јер поседује особине тиолата, као  $\pi$ -донора, и особине тиоетра, као  $\sigma$ -донора и  $\pi$ -акцептора.<sup>176,177</sup> Такође, треба имати у виду да је тиоуреа и најмање волуминозан нуклеофил. Већа реактивност тиоетра (L-Met) у односу на тиол (L-Cys) објашњава се чињеницом да метил група на атому сумпора код L-Met повећава његову нуклеофилност преко позитивног индуктивног ефекта.<sup>171,173</sup> Према вредностима приказаним у Табели 6, L-His је око 2-3 пута реактивнији од нуклеотида 5'-GMP. Овакав редослед реактивности може се повезати са различитом волуминозношћу ових нуклеофила.

Активациони параметри  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  (Табела 7) израчунати су коришћењем Ејрингове једначине (2) за први и други корак супституције. Израчунате негативне вредности за  $\Delta S^\ddagger$  указују на асоцијативни механизам супституције за сваку од испитиваних реакција.

Табела 7. Активациони параметри  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  за супституционе реакције комплекса **1.1-1.6** са нуклеофилима Tu, L-Met, L-Cys, L-His и 5'-GMP.<sup>142</sup>

	$\Delta H_1^\ddagger$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S_1^\ddagger$ [J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta H_2^\ddagger$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S_2^\ddagger$ [J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]
<b>Комплекс 1.1</b>				
Tu	24 ± 3	-88 ± 9	8 ± 1	-155 ± 3
L-Met	31 ± 2	-78 ± 6	19 ± 3	-125 ± 9
L-Cys	19 ± 2	-115 ± 8	32 ± 3	-81 ± 9
L-His	19 ± 1	-124 ± 4	39 ± 3	-67 ± 9
5'-GMP	16 ± 2	-137 ± 6	17 ± 2	-144 ± 6

<b>Комплекс 1.2</b>				
Tu	18 ± 1	-121 ± 3	26 ± 7	-110 ± 20
L-Met	21 ± 6	-120 ± 20	21 ± 3	-131 ± 9
L-Cys	19 ± 2	-126 ± 6	16 ± 2	-151 ± 7
L-His	19 ± 3	-127 ± 9	21 ± 3	-140 ± 10
5'-GMP	16 ± 2	-142 ± 6	19 ± 3	-150 ± 10
<b>Комплекс 1.3</b>				
Tu	23 ± 3	-101 ± 9	17 ± 1	-137 ± 3
L-Met	26 ± 7	-90 ± 20	17 ± 3	-141 ± 9
L-Cys	21 ± 1	-114 ± 3	15 ± 1	-152 ± 3
L-His	11 ± 1	-152 ± 3	22 ± 2	-132 ± 7
5'-GMP	21 ± 3	-125 ± 9	29 ± 1	-117 ± 3
<b>Комплекс 1.4</b>				
Tu	27 ± 3	-84 ± 9	19 ± 2	-123 ± 7
L-Met	23 ± 6	-110 ± 20	19 ± 3	-127 ± 9
L-Cys	21 ± 3	-114 ± 9	27 ± 6	-110 ± 20
L-His	11 ± 1	-152 ± 3	21 ± 2	-136 ± 6
5'-GMP	14 ± 2	-145 ± 7	9 ± 1	-177 ± 3
<b>Комплекс 1.5</b>				
Tu	19 ± 2	-121 ± 6	19 ± 2	-123 ± 7
L-Met	17 ± 2	-131 ± 6	13 ± 1	-171 ± 3
L-Cys	21 ± 7	-120 ± 20	8 ± 1	-191 ± 3
L-His	45 ± 1	-43 ± 3	8 ± 1	-189 ± 3
5'-GMP	24 ± 1	-121 ± 3	19 ± 1	-159 ± 3
<b>Комплекс 1.6</b>				
Tu	18 ± 2	-122 ± 6	23 ± 3	-199 ± 9
L-Met	21 ± 2	-117 ± 6	15 ± 3	-161 ± 9
L-Cys	22 ± 1	-117 ± 3	15 ± 3	-163 ± 9
L-His	51 ± 2	-22 ± 6	21 ± 3	-150 ± 10
5'-GMP	32 ± 2	-92 ± 7	17 ± 3	-161 ± 9

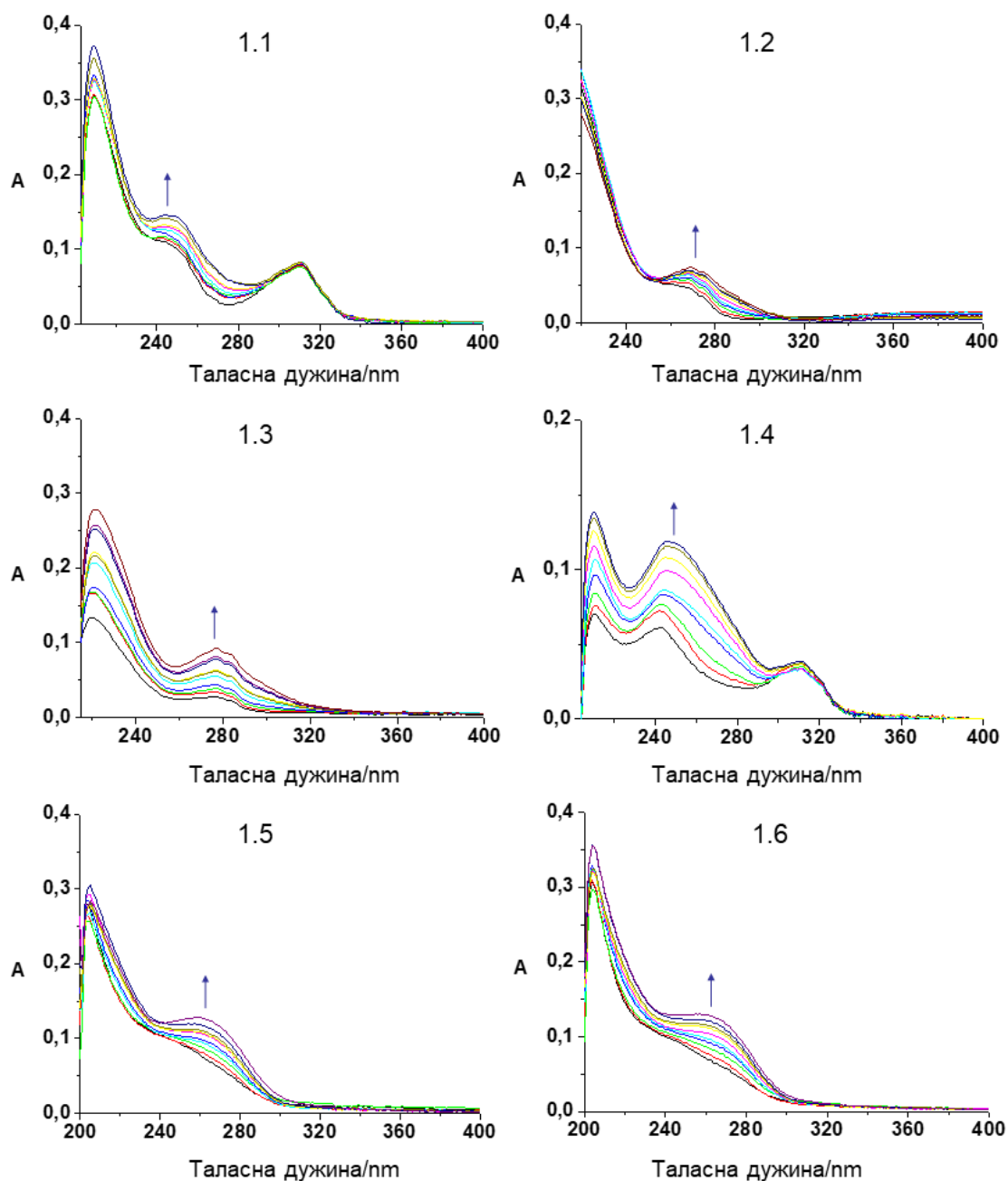
Познато је да комплекси Pd(II) реагују  $10^4$ - $10^5$  пута брже од одговарајућих Pt(II) комплекса. Динуклеарни комплекси показују слично понашање што се тиче реактивности. На пример, комплекси **1.2** и **1.3** реагују  $\sim 4 \times 10^3$  пута брже у односу на њихове Pt(II) аналоге у реакцији са L-His.<sup>142</sup> У реакцији са 5'-GMP овај однос је већи и



креће се у опсегу од  $8 \times 10^3 - 1,2 \times 10^5$ .<sup>178</sup> Међутим, упоређивањем вредности за константе брзине реакције супституције комплекса **1.3** са L-His и 5'-GMP са вредностима добијеним за одговарајући хетеро-динуклеаран Pd(II)- Pt(II) комплекс, тај однос је око 4 пута мањи.<sup>171</sup> Узимајући у обзир све наведено, може се закључити да присуство Pt(II) јона у структури динуклеарног система значајно смањује реактивност комплекса.

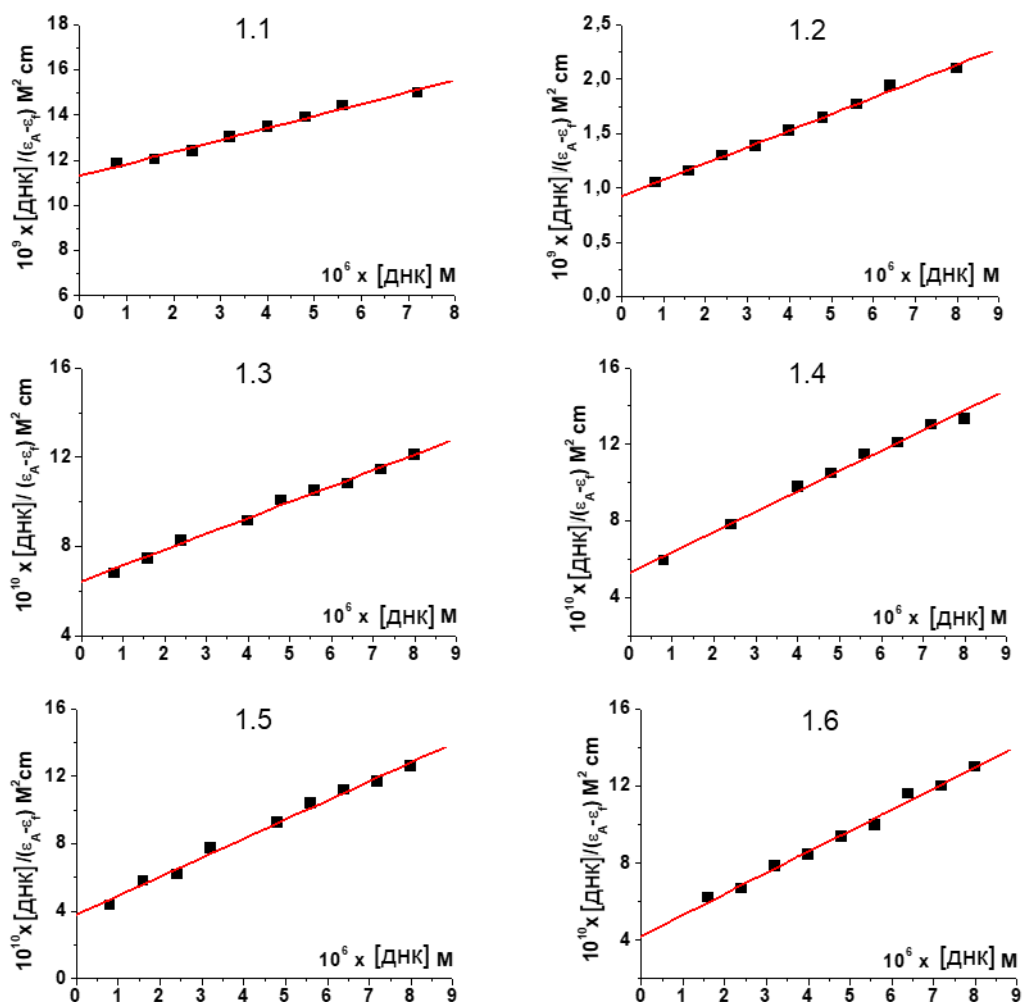
### **3.1.3) Испитивање интеракција комплекса 1.1-1.6 са ДНК апсорпционом методом**

Пошто ДНК представља потенцијалну биолошку мету за многе антиканцерогене агенсе на бази јона метала, важно је испитати начин везивања комплекса са ДНК молекулом. Електронска апсорпциона спектроскопија једна је од метода за одређивање начина и обима везивања комплекса са ДНК. Комплекси јона прелазних метала могу се везати за ДНК путем ковалентних (супституција лабилног лиганда у структури комплекса азот-донорском базом из молекула ДНК, нпр. преко N7 атома гуанина) и/или нековалентних (интеркалација, електростатичко везивање или везивање за мали жљеб) интеракција.<sup>179</sup> У принципу, интензитет апсорпције раствора ДНК у присуству комплекса може се смањити (хипохромизам) или повећати (хиперхромизам), уз повећање апсорпционе таласне дужине (батохромизам). Апсорпциони спектри комплекса **1.1-1.6** у одсуству и присуству ДНК приказани су на Слици 43.



Слика 43. Апсорпциони спектри комплекса **1.1-1.6** у PBS пуферу након додатка ДНК.  $[\text{комплекс}] = 8 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $[\text{ДНК}] = (0-8) \times 10^{-6} \text{ M}$ . Стрелица показује промену апсорбанце након додатка растуће концентрације ДНК.<sup>142</sup>

Додавање растуће концентрације ДНК раствору испитиваних комплекса узрокује значајан хиперхромни ефекат. Ова појава указује на јаке интеракције између испитиваних комплекса и ДНК молекула, највероватније преко спољних контаката.<sup>180,181</sup> Константе везивања комплекса са ДНК молекулом ( $K_b$ ), добијене применом једначине (11), сумиране су у Табели 8. Линеарна зависност, добијена на основу Волф-Шимерове једначине, приказана је на Слици 44.



Слика 44. Линеарна зависност  $[\text{ДНК}]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$  у односу на  $[\text{ДНК}]$  за испитиване комплексе **1.1-1.6**.<sup>142</sup>

Табела 8. Константе везивања ( $K_b$ ) и Стерн-Волмерове константе ( $K_{SV}$ ) за комплексе **1.1-1.6** са ДНК.<sup>142</sup>

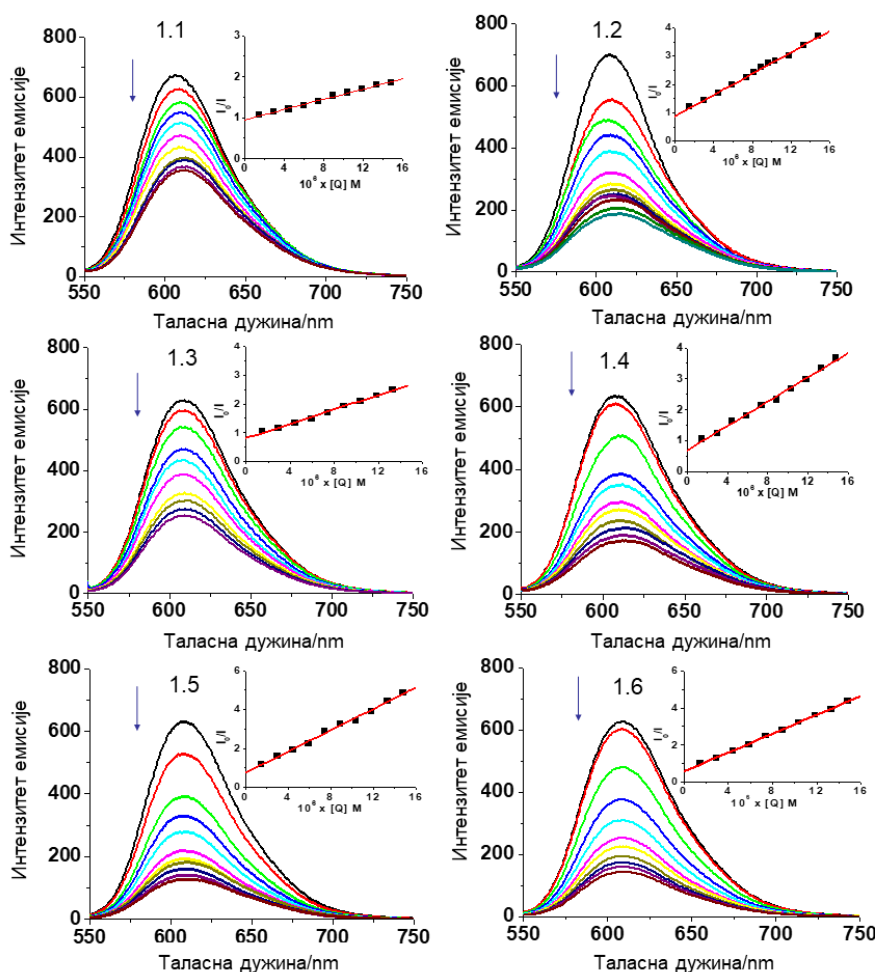
Комплекс	$K_b$ [M <sup>-1</sup> ]	$K_{SV}$ [M <sup>-1</sup> ]
<b>1.1</b>	$(4,8 \pm 0,2) \times 10^4$	$(6,3 \pm 0,3) \times 10^4$
<b>1.2</b>	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^5$	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^5$
<b>1.3</b>	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^5$
<b>1.4</b>	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^5$	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^5$
<b>1.5</b>	$(2,9 \pm 0,1) \times 10^5$	$(2,7 \pm 0,1) \times 10^5$
<b>1.6</b>	$(2,6 \pm 0,2) \times 10^5$	$(2,5 \pm 0,1) \times 10^5$

Израчунате вредности за  $K_b$  указују на јако везивање комплекса **1.1-1.6** са ДНК. Генерално, за комплекс **1.5** добијена је највећа вредност за  $K_b$ . Додатно, у поређењу са

$K_b$  вредношћу класичног интеркалатора етидијум-бромида ( $K_b = (1,23 \pm 0,07) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ )<sup>182</sup>, за комплексе **1.2**, **1.4**, **1.5** и **1.6** су добијене веће вредности за константе везивања. Ови резултати указују да испитивани комплекси имају способност да истисну етидијум-бромид претходно интеркалиран у ДНК базе парове, тј. да поред осталих начина интеракције са ДНК молекулом показују и способност за интеркалацију.

### 3.1.4) Испитивање интеракција комплекса 1.1-1.6 са ДНК емисионом методом

Етидијум-бромид (ЕВ) представља једињење које интеркалирано у базе парове ДНК молекула испољава значајан интензитет флуоресцентне емисије. ДНК-индукована ЕВ флуоресцентна емисија може се значајно смањити додатком комплекса способног да награди јаке интеркалационе везе са ДНК молекулом, замењујући ЕВ.<sup>183</sup> Смањење флуоресценције у ЕВ-ДНК систему у присуству комплекса **1.1-1.6** приказано је на Слици 45.



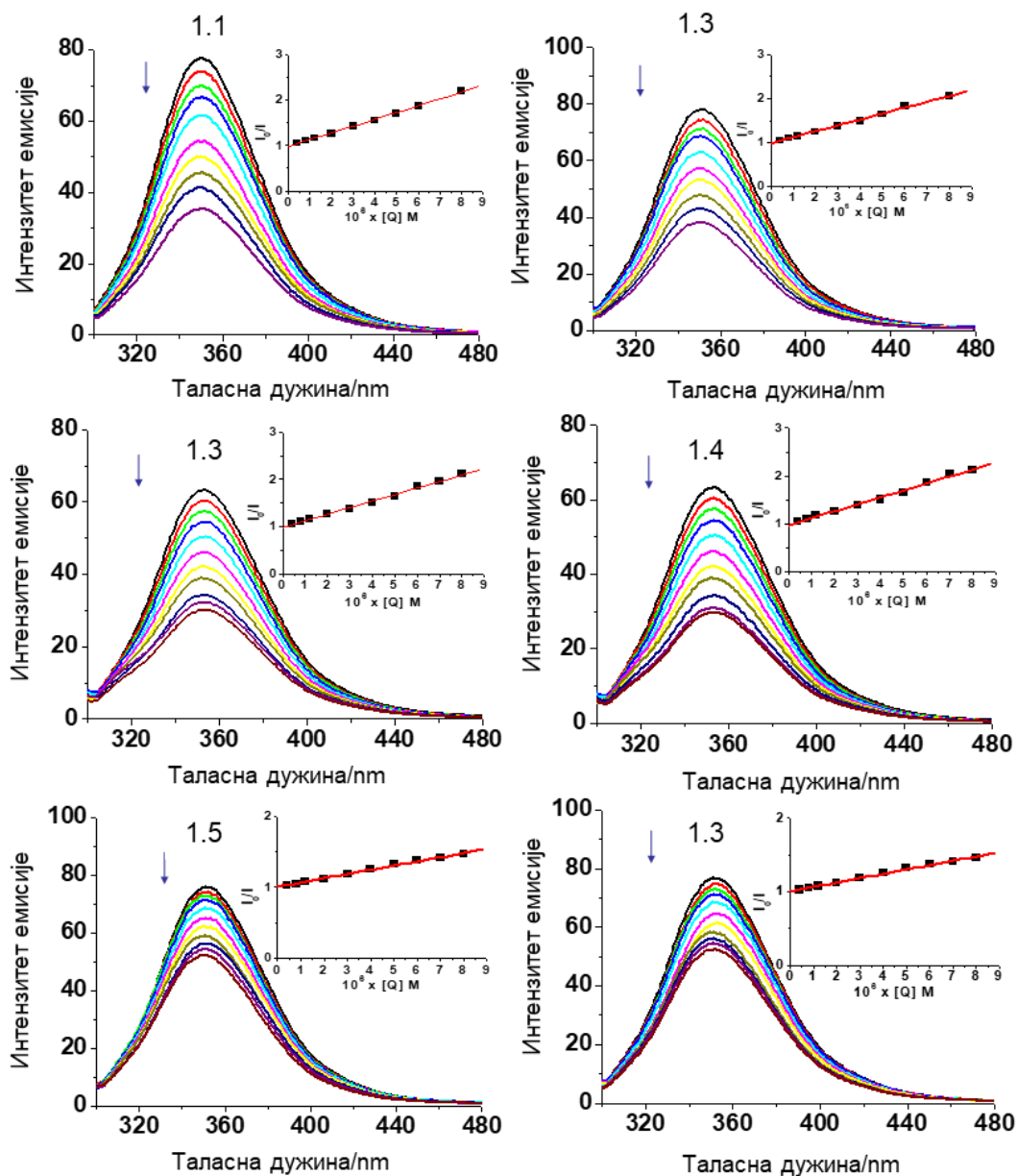
Слика 45. Емисиони спектри ЕВ везаног за ДНК у присуству комплекса **1.1-1.6**;  $[ЕВ] = 14,8 \mu\text{M}$ ,  $[ДНК] = 14,8 \mu\text{M}$ ,  $[\text{комплекс}] = 0-14,8 \mu\text{M}$ ,  $\lambda_{ex} = 527 \text{ nm}$ . Стрелице указују на промену интензитета емисије након додатка растуће концентрације комплекса  $[Q]$ . Уметнути график:  $I_0/I$  у односу на  $[Q]$ .<sup>142</sup>

Са повећањем концентрације комплекса у свим изучаваним системима дошло је до значајног смањења интензитета емисије на 612 nm, што указује на отпуштање EB из EB-ДНК система, односно замену са одговарајућим комплексом.<sup>140,184</sup> Стерн-Волмерове константе ( $K_{SV}$ ), добијене применом једначине (12), сумиране су такође у Табели 8. Високе вредности за  $K_{SV}$  потврђују велику способност ових комплекса да замене EB и вежу се за ДНК молекулу. Редослед опадања вредности Стерн-Волмерових константи ( $K_{SV}$ ) је идентичан редоследу опадања вредности за константе везивања ( $K_b$ ): **1.5 > 1.6 > 1.4 > 1.2 > 1.3 > 1.1**. На основу ових резултата може се закључити да способност испитиваних комплекса да се вежу за ДНК молекулу зависи од њихове могућности да интеркалирају у ДНК хеликс. Генерално, динуклеарни комплекси са 4,4'-bipy мостним лигандом показали су се као бољи интеркалирајући агенси у поређењу са комплексима који садрже pz као мостни лиганд. Заједничко за обе серије динуклеарних комплекса је да су највеће вредности константи добијене у случају комплекса са dash инертним лигандом.

### 3.1.5) Испитивање интеракција комплекса 1.1-1.6 са BSA емисионом методом

Албумин има веома важну улогу у организму, пре свега у транспорту јона и молекула, регулацији осмотског притиска у крви, одржавању рН вредности крви и др. Такође, транспорт многих фармацеутских агенаса кроз телесни систем до места њиховог деловања остварује се помоћу ових протеина. Из тог разлога је изучавање интеракција комплексних једињења са албумином од великог значаја за разумевање њихове потенцијалне биодистрибуције, токсичности и механизма деловања.<sup>185</sup> Велика структурна сличност између BSA и хуманог серумског албумина (HSA), око 76%,<sup>186</sup> омогућава коришћење BSA као погодног модела у овим испитивањима. Оба протеина имају идентичну терцијалну структуру, састављену од три  $\alpha$ -хеликса (домена I, II, III), док је сваки домен подељен у под-домене А и Б. BSA протеин поседује две триптофанске јединице, Trp-134 и Trp-213, који су лоцирани у под-доменима IA и IIA, док HSA поседује само један триптофански остатак, Trp-213, присутан у IIA под домену.<sup>187,188</sup>

Раствор BSA показује интензивну флуоресцентну емисију на  $\lambda_{em,max} = 352$  nm, након екситације на 295 nm.<sup>189</sup> Испитивање интеракција комплекса јона прелазних метала са BSA заснива се управо на праћењу смањења интензитета флуоресценције на 352 nm. С тим у вези, резултати добијени током изучавања интеракција комплекса **1.1-1.6**, приказани на Слици 46, указују на успешно везивање сваког комплекса за протеин албумин.<sup>190</sup>



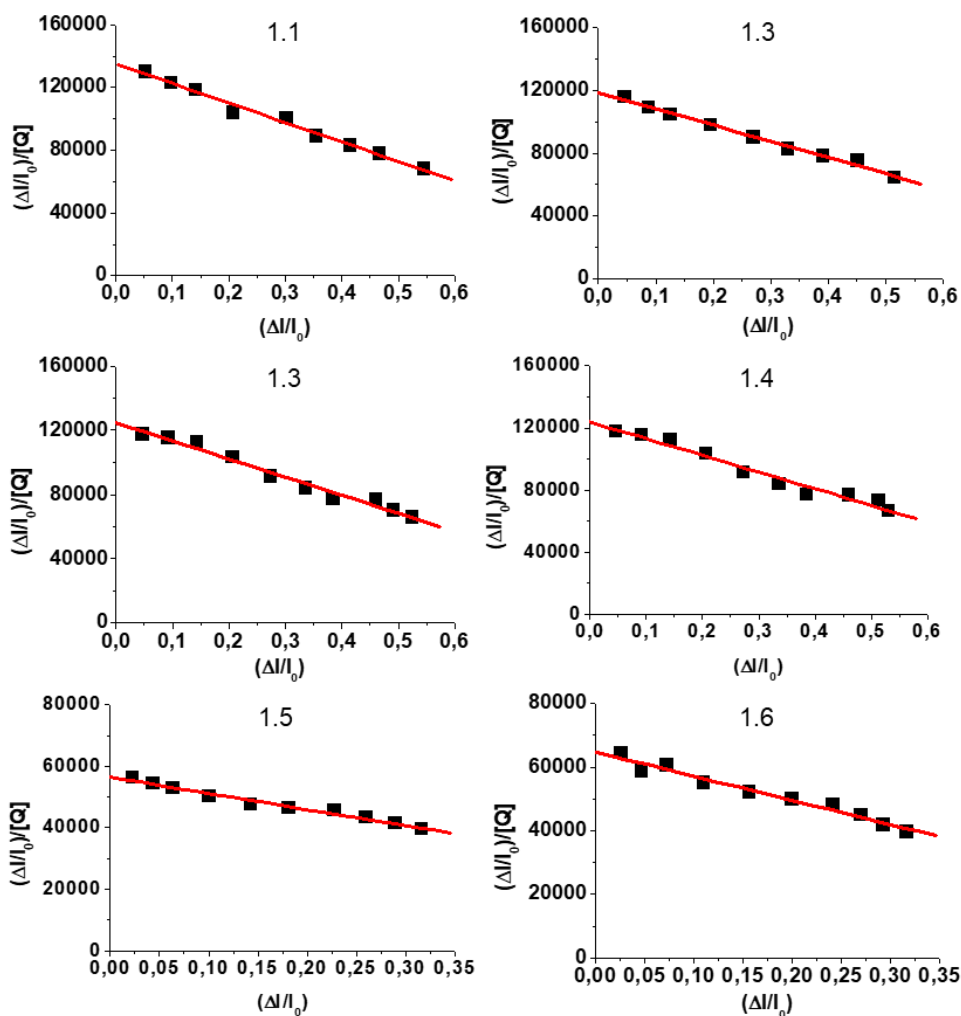
Слика 46. Емисиони спектар BSA у присуству комплекса **1.1-1.6**. [BSA] = 2  $\mu$ M, [комплекс] = 0-8  $\mu$ M,  $\lambda_{ex}$  = 295 nm. Стрелица указује на промену интензитета флуоресценције након додатка растуће концентрације комплекса [Q].  
Уметнути график:  $I_0/I$  у односу на [Q].<sup>142</sup>

Вредности за Стерн-Волмерове константе стабилности ( $K_{sv}$ ) и константе брзине „гашења” флуоресценције ( $k_q$ ) израчунате су применом једначина (14) и (15), а добијени резултати приказани су у Табели 9. Сви комплекси показују способност да смање флуоресценцију раствора BSA.

Табела 9. Константе и параметри везивања за интеракције комплекса **1.1-1.6** и BSA.<sup>142</sup>

Комплекс	$K_{sv}$ [M <sup>-1</sup> ]	$k_q$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$K$ [M <sup>-1</sup> ]	n
<b>1.1</b>	$(1,49 \pm 0,02) \times 10^5$	$(1,49 \pm 0,02) \times 10^{13}$	$(1,24 \pm 0,05) \times 10^5$	1,1
<b>1.2</b>	$(1,35 \pm 0,03) \times 10^5$	$(1,35 \pm 0,03) \times 10^{13}$	$(1,03 \pm 0,03) \times 10^5$	1,2
<b>1.3</b>	$(1,39 \pm 0,02) \times 10^5$	$(1,39 \pm 0,02) \times 10^{13}$	$(1,13 \pm 0,06) \times 10^5$	1,1
<b>1.4</b>	$(1,46 \pm 0,04) \times 10^5$	$(1,46 \pm 0,04) \times 10^{13}$	$(1,18 \pm 0,01) \times 10^5$	1,1
<b>1.5</b>	$(5,84 \pm 0,05) \times 10^4$	$(5,84 \pm 0,05) \times 10^{12}$	$(5,26 \pm 0,02) \times 10^4$	1,1
<b>1.6</b>	$(5,9 \pm 0,1) \times 10^4$	$(5,9 \pm 0,1) \times 10^{12}$	$(7,6 \pm 0,4) \times 10^4$	0,9

Вредности за константе везивања ( $K$ ) и број везивних места ( $n$ ) израчунати су коришћењем Скетчардове једначине (16), из добијених линеарних зависности, Слика 47. Резултати су приказани у Табели 9. Сви испитивани комплекси показују оптималне вредности за константе везивања са BSA, при чему је највећа вредност добијена за комплекс **1.1**. Под оптималном вредношћу подразумева се да су вредности довољно високе да долази до интеракције протеина са комплексом, али и да су довољно ниске, тако да након транспорта једињења до циљане ћелије долази до отпуштања комплекса од стране протеина.<sup>191</sup> Вредности за  $n$  су око 1, што указује на постојање једног везивног места унутар BSA структуре за које се везује испитивани комплекс.



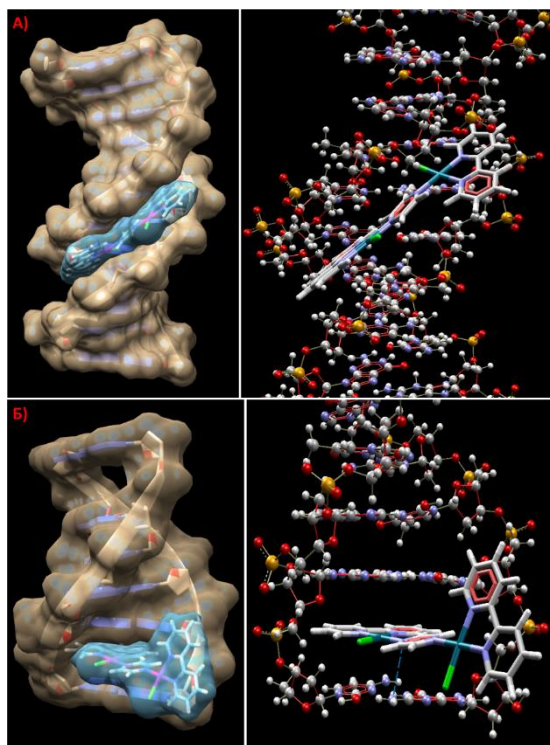
Слика 47. Скетчардови линеарни односи за интеракције комплекса **1.1-1.6** са BSA.<sup>142</sup>

### 3.1.6) Резултати молекулског докинга

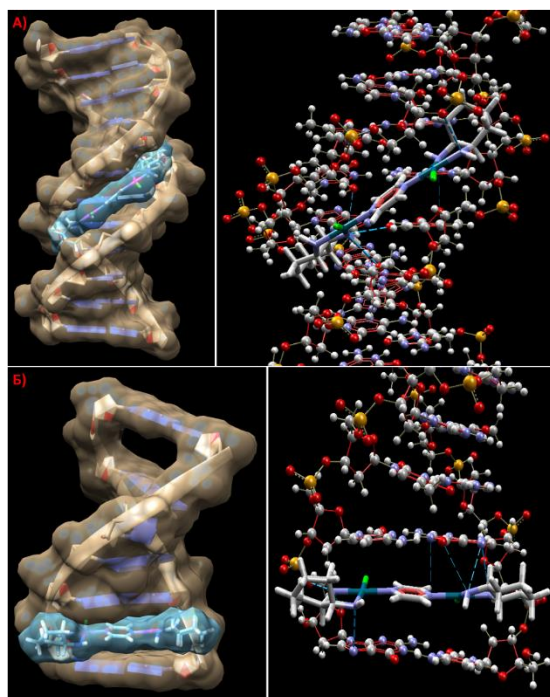
Коришћењем симулације молекулског докинга може се стећи даљи увид у тип интеракција испитиваних комплекса са макромолекулама, ДНК и BSA. У случају ДНК докинга, два типа интеракција су симулиране на основу добијених експерименталних резултата. Да би се предвидело везивање за мали жљеб коришћен је канонски тип ДНК молекула (PDB ID: 1BNA), док је за испитивање могућности интеркалације изабран други одговарајући ДНК фрагмент (PDB ID: 1Z3F). Најпогодније геометрије испитиваних комплекса за везивање са ДНК хеликсом или за везивно место унутар BSA молекула изабране су на основу најниже енергије.

Комплекси **1.1-1.6** тестирани су докинг симулацијом како би се испитала њихова структурна компатибилност да различито интерагују са ДНК молекулом, и то везивањем за мали жљеб (канонски ДНК; PDB ID: 1BNA) или интеркалацијом (PDB ID: 1Z3F). Резултати симулације са ДНК приказани су на Сликама 48-53, а вредности MVD функција на основу којих је вршена евалуација представљене су у Табели 10.

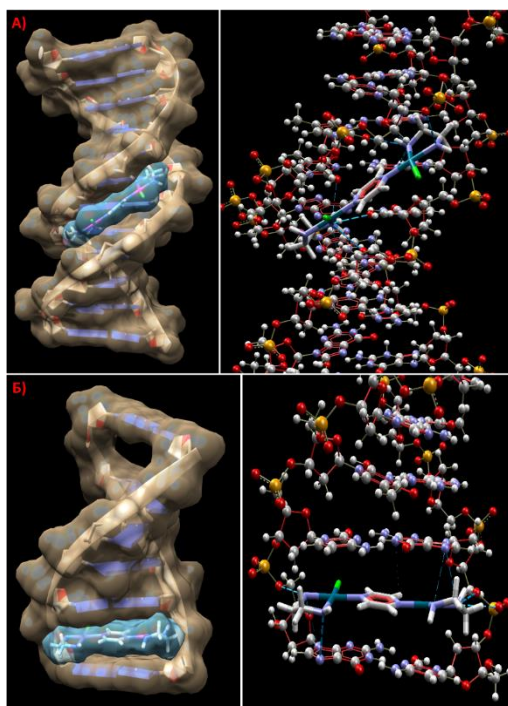




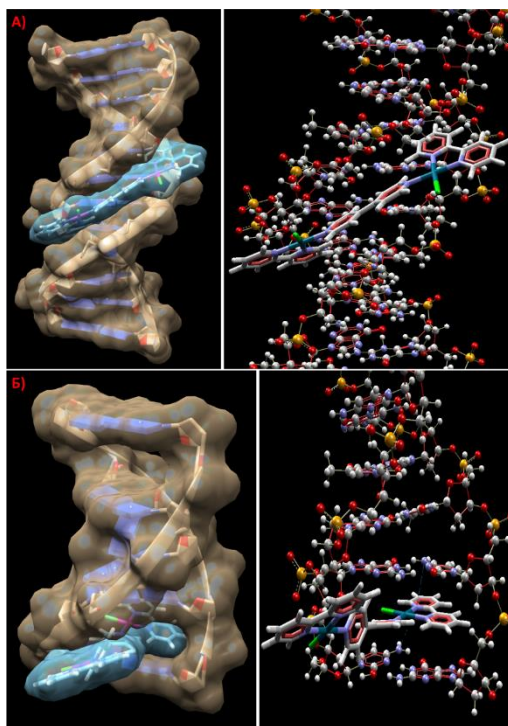
Слика 48. Компјутерски модел интеракције комплекса **1.1** и ДНК (водоничне везе представљене су плавом бојом); А) илустрација везивања за мали жљеб; Б) илустрација интеркалације.



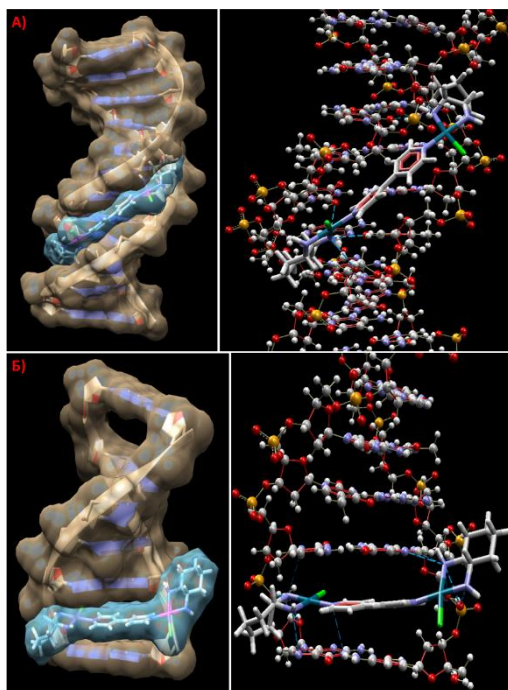
Слика 49. Компјутерски модел интеракције комплекса **1.2** и ДНК (водоничне везе представљене су плавом бојом); А) илустрација везивања за мали жљеб; Б) илустрација интеркалације.



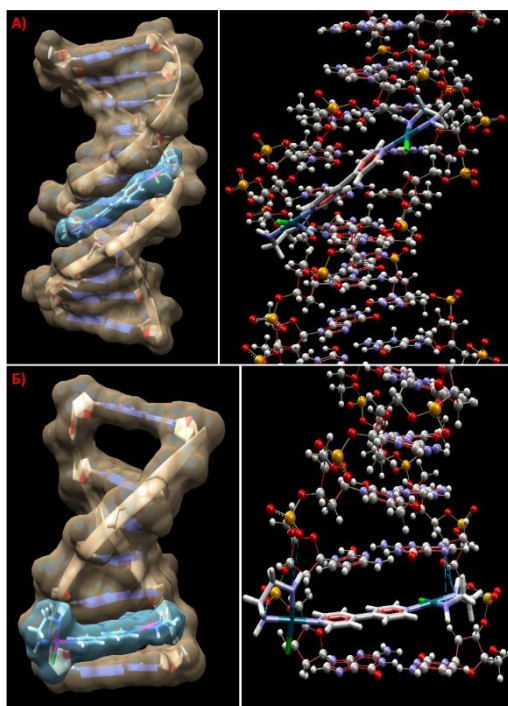
Слика 50. Компјутерски модел интеракције комплекса **1.3** и ДНК (водоничне везе представљене су плавом бојом); А) илустрација везивања за мали жљеб; Б) илустрација интеркалације.



Слика 51. Компјутерски модел интеракције комплекса **1.4** и ДНК (водоничне везе представљене су плавом бојом); А) илустрација везивања за мали жљеб; Б) илустрација интеркалације.



Слика 52. Компјутерски модел интеракције комплекса **1.5** и ДНК (водоничне везе представљене су плавом бојом); А) илустрација везивања за мали жљеб; Б) илустрација интеркалације.



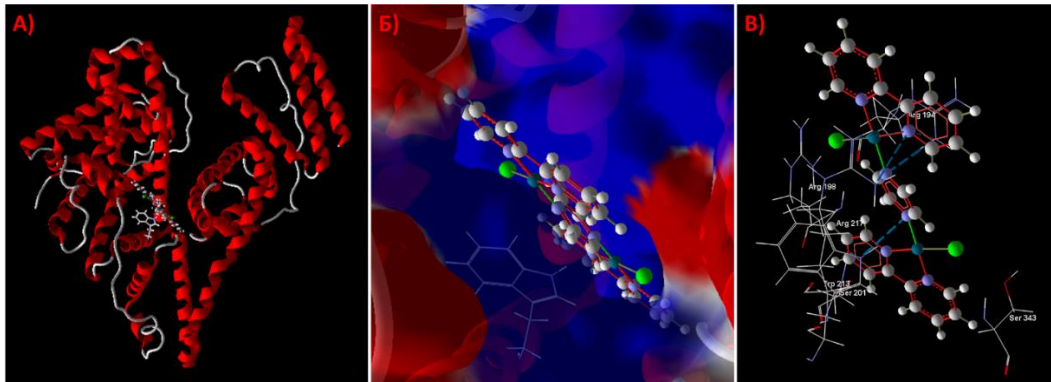
Слика 53. Компјутерски модел интеракције комплекса **1.6** и ДНК (водоничне везе представљене су плавом бојом); А) илустрација везивања за мали жљеб; Б) илустрација интеркалације.

Табела 10. Вредности MVD функција за комплексе **1.1-1.6** у интеракцији са ДНК фрагментима (1BNA и 1Z3F).

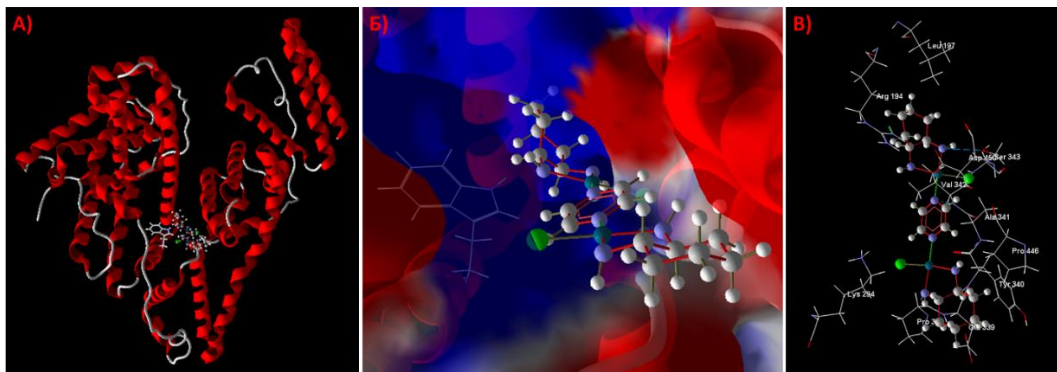
PDB код ДНК	Комплекс	MolDock	Rerank	Docking
1BNA	<b>1.1</b>	-153,37	-88,67	-150,53
	<b>1.2</b>	-183,48	-100,76	-180,18
	<b>1.3</b>	-180,86	-103,38	-175,86
	<b>1.4</b>	-188,21	-108,06	-183,69
	<b>1.5</b>	-228,36	-125,95	-223,75
	<b>1.6</b>	-221,01	-124,98	-215,51
1Z3F	<b>1.1</b>	-143,11	-83,14	-140,03
	<b>1.2</b>	-157,21	-74,12	-152,89
	<b>1.3</b>	-152,37	-87,04	-149,19
	<b>1.4</b>	-157,32	-85,26	-153,33
	<b>1.5</b>	-167,49	-87,11	-163,33
	<b>1.6</b>	-157,75	-83,71	-152,65

Резултати у Табели 10 показују да комплекси **1.1-1.6** поседују велики афинитет да се вежу интеркалацијом. Такође, ове вредности су у сагласности са претходно добијеним експерименталним резултатима. Наиме, анализирање добијених резултата базирано је пре свега на структурним карактеристикама испитиваних комплекса, при чему се првенствено узима у обзир волуминозност и флексибилност комплекса. Испитивани комплекси су волуминознији у поређењу са стандардним базним паром ДНК. Из тог разлога је могућност за интеркалацију ограничена. Узимајући у обзир податке на Сликама 48-53, интеркалација се углавном постиже преко планарних лиганда унутар комплекса, а то су инертни лиганд 2,2'-bipy и мостни лиганди 4,4'-bipy и pz. Алифатични инертни лиганди (en и dach), због своје волуминозности, у процесу интеркалације имају отежавајућу улогу. Са друге стране, комплекси су показали већу компатибилност да се вежу за мали жљоб ДНК молекула (1BNA). У овом случају, комплекси који поседују 4,4'-bipy као мостни лиганд показују боље резултате у поређењу са комплексима који садрже pz. Ова чињеница може се објаснити присуством додатног степена слободне ротације коју омогућава 4,4'-bipy мостни лиганд.

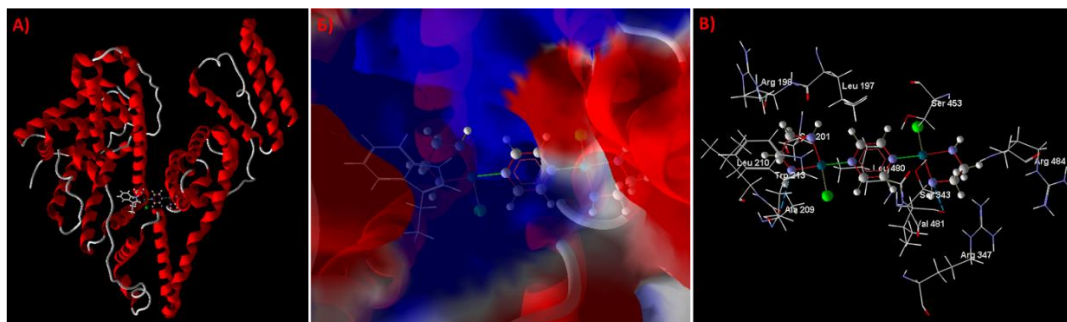
Молекулским докингом испитиване су и интеракције комплекса **1.1-1.6** и BSA. Резултати испитивања показују да се сви комплекси успешно везују за домен ПА (везивно место I) BSA протеина у непосредној близини Trp-213 аминокиселине. Ови резултати илустровани су на Сликама 54-59, а вредности MVD функција представљене су у Табели 11.



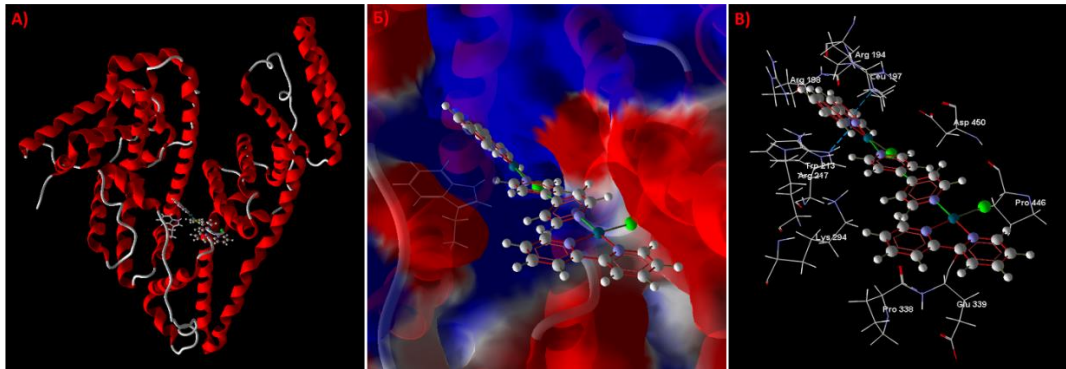
Слика 54. Компјутерски модел интеракције комплекса **1.1** и BSA на основу HBond вредности MVD функције; А) комплекс унутар скелета BSA; Б) комплекс у односу на електростатичку мапу површине BSA; В) комплекс унутар везивног места BSA са одабраним аминокиселинама (водоничне везе су представљене плавом бојом).



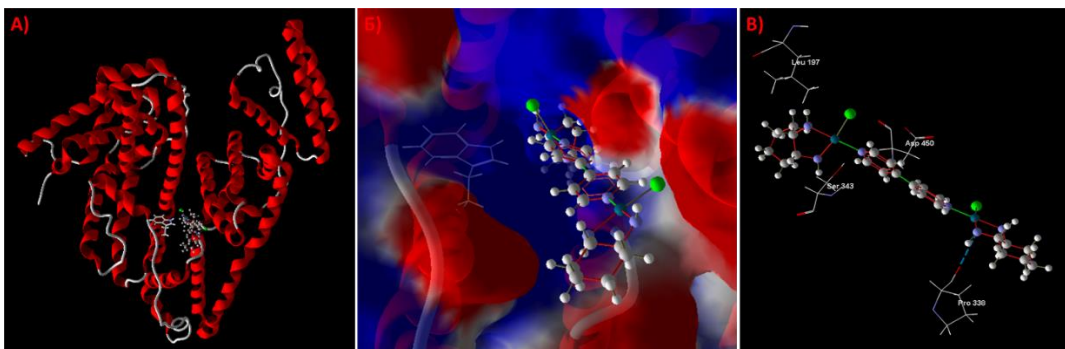
Слика 55. Компјутерски модел интеракције комплекса **1.2** и BSA на основу HBond вредности MVD функције; А) комплекс унутар скелета BSA; Б) комплекс у односу на електростатичку мапу површине BSA; В) комплекс унутар везивног места BSA са одабраним аминокиселинама (водоничне везе су представљене плавом бојом).



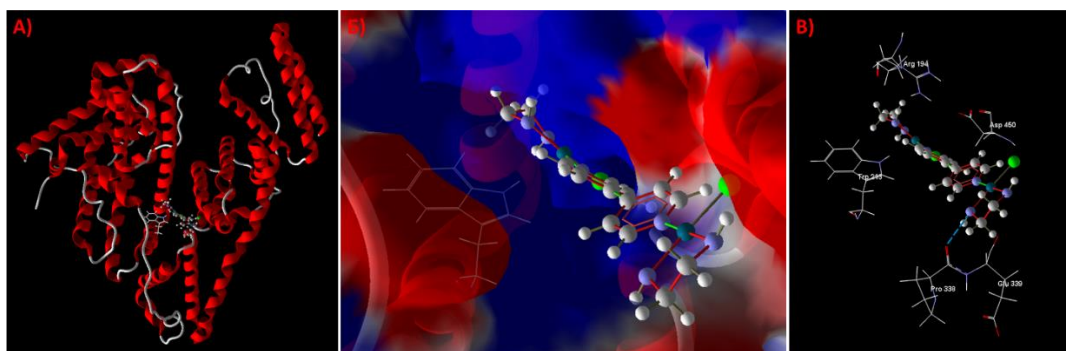
Слика 56. Компјутерски модел интеракције комплекса **1.3** и BSA на основу HBond вредности MVD функције; А) комплекс унутар скелета BSA; Б) комплекс у односу на електростатичку мапу површине BSA; В) комплекс унутар везивног места BSA са одабраним аминокиселинама (водоничне везе су представљене плавом бојом).



Слика 57. Компјутерски модел интеракције комплекса **1.4** и BSA на основу HBond вредности MVD функције; А) комплекс унутар скелета BSA; Б) комплекс у односу на електростатичку мапу површине BSA; В) комплекс унутар везивног места BSA са одабраним аминокиселинама (водоничне везе су представљене плавом бојом).



Слика 58. Компјутерски модел интеракције комплекса **1.5** и BSA на основу HBond вредности MVD функције; А) комплекс унутар скелета BSA; Б) комплекс у односу на електростатичку мапу површине BSA; В) комплекс унутар везивног места BSA са одабраним аминокиселинама (водоничне везе су представљене плавом бојом).



Слика 59. Компјутерски модел интеракције комплекса **1.6** и BSA на основу HBond вредности MVD функције; А) комплекс унутар скелета BSA; Б) комплекс у односу на електростатичку мапу површине BSA; В) комплекс унутар везивног места BSA са одабраним аминокиселинама (водоничне везе су представљене плавом бојом).

Табела 11. Вредности MVD функција за интеракције комплекса **1.1-1.6** и BSA.

Комплекс	MolDock	Rerank	Hbond	Docking	Амино киселине <sup>б,ц</sup>
<b>1.1<sup>а,б</sup></b>	-125,65	-89,36	-4,71	-132,36	Arg-217(H), Arg-198, Arg-194(H), Ser-201, Ser-343, Trp-213(H)
<b>1.2<sup>а</sup></b>	-120,78	-92,00	-0,68	-122,78	Arg-194, Leu-197, Ser-343(H), Trp-213, Asp-450, Val-343(H), Ala-343, Pro-338(H), Glu-339, Pro-446, Tyr-340, Lys-294
<b>1.2<sup>б</sup></b>	-109,98	-79,09	-5,00	-110,14	
<b>1.3<sup>а</sup></b>	-107,62	-60,12	-1,95	-110,43	Arg-347, Arg-484, Ser-343, Ser-453, Val-481(H), Leu-197, Ser-201, Arg-198, Trp-213, Leu-210, Ala-209(H), Leu-480
<b>1.3<sup>б</sup></b>	-104,01	-58,38	-3,91	-106,11	
<b>1.4<sup>а</sup></b>	-133,26	-24,76	-1,21	-131,59	Pro-446, Glu-339, Pro-338, Lys-294, Leu-197, Asp-450, Trp-213(H), Arg-198, Arg-217, Arg-194(H)
<b>1.4<sup>б</sup></b>	-132,03	-47,49	-3,25	-129,89	
<b>1.5<sup>а</sup></b>	-144,62	-107,37	0	-145,85	Pro-338(H), Leu-197, Ser-343, Asp-450
<b>1.5<sup>б</sup></b>	-135,76	-103,03	-2,51	-136,12	
<b>1.6<sup>а</sup></b>	-120,75	-96,59	0	-121,11	Glu-339, Pro-338(H), Trp-213, Arg-194, Asp-450
<b>1.6<sup>б</sup></b>	-118,04	-91,59	-2,67	-118,29	

<sup>а</sup> Најбољи резултати према MolDock, Docking и Rerank функцијама

<sup>б</sup> Најбољи резултати према Hbond функцији

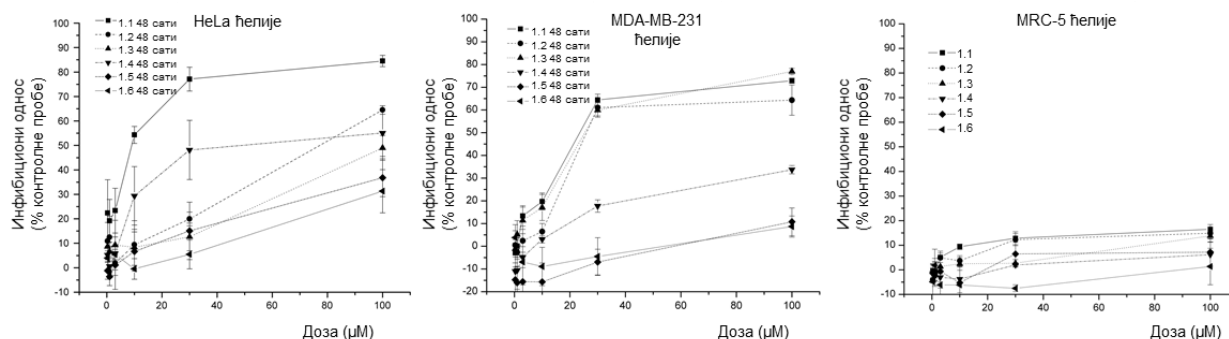
<sup>ц</sup> (H) означава да се аминокиселина везала водоничном везом за комплекс

На основу добијених резултата може се закључити да се сви комплекси везују за везивно место I унутар BSA протеина. Комплекси показују и потенцијалну способност да награде водоничне везе са једном или више аминокиселина унутар везивног места BSA протеина. Постојање ових водоничних веза је од великог значаја, имајући у виду да водоничне везе играју значајну улогу у успешном транспорту агенса кроз телесни систем.

### 3.1.7) Испитивање цитотоксичне активности комплекса **1.1-1.6** према HeLa, MDA-MB-231 и MRC-5 ћелијским линијама

*In vitro* цитотоксична активност комплекса **1.1-1.6** у односу на две хумане туморске ћелијске линије (HeLa и MDA-MB-231) и у односу на малигно нетрансформисане хумане фибробласте (MRC-5) испитивана је МТТ тестом. Третман Pd(II) комплексима показао је значајан дозно-зависни цитотоксични ефекат на туморске ћелијске линије, али не и на ћелијску линију здравих фибробласта плућа (Слика 60). Као што се може видети на основу резултата приказаних у Табели 12, тестирани комплекси су показали средњу до високу цитотоксичност у односу на обе хумане туморске ћелијске линије. Генерално, комплекси **1.1-1.4** показали су већу цитотоксичну активност, са IC<sub>50</sub> вредностима неколико пута мањим у поређењу са одговарајућим вредностима за комплексе **1.5-1.6**.

Комплекс **1.1** је показао највећу активност према HeLa и MDA-MB-231 ћелијским линијама ( $IC_{50} = 6 \mu M$  и  $17 \mu M$ ) од свих испитиваних комплекса. Такође, овај комплекс је показао већу активност и у односу на *цисплатину* (CDDP), која је коришћена као позитивна контрола ( $IC_{50} = 9 \mu M$  и  $55 \mu M$ ). Додатно, MRC-5 ћелијске линије су значајно мање сензитивне на све испитиване Pd(II) комплексе ( $IC_{50} > 100$ ), што указује на супериорнију селективност датих комплекса у односу на *цисплатину* ( $IC_{50} = 51 \mu M$ ).



Слика 60. *In vitro* цитотоксичност комплекса **1.1-1.6** након 48 сати.<sup>142</sup>

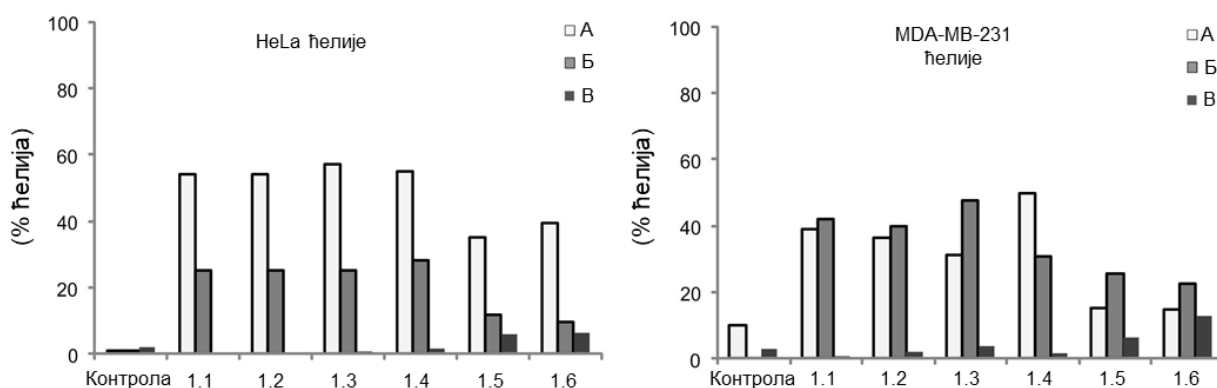
Табела 12. Цитотоксична активност ( $IC_{50}$  вредности) комплекса **1.1-1.6**.<sup>142</sup>

Комплекс	HeLa		MDA-MB-231		MRC-5	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<b>1.1</b>	$34 \pm 5$	$6 \pm 3$	$58 \pm 4$	$17 \pm 4$	$> 100$	$> 100$
<b>1.2</b>	$90 \pm 10$	$80 \pm 10$	$70 \pm 10$	$26 \pm 3$	$> 100$	$> 100$
<b>1.3</b>	$> 100$	$90 \pm 30$	$47 \pm 7$	$25 \pm 4$	$> 100$	$> 100$
<b>1.4</b>	$47 \pm 2$	$15 \pm 5$	$> 100$	$70 \pm 20$	$> 100$	$> 100$
<b>1.5</b>	$> 100$	$57 \pm 9$	$> 100$	$> 100$	$> 100$	$> 100$
<b>1.6</b>	$> 100$	$> 100$	$> 100$	$> 100$	$> 100$	$> 100$
CDDP	$35 \pm 7$	$9 \pm 3$	$77 \pm 3$	$55 \pm 2$	$> 100$	$51 \pm 7$

Резултати Annexin V-FITC/7-ADD теста показали су да третман HeLa и MDA-MB-231 ћелија комплексима индукује ћелијску смрт апоптозом у оба случаја, Слика 61. У концентрацијама које одговарају  $IC_{50}$  вредностима, комплекси су у HeLa ћелијама индуковали апоптозу у значајном проценту (комплекс **1.1**: 76,68%; комплекс **1.2**: 79,68%; комплекс **1.3**: 82,77%; комплекс **1.4**: 83,75%; комплекс **1.5**: 46,99% и комплекс **1.6**: 49,37%), где је преовладавала рана апоптоза. Насупрот томе, код MDA-MB-231 ћелија, популацију апоптотичних ћелија (комплекс **1.1**: 81,37%; комплекс **1.2**: 76,50%; комплекс **1.3**: 79,35%; комплекс **1.4**: 80,66%; комплекс **1.5**: 41,30% и комплекс **1.6**: 37,61%) чиниле су претежно касно апоптотичне ћелије. Комплекси **1.1-1.4** показали су већу апоптотску активност на обе ћелијске линије. Укупан број апоптотичних ћелија био је око два пута већи код ћелија третираних комплексима **1.1-1.4** у односу на ћелије третиране комплексима **1.5** и **1.6**. Процент некротичних ћелија био је занемарљив, сем



у случају комплекса **1.6**, који је индуковао некрозу у 13,08% MDA-MB-231 ћелија, Табела 13.



Слика 61. Процент рано апоптотичних (А), касно апоптотичних (Б) и некротичних ћелија (В) у нетретираним (контрола) и третираним HeLa и MDA-MB-231 ћелијама. Резултати су представљени као средња вредност три независна експеримента.<sup>142</sup>

Табела 13. Процент рано апоптотичних (А), касно апоптотичних (Б) и некротичних ћелија (В) у нетретираним (контрола) и третираним (комплексима **1.1-1.6**) HeLa и MDA-MB-231 ћелијама.<sup>142</sup>

	Контрола	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6
<b>HeLa</b>							
А	1,00	54,40	54,40	57,40	55,23	35,19	39,53
Б	1,00	25,28	25,28	25,37	28,52	11,80	9,84
В	2,01	0,57	0,57	0,78	1,72	5,91	6,33
<b>MDA-MB-231</b>							
А	10,12	39,07	36,54	31,46	49,78	15,52	14,86
Б	0,31	42,30	39,96	47,89	30,88	25,78	22,75
В	3,16	0,88	2,04	3,69	1,66	6,57	13,08

А – рана апоптоза

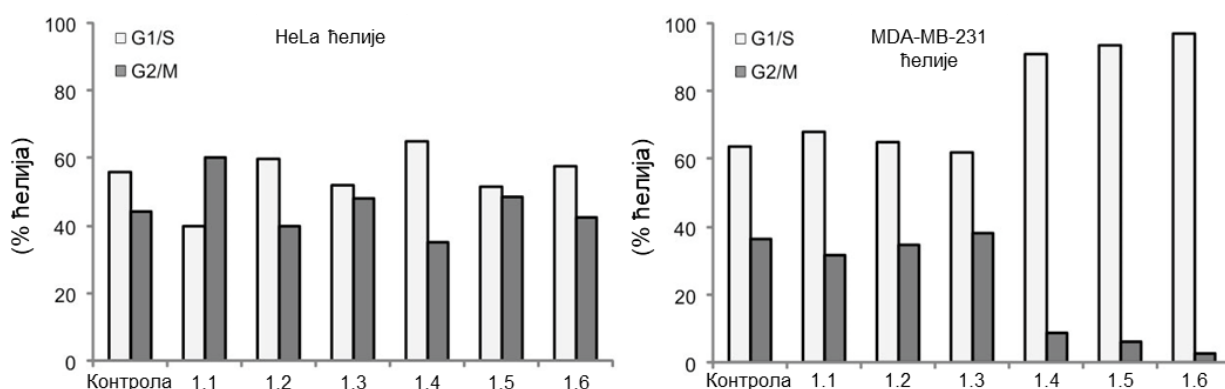
Б – касна апоптоза

В – некроза

Ћелијски циклус обухвата неколико контролисаних фаза током којих долази до дупликације ДНК и њене равномерне поделе на ћелије-потомке. Свака фаза ћелијског циклуса је строго регулисана контролним тачкама и заштитним механизмима који заустављају ћелијски циклус у случају оштећења ДНК. Регулаторни молекули укључени у заустављање ћелијског циклуса и активацију механизма који ће извршити поправку насталог оштећења повезани су са апоптозом. Уколико оштећење не може да се поправи,

покреће се процес апоптозе. За разлику од нормалних ћелија, код туморских ћелија контролни механизми су често нефункционални, услед мутација гена различитих регулаторних молекула. Ова појава је искоришћена у дизајнирању нових терапеутских стратегија.

Да би се испитао механизам цитотоксичности индуковане испитиваним Pd(II) комплексима, ефекат комплекса на дистрибуцију фаза ћелијског циклуса код HeLa и MDA-MB-231 ћелија испитиван је проточном цитометријом. Анализа ћелијског циклуса показала је различит ефекат комплекса на ове ћелијске линије, Слика 62. Генерално, испитивани Pd(II) комплекси показали су значајнији утицај на ћелијски циклус MDA-MB-231 ћелија. Најзначајнији ефекат на MDA-MB-231 ћелије имали су **1.4**, **1.5** и **1.6** комплекси, који су велики проценат ћелија зауставили у G1/S фази (63,68% - контрола, 90,99% - **1.4**, 93,73% - **1.5** и 97,09% - **1.6**), Табела 14. С друге стране, утицај Pd(II) комплекса на ћелијски циклус HeLa ћелија није био тако изражен, с обзиром да су само комплекси **1.1** и **1.4** индуковали значајно заустављање у G1/S (55,85% - контрола, 64,94% - **1.4**), односно G2/M фази (44,15% - контрола, 60,18% - **1.1**).



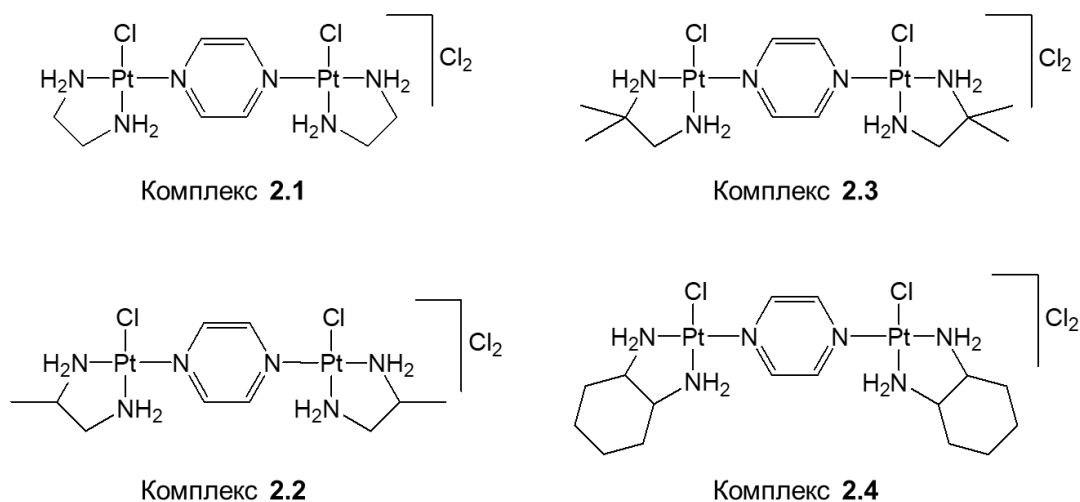
Слика 62. Анализа ћелијског циклуса. Графикони показују дистрибуцију фаза ћелијског циклуса код нетретираних (контрола) и третираних HeLa и MDA-MB-231 ћелија (комплекси **1.1-1.6**).<sup>142</sup>

Табела 14. Процент ћелија у G1/S и G2/M фази ћелијског циклуса код нетретираних (контрола) и третираних HeLa и MDA-MB-231 ћелија (комплекси **1.1-1.6**).<sup>142</sup>

	Контрола	<b>1.1</b>	<b>1.2</b>	<b>1.3</b>	<b>1.4</b>	<b>1.5</b>	<b>1.6</b>
<b>HeLa</b>							
G1/S	55,85	39,82	59,92	51,95	64,94	51,57	57,62
G2/M	44,15	60,18	40,08	48,05	35,06	48,43	42,38
<b>MDA-MB-231</b>							
G1/S	63,68	68,20	65,05	61,93	90,99	93,73	97,09
G2/M	36,35	31,80	34,95	38,07	9,01	6,27	2,91

### 3.2) Динуклеарни комплекси Pt(II): Резултати испитивања хидролизе, нуклеофилних супституционих реакција и молекулског докинга са ДНК/BSA

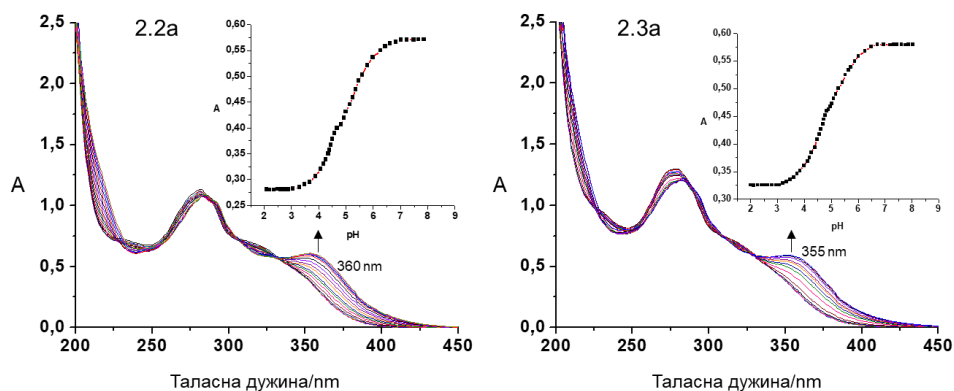
Четири динуклеарна Pt(II) комплекса  $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu\text{-pz})]Cl_2$  (**2.1**),  $[\{Pt(1,2\text{-pn})Cl\}_2(\mu\text{-pz})]Cl_2$  (**2.2**),  $[\{Pt(ibn)Cl\}_2(\mu\text{-pz})]Cl_2$  (**2.3**) и  $[\{Pt(dach)Cl\}_2(\mu\text{-pz})]Cl_2$  (**2.4**), (Слика 63), синтетисани су и окарактерисани елементалном микроанализом, IR и  $^1H$  NMR спектроскопијом (подаци су сумирани у поглављу 2.3).<sup>194</sup> Испитиван је утицај различитих алифатичних инертних лиганата на карактеристике динуклеарних Pt(II) комплекса, имајући у виду да  $\sigma$ -донорски капацитет инертних лиганата расте идући од комплекса **2.1** ка комплексу **2.4**.



Слика 63. Структурне формуле комплекса **2.1-2.4**.<sup>194</sup>

#### 3.2.1) Одређивање константе киселости диаква комплекса **2.2a** и **2.3a**

Хидролиза комплекса **2.2a** и **2.3a**, односно одређивање њихових  $pK_a$  вредности изучавана је спектрофотометријски, титрацијом стандардним раствором NaOH (0,1143 M) на температури од 298 K у 0,1 M воденом раствору NaClO<sub>4</sub>. Спектралне промене настале током спектрофотометријске титрације приказане су на Слици 64. Спектрални подаци анализирани су као однос апсорбанце на одређеној таласној дужини и pH вредности применом једначине (8). За оба комплекса одређене су по две константе, које су дате у Табели 15.



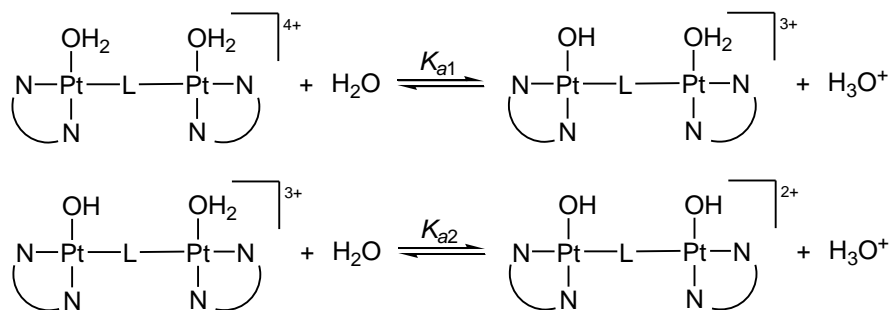
Слика 64. UV-Vis спектри диаква комплекса **2.2a** и **2.3a** у рН опсегу од 2 до 9 на 298 К у 0,1 М NaClO<sub>4</sub>. Уметнути график: однос апсорбанце у функцији рН на одређеној таласној дужини.<sup>194</sup>

Табела 15.  $pK_a$  вредности испитиваних диаква комплекса.<sup>194</sup>

Комплекс	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$
<b>2.1a<sup>a</sup></b>	4,32 ± 0,05	5,2 ± 0,2
<b>2.2a</b>	4,39 ± 0,02	5,29 ± 0,02
<b>2.3a</b>	4,43 ± 0,02	5,34 ± 0,02
<b>2.4a<sup>a</sup></b>	4,48 ± 0,07	5,53 ± 0,05

<sup>a</sup> Референца [142]

Укупни процес депротонације диаква комплекса **2.1a-2.4a** може се представити једначинама приказаним на Шеми 6.



Шема 6. Депротонација динуклеарних комплекса **2.1a-2.4a** (N-N = 1,2-pn или ibn, L = pz).<sup>194</sup>

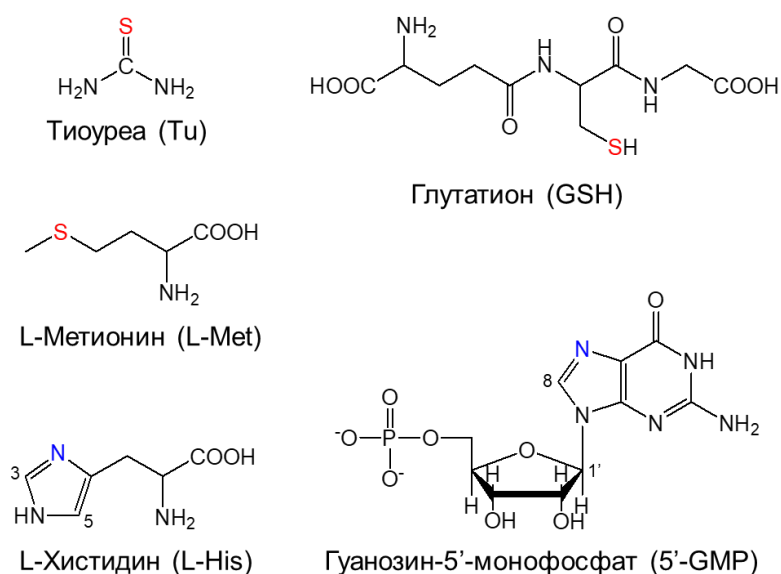
С обзиром да је у свим испитиваним комплексима пиазин мостни лиганд, разлике у  $pK_a$  вредностима могу се у потпуности приписати различитим инертним лигандима.

На основу података из Табеле 15, вредности за  $pK_a$  расту у следећем низу: **2.1a** < **2.2a** < **2.3a** < **2.4a**. Генерално, добијене  $pK_a$  вредности представљају добар индикатор електрофилности јона метала.<sup>172,192</sup> Наиме, групе са  $\pi$ -акцепторским карактеристикама имају способност да додатно стабилизују хидроксо честице у поређењу са аква комплексима, што утиче на смањење  $pK_a$ .<sup>193</sup> Са друге стране, повећање  $\sigma$ -донорског капацитета инертних лиганда доводи до повећања  $pK_a$  вредности.<sup>142</sup> На основу добијених резултата може се закључити да диаква комплекс **2.1a** поседује највећу киселост. Ово указује да метил групе, једна у комплексу **2.2a** или две у комплексу **2.3a** у скелету етилендиамина, својим  $\sigma$ -донорским ефектом повећавају електронску густину на јону метала, што се огледа у благом повећању  $pK_a$  вредности комплекса. Такође, пошто *dash* лиганд поседује највећи  $\sigma$ -донорски капацитет, комплекс **2.4a** има највећу  $pK_a$  вредност. Како су вредности  $pK_a$  за серије комплекса **1.1a-1.6a** и **2.1a-2.4a** одређене истом методом под истим условима, може се закључити да Pd(II) комплекси поседују нижу вредност  $pK_a$  у односу на комплексе са Pt(II) јоном.

На основу резултата из Табеле 15 приметно је да су  $pK_{a2}$  вредности веће у поређењу са  $pK_{a1}$  вредностима за сваки комплекс. Наиме, након депротонације првог молекула воде укупно наелектрисање комплекса се смањује са 4+ на 3+, што узрокује смањену тенденцију за даљом депротонацијом.<sup>141,172</sup>

### 3.2.2) Испитивање супституционих реакција комплекса 2.1-2.4

Ради што бољег дефинисања механизма супституције, као и структуре производа реакције, супституционе реакције комплекса **2.1** са нуклеофилима Tu, L-Met, GSH, L-His и 5'-GMP (Слика 65) прво су испитиване помоћу <sup>1</sup>H NMR спектроскопије у D<sub>2</sub>O на 295 K. Значајнија хемијска померања слободних (некоординованих) нуклеофила и хемијска померања нуклеофила након координације за комплекс **2.1** дата су у Табели 16.

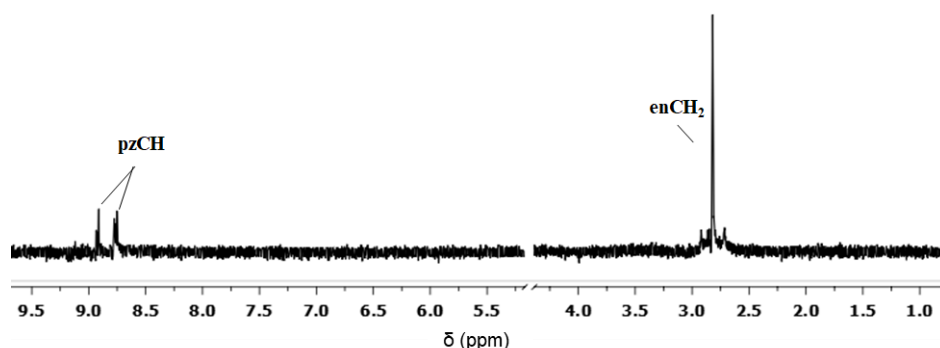


Слика 65. Структурне формуле нуклеофила.<sup>194</sup>

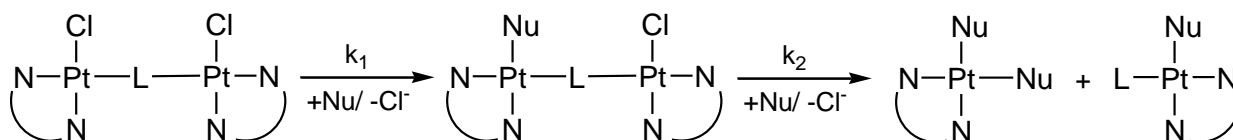
Табела 16. Хемијска померања ( $\delta$ ) слободних и координованих нуклеофила за комплекс **2.1**.<sup>194</sup>

Честице	$\delta(\text{pzCH})$	$\delta(\text{CH}_3)$	$\delta(\text{CH}_2\text{S})$	$\delta(\text{H}_2)$	$\delta(\text{H}_8)$	$\delta(\text{H}1')$
Tu						
Tu-(Pt)	8,75-8,91					
L-Met		2,13				
L-Met-(Pt)	8,74-8,88	2,56				
GSH			2,92			
GSH-(Pt)	9,01		3,34			
L-His				7,75		
L-His-(Pt)	9,02			7,82		
5'-GMP					8,20	5,92
5'-GMP-(Pt)	9,03				8,98	6,01

Након додатка два еквивалента Tu раствору комплекса **2.1** добијен је  $^1\text{H}$  NMR спектар приказан на Слици 66. У спектру се може приметити одсуство синглета на 9,03 ppm, који одговара протонима пиразина као мостног лиганда код динуклеарног комплекса.<sup>195</sup> Додатно, два нова мултиплета, који одговарају монодентатно координованом пиразину за јон метала, појављују се у оспегу између 8,75 и 8,91 ppm.<sup>196</sup> Ово указује да у току супституције долази до раскидања везе између једног Pt(II) јона и мостног лиганда, односно до разлагања полазног динуклеарног комплекса на начин као што је приказано на Шеми 7. У спектру није уочена даља разградња пиразинског комплекса.

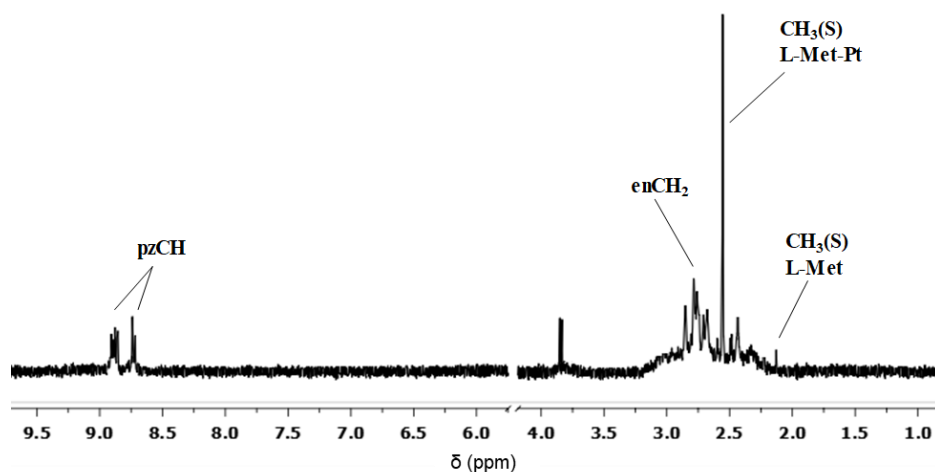


Слика 66.  $^1\text{H}$  NMR спектар комплекса **2.1** (2 mM) након додатка Tu (4 mM) на pH 5,0 и температури од 295 K, 48 сати након почетка реакције.<sup>194</sup>



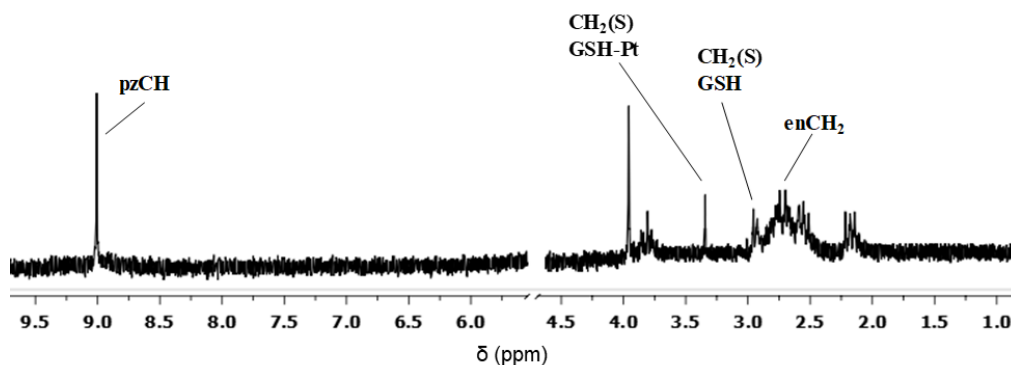
Шема 7. Супституционе реакције динуклеарних комплекса **2.1-2.4** са Tu и L-Met (N-N = en, 1,2-pn, ibn или dach, L = pz, Nu = Tu или L-Met).<sup>194</sup>

<sup>1</sup>H NMR спектар реакције комплекса **2.1** (2 mM) и L-Met (4 mM) приказан је на Слици 67. Појава два мултиплета у опсегу између 8,74 и 8,88 ppm потврђује исти начин супституције као што је приказано на Шеми 7.

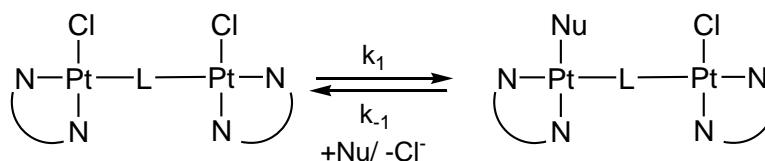


Слика 67. <sup>1</sup>H NMR спектар комплекса **2.1** (2 mM) након додатка L-Met (4 mM) на pH 5,0 и температури од 295 K, 48 сати након почетка реакције.<sup>194</sup>

<sup>1</sup>H NMR спектар супституционе реакције између комплекса **2.1** (2 mM) и GSH (2 mM) приказан је на Слици 68. У спектру се може видети јасан синглет на 9,01 ppm, који потиче од мостног лиганда пиразина из реакционог производа  $[\{\text{Pt}(\text{en})(\text{GSH})\}(\mu\text{-pz})\{\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}\}]^{2+}$ . Додатно, координовање GSH за Pt(II) јон може се потврдити и померањем сигнала CH<sub>2</sub>(S) протона од 2,92 ppm (слободан GSH) на 3,34 ppm (координован GSH). На основу ових резултата може се закључити да се процес супституције глутатионом дешава на начин као што је приказано на Шеми 8.

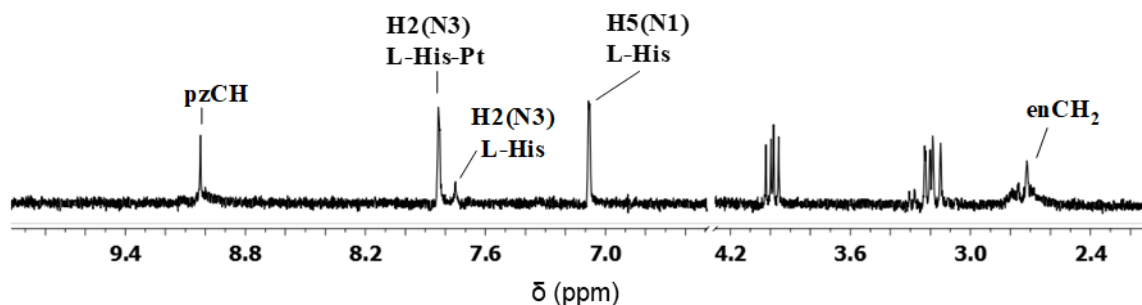


Слика 68.  $^1\text{H}$  NMR спектар комплекса **2.1** (2 mM) након додатка GSH (2 mM) на pH 5,0 и температури од 295 K, 48 сати након почетка реакције.<sup>194</sup>



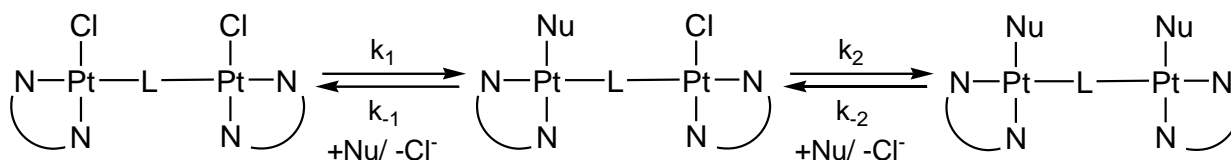
Шема 8. Супституционе реакције динуклеарних комплекса **2.1-2.4** са GSH (N-N = en, 1,2-pn, ibn или dach, L = pz, Nu = GSH).<sup>194</sup>

$^1\text{H}$  NMR спектар добијен током реакције између комплекса **2.1** и L-His на pD = 5,0 приказан је на Слици 69. Познато је да L-His може да се координује за јоне метала преко N1 и N3 азотових атома имидазолског прстена.<sup>197</sup> Координацију L-His за Pt(II) јон преко N3 атома прати померање сигнала ка вишим вредностима хемијског померања, и то од 7,75 ppm (некоординовани L-His) на 7,82 ppm (координовани L-His). Штавише, присуство синглета на 9,02 ppm указује да је мостни лиганд пиазин координован за оба Pt(II) јона у реакционом производу, тако да се механизам супституције комплекса са L-His може представити једначинама приказаним на Шеми 9.



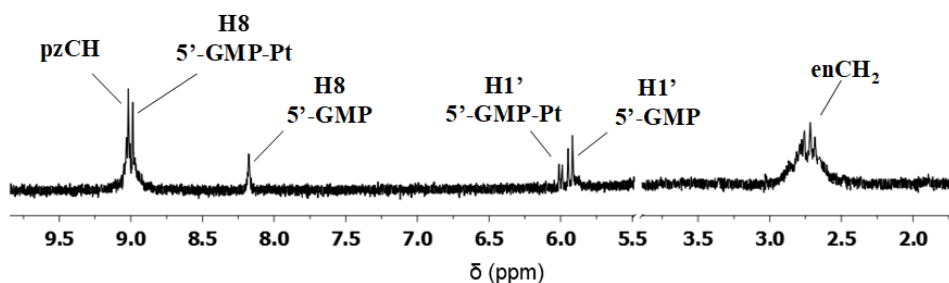
Слика 69.  $^1\text{H}$  NMR спектар комплекса **2.1** (2 mM) након додатка L-His (4 mM) на pH 5,0 и температури од 295 K, снимано 48 сати након почетка реакције.<sup>194</sup>





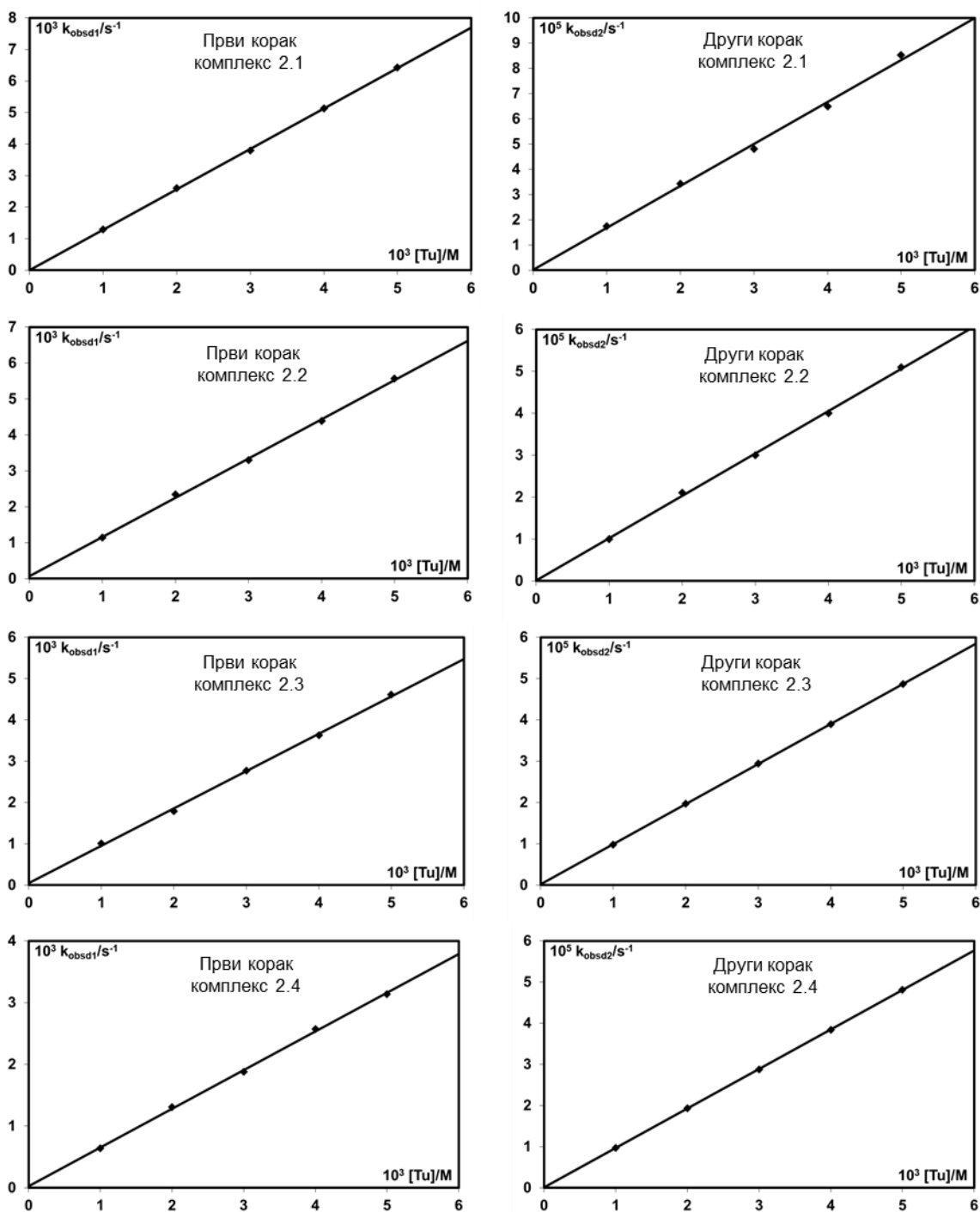
Шема 9. Супституционе реакције динуклеарних комплекса **2.1-2.4** са L-His и 5'-GMP (N-N = en, 1,2-pn, ibn или dach, L = pz, Nu = L-His или 5'-GMP).<sup>194</sup>

Процес супституције испитиваних комплекса са 5'-GMP као нуклеофилом одиграва се реакцијама приказаним на Шеми 9. Координација нуклеофила за Pt(II) јон потврђена је померањем сигнала протона H8 и H1' са 8,20 ppm и 5,92 ppm (за слободан 5'-GMP) на 8,98 ppm и 6,01 ppm (за координовани 5'-GMP), Слика 70. Присуство сигнала на 9,03 ppm потврђује да структура полазног динуклеарног комплекса остаје очувана током супституције. Додатно, реакција између комплекса **2.1** и 5'-GMP у 1:1 моларном односу такође је изучавана помоћу <sup>1</sup>H NMR спектроскопије, а на основу публикованих резултата потврђен је исти реакциони механизам.<sup>141</sup>

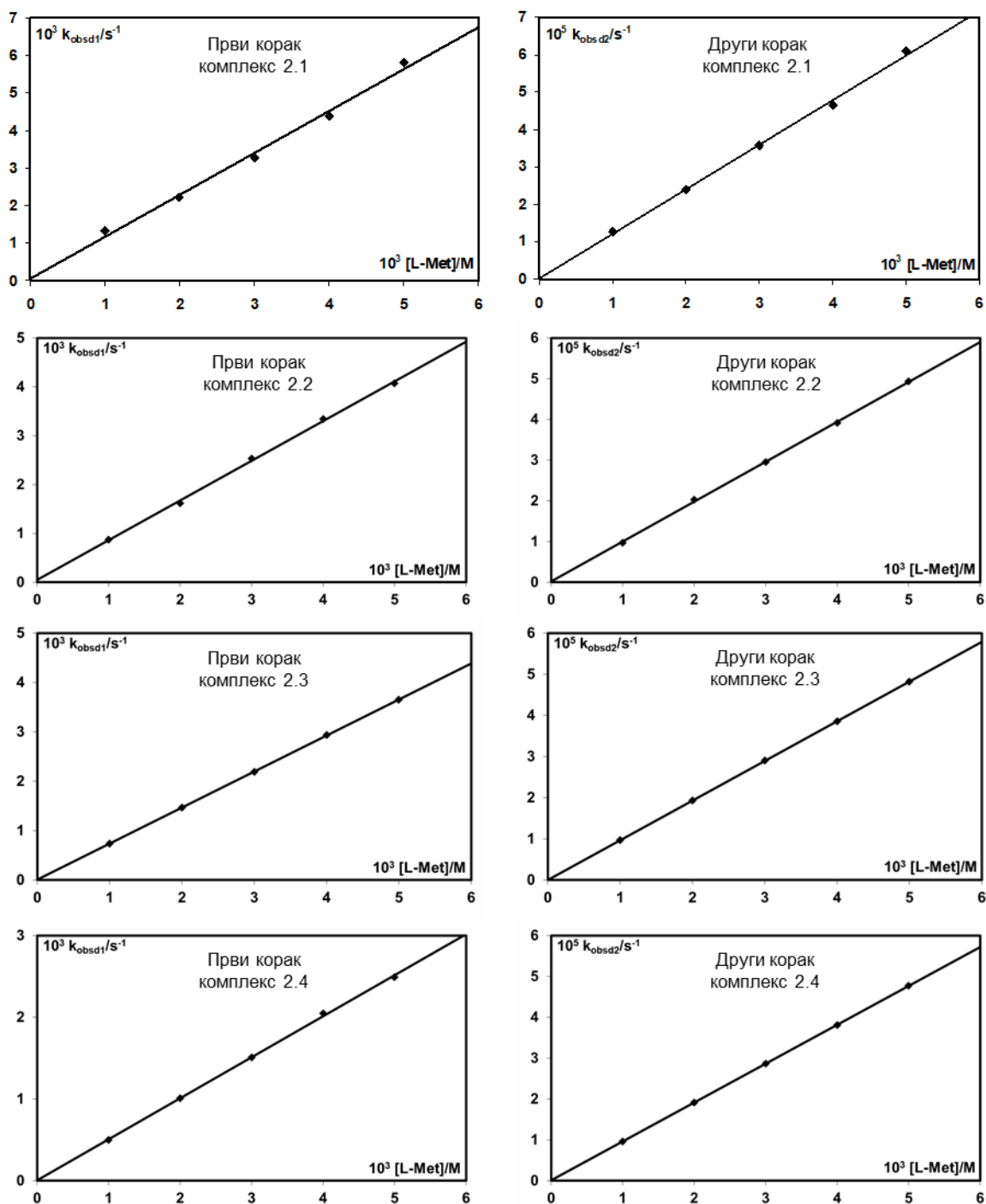


Слика 70. <sup>1</sup>H NMR спектар комплекса **2.1** (2 mM) након додатка 5'-GMP (4 mM) на pH 5,0 и температури од 295 K, 48 сати након почетка реакције.<sup>194</sup>

Супституционе реакције комплекса **2.1-2.4** проучаване су и UV-Vis спектрофотометријски на pH 7,2 (25 mM HEPES пуфер) у присуству 40 mM NaCl, у циљу сузбијања спонтане хидолизе комплекса. Кинетички подаци добијени за реакције комплекса **2.1-2.4** са Tu и L-Met потврђују супституцију у два корака, као што је приказано на Шеми 7. Први корак, окарактерисан константом брзине  $k_1$ , представља супституцију једног хлоридног јона из координационе сфере полазног комплекса. Координација другог молекула нуклеофила за исти Pt(II) јон са истовременим раскидањем Pt(II)-pz везе дешава се у другом реакционом кораку, окарактерисаним константом  $k_2$ . Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда за први ( $k_{obsd1}$ ) и други ( $k_{obsd2}$ ) корак супституције израчунате су применом једначине (9). Добијене вредности су показале линеарну зависност у односу на концентрацију одговарајућег нуклеофила (Tu и L-Met), а графичке зависности приказане су на Сликама 71 и 72. Константе брзине реакције за први ( $k_1$ ) и други ( $k_2$ ) реакциони корак израчунате су из нагиба добијених графика применом једначине (7), а сумиране су у Табели 17.



Слика 71. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације Tu за реакције супституције комплекса **2.1-2.4** на 310 K, pH = 7,2 (25 mM HEPES, 40 mM NaCl).<sup>194</sup>



Слика 72. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације L-Met за реакције супституције комплекса **2.1-2.4** на 310 K, pH = 7,2 (25 mM Hepes, 40 mM NaCl).<sup>194</sup>

Табела 17. Константе брзине реакције другог реда за процес супституције комплекса **2.1-2.4** са нуклеофилима Tu, L-Met, GSH, L-His и 5'-GMP на 310 K, pH = 7,2 (25 mM Hepes, 40 mM NaCl).<sup>194</sup>

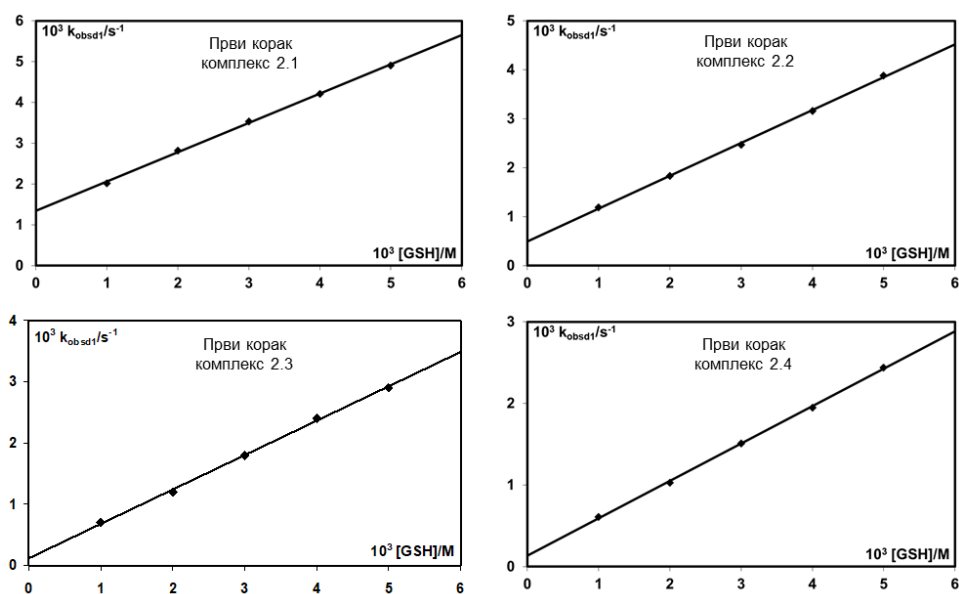
	$10^2 k_1$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$10^2 k_{-1}^{\delta}$ [s <sup>-1</sup> ]	$10^2 k_2$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$10^2 k_{-2}^{\delta}$ [s <sup>-1</sup> ]
<b>Комплекс 2.1</b>				
Tu	128 ± 1	-	1,662 ± 0,006	-
L-Met	112 ± 5	-	1,19 ± 0,03	-
GSH	72 ± 1	3,4 ± 0,1	-	-
L-His <sup>a</sup>	9,8 ± 0,9	0,50 ± 0,07	0,96 ± 0,01	0,015 ± 0,002
5'-GMP <sup>a</sup>	5,8 ± 0,3	0,15 ± 0,02	0,90 ± 0,07	0,007 ± 0,002
<b>Комплекс 2.2</b>				
Tu	109 ± 2	-	1,01 ± 0,02	-
L-Met	81 ± 2	-	0,98 ± 0,01	-
GSH	67 ± 1	1,23 ± 0,09	-	-
L-His	9,69 ± 0,08	0,090 ± 0,006	0,953 ± 0,006	0,0154 ± 0,0005
5'-GMP	5,66 ± 0,08	0,104 ± 0,002	0,81 ± 0,02	0,006 ± 0,002
<b>Комплекс 2.3</b>				
Tu	90 ± 2	-	0,971 ± 0,003	-
L-Met	72,9 ± 0,3	-	0,963 ± 0,001	-
GSH	56 ± 1	0,30 ± 0,09	-	-
L-His	9,40 ± 0,03	0,209 ± 0,003	0,95 ± 0,02	0,090 ± 0,002
5'-GMP	5,5 ± 0,1	0,131 ± 0,008	0,77 ± 0,01	0,0098 ± 0,0009
<b>Комплекс 2.4</b>				
Tu	63 ± 1	-	0,959 ± 0,002	-
L-Met	50,2 ± 0,8	-	0,952 ± 0,002	-
GSH	45,7 ± 0,7	0,34 ± 0,07	-	-
L-His <sup>a</sup>	9,1 ± 0,9	0,50 ± 0,07	0,94 ± 0,01	0,007 ± 0,002
5'-GMP <sup>a</sup>	5,4 ± 0,2	0,10 ± 0,02	0,68 ± 0,06	0,012 ± 0,002

<sup>a</sup> Референца [142]

<sup>δ</sup> Израчунато из  $k_{-1}[\text{Cl}^-]$  и  $k_{-2}[\text{Cl}^-]$  пошто је  $[\text{Cl}^-] = 40 \text{ mM}$

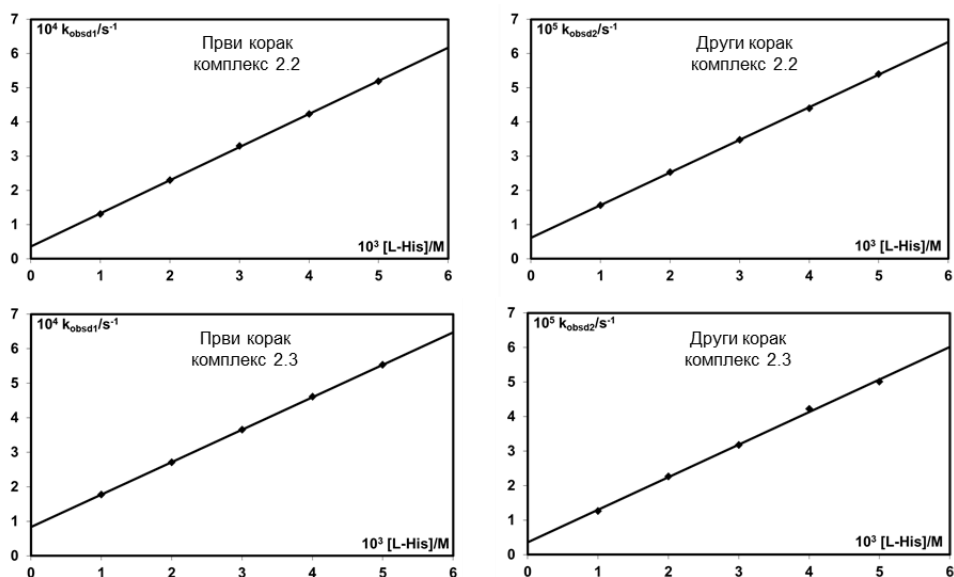
Супституционе реакције динуклеарних комплекса и GSH дешавају се као реверзибилна супституција једног лабилног хлоридног јона координованог за Pt(II) јон, као што је приказано на Шеми 8. Константе брзине за директну и повратну реакцију израчунате су из линеарне зависности константе брзине реакције *pseudo*-првог реда од

концентрације нуклеофила према јендацини (10), а добијени графици представљени су на Слици 73. Вредности за константе сумиране су у Табели 17.

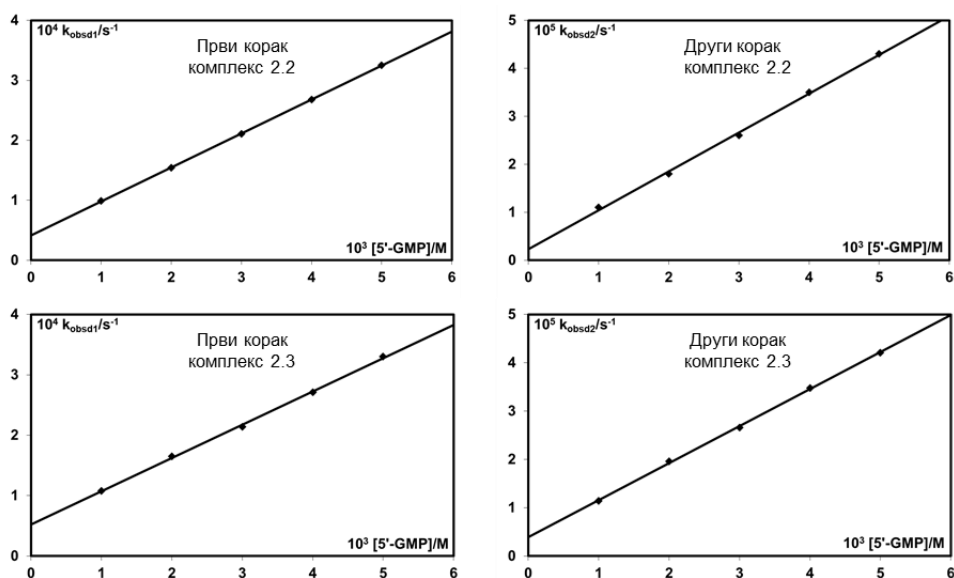


Слика 73. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације GSH за реакције супституције комплекса **2.1-2.4** на 310, pH = 7,2 (25 mM Hepes, 40 mM NaCl).<sup>194</sup>

Реакције супституције динуклеарних комплекса са L-His и 5'-GMP дешавају се у два узастопна реверзибилна корака, Шема 9. Први корак представља реверзибилну супституцију хлоридног јона из координационе сфере једног јона метала, док други корак представља реверзибилну супституцију хлоридног јона из координационе сфере другог јона метала. Линеарне зависности константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације нуклеофила (L-His и 5'-GMP) приказане су на Сликама 74 и 75. Константе брзине директних и повратних реакција израчунате су помоћу једначине (10) и сумиране су у Табели 17.



Слика 74. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације L-His за реакције супституције комплекса **2.2** и **2.3** на 310 K, pH = 7,2 (25 mM Нерес, 40 mM NaCl).<sup>194</sup>



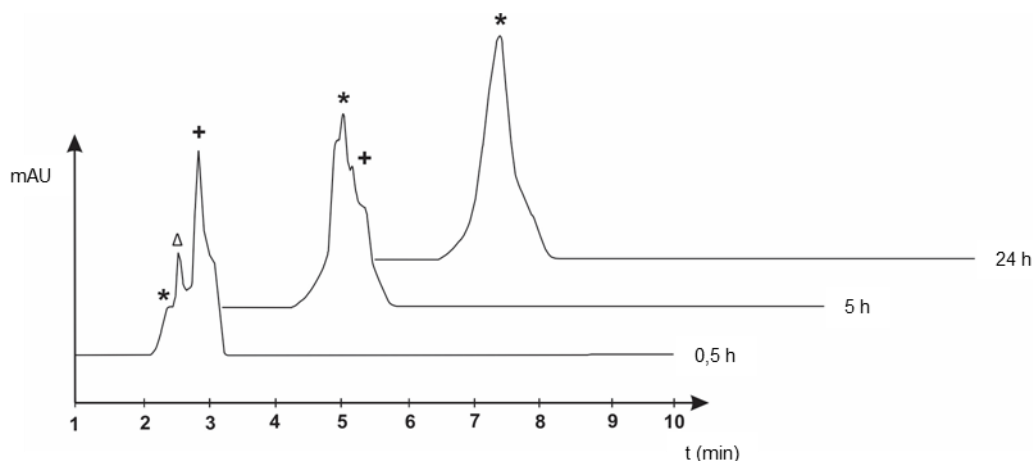
Слика 75. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације 5'-GMP за реакције супституције комплекса **2.2** и **2.3** на 310 K, pH = 7,2 (25 mM Нерес, 40 mM NaCl).<sup>194</sup>

Редослед реактивности испитиваних Pt(II) комплекса према одабраним нуклеофилима опада у низу: **2.1** > **2.2** > **2.3** > **2.4** (Табела 17). Пошто сви комплекси садрже исти мостни лиганд (пиразин), разлика у реактивности може се приписати природи инертног лиганда (en, 1,2-pn, ibn, dach). Ако упоредимо реактивност комплекса

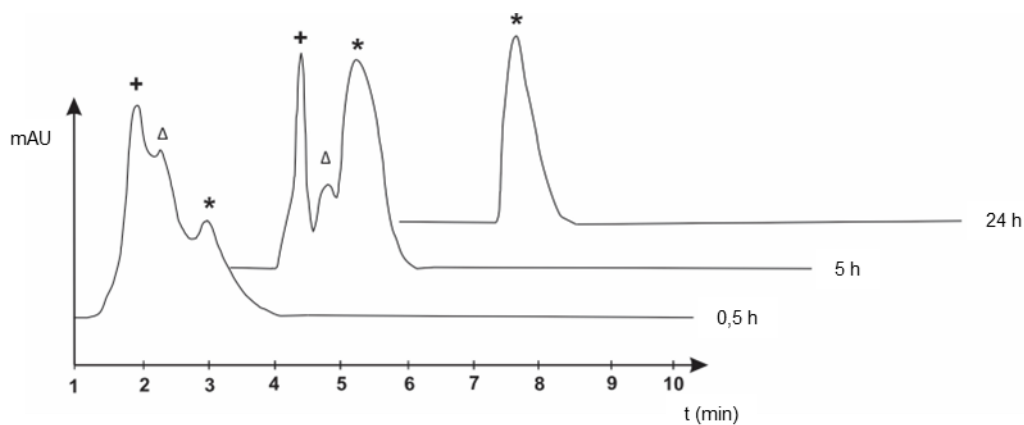
**2.1-2.3**, комплекс **2.1** поседује највећу реактивност. Наиме, комплекс **2.1** садржи етилендиамин као инертни лиганд, комплекс **2.2** садржи једну метил групу на етилендиаминском скелету, док комплекс **2.3** садржи две метил групе на истом угљениковом атому етилендиаминског система. Ово указује да се повећањем  $\sigma$ -донорског капацитета инертног лиганда, због присуства метил група, повећава електронска густина на јону метала, чиме се успорава реакција супституције. Најмању реактивност од свих испитиваних комплекса показује комплекс **2.4**, због израженог позитивног индуктивног ефекта циклохексановог прстена, чиме се значајно смањује електрофилност јона метала.<sup>178,179</sup> Поред тога, волуминозност *dach* лиганда свакако отежава прилаз нуклеофила јону метала, што додатно утиче на смањење реактивности овог комплекса.

На основу резултата приказаних у Табели 17, ред реактивности нуклеофила опада у низу:  $\text{Tu} > \text{L-Met} > \text{GSH} > \text{L-His} > 5'\text{-GMP}$ . Наиме, сумпор-донорски нуклеофили ( $\text{Tu}$ ,  $\text{L-Met}$  и  $\text{GSH}$ ) реагују знатно брже у односу на азот-донорске ( $\text{L-His}$  и  $5'\text{-GMP}$ ). Тиоуреа је показала највећу реактивност од свих испитиваних нуклеофила из разлога већ објашњених у претходном делу. Реактивност тиоетра ( $\text{L-Met}$ ) већа је од реактивности тиола ( $\text{GSH}$ ), јер метил група, својим позитивни индуктивним ефектом, значајно повећава нуклеофилност атома сумпора.<sup>171,173</sup> Разлика у реактивности између  $\text{L-His}$  и  $5'\text{-GMP}$  повезана је са њиховом волуминозношћу.

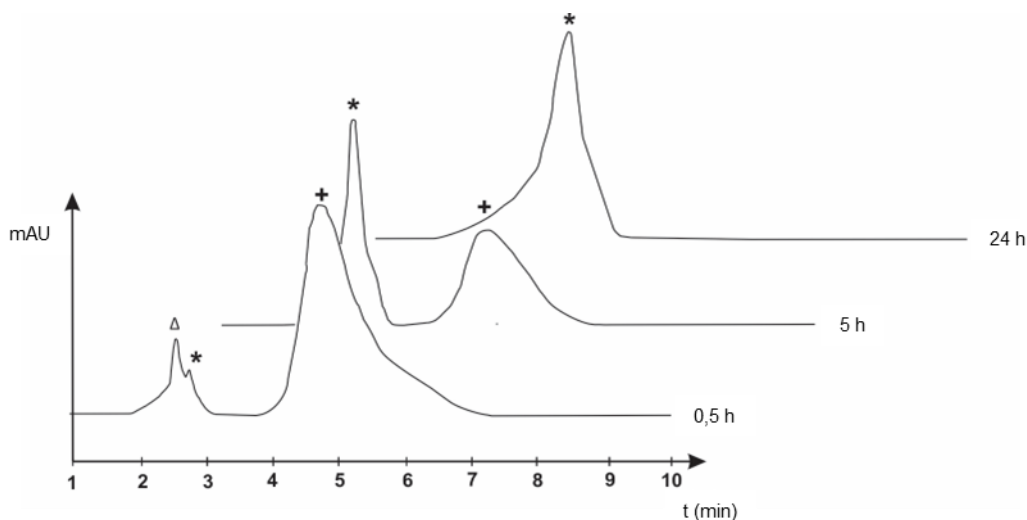
У циљу дефинисања састава реакционих смеша у току и након процеса супституције, реакције између комплекса **2.2** и **2.3** са  $5'\text{-GMP}$ , као и реакција између комплекса **2.2** са  $\text{GSH}$  праћење су HPLC методом. Исти тип реакција комплекса **2.1** и **2.4** са  $5'\text{-GMP}$  претходно је испитиван овом методом.<sup>142</sup> Смеша раствора комплекса и лиганда термостатирана је на 310 K и аликвоти ове смеше ињектирани су у колону у различитим временским интервалима. Добијени хроматограми приказани су на Сликама 76-78.



Слика 76. Хроматограми добијени за реакцију између комплекса **2.2** (5 mM) и  $5'\text{-GMP}$  (10 mM) на  $\text{pH} = 7,2$  и температури од 310 K,  $\lambda = 360 \text{ nm}$ ; (+) – слободан  $5'\text{-GMP}$  (ретенционо време је 2,9 минута), (\*) – производ супституције (ретенционо време је 2,3 минута), ( $\Delta$ ) – полазни комплекс (ретенционо време је 2,5 минута).<sup>194</sup>



Слика 77. Хроматограми добијени за реакцију између комплекса **2.3** (5 mM) и 5'-GMP (10 mM) на рН = 7,2 и температури од 310 К,  $\lambda = 360$  nm; (+) – слободан 5'-GMP (ретенционо време је 2,9 минута), (\*) – производ супституције (ретенционо време је 2,3 минута), ( $\Delta$ ) – полазни комплекс (ретенционо време је 2,5 минута).<sup>194</sup>



Слика 78. Хроматограми добијени за реакцију између комплекса **2.2** (5 mM) и GSH (10 mM) на рН = 7,2 и температури од 310 К,  $\lambda = 360$  nm; (+) – слободан GSH (ретенционо време је 2,9 минута), (\*) – производ супституције (ретенционо време је 2,3 минута), ( $\Delta$ ) – полазни комплекс (ретенционо време је 2,5 минута).<sup>194</sup>

У реакцији између комплекса **2.2** и 5'-GMP (Слика 76), пола сата од почетка реакције, у хроматограму се појављују три различита сигнала. Ови сигнали припадају полазном комплексу (на 2,5 минута), некоординаном 5'-GMP (на 2,9 минута) и реакционом производу (на 2,3 минута). Након 5 сати интензитети сигнала полазног комплекса и слободног лиганда су се смањили, док се интензитет сигнала производа реакције повећао. Након 24 часа у хроматограму је присутан само један сигнал који одговара реакционом производу. Узимајући у обзир да је моларни однос између

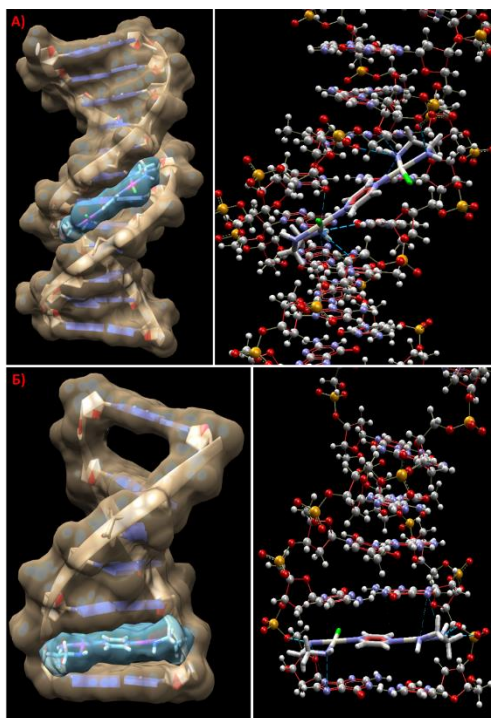


комплекса **2.2** и нуклеофила 5'-GMP био 1:2, присуство само једног сигнала на 2,3 минута након 24 сата потврђује да се ова реакција супституције управо одиграва на начин као што је приказано на Шеми 9. Исти механизам раније је публикован за реакције између комплекса **2.1** и **2.4** са 5'-GMP.<sup>142</sup> Реакција између комплекса **2.3** и 5'-GMP дешава се по истом механизму. Наиме, према хроматограму на Слици 77, након завршетка реакције (24 сата) присутан је само један сигнал реакционог производа на 3,1 минута.

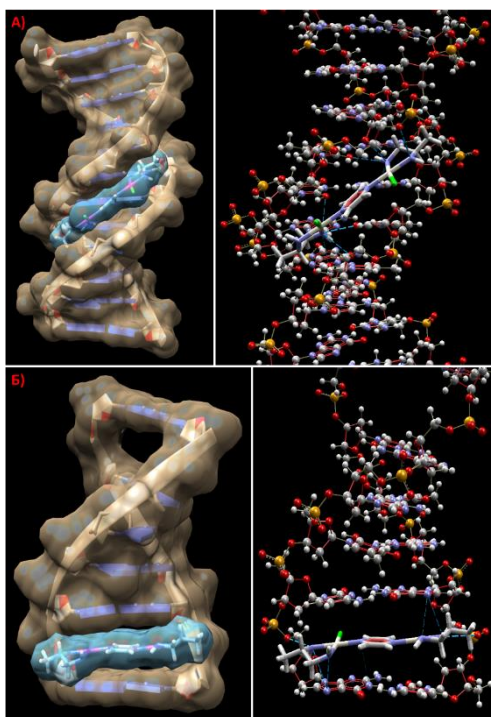
Хроматограми добијени током реакције између комплекса **2.2** (5 mM) и GSH (5 mM) приказани су на Слици 78. Након 30 минута у хроматограму се могу уочити три сигнала: сигнал комплекса **2.2** (на 2,5 минута), слободног GSH (на 2,5 минута) и реакционог производа (на 2,7 минута). По завршетку реакције (24 сата) у хроматограму је такође присутан само један сигнал, који потиче од производа реакције  $[\{Pt(en)(GSH)\}(\mu-pz)\{Pt(en)Cl\}]^{2+}$ . Овај податак додатно потврђује чињеницу да у току супституције не долази до разлагања полазног комплекса.

### 3.2.3) Резултати молекулског докинга

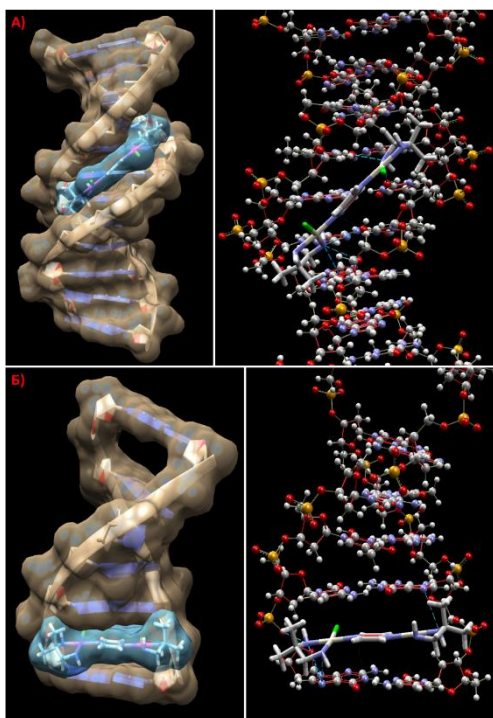
У циљу испитивања структурне компатабилности комплекса **2.1-2.4** да се вежу са биолошки релевантим макромолекулима ДНК и BSA изведена је симулација молекулског докинга. Симулације са молекулом ДНК рађене су такође у односу на два различита структурна представника ДНК молекула, канонски ДНК (PDB ID: 1BNA) за који се испитивани комплекси могу везати за мали или велики жљеб, и интеркалациони ДНК (PDB ID: 1Z3F), за који се испитивани комплекси могу везати интеркалацијом. Резултати докинг симулације према оба ДНК фрагмента приказани су на Сликама 79-82, а вредности MVD функција на основу којих је вршена евалуација представљене су у Табели 18.



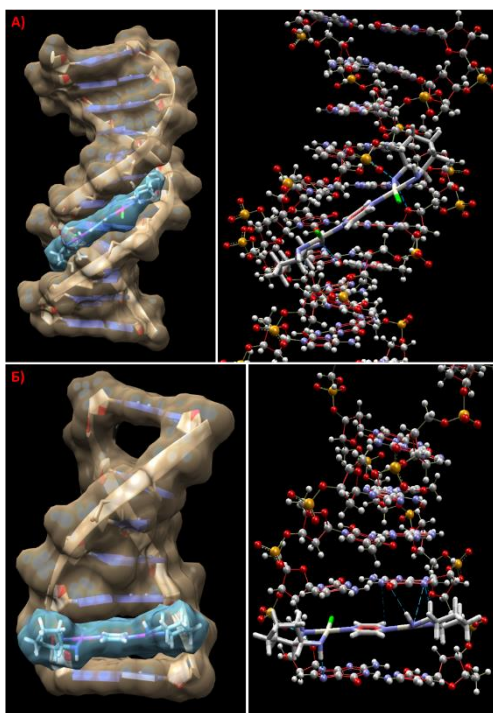
Слика 79. Компјутерски модел интеракције комплекса **2.1** и ДНК (водоничне везе представљене су плавом бојом); А) илустрација везивања за мали жљеб; Б) илустрација интеркалације.



Слика 80. Компјутерски модел интеракције комплекса **2.2** и ДНК (водоничне везе представљене су плавом бојом); А) илустрација везивања за мали жљеб; Б) илустрација интеркалације.



Слика 81. Компјутерски модел интеракције комплекса **2.3** и ДНК (водоничне везе представљене су плавом бојом); А) илустрација везивања за мали жљеб; Б) илустрација интеркалације.



Слика 82. Компјутерски модел интеракције комплекса **2.4** и ДНК (водоничне везе представљене су плавом бојом); А) илустрација везивања за мали жљеб; Б) илустрација интеркалације.

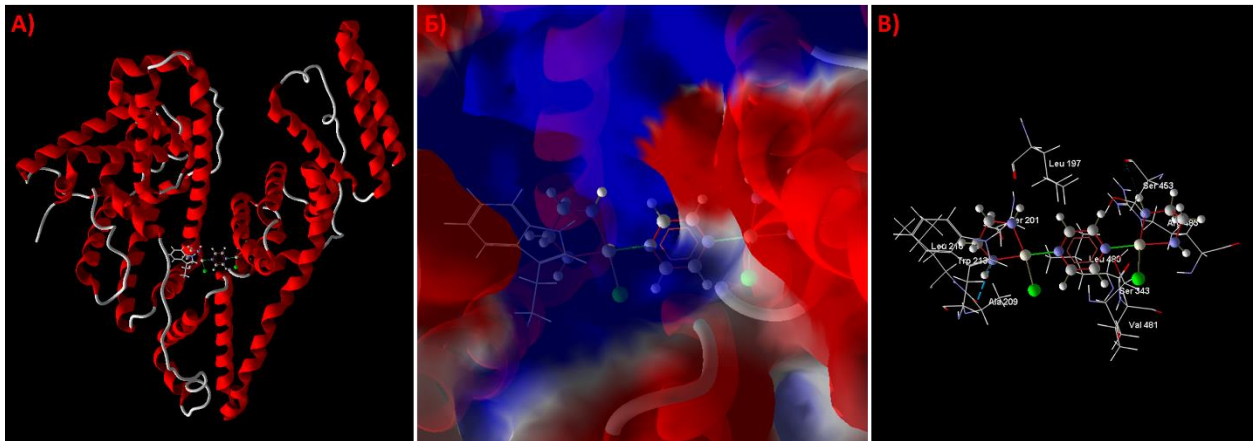
Табела 18. Вредности MVD функција за интеракције комплекса **2.1-2.4** са ДНК фрагментима (1BNA и 1Z3F).

PDB код ДНК	Комплекс	MolDock	Rerank	Docking
1BNA	<b>2.1</b>	-153,72	-88,74	-150,15
	<b>2.2</b>	-168,59	-96,97	-164,88
	<b>2.3</b>	-148,12	-84,65	-145,28
	<b>2.4</b>	-179,21	-103,33	-175,51
1Z3F	<b>2.1</b>	-143,06	-83,29	-139,89
	<b>2.2</b>	-146,45	-84,64	-142,76
	<b>2.3</b>	-139,83	-79,04	-133,11
	<b>2.4</b>	-152,31	-86,99	-148,93

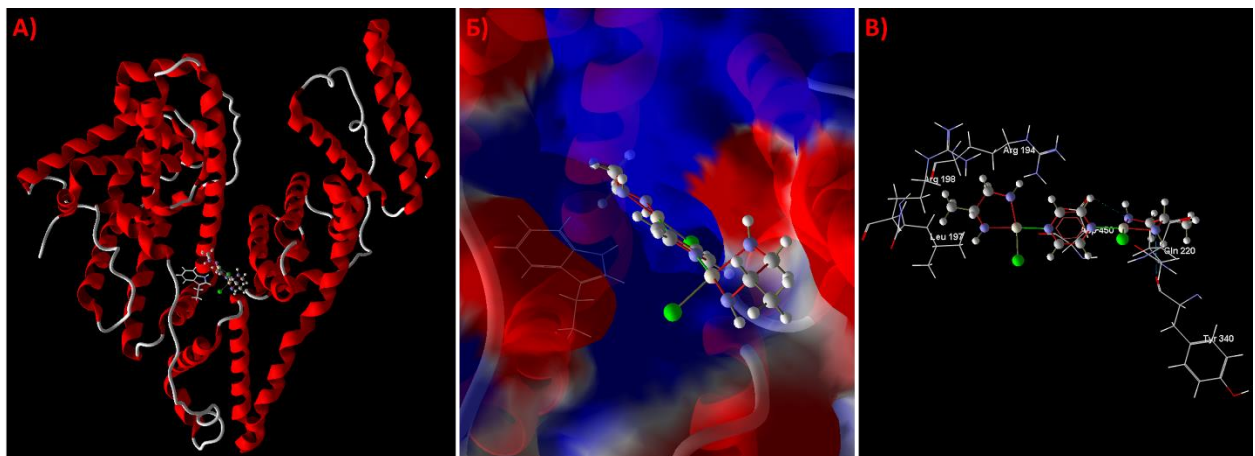
Резултати приказани у Табели 18 прате редослед већ објављених резултата молекулског докинга за исте комплексе при сличним условима.<sup>144</sup> Најбоље резултате да се веже за мали жљеб ДНК показао је комплекс **2.4**, потом комплекси **2.2** и **2.1**, а најмањи афинитет показао је комплекс **2.3**. Очигледно, донекле флексибилан *dash* лиганд бидентатно координан за Pt(II) јон структурно је компатибилнији са малим жљебом ДНК молекула. Присуство једне метил групе на етилендиаминском скелету инертног лиганда и даље фаворизује везивање за мали жљеб у односу на етилендиамин као инертни лиганд, док присуство две метил групе у структури изобутилендиамина код комплекса **2.3**, због стерних сметњи, отежава везивање за мали жљеб ДНК молекула.

Резултати симулације везивања испитиваних комплекса интеркалацијом за ДНК за све комплексе су јако слични (Табела 18) и упоредиви са резултатима за комплексе **1.2** и **1.3** (Табела 10). Као и код комплекса **1.1-1.6**, динуклеарни комплекси Pt(II) настоје да интеркалирају са ДНК преко планарног структурног дела. У серији комплекса **2.1-2.4** то је пиразински мостни лиганд, који поседује способност уметања између базних парова ДНК молекула (Слике 79-82 Б). Мале разлике у добијеним вредности произилазе из стерне заштићености остатка комплекса (инертних лиганда).

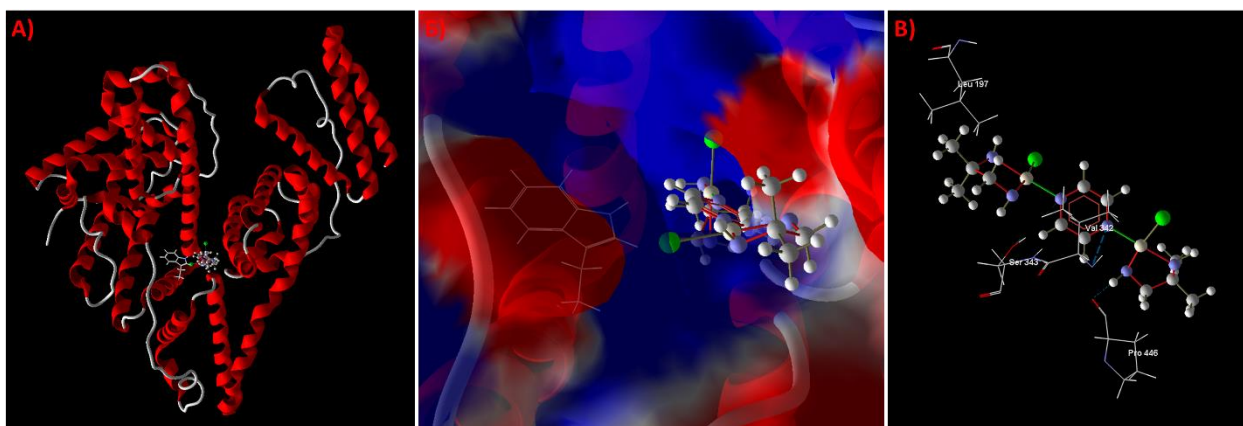
За серију комплекса **2.1-2.4** нису вршена експериментална флуоресцентна испитивања везивања за BSA. Међутим, на основу већ публикованих експерименталних резултата за сличне динуклеарне комплексе,<sup>143,149</sup> над овим комплексима вршена је молекулска докинг симулација унутар домена IIA (везивно место I) BSA протеина у непосредној близини Trp-213 аминокиселине. Добијени резултати за интеракције комплекса **2.1-2.4** и BSA илустровани су на Сликама 83-86, а вредности MVD функција представљене су у Табели 19.



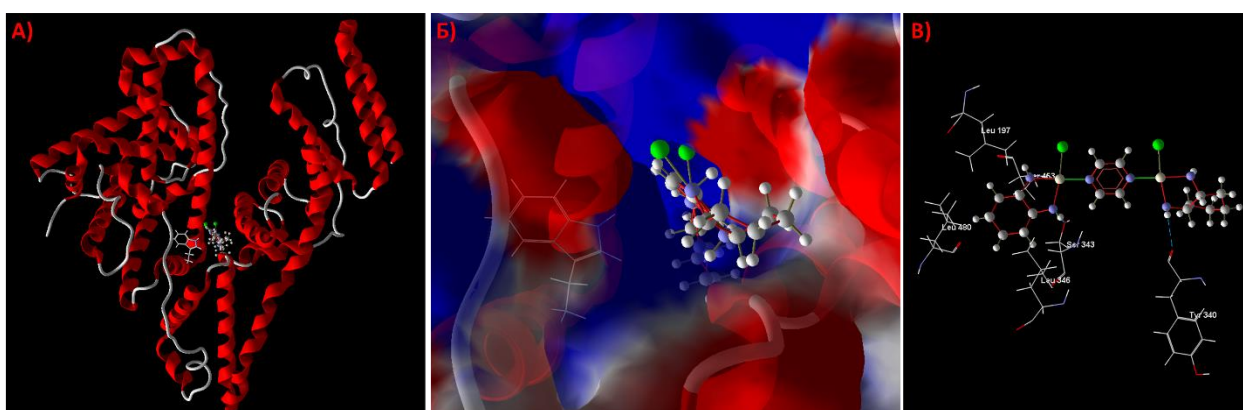
Слика 83. Компјутерски модел интеракције комплекса **2.1** и BSA на основу HBond вредности MVD функције; А) комплекс унутар скелета BSA; Б) комплекс у односу на електростатичку мапу површине BSA; В) комплекс унутар везивног места BSA са одабраним аминокиселинама (водоничне везе представљене су плавом бојом).



Слика 84. Компјутерски модел интеракције комплекса **2.2** и BSA на основу HBond вредности MVD функције; А) комплекс унутар скелета BSA; Б) комплекс у односу на електростатичку мапу површине BSA; В) комплекс унутар везивног места BSA са одабраним аминокиселинама (водоничне везе представљене су плавом бојом).



Слика 85. Компјутерски модел интеракције комплекса **2.3** и BSA на основу HBond вредности MVD функције; А) комплекс унутар скелета BSA; Б) комплекс у односу на електростатичку мапу површине BSA; В) комплекс унутар везивног места BSA са одабраним аминокиселинама (водоничне везе представљене су плавом бојом).



Слика 86. Компјутерски модел интеракције комплекса **2.4** и BSA на основу HBond вредности MVD функције; А) комплекс унутар скелета BSA; Б) комплекс у односу на електростатичку мапу површине BSA; В) комплекс унутар везивног места BSA са одабраним аминокиселинама (водоничне везе представљене су плавом бојом).

Табела 19. Вредности MVD функција за интеракције комплекса **2.1-2.4** са BSA.

Комплекс	MolDock	Rerank	Hbond	Docking	Амино киселине <sup>б,ц</sup>
<b>2.1<sup>а</sup></b>	-107,39	-60,61	-1,95	-110,04	Arg-483, Ser-453, Val-481, Ser-343, Leu-197, Ser-201, Leu-210, Trp-213, Ala-209(H), Leu-480
<b>2.1<sup>б</sup></b>	-105,61	-71,09	-2,41	-107,45	
<b>2.2<sup>а</sup></b>	-106,77	-75,86	-0,65	-105,64	Tyr-340(H), Asp-450, Gln-220, Arg-194, Trp-213, Arg-198, Leu-197
<b>2.2<sup>б</sup></b>	-104,51	-70,56	-1,39	-104,62	
<b>2.3<sup>а</sup></b>	-105,36	-50,37	-0,04	-104,99	Ser-343(H), Trp-213, Leu-197, Val-342(H), Pro-446(H)
<b>2.3<sup>б</sup></b>	-101,47	-53,88	-1,98	-104,85	
<b>2.4<sup>а</sup></b>	-124,47	-95,38	-2,51	-124,22	Tyr-340(H), Leu-197, Leu-480, Trp-213, Ser-453, Leu-346, Ser-343(H)
<b>2.4<sup>б</sup></b>	-111,01	-77,71	-3,63	-111,81	

<sup>а</sup> Најбољи резултати према MolDock, Docking и Rerank функцијама

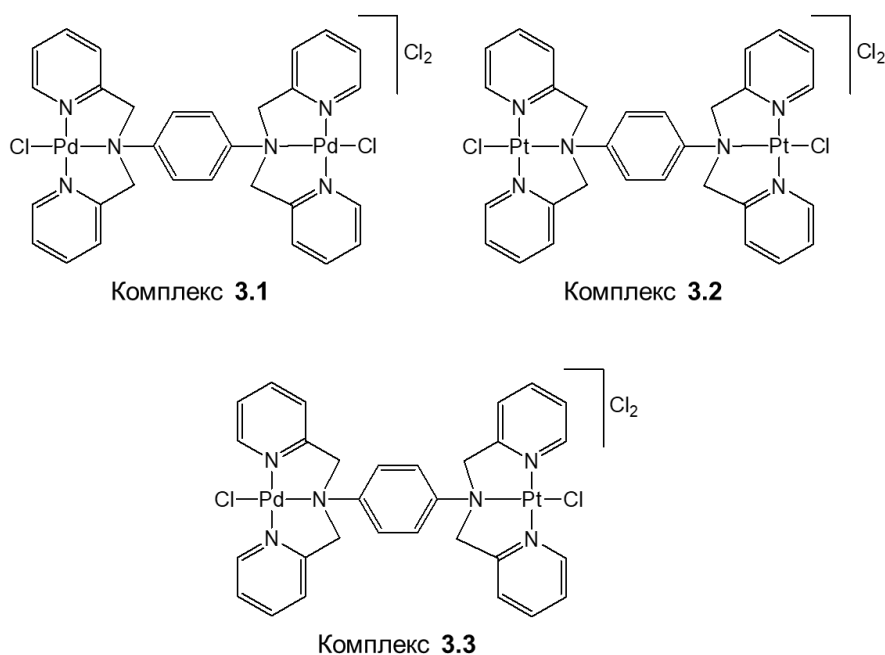
<sup>б</sup> Најбољи резултати према Hbond функцији

<sup>ц</sup> (H) означава да се аминокиселина везала водоничном везом за комплекс

Резултати приказани у Табели 19 показују да комплекс **2.4** поседује највећи афинитет да се веже за BSA молекулу, док остали комплекси испољавају релативно сличне вредности. Добијени резултати су такође у сагласности са резултатима за комплексе **1.2** и **1.3** (Табела 11). На основу ових резултата може се закључити да могућност формирања водоничних веза, као и стерна заштићеност инертних лиганата, имају значајнију улогу у афинитету испитиваних комплекса према BSA молекулу.

### 3.3) Хомо- и хетеро-динуклеарни Pt(II)/Pd(II) комплекси: Резултати испитивања хидролизе, нуклеофилних супституционих реакција, ДНК/BSA интеракција и цитотоксичне активности

Три нова динуклеарна комплекса  $[\text{Pd}_2(\text{tpbd})\text{Cl}_2]\text{Cl}_2$  (**3.1**),  $[\text{Pt}_2(\text{tpbd})\text{Cl}_2]\text{Cl}_2$  (**3.2**) и  $[\text{PdPt}(\text{tpbd})\text{Cl}_2]\text{Cl}_2$  (**3.3**) (у којима је  $\text{tpbd} = \text{N,N,N',N'}$ -*tetrakis*-(2-пиридилметил)бензен-1,4-диамин), чије су структурне формуле приказане на Слици 87, синтетисани су и окарактерисани елементалном микроанализом, ESI-MS спектрометријом, IR и  $^1\text{H}$  NMR спектроскопијом (подаци су сумирани у поглављу 2.3).<sup>148</sup> Ови комплекси дизајнирани су са циљем да се испита утицај истих или различитих јона метала у структури динуклеарних комплекса на њихове хемијске (хидролитичке, кинетичке и термодинамичке), биолошке (интеракције са биомолекулима ДНК и BSA) и потенцијалне антитуморске (цитотоксичност) карактеристике.



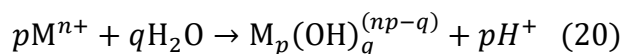
Слика 87. Структурне формуле комплекса **3.1**, **3.2** и **3.3**.<sup>148</sup>

#### 3.3.1) Одређивање константе киселости диаква комплекса **3.1a-3.3a**

$pK_a$  вредности одговарајућих диаква комплекса **3.1a-3.3a** одређене су применом потенциометријске титрације. Узимајући у обзир да хидролиза ових комплекса почиње у слабо киселој средини, сваком узорку додата је позната количина перхлорне киселине у циљу сузбијања почетка хидролизе. Све пробе титроване су додавањем по 0,01 ml стандардног раствора NaOH (0,1000 M). У оквиру овог испитивања аква комплекси **3.1a-3.3a** представљени су у виду  $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_2]^{4+}$  (где је  $\text{M} = [\text{Pd}_2\text{L}]^{4+}$ ,  $[\text{Pt}_2\text{L}]^{4+}$  или  $[\text{PdPtL}]^{4+}$ , а  $\text{L} = \text{tpbd}$ ). Константе стабилности и састав хидролитичких производа одређени су на основу претпоставке да јон метала (M) интерагује са молекулима воде и формира једну



или више хидролитичких честица опште формуле  $M_p(OH)_q$ , на основу следећих једначина (20) и (21):



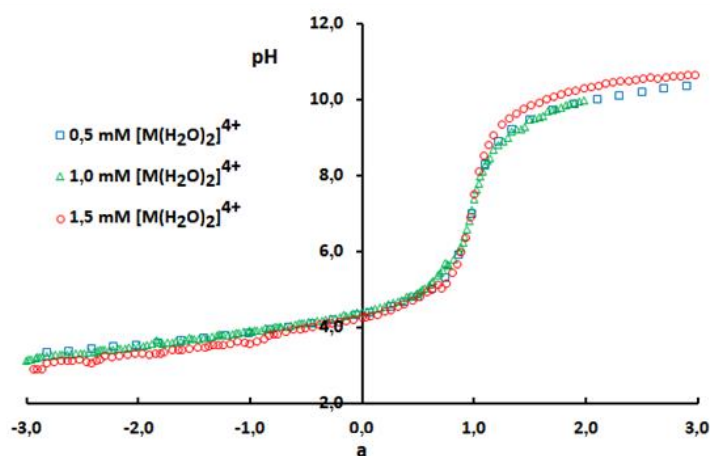
$$\beta_{p,q} = [M_p(OH)_q^{(np-q)}][H^+]^q[M^{n+}]^{-p} \quad (21)$$

Наиме, количина ослобођених  $H^+$  јона еквивалентна је броју хидроксилних јона који су везани за јон метала. Вредност  $\beta_{p,q}$  представља укупну (кумулативну) константу формирања, док су  $p$  и  $q$  стехиометријски коефицијенти. Негативне вредности за  $q$  односе се на уклањање протона или адицију хидроксилне групе током формирања комплекса. Општа формула  $M_p(OH)_q^{(np-q)}$  такође укључује и одређену количину молекула воде као растварача.

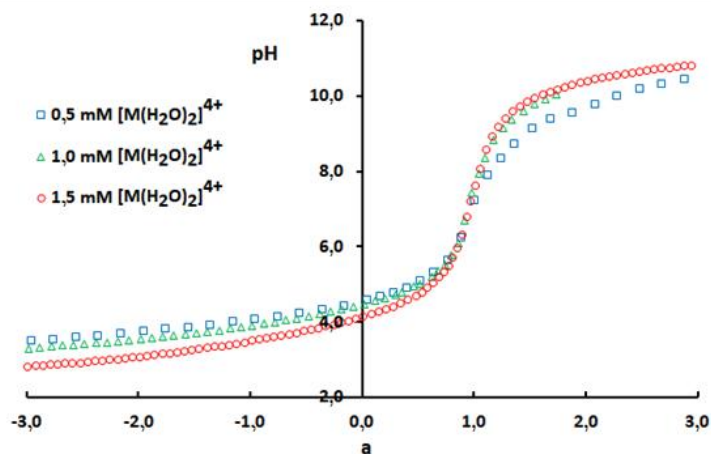
Да би се одредио модел честица присутан у раствору за сваки испитивани систем, експериментални подаци представљени су као однос вредности рН у односу на титрациони параметар ( $a$ ), Сlike 88-90. Титрациони параметар  $a$  добијен је на основу једначине (22):<sup>198</sup>

$$a = \frac{C_{NaOH}V_{NaOH} - C_{HClO_4}V_0}{C_{com}V_0} \quad (22)$$

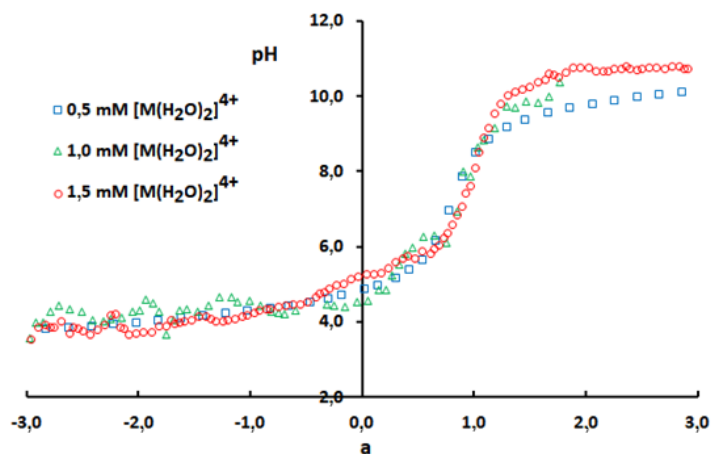
Вредност  $V_0$  представља почетну запремину титрованог раствора, а  $C_{com}$  је концентрација  $[M(H_2O)_2]^{4+}$  (где је  $M = [Pd_2L]^{4+}$ ,  $[Pt_2L]^{4+}$  или  $[PdPtL]^{4+}$ , а  $L = tpbd$ ).



Слика 88. Потенциометријска титрација  $[M(H_2O)_2]^{4+}$  јона ( $M = [Pd_2L]^{4+}$ ,  $L = tpbd$ ) стандардним раствором NaOH у 0,1 M NaClO<sub>4</sub> на 298 K.<sup>148</sup>

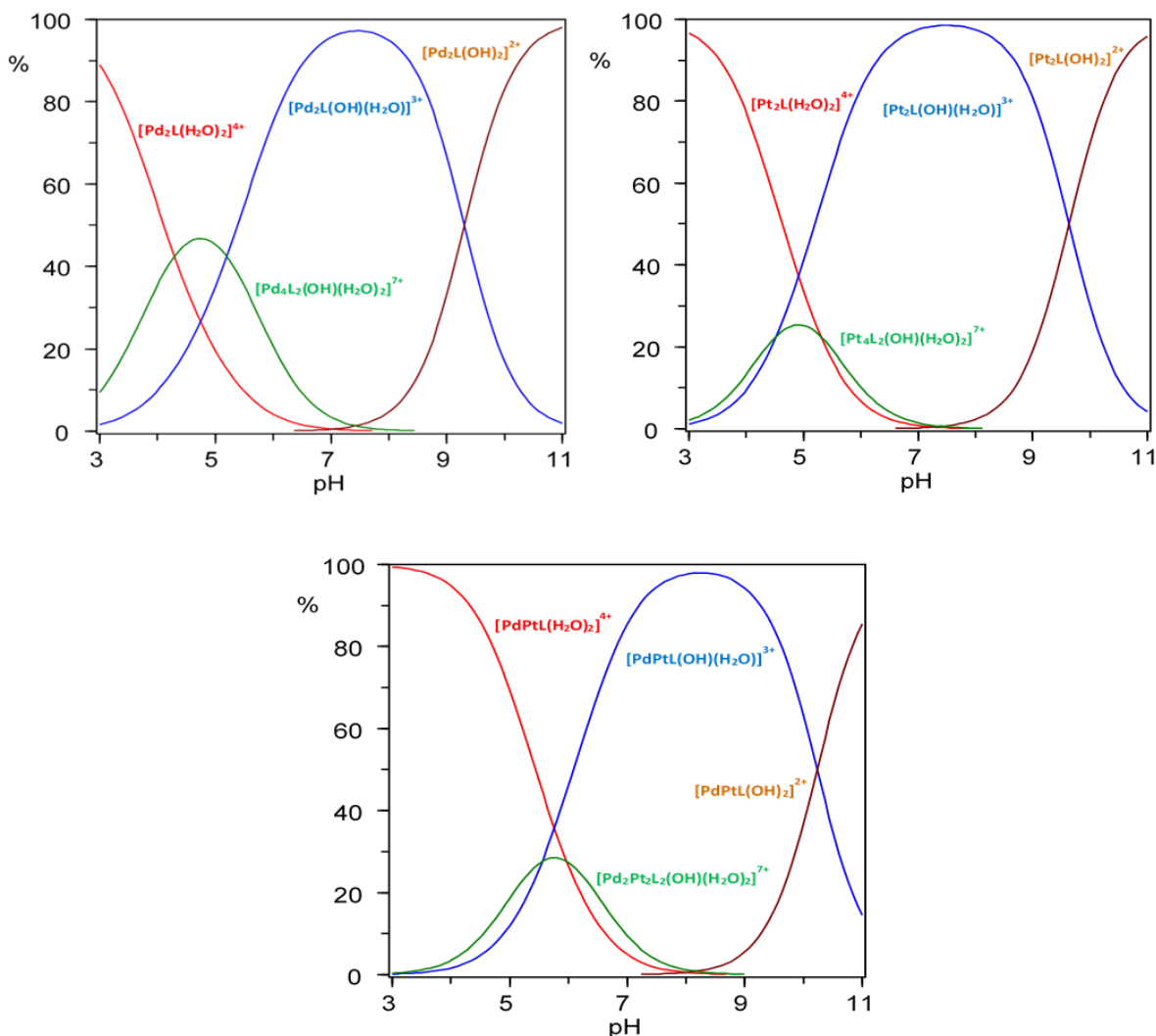


Слика 89. Потенциометријска титрација  $[M(H_2O)_2]^{4+}$  јона ( $M = [Pt_2L]^{4+}$ ,  $L = tpbd$ ) стандардним раствором  $NaOH$  у  $0,1 M NaClO_4$  на  $298 K$ .<sup>148</sup>



Слика 90. Потенциометријска титрација  $[M(H_2O)_2]^{4+}$  јона ( $M = [PdPtL]^{4+}$ ,  $L = tpbd$ ) стандардним раствором  $NaOH$  у  $0,1 M NaClO_4$  на  $298 K$ .<sup>148</sup>

Састав хидролитичких комплекса и њихове константе стабилности одређене су коришћењем компјутерског програма Nupergquad2006.<sup>151,152</sup> Константе су сумиране у Табели 20, док су одговарајући дистрибуциони дијаграми приказани на Слици 91.



Слика 91. Дистрибуциони дијаграм честица формираних током хидролизе диаква комплекса **3.1a**, **3.2a** и **3.3a** у функцији рН у 0,1 М NaClO<sub>4</sub> на 298 К,  $C_{\text{com}} = 1 \times 10^{-3}$  М.<sup>148</sup>

Доминантне честице у свим испитиваним системима су почетни диаква комплекс, моно-хидроксо  $[M_2L(OH)]^{2+}$ , ди-хидроксо  $[M_2L(OH)_2]^{2+}$  и димер  $\mu$ -хидроксо  $[M_4L_2(OH)]^{2+}$  комплекси у рН опсегу између 3,0 и 11,0. Добијени резултати су готово идентични за све испитиване системе. Наиме, полазећи из јако киселе средине концентрација диаква честице постепено се смањује. Међутим, у истом рН опсегу почиње формирање монохидроксо (1,-1) комплекса, који достиже максимум у концентрацији при физиолошкој рН вредности. Даље повећање рН вредности иде у прилог формирању дихидроксо (1,-2) комплекса. Такође треба напоменути да је у свим изучаваним системима присутан димер,  $\mu$ -хидроксо комплекса, у рН опсегу од 3,0 до 7,0.

Израчунате вредности за константе стабилности (Табела 20) потврђују да је међу свим испитиваним једињењима диаква комплекс **3.1a**,  $[Pd_2L(H_2O)(OH)]^{3+}$ , најстабилнији. Поред тога, резултати су показали да је хидролитичка честица хетеронуклеарног Pd(II)/Pt(II) комплекса  $[PdPtL(H_2O)(OH)]^{3+}$  у датим условима најмање стабилна. Константе стабилности испитиваних комплекса упоређене су са већ

објављеним вредностима за сличне системе, при чему су резултати показали добро слагање.<sup>178,199</sup>

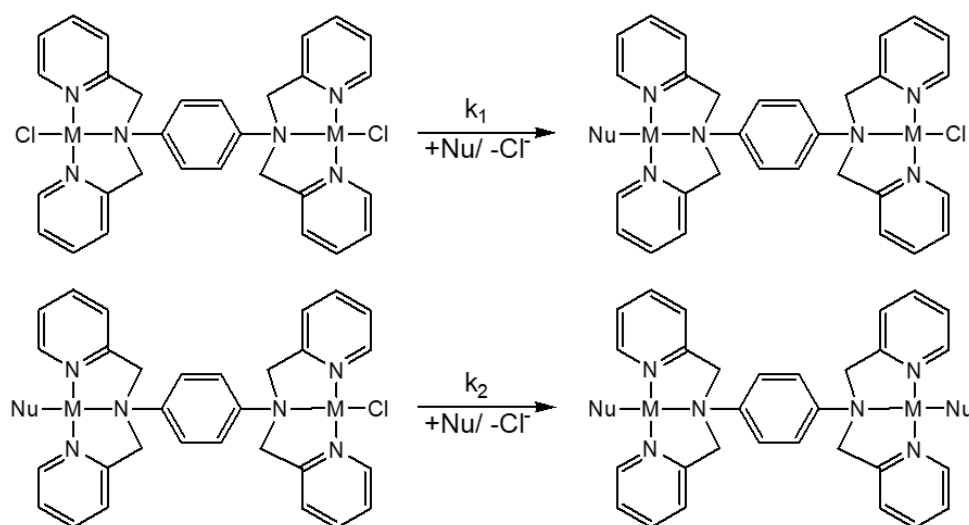
Табела 20. Константе стабилности хидролитичких честица формираних током хидролизе диаква комплекса **3.1a**, **3.2a** и **3.3a** у 0,1 М NaClO<sub>4</sub> на 298 К.<sup>148</sup>

Честица ( <i>p,q</i> )	Log $\beta_{p,q} \pm \sigma$		
	[Pd <sub>2</sub> L(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] <sup>4+</sup> <b>3.1a</b>	[Pt <sub>2</sub> L(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] <sup>4+</sup> <b>3.2a</b>	[PdPtL(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] <sup>4+</sup> <b>3.3a</b>
(1,-1)	-4,74 ± 0,03	-4,91 ± 0,04	-5,76 ± 0,05
(1,-2)	-14,07 ± 0,03	-14,54 ± 0,07	-15,99 ± 0,09
(2,-1)	-1,21 ± 0,09	-1,95 ± 0,04	-2,71 ± 0,07

### 3.3.2) Испитивање супституционих реакција комплекса 3.1-3.3

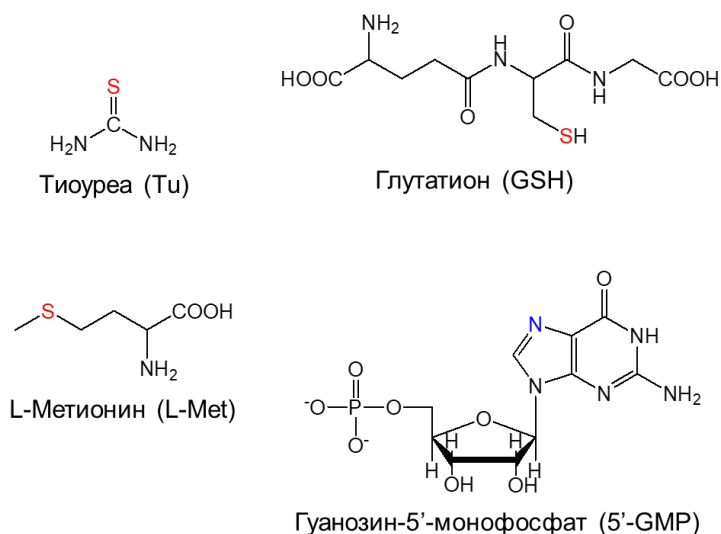
Супституционе реакције комплекса **3.1-3.3** проучаване су UV-Vis спектрофотометријски на рН 7,2 (25 mM Нерес пуфер) у присуству 50 mM NaCl. Кинетички подаци добијени током испитивања супституционих реакција комплекса **3.1-3.3** са нуклеофилима Tu, L-Met, GSH, и 5'-GMP (Слика 92) дали су одлично слагање када су анализирани као експоненцијална функција другог реда. На тај начин су израчунате вредности за одговарајуће константе брзине реакције *pseudo*-првог реда,  $k_{obsd1}$  и  $k_{obsd2}$ .

Генерално, процес супституције ових комплекса може се приказати једначинама датим у Шеми 10.



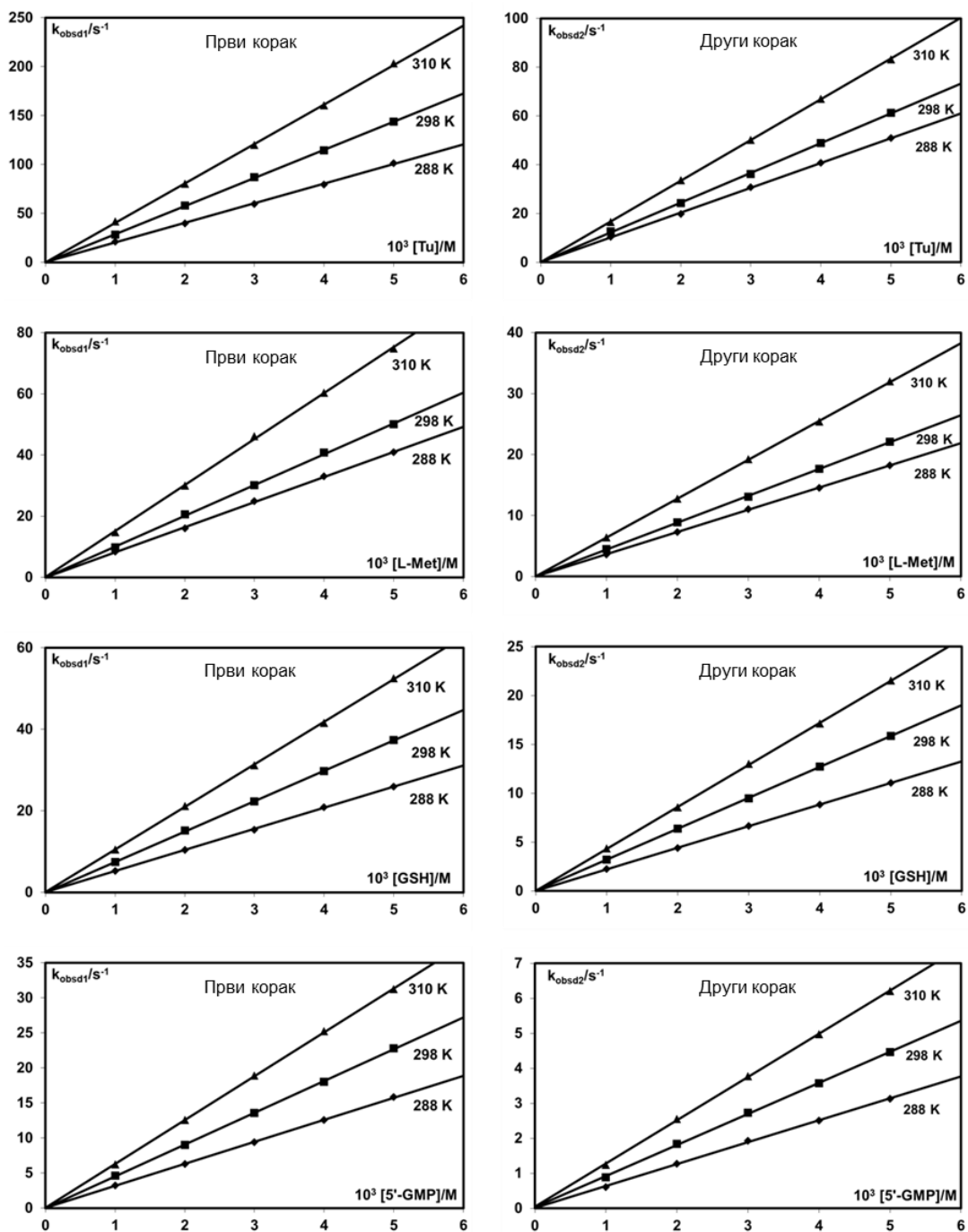
Шема 10. Супституционе реакције динуклеарних комплекса **3.1-3.3** са Tu, L-Met, GSH и 5'-GMP.<sup>148</sup>

Константе брзине реакције за први ( $k_1$ ) и други ( $k_2$ ) корак супституције израчунате су из нагиба праве добијене линеарне зависности константе брзине реакције *pseudo*-првог реда у функцији од концентрације нуклеофила, на основу једначине једначине (10).

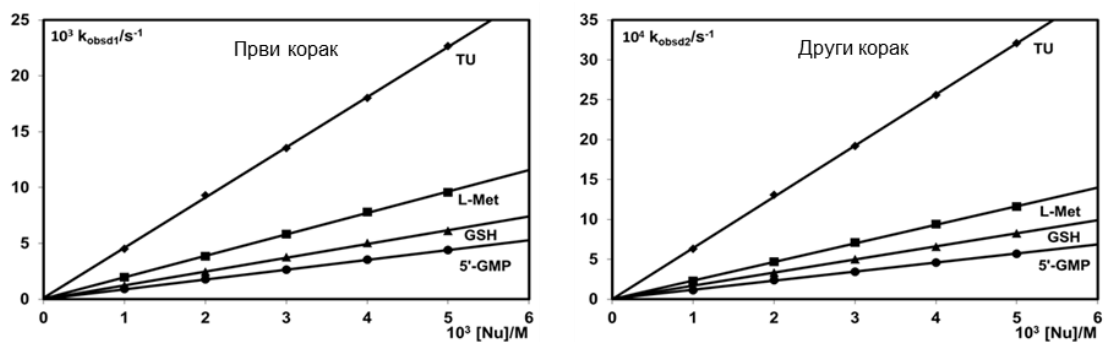


Слика 92. Структурне формуле нуклеофила.<sup>148</sup>

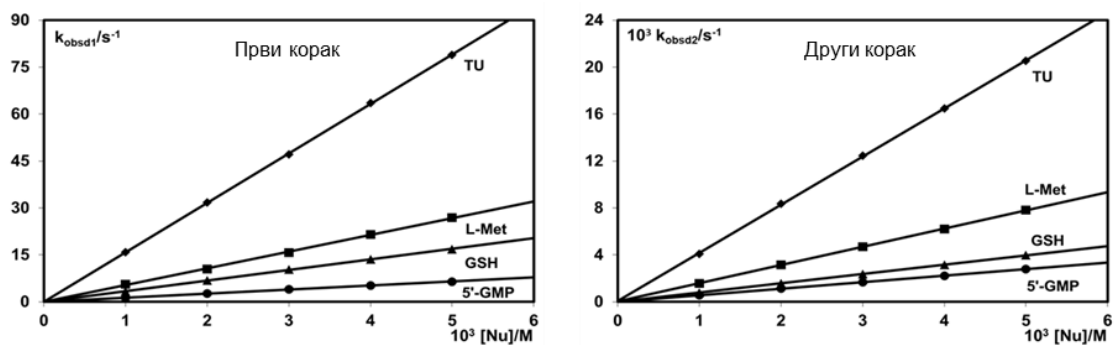
Добијене зависности константе брзине реакције *pseudo*-првог реда  $k_{obsd}$  од концентрације нуклеофила графички су представљене на Сликама 93-95. Пошто у свим случајевима није уочен значајан одсечак може се закључити да су ови процеси супституције иреверзибилни. Вредности за константе брзине, као и вредности термодинамичких активационих параметара  $\Delta H^\ddagger$  и  $\Delta S^\ddagger$  израчунати применом Ејрингове једначине (2), сумирани су у Табели 21.



Слика 93. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда за први ( $k_{\text{obsd1}}$ ) и други ( $k_{\text{obsd2}}$ ) корак супституције у функцији од концентрације нуклеофила и температуре за реакције супституције комплекса **3.1**, pH = 7,2 (25 mM Перес, 50 mM NaCl).<sup>148</sup>



Слика 94. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда за први ( $k_{obsd1}$ ) и други ( $k_{obsd2}$ ) корак супституције у функцији од концентрације нуклеофила за реакције супституције комплекса **3.2** на 298 К, рН = 7,2 (25 mM Нерес, 50 mM NaCl).<sup>148</sup>



Слика 95. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда за први ( $k_{obsd1}$ ) и други ( $k_{obsd2}$ ) корак супституције у функцији од концентрације нуклеофила за реакције супституције комплекса **3.3** на 298 К, рН = 7,2 (25 mM Нерес, 50 mM NaCl).<sup>148</sup>

Табела 21. Константе брзине и активациони параметри за супституционе реакције комплекса **3.1-3.3** са нуклеофилима Tu, L-Met, GSH, и 5'-GMP при рН = 7,2 (25 mM Hepes, 50 mM NaCl).<sup>148</sup>

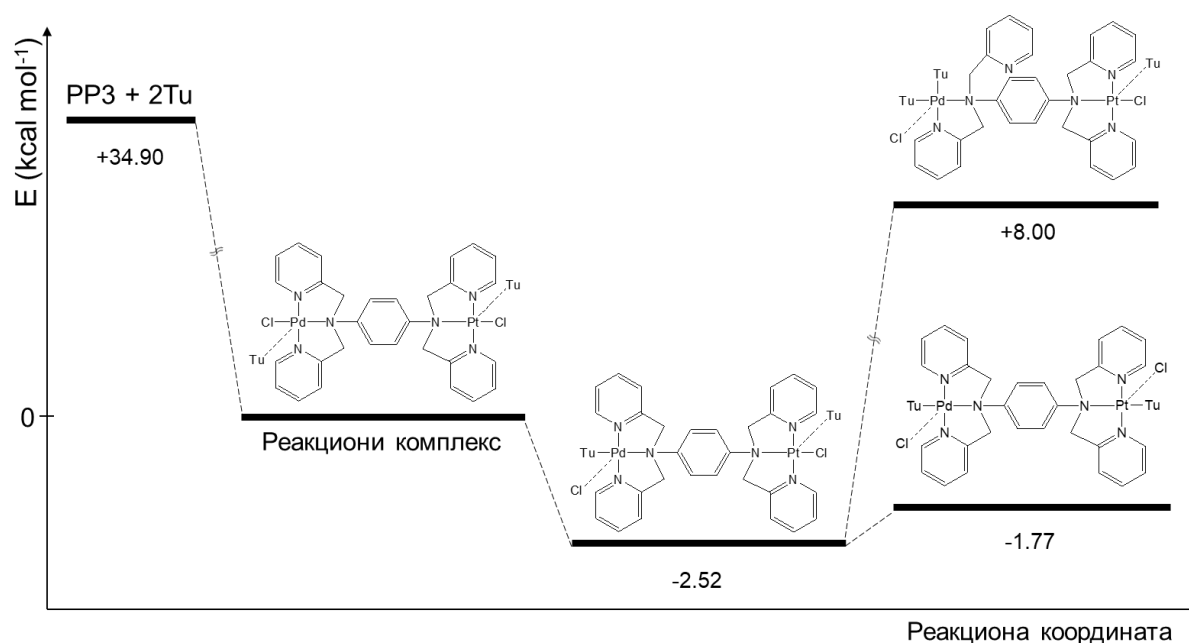
Систем	T [K]	k <sub>1</sub> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	k <sub>2</sub> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	ΔH <sub>1</sub> <sup>‡</sup> [kJ mol <sup>-1</sup> ]	ΔH <sub>2</sub> <sup>‡</sup> [kJ mol <sup>-1</sup> ]	ΔS <sub>1</sub> <sup>‡</sup> [J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]	ΔS <sub>2</sub> <sup>‡</sup> [J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]
<b>комплекс 3.1</b>							
Tu	288	20000 ± 300	10100 ± 100				
	298	28800 ± 200	12200 ± 100	21 ± 1	15 ± 2	-105 ± 5	-133 ± 6
	310	40000 ± 500	16700 ± 90				
L-Met	288	8200 ± 100	3640 ± 30				
	298	10100 ± 100	4400 ± 30	18 ± 3	17 ± 3	-120 ± 10	-130 ± 10
	310	15100 ± 200	6380 ± 40				
GSH	288	5190 ± 50	2210 ± 10				
	298	7460 ± 40	3160 ± 10	21 ± 1	20 ± 2	-115 ± 4	-127 ± 6
	310	10450 ± 80	4300 ± 30				
5'-GMP	288	3150 ± 20	628 ± 9				
	298	4530 ± 30	890 ± 10	21 ± 2	20 ± 1	-121 ± 5	-135 ± 4
	310	6260 ± 40	1240 ± 10				
<b>комплекс 3.2</b>							
Tu		4,50 ± 0,05	0,641 ± 0,005	-	-	-	-
L-Met	298	1,92 ± 0,02	0,233 ± 0,003	-	-	-	-
GSH		1,24 ± 0,03	0,164 ± 0,001	-	-	-	-
5'-GMP		0,880 ± 0,007	0,114 ± 0,001	-	-	-	-
<b>комплекс 3.3</b>							
Tu		15790 ± 90	4,10 ± 0,03	-	-	-	-
L-Met	298	5300 ± 100	1,556 ± 0,008	-	-	-	-
GSH		3380 ± 40	0,790 ± 0,004	-	-	-	-
5'-GMP		1300 ± 20	0,555 ± 0,004	-	-	-	-



Ако упоредимо резултате за константе брзине реакције супституције, приказане у Табели 21, највећу реактивност показује комплекс **3.1**. Ова чињеница је и очекивана, с обзиром да је добро познато да комплекси Pd(II) реагују  $10^3$ - $10^5$  пута брже од одговарајућих Pt(II) аналога.<sup>180</sup> Други корак супституције код свих изучаваних система је од 2 до 10 пута спорији у односу на први корак, што је у сагласности са смањеном електрофилношћу јона метала након координације одговарајућег сумпор- или азот-донорског нуклеофила. Ако упоредимо константе брзине за први реакциони корак код комплекса **3.1** и **3.3** на 298 K, присутно је смањење вредности константе за око 45-70%, у зависности од врсте нуклеофила.

На основу добијених резултата може се такође закључити да сви одабрани нуклеофили представљају јако добре улазне лиганде за процес супституције испитиваних динуклеарних комплекса, при чему редослед њихове реактивности опада у низу: Tu > L-Met > GSH > 5'-GMP. Овакав редослед је очекиван узимајући у обзир природу донорских атома. Поред тога, израчунате вредности промене ентропије активирања за комплекс **3.1** су негативне, што потврђује асоцијативни механизам супституције.

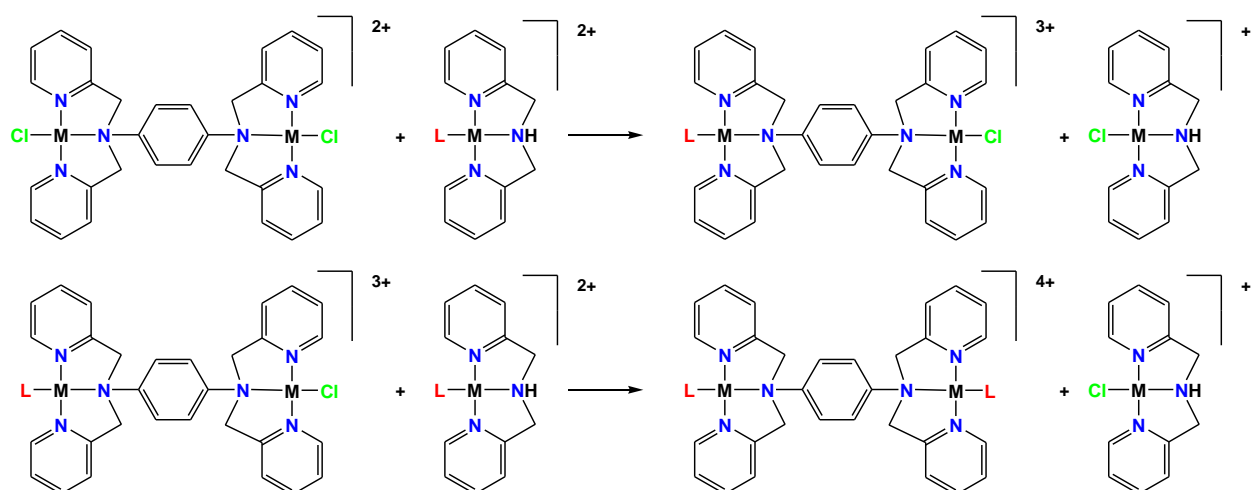
У случају хетеро-динуклеарног комплекса **3.3**, термодинамички вероватнији други корак супституције дефинисан је применом компјутерске хемије. Наиме, релативно ниска вредност за константу брзине другог корака супституције овог комплекса (вредности  $k_2$  у Табели 21) подразумева супституцију хлорида на Pt(II) јону. Међутим, овом методом је анализирана и могућност координације другог молекула Tu за Pd(II) јон раскидањем Pd-N везе у *trans* положају, што је графички приказано на Слици 96.



Слика 96. Израчуната (B3LYP/def2-SVP) реакција супституције комплекса **3.3** са Tu. Све честице су израчунате као изомери да би се елиминисао утицај Кулонових сила, а вредности енергије израчунате су у односу на реакциони комплекс.<sup>148</sup>

Реакциони комплекс формиран је довођењем два молекула Tu у непосредну близину јона метала без нарушавања његовог координационог окружења. Овај процес праћен је стабилизацијом система за  $34,90 \text{ kcal mol}^{-1}$ , у поређењу са системом у коме су сви молекули били раздвојени. Од реакционог комплекса (Слика 96) супституција једног јона хлорида помоћу Tu дала је производ првог корака реакције, стабилнијег за  $2,52 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Други корак представља супституцију на Pd(II) јону уз раскидање Pd-N везе или супституцију другог хлоридног јона на Pt(II) јону. На основу добијених резултата може се закључити да је супституција на Pt(II) јону за око  $9,77 \text{ kcal mol}^{-1}$  повољнији процес у односу на процес раскидања везе између атома азота из мостног лиганда и Pd(II) јона.

У циљу упоређивања релативне стабилности испитиваних комплекса и њихових мононуклеарних аналога, термодинамичке особине и релативне стабилности комплекса **3.1-3.3** израчунате су на основу конструисане модел једначине приказане у Шеми 11, а добијени резултати сумирани су у Табели 22.



**M** = Pd(II), Pt(II)

**L** = Tu, Gua, S(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, HSCH<sub>3</sub>

Шема 11. Модел једначина коришћених при евалуацији релативне стабилности комплекса **3.1-3.3** у односу на њихове мононуклеарне аналоге.<sup>148</sup>

Табела 22. Израчунате релативне стабилности (у kcal mol<sup>-1</sup>) за модел једначину приказану у Шеми 11.<sup>148</sup>

Систем	B3LYP		B3LYP(CPCM)	
	I корак	II корак	I корак	II корак
<b>Комплекс 3.1</b>				
Tu	28,38	57,15	1,86	-1,88
HSCH <sub>3</sub>	32,25	66,96	3,13	1,57
S(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	32,52	64,43	2,36	1,11
Gua	28,54	51,73	1,86	1,42
<b>Комплекс 3.2</b>				
Tu	28,42	57,02	-0,28	0,70
HSCH <sub>3</sub>	32,16	66,51	0,96	1,84
S(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	32,77	63,96	0,86	1,92
Gua	28,85	51,31	0,99	1,48
<b>Комплекс 3.3<sup>б</sup></b>				
Tu	28,43	57,01	-0,18	0,70
HSCH <sub>3</sub>	32,32	64,72	-0,28	3,08
S(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	32,55	63,49	1,21	1,55
Gua	28,58	51,29	0,96	1,94

<sup>а</sup> B3LYP:RB3LYP/ def2-SVP+ZPE(B3LYP/ def2-SVP)

B3LYP(CPCM):RB3LYP(CPCM)/def2-SVP//

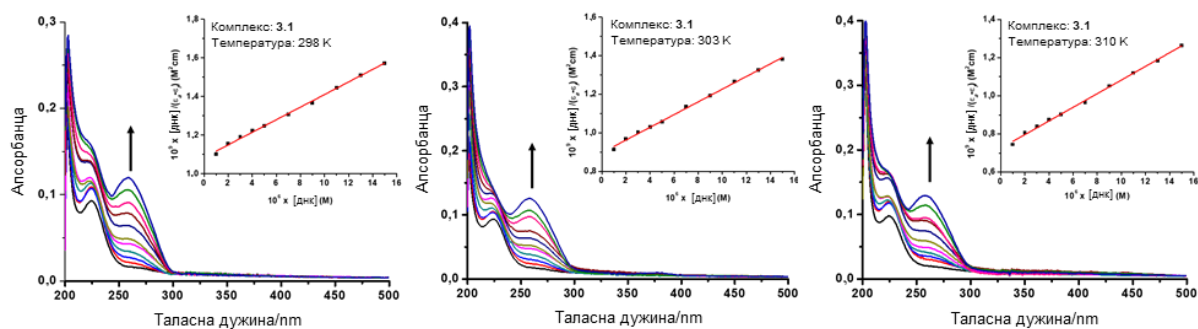
RB3LYP/def2-SVP +ZPE(B3LYP/ def2-SVP)

<sup>б</sup> Првим коркако сматра се супституција на Pd(II) јону, а други корак представља супституцију на Pt(II) јону.

Резултати добијени применом „CPCM” модела растварача (при чему је вода коришћена као растварач), где су вредности веома блиске нули, показују да испитивани комплекси формирају једнако стабилне продукте са нуклеофилима, као и њихови мононуклеарни аналоги.

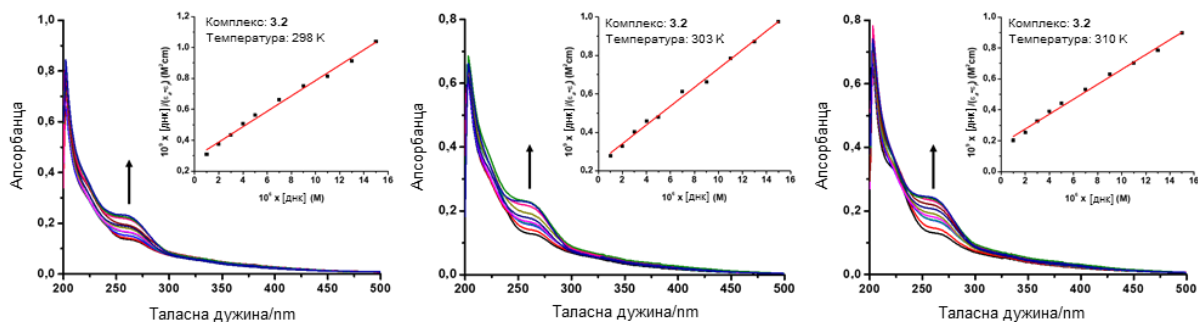
### 3.3.3) Испитивање интеракција комплекса 3.1-3.3 са ДНК апсорпционом методом

Апсорпциони спектри комплекса **3.1-3.3** у PBS пуферу (рН = 7,4), у одсуству и присуству растуће концентрације ДНК, приказани су на Сликама 97-99.



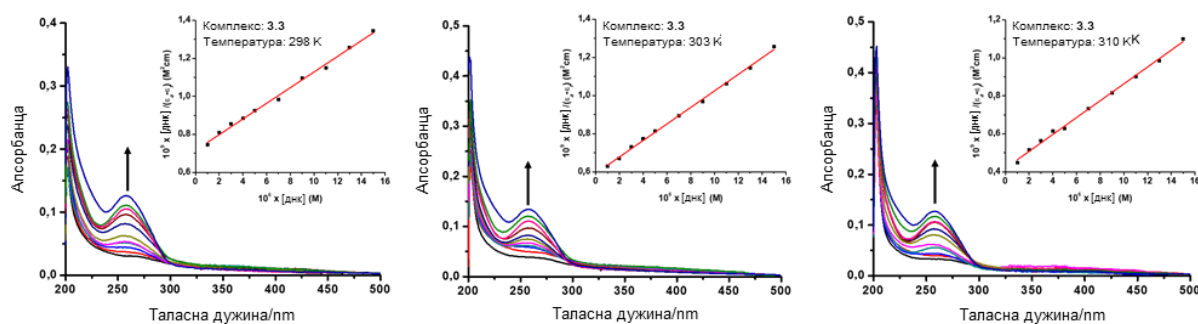
Слика 97. Апсорпциони спектар комплекса **3.1** на 298, 303 и 310 К у PBS пуферу након додатка ДНК. [комплекс] =  $1 \times 10^{-5}$  М, [ДНК] =  $(0 - 1,5) \times 10^{-5}$  М. Стрелица указује на промену апсорбанце са повећањем концентрације ДНК.

Уметнути график:  $[\text{ДНК}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  у односу на  $[\text{ДНК}]$ .<sup>148</sup>



Слика 98. Апсорпциони спектар комплекса **3.2** на 298, 303 и 310 К у PBS пуферу након додатка ДНК. [комплекс] =  $1 \times 10^{-5}$  М, [ДНК] =  $(0 - 1,5) \times 10^{-5}$  М. Стрелица указује на промену апсорбанце са повећањем концентрације ДНК.

Уметнути график:  $[\text{ДНК}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  у односу на  $[\text{ДНК}]$ .<sup>148</sup>



Слика 99. Апсорпциони спектар комплекса **3.3** на 298, 303 и 310 K у PBS пуферу након додатка ДНК. [комплекс] =  $1 \times 10^{-5}$  M, [ДНК] =  $(0 - 1,5) \times 10^{-5}$  M. Стрелица указује на промену апсорбанце са повећањем концентрације ДНК. Уметнути график:  $[\text{ДНК}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  у односу на [ДНК].<sup>148</sup>

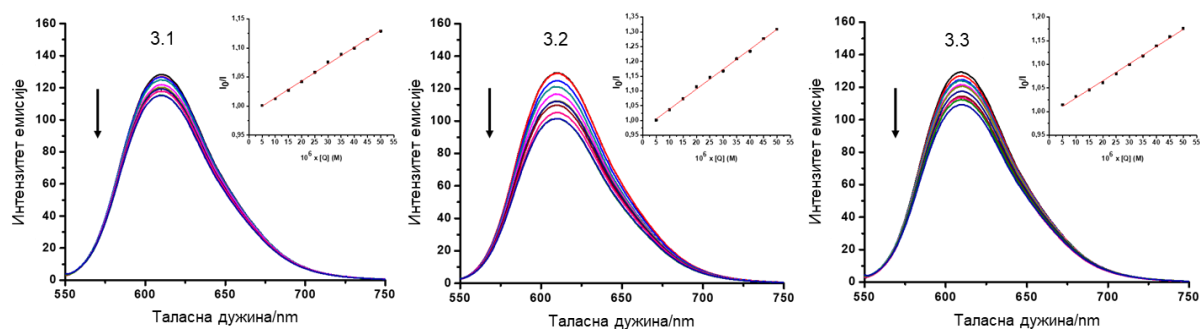
Додатак ДНК раствору испитиваних комплекса узрокује значајан хиперхромни ефекат, уз појаву новог сигнала (максимума) на 258 nm. Ово запажање присутно је у случају свих комплекса. Генерално, појава хиперхромизма повезује се са присуством синергичних нековалентних интеракција, као што су везивање преко спољашњег контакта (електростатичко везивање), формирање водоничних веза и/или везивање за површину малог или великог жљеба. Међутим, добијене спектралне промене након додатка ДНК у раствор комплекса, као и одсуство изобестичких тачака у датим спектрима, указују на могућност више од једног начина везивања.<sup>200</sup> Константе везивања ( $K_b$ ) израчунате применом Волф-Шимерове једначине (11) и термодинамички параметри добијени помоћу Ван'т Хофове једначине (18) представљени су у Табели 23. Високе вредности за  $K_b$  ( $\sim 10^4$  M<sup>-1</sup>), које опадају у низу: **3.2** > **3.3** > **3.1**, указују на снажно везивање комплекса за ДНК, док негативне вредности Гибсове слободне енергије сугеришу да се везивање комплекса и ДНК молекула одвија спонтано.

Табела 23. Константе везивања и термодинамички параметри за интеракције комплекса **3.1-3.3** са ДНК.<sup>148</sup>

Комплекс	T [K]	$K_b \times 10^3$ [M <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>	$\Delta G^0$ [kJmol <sup>-1</sup> ]	$\Delta H^0$ [kJmol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S^0$ (JK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
<b>3.1</b>	298	3,00 ± 0,03	0,9969	-25,54 ± 0,03			
	303	3,68 ± 0,04	0,9971	-26,49 ± 0,09	31,84 ± 0,04	192,5 ± 0,2	0,9994
	310	4,93 ± 0,06	0,9972	-27,85 ± 0,08			
<b>3.2</b>	298	17,01 ± 0,05	0,9918	-29,87 ± 0,07			
	303	20,13 ± 0,05	0,9950	-30,76 ± 0,07	28,34 ± 0,04	195,2 ± 0,2	0,9867
	310	27,04 ± 0,03	0,9930	-32,21 ± 0,06			
<b>3.3</b>	298	5,75 ± 0,01	0,9951	-27,15 ± 0,04			
	303	7,35 ± 0,03	0,9976	-28,23 ± 0,09	39,25 ± 0,05	222,8 ± 0,3	0,9984
	310	16,02 ± 0,02	0,9962	-29,82 ± 0,04			

### 3.3.4) Испитивање интеракција комплекса 3.1-3.3 са ДНК емисионом методом

Као што је претходно напоменуто, етидијум-бромид (ЕВ), због своје карактеристичне планарне структуре, спада у класичне интеркалаторе у интеракцијама са ДНК, где након његове интеркалације у ДНК молекула долази до повећања флуоресценције раствора.<sup>143,202,201</sup> Међутим, уколико неко једињење (у овом случају комплекси **3.1-3.3**) интеркалира снажније са ДНК, везивно место није више доступно етидијум-бромиду, што као последицу има смањење флуоресценције система ДНК-ЕВ. Спектри промене флуоресценције етидијум-бромида везаног за ДНК у присуству растуће концентрације комплекса **3.1-3.3** приказани су на Слици 100.



Слика 100. Емисиони спектри ЕВ везаног за ДНК у присуству комплекса **3.1-3.3**; [ЕВ] = 25  $\mu\text{M}$ , [ДНК] = 258  $\mu\text{M}$ , [комплекс] = 0-50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}$  = 527 nm. Стрелице указују на промену интензитета емисије након додатка растуће концентрације комплекса [Q]. Уметнути график:  $I_0/I$  у односу на [Q].<sup>148</sup>

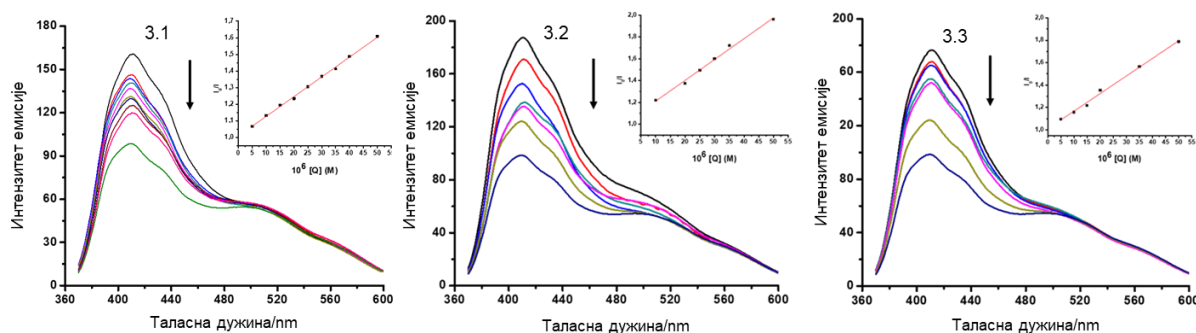
У принципу, интензитет емисије на таласној дужини од 610 nm смањује се 11-24%, у зависности од испитиваног комплекса. Ови подаци указују на могућност, али не и на значајну конкурентност комплекса у односу на ЕВ при интеркалацији са ДНК. Коришћењем једначине (12) израчунате су Стерн-Волмерове константе ( $K_{\text{SV}}$ ) на основу добијених линеарних зависности (Слика 100 уметнути график), а вредности су сумиране у Табели 24.

Табела 24. Стерн-Волмерове константе ( $K_{\text{SV}}$ ) за ЕВ и Ное у упоредним флуоресцентним испитивањима интеракција комплекса **3.1-3.3** са ДНК.<sup>148</sup>

Комплекс	Резултати са ЕВ			Резултати са Ное		
	$K_{\text{SV}} \times 10^3$ [M <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>	(%) <sup>a</sup>	$K_{\text{SV}} \times 10^3$ [M <sup>-1</sup> ]	R <sup>2</sup>	(%) <sup>a</sup>
<b>3.1</b>	2,91 ± 0,03	0,9981	11,43	1,18 ± 0,02	0,9981	34,88
<b>3.2</b>	6,75 ± 0,06	0,9974	23,61	1,87 ± 0,07	0,9919	43,91
<b>3.3</b>	3,63 ± 0,08	0,9929	14,96	1,55 ± 0,05	0,9936	40,69

<sup>a</sup> Процент смањења интензитета флуоресценције на 610 nm

Да би се датаљније разјаснио начин везивања испитиваних комплекса са ДНК, урађен је упоредни експеримент са једињењем Hoechst 33258 (Ное). Hoechst 33258, (2-(4-хидроксифенил)-5-[5-(4-метилпипера-зине-1-ил)бензимидазо-2-ил]-бензимидазол), је синтетички дериват *N*-метилпиперазина који поседује афинитет да се веже за мали жљеб ДНК молекула.<sup>202</sup> Карактеристични емисиони спектри Ное везаног за ДНК у присуству растуће концентрације испитиваних комплекса приказани су на Слици 101.



Слика 101. Емисиони спектри Ное везаног за ДНК у присуству комплекса **3.1-3.3**; [Ное] = 25  $\mu\text{M}$ , [ДНК] = 258  $\mu\text{M}$ , [комплекс] = 0-50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}$  = 346 nm. Стрелице указују на промену интензитета емисије након додатка растуће концентрације комплекса [Q]. Уметнути график:  $I_0/I$  у односу на [Q].<sup>148</sup>

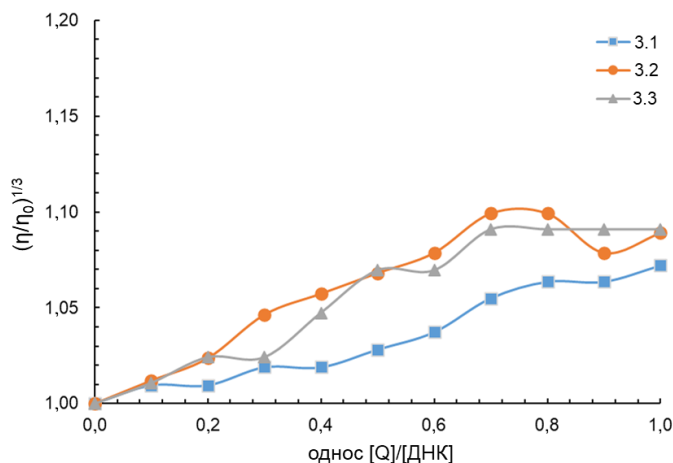
Додатак растуће концентрације комплекса у раствор ДНК-Ное система узрокује приметно смањење (~39-48% од почетне вредности) интензитета флуоресценције система. На основу Стерн-Волмерове једначине (12) добијена је линеарна зависност „гашења” флуоресценције у функцији концентрације комплекса, а вредности за константе сумиране су у Табели 24.

Резултати „гашења” флуоресценције етидијум-бромида и Ное показали су да се комплекси **3.1**, **3.2** и **3.3** везују неселективно за ДНК молекулу, и то путем интеркалације и везивањем за мали жљеб. Вредности за  $K_{SV}$  за оба агенса варирају по редоследу, на потпуно идентичан начин као код испитивања интеракција апсорпционом методом. Упоредивањем  $K_{SV}$  вредности и вредности константи „гашења” флуоресценције може се закључити да су комплекси ефикаснији у везивању за мали жљеб, него у интеркалацији. Међутим, узимајући у обзир структуру комплекса (Слика 87) и целокупне резултате добијене испитивањем везивања комплекса са ДНК, оптимални начин интеракције, поред везивања за мали жљеб, може да укључи и интеркалацију за хеликс молекула ДНК.<sup>203</sup>

### 3.3.5) Испитивање интеракција комплекса 3.1-3.3 са ДНК мерењем вискозности

Хидродинамичке особине, а нарочито вискозност, могу дати бољи увид у начин везивања малих молекула за ДНК. Класични интеркалатори продужавају ДНК ланац, услед раздвајања базних парова на месту интеркалације, што као последицу има повећање релативног специфичног вискозитета таквог раствора.<sup>204</sup> Мале позитивне или чак и негативне промене у вискозитету ДНК раствора јављају се када се везивање дешава

за жљебове ДНК молекула.<sup>205</sup> Додатак растуће концентрације испитиваних комплекса (однос концентрације ДНК и комплекса до 1) раствору ДНК довео је до благог пораста вискозитета раствора (Слика 102), који није карактеристичан за класичне интеркалаторе.<sup>206</sup>

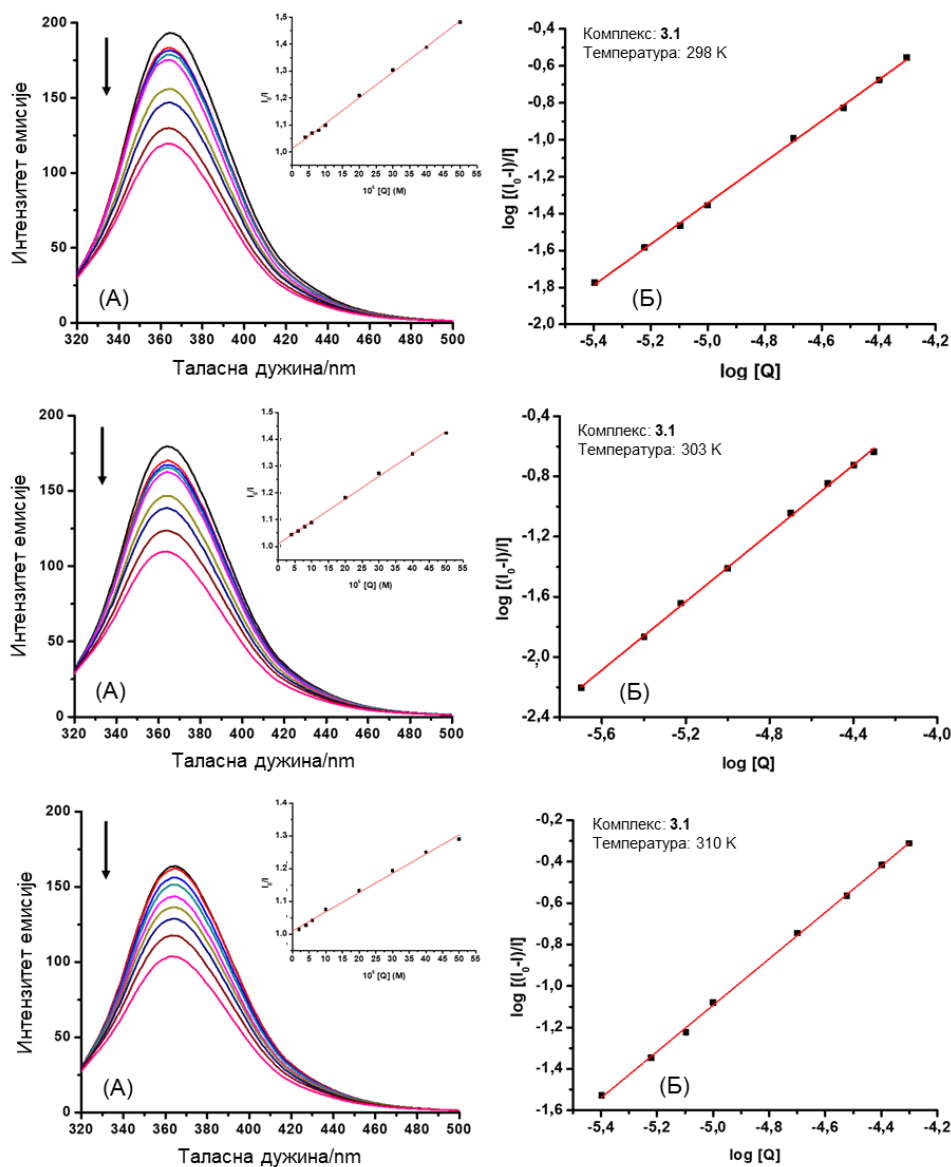


Слика 102. Релативна вискозност  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  раствора ДНК (0,01 mM) у PBS пуферу након додатка растуће концентрације комплекса **3.1**, **3.2** и **3.3**.<sup>148</sup>

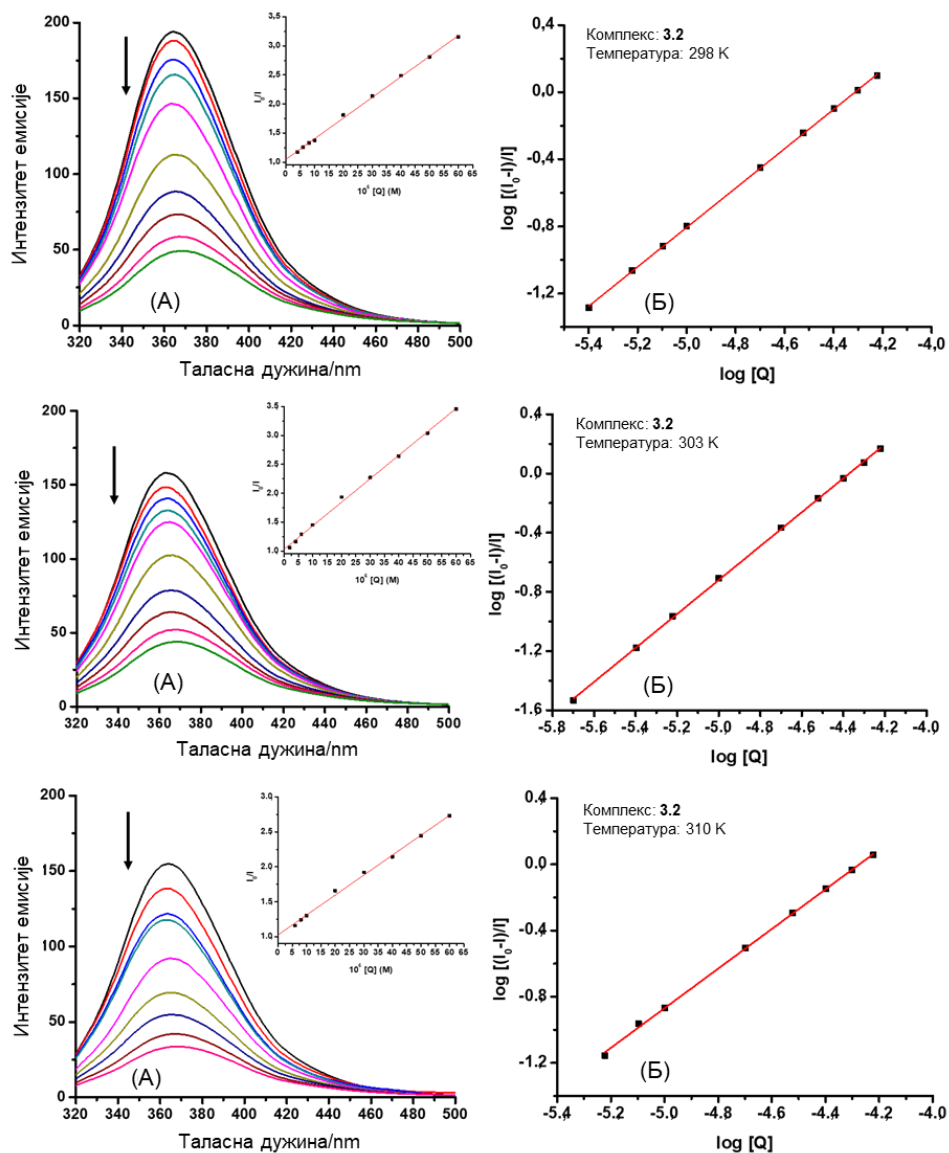
### 3.3.6 Испитивање интеракција комплекса 3.1-3.3 са BSA емисионом методом

Испитивање интеракција комплекса јона прелазних метала **3.1-3.3** са BSA проучавано је на основу смањења флуоресценције на 352 nm у PBS пуферу (pH = 7,4). У оквиру ових истраживања, повећање концентрације комплекса довело је до линеарног смањења интензитета флуоресценције BSA, као што је приказано на Сликама 103-105.

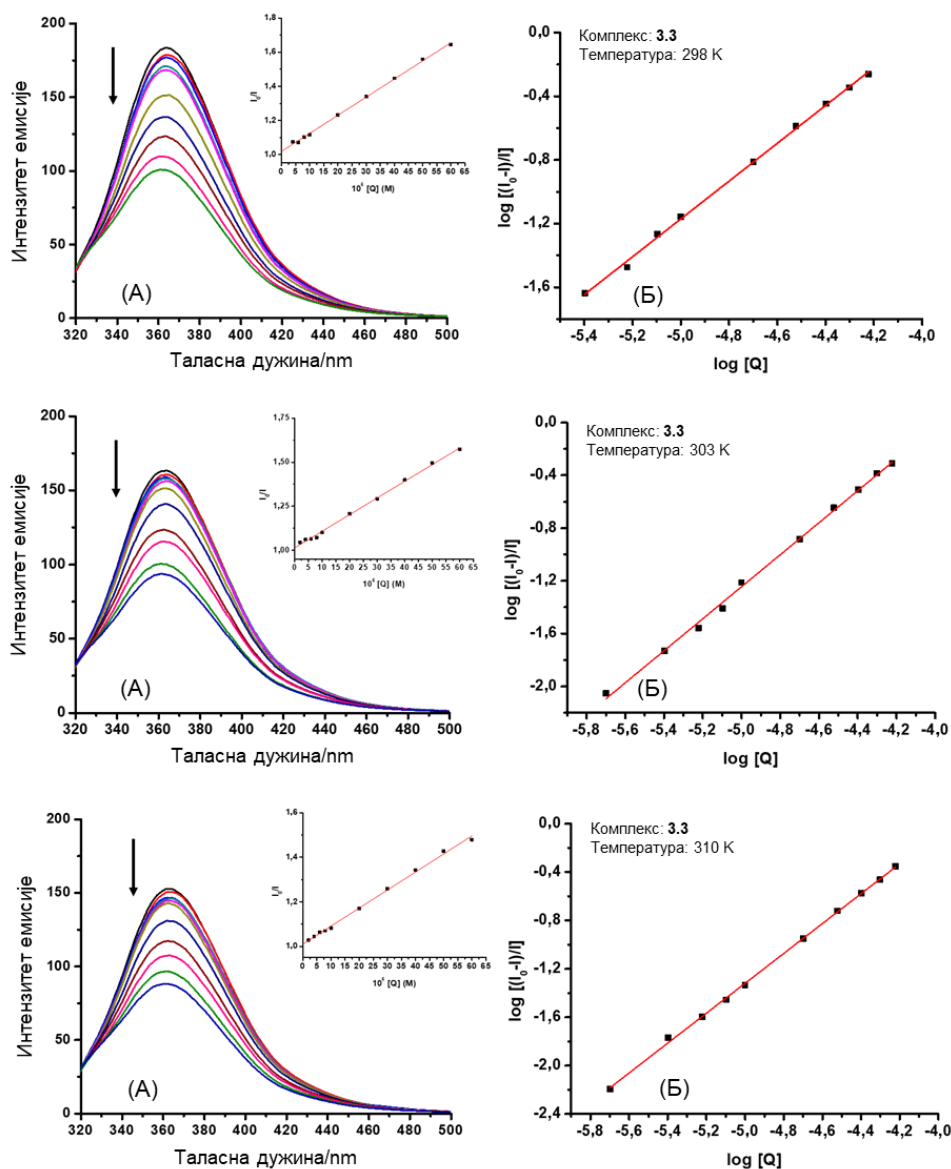




Слика 103. (А) Емисиони спектар BSA у присуству комплекса **3.1** на три различите температуре.  $[BSA] = 2 \mu M$ ,  $[\text{комплекс}] = 0 - 50 \mu M$ ,  $\lambda_{ex} = 285 \text{ nm}$ . Стрелица указује на промену интензитета емисије након додатка растуће концентрације комплекса  $[Q]$ . Уметнути график:  $I_0/I$  у односу на  $[Q]$ . (Б)  $\log[(I_0 - I)/I]$  у односу на  $\log[Q]$ .<sup>148</sup>



Слика 104. (А) Емисиони спектар BSA у присуству комплекса **3.2** на три различите температуре.  $[BSA] = 2 \mu M$ ,  $[\text{комплекс}] = 0 - 50 \mu M$ ,  $\lambda_{ex} = 285 \text{ nm}$ . Стрелица указује на промену интензитета емисије након додавања растуће концентрације комплекса  $[Q]$ . Уметнути график:  $I_0/I$  у односу на  $[Q]$ . (Б)  $\log[(I_0 - I)/I]$  у односу на  $\log[Q]$ .<sup>148</sup>



Слика 105. (А) Емисиони спектар BSA у присуству комплекса **3.3** на три различите температуре.  $[BSA] = 2 \mu\text{M}$ ,  $[\text{комплекс}] = 0 - 50 \mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$ . Стрелица указује на промену интензитета емисије након додавања растуће концентрације комплекса  $[Q]$ . Уметнути график:  $I_0/I$  у односу на  $[Q]$ . (Б)  $\log[(I_0-I)/I]$  у односу на  $\log[Q]$ .<sup>148</sup>

Ефекат „гашења“ флуоресценције испитиван је у опсегу емисионе таласне дужине између 320 и 500 nm, након ексцитације на 285 nm. На основу добијених резултата може се закључити да се интензитет флуоресценције BSA смањује за око 25-76% на 365 nm у присуству растуће концентрације комплекса. Смањење интензитета флуоресценције праћено је и црвеним/плавим померањем емисионе таласне дужине ( $\lambda_{\text{max}}$ ), што указује на смањење/повећање хидрофобилности у микро окружењу везивног места, тј. у близини триптофанског и тирозинског аминокиселинског остатка унутар протеина.<sup>207,208</sup> Као резултат, може се претпоставити да је Trp-213 релативно добро стерно заштићен унутар везивног места BSA протеина, што узрокује формирање нефлуоресцентног система.<sup>209</sup>

Додатно, испитивани комплекси могу да се вежу за BSA на везивном месту лоцираном у ПБ под-домену.

Добијени резултати анализирани су применом Стерн-Волмерове једначине (14), а израчунате вредности за Стерн-Волмерове константе ( $K_{SV}$ ) и константе „гашења” флуоресценције ( $k_q$ ) приказане су у Табели 25.

Табела 25. Стерн-Волмерове константе ( $K_{SV}$ ) и константе „гашења” флуоресценције ( $k_q$ ) за интеракције комплекса **3.1**, **3.2** и **3.3** са BSA.<sup>148</sup>

Комплекс	T [K]	$K_{SV} \times 10^3$ [M <sup>-1</sup> ]	$k_q \times 10^{11}$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]
<b>3.1</b>	298	9,36 ± 0,07	9,36 ± 0,07
	303	8,34 ± 0,05	8,34 ± 0,05
	310	5,82 ± 0,04	5,82 ± 0,04
<b>3.2</b>	298	39,41 ± 0,07	39,41 ± 0,07
	303	33,93 ± 0,09	33,93 ± 0,09
	310	27,89 ± 0,08	27,89 ± 0,08
<b>3.3</b>	298	10,45 ± 0,05	10,45 ± 0,05
	303	9,33 ± 0,08	9,33 ± 0,08
	310	8,02 ± 0,08	8,02 ± 0,08

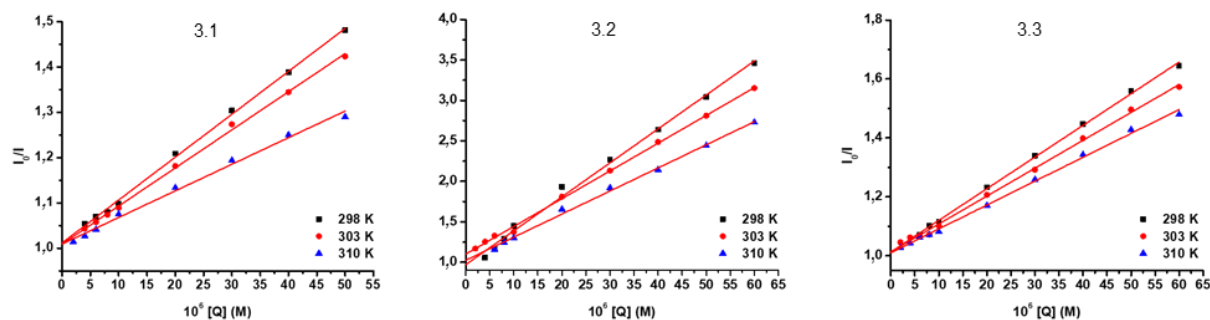
Вредности за  $K_{SV}$  опадају у низу: **3.2** > **3.3** > **3.1**. Поред тога, са повећањем температуре, долази до смањења константе „гашења” флуоресценције за сваки комплекс. Генерално, механизам „гашења” флуоресценције може да се дефинише на основу начина промене вредности за  $K_{SV}$  и  $k_q$  са променом температуре. Динамички механизам „гашења” флуоресценције зависи од дифузије, јер повећање температуре за последицу има повећање дифузионог коефицијента. Тако, динамичка константна „гашења” флуоресценције расте са повећањем температуре. Насупрот томе, повећање температуре може да утиче на смањење стабилности комплекса, уколико је присутан статички механизам „гашења” флуоресценције. На основу добијених резултата приказаних у Табели 25,  $k_q$  вредности су значајно веће од максималне вредности константе колизионог растурања ( $2,0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) за различите агенсе који узрокују „гашење” флуоресценције биомолекула.<sup>210</sup> На основу тога може се закључити да је статички механизам „гашења” флуоресценције доминантан у интеракцијама испитиваних комплекса са BSA.

Вредности за константе везивања ( $K$ ), као и број везивних места ( $n$ ) за интеракције комплекса са BSA, добијени применом Хилове једначине (17), приказани су у Табели 26.

Табела 26. Константе везивања ( $K$ ), број везивних места ( $n$ ) и термодинамички параметри за интеракције комплекса **3.1-3.3** са BSA.<sup>148</sup>

Комплекс	T [K]	$K \times 10^4$ [M <sup>-1</sup> ]	n	$\Delta G^0$ [kJmol <sup>-1</sup> ]	$\Delta H^0$ [kJmol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S^0$ (JK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
<b>3.1</b>	298	1,64 ± 0,01	1,11	-24,09 ± 0,03		
	303	1,86 ± 0,03	1,14	-24,81 ± 0,05	43,36 ± 0,09	225,7 ± 0,4
	310	3,18 ± 0,04	1,12	-26,73 ± 0,07		
<b>3.2</b>	298	10,37 ± 0,01	1,14	-28,68 ± 0,02		
	303	11,68 ± 0,01	1,17	-29,43 ± 0,02	15,85 ± 0,07	149,2 ± 0,3
	310	13,25 ± 0,03	1,20	-30,42 ± 0,06		
<b>3.3</b>	298	5,95 ± 0,05	1,20	-27,22 ± 0,06		
	303	6,64 ± 0,04	1,21	-28,03 ± 0,05	12,31 ± 0,05	132,8 ± 0,2
	310	7,23 ± 0,02	1,23	-28,86 ± 0,05		

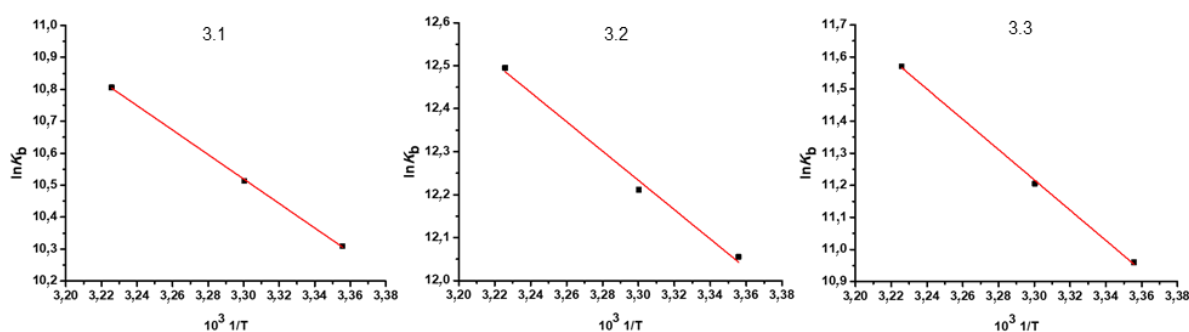
Вредности за константе везивања испитиваних комплекса опадају у низу: **3.2** > **3.3** > **3.1**, тако да се комплекс **3.2** издвојио као најбоље везујући за BSA протеин. Такође, број везивних места приближан је јединици, што говори о постојању једног места унутар BSA молекула за које може да се веже одговарајући комплекс. Вредности за  $n$  благо се повећавају са повећањем температуре, указујући да се интеракције комплекса са BSA дешавају преко једног везивног места великог афинитета. Поред тога, интеракције комплекса су такође убрзане са повећањем температуре (Слика 107).<sup>211</sup> Резултати добијени у оквиру ових испитивања указују да комплекси **3.1**, **3.2** и **3.3** могу успешно да се вежу, складиште и транспортују помоћу BSA молекула.<sup>193</sup>



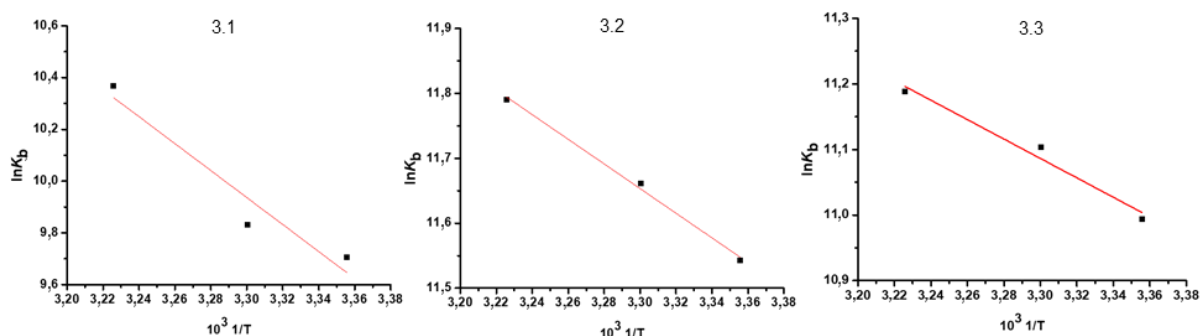
Слика 106. Стерн-Волемерови дијаграми „гашења” флуоресценције BSA у присуству комплекса **3.1**, **3.2** и **3.3** на три различите температуре.<sup>148</sup>

### 3.3.7) Термодинамички параметри везивања

У суштини, силе заслужне за везивања између агенса и биомолекула (у овом случају испитиваних комплекса **3.1**, **3.2** и **3.3** и биомолекула ДНК и BSA) укључују водоничне везе, ван дер Валсове силе, електростатичке и хидрофобне интеракционе силе. Пошто знак и величина термодинамичких параметара, као што су  $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$  и  $\Delta G^0$ , могу да се повежу са покретачком силом интеракција са биомолекулима, њихове вредности израчунате су на основу односа  $\ln K_b$  у функцији од  $1/T$  (Слика 107 и 108) применом Ван'т Хофове једначине (18).



Слика 107. Ван'т Хофови графици за интеракције комплекса **3.1**, **3.2** и **3.3** и ДНК.<sup>148</sup>

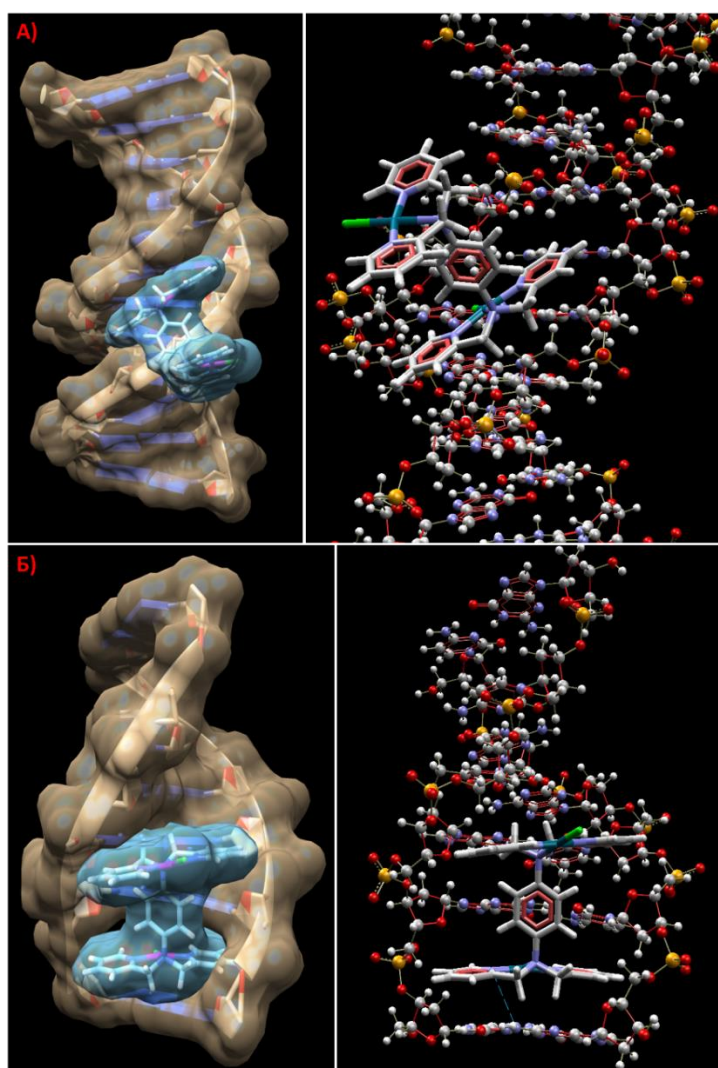


Слика 108. Ван'т Хофови графици за интеракције комплекса **3.1**, **3.2** и **3.3** и BSA.<sup>148</sup>

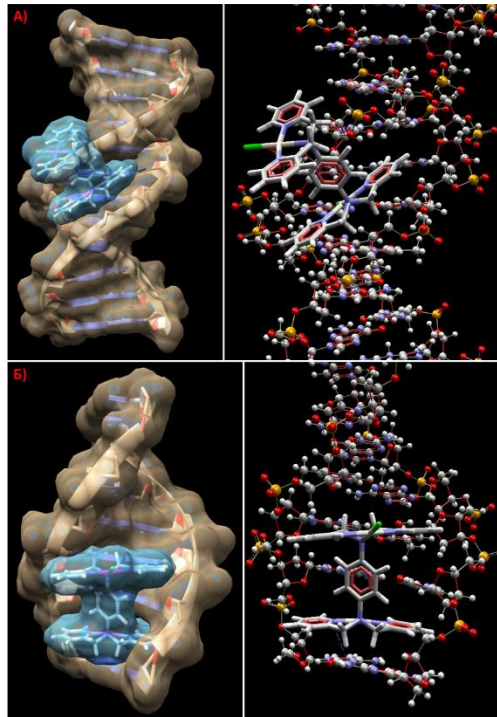
Рос и Субраманиан<sup>212</sup> дефинисали су правила идентификације интеракција агенса и биомолекула на основу термодинамичких вредности промене стандардне енталпије и ентропије: а)  $\Delta H^0 > 0$  и  $\Delta S^0 > 0$  доводи се у везу са хидрофобним интеракцијама; б) електростатичке силе су доминантне када је  $\Delta H^0 \approx 0$  и  $\Delta S^0 > 0$ ; в)  $\Delta H^0 < 0$  и  $\Delta S^0 < 0$  се често разматра као везивање водоничним везама и ван дер Валсовим силама. У нашем истраживању, позитивне вредности за  $\Delta H^0$  и  $\Delta S^0$  (Табела 23 и 26) указују да хидрофобне интеракције играју важну улогу током интеракција молекула ДНК и BSA са испитиваним комплексима. Узимајући у обзир структуре испитиваних комплекса, хидрофобни контакт се вероватно дешава преко ароматичних прстенова лиганда. Негативне вредности за  $\Delta G^0$  потврђују да се процес везивања одвија спонтано.<sup>213</sup>

### 3.3.8) Резултати молекулског докинга

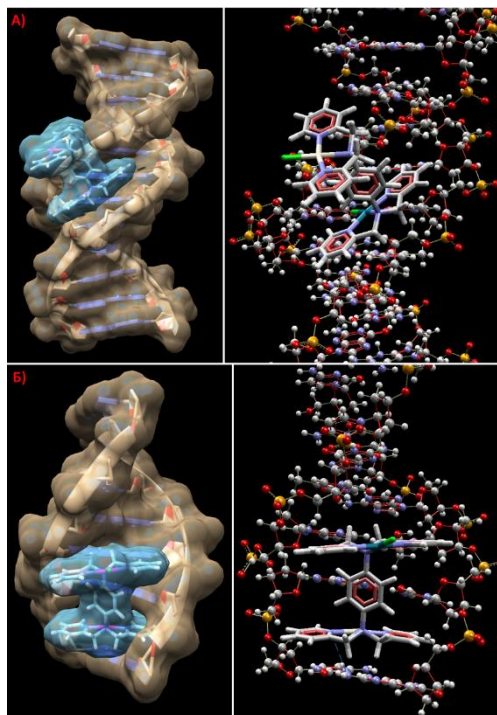
У случају ДНК докинга, два типа интеракција су симулиране. Да би се предвидело везивање за мали жљеб коришћен је канонски тип ДНК молекула (PDB ID: 1BNA), док је за испитивање могућности интеркалације одабран други одговарајући ДНК фрагмент (PDB ID: 1Z3F). Резултати симулације са ДНК приказани су на Сликама 109-111, а вредности MVD функција на основу којих је вршена евалуација представљене су у Табели 27. Добијени резултати показују да испитивани комплекси имају способност да интерагују са ДНК молекулом путем интеркалације и везивањем за мали жљеб, али је везивање за мали жљеб фаворизовано. Овај закључак је у сагласности са експерименталним резултатима добијеним на основу флуоресцентних испитивања интеракција са ДНК. Такође, резултати симулације показали су одсуство значајнијих водоничних веза, нарочито код везивања за мали жљеб, што је у сагласности са резултатима добијеним на основу термодинамичких параметара везивања.



Слика 109. Компјутерски модел интеракције комплекса **3.1** и ДНК (водоничне везе представљене су плавом бојом); А) илустрација везивања за мали жљеб; Б) илустрација интеркалације.<sup>148</sup>



Слика 110. Компјутерски модел интеракције комплекса **3.2** и ДНК (водоничне везе представљене су плавом бојом); А) илустрација везивања за мали жљеб; Б) илустрација интеркалације.<sup>148</sup>



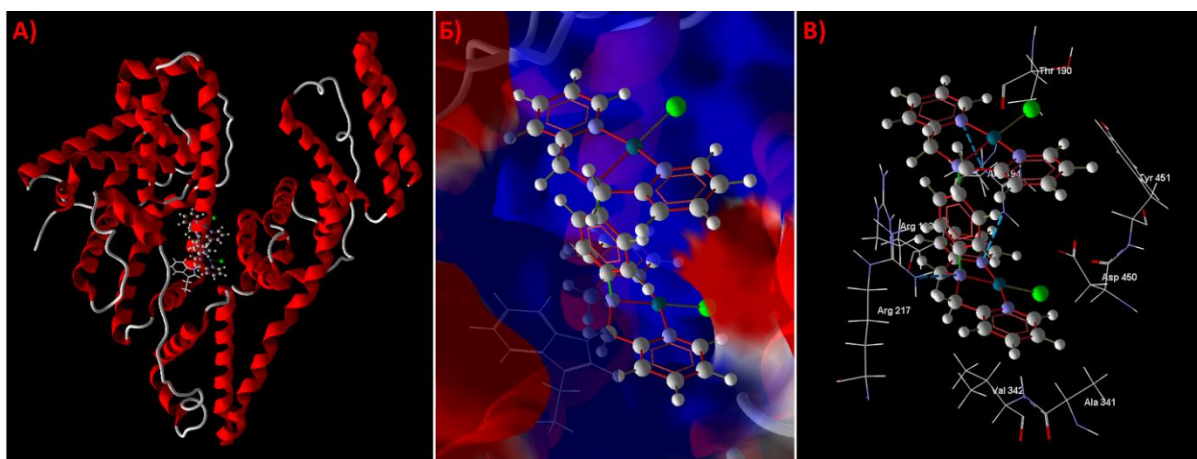
Слика 111. Компјутерски модел интеракције комплекса **3.2** и ДНК (водоничне везе представљене су плавом бојом); А) илустрација везивања за мали жљеб; Б) илустрација интеркалације.<sup>148</sup>



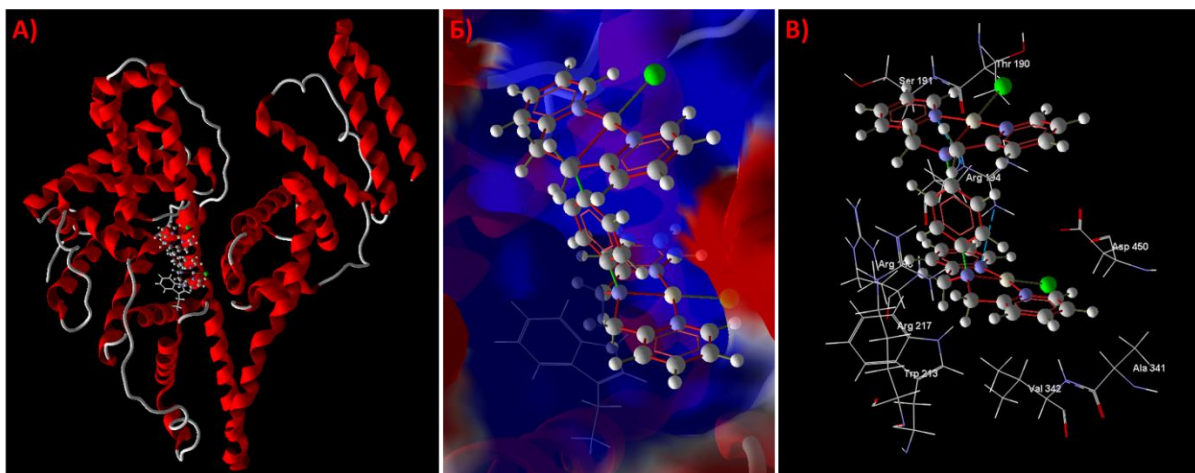
Табела 27. Вредности MVD функција за интеракције комплекса **3.1-3.3** са ДНК фрагментима (1BNA и 1Z3F).<sup>148</sup>

PDB код ДНК	Комплекс	MolDock	Rerank	Docking
1BNA	<b>3.1</b>	-188,764	-83,186	-185,202
	<b>3.2</b>	-186,231	-82,977	-183,011
	<b>3.3</b>	-188,873	-82,161	-184,531
1Z3F	<b>3.1</b>	-160,085	-76,460	-156,383
	<b>3.2</b>	-159,868	-76,213	-156,417
	<b>3.3</b>	-159,763	-76,251	-156,211

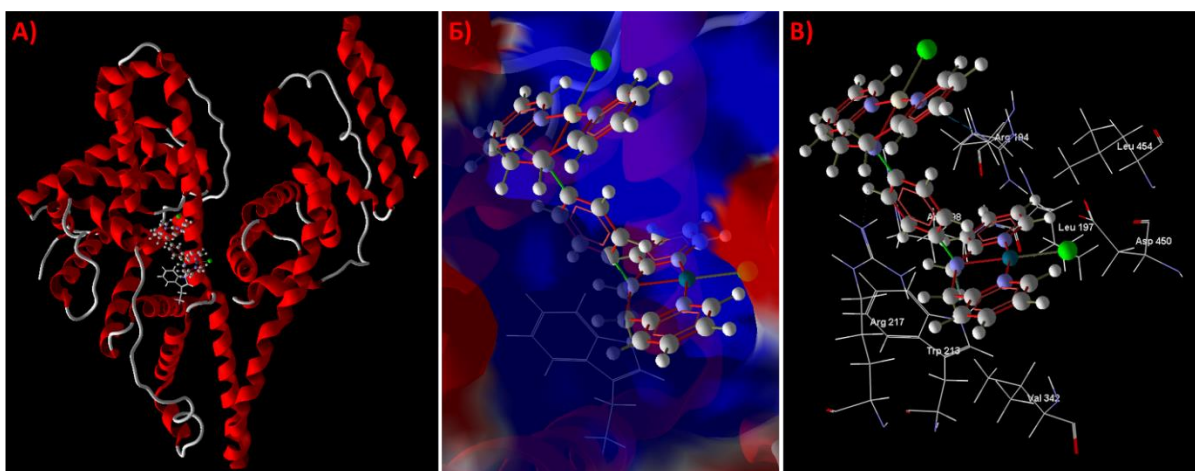
Резултати добијени докинг симулацијом интеракција комплекса **3.1-3.3** и BSA приказани су у Табели 28 и на Сликама 112-114. На основу ових резултата може се закључити да се сви комплекси успешно везују за домен ПА (везивно место I) BSA протеина у непосредној близини Трп-213. Такође, сви комплекси показују сличан афинитет да се вежу за BSA. Комплекси су додатно стабилизовани унутар BSA грађењем водоничних веза, пре свега са Arg-194. Једино у случају комплекса **3.2** формира се додатна водонична веза са Arg-217.



Слика 112. Компјутерски модел интеракције комплекса **3.1** и BSA на основу HBond вредности MVD функције; А) комплекс унутар скелета BSA; Б) комплекс у односу на електростатичку мапу површине BSA; В) комплекс унутар везивног места BSA са одабраним аминокиселинама (водоничне везе представљене су плавом бојом).<sup>148</sup>



Слика 113. Компјутерски модел интеракције комплекса **3.2** и BSA на основу HBond вредности MVD функције; А) комплекс унутар скелета BSA; Б) комплекс у односу на електростатичку мапу површине BSA; В) комплекс унутар везивног места BSA са одабраним аминокиселинама (водоничне везе представљене су плавом бојом).<sup>148</sup>



Слика 114. Компјутерски модел интеракције комплекса **3.3** и BSA на основу HBond вредности MVD функције; А) комплекс унутар скелета BSA; Б) комплекс у односу на електростатичку мапу површине BSA; В) комплекс унутар везивног места BSA са одабраним аминокиселинама (водоничне везе представљене су плавом бојом).<sup>148</sup>

Табела 28. Вредности MVD функција за интеракције комплекса **3.1-3.3** са BSA.<sup>148</sup>

Комплекс	MolDock	Rerank	Hbond	Docking	Амино киселине <sup>б,ц</sup>
<b>3.1<sup>а</sup></b>	-137,032	-81,418	0	-134,651	Arg-217, Val-342, Ala-341, Asp-450,
<b>3.1<sup>б</sup></b>	-125,951	-68,045	-4,311	-125,932	Arg-194(H), Trp-213, Arg-198, Ser-191, Thr-190, Tyr-451
<b>3.2<sup>а</sup></b>	-137,434	-60,767	0	-135,323	Val-342, Ala-341, Arg-217(H), Asp-450, Arg-194(H), Trp-213, Arg-198,
<b>3.2<sup>б</sup></b>	-128,962	-69,372	-4,039	-127,721	Ser-191, Thr-190
<b>3.3<sup>а</sup></b>	-137,372	-86,003	0	-135,263	Val-342, Asp-450, Leu-454, Leu-197,
<b>3.3<sup>б</sup></b>	-126,631	-82,893	-1,284	-124,628	Trp-213, Arg-198, Arg-194(H), Arg-217

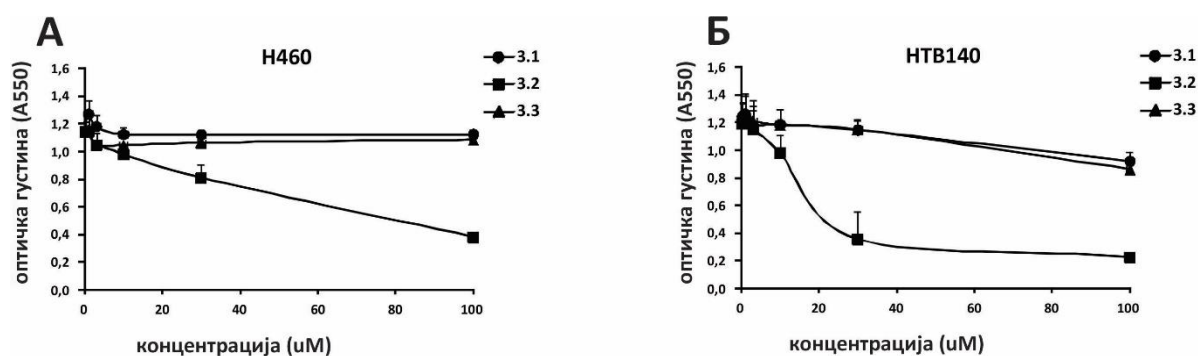
<sup>а</sup> Најбољи резултати према MolDock, Docking и Rerank функцијама

<sup>б</sup> Најбољи резултати према Hbond функцији

<sup>ц</sup> (H) означава да се аминокиселина везала водоничном везом за комплекс

### 3.3.9) Испитивање цитотоксичне активности комплекса **3.1-3.3** према НТВ14, Н460 и MRC-5 ћелијским линијама

Циљ ових испитивања био је да се утврди цитотоксични потенцијал испитиваних комплекса над хуманим туморским ћелијским линијама, као и да се одреди њихов механизам дејства. Ефекат комплекса **3.1-3.3** на вијабилност/метаболичку активност НТВ140 и Н460 туморских ћелијских линија утврђен је након 48 сати третмана помоћу *MTT* теста. Добијени резултати представљени су помоћу графикана (Слика 115), и у виду GI<sub>50</sub>, TGI и LC<sub>50</sub> вредности (Табела 29).



Слика 115. Криве зависности оптичке густине од концентрације комплекса **3.1-3.3** на ћелијским линијама Н460 (А) и НТВ140 (Б) након 48 сати третмана.<sup>148</sup>

Табела 29. GI<sub>50</sub>, TGI и LC<sub>50</sub> вредности за испитиване комплексе након 48 сати третмана. CDDP је коришћена као позитивна контрола. Вредности су приказане као концентрација у  $\mu\text{M}$ .<sup>148</sup>








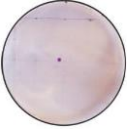




Комплекс	HTB14			H460			MRC-5
	GI <sub>50</sub>	TGI	LC <sub>50</sub>	GI <sub>50</sub>	TGI	LC <sub>50</sub>	GI <sub>50</sub>
<b>3.1</b>	176 ± 3	370 ± 3	340 ± 50	210 ± 10	440 ± 10	440 ± 40	-
<b>3.2</b>	22 ± 1	92 ± 2	101 ± 4	21 ± 1	92 ± 1	104 ± 2	59,9 ± 4,2
<b>3.3</b>	139 ± 7	294 ± 7	320 ± 30	144 ± 9	340 ± 20	30 ± 3	-
CDDP	8 ± 1	-	-	9 ± 1	-	-	-

Као што је приказано на Слици 115 и у Табели 29, највећи ефекат на обе ћелијске линије имао је комплекс **3.2**, док су комплекси **3.1** и **3.3** показали слабу активност (> 100  $\mu\text{M}$ ). Насупрот томе, комплекс **3.2** показао је значајну инхибицију раста на ћелијским линијама HTB14 и H460, али без значајног цитотоксичног ефекта (LC<sub>50</sub> > 100) у периоду од 48 сати. Такође је важно напоменути да је GI<sub>50</sub> вредност за комплекс **3.2** на нормалним MRC-5 фибробластима износила 59.9 ± 4.2  $\mu\text{M}$ , те да је индекс селективности за HTB14 био 2,7, а за H460 око 3. Ови подаци показују селективно/високо селективно дејство комплекса **3.2**. На основу ових резултата комплекс **3.2** је био укључен у даља истраживања.

### 3.3.9.1) Кологени тест

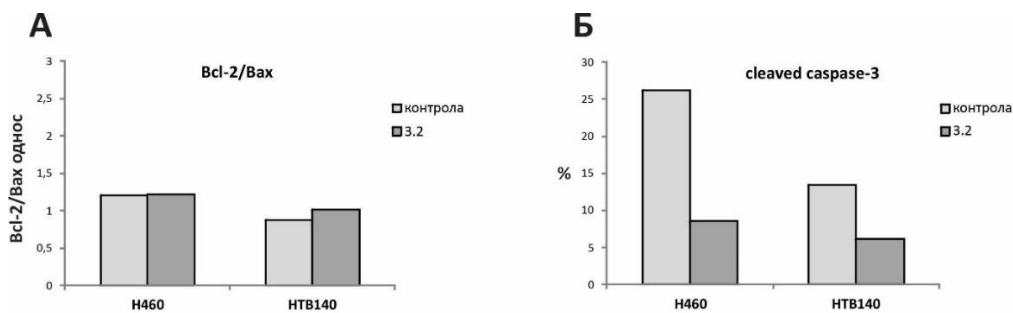
Кологени тест је коришћен да би се утврдио ефекат комплекса **3.2** на преживљавање и способност HTB14 и H460 ћелија да формирају колоније. Капацитет индивидуалне ћелије да формира колонију (дефинисану као група од најмање 50 ћелија) доказ је да та ћелија задржава свој репродуктивни потенцијал након третирања токсичним агенсима. Ћелијске линије HTB14 и H460 показале су сличан ниво осетљивости према **3.2** комплексу. Резултати су потврдили дозно-зависно смањење броја колонија (Табела 30). SF вредности показују да и најнижа концентрација комплекса **3.2** (1  $\mu\text{M}$ ) има одличан дугорочни ефекат на пролиферациони потенцијал обе ћелијске линије.

Табела 30. Резултати Кологеног теста.<sup>148</sup>

Ћелијска линија	HTB140					
Концентрација (μM)	0 (контрола)	1 μM	3 μM	10 μM	30 μM	100 μM
Слика						
SF	-	0,51	0,10	0,0025	0	0
Ћелијска линија	H460					
Концентрација (μM)	0 (контрола)	1 μM	3 μM	10 μM	30 μM	100 μM
Слика						
SF	-	0,025	0,0025	0	0	0

### 3.3.9.2) Механизам ћелијске смрти

Апоптоза, најпожељнији начин ћелијске смрти, уочен је као главни тип ћелијске смрти узроковане многим хемиотерапеуцима, укључујући CDDP. Пошто је комплекс **3.2** показао значајан резултат у инхибицији раста ћелија, даља истраживања укључила су испитивање способности овог комплекса да индукује апоптозу, програмирану ћелијску смрт типа I. Након 48 сати третмана ћелије HTB14 и H460 су обојене са Annexin V-FITC, који се везује за фосфатидилсеринске остатке на спољној површини мембране апоптичне ћелије чији је интегритет и даље очуван (рана апоптоза), или су обојене са 7-аминоактиномицином Д (7-AAD), који има способност да уђе у ћелију након што ћелијска мембрана ослаби (секундарна апоптоза и некроза) и везује се за ДНК. Проточна цитометријска анализа показала је да не постоји пораст у Annexin V-FITC+, 7-AAD+ или дупло позитивним ћелијама, указујући да комплекс **3.2** не индукује апоптозу и некрозу. Овај закључак потврђен је цитометријском анализом апоптичких маркера: анти-апоптичног протеина Bcl-2, про-апоптичног протеина Вах и активне форме caspase-3, једаног од главних извршитеља апоптозе (Слика 116). Код обе ћелијске линије комплекс **3.2** није довео до промене нивоа Bcl-2 или Вах протеина, нити односа Bcl-2/Вах, у поређењу са контролом, док је проценат ћелија које су експримирале активну форму caspase-3 смањен у односу на нетретирание ћелије, указујући на инхибицију caspase-3-зависне ћелијске смрти.

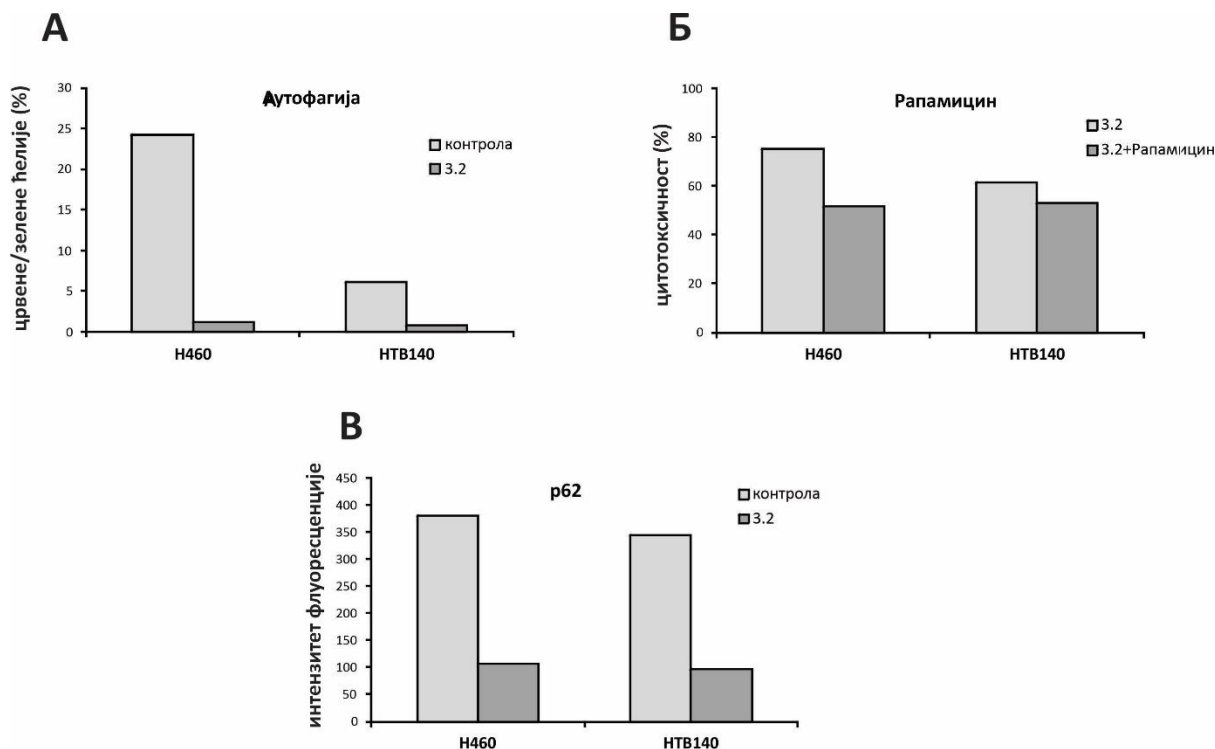


Слика 116. Представљање протеина повезаних са апоптозом у НТВ14 и Н460 ћелијским линијама; А) Bcl-2/Bax однос код контролних и третираних ћелија; Б) Процент контролних и третираних ћелија које експримирају активну форму caspase-3.<sup>148</sup>

Поред поменутог, испитивана је способност комплекса **3.2** да индукује програмирану ћелијску смрт типа II, аутофагију. Аутофагија је процес који настоји да одржи или обнови ћелијску хомеостазу након метаболичког или терапеутског стреса. Међутим, недавна испитивања потврдила су да аутофагија има двоструку улогу, и заштитну и цитотоксичну. Крајњи резултат индукције аутофагије као одговора на терапију зависи од врсте тумора и примењене терапије.<sup>214</sup>

Анализа проточном цитометријом показала је да је, у поређењу са контролом, проценат ћелија које емитују зелену и црвену флуоресценцију (живе ћелије које садрже киселе везикуларне органеле) смањен након третирања комплексом **3.2** (Слика 117А), што указује да комплекс **3.2** инхибира аутофагију. Да би се утврдио ефекат инхибиције аутофагије, ћелије су третиране рапамицином, који је индуктор аутофагије. Комбиновани третман комплексом **3.2** и рапамицином резултирао је смањењем цитотоксичности на обе ћелијске линије (Слика 117Б), што потврђује да инхибиција аутофагије доприноси цитотоксичном дејству испитиваног комплекса.

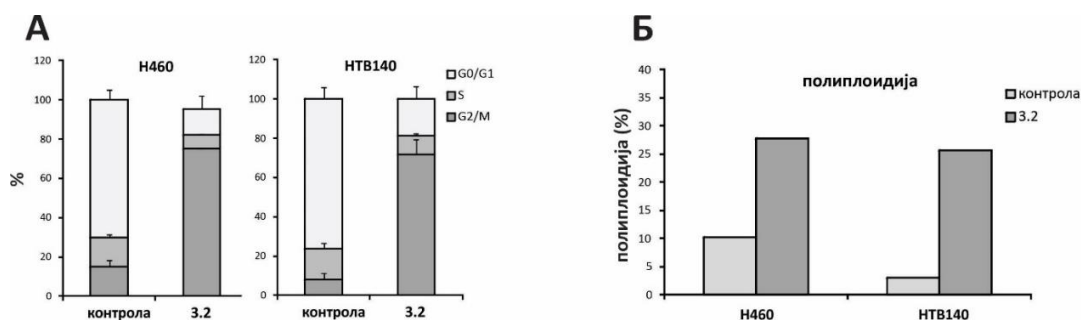
Да би се потврдила инхибиција аутофагије, одређивана је експресија p62, маркера коришћеног за праћење аутофагне активности. Маркер p62 интерагује са „ubiquitinated” протеинима, назначеним за уништење, и везује се за LC3, централни протеин у процесу аутофагије, омогућавајући њихову деградацију у лизозомима. Истовремено се и сам деградира, тако да је индукција аутофагије праћена смањењем нивоа p62. Резултати проточне цитометрије су показали да је ниво p62 протеина био смањен у ћелијама третираним комплексом **3.2** у односу на нетретиране ћелије (Слика 117В), што указује да је p62 вероватно укључен у друге процесе индуковане комплексом **3.2**. Познато је да је p62 мултифункционални адаптивни протеин, који путем многих везивних домена може да интерагује са различитим протеинима.<sup>215</sup> При условима стреса, p62 може да интерагује са Keap1 (негативни регулатор транскрипционог фактора Nrf2) при чему долази до протеазомалне деградације и p62 и Keap1. Као резултат, активирани Nrf2, путем Nqo1, обезбеђује стабилизацију p53.<sup>216</sup> Транскрипциони фактор p53 индукован је сигнаlima стреса, као што је оштећење ДНК молекула, а доминантни исходи активације p53 су апоптоза и заустављање ћелијског циклуса.<sup>217</sup> Из ових разлога анализирана је прогресија ћелијског циклуса код ћелија третираних комплексом **3.2**.



Слика 117. Учешће аутофагије у механизму деловања комплекса **3.2**.

А) Процент ћелија са киселим везикуларним органелма код третираних и нетретираних HTB14 и H460 ћелија; Б) Ефекат индуктора аутофагије рапамицина на цитотоксичност индуковану комплексом **3.2**; В) Ниво експресије р62 у третираним и нетретираним H460 и HTB14 ћелијама.<sup>148</sup>

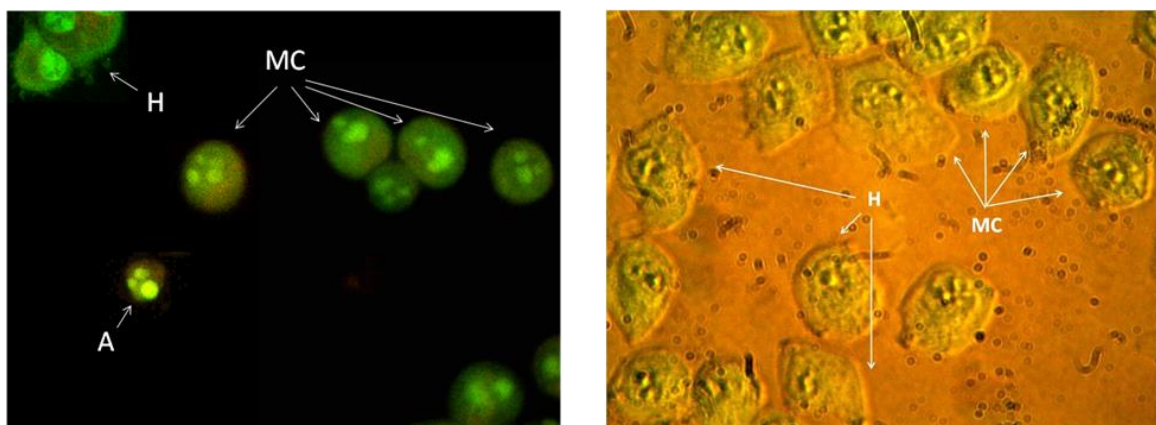
Коришћењем проточне цитометрије анализиран је садржај ДНК, 48 сати након третирања комплексом **3.2**. Резултати су упоређени са дистрибуцијом фаза ћелијског циклуса нетретираних, контролних ћелија. Код обе ћелијске линије, комплекс **3.2** индукује значајну акумулацију ћелија у G2/M фази, уз истовремено смањење броја ћелија у G0/G1 и S фази ћелијског циклуса (Слика 118А). Важно је напоменути да је примећен пораст броја полиплоидних (>4 N) ћелија код обе ћелијске линије (Слика 118Б), указујући на продужену митозу као последицу аберантног раздвајања хромозома.



Слика 118. Анализа садржаја ДНК код третираних и нетретираних H460 и HTB140 ћелија; А) Дистрибуција фаза ћелијског циклуса; Б) Процент полиплоидних ћелија.<sup>148</sup>

Неуспешна митоза која омета пролиферацију и/или преживљавање ћелија доводећи до старења или смрти ћелија дефинисана је као митотичка катастрофа.<sup>218</sup> Ћелије које подлежу митотичкој катастрофи су привремено вијабилне, али њихова способност да пролиферишу је ослабљена. Митотичка катастрофа се може детектовати применом флуоресцентне и инвертне микроскопије уочавањем карактеристичних морфолошких промена.

За разлику од апоптотичних ћелија које карактерише смањење величине, фрагментација нуклеуса и кондензација хроматина која резултира хомогеном светло зеленом флуоресценцијом, ћелије које пролазе кроз митотичку катастрофу су велике, вишеједарне, са зеленим некондензованим једрима и хроматином са организованом структуром. Флуоресцентна микроскопска анализа показала је значајан број ћелија са особинама митотичке катастрофе код обе ћелијске линије (Слика 119, лево). Такође, инвертна микроскопија је омогућила визуализацију ћелија са више једара (Слика 119, десно), потврђујући индукцију митотичке катастрофе. Уколико није праћена ћелијском смрћу, митотичка катастрофа може бити механизам преживљавања ћелије, подржавајући онкогену полиплоидизацију и раст оштећених ћелија, што на крају води до развоја тумора.<sup>219,220</sup> Међутим, резултати кологеног теста показали су да комплекс **3.2** инхибира пролиферацију на обе ћелијске линије (НТВ14 и Н460) и индукује ћелијску смрт у испитиваном временском интервалу.



Слика 119. Митотичка катастрофа након третирања ћелија комплексом **3.2**. Флуоресцентна микроскопија АО/ЕВ обојених ћелија (лево) која показује апоптотичне ћелије (А) карактеристичне по смањеној величини, фрагментацији нуклеуса и кондензацији хроматина која резултује у хомогеној светло зеленој флуоресценцији; вишеједарне ћелије које пролазе кроз митотичку катастрофу (МС) са организованом структуром некондензованог хроматина; здраве ћелије (Н) са нуклеусима организоване структуре. Десна слика добијена је помоћу инвертног микроскопа.<sup>148</sup>

Једно од обележја тумора јесте избегавање апоптозе. Туморске ћелије користе разне молекулске механизме да би избегле апоптозу, омогућавајући преживљавање, раст и метастазирање тумора. Зато агенси који изазивају друге типове ћелијске смрти могу бити од великог значаја у третирању канцера. Треба напоменути да дугорочни ефекти ниске концентрације комплекса **3.2**, као резултат индукције митотичке катастрофе независне од апоптозе, указују на могућност употребе комплекса **3.2** као терапеутског агенса.



#### 4) ЗАКЉУЧАК

На основу резултата добијених у оквиру ове докторске дисертације могу се извести следећи закључци:

- Синтетисани су нови динуклеарни комплекси Pd(II) са пиразином (**1.1-1.3**) и 4,4'-бипиридином (**1.4-1.6**) као мостним лигандом, потом динуклеарни комплекси Pt(II) са пиразином (**2.1-2.4**) као мостним лигандом, као и хомо- и хетеро-динуклеарни комплекси Pd(II) и Pt(II) (**3.1 - 3.3**) са дериватом бензен-1,4-диаминa (tpbd). Сви комплекси окарактерисани су елементалном анализом, IR, <sup>1</sup>H NMR спектроскопијом и масеном (MALTI-TOF и/или ESI-MS) спектрометријом.

- Испитивањем хидролитичких карактеристика комплекса добијени резултати су показали да су константе киселости динуклеарних комплекса ниже су у поређењу са вредностима за одговарајуће мононуклеарне аналоге. Такође, динуклеарни Pd(II) комплекси имају ниже вредност за  $pK_a$  у односу на аналогне комплексе са Pt(II) јоном као централним металним јоном. Резултати испитивања комплекса **3.1-3.3** показали су је да је динуклеарни диаква Pd(II) комплекс **3.1** најстабилнији, док је Pt(II) аналог најмање стабилан. У свим случајевима добијене су веће вредности за константе киселости другог корака ( $pK_{a2}$ ) у односу на вредности за константе киселости првог степена хидролизе ( $pK_{a1}$ ).

- Резултати изучавања нуклеофилних супституционих реакција динуклеарних комплекса са биолошки релевантним нуклеофилима, показали су да, у зависности од нуклеофила у процесу супституције може доћи до нарушавања структуре динуклеарног комплекса. Такође, редослед реактивности динуклеарних комплекса јако зависи од врсте јона метала који улазе у састав, као и од структурних и електронских карактеристика инертних и мостних лиганата. Реактивност коришћених нуклеофила зависи од врсте донорског атома. Реакције са сумпор-донорским (Tu, L-Cys, L-Met и GSH) су у свим случајевима биле брже у односу на реакције са азот-донорским нуклеофилима (L-His и 5'-GMP).

- Резултати испитивања интеракција комплекса са ДНК показали су да сви комплекси поседују велики афинитет да интерагују интеркалацијом и/или везивањем за мали жљеб ДНК хеликса. Методама симулације молекулског докинга потврђени су експериментално добијени резултати.

- На основу резултата испитивања интеракција са BSA може се закључити да испитивани динуклеарни комплекси имају способност да се вежу за BSA молекул на везивном месту I (домен IIА) у довољној мери да не дође до нарушавања основне функције протеина.

- Резултати испитивања цитотоксичне активности показали су да комплекси **1.1-1.6** селективно смањују одрживост канцерогених ћелија HeLa и MDA-MB-231, при чему индукују апоптозу. Ови Pd(II) комплекси показали су значајан утицај на ћелијски циклус, изазивајући заустављање раста канцерогених ћелија у високом проценту. Резултати испитивања динуклеарних комплекса са дериватом бензен-1,4-диаминa (tpbd) показали су да динуклеарни Pt(II) комплекс **3.2** поседује јак и селективан ефекат на пролиферацију канцерогених ћелијских линија HTB14 и H460.

- Резултати добијени у оквиру ове дисертације могу значајно допринети даљим истраживањима у области хомо- и хетеро-динуклеарних комплекса Pd(II) и Pt(II), односно бољем разумевању везе између структуре, хемијских и биолошких

карактеристика комплекса, у циљу дизајнирања једињења које поседује потенцијалну антитуморску активност.

## ЛИТЕРАТУРА

---

1. R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, *Cancer Statistics*, 2017, **67**, 7–30.
2. WHO report on cancer: Setting priorities, investing wisely and providing care for all. World Health Organization, 2020. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330745>.
3. B. Rosenberg, L. Van Camp, J.E. Trosko, V.H. Mansour, *Nature*, 1969, **222**, 385–386.
4. B. Lippert, *Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, Wiley VCH, Zurich, Switzerland, 1999.
5. M. Fuertes, C. Alonso, J.M. Perez, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 645–662.
6. Y. Jung, S.J. Lippard, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 1387–1407.
7. R.P. Miller, R.K. Tadagavadi, G. Ramesh, W.B. Reeves, *Toxins*, 2010, **2**, 2490–2518.
8. X. Yao, K. Panichpisal, N. Kurtzman, K. Nugent, *Am. J. Med. Sci.*, 2007, **334**, 115–124.
9. S.R. McWhinney, R.M. Goldberg, H.L. McLeod, *Mol. Cancer Ther.*, 2009, **8**, 10–16.
10. S.S. More, O. Akil, A.G. Ianculescu, E.G. Geier, L.R. Lustig, K.M. Giacomini, *J. Neurosci.*, 2010, **30**, 9500–9509.
11. J.R. Brahmer, D.S. Ettinger, *Oncologist*, 1998, **3**, 143–154.
12. C. Manzotti, G. Pratesi, E. Menta, R. Di Domenico, E. Cavalletti, H. H. Fiebig, L. R. Kelland, N. Farrell, D. Polizzi, R. Supino, G. Pezzoni and F. Zunino, *Clin. Cancer Res.*, 2000, **6**, 2626–2634.
13. P. Perego, C. Caserini, L. Gatti, N. Carenini, S. Romanelli, R. Supino, D. Colangelo, I. Viano, R. Leone, S. Spinelli, G. Pezzoni, C. Manzotti, N. Farrell, F. Zunino, *Mol. Pharmacol.*, 1999, **55**, 528–534.
14. V. Brabec, J. Kasparikova, V. Menon, N. P. Farrell, *Met. Ions Life Sci.*, 2018, **18**, 43–68.
15. S. Komeda, *Metallomics*, 2011, **3**, 650–655.
16. C. A. Claussen, E. C. Long, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2797–2816.
17. K. J. Franz, N. Metzler-Nolte, *Chem. Rev.*, 2019, **119**, 727–729.
18. J. E. F. Reynolds, *The Extra Pharmacopoeia*, 31<sup>st</sup>ed., The Royal Pharmaceutical Society; London, 1996.
19. A. Albert, *Selective Toxicity*, 6<sup>th</sup> ed., Wiley, New York, 1979.
20. R.M. Roat-Malone, *Bioinorganic Chemistry*, Washington College Chestertown, MD 2002.
21. B. Lippert, *Cisplatin*, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, 1999.
22. P.J. Sadler. *Adv. Inorg. Chem.*, 1991, **36**, 1–48.
23. M.J. Abrams, B.A. Murrer, *Science*, 1993, **261**, 725–730.
24. Y. Kidani, R. Kizu, M. Miyazaki, M. Noji, A. Matsuzawa, Y. Takeda, N. Akiyama, M. Eriguchi, *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*, Plenum Press, New York, p43–51, 1993.
25. P. J. Sadler, Z. Guo, *Pure & Appl. Chem.*, 1998, **70**, 863–871.
26. Food and Drug Administration (<http://www.fda.gov>), United States Food and Drug Administration; Vol. 2002.
27. National Cancer Institute (<http://nci.nih.gov/dtp.cfm>), NCI-DTP, Vol. 2002.
28. S.D. Dertinger, S.L. Avlasevich, D.K. Torous, J.C. Bemis, S. Phonethepswath, C. Labash, K. Carlson, J. Mereness, J. Cottom, J. Palis, J.T. MacGregor, *Toxicol. Sci.*, 2014, **140**, 307–314.
29. M.S. Highley, A.H. Calvert, *Clinical Experience with Cisplatin and Carboplatin*, Humana Press, Totowa NJ, pp 89–113, 2000.
30. P.J. O'Dwyer, J.P. Stevenson, S.W. Johnson, *Clinical Status of Cisplatin, Carboplatin, and Other Platinum-based Antitumor Drugs*. Wiley- VCH: New York, pp 31–72, 1999.
31. S.M. Cohen, S.J. Lippard, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 2001, **67**, 93–130.

- 
32. W.J.F. van der Vijgh, *Clin. Pharmacokinet.*, 1991, **21**, 242–261.
  33. C.H. Choi, Y.J. Cha, C.S. An, K.J. Kim, K.C. Kim, S.P. Moon, Z.H. Lee, Y.D. Min, *Cancer Cell Int*, 2004, **4**, 6-11.
  34. J.M. Extra, M. Espie, F. Calvo, C. Ferme, L. Mignot, M. Marty, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1990, **25**, 299–303.
  35. M.A. Jakupec, M. Galanski, B.K. Keppler, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. vol 146. Springer, Berlin, Heidelberg, 2003.
  36. C. Metcalfe, C. Rajput, J.A. Thomas, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 1314-1319.
  37. H.E. Ruley, *Important Adv. Oncol.*, 1996, **10**, 37–56.
  38. A. Eastman, *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Wiley-VCH: Weinheim, pp. 111–134, 1999.
  39. V.M. Gonzalez, M.A. Fuertes, C. Alonso, J.M. Perez, *Mol. Pharmacol.*, 2001, **59**, 657–663.
  40. A.B. Williams, B. Schumacher, *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016, **6**, 1-15.
  41. M. Kartalou, J.M. Essigmann, *Mutat. Res.*, 2001, **478**, 23–43.
  42. R.P. Perez, *Eur. J. Cancer*, 1998, **34**, 1535–1542.
  43. M. Kartalou, J.M. Essigmann, *Mutat. Res.*, 2001, **478**, 1–21.
  44. K.R. Harrap, M. Jones, J. Siracky, L.A. Pollard, L.R. Kelland, *Ann. Oncol.*, 1990, **1**, 65–76.
  45. S.Y. Loh, P. Mistry, L.R. Kelland, G. Abel, K.R. Harrap, *Br. J. Cancer*, 1992, **66**, 1109–1115.
  46. L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer*, 2007, **7**, 573–584.
  47. G.K. Poon, P. Mistry, F.I. Raynaud, K.R. Harrap, B.A. Murrer, C.F.J. Barnard, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995, **13**, 1493-1498.
  48. S. Barton, K.J. Barnham, A. Habtemariam, P.J. Sadler, R.E. Sue, *Inorg. Chim. Acta* 1998, **273**, 8-13.
  49. Y. Chen, Z. Guo, S. Parsons, P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.*, 1998, **4**, 672-676.
  50. J. Kozelka, F. Legendre, F. Reeder, J. Chottard, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **61**, 190–192.
  51. L. Canovese, L. Cattalini, G. Chessa, M.L. Tobe, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1988, 2135–2140.
  52. E. Wong, C.M. Giandomenico, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2451–2466.
  53. S.J. Berners-Price, P.J. Sadler. *Coord. Chem. Rev.*, 1996, **151**, 1-40.
  - 54 P.M. Takahara, A.C. Rosenzweig, C.A. Frederick, S.J. Lippard, *Nature*, 1995, **377**, 649-652.
  55. P.M. Takahara, C.A. Frederick, S.J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 12309-12321.
  56. T.W. Hambley, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2001, 2711–2718.
  57. T.W. Hambley, *Med. Chem. Commun.*, 2011, **2**, 274-277.
  58. F. Coste, J.M. Malinge, L. Serre, W. Shepard, M. Roth, M. Leng, C. Zelwer, *Nucleic Acids Res.*, 1999, **27**, 1837–1846.
  59. F. Coste, W. Shepard, C. Zelwer, *Acta Crystallogr. D*, 2002, **58**, 431–440.
  60. H. Huang, L. Zhu, B.R. Reid, G.P. Drobny, P.B. Hopkins, *Science*, 1995, **270**, 1842–1845.
  61. F. Paquet, C. Perez, M. Leng, G. Lancelot, M.J. Malinge, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1996, **14**, 67–77.
  62. V. Brabec, M. Leng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 5345–5349.
  63. G. Chu, *J. Biol. Chem.* 1994, **269**, 787–790.
  64. J. Zlatanova, J. Yaneva, S. H. Leuba, *Faseb J.*, 1998, **12**, 791–799.

- 
65. S.M. Patrick, J.J. Turchi, *Biochemistry*, 1998, **37**, 8808–8815.
66. J.O. Thomas, *Biochem. Soc. Trans.*, 2001, **29**, 395–401.
67. U.M. Ohndorf, M.A. Rould, Q. He, C.O. Pabo, S.J. Lippard, *Nature*, 1999, **399**, 708–712.
68. P. del S. Murdoch, J.D. Ranford, P.J. Sadler, S.J. Berners-Price, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 2249–2255.
69. K.J. Barnham, M.I. Djuran, P. del S. Murdoch, P.J. Sadler, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 721–722.
70. S.S.G.E. van Boom, J. Reedijk, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1993, 1397–1398.
71. K.J. Barnham, Z. Guo, P.J. Sadler, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1996, 2867–2876.
72. K.J. Barnham, M.I. Djuran, P. del S. Murdoch, J.D. Ranford and P.J. Sadler, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1995, 3721–3726.
73. U. Frey, J.D. Ranford, P.J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 1333–1340.
74. K.J. Barnham, U. Frey, P. del S. Murdoch, J.D. Ranford, P.J. Sadler, D.R. Newell. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, **116**, 11175–11176.
75. S.J. Berners-Price, P.W. Kuchel, *J. Inorg. Biochem.*, 1990, **38**, 327–335.
76. J. Reedijk, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2499–2510.
77. M.I. Djuran, E.L.M. Lempers, J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 1991, **30**, 2648–2652.
78. T.G. Appleton, J.W. Connor, J.R. Hall, P.D. Prenzler, *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 2030–2037.
79. T. Ishikawa, C.D. Wright, H. Ishizuka. *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 29085–29093.
80. B.L. Zhang, W.X. Tang, *J. Inorg. Biochem.*, 1994, **56**, 143–153.
81. A.I. Ivanov, J. Christodoulou, J.A. Parkinson, K.J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow, P.J. Sadler, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 14721–14730.
82. A. Bhargava, U.N. Vaishampayan, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2009, **18**, 1787–1797.
83. Y. Sedletska, M.J. Giraud-Panis, J.M. Malinge, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, 2005, **5**, 251–265.
84. W. Sttiroyens, P. Dodion, M. Rozenzweig, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1990, **116**, 392–396.
85. T. Rau, R. Alsfasser, A. Zahl, R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 4223–4230.
86. T.M. Silva, S.M. Fiuza, M.P.M. Marques, L. Person, S. Oresson, *Amino Acids*, 2014, **46**, 339–352.
87. A.L.M. Batista de Carvalho, P.S.C. Medeiros, F.M. Costa, V.P. Ribeiro, J.B. Sousa, C. Diniz, M.P.M. Marques, *PloS One*, 2016, **11**, 1–15.
88. M.P.M. Marques. *ISRN Spectrosc.*, 2013, 1–29.
89. S.M. Fiuza, J. Holy, L.A.E. Batista de Carvalho, M.P.M. Marques, *Chem. Biol. Drug. Des.*, 2011, **77**, 477–488.
90. S. Jovanović, K. Obrenčević, Ž.D. Bugarčić, I. Popović, J. Žakulac, B. Petrović. *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 12444–12457.
91. E. Ulukaya, F. Ari, K. Dimas, E.I. Ikitimur, E. Guney, V.T. Yilmaz, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 4957–4963.
92. A.L.M. Batista de Carvalho, M. Pilling, P. Gardner, J. Doherty, G. Cinque, K. Wehbe, C. Kelley, L.A.E. Batista de Carvalho, M.P.M. Marques, *Faraday Discuss.*, 2016, **187**, 273–298.
93. N. Farrell, Y. Qu, M.P. Hacker, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 2179–2184.
94. N. Farrell, *Comm. Inorg. Chem.*, 1995, **16**, 373–389.
95. N. Farrell, *Advances in DNA Sequence Specific Agents. Vol. 2*, Hurley, JAI Press, pp. 187–216, 1996.
96. N. Farrell, *Cancer Invest.*, 1993, **11**, 578–589.

- 
97. M.P. Farrell, Y. Qu, U. Bierbach, M. Valsecchi, E. Menta, *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Verlag, pp. 479–496 1999.
  98. N. Farrell, S. Spinelli, *Uses of Inorganic Chemistry in Medicine*, The Royal Society of Chemistry: Cambridge, pp. 124–134, 1999.
  99. N.P. Farrell, *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*, Humana Press, pp. 321–338, 2000.
  100. C. Manzotti, G. Pratesi, E. Menta, R. Di Domenico, E. Cavalletti, H.H. Fiebig, L.R. Kelland, N. Farrell, D. Polizzi, R. Supino, G. Pezzoni, F. Zunino, *Clin. Cancer Res.*, 2000, **6**, 2626–2634.
  101. G. Pratesi, P. Perego, D. Polizzi, S.C. Righetti, R. Supino, C. Caserini, C. Manzotti, F.C. Giuliani, G. Pezzoni, S. Tognella, S. Spinelli, N. Farrell, F. Zunino, *Br. J. Cancer*, 1999, **80**, 1912–1919.
  102. P. Perego, C. Caserini, L. Gatti, N. Carenini, S. Romanelli, R. Supino, D. Colangelo, I. Viano, R. Leone, S. Spinelli, G. Pezzoni, C. Manzotti, N. Farrell, F. Zunino, *Mol. Pharmacol.*, 1999, **55**, 528–534.
  103. P.M. Calvert, M.S. Highley, A.N. Hughes, E.R. Plummer, A.S.T. Azzabi, M.W. Verrill, M.G. Camboni, E. Verdi, A. Bernareggi, M. Zucchetti, A.M. Robinson, J. Carmichael, A.H. Calvert, *Clin. Cancer Res.*, 1999, **5**, 3796s.
  104. C. Sessa, G. Capri, L. Gianni, F. Peccatori, G. Grasselli, J. Bauer, M. Zucchetti, L. Vigano, A. Gatti, C. Minoia, P. Liati, S. Van den Bosch, A. Bernareggi, G. Camboni, S. Marsoni, *Ann. Oncol.*, 2000, **11**, 977–983.
  105. C. Gourley, J. Cassidy, D. Bisset, G. Camboni, D. Boyle, D. Jodrell, *Proc. AACR*, 2002, 2760-2763.
  106. A.H. Calvert, H. Thomas, N. Colombo, M. Gore, H. Earl, L. Sena, G. Camboni, P. Liati, C. Sessa, *European Journal of Cancer*, 2001, **37** (supp6) Poster Discussion 965.
  107. G. Scagliotti, L. Crino, F. de Marinis, M. Tonato, G. Selvaggi, F. Massoni, A. Maestri, B. Gatti, G. Camboni, *European Journal of Cancer*, 2001, **37** (Supp6) Poster Discussion 182.
  108. J.D. Roberts, J. Peroutka, N.J. Farrell, *Inorg. Biochem.*, 1999, **77**, 51–57.
  109. P. Perego, L. Gatti, C. Caserini, R. Supino, D. Colangelo, R. Leone, S. Spinelli, N. Farrell, F. Zunino, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **77**, 59–64.
  110. Z. Guo, Y. Chen, E. Zang, P.J. Sadler, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, 4107–4111.
  111. M.S. Davies, J. Cox, S. Berners-Price, W. Barklage, Y. Qu, N. Farrell, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 1710–1715.
  112. M.S. Davies, D.S. Thomas, A. Hegmans, S.J. Berners-Price, N. Farrell, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 1101–1109.
  113. T.D. McGregor, A. Hegmans, J. Kasparkova, K. Nepelchova, O. Novakova, H. Penazova, O. Vrana, V. Brabec, N. Farrell, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2002, **7**, 397–404.
  114. V. Brabec, J. Kasparkova, O. Vrana, O. Novakova, J.W. Cox, Y. Qu, N. Farrell, *Biochemistry*, 1999, **38**, 6781–6790.
  115. N. Farrell, *Comprehensive Coordination Chemistry II*, 2003, **9**, 809–840.
  116. A. Johnson, Y. Qu, B. Van Houten, N. Farrell, *Nucleic Acids Res.*, 1992, **20**, 1697–1703.
  117. P.K. Wu, M. Kharatishvili, Y. Qu, N. Farrell, *J. Inorg. Biochem.*, 1996, **63**, 9–18.
  118. T.D. McGregor, Z. Balcarova, Y. Qu, M.C. Tran, R. Zaludova, V. Brabec, N. Farrell, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **77**, 43–46.
  119. T.D. McGregor, W. Bousfield, Y. Qu, N. Farrell, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **91**, 212–219.
  120. Y. Kim, J.H. Geiger, S. Hahn, P.B. Sigler, *Nature*, 1993, **365**, 512–520.
  121. A. Herbert, A. Rich, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 11595–11598.

- 
122. M.B. Kloster, J.C. Hannis, D.C. Muddiman, N. Farrell, *Biochemistry*, 1999, **38**, 14731–14737.
123. J.W. Cox, S.J. Berners-Price, M.S. Davies, Y. Qu, N. Farrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 1316–1326.
124. M.S. Davies, D.S. Thomas, A. Hegmans, S.J. Berners-Price, Y. Qu, N. Farrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 16092–16103.
125. Y. Qu, M.J. Bloemink, J. Reedijk, T.W. Hambley, N. Farrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 9307–9313.
126. J. Kasparkova, O. Novakova, O. Vrana, N. Farrell, V. Brabec, *Biochemistry*, 1999, **38**, 10997–11005.
127. J. Kasparkova, K.J. Mellish, Y. Qu, V. Brabec, N. Farrell, *Biochemistry*, 1996, **35**, 16705–16713.
128. J. Kasparkova, N. Farrell, V. Brabec, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 15789–15798.
129. J. Zehnulova, J. Kasparkova, N. Farrell, V. Brabec, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 22191–22199.
130. J. Kasparkova, J. Zehnulova, N. Farrell, V. Brabec, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 48076–48086.
131. A. Sancar, *Annu. Rev. Biochem.*, 1996, **65**, 43–81.
132. F. Basola, R.G. Pearson, D.D. Williams, *J. Electrochem. Soc.*, 1959, **106**, 272–281.
133. G. Lente, I. Fábián, A. Poë, *New J. Chem.*, 2005, **29**, 759–760.
134. C. Housecroft, *Inorganic Chemistry*, Pearson Education Limited, United Kingdom, Harlow, 2012
135. I.J. Gal, *Mehanizmi neorganskih reakcija*, Naučna Knjiga, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 1979.
136. Ž. D. Bugarčić, *Kinetika i mehanizam supstitucionih reakcija*, Autor i Prirodno-matematički fakultet u Kragujevcu, Kragujevac, 1996.
137. T. Buchen, A. Hazell, L. Jessen, C.J. McKenzie, L.P. Nielsen, J.Z. Pedersen, D. Schollmeyer, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, 2697–2704.
138. T.G. Appleton, J.R. Hall, S.F. Ralph, C.S.M. Thompson, *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 3521–3525.
139. F. Dimiza, S. Fountoulaki, A.N. Papadopoulos, C.A. Kontogiorgis, V. Tangoulis, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, A. Terzis, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 8555–8568.
140. T. Soldatović, S. Jovanović, Ž.D. Bugarčić, R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2012, **41** 876–884.
141. S. Jovanović, J. Bogojeski, M. Petković, Ž.D. Bugarčić, *J. Coord. Chem.*, 2015, **68**, 3148–3163.
142. D. Čočić, S. Jovanović, M. Nišavić, D. Baskić, D. Todorović, S. Popović, Ž.D. Bugarčić, B. Petrović, *J. Inorg. Biochem.*, 2017, **175**, 67–79
143. L. Senerović, M.D. Živković, A. Veselinović, A. Pavić, M.I. Djuran, S. Rajković, J. Nikodinović-Runić, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 1442–1451.
144. H. Hohmann, R. Van Eldik, *Inorg. Chim. Acta*, 1990, **174**, 87–92.
145. N. Summa, T. Soldatovic, L. Dahlenburg, Ž.D. Bugarčić, R. Van Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2007, **12**, 461–475.
146. M.D. Živković, D.P. Ašanin, S. Rajković, M.I. Djuran, *Polyhedron*, 2011, **30**, 947–952.
147. A. Hofmann, R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2003, 2979–2985.
148. D. Čočić, S. Jovanović-Stević, R. Jelić, S. Matić, S. Popović, P. Djurdjević, D. Baskić, B. Petrović, *Dalton Trans.*, 2020, **49**, 14411–14431.

- 
149. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta*, 1996, **43**, 1739-1753.
150. J. Bogojeski, R. Jelic, D. Petrovic, E. Herdtweck, P.G. Jones, M. Tamm, Z.D. Bugarcic, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 6515-6523.
151. L. Alderighi, P. Gans, A. Lenco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **184**, 311-318.
152. A. Krężel, W. Bal, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 161-166.
- 153 (a) A. D. Becke, *J. Phys. Chem.*, 1993, **98**, 5648-5652; (b) C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.*, 1988, **37**, 785-789; (c) S.H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair, *Can. J. Phys.*, 1980, **58**, 1200-1211; (d) P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski, M.J. Frisch, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 11623-11627.
154. (a) F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, **7**, 3297-3305; (b) A. Schaefer, H. Horn, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.*, 1992, **97**, 2571-2577; (c) A. Schaefer, C. Huber, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.*, 1994, **100**, 5829-5835; (d) K. Eichkorn, F. Weigend, O. Treutler, R. Ahlrichs, *Theor. Chem. Acc.*, 1997, **97**, 119-124; (e) F. Weigend, F. Furche, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.*, 2003, **119**, 12753-12762.
155. (a) V. Barone, M. Cossi, *J. Phys. Chem. A*, 1998, **102**, 1995-2001; (b) M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, V. Barone, *J. Comput. Chem.*, 2003, **24**, 669-681.
156. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, Gaussian 09, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2010.
- 157 E. A. Dolgoplova, A. A. Berseneva, M. S. Faillace, O. A. Ejegbavwo, G. A. Leith, S. W. Choi, H. N. Gregory, A. M. Rice, M. D. Smith, M. Chruszcz, S. Garashchuk, K. Mythreye, N. B. Shustova, *J. Am. Chem. Soc.*, 2020, **142**, 4769-4783.
158. J. R. Lakowicz, G. Weber, *Biochemistry*, 1973, **12**, 4161-4170.
159. S. Wu, W. Yuan, H. Wang, Q. Zhang, M. Liu, K. Yu, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 2026-2034.
160. J. Min, X. Meng-Xia, Z. Dong, L. Yuan, L. Xiao-Yu, C. Xing, *J. Mol. Struct.*, 2004, **692**, 71-80.
161. A. Samanta, S. Jana, D. Ray, N. Guchhait, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2014, **121**, 23-34.
162. H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1981, **78**, 2179-2183.
163. A. Canals, M. Purciolas, J. Aymami, M. Colla, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2005, **61**, 1009-1012.
164. A. Bujacz, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2012, **68**, 1278-1289.
165. R. Thomsen, M. H. Christensen, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 3315-3321.
166. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, 1983, **65**, 55-63.
167. M.R. Shehata, *Transit. Met. Chem.*, 2001, **26**, 198-204.
168. H. Ertürk, A. Hofmann, R. Puchta, R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2007, **22**, 2295-2301.



- 
169. S. Jovanović, B. Petrović, M. Petković, Ž.D. Bugarčić, *Polyhedron*, 2015, **101**, 206–214.
170. W.Z. Shen, G.T. Kaus, B. Lippert, *Dalton Trans.*, 2009, **39**, 8203–8214.
171. J. Park, M. Ko, H. So, *Bull. Kor. Chem. Soc.*, 1993, **14**, 759–762.
172. P. Tsiveriotis, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, *Rev. Inorg. Chem.*, 2000, **20**, 305–338.
173. A. Caubet, V. Moreno, E. Molins, C. Miravittles, *J. Inorg. Biochem.*, 1992, **48**, 135–152.
174. N. Summa, W. Schiessl, R. Puchta, N.H. Eikema, R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 2948–2959.
175. S. Jovanović, B. Petrović, D. Čanović, Ž.D. Bugarčić, *In. J. Chem. Kinet.*, 2011, **43**, 99–106.
176. M.T. Ashby, *Comments Inorg. Chem.*, 1990, **10**, 297–313.
177. S.G. Murray, F.R. Hartley, *Chem. Rev.*, 1981, **81**, 365–414.
178. D. Čočić, S. Jovanović, S. Radisavljević, J. Korzekwa, A. Scheurer, R. Puchta, D. Baskić, D Todorović, S. Popović, S. Matić, B. Petrović, *J. Inorg. Biochem.*, 2018, **189**, 91–102.
179. O. Novakova, H. Chen, O. Vrana, A. Rodger, P.J. Sadler, V. Brabec, *Biochemistry*, 2003, **42**, 11544–11554.
180. M.A. Rizvi, M. Zaki, M. Afzal, M. Mane, M. Kumar, B.A. Shah, S. Srivastav, S. Srikrishna, G.M. Peerzada, S. Tabassum, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **90**, 876–888.
181. M.M. Milutinović, J.V. Bogojeski, O. Klisurić, A. Scheurer, S.K.C. Elmrothd, Ž.D. Bugarčić, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 15481–15491.
182. A.A. Recio Despaigne, J.G. Da Silva, P.R. da Costa, R.G. dos Santos, H. Beraldo, *Molecules*, 2014, **19**, 17202–17220.
183. S. Dhar, M. Nethaji, A.R. Chakravarty, *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**, 805–812.
184. F. Dimiza, F. Perdih, V. Tangoulis, I. Turel, D.P. Kessissoglou, G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.*, 2011, **105**, 476–489.
185. A.R. Timerbaev, C.G. Hartinger, S.S. Aleksenko, B.K. Keppler, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 2224–2248
186. N. Wang, L. Ye, F. F. Wan, R. Xu, *Int. J. Pharm.*, 2008, **351**, 55-60.
187. X. M. He, D. C. Carter, *Nature*, 1992, **358**, 209-215.
188. L. Leboffe, A. di Masi, F. Polticelli, V. Trezza and P. Ascenzi, *Curr. Med. Chem.*, 2020, **27**, 4907-4931
189. Y. Wang, H. Zhang, G. Zhang, W. Tao, S. Tang, *J. Lumin.*, 2007, **126**, 211–218.
190. J.S. Johansson, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 17961–17965.
191. J. Kljun, I. Bratsos, E. Alessio, G. Psomas, U. Repnik, M. Butinar, B. Turk, I. Turel, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**, 9039–9052.
192. A. Hofmann, D. Jaganyi, O.Q. Munro, G. Liehr, R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 1688-1700.
193. D. Reddy, D. Jaganyi, *Int. J. Chem. Kinet.*, 2011, **43**, 161-174.
194. D. Čočić, S. Jovanović, S. Rajković, B. Petrović, *Inorg. Chim. Acta*, 2018, **482**, 635–642.
195. D.P. Ašanin, M.D. Živković, S. Rajković, B. Warzajtis, U. Rychlewska, M.I. Djuran, *Polyhedron*, 2013, **51**, 255-262.
196. M. Willermann, C. Mulcahy, R.K.O. Sigel, M. Morell Cerda, E. Freisinger, P.J.S. Miguel, M. Roitzsch, B. Lippert, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 2093-2099.
197. P. Tsiveriotis, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, *Rev. Inorg. Chem.*, 2000, **4**, 305-309.
198. D. T. Richens, *The Chemistry of Aqua Ions*, John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, West Sussex, England, 1997.
199. T. A. Abdelkarim, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2016, **11**, 4283-4299.

- 
200. N. R. Filipovic, S. Bjelobrljic, A. Marinkovic, T. Z. Verbic, I. N. Cvijetic, M. Sencanski, M. Rodic, M. Vujcic, D. Sladic, Z. Stirkovic, T. R. Todorovic, C. D. Muller, *RCS Adv.*, 2015, **5**, 95191-95211.
201. Y. Song, L. Xu, Q. Wu, S. Xiao, H. Zeng, Y. Gong, C. Li, S. Cheng, Q. Li, L. Zhang, Z. Li, *Small Methods*, 2020, **4**, 1900779-1900785.
202. S. Verma, V. Ravichandiran, N. Ranjan, S. Flora, *Med. Chem.*, 2020, **16**, 454-486.
203. J. Chen, J. Stubbe, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2004, **8**, 175-181.
204. W. Fudickar, T. Linker, *Bioorg. Med. Chem.*, 2020, **28**, 115432-115439.
205. S. M. Robinson, Z. Shen, J. R. Askim, C. B. Montgomery, H. O. Sintim and S. Semancik, *Biosensors*, 2019, **9**, 54-56.
206. V. G. Vaidyanathan, B. U. Nair, *J. Inorg. Biochem.*, 2003, **94**, 121-126.
207. N. Seedher, P. Agarwal, *J. Lumin.*, 2010, **130**, 1841-1848.
208. M. G. Wen, X. B. Zhang, J. N. Tian, S. H. Ni, H. D. Bian, Y. L. Huang and H. Liang, *J. Solution Chem.*, 2009, **38**, 391-401.
209. G. Z. Chen, X. Z. Huang, J. G. Xu, *Fluorimetry*, Science Press, Beijing, 2<sup>nd</sup> edn, 1990.
210. D. M. Poloni, O. Dangles, J. A. Vinson, *J. Agric. Food Chem.*, 2019, **67**, 9139-9147.
211. Y. J. Hu, Y. O. Yang, C. M. Dai, Y. Lui, X. H. Xiao, *Biomacromolecules*, 2010, **11**, 106-112.
212. P. D. Ross, S. Subramanian, *Biochemistry*, 1981, **20**, 3096-3102.
213. L. Van de Sande, S. Cosyns, W. Willaert, W. Ceelen, *Drug Delivery*, 2020, **27**, 40-53.
214. S. S. Singh, S. Vats, A. Y. Chia, T. Z. Tan, S. Deng, M. S. Ong, F. Arfuso, C. T. Yap, B. C. Goh, G. Sethi, R. Y. Huang, H. M. Shen, R. Manjithaya and A. P. Kumar, *Oncogene*, 2018, **37**, 1142-1158.
215. M. Komatsu, S. Kageyama, Y. Ichimura, *Pharmacol. Res.*, 2012, **66**, 457-466.
216. C.-B. Bui, J. Shin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, **412**, 347-352.
217. J. Chen, *Cold Spring Harbor Perspect. Med.*, 2016, **6**, a026104.
218. L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D. W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, A. V. Antonov, E. Arama, E. H. Baehrecke, N. A. Barlev, N. G. Bazan, F. Bernassola, M. J. M. Bertrand, K. Bianchi, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, P. Boya, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, D. Carmona- Gutierrez, F. Cecconi, F. K. Chan, N. S. Chandel, E. H. Cheng, J. E. Chipuk, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, M. Conrad, J. R. Cubillos-Ruiz, P. E. Czabotar, V. D'Angiolella, T. M. Dawson, V. L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K. M. Debatin, R. J. DeBerardinis, M. Deshmukh, N. Di Daniele, F. Di Virgilio, V. M. Dixit, S. J. Dixon, C. S. Duckett, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, J. W. Elrod, G. M. Fimia, S. Fulda, A. J. García-Sáez, A. D. Garg, C. Garrido, E. Gavathiotis, P. Golstein, E. Gottlieb, D. R. Green, L. A. Greene, H. Gronemeyer, A. Gross, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, I. S. Harris, M. O. Hengartner, C. Hetz, H. Ichijo, M. Jäättelä, B. Joseph, P. J. Jost, P. P. Juin, W. J. Kaiser, M. Karin, T. Kaufmann, O. Keep, A. Kimchi, R. N. Kitsis, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kumar, S. W. Lee, J. J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S. A. Lipton, R. A. Lockshin, C. López-Otín, S. W. Lowe, T. Luedde, E. Lugli, M. MacFarlane, F. Madeo, M. Malewicz, W. Malorni, G. Manic, J. C. Marine, S. J. Martin, J. C. Martinou, J. P. Medema, P. Mehlen, P. Meier, S. Melino, E. A. Miao, J. D. Molkentin, U. M. Moll, C. Muñoz-Pinedo, S. Nagata, G. Nuñez, A. Oberst, M. Oren, M. Overholtzer, M. Pagano, T. Panaretakis, M. Pasparakis, J. M. Penninger, D. M. Pereira, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J. H. M. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, M. Rehm, R. Rizzuto, C. M. P. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, K. M. Ryan, E. Sayan, L.

- 
- Scorrano, F. Shao, Y. Shi, J. Silke, H. U. Simon, A. Sistigu, B. R. Stockwell, A. Strasser, G. Szabadkai, S. E. G. Tait, D. Tang, N. Tavernarakis, A. Thorburn, Y. Tsujimoto, B. Turk, T. V. Berghe, P. Vandenabeele, M. G. V. Heiden, A. Villunger, H. W. Virgin, K. H. Vousden, D. Vucic, E. F. Wagner, H. Walczak, D. Wallach, Y. Wang, J. A. Wells, W. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, L. Zitvogel, G. Melino, G. Kroemer, *Cell Death Differ.*, 2018, **25**, 486-541.
219. J. Erenpreisa, M. Kalejs, F. Ianzini, E. A. Kosmacek, M. A. Mackey, D. Emzinsh, M. S. Cragg, A. Ivanov, T. M. Illidge, *Cell Biol. Int.*, 2005, **29**, 1005-1011.
220. P. E. Puig, M. N. Guilly, A. Bouchot, N. Droin, D. Cathelin, F. Bouyer, L. Favier, F. Ghiringhelli, G. Kroemer, E. Solary, F. Martin, B. Chauffert, *Cell Biol. Int.*, 2008, **32**, 1031-1043.

# ПРИЛОЗИ



## New dinuclear palladium(II) complexes: Studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interactions and cytotoxic activity



Dušan Čočić<sup>a</sup>, Snežana Jovanović<sup>a</sup>, Marija Nišavić<sup>b</sup>, Dejan Baskić<sup>c,d</sup>, Danijela Todorović<sup>e</sup>, Suzana Popović<sup>c</sup>, Živadin D. Bugarčić<sup>a</sup>, Biljana Petrović<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, P. O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup> “Vinča” Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Mike Petrovića Alasa 12-14, 11001 Belgrade, Serbia

<sup>c</sup> University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Microbiology and Immunology, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>d</sup> Public Health Institute, Nikole Pašića 1, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>e</sup> University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Genetics, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Dinuclear Pd(II) complexes

Kinetics

DNA

BSA

Cytotoxicity

### ABSTRACT

Six new dinuclear Pd(II) complexes,  $[\{Pd(2,2'-bipy)Cl\}_2(\mu-pz)](ClO_4)_2$  (**Pd1**),  $[\{Pd(dach)Cl\}_2(\mu-pz)](ClO_4)_2$  (**Pd2**),  $[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu-pz)](ClO_4)_2$  (**Pd3**),  $[\{Pd(2,2'-bipy)Cl\}_2(\mu-4,4'-bipy)](ClO_4)_2$  (**Pd4**),  $[\{Pd(dach)Cl\}_2(\mu-4,4'-bipy)](ClO_4)_2$  (**Pd5**) and  $[\{Pd(en)Cl\}_2(\mu-4,4'-bipy)](ClO_4)_2$  (**Pd6**) (where 2,2'-bipy = 2,2'-bipyridyl, pz = pyrazine, dach = *trans*-(±)-1,2-diaminocyclohexane, en = ethylenediamine, 4,4'-bipy = 4,4'-bipyridyl) have been synthesized and characterized by elemental microanalysis, IR, <sup>1</sup>H NMR and MALDI-TOF mass spectrometry. The pK<sub>a</sub> values of corresponding diqua complexes were determined by spectrophotometric pH titration. Substitution reactions with thiourea (Tu), L-methionine (L-Met), L-cysteine (L-Cys), L-histidine (L-His) and guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) were studied under the *pseudo*-first order conditions at pH 7.2. Reactions of **Pd1** with Tu, L-Met and L-Cys were followed by decomposition of complexes, while structures of dinuclear complexes were preserved during the substitution with nitrogen donors. Interactions with calf-thymus DNA (CT-DNA) were followed by absorption spectroscopy and fluorescence quenching measurements. All complexes can bind to CT-DNA exhibiting high intrinsic binding constants ( $K_b = 10^4$ – $10^5$  M<sup>-1</sup>). Competitive studies with ethidium bromide (EB) have shown that complexes can displace DNA-bound EB. High values of binding constants towards bovine serum albumin protein (BSA) indicate good binding affinity. Finally, all complexes showed moderate to high cytotoxic activity against HeLa (human cervical epithelial carcinoma cell lines) and MDA-MB-231 (human breast epithelial carcinoma cell lines) tumor cell lines inducing apoptotic type cell death, whereas normal fibroblasts were significantly less sensitive. The impact on cell cycle of these cells was distinctive, where **Pd4**, **Pd5** and **Pd6** showed the most prominent effect arresting MDA-MB-231 (human lung fibroblast cell lines) cell in G1/S phase of cell cycle.

### 1. Introduction

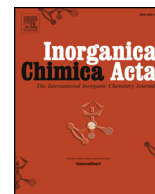
Platinum-based drugs are widely used anticancer agents with a broad range of antitumor activities [1,2]. Although cisplatin is one of the most common chemotherapy drugs, its application is limited due to the development of drug resistance and severe side effects [3,4]. These limitations have stimulated the investigations for improvement of existing platinum antitumor drugs and development of new derivatives that display better therapeutic properties [5–7]. One such class of compounds are polynuclear platinum complexes which contain two or more reactive platinum centers linked by the various types of ligands

[8–14]. Development of research in this area was driven by the hypothesis that complexes with distinctly different DNA-binding mechanisms may exhibit unique biological activity in comparison with current mononuclear clinically used agents [15]. Already published results have shown that polynuclear complexes with azoles as bridging ligands reduce the distortion of DNA double helix in a cross-link [16], while complexes with flexible linear aliphatic molecules form long-range cross-links with DNA [17].

However, the long-term application of platinum complexes was leading scientists to examine complexes of some other metals, such as palladium [18–20]. It is well known that palladium(II) complexes are

\* Corresponding author.

E-mail address: [biljanap@kg.ac.rs](mailto:biljanap@kg.ac.rs) (B. Petrović).



# Kinetics and mechanism of the substitution reactions of dinuclear platinum (II) complexes with important bio-molecules



Dušan Čočić, Snežana Jovanović, Snežana Rajković, Biljana Petrović\*

Faculty of Science, University of Kragujevac, Domanovića 12, P. O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Dinuclear Pt(II) complexes  
Kinetics  
Mechanism

## ABSTRACT

Substitution reactions of the series of dinuclear platinum(II) complexes with the general formula  $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2\}$  (1–4) (where L is ethylenediamine (en), 1; ( $\pm$ )-1,2-propylenediamine (1,2-pn), 2; isobutylenediamine (ibn) 3; *trans*-( $\pm$ )-1,2-diaminocyclohexane (dach), 4) and biologically important ligands such as thiourea (Tu), glutathione (GSH) and L-methionine (L-Met) were studied in a medium consisting of 25 mM Hepes buffer and 40 mM NaCl, at pH 7.2 and 310 K using UV-Vis spectrophotometry. In addition, substitution reactions of complexes 2 and 3 with L-histidine (L-His) and guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) were investigated and the obtained results were compared with those previously published for complexes 1 and 4. The observed order of reactivity of the studied complexes toward selected nucleophiles is:  $1 > 2 > 3 > 4$ , while the reactivity of nucleophiles follows the order:  $Tu > L-Met > GSH > L-His > 5'-GMP$ . The reactions with Tu and L-Met were followed by decomposition of the starting dinuclear platinum(II) complexes, whereas the structures of all complexes were preserved during substitution with GSH, L-His and 5'-GMP. To confirm the reaction pathways,  $^1H$  NMR spectroscopy and the HPLC method were additionally used. Furthermore, the two  $pK_a$  values for the aqua complexes,  $\{[Pt(1,2-pn)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$  2a and  $\{[Pt(ibn)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$  3a were determined and compared with those previously reported for complexes  $\{[Pt(en)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$  1a and  $\{[Pt(dach)(H_2O)]_2(\mu-pz)\}^{4+}$  4a.

## 1. Introduction

Among a number of platinum complexes cisplatin, *cis*- $[PtCl_2(NH_3)_2]$ , is still the most used cytostatic worldwide in the treatment of different types of cancers [1,2]. The main problems that limit the clinical use of cisplatin include acquired resistance and serious side effects, which is closely related to the lack of tumour selectivity of cisplatin [3,4]. These limitations have stimulated investigations for the improvement of existing platinum antitumor drugs and development of new derivatives that display better therapeutic properties [5].

Polynuclear platinum complexes represent a novel class of promising antitumor agents with potential clinical significance [6–9]. These complexes contain two or more platinum centres linked by various types of ligands [10–14]. Complexes with azoles as bridging ligands were developed to minimize distortion of the DNA double helix in a cross-link [15], while complexes with flexible linear aliphatic molecules form long-range cross-links with DNA [16]. The first polynuclear complex that entered clinical trials was the trinuclear platinum complex, BBR3464 [17]. Its preclinical anticancer profile was highlighted by exceptional potency and activity in a broad spectrum of solid human tumours [18]. Considering that polynuclear complexes interact

with DNA in completely different way compared to cisplatin or other mononuclear platinum complexes, further research in this area led to the synthesis of many di- and trinuclear platinum complexes as potential anticancer drugs [19–21].

It is well established that the antitumor activity of platinum drugs is based on their interactions with DNA molecule, while the side effects of platinum therapy arise from interactions with some bio-molecules that contain sulfur [22]. Therefore, the study of kinetics and mechanism of the substitution reactions between dinuclear platinum(II) complexes and bio-molecules under physiological conditions would improve the understanding of biochemical processes that occur in the body during the application of dinuclear platinum(II) complexes as antitumor drugs.

In accordance with previous, in this study substitution reactions of the series of dinuclear complexes with general formula  $\{[Pt(L)Cl]_2(\mu-pz)Cl_2\}$  (1–4) (where L is ethylenediamine (en), 1; ( $\pm$ )-1,2-propylenediamine (1,2-pn), 2; isobutylenediamine (ibn) 3; *trans*-( $\pm$ )-1,2-diaminocyclohexane (dach), 4) (Fig. 1) and biologically relevant ligands such as thiourea (Tu), glutathione (GSH), L-methionine (L-Met), L-histidine (L-His) and guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) (Fig. 2) were examined by conventional UV-Vis spectrophotometry,  $^1H$  NMR spectroscopy and HPLC. These nucleophiles were chosen because of their

\* Corresponding author.

E-mail address: [biljanap@kg.ac.rs](mailto:biljanap@kg.ac.rs) (B. Petrović).



Cite this: DOI: 10.1039/d0dt02906h

# 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†

Dušan Čočić,<sup>a</sup> Snežana Jovanović-Stević,<sup>b</sup> Ratomir Jelić,<sup>c</sup> Sanja Matić,<sup>c</sup> Suzana Popović,<sup>d</sup> Predrag Djurdjević,<sup>e,f</sup> Dejan Baskić<sup>d,g</sup> and Biljana Petrović<sup>g,\*a</sup>

Three dinuclear complexes [Pd<sub>2</sub>(tpbd)Cl<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> (**PP1**), [Pt<sub>2</sub>(tpbd)Cl<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> (**PP2**) and [PdPt(tpbd)Cl<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> (**PP3**) (tpbd = *N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl)benzene-1,4-diamine) have been synthesized and characterized and the protonation constants of their corresponding diaqua analogues have been determined. Also, in water solution, the aqua analogues of these complexes exist as mono-hydroxo, di-hydroxo and dimer  $\mu$ -hydroxo complexes in the pH between 3.0 and 11.0. Substitution reactions with sulfur- and nitrogen-donor nucleophiles, such as thiourea (Tu), L-methionine (L-Met), glutathione (GSH) and guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP), were studied at pH 7.2 by conventional and stopped-flow UV-Vis spectrophotometry and the observed reactivity follows the order: Tu > L-Met > GSH > 5'-GMP. Also, the interactions with calf thymus DNA (CT-DNA) and bovine serum albumin (BSA) were investigated. Competitive studies with DNA were performed in the presence of ethidium bromide and Hoechst dye 33258 as well. The complexes possess the strong ability to react with CT-DNA exhibiting intercalation and more preferable minor groove binding. Nevertheless, all complexes showed a good binding affinity toward BSA with relatively high binding constants. The nature of the binding forces between complexes and biomolecules has been identified as hydrophobic. Experimental results were compared with the molecular docking results, while the relative stability and thermodynamic properties of dinuclear complexes were compared with their mononuclear units by DFT calculations. Among three tested complexes, **PP2** showed the most powerful cytotoxic effect on HTB140 and H460 cancer cell lines after 48 h of treatment and exerted a strong long-term influence on the proliferation potential of both tested cell lines. **PP2** induced the inhibition of autophagy, G2/M cell cycle arrest and mitotic catastrophe.

Received 18th August 2020,  
Accepted 20th September 2020

DOI: 10.1039/d0dt02906h

rsc.li/dalton

## Introduction

Notwithstanding the success story of cisplatin,<sup>1</sup> there are a number of problems that need to be considered during the treatment of cancer with this Pt(II) complex.<sup>2,3</sup> The side effects of cisplatin are severe and include dose-limiting toxicity such as nephrotoxicity, neurotoxicity, ototoxicity and emetogenesis.<sup>4</sup> As a result of these negative properties and the quite evident fact that some analogues of cisplatin would probably not offer any substantial clinical advantages over the existing drugs, research in recent years has been focused more on non-classical multinuclear Pt(II) and Pd(II) complexes.<sup>5</sup> Promising candidates among these complexes are bridged dinuclear or trinuclear Pd(II) and/or Pt(II) complexes that can form DNA-adducts that are not accessible to their mononuclear analogues, such as 1,3- and 1,4-GG interstrand cross-links.<sup>6</sup> Published results

<sup>a</sup>University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: biljana.petrovic@pmf.kg.ac.rs; Fax: +381(0)34335040; Tel: +381(0)34336223

<sup>b</sup>University of Kragujevac, Institute of Information Technologies, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>c</sup>University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

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

<sup>e</sup>University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Internal medicine, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>f</sup>Clinic for Haematology, Clinical Centre Kragujevac, Zmaj Jovina 30, 34000 Kragujevac, Serbia

<sup>g</sup>Public Health Institute, Nikole Pašića 1, 34000 Kragujevac, Serbia

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0dt02906h

## БИОГРАФИЈА



Душан Тоћић рођен је 06. 04. 1991. године у Крушевцу. Завршио је Гимназију Свети Трифун, општи смер, у Александровцу 2010. године. Природно-математички факултет у Крагујевцу, студијски програм хемија, смер истраживање и развој, уписао је 2010/2011. године у Крагујевцу, где је одбранио завршни рад на основним академским студијама 2015. године, са просечном оценом 8,24. Мастер академске студије, студијски програм хемија, смер истраживање и развој, уписао је 2015/2016. године на истом факултету. Мастер рад је одбранио 15. 09. 2016. године, са просечном оценом 10,00. Докторске академске студије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу уписао је школске 2016/2017. године, смер неорганска хемија.

Под менторством професора др Биљане Петровић истраживање усмерава на синтезу хомо- и хетеро-динуклеарних комплекса платине(II) и паладијума(II) и њихову карактеризацију. До сада је положио све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 10. Од октобра 2017. године запослен је као истраживач-приправник, а од децембра 2019 као истраживач-сарадник на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Члан је Српског хемијског друштва.

Душан Тоћић се бави научно-истраживачким радом из области неорганске хемије. Предмет научних истраживања на којима је ангажован у Институту за хемију у Крагујевцу је синтеза динуклеарних комплекса платине(II) и паладијума(II), њихова карактеризација, као и интеракције са малим биомолекулима. Такође бави се супрамолекулском хемијом, истраживањем интеракција комплекса метала за различите биомолекуле молекулском докинг методом, као и истраживањем механизма хемијских реакција компјутерском хемијом. До сада је објавио двадесет и шест научних радова у часописима од међународног значаја.



**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Душан С. Ђоћић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И БИОЛОШКА АКТИВНОСТ  
ДИНУКЛЕАРНИХ ПЛАТИНА(II) И ПАЛАДИЈУМ(II) КОМПЛЕКСА СА  
АЗОТ-ДОНОРСКИМ МОСТНИМ ЛИГАНДИМА

која је одбрањена на Природно-математичком факултету  
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 14.7.2022. године,



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Душан С. Ћоћић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И БИОЛОШКА АКТИВНОСТ  
ДИНУКЛЕАРНИХ ПЛАТИНА(II) И ПАЛАДИЈУМ(II) КОМПЛЕКСА СА  
АЗОТ-ДОНОРСКИМ МОСТНИМ ЛИГАНДИМА

која је одбрањена на Природно-математичком факултету

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

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

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 14.7.2022. године,

  
\_\_\_\_\_

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/>