

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Stefan R. Nikolić

**Sinteza i karakterizacija rutenijum-arenskih kompleksa sa
N, S ili O donorskim ligandima**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Stefan R. Nikolić

**Synthesis and characterization of ruthenium-arene
complexes with N, S or O donor ligands**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019.

Mentor

dr Sanja Grgurić-Šipka

redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije

dr Tibor Sabo

redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Dejan Opsenica

naučni savetnik Centra za hemiju IHTM-a

dr Sandra Arandelović

viši naučni saradnik Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane: ____ . ____ . 2019. godine

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je pri Katedri za opštu i neorgansku hemiju, Hemiskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u okviru nacionalnog projekta „Racionalni dizajn i sinteza biološki aktivnih i koordinacionih jedinjenja i funkcionalnih materijala, relevantnih u (bio)nanotehnologiji”.

Zahvaljujem se mentoru prof. dr Sanji Grgurić-Šipka na ukazanom poverenju, rukovođenju i pomoći prilikom izrade ove disertacije i prof. dr Tiboru Sabou koji je zajedno sa mentorom omogućio usvajanje raznolikog znanja i veština kroz saradnju sa inostranstvom i privredom.

Zahvalio bih se dr Dejanu Opsenici na korisnim savetima, pomoći i saradnji tokom izrade ove disertacije. Takođe bih se zahvalio dr Sandri Arandžević sa Instituta za onkologiju i radiologiju u Beogradu na saradnji i korisnim sugestijama u toku izrade ovog rada.

Zahvaljujem se svim kolegama iz laboratorije 525 koji su bili tu, pomagali mi i davali mi nesebičnu podršku i savete tokom izrade ove disertacije.

Hvala i ostalim kolegama sa Katedre za opštu i neorgansku hemiju, kao i kolegama sa Katedri organske, analitičke, biohemije i primenjene hemije, koji su bili dobre volje za saradnju, pomoć i sve drugo kada mi je bilo potrebno.

Hvala kolegama iz Centra za instrumentalnu analizu Hemijskog fakulteta gde je urađena većina potrebne karakterizacije sintetisanih jedinjenja.

Hvala kolegama sa magacina Hemijskog fakulteta koji su izlazili u susret u vezi potrebnih sredstava korišćenih za izradu ove teze.

Zahvaljujem se prof. dr Gilles Gasser-u sa Instituta za neorgansku hemiju u Cirihu i prof. dr Vladimiru Arionu sa Instituta za neorgansku hemiju u Beču, na saradnji i gostoprimstvu u svoje istraživačke grupe tokom izrade doktorske disertacije.

I najveću zahvalnost dugujem prijateljima i majci Radmili koji su bili moja najveća podrška sve ove godine.

Sinteza i karakterizacija rutenijum-arenskih kompleksa sa N, S ili O donorskim ligandima

REZIME

U ovom radu je opisana sinteza, karakterizacija i biološka aktivnost novih organorutenijumskih kompleksa. Sintetisani su kompleksi koji se sastoje od benzenskog, toluenskog i cimenskog arenskog dela, a kao ligandi su korišćeni hlorhinolinski derivati, planarni aromatični polipiridini, dihidrazid i hlorido anjoni.

Sintetisani su ligandi: 1-(7-hlorhinolin-4-il)tiourea, kao predstavnik 7-hlorhinolina, 11,12-dimetildipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin (Me_2dppz), 2-(9-antril)-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolin (aip) i pirido[2',3':5,6]pirazino[2,3-f][1,10]fenantrolin (ppf) koji predstavljaju seriju planarnih aromatičnih polipiridinskih liganada koji daju kompleksima lipofilna svojstva i samim tim olakšavaju prodor u ćeliju i ispoljavanje željenog dejstva i N^1, N^2 -dipropionilhidrazin, koji je koordinovan za dva rutenijum(II) centra dao kompleks. Svi kompleksi su okarakterisani infacrvenom i NMR spektroskopijom, masenom spektrometrijom i molekulske formule su potvrđene elementalnom analizom. Stabilnost kompleksa u rastvoru DMSO-a je takođe analizirana zbog daljih bioloških istraživanja u ovom medijumu i na osnovu NMR spektara je potvrđena stabilnost kompleksa.

Biološka istraživanja aktivnosti sintetisanih liganada i kompleksa su *in vitro* izvršena na tumorskim ćelijama: karcinoma grlića materice (HeLa), humanoj ćelijskoj liniji endotela (EA.hy 926), mijelogenoj eritroleukemiji (K562), alveolarnom bazalnom adenokarcinomu (A549), karcinomu dojke (MDA-MB-231) i jednoj netumorskoj humanoj ćelijskoj liniji fibroblasta iz pluća (MRC-5). Kompleksi su pokazali bolju aktivnost u poređenju sa ligandima, a cimenski kompleksi se mogu izdvojiti kao aktivniji u odnosu na ostale arenske komplekse. Antitumorsko dejstvo nekih jedinjenja je sličnih vrednosti aktivnosti kao cisplatina, a u nekim slučajevima su rutenijumski kompleksi pokazali i znatno veću aktivnost.

Ključne reči: organorutenijumski kompleksi, hlorhinolin, interkalacija, tumor, citotoksičnost

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Opšta i neorganska hemija

UDK broj: 546.9

Synthesis and characterization of ruthenium-arene complexes with N, S or O donor ligands

SUMMARY

In this is presented synthesis, characterization and biological activity of new organoruthenium complexes. Complexes contain benzene, toluene and cymene as part of arene moiety, and chloroquinoline derivatives, planar aromatic polypyridines dihydrazide and chlorido anions as ligands.

Synthesized ligands: 1-(7-chloroquinolin-4-yl)thiourea, as a representative of 7-chloroquinoline, potent antimalaran, 11,12-dimethyldipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine (Me₂dppz), 2-(anthracen-9-yl)-1*H*-imidazo[4,5-*f*][1,10]phenanthroline (aip) and pyrido[2',3':5,6]pyrazino[2,3-*f*][1,10]phenanthroline (ppf) representing a series of planar aromatic polypyridine ligands that give complexes lipophilic properties and thus facilitate cellular uptake, and expression of the desired anticancer effect, and *N*¹, *N*²-dipropionylhydrazine, which gave a complex coordinated to two ruthenium(II) centers. All complexes were characterized by infrared and NMR spectroscopy, mass spectrometry and molecular formula were confirmed by elemental analysis. The stability of the complex in the DMSO solution was also analyzed for further biological tests in this medium, and based on the NMR spectra, the stability of the complex was confirmed.

Biological studies of the activity of synthetic ligands and complexes were performed *in vitro* on tumor cells: human cervical adenocarcinoma (HeLa), human umbilical vein endothelial cells (EA.hy 926), human myelogenous leukemia (K562), human alveolar basal adenocarcinoma (A549), human breast adenocarcinoma (MDA -MB-231) and one nontumor human lung fibroblast cell line (MRC-5). Complexes have shown better activity compared to ligands, and cymene complexes can be highlighted as the more active in relation to other arene complexes. The antitumor effect of some compounds is similar to the activity values of cisplatin, and in some cases ruthenium complexes have shown significantly higher activity.

Keywords: organoruthenium complexes, chloroquinoline, intercalation, cancer, cytotoxicity

Scientific area: Chemistry

Scientific Sub-area: General and Inorganic Chemistry

UDC number: 546.9

Lista skraćenica

DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
CDDP	cis-diamindihloridoplatina(II)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (redukovan oblik)
GSH	glutation
NAMI-A	imidazolijum-[<i>trans</i> -tetrahlorido(dimetilsulfoksid)(imidazol)rutenat(III)]
KP1019	indazolijum-[<i>trans</i> -tetrahloridobis(1H-indazol)rutenat(III)]
bpi	bipiridin
phen	1,10-fenantrolin
dpq	dipiridokinoksalin = pirazino[2,3- <i>f</i>][1,10]fenantrolin
dppz	dipiridofenazin
Me ₂ dppz	dimetil-dipiridofenazin
dppn	4,5,9,16-tetraaza-dibenzo[<i>a,c</i>]naftacen
aip	2-(9-antril)-1H-imidazo[4,5- <i>f</i>] [1,10]fenantrolin
ppf	pirido[2',3':5,6]piraaipzino[2,3- <i>f</i>][1,10]fenantrolin
PTA	1,3,5-triaza-7-fosfatriciklo[3.3.1.1]dekan
DCM	dihlormetan
DMSO	dimetil-sulfoksid
MTT	2,5-difenil-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2 <i>H</i> -tetrazolijum-bromid
TB	tripan-plava
PBS	fosfatni puferski rastvor ("Phosphate buffer solution")
PI	propidijum-jodid

FITC	fluorescein-izotiocijanat
Me	metil
Et	etil
IR	infracrveno zračenje
ATR	razblažena ukupna refleksija (Attenuated Total Reflection)
NMR	Nuklearno-magnetna rezonanciona (spektroskopija)
HSQC	heteronuklearna pojedinačna kvantna koherencija (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
HMBC	heteronuklearna koherencija preko više veza (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
ESI-MS	elektrosprej-jonizaciona masena spektrometrija

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Opšti deo.....	2
2.1. Kompleksi platine.....	5
2.1.1. Cisplatina.....	5
2.1.1.1. Mehanizmi delovanja cisplatine.....	6
2.1.1.2. Neželjeni efekti cisplatine.....	8
2.1.1.3. Rezistencija na cisplatinu.....	9
2.1.1.4. Razvoj novih antitumorskih lekova zasnovanih na platini.....	10
2.2. Kompleksi rutenijuma.....	14
2.2.1. Kompleksi rutenijuma(III).....	14
2.2.2. Kompleksi rutenijuma(II).....	16
2.2.3. Mehanizmi dejstva rutenijumskih kompleksa.....	19
2.2.4. Kompleksi rutenijuma sa planarnim aromatičnim ligandima.....	20
2.2.5. Kompleksi rutenijuma sa 7-hlorohinolinima.....	25
2.2.6. Katalitička primena kompleksa rutenijuma.....	26
2.3. Cilj rada.....	27
3. Eksperimentalni deo.....	28
3.1. Sinteze liganada.....	28
3.2. Sinteze kompleksa.....	31
3.3. Materijal i metode.....	36
3.3.1. Supstance korišćene u sintezama.....	36
3.3.2. Elementalna analiza.....	36
3.3.3. Infracrvena spektroskopija.....	36
3.3.4. NMR spektroskopija.....	36
3.3.5. Masena spektrometrija.....	37
3.3.6. Električna provodljivost.....	37
3.3.7. Rendgenska strukturna analiza.....	37
3.3.8. Računarski detalji.....	37
3.3.9. Biološka ispitivanja.....	38

3.3.10. Ćelijske kulture i reagensi.....	38
3.3.11. Test preživljavanja ćelija upotrebom boje triptan-plavo.....	39
3.3.12. Ispitivanje citotoksičnosti.....	39
3.3.13. Merenje distribucije faze ćelijskog ciklusa metodom protočne citometrije.....	40
3.3.14. Analiza apoptoze pomoću Anekin-FITC metodom protočne citometrije.....	40
3.3.15. Morfološka analiza smrti ćelije fluorescentnom mikroskopijom.....	41
3.3.16. Mikrotalasna digestija uzoraka za ICP-MS.....	41
3.3.17. Merenje intraćelijske akumulacija rutenijuma (II) i platine (II) pomoću ICP-MS.....	42
3.3.18. Priprema uzorka za merenje vezivanja jona za DNK pomoću ICP-MS.....	43
4. Rezultati i diskusija.....	44
4.1. Sinteze liganada.....	44
4.2. Sinteze kompleksa.....	46
4.3. Spektroskopska karakterizacija sintetisanih kompleksa rutenijuma.....	50
4.3.1. Masena spektrometrija.....	51
4.3.2. Infracrvena spektroskopija.....	52
4.3.3. NMR spektroskopija.....	53
4.3.4. Električna provodljivost sintetisanih kompleksa.....	59
4.3.5. Stabilnost kompleksa u DMSO-u.....	59
4.3.6. Rendgenska strukturna analiza.....	60
4.3.7. Ispitivanje citotoksične aktivnosti <i>in vitro</i>	62
4.3.8. Merenje distribucije faze ćelijskog ciklusa metodom protočne citometrije C1 i C2.....	69
4.3.9. Testovi određivanja apoptoze ispitivanih kompleksa C3.....	72
4.3.10. Rezultati morfološke analize smrti ćelije fluorescentnom mikroskopijom C3.....	73
4.3.11. Rezultati merenja intraćelijske akumulacije rutenijuma (II) i platine (II) pomoću ICP-MS kompleksa C1, C2 i C3.....	75
4.3.12. Rezultati merenje vezivanja jona Ru(II) i Pt(II) za DNK pomoću ICP-MS.....	77
5. Zaključak.....	81
6. Literatura.....	83
7. Prilog.....	92

1. Uvod

Zbog opšteg trenda porasta obolelih od raznih bolesti, javlja se veća potreba za lekovima, unapređivanjem načina lečenja i dijagnostike. Po broju smrtnih slučajeva kod ljudi, na drugom mestu se nalaze tumori kao uzrok. Iz tog razloga se na globalnom nivou ulažu veliki napor u borbi protiv ovog uzroka smrti. Postoji već veliki broj poznatih lekova za kancer koji su u upotrebi, ali se konstantno traga za boljim, selektivnijim i lekovima sa manje neželjenih efekata. Razne oblasti hemije služe kao desna ruka medicini i farmaciji u pronalaženju novih i modifikaciji poznatih lekova u primeni protiv raka. U oblasti koordinacione hemije kompleksi prelaznih metala imaju važnu ulogu u lečenju i dijagnostici raznovrsnih vrsta oboljenja. Zbog ovih karakteristika pronalaze primenu u oblastima medicinske i bioneorganske hemije, farmacije, mikrobiologije i kozmetike.

Do sada je sintetisan veliki broj kompleksnih jedinjenja platine, paladijuma, zlata, rutenijuma i kobalta sa raznovrsnim ligandima, u cilju dobijanja kompleksa sa što boljim antitumorskim dejstvom i selektivnošću. Pored najčešće korišćenih kompleksa platine, kompleksna jedinjenja rutenijuma su predmet velikog interesovanja još od treće četvrtine prošlog veka, a intenzivna proučavanja zasnivaju se na dobroj biološkoj aktivnosti koju pokazuju. Način na koji deluje neki lek je jako važna karakteristika, koja mnogo može da pomogne u daljim istraživanjima, kako bi se što bolje modifikovale osobine budućih lekova. Samim tim, u sklopu ovih istraživanja je i utvrđivanje mehanizma dejstva dobijenih jedinjenja.

Tema ove doktorske disertacije bila su istraživanja usmerena na sintezu novih kompleksnih jedinjenja rutenijuma i ispitivanju njihove potencijalne antitumorske aktivnosti u cilju dobijanja jedinjenja koja će prevazići trenutno primenjivane lekove na bazi platine koja ispoljavaju širok spektar neželjenih dejstava. U ovu svrhu, kao ligandi korišćeni su organski molekuli čije su strukturne osnove pokazale značajno preimućstvo kako u smislu biodostupnosti tako i farmakokintetičkih osobina.

2. Opšti deo

Tumor je opšti naziv za stanje koje nastaje kao posledica nekontrolisane deobe i širenja nefunkcionalnih ćelija ili je posledica neizumiranja ćelija u trenutku kada je njihov životni vek završen. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (iz juna 2017) oko 90,5 miliona ljudi ima dijagnostikovan rak i svake godine se javlja oko 14,1 miliona novih slučajeva. Tumor, odmah posle kardiovaskularnih bolesti, izaziva najveći broj smrtnih slučajeva na godišnjem nivou (8,8 miliona ljudi).¹ Upotreba duvana uzrokuje oko 22 % smrtnosti od raka. Još oko 10 % uzrokuju gojaznost, loša ishrana, nedostatak fizičke aktivnosti ili prevelika količina alkohola. Ostali faktori rizika uključuju određene infekcije, izloženost jonizujućem zračenju i zagađivače životne sredine. Oko 5-10 % karcinoma uzrokovano je naslednim genetskim defektima od roditelja.

Rak može nastati skoro svuda u ljudskom telu. Normalno, ćelije rastu i dele se kako bi formirale nove ćelije. Ćelije odumiru usled starenja i oštećenja i zamenjuju se novim ćelijama. Razvitak raka remeti ovaj proces, stare i oštećene ćelije ne odumiru, a formiraju se nove ćelije koje nemaju normalnu funkciju, ubrzano se dele i formiraju abnormalnosti zvane tumori. Mnogi tumori stvaraju čvrsta tkiva. Izuzetak su kanceri krvi, kao što je npr. leukemija, kod koje ne nastaju čvrsta tkiva.

Tumori u najosnovnijoj podeli mogu biti benigni i maligni (kancerogeni). Postoji mnogo vrsta različitih tumora, a njihovo ime najčešće potiče od mesta nastanka primarnog tumora ili mogu ukazati na njihov oblik ili način na koji rastu. Kancerogeni tumori su maligni, što znači da se mogu širiti ili prodirati u obližnja tkiva. Osim toga, neke ćelije raka mogu se odvojiti od primarnog tumora i preneti kroz krv ili limfni sistem do udaljenih mesta u telu i formirati nove tumore daleko od prvobitnog tumora. Ovo predstavlja razviće metastaza. Metastatski tumori mogu ozbiljno narušiti normalno funkcionisanje tela i većina smrtnih ishoda kod ljudi obolelih od raka je posledica metastaze.

Za razliku od malignih tumora, benigni tumori ne prodiru u obližnja tkiva. Ipak, benigni tumori mogu biti prilično veliki. Kada se uklone, nasuprot malignim tumorima, obično se ne

vraćaju. Za razliku od većine benignih tumora u drugim delovima tela, benigni tumori mozga mogu biti opasni po život.

Tumorske ćelije se razlikuju od normalnih ćelija, što im omogućava da se otmu kontroli organizma i postanu invazivne. Jedna važna razlika je u tome što su ćelije raka manje specijalizovane od normalnih ćelija. Normalne ćelije imaju svoje specifične funkcije, dok ćelije raka nemaju. Ovo je jedan od razloga što, za razliku od normalnih ćelija, ćelije raka nastavljaju da se dele bez kontrole. Pored toga, tumorske ćelije mogu da ignorišu signale za prestanak deobe ili proces poznat kao programirana ćelijska smrt (apoptoza), koje telo koristi da bi se rešilo nepotrebnih ćelija. Ćelije raka mogu uticati na normalne ćelije, molekule i krvne sudove koji ih okružuju i hrane tumor. One mogu izazvati formiranje krvnih sudova iz obližnjih normalnih ćelija, da bi se tumor snabdevao kiseonikom i hranjivim materijama, koje omogućavaju njegov rast. One takođe mogu izbeći odgovor imunog sistema, "sakriti" se od njega i sistema popravke. Tumori takođe mogu koristiti imuni sistem za svoj rast i razvoj.²

U tumorskim ćelijama, glikoliza je značajno ubrzana da ispuni visoke zahteve za ATP-om i energijom, a ugljenici koji potiču od glukoze su glavni gradivni elementi masnih kiselina i nukleotida potrebnih za nove ćelije. Glutaminoliza se takođe povećava radi regeneracije NADPH (iz koga kasnije nastaje GSH), dok glutaminski ugljenici dopunjuju Krebsov ciklus, u kome nastaju metaboliti koji kasnije služe za biosintezu makromolekula. Rezultat ubrzanog metabolizma tumorskih ćelija je pojava acidoze, što je posledica lokalnog nagomilavanja mlečne kiseline u ćeliji. Ovo je povezano i sa fragmentima glutamina i glukoze, koji se takođe koriste za proizvodnju mlečne kiseline. Laktična acidoza takođe usmerava metaboličko reprogramiranje tumorskih ćelija i služi kao dodatni selektivni pritisak promena.³

Muškarace statistički najčešće pogađaju karcinomi prostate, pluća i kolorektalni karcinom. Karcinom dojke predstavlja najčešće dijagnostikovani tumor i nakon kancera pluća predstavlja drugi vodeći uzrok smrti od tumora kod žena.⁴

Dijagnoza zavisi od vrste i lokacije tumora. Mogu se koristiti tumor marker testovi krvi, radiografija X-zracima, magnetna rezonanca, endoskopija, neki tumori mogu se videti golim okom (ukoliko su spolja na koži), dok se neki mogu osetiti (palpacija prstima).⁵

Benigni tumori nekada ne zahtevaju tretman ukoliko se prate i dođe do njihove primetne redukcije u veličini ili se mogu ukloniti hirurškim putem.

Za maligne tumore postoje sledeće opcije tretmana:

1. Operacija – hirurško uklanjanje tumora ili nekog njegovog dela.
2. Radioterapija – dozirano i kontrolisano ozračivanje samog tumora ili nakon hirurškog odstranjivanja tumora, regije u kojoj se nalazio. Najčešće se koristi za lokalni tretman kancera. Međutim, velike doze koje su neophodne da bi se postigla efikasna kontrola često ograničavaju uspešnu upotrebu ove metode jer može doći do oštećenja zdravog tkiva.⁶
3. Hemioterapija – tretman u kom se koriste hemioterapeutici (citostatici) kako bi zaustavili rast ćelija raka, ubijanjem ćelija ili zaustavljanjem njihove deobe. Mete ovakvih lekova su DNK ili drugi molekuli koji su odgovorni za rast i regulaciju funkcionisanja ćelije. Citostatici mogu biti administrirani oralno, intramuskularno ili intravenozno u zavisnosti od faze u kojoj je kancer, a mogu se primenjivati i u kombinaciji sa prethodno navedenim tretmanima.⁷
4. Imunoterapija – koja se zasniva na stimulaciji imunog sistema kako bi se organizam sam efikasnije izborio sa tumorom. Tokom tretmana se koriste antitela ili transfer zdravih ćelija obolelog tkiva u organizam, dok su druge metode ove terapije još u fazi ispitivanja.⁸
5. Terapija laserom – koristi usmerenu svetlost visoke energije (laser) u cilju smanjivanja ili potpunog uništavanja ćelija raka. Ovu metodu je moguće koristiti na površini tela, na površini unutrašnjih organa ili u telesnim šupljinama do kojih je moguće pristupiti. Ova metoda je preciznija od operacije i uzrokuje manje povrede zdravog tkiva, samim tim manje je bolna, uzrokuje manje krvarenja i oticanja, ali je skuplja i zahteva dodatnu obuku lekara radi efikasne primene.⁹
6. Alternativno lečenje – podrazumeva metode koje koriste klinički malo proverene supstance ili načine lečenja tumora. Neke od njih se zasnivaju na detoksikaciji organizma i posebnim dijetama ili na psihoterapiji, koja ima za cilj da mentalno pospeši fizičku borbu organizama protiv tumora. Ove i slične alternativne metode mogu da daju više uspeha ako se tumor otkrije u ranijim fazama, dok kod poodmaklih i metastaziranih slučajeva nema preteranog učinka.¹⁰

Otkriće leka koji se danas koristi za lečenje brojnih tumora, dogodilo se slučajno 1965. godine.¹¹ Naime, Barnet Rosenberg je proučavao uticaj električnog polja na rast bakterije *Escherichia coli* i uvideo da dolazi do smanjenja deobe ćelija pod uslovima koji su korišćeni za ova istraživanja. Kasnije je otkriveno da električno polje nije bilo uzrok smanjene deobe ćelija, već jedinjenja platine koja su nastala *in situ* prilikom eksperimenata, jer je korišćena platinska

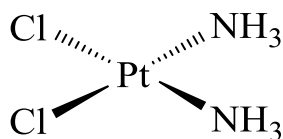
elektroda u amonijačnom puferu. Utvrđeno je da je to jedinjenje bilo (*cis*-diammindihloridoplatina(II)), danas poznato pod nazivom cisplatina. Ovo otkriće antitumorske aktivnosti cisplatine predstavlja revolucionarno otkriće u primeni ovog i sličnih kompleksnih jedinjenja u terapiji tumorskih oboljenja.¹²

Godine 1971, cisplatina je prvi put primenjena na pacijentu obolelom od karcinoma. Postala je dostupna za kliničku praksu 1978. godine, kao Platinol® (Bristol-Miers Skuibb). Cisplatina je do danas jedan od najčešće korišćenih hemioterapeutika. Osim cisplatine, kliničku primenu našla su još dva jedinjenja platine: karboplatina (odobren za primenu 1993.godine) i oksaliplatina (odobren za primenu 2002. godine).^{13, 14}

2.1. Kompleksi platine

2.1.1. Cisplatina

Procenjeno je da se u 50-70% slučajeva, lečenje obolelih od različitih vrsta raka zasniva na primeni cisplatine.¹⁵ Koristi se u tretmanu tumora bešike, glave, vrata, pluća, jajnika i testisa. Efikasna je protiv različitih vrsta tumora uključujući karcinom, limfom i sarkom. Najveću efikasnost pokazala je u slučaju raka testisa, gde su pacijenti u 95% slučajeva preživeli narednih 10 godina nakon tretmana.¹⁶ Cisplatina je neutralan kvadratno planarni kompleks (**Slika 1.**) koji reaguje sa DNK i indukuje biološke efekte, koji kao krajnji ishod dovede do programirane ćelijske smrti (aktivacija apoptoze) ili popravkom oštećenja DNK i preživljavanjem ćelija. Međutim, da bi došlo do interakcije sa DNK, neutralan molekul cisplatine mora biti aktiviran kroz hidrolizu, koja uključuje sekvencijalnu zamenu *cis*-hlorido liganda molekulima vode. Monoakva oblik je visoko reaktivan, ali njegova reakcija sa endogenim nukleofilima, kao što su glutation (GSH), metionin i proteini ograničava brzinu njegove interakcije sa DNK. Na taj način, nakon ulaska u ćeliju, cisplatina može biti inaktivirana molekulima citoplazme i drugim intraćelijskim komponentama.¹⁷

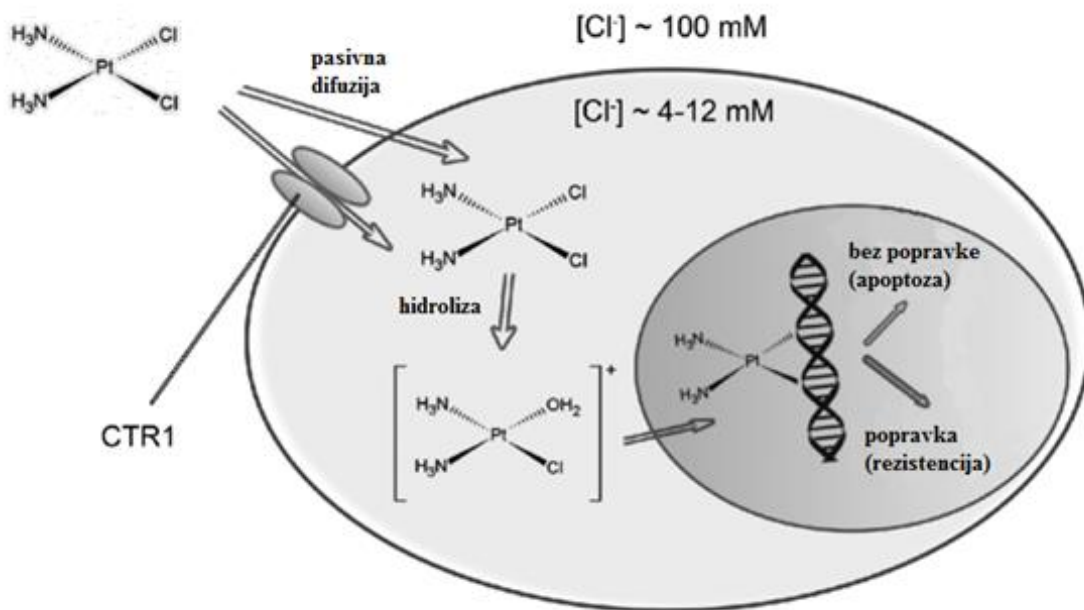


Slika 1. Cisplatina

Usled pojave rezistentnosti i velikog broja neželjenih efekata kao što su: problemi sa bubrežima (nefrotoksičnost), neurotoksičnost, alergijske reakcije, gastrointestinalni problem, hemolitička anemija, pad imuniteta, oštećenje jetre (hepatotoksičnost), opadanje kose (alopecija), i gubitak sluha naročito kod mladih pacijenata, drugi lekovi zasnovani na platini (karboplatina i oksaliplatina) se sve više koriste u terapiji.¹⁸ Nefrotoksičnost se zasniva na interakciji enzima gama-glutamil transpeptidaze, koja je zastupljenija u ćelijama bubrega nego u drugim ćelijama i dovodi do povećanog ulaska citotoksičnih lekova u ćelije bubrega i njihovog oštećenja. Do neurotoksičnosti dolazi usled formiranja veza između kompleksa metala i ćelija neurona, pre svega dorzalne grupe neurona i to najviše zbog oštećenja mijelinskog omotača i aksona što se manifestuje u vidu parastezija, konfuznosti i smanjene mogućnosti brzog reagovanja. Hepatotoksičnost se bazira na činjenici da kompleksi metala kompleksi reaguju u jetri sa glutathion-peroksidazom koji je najvažniji antioksidativni enzim u organizmu, što dovodi do formiranja konjugata koji svoja toksična dejstva ispoljavaju na enzimima jetre, inhibirajući ih, kao i na same ćelije jetre, tako što metabolit leka ulazi i remeti hepatobilijarni put.¹⁷ Mehanizam dejstva cisplatine dovodi se u vezu sa narušavanjem strukture DNK i onemogućavanjem njenih mehanizama reparacije što u kancerogenim ćelijama koje se brže dele u odnosu na zdrave ćelije dovodi do programirane ćelijske smrti.¹⁹

2.1.1.1. Mehanizmi delovanja cisplatine

Cisplatina se primenjuje intravenski, u sterilnom rastvoru soli. U krvi je koncentracija hlorida relativno visoka, pa cisplatina ostaje nepromenjena i može se transportovati po celom telu. U krvotoku, snažno se vezuje za proteine u plazmi, kao što su albumin i transferin, što dovodi do inaktivacije velike količine primenjenog leka. Pasivna difuzija preko membrane je predložena kao proces koji je odgovoran za transport molekula u ćeliju (**Slika 2.**). U poslednjih nekoliko godina postoji sve više dokaza da je nekoliko proteina koji se nalaze u ćelijskoj membrani, uključeno u transport, lekova na bazi platine. Na primer, bakarni transporter CTR1, koji kontroliše intraćelijsku bakarnu homeostazu, takođe je uključen u preuzimanje cisplatine.²⁰ Mnoge ćelijske komponente, kao što su citoskeletni mikrofilamenti, peptidi i proteini koji sadrže RNK i tiol, mogu reagovati sa cisplatinom u citoplazmi. Intraćelijski molekuli koji sadrže tiol, kao što su glutathion i metalotionein, povećavaju inaktivaciju leka koji dovodi do otpornosti na cisplatinu.



Slika 2. Način ulaska cisplatine u ćeliju i njeno dejstvo

Genomska DNK je željena ćelijska meta cisplatine u lečenju, iako se samo preko jedan procenat intraćelijske cisplatine vezuje za nuklearnu DNK. Cisplatina se vezuje sa DNK u dva koraka, te se prvo formira veza sa N7 guaninom, a zatim se vezuje sa guaninom ili adeninom na istom ili suprotnom lancu DNK. N7 atomi guanina i adenina su najpristupačniji i cisplatina formira širok spektar ukrštanja jednog lanca ili između dva lanca, što uzrokuje izobličenje DNK, odnosno narušavanje native strukture. Velika većina DNK ukrštanja je preko dva lanca između 1,2-d(GpG) (oko 70 %), dok ukrštanja na jednom lancu d(ApG) ima oko 20 %. Ukrštanje između dva lanca smatra se najaktivnijim, jer uzrokuju savijanje i rasplitanje dvostruke spirale i gubitak funkcije DNK. Cisplatina se vezuje za DNK formiranjem unutrašnjih mostova ili drugih adukata. DNK adukti formirani sa cisplatinom inhibiraju replikaciju DNK i/ili transkripciju i aktiviraju nekoliko puteva prenosa signala, što aktivira apoptozu.

Nekoliko proteina može prepoznati promene DNK uzrokovane cisplatinim aduktima. HMG-proteini, koji sadrže HMG domen (HMG-High Mobility Group) su ne-histonski jedarni proteini uključeni u regulaciju genske ekspresije i organizaciju strukture hromatina. Protein HMG1 se vezuje sa visokom selektivnošću na adukate platine DNK i na taj način, deluje kao štit

koji štiti DNK od mehanizama popravke. Sledeći korak je prepoznavanje 1,2 spojenih lanaca sa platinom kako bi se inicirala apoptoza.

Nepravilnosti u strukturi DNK mogu biti detektovane pomoću makromolekula za prepoznavanje oštećenja i oni mogu popraviti adukte cisplatine sa DNK. Najvažnije porodice proteina za popravku DNK su: 1) proteini mehanizmanukleotidne ekscizije (NER – nucleotide excision repair), 2) proteini mehanizma popravke pogrešno sparenih baza(MMR – mismatch repair) i 3) DNK-zavisne protein-kinaze (DNK-PK) koje zavise od DNK. Prekomerna ekspresija gena uključenih u kompleks NER je povezana sa rezistencijom na cisplatinu. MMR protein pokušava da ubaci tačan neoštećeni nukleotid na lancu nasuprot platinskog adukta između dva guanina. Kada ne uspe pokušaj popravljavanja oštećenja, zaustavlja se ćelijski ciklus i aktivira se apoptoza.

Oksidativni stres je jedan od najvažnijih mehanizama uključenih u citotoksičnost cisplatine. Cisplatina uzrokuje oksidativni stres povećavanjem nivoa superoksidnih anjona i hidroksilnih radikala. U uslovima oksidativnog stresa, višak reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS – reactive oxygen species) mogu oštetiti ćelijske proteine, lipide i DNK, a u zavisnosti od težine i trajanja ROS ekspozicije mogu se aktivirati reakcije preživljavanja ćelije ili proapoptoze.

Mitohondrijalni glutation (GSH) je esencijalni molekul u regulaciji unutrašnje mitohondrijalne propustljivosti. Cisplatina smanjuje intraćelijsku koncentraciju GSH, dovodeći do formiranja hidroksilnih radikala i oksidativnog stresa, što dovodi do gubitka mitohondrijalne proteinske sulfhidril grupe, smanjenja apsorpcije kalcijuma i potencijala mitohondrijalne membrane.¹⁷

2.1.1.2. Neželjeni efekti cisplatine

Hemioterapija je povezana sa povećanom toksičnošću, posebno kod starijih pacijenata. Efikasnost primene cisplatine često je ograničena njenim neželjenim efektima. Bubrež je glavna ruta za izlučivanje cisplatine i akumulira je u većem stepenu od drugih organa, što je razlog za nefrotoksičnost indukovanu cisplatinom.

Između 10 i 90 procenata lečenih bolesnika razvija se određeni stepen gubitka sluha. Ove promene su nepovratne, a mlađa populacija je podložnija ovim posledicama. Razaranje utiče na slušne senzorne ćelije u Kortijevom organu. Ototoksičnost je nepovratna i povezana je sa

hipoalbuminemijom, primenom drugih lekova, genetskim faktorima, bubrežnom insuficijencijom i starosnom dobu pacijenta. Terapija cisplatinom povezana je sa blagim povećanjem transaminaza i bilirubina u cirkulaciji. Nedavne studije pokazuju da primena visokih doza selena i vitamina E ima zaštitni efekat na povrede jetre. Upotreba cisplatine izaziva mučninu, povraćanje, gastro-toksičnost i neke neželjene efekte reproduktivnih organa.¹⁷

2.1.1.3. Rezistencija na cisplatinu

Otpornost tumorskih ćelija na hemioterapeutske lekove predstavlja prepreku za efikasnost terapije. Otpornost na cisplatinu zavisi od više faktora i može uključivati promenenu nivou usvajanja (unutarćelijskog ili ekstraćelijskog transporta) leka od strane ćelije, detoksikacije leka tj. povećanoj interakciji leka sa glutationom ili metalotioneinima u ćeliji. Takođe, povećana popravka DNK i inhibicija apoptoze su značajni mehanizmi u rezistenciji. Lek može biti neefikasan od početka ili se može steći rezistencija, kada je lek u početku koristan, ali postaje neefikasan tokom vremena.

U citoplazmi cisplatina reaguje sa jedinjenjima koja sadrže tiol, uključujući glutation i metalotioneine. Glutation-S-transferaza (GST) katalizuje reakciju gde je cisplatina konjugovana sa glutationom i zbog toga se cisplatina dalje ne može vezati sa DNK i druge mete u ćeliji. U nekim malignim tkivima postoji korelacija između rezistencije na lečenje i nivoa glutationa u ćeliji, kao i količine ekspresije GST i drugih enzima uključenih u metabolizam glutationa. Metalotioneini, familija proteina bogatih tiolom sa niskom molekulskom težinom, mogu vezati cisplatinu u citoplazmi koja dovodi do inaktivacije leka.

Mehanizmi rezistencije nastaju kao posledica intraćelijskih promena koje ili sprečavaju interakciju cisplatine sa DNK ili ometaju signale oštećenja DNK za aktiviranje apoptotske mašine ili oboje. Da bi se smanjila otpornost na cisplatinu, kombinovane terapije su razvijene i pokazale su se efikasnijim u prevazilaženju ovog problema i lečenju kancera. Glavni cilj je pronalaženje jedinjenja koja su manje otrovna, nemaju unakrsnu otpornost i mogu biti efikasnija od cisplatine. Otpornost na lekove je najčešći razlog za prekid lečenja.²¹

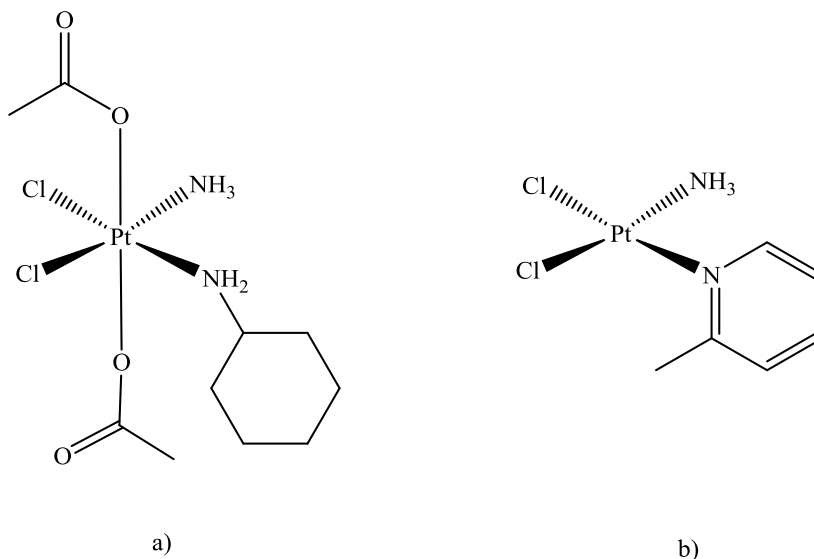
Rezistencija na platinske lekove može se izbeći boljom lokalizacijom leka u tumorskom tkivu. U nekim slučajevima (rak jajnika) lokalna primena leka injekcijom može biti odgovarajuća.¹⁷

2.1.1.4. Razvoj novih antitumorskih lekova zasnovanih na platini

Različite modifikacije cisplatine su ispitane kako bi se dobio lek koji ima bolji profil toksičnosti i širi terapijski spektar od cisplatine. U cilju smanjenja toksičnih neželjenih efekata i prevazilaženja otpornosti na ćelijama, razvijeni su novi lekovi na bazi platine. Iako je veliki broj platinskih jedinjenja prošao *in vitro* testiranje, samo 23 jedinjenja je ušlo u klinička ispitivanja.

Satraplatina, lipofilni platina(IV) kompleks je prvo platinsko jedinjenje aktivno nakon oralne primene i trenutno je u različitim fazama kliničkog istraživanja (**Slika 3a**).²² Platina(IV) kompleksi su manje reaktivni u reakcijama supstitucije liganda u poređenju sa njihovim analogima platine(II), imaju smanjenu toksičnost i manji deo leka se deaktivira na svom putu do ciljane ćelije. Novi sintetisani kompleksi platine(IV) su testirani na citotoksičnu aktivnost na različite ćelijske linije, a neki od njih su pokazali sličnu aktivnost kao cisplatina na karcinomu dojke.

Pikoplatina je platinski kompleks koji je tokom *in vitro* testiranja pokazao aktivnost protiv nekoliko cisplatina-otpornih i oksaliplatina-otpornih ćelijskih linija (**Slika 3b**).²³ Nažalost, nije uspeo da pokaže značajne kliničke rezultate u poređenju sa standardnom terapijom karcinoma pluća.



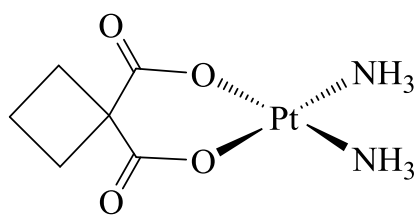
Slika 3. a) satraplatina, b) pikoplatina

Multinuklearni kompleksi predstavljaju drugu klasu platinskih kompleksa koji su pokazali aktivnost i kod cisplatina-rezistentnih cisplatina-osetljivih ćelijskih linija. To su di-, tri- ili tetra-nuklearna jedinjenja, u kojima su joni platine povezani krutim ili fleksibilnim mostovima. Vezivanje DNK kod ovih jedinjenja strukturno se razlikuje od vezivanja cisplatine i njenih analoga, a neki su ušli u klinička ispitivanja.

Druga generacija platinskog leka, karboplatina, uvedena je u terapiju raka 1989. godine, za lečenje raka jajnika. Zamena hloridnih grupa cisplatine sa ciklobutandikarboksilatnim ligandom, karboplatini daje dobru rastvorljivost u vodi, veću stabilnost i smanjenje neželjenih efekata. Karboplatina se može primeniti u većim dozama uz veću efikasnost. Nedostatak je to što karboplatina i cisplatina daju unakrsnu rezistenciju.²⁴

Nova otkrića na polju mehanizma rezistencije tumorskih ćelija na platinske lekove omogućila su pronalazak lekova treće generacije, kao što je oksaliplatine, koja je efikasna kod karcinoma debelog creva, za koji se smatralo da je otporan na platinske lekove. Oksaliplatina koja kao ligand sadrži diaminocikloheksan ima bolji profil toksičnosti i stvara manju rezistenciju.²⁵

Karboplatina (diammin[1,1-ciklobutandikarboksilato(2-)-O,O']platina(II) - **Slika 4.**) koji pripada drugoj generaciji platinskih kompleksa, sintetisan je u želji da se dobije jedinjenje koje pokazuje manje neželjenih dejstava od cisplatine. Usled sličnog mehanizma dejstva koristi se u lečenju istih vrsta tumora kao i cisplatina, pri čemu ima prednost u odnosu na cisplatinu kod lečenja karcinoma jajnika. Druga prednost ovog leka je manja opšta toksičnost i eliminacija toksičnosti na bubrege.²⁶ Mana ovog kompleksa u odnosu na cisplatinu, je njena manja aktivnost. U zavisnosti od tipa tumora, može da bude od 8-45 puta slabija, pa je potrebna upotreba većih doza pri lečenju. Karboplatina ima mnogo veću stabilnosti u organizmu od cisplatine, pa se čak 90 % primenjene doze može naći nepromenjeno u urinu pacijenta.¹⁹

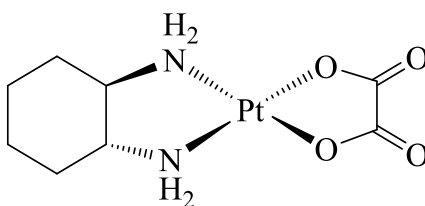


Slika 4. Karboplatina

Aktivacija karboplatine je uslovljena prolaskom kroz ćelijsku membranu. Unutar ćelije, molekul podleže hidrolizi 1,1-ciklobutandikarboksilata, postaje pozitivno naelektrisan. Ovo omogućava interakciju karboplatine sa nukleofilnim molekulima unutar ćelija, uključujući DNK, RNK i proteine. Ovaj proces se odvija kroz kovalentno vezivanje karboplatine na N7 mesto purina baze, formirajući DNK-protein ili DNK-DNK derivate.

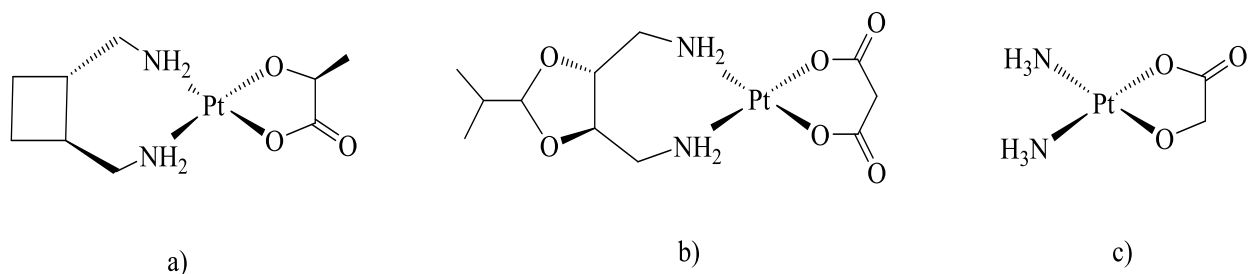
Zbog svoje farmakodinamike i nastajanja manje količine adukata sa DNK, karboplatina ima manje neželjenih efekata ali i manji potencijal za lečenje. Ove razlike u aktivnosti verovatno su posledica niske reaktivnosti karboplatine sa nukleofilima, pošto je 1,1-ciklobutandikarboksilat lošija odlazeća grupa od hlorida.²⁷

Okasaliplatina ([oksalato(2-)-O,O'] [1R,2R-cikloheksandiamin-N,N']platina(II) - **Slika 5.**), predstavnik treće generacije platinskih kompleksa, ima mehanizam dejstva različit od kompleksa prve i druge generacije usled čega pokazuje aktivnost kod nekih vrsta tumora koji su rezistentni na cisplatinu i karboplatinu.²⁸ Okasaliplatina se koristi u terapiji karcinoma debelog creva, tumora u čijem slučaju cisplatina i karboplatina ne pokazuju nikakvu antitumorsku aktivnost.²⁹



Slika 5. Okasaliplatina

Osim navedenih platinskih jedinjenja koja se koriste u terapiji karcinoma, veliki broj antitumorskih agensa koji se zasnivaju na platini nalazi se u pretkliničkoj, a neki i u kliničkoj fazi ispitivanja. Među njima su se izdvojili lobaplatina,³⁰ heptaplatina³¹ i nedaplatina³² (**Slika 6.**) koji su odobreni za kliničku upotrebu u Kini, Južnoj Koreji i Japanu.³³ Njihova šira upotreba ograničena je nedovoljnom rastvorljivošću u vodi, brzim razvijanjem rezistentnosti, kao i malim brojem različitih vrsta tumora prema kojima pokazuju aktivnost.³⁴



Slika 6. a) lobaplatina, b) heptaplatina, c) nedaplatina

Zbog svih pomenutih neželjenih efekata i ograničenja postojećih jedinjenja platine, postoji stalna potreba za razvojem nešto drugačijih jedinjenja koja bi pokazivala dobru efikasnost prema tumorskim ćelijama, uz što manje neželjenih efekata prema zdravim ćelijama.

Alternativa platinskim jedinjenjima potencijalno bi mogla biti kompleksna jedinjenja drugih prelaznih metala, kao što su rutenijum, rodijum, iridijum ili osmijum.^{35, 36}

Dobro je poznata potencijalna antitumorska aktivnost jedinjenja rutenijuma, iako imaju malo zajedničkih osobina sa već postojećim platinskim lekovima. Potencijal se ogleda u smanjenoj toksičnosti i boljoj toleranciji ovih jedinjenja u *in vivo* uslovima. Fenomen bolje tolerancije u *in vivo* uslovima pripisuje se sposobnosti rutenijuma da imitira vezivanje gvožđa za serum transferin kojim se gvožđe solubilizuje i u netoksičnoj formi prenosi kroz organizam.³⁷

Rutenijum je prelazni metal osme grupe periodnog sistema elemenata koji je po hemijskim karakteristikama vrlo sličan gvožđu. Glavna oksidaciona stanja su +2 i +3, iako postoji i +4 oksidaciono stanje, ali obično su jedinjenja tog oksidacionog stanja nestabilna.³⁸ Rutenijum je uobičajeno u kompleksima heksakoordinovan, a geometrija je oktaedarska. Kompleksi rutenijuma(III) imaju nižu termodinamičku i kinetičku aktivnost od kompleksa rutenijuma(II), a kinetika hidratacije kompleksa rutenijuma(II/III) zavisi od vrste liganda i naelektrisanja.³⁹ Veliki broj kompleksa rutenijuma(III) sadrži ligande koji se lako izmenjuju, što je značajno za mikrookruženje u samim tumorskim ćelijama.⁴⁰

2.2. Kompleksi rutenijuma

2.2.1. Kompleksi rutenijuma(III)

Nakon otkrića antitumorskog potencijala kompleksa „rutenijum crvenog” $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}^{\text{III}}\text{ORu}^{\text{IV}}(\text{NH}_3)_4\text{ORu}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5]^{6+}$ istraživanja sa pokazala da i kompleksi rutenijuma(III) kao što su *fac*- $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_3(\text{NH}_3)_3]$ i *cis*- $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}$ pokazuju antitumorsku aktivnost.⁴¹

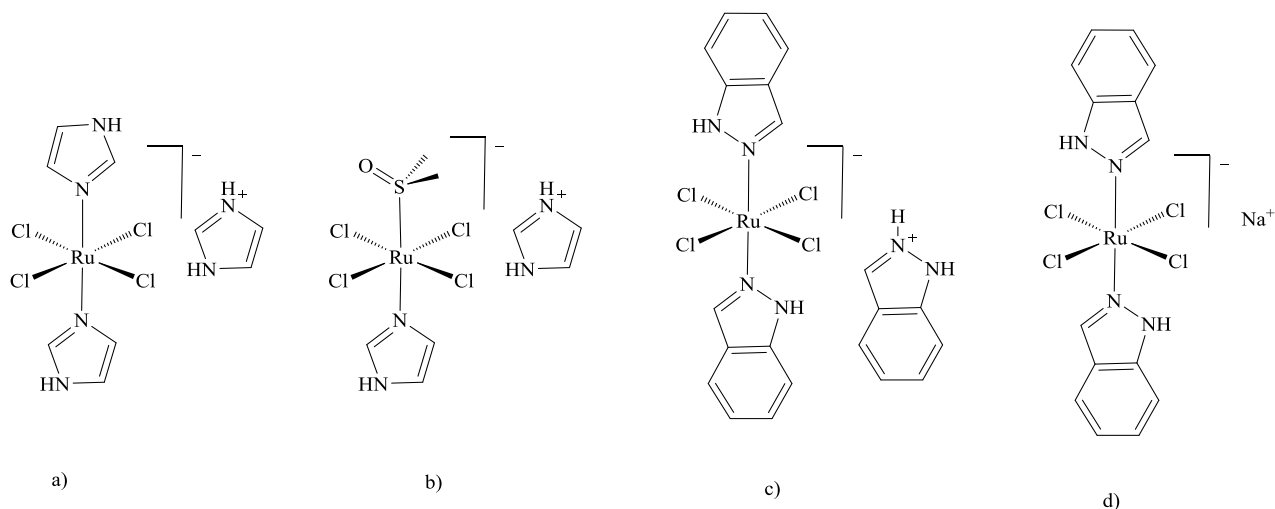
Dva najpoznatija kompleksa rutenijuma su: imidazolijum-[trans-tetrahlorido(dimetilsulfoksid)(imidazol)rutenat(III)] (NAMI-A – New Anti-Tumor Metastasis Inhibitor) i indazolijum-[trans-tetrahloridobis(1H-indazol)rutenat(III)] (KP1019).⁴² Iako su strukturno slični, razlikuje im se pretpostavljeni mehanizam dejstva; NAMI-A interferira regulaciju ćelijskog ciklusa i ekstraćelijskog matriksa, dok KP1019 direktno mitohondrijalnim putem izaziva ćelijsku apoptozu uz generisanje reaktivnih kiseoničnih vrsta. Zahvaljujući rezultatima koje je objavio Kepler sa saradnicima krajem osamdesetih godina (KP418),⁴³ NAMI i njegovi analozi, sintetisani od strane Alezia i saradnika, su vrlo brzo istraženi *in vivo*. Kod miševa NAMI/NAMI-A je pokazao odličnu i selektivnu aktivnost protiv metastaza pluća kod nekoliko čvrstih tumora. Najznačajnije smanjenje metastaza (do 100%) se dogodilo u odsustvu značajnog smanjenje rasta primarnog tumora, pa zato ovaj nalaz i sugeriše različit mehanizam delovanja od onog koji je prisutan kod platinskih lekova protiv raka. Glavni cilj hemioterapije (bar u slučaju čvrstih tumora) je eliminacija preostalog tumora, nakon uklanjanja/smanjenja primarne lezije operacijom i/ili radioterapijom. Tako da je uspeh hemioterapije strogo vezan za njegovu efikasnost protiv tumorskih metastaza, a ne prema primarnim lezijama. Dalja istraživanja su dovela do otkrića prvih i jedinih kompleksa koji su ušli u klinička istraživanja.

Za razliku od cisplatine i drugih platinskih lekova protiv raka, NAMI-A je u osnovi netoksičan na tumorske ćelijske linije. Nije pokazao nikakvu aktivnost na 60 ćelijskih linija u *in vitro* testovima. U poređenju sa cisplatinom na nekoliko tumorskih ćelijskih linija pod istim uslovima inkubacije, NAMI-A je u proseku bio više od 1000 puta manje citotoksičan.

Za izostatak citotoksičnosti na tumorske ćelije linije je najverovatnije zaslužna činjenica da NAMI-A podleže brzim ekstraćelijskim transformacijama i što takvi njegovi metaboliti lako interaguju sa ćelijskim zidovima i nisu značajno prisutni u ćelijama.

Iako je NAMI-A stabilan u čvrstom stanju, u rastvoru prolazi kroz procese hidrolize koji su značajno zavisni od pH. Na fiziološkom pH i 37 °C (fosfatni pufer, NaCl 0,9 %) disocijacija dva hloridna jona iz NAMI-A se dešava u roku od nekoliko minuta. Ovaj proces je u pratnji sa progresivnim oslobađanjem DMSO-a, što na kraju vodi ka formiranju tamnozelenih polioksidnih kompleksnih vrsta. Međutim, procesi hidrolize su gotovo potpuno potisnuti na sobnoj temperaturi i blago kiselom pH (3-5), pri čemu se javlja spora disocijacija DMSO-a (oko 2 % na sat).⁴⁴

KP1019 je u prvoj fazi kliničkih ispitivanja pokazao dobru stabilizaciju tumora jetre, endometrijuma, jezika i adenokarcinoma debelog creva, u trajanju od čak deset nedelja sa jako niskom toksičnošću.⁴⁵ NAMI-A i KP1019 su prvu fazu kliničkih istraživanja prošli tokom 2004., odnosno 2008. godine, redom, a dalja istraživanja su planirana sa KP1019.⁴⁶ Natrijumova so KP1019 - NKP-1339, koja je rastvorljivija u vodi od prethodnika, razmatrana je u prvoj fazi kliničkog ispitivanja sa aspekta njene bezbedne primene kao i farmakokinetičkih i farmakodinamičkih parametara.⁴⁷ U prvoj fazi kliničkih ispitivanja NKP-1339 je pokazao stabilizaciju tumora do čak osamdesetosam nedelja.⁴⁸ Dobro se pokazao i u kombinovanoj terapiji sa drugim lekovima,⁴⁹ pa se nastavak kliničkih ispitivanja kombinovane terapije raka pankreasa i stomaka očekuje u 2018. godini.⁵⁰ Mala toksičnost leka i njegova velika efikasnost može se objasniti velikom stabilnošću i inertnošću ovog proleka. Ovaj rutenijum(III) kompleks je dosta stabilan. Ulaskom u kancerogenu ćeliju, koja je kiselija od normalnih i ima više glutaciona, rutenijum se može redukovati u 2+ oksidaciono stanje kod koga dolazi do olakšane hidrolize Ru-Cl veze i nastajanja elektrofila pogodnog za interakciju sa biomolekulima. Prednost ovih karakteristika ovog kompleksa je što se ovakvi uslovi nalaze skoro jedino u kancerogenoj ćeliji, pa je samim tim povećana selektivnost dejstva u odnosu na zdrave ćelije.⁵¹

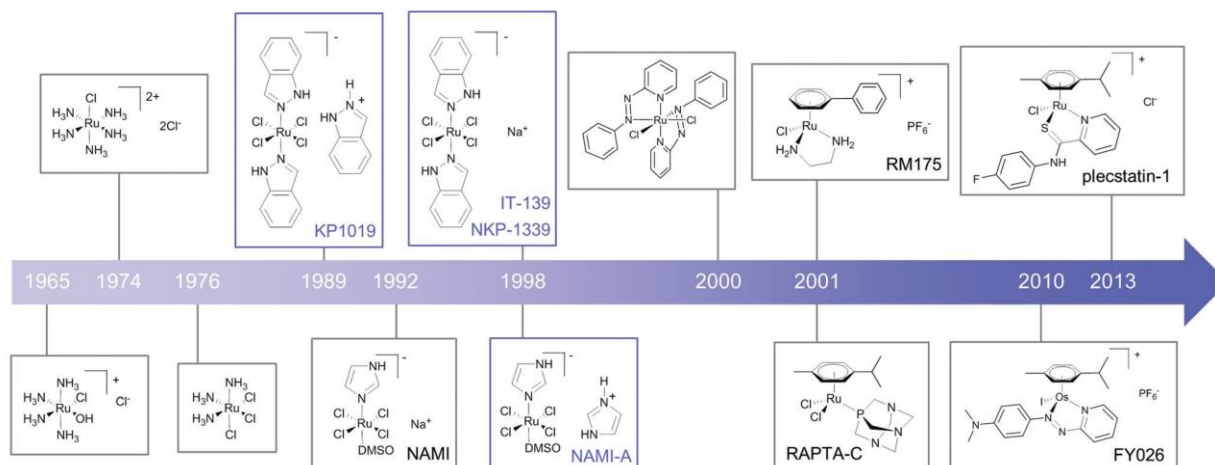


Slika 7. a) KP418, b) NAMI-A, c) KP1019, d) NKP-1339

2.2.2. Kompleksi rutenijuma(II)

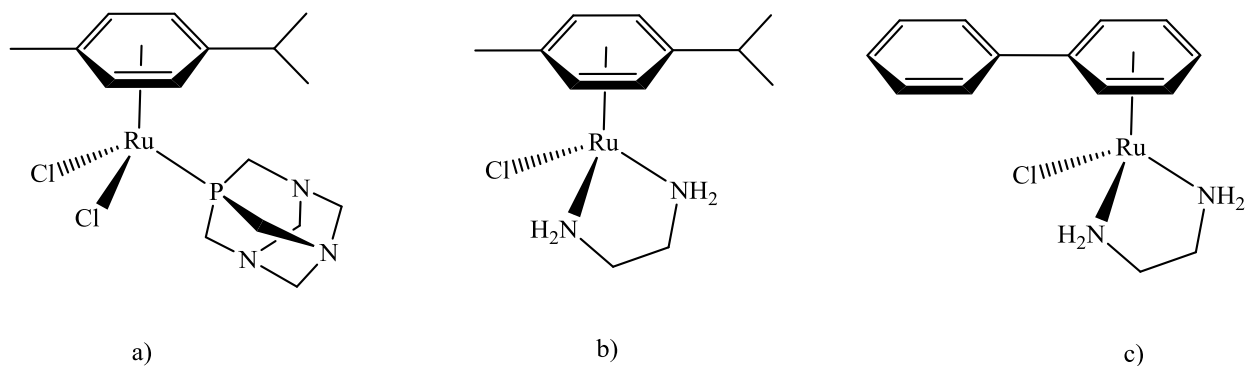
Pored toga, veliki potencijal kao antitumorski agensi pokazali su organorutenijumski kompleksi, opšte formule $[(\eta^6\text{-aren})\text{Ru}(\text{XY})\text{Z}]$.⁵² Ovi kompleksi imaju polu-sendvič strukturu, odnosno imaju izgled "stolice za klavir" jer se sastoje od arenkog dela (najčešće benzen i njegovi derivati) koji podseća na sedište stolice. Arenski deo ima ulogu prvenstveno u stabilizaciji oksidacionog stanja rutenijuma, koje je u ovom slučaju +2 i daje kompleksima povećanu lipofilnost, koja je prvenstveno potrebna za prolazak kompleksa kroz nepolarne barijere u organizmu (ćelijska membrana) ili za interakcije sa DNK i narušavanje njene strukture kod tumorskih ćelija. Kompleksi imaju još tri koordinaciona mesta pored arenkog dela, koji liče na noge "stolice za klavir". Na ovim mestima (XY) vezani su ligandi koji dodatno poboljšavaju fizičko-hemijske osobine kompleksa kako bi se dobila što bolja aktivnost. Jedan (Z) ili dva od tri liganda je neki halogeni anjon (najčešće hlorid), koji može lako da se zameni molekulom vode i time aktivira kompleks koji lakše podleže interakciji sa drugim biomolekulima.⁵³ Supstitucija hlorida drugim halogenom (bromidom ili jodidom) ima neznatan uticaj na citotoksičnost kompleksa.⁵⁴ Dva kompleksa ove vrste, koja su privukla najviše pažnje kao antitumorski i antimetastatski agensi su RAPTA-C (**Slika 9a**), koji je pokazao dobru aktivnost uz efikasno izlučivanje iz organizma⁵⁵ i RAED-C (**Slika 9b**) koji je pokazao dobru redukciju rasta primarnih

tumora.⁵⁶ Eksperimentalni podaci sugerišu da je mehanizam delovanja RAPTA jedinjenja nezavistan od DNK. RAPTA je arenski kompleks koji u sebi ima veoma hidrofobno aromatično benzenovo jezgro, koje sprečava oksidaciju rutenijuma(II) i pomaže svojom lipofilnošću lakši ulazak u ćelije, ali takođe ima i PTA (1,3,5-triaza-7-fosfoadamantan) ligand koji obezbeđuje bolju rastvorljivost u vodi (gradi vodonične veze preko tri donorska N-atoma). Ovaj kompleks pokazuje sličan spektar aktivnosti kao NAMI-A kompleks, iako je razlika u strukturi i oksidacionom stanju rutenijuma velika. RAPTA-C ima kao arenski ligand *p*-cimen. PTA ligand koji je protonovan na niskim pH vrednostima je od ključnog značaja za toksičnost. Ovaj kompleks izaziva pH zavisno oštećenje ćelija, a s obzirom da kancerski izmenjene ćelije imaju niže vrednosti pH u poređenju sa zdravim ćelijama, to ukazuje na princip selektivnosti ovakvih kompleksa prema kancerskim ćelijama. RAPTA se vezuje za proteinske komponente-histone i na taj način sprečava širenje metastaza, tj. sekundarnih kancera, ali ne deluje na primarne kancere. Pozitivna činjenica kod RAPTA jeste da je manje toksičan u odnosu na većinu drugih rutenijumovih kompleksa, a tretman je veoma efikasan.⁵⁷ RAED-C je kompleks koji za razliku od RAPTA, reaguje sa DNK komponentom hromatina u ćeliji i pokazuje visoku antitumorsku aktivnost prema primarnim kancerima. Iako je strukturna sličnost sa RAPTA-om primetna, mehanizam citotoksičnosti je drugačiji.⁵⁸



Slika 8. Hronološki razvoj rutenijumskih antitumorskih kompleksa (slika uzeta iz reference: S. M. Meier-Menches, C. Gerner, W. Berger, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, *Chem. Soc. Rev.*, **47** (2018) 909-928.)

Bifenilni kompleks koji je privukao najviše pažnje zbog svoje aktivnosti je RM175 (**Slika 9c**).



Slika 9. a) RAPTA-C, b) RAED-C c) RM175

Osim bifenilnog arenskog dela sadrži i etilendiamin u koordinacionoj sferi. Citotoksični efekat ovog kompleksa je u rangu aktivnosti karboplatine,^{56a} ne dovodi do unakrsne rezistencije sa drugim platinskim lekovima, izaziva *in vitro* zastoj rasta i apoptozu,⁵⁹ i značajno usporavanje rasta tumora *in vivo*.^{60, 61}

2.2.3. Mehanizmi dejstva rutenijumskih kompleksa

Prvi radovi na polju kompleksa rutenijuma kao antitumorskih jedinjenja objavljeni su u periodu od 1975-1985. godine. Najveće intresovanje su privukli radovi koji se odnose na antitumorsku aktivnost kompleksa rutenijuma(III) i mehanizam dejstva:

1. Selektivan mehanizam aktivacije redukcijom

Mehanizam dejstva je predložio Klark 1980. godine.⁶² Mehanizam pretpostavlja da je za ispoljavanje antitumorske aktivnosti kompleksa rutenijuma(III) u *in vivo* uslovima neophodno da se metalni jon redukuje do rutenijuma(II). U uslovima u kojima se tumor razvija, kao što su kisela sredina, niska koncentracija O₂, visok nivo glutaciona, može lako da dođe do redukcije rutenijuma(III) u rutenijum(II). Utvrđeno je da kod kompleksa [Ru(NH₃)₅Cl]Cl₂ dolazi do redukcije jona metala (verovatno glutationom iz ćelije), a pritom se smanjuju π-akceptorske osobine kompleksa. Ovo dovodi do odlaska donorskih liganada i hidrolize unutar koordinacione sfere i samim tim do aktivacije koja favorizuje koordinaciju drugih nukleofila u ćeliji (DNK i proteini).^{63, 45}

2. Transport rutenijuma do ćelija kancera preko transferina

Ovaj mehanizam je predložen od strane Srivastave 1983. godine.⁶⁴ Zbog brzog razvića tumorskih ćelija, povećana je potreba za gvoždem, pa je samim tim povećana ekspresija proteina transferina (2 do 12 puta više), koji služi kao receptor i prenosilac ovog metala. Kako se gvožđe i rutenijum nalaze u istoj grupi periodnog sistema elemenata, pa zbog toga imaju slične hemijske osobine, joni rutenijuma se mogu lako vezati se za transferin umesto jona gvožđa. Takođe, unos rutenijuma unutar ćelija povećan je kada su potrebe za gvoždem unutar ćelije obezbeđene, iz razloga što je više transferina dostupno za intraćelijski transport. Ovako vezan jon rutenijuma lako može ući u ćeliju tumora, gde ispoljava svoje antitumorsko dejstvo.⁶⁵ Međutim, naučnici nisu sigurni u ovaj mehanizam, iz razloga što transferin ima veoma visok afinitet prema gvožđu, pa samim tim mala količina rutenijuma teorijski može zameniti gvožđe u ovom prenosnom proteinu.

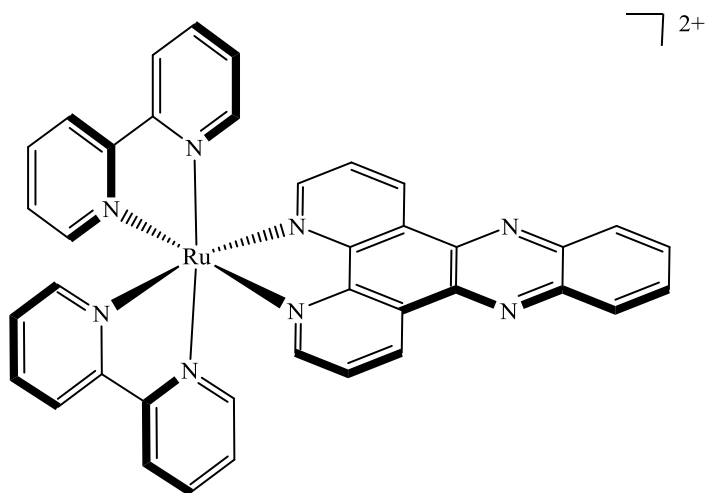
3. Vezivanje rutenijumskih kompleksa za DNK koje se razlikuje od načina vezivanja platinskih jedinjenja

Mehanizam je predložen od strane Brabeka 2002. godine.⁶⁶ Cilj sinteze kompleksa koji bi drugačijim mehanizmom interagovali sa DNK u odnosu na platinske komplekse je da se prevaziđe rezistencija tumora na platinske lekove. Praktično svi kompleksi rutenijuma, u *in vitro* modelima, pokazuju aktivnost na rezistentnim ćelijama. U nekim slučajevima stvaraju se veze jona rutenijuma i DNK iste jačine ili čak jače u poređenju sa platinskim aduktima, rezultujući onemogućenom popravkom modifikovane DNK i smrću tumorske ćelije. Isto tako, nije u potpunosti razjašnjen mehanizam dejstva rutenijumskih kompleksa, jer DNK nije jedina meta kompleksa koja dovodi do izumiranja tumorskih ćelija. Verovatnija je pretpostavka višestrukog dejstva rutenijuma na razne funkcije ćelije potrebne za njen život, što sinergijskim efektom dovodi do bolje aktivnosti.⁶⁷

2.2.4. Kompleksi rutenijuma sa planarnim aromatičnim ligandima

Rutenijum(II)-polipiridil kompleksi su oktaedarski, zbog toga se ligandi mogu lako zameniti ili modifikovati, pa ovo daje mogućnost kontrole afiniteta vezivanja za DNK, selektivnost, način vezivanja i vrstu interkalacija. Mogu biti fotoluminescentni, fotoelektrični, elektroluminescentni. Ove karakteristike omogućavaju korišćenje u širokom opsegu, od luminescentnih markera za biomolekule do terapijskih svrha. Širok spektar kompleksa zasnovanih na dppz-ligandu sintetisan je i modifikovan pomoću drugih pomoćnih liganada, ubacivanjem supstituenata ili korišćenjem drugih jona metala, kao što su bakar, kobalt, renijum, rodijum, platina, osmijum, iridijum i drugi metali. Istraživanja su dala značajne rezultate, pa interesovanje za istraživanje ovih kompleksa i dalje traje. Među ovim kompleksima, $[\text{Ru}(\text{bpi})_2\text{dppz}]^{2+}$ (**Slika 10.**) je jedan od najupečatljivijih molekula, jer je 1990. Bartonova grupa otkrila da ovaj kompleks može služiti kao luminescentni DNK marker. Ovaj kompleks ne pokazuje fotoluminiscenciju u vodenom rastvoru na sobnoj temperaturi, ali prikazuje intenzivnu fotoluminiscenciju u prisustvu dvostrukog heliksa DNK. Ova pojava, koja je dobila naziv DNK „prekidač”, privukla je puno pažnje i otvorila novu oblast za proučavanje interakcija metalnih polipiridilnskih kompleksa sa DNK.^{68,69} Utvrđeno je da se ovi molekuli „interkaliraju” u DNK, odnosno ubacuju se između slojeva dvostrukog heliksa DNK, jer imaju produženu planarnu

aromatičnu strukturu, sličnu parovima DNK baza, pa dolazi do π - π interakcija između kompleksa i parova baza.⁷⁰



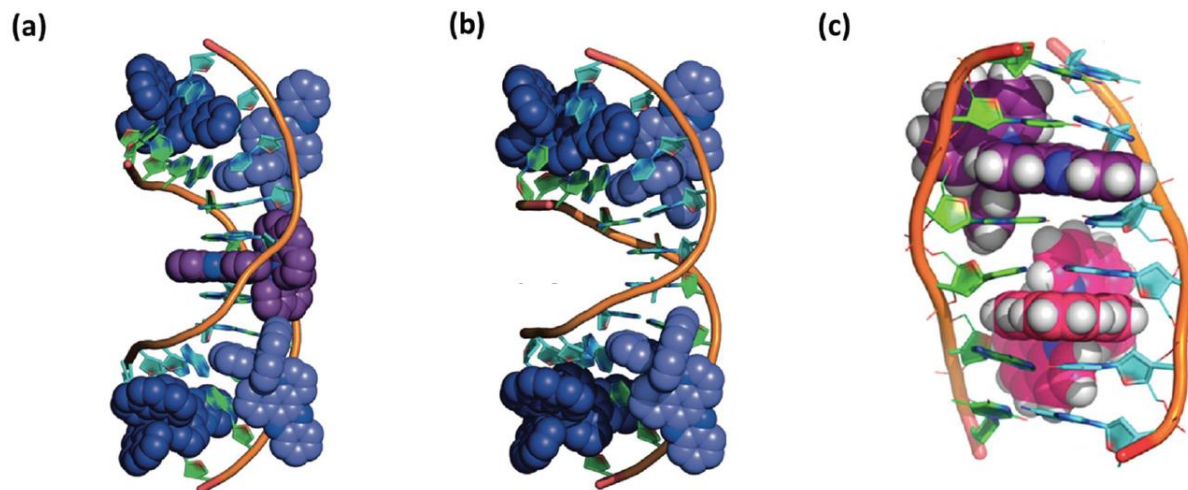
Slika 10. $[\text{Ru}(\text{bpi})_2(\text{dppz})]^{2+}$

Dppz ligand ima veliku aromatičnu površinu, što mu daje ekstremne interkalativne osobine za slaganje između baznih parova DNK. Sa nekoliko izuzetaka, većina Ru-dppz kompleksa se snažno vezuje za DNK heliks putem interkalacija (**Slika 11.**). Vezujući afinitet DNK za Ru-dppz kompleks je jako visok, kao npr referentni interkalator DNK etidijum-bromid (EB) (za $[\text{Ru}(\text{bpi})_2\text{dppz}]^{2+}$, $\log K > 7$, za EB, $\log K > 6$).

Interakcija rutenijumskih-dppz kompleksa je takođe ispitivana na nedupleksnoj DNK. Kompleks $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ se ne može interkalirati u jednolančani niz DNK, ali je interkalacija povećana u slučaju defekta DNK i RNK dupleksa, što se može uočiti povećanjem luminiscencije. Takođe, može se videti razlika u luminiscenciji enantiomernih kompleksa D- $[\text{Ru}(\text{bpi})_2\text{dppz}]^{2+}$ i L- $[\text{Ru}(\text{bpi})_2\text{dppz}]^{2+}$, gde D-oblik pokazuje jaču luminiscenciju. Molekulske dinamičke proračune je utvrđeno da je vezujući afinitet prema neusaglašenom DNK 26 puta veći u poređenju sa dobro sparenim bazama DNK, što se i vidi zbog povećanja intenziteta luminiscencije i dužeg životnog veka emisije.

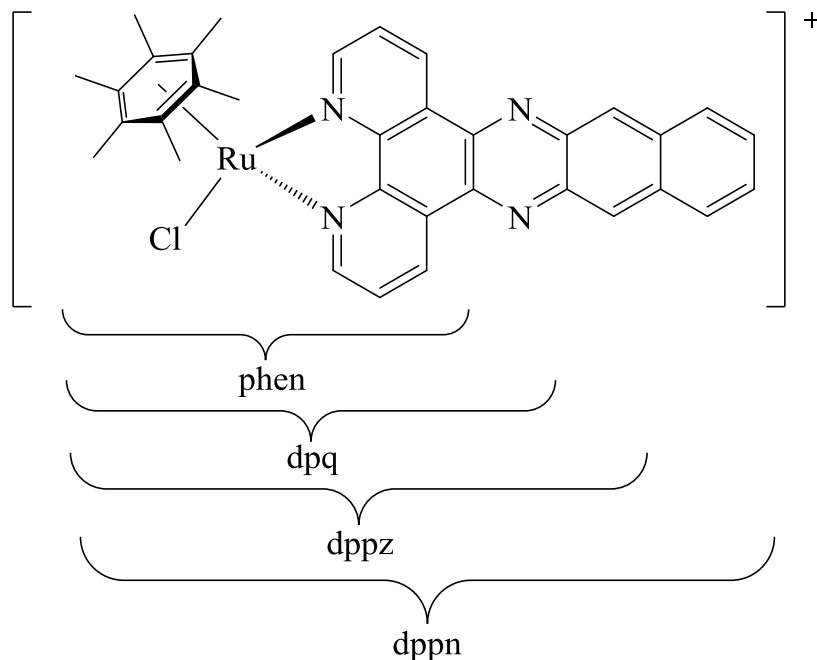
Guanin (G) je najlakše oksidovana baza sa potencijalom od 1,29 V u DNK dupleksu. Kompleks rutenijuma sa dppz ligandom može biti fotoekscitovan gde se generiše rutenijum(II)*

koji kasnije putem prenosa elektrona prelazi u oblik rutenijum(III). Nastali rutenijum(III) može se redukovati lako nazad u rutenijum(II) prenosom elektrona sa obližnjeg molekula guaninske baze unutar DNK heliksa. Nakon ovog procesa, često dolazi do kovalentne metalacije DNK. Primena ovih kompleksa zavisna je od ćelijske akumulacije, pa je uvođenjem hidrofobnih liganada moguće povećanje akumulacije u ćeliju.



Slika 11. Kristalne strukture interkaliranih kompleksa $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ u oligonukleotidima (slika uzeta iz reference: G. Li, L. Sun, L. Ji, H. Chao, *Dalton Trans.*, **45** (2016) 13261-13276).

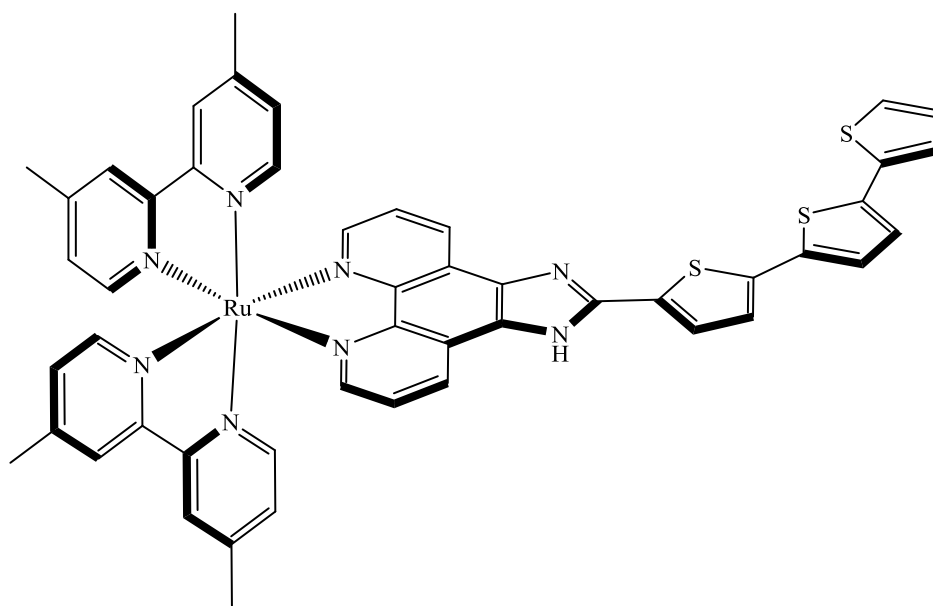
Citotoksičnost ovih kompleksa i srodnih kompleksa $[\text{Ru}(\text{bpi})_2(\text{N-N})]^{2+}$ (N-N = bpi, fen, dpk, dppn) pokazala je zavisnost od površine N-N liganda. $[\text{Ru}(\text{bpi})_2\text{dppz}]^{2+}$ pokazuje umerenu citotoksičnost, dok $[\text{Ru}(\text{bpi})_2\text{dppn}]^{2+}$ pokazuje veću citotoksičnost, sličanu onom koju pokazuje cisplatina u istim uslovima. Fluorescentne osobine uzrokovane prisustvom liganda i svojstva rutenijuma kao antitumorskog agensa, daju ovim kompleksima dvostruku primenu, kako u dijagnostici tako i u potencijalnoj terapiji.⁷¹ Arenski kompleksi ovog tipa: $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{dppn})\text{Cl}]^+$, $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{dppn})(\text{py})]^{2+}$ i $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{dppz})(\text{py})]^{2+}$, takođe pokazuju antitumorske i fluorescentne osobine.⁷² Isto tako, otkriveno je da postoji povezanost veličine aromatičnog liganda sa antitumorskim potencijalom, što je utvrđeno poređenjem aktivnosti kompleksa $(\eta^6\text{-heksametilbenzen})\text{Ru}(\kappa^2\text{NN})(\text{CF}_3\text{SO}_3)$, gde NN predstavlja ligande: phen, dpq, dppz, dppn (**Slika 12.**)⁷³



Slika 12. Organorutenijumski kompleksi sa planarnim aromatičnim ligandima različitog broja prstenova

Kompleksi Ru^{2+} koji u svom sastavu imaju bipyridinske prstenove zajedno sa drugim poliaromatičnim sistemima u koordinacionoj sferi, zbog velike prostorne konjugacije π -elektrona, ispoljavaju dobre apsorpcione osobine elektromagnetnog zračenja prilikom ozračivanja. Ova njihova karakteristika je našla veliku primenu u fotodinamičkoj terapiji (PDT-Photo Dynamic Therapy) za lečenje nekih vrsta kancerogenih i kožnih oboljenja.⁷⁴ Za klinička lečenja određenih kožnih poremećaja, makularne degeneracije kod starih osoba i raka već se primenjuje medicinska tehnika zasnovana na svetlosnoj aktivaciji proleka (tj. fotosenzitizera, FS). Ovaj tretman koristi istovremenu kombinaciju tri komponente: FS, svetlost i kiseonik. Njihova sinergijska aktivnost dovodi do generisanja oksidativnog stresa unutar ćelije, što na kraju dovodi do smrti ćelije. Fotosenzitizeri se prvo daju pacijentu, zatim se čeka određeno vreme potrebno za akumulaciju proleka i njegovo raspoređivanje po organizmu pre ozračivanja. Nakon svetlosnog ozračivanja na određenoj vrednosti talasne dužine, FS postiže svoje ekscitovano stanje, FS^* . U tom trenutku, dešava se prenos protona ili elektrona iz FS^* na okolne biološke molekule (reakcija tipa I). Ovo vodi do formiranje radikala i reaktivnih kiseoničnih

vrsta (ROS) i posledično, do jakog oksidativnog stresa za ćeliju. Takođe, može se dogoditi prenos energije sa FS* na tripletni kiseonik u okruženju, što dovodi do formiranja singletog kiseonika (reakcija tipa II). Ova vrsta je vrlo reaktivna forma kiseonika i ima vrlo kratko difuziono rastojanje u biološkom okruženju (0,02 mm). Kao posledica, njegov toksičan efekat biće izvršen upravo u neposrednoj blizini ozračenog područja. Većina odobrenih FS deluju preko drugog mehanizma delovanja, što za posledicu ima izazivanje ćelijske smrti.⁷⁵ Ova tehnika generalno omogućava smanjene neželjenih efekta u poređenju sa tradicionalnom hemioterapijom. Međutim, PDT nije potpuno efikasan na hipoksičnim tumorima (tumori sa manjkom kiseonika). Za prevazilaženje ovog nedostatka, razvijeni su agensi za fotoaktivacionu hemioterapiju (PACT – PhotoActivated Chemo Therapy) koji posredstvom svetlosti indukuju smrt ćelije raka, preko mehanizma nezavisnog od količine kiseonika u ćeliji.⁷⁶ Na ovaj način se može ozračiti samo bolesno tkivo, tako da je oštećenje zdravih ćelija znatno smanjeno, što čini ovu metodu manje invazivnom i manje toksičnom. Kompleks rutenijuma koji je pokazao dobre karakteristike za ovu primenu je TLD-1433 (**Slika 13.**)⁷⁷



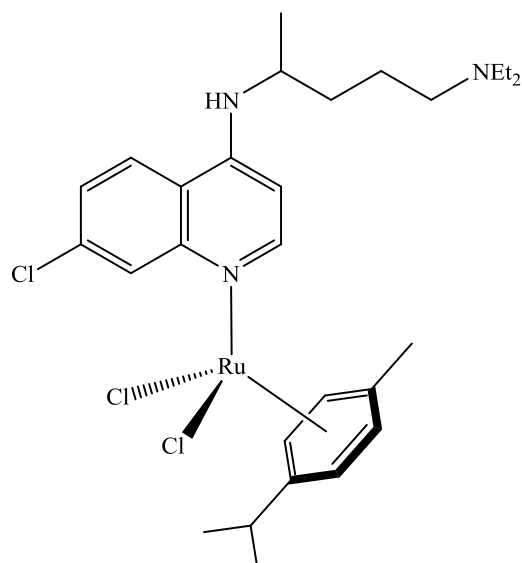
Slika 13. TLD-1443

Nekoliko reakcija je moguće u cilju nastajanja aktivne citotoksične vrste. To može biti zamena liganda ili foto-oslobađanje biološki aktivnih jedinjenja. Tako na primer, kompleks $[\text{Ru}(\text{bpi})_2\text{dppz-NH}_2]^{2+}$ se pokazao netoksičan prema HeLa i MRC-5-ćelijama (IC_{50} vrijednost $> 100 \text{ mM}$) u mraku, međutim, osvetljavanjem na talasnoj dužini od 420 nm postaje efikasan. Selektivnost i kontrola citotoksičnog efekta može se postići strategijom „fotokavezovanja”, odnosno vezivanjem fotolabilne grupe u Ru-dppz kompleks. Citotoksično dejstvo se aktivira u živim ćelijama tek nakon osvetljenja i time smanjuje neželjeno dejstvo na druge ćelije.⁷⁸

2.2.5. Kompleksi rutenijuma sa 7-hlorhinolinima

Alternativni pristup otkrivanju novih kompleksa kao potencijalnih lekova, uključuje vezivanje organskog jedinjenja poznatog terapijskog dejstva za fragment koji sadrži jon metala. U ovoj kombinaciji jon metala deluje kao nosač i stabilizator za lek dok jedinjenje ne dođe do ciljanog mesta, dok u isto vreme organski deo omogućava transport i istovremeno štiti metal, sprečavajući bočne reakcije u tranzitu. Takvi kombinovani efekti mogu rezultovati značajnim poboljšanjem aktivnosti leka i otvaranjem novih mehanizama delovanja i primene. Kao jedan od primera, može se izdvojiti dobro poznati lek protiv raka dojke, tamoksifen, koordinovan za gvožđe u obliku sendvič jedinjenja (Ferrocifen) i drugi njegovi derivati, koji pokazuju veliki potencijal u primeni za lečenje tumora.⁷⁹ Poznata je kombinacija ferrocenskog dela sa hlorokinom, antimalarikom, nakon čega je poboljšana aktivnost ovog molekula prema malariji,⁸⁰ uz takođe značajnu antitumorsku aktivnost.⁸¹

Sličnu aktivnost pokazali su i organorutenijumski kompleksi sa hlorokinom (**Slika 14.**). Oni su aktivni na Dd2 hlorokin-rezistentan soj virusa malarije⁸² i na ćelije raka.⁸³ I u ovom slučaju, kombinovani uticaj strukture hlorokinskog jezgra, zajedeno sa arenskim delom rutenijumskog kompleksa, dovodi do interakcije sa DNK i dobre aktivnosti prema ćelijama raka, a labilnije vezani hloridni anjoni omogućavaju brz i efikasan prenos molekula do mesta dejstva.⁸⁴



Slika 14. Organorutenijumski kompleksi sa hlorokinom

2.2.6. Katalitička primena kompleksa rutenijuma

Osim primene rutenijumskih kompleksa u medicinskoj hemiji i farmaciji, veliku primenu su našli kao katalizatori, zbog toga što rutenijum može da katalizuje veliki broj raznovrsnih hemijskih transformacija, što može imati dalju primenu u organskoj, neorganskoj ili industrijskoj hemiji.⁸⁵ Jedna od najpoznatijih primena u organskoj hemiji imaju tzv. Grubbs-ovi katalizatori, koji se koriste u olefinskoj metatezi.⁸⁶

Transformacija hidrazida u *N,N'*-diacilhidrazin je poznata reakcija u organskoj hemiji i obično zahteva oksidaciona sredstva poput oksona,⁸⁷ jedinjenja selena,⁸⁸ jod,⁸⁹ jodobenzen diacetat,⁹⁰ natrijum-perborat⁹¹ ili živa(II)acetat.⁹² U nekim slučajevima, ova reakcija može se odigrati i posredstvom arenskog rutenijumovog kompleksa. Do reakcije dolazi ukoliko hidrazid sadrži četiri ili pet ugljenikovih atoma u normalnom nizu.⁹³ Kada hidrazid ima duži niz ili aromatično jezgro, ne dobija se dimerizovan molekul u sastavu kompleksa ili van njega, već ostaje nepromenjenog oblika.⁹⁴

2.3. Cilj rada

Cilj ove doktorske disertacije je:

1. Sinteza novih liganada i odgovarajućih arenkih kompleksa rutenijuma(II).
2. Karakterizacija dobijenih kompleksa standardnim metodama analize: infracrvenom spektroskopijom, NMR spektroskopijom, masenom spektrometrijom i elementalnom analizom.
3. Ispitivanje antitumorske aktivnosti na humanim ćelijama raka *in vitro* i predlaganje mehanizma dejstva kako bi se ti rezultati iskoristili za planiranje sinteze novih kompleksa sa boljom aktivnošću.

3. Eksperimentalni deo

3.1. Sinteze liganada

Sinteza 7-hlor-4-izotiocijanatohinolin⁹⁵ (2)

Rastvoru 4,7-dihlorhinolina **1** (500 mg, 2,52 mmol) u suvom toluenu (4 cm³) dodat je srebro-izotiocijanat (830 mg, 5 mmol) i reakciona smeša je mešana tokom 18 h na 115 °C u atmosferi argona. Topla reakciona smeša je procedena i talog ispran metilen-hloridom (3 x 10 cm³). Kombinovani organski filtrat je koncentrovan pod sniženim pritiskom pri čemu je dobijeno 490 mg proizvoda, u obliku žutog taloga (89 %). **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD): δ H 8,81 (H2, d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 8,07 (H5, d, *J* = 9,1 Hz, 1H), 8,00 (H8, d, *J* = 2,05 Hz, 1H), 7,90 (H3, d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 7,59 (H6, dd, *J*₁ = 2,05, *J*₂ = 9,1, Hz, 1H).

Sinteza 1-(7-hlorhinolin-4-il)tiouree (L1)

7-hlor-4-izotiocijanatohinolin je rastvoren u MeOH/NH₃ (metanol zasićen NH_{3(g)}, 10 cm³) i reakciona smeša je mešana tokom 24 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga, smeša je koncentrovana na sniženom pritisku, rastvorena u metilen-hloridu, organski sloj ispran destilovanom vodom i zasićenim rastvorom NaCl i osušen iznad MgSO₄. Rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom. Prečišćavanjem na koloni (SiO₂, eluent DCM/MeOH(NH₃) = 9/1) dobijeno je 308 mg proizvoda, u obliku žutog taloga (59 %). **T.t.** = 220 °C. Elementalna analiza izračunata za C₁₀H₈ClN₃S·H₂O: C, 46,97; H, 3,94; N, 16,43; S, 12,54. Nađeno: C, 47,54; H, 4,24; N, 16,11; S, 12,24. **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ 3268, 3124, 2962, 1735, 1641, 1610, 1592, 1568, 1491, 1448, 1421, 1374, 1352, 1312, 1251, 1192, 1161, 1111, 1075, 1055, 908, 876, 828, 803, 768, 732, 634, 616, 585 cm⁻¹. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ H 9,97 (Ar-NH, br s, 1H), 8,83 (H2, d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 8,33 (S=C-NH₂, br s, 1H), 8,11 (H5, d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 8,05 (H8, d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 8,01 (H3, d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 7,68 (H6 i S=C-NH₂, m, 2H). **¹³C NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ C 182,21 (C9); 151,79 (C2); 149,13 (C8a); 143,24 (C4); 134,19 (C7); 127,80 (C8); 126,66 (C6); 124,74 (C5); 121,59 (C4a); 115,69 (C3). (+)**ESI-MS** (m/z): [M + H]⁺ izračunato 238,02002, nađeno 238,01970.

*Sinteza 2-piridin-3-il-4,5-dihidro-1H-imidazol-hidrohlorida (L2)*⁹⁶

Smeša 3-cijanopiridina **3** (250 mg, 2,40 mmol), etilendiamina (3.0 cm³, 44,92 mmol) i sumpora (154 mg, 4,8 mmol) je zagrevana (110 °C) u mikrotalasnom reaktoru tokom 1,5 h. Reakciona smeša je ohlađena na sobnu temperaturu i koncentrovana pod sniženim pritiskom do suva. Ostatak je rastvoren u 30 cm³ CH₂Cl₂, ispran sa vodom (10 cm³), zasićenim rastvorom NaCl (15 cm³) i osušen iznad anhidrovanog Na₂SO₄. Organski sloj je koncentrovan pod sniženim pritiskom i rastvoren u smeši MeOH/HCl (MeOH zasićen gasovitim HCl-om, 30 cm³) i mešan tokom 2 h na sobnoj temperaturi. Smeša je koncentrovana pod sniženim pritiskom do suva i u ostatak je dodat MeOH (5 cm³). Talog proizvoda je profiltriran i osušen. Dobijeno je 220 mg proizvoda u obliku svetlo žutog taloga (51%). **T. t.**: 248–250 °C. **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ 3503, 2915, 2804, 2713, 2678, 2575, 2519, 2443, 2054, 1603, 1555, 1507, 1343, 1085, 1033, 1008, 819, 685 cm⁻¹. **¹H NMR** (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ H 11,46 (2 × NH, br s, 2H), 9,39 (H2, br s, 1H), 8,95 (H6, d, *J* = 4,5 Hz, 1H), 8,74 (H4, dt, *J* = 8,3, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,81 (H5, dd, *J* = 8,1, *J* = 4,8 Hz, 1H), 4,01 (H8 i H9, s, 4H). **¹³C NMR** (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ C 162,88 (C7); 153,31 (C6); 148,39 (C2); 138,47 (C4); 124,91 (C5); 119,86 (C3); 44,69 (C8 i C9).

*Sinteza 1,10-fenantrolin-5,6-diona (4)*⁹⁷

1,10-fenantrolin (4 g, 22,19 mmol) i kalijum-bromid (4 g, 33,6 mmol) su pomešani i polako dodati u ohlađenu smešu (0 °C) koncentrovane sumporne kiseline (98 %, 40 cm³) i koncentrovane azotne kiseline (65 %, 20 cm³). Nakon toga reakciona smeša je mešana tokom 3 h na 100 °C pri čemu se izdvajaju se braon pare, a zatim ohlađena do sobne temperature i prelivena na smrvljeni led. Takva smeša je neutralisana rastvorom natrijum-hidroksida (80 g u 400 cm³ H₂O) do postizanja pH vrednosti rastvora između 4 i 5, kada se dobija žuti rastvor. Vodeni rastvor je ekstrahovan metilen-hloridom (8 x 100 cm³), organski ekstrakti su osušeni iznad anhidrovanog MgSO₄ i rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom. Dobijeno je 4,03 g proizvoda, u obliku svetlo žutog praha (86,5 %). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ 3276, 3034, 2931, 1717, 1688, 1559, 1413, 1291, 1030, 736 cm⁻¹.

*Sinteza 11,12-dimetildipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazin (Me₂dppz) (L3)*⁹⁸

1,10-fenantrolin-5,6-dion **4** (151 mg, 0,72 mmol) je suspendovan u etanolu (20 cm³) na 50 °C i dodat je 4,5-dimetilbenzen-1,2-diamin (127 mg, 0,93 mmol). Reakciona smeša je refluksovana 3 h, ohlađena na sobnu temperaturu i koncentrovana pod vakuumom na polovinu prvobitne zapremine. Talog je proceden, ispran sa malo hladnog metanola i hladnim dietil-etrom. Dobijeno je 157 mg proizvoda u obliku žutog taloga (70 %). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ 3380, 3062, 1646, 1503, 1421, 853, 738, 700, 621 cm⁻¹. **¹H NMR** (200 MHz, CDCl₃) δ 9,58 – 9,48 (m, 2H), 9,23 (dd, $J = 4,5, 1,8$ Hz, 2H), 7,97 (s, 2H), 7,75 (dd, $J = 8,1, 4,5$ Hz, 2H), 2,55 (s, 6H).

*Sinteza 2-(9-antril)-1H-imidazo[4,5-f] [1,10]fenantrolin (aip) (L4)*⁹⁹

1,10-fenantrolin-5,6-dion **4** (80 mg, 0,38 mmol) i amonijum-acetat (586 mg, 7,6 mmol) su suspendovani u glacijalnoj sirćetnoj kiselini (3 cm³), i tom rastvoru je dodat rastvor antracen-9-karbaldehida (11 mg, 0,532 mmol) u sirćetnoj kiselini (1 cm³) i smeša refluksovana tokom 4 h. Ohlađena smeša je procedena i talog ispran vodom. Talog je prekrystalisan u smeši MeOH/CHCl₃. Dobijeno je 113 mg proizvoda u obliku žutog taloga (75 %). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ 3749, 3162, 3118, 3053, 3022, 1564, 1541, 1505, 1400, 1352, 1068, 805, 737 cm⁻¹. **¹H NMR** (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14,21 (s, 1H), 9,09 (dd, $J = 4,3, 1,7$ Hz, 2H), 8,95 (d, $J = 12,5$ Hz, 2H), 8,79 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 8,27 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H), 7,91 – 7,76 (m, 4H), 7,67 – 7,49 (m, 4H).

*Sinteza pirido[2',3':5,6]pirazino[2,3-f][1,10]fenantrolin (ppf) (L5)*⁹⁸

Ključalom rastvoru 1,10-fenantrolin-5,6-diona **4** (200 mg, 0,951 mmol) u metanolu (16 cm³) je dodat piridin-2,3-diamin (104 mg, 0,951 mmol) i smeša je ostavljena da ključa tokom 1,5 h. Formirani talog je proceden, ispran hladnim metanolom, hladnim dietil-etrom i osušen. Dobijeno je 253 mg proizvoda u obliku žutog taloga (94 %). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ 3052, 2977, 2925, 1580, 1480, 1412, 1356, 1274, 1075, 810, 737 cm⁻¹. **¹H NMR** (200 MHz, CDCl₃) δ H 9,81 (H₂, dd, $J_1 = 8,2,$

$J_2 = 1,8$ Hz, 1H), 9,64 (H19, dd, $J_1 = 8,2$, $J_2 = 1,8$ Hz, 1H), 9,40 (H10, dd, $J_1 = 4,0$, $J_2 = 1,9$ Hz, 1H), 9,33 (H4 i H17, dd, $J_1 = 4,5$, $J_2 = 1,6$ Hz, 2H), 8,76 (H12, dd, $J_1 = 8,5$, $J_2 = 1,9$ Hz, 1H), 7,96 – 7,80 (H3, H18 i H11, m, 3H).

Sinteza N^1, N^2 -dipropionilhidrazina (L6)

Propionil-hlorid (840 mg, 793 μ l, 9,08 mmol) je dodavan u kapima rastvoru propionil-hidrazina (200 mg, 2,27 mmol) i kalijum-karbonata (627 mg, 4,54 mmol) u vodi (4 cm³) tokom 30 min na 0 °C. Reakciona smeša je mešana na 0 °C tokom 2 h, zatim 1 h na sobnoj temperaturi. Rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom i ostatak je prečišćen hromatografijom na koloni (SiO₂, eluent DCM/MeOH=1/4). Dobijeno je 190 mg proizvoda u obliku belog praha (58 %). **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ 3215, 3046, 2974, 2938, 1598, 1489, 1218, 1073, 883, 654 cm⁻¹. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ H 9,64 (NH, s, 1H), 2,14–2,08 (H2, q, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,03–0,97 (H3, t, $J = 7,5$ Hz, 2H). **¹³C NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ C 171,89 (C1); 26,38 (C2); 9,67 (C3). (+)**ESI-MS** (m/z): [M + Na]⁺ 67,14.

3.2. Sinteze kompleksa

Sinteza [(η^6 -*p*-cimen)Ru(1-(7-hlorhinolin-4-il)tiourea)Cl]Cl (C1)

Rastvoru 1-(7-hlorhinolin-4-il)tiouree (63 mg, 0,262 mmol) u CH₂Cl₂/MeOH (40 cm³, v/v=3/1) na 35 °C dodat je [RuCl₂(η^6 -*p*-cimen)]₂ (80 mg, 0,131 mmol) u CH₂Cl₂ (2 cm³) i reakciona smeša je mešana 20 h na sobnoj temperaturi. Posle dva dana u frižideru, izdvojeni talog je proceden, ispran heksanom i osušen. Dobijeno je 86 mg proizvoda u obliku crvenog praha (58 %). Elementalna analiza: Izračunato za C₂₀H₂₂Cl₃N₃RuS: C, 44,16; H, 4,08; N, 7,73. Nađeno: C, 43,77; H, 4,53; N, 7,39. **IR** (ATR): $\tilde{\nu}$ 3277, 3074, 2996, 2957, 2870, 2702, 2646, 1625, 1586, 1472, 1414, 1366, 1345, 1238, 1208, 832, 644 cm⁻¹. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ H 8,88 (H2, d, $J = 5,4$ Hz, 1H), 8,59 (1H, br s S=C-NH₂), 8,37–8,32 (H3 i H5, m, 2H), 8,16 (S=C-NH₂, br s, 1H), 8,10 (H8, d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 7,76 (H6, dd, $J_1 = 9,1$, $J_2 = 2,2$ Hz, 1H), 5,84–5,75 (H11, H11'', H12 i H12', m, 4H), 2,88–2,78 (H15, m, 1H), 2,09 (H14, s, 3H), 1,19 (H16 i H16', d, $J = 7,0$ Hz, 6H). **¹³C NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ C 182,03 (C9); 149,38 (C2); 145,96 (C8a i C4);

135,56 (C7); 127,20 (C6); 125,21 (C8 i C5); 120,50 (C4a); 113,31 (C3); 106,35 (C13); 100,06 (C10); 86,34 (C12 i C12'); 85,48 (C11 i C11'); 29,94 (C15); 21,47 (C16 i C16'); 17,84 (C14). (+)ESI-MS (m/z): $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{L1-H})]^+$ izračunato 472,01776, nađeno 472,0189.

Sinteza $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(2\text{-Piridin-3-il-4,5-dihidro-1H-imidazol})\text{Cl}_2]\text{BPh}_4$ (C2)

Rastvoru 2-piridin-3-il-4,5-dihidro-1H-imidazol-hidrohlorida (36 mg, 0,196 mmol) u etanolu (6 cm³) dodat je rastvor $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})]_2$ (60 mg, 0,098 mmol) u etanolu (4 cm³). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi u toku 48 h, nakon čega je dodat natrijum-tetrafenilborat (67 mg, 0,196 mmol). Formirani talog je proceden, ispran sa dietil-etrom i osušen. Dobijeno je 105 mg proizvoda u obliku žutog praha (68 %). Elementalna analiza: Izračunato za C₄₂H₄₄Cl₂N₃Ru: C, 65,49; H, 6,01; N, 5,33. Nađeno: C, 64,86; H, 6,01; N, 5,44. IR (ATR): 3300, 3117, 3055, 2966, 1622, 1580, 1476, 1426, 1379, 1291, 1033, 737, 707, 613 cm⁻¹. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ H 10,70 (2 × NH, br s, 2H), 9,09 (H2, d, *J* = 2,2, 1H), 8,90 (H6, dd, *J*₁ = 4,8, *J*₂ = 1,4 Hz, 1H), 8,29 (H4, dt, *J*₁ = 7,9, *J*₂ = 2,0, 1H), 7,68 (H5, dd, *J*₁ = 8,1, *J*₂ = 4,8 Hz, 1H), 7,20 (H2-BPh₄, br s, 8H), 7,00–6,86 (H3-BPh₄, m, 8H), 6,85–6,72 (H4-BPh₄, m, 4H), 5,83–5,73 (H11, H11'', H12 i H12', m, 4H), 4,03 (H8 i H9, s, 4H), 2,95–2,77 (H15, m, 1H), 2,12 (H14, s, 3H), 1,22 (H16 i H16', d, *J* = 6,7 Hz, 6H). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ C 163,90 (C7); 163,61 (C1-BPh₄); 155,04 (C6); 149,19 (C2); 136,41 (C4); 135,79 (C2-BPh₄); 125,55 (C3-BPh₄); 124,38 (C5); 121,77 (C4-BPh₄); 119,23 (C3); 106,61 (C13); 100,33 (C10); 86,60 (C12 i C12'); 85,74 (C11 i C11'); 44,80 (C8 i C9); 30,18 (C15); 21,69 (C16 i C16'); 18,07(C14). $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{L2-H})]^+$ izračunato 382,084664, nađeno 382,0903.

Sinteza $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{Me}_2\text{dppz})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (C3)

Rastvoru Me₂dppz (36 mg, 0,116 mmol) u smeši metanol/CH₂Cl₂ = 1/1 (10 cm³) je dodat u kapima rastvor $[\text{RuCl}_2(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})]_2$ (35,5 mg, 0,058 mmol) u CH₂Cl₂ (4 cm³). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 5 h i zatim procedena. Rastvoru je dodat NH₄PF₆ (28 mg, 0,174 mmol) i smeša je mešana preko noći na sobnoj temperaturi. Formirani talog je proceden, ispran hladnim metanolom, hladnim dietil-etrom i osušen. Dobijeno je 56,6 mg proizvoda u obliku žutog taloga (64 %). Elementalna analiza: Izračunato za C₃₀H₂₈ClF₆N₄PRu × 2H₂O: C,

47,28; H, 4,23; N, 7,35. Nađeno: C, 47,44; H, 3,83; N, 7,51. **IR** (ATR): 3648, 3091, 2971, 1493, 1471, 1411, 1359, 840, 729, 558 cm^{-1} . **^1H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10,00 (d, $J = 4,8$ Hz, 2 H), 9,55 (d, $J = 8,0$ Hz, 2 H), 8,28 (dd, $J_1 = 7,6$, $J_2 = 5,2$ Hz, 2H), 8,10 (s, 2H), 6,40 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H), 6,17 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H), 2,71 (m, 1H), 2,59 (s, 6H), 2,24 (s, 3H), 1,01 (d, $J = 6,8$ Hz, 6H). **^{13}C NMR** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 157,00; 147,54; 143,93; 141,04; 138,07; 134,93; 129,41; 127,69; 127,46; 104,78; 102,64; 85,91; 84,22; 30,43; 21,74; 20,18; 18,21. (+)**ESI-MS** (m/z): ([M-PF $_6$] $^+$) 581,2.

Sinteza [η^6 -benzen)Ru(Me $_2$ dppz)Cl]PF $_6$ (C4)

Rastvoru Me $_2$ dppz (35 mg, 0,113 mmol) u CH $_2$ Cl $_2$ (8 cm^3) je dodata suspenzija [η^6 -benzen)RuCl $_2$] $_2$ (28 mg, 0,056 mmol) u metanolu (6 cm^3). Reakciona smeša je mešana tokom 5 h na sobnoj temperaturi i nakon toga profiltrirana. Rastvoru je dodat NH $_4$ PF $_6$ (27 mg, 0,168 mmol) i smeša je mešana preko noći. Formirani talog je proceden, ispran sa hladnim metanolom, hladnim dietil-etrom i osušen. Dobijeno je 56,7 mg proizvoda u obliku žutog taloga (73 %). Elementalna analiza: Izračunato za C $_{26}$ H $_{20}$ ClF $_6$ N $_4$ PRu x H $_2$ O: C, 45,39; H, 3,22; N, 8,14. Nađeno: C, 45,35; H, 3,061; N, 8,162. **IR** (ATR): 3097, 2988, 2942, 1497, 1442, 1411, 1356, 833, 731, 556 cm^{-1} . **^1H NMR** (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10,08 (dd, $J_1 = 5,5$, $J_2 = 0,8$ Hz, 1H), 9,54 (dd, $J_1 = 8,0$, $J_2 = 1,0$ Hz, 1H), 8,26 (dd, $J_1 = 6,8$, $J_2 = 2,5$ Hz, 1H), 8,09 (s, 1H), 6,39 (s, 6H), 2,58 (s, 6H). **^{13}C NMR** (125 MHz, DMSO- d_6) δ 157,31; 147,59; 144,00; 141,08; 137,90; 134,99; 129,36; 128,30; 127,71; 127,31; 86,87; 20,18. (+)**ESI-MS** (m/z): [M-PF $_6$] $^+$ 525,1.

Sinteza [η^6 -*p*-cimen)Ru(aip)Cl]PF $_6$ (C5)

Suspenziji aip (30 mg, 0,075 mmol) u smeši metanol/CH $_2$ Cl $_2$ = 1/1 (10 cm^3) je dodat u kapima rastvor [RuCl $_2$ (η^6 -*p*-cimen)] $_2$ (23 mg, 0,038 mmol) u CH $_2$ Cl $_2$ (4 cm^3). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperaturi tokom 8 h i procedena. U rastvor je dodat NH $_4$ PF $_6$ (24 mg, 0,15 mmol) i smeša je mešana tokom 2 h. Formirani talog je proceden, ispran hladnim metanolom, hladnim dietil-etrom i osušen. Dobijeno je 60,4 mg proizvoda u obliku žutog taloga (94 %). Elementalna analiza: Izračunato za C $_{37}$ H $_{34}$ ClF $_6$ N $_4$ O $_2$ PRu x 2H $_2$ O C, 52,39; H, 4,04; N, 6,61. Nađeno: C, 51,85; H, 4,08; N, 6,64. **IR** (ATR): 3640, 3060, 2970, 2930, 1607, 1544, 1507, 1447,

1413, 1365, 839, 742, 556 cm^{-1} . $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 14,83 (bs, 1H), 9,92 (d, $J = 5,0$ Hz, 2 H), 9,19 (bs, 2H), 8,95 (s, 1H), 8,30–8,20 (m, 4H), 7,80 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 7,61 (t, $J = 7,0$ Hz, 2 H), 7,53 (s, 2H), 6,39 (d, $J = 6,5$ Hz, 2H), 6,15 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H), 2,67 (m, 1H), 2,25 (s, 3H), 0,96 (d, $J = 7,0$ Hz, 6 H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 153,92; 150,66; 143,31; 132,44; 130,82; 130,64; 129,61; 128,64; 127,31; 126,39; 125,83; 125,49; 124,40; 104,02; 103,10; 86,23; 83,97; 30,46; 21,73; 18,33. (+)ESI-MS (m/z): ($[\text{M-PF}_6]^+$) 667,2.

Sinteza $[(\eta^6\text{-benzen})\text{Ru}(\text{ppf})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (C6)

Rastvoru ppf (45 mg, 0,16 mmol) u smeši izopropanol/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1/1$ (10 cm^3) je dodata suspenzija $[(\eta^6\text{-benzen})\text{RuCl}_2]_2$ (40 mg, 0,08 mmol) u izopropanolu (4 cm^3). Reakciona smeša je mešana tokom 5 h na sobnoj temperaturi i nakon toga profiltrirana. Rastvoru je dodat NH_4PF_6 (39 mg, 0,24 mmol) i smeša je mešana preko noći. Formirani talog je proceden, ispran sa hladnim metanolom, hladnim dietil-etrom i osušen. Dobijeno je 82 mg proizvoda u obliku žutog taloga (80 %). Elementalna analiza: Izračunato za $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{ClF}_6\text{N}_5\text{PRu}$ C, 42,97; H, 2,35; N, 10,89. Nađeno: C, 43,16; H, 2,44; N, 10,93. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10,17 (H2 i H19, dd, $J_1 = 11,5$, $J_2 = 5,0$ Hz, 2H), 9,70 (H4, d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 9,64 (H17, d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 9,50 (H10, dd, $J_1 = 3,8$, $J_2 = 1,7$ Hz, 1H), 8,89 (H12, dd, $J_1 = 8,5$, $J_2 = 1,6$ Hz, 1H), 8,31 (H3 i H18, ddd, $J_1 = 18,2$, $J_2 = 8,1$, $J_3 = 5,4$ Hz, 2H), 8,15 (H11, dd, $J_1 = 8,5$, $J_2 = 3,9$ Hz, 1H), 6,43 (H23-PhH, s, 6H). (+)ESI-MS (m/z): ($[\text{M-PF}_6]^+$) 498,00.

Sinteza $[(\eta^6\text{-toluen})\text{Ru}(\text{ppf})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (C7)

Rastvoru ppf (30 mg, 0,106 mmol) u smeši metanol/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1/1$ (10 cm^3) je dodata suspenzija $[(\eta^6\text{-toluen})\text{RuCl}_2]_2$ (28 mg, 0,053 mmol) u metanolu (5 cm^3). Reakciona smeša je mešana tokom 5 h na sobnoj temperaturi i nakon toga profiltrirana. Rastvoru je dodat NH_4PF_6 (26 mg, 0,159 mmol) i smeša je mešana preko noći. Formirani talog je proceden, ispran sa hladnim metanolom, hladnim dietil-etrom i osušen. Dobijeno je 54 mg proizvoda u obliku žutog taloga (78 %). Elementalna analiza: Izračunato za $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{ClF}_6\text{N}_5\text{PRu} \times \text{H}_2\text{O}$ C, 42,71; H, 2,84; N, 10,38. Nađeno: C, 42,60; H, 2,67; N, 10,09. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ H 10,07 (H2 i H19, d, $J = 4,2$ Hz, 2H), 9,74 (H4 i H17, dd, $J_1 = 9,7$, $J_2 = 8,4$ Hz, 2H), 9,52 (H10, dd, $J_1 = 4,0$, $J_2 = 1,9$ Hz,

1H), 8,94 (H12, dd, $J_1 = 8,5$, $J_2 = 1,8$ Hz, 1H), 8,34 (H3 i H18, ddd, $J_1 = 8,3$, $J_2 = 5,4$, $J_3 = 3,0$ Hz, 2H), 8,18 (H11, dd, $J_1 = 8,6$, $J_2 = 4,1$ Hz, 1H), 6,52 (H26 i H26', t, $J = 6,0$ Hz, 2H), 6,14 (H25 i H25', d, $J = 6,1$ Hz, 2H), 5,94 (H27, t, $J = 5,7$ Hz, 1H), 2,32 (H24, s, 3H). (+)ESI-MS (m/z): ([M-PF₆]⁺) 512,02.

Sinteza [(η^6 -*p*-cimen)Ru(ppf)Cl]PF₆ (C8)

Rastvoru ppf (46 mg, 0,164 mmol) u smeši metanol/CH₂Cl₂ = 1/1 (10 cm³) je dodat u kapima rastvor [RuCl₂(η^6 -*p*-cimen)]₂ (50 mg, 0,082 mmol) u CH₂Cl₂ (4 cm³). Reakciona smeša je mešana tokom 5 h na sobnoj temperaturi i nakon toga profiltrirana. Rastvoru je dodat NH₄PF₆ (40 mg, 0,246 mmol) i smeša je mešana preko noći. Formirani talog je proceden, ispran sa hladnim metanolom, hladnim dietil-etrom i osušen. Dobijeno je 91 mg proizvoda u obliku žutog taloga (83 %). Elementalna analiza: Izračunato za C₂₇H₂₃ClF₆N₅PRu C, 46,39; H, 3,32; N, 10,02. Nađeno: C, 47,10; H, 2,77; N, 10,38. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ H 10,05 (H2 i H19, m, 2H), 9,75 (H4, dd, $J_1 = 8,2$, $J_2 = 1,0$ Hz, 1H), 9,70 (H17, dd, $J_1 = 8,1$, $J_2 = 1,0$ Hz, 1H), 9,49 (H10, dd, $J_1 = 3,9$, $J_2 = 1,9$ Hz, 1H), 8,90 (H12, dd, $J_1 = 8,5$, $J_2 = 1,8$ Hz, 1H), 8,34 (H3 i H18, dt, $J_1 = 8,2$, $J_2 = 5,6$ Hz, 2H), 8,15 (H11, dd, $J_1 = 8,5$, $J_2 = 4,0$ Hz, 1H), 6,41 (H25 i H25', d, $J = 6,5$ Hz, 2H), 6,18 (H26 i H26', d, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,71 (H28, m, $J_1 = 13,7$, $J_2 = 6,8$ Hz, 1H), 2,23 (H24, s, 3H), 1,01 (H29 i H29', d, $J = 6,9$ Hz, 6H). (+)ESI-MS (m/z): ([M-PF₆]⁺) 554,06.

Sinteza [(η^6 -*p*-cimen)₂Ru₂Cl₂(N¹,N²-dipropionilhidrazin)] (C9)

Rastvoru [RuCl₂(η^6 -*p*-cimen)]₂ (62 mg, 0,101 mmol) u CH₂Cl₂ (4 cm³) dodat je N¹,N²-dipropionilhidrazin (18 mg, 0,125 mmol) u etanolu (4 cm³). Reakciona smeša je mešana na sobnoj temperature tokom 4 h. Sledećeg dana, rastvor je koncentrovan pod sniženim pritiskom, izdvojeni narandžasti talog je proceden i ispran dietil-etrom. Dobijeno je 46 mg proizvoda (66%). Monokristal pogodan za X-ray analizu je dobijen sporim isparavanjem rastvora reakcione smeše. Elementalna analiza: Izračunato za C₂₆H₃₈Cl₂N₂O₂Ru₂: C, 45,68; H, 5,60; N, 4,10. Nađeno: C, 45,59; H, 5,57; N, 4,02. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ 3391, 3209, 3055, 3031, 2965, 2875, 2781, 1697, 1639, 1570, 1539, 1464, 1396, 1234, 1088, 880 cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ H 5,35 (H7, 7', 8', dt, $J_1 = 16,5$, $J_2 = 6,0$ Hz, 3H), 4,99 (H8, d, $J = 5,5$ Hz, 1H), 3,71 (H4, q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 2,90

(H2, m, 1H), 2,74–2,65 (H2, H11, m, 2H), 2,20 (H10, s, 3H), 1,28 (H1, t, $J = 7,5$ Hz, 3H), 1,24 (H5, t, $J = 7,0$ Hz, 3H), 1,16 (H12, 12', dd, $J_1 = 14,0$, $J_2 = 6,5$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ C 174,38 (C3); 101,19 (C9); 98,49 (C6); 83,34 (C7); 80,49 (C8); 80,42 (C7'); 79,98 (C8'); 58,14 (C4); 30,43 (C11); 27,35 (C2); 22,40 (C12); 22,08 (C12'); 18,51 (C10); 18,29 (C5); 11,74 (C1). (+)ESI-MS (m/z): $[\text{M} - \text{Cl}]^+$ 649,21.

3.3. Materijal i metode

3.3.1. Supstance korišćene u sintezama

Polazni arenski kompleksi rutenijuma $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{RuCl}_2]_2$, $[(\eta^6\text{-toluen})\text{RuCl}_2]_2$ i $[(\eta^6\text{-benzen})\text{RuCl}_2]_2$ sintetisani su prema objavljenoj proceduri.¹⁰⁰ Ostale supstance za sintezu liganada i rastvarači su komercijalno dostupne supstance nabavljene od dobavljača.

3.3.2. Elementalna analiza

Elementalne analize (C, H, N) su urađene su uz pomoć Elemental Vario EL III microanalyzer-a u Beogradu ili LecoCHNS-932 elemental analyzer-a na Institutu za neorgansku hemiju, Univerziteta u Cirihu.

3.3.3 Infracrvena spektroskopija

Infracrveni spektri su snimljeni pomoću spektrometra Nicolet 6700 FT-IR (ATR tehnika, 4000 - 400 cm^{-1}).

3.3.4. NMR spektroskopija

NMR spektri su snimani na spektrometrima Varian Gemini 200 (^1H : 200 MHz; ^{13}C 50 MHz), Bruker Ultrashield Advance III 500 (^1H : 500 MHz; ^{13}C 125 MHz) i Bruker DRX 400 (^1H : 400 MHz; ^{13}C 100 MHz). Spektri su snimani u deuterisanim rastvaračima.

3.3.5. Masena spektrometrija

Maseni spektri su mereni na spektrometrima Bruker Esquire 6000, 6210 Time-of-Flight LC-MS instrument (G1969A, Agilent Technologies), Bruker Daltonics HCT 6000 i Orbitrap LTQ HR u pozitivnom režimu rada.

3.3.6. Električna provodljivost

Provodljivost je merena pomoću Crison MultiMeter MM41 instrumenta.

3.3.7. Rendgenska strukturna analiza

Rendgenski strukturni podaci sakupljeni su na sobnoj temperaturi pomoću Bruker X8 APEXII CCD i Bruker D8-Venture difraktometrom. Monokristal je postavljen na 34 mm od detektora i prikupljeno je 1630 refleksija, na svakih 30 s sa širinom skeniranja većom od 1°. Podaci su obrađeni pomoću SAINT softvera.¹⁰¹ Kristalografski podaci, parametri utičnjavanja i detalji o preciznosti strukture dati su u **Tabeli 5**. Struktura je rešena direktnom metodom i utičnjene metodom potpune matrice najmanjih kvadrata. Svi ne-vodonikovi atomi su utičnjeni anizotropno. Vodonikovi atomi vezani za ugljenik su uključeni u model na osnovu geometrijski proračunatih pozicija i utičnjeni korišćenjem „jašućeg” modela. Za obradu podataka korišćeni su sledeći računarski programi i hardver: određivanje strukture SHELKSS-2013 i utičnjavanje SHELKSL-2013¹⁰², molekularni dijagrami ORTEP¹⁰³ i kompjuter Intel CoreDuo. Kristalografski podaci za kompleks **C9** su deponovani u Cambridge Crystallographic Data Centru pod brojem br. CCDC 1492600.

3.3.8. Računarski detalji

Kvantne hemijske kalkulacije izvršene su pomoću programskog paketa Gaussian 09.¹⁰⁴ Optimalne geometrije ispitivanih molekula izračunate su u gasnoj fazi pomoću DFT metode sa

funkcijom B3LYP (Becke's three parameter Lee–Yang–Parr)¹⁰⁵ bez ograničenja (prekid energije od 10^{-5} kJ mol⁻¹, konačni RMS energetski gradijent ispod 0,01 kJ mol⁻¹ Å⁻¹). Za sve proračune korišćen je bazni set SVP/FitSVP.¹⁰⁶ Optimizovane strukture su potvrdile da su stvarni minimumi analizom frekvencije (bez lažnih frekvencija). Entalpija i Gibbs-ova slobodna energija iznosi 298,15 K. Vizualizacija dobijenih teorijskih rezultata izvršena je programskim paketom Molekel.¹⁰⁷

3.3.9 Biološka ispitivanja

Za biološka ispitivanja (intraćelijska akumulacija, interakcije sa DNK, citotoksičnost), kompleksi i odgovarajući ligandi su rastvoreni u DMSO-u (20 mM) pre upotrebe. DMSO rastvori su pomešani sa vodenim rastvorima koji su odmah korišćeni u biološkim istraživanjima, tako da konačna koncentracija DMSO-a nikada nije prelazila 0,1% (v/v).

3.3.10. Čelijske kulture i reagensi

Biološka ispitivanja su vršena na nekoliko humanih tumorskih ćelijskih linija poreklom od karcinoma grlića materice (HeLa), hronične mijeloidne leukemije (K562), alveolarno bazalnog adenokarcinoma pluća (A549), karcinoma dojke (MDA-MB-231). Takodje su ispitivanja radjena na humanoj transformisanoj endotelijalnoj ćelijskoj liniji (EA.hy 926) i jednoj netumorskoj humanoj ćelijskoj liniji fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5). Čelijske linije su održavane u kulturi u monosloju, pomoću hranljivog medijuma (Roswell Park Memorial Institute) RPMI-1640 (Gibco) ili Dulbecco's modifikovanog Eagle medijuma (DMEM). Hranljivi medijumi za ćelije su pripremljeni pomoću dejonizovane sterilne vode sa dodatkom penicilina (192 U/cm^3), streptomicina ($200 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$), 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonske kiseline (HEPES) (25 mM), L-glutamina (3 mM) i 10% toplotno-inaktiviranog fetalnog telećeg seruma (FCS) (pH 7,2). Za ćelijsku liniju EA.hy 926, u medijum je dodata D-glukoza (4,5 g/L). Čelije su gajene na 37 °C u 5% atmosferi CO₂ i u određenoj vlažnosti vazduha.

3.3.11. Test preživljavanja ćelija upotrebom boje tripan-plavo

Tripan-plavo test (trypan blue - TB) je korišćen za određivanje broja živih ćelija prisutnih u ćelijskoj suspenziji. TB test se zasniva na principu da žive ćelije poseduju netaknute ćelijske membrane koje ne propuštaju TB boju, dok kod ćelija koje nisu žive, sa oštećenom ćelijskom membranom, dolazi do ulaska TB boje. Bojenje je urađeno prema prethodno opisanom protokolu.¹⁰⁸ Suspenzija ćelija (50 µl) je pomešana sa 250 µl profiltriranog TB rastvora (0.4%). Nakon toga, ćelije su vizuelno ispitane svetlosnom mikroskopijom i broj ćelija je određen pomoću komore za brojanje, Neubauer. Žive ćelije su ostaleneobojene, dok nežive imaju plavu citoplazmu.

3.3.12. Ispitivanje citotoksičnosti

Citotoksičnost jedinjenja prema ćelijskim linijama tumora i normalnim ćelijama merena je fluorometrijskom studijom, tj. testom sposobnosti preživljavanja, koristeći resazurin boju (Promocell GmbH). Ćelije su posejane u triplikatu na ploči sa 96 bunara, sa gustinom od 5×10^3 ćelija/bunaru 100 µl 24 h pre tretmana. Ćelije su zatim tretirane sa gradijentnim povećanjem koncentracije ispitivanih jedinjenja tokom 48 h ili 72 h. Nakon inkubacije, medijum je zamenjen sa 100 µl medijuma koji sadrži resazurin (konačna koncentracija 0,2 mg/cm³). Nakon 4 h inkubacije na 37 °C, fluorescencija proizvoda, fluorescentno-crvenog resorufina, je kvantifikovana merenjem emisije nakon ekscitacije pomoću svetlosti na 590 nm na aparatu SpectraMax M5 microplate Reader-u.

Citotoksičnost kompleksa je takođe testirana koristeći MTT test, uz pomoć 3-(4,5-dimetiltiazol-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromida (MTT, Sigma-Aldrich). Ćelijske kulture su zasejane na ploči u 96 bunara (Thermo Scientific Nunc) sa gustinom od 4000 ć/b (HeLa), 8000 ć/b (A549), 6000 ć/b (A375, LS 174T), 7000 ć/b (MDA-MD-231 i MRC- 5), 3000 ć/b (EA.hi 926) i 5000 ć/b (K562) u 100 cm³ kulture srednja. Nakon 24 h rasta, ćelije su izložene serijskom razblaženju testiranih kompleksa. Testirana jedinjenja su rastvorena u DMSO-u, neposredno pre upotrebe, u koncentraciji od 10 mM kao polazni rastvor. Cisplatina je korišćena u ovoj studiji kao referentno jedinjenje. Serija razblaženja je napravljena u istom rastvoru korišćenom za ćelije, tako da su konačne koncentracije po bunarima bile 6,25, 12,5, 25, 50 i 100 mM (konačna

koncentracija DMSO-a nije prelazila 1% (v/v) po bunaru). Svaka koncentracija je testirana u tri probe. Posle perioda inkubacije od 72 h, 20 cm³ MTT rastvora i 5 mg/cm³ rastvora fosfatnog pufera pH 7,2 dodato je svakom bunaru. Uzorci su inkubirani 4 časa na 37 °C sa 5% CO₂ u vlažnoj atmosferi. Formirani kristali su rastvoreni u 100 cm³ 10 % rastvora natrijum-dodecilsulfata (SDS). Apsorbance dobijenih uzoraka su merene nakon 24 časa na enzimsko vezanom testu imunosorbenta (ELISA) (ThermoLabsystems Multiskan EKS 200-240 V), na talasnoj dužini od 570 nm. IC₅₀ vrednosti (mM) određene su pomoću dijagrama. Poređen je procenat preživelih ćelija kontrole u odnosu na nezdrave i mrtve ćelije. Vrednost IC₅₀, definisana kao koncentracija jedinjenja koja uzrokuje 50% inhibiciju rasta ćelija, procenjena je iz krive doza-odgovor.¹⁰⁹

3.3.13. Merenje distribucije faze ćelijskog ciklusa metodom protočne citometrije

Izvedena je kvantitativna analiza raspodele faze ćelijskog ciklusa primenom protočne citometrijske analize sadržaja DNK u fiksiranim HeLa ćelijama, nakon bojenja sa propidijum-jodidom (PI).¹¹⁰ Ćelije su zasejane u gustini od 2×10^5 ćelija/bunaru, u ploče sa 6 bunara (Thermo Scientific Nunc™), u 2 cm³ hranljivog medijuma. Ćelije su kontinualno bile izložene ispitivanim jedinjenjima ili cisplatinu u odgovarajućim koncentracijama IC₅₀ i 2×IC₅₀ vrednosti. Kontrolne ćelije su inkubirane samo u hranljivom medijumu. Nakon 24 h ili 48 h rasta, ćelije su sakupljene, isprane dva puta sa ledenim fosfatnim puferom (PBS) i fiksirane preko noći u 70% etanolu. Nakon fiksacije, ćelije su isprane sa PBS i inkubirane sa RNaseA (1mg/cm³) tokom 30 min, na 37 °C. Neposredno pre protočne citometrijske analize, ćelije su obojene sa PI, u koncentraciji od 400 µg/cm³. Ispitivana je faza raspodele ćelijskog ciklusa koristeći fluorescentno aktivirani ćelijski sorter (FACS, Calibur Becton Dickinson citometar), na liniji ekscitacije od 488 nm (Argon-jon laser). Prikupljeni podaci su analizirani pomoću računarskog softvera Cell Quest.

3.3.14. Analiza apoptoze pomoću Anekin-FITC metodom protočne citometrije

Kvantitativna analiza apoptozne i nekrozne ćelijske smrti indukovane ispitivanim jedinjenjima izvršena je primenom protočne citometrije i dualnim bojenjem ispitivanih uzoraka

Aneksin-FITC (fluorescein-izotiocijanat) i propidijum jodidom (PI), kompletom za detekciju apoptoze, prema uputstvima proizvođača (BD Biosciences). HeLa ćelije (2×10^5) su zasejane u ploče sa 6 bunara (Thermo Scientific Nunc™), u 2 cm^3 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medijuma. Nakon 24 h rasta, ćelije su tretirane ispitivanim jedinjenjima tokom 24 h i 48 h, u koncentracijama koje odgovaraju njihovim vrednostima IC_{50} i $2 \times IC_{50}$. Nakon toga, ćelije su isprane dva puta ledenim rastvorm PBS-a, zatim resuspendovane u $200 \mu\text{l}$ vezujućeg pufera (10 mM HEPES / NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2). $100 \mu\text{l}$ suspenzije ćelija (10^5 ćelija) je prebačeno u tubu za ćelijske kulture od 5 cm^3 i pomešano sa $5 \mu\text{l}$ aneksin-FITC i $5 \mu\text{l}$ propidium-jodida (PI).¹¹¹ Ćelije su vorteksovane i inkubirane 15 min na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ u mraku. Nakon toga je dodato $400 \mu\text{l}$ vezujućeg pufera u svaku tubu za ćelijske kulture i analizirano korišćenjem FACS, Calibur Becton Dickinson protočnim citometrom, a podaci su obrađeni pomoću računarskog softvera Cell Quest.

3.3.15. Morfološka analiza smrti ćelije fluorescentnom mikroskopijom

HeLa ćelije (2×10^4) su zasejane u ploče sa 6 bunara (ThermoScientific Nunc™) u 2 cm^3 hranljivog medijuma. Posle 24 h rasta, ćelije su izložene ispitivanim jedinjenjima pri IC_{50} ili $2 \times IC_{50}$ koncentracijama. Nakon 24 h ili 48 h tretmana, ćelije su obojene etidijum-bromidom ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) i akridin-narandžastim ($1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) u skladu sa standardnom procedurom,¹¹² a odmah posle, posmatrane su pod fluorescentnim mikroskopom Axio Observer Z1, pomoću AkioVision softvera za snimanje (Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

3.3.16. Mikrotalasna digestija uzoraka za ICP-MS

Digestija je urađena na Advanced Microvave Digestion Sistemu (ETHOS 1, Milestone, Italija) korišćenjem segmentiranog rotora visokog pritiska HPR-1000/10S. Pre upotrebe, PTFE posude otporne na pritisak su očišćene kiselinom i isprane ultra-čistom vodom. Uzorak je kvantitativno prenesen, pomešan u posudi sa 3 cm^3 HNO_3 (65%), 4 cm^3 ultra čiste vode i 2 cm^3 H_2O_2 (30%), a potom zagrejan mikrotalasima tokom 10 min. Temperatura je kontrolisana programom pomoću sonde uronjene u rastvor. Temperatura je podignuta na $200 \text{ }^\circ\text{C}$ u prvih 10 min, održavana 10 min, a zatim je brzo ohlađeno. Nakon hlađenja, rastvor je razblažen do fiksne

zapremine od 10 cm³ ultra čistom vodom. Ultra čista voda je pripremljena dvostrukom dejonizacijom u Milli-Q sistemu (Millipore, Bedford, MA, SAD) do otpora vode od 18,2 MΩ cm.

3.3.17. Merenje intraćelijske akumulacije rutenijuma (II) i platine (II) pomoću ICP-MS

Intraćelijska akumulacija ispitivanih jedinjenja analizirana je u HeLa i K562 ćelijama, u poređenju sa cisplatinom, koristeći masenu spektrometriju induktivno spregnute plazme (ICP-MS), koristeći Thermo Scientific iCAP Qc ICP-MS (Thermo Scientific, Bremen, Nemačka)¹¹³ spektrometar sa operativnim softverom Qtegra. Instrument je optimizovan u režimu KED (diskriminacija kinetičke energije) korišćenjem isporučениh automatskih protokola. Instrument ICP-MS je podešen korišćenjem rastvora TUNE B iCAP Q (1 µg/l svakog jona: Ba, Bi, Ce, Co, In, Li, U), proizvođač Thermo Scientific, Nemačka. Eksterni standardi za kalibraciju instrumenta pripremljeni su na bazi rutenijuma, standardnim rastvorom za ICP-MS, Specpure®, pomoću sertifikovanog referentnog rastvora Ru 1000 µg/cm³ ICP standard, kupljenog od kompanije Alfa Aesar GmbH & Co KG (Nemačka). Koncentracija kiselih eksternih standarda usklađena sa koncentracijom kiseline pripremljenih uzoraka. Za eksperimente akumulacije u ćelijama, granica kvantifikacije (LOQ) za platinu iznosi 34 ng/L, a 88 ng/L za rutenijum. HeLa ćelije (1 × 10⁶) su zasejane u posude zapremine 75 cm³, a K562 ćelije (1 × 10⁶) u posude zapremine 25 cm³ (Thermo Scientific Nunc™) i u ekspanzionalnoj fazi rasta ćelije su tretirane ispitivanim jedinjenjima u ekvimolarnim koncentracijama. Nakon 4 h i 20 h tretmana, pričvršćene ćelije su sastrugane, oprane ledenim PBS-om i ćelije sakupljene centrifugiranjem pri 2000 obr/min, 10 min. Za proveru merenja Ru i Pt na ICP-MS, dva kompleta kontrolnih uzoraka su napravljena, intraćelijska i DNK.

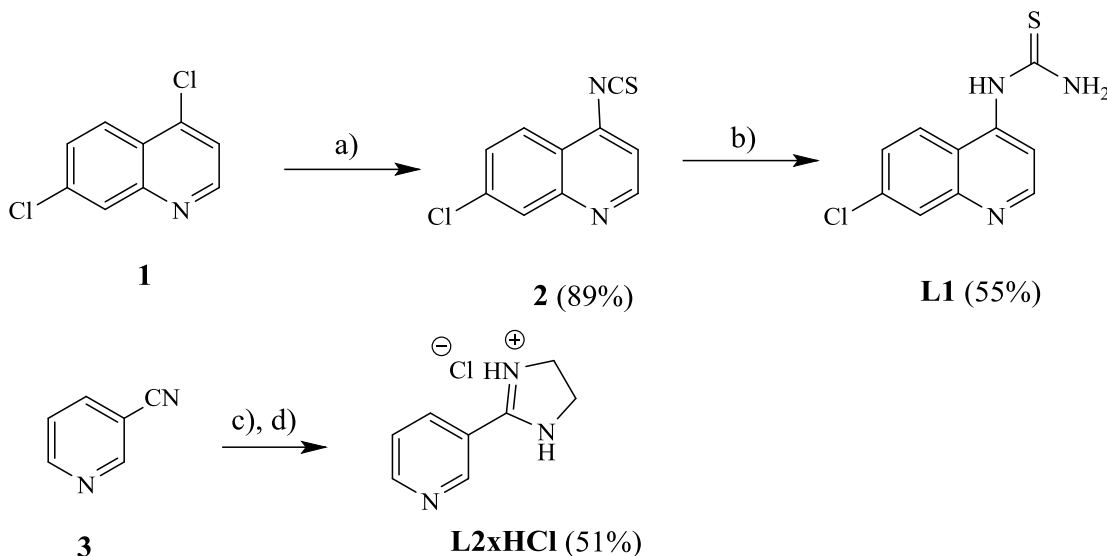
3.3.18. Priprema uzorka za merenje vezivanja jona za DNK pomoću ICP-MS

Vezivanje Ru i Pt za ćelijsku DNK analizirano je u HeLa i K562 ćelijama, koristeći masenu spektrometriju induktivno spregnute plazme (ICP-MS). HeLa i K562 ćelije su pripremane i sakupljane koristeći istu proceduru kao što je prethodno opisano. Ukupan DNK je izolovan koristeći TRI Reagent® (Sigma Aldrich), u skladu sa procedurom proizvođača i koncentracije su određene spektrofotometrijskim merenjem apsorbance na BioPhotometer 6131 (Eppendorf) ili BioSpec-nano (Shimadzu Biotech) spektrofotometrima.

4. Rezultati i diskusija

4.1. Sinteze liganada

Ligand hinolinskog derivata tiouree **L1** sintetisan je iz dva koraka, polazeći od 4,7-dihlorhinolina **1**. U prvom koraku je hinolin **1** u prisustvu dva ekvivalenta srebro-tiocijanata preveden u izotiocijanatni intermedijer **2**, uvođenjem izotiocijanata u položaju 4, a transformacija do tiouree je izvršena mešanjem proizvoda **2** u metanolu zasićenim gasovitim amonijakom, na sobnoj temperaturi. Piridinski ligand **L2xHCl**, sintetisan je u jednom koraku, polazeći od 3-cijanopiridina. 3-cijanopiridin, etilendiamin i sumpor su pomešani i zagrevani pod mikrotalasima u toku 1,5 h. Posle obrade reakcije i prečišćavanja dobijen je neutralni oblik 3-(4,5-dihidro-1,3-thiazol-2-il)piridin, koji je mešanjem u rastvoru metanola zasićenim gasovitim hlorovodonikom preveden u krajnji proizvod **L2xHCl** (**Shema 1**).⁹⁶

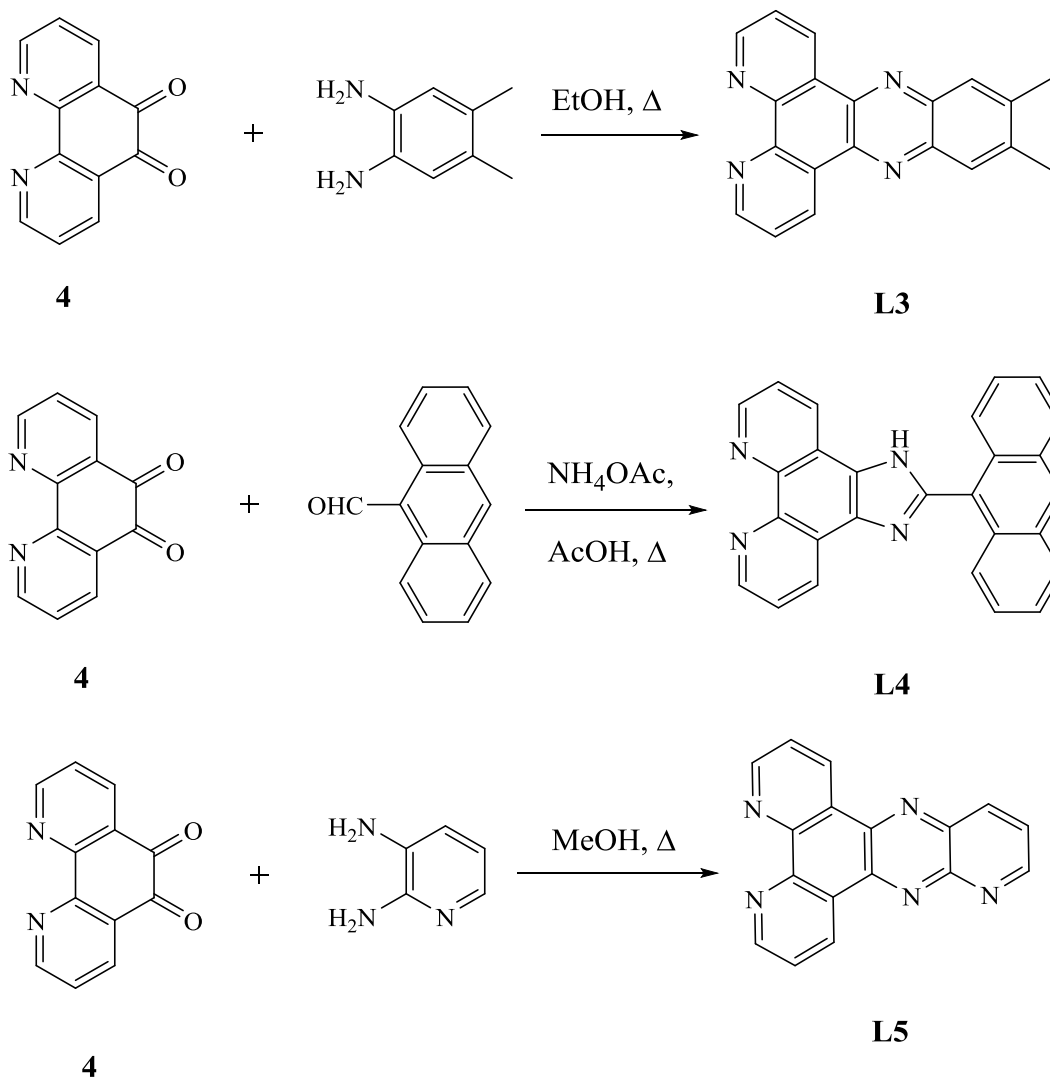


a) AgSCN, PhMe, 115 °C; b) MeOH / NH₃, s.t.; c) etilendiamin, S, MW; d) MeOH / HCl

Shema 1. Sinteza izohinolinskog liganda **L1** i piridinskog liganda **L2**

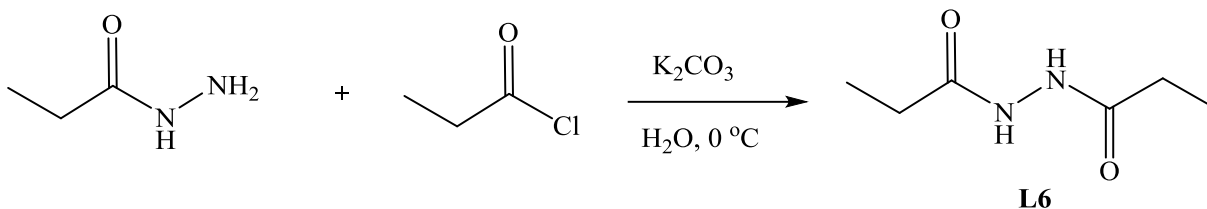
Ligandi 11,12-dimetildiprido[3,2-a:2',3'-c]fenazin (**Me₂dppz**, **L3**) i pirido[2',3':5,6]pirazino[2,3-f][1,10]fenantrolin (**ppf**, **L5**) sintetisani su kondenzacijom 1,10-

fenantrolin-5,6-diona **4**⁹⁷ sa 4,5-dimetilbenzen-1,2-diaminom ili piridin-2,3-diaminom po opisanoj proceduri iz literature.⁹⁸ Ligand 2-(9-antril)-1H-imidazo[4,5-f] [1,10]fenantrolin (aip, **L4**) je dobijen kondenzacijom diona **4** sa antracen-9-karbaldehidom u prisustvu NH₄OAc i sirćetne kiseline prema protokolu opisanom u literaturi (**Shema 2.**).⁹⁹



Shema 2. Strukture planarnih aromatičnih liganada **L3**, **L4** i **L5**

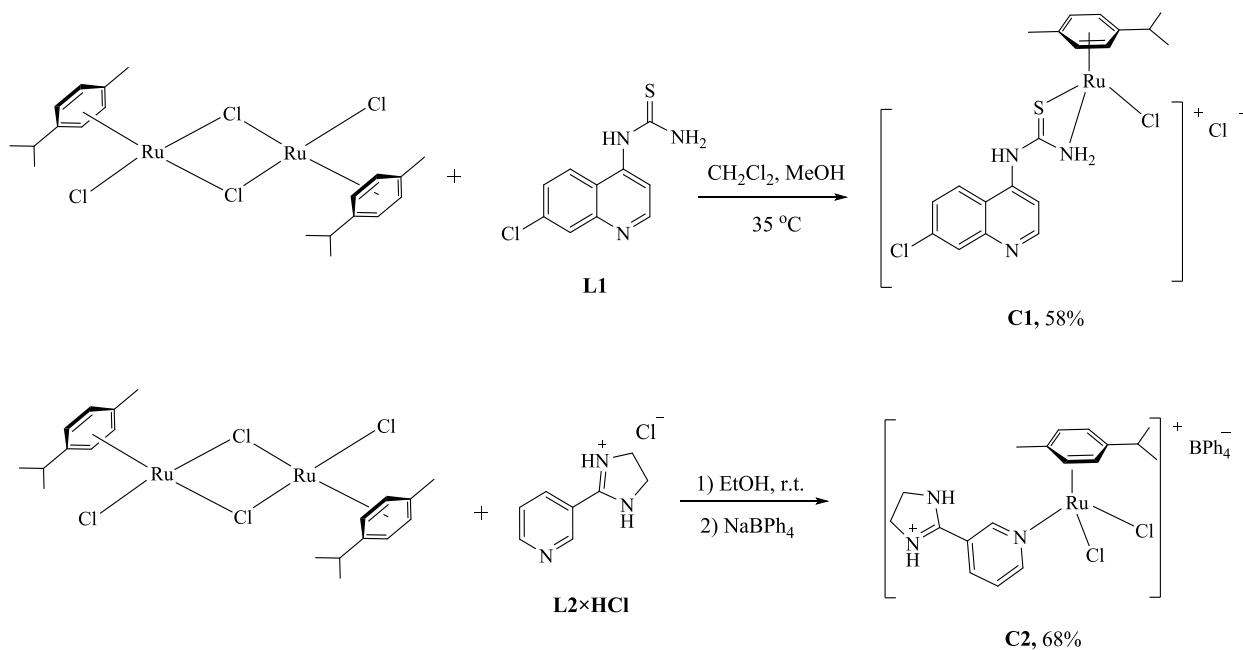
Ligand *N*¹,*N*²-dipropionilhidrazin (**L6**) je dobijen kondenzacijom propilhidrazida sa propionil-hloridom u prisustvu baze (**Shema 3.**).



Shema 3. Sinteza liganda dipropanoil-hidrazina **L6**

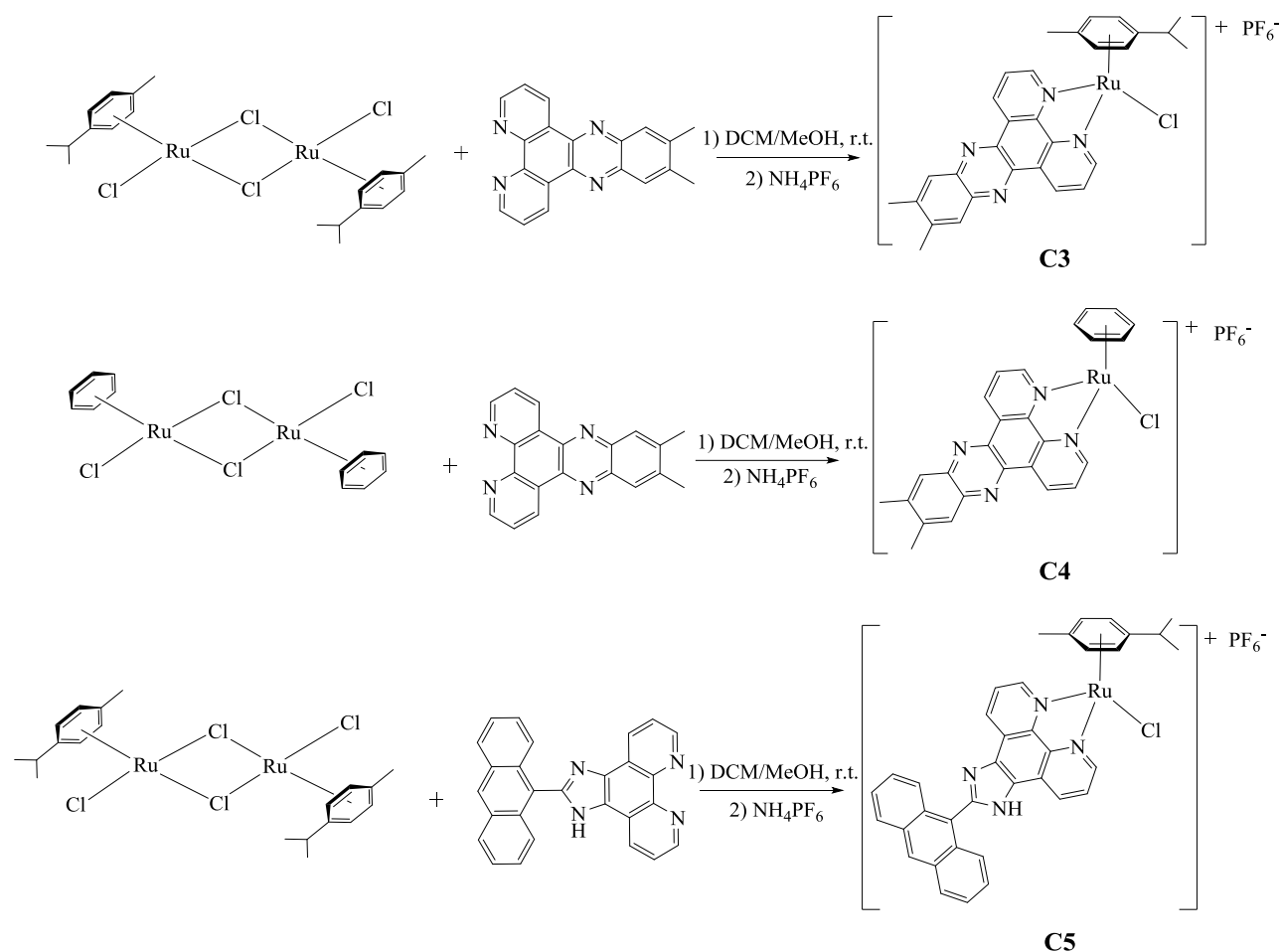
4.2. Sinteze kompleksa

Kompleks **C1** dobijen je reakcijom polaznog *p*-cimenskog rutenijumskog dimera sa i liganda **L1** u smeši rastvarača MeOH/CH₂Cl₂ (1:1 V/V) blagim zagrevanjem. Sporim isparavanjem rastvarača nastao je crveni talog kompleksa, koji je ceđenjem iodvojen, ispran rastvaračem i osušen. Za razliku od kompleksa **C1**, kompleks **C2** sa hloridnim kontra jonom nije mogao da bude izolovan i okarakterisan. Uspesna sinteza je postignuta kada je u reakcionu smešu dodat NaBPh₄ gde je tokom izolovanja i prečišćavanja, dobijen kompleks koji kao kontra jon ima tetrafenilboratni anjon (**Shema 4**).



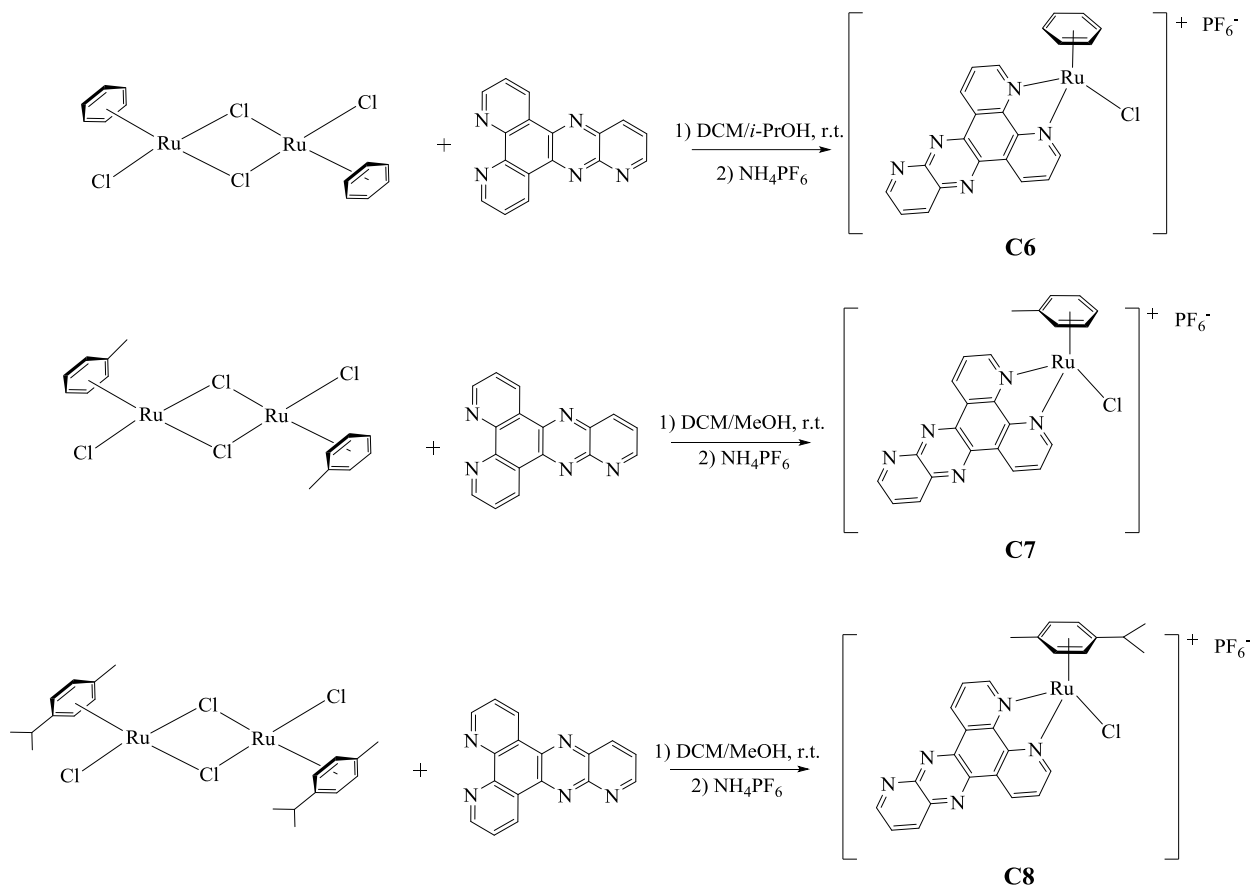
Shema 4. Sinteza rutenijumskih kompleksa **C1** i **C2**

Seriya arenjskih kompleksa sa poliaromatičnim ligandima 11,12-dimetildipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazinom (**L3**) i 2-(antracen-9-il)-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolinom (**L4**) sintetisana je korišćenjem benzenskog ili *p*-cimenskog dimera rutenijuma u smeši rastvarača MeOH/CH₂Cl₂. Nakon dodatka amonijum-heksafluorofosfata kompleksi su izdvojeni u obliku taloga (**Shema 5**).



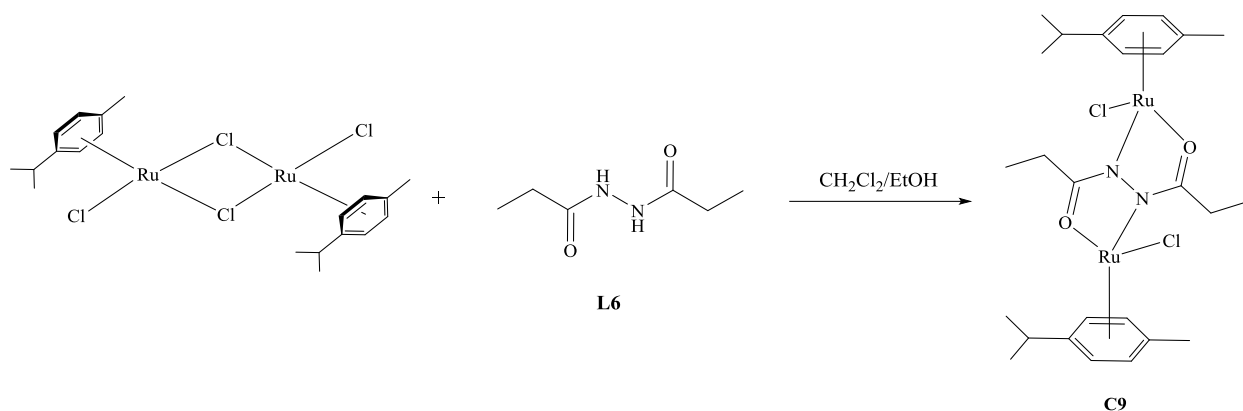
Shema 5. Sintetza arenjskih kompleksa **C3**, **C4** i **C5** sa poliaromatičnim ligandima **L3** i **L4**

Sinteza serije arenских kompleksa rutenijuma sa ligandom pirido[2',3':5,6]pirazino[2,3-f][1,10]fenantrolinom (ppf, **L5**), izvršena je prema modifikovanim procedurama koristeći poliaromatični ligand i binuklearni kompleks, pri čemu dolazi do građenja mononuklearnog adukta sa bidentatno koordinovanim ligandom (**Shema 6**).



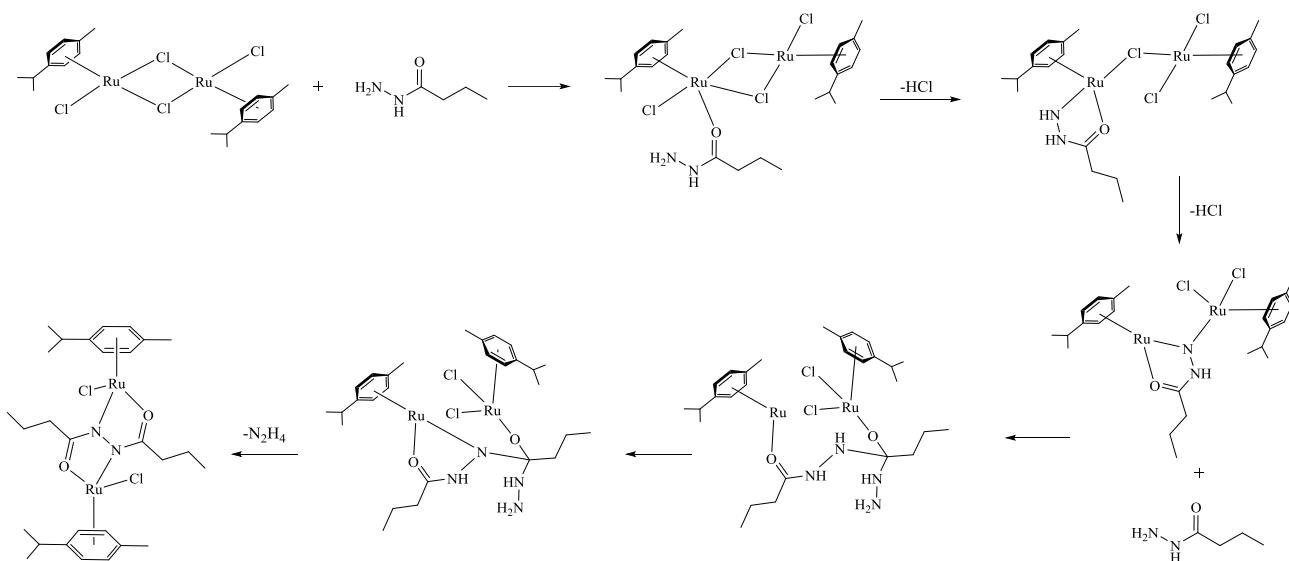
Shema 6. Sinteza kompleksa rutenijuma **C6**, **C7** i **C8** sa poliaromatičnim piridinskim ligandom **L5**

Binuklearni kompleks **C9** (**Shema 7**.) je dobijen reakcijom polaznog *p*-cimenskog kompleksa rutenijuma sa ligandom *N*¹,*N*²-dipropionilhidrazina (**L6**).

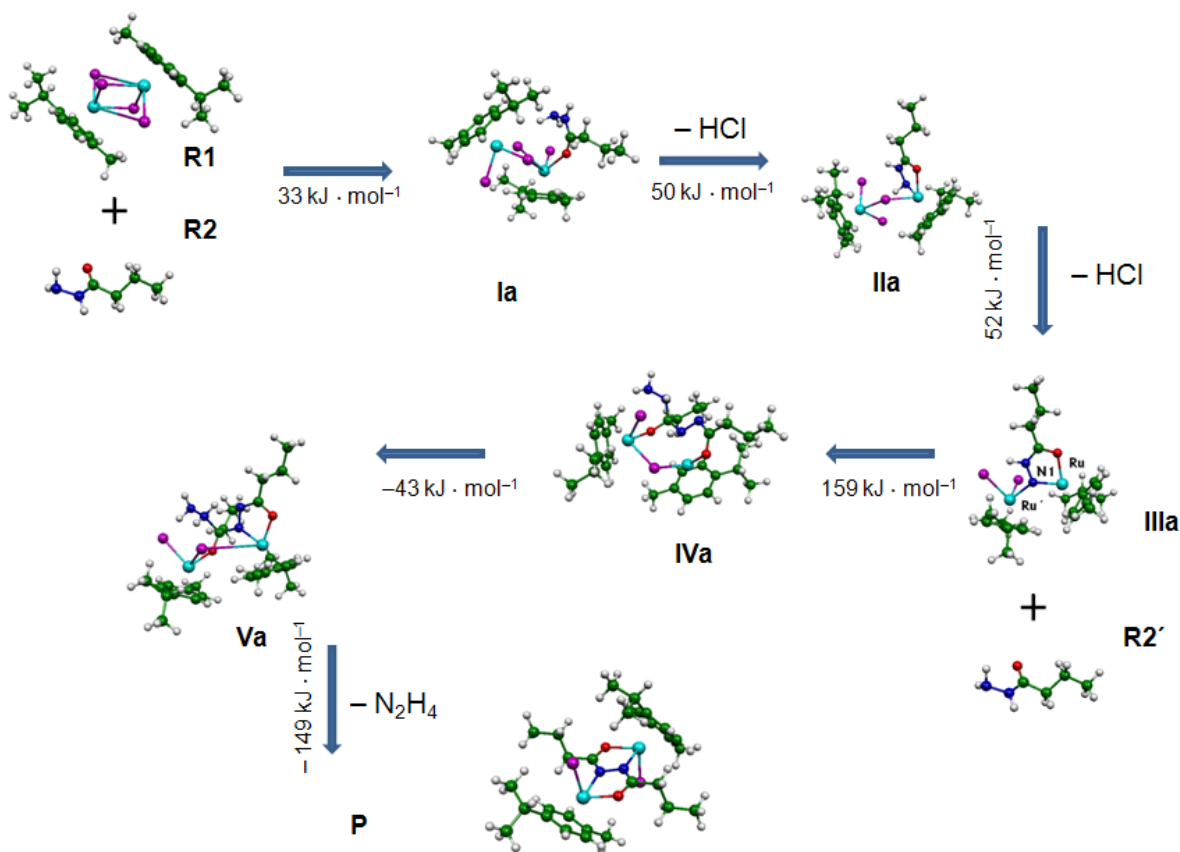


Shema 7. Sinteza binuklearnog kompleksa **C9**

Za sintezu binuklearnog kompleksa sa N^1, N^2 -dibutanoilhidrazinom, jedinjenje se može dobiti mešanjem polaznog *p*-cimenskog kompleksa rutenijuma i butanoilhidrazida, pri čemu na atomu rutenijuma dolazi do kondenzacija dva molekula hidrazida i dobija tetradentatni ligand koji povezuje dva atoma rutenijuma (**Shema 8.**). U ovoj reakciji, jon rutenijuma ujedno ima ulogu katalizatora (**Slika 15.**). U slučaju propanskog derivata, ova transformacija na atomu rutenijuma nije moguća, pa je potrebna prethodna sinteza željenog liganda (**Shema 3.**).⁹³



Shema 8. Strukturno-skeletni prikaz sinteze binuklearnog kompleksa sa N^1, N^2 -dibutanoilhidrazinom



Slika 15. Predloženi mehanizam dobijanja binuklearnog kompleksa sa butanoilhidrazidom uz pomoć katalitičke aktivnosti rutenijuma (slika uzeta iz reference: S. Nikolić, I. Ćirić, A. Roller, V. Lukeš, V. B. Arion, S. Grgurić-Šipka, *New J.Chem.*, **41** (2017) 6857-6865.)

4.3. Spektroskopska karakterizacija sintetisanih kompleksa rutenijuma

Sintetisani kompleksi analizirani su metodama za određivanje strukture hemijskih jedinjenja: masenom spektrometrijom, IR spektroskopijom i NMR spektroskopijom, dok je elementalni sastav kompleksa potvrđen elementalnom analizom. Struktura binuklearnog kompleksa **C9** rešena je uz pomoć X-zraka.

4.3.1. Masena spektrometrija

Masenom spektrometrijom potvrđena je struktura kompleksnih jedinjenja na osnovu signala karakterističnih fragmentacionih jona. . Spektri su snimani u pozitivnom režimu rada masenog spektrometra, tako da kod svih masenih spektara kompleksa izostaje odgovarajući anjon iz spoljašnje sfere kompleksa (Cl^- , BPh_4^- ili PF_6^-) (**Tabela 1.**).

Tabela 1. Detektovani fragmentacioni joni kompleksa na masenom analizatoru

Joni kompleksog katjona i fragmentacioni joni	Detektovana masa
C1 -HCl-[Cl]	472,02
C2 -2HCl-[BPh ₄]	382,09
C3 -[PF ₆]	581,20
C4 -[PF ₆]	525,10
C5 -[PF ₆]	667,20
C6 -[PF ₆]	498,00
C7 -[PF ₆]	512,02
C8 -[PF ₆]	554,06
C9 -Cl	649,21

Kod kompleksa **C1** u masenom spektru, uočen je odlazak jednog molekula HCl-a iz unutrašnje sfere kompleksnog katjona. Slična fragmentacija primećena je i kod kompleksa **C2**, ali je u ovom slučaju došlo je do eliminacije dva molekula HCl-a. Razlog za odlazak dva molekula iz unutrašnje sfere kompleksnog jona **C2**, za razliku od odlaska jednog molekula u slučaju kompleksa **C1**, je najverovatnije monodentatno vezivanje liganda **L2**, čime u koordinacionoj sferi kompleksa ostaju dva hloridna anjona podložna eliminaciji. Kompleksi **C3**-**C8** pokazuju stabilne katjonske jone, u kojima ne dolazi do eliminacije liganada vezanih za

rutenijum. Kompleks **C9** je izolovan kao neutralan kompleks i maseni spaktar je pokazao samo odlazak hloridnog anjona iz unutrašnje sfere kompleksa.

4.3.2. Infracrvena spektroskopija

Infracrveni spektri sintetisanih kompleksa **C1-C9** su upoređivani sa infracrvenim spektrima odgovarajućih liganada. Poređenjem je moguće videti da se položaj apsorpcionih traka svih funkcionalnih grupa koje učestvuju u koordinaciji za atom rutenijuma, razlikuju od apsorpcionih traka slobodnih liganada. Ovo je posledica promene elektronske gustine oko tih atoma, što je posledica koordinacije ovih liganada za atom rutenijuma.

Tako na primer, u infracrvenom spektru liganda **L1** mogu se videti dve trake od NH_2 vibracija istezanja na 3321 i 3282 i $\text{C}=\text{S}$ vibraciona traka na 1634 cm^{-1} . U spektru odgovarajućeg kompleksa **C1** dve trake od NH_2 grupe su se spojile u jednu na 3278 cm^{-1} , a $\text{C}=\text{S}$ vibraciona traka je pomerena na 1624 cm^{-1} .

U slučaju liganda **L2** javlja se jaka piridinska apsorpciona traka na 1628 cm^{-1} koja potiče od skeletnih vibracija $\text{C}=\text{N}$ vibracije. U slučaju odgovarajućeg kompleksa **C2**, ova traka je pomerena na 1616 cm^{-1} , što ukazuje na koordinaciju liganda preko piridinskog azota. Značajne promene mogu se uočiti i u aromatičnim $\text{C}-\text{H}$ vibracionim trakama, koje se sa dve trake kod liganda na 3043 i 3114 cm^{-1} pomeraju i spajaju u jednu na 3055 cm^{-1} kod kompleksa.

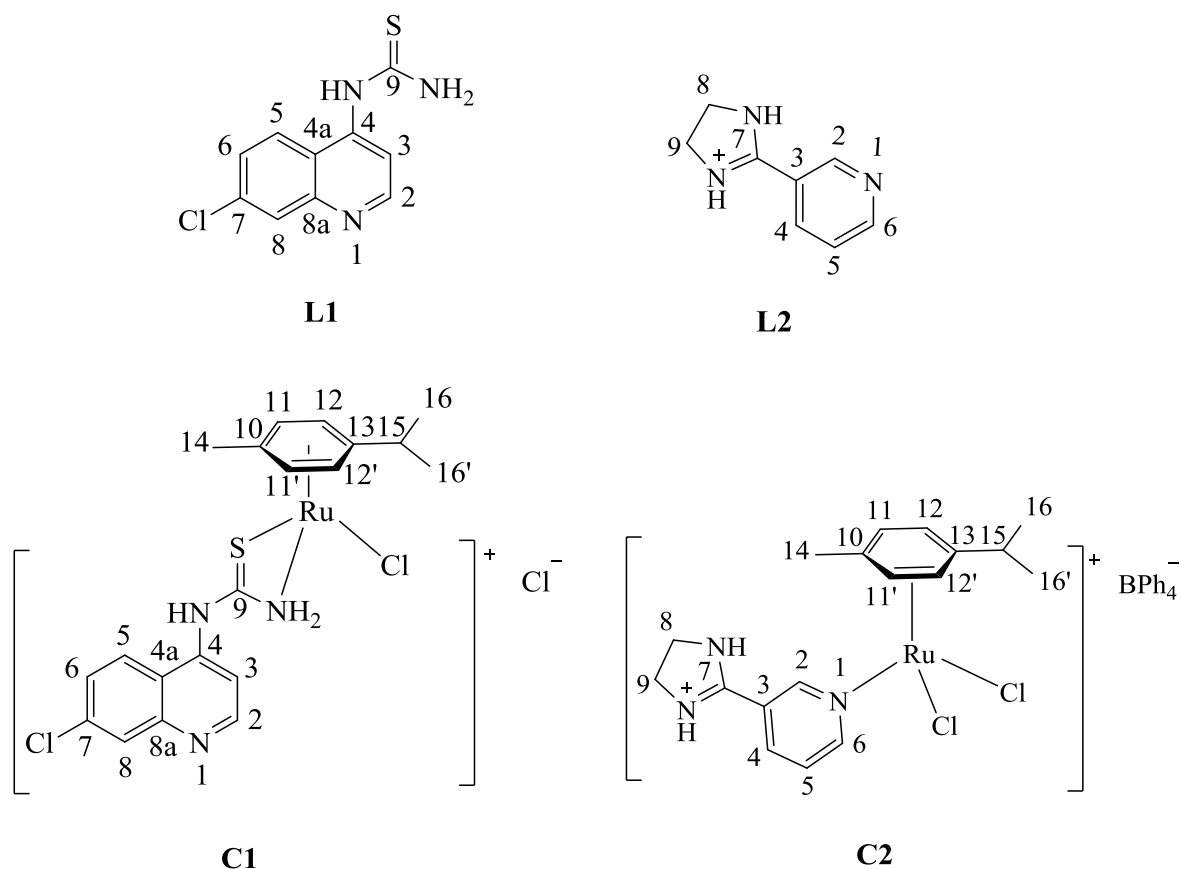
Kod infracrvenih spektara liganada **L3**, **L4** i **L5**, koji su planaranog aromatičnog karaktera, javljaju se jake trake u oblasti od 1500-1400 cm^{-1} koje potiču od piridinskog prstena i druga traka na oko 737 cm^{-1} . U slučaju odgovarajućih kompleksa **C3-C5** dolazi do vidnog smanjivanja intenziteta traka u oblasti od 1500-1400 cm^{-1} , dok se trake sa 737 cm^{-1} pomeraju na 840 cm^{-1} što može biti posledica koordinacije aromatičnog liganda za jon metala pri čemu se menja elektronska gustina u jedinjenju aromata. Slične promene se mogu uočiti u spektrima liganda **L5**, odnosno u odgovarajućim kompleksima **C6-C8**.

U spektru liganda **L6** dolazi do najuočljivijeg pomeranja trake koja potiče od karbonilne grupe, preko koje je koordinovan ligand za jon rutenijuma. Traka sa 1598 cm^{-1} se deli na dve

intenzivne trake na 1639 i 1539 cm^{-1} . Takođe, široka traka koja potiče od N-H vibracija na preko 3100 cm^{-1} izostaje u infracrvenom spektru kompleksa **C9**, jer su vodonični protoni izgubljeni tokom koordinacije za metalni jon.

4.3.3. NMR spektroskopija

U NMR spektrima sintetisanih kompleksa takođe se mogu uočiti razlike u hemijskim pomeranjima signala u odnosu na NMR spektre slobodnih liganada, kao posledica koordinacije. Hemijska pomeranja u spektrima kompleksa su na vrednostima očekivanim za ovu vrstu kompleksa i vrednosti integrala signala pokazuju odnos liganada i arenskog dela 1:1.



Slika 16. Struktura i numeracija atoma kod liganada **L1** i **L2** i kompleksa **C1** i **C2**

U ^1H i ^{13}C NMR spektrima kompleksa **C1** i **C2** vidi se značajno pomeranje signala aromatičnog dela liganada **L1** i **L2** u odnosu na slobodne ligande (**Tabela 2**). Takođe, došlo je i

do premene hemijskog pomeranja ugljenika koji je u sklopu tioureatnog dela liganda **L1**. U ^{13}C NMR spektru slobodnog liganda ovaj ugljenik se nalazi na 182,21 ppm, a u kompleksu **C1** na 182,03 ppm. Cimenski deo molekula u kompleksima **C1** i **C2** ima hemijska pomeranja na oko 5,75-5,85 ppm (aromatičan deo), metil grupa na oko 2,10 ppm, a iz *i*-Pr grupe CH i dve CH_3 -grupe na oko 2,90 ppm i 1,20 ppm, redom, što su očekivane vrednosti hemijskih pomeranja za organorutenijumske komplekse.

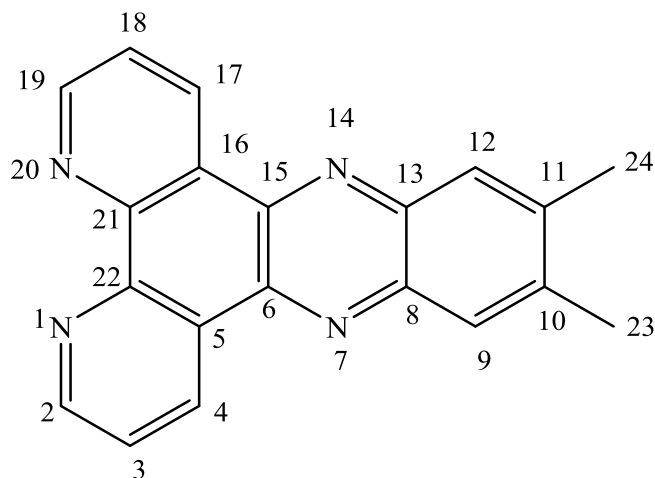
Tabela 2. Hemijska pomeranja u ^1H NMR spektrima signala protona liganada **L1** i **L2** u odnosu na odgovarajuće signale kompleksa **C1** i **C2** (odabrani signali).

L1		C1		L2		C2	
atom	δ (ppm)	atom	δ (ppm)	atom	δ (ppm)	atom	δ (ppm)
S=C-NH ₂	8,33	S=C-NH ₂	8,16	H2	9,39	H2	9,09
H2	8,83	H2	8,88	H4	8,74	H4	8,29
H3	8,01	H3	8,37	H5	7,81	H5	7,68
H5	8,11	H5	8,32	H6	8,95	H6	8,90
H6	7,68	H6	7,76	H8,9	4,01	H8,9	4,03
H8	8,05	H8	8,10	NH	11,46	NH	10,70

Za dodatnu potvrdu koordinacije i određivanja načina vezivanja liganada, snimljeni su ^1H - ^{15}N HSQC i ^1H - ^{15}N HMBC NMR spektri liganada **L1**, **L2** i kompleksa **C1**, **C2**.

U ^1H - ^{15}N HSQC spektru liganada **L1** vide se dve korelacije N/H = 131,02/9,22 ppm i 131,02/9,05 ppm, koje potiču od sprežanja atoma azota i dva atoma vodonika iz tioureatnog dela molekula (S=C-NH₂). Odgovarajući signali u ^1H - ^{15}N HSQC spektru kompleksa **C1** nalaze se na N/H = 122,34/8,67 ppm i 122,34/8,57–8,47 ppm vrednostima hemijskih pomeranja. Razlika hemijskog pomeranja ^{15}N za više od 8 ppm ukazuje da u koordinaciji liganada učestvuje i azot S=C-NH₂-grupe. U ^1H - ^{15}N HMBC NMR spektru liganada **L2** vide se korelacije N/H = 316,7/9,08

ppm i 316,7/8,90 ppm koje potiču od prostornih interakcija piridinskog azota i atoma vodonika H2 i H6 iz piridinskog prstena i slabije korelacije na 115,33/4,0 ppm od interakcija imidazolskog azota sa atomima vodonika H8 i H9 na tom prstenu. U ^1H - ^{15}N HMBC NMR spektru kompleksa **C2**, može se uočljiti pomeranje piridinskog azota na 317,65 ppm, što takođe može biti objašnjeno kao posledica koordinacije. Na osnovu analize NMR spektara liganada **L1**, **L2** i kompleksa **C1** i **C2** predložen je način koordinacije kako je prikazano na **Slici 16**.



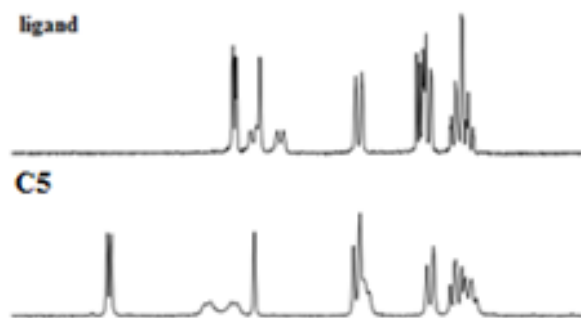
Slika 17. Struktura i numeracija liganda **L3**

U ^1H NMR spektru kompleksa **C3** i **C4** koji sadrže ligand **L3** (**Slika 17.**), mogu se uočiti značajne promene hemijskih pomeranja signala liganda u poređenju sa ^1H NMR spektrom slobodnog liganda (**Tabela 3**). Može se uočiti da pomeranja signala idu i do 0,50 ppm, kao posledica promene elektronske gustine u ligandu usled koordinacije.

Tabela 3. Hemijska pomeranja u ^1H NMR spektru liganda **L3** i njegovih kompleksa **C3** i **C4** (odabrani signali)

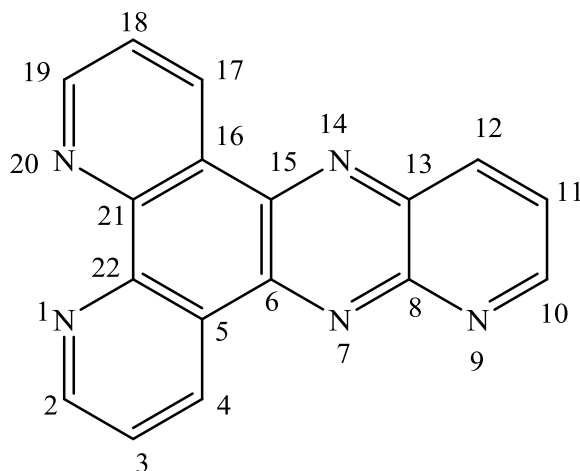
	L3 (Me ₂ dppz)	C3	C4
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
aromatični deo liganda	9,53	10,00	10,08
	9,23	9,55	9,54
	7,97	8,28	8,26
	7,75	8,10	8,09
metil grupe	2,55	2,59	2,58

Poredeći ^1H NMR spektre liganda **L4** i kompleksa **C5**. Mogu se primetiti značajne razlike u hemijskim pomeranjima atoma vodonika liganda. Na **Slici 18.** vidi se kolika je promena hemijskog pomeranja protona sa liganda **L4** od 9,09 ppm na 9,92 ppm što pokazuje koliko je smanjena elektronska gustina oko tog protona u kompleksu. I ostali vodonikovi atomi na aromatičnom jezgru imaju promenu u hemijskom pomeranju, ali ne toliko značajno koliko proton H2, najbliži mestu koordinacije za jon metala.



Slika 18. Izgled spektra liganda **L4** upoređen sa spektrom odgovarajućeg kompleksa **C5**

I u kompleksima **C6**, **C7** i **C8** dolazi do promene hemijskih pomeranja u odnosu na ligand **L5** sumirano u **Tabeli 4.**



Slika 19. Struktura i numeracija liganda **L5**

U ^1H NMR spektrima može se uočiti je da količina promene hemijskog pomeranja liganda **L5** u kompleksima zavisi i od arenskog liganda koji je vezan za rutenijumov jon. U kompleksima **C6**, **C7** i **C8** se redom, nalaze arenska jezgra: benzen, toluen i *p*-cimen. Kako u tom nizu raste voluminozni karakter, tako se povećava i uticaj na hemijska pomeranja na ligandu. U kompleksu **C7** i ligandu je primetno poklapanje pojedinih signala sa aromatičnih prstenova, dok kod kompleksa **C6** i **C8** dolazi do jasnog razdvajanja signala kao posledica koordinacije. Do najvećeg odstupanja kod kompleksa **C8** u odnosu na slobodan ligand, dolazi zbog uticaja *p*-cimen, zbog njegove najveće voluminoznosti.

Tabela 4. Hemijska pomeranja u ^1H NMR spektru liganda **L5** i njegovih kompleksa **C6**, **C7** i **C8** (odabrani signali)

	L5 (ppf)	C6	C7	C8
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
aromatični deo liganda	9,81	10,17	10,07	10,05
	9,64	9,70	9,74	9,75
	9,40	9,64	9,52	9,70
	9,33	9,50	8,94	9,49
	8,76	8,89	8,34	8,90
	7,96 - 7,80	8,31 8,15	8,18	8,34 8,15

Kompleksi **C3**, **C5** i **C8** kao arenski deo sadrže *p*-cimen, čiji se aromatični protoni u vidu dva dubleta nalaze na oko 6,20 ppm i 6,40 ppm u sva tri kompleksa. Niža vrednost hemijskog pomeranja od očekivanog signala a,b-kvarteta na oko 7,1 ppm, posledica je razmene elektronske gustine sa jonom rutenijuma, koji je ujedno i interakcijom sa π -elektronima stabilizovan u oksidacionom stanju +2. Metil-grupe liganda nalaze se na oko na oko 2,20 ppm, a CH i dve CH₃-grupe iz izo-propilidenske grupe nalaze se na oko 2,75 ppm i 1,05 ppm, redom, u sva tri kompleksna jedinjenja.

Kompleksi **C4** i **C6** sadrže benzen kao arenski deo kompleksa i signali protona iz benzena nalaze na hemijskim pomeranjima oko 6,40 ppm. To je takođe dosta niže od pomeranja od 7,37 ppm kod nekoordinovanog benzena i posledica je razmene elektronske gustine sa jonom rutenijuma. Kompleks **C7** sadrži toluen kao arenski deo molekula. Njegovi protoni se javljaju kao triplet, dublet i triplet na pomeranjima 6,50 ppm, 6,20 ppm i 5,90 ppm, redom. U slobodnom molekulu toluena ovi signali se javljaju na oko 7,05 ppm. Metil-grupa toluena u kompleksu ima hemijsko pomeranje 2,30 ppm. Vrednosti hemijskih pomeranja arenskih delova kompleksa imaju očekivane vrednosti za ova jedinjenja, pa se može reci da nije došlo do narušavanja njihove stabilnosti prilikom koordinacije za centralni atom rutenijuma u toku snimanja spektara u DMSO-u kao rastvaraču korišćenom u ove svrhe. Ova pojava je moguća, jer sumpor iz DMSO-a ima veliki afinitet prema rutenijumu, što može narušiti primarnu strukturu kompleksa.

Zbog koordinacije arenskog liganda za jon rutenijuma +2, dolazi do promena hemijskog pomeranja i u ¹³C NMR spektrima. Tako na primer, benzenski ligand kada je slobodan daje signal na oko 125 ppm, u kompleksima se javlja na 86 ppm. Slična promena hemijskog pomeranja vidi se i kod toluenskog, odnosno *p*-cimenskog kompleksa. Kod slobodnog *p*-cimena signali atoma ugljenika iz prstena javljaju se na oko 145 ppm, 135 ppm, 128 ppm i 126 ppm, dok su kod kompleksa **C3** i **C5** pomereni ka nizim hemijskim pomeranjima na oko 105 ppm, 103 ppm, 86 ppm i 84 ppm, redom. Značajnu promenu hemijskog pomeranja pokazuje karbonilni ugljenik u kompleksu **C9**, što je posledica učestvovanja u koordinaciji liganda **L6**. U spektru slobodnog liganda ovaj ugljenik ima signal na 171,89 ppm, a u kompleksu na 174,38 ppm. Očekivano, ostali atomi ugljenika liganda **L6** nemaju značajniju promenu hemijskog pomeranja kada su slobodni i u kompleksu **C9**. Manja promena od oko 1 ppm-a, može se objasniti tako da

ovi atomi ugljenika ne učestvuju u koordinaciji, već su samo vezani za heteroatome koji su donori elektrona rutenijumu.

4.3.4. Električna provodljivost sintetisanih kompleksa C1 i C2

U cilju određivanja odnosa kompleksnog katjona i anjona u spoljnoj sferi, kao dodatne potvrde strukture kompleksa, merena je provodljivost rastvora sintetisanih kompleksa u DMSO-u. Izmerene vrednosti provodljivosti od 16,21 i 20,62 $\Omega^{-1}\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$ rastvora kompleksa C1 i C2 koncentracije 1 mM u DMSO-u, ukazuju da su kompleksi tipa ML^+A^- , odnosno da rastvaranjem kompleksi disosuju na jedan katjon i jedan anjon, i u skladu su sa podacima iz literature.¹¹⁴ Nakon 24 h stajanja rastvora, provodljivost se nije promenila, što dodatno potvrđuje stabilnost kompleksa u ovom rastvaraču (videti dalje održavanje stabilnosti kompleksa, odeljak 4.3.5.).

4.3.5. Stabilnost kompleksa u DMSO-u

Poznato je da jedinjenja koja sadrže sumpor, među kojima i DMSO, imaju tendenciju da se koordinuju za rutenijum. Ovo može da dovede do narušavanja strukture ispitivanih rutenijumskih kompleksa, što samim time dovodi i do promene svih ostalih fizičkih, hemijskih i konačno bioloških karakteristika kompleksa koje se dalje ispituju. Poznata je činjenica da su kompleksi u celiji aktivirani zamenom hloridnog ili nekog drugog lakoodlazećeg liganda vodom, pa tako zamena molekulom DMSO-a može sprečiti ovaj proces i deaktivirati ispitivan kompleks. DMSO je korišćen kao rastvarač za ispitivanje biološke aktivnosti sintetisanih kompleksa, pa je neophodno bilo ispitati stabilnost kompleksnih jedinjenja u ovom rastvaraču. Svaki od liganada koji čine kompleks, pa čak i arenski deo koji stabilizuje rutenijum u oksidacionom stanju +2, može se zameniti ovim molekulom. Ova činjenica je potvrđena i NMR spektroskopijom, gde se mogu videti pomeranja signala sa proteklom vremenom.¹¹⁵ Koji od liganada će DMSO izmeniti zavisi od afiniteta vezivanja liganda za rutenijum u odnosu na DMSO. U najvećem broju slučajeva zamena liganda se dešava kod kompleksa $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{RuCl}_2\text{L}]$ tipa, gde je L = ligand koordinovan preko N-atoma. Ako dolazi do jako brze zamene liganda molekulom DMSO-a, a to znači do formiranja $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{RuCl}_2\text{DMSO}]$ kompleksa, koji se onda u rastvoru nalazi u

odnosu 1:1 sa slobodnim ligandom L. Usled toga, se ne može tačno zaključiti da li biološka aktivnost potiče od samog liganda, svojstva rastvora u celini ili novo-formiranog kompleksa. Iz ovih razloga, grupa profesora Gasser-a je uporedo ispitala biološke aktivnosti tri različite smeše, i to: a) sintetisanog kompleksa; b) samog liganda i c) smeše kompleksa $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{RuCl}_2\text{DMSO}]$ sa odgovarajućim ligandom u odnosu 1:1, u rastvorima DMSO-a. Rezultati su pokazali slične vrednosti aktivnosti u sva tri slučaja, dok kontrolni uzorak, sam kompleks $[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{RuCl}_2\text{DMSO}]$ nije pokazao značajnu aktivnost.¹¹⁵ Iz ovih razloga, svim kompleksima koji su kasnije ispitani na ćelijskim linijama prethodila su ispitivanja stabilnosti u rastvoru DMSO. U slučaju kompleksa sintetisanih u ovom radu, čija biološka aktivnost je određivana, stabilnost je praćena NMR spektroskopijom u rastvoru DMSO- d_6 . Spektri su snimani odmah nakon rastvaranja, a zatim posle 1 h, 3 h, 6 h, 24 h i 48 h. U slučaju svih kompleksa koji su ispitivani, na osnovu spektara, zaključeno je da su kompleksi stabilni u rastvoru DMSO-a nakon 48 h, jer nije došlo do promena hemijskih pomeranja signala. Ovo je omogućilo njihovo dalje korišćenje za biološka ispitivanja.

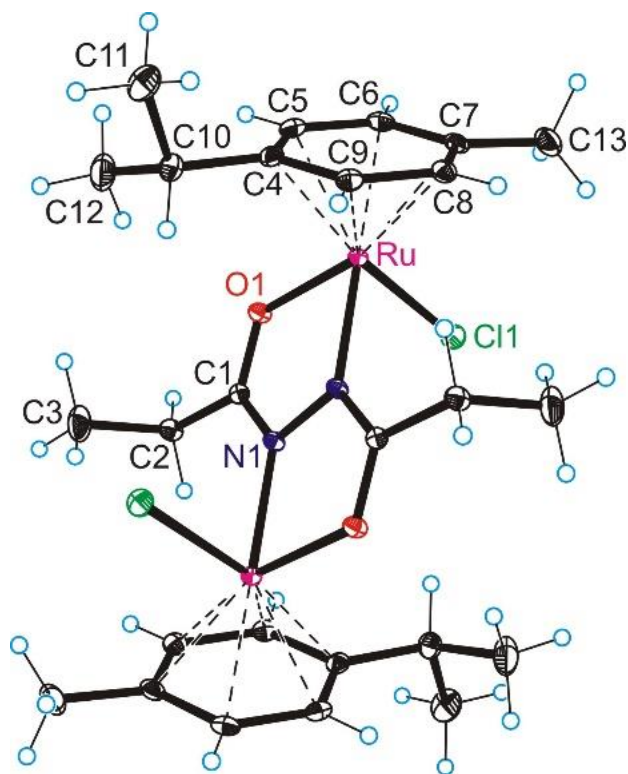
4.3.6. Rendgenska strukturna analiza

Kompleks **C9** dobijen je u pogodnom obliku za kristalografsku analizu. Monokristal je dobijen sporim isparavanjem matičnog rastvora. Analiza X-zracima je pokazala da kompleks **C9** pokazuje uobičajenu geometriju „klavirske stolice”. Kompleks se sastoji od dva atoma rutenijuma povezanih sa jednim tetradentatnim molekulom N^1, N^2 -dipropionilhidrazina. Po jedan hloridni anjon vezan je za svaki atom rutenijuma, a površinski deo „klavirske stolice” predstavlja po jedan molekul *p*-cimena vezan za rutenijum. Kristalni podaci o kompleksu **C9** se nalaze u **Tabeli 5**, a geometrija kompleksa je prikazana na **Slici 20**.

Tabela 5. Kristalni podaci za **C9·2EtOH**

jedinjenje	C9·2EtOH
empirijska formula	C ₃₀ H ₅₀ Cl ₂ N ₂ O ₄ Ru ₂
fw	775,76
space group	<i>P</i> -1
α , Å	9,0536(4)
b , Å	9,0906(4)
c , Å	9,9218(4)
α , °	88,9010(11)
β , °	88,7726(11)
γ , °	85,6563(11)
V [Å ³]	813,93(6)
Z	1
λ [Å]	0,71073
ρ_{calcd} , g cm ⁻³	1,583
Veličina kristala, mm	0,25 × 0,21 × 0,11
T [K]	100(2)
μ , mm ⁻¹	1,128
R_1^a	0,0148
wR_2^b	0,0386
GOF ^c	1,048

^a $R_1 = \Sigma ||F_o| - |F_c|| / \Sigma |F_o|$. ^b $wR_2 = \{\Sigma [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \Sigma [w(F_o^2)^2]\}^{1/2}$. ^c $\text{GOF} = \{\Sigma [w(F_o^2 - F_c^2)^2] / (n - p)\}^{1/2}$, gde je n broj refleksija, p je ukupan broj prerađenih parametara.



Slika 20. Kristalna struktura kompleksa **C9**

Dužina veze između dva atoma azota odgovara tipičnoj dužini ove veze, odnosno u ovom slučaju iznosi 1,434 Å. Veza između karbonilnog ugljenika i kiseonika je za oko 0,04 Å izduženija, zbog delokalizacije elektrona sa kiseonika na rutenijum i iznosi 1,293 Å. Oko rutenijumovog atoma, veze su uobičajenih dužina za ovu vrstu kompleksa.¹¹⁶ Veza rutenijum-kiseonik iznosi 2,053 Å, rutenijum-azot 2,099 Å, a rutenijum-hlor 2,429 Å. Dužine veza između rutenijuma i ugljenikovih atoma koji su sastavni deo *p*-cimenskog prstena iznose: 2,184, 2,167, 2,201, 2,216, 2,202, 2,146 Å. Ugao koji prave atom kiseonika, rutenijuma i azota iznosi 76,03 °. Rastojanje između dva atoma rutenijuma u kompleksu **C9** iznosi 4,949 Å, što se slaže sa kompleksima slične strukture.¹¹⁷

4.3.7. Ispitivanje citotoksične aktivnosti *in vitro*

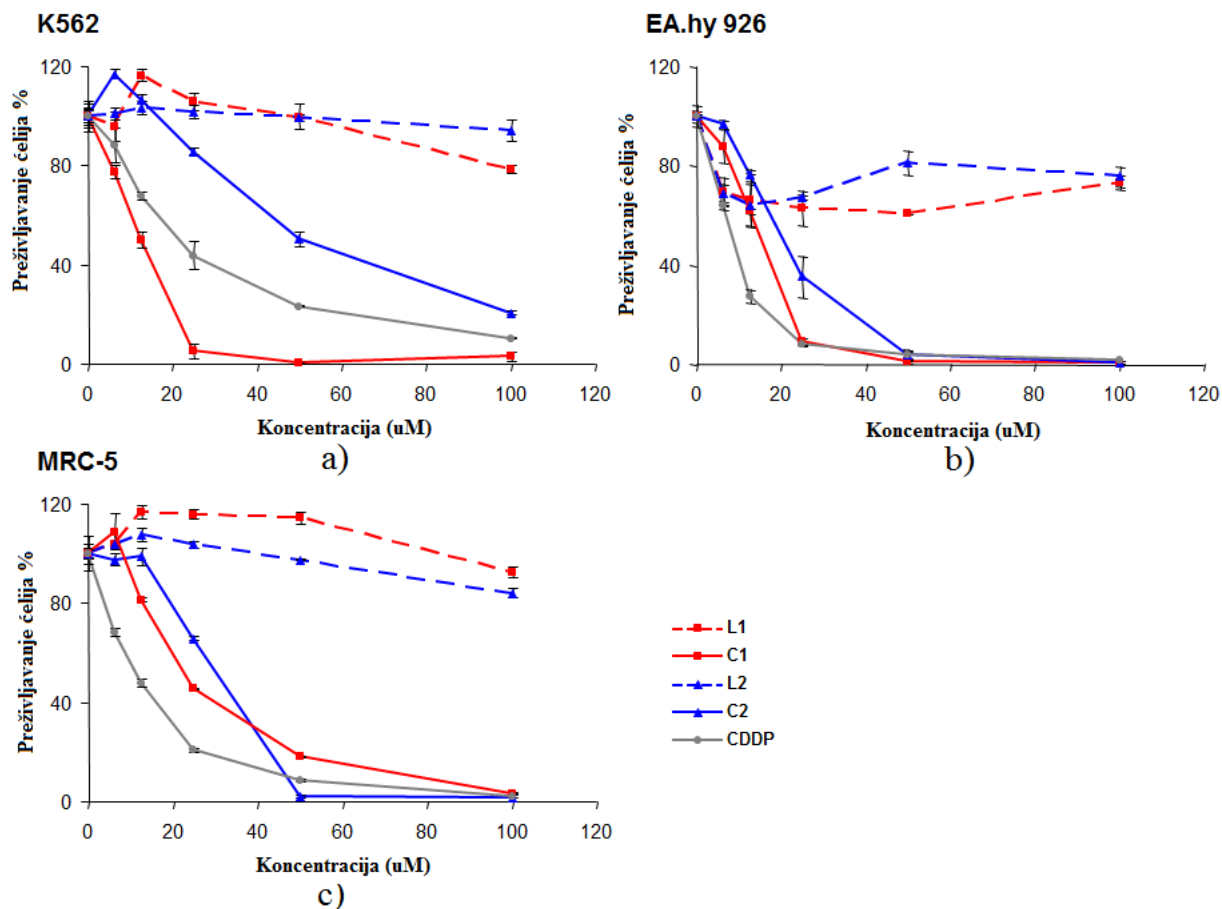
Citotoksične aktivnosti kompleksa rutenijuma(II) **C1**, **C2**, odgovarajućih liganda **L1**, **L2** × **HCl** i cis-diamindihloridoplatine(II) (cisplatin, **CDDP**) kao referentnog jedinjenja, praćene su tokom 72 sata kontinuiranog dejstva pomoću kolorimetrijskog MTT testa. Studija je izvedena na

pet humanih neoplastičnih ćelijskih linija (HeLa, K562, A549, MDA-MB-231 i EA.hi 926) i jednoj ćelijskoj liniji fibroplastične humane fetalne ćelije pluća (MRC-5), koja je korišćena kao nekancerogeni model za procenu toksičnosti *in vitro*. Dobijeni rezultati predstavljeni kao IC_{50} vrednosti (**Tabela 6.**) pokazuju da su testirani kompleksi pokazali citotoksičnost prema svim ispitivanim ćelijskim linijama, sa IC_{50} vrednostima u opsegu od 11,03 – 56,45 μM . Ligandi **L1** i **L2** \times **HCl** nisu pokazali citotoksičnu aktivnost (IC_{50}) do 100 μM i mogu se smatrati neaktivnim na testiranim ćelijskim linijama. Rezultati jasno pokazuju značajan doprinos koordinacije liganda **L1** i **L2** \times **HCl** na citotoksičnu aktivnost testiranih kompleksa. Kompleks **C1** pokazuje bolju citotoksičnost u poređenju sa **C2**, sa izuzetkom prema HeLa ćelijama. Prema toj ćelijskoj liniji **C2** je približno dva puta aktivniji od **C1**. Najniže IC_{50} vrednosti (μM), za **C1** su primećene u humanim ćelijama hronične mijeloidne leukemije (K562) i humanim transformisanim endotelijalnim ćelijama (EA.hi 926): $11,03 \pm 1,39$ i $13,8 \pm 2,51$ respektivno, što su približne IC_{50} vrednosti **CDDP** ($10,86 \pm 0,55$ i $7,79 \pm 1,2$ respektivno). MTT analiza na MRC-5 ćelijama otkrila je smanjenu toksičnost i **C1** i **C2** u odnosu na **CDDP**. Naročito **C1** je pokazao približno 3 puta manju citotoksičnost u ćelijama MRC-5, nego u tumorskim K562 i EA.hi 926 ćelijama, pa se može pretpostaviti njegov citoselektivni potencijal prema tumorskim ćelijama. Poređenje strukturnih aktivnosti u ovoj studiji jasno je pokazalo da je veća citotoksičnost i citoselektivnost prema tumorskim ćelijama kompleksa **C1** u odnosu na **C2** doprinos koordinovanog liganda **L1**.

Tabela 6. *In vitro* citotoksičnost jedinjenja **C1**, **C2**, **L1**, **L2×HCl** i **CDDP** na humanim ćelijskim linijama nakon 72 sata kontinualnog dejstva

Ćelijska linija ^a IC ₅₀ (μM)	Jedinjenje				
	C1	C2	L1	L2×HCl	CDDP
HeLa	56,45 ± 1,59	28,62 ± 1,72	>100 ^b	>100	7,59 ± 0,04
K562	11,03 ± 1,39	54,86 ± 6,6	>100	>100	10,86 ± 0,55
MDA-MB-231	26,62 ± 7,24	47,66 ± 1,02	>100	>100	13,24 ± 0,4
EA.hy 926	13,8 ± 2,51	25,34 ± 3,57	>100	>100	7,79 ± 1,2
A549	31,49 ± 5,63	39,77 ± 0,79	>100	>100	17,2 ± 0,7
MRC-5	33,7 ± 5,47	42,54 ± 6,7	>100	>100	11,54 ± 0,5

^a IC₅₀ vrednosti (μM) predstavljene kao prosek ± standardna devijacija od tri ili više nezavisnih eksperimenata.



Slika 21. Preživljavanje ćelija nakon 72 h tretmana ligandima **L1** i **L2**×**HCl** i kompleksima **C1**, **C2** i **CDDP**.

Druga serija kompleksa (**C3**, **C4** i **C5**), sa interkalirajućim ligandima (**L3** i **L4**), ispitivana je na tri humane tumorske ćelijske linije adenokarcinoma: pluća (A549), dojke (MDA-MB-231) cerviksa (HeLa) i jednoj zdravoj ćelijskoj liniji fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5), kao *in vitro* modelu za praćenje toksičnog delovanja leka. Početni rutenijumski dimerni kompleksi i poznati hemioterapeutske agens cisplatin (**CDDP**) takođe su testirani kao referentna jedinjenja. Kao što je prikazano u **Tabeli 7**, utvrđeno je da sva početna jedinjenja (dimerni kompleksi i ligandi) nisu toksični na svim ćelijskim linijama koje su proučavane u ovom testu. Interesantno je slično ponašanje primećeno kod kompleksa **C4**. Ovo zapažanje je u saglasnosti sa prethodnim ispitivanjima koja opisuju citotoksičnost kompleksa rutenijuma koji sadrže različite ligande arenskog tipa.¹¹⁸ Suprotno njima kompleksi **C3** i **C5**, koji sadrže i *p*-cimenski ligand, su izuzetno toksični prema svim ispitivanim ćelijama. Ova dva kompleksa su takođe više citotoksična od

CDDP. Kompleks **C3**, kao najaktivniji, korišćen je za sva dalja ispitivanja na ćelijama. HeLa ćelije izabrane su za sva dalja biološka istraživanja, jer su pokazale najveću osetljivost na delovanje kompleksa **C3** ($IC_{50} = 0,6 \pm 0,5$).

Tabela 7. IC_{50} vrednosti kompleksa **C3**, **C4**, **C5**, liganada **L3** i **L4**, polaznih rutenijumskih dimera i **CDDP** na različitim ćelijskim linijama

Jedinjenja	IC_{50} vrednosti (μM)			
	A549	MDA-MB-231	HeLa	MRC-5
$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{Me}_2\text{dppz})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (C3)	$6,99 \pm 2,88$	$0,72 \pm 0,25$	$0,65 \pm 0,48$	$0,40 \pm 0,12$
$[(\eta^6\text{-benzen})\text{Ru}(\text{Me}_2\text{dppz})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (C4)	>100	>100	>100	>100
$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{Ru}(\text{aip})\text{Cl}]\text{PF}_6$ (C5)	$24,50 \pm 0,14$	$3,68 \pm 0,33$	$4,92 \pm 0,11$	$3,23 \pm 0,10$
$[(\eta^6\text{-benzen})\text{RuCl}_2]_2$	>100	>100	>100	>100
$[(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})\text{RuCl}_2]_2$	>100	>100	>100	>100
L3 (Me_2dppz)	>100	58,78	>100	>100
L4 (aip)	>100	>100	>100	>100
CDDP	$28,45 \pm 5,08$	$27,94 \pm 2,68$	$16,37 \pm 7,13$	$17,00 \pm 6,24$

Serijski kompleks sa ligandom **L5**, jedinjenja **C6**, **C7** i **C8** je testirana na panelu od tri humane tumorske ćelijske linije, i to: A549 (adenokarcinom pluća), A375 (melanom), LS174T (kolorektalni adenokarcinom) i na jednoj ne-tumorskoj humanoj ćelijskoj liniji, MRC-5 zajedno sa cisplatinom (**CDDP**) kao referentnim jedinjenjem. Rezultati su dobijeni nakon 72 h kontinuirane inkubacije sa testiranim supstancama i prikazani su u formi IC_{50} vrednosti (μM) u **Tabeli 8**. Kompleksi **C6**, **C7** i **C8** su ispoljili citotoksičnost prema svim ispitivanim ćelijskim

linijama, u opsegu od 15,78 – 95,92 μM , izuzev kompleksa **C6** koji nije ispoljio citotoksičnost prema LS174T ćelijama u ispitivanom opsegu koncentracija do 100 μM . Ligand je ispoljio izuzetno veću citotoksičnost u poređenju sa njegovim kompleksima i to uniformno (oko 6 μM) prema svim testiranim ćelijskim linijama. Ćelijske linije A549 i A375 su ispoljile osetljivost na dejstvo liganda koja je u nivou osetljivosti na cisplatinu, dok su LS174T i MRC-5 ćelije pokazale nešto veću osetljivost prema ligandu u odnosu na cisplatinu. Najosetljivije na dejstvo ispitivanih kompleksa su bile A549 ćelije adenokarcinoma pluća, gde su sva tri kompleksa ispoljila približno sličnu aktivnost, oko 40 μM . Kompleksi **C6**, **C7** i **C8** su ispoljili konzistentnu aktivnost u svim ispitivanim ćelijskim linijama, pri čemu se kompleks **C8** pokazao kao najaktivniji. Najnižu citotoksičnost **C8** je ispoljio prema ćelijama melanoma, A375, gde je sa 15,78 μM bio oko šest puta aktivniji od **C6** i **C7** i dva puta slabije aktivan od cisplatine. Dobijeni rezultati ukazuju da citotoksičnost ovih rutenijumskih kompleksa zavisi od tipa η^6 -arenskog liganda pridruženog rutenijumu, i s tim u vezi, pokazalo se da je rutenijumski kompleks sa *p*-cimenom znatno aktivniji od kompleksa sa benzenom ili toluenom, što je u skladu sa prethodnim rezultatima.¹¹⁹

Tabela 8. Citotoksičnosti ispitivanih kompleksa rutenijuma i njihovog liganda, u poređenju sa cisplatinom, nakon 72 h kontinuranog tretmana, dobijene MTT testom i iskazane u obliku IC_{50} vrednosti (μM).

Supstanca	A549	A375	LS174T	MRC-5
C6	45,8 ± 3,65	89,08 ± 2,46	>100	84,68 ± 1,11
C7	40,64 ± 2,8	95,92 ± 3,44	68,54 ± 1,78	81,54 ± 4,33
C8	36,13 ± 3,53	15,78 ± 2,7	65,84 ± 5,57	68,83 ± 2,95
L5	6,07 ± 0,92	6,61 ± 0,89	5,95 ± 0,92	6,57 ± 0,35
CDDP	6,06 ± 2,64	7,52 ± 0,93	15,59 ± 0,74	9,55 ± 2,29

IC_{50} vrednosti (μM) su prikazane kao srednja vrednost (\pm standardna devijacija) tri nezavisna eksperimenta. >100 podrazumeva da IC_{50} vrednost nije dobijena u ispitivanom opsegu koncentracija do 100 μM .

Na ćelijskoj liniji adenokarcinoma pluća (A549) najbolju aktivnost od svih ispitivanih kompleksa (**C1-C8**) pokazalo je jedinjenje **C3** (6,99 ± 2,88 μM). Kompleks sa istim ligandom **L3** i benzenom kao arenskim ligandom (**C4**) je pokazao najlošiju aktivnost (>100 μM) od svih

jedinjenja prema ovoj ćelijskoj liniji. Umerenu aktivnost od $31,49 \pm 5,63$ i $39,77 \pm 0,79$ μM , pokazali su **C1** i **C2**, redom. Bolja aktivnost **C1** u odnosu na **C2** je posledica veće planarnosti liganda **L1** koji je u sastavu **C1**. U nizu **C6** – **C8** u čiji sastav ulazi ligand **L5**, vidi se poboljšanje aktivnosti za oko 5 μM kako se menja arenski ligand od benzena, preko toluena, do *p*-cimena ($45,8 \pm 3,65$; $40,64 \pm 2,8$; $36,13 \pm 3,53$ μM , redom). Kompleks **C5** koji sadrži *p*-cimen i **L4** pokazao je umerenu aktivnost ($24,50 \pm 0,14$ μM). Ova pojava se može objasniti atropoizomerijom liganda **L4**, koji se sastoji iz dva poliaromatična dela. Aromatični delovi su spojeni prostom vezom koja omogućava rotaciju, stoga ovaj molekul nije planaran, što smanjuje njegovu pokretljivost kroz ćelijsku membranu i druge barijere na putu ka boljoj aktivnosti. Od liganada **L1** - **L5**, najbolju aktivnost na ćelijskoj liniji A549 pokazao je **L5** ($6,07 \pm 0,92$ μM), dok su svi ostali bili neaktivni, tj. aktivnost im je veća od 100 μM .

Poredeći aktivnost kompleksa prema tumorskoj ćelijskoj liniji A549 i na zdrave ćelijske linije MRC5, može se uvideti da najbolju selektivnost pokazuju kompleksi **C6** – **C8** jer su prema zdravim ćelijama približno dva puta manje aktivni ($84,68 \pm 1,11$; $81,54 \pm 4,33$ i $68,83 \pm 2,95$ μM , redom). Kompleksi **C1** i **C2** pokazuju slične vrednosti aktivnosti na zdravim ćelijama od $33,7 \pm 5,47$ i $42,54 \pm 6,7$ μM , redom, u odnosu na liniju A549. Za razliku od svih kompleksa, **C3** i **C5** pokazuju aktivnost na zdrave ćelije u znatno manjim koncentracijama u odnosu na adenokarcinom pluća, što je u ovom slučaju nepovoljnije.

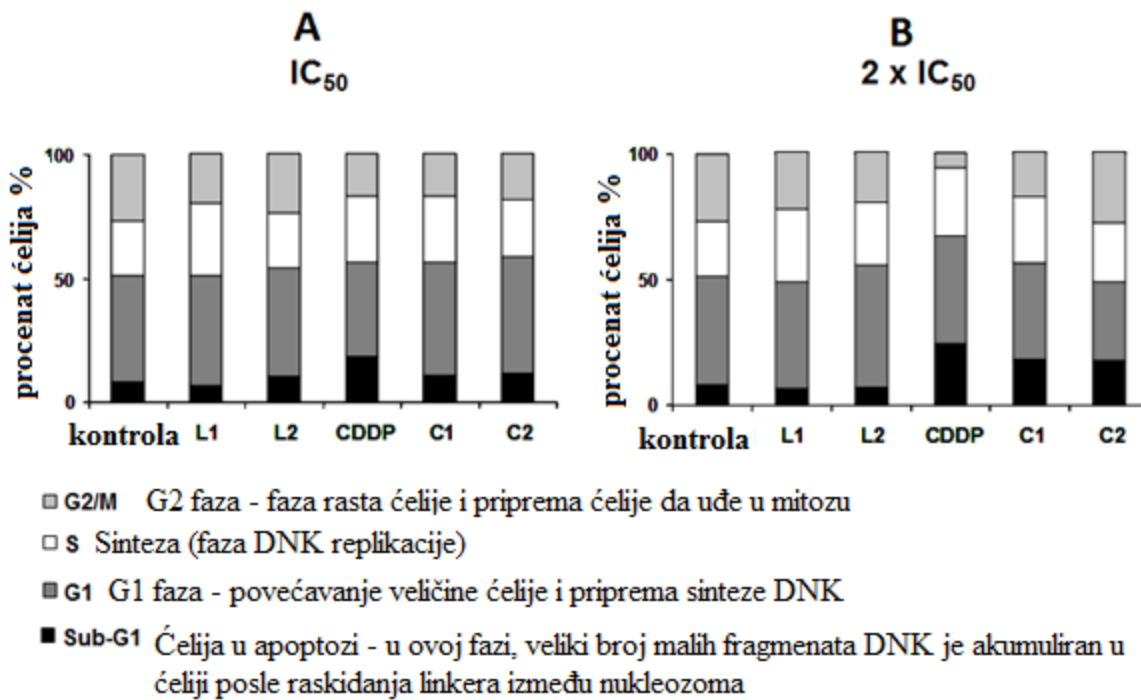
Prema HeLa ćelijskoj liniji tumora **C1** i **C2** pokazali su umerenu aktivnost ($56,45 \pm 1,59$ i $28,62 \pm 1,72$ μM , redom) dok su **C3** i **C5** pokazali aktivnost prema ovim ćelijama u jako niskim koncentracijama ($0,65 \pm 0,48$ i $4,92 \pm 0,11$ μM , redom), dok **C4** nije pokazao aktivnost do koncentracije od 100 μM .

Na osnovu svih dobijenih rezultata aktivnosti kompleksa prema ćelijama tumora, može se zaključiti da je aktivnost bolja ako je sastavni deo molekula ligand sa što većom planarnom aromatičnom površinom. Ovo daje molekulu lipofilnost potrebnu za lakši prodor kroz membranu ćelije, gde posle ispoljava svoju aktivnost. Takođe, od velikog je značaja i arenski deo kompleksa, koji isto većom lipofilnošću daje bolju aktivnost, pa su se *p*-cimenski kompleksi pokazali bolje od benzenskih i toluenskih. Ovi kompleksi biće odabrani kao vodeći kandidati za buduća detaljna ispitivanja.

4.3.8. Merenje distribucije faze ćelijskog ciklusa metodom protočne citometrije kompleksa C1 i C2

U cilju ispitivanja inhibicije rasta ćelija raka kroz supresiju ćelijskog ciklusa, analiza protočnom citometrijom raspodele faze ćelijskog ciklusa ispitana je u ćelijama K562, koristeći bojenje sa propidium-jodidom (PI). K562 ćelije su izabrane za dalju analizu zbog njihove visoke osetljivosti na delovanje C1 i to na nivou uporedivim sa cisplatinom. Dejstvo je ispitivano dvema koncentracijama, IC_{50} i $2 \times IC_{50}$. Kod niže koncentracije, testirani agensi nisu značajno promenili progresiju ćelijskog ciklusa. Kod $2 \times IC_{50}$, cisplatina je izazvala gubitak DNK kod G2-M i kasnije povećanje sadržaja sub-G1. C1 i C2 su indukovali koncentraciono zavisne akumulacije ćelija u sub-G1 frakciji, u meri koja je slična cisplatinu. Generisanje sub-G1 vrha smatra se znakom internukleozomnog rascepa DNK, kao rezultat apoptotske smrti ćelije. Međutim, C1 i C2 nisu uzrokovali nikakve druge izmene ćelijskog ciklusa, nakon tretmana od 24 sata.

Slobodni ligand nije izazvao promene u sub-G1 frakciji, u odnosu na kontrolu, što je u skladu sa nedostatkom citotoksičnosti. Manje kašnjenje u S fazi je uzrokovano ligandom L1 i čini se da je nezavisno od koncentracije (oko 29,3% na IC_{50} i $2 \times IC_{50}$, u poređenju sa kontrolom od 21,3%). Malo kašnjenje S faze, može ukazati na interferenciju 7-hlorohinolina sa ćelijskom DNK. Prethodne studije o antibakterijskim sredstvima zasnovanim na hinolinu (kao što je Ciprofloksacin) pokazale su potencijal derivata hinolina da inhibiraju topoizomerazu u HeLa ćelijama i DNK-girazu u bakterijama u višim koncentracijama, dok su K562 ćelije koje su tretirane Ciprofloksacinom napredovale sporije kroz S i G2/M stupnjeve ćelijskog ciklusa (Slika 22).

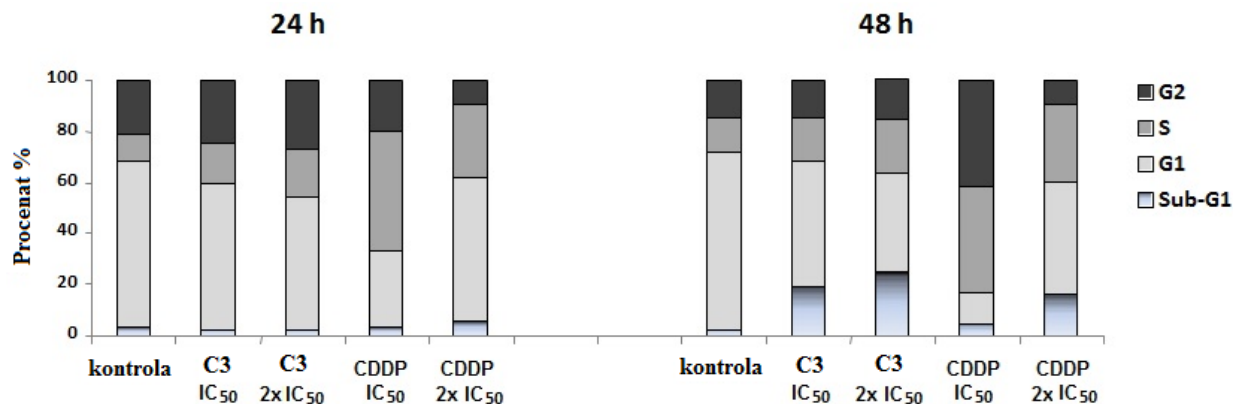


Slika 22. Dijagram raspodele faza ćelijskih ciklusa u tretiranim K562 ćelijama posle 24 h inkubacije sa L1, L2, CDDP, C1 i C2 pri koncentracijama odgovarajućim za (A) IC₅₀ i (B) 2×IC₅₀.

Tabela 9. Procenat ćelija u sub-G1 frakciji ćelijskog ciklusa, posle 24 h inkubacije sa **L1**, **L2**, **CDDP**, **C1** i **C2** pri koncentracijama odgovarajućim za IC_{50} i $2 \times IC_{50}$.

	Sub G1 frakcija (%)	
	IC_{50}	$2 \times IC_{50}$
Kontrola	8,06 ± 0,00	8,1 ± 0,00
L1	6,57 ± 0,02	6,5 ± 0,57
L2	10,38 ± 0,41	6,9 ± 0,08
CDDP	18,47 ± 1,38	24,4 ± 1,38
C1	10,84 ± 0,71	18,4 ± 0,33
C2	11,84 ± 0,00	17,9 ± 1,5

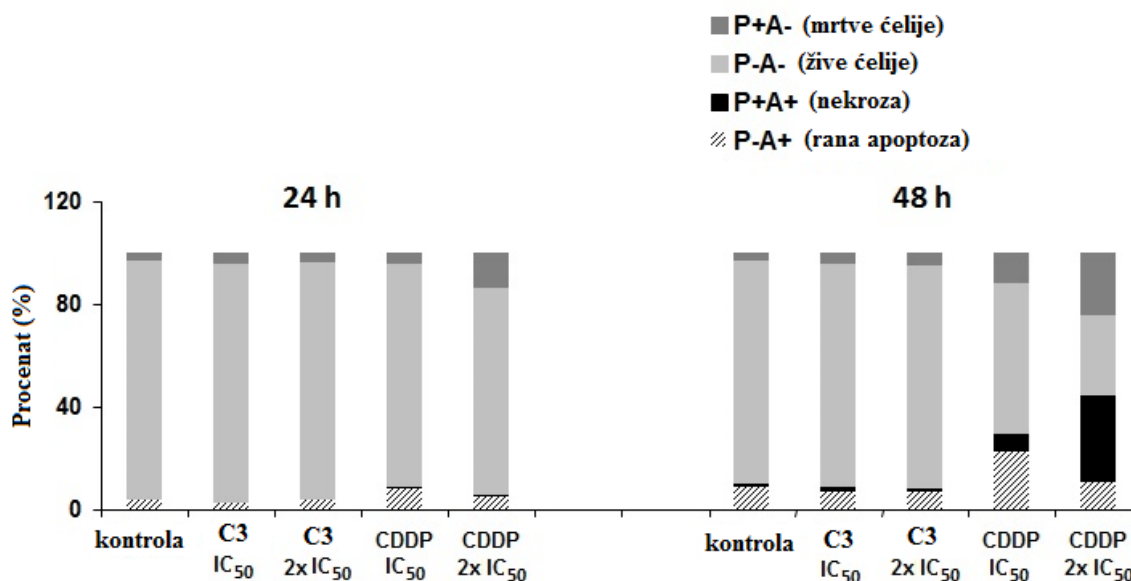
Analiza raspodele faza ćelijskog ciklusa ispitana je u HeLa ćelijama za kompleks **C3**, primenom protočne citometrije. Efekti kompleksa i **CDDP** analizirani su u dve koncentracije (IC_{50} i $2 \times IC_{50}$) i dve vremenske tačke (24 h i 48 h). Rezultati su prikazani na **Slici 23**. Nakon 24 h inkubacije, kompleks **C3** je izazvao promene koje karakterišu postepeni gubitak ćelija u G1 fazi i akumulaciju ćelija u G2-M fazi. Nakon produženog tretmana (48 h) kompleks **C3** je izazvao kašnjenje u S fazi ćelijskog ciklusa, posmatrano zavisno od koncentracije, 17,1% i 21%, kod IC_{50} i $2 \times IC_{50}$, respektivno, u poređenju sa kontrolom (12,9%) . Posle toga, došlo je do akumulacije ćelija u sub-G1 frakciji, koja se povećala sa povećanjem koncentracije do 24,5% (na $2 \times IC_{50}$) i bila je veća od one izazvane sa **CDDP** (16,4%). Generisanje pod-G1 vrha smatra se znakom pokidanog DNK u ćelijama koje su podvrgnute ćelijskoj smrti. Promene u ćelijskom ciklusu uzrokovane kompleksom **C3** snažno ukazuju na to da se direktno vezivanje DNK i kompleksa **C3** desilo na način koji zavisi od koncentracije i vremena. Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodnim rezultatima sličnih jedinjenja, koji su pokazali slično dejstvo kao snažni citotoksični i DNK vezujući agensi.¹²⁰



Slika 23. Dijagram raspodele faza ćelijskih ciklusa u tretiranim HeLa ćelijama posle 24 i 48 h inkubacije sa **CDDP** i **C3** pri koncentracijama odgovarajućim za (A) IC₅₀ i (B) 2×IC₅₀.

4.3.9. Testovi određivanja apoptoze ispitivanih kompleksa C3

Potencijal kompleksa **C3** ili **CDDP** da indukuje apoptozu u HeLa ćelijama analiziran je protočnom citometrijom i bojom Anekin-FITC/propidium jodida. Dobijeni podaci su prikazani na **Slici 24.** kao procenat ranih apoptotskih ćelija [FITC (+) PI (-)], nekrotičnih ćelija [FITC (+)/PI (+)] i mrtvih ćelija [FITC (-)/PI (+)]. Rezultati pokazuju da kompleks **C3** nije pokrenuo eksternalizaciju fosfatidilserina, što je karakteristika apoptotičkih promena, pošto je (FITC + PI-) bojenje imalo nivo koji je uporediv sa kontrolom i nakon 24 h i 48 h od početka primene leka. Pod istim uslovima cisplatina, prouzrokovala je povećanje FITC (+) PI (-) bojenja (rana apoptoza), do 22,6 % (24 h) i 10,8% (48 h). Nekrotične promene FITC (+)/PI (+) nakon tretmana sa **C3** nisu primećene i bile su na nivou uporedivom sa kontrolom.

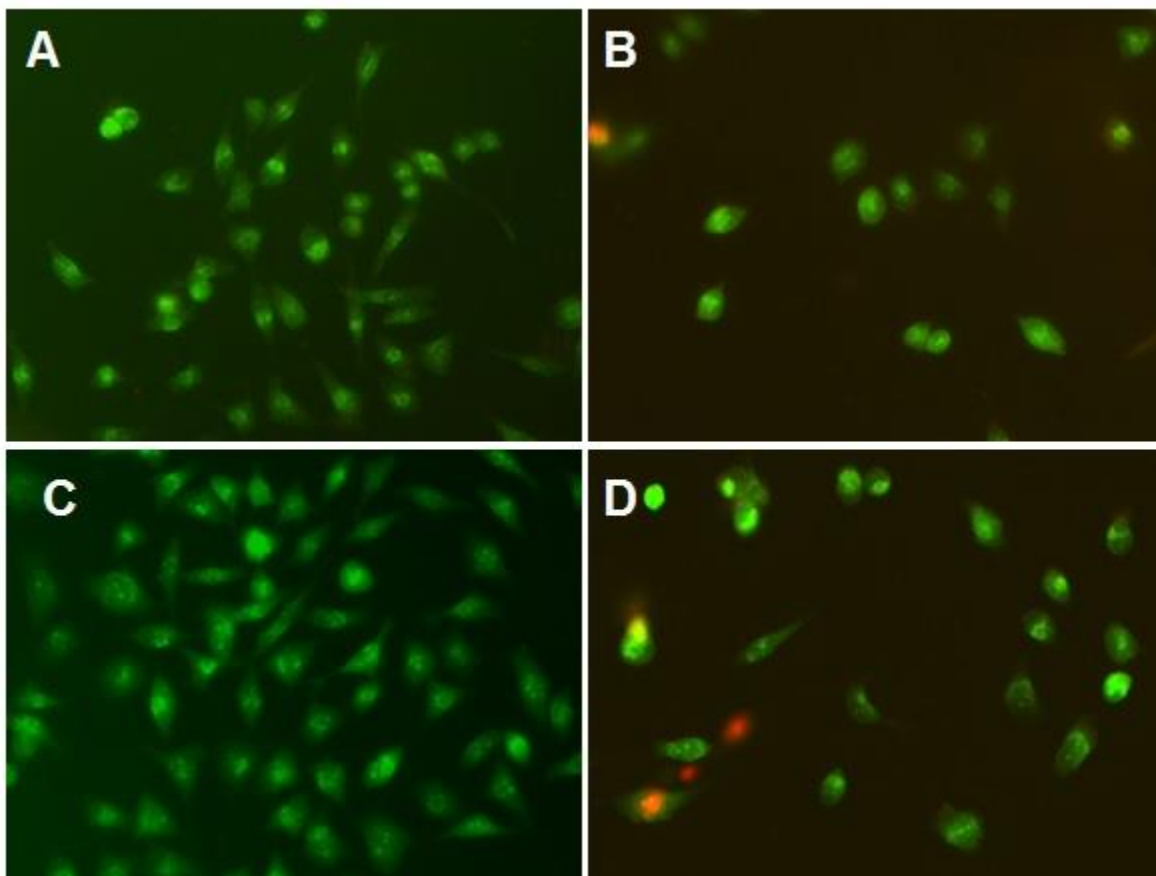


Slika 24. Dijagrami prikazuju rezultate dvostrukog PI/Anekin V-FITC bojenja (skraćeno kao P/A), praćenog sa FACS-protokom na HeLa ćelijama, posle 24 h i 48 h inkubacije sa kompleksima **C3** ili **CDDP** pri koncentracijama koje odgovaraju IC₅₀ i 2 × IC₅₀. Bar-dijagrami predstavljaju rezultat jednog od najmanje tri nezavisna eksperimenta

4.3.10. Rezultati morfološke analize smrti ćelije fluorescentnom mikroskopijom C3

Fluorescentna mikroskopija i akridin-narandžasto/etidijum-bromid (AO/EB) se koriste za analizu morfoloških karakteristika ćelijske smrti. Mikrografije HeLa ćelija obojenih AO/EB, nakon 48 h tretmana sa kompleksom **C3** ili **CDDP** prikazani su na **Slici 26**. Netretirane ćelije (kontrolne ćelije) su guste, svetlo zelene boje i izdužene sa kružnom sferom. Tek nakon produženog tretmana (48 h) na nižim koncentracija (IC₅₀) kompleksa **C3** primećene su određene morfološke promene na ćelijama. Naime, ćelije su počele da gube svoju normalnu morfologiju i postaju zaokružene, manje veličine, sa kondenzovanim i ekscentrično postavljenim jezgrima i sa još uvek netaknutom ćelijskom membranom, pošto ćelije sadrže samo AO (zelenu fluorescenciju). Kod veće koncentracije kompleksa **C3** (2 × IC₅₀), broj ćelija je značajno smanjen u poređenju sa kontrolom, pošto su mnoge od njih odvojene. Među vezanim ćelijama, posmatrane su one nekrotične morfologije (ćelije su bile narandžaste boje zbog poremećene

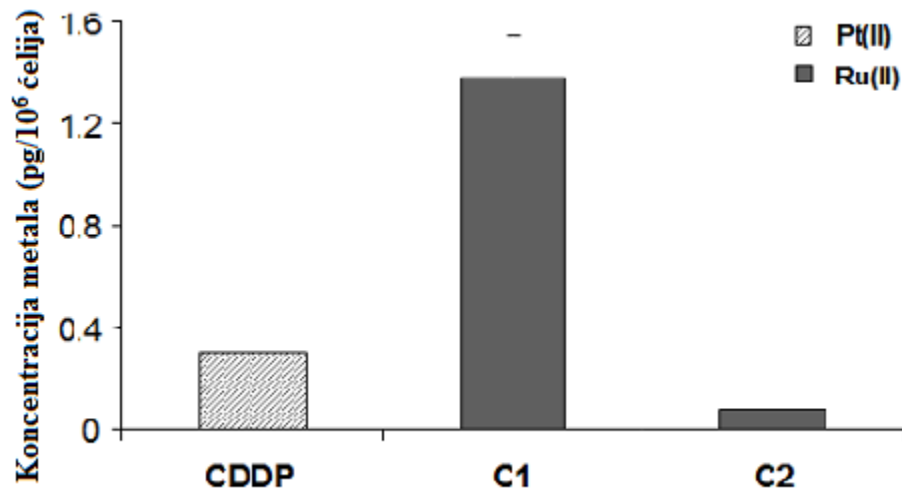
ćelijske membrane). Za utvrđivanje tačnog mehanizma prelaska u apoptozu i ćelijsku smrt potrebna su dodatna ispitivanja, jer postoji veliki broj mogućih okidača ovog procesa, kao posledica delovanja kompleksa **C3**.



Slika 25. Fluorescentne mikrofotografije koje predstavljaju HeLa ćelije tretirane kompleksom **C3** tokom 48 h u koncentracijama koje odgovaraju A) IC_{50} i B) $2 \times IC_{50}$ C) netretirane HeLa ćelije su korišćene kao negativna kontrola D) HeLa ćelije tretirane **CDDP**-om na IC_{50} , koristi se kao pozitivna kontrola za apoptotške morfološke promene.

4.3.11. Rezultati merenja intraćelijske akumulacije rutenijuma (II) i platine (II) pomoću ICP-MS kompleksa C1, C2 i C3

Da bi se odredio stepen intraćelijske akumulacije kompleksa rutenijuma(II) **C1** i **C2**, u odnosu na akumulaciju **CDDP**-e, studija je izvedena u ćelijama K562 nakon 24 h tretmana sa jednakim koncentracijama ($50 \mu\text{M}$) jedinjenja. Dobijeni rezultati su predstavljeni kao koncentracije Ru(II) ili Pt(II) zabeležene unutar ćelija ($\mu\text{g}/10^6$ ćelija). Dobijeni podaci ukazuju da je **C1** ušao u ćelije efikasnije u poređenju sa **CDDP**. Koncentracija intraćelijskog rutenijuma (**C1**): $1,38 \pm 0,166$ ($\mu\text{g Ru}/10^6$ ćelija) je prevazišla vrednost **CDDP**: $0,299 \pm 0,002$ ($\mu\text{g Pt}/10^6$ ćelija) za oko 4,6 puta. Kompleks **C2** je pokazao lošiju intraćelijsku akumulaciju $0,081 \pm 0,004$ ($\mu\text{g M}/10^6$ ćelija) u istoj koncentraciji, što je u skladu sa njegovom nižom aktivnošću. Poznat je uticaj lipofilnosti na dostupnost jedinjenja u ćeliji i aktivnost, shodno tome, dobijeni podaci u ovoj studiji pokazali su značajno veću intraćelijsku akumulaciju **C1** u odnosu na **C2** i **CDDP** i jasno pokazali pozitivan efekat hinolinskog dela na ćelijsku akumulaciji kompleksa koja ima uticaja i na bolju citotoksičnost kompleksa **C1** u poredjenju sa kompleksom **C2** (Slika 26).



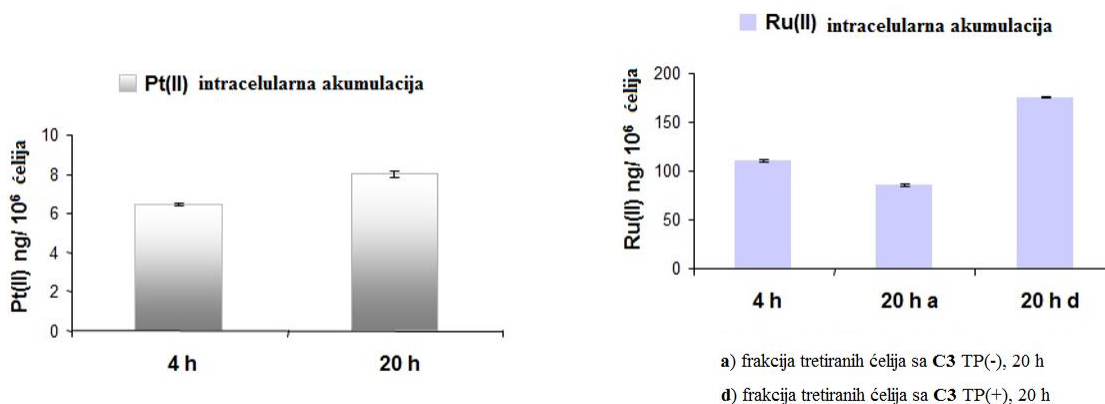
Slika 26. Intraćelijska koncentracija Pt(II)/Ru(II) nakon 24 h tretmana K562 ćelija sa ekvimolarnim koncentracijama ($50 \mu\text{M}$) kompleksa **C1**, **C2** i **CDDP** merena ICP-MS-om

Jedan od glavnih ciljeva u razvoju novih antitumorskih lekova zasnovanih na metalima jeste da se dobije efikasan prodor metala u tumorske ćelije, čime bi se povećavala terapijska

efikasnost i smanjenje toksičnosti za zdravo tkivo. Da bi se procenila efikasnost intraćelijskog usvajanja kompleksa **C3**, ispitivan je njegov uticaj na HeLa ćelije, uz primenu ICP-MS. Vrednosti su poredjene sa **CDDP**. **Slika 27** prikazuje intraćelijski sadržaj (ng metala/10⁶ ćelija) nakon 4 h, odnosno 20 h tretmana, sa ekvimolarnim koncentracijama od 10 mM kompleksa **C3** i **CDDP**. Preživljavanje ćelija i broj ćelija određeni su testom tripan-plavo. Merenja nakon 20 h tretmana izvedena su na ćelijama koje su preživele tretman (5,6%) i ćelijama koje su ušle u ćelijsku smrt i odlepile se sa površine suda za gajenje, što je predstavljalo više od 90% testiranog uzorka. U istim uslovima tretmana, **CDDP** nije uzrokovao odvajanje ćelija u većem procentu u odnosu na kontrolu. Treba napomenuti da su promene u preživljavanju HeLa ćelija, koje su se desile nakon 20 h primene kompleksa **C3** (10 μM) karakteristične za apoptozu.¹²¹ Štaviše, kao što je već opisano u literaturi,¹²² biološko dejstvo kompleksa rutenijuma(II) koji sadrže velike i rigidne aromatične ligande kao što je dppz, mogu uključivati interakcije sa ćelijskim membranama, naknadnu modifikaciju ćelijske membrane. Stoga, kako bi se dobili potpuni podaci o raspodeli kompleksa rutenijuma **C3** u HeLa ćelijama, analizirali smo primenom ICP-MS žive ćelije sa neoštećenom ćelijskom membranom, koje su ostale prilepljene za dno suda, TP (-), kao i ćelije sa oštećenom ćelijskom membranom, koje su usvojile boju, TP (+), i koje su se nalazile plivajuće u podlozi za gajenje. Kao što se vidi na **Slici 23**, ukupna akumulacija rutenijuma se povećava na način koji zavisi od vremena i koncentracije. Kompleks **C3** akumulira se u ćelijama efikasnije nego **CDDP**. Akumulacija kompleksa **C3** (ng Ru/10⁶ ćelija) nakon kratkotrajnog tretmana (4 h) iznosi 110,5 ± 0,8 i bila je približno 17 puta veća od akumulacije **CDDP** (6,5 ± 0,1 ng Pt/10⁶ ćelija). Posle 20 h inkubacije, stopa akumulacije kompleksa **C3** (ng Ru/10⁶ ćelija) u nevezanim ćelijama iznosila je 175,6 ± 0,8 i premašila je **CDDP** (8 ± 0,1 ng Pt/10⁶ ćelija) za oko 20 puta. Međutim, koncentracija u vezanim ćelijama je iznosila 85,4 ± 1,1 ng Ru/10⁶ ćelija i sa vremenom se smanjila. Ovo zapazanje moglo bi se objasniti time, da se deljenje ćelija nastavilo u ovom malom procentu (5,6%) vezanih tretiranih ćelija, iako su bili pod jakim citotoksičnim stresom.

Dobijeni rezultati ukazuju na poboljšani unos kompleksa **C3** u HeLa ćelijama u poređenju sa **CDDP**. Lipofilne karakteristike aromatičnih liganda kao što je dppz svakako olakšavaju prolaz kompleksa rutenijuma(II) kroz ćelijsku membranu pasivnom difuzijom.¹²³ Međutim, kao što je i ranije utvrđeno,¹²⁴ ovo povećanje lipofilnosti može doprineti neželjenim biološkim efektima kao što je toksičnost ili smanjena selektivnost prema ćelijama karcinoma.

Ovim eksperimentima je potvrđeno da koordinacija biološki neaktivnog derivata Me₂dppz za rutenijumski jon, dovodi do stvaranja kompleksa sa povećanom mogućnošću prolaska kroz ćelijsku membranu i većom citotoksičnošću u poređenju sa **CDDP**.



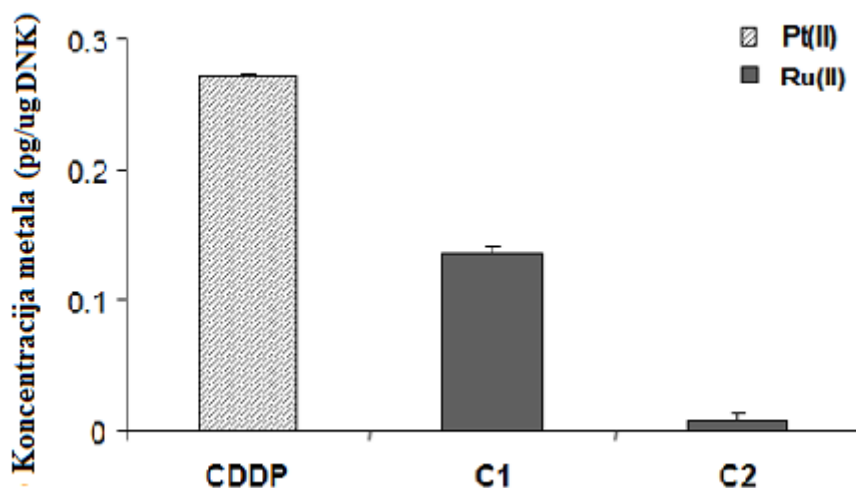
Slika 27. Intraćelijska koncentracija Pt(II)/Ru(II) nakon 4 i 20 h tretmana HeLa ćelija sa ekvimolarnim koncentracijama (10 mM) kompleksa **C3** i **CDDP** merena ICP-MS-om

4.3.12. Rezultati merenja vezivanja jona Ru(II) i Pt(II) za DNK pomoću ICP-MS

Ćelijska DNK je glavna meta citotoksičnog delovanja kompleksa baziranih na metalima. Jedinjenja rutenijuma(II) mogu direktno da se vežu za DNK, izazivajući konformacione promene, ukrštanja ili pukotine, ili mogu indirektno oštetiti DNK. Takođe, mogu da pokrenu signalnu kaskadu programirane ćelijske smrti mitohondrijalnim putem i-ili indukuju oslobađanje slobodnih kiseoničnih radikala, tj. oksidativni stres. Da bi se procenila sposobnost kompleksa **C1** i **C2** za vezivanje za DNK u K562 ćelijama, ICP-MS merenja su sprovedena nakon 24 časa inkubacije sa ispitivanim jedinjenjima. Ćelije su sakupljene odmah nakon tretmana, a nuklearna DNK je izolovana i kvantifikovana. Osnovni rastvori DNK daju odnos UV absorbance A_{260}/A_{280} od 2,3-2,8, što ukazuje na to da je DNK nije kontaminirana proteinima. Rezultati ICP-MS studije (**Slika 28.**) pokazali su da se oba rutenijumska kompleksa vezuju za ćelijsku DNK efikasnije u poređenju sa **CDDP**. Nivo vezivanja platine za DNK je $0,271 \pm 0,001$ pg Pt/ μ g DNK, bio je dva puta veći od nivoa vezivanja za DNK rutenijuskog kompleksa **C1**: $0,135 \pm 0,005$ pg Ru/ μ g DNK. Slabo vezivanje za DNK kompleksa **C2**: $0,007 \pm 0,006$ pg Ru/ μ g DNK bilo je u skladu sa

njegovom smanjenom intraćelijskom akumulacijom i generalno nižom citotoksičnošću. Odnos vezivanja za DNK (u odnosu na količinu kompleksa prisutnog u ćeliji) je smanjen, u odnosu: **CDDP** > **C1** > **C2**. Iako je **C1** pokazao uporedivu *in vitro* aktivnost sa **CDDP**-om u K562 ćelijama, naš zaključak je da se njegov mehanizam citotoksičnog delovanja ne može objasniti samo sposobnošću vezivanja za DNK ili bar da DNK nije jedina intraćelijska meta za ovu vrstu kompleksa kroz koju kompleks ispoljava svoje dejstvo.

Smanjeno vezivanje kompleksa **C1** za DNK u poređenju sa **CDDP** može biti uzrokovano dodatnim interakcijama sa proteinima ili peptidima koji sadrže sumpor, kao što su cistein, metionin, glutation (GSH), za koje je poznato da vezuju metalne komplekse pre ulaska u jezgro i da imaju važnu ulogu u mehanizmima toksičnosti i otpornosti na metale i lekove. Tačan mehanizam delovanja kompleksa baziranih na rutenijumu je i dalje u velikoj meri nepoznat. Iako se **C1** vezuje za DNK, može izazvati različite konformacijske promene DNK od **CDDP**, zbog različite kompleksne geometrije, a pored toga može interagovati na ne-nuklearne mete, kao što je mitohondrija ili ćelijski enzimi.

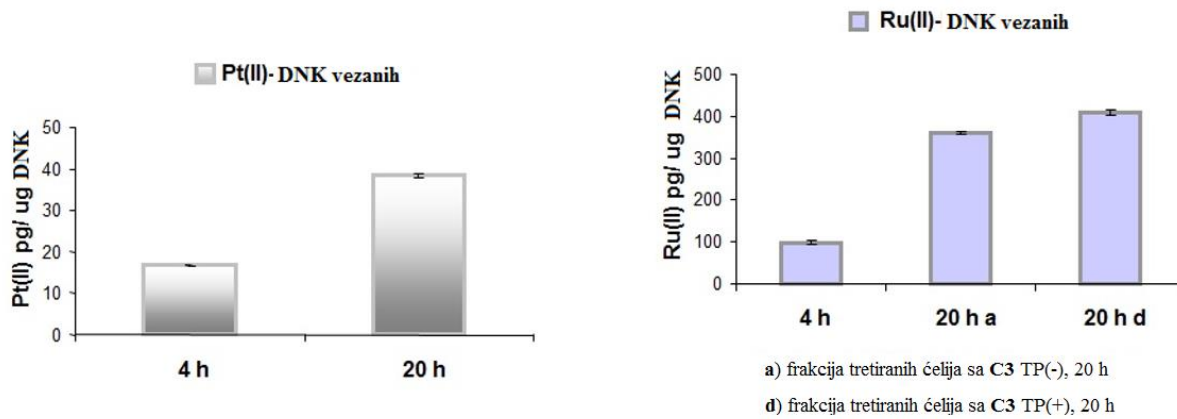


Slika 28. Koncentracije metala (pg/ug DNK) vezanih za ćelijsku DNK. Grafik predstavlja srednje vrednosti od tri nezavisna merenja.

Da bi se procenila sposobnost kompleksa **C3** da se veže na DNK u HeLa ćelijama, količina rutenijuma vezanog za DNK je određena ICP-MS-om nakon 4 h i 20 h inkubacije ćelija kompleksom. Nakon dužeg dejstva kompleksa **C3** (20 h) izvršene su merenja u vezanim ćelijama za podlogu kao i na ćelijama koje su odvojene. U tu svrhu, ćelije su sakupljene odmah nakon inkubacije, a nuklearna DNK je izolovana i kvantifikovana. Osnovni rastvori DNK daju odnos UV apsorbance A260/A280 u rasponu od 2,05-2,08.

Rezultati ove ICP-MS studije (**Slika 29.**) pokazuju da se kompleks **C3** vezuje za ćelijsku DNK efikasnije od **CDDP**. Nivo vezivanja **C3** za DNK posmatrano nakon 4 h inkubacije, iznosi $96,4 \pm 4,2$ (pg Ru/ug DNK) i mnogo je veći od vezivanja platine za DNK $16,7 \pm 0,1$ (pg Pt/ug DNK). Sa produženjem vremenskog intervala, vezivanje **CDDP** za DNK povećano je sporije od vezivanja kompleksa **C3**. Posle 20 h inkubacije, sadržaj rutenijuma-DNK adukata (pg Ru/ug DNK) izmeren u obe ćelijske frakcije: $358,3 \pm 4,6$ (vezane ćelije); $407,3 \pm 7,7$ (nevezane ćelije), premašio je **CDDP** ($38,4 \pm 0,5$) za približno 10 puta, sto navodi na pretpostavku da lipofilni karakter kompleksa **C3** olakšava transport kroz ćelijsku membranu. Kada kompleks **C3** prodre u ćeliju, ulazi efikasno u jedro i reaguje sa jedarnom DNK. Analiza ICP-MS-om pokazala je da je vezivanje rutenijuma za DNK efikasno u oba slučaja, vezanim ćelijama (TP-) i nevezanim ćelijama (TP +). Dodatna ispitivanja su neophodna da bi se precizno utvrdilo da li kompleks **C3**, posebno u visokim koncentracijama ($10 \mu\text{M}$), može ostati vezan za ćelijsku membranu i ometati vezivanje ćelija za podlogu.

Rezultati vezivanja rutenijuma za DNK su u saglasnosti sa studijom intraćelijske akumulacije i podacima citotoksičnosti. Kompleks **C3** brže ulazi u ćeliju i efikasnije interaguje sa jedarskom DNK nego **CDDP**. Ova opservacija se može objasniti kontrolisanom kinetikom disocijacije liganda. Pored toga, moguće je da hidrofobna struktura planarnog aromatičnog liganda Me₂dppz i hidrofobna interakcija obezbeđena *p*-cimenskog liganda sa bazama u DNK-heliku mogu zajednički doprineti poboljšanom afinitetu vezivanja ovog kompleksa za DNK u poređenju sa **CDDP**.



Slika 29. Koncentracije metala (pg/ug DNK) vezanih za ćelijsku DNK. Grafik predstavlja srednje vrednosti od tri nezavisna merenja interakcija **C3** i **CDDP** u HeLa ćelijama.

5. Zaključak

U ovoj doktorskoj disertaciji opisana je sinteza jednog novog liganda i pet ranije u literaturi opisanih liganada. Oni su korišćeni za sintezu dva benzenska, jednog toluenskog i šest p-cimenskih rutenijum(II) kompleksa. Sintetisanim jedinjenjima strukture su određene primenom standardnih analitičkih spektroskopskih metoda: infracrvena spektroskopija, elementalna analiza, NMR spektroskopija, masena spektrometrija i difrakcija X-zraka. Na osnovu ovih podataka izvedeni su sledeći zaključci:

- U infracrvenim spektrima opažena je promena vibracionih frekvenci traka funkcionalnih grupa kod kompleksa usled promene elektronske gustine na ligandu nakon vezivanja za jon metala.
- Elementalna analiza potvrdila je procentni sadržaj elemenata u pretpostavljenim molekulskim formulama jedinjenja
- Hemijska pomeranja protona, ugljenika i njihove međusobne korelacije u 1D i 2D NMR spektrima potvrđuju pretpostavljeni sastav kako po odnosu integrala, tako i na osnovu položaja signala, čime se potvrđuje koordinacija liganda u kompleksima.
- Stabilnost u rastvoru DMSO-a takođe je potvrđena NMR spektroskopijom, snimanjem spektara u funkciji od proteklog vremena nakon rastvaranja. Pošto do promene spektara nije došlo, može se potvrditi stabilnost kompleksa u ovom rastvaraču, koji je dalje korišćen za *in vitro* istraživanja.
- Masenom spektrometrijom detektovani su kompleksni katjoni sintetisanih jedinjenja, što je takođe nedvosmislena potvrda sastava kompleksa.
- Difrakcijom X-zraka na kompleksu **C9** potvrđena je njegova struktura, odnosno tačni uglovi veza, dužina veza i prostorni raspored fragmenata kompleksa.

Sintetisana jedinjenja su pripremana u cilju ispitivanja njihovih citotoksičnih osobina, kako bi u budućnosti možda zamenila postojeća jedinjenja za lečenje malignih oboljenja. U tu svrhu testovi citotoksičnosti su prvo rađeni na ćelijama kancera koja su pokazala da:

- Aktivnost liganada je u najvećem broju slučajeva zanemarljiva u odnosu na aktivnost kompleksa. Kompleksi su pokazali sličnu ili bolju aktivnost od cisplatine, što znači da je odgovarajućom optimizacijom strukture rutenijumskih kompleksa postignuta selektivnost sa značajnom aktivnošću na ćelije tumora. Istraživanja su pokazala da veću aktivnost imaju kompleksi koji kao arenski ligand imaju *p*-cimen u odnosu na one koji sadrže toluen ili benzen. Takođe, aktivnost kompleksa zavisi i od liganda, odnosno, što ligand poseduje više aromatičnih prstenova planarne geometrije, kompleksima se povećava lipofilnost koja omogućava prodor u ćelije.
- Na osnovu masene analize (ICP-MS) frakcionisanih ćelija zaključeno je da se kompleksi koji imaju bolju aktivnost bolje akumuliraju unutar ćelije i unutar jedra u odnosu na cisplatinu, što može biti posledica bolje aktivnosti jedinjenja.

Ovi rezultati mogu da posluže za dalja planiranja sinteze i modifikacije liganada i kompleksa kako bi se dobila njihova što bolja aktivnost i selektivnost na ćelije tumora u odnosu na cisplatinu, koja je inače korišćena u ove svrhe.

6. Literatura

- ¹ (a) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/>; (b) R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Jemal, *CA-Cancer J. Clin.*, **68** (2018) 7.
- ² (a) F. P. Perera, *Science*, **278** (1997) 1068-1073; (b) *International Classification of Diseases for Oncology, Third Edition, First Revision*, World Health Organisation, Geneva, (2013); (c) D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell*, **100** (2000) 57-70.
- ³ S. Romero-Garcia, J. S. Lopez-Gonzalez, J. L. Báez-Viveros, D. Aguilar-Cazares, H. Prado-Garcia, *Cancer Biol. Ther.*, **12** (2011) 939–948.
- ⁴ World Cancer Report 2014, World Health Organization. 2014. pp. Chapter 1.1. ISBN 9283204298.
- ⁵ L. Fass, *Mol. Oncol.*, **2** (2008) 115.
- ⁶ (a) S. S. Ahmad, S. Duke, R. Jena, M. V. Williams, N. G. Burnet, *BMJ*, **345** (2012) 7765; (b) N. Wu, S. Z. Jin, X. N. Pan, S. Z. Liu, *Int. J. Radiat. Biol.*, **84** (2008) 201.
- ⁷ M. J. Lind, *Med.*, **36** (2008) 19.
- ⁸ T. A. Waldmann, *Nat. Med.*, **9** (2003) 269.
- ⁹ A. Kimoto, H. Suzuki, J. Yamashita, J. Takeuchi, K. Matsumoto, Y. Enomoto, T. Komori, *Photomed. Laser Surg.*, **35** (2017) 479.
- ¹⁰ A. Vickers, *CA-Cancer J. Clin.*, **54** (2004) 110.
- ¹¹ B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature*, **205** (1965) 698.
- ¹² B. Rosenberg, L. Vancamp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature*, **222** (1969) 385.
- ¹³ R. Canetta, K. Bragman, L. Smaldone, M. Rozenzweig, *Cancer Treat. Rev.*, **15** (1988) 17.
- ¹⁴ J. P. Caussanel, F. Levi, S. Brienza, J. L. Misset, M. Itzhaki, R. Adam, G. Milano, B. Hecquet, G. Mathe, *J. Natl. Cancer Inst.*, **82** (1990) 1046.
- ¹⁵ (a) E. Wong, C. M. Giandomenico, *Chem. Rev.*, **99** (1999) 2451; (b) P. J. Dyson, G. Sava, *Dalton Trans.* (2006) 1929.
- ¹⁶ L. B. Travis, S. D. Fossa, S. J. Schonfeld, M. L. McMaster, C. F. Lynch, H. Storm, P. Hall, E. Holowaty, A. Andersen, E. Pukkala, M. Andersson, M. Kaijser, M. Gospodarowicz, T. Joensuu, R. J. Cohen, J. D. Boice, Jr., G. M. Dores and E. S. Gilbert, *J. Natl. Cancer Inst.*, **97** (2005) 1354–1365.
- ¹⁷ Z. H. Siddik, *Oncogene*, **22** (2003) 7265-7279.

-
- ¹⁸ J. A. Levi, R. S. Aroney, D. N. Dalley, *Brit. Med. J.*, **282** (1981) 2003–2004.
- ¹⁹ S. Dasari, P.B. Tchounwou, *Eur. J. Pharmacol.* **740** (2014) 364.
- ²⁰ R. Safaei, S. Otani, B. J. Larson, M. L. Rasmussen, S. B. Howell, *Mol Pharmacol.*, **73** (2008) 461–468.
- ²¹ M. Petrović, D. Todorović, *BLM*, **18** (2016) 12–18.
- ²² S. Akshintala, Leigh Marcus, K. E. Warren, R. F. Murphy, T. M. Sissung, A. Srivastava, W. J. Goodspeed, *Pediatr. Blood Cancer.*, **62** (2015) 603–610.
- ²³ C.-H. Tang, C. Parham, E. Shocron, G. McMahon, N. Patel, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **67** (2011) 1389–1400.
- ²⁴ A. J. Wagstaff, A. Ward, P. Benfield, R. C. Heel, *Drugs*, **37** (1989) 162–190.
- ²⁵ T. Alcindor, N. Beauger, *Curr Oncol.* **18** (2011) 18–25.
- ²⁶ G. Y. Ho, N. Woodward, J. I. G. Coward, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **102** (2016) 37.
- ²⁷ A.-M. Florea, D. Büsselberg, *Cancers*, **3** (2011) 1351–1371.
- ²⁸ (a) L. Pendyala, P. J. Creaven, *Cancer Res.*, **53** (1993) 5970; (b) E. Raymond, S.G. Chaney, A. Taamma, E. Cvitkovic, *Ann. Oncol.*, **10** (1998) 1053; (c) O. Rixe, W. Ortuzar, M. Alvarez, R. Parker, E. Reed, K. Paull, T. Fojo, *Biochem. Pharmacol.*, **52** (1996) 1855.
- ²⁹ J. L. Misset, H. Bleiberg, W. Sutherland, M. Bekradda, E. Cvitkovic, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **35** (2000) 75.
- ³⁰ M. J. McKeage, *Expert. Opin. Investig. drugs*, **10** (2001) 119.
- ³¹ (a) J.-W. Lee; J.-K. Park; S.-H. Lee; S.-Y. Kim; Y.-B. Cho; H.-J. Kuh, *Anti-Cancer Drugs*, **17** (2006) 377; (b) W. Liu, X. Chen, Q. Ye, Y. Xu, C. Xie, M. Xie, Q. Chang, L. Lou *Inorg. Chem.*, **50** (2011) 5324.
- ³² M. Shimada, H. Itamochi, J. Kigawa, *Cancer Manag. Res.*, **5** (2013) 67.
- ³³ (a) M. A. Jakupec, M. Galanski, B. K. Keppler, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **146** (2003) 1; (b) N. J. Wheate, S. Walker, G. E. Craig, R. Oun, *Dalton Trans.*, **39** (2010) 8113.
- ³⁴ (a) Y. Zhao, N. J. Farrer, H. Li, J. S. Butler, R. J. McQuitty, A. Habtemariam, F. Wang, P. J. Sadler., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52** (2013) 13633; (b) T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, **116** (2016) 3436.
- ³⁵ (a) A. Habtemariam, M. Melchart, R. Fernández, S. Parsons, I. D. H. Oswald, A. Parkin, F. P. A. Fabbiani, J. E. Davidson, A. Dawson, R. E. Aird, D. I. Jodrell, P. J. Sadler. *J. Med. Chem.*, **49** (2006) 6858; (b) C. G. Hartinger, P. J. Dyson, *Chem. Soc. Rev.*, **38** (2009) 391 (c) Z. Liu, A.

-
- Habtemariam, A. M. Pizarro, S. A. Fletcher, A. Kisova, O. Vrana, L. Salassa, P. C. A. Bruijninx, G. J. Clarkson, V. Brabec, P. J. Sadler. *J. Med. Chem.*, **54** (2011) 3011.
- ³⁶ (a) A. F. A. Peacock, S. Parsons, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.*, **129** (2007) 3348; (b) F. Wang, A. Habtemariam, E. P. L. van der Geer, R. Fernandez, M. Melchart, R. J. Deeth, R. Aird, S. Guichard, F. P. A. Fabbiani, P. Lozano-Casal, I. D. H. Oswald, D. I. Jodrell, S. Parsons, P. J. Sadler. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102** (2005) 18269; (c) Z. Almodares, S. J. Lucas, B. D. Crossley, A. M. Basri, C. M. Pask, A. J. Hebden, R. M. Phillips, P. C. McGowan, *Inorg. Chem.*, **53** (2014) 727.
- ³⁷ (a) I. Kostova, *Curr. Med. Chem.*, **13** (2006) 1085; (b) I. Ott, R. Gust, *Arch. Pharm.*, **340** (2007) 117; (c) D. Griffith, S. Cecco, A. Bergamo, E. Zangrando, G. Sava, C. J. Marmion, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **13** (2008) 511.
- ³⁸ L. Duan, A. Fischer, Y. Xu, L. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, **131** (2009) 10397.
- ³⁹ M. Abid, F. Shamsi, A. Azam, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **10** (2016) 772.
- ⁴⁰ I. Dragutan, V. Dragutan, A. Demonceau, *Molecules*, **20** (2015) 17244.
- ⁴¹ M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.* **232** (2002) 69.
- ⁴² G. K. Gransbury, P. Kappen, C. J. Glover, J. N. Hughes, A. Levina, P. A. Lay, I. F. Musgrave, H. H. Harris, *Metallomics*, **8** (2016) 762-773.
- ⁴³ B. K. Keppler, W. Rupp, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **111** (1986) 166-168.
- ⁴⁴ E. Alessio, *Eur. J. Inorg. Chem.*, (2017) 1549-1560.
- ⁴⁵ S. M. Meier-Menches, C. Gerner, W. Berger, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, *Chem. Soc. Rev.*, **47** (2018) 909-928.
- ⁴⁶ (a) G. Sava, K. Clerici, I. Capozzi, M. Cocchietto, R. Gagliardi, E. Alessio, G. Mestroni, A. Perbellini, *Anti-Cancer Drugs* **10** (1999) 129; (b) C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* **100** (2006) 891; (c) M. Galanski, V. B. Arion, M. A. Jakupec, B. K. Keppler, *Curr. Pharm. Des.* **9** (2003) 2078; (d) E. Antonarakis, A. Emadi, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **66** (2010) 1.
- ⁴⁷ (a) R. Trondl, P. Heffeter, C. R. Kowol, M. A. Jakupec, W. Berger, B. K. Keppler, *Chem. Sci.*, **5** (2014) 2925; (b) T. Gianferrara, I. Bratsos, E. Alessio, *Dalton Trans.* (2009) 7588.
- ⁴⁸ R. Trondl, P. Heffeter, C. R. Kowol, M. A. Jakupec, W. Berger, B. K. Keppler, *Chem. Sci.*, **5** (2014) 2925-2932.

-
- ⁴⁹ H. A. Burris, S. Bakewell, J. C. Bendell, J. Infante, S. F. Jones, D. R. Spigel, G. J. Weiss, R. K. Ramanathan, A. Ogden, D. Von Hoff, *EMSO Open*, **1** (2016) e000154.
- ⁵⁰ it-139, <http://intezyne.com/it-139/>
- ⁵¹ H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K Hori, *J. Control. Release*, **65** (2000) 271-284.
- ⁵² W. Su, Z. Tang, P. Li, *Mini-Rev. Med. Chem.*, **16** (2016) 787.
- ⁵³ P. J. Dyson, *Chimia*, **61** (2007) 698.
- ⁵⁴ (a) Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, **38** (2005) 4764-4776; (b) F. Wang, H. Chen, S. Parsons, I. D. H. Oswald, J. E. Davidson, P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.*, **9** (2003) 5810-5820.
- ⁵⁵ (a) S. Chatterjee, S. Kundu, A. Bhattacharyya, C. G. Hartinger, P. J. Dyson, *J. Biol. Inorg. Chem.* **13** (2008) 1149; (b) R. H. Berndsen, A. Weiss, U. K. Abdul, T. J. Wong, P. Meraldi, A. W. Griffioen, P. J. Dyson, P. Nowak-Sliwinska, *Sci. Rep.-UK*, **7** (2017) 43005; (c) A. Weiss, R. H. Berndsen, M. Dubois, C. Muller, R. Schibli, A. W. Griffioen, P. J. Dyson, P. Nowak-Sliwinska, *Chem. Sci.*, **5** (2014) 4742.
- ⁵⁶ (a) R. E. Aird, J. Cummings, A. A. Ritchie, M. Muir, R. E. Morris, H. Chen, P. J. Sadler, D. I. Jodrell, *Br. J. Cancer* **86** (2002) 1652; (b) Z. Adhireksan, G. E. Davey, P. Campomanes, M. Groessl, C. M. Clavel, H. Yu, A. A. Nazarov, H. F. Yeo, W. H. Ang, P. Droge, U. Rothlisberger, P. J. Dyson, C. A. Davey, *Nat. Commun.* **5** (2014) 3462.
- ⁵⁷ A. Herman, *Inorg. Chem.*, **47** (2008) 274-280.
- ⁵⁸ A. Weiss, R. H. Berndsen, M. Dubois, C. Muller, R. Schibli, A. W. Griffioen, P. J. Dyson, P. Nowak-Sliwinska, *Chem. Sci.*, **5** (2014) 4742-4748.
- ⁵⁹ R. Hayward, Q. Schornagel, R. Tente, J. Macpherson, R. Aird, S. Guichard, A. Habtemariam, P. J. Sadler, D. I. Jodrell, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **55** (2005) 577.
- ⁶⁰ S. M. Guichard, R. Else, E. Reid, B. Zeitlin, R. Aird, M. Muir, M. Dodds, H. Fiebig, P. J. Sadler, D. I. Jodrell, *Biochem. Pharmacol.* **71** (2006) 408
- ⁶¹ A. Bergamo, A. Masi, A. F. A. Peacock, A. Habtemariam, P. J. Sadler, G. Sava, *J. Inorg. Biochem.*, **104** (2010) 79.
- ⁶² (a) M. J. Clarke, S. Bitler, D. Rennert, M. Buchbinder, A. D. Kelman, *J. Inorg. Biochem.*, **12** (1980) 79; (b) D. Frasca, J. Ciampa, J. Emerson, R. S. Umans, M. J. Clarke, *Met.-Based Drugs*, **3** (1996) 197; (c) M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.*, **236** (2003) 209.

-
- ⁶³ (a) C. G. Hartinger, M. Groessl, S. M. Meier, A. Casini, P. J. Dyson, *Chem. Soc. Rev.*, **42** (2013) 6186; (b) E. S. Antonarakis, A. Emadi, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **66** (2010) 1; (c) A. I. Minchinton, I. F. Tannock, *Nat. Rev. Cancer*, **6** (2006) 583.
- ⁶⁴ P. Som, Z. H. Oster, K. Matsui, G. Guglielmi, B. R. Persson, M. L. Pellettieri, S. C. Srivastava, P. Richards, H. L. Atkins and A. B. Brill, *Eur. J. Nucl. Med.*, **8** (1983) 491.
- ⁶⁵ (a) E. Musgrove, C. Rugg, I. Taylor, D. Hedley, *J. Cell. Physiol.*, **118** (1984) 6; (b) L. Messori, F. Kratz, E. Alessio, *Met.-Based Drugs*, **3** (1996) 15; (c) L. Messori, F. Gonzalez Vilchez, R. Vilaplana, F. Piccioli, E. Alessio, B. K. Keppler, *Met.-Based Drugs*, **7** (2000) 335; (d) C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupc, B. Kynast, H. Zorbas, B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.*, **100** (2006) 891.
- ⁶⁶ (a) V. Brabec, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **71** (2002) 1; (b) V. Brabec, O. Novakova, *Drug Resist. Updates*, **9** (2006) 111.
- ⁶⁷ A. Bergamo, G. Sava, *Dalton Trans.*, **40** (2011) 7817.
- ⁶⁸ G. Li, L. Sun, L. Ji, H. Chao, *Dalton Trans.*, **45** (2016) 13261-13276.
- ⁶⁹ (a) A. Juris, V. Balzani, F. Barigelletti, S. Campagna, P. Belser, A. Von Zelewsky, *Coord. Chem. Rev.* **84** (1988) 85; (b) A. E. Friedman, J.-C. Chambron, J.-P. Sauvage, N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 4960.
- ⁷⁰ (a) A. J. McConnell, H. Song, J. K. Barton, *Inorg. Chem.*, **52** (2013) 10131; (b) D. Franco, A. V. Vargiu, A. Magistrato, *Inorg. Chem.*, **53** (2014) 7999; (c) Y. Sun, C. Turro, *Inorg. Chem.*, **49** (2010) 5025.
- ⁷¹ (a) J. Xie, G. Liu, H. S. Edent, H. Ai, X-Y. Chen, *Acc. Chem. Res.* **44** (2011) 883; (b) R. Bardhan, S. Lal, A. Joshi, N. J. Halas, *Acc. Chem. Res.* **44** (2011) 936.
- ⁷² Q. Zhou, W. Lei, Y. Chen, C. Li, Y. Hou, B. Zhang, X. Wang, *Chem. Eur. J.* **18** (2012) 8617.
- ⁷³ (a) S. Schäfer, W. S. Sheldrick, *J. Organomet. Chem.* **692** (2007) 1300; (b) S. Schäfer, I. Ott, R. Gust, W. S. Sheldrick, *Eur. J. Inorg. Chem.* **19** (2007) 3034; (c) A. Frodl, D. Herebian, W. S. Sheldrick, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2002) 3664.
- ⁷⁴ C. Mari, R. Rubbiani, G. Gasser, *Inorg. Chim. Acta*, **454** (2017) 21.
- ⁷⁵ D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, *Nat. Rev. Cancer*, **3** (2003) 380.
- ⁷⁶ C. Mari, G. Gasser, *Chimia*, **69** (2015) 176–181.

-
- ⁷⁷ (a) J. Fong, K. Kasimova, Y. Arenas, P. Kaspler, S. Lazic, A. Mandela, L. Lilge, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **14** (2015) 2014; (b) P. Kaspler, S. Lazic, S. Forward, Y. Arenas, A. Mandela, L. Lilge, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **15** (2016) 481.
- ⁷⁸ C. Mari, V. Pierroz, S. Ferrarib, G. Gasser, *Chem. Sci.*, **6** (2015) 2660–2686.
- ⁷⁹ (a) G. Jaouen, A. Vessièrèsab, S. Top, *Chem. Soc. Rev.*, **44** (2015) 8802; (b) P. Resnier, N. Galopin, Y. Sibiril, A. Clavreul, J. Cayon, A. Briganti, P. Legras, A. Vessièrès, T. Montier, G. Jaouen, J. P. Benoit, C. Passirani, *Pharmacol. Res.*, **126** (2017) 54; (c) C. Bruyère, V. Mathieu, A. Vessièrès, P. Pigeon, S. Top, G. Jaouen, R. Kiss, *J. Inorg. Biochem.*, **141** (2014) 144.
- ⁸⁰ W. A. Wani, E. Jameel, U. Baig, S. Mumtazuddin, L. T. Hun, *Eur. J. Med. Chem.*, **101** (2015) 534.
- ⁸¹ A. Kondratskyi, K. Kondratska, F. Vanden Abeele, D. Gordienko, C. Dubois, R.-A. Toillon, C. Slomianny, S. Lemièrè, P. Delcourt, E. Dewailly, R. Skryma, C. Biot, N. Prevarskaya, *Sci. Rep.-UK*, **7** (2017) 15896.
- ⁸² L. Glans, A. Ehnbohm, C. de Kock, A. Martínez, J. Estrada, P. J. Smith, M. Haukka, R. A. Sánchez-Delgado, E. Nordlander, *Dalton Trans.*, **41** (2012) 2764.
- ⁸³ (a) C. S. K. Rajapakse, A. Martinez, B. Naoulou, A. A. Jarzecki, L. Suarez, C. Deregnaucourt, V. Sinou, J. Schrevel, E. Musi, G. Ambrosini, G. K. Schwartz and R. A. Sanchez-Delgado, *Inorg. Chem.*, **48** (2009) 1122; (b) Y. Li, C. de Kock, P. J. Smith, H. Guzgay, D. T. Hendricks, K. Naran, V. Mizrahi, D. F. Warner, K. Chibale, G. S. Smith, *Organometallics*, **32** (2013) 141.
- ⁸⁴ A. Martínez, C. S. K. Rajapakse, R. A. Sánchez-Delgado, A. Varela-Ramirez, C. Lema, R. J. Aguilera, *J. Inorg. Biochem.*, **104** (2010) 967
- ⁸⁵ (a) B. R. James, *Inorg. Chim. Acta Rev.* **4** (1970) 73; (b) C. P. Lau, S. M. Ng, G. Jia, Z. Lin, *Coord. Chem. Rev.* **251** (2007) 2223; (c) I. Dragutan, V. Dragutan, A. Demonceau, *Molecules* **20** (2015) 17244
- ⁸⁶ G. C. Vougioukalakis, R. H. Grubbs, *Chem. Rev.*, **110** (2010) 1746.
- ⁸⁷ P. P. Kulkarni, A. J. Kadam, U. V. Desai, R. B. Mane, P. P. Wadgaonkar, *J. Chem. Res.* (2000) 184.
- ⁸⁸ (a) T. G. Back, S. Collins, R. G. Kerr, *J. Org. Chem.* **46** (1981) 1564; (b) R. S. Yalgudre, G. S. Gokavi, *J. Chem. Sci.* **124** (2012) 821.

-
- ⁸⁹ R. K. Ismagilov, V. V. Moskva, Yu. V. Lebedev, L. Yu. Mosunova, *Russ. J. Gen. Chem.* **71** (2001) 991.
- ⁹⁰ (a) S. P. Singh, H. Batra, P. K. Sharma, *J. Chem. Res.* (1997) 468; (b) O. Prakash, V. Sharma, A. Sadana, *Synth. Comm.* **27** (1997) 3371.
- ⁹¹ V. K. Jadhav, P. P. Wadagaonkar, M. M. Salunkhe, *J. Chin. Chem. Soc.* **45** (1998) 831.
- ⁹² K. Mogilaiah, E. Anitha, K. S. Kumar, R. S. Prasad, *Indian J. Chem. B*, **50** (2011) 126.
- ⁹³ S. Nikolić, I. Ćirić, A. Roller, V. Lukeš, V. B. Arion, S. Grgurić-Šipka, *New J. Chem.*, **41** (2017) 6857.
- ⁹⁴ I. Ivanović, N. Gligorijević, S. Arandelović, S. Radulović, A. Roller, B. Keppler, Z. Tešić, S. Grgurić-Šipka, *Polyhedron*, **61** (2013) 112.
- ⁹⁵ (a) H. R. Bhat, U. P. Singh, P. Gahtori, S. K. Ghosh, K. Gogoi,; A. Prakash, R. K. Singh, *RSC Adv.* **3** (2013) 2942–2952; (b) B. Zhong, R. S. Al-Awar, C. Shih, J. H. Jr. Grimes, M. Vieth, C. Hamdouchi, *Tetrahedron Lett.* **47** (2006) 2161–2164.
- ⁹⁶ (a) M. Sun, H. T. Wei, D. Li, Y.-G. Zheng, J. Cai, M. Ji, *Synth. Commun.*, **38** (2008) 3151–3158; (b) V. Mirkhani, M. Moghadam, S. Tangestaninejada, H. Kargara, *Tetrahedron Lett.*, **47** (2006) 2129–2132.
- ⁹⁷ R. D. Gillard, R. E. E. Hill, R. Maskill, *J. Chem. Soc. A* (1970) 1447–1451.
- ⁹⁸ (a) C. M. Dupureur, J. K. Barton, *Inorg. Chem.* **36** (1997) 33–43; (b) J. E. Dickeson, L. A. Summers, *Aust. J. Chem.* **23** (1970) 1023–1027.
- ⁹⁹ P. Nagababu, M. Shilpa, B. Mustafa, P. Ramjee, S. Satyanarayana, I. Ivanovic-Burmazović, *Inorg. Reac. Mech.*, **6** (2008) 301–311.
- ¹⁰⁰ S. B. Jensen, S. J. Rodger, M. D. Spicer, *J. Organomet. Chem.* **556** (1998) 151–158.
- ¹⁰¹ SAINT-Plus (Version 7.06a) i APEX2. Bruker-Nonius AXS Inc. 2004, Madison, Wisconsin, USA.
- ¹⁰² Sheldrick, G.M. *Acta Cryst.* **A64** (2008) 112-122.
- ¹⁰³ G.K. Johnson, Report ORNL-5138, Oak Ridge National Laboratory, 840 Oak Ridge, TN, 1976.
- ¹⁰⁴ 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, D. J. Fox, Gaussian 09 Revision C.01, Gaussian Inc, Wallingford, CT, 2010.
- ¹⁰⁵ (a) C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B*, **37** (1988) 785–789; (b) A. D. Becke, *Phys. Rev. A*, **38** (1988) 3098–3100.
- ¹⁰⁶ (a) K. Eichkorn, O. Treutler, H. Ohm, M. Haser, R. Ahlrichs, *Chem. Phys. Lett.*, **240** (1995) 283–289; (b) K. Eichkorn, F. Weigend, O. Treutler, R. Ahlrichs, *Theor. Chem. Acc.*, **97** (1997) 119–124.
- ¹⁰⁷ U. Varetto, Molekel 5.4.0.8; Swiss National Supercomputing Centre: Lugano (Switzerland).
- ¹⁰⁸ W. Strober, Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability, *Curr. Protoc. Immunol.* (1987) Appendix 3, page B.1.
- ¹⁰⁹ Supino, R. *Methods Mol. Biol.* **43** (1995) 137–149.
- ¹¹⁰ M.G. Ormerod, Analysis of DNA-general methods, in: M.G. Ormerod (Ed.), *Flow Cytometry, a Practical Approach*, Oxford University Press, New York (1994) 119–125.
- ¹¹¹ M. van Engeland, L. J. W. Nieland, F. C. S. Ramaekers, B. Schutte, C. P. M. Reutelingsperger, *Cytometry* **31** (1998) 1–9.
- ¹¹² K. Liu, P.C. Liu, R. Liu, X. Wu, *Med Sci. Monit. Basic Res.* **21** (2015) 15–20.
- ¹¹³ H. Gehrke, J. Pelka, C. G. Hartinger, H. Blank, F. Bleimund, R. Schneider, D. Gerthsen, S. Bräse, M. Crone, M. Türk, D. Marko, *Arch. Toxicol.* **85** (2011) 799–812.
- ¹¹⁴ Geary, W. J. *Coord. Chem. Rev.* **7** (1971) 81–122.
- ¹¹⁵ M. Patra, T. Joshi, V. Pierroz, K. Ingram, M. Kaiser, S. Ferrari, B. Spingler, J. Keiser, G. Gasser, *Chem. Eur. J.* **19** (2013) 14768–14772.
- ¹¹⁶ J. Tsuji, T. Nagashima, N. T. Qui and H. Takayanagi, *Tetrahedron* **36** (1980) 1311–1315.

-
- ¹¹⁷ I. Ivanović, N. Gligorijević, S. Arandelović, S. Radulović, A. Roller, B. Keppler, Z. Tešić, S. Grgurić-Šipka, *Polyhedron* **61** (2013) 112-118.
- ¹¹⁸ Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Chem. Commun.* (2005) 4764-4776.
- ¹¹⁹ S. Nikolić, L. Rangasamy, N. Gligorijević, S. Arandelović, S. Radulović, G. Gasser, S. Grgurić-Šipka. *J. Inorg. Biochem.* **160** (2016) 156-165.
- ¹²⁰ V. Pierroz, T. Joshi, A. Leonidova, C. Mari, J. Schur, I. Ott, L. Spiccia, S. Ferrari, G. Gasser, *J. Am. Chem. Soc.* **134** (2012) 20376-20387.
- ¹²¹ (a) G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, W.S. El-Deiry, P. Golstein, D.R. Green, M. Hengartner, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, W. Malorni, G. Nunêz, M.E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino, *Cell Death Differ.* **16** (2009) 3-11; (b) J. Grossmann, K. Walther, M. Artinger, S. Kiessling, J. Schölmerich, *Cell Growth Differ.* **12** (2001) 147-155.
- ¹²² (a) T. Gianferrara, I. Bratsos, E. Alessio, *Dalton Trans.* (2009) 7588-7598; (b) U. Schatzschneider, J. Niesel, I. Ott, R. Gust, H. Alborzina, S. Wölfl, *ChemMedChem* **3** (2008) 1104-1109.
- ¹²³ C. A. Puckett, J. K. Barton, *Biochem.* **47** (2008) 11711-11716.
- ¹²⁴ H. Huang, P. Zhang, B. Yu, Y. Chen, J. Wang, L. Ji, H. Chao, *J. Med. Chem.* **57** (2014) 8971-8983.

7. Prilog

Slika P1. IC spektar liganda **L1**

Slika P2. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L1**

Slika P3. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L1**

Slika P4. ^1H - ^1H COSY NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L1**

Slika P5. ^1H - ^{13}C HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L1**

Slika P6. ^1H - ^{15}N HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L1**

Slika P7. IC spektar liganda **L2**

Slika P8. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L2**

Slika P9. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L2**

Slika P10. ^1H - ^{13}C HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L2**

Slika P11. ^1H - ^{15}N HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L2**

Slika P12. IC spektar liganda **L3**

Slika P13. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) spektar liganda **L3**

Slika P14. IC spektar liganda **L4**

Slika P15. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) spektar liganda **L4**

Slika P16. IC spektar liganda **L5**

Slika P17. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) spektar liganda **L5**

Slika P18. IC spektar liganda **L6**

Slika P19. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L6**

Slika P20. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L6**

Slika P21. Maseni spektar liganda **L6**

Slika P22. IC spektar kompleksa **C1**

Slika P23. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C1**

Slika P24. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C1**

Slika P25. ^1H - ^{13}C HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C1**

Slika P26. ^1H - ^{15}N HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **C1**

Slika P27. Maseni spektar kompleksa **C1**

Slika P28. IC spektar kompleksa **C2**

Slika P29. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C2**

Slika P30. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C2**

Slika P31. ^1H - ^{13}C HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C2**

Slika P32. ^1H - ^{15}N HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **C2**

Slika P33. IC spektar kompleksa **C3**

Slika P34. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C3**

Slika P35. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C3**

Slika P36. Maseni spektar kompleksa **C3**

Slika P37. Stabilnost kompleksa **C3** u DMSO- D_6 u toku 48h.

Slika P38. IC spektar kompleksa **C4**

Slika P39. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C4**

Slika P40. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C4**

Slika P41. Maseni spektar kompleksa **C4**

Slika P42. Stabilnost kompleksa **C4** u DMSO- D_6 u toku 48h

Slika P43. IC spektar kompleksa **C5**

Slika P44. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C5**

Slika P45. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C5**

Slika P46. Maseni spektar kompleksa **C5**

Slika P47. Stabilnost kompleksa **C5** u DMSO- D_6 u toku 48h

Slika P48. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C6**

Slika P49. Maseni spektar kompleksa **C6**

Slika P50. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) spektar kompleksa **C7**

Slika P51. Maseni spektar kompleksa **C7**

Slika P52. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) spektar kompleksa **C8**

Slika P53. Maseni spektar kompleksa **C8**

Slika P54. IC spektar kompleksa **C9**

Slika P55. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) spektar kompleksa **C9**

Slika P56. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) spektar kompleksa **C9**

Slika P57. ^1H - ^1H COSY NMR (500 MHz, CDCl_3) spektar kompleksa **C9**

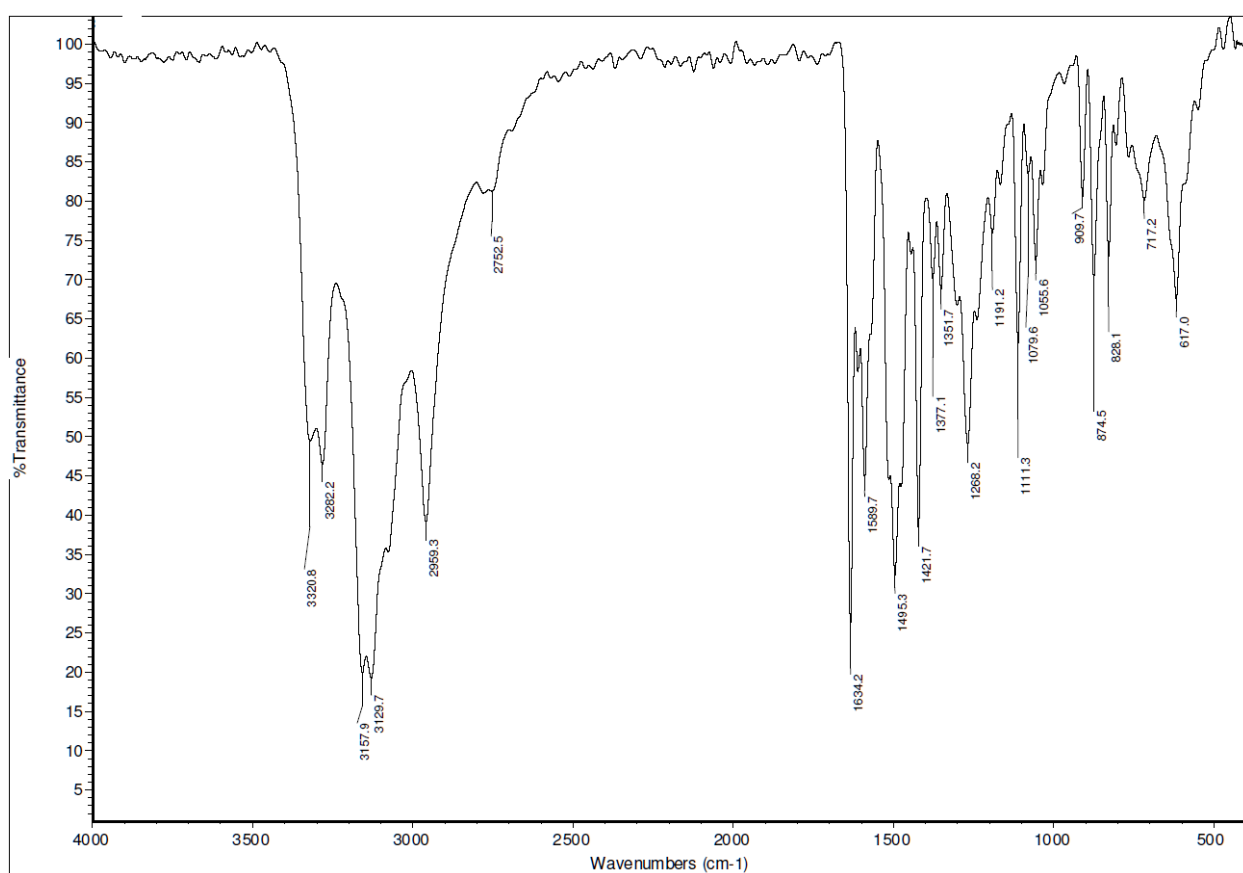
Slika P58. ^1H - ^{13}C HSQC NMR (500 MHz, CDCl_3) spektar kompleksa **C9**

Slika P59. Maseni spektar kompleksa **C9**

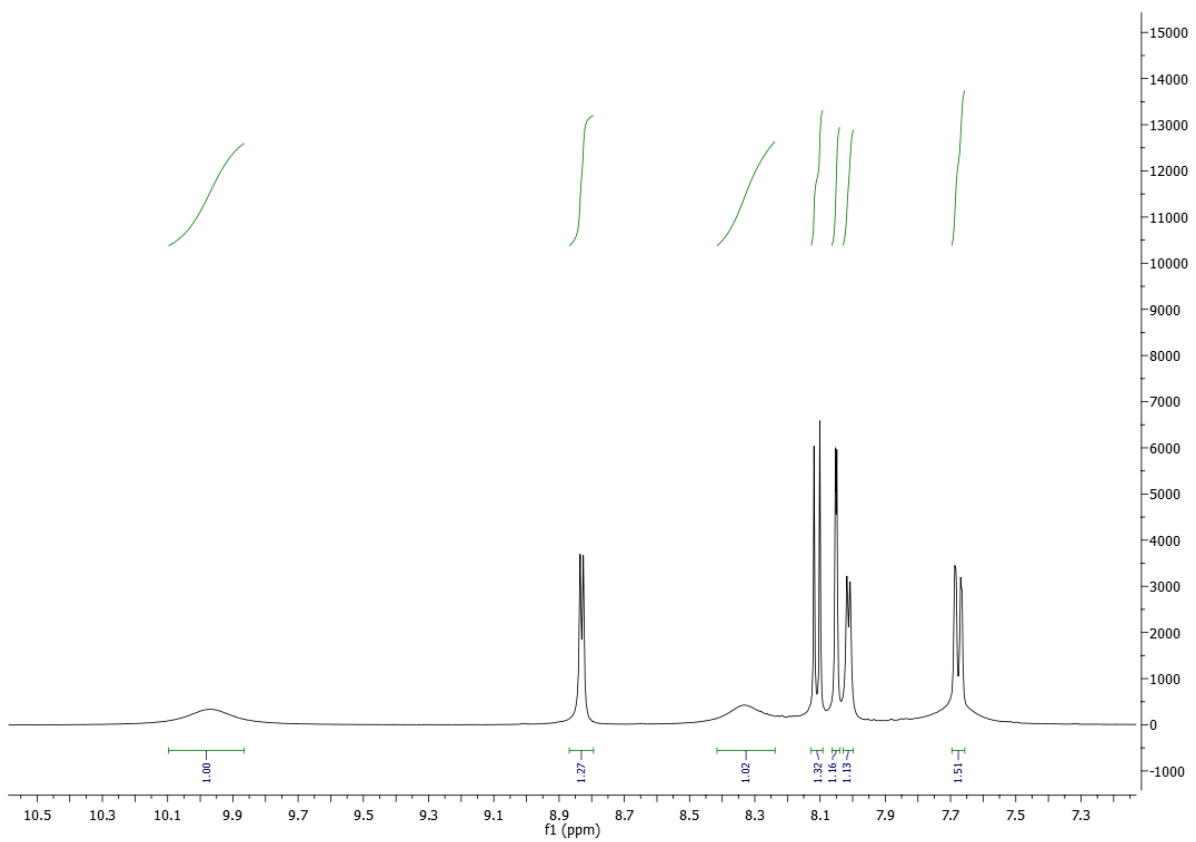
Slika P60. Kristalna struktura **C9**, nacrtana sa 50% elipsoidnog rasipanja

Tabela P1. Uzorak i podaci o kristalu **C9**

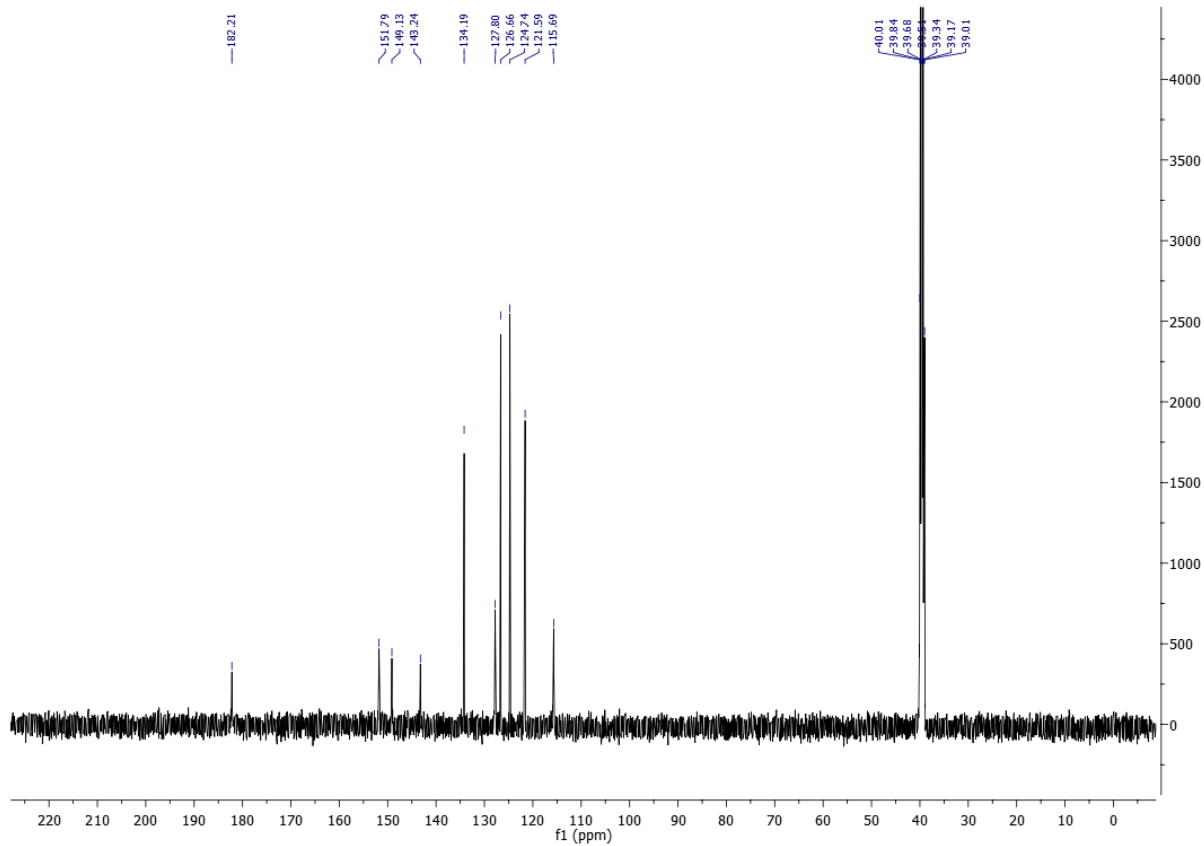
Tabela P2. Sakupljanje podataka i obrada podataka o **C9**



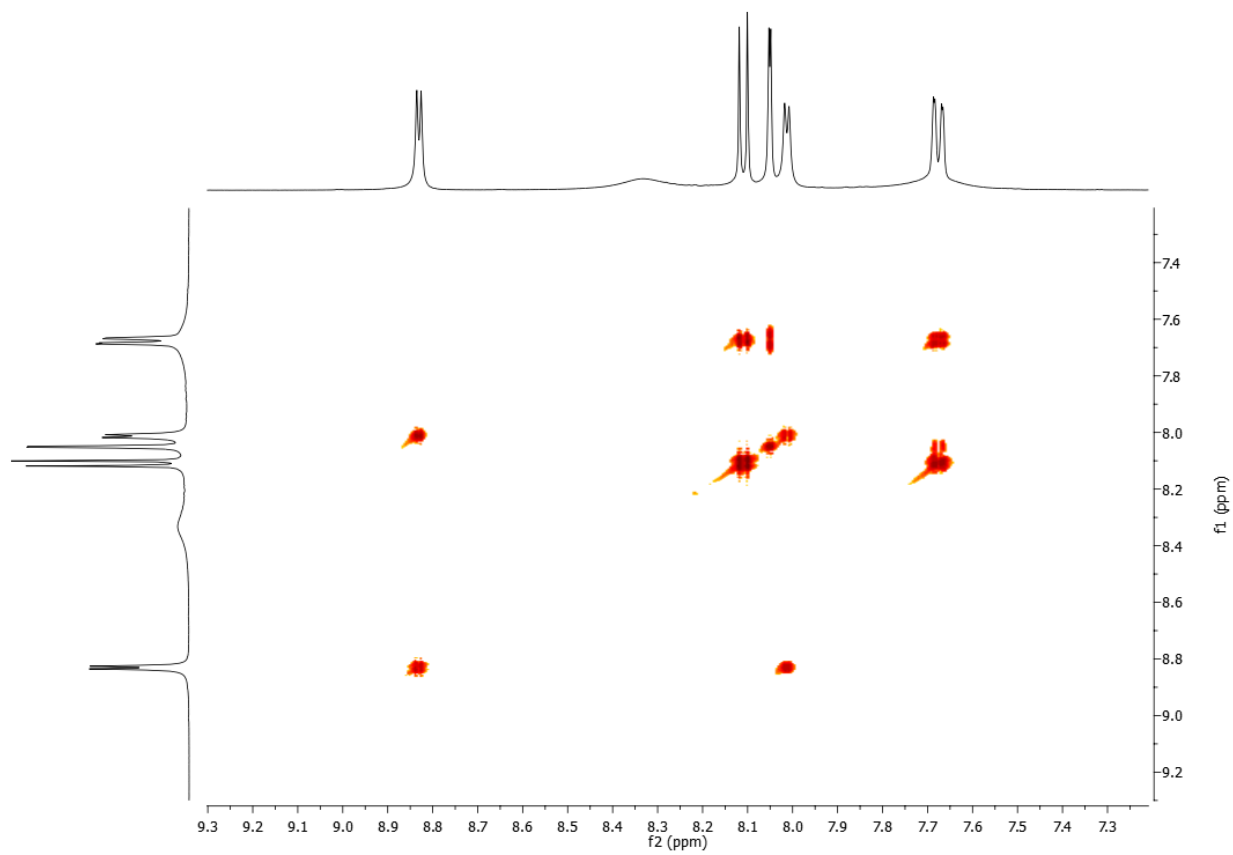
Slika P1. IC spektar liganda L1



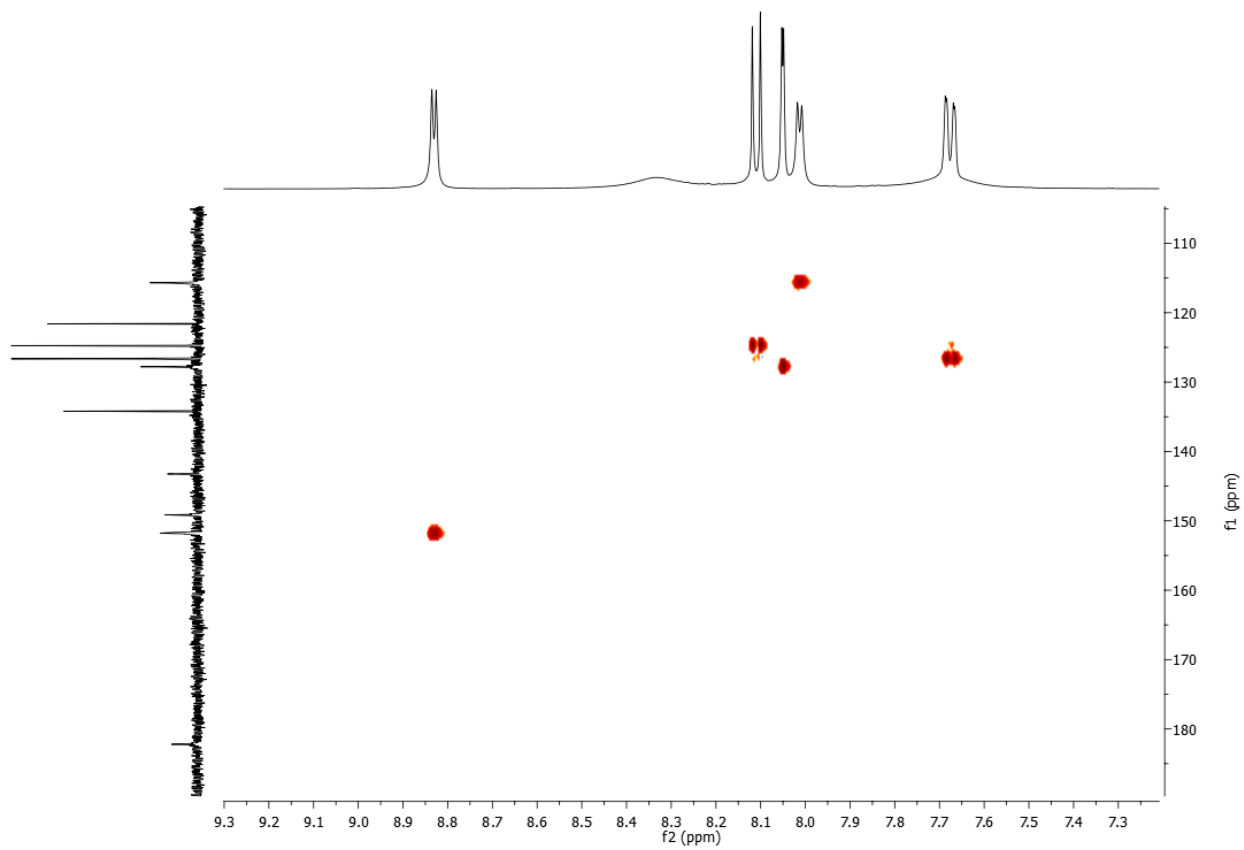
Slika P2. ^1H NMR (500 MHz, DMSO-D_6) spektar liganda **L1**



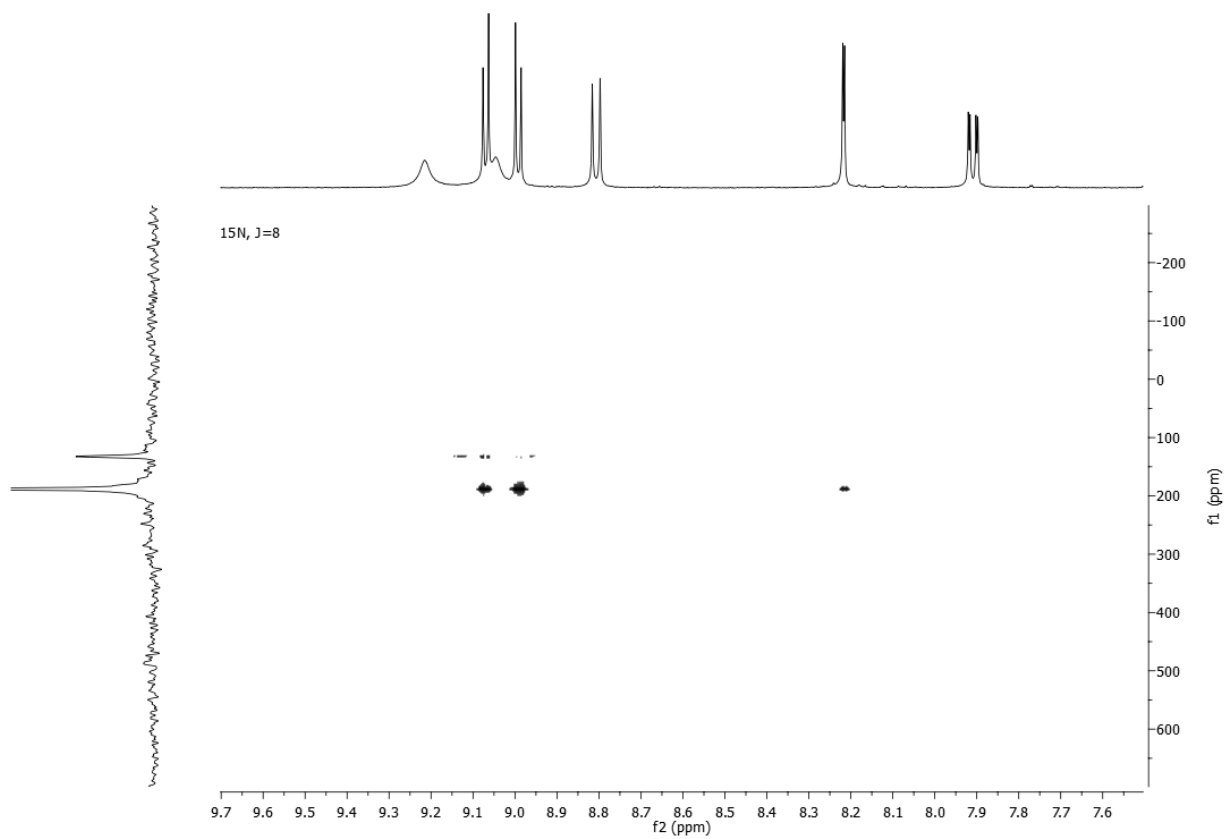
Slika P3. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L1**



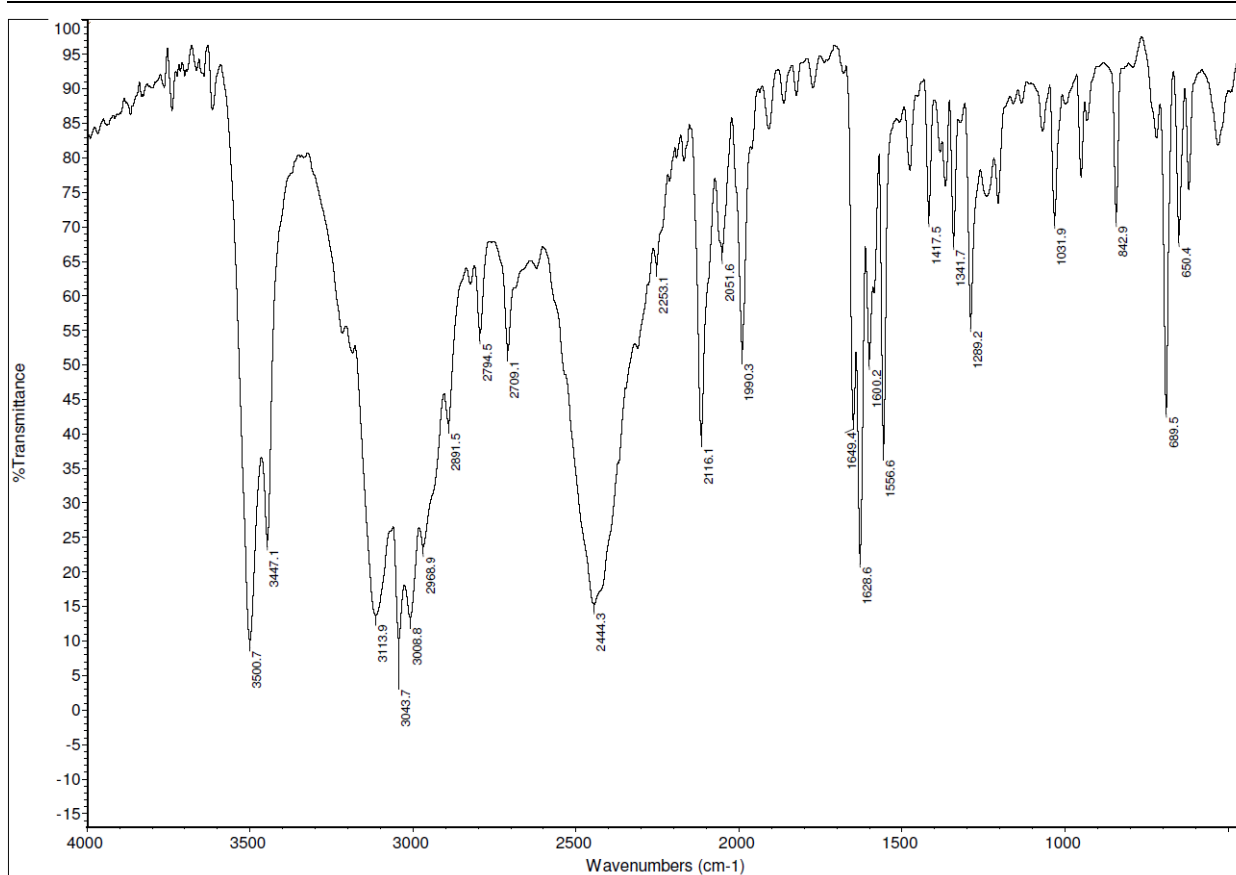
Slika P4. ^1H - ^1H COSY NMR (500 MHz, DMSO-D_6) spektar liganda **L1**



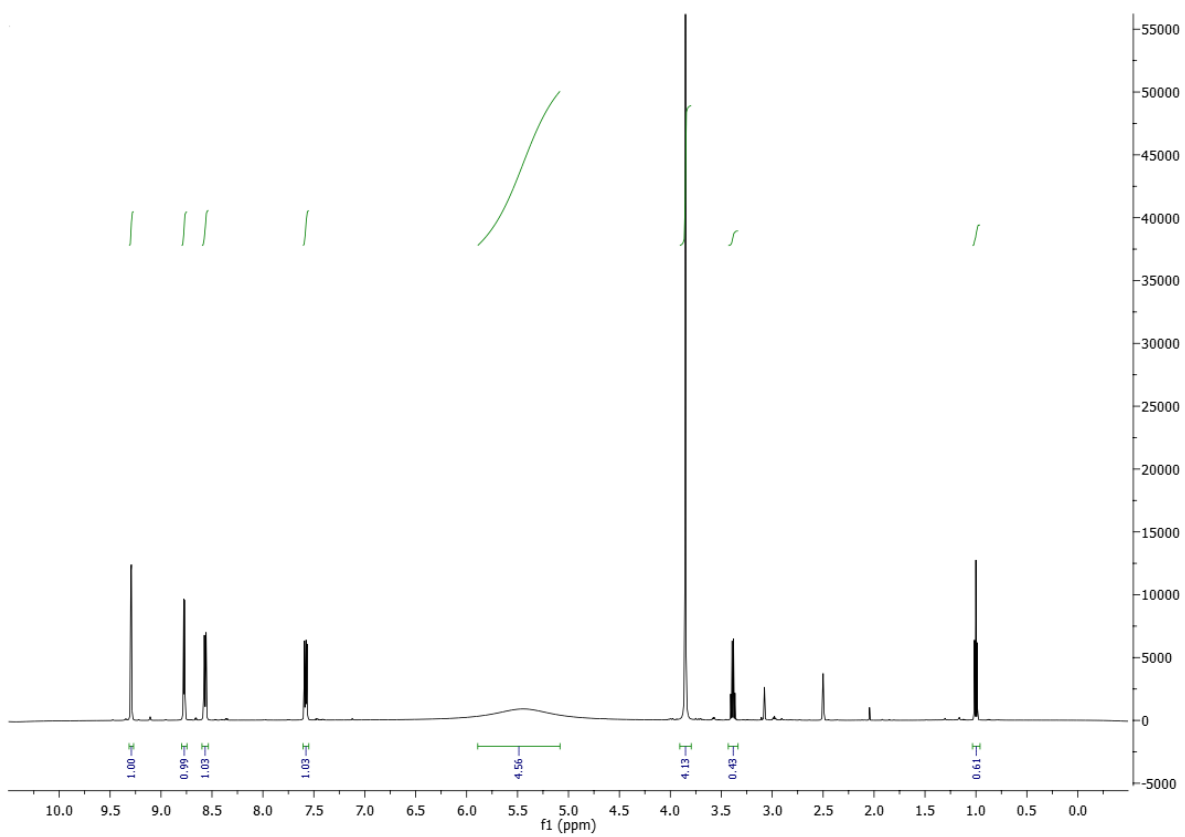
Slika P5. ^1H - ^{13}C HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L1**



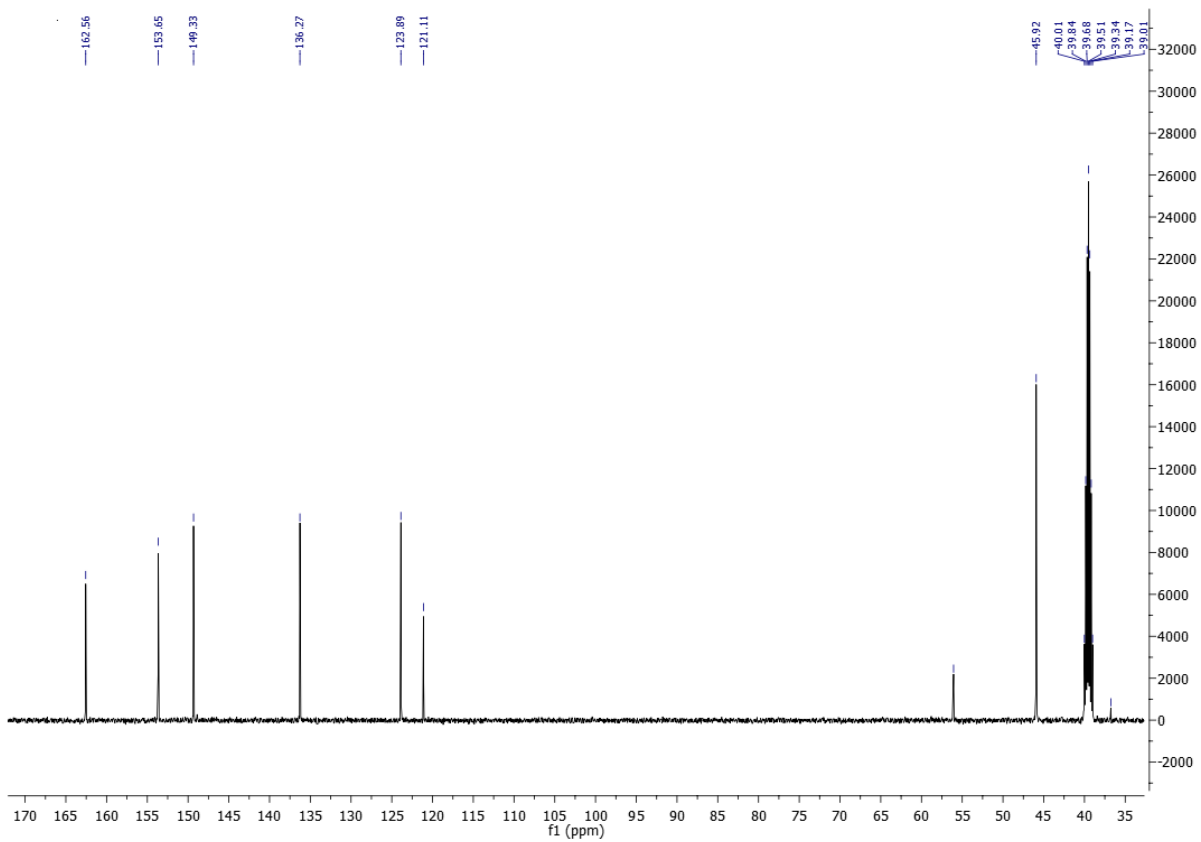
Slika P6. ^1H - ^{15}N HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L1**



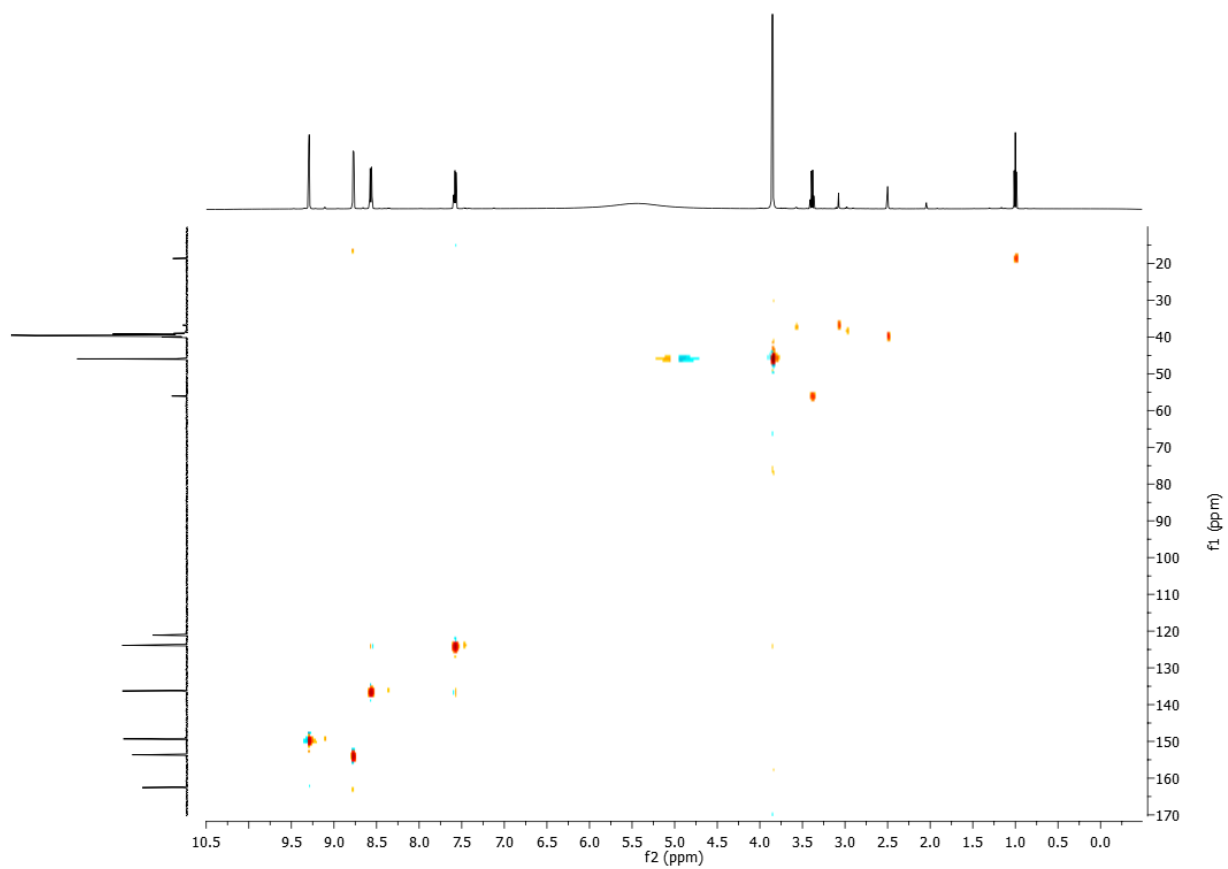
Slika P7. IC spektar liganda L2



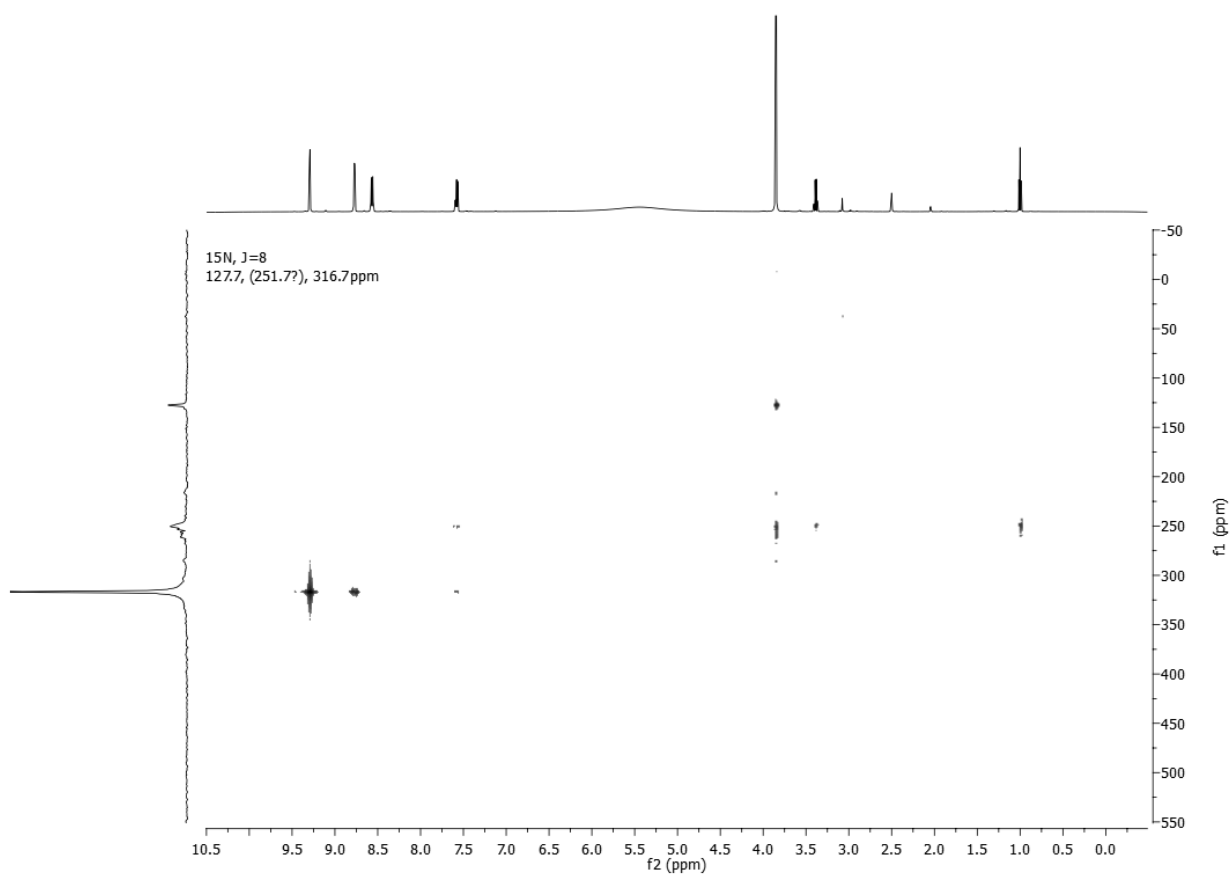
Slika P8. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}D_6$) spektar liganda L2



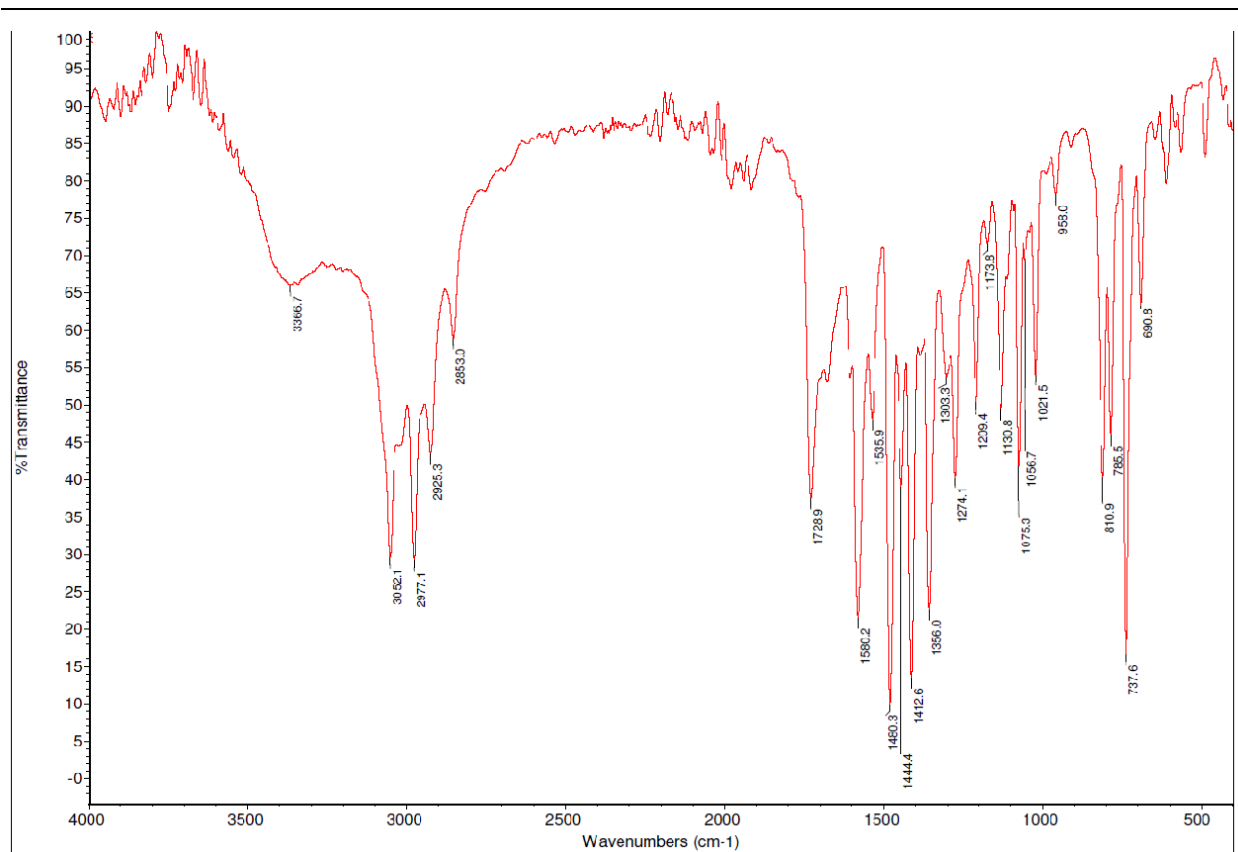
Slika P9. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda L2



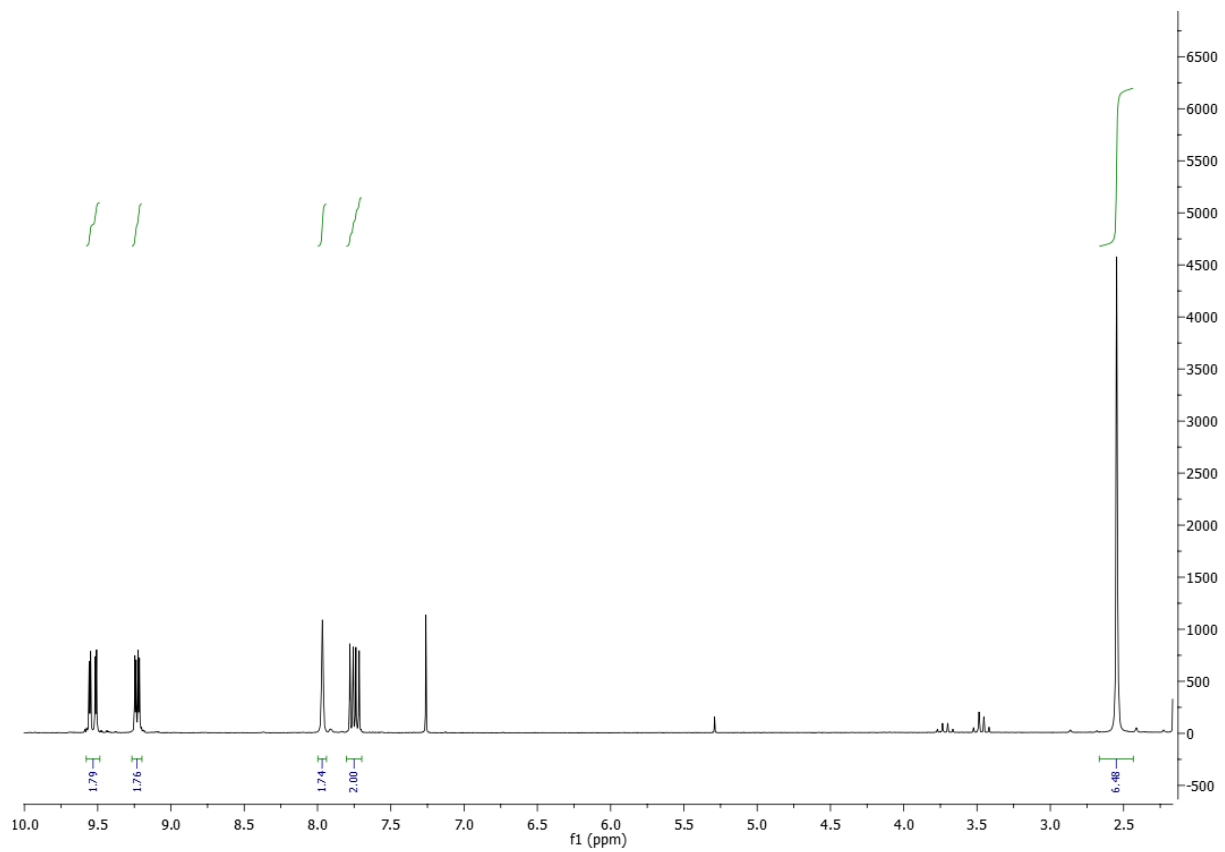
Slika P10. ^1H - ^{13}C HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L2**



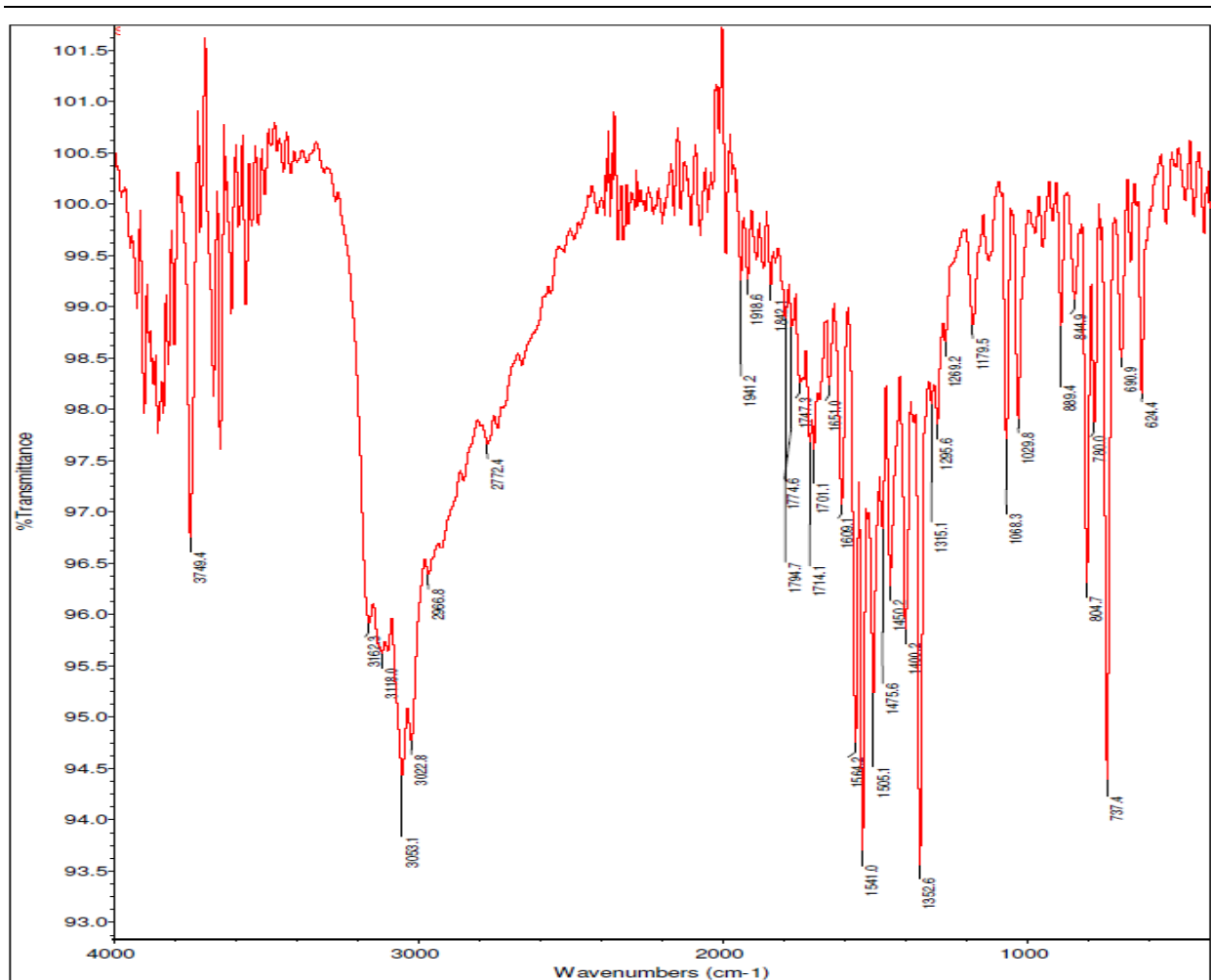
Slika P11. ^1H - ^{15}N HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **L2**



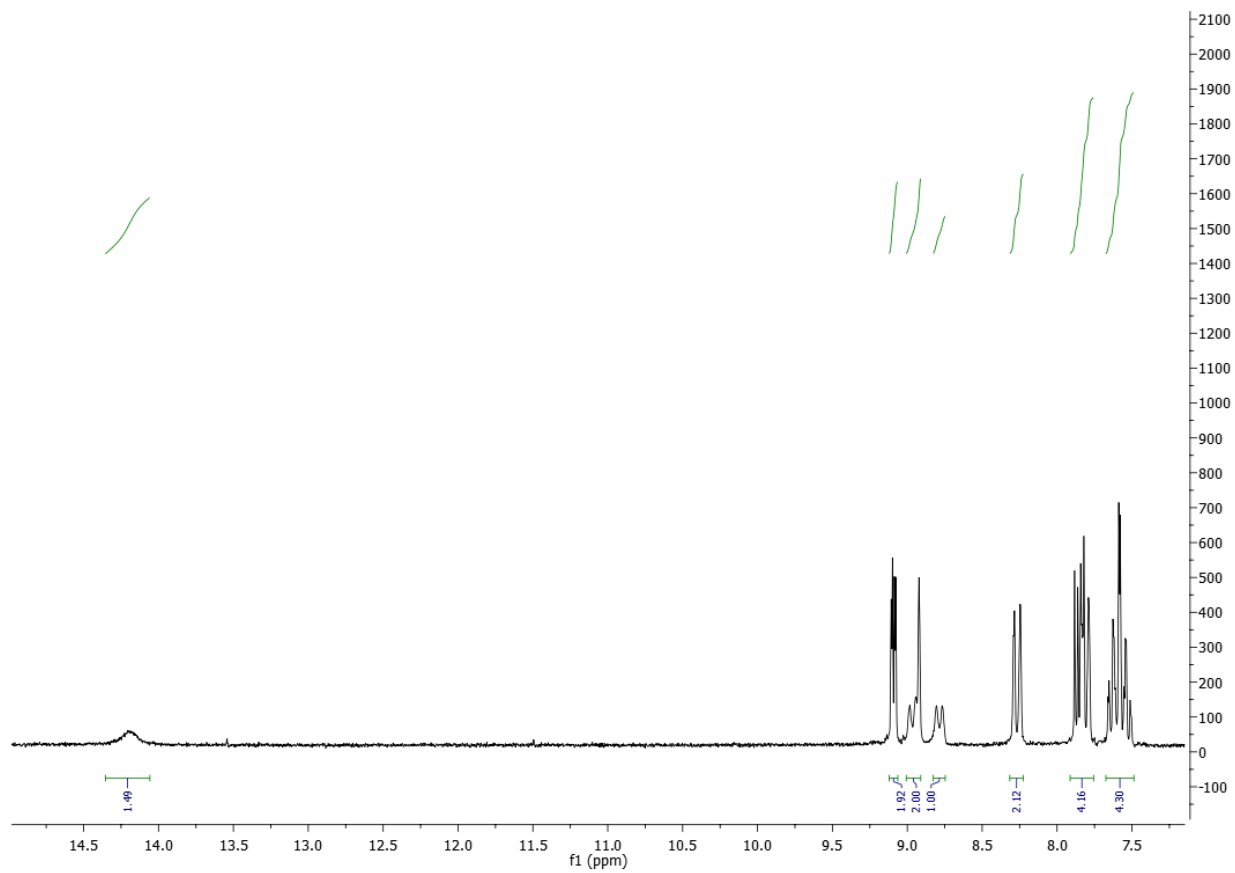
Slika P12. IC spektar liganda L3



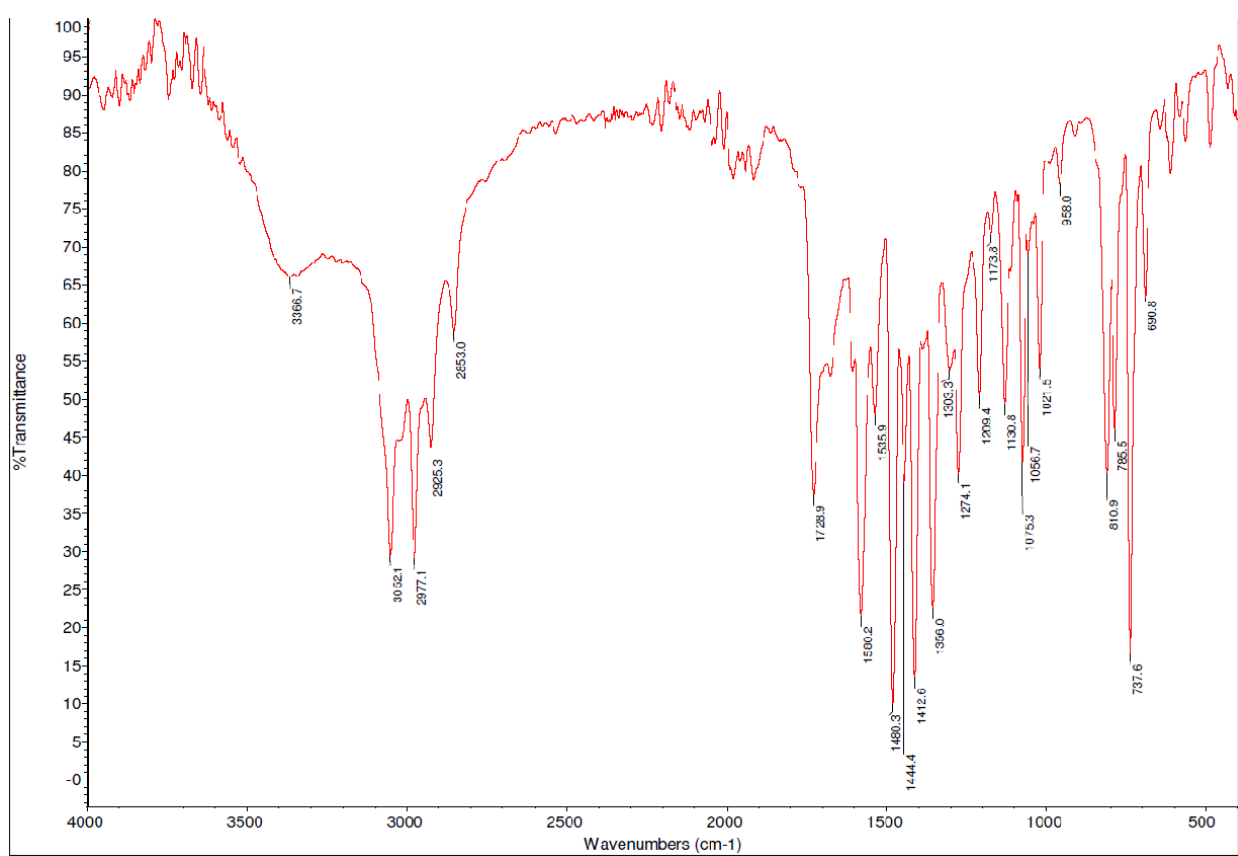
Slika P13. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) spektar liganda L3



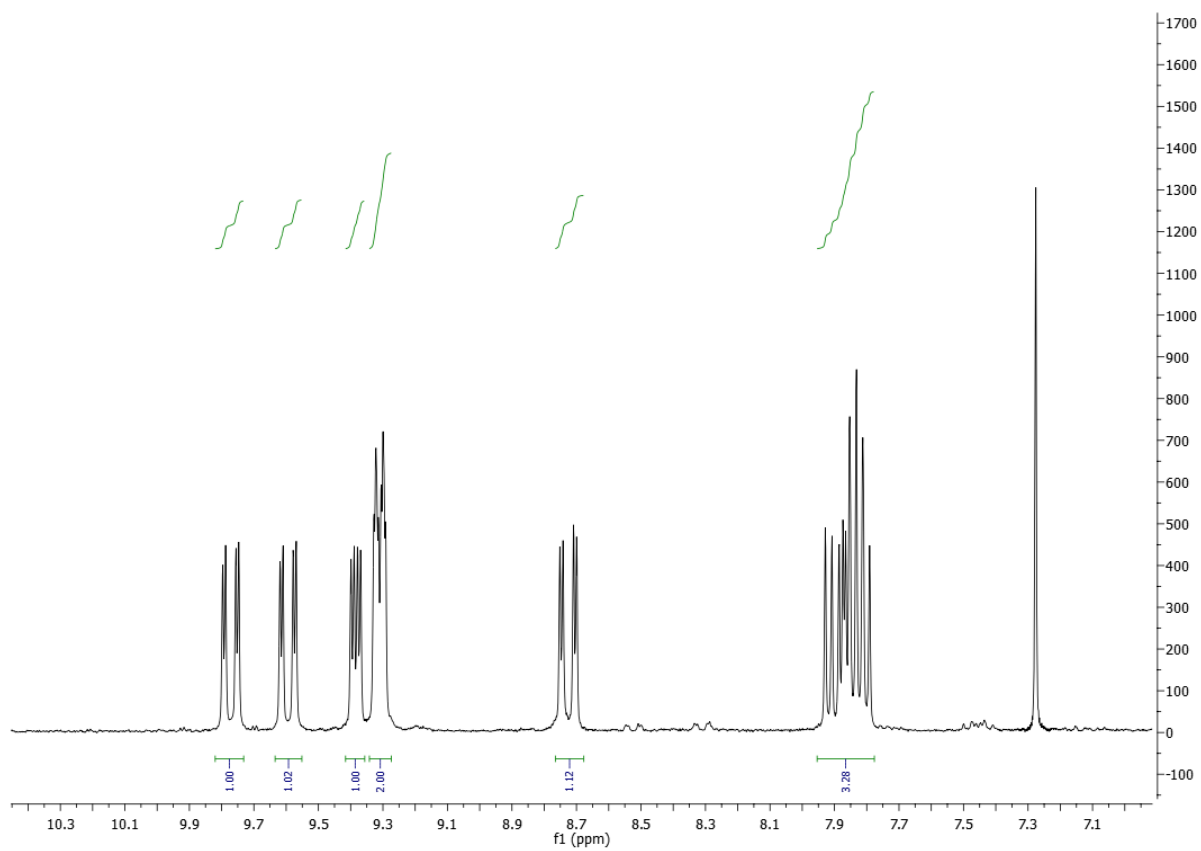
Slika P14. IC spektar liganda **L4**



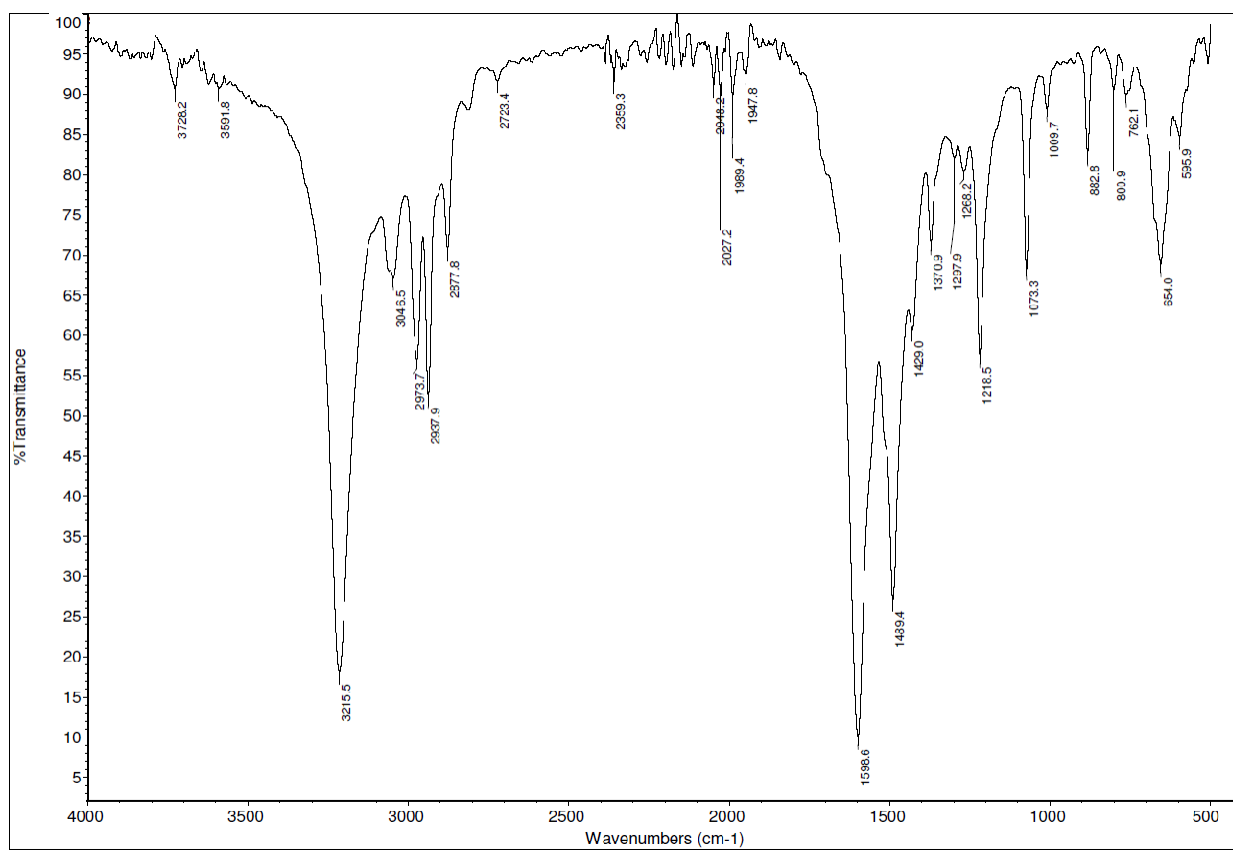
Slika P15. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) spektar liganda **L4**



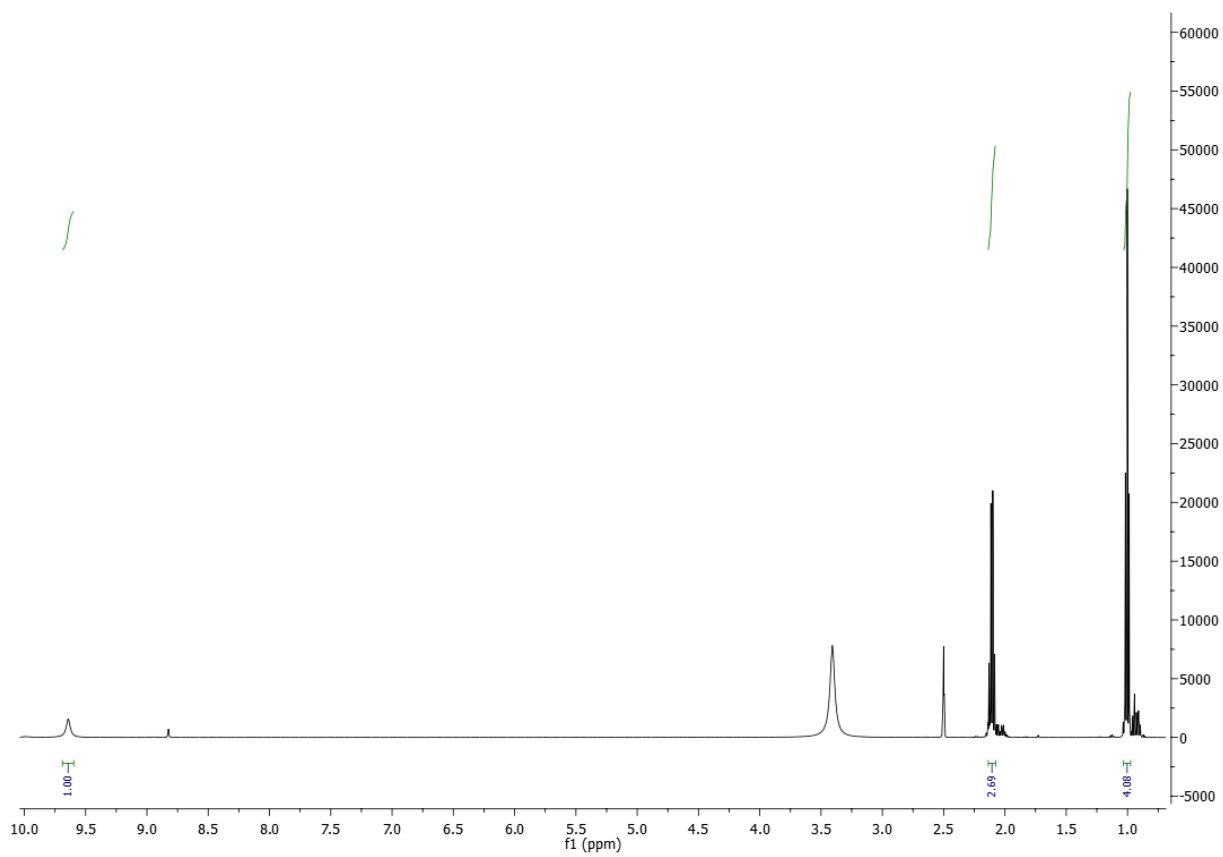
Slika P16. IC spektar liganda **L5**



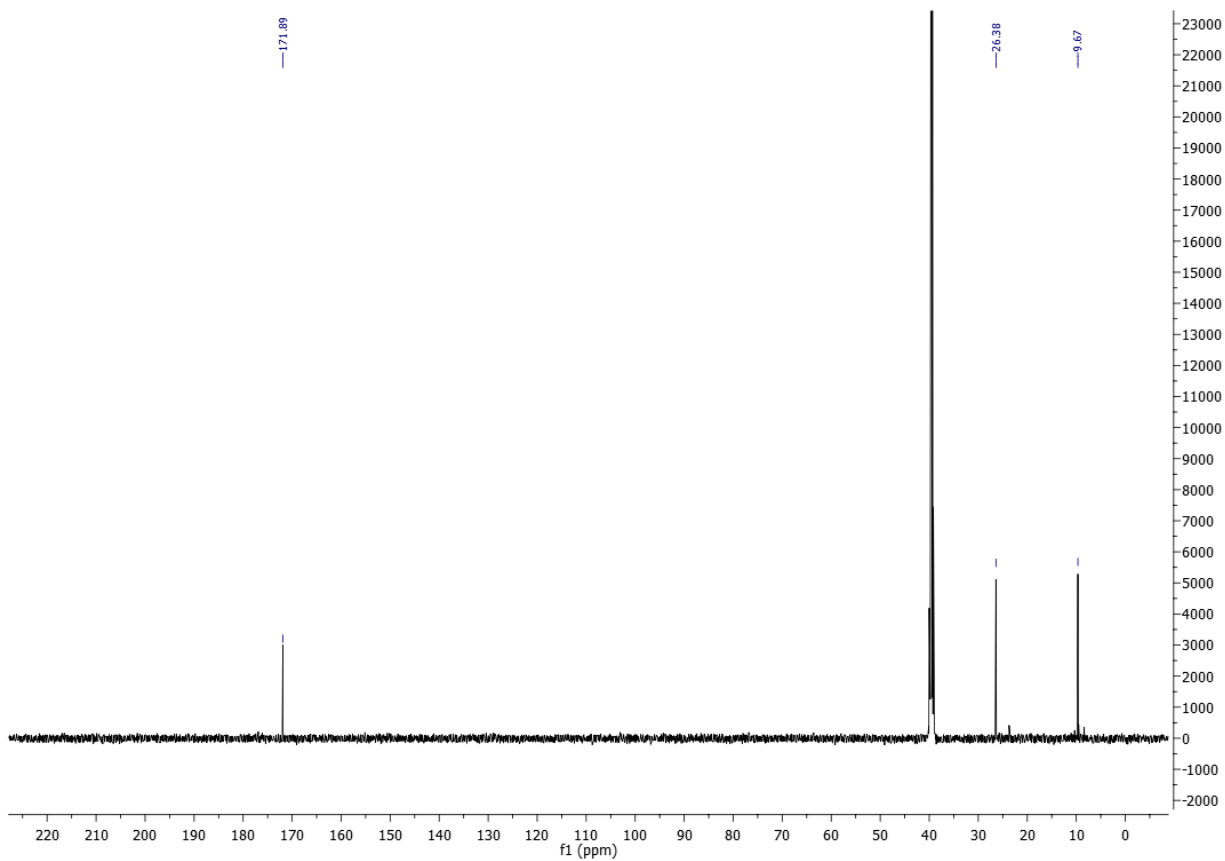
Slika P17. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) spektar liganda L5



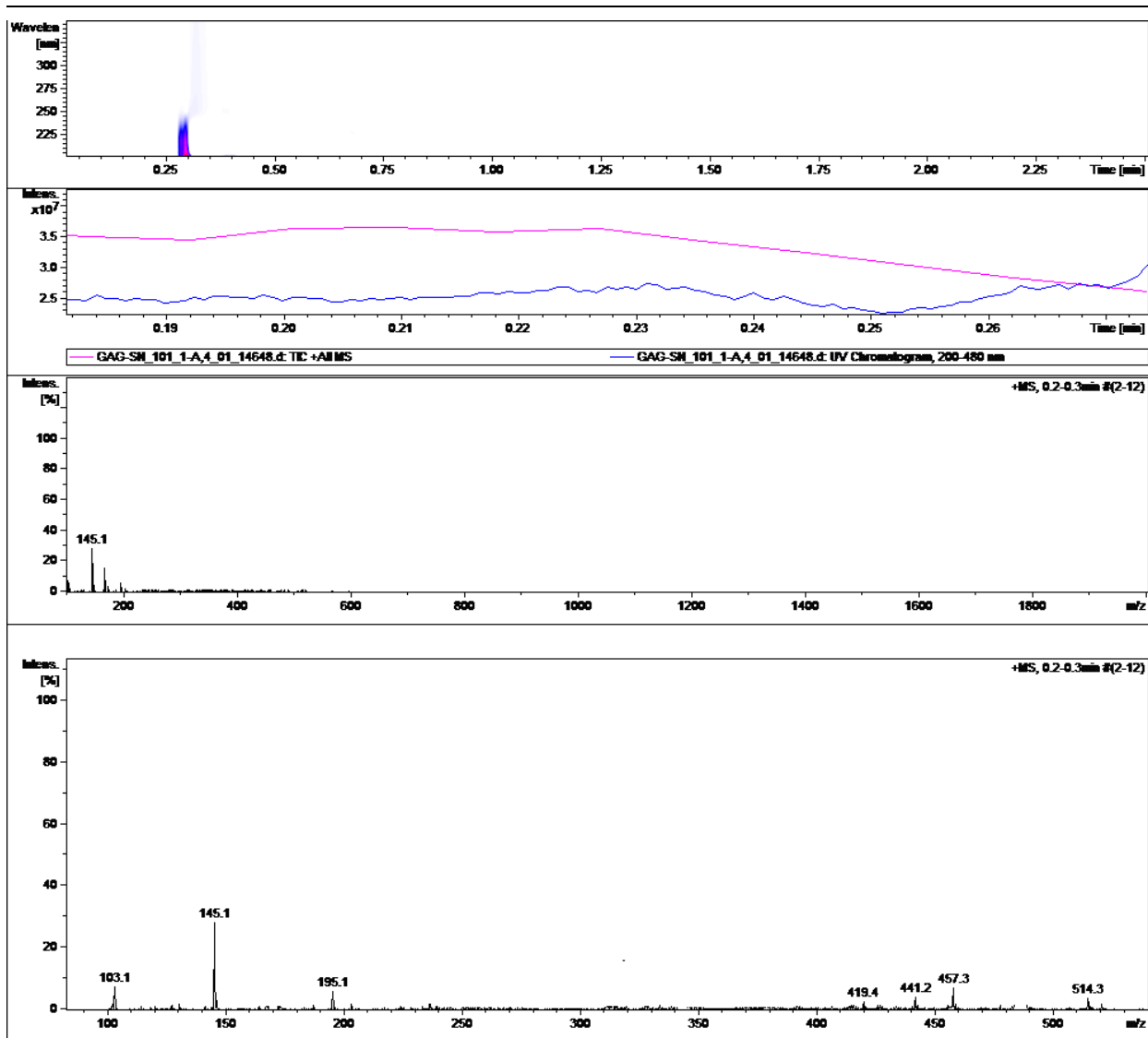
Slika P18. IC spektar liganda L6



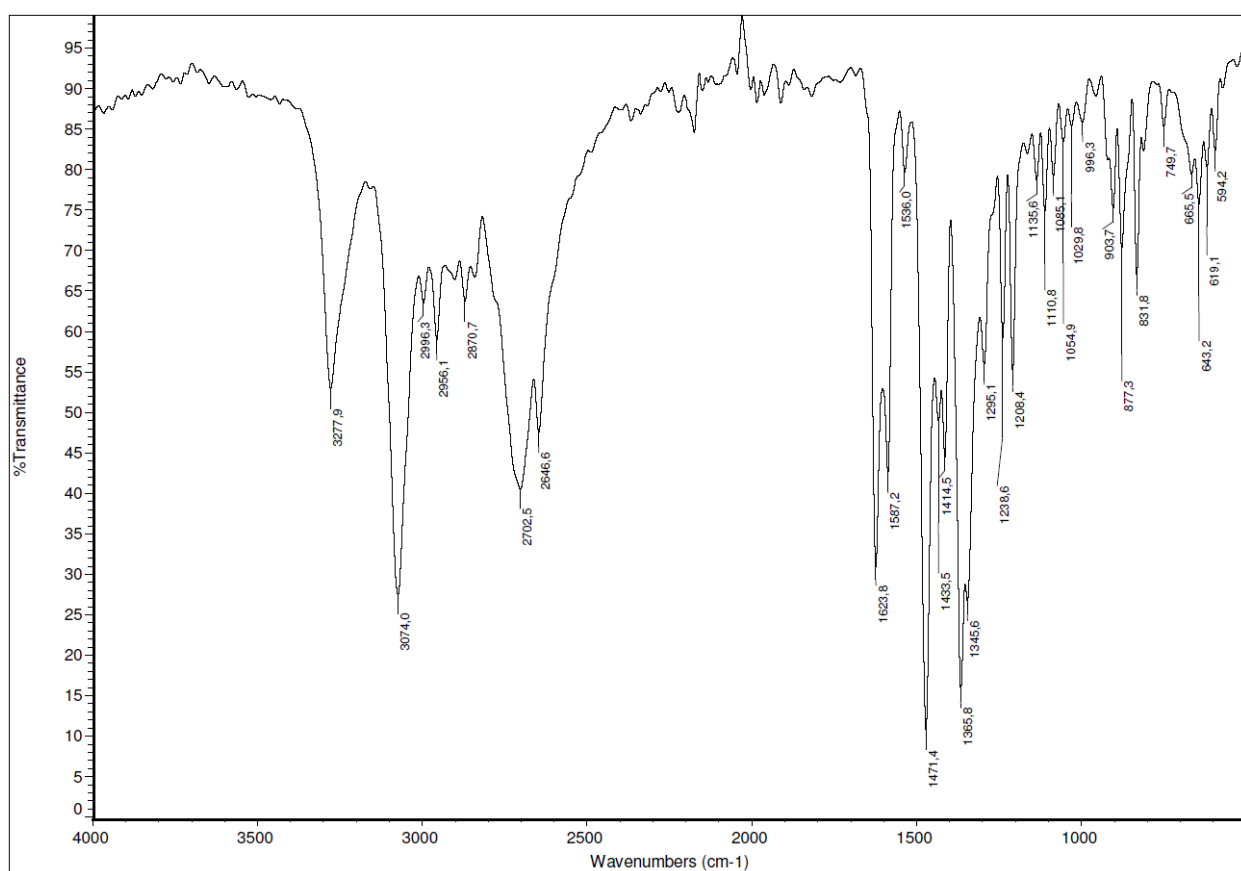
Slika P19. ^1H NMR (500 MHz, DMSO-D_6) spektar liganda L6



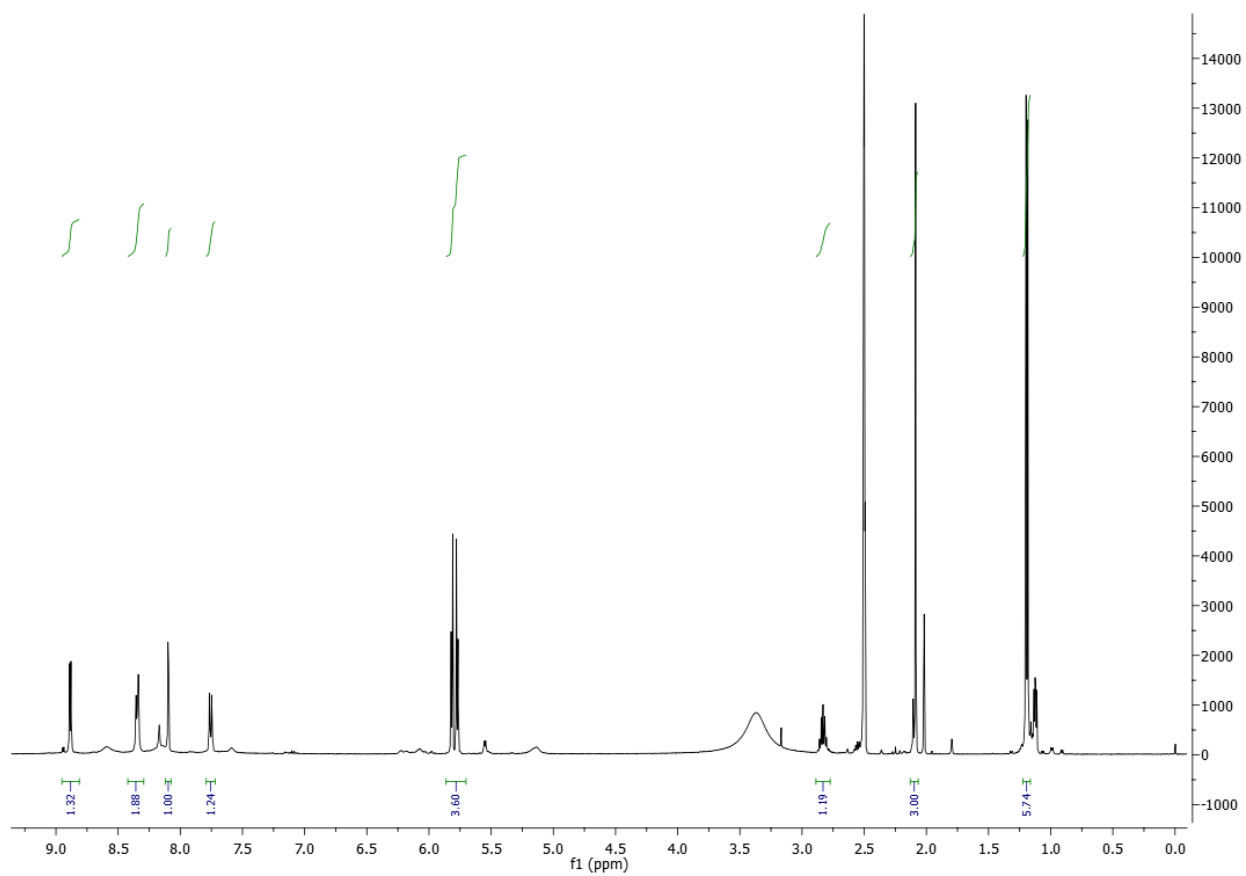
Slika P20. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-D_6) spektar liganda **L6**



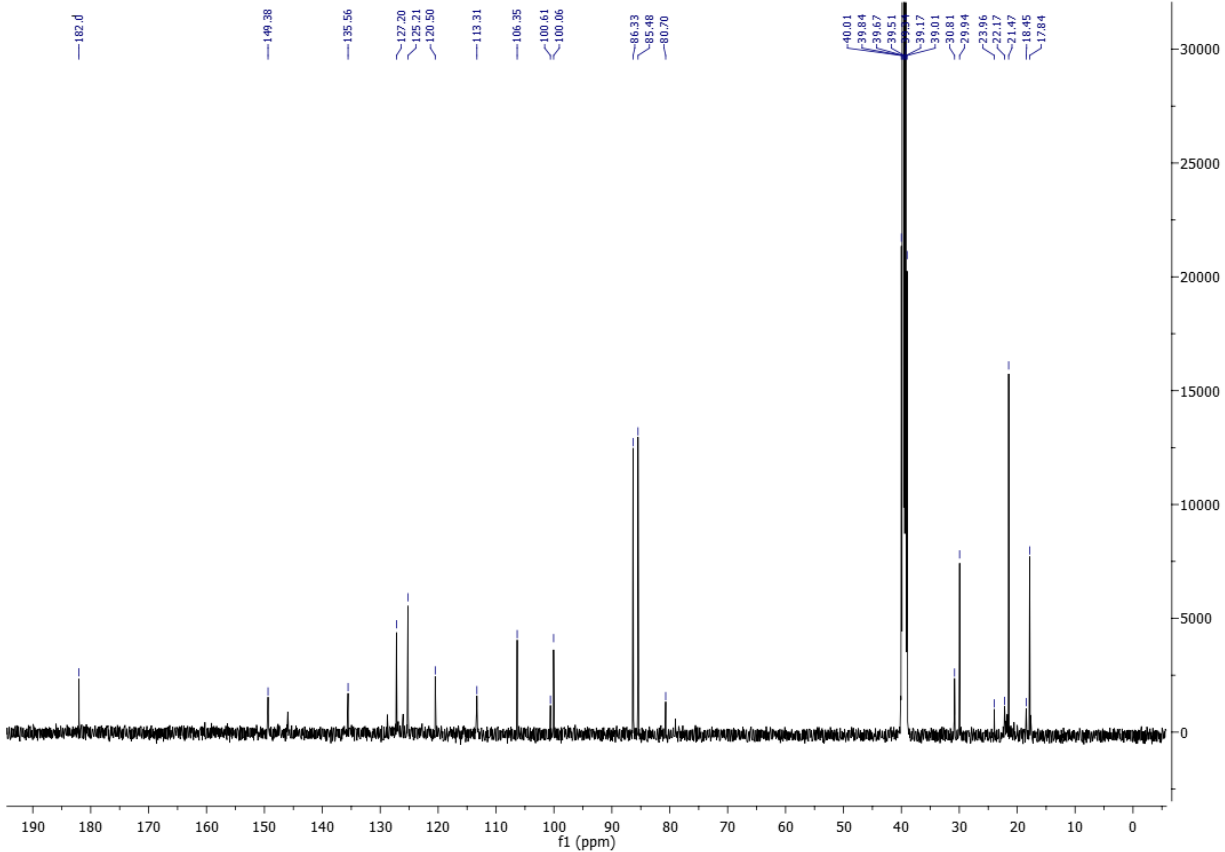
Slika P21. Maseni spektar liganda L6



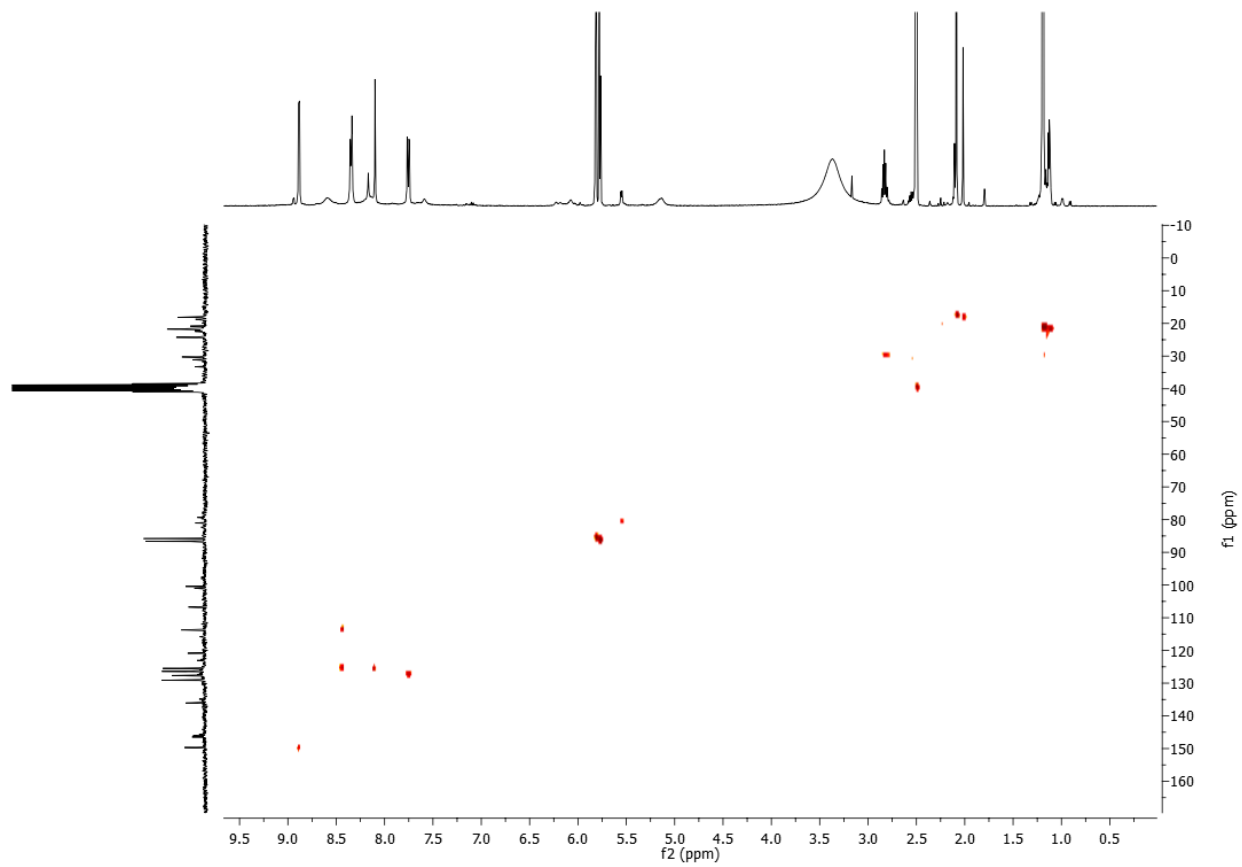
Slika P22. IC spektar kompleksa C1



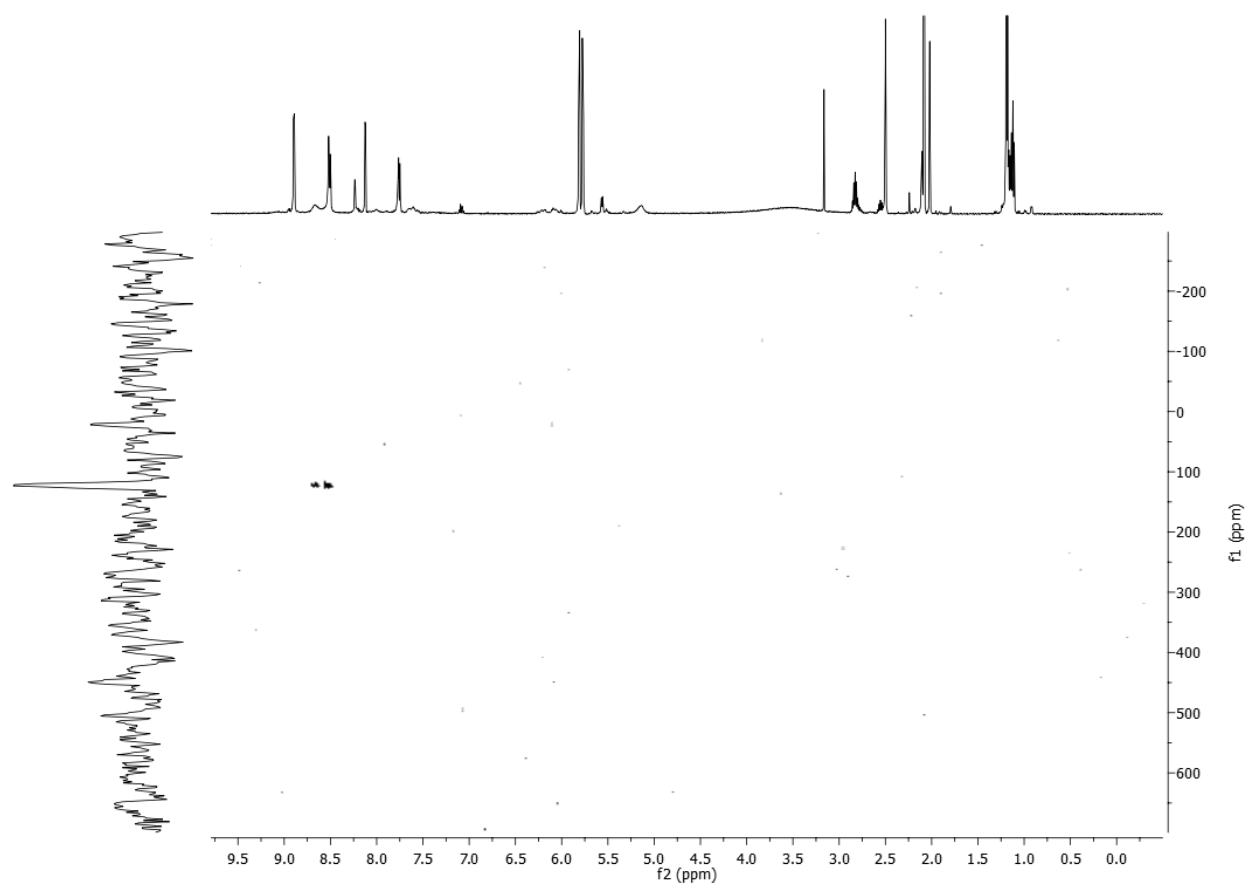
Slika P23. ^1H NMR (500 MHz, DMSO-D_6) spektar kompleksa C1



Slika P24. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-D_6) spektar kompleksa **C1**

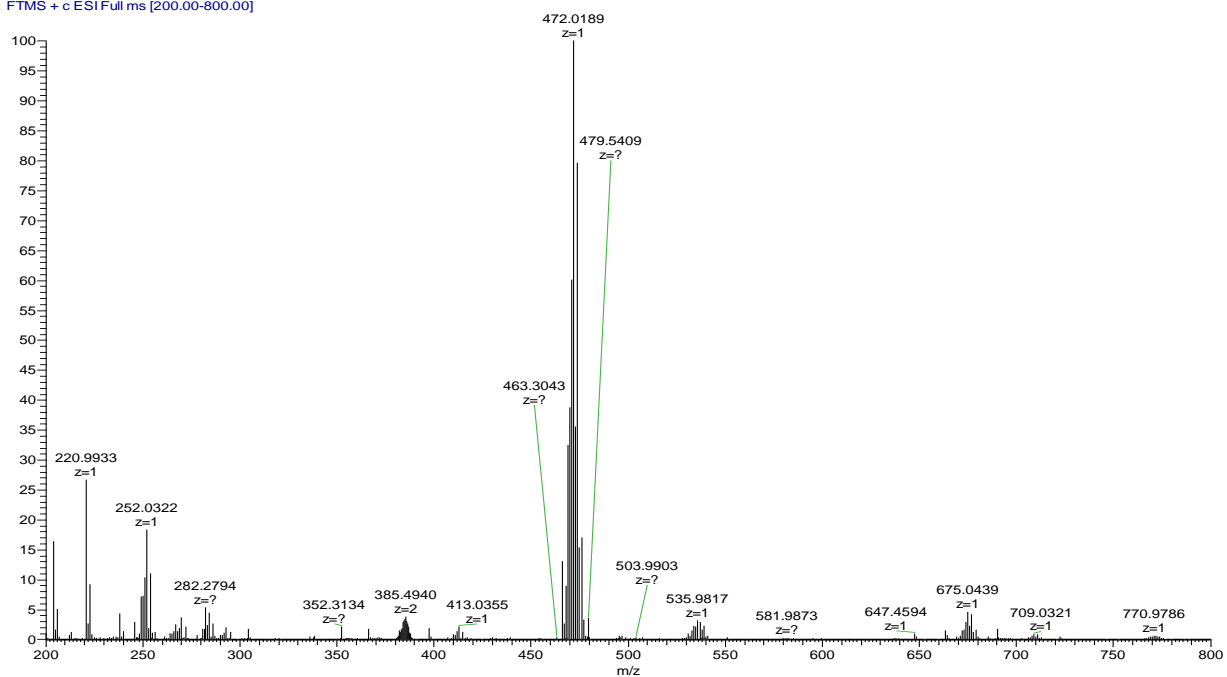


Slika P25. ^1H - ^{13}C HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C1**

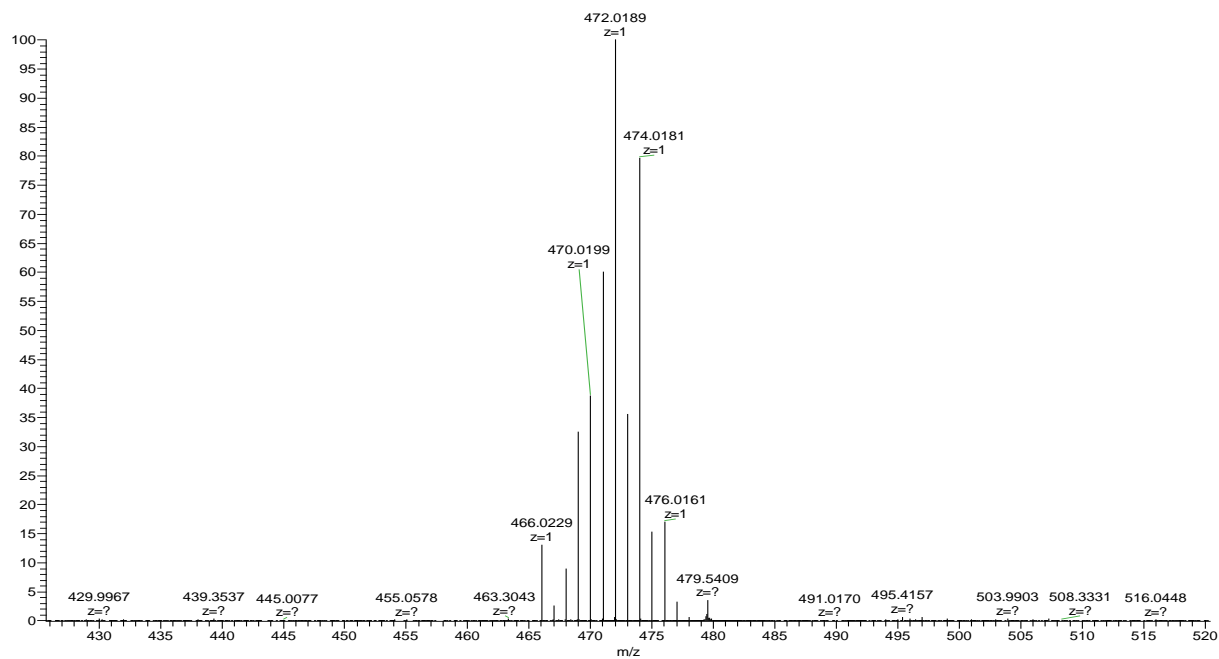


Slika P26. ^1H - ^{15}N HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **C1**

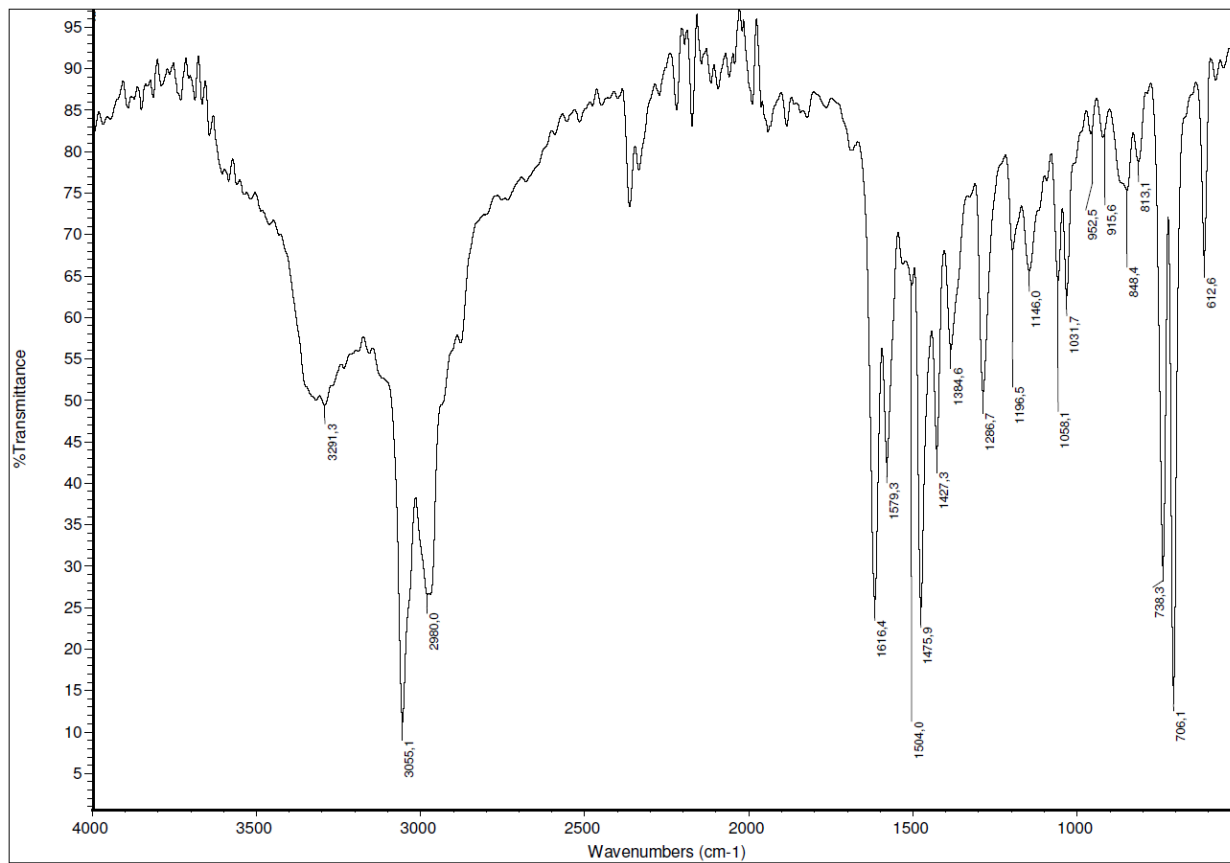
OB1733 #1-127 RT: 0.01-1.00 AV: 127 NL: 6.71E7
T: FTMS + c ESI Full ms [200.00-800.00]



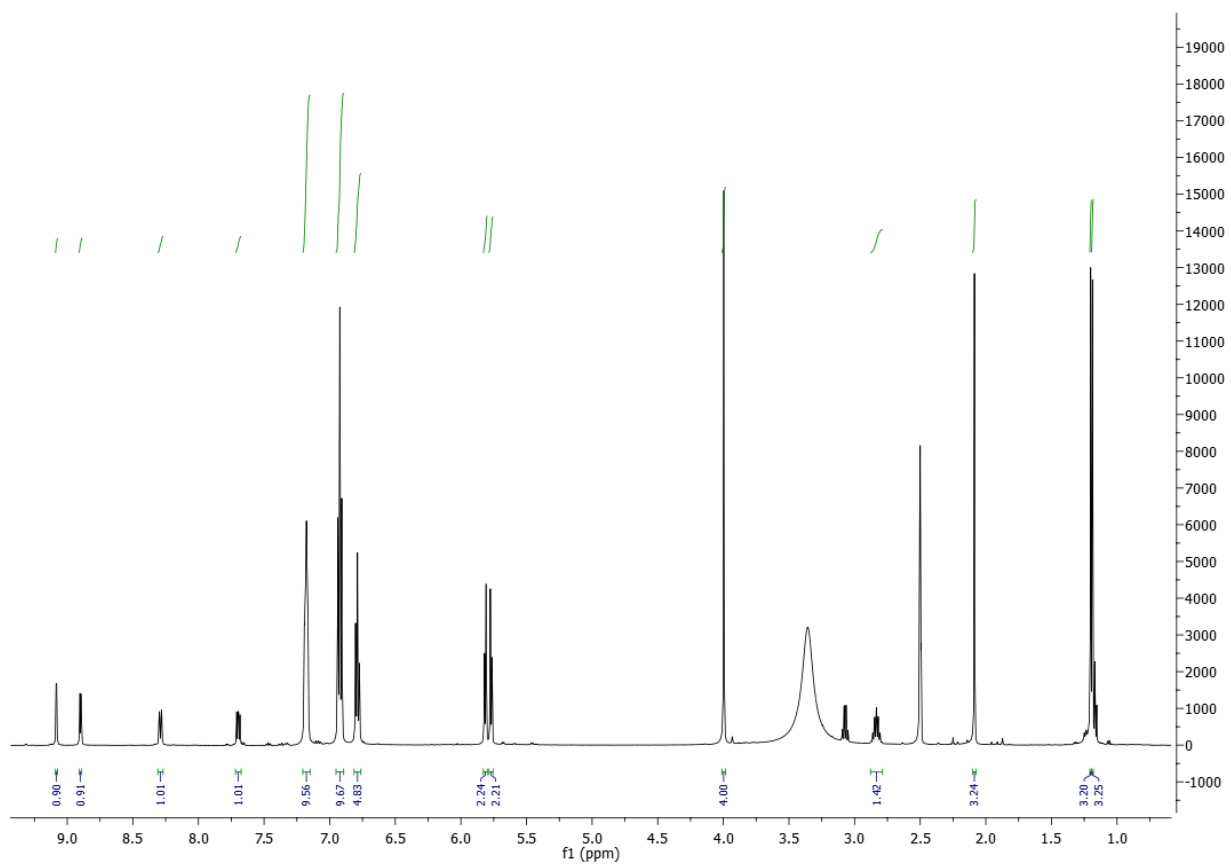
OB1733 #1-127 RT: 0.01-1.00 AV: 127 NL: 6.71E7
T: FTMS + c ESI Full ms [200.00-800.00]



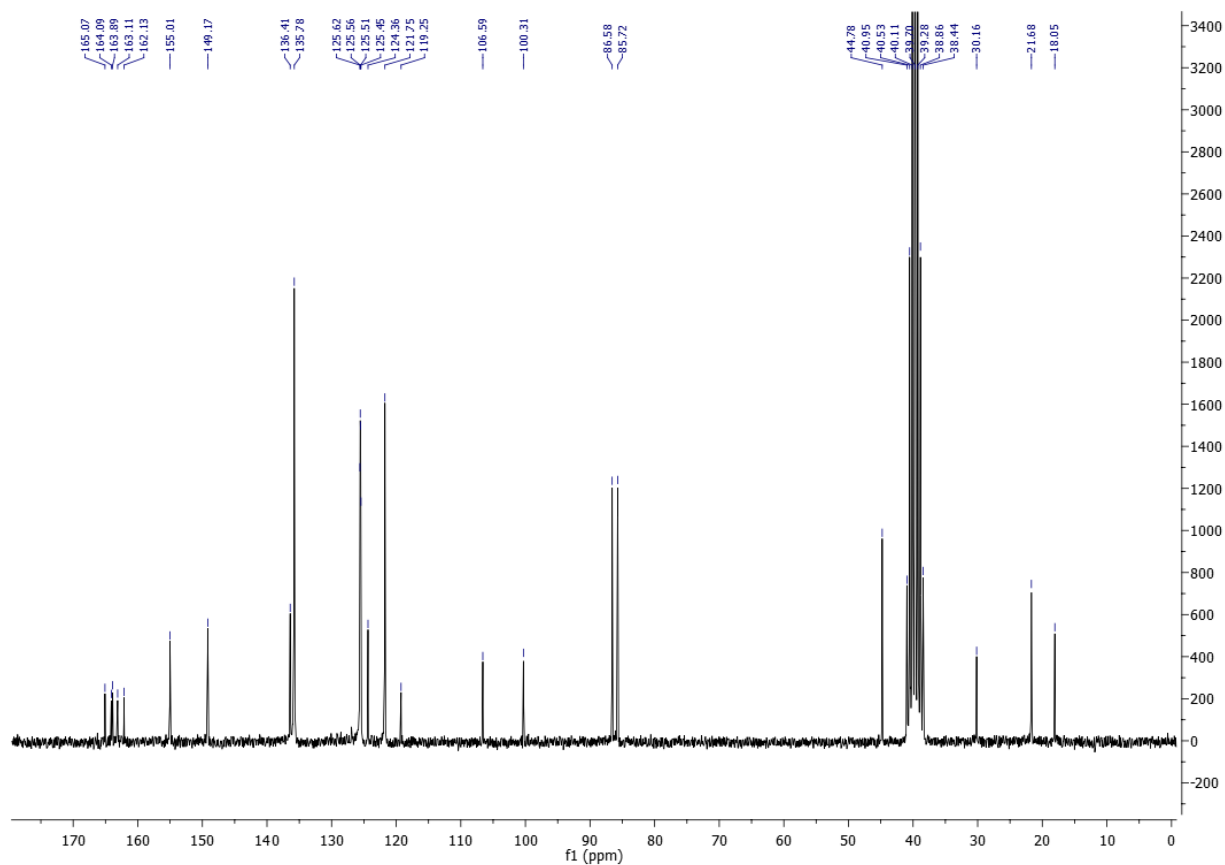
Slika P27. Maseni spektar kompleksa C1



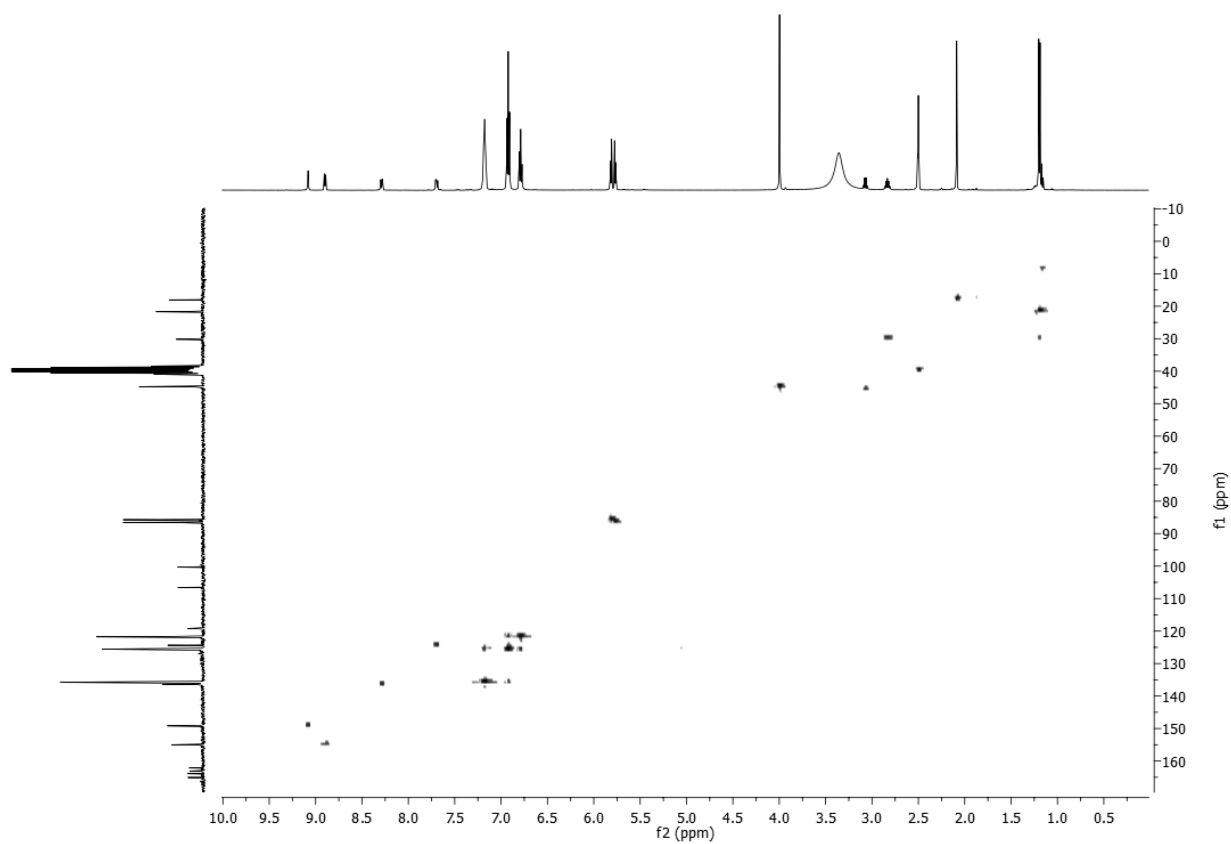
Slika P28. IC spektar kompleksa **C2**



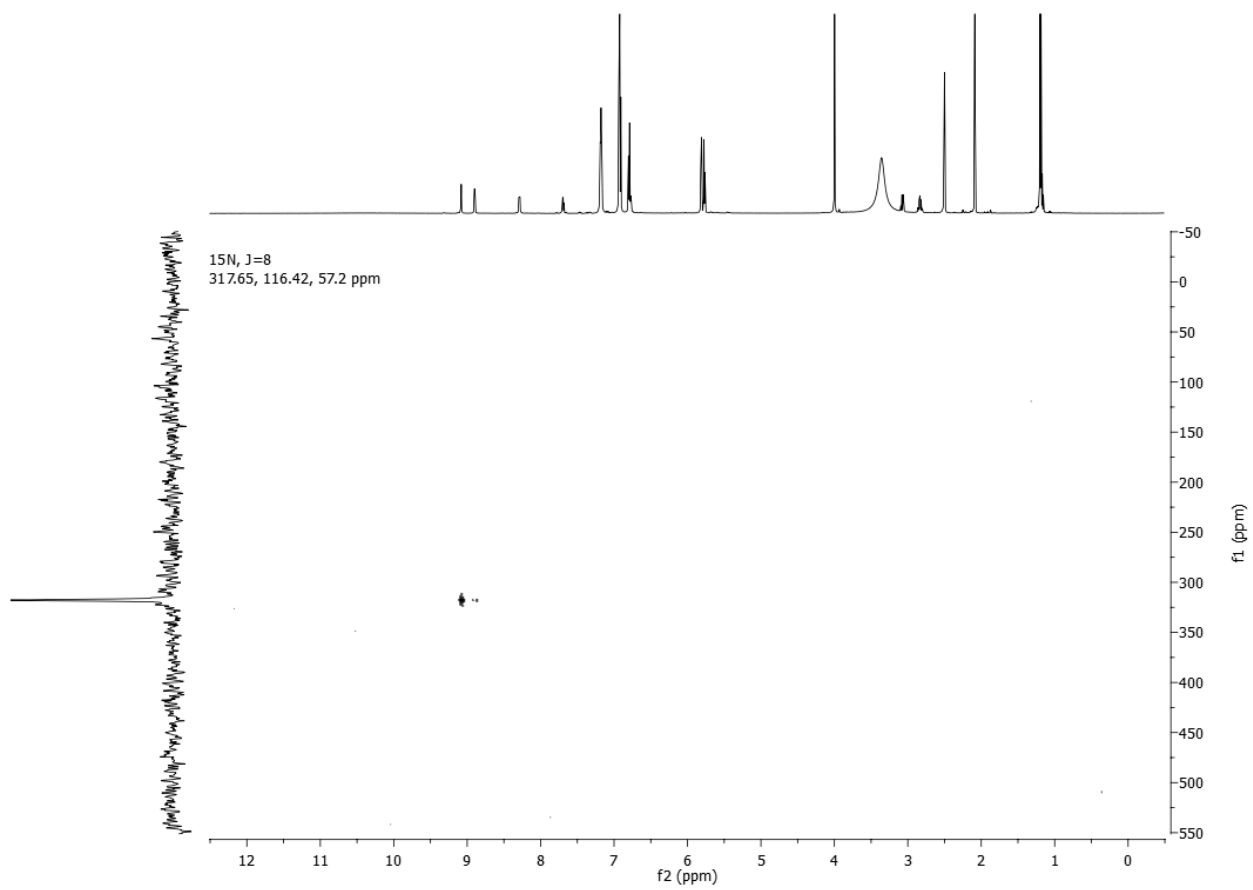
Slika P29. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C2**



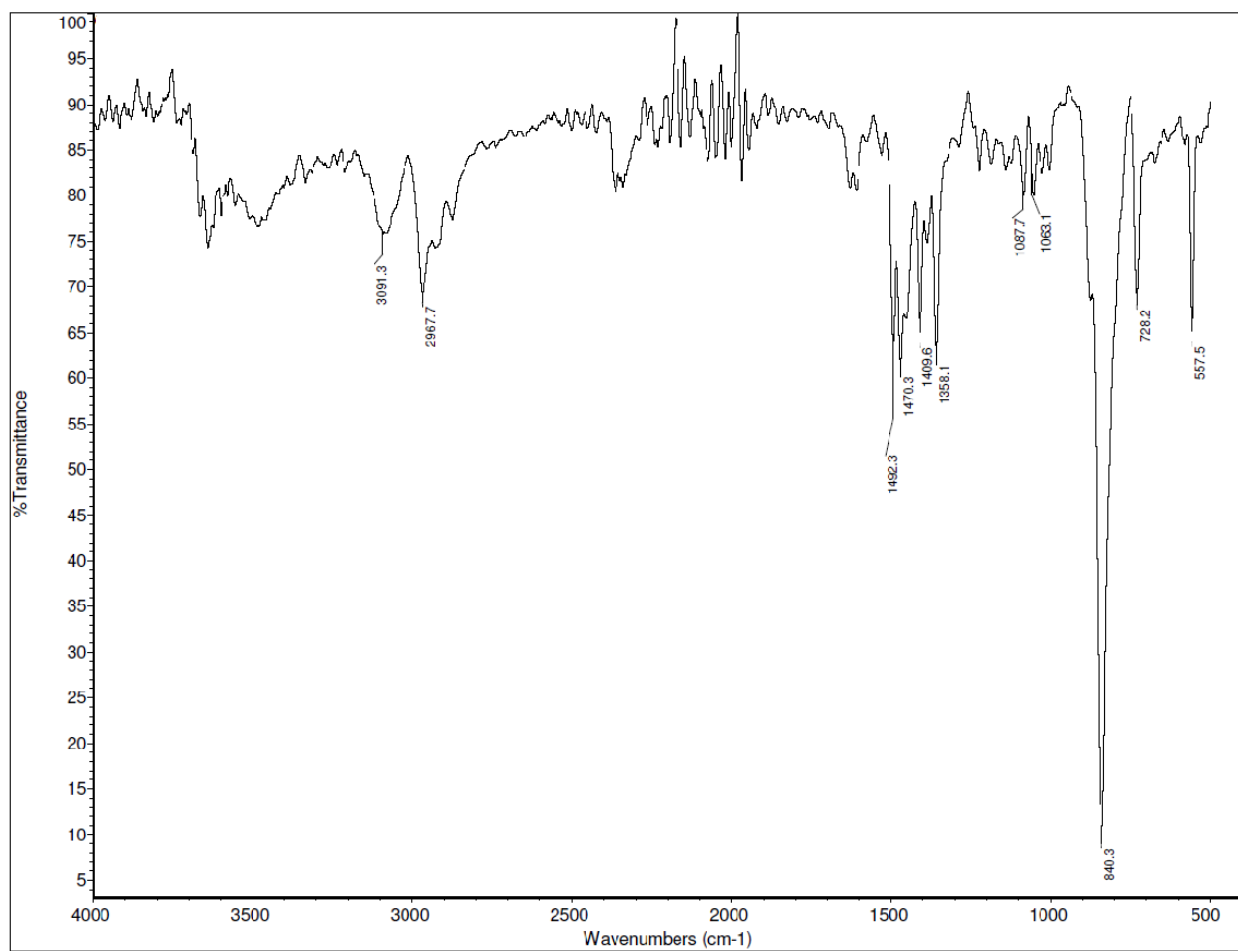
Slika P30. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-D_6) spektar kompleksa **C2**



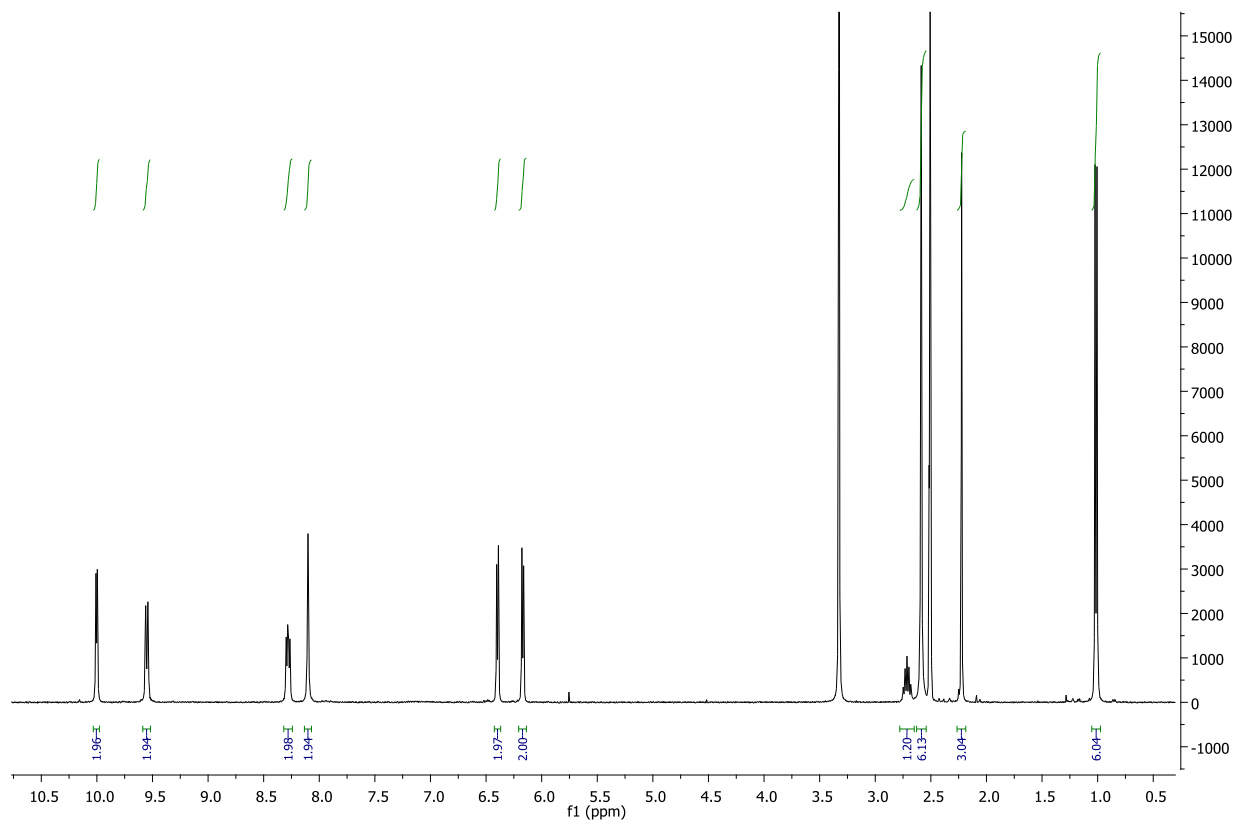
Slika P31. ^1H - ^{13}C HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C2**



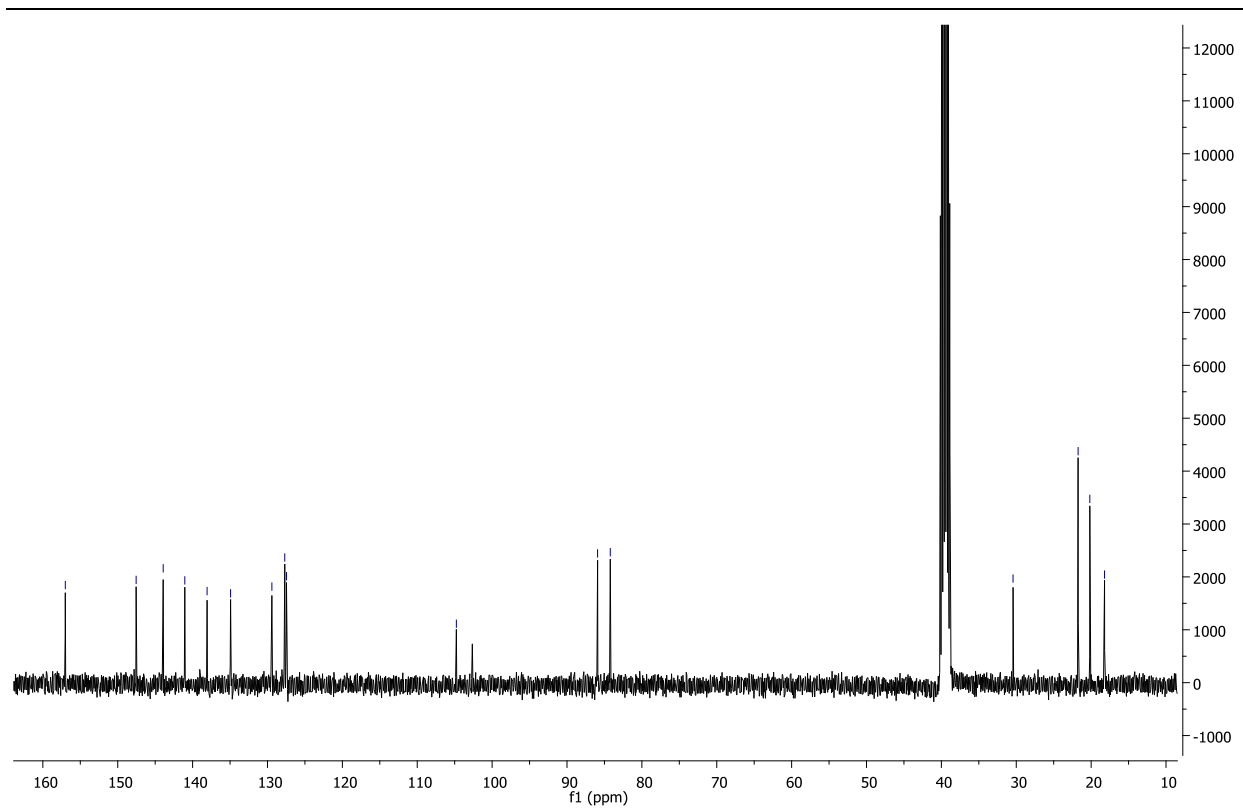
Slika P32. ^1H - ^{15}N HSQC NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar liganda **C2**



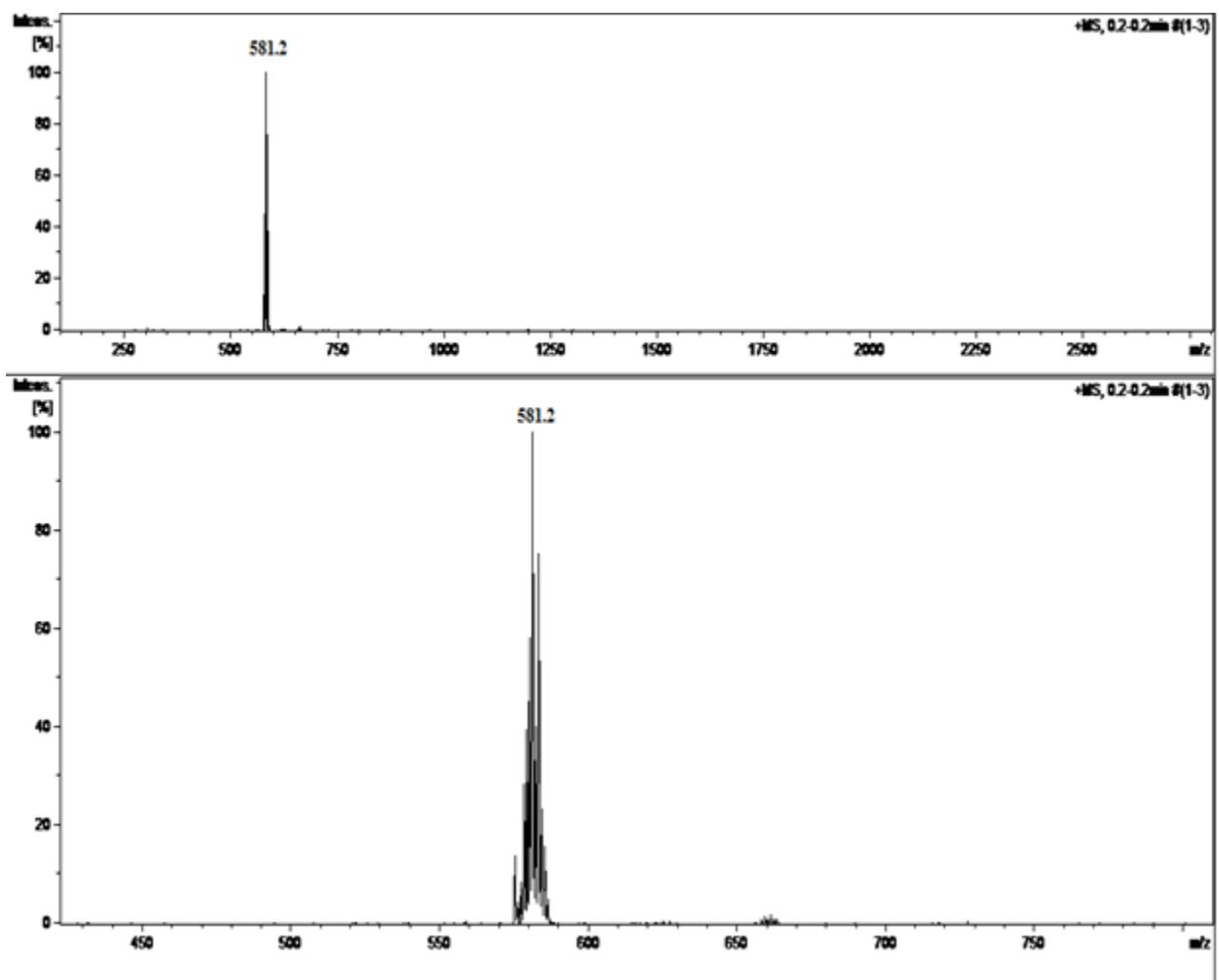
Slika P33. IC spektar kompleksa C3



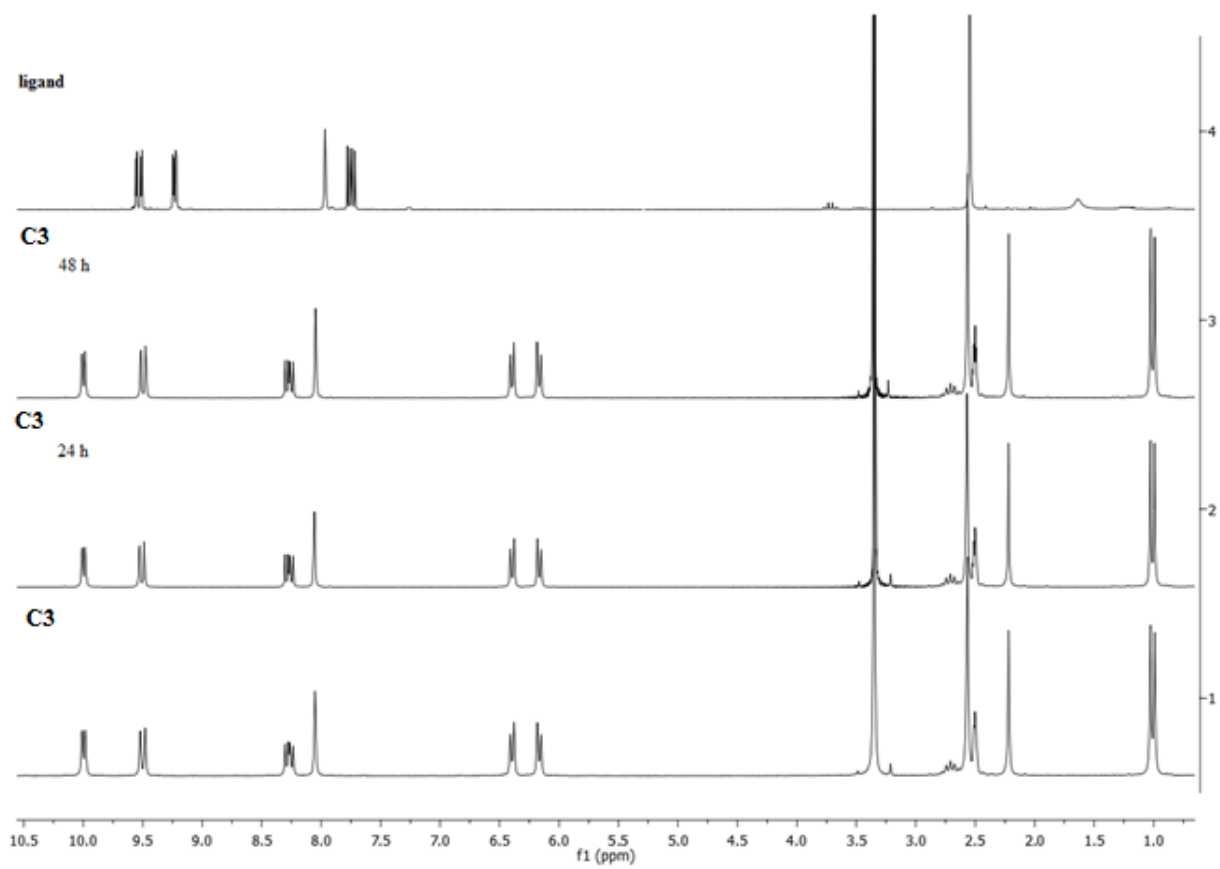
Slika P34. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-D_6) spektar kompleksa **C3**



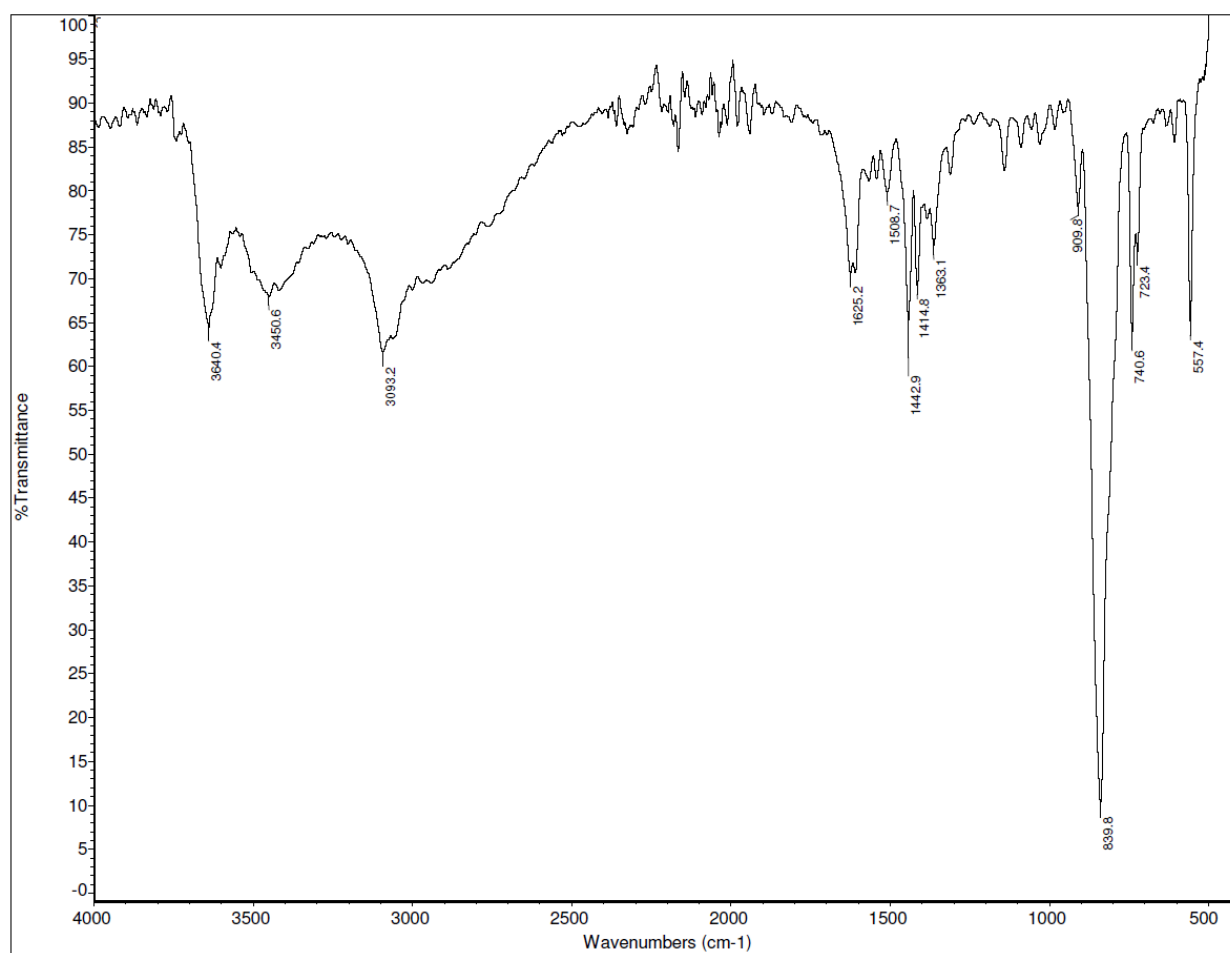
Slika P35. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C3**



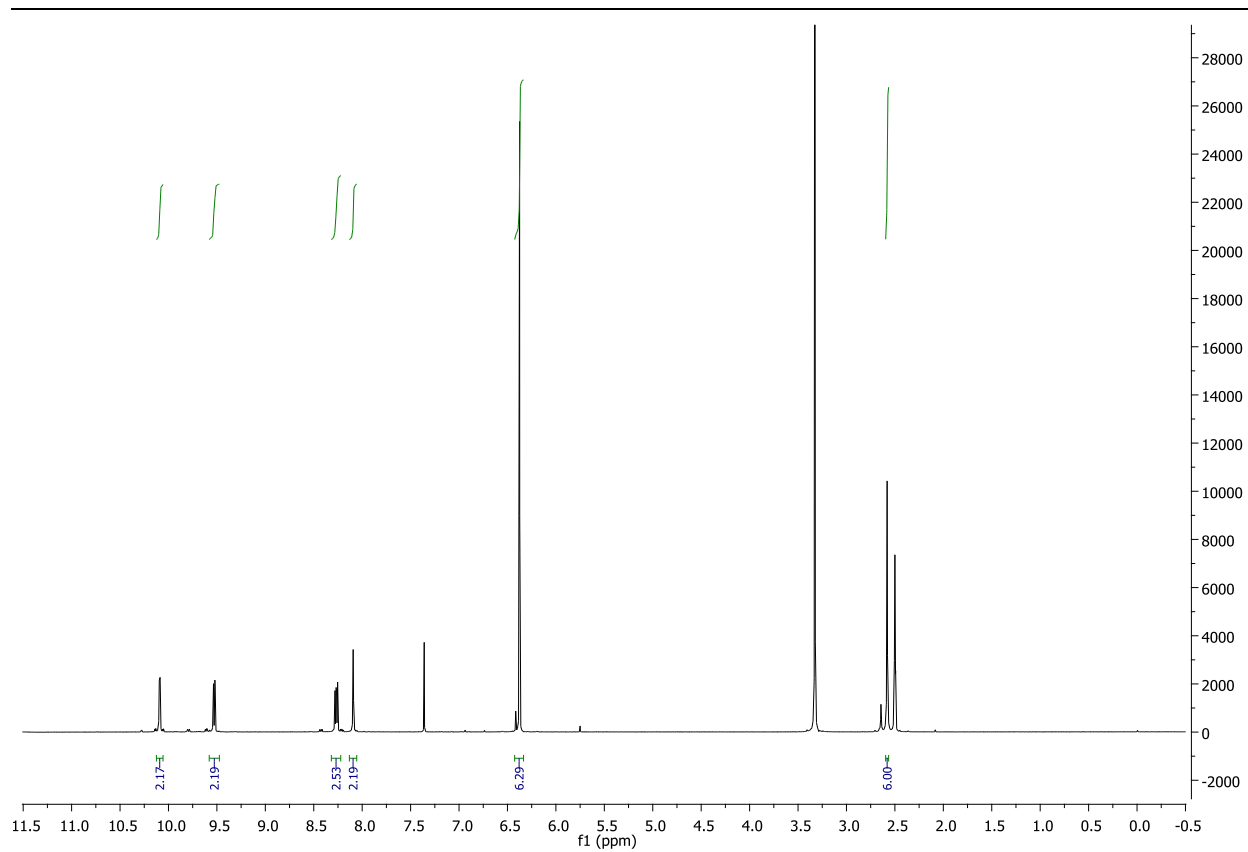
Slika P36. Maseni spektar kompleksa C3



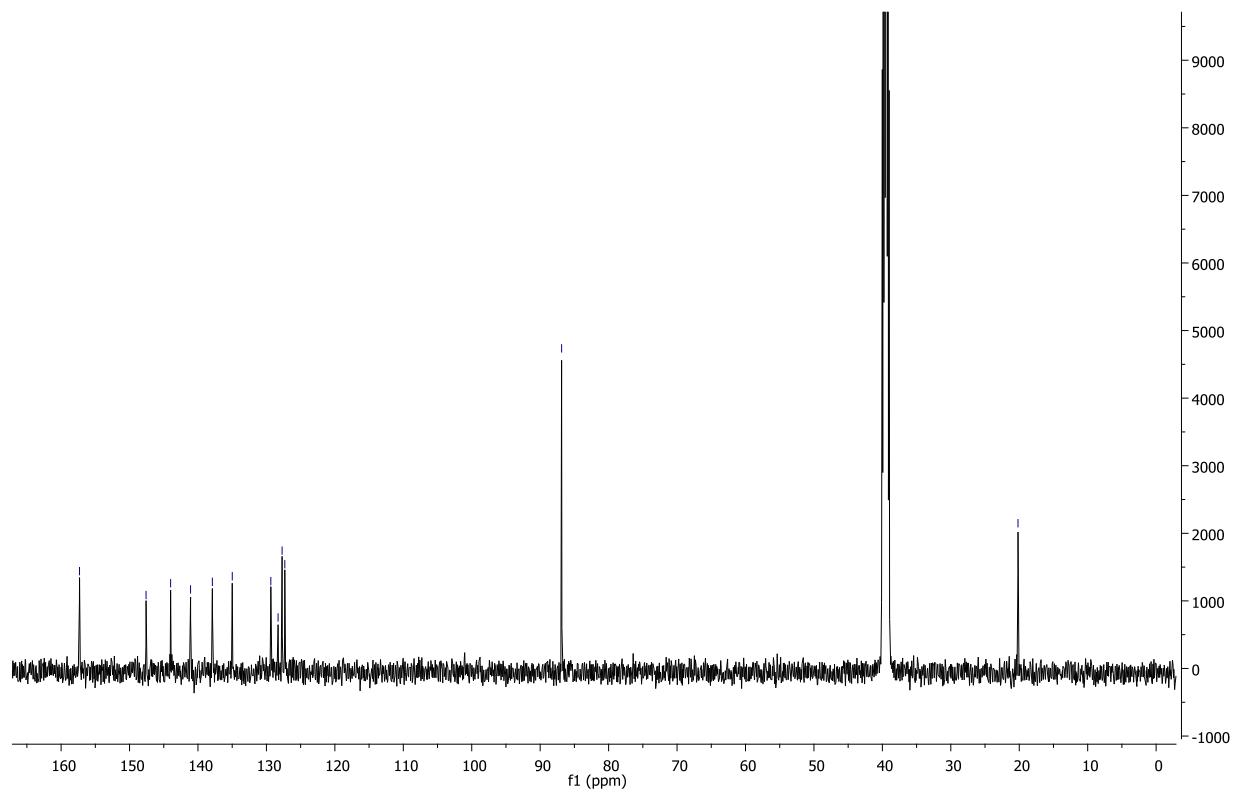
Slika P37. Stabilnost kompleksa **C3** u DMSO-D₆ u toku 48h



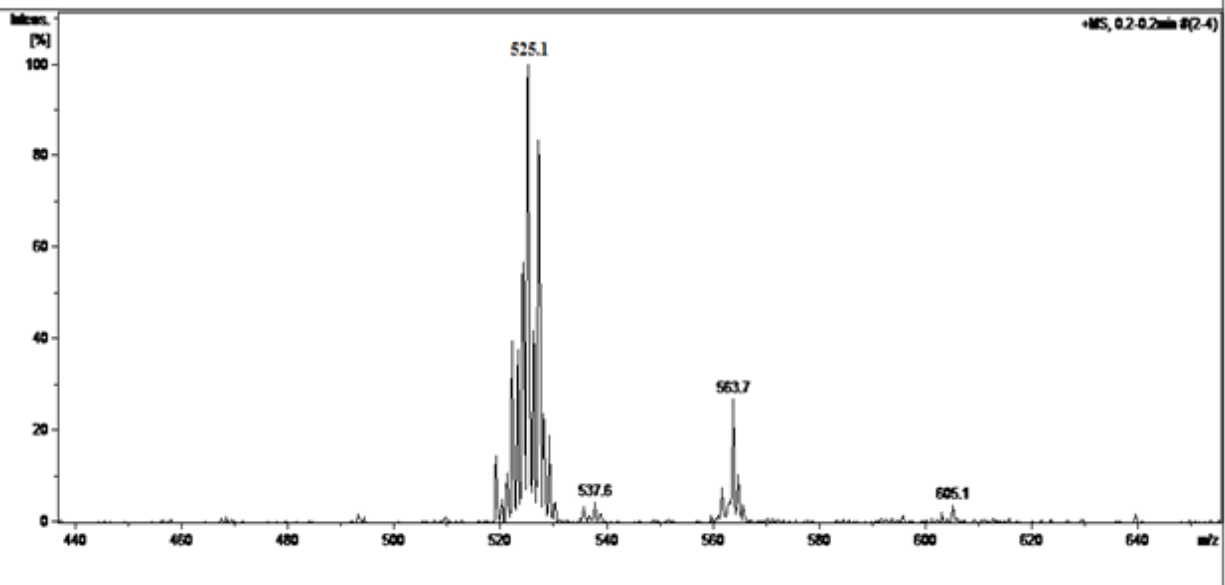
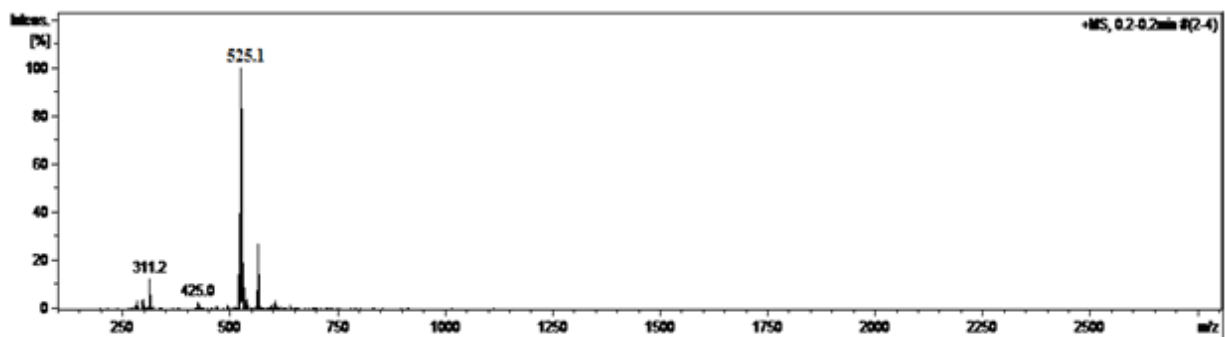
Slika P38. IC spektar kompleksa C4



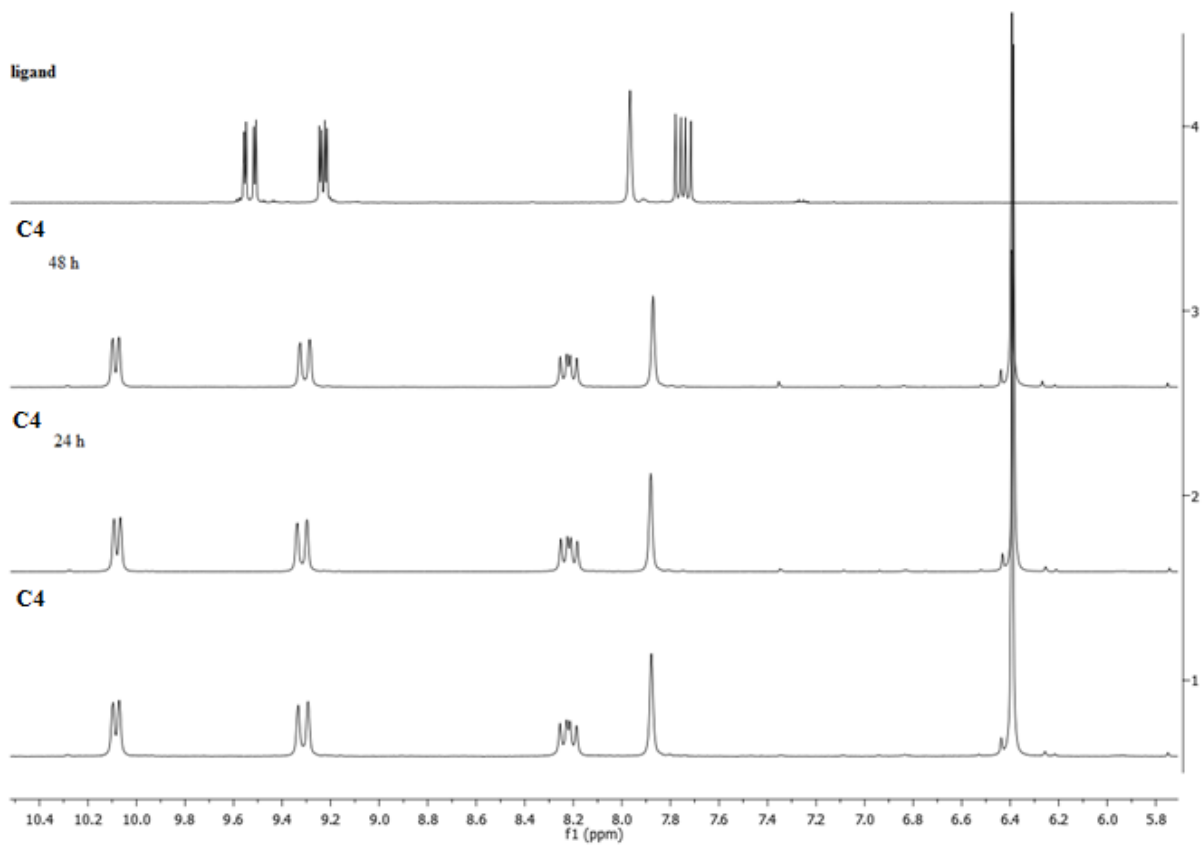
Slika P39. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C4**



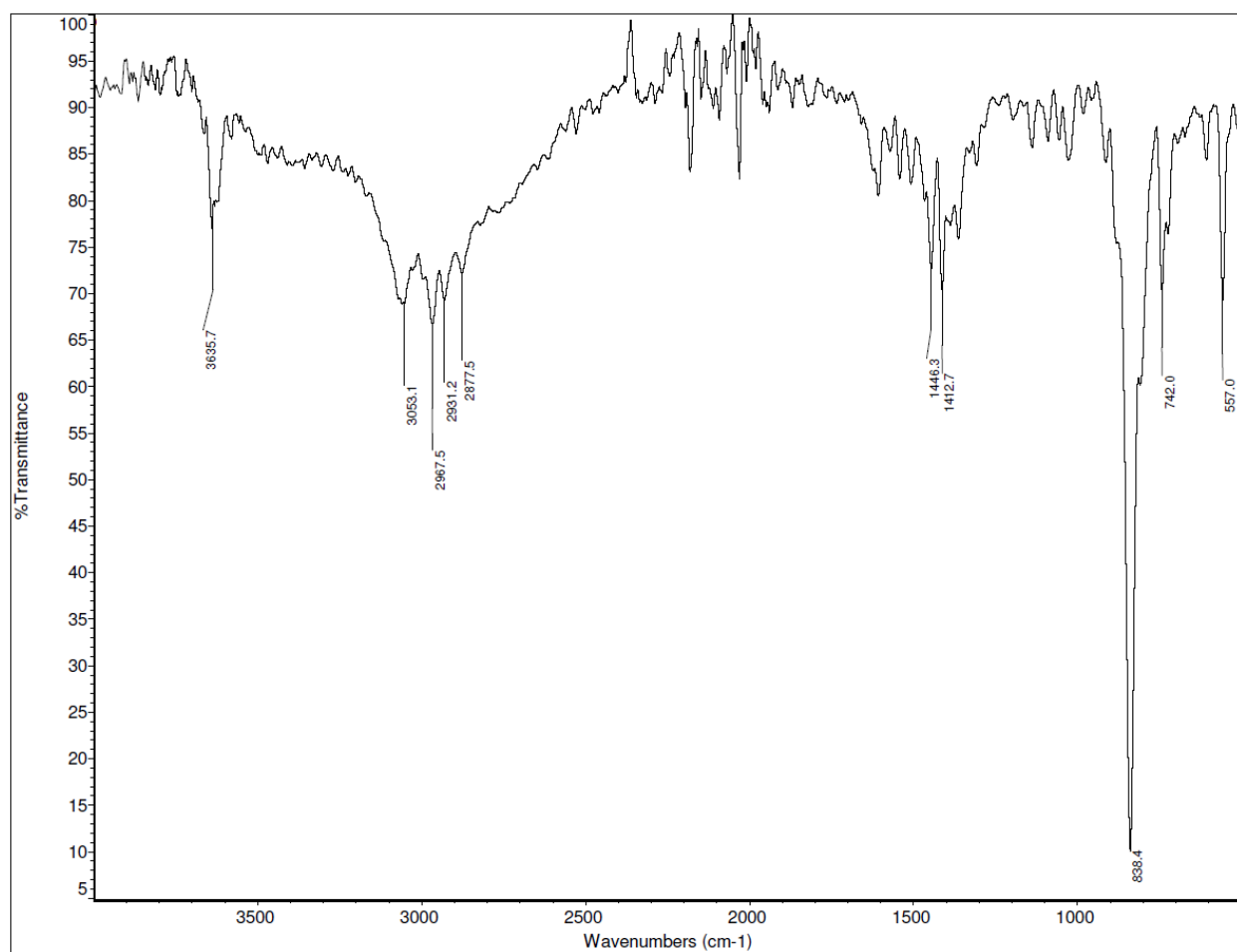
Slika P40. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- D_6) spektar kompleksa **C4**



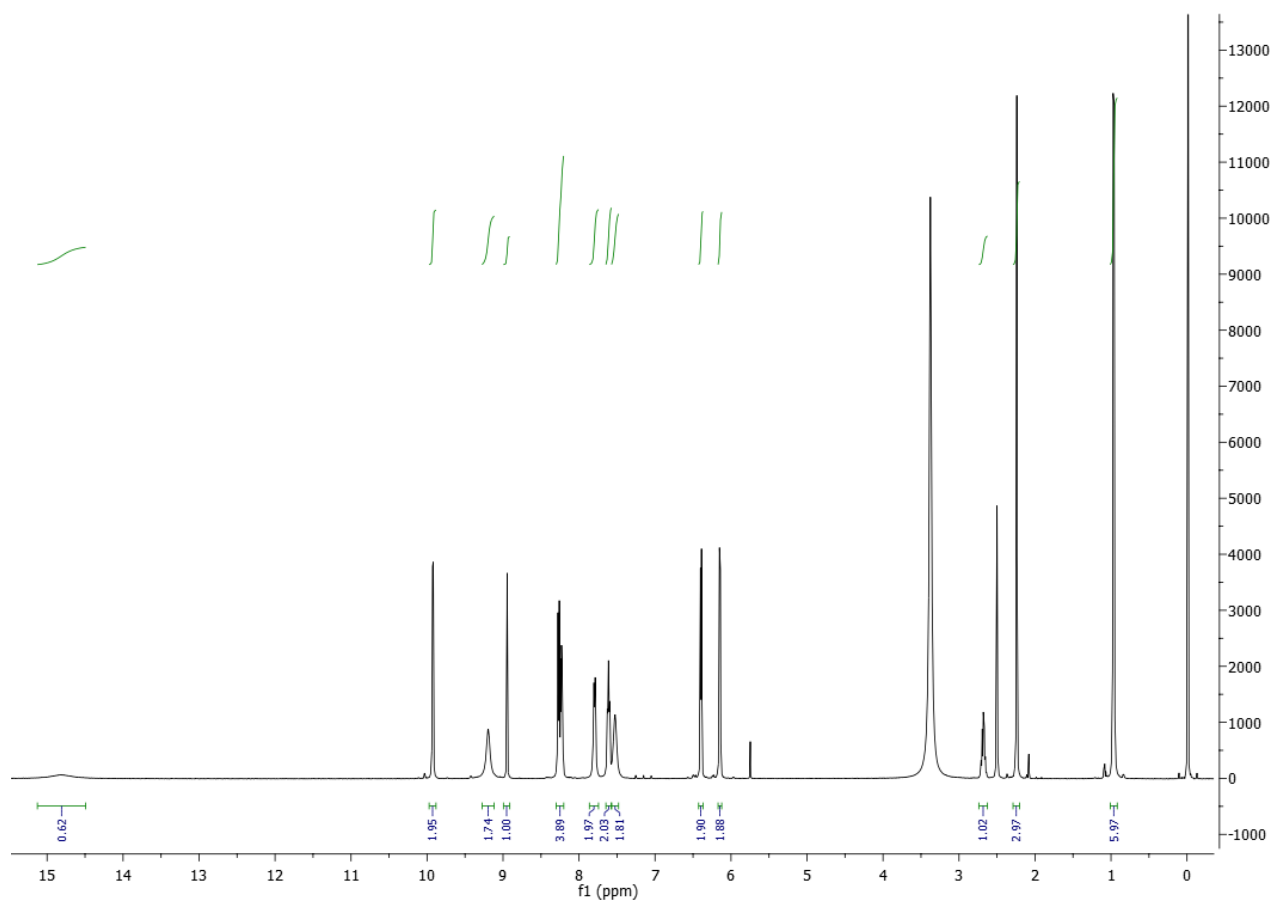
Slika P41. Maseni spektar kompleksa C4



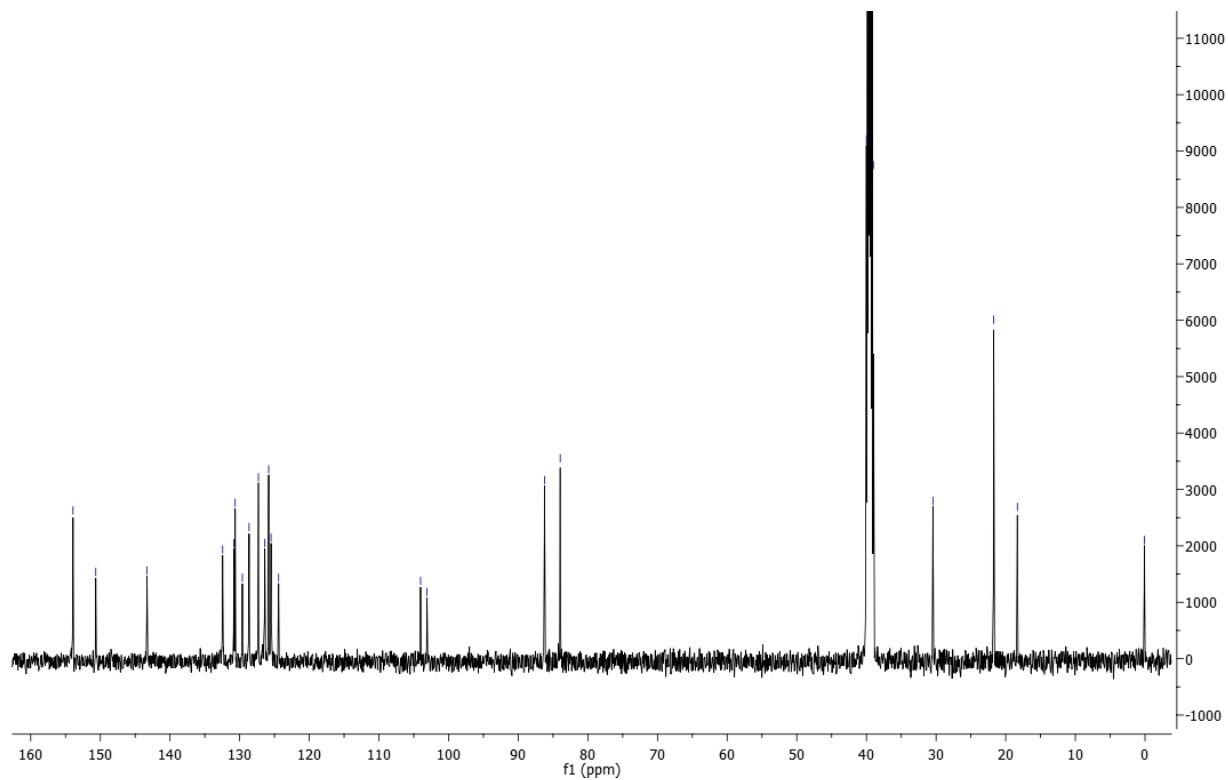
Slika P42. Stabilnost kompleksa **C4** u DMSO-D₆ u toku 48h



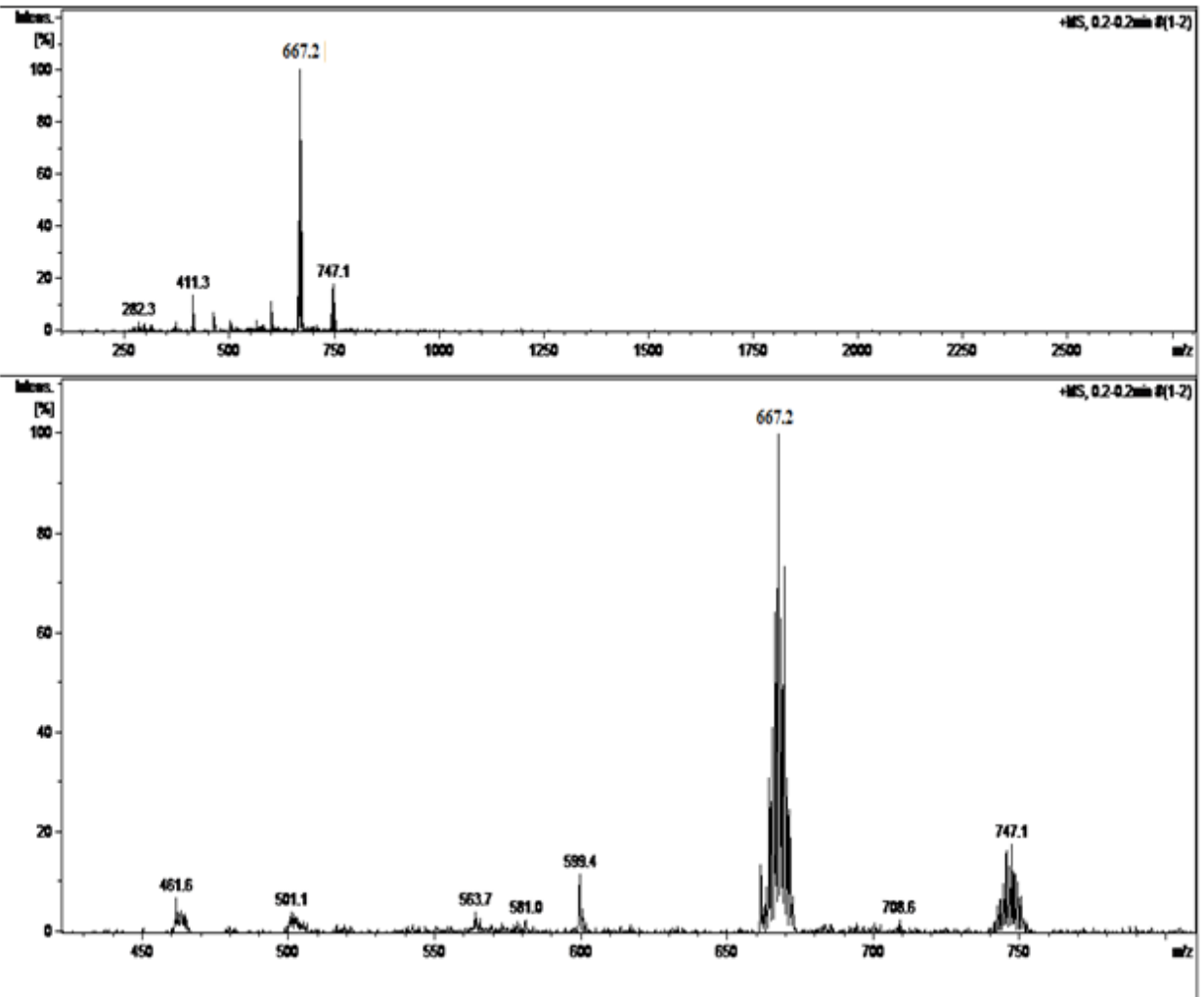
Slika P43. IC spektar kompleksa **C5**



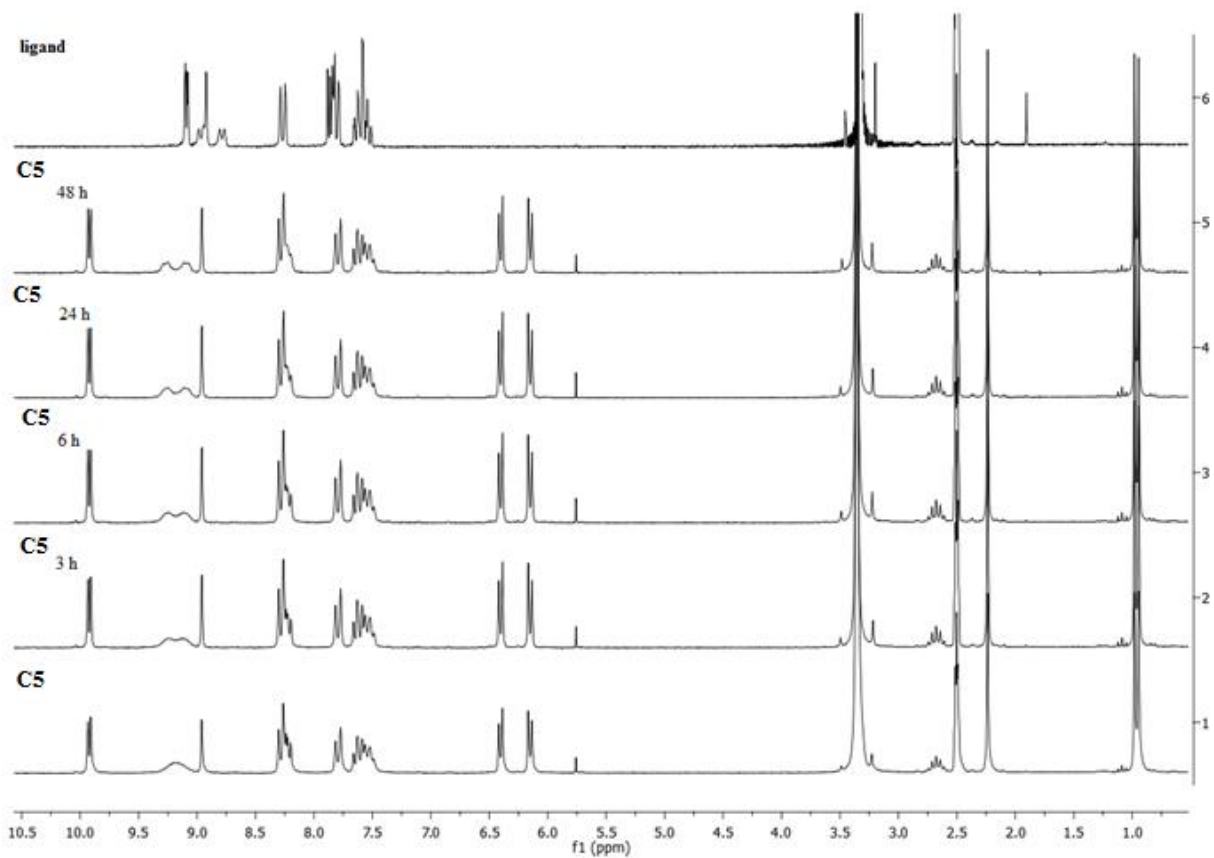
Slika P44. ^1H NMR (500 MHz, DMSO-D_6) spektar kompleksa **C5**



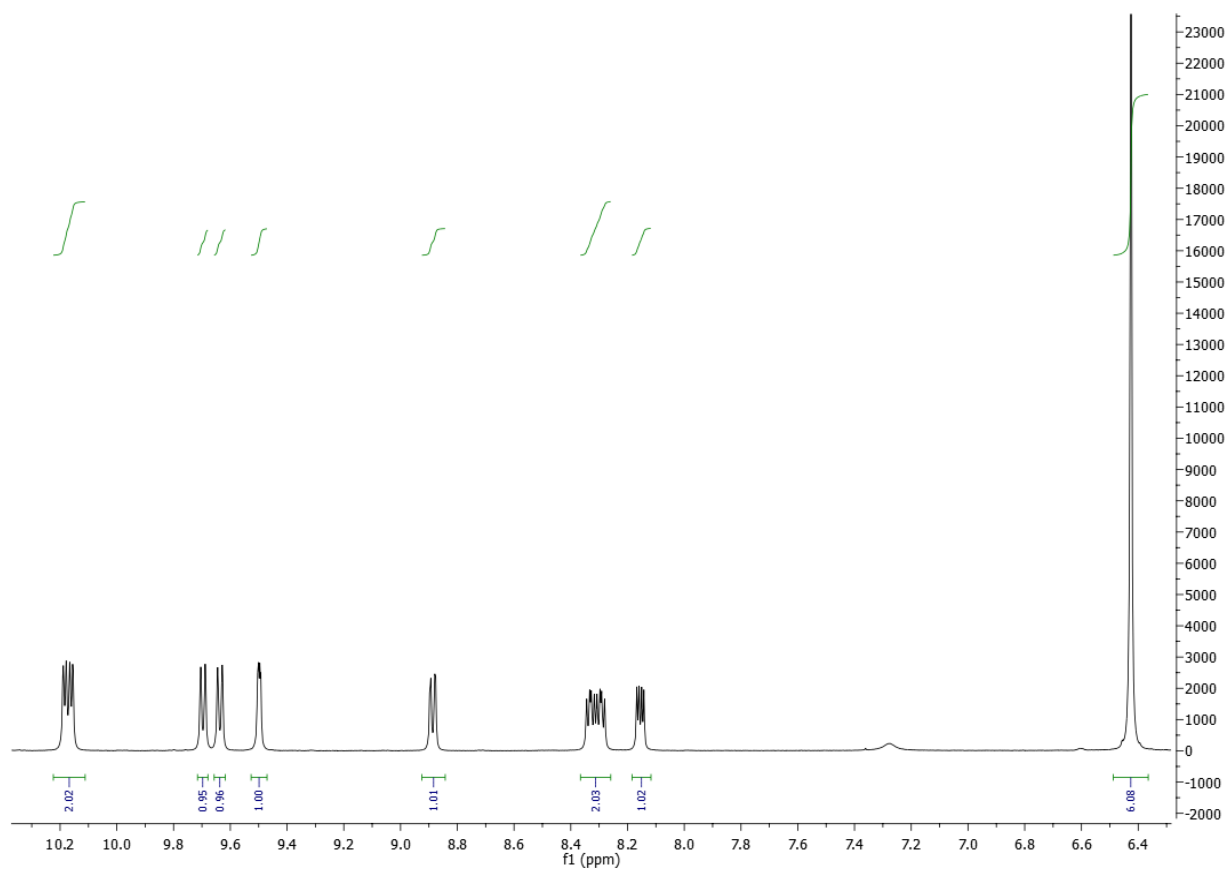
Slika P45. ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-D_6) spektar kompleksa **C5**



Slika P46. Maseni spektar kompleksa C5

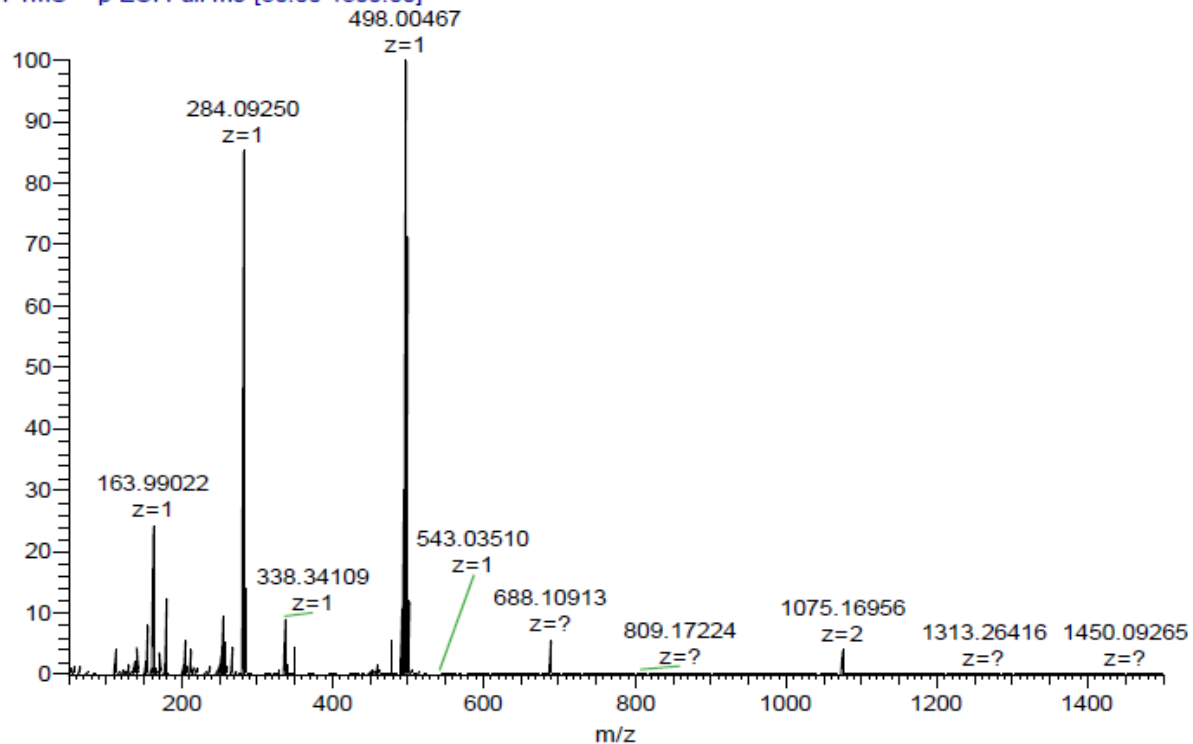


Slika P47. Stabilnost kompleksa **C5** u DMSO-D₆ u toku 48h

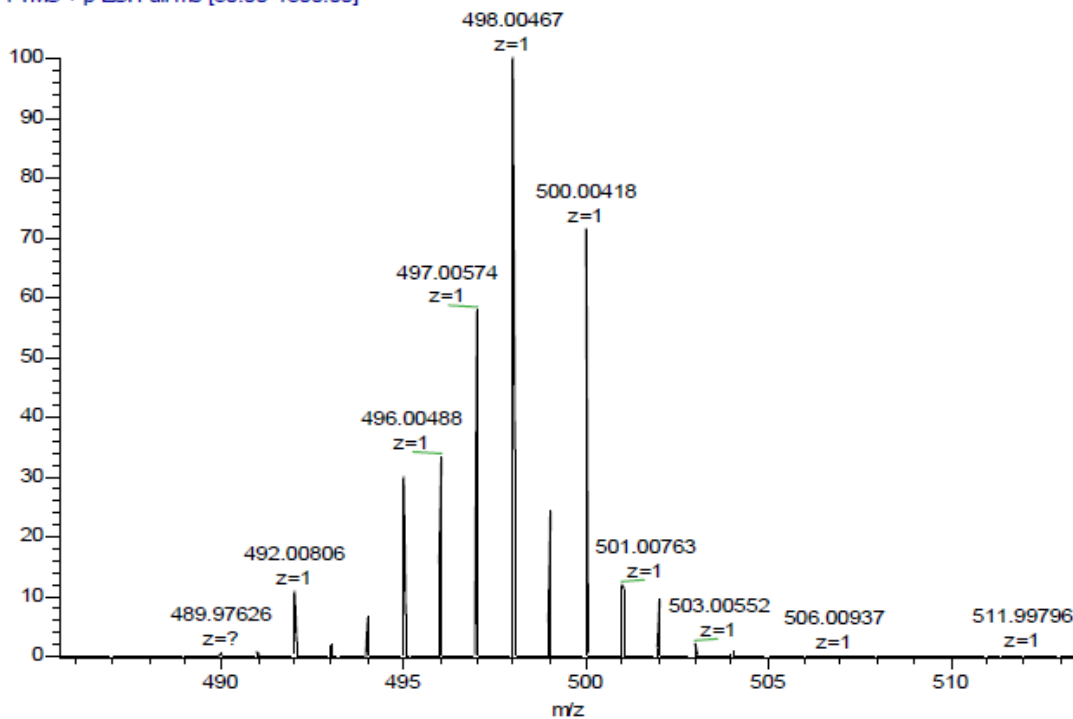


Slika P48. ^1H NMR (500 MHz, DMSO-D_6) spektar kompleksa **C6**

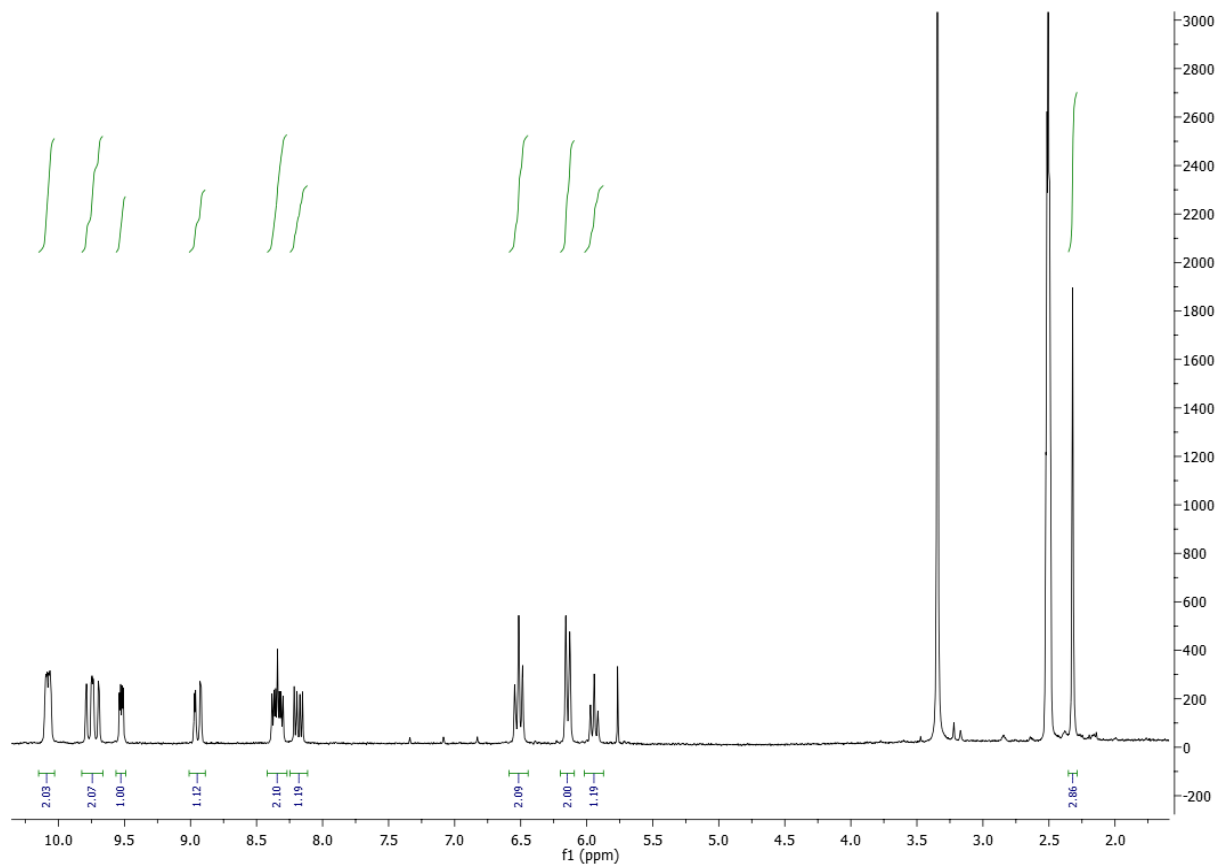
OB5096 #35 RT: 0.28 AV: 1 NL: 2.06E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-1500.00]



OB5096 #35 RT: 0.28 AV: 1 NL: 2.06E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-1500.00]

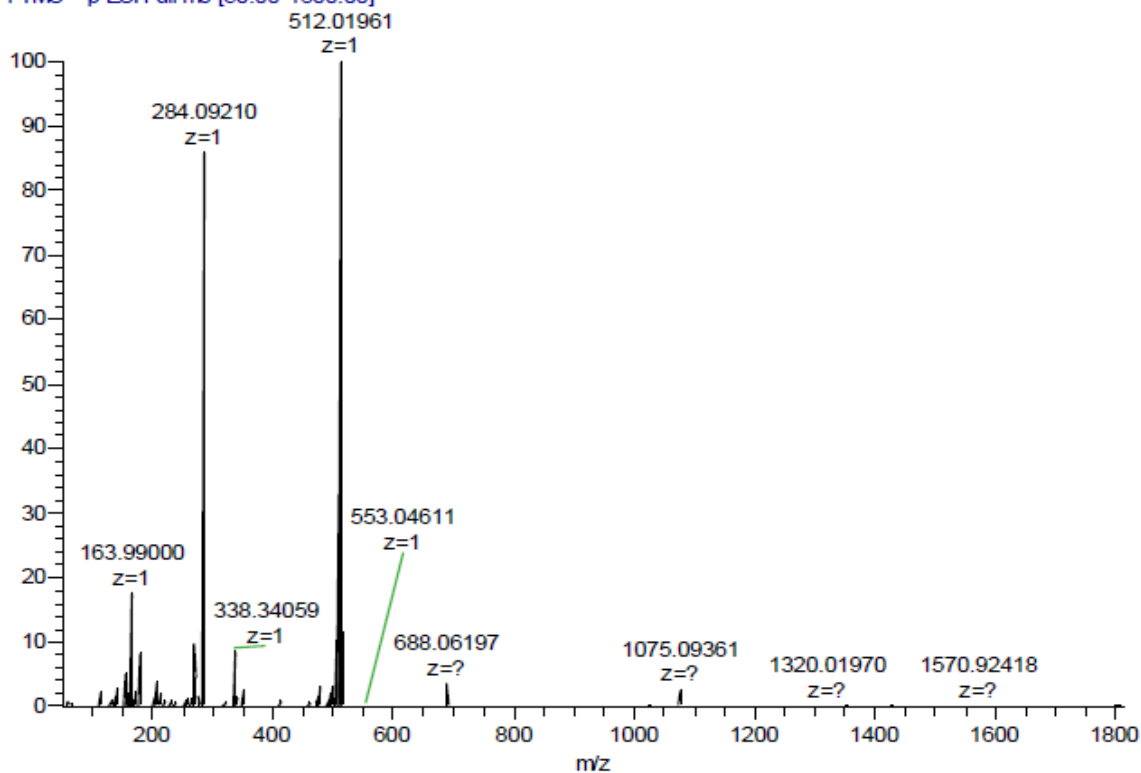


Slika P49. Maseni spektar kompleksa C6

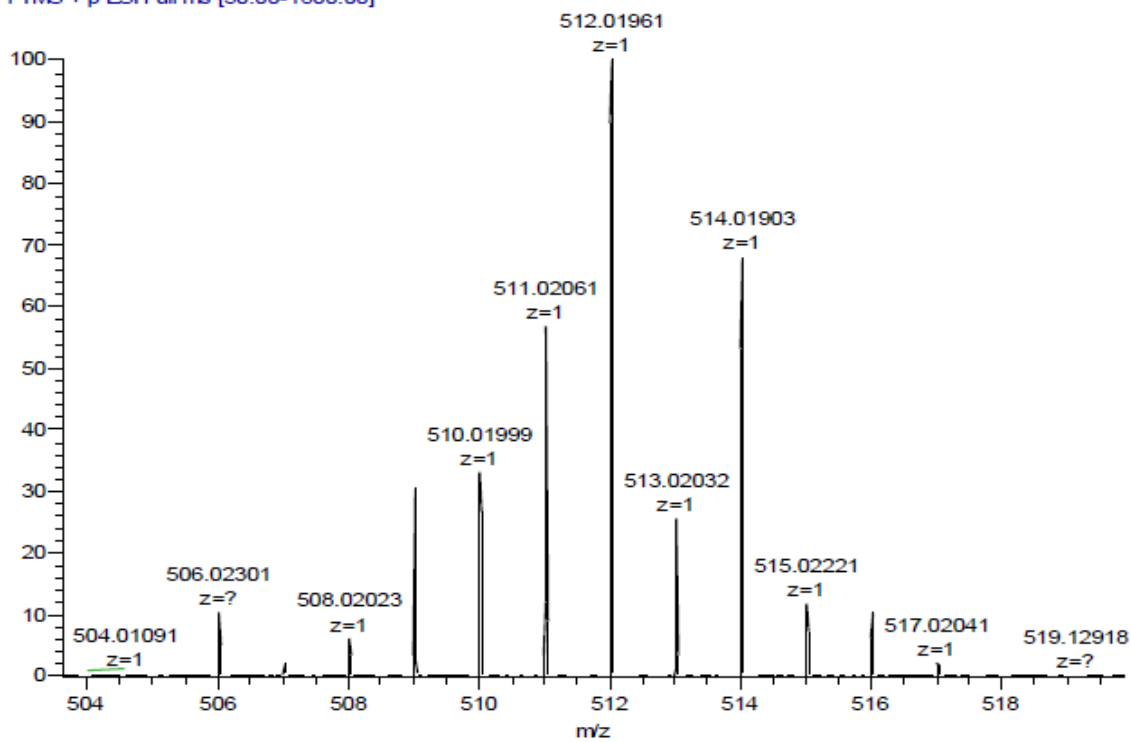


Slika P50. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) spektar kompleksa C7

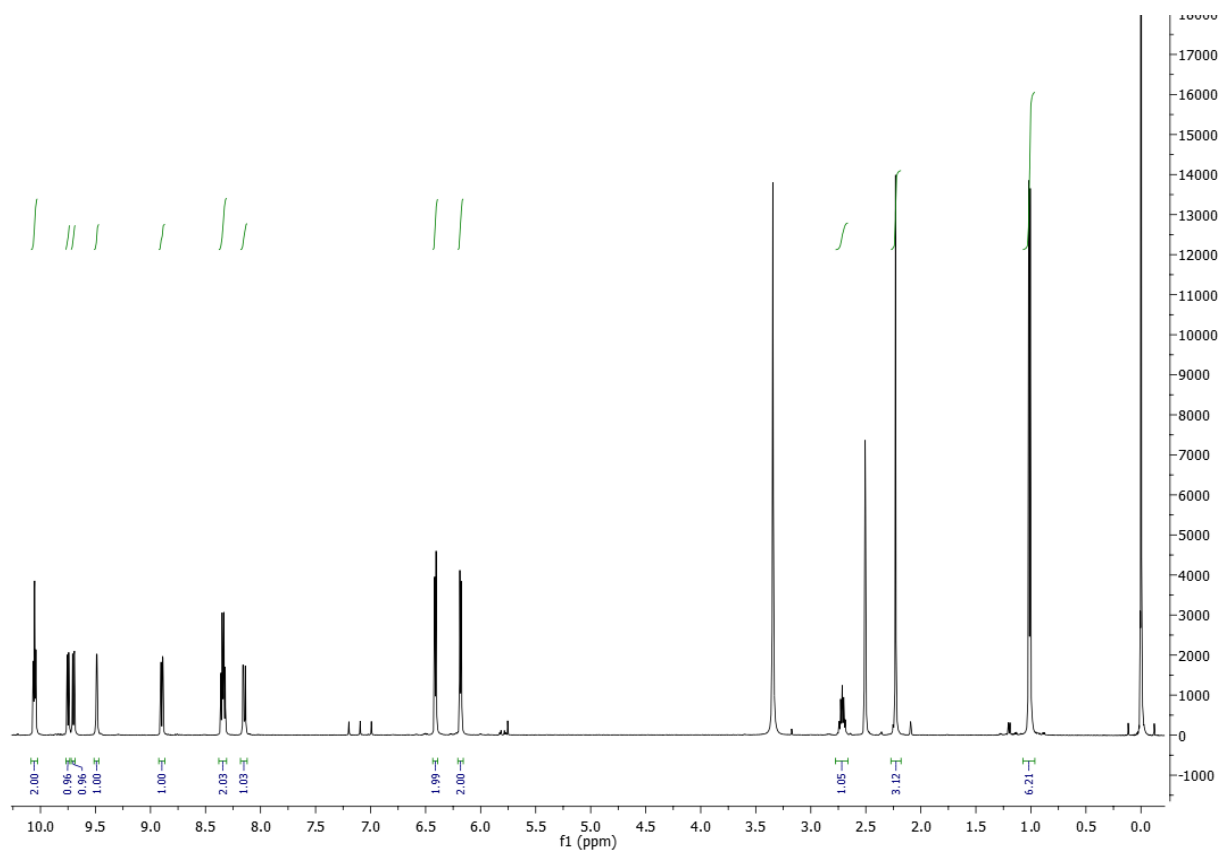
OB5097 #1-63 RT: 0.00-0.50 AV: 63 NL: 2.86E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-1800.00]



OB5097 #1-63 RT: 0.00-0.50 AV: 63 NL: 2.86E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-1800.00]

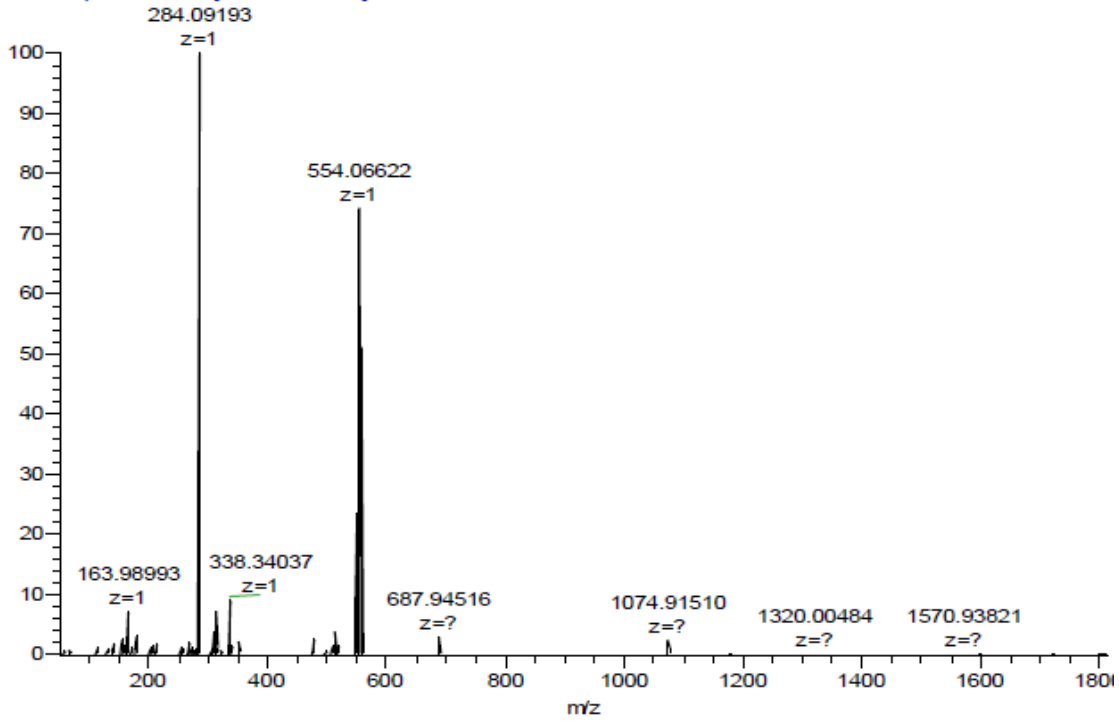


Slika P51. Maseni spektar kompleksa C7

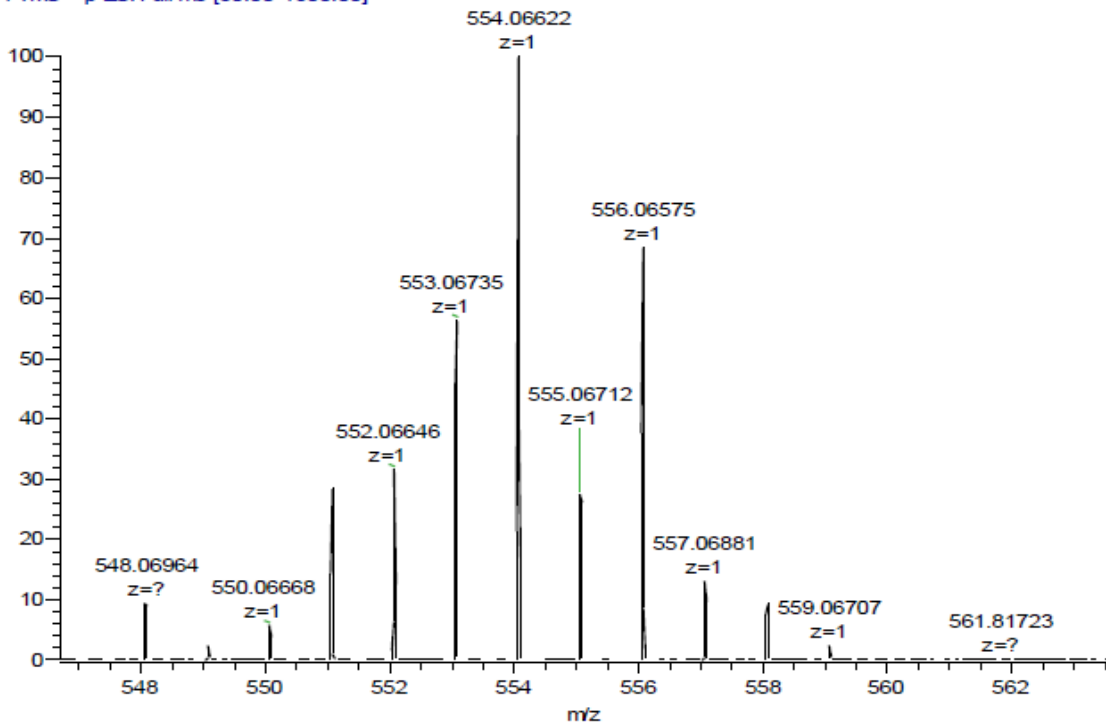


Slika P52. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) spektar kompleksa C8

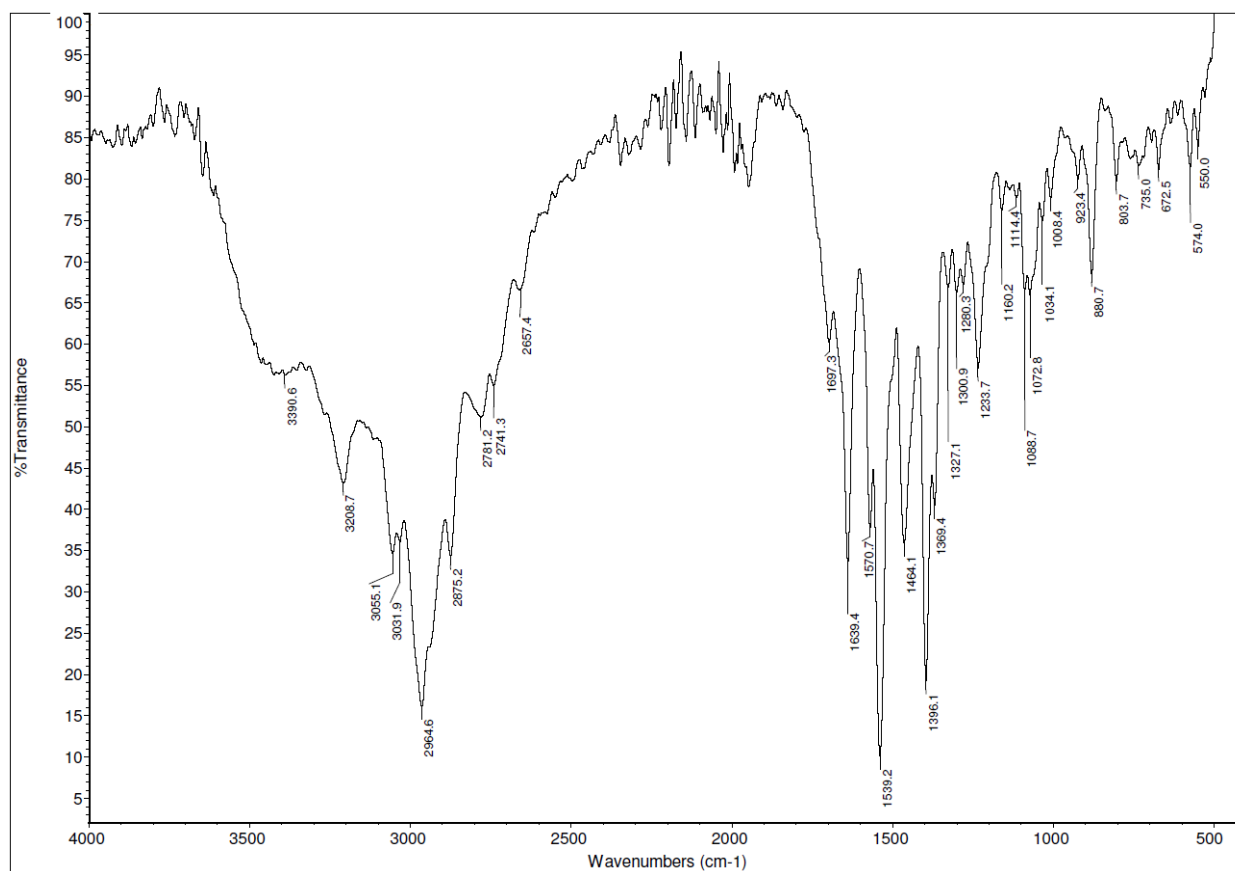
OB5098 #1-63 RT: 0.00-0.50 AV: 63 NL: 3.56E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-1800.00]



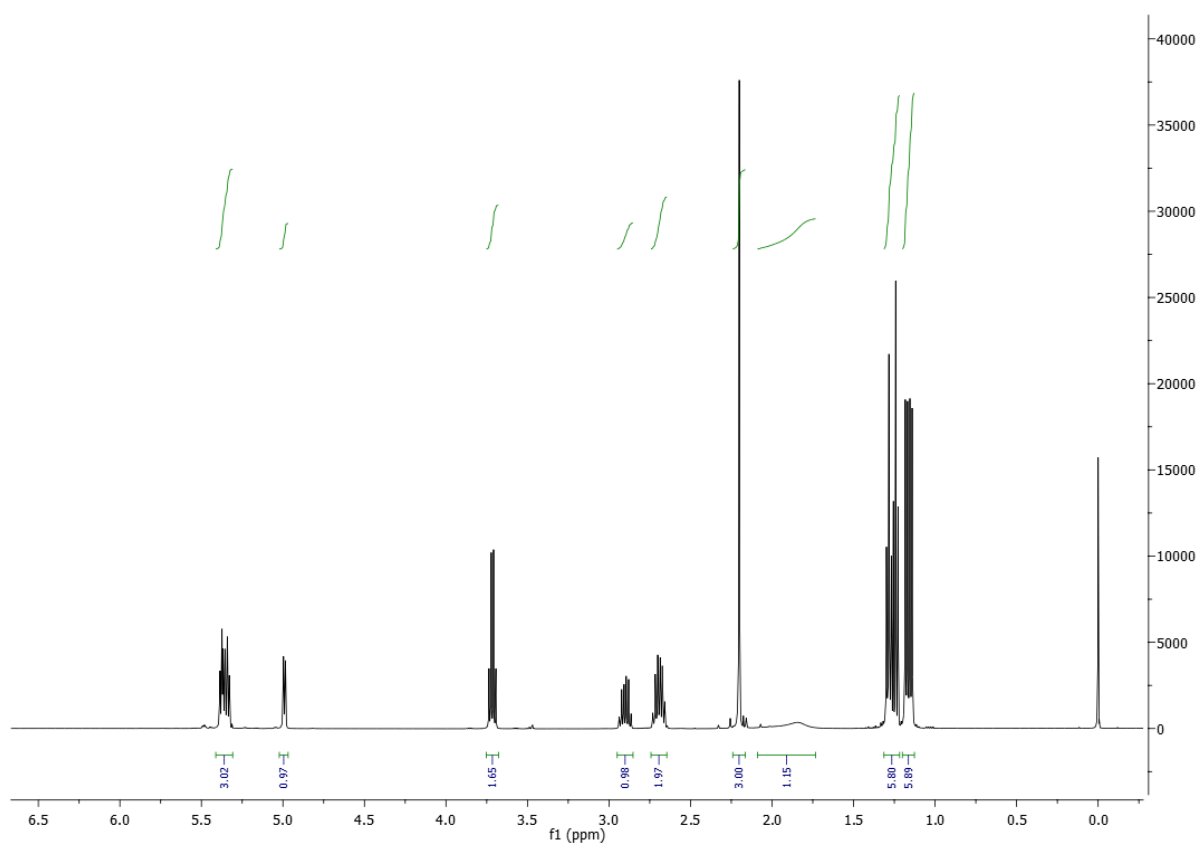
OB5098 #1-63 RT: 0.00-0.50 AV: 63 NL: 2.65E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-1800.00]



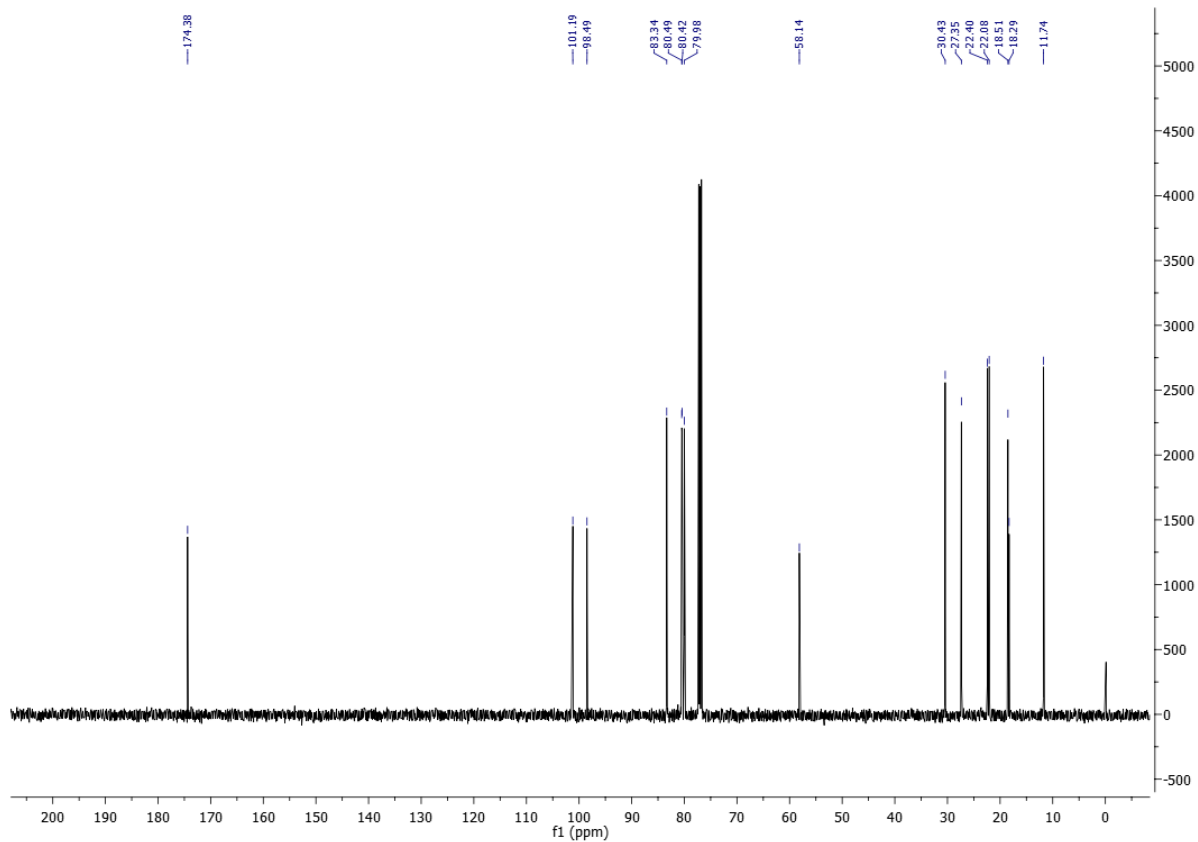
Slika P53. Maseni spektar kompleksa C8



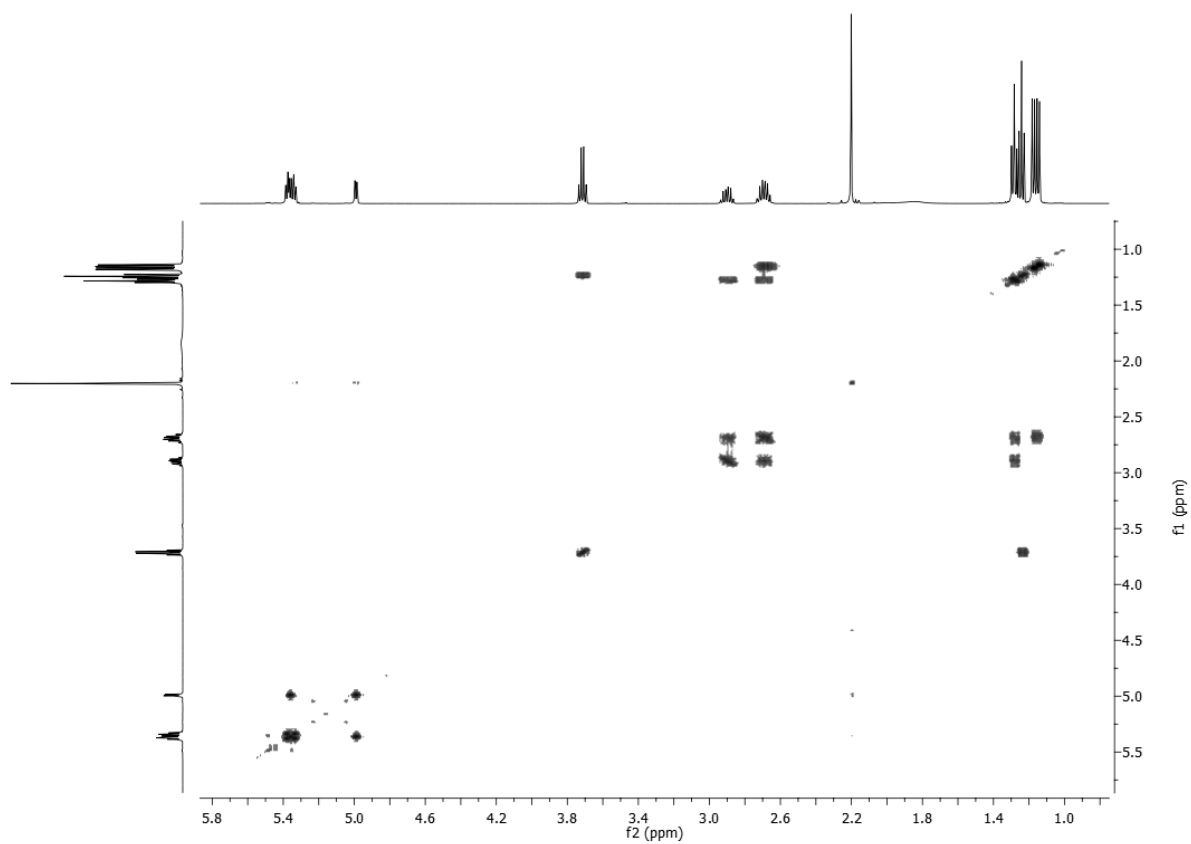
Slika P54. IC spektar kompleksa C9



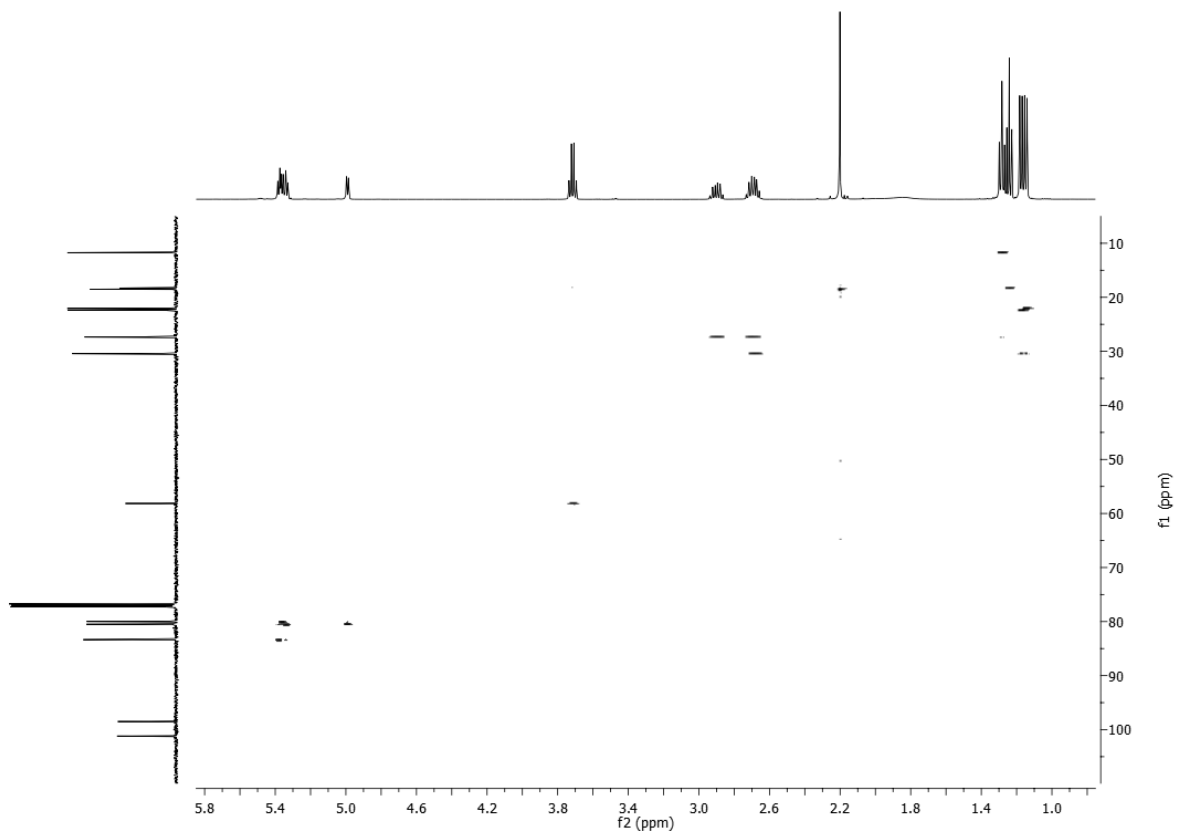
Slika P55. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) spektar kompleksa C9



Slika P56. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) spektar kompleksa C9

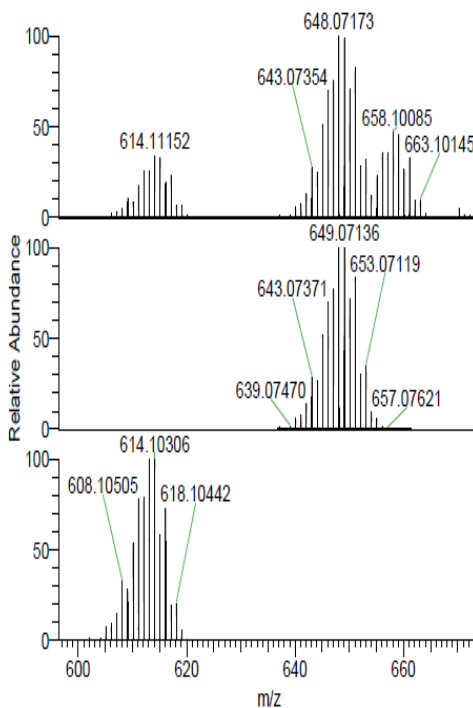
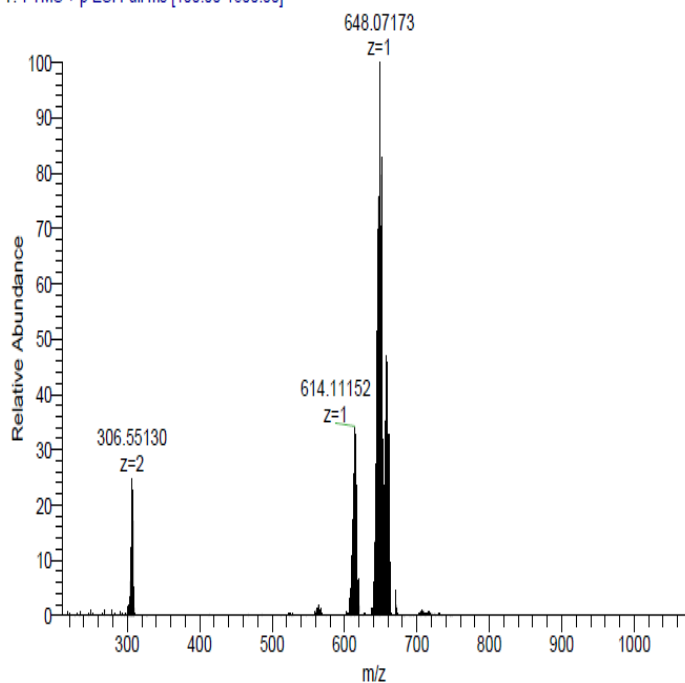


Slika P57. ^1H - ^1H COSY NMR (500 MHz, CDCl_3) spektar kompleksa **C9**



Slika P58. ^1H - ^{13}C HSQC NMR (500 MHz, CDCl_3) spektar kompleksa **C9**

gaQEx0317 #37-49 RT: 0.37-0.49 AV: 7 SB: 10 0.06-0.25 NL: 3.25E8
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1500.00]

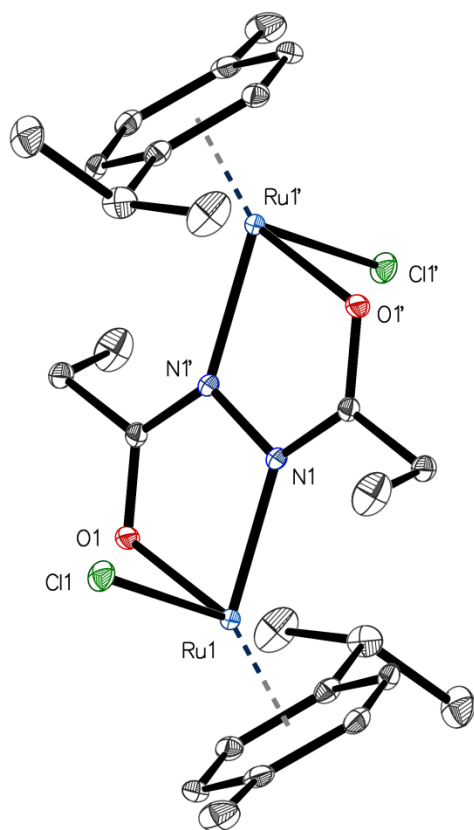


NL:
3.25E8
gaQEx0317#37-49 RT:
0.37-0.49 AV: 7 SB: 10
0.06-0.25 T: FTMS + p ESI
Full ms [100.00-1500.00]

NL:
3.16E3
C₂₆H₃₈ClN₂O₂Ru₂
C₂₆H₃₈Cl₁N₂O₂Ru₂
p (gss, s /p:40) Chrg 1
R: 30000 Res .Pwr. @FWHM

NL:
3.35E3
C₂₆H₃₈N₂O₂Ru₂
C₂₆H₃₈N₂O₂Ru₂
p (gss, s /p:40) Chrg 1
R: 30000 Res .Pwr. @FWHM

Slika P59. Maseni spektar kompleksa **C9**



Slika P60. Kristalna struktura [C9], nacrtana sa 50% elipsoidnog rasipanja. Rastvarač i vodonikovi atomi su izostavljeni zbog bolje preglednosti. Simetrični atomi su obeleženi sa (') i ekvivalentni su $2-X, -Y, 1-Z$

Tabela P1. Uzorak i podaci o kristalu [C9]

Hemijska formula	C30H50Cl2N2O4Ru2	Kristalni sistem	triclinic	
Molekulska masa [g/mol]	775.76	Prostorna grupa	P-1	
Temperatura [K]	100	Z	1	
Metod merenja	$\backslash\Phi$ and $\backslash\omega$ scans	Volumen [\AA^3]	813.93(6)	
Radiation (Wavelength [\AA])	MoK α ($\lambda = 0.71073$)	Jedinična dimenzija ćelije [\AA] i [$^\circ$]	9.0536(4)	88.9010(11)
Veličina kristala / [mm^3]	$0.253 \times 0.214 \times 0.11$		9.0906(4)	88.7726(11)
Izgled kristala	Narandžast blok		9.9218(4)	85.6563(11)
Gustina (izračunata) / [g/cm^3]	1.583	Absorpcioni koeficijent / [mm^{-1}]	1.128	
Korekcija Abs. Tmin	0.7056	Korekcija Abs. Tmax	0.746	
Korekcija Abs. tip	multisken	F(000) [e^-]	398	

Tabela P2. Sakupljanje podataka i obrada podataka o [C9]

Indeksni opseg	$-12 \leq h \leq 12, -12 \leq k \leq 12, -13 \leq l \leq 13$	Teta opseg za prikupljanje podataka [$^\circ$]	4.494 do 60.216	
Reflekcioni broj	24472	podaci / ograničenja / parametri	4777/0/187	
Metoda poboljšanja	Najmanjih kvadrata	Finalni R indeksi	svi podaci	R1 = 0.0153, wR2 = 0.0390
Funkcija minimalizacije	$\Sigma w(F_o^2 - F_c^2)^2$		I > 2 σ (I)	R1 = 0.0149, wR2 = 0.0387
Prilagodavanje na F ²	1.058	Otežavanje	$w=1/[\sigma^2(F_o^2)+(0.0183P)^2+0.4424P]$	
Najveći difrakcioni signal i rupa [$e \text{\AA}^{-3}$]	0.55/-0.75		$P=(F_o^2+2F_c^2)/3$	

Biografija autora

Stefan R. Nikolić rođen je 13.7.1989. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Na Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu (studijski program diplomirani hemičar) upisao se 2008. godine. Diplomirao i masterirao je na Katedri za organsku hemiju 04.10.2013. sa prosečnom ocenom 8,50. Diplomski i master rad radio je pod rukovodstvom dr Radomira Saičića i odbranio ih sa ocenom 10. Doktorske studije, na Katedri za opštu i neorgansku hemiju, upisao je školske 2013/2014. godine pod rukovodstvom dr Sanje Grgurić-Šipke.

Od 2013. godine zaposlen je na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta u Beogradu, najpre u zvanju istraživač-pripravnik, a od 2015. godine u zvanju istraživač-saradnik.

Objavljeni naučni radovi koji su direktno proistekli iz teze:

1. Stefan Nikolić, Dejan M. Opsenica, Vuk Filipović, Biljana Dojčinović, Sandra Arandelović, Siniša Radulović, Sanja Grgurić-Šipka, Strong *in vitro* Cytotoxic Potential of New Ruthenium-Cymene Complexes. *Organometallics*, 2015, 34, 3464-3473.
2. Stefan Nikolić, Loganathan Rangasamy, Nevenka Gligorijević, Sandra Arandelović, Siniša Radulović, Gilles Gasser, Sanja Grgurić-Šipka, Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of novel Ru(II) Arene Complexes containing intercalating Ligands. *J. Inorg. Biochem.* 2016, 160, 156-165.
3. Stefan Nikolić, Ivanka Ćirić, Alexander Roller, Vladimir Lukeš, Vladimir B. Arion, Sanja Grgurić-Šipka. Conversion of hydrazides into *N,N'*-diacylhydrazines in the presence of a ruthenium(II)–arene complex. *New J. Chem.* 2017, 41, 6857-6865.
4. Marijana Pavlović, Stefan Nikolić, Nevenka Gligorijević, Biljana Dojčinović, Sandra Arandelović, Sanja Grgurić-Šipka, Siniša Radulović, New organoruthenium compounds with pyrido[2',3':5,6]pyrazino[2,3-f][1,10]phenanthroline: synthesis, characterization, cytotoxicity and investigation of mechanism of action, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2019, DOI: 10.1007/s00775-019-01647-4.

Saopštenja:

1. Stefan Nikolić, Ivanka Ivanović, Darko Pantić, Vuk Filipović, Dejan Opsenica, Siniša Radulović, Tibor Sabo, Sanja Grgurić-Šipka, New ruthenium(II)-arene complexes with N, O or S containing ligands, ISBOMC14: 7th International Symposium on Bioorganometallic Chemistry, Vienna, Austria, 22 – 25. jul, 2014, P15 Book of abstracts pp 63.
2. Aleksandar Savić, Stefan Nikolić, Ivanka Ivanović, Siniša Radulović, Tibor Sabo, Sanja Grgurić-Šipka, New Platinum(II) Iodido and Ruthenium(II) Arene Complexes with different Types of N,O, or S Containing Ligands, 2nd International Symposium on Functional Metal Complexes that Bind to Biomolecules, Zurich, Switzerland, 22. i 23. avgust, 2014, WG5-07.
3. Jelena M. Poljarević, Ana Tadić, Milena Krstić, Ljiljana Mihajlović-Lalić, Aleksandar Savić, Stefan Nikolić, Marijana Kajzgergerber, Sandra Arandelović, Sanja Grgurić-Šipka, Novel ruthenium–arene complexes with antiinflammatory drugs, 55. Meeting of the Serbian Chemical Society, Novi Sad, Serbia, 8. i 9. jun 2018, p. 44.
4. Stefan Nikolić¹, Marijana Pavlović, Synthesis, characterization and biological activity in melanoma cells of novel ruthenium(II)-arene complexes containing intercalating ligands, Sixth Conference of the Young Chemists of Serbia, Beograd, 27. oktobar 2018. HS14 PE 12.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Стефан Р. Николић

број индекса ДХ03/2013

Изјављујем

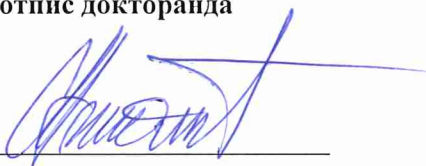
да је докторска дисертација под насловом

Синтеза и карактеризација рутенијум-аренских комплекса са N, S или O донорским лигандима

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 31.01.2019.

Потпис докторанда



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Стефан Р. Николић

Број индекса: ДХ03/2013

Студијски програм: Доктор хемијских наука

Наслов рада: Синтеза и карактеризација рутенијум-аренских комплекса са N, S или O
донорским лигандима

Ментор: др Сања Гргурић-Шипка

Потписани Стефан Р. Николић

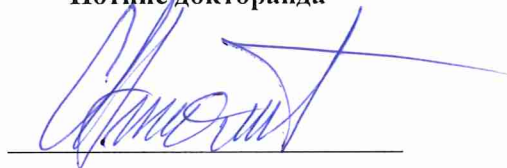
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 31.01.2019.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Синтеза и карактеризација рутенијум-аренских комплекса са N, S или O донорским лигандима

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 31.01.2019.

Потпис докторанда

