



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Ана С. Живановић

**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ИСПИТИВАЊЕ
БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА
S,O-ТЕТРАДЕНТАТНИМ ЛИГАНДИМА, ДЕРИВАТИМА
ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ**

докторска дисертација

Крагујевац, 2022.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Ana S. Živanović

**SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND EXAMINATION
OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF COPPER(II) COMPLEXES
WITH S,O-TETRADENTATE LIGANDS, DERIVATIVES OF
THIOSALICYLIC ACID**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2022.

Аутор
Име и презиме: Ана С. Живановић
Датум и место рођења: <i>22.08.1992., Приштина, Република Србија</i>
Садашње запослење: <i>Сарадник у настави на Катедри за фармацеутску хемију Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу</i>
Докторска дисертација
Наслов: Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине
Број страница: <i>105</i>
Број слика: <i>34</i>
Број библиографских података: <i>187</i>
Установа и место где је рад израђен: <i>Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу</i>
Научна област (УДК): <i>Медицина.</i>
Ментор: <i>доц. др Андриана Букоњић, доцент за ужу научну област Фармацеутска хемија Факултета медицинских наука у Крагујевцу</i>
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: <i>20.11.2019.</i>
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: <i>IV-03-209/15 11.03.2020.</i>
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> <i>1. Проф. др Небојша Н. Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за уже научне области Микробиологија и имунологија; Онкологија, председник;</i> <i>2. Доц. др Јелена Пољаревић, доцент Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Опита и неорганска хемија, члан;</i> <i>3. Проф. др Верица В. Јевтић, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Неорганска хемија, члан;</i> <i>4. Доц. др Јована В. Богојески, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Неорганска хемија, члан;</i> <i>5. Др Ивана Д. Радојевић, научни сарадник Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за научну област Биологија, члан.</i>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
<ol style="list-style-type: none"> <i>1. Проф. др Гордана Радић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, председник,</i> <i>2. Проф. др Јелена Пољаревић, ванредни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Опита и неорганска хемија, члан,</i> <i>3. Доц. др Марина Мијајловић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска хемија, члан</i>
Датум одбране дисертације:

Најпре желим да изразим велику захвалност ментору, доц. др Андриани Букоњић, која ме је својим стрпљењем и саветима довела до краја овог путовања.

Члановима комисије, проф. др Гордани Радић, ванредном професору Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, проф. др Јелени Пољаревић, ванредном професору Хемијског факултета Универзитета у Београду и доц. др Марини Мијајловић, доценту Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу захваљујем се на сугестијама и коментарима који су допринели да дисертација добије свој коначан облик.

Члановима своје Катедре, проф. др Милошу Николићу, доц. др Душану Томовићу и маг.фарм. Николи Недељковићу желим да се захвалим на бодрењу, разумевању и помоћи како током експерименталног дела, али и на сугестијама током писања дисертације.

Такође, бескрајно сам захвална супругу, сестрама и родитељима на ентузијазму и љубави коју сам безусловно добијала током докторских студија и израде дисертације.

Ову Докторску дисертацију посвећујем родитељима

Апстракт

Увод: Терапијска примена комплекса бакра(II) привлачи пажњу истраживача због могућности координовања са различитим донорским атомима. Међу лиганата који у структури садрже сумпор и кисеоник издваја се тиосалицилна киселина, чији деривати показују цитотоксичност у терапији тумора.

Материјал и методе: У овој Докторској дисертацији описани су синтеза S,O тетрадентатних лиганата, деривата тиосалицилне киселине и комплекса бакра(II) са наведеним лиганата. Ради потврде њихове структуре, спроведена су различита мерења: микроанализа, инфрацрвена спектроскопија, нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија, електронска парамагнетна резонанција и моларна проводљивост. У циљу процене биолошке активности спроведене су нуклеофилне супституционе реакције комплекса са ендогеним лиганата (*L*-метионином, *L*-цистеином и 5'-*GMP*), *in vitro* интеракције са СТ-ДНК (енг. *calf thymus*, ДНК тимуса говечета) и хуманим серумским албумином (ХСА) помоћу апсорпционе спектроскопске анализе и емисионе флуоресценције, *in silico* интеракције са ДНК и ХСА. Такође, применом МТТ колориметријског теста анализирана је цитотоксичност синтетисаних лиганата и комплекса на три ћелијске линије.

Резултати: Анализом спроведених мерења претпостављена је октаедарска геометрија комплекса. Сви комплекси подлежу реакцијама нуклеофилне супституције. Високе вредности константе везивања показују да комплекси интерагују са молекулом ДНК и ХСА. Интеракција са ДНК молекулом дешава се интеркалацијом или интеракцијом са малим жлебом. Комплекси имају цитотоксични потенцијал, док је према свим ћелијским линијама најбољу цитотоксичност на основу IC₅₀ вредности показао комплекс [Cu(*S,O*-пентилен-тиосалицилна киселина)].

Кључне речи: S,O-тетрадентатни лиганди, комплекси бакра(II), интеракције, молекулски докинг, антитуморска активност

Abstract

Introduction: The therapeutic application of copper(II)-complexes attracts the attention of researchers due to the possibility of coordination with different donor atoms. Among the ligands that contain sulfur and oxygen in the structure, thiosalicylic acid stands out, whose derivatives show cytotoxicity in tumor therapy.

Material and methods: In this Doctoral dissertation, the synthesis of S,O-tetradentate ligands, derivatives of thiosalicylic acid and copper(II)-complexes with the mentioned ligands is described. In order to confirm their structure, various measurements were performed: microanalysis, infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy, electronic paramagnetic resonance and molar conductivity. In order to assess biological activity, nucleophilic substitution reactions of complexes with endogenous ligands (L-methionine, L-cysteine and 5'-GMP), in vitro interactions with ct-DNA (calf thymus DNA) and human serum albumin (HSA) were performed by absorption spectroscopic analysis and emission fluorescence, in silico interactions with DNA and HSA. Also, the cytotoxicity of synthesized ligands and complexes on three cell lines was analyzed using MTT colorimetric test.

Results: The octahedral geometry of the complex was assumed by the analysis of the performed measurements. All complexes react to nucleophiles. High values of the binding constant indicate that the complexes interact with the DNA molecule and HSA. Interaction with a DNA molecule occurs by intercalation or interaction with a small groove. The complexes have cytotoxic potential, while the [Cu (S,O-*pentylene-thiosalicylic acid*)] complex showed the best cytotoxicity based on IC₅₀ values according to all cell lines.

Keywords: S,O-tetradentate ligands, copper(II) complexes, interactions, molecular docking, antitumor activity

Садржај

1. УВОД	10
1. 1. Тиосалицилна киселина	11
1.1.2. Примена и значај тиосалицилне киселине и њених деривата	11
1.1.2. Терапијска примена деривата тиосалицилне киселине	14
1.2. Бакар	18
1.2.1. Хомеостаза и физиолошка улога	18
1.2.2. Болести повезане са дисрегулацијом бакра	21
1.2.3. Хемија бакра у комплексним једињењима	23
1.2.4. Повезаност бакра и карцинома	25
1.2.5. Антитуморска активност бакра.....	26
1.2.6. Механизам антитуморског дејства бакра.....	27
1.3. Комплекси бакра(II) са тиосалицилном киселином и њеним дериватима и њихове структурне карактеристике	33
1.4. Молекулски докинг са молекулом ДНК и хуманим серумским албумином и његов значај	36
2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	38
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	40
3.1. Синтезе S,O-тетраденататних лиганада, деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса бакра(II).....	41
3.1.1 Синтезе S,O – тетраденататних лиганада, деривата тиосалицилне киселине... 41	
3.1.2. Синтезе комплекса бакра(II) са S,O – тетраденататним лиганада, дериватима тиосалицилне киселине	42
3.2. Карактеризација синтетисаних једињења	46
3.2.1. Елементална микроанализа	46
3.2.2. Инфрацрвена спектроскопија.....	46
3.2.3. Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија	46
3.2.4. Електронска парамагнетна резонанција.....	47
3.2.5. Моларна проводљивост	47
3.3. Кинетичка мерења	48
3.4. Интеракције комплекса са ДНК.....	48
3.4.1. Апсорпциона спектроскопска мерења	48
3.4.2. Флуоресцентна мерења.....	49
3.5. Интеракција комплекса са хуманим серумским албумином	50

3.6. Молекулски докинг комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине са молекулом ДНК и хуманим серумским албумином.....	51
3.6. <i>In vitro</i> антитуморска активност	52
3.6.1. Припремање раствора испитиваних једињења.....	52
3.6.2. Ђелијске културе	52
3.6.3. Тестови цитотоксичности. МТТ тест.	52
4. РЕЗУЛТАТИ	54
4.1. Синтеза и карактеризација	55
4.1.1. Синтеза S,O – тетраденатних лиганада и одговарајућих комплекса бакра(II).....	55
4.1.2. Елементална микроанализа комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима.....	57
4.1.3. Инфрацрвени спектри S,O-тетраденатних лиганада, деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса бакра(II)	58
4.1.4. Нуклеарно-магнетно-резонанциони спектри S,O-тетраденатних лиганада, деривата тиосалицилне киселине	58
4.1.5. Електронска парамагнетна резонанција.....	59
4.1.6. Моларна проводљивост	60
4.2. Кинетичка мерења	61
4.3. Интеракције са молекулом ДНК.....	67
4.3.1. Апсорпциона спектроскопска анализа.....	67
4.3.2. Флуоресцентна емисиона спектроскопија	69
4.4. Интеракције са хуманим серумским албумином	71
4.5. Молекулски докинг комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине са молекулом ДНК и хуманим серумским албумином.....	73
4.6. <i>In vitro</i> антитуморска активност S,O-тетраденатних лиганада, деривата тиосалицилне киселине и комплекса бакра(II).....	79
5. ДИСКУСИЈА	81
5.1. Синтеза и карактеризација S,O-тетраденатних лиганада, деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса бакра(II)	82
5.2. Супституционе реакције комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине са L-метионином, L-цистеином и 5'GMP	84
5.3. Интеракције комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине са молекулом ДНК и хуманим серумским албумином.....	85
5.4. Молекулски докинг комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине са молекулом ДНК и хуманим серумским албумином.....	86

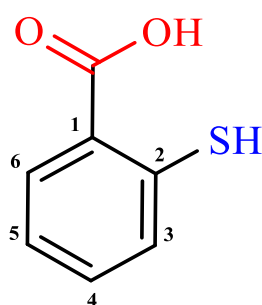
5.5. <i>In vitro</i> антитуморска активност комплекса бабра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине	87
6. ЗАКЉУЧАК	90
7. ЛИТЕРАТУРА	93

1. УВОД

1. 1. Тиосалицилна киселина

1.1.2. Примена и значај тиосалицилне киселине и њених деривата

Тиосалицилна киселина (*син.* 2-меркаптобензоева киселина, 2-сулфанилбензоева киселина, *о*-меркаптобензоева киселина) је 2-сулфанил дериват бензоеве киселине (Слика 1). Представља белу, чврсту супстанцу, без мириса која се добро раствара у нижим алкохолима. Растворљивост у води при киселим рН вредностима је мала, али расте са повећањем рН вредности. Дипротична је киселина, при чему су рКа вредности 4,92 и 9,96 за први, односно други корак дисоцијације. На ваздуху је стабилна, па представља добар лиганд за координовање [1].



Слика 1. Структура тиосалицилне киселине

Лако може да се оксидује до дисулфида, као и остали тиоли (Схема 1). При ниским рН вредностима, тиосалицилна киселина остаје непромењена, када се рН вредност повећа на 6, 50% киселине остаје непромењено, док је на неутралној рН у потпуности оксидована [2].

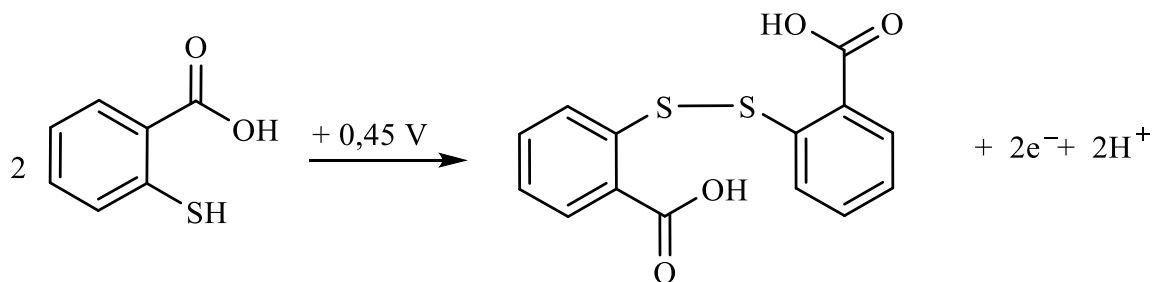
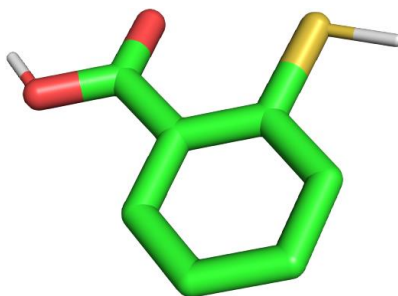


Схема 1. Реакција оксидације тиосалицилне киселине до одговарајућег дисулфида

У инфрацрвеном спектру тиосалицилне киселине постоји јака C=O апсорпциона трака на 1675 cm^{-1} , као и S-H вибрације истезања на 2523 cm^{-1} или 2560 cm^{-1} . Непостојање S-H вибрације истезања у апсорпционом спектру указује на грађање комплекса са јоном метала или на алкиловање тиолне групе. У оквиру карбоксилне групе, OH група даје широку траку на $3050\text{--}2835\text{ cm}^{-1}$ [3,4].

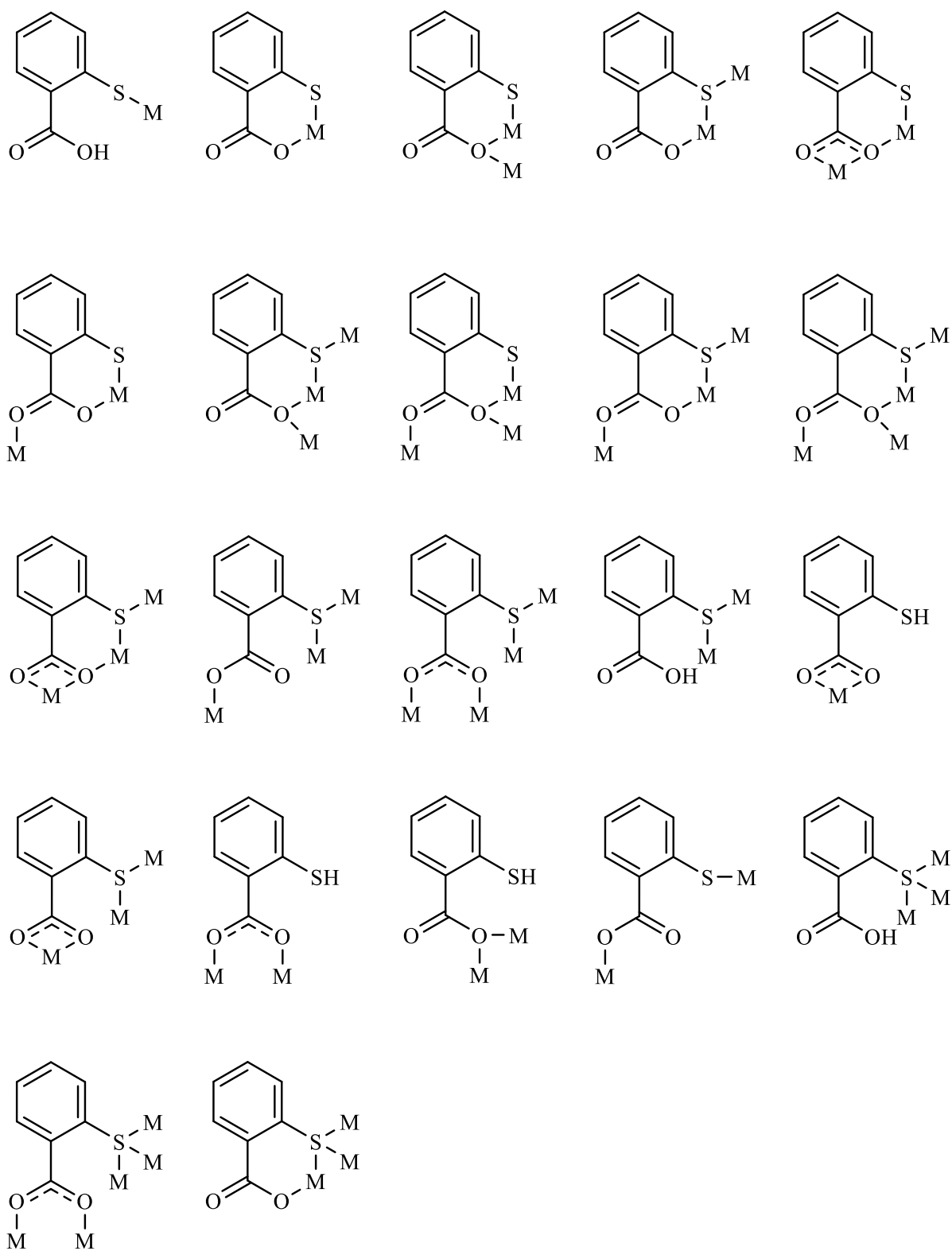
Кристална структура тиосалицилне киселине је већ окарактерисана и описана (Слика 2). Проучавањем кристалне структуре уочено је да долази до настанка димера грађењем водоничне везе између атома водоника и кисеоника из карбоксилне групе. Водонична веза настаје и између атома сумпора из једне и атома водоника из друге тиолне групе (које су супротне оријентације у односу на карбоксилну групу) чиме долази до формирања бесконачно дугог ланца [3].



Слика 2. Кристална структура тиосалицилне киселине

Тиосалицилна киселина садржи „меке“ (тиолну групу – S) и „тврде“ (карбоксилну групу – O) донорске атоме, што јој омогућава различите начине координовања са јонима различитих метала. У зависности од јона метала коришћеног у синтези, може доћи до координовања преко атома сумпора, једног или оба атома кисеоника или преко атома кисеоника и атома сумпора. Постоји пуно начина координовања тиосалицилне киселине за централни јон метала (Слика 3):

1. монодентатно преко атома сумпора из тиолне групе;
2. монодентатно координовање карбоксилатног анјона уз координовање сумпора из тиолне групе;
3. бидентатно координовање карбоксилатног анјона уз или без координовања сумпора из тиолне групе [5];



Слика 3. Начини координовања тиосалицилатног лиганда

Многи лекови који су у хуманој употреби у хемијском смислу представљају арил сулфиде. Њихова разноврсна примена је разлог интензивне синтезе ове групе једињења. Добијају се у реакцији тиосалицилне киселине са алкил халогенидима у базној средини са или без присуства неког прелазног метала. Ако су реактанти тиосалицилна киселина и јодбензен или 1-флуор-2-нитробензен настају у високом приносу диарил тиоетри, док у реакцији супституисаних и несупституисаних бензил бромида настају деривати арил бензил тиоетара (Схема 2). Структуре овако добијених једињења су и кристалографски потврђене [6].

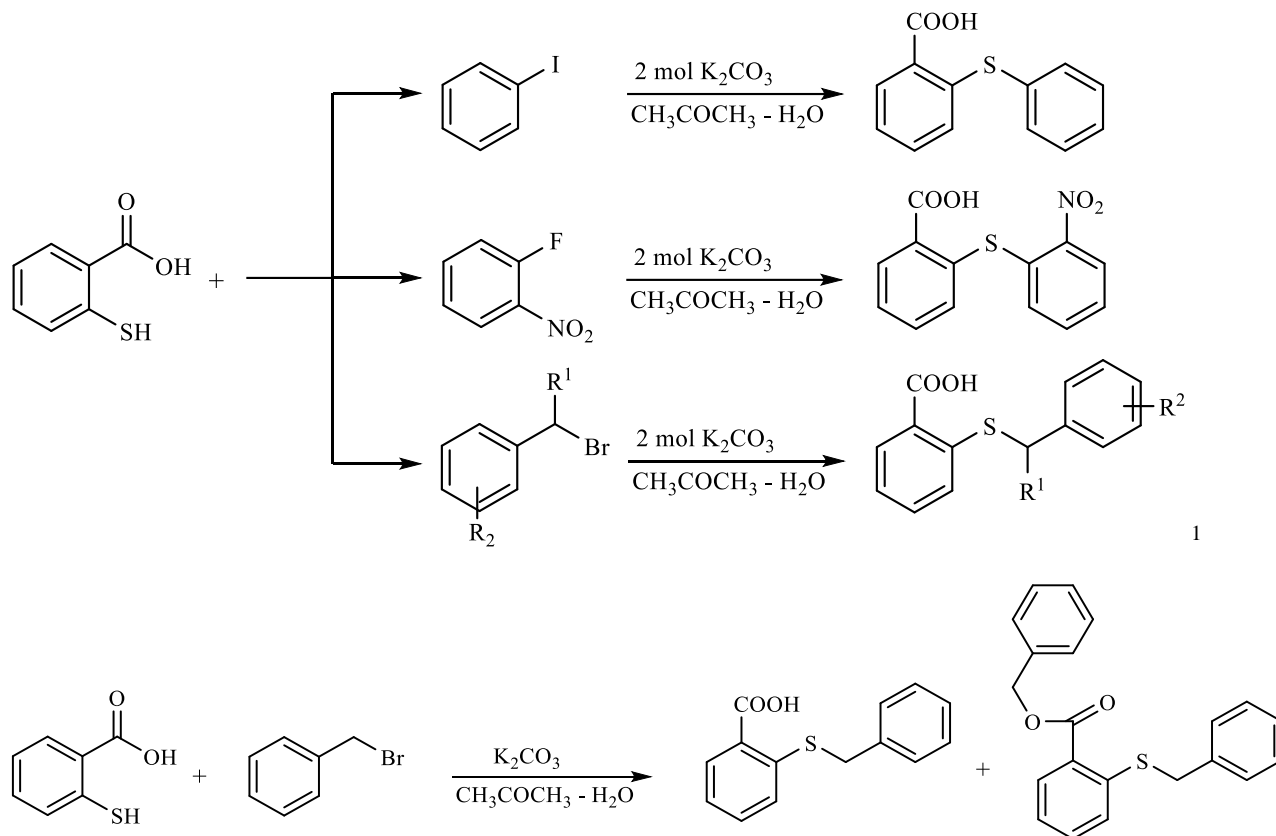


Схема 2. Приказ реакција грађења диарил тиоетара и арил бензил тиоетара

1.1.2. Терапијска примена деривата тиосалицилне киселине

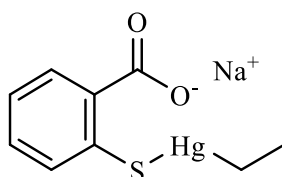
Тиосалицилна киселина показује антиинфламацијско, антиоксидативно и аналгетско деловање. Многи њени деривати нашли су, или ће тек наћи различиту терапијску примену.

Тимеросал (тиомерсал, мертиолат) (Слика 3) је органско једињење живе које се још од тридесетих година XX века налази у употреби као конзерванс у многим медицинским препаратима током њиховог складиштења и употребе, али и током самог процеса производње. Осамдесетих година XX века уклоњен је из препарата за топикалну

¹ Растварач је смеша ацетона и воде.

примену због недовољне антимикуробне ефикасности и могуће токсичности, али је настављена његова употреба у препаратима за парентералну примену [7].

Опречни су ставови који се тичу безбедности примене тимеросала. Сумња да тимеросал може имати токсичне ефекте јавила се због познатих нежељених дејства њему сродног једињења, метил-живе. Осетљивост на тимеросал која се јавља као реакција касне преосетљивости због присуства живе у једињењу такође је један од ограничења за његову примену. Сматра се да дуготрајно излагање живи, нарочито код одојчади и мале деце може оставити озбиљне последице по здравље. Данас се код деце тимеросал примењује само као конзерванс у вакцинама против вируса инфлуенце [8].



Слика 3. Структура тимеросала

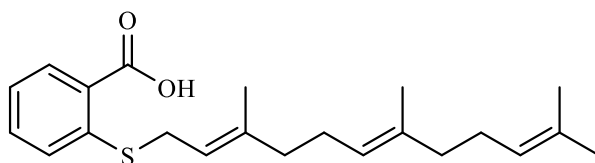
Dóreaa је са сарадницима анализирао студије које су пратиле разлику у токсичности метил-живе и етил-живе у *in vitro* и *in vivo* условима [9]. Неуротоксичност етил- и метил-живе је слична на ћелијским културама, али се другачији одговор у организмима јавља услед њихове различите кинетике, где већу токсичност показује метил-жива. Имунотоксичност је израженија код етил-живе. Етил-жива се и брже метаболички разграђује у поређењу са метил-живом и жива(II)-јоном. Године старости пацијената, начин излагања, пут примене и хемијске разлике између ова два једињења помажу у разумевању токсиколошких разлика и сложености метаболизма једињења живе, али су недовољне за примену адекватних смерница везаних за њихову примену. Ипак, веома је мало спроведених епидемиолошких студија на хуманој популацији које се баве неуротоксичним ефектима тимеросала, те су оне неопходне за боље разумевање његових дуготрајних токсичних дејстава.

Ипак, ставови Светске здравствене организације су да тимеросал треба и даље да буде конзерванс у вакцинама и инјекцијама, јер корист од његове примене превазилази потенцијални ризик који може настати услед хроничног излагања [10].

Тиосалицилна киселина нашла је примену и као носач антитуморских лекова. Наиме, тиосалицилна киселина искоришћена је за формирање мицела и чини њен хидрофобни регион, док хидрофилни регион чини полиетилен гликол са којим тиосалицилна киселина остварује естарску везу [11]. Zhang и сарадници су испитивали утицај овако формираних мицела (чија је величина честица 20-30 nm) на испоруку паклитаксела до више туморских ћелијских линија, при различитој комбинацији дужине ланца полиетилен гликола и при различитом односу полиетилен гликола и тиосалицилне киселине (PEG_{2K}-FTS₂, PEG_{2K}-FTS₄, PEG_{5K}-FTS₂ и PEG_{5K}-FTS₄) [12]. Испитивања су вршена на хуманим ћелијским линијама карцинома колоне и дојке и на мишјим ћелијама тумора дојке. Након инсертовања паклитаксела, величина честице повећала се до највише 60 nm, што омогућава адекватну испоруку лека до туморских ћелија. Показано је да паклитаксел испоручен у виду PEG_{5K}-FTS₄ мицела показује најбољу активност на

ефекат инхибиције раста тумора у поређењу са слободним паклитакселом и паклитакселом инсертованим у друге мицеле, посебно на мишјим ћелијама тумора дојке.

Ras/Raf/MAPK је битан ћелијски сигнални пут који преноси екстраћелијске сигнале до једра где утиче на транскрипцију гена који су укључени у ћелијску деобу, раст и диференцијацију ћелија. *Ras* протеини се другачије називају и мале *GTP*-азе, јер у активном стању везују гуанозин-3-фосфат [13]. Овај сигнални пут одговоран је и за регулацију ћелијског циклуса, обнављање ткива, миграцију ћелија и ангиогенезу. Сви ови процеси битни су и за настанак тумора [14]. Велики проценат свих хуманих карцинома садржи мутиране *Ras* протеине, међу којима нарочито мутира *K-Ras*. Најчешће мутације овог протеина примећене су код карцинома панкреаса. Узимајући у обзир да је у питању тумор који брзо напредује, и да је у стадијуму када се открије често иноперабилан, битно је на њега деловати адекватном хемиотерапијом [15,16]. *Ras* протеин се посттранслационо модификује процесом фарнезилације чиме долази до његове нисходне регулације. Мутирани *Ras* протеин је стално активан и доводи до настанка тумора. Терапијски циљ је синтетисати лек који ће деловати на овај ћелијски сигнални пут [17]. Међу молекулима који се у ову сврху испитују нашао се и Салирасиб (*S-trans*-фарнезилтиосалицилна киселина – ФТС) (Слика 4). Салирасиб се уместо *Ras* протеина везује за његово место на ћелијској мембрани захваљујући структурној сличности, чиме онемогућава активацију *Ras* сигналног пута. Наиме, молекул ФТС садржи фарнезил групу која структурно подсећа на фарнезил цистеин, присутан у свим изоформама *Ras* протеина. Када се ФТС веже за активно место *Ras* протеина, долази до деградације *Ras* протеина у плазми.



Слика 4. Структура молекула фарнезилтиосалицилне киселине

Салирасиб је у првој фази клиничких испитивања испитиван код пацијената са солидним туморима [18], као и код пацијената са хематолошким малигнитетима [19]. Фармакокинетичке особине, укупна количина лека у организму, али и дозно-зависна нежељена дејства показују да би препоручена дневна доза Салирасиба требало да износи 800 mg два пута дневно. Међу благим нежељеним дејствима пријављиваним код пацијената издвојила су се гастроинтестиналне тегобе. Салирасиб доводи до продужетка преживљавања пацијената са солидним туморима, што га сврстава у кандидата за будућа испитивања у терапији различитих малигнитета, нарочито код особа са мутацијом *K-Ras* протеина и у комбинацији са другим терапијским приступима. Захваљујући истом механизму дејства испитиван је и његов утицај на смањење неуропатског бола који настаје применом винкрестина [20], али и на хроничну констрикцију ишијадичног нерва код пацова [21]. Једнократна интратекална примена ФТС смањује хипералгезију и алодинију, што говори у прилог њеном антинеурозапаљенском и аналгетском деловању. Његова неуропротективна улога показана је и код трауматске повреде мозга, експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса и аутоимунског неуритиса код пацова, чиме се испитивања продубљују и у смеру терапије инфламацијских неуропатија [21,22].

Алцхајмерова болест је у данашње време један од водећих узрока инвалидитета и смрти у целом свету. Когнитивна оштећења која се јављају углавном зависе од неурогенетског оштећења. Патогенеза ове болести лежи у таложењу бета амилоида, а показано је да он доводи до активације *Ras/ERK* сигналног пута. У нефизиолошким условима, активација овог сигналног пута може имати супротан ефекат [23,24]. Студије на ћелијским линијама показале су да ФТС спречава поновни улазак ћелије у ћелијски циклус, који је индукован таложењем бета амилоида. *In vivo* истраживања на мишевима показују да ФТС може да спречи утицај бета амилоида на преживљавање и раст нових неурона у хипокампусном дентатном гирису, што има позитиван ефекат на способност учења и просторне меморије, па се даља испитивања овог молекула померају и ка терапији Алцхајмерове болести [25,26].

Међу водећим светским болестима у погледу заражавања и смртности, налази се и маларија. Ограничена ефикасност постојеће терапије, али и недостатак имунизације против ове болести представљају разлог због кога се научници све више окрећу већ познатим молекулима у циљу испитивања њиховог ефекта на асексуалну фазу паразита *Plasmodium falciparum*. Салирасиб је као *Ras* инхибитор испитиван и у терапији маларије [27].

Показано је да има дозно-зависни одговор са вредношћу IC_{50} од 14 μM , с тим да је најефикаснији у стадијуму формирања шизонта у јетри, у ком је и највише експримиран *Ras* протеин. Захваљујући овим резултатима, новија испитивања Салирасиба крећу се у смеру синтезе његових деривата. *Porta* је са сарадницима испитивао активност тиоетара насталих алкиловањем, као и деривата добијених увођењем 1,2,3-триазолског прстена. Праћени су следећи параметри: испуњавање правила Липинског, вредности партиционих коефицијента ($\log P$ и $\log D$) и фармакокинетичких параметара молекула. Међу испитиваним једињењима са највећом ефикасношћу и најмањом токсичношћу издвојен је дериват код кога је триазолски прстен алкилован 2-нафтилметил супституентом. Ово једињење има IC_{50} вредност 20,54 и представља потенцијални антималярик за даља испитивања [28].

Индучибилна синтаза азот оксида (*iNOS*) доводи до ослобађања азот-мооксида и представља ензим који је у физиолошким условима одговоран за нормално зарастање коже и интестиналне мукозе, пролиферацију Т лимфоцита и мобилизацију леукоцита у оквиру урођеног имунског одговора. Претерана стимулација овог ензима у неким патолошким стањима (нпр. услед ослобађања липополисахарида) доводи до оштећења митохондрија и индукује ћелијску апоптозу. *Wu JJ* и сарадници испитивали су утицај ФТС на индукцију *iNOS* у макрофагима мишева. Показано је да под утицајем ФТС долази до инхибиције индукције *iNOS*. То се дешава спречавањем везивања транскрипционог фактора *NF- κ B* (енг. нуклеарни фактор капа В) за гене који регулишу синтезу *iNOS* у инфламацијским стањима. Аутори истичу да даља испитивања треба да обухвате деривате ФТС који могу показивати боље фармаколошке ефекте. Овим резултатима знатно се проширује потенцијални терапијски ефекат ФТС [29].

1.2. Бакар

1.2.1. Хомеостаза и физиолошка улога

Бакар је биогени елемент. После гвожђа и цинка најзаступљенији је елемент у траговима у хуманом организму [30,31]. Заједно са сребром и златом спада у групу племенитих метала. Апсорпција бабра зависи од количине која се унесе храном, конкуренције са јонима цинка, гвожђа и кадмијума, као и од старосне доби особе која уноси бакар. Такође, на апсорпцију утиче и концентрација NaCl у интестинуму (повећана концентрација NaCl повећава инфлукс бабра у ћелију и обрнуто) (Схема 3)[32]. Инфлукс јона сребра се врши преко истог транспортног протеина (hCTR1), што такође може смањити апсорпцију бабра [33]. Апсорпција и екскреција су добро контролисане у циљу регулације недостатка бабра, али и његових токсичних ефеката. Метаболизам у великој мери зависи од различитих стања, попут трудноће, инфламације, тоталне парентералне исхране, али и болести као што су Менкесова и Вилсонова болест [34,35].

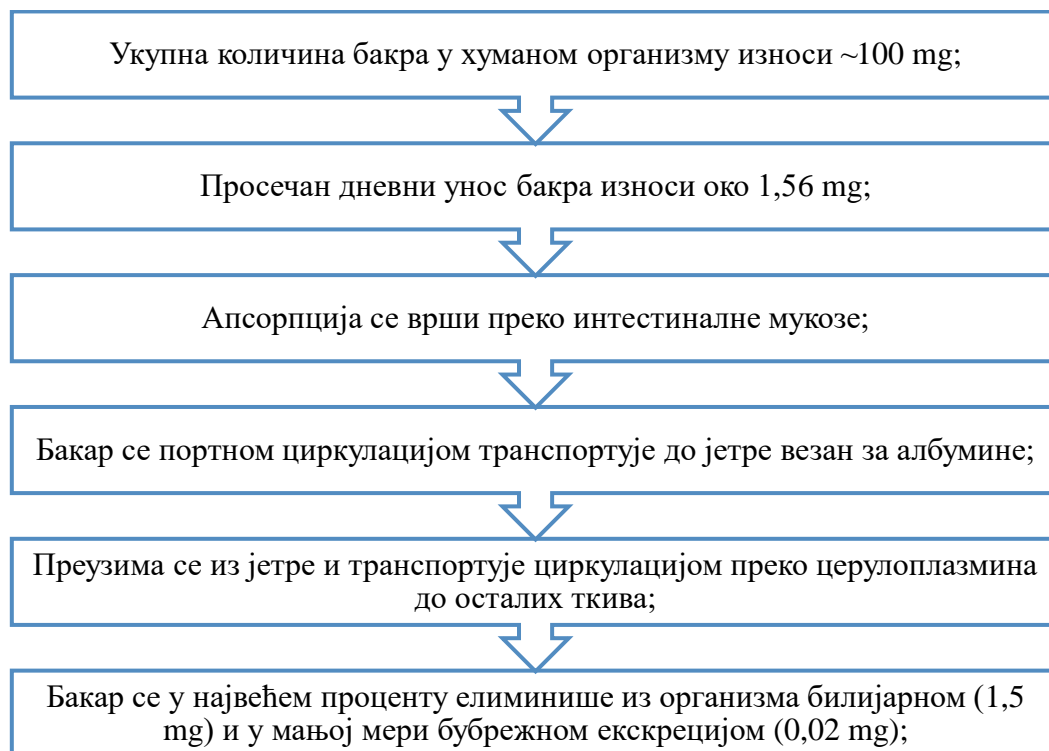


Схема 3. Кинетика бабра у хуманом организму [33,35,36];

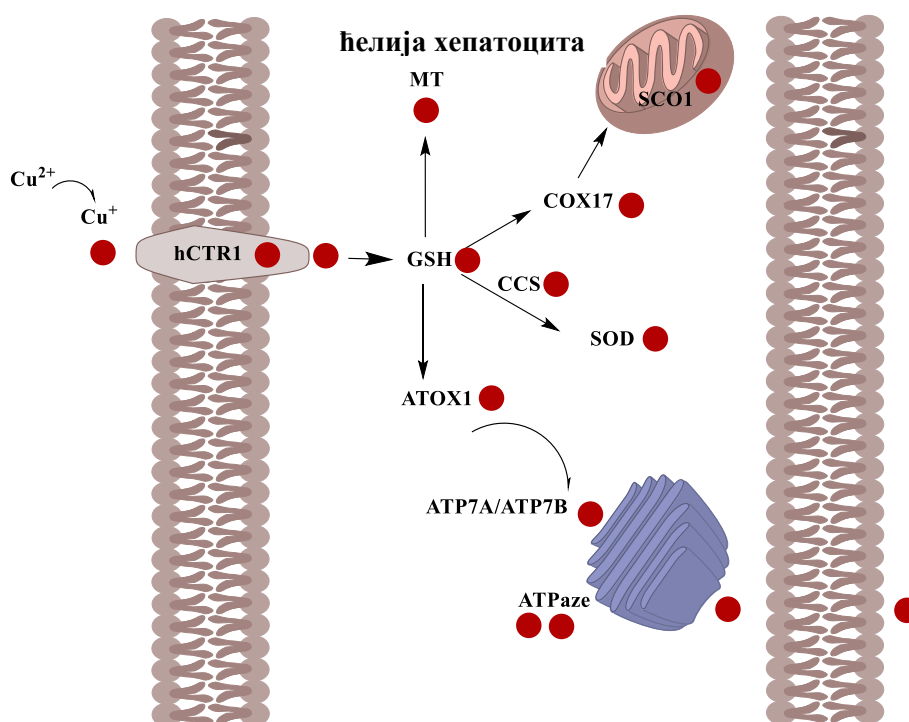
Да би бакар могао да се апсорбује, неопходно је да се редукује до бакар(I)-јона. Апсорпција се највећим делом одвија у танком цреву. Након проласка кроз ентероците, транспортује се до јетре циркулацијом као бакар(II)-јон везан за албумин и транскупреин. Бакар се у циркулацији налази највећим делом везан за протеин

церулоплазмин, што спречава његову редукцију. Формирање тернарног комплекса албумин-бакар-хистидин омогућава пролазак кроз ћелијску мембрану [37].

На ћелијама хепатоцита и ентероцита се налази протеин који транспортује бакар у ћелију, хумани транспортни протеин бакра (hCTR1) (Слика 5 и Табела 1). Осим овог трансмембранског протеина, бакар се може транспортовати до ћелије и помоћу транспортера двовалентних јона метала (DMT1), који поред јона бакра врши преузимање и транспорт јона цинка и гвожђа [38,39].

Након што се бакар овим путем унесе у ћелију, долази до његовог преузимања од стране глутатиона и настанка глутатион-бакар(I) комплекса. Овакав комплекс даље може да транспортује јон бакра до одговарајућих хаперона, антиоксидативног протеина (Atox1), који бакар предаје трансмембрanskим протеинима, АТР7А (који је заступљенији у ентероцитима) и АТР7В (у већем проценту присутан у хепатоцитима) у оквиру транс-Голџијеве мреже. АТР7А отпушта бакар у портну циркулацију чиме се врши његово допремање до јетре. АТР7В елиминише вишак бакра из ћелија ентероцита и врши уградњу бакра у церулоплазмин. Он неутралише вишак бакра и учествује у даљем транспорту бакра до крви и жучи [40,41].

Поред Atox1, у хапероне спадају и Cox17, који транспортује бакар до цитохром с оксидазе (присутне у митохондријама), као и CCS који транспортује јон бакра до супероксид дисмутазе (SOD). Такође, бакар може бити преузет и од стране металотионеина. Они представљају интрацелуларне протеине, који су задужени за спречавање токсичног дејства метала на нивоу ћелије [41-43].



Слика 5. Графички приказ транспорта бакра кроз ћелију

Табела 1: Интрацелуларни протеини и ензими који учествују у транспорту бакра кроз ћелију

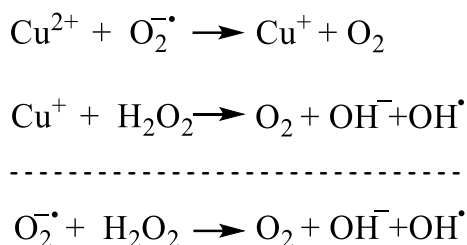
<i>h(CTR1)</i>	(хумани) транспортни протеин бакра
<i>MT</i>	металотионеини
<i>GSH</i>	глутатион
<i>CCS, ATOX1, COX17</i>	хаперони бакра
<i>ATP7A/7B</i>	транспортери бакра, алфа и бета полипептиди
<i>SOD</i>	супероксид дисмутаза

Бакар има вишеструку улогу у хуманом организму, јер улази у састав многих ензима: цитохром *c* оксидаза, тирозиназа, Cu/Zn супероксид дисмутаза, церулоплазмин, итд. Битан је ћелијски антиоксиданс. Учествује у метаболизму гвожђа, еритропоези, неуротрансмисији, изградњи везивног ткива, синтези меланина, омогућава нормално функционисање тиреоидне жлезде, итд. Бакар се у оквиру својих ензима (купроензими) налази унутар протеина где се налази активно место и учествује у преносу једног електрона у реакцијама које укључују кисеоник [35,40,42].

Табела 2. Најзначајнији купроензими и њихова улога у организму [35]

Ензими који садрже бакар		Улога у хуманом организму
амино оксидазе	АОС3	Ћелијски адхезиони протеин; Улога у миграцији леукоцита;
	МАО _а МАО _б	Деаминација моноаминских неуротрансмитера;
	АОС1	Инактивација биомолекула који учествују у ћелијској пролиферацији и диференцијацији ткива, алергијским и имунским реакцијама, развоју карцинома и у апоптози;
лизил оксидаза		Унакрсно повезивање колагена и влакана; Повећање чврстоће везивног ткива;
цитохром <i>c</i> оксидаза		Катализа реакције редукције молекулског кисеоника уз стварање воде као споредног производа;
церулоплазмин		Оксидација феро јона у фери јон и његова уградња у транспортни протеин гвожђа – трансферин;
супероксид дисмутаза		Конверзија супероксид радикала у водоник пероксид и кисеоник;
тирозиназа		Конверзија тирозина у допамин и оксидација допамина до допахинона;
допамин β-хидроксилаза		Конверзија допамина у норадреналин;

Повећан ниво бакра у организму доводи до различитих обољења на нивоу бубрега, јетре, имунског система. Многа од тих обољења су последица стварања слободних радикала који доводе до оштећења ДНК молекула, пероксидације липида, али и замене јона метала у различитим ензимима. У присуству неког редукујућег агенса (нпр. аскорбинске киселине или глутатиона) долази до редукције бакра(II) у бакар(I)-јон, који гради хидроксилни радикал из H₂O₂ [44]:



Тако настали слободни радикали генеришу стварање нових слободних радикала од стране других неутралних молекула (нпр. липидни радикали настају из незасићених масних киселина). Такође, снижена концентрација јона бакра у организму може утицати на повећано стварање слободних радикала. Бакар може двојачко утицати на оштећење ДНК молекула, делујући директно токсично или инхибицијом ензима за његову репарацију. Протективно дејство у овом процесу има глутатион који може да спречи редукцију бакар(I)-јона, чиме га стабилизује и онемогућава настанак слободних радикала. Хелатори који садрже домене богате аминокиселинама (метионином, цистеином и хистидином) имају способност да при концентрацијама већим од 10⁻¹⁸ М регулишу интрацелуларну концентрацију јона бакра. Захваљујући редокс-активности бакар своје терапијско дејство испољава као антипролиферативни, антиинфламацијски и антимикробни агенс [44,45].

1.2.2. Болести повезане са дисрегулацијом бакра

Вилсонова болест представља аутозомно рецесивно обољење које се јавља због мутације АТР7В гена. Последица ове мутације је онемогућена екскреција бакра путем жучи, што доводи до његовог накупљања у организму, првенствено у јетри и мозгу [46,47]. Бакар индукује оксидативно оштећење што активира ћелијску смрт. Тако ослобођени екстрацелуларни бакар накупља се у плазми и узрокује екстрахепатичну токсичност. Овај токсични ефекат се манифестује повећањем величине хепатоцита, појавом инфламације и поремећајем у функционисању цитоскелета што за последицу има цирозу јетре [48]. Терапија подразумева примену хелатора бакра који га везују и елиминишу урином. Међу њима издвајају се *D*-пенициламин, и новији, безбеднији хелатори: триентин и тетратиолибдат. Такође, примењује се и цинк ацетат за одржавање концентрације бакра у серуму.

Менкесова болест је рецесивно наследно обољење везано за X хромозом који карактерише дефект на нивоу АТР7А гена. Обично се јавља код мушкараца и симптоми се примећују током првих месеци живота. Улога АТР7А протеина је да у транс-Голџијеву мрежу упумпава бакар, како би се уградио у ензиме чији је саставни део (нпр. допамин-β-хидроксилаза), али утиче и на излазак бакра из ћелије [49]. Мутација АТР7А протеина онемогућава интестиналну апсорпцију бакра што доводи до његове интестиналне акумулације и системског дефицита [50]. Клиничке манифестације обично

подразумевају потешкоће у неуролошком развоју, церебралну атрофију и демијелинизацију, поремећаје на нивоу крвних судова, косе, слабе кости, итд. Услед дефицијенције ензима чији је бакар саставни део у мозгу (цитохром *c* оксидаза, лизил оксидаза, тирозиназа и др.) присутни су многи неуролошки симптоми. Терапија подразумева примену комплекса бакра са хистидином у циљу контроле неуролошких симптома и продужетка преживљавања, међутим показано је да је овај терапијски приступ ефикасан само ако се са применом започне у неонаталном периоду [51].

Бакар и инфламација. Церулоплазмин је протеин акутне фазе који се секретује у стањима трауме и стреса. Инфламација, инфекција и хроничне инфламаторне болести такође утичу на повећање концентрације овог ензима, што доводи и до повећања концентрације бакра. [52,53]

Бакар и Sars-CoV-2. Бакар може да индукује аутофагију као одговор на присуство вируса у организму. На овај начин се ћелија брани од дејства вируса. Долази до формирања аутофагијских вакуола и до апоптозе ћелије. Узимајући у обзир те чињенице, научници сматрају да би суплементација бакром могла да обезбеди бољи имунитет против SARS-CoV-2 инфекције [54]. Истраживање које су спровели *Andreou* и сарадници показало је да комбинована терапија бакра, *N*-ацетилцистеина, колхицина, азот-моноксида са новом антивирусном терапијом – ремдесивир и молнупиравир представљала добар избор за пацијенте позитивне на SARS-CoV-2 вирус. Испитује се и примена наночестица бакра као носиоца лекова и вакцина у превенцији и терапији овог вируса [55].

Бакар и Алцхајмерова болест. Повећан ниво бакра у цереброспиналној течности пронађен је код пацијената са Алцхајмеровом деменцијом, који прати повећан или нормалан ниво бакра у плазми [56]. Додатак бакра у пијаћу воду код зечева довело је до погоршања когнитивне функције и погоршања патолошке основе болести. Повећан унос бакра уз унос хране богате zasiћеним и *trans*-мастима такође доводи до прогресије болести. Јони бакра(II) се високим афинитетом везују за амилоидни прекурсорски протеин и бета амилоидни пептид што повећава настанак плакова [57-59].

1.2.3. Хемија бакра у комплексним једињењима

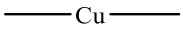
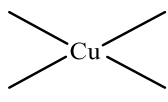
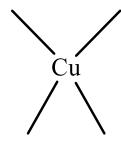
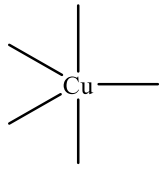
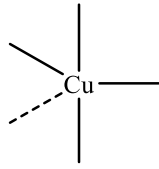
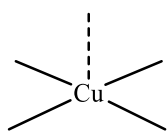
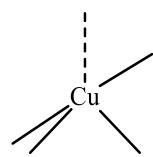
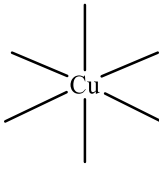
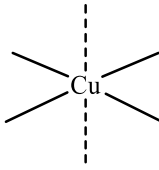
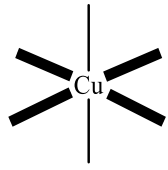
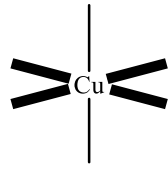
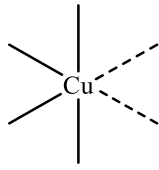
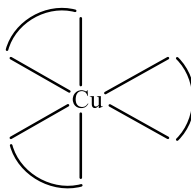
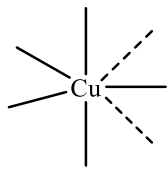
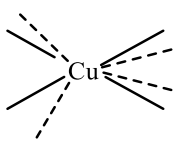
Бакар је 29. елемент периодног система (Табела 3). У биолошким системима постоји у облику бакар(I) и бакар(II)-јона. Бакар(I) је нерастворан у биолошким течностима и обично се налази везан за друге биомолекуле. Пошто је редокс активан често мења оксидациона стања у реакцијама у којима учествује као ензимски активатор [35,60].

Табела 3. Карактеристике елементарог бакра

Атомски број	29
Атомска маса	63,546
Електронска конфигурација	$1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^1$
Тачка топљења	1083°C
Тачка кључања	2573°C
Електронегативност	1,90 (Pauling)
Јонски радијус	0,96Å° Cu(I) 0,73Å° Cu(II)
Стандардни редокс потенцијал	+0,520V за $Cu^+ + e^- \rightarrow Cu$
	+0,341V за $Cu^{2+} + 2e^- \rightarrow Cu$
	+0,159V за $Cu^{2+} + e^- \rightarrow Cu^+$

Оксидациона стања бакра у оквиру комплексних једињења крећу се од 0 до +4, међутим, најчешће се јавља као бакар(I) и бакар(II)-јон [61]. Бакар(I)-јон гради комплексна једињења са координационим бројевима 2, 3 и 4. Бакар(II)-јон најчешће гради комплексна једињења са координационим бројевима 4 или 6. Ретко, бакар(II) може да награди линеарне (координациони број – 2) и тригонално – бипирамидалне (координациони број – 5) комплексе, али и комплексе са координационим бројевима 3, 7 и 8 [62]. Комплекси су најчешће са тетрагоналном дисторзијом, односно донорски атоми нису правилно распоређени око јона бакра. Комплекси бакар(II)-јона са координационим бројем 4 су квадратно-планарни и најчешће садрже 4 краће екваторијалне везе и 2 дуге аксијалне везе. Ређе се могу јавити и комплекси код којих су 2 аксијалне везе краће, а 4 екваторијалне везе дуге [63]. Захваљујући могућности грађења комплекса различите геометрије, бакар(II) може да се координује са лигандима који садрже различите донорске атоме (N, O, S и халогени), као и са лигандима различите дентатности (од монодентатних до хексадентатних). Зато се добро координује са карбоксилатним кисеоником, имидазолским азотом, цистеинским и метионинским сумпором и фосфинским фосфором [37]. Бакар(I) комплекси истог координационог броја најчешће су тетраедарски. Комплекси бакра(II) обично су плаве или зелене боје (апсорбују на таласној дужини од 600-900 nm) захваљујући непопуњеној *d* орбитали. Начини координовања бакра са одговарајућим лигандима у оквиру комплексних једињења приказани су у Табели 4 [64,65].

Табела 4. Могућа геометрија и координациони бројеви комплекса бабра(II)

			
линеарна (КБ ² : 2)	квадратна и ромбоидно копланарна (КБ: 4)	спљоштен тетраедар (КБ: 4)	тригонална бипирамида (КБ: 5)
			
искривљена тригонална бипирамида (КБ: 5)	квадратна пирамида (КБ: 5)	искривљена квадратна пирамида (КБ: 5)	октаедар (КБ: 6)
			
продужени тетрагонални октаедар (КБ: 6)	спљоштен тетрагонални октаедар (КБ: 6)	спљоштен ромбоидни октаедар (КБ: 6)	<i>cis</i> -искривљени октаедар (КБ: 6)
			
тригонални октаедар (КБ: 6)	хептакоординована (КБ: 7)	октакоординована (КБ: 8)	

² КБ – координациони број

1.2.4. Повезаност бакра и карцинома

Бакар учествује у процесима оксидо-редукцује, стимулише ангиогенезу и може да замени друге јоне метала у активном месту ензима. Код неких тумора као што су лимфом, карцином плућа, желуца, дојке, цервикални карцином, итд. концентрација бакра знатно је виша у односу на његову концентрацију у здравим ћелијама [66].

Истраживања спроведена на мишевима показала су да се са повећањем концентрације јона бакра у серуму смањује његова концентрација у јетри. Истовремено долази до смањења нивоа гвожђа, селена и цинка у серуму, па је однос концентрације бакра и сваког од наведених јона добар показатељ ефикасности антитуморске терапије [67].

Опречна су истраживања која испитују утицај бакра на настанак и раст карцинома. Примена бакра код мишева са карциномом у облику раствора који се примењивао током 10 дана у дози од 0,75 mg/дан довела је до престанка раста тумора [68]. Када се бакар ацетат давао субкутано мишевима са карциномом јетре (2 mg/kg/недељно), довео је до значајног смањења тумора током 26 недеља примене [69]. Међутим, орална примена бакар сулфата [70] и његова примена у пијаћој води [71] изазвала је настанак карцинома дојке и Лангерхансових острваца панкреаса код мишева који су били изложени. Ове податке ипак треба пажљиво размотрити приликом анализе, јер ниједно истраживање није обухватило праћење серумске концентрације јона бакра.

Осамдесетих година двадесетог века дошло се до сазнања да бакар учествује у ангиогенези [72]. Ангиогенеза представља процес настанка нових крвних судова из већ постојећих венула и капилара, који се дешава у физиолошким и патолошким условима. Физиолошки се ангиогенеза одвија у ембрионалном периоду, током репродуктивног развоја и процеса зарастања рана, док се патолошки дешава при расту и развоју тумора и у неким болестима (артритис и атеросклероза) [73,74]. Контролисана је проангиогенетским (васкуларни ендотелни фактор раста – VEGF, базични фибробластни фактор раста – bFGF, трансформишући фактор раста β – TGF β , ангиогенин, интерлеукини – IL-1 и IL-8) и антиангиогенетским факторима (ангиостатин и ендостатин) [75]. Протеини који везују бакар: церулоплазмин, хепарин и трипептид глицил-хистидил-лизин откривени су као молекули значајни за ангиогенезу у корнеи зечева. *In vitro* испитивања доказала су да бакар учествује у пролиферацији и миграцији хуманих ендотелних ћелија и да је ко-фактор проангиогенетских ензима. Има утицаја и на сам ангиогенин, повећавајући његов афинитет везивања за ендотелијалне рецепторе.

У циљу контроле концентрације бакра и његовог утицаја на ангиогенезу испитивања су првенствено била усмерена ка постојећој терапији. Хелатори бакра, који су примарно испитивани у терапији Вилсонове болести, делују везујући екстрацелуларне јоне бакра. Триентин, D-пенициламин и тетратиомолибдат испитивани су у различитим анималним моделима карцинома: хепатоцелуларни карцином, карцином сквамозних ћелија главе и врата и др. где су довели до значајне инхибиције раста тумора уз контролу ангиогенезе. Тетратиомолибдат је у првој и другој фази клиничких испитивања код 34 пацијената са мезотелиомом плеуре у дози од 180 mg/дан током 34 дана довео до приметног снижења купредоксина (са 45 \pm 2 на 13 \pm 2 mg/dl) и VEGF у серуму (са 2086 на 1250 pg/ml). Иако су истраживања показала њихов позитивни ефекат у контроли

ангиогенезе, хелатори бакра не могу бити једини терапијски избор код карцинома, већ се морају комбиновати са другим лековима.

Јонофоре везују екстрацелуларне јоне бакра и врше њихов трансфер до ћелије, повећавајући његову интрацелуларну концентрацију. Комплекс бакра са дитиосемикарбазоном, као и дисулфирам и клиохинол интрацелуларно отпуштају координовани бакар, што је потврђено истраживањима на мишјим ћелијским линијама [76]. Дисулфирам и клиохинол показали су ефикасност и у клиничким студијама на карциному дојке [77]. Претпоставља се да су малигне ћелије осетљивије на дејство јонофора, али то још увек није клинички потврђено [78,79].

Бакар који се у ћелију испоручује јонофорама може имати и токсичне ефекте услед способности да ствара слободне радикале, али и могућности да замени друге јоне у оквиру интрацелуларних ензима. Осим измењеног метаболизма бакра код урођених болести као што су Менкесова и Вилсонова болест, акумулација бакра забележена је и код других обољења, попут Алјцхајмерове болести, Кројцфелд-Јакобсове болести, реуматоидног артритиса, дијабетеса и карцинома [68].

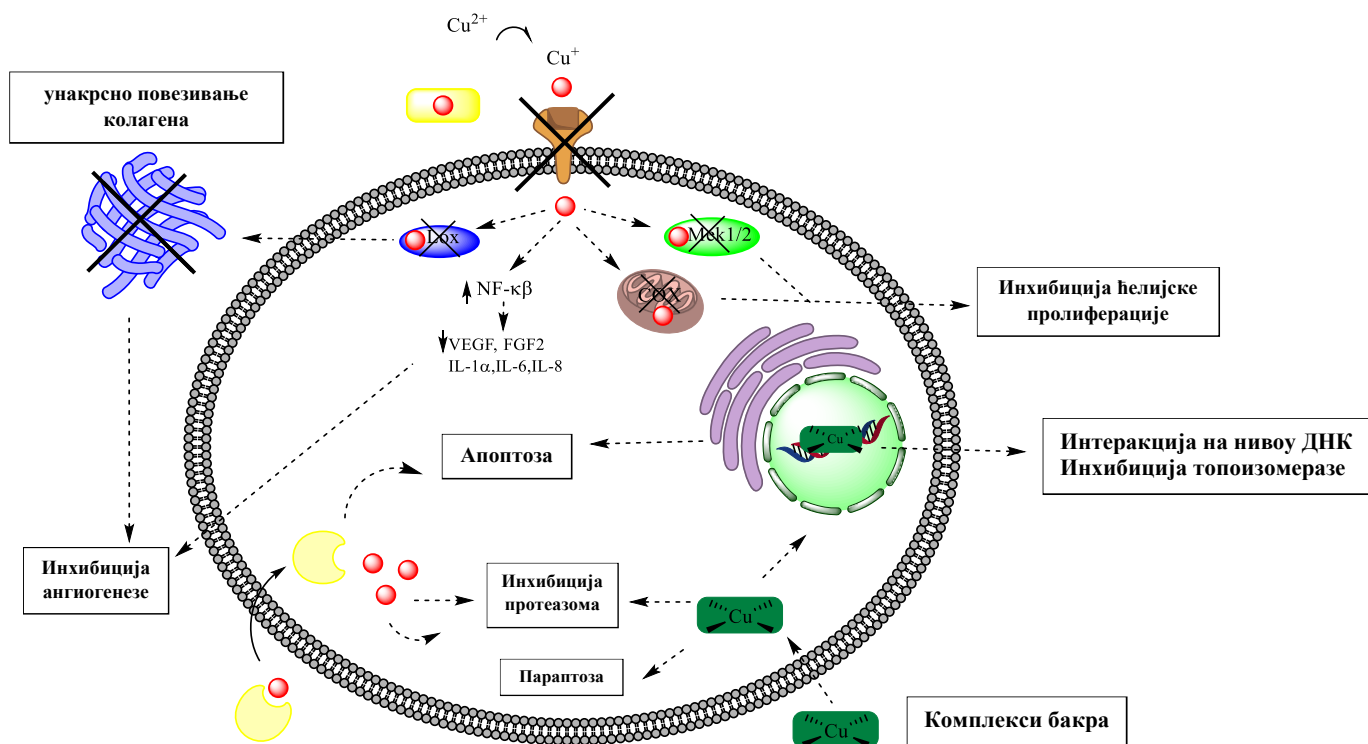
1.2.5. Антитуморска активност бакра

Иако је са открићем *цисплатине* започета ера примене и испитивања комплексних једињења у терапији карцинома, нежељена дејства која се јављају као последица њене примене, али и урођена и стечена резистенција на лек били су разлог да се научници окрену испитивању нових комплексних једињења. Циљ је био да се синтетише комплекс са побољшаном фармаколошком активношћу, смањеном резистенцијом и токсичношћу у односу на *цисплатину*. Након *цисплатине*, синтетисани су и други комплекси платине(II) чиме су проблеми делимично превазиђени. Међутим, отпочето је и испитивање комплекса других прелазних метала, међу којима су се издвојили биогени елементи [68,80].

Сматра се да би њихов другачији механизам дејства у односу на платину, али и метаболизам и токсичност били боља алтернатива за хумани организам. То су разлози због којих би примена других комплексних једињења могла да буде ефикаснија у терапији тумора који су постали резистентни на конвенционалну терапију. Узимајући у обзир другачији механизам деловања комплекса бакра, може се очекивати и шири спектар деловања у терапији различитих тумора [81].

Бакар је неопходан за ангиогенезу, пролиферацију и миграцију ендотелних ћелија. Повишен ниво бакра у организму може бити окидач за настанак карцинома. Осим што је откривен код многих типова карцинома, такође може бити добар предиктор тока болести. Међутим, управо због тога што здраве и туморске ћелије различито реагују на присуство бакра, ови комплекси се интензивно испитују у терапији карцинома [82].

Комплекси бакра различитим механизмима испољавају антитуморску активност [83-85]: инхибирају активност протеазома, теломераза, учествују у формирању реактивних кисеоничних врста, интеркалацијом, инхибицијом протеазома, апоптозом, параптозом, учествују у деградацији молекула ДНК, итд. (Слика 6).



Слика 6. Механизми антитуморског дејства бакра [62,86]

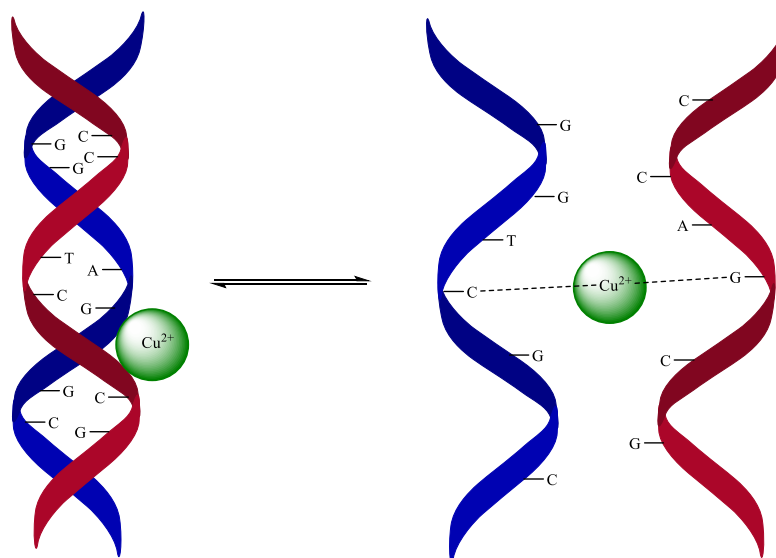
Хелатори делују везујући екстрацелуларни бакар, чиме онемогућавају његову улогу у ангиогенези, расту тумора и његовој метастази. Јонофоре пак омогућавају улазак бакра у ћелију и повећавају му интрацелуларну концентрацију. Механизам различитих комплекса бакра подразумева инхибицију протеазома, топоизомеразе I и II, стварање реактивних кисеоничних врста, интеракцију са ДНК молекулом, апоптозу и параптозу.

COX - цитохром с оксидаза, **FGF2** - фактор раста фибробласта, **IL-1, -6, -8** - интерлеукини, **LOX** - лизил оксидаза, **MEK1/2** - митогеном активирани протеин киназа, **NF-κB** – нуклеарни фактор капа В, **VEGF** – васкуларни ендотелијални фактор раста.

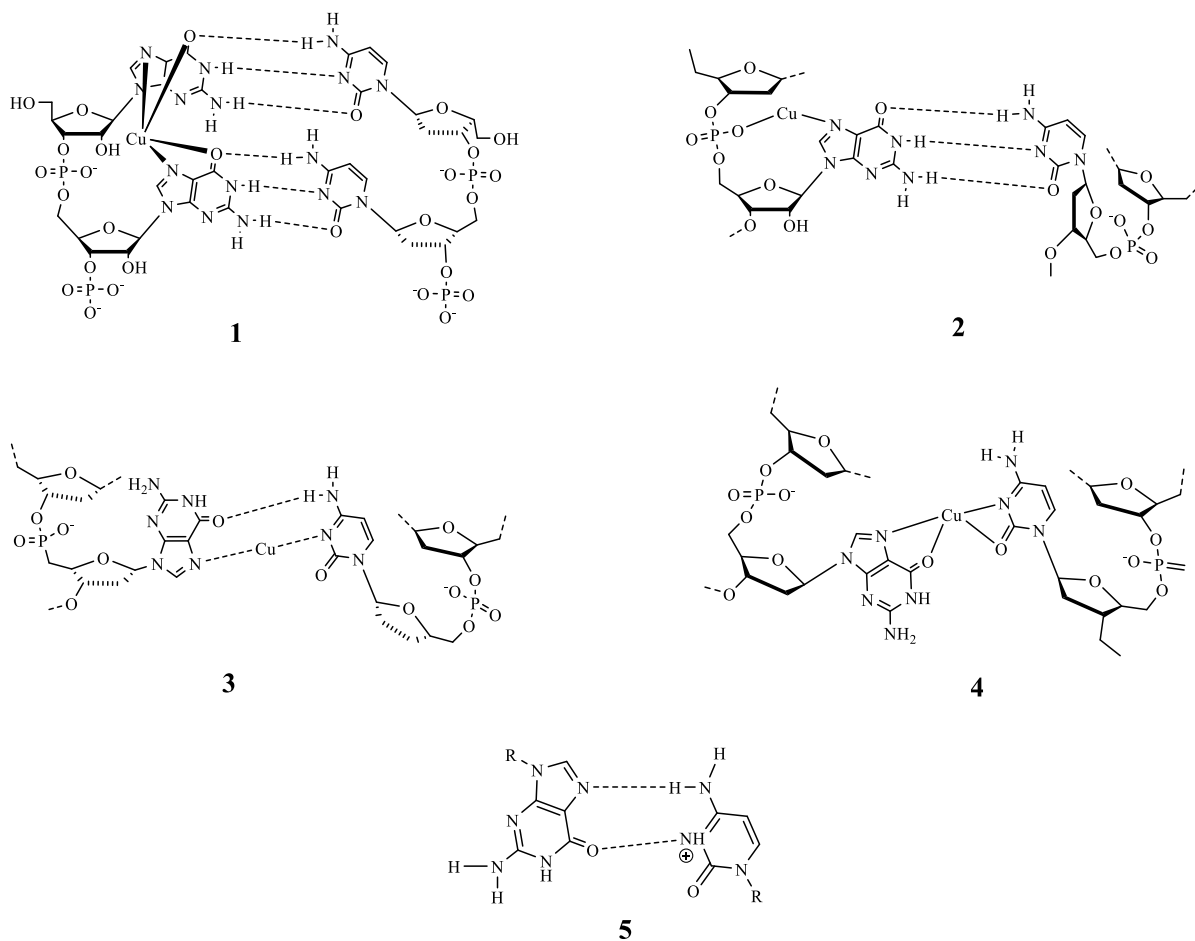
1.2.6. Механизам антитуморског дејства бакра

Непосредно након што је откривена цитотоксична активност *цисплатине* показано је да и бакар(II)-јон утиче на одмотавање и намотавање ДНК ланца и да изазива грешке приликом процеса транскрипције везујући за ДНК ланац. Чак и у микромоларним концентрацијама има способност да индукује кондензовање ДНК молекула [87,88]. Још тада је доказано да се бакар(II)-јон везује за азот у позицији N7 гуанина [89], али је указано и на могуће везивање за фосфатне групе које формирају кичму ДНК ланца [90]. Научници су запазили да се при ниским концентрацијама бакар(II)-јон интеркалира између комплементарних база (Слика 7) градећи тзв. „сендвич“ комплекс, а награђени комплекс је додатно стабилизован стекинг и водоничним интеракцијама које се остварују са комплементарном цитозинском базом

(Слика 8.1.). Када се концентрација јона бакра повећа, он се повезује са гуанином преко N7 атома и са кисеоником из фосфатне групе, што онемогућава грађење водоничних веза и дестабилизује ДНК молекул. Истовремено се због блокаде гуанина омогућава грађење водоничне везе са цитозином у позицији N3 [91,92]. Други начини везивања обухватају гуанин-цитозин базне парове и то формирањем *Hoogsteen* гуанин-цитозин базних парова, што подразумева промену гликозидне везе из *anti* у *syn* конформацију. Rohner је са сарадницима претпоставио још један начин везивања јона бакра, интерланчано везивање преко гуанина у позицијама N7/O6 и цитозина N3/O3 [93].



Слика 7. Интеркалација бакра(II) између комплементарних база



Слика 8. Ковалентно везивање бакра(II) за ДНК молекулу и Hoogsteen гуанин-цитозин базни пар (5)

1.2.6.1. Комплекси бакра који делују на нивоу ДНК

Механизам антитуморског дејства комплекса бакра још увек није довољно разјашњен. Сматра се да за разлику од *цисплатине*, комплекси бакра остварују антитуморско дејство механизмима који не подразумевају ковалентно везивање за ДНК молекулу. Иако многи од њих своје антитуморско дејство испољавају управо интеракцијом са ДНК молекулом, они то најчешће чине нековалентним интеракцијама [94]:

- интеркалацијом,
- интеракцијом са великим или малим жлебом,
- електростатичким интеракцијама.

Интеркалација подразумева уметање молекула који садрже планарне ароматичне прстенове између комплементарних база у оквиру двоструког хеликса (Слика 7). Канонска конформација ДНК састоји се из великог и малог жлеба. Они се

јављају дуж целог двоструког хеликса, а последица су одбијања анјонских фосфатних група и интеракција између базних парова. Стабилизоване су формирањем водоничних веза, хидрофобним или електростатичким интеракцијама. Формирање водоничних веза у великом жлебу који је дубљи и шири дешава се преко N7 гуанина и O4 цитозина. Мали жлеб је плитак и узак, а водоничне везе се могу формирати преко O2 атома цитозина и тимина, N3 гуанина и N3 аденина [92,95,96].

Електростатичке интеракције подразумевају интеракцију комплекса са негативно наелектрисаним фосфатним групама везаних за шећерне компоненте са којима граде кичму ДНК ланца [97].

Међу комплексима бакра који поседују антитуморску активност посебно се издвајају они који садрже лиганде са *N*-донорским атомима, с обзиром да је њихово антитуморско дејство доказано у *in vitro* истраживањима. То су комплекси са 1,10-фенантролином, 2,2'-бипиридином и њиховим дериватима код којих се координовање врши преко два атома азота, и који се комбинују са другим ко-лигандима (хинолинима, имидазолидин-2-тионима, кумаринима, тетрациклинама, сулфонамидима, и др.). На врсту интеракције са молекулом ДНК велику улогу имају особине диимина као лигананда, попут њихове величине, планарности и врсте ко-лигананда, али и геометрија награђеног комплекса. Показано је да се диимини интеркалирају између базних парова ДНК молекула захваљујући хетероцикличним прстеновима (комплекси као што су [Cu(imda)(phen)(H₂O)] и [Cu(imda)(dprq)], где су imda – иминодисирћетна киселина, phen – 1,10-фенантролин, dprq – дипиридохиноксалин) или претежно интерагују са жлебом (комплекс [Cu(imda)(5,6-dmp)], где је 5,6-dmp – 5,6-диметил-1,10-фенантролин). Код ових комплекса увођење метил група у структуру учествује у додатној стабилизацији интеракције да ДНК молекулом и има утицаја на формирање интеракција са малим жлебом [98].

И код других комплекса бакра (са флавоноидима, Шифовим базама, салфеном, итд.) планарност прстена има значајну улогу у процесу интеркалације, јер омогућава боље уметање између базних парова ДНК молекула, док је код непланарних система процес интеркалације значајно смањен и када у структури садрже ароматичне хетероцикличне прстенове. Процес интеркалације изазива деформацију у структури ДНК молекула, при чему се комплекси бакра понашају као хемијске нуклеазе; хидролизују естарске везе и доводе до оксидације дезоксирибозе и нуклеинских база, што изазива дефекте у једном или оба ДНК ланца. Оштећење се јавља и услед стварања слободних радикала који такође оштећују молекул ДНК. Последице деловања комплекса метала на ДНК молекул су ирверзибилне, односно ензими нису у стању да доведу до репарације молекула [68].

1.2.6.2. Комплекси бакра као инхибитори топоизомераза

Топоизомераза је ензим присутан у једру хуманих ћелија који учествује у намотавању или одмотавању ДНК ланца чиме учествује у процесима транскрипције и репликације. Постоје две изоформе овог ензима: топоизомераза I и топоизомераза II [99]. Топоизомераза I прави прекиде у једном ланцу ДНК молекула, док топоизомераза II доводи до прекида у оба ДНК ланца. Ови ензими представљају добру мету у терапији карцинома. Могу се поделити у две групе: топоизомеразни отрови, чија је улога у стабилизацији ковалентног комплекса који се гради између молекула ДНК и

топоизомеразе, а који се другачије назива „комплекс цепања“, и каталитички инхибитори који делују на осталим местима каталитичког циклуса, првенствено на топоизомеразу II [68].

Комплекси који инхибирају топоизомеразе су најчешће мононуклеарни комплекси бакра координовани са лигандима који садрже различите донорске атоме. Већина комплекса бакра који делују као инхибитори топоизомера покрећу апоптозу, програмирану ћелијску смрт [100,101]. Комплекси бакра(II) са оксимима делују као отрови на топоизомеразу II. Показано је да комплекс са 2-фуралдехид оксимом поседује активност по узору на етипозид [102]. Салицилалдоксим делује цитотоксично на L1210 ћелије леукемије спречавајући димеризацију топоизомеразе II и индукујући ензимски прекид у ланцу ДНК. Комплекси са супституисаним α -хетероцикличним тиосемикарбазонима инхибирају топоизомеразу II и показују антипролиферативну активност на ћелије карцинома дојке која је боља у односу на некоординоване лиганде, захваљујући квадратно-планарној структури наглађених комплекса [103]. Комплекси бакра са хинолонима показују значајну цитотоксичну активност према хуманим ћелијама карцинома јетре, HepG2, иако спречавају инхибицију топоизомеразе II коју иначе изазивају слободни лиганди [104]. Док сви наведени комплекси инхибирају топоизомеразу II, комплекс бакра(II) са дипептидом глицил-глицином и пиперазином инхибира топоизомеразу I и истовремено препознаје секвенце у малом жлебу ДНК молекула, чиме делује цитотоксично при веома ниским концентрацијама $IC_{50} = 12,5 \mu\text{mol/l}$ [105].

Табела 5. Механизам деловања којим комплекси бабра(II) са наведеним лигандима остварују антитуморско дејство

Врста интеракције	Врста лиганда	Донорски атоми	Испитиване ћелијске линије
Интеркалација	аминокиселине	N-N	HCT-15, A549, Hep-2
	диимини (фенантролин, бипиридин)	N-N	HT29, SW480, SW620, K562, Јукартове Т ћелије, CCRF-CEM, CCRF-SB, K-MES-1, DU-145
	диимини (иминодисирћетна киселина)	N-N	HOS, MCF7
	тридентатни диимини (терпиридин)	N-N-N	HeLa, SiHa, CaSki, MCF-7, HepG2, H1299
	диимини (фенантролин, дипиридофеноксалин, дипиридофеназин)	N-N	HeLa
	салфен	N-N	MCF7, A549, 786-0, Mia-PaCa-2
	флавоноиди (трихидрокси-изофлавон, хесперетин, апигенин, кверцетин)	O-O	HepG2, SGC-7901, HeLa, A549
	изоеуксантони	O-O	ECA109, SGC-7901
	Шифове базе	N-N-O или N-O-O	A2780
Интеракција са жлебом	супституисани диимини (<i>Casiopainas</i> ®)	N-N	HeLa, HOS, MCF-7, HCT-116, A549
	диимини	N-N	HT29, SW480, SW620
Оксидативно оштећење	семикарбазони	O-O-N-O	HeLa, Hep-2, HepG2
Хидролитичко оштећење	диимини	N-N	HeLa, MCF-7
	терпиридин	N-N-N или (N-N-N) ²	HeLa, SiHa, CaSki, MCF-7, HepG2, H1299
	салицилалдоксим	N-O	L1210
Инхибитори топоизомеразе	2-фуралдехид оксим	N-O	L1210
	тиосемикарбазони	N-N-S-(O) ₃	MCF-7, MDA-MB-231
	<i>Casiopainas</i> ®/фосфини	N-N-O-O	A2780
Инхибитори протеазома	(N,N) диимини	N-N-(O) ₄	PC-3, MDA-MB-231, MCF-10A
	триоксотриазоли	S-N-Cl-Cl	HT1080
	метилпиридин-аминометилфенол	N-N-O	C4-2B, PC3
<p>786-0 – ћелије реналног карцинома; HCT-15, HCT-116, HT29, SW480, SW620 – ћелије карцинома колона; DU-145, C4-2B, PC-3 – ћелије карцинома простате; HeLa, SiHa, CaSki – ћелије цервикалног карцинома; MCF-7, MCF-10A – ћелије карцинома дојке; A2780 – ћелије карцинома јајника; A549, H1299 – ћелије карцинома плућа; Hep-2 – ћелије карцинома ларинкса; HOS – ћелије остеосаркома; K562 – ћелије хроничне мијелоидне леукемије; Јукарт Т-ћелије – акутна леукемија Т-ћелија; CCRF-CEM, CCRF-SB – акутна лимфобластна леукемија; K-MES-1 – сквамозне ћелије карцинома плућа; HepG2 – ћелије хепатоцелуларног карцинома; Mia-PaCa-2 – ћелије карцинома панкреаса; SGC-7901 – ћелије карцинома желуца; ECA109 – ћелије езофагеалног карцинома; L1210 – мишије ћелије леукемије;</p>			

1.3.6.3. Комплекси бакра као инхибитори протеазома

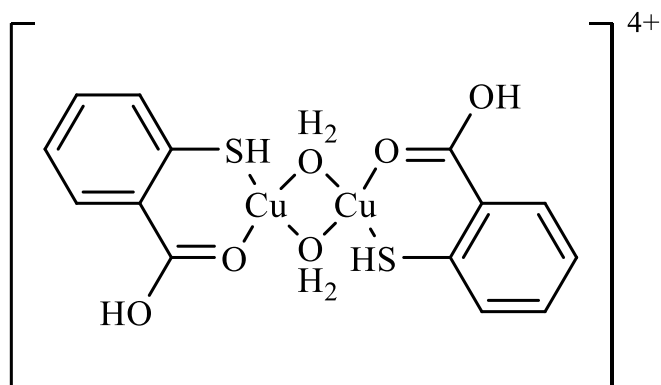
Протеазом представља ензимски комплекс присутан у једру и цитоплазми еукариота који учествује у протеолитичкој деградацији фактора неопходних за раст тумора, као што су регулаторни протеини, инхибитори циклин-зависних киназа, супресор тумора p53, и др [106-108].

Показано је да су туморске ћелије осетљивије на дејство протеазома у односу на здраве ћелије. Протеазом се састоји од језгра, 20s подјединице и две капе, 19s подјединице, које садрже место за везивање протеина и поседују активност АТР-аза [68]. Протеини који се разграђују под дејством протеазома најпре се везују за убиквитин, протеин који представља сигнал за везивање других молекула убиквитина, чиме настаје полиубиквитински ланац који протеазом може да препозна. Убиквитин-протеазом активност регулише експресију гена, индукује ћелијску апоптозу и одговор на оксидативни стрес [62]. Комплекси бакра чија је структура таква да не омогућава супституционе реакције лиганата од јона бакра(II) нису кандидати за инхибиторе протеазома, јер се на тај начин блокира интеракција на нивоу туморских ћелија [109]. У циљу инхибиције протеазома, неопходно је да 20s подјединица најпре врши редукцију бакра(II) до бакар(I)-јона [62,68]. Различита једињења бакра(II) испитивана су као инхибитори протеазома, јер је показано да постоји веза између бакра, инхибиције протеазома и тумора. Испитана су дејства бакар(II)-хлорида, клиохинола и лиганата 8-хидроксихинолина, 1,10-фенантролина и дитиокарбамата, како појединачно, тако и у комплексу са баком. Бакар има кључну улогу у инхибицији протеазома, јер самостални лиганди не поседују ову активност [110]. Такође, показана је селективност комплекса према туморским ћелијама код којих је концентрација бакра повишена, у односу на здраве ћелије код којих је ниво бакра у серуму у физиолошким вредностима. Комплекс бакра са диетилдитиокарбаматом довео је до супресије раста хуманих ћелија карцинома дојке, MDA-MB-231, механизмом који подразумева везивање за JAB1/MPN/Mov34 (JAMM) сегмент 19s подјединице протеазома [111].

1.3. Комплекси бакра(II) са тиосалицилном киселином и њеним дериватима и њихове структурне карактеристике

Комплексе бакра(II) са тиосалицилном киселином често је тешко изоловати, како услед редокс активности бакра, тако и због потенцијалне оксидације тиосалицилатног лиганда до одговарајућег дисулфида. Међутим, међу њима налазе се и врло стабилни комплекси са окарактерисаном структуром [112].

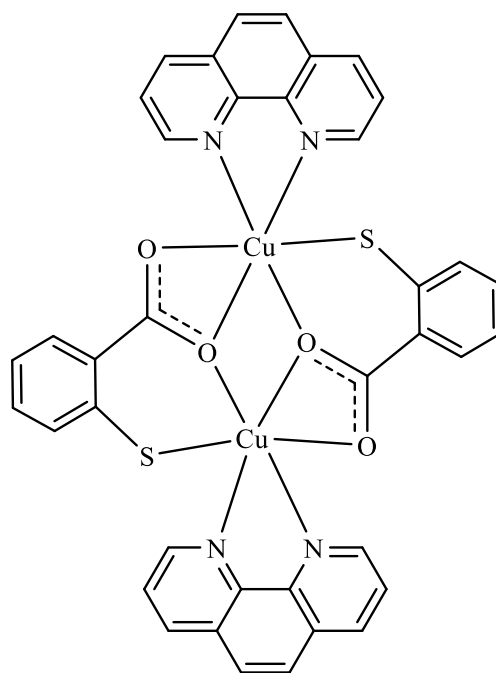
Синтетисано је више комплекса бакра(II) са тиосалицилном киселином, чије су структуре окарактерисане применом елементарне микроанализе, инфрацрвене, електронске спектроскопије и електронске парамагнетне резонанције. Један такав комплекс, $[\text{Cu}_2(\text{HSC}_6\text{H}_4\text{COOH})_2(\text{H}_2\text{O})_6]^{4+}$, чија је структура претпостављена на основу претходно наведених анализа, приказан је на Слици 9. Код овог комплекса координовање се врши преко једног атома кисеоника из карбоксилне групе, али и преко атома сумпора из тиолне групе.



Слика 9. Структура комплекса бакра са тиосалицилном киселином

Комплекси бакра(II) са тиосалицилатом као лигандом могу се додатно стабилизovati увођењем помоћних лиганда који садрже азот као донорски атом. Међу њима издваја се тетрааза макроциклични лиганд, који гради комплекс [(tet b)Cu(SC₆H₄CO₂)]. На основу структурне анализе комплекс је окарактерисан као тригонално бипирамидални, чиме је утврђено и да се координовање тиосалицилног лиганда врши преко атома сумпора. Синтетисани су и бинуклеарни комплекси бакра(II):

- са 1,10-фенантролином и тиосалицилатом, код кога је координовање извршено преко оба атома кисеоника из карбоксилне групе (награђен је карбоксилатни мост) и преко атома сумпора (Слика 10) [113];
- са пиридином као помоћним лигандом, код кога је координовање извршено искључиво преко карбоксилатних мостова два молекула тиосалицилне киселине [114].



Слика 10. Комплекс бакра(II) са тиосалицилном киселином и 1,10-фенантролином

У реакцији тиосалицилне киселине са бакар(II)-хлоридом и у присуству 2,2'-бипиридина, долази до формирања тамно плавих кристала. Кристали потичу од нагађеног комплекса чија је структура и кристалографски потврђена. Настали бинуклеарни комплекс гради се координовањем бакра за два молекула тиодибензојеве киселине преко хидроксилних атома кисеоника из карбоксилне групе, као и преко оба атома азота из бипиридина (Схема 4) [115].

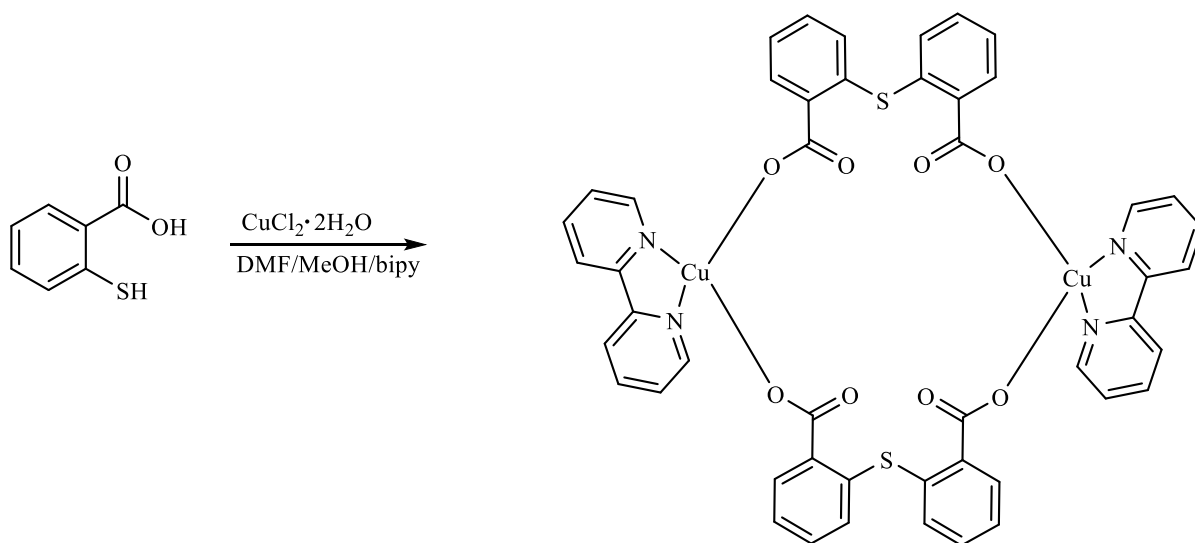
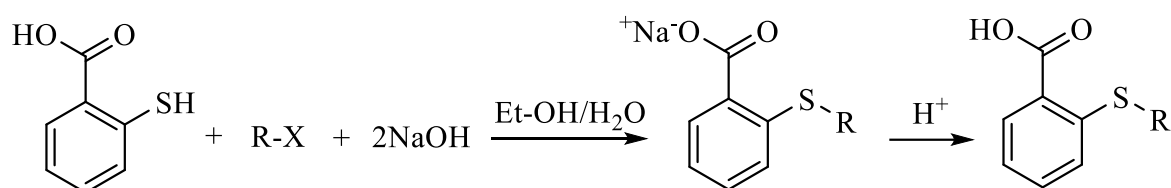


Схема 4. Бинуклеарни комплекс бакра са тиодибензојевом киселином

Радић и сарадници синтетисали су комплексе бакра(II) са дериватима тиосалицилне киселине, код којих је извршено алкиловање тиолне групе, при чему су добијени одговарајући S-алкил (R = метил-, етил-, пропил-, бутил- и бензил-) и S-алкенил (R = пропенил- и изобутенил-) деривати (Схема 5). Ови комплекси окарактерисани су на основу резултата елементалне микроанализе, инфрацрвене спектроскопије, док су стварне структуре за неке од комплекса потврђене резултатима рендгенске структурне анализе. При томе је утврђено да се ради о бинукларним комплексима, при чему је координовање извршено преко четири атома кисеоника из два молекула деривата тиосалицилне киселине и награђена тзв. *paddle wheel* структура. Показано је и да ови комплекси интерагују са молекулом ДНК, хуманим серумским албумином, али и да показују антимикуробну и антитуморску активност [116-119].



R= -метил, -етил, -пропил, -бутил, -бензил, -пропенил, -изобутенил;

Схема 5. Синтеза S-алкил и S-алкенил деривата тиосалицилне киселине

1.4. Молекулски докинг са молекулом ДНК и хуманим серумским албумином и његов значај

Примена молекулског докинга последњих неколико деценија све је присутнија као први корак у проналаску једињења са биолошком активношћу, како услед све веће употребе рачунара, тако и због доступности протеинских база података. Циљ молекулског докинга је предвиђање молекулског уклапања, везујућих места испитиваних молекула са различитим макромолекулима и ензимима и у зависности од вредности слободне енергије везивања одређивање афинитета везивања међу испитиваним молекулима. Применом молекулског докинга могуће је одредити и врсте интеракција које се јављају између испитиваних једињења и макромолекула [120,121].

Молекулски докинг је битан и за предвиђање интеракције потенцијалних лекова са нуклеинским киселинама, у циљу откривања везе између структуре испитиваног молекула и његове цитотоксичности. Велики број истраживања бави се управо испитивањем антитуморског дејства једињења бакра. Уколико се *in silico* докаже антитуморско дејство испитиваног молекула, даља истраживања су експериментална у циљу стварне потврде начина интеракције. Такође, молекулски докинг може бити и потврда већ спроведених експерименталних истраживања. Свеукупни резултати оваквих истраживања доводе до развоја нових антитуморских лекова [122,123].

Молекул ДНК је флексибилан и у простору заузима различите конформације. Приликом спровођења докинг анализе, неопходно је изабрати једну од конформација. Интеркалација и интеракција са жлебом су најчешће врсте интеракције између малих молекула и молекула ДНК. Интеракција испитиваних молекула са ДНК разликује се на нивоу малог и великог жлеба, у погледу стерних ефеката и електростатичког потенцијала. Најчешће интеракцију са малим жлебом остварују мали молекули, док они са већом молекулском масом интерагују са ДНК молекулом на нивоу великог жлеба. Интеракција са жлебом сматра се интеракцијом по принципу кључ-брава јер не долази до промене конформације ДНК молекула по везивању испитиваног једињења [124].

За везивање молекула за мали жлеб најзначајније су *Van der Waals*-ове интеракције, водоничне везе и електростатичко привлачење [125].

Хумани серумски албумин је најприсутнији протеин плазме и представља макромолекул који се састоји из више домена, који је одговоран за регулацију осмотског притиска плазме, као и за расподелу течности у организму [126-129].

Има способност интеракције са великим бројем ендогених и екзогених лиганата, па представља носач за многе лекове. Утиче и на фармакокинетске особине многих лекова, неутралише многе токсине, али чини и велики део антиоксидативне заштите крвне плазме. Испитивање интеракције лекова са хуманим серумским албумином је значајно управо због утицаја на њихову фармакокинетiku, посебно на клиренс и волумен дистрибуије. Везивањем лекова за албумин смањује се фракција слободног лека који се везује за биолошке мете [130]. Такође, за липосолубилне лекове који пролазе крвно-мождану баријеру битна је фракција слободног лека, јер само она продире у централни нервни систем. Интеракцијом са албуминима утиче се на АДМЕ карактеристике лека, па се модификација ове интеракције користи у синтези лекова [131]. На албумину постоје три места за везивање:

- место 1 које се налази у субдомену ПА и за које се претежно везују негативни хетероциклични молекули;
- место 2 које се налази у субдомену ША за које се везују карбоксилне киселине, као и кисели, базни и неутрални молекули;
- место 3 које се налази у субдомену ІВ за које се везује хем [132-134].

Испитивање интеракције молекула са албумином се спроводе *in silico* применом молекулског докинга и *in vitro* применом УВ апсорпционе спектрофотометрије и флуоресцентне спектроскопије.

2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Прегледом литературе постављена је следећа радна хипотеза:

Реакцијом S,O-тетраденатних лиганада деривата тиосалицилне киселине са етиленским-, пропиленским-, бутиленским- и пентиленимским- мостом и бакар(II)-нитрата трихидрата настају моноклеарни, октаедарски комплекси. Синтетисани комплекси окарактерисани су на основу резултата моларне проводљивости, елементалне микроанализе, инфрацрвене спектроскопије и електронско-парамагнетне-резонанционе спектроскопије. Даљим испитивањем, показано је да награђени комплекси остварују интеракцију са молекулом ДНК, хуманим серумским албумином и поседују антитуморску активност.

Како би се утврдило да ли су претпостављене хипотезе у овој дисертацији тачне, постављени су следећи циљеви истраживања:

Основни циљ:

Синтетисати S,O-тетраденатне лиганде, деривате тиосалицилне киселине који у структури садрже етиленски-(Л1), пропиленски-(Л2), бутиленски-(Л3) и пентиленимски-(Л4) мост, као и комплексе бакра(II) са наведеним тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине (К1-К4).

Специфични циљеви:

1. Потврдити састав синтетисаних једињења на основу резултата елементалне микроанализе;
2. Испитати структуре добијених лиганада и одговарајућих комплекса бакра(II) на основу резултата инфрацрвене спектроскопије, нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије и електронске-парамагнетне-резонанције;
3. Испитати интеракцију новосинтетисаних комплекса са молекулом гуанозин-5'-монофосфата, L-метионином и L-цистеином праћењем супституционих реакција при физиолошким условима. Такође, пратиће се и интеракција између синтетисаних комплекса и СТ-ДНК (енгл. *calf thymus*, ДНК тимуса говечета) и ХСА (хуманим серумским албумином);
4. Спровести *in silico* испитивања у циљу додатне потврде интеракције синтетисаних комплекса са молекулом ДНК и ХСА;
5. Испитати антитуморску активност добијених тетраденатних лиганада и одговарајућих комплекса бакра(II).

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Синтезе S,O-тетраденататних лиганата, деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса бакра(II)

3.1.1 Синтезе S,O – тетраденататних лиганата, деривата тиосалицилне киселине

Тетраденататни лиганди, деривати тиосалицилне киселине са етиленским – Л1, пропиленским – Л2, бутиленским – Л3 и пентиленим – Л4 мостом добијају се реакцијом алкиловања тиосалицилне киселине одговарајућим алкил-дихалогенидима у базној средини и смеси вода-етанол као растварачу, што подразумева да се у раствор добијен растварањем (2,00 mmol) тиосалицилне киселине у 50,00 ml 30% етанола додаје раствор натријум-хидроксида (2,00 mmol у 5,00 ml дестиловане воде). Затим се одговарајући алкил-дихалогенид (1,2-дихлоретан, 1,3-дихлорпропан, 1,4-дихлорбутан и 1,5-дихлорпентан) (1,00 mmol) раствори у 5,00 mL етанола и постепено додаје у малим порцијама у претходно припремљену бистру реакциону смешу. Тако добијена реакциона смеша остави се током ноћи на 60°C. Након тога раствор се пренесе у кристализациону шољу и упари на воденом купатилу ради удаљавања етанола. У добијени водени раствор додаје се (2,00 mM) раствор хлороводоничне киселине услед чега се ствара бели талог одговарајућег деривата тиосалицилне киселине. Тако добијени производ се одвоји цеђењем, испере великом количином дестиловане воде и суши преко ноћи на вакууму. Синтеза је спроведена по већ публикованом поступку за синтезу деривата тиосалицилне киселине [135].

S,O-тетраденататни лиганд, дериват тиосалицилне киселине са етиленским мостом (Л1): (S,O-етилен-тиосалицилна киселина) = C₁₆H₁₄O₄S₂ (Mr = 334,40), бео прах.

Микроанализа – Израчунато: С, 57,50; Н, 4,19; S, 19,15. Нађено: С, 57,25; Н, 4,16; S, 19,04.

IR (KBr, cm⁻¹): 3439, 3065, 2998, 2928, 2648, 2558, 1961, 1807, 1683, 1586, 1563, 1464, 1449, 1433, 1410, 1315, 1280, 1269, 1253, 1206, 1169, 1151, 1063, 1048, 984, 877, 812, 734, 701, 685, 652, 609, 550, 511, 493, 463.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 3,21 (s, 4H, -CH₂), 7,19-7,27 (m, 2H, -Ar), 7,38-7,56 (m, 4H, -Ar), 7,88 (dd, 2H, -Ar).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 30,2 (-CH₂), 124,4; 125,9; 128,9; 131; 132,5; 139,6 (-Ar), 167,5 (-COOH).

S,O-тетраденататни лиганд, дериват тиосалицилне киселине са пропиленским мостом (Л2): (S,O-пропилен-тиосалицилна киселина) = C₁₇H₁₆O₄S₂ (Mr = 348,43), бео прах.

Микроанализа – Израчунато: С, 58,64; Н, 4,60; S, 18,38. Нађено: С, 58,60; Н, 4,64; S, 18,47.

IR (KBr, cm⁻¹): 3891, 3747, 3425, 3066, 2946, 2923, 2882, 2650, 1960, 1813, 1678, 1587, 1562, 1464, 1432, 1415, 1314, 1292, 1270, 1257, 1170, 1152, 1119, 1062, 1047, 1000, 908, 865, 810, 783, 739, 705, 688, 668, 651, 557, 526, 519, 495, 469.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1,84-1,99 (m, 2H, -CH₂), 3,0-3,11 (m, 4H, -CH₂), 7,16-7,26 (m, 2H, -Ar), 7,30-7,56 (m, 4H, -Ar), 7,86 (dd, 2H, -Ar).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 30 (-CH₂), 31,2 (-CH₂), 124,1;125,7;128,8;130,9; 132,3;140 (-Ar), 167,5 (-COOH).

S,O-тетраденатни лиганд, дериват тиосалицилне киселине са бутиленским мостом (Л3): (*S,O*-бутилен-тиосалицилна киселина) = C₁₈H₁₈O₄S₂ (Mr = 362,32), бео прах.

Микроанализа – Израчунато: С, 59,68; Н, 4,97; S, 17,67; Нађено: С, 59,82; Н, 4,86; S, 17,53.

IR (KBr, cm⁻¹): 3867, 3076, 3009, 2935, 2858, 2648, 2559, 1970, 1676, 1587, 1558, 1465, 1446, 1433, 1411, 1312, 1293, 1269, 1252, 1224, 1172, 1153, 1111, 1063, 1046, 988, 960, 908, 869, 808, 794, 746, 704, 690, 652, 609, 553, 498, 482, 455.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1,78-1,8 (m, 4H, -CH₂), 2,93-2,99 (m, 4H, -CH₂), 7,15-7,23 (m, 2H, -Ar), 7,39-7,54 (m, 4H, -Ar), 7,86 (dd, 2H, -Ar).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 27,4 (-CH₂), 30,6 (-CH₂), 123,9; 125,8; 128,6; 130,9; 132,3; 140,7 (-Ar), 167,5 (-COOH).

S,O-тетраденатни лиганд, дериват тиосалицилне киселине са пентиленим мостом (Л4): (*S,O*-пентиленим-тиосалицилна киселина) = C₁₉H₂₀O₄S₂ (Mr = 376,35), бео прах.

Микроанализа – Израчунато: С, 60,65; Н, 5,05; S, 17,02. Нађено: С, 60,47; Н, 5,12; S, 17,12.

IR (KBr, cm⁻¹): 3867, 3076, 3009, 2935, 2858, 2648, 2559, 1970, 1676, 1587, 1558, 1465, 1446, 1433, 1411, 1312, 1293, 1269, 1252, 1224, 1172, 1153, 1111, 1063, 1046, 988, 960, 908, 869, 808, 794, 746, 704, 690, 652, 609, 553, 498, 482, 455.

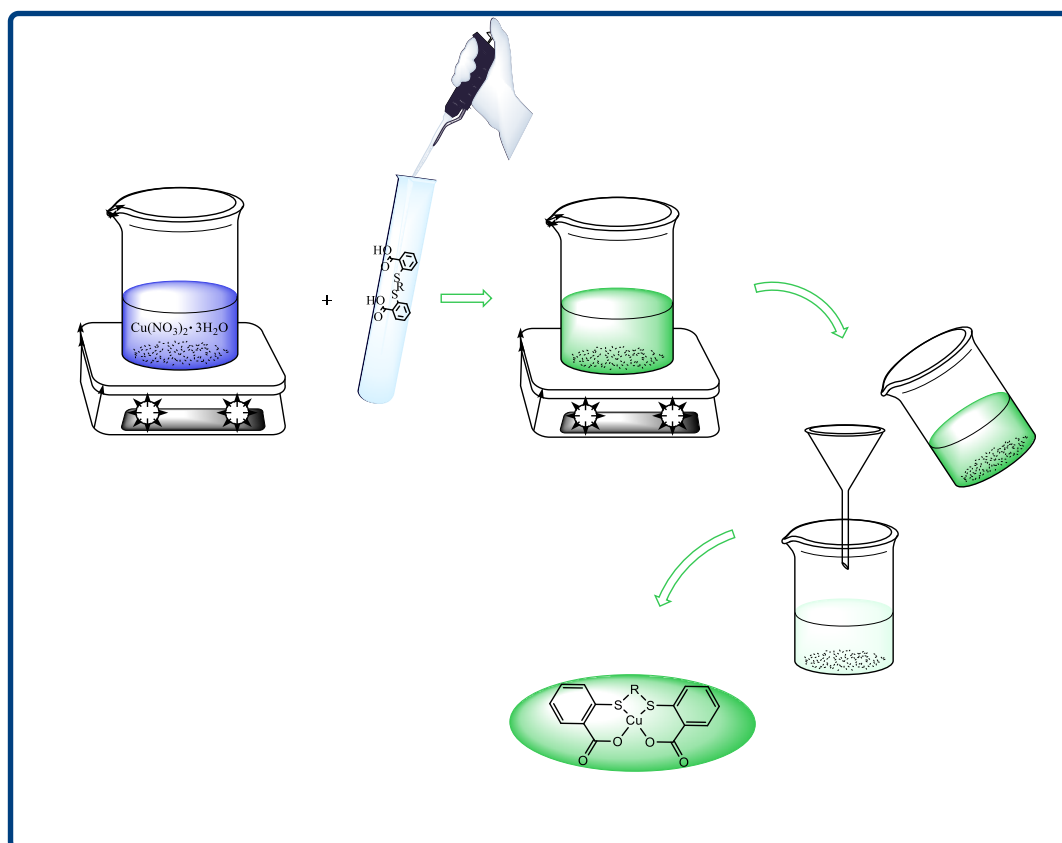
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1,62-1,73 (m, 6H, -CH₂), 2,88-2,91 (m, 4H, -CH₂), 7,15-7,22 (m, 2H, -Ar), 7,37-7,54 (m, 4H, -Ar), 7,86 (dd, 2H, -Ar).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 28 (-CH₂), 28,1 (-CH₂), 31 (-CH₂), 123,8; 125,8; 128,7; 130,7; 132,1; 140,7 (-Ar), 167,4 (-COOH).

3.1.2. Синтезе комплекса бакра(II) са *S,O* – тетраденатним лиганом, дериватима тиосалицилне киселине

3.1.2.1. Општи поступак синтезе комплекса бакра(II) са *S,O*-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине

Комплекси бакра(II) са тетраденатним лигандом дериватом тиосалицилне киселине са етиленским, пропиленским, бутиленским и пентиленим- мостом добијају се у директној реакцији бакар(II)-нитрата трихидрата, одговарајућег деривата тиосалицилне киселине и литијум хидроксида у молском односу 1:1:2.



Слика 11. Графички приказ поступка синтезе одговарајућих комплекса бакра(II)

3.1.2.2. Синтеза комплекса бакра(II) са *S,O* – тетраденатним лигандом, дериватом тиосалицилне киселине са етиленским мостом (K1)

Бакар(II)-нитрат трихидрат (0,1000 g, 0,4139 mmol) раствори се у 10 ml дестиловане воде на воденом купатилу. У ову реакциону смешу додаје се дериват тиосалицилне киселине са етиленским мостом – Л1 (0,1383 g, 0,4139 mmol). Смеша се уз повремено мешање загрева током 3 сата и током овог периода се у малим порцијама додаје водени раствор литијум хидроксида (0,0192 g, 0,8278 mmol). Производ реакције је зелени талог наgraђеног комплекса бакра(II), који се филтрира, испере великом количином дестиловане воде и суши на ваздуху.

Табела 6. Опште карактеристике комплекса K1

Молекулска формула:	CuC₁₆H₁₂O₄S₂
Молекулска маса:	394,95
Принос:	30,95%
Скраћеница:	[Cu(S,O-етилен-тиосалицилна киселина)]
Микроанализа:	Израчунато: C, 44,5; H, 3,73; S, 14,85; Нађено: C, 44,32; H, 3,64; S, 14,73;
IR (KBr, cm ⁻¹):	3900, 3570, 3370, 3064, 2926, 2852, 1684, 1591, 1545, 1463, 1435, 1401, 1385, 1316, 1282, 1254, 1024, 1154, 1118, 1065, 1046, 954, 873, 833, 808, 743, 710, 694, 658, 603, 546, 535, 506, 494
Моларна проводљивост:	10,15 μS/cm (48 s)

3.1.2.3. Синтеза комплекса бакра(II) са S,O – тетраденатним лигандом, дериватом тиосалицилне киселине са пропиленским мостом (K2)

Бакар(II)-нитрат трихидрат (0,1000 g, 0,4139 mmol) раствори се у 10 ml дестиловане воде на воденом купатилу. У ову реакциону смешу додаје се дериват тиосалицилне киселине са пропиленским мостом – **Л2** (0,1442 g, 0,4139 mmol). Смеша се уз повремено мешање загрева током 3 сата и током овог периода се у малим порцијама додаје водени раствор литијум хидроксида (0,0192 g, 0,8278 mmol). Производ реакције је зелени талог награђеног комплекса бакра(II), који се филтрира, испере великом количином дестиловане воде и суши на ваздуху.

Табела 7. Опште карактеристике комплекса K2

Молекулска формула:	CuC₁₇H₁₄O₄S₂
Молекулска маса:	409,96
Принос:	43,93%
Скраћеница:	[Cu(S,O-пропилен-тиосалицилна киселина)]
Микроанализа:	Израчунато: C, 45,79; H, 4,07; S, 14,35; Нађено: C, 45,51; H, 4,22; S, 14,16;
IR (KBr, cm ⁻¹):	3891, 3400, 3059, 2923, 2856, 1684, 1590, 1548, 1462, 1435, 1400, 1282, 1250, 1154, 1120, 1061, 1044, 956, 871, 847, 805, 746, 715, 695, 656, 598, 512, 501, 469
Моларна проводљивост:	14,79 μS/cm (48 s)

3.1.2.4. Синтеза комплекса бакра(II) са S,O – тетраденатним лигандом, дериватом тиосалицилне киселине са бутиленским мостом (K3)

Бакар(II)-нитрат трихидрат (0,1000 g, 0,4139 mmol) раствори се у 10 ml дестиловане воде на воденом купатилу. У ову реакциону смешу додаје се дериват тиосалицилне киселине са бутиленским мостом – Л3 (0,1500 g, 0,4139 mmol). Смеша се уз повремено мешање загрева током 3 сата и током овог периода се у малим порцијама додаје водени раствор литијум хидроксида (0,0192 g, 0,8278 mmol). Производ реакције је зелени талог награђеног комплекса бакра(II), који се филтрира, испере великом количином дестиловане воде и суши на ваздуху.

Табела 8. Опите карактеристике комплекса K3

Молекулска формула:	CuC ₁₈ H ₁₆ O ₄ S ₂
Молекулска маса:	423,99
Принос:	38%
Скраћеница:	[Cu(S,O-бутилен-тиосалицилна киселина)]
Микроанализа:	Израчунато: C, 46,99; H, 4,39; S, 13,94; Нађено: C, 47,20; H, 4,47; S, 14,12;
IR (KBr, cm ⁻¹):	3901, 3750, 3571, 3497, 3051, 2915, 2843, 1948, 1628, 1597, 1553, 1461, 1432, 1399, 1320, 1281, 1258, 1198, 1152, 1123, 1065, 1045, 1006, 847, 804, 744, 736, 721, 659, 617, 556, 535, 515, 494, 472, 456
Моларна проводљивост:	2,85 μS/cm (48 s)

3.1.2.5 Синтеза комплекса бакра(II) са S,O – тетраденатним лигандом, дериватом тиосалицилне киселине са пентиленим мостом (K4)

Бакар(II)-нитрат трихидрат (0,1000 g, 0,4139 mmol) раствори се у 10 ml дестиловане воде на воденом купатилу. У ову реакциону смешу додаје се дериват тиосалицилне киселине са пентиленим мостом – Л4 (0,1558 g, 0,4139 mmol). Смеша се уз повремено мешање загрева током 3 сата и током овог периода се у малим порцијама додаје водени раствор литијум хидроксида (0,0192 g, 0,8278 mmol). Производ реакције је зелени талог награђеног комплекса бакра(II), који се филтрира, испере великом количином дестиловане воде и суши на ваздуху.

Табела 9. Опште карактеристике комплекса К4

Молекулска формула:	CuC₁₉H₁₈O₄S₂
Молекулска маса:	436,99
Принос:	45,69%
Скраћеница:	[Cu(S, O-пентилен-тиосалицилна киселина)]
Микроанализа:	Израчунато: C, 48,15; H, 4,68; S, 13,50; Нађено: C, 48,34; H, 4,72; S, 13,67;
IR (KBr, cm ⁻¹):	3438, 3058, 2929, 2852, 1683, 1591, 1549, 1462, 1435, 1400, 1385, 1282, 1256, 1153, 1062, 1045, 846, 806, 745, 720, 695, 657, 609
Моларна проводљивост:	9,07 μS/cm (48 s)

3.2. Карактеризација синтетисаних једињења

3.2.1. Елементална микроанализа

Одређивање тачног састава наглађених лиганата и комплекса спроведено је методом елементалне анализе (C, H, N) на апарату Vario III C, H, N, S Elemental Analyzer, на Катедри за органску хемију Хемијског факултета Универзитета у Београду.

3.2.2. Инфрацрвена спектроскопија

Инфрацрвени спектри снимљени су помоћу спектрофотометра *Perkin Elmer FTIR 31725X* применом технике калијум-бромидне капсуле на Институту за хемију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

3.2.3. Нуклеарно-магнетно-резонанционa спектроскопија

Снимање нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра синтетисаних једињења извршено је помоћу спектрофотометра *Varian Gemini-200 NMR* употребом D₂O као растварача за синтетисане лиганде. Хемијска померања прикрана су у односу на триметилсилан (TMS). Нуклеарно-магнетно-резонанционa спектроскопија спроведена је на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу.

3.2.4. Електронска парамагнетна резонанција

Спектри електронске парамагнетне резонанције (9,85 GHz) снимљени су на Факултету за физичку хемију Универзитета у Београду употребом *Bruker Elexsys II 540 EPR* спектрофотометра. Снимање је спроведено на температури од 77 K при следећим експерименталним условима: микроталасној фреквенцији од 9,4 GHz, микроталасној снази од 1 mW, амплитуди модулације од 10 G и модулационој фреквенцији од 100 kHz. Узорци (180 μ l, 0,5 mM) су припремљени растварањем комплекса бакра у диметилсулфоксиду у кварцним киветама за ЕПР од 3 mm, а потом брзим смрзавањем у хладном изопентану и постављени у *Suprasil* азотне цеви за снимање.

3.2.5. Моларна проводљивост

Моларна проводљивост (Λ) свеже припремљених раствора комплекса бакра(II) са S,O-тетрадентатним лигандима (концентрације $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) у диметилсулфоксиду као растварачу одређена је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу помоћу ЕС-Meter BASIC 30+ кондуктометра (CRISON) на температури од 20°C. Мерењем електричног отпора (R) у ћелији мерног инструмента одређена је специфична проводљивост, која је једнака реципрочној вредности специфичног отпора:

$$R = \rho \cdot \frac{l}{A} \Rightarrow \rho = R \cdot \frac{A}{l}$$
$$\kappa = \frac{1}{\rho} = \frac{1}{R} \cdot \frac{l}{A}$$

R – електрични отпор (Ω)

ρ – специфични отпор ($\Omega \cdot \text{m}$)

l/A – константа кондуктометријске ћелије и за коришћени инструмент износи $1 \cdot \text{cm}^{-1}$

κ – специфична проводљивост ($\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Моларна проводљивост представља снагу проводљивости свих јона насталих растварањем једног мола електролита у раствору. Моларна проводљивост израчуната је као:

$$\Lambda = \frac{\kappa}{C}$$

где је:

Λ – моларна проводљивост ($\text{S} \cdot \text{cm}^2/\text{mol}$); C – моларна концентрација mol/dm^3

3.3. Кинетичка мерења

Кинетичка мерења спроведена су на Институту за хемију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Супституционе реакције комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине (**K1-K4**) са L-метионином, L-цистеином и 5'-GMP (гуанозин-5'-монофосфат) проучаване су на *Stopped-flow* спектрофотометру праћењем промена у апсорбанци на одговарајућим таласним дужинама у функцији времена. Радна таласна дужина одређена је снимањем спектралних промена на таласним дужинама од 220 до 500 nm.

Нуклеофили, L-метионин, L-цистеин и натријумова со гуанозин-5'-монофосфата набављени су од *Acros Organics* и коришћени без даљег пречишћавања. *Hepes* пуфер (N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етансулфонска киселина), етидијум бромид (ЕБ) (3,8-диамино-5-етил-6-фенилфенантридинијумбромид), СТ-ДНК и ХСА набављени су од *Sigma Chemicals Co.* Раствор СТ-ДНК припрема се у *PBS* пуферу (раствор фосфатног пуфера) у концентрацији од 0,01 М (*Sigma Aldrich*) при рН од 7,2. Однос апсорбанце на 260 nm и 280 nm (A260/A280) износио је 1,8-1,9, што је указивало да ДНК не садржи протеине. Концентрација ДНК одређена је на апсорбанци од 260 nm ($\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [136,137]. Раствор ХСА припремљен је у 0,01 М раствору *PBS* пуфера при рН 7,2 и концентрација је константно била 2 μM .

Све реакције снимане су на температури од 310 К и рН = 7,2 у раствору 25 mM *Hepes* пуфера (хем. 4-(2-хидроксиетил)пиперазин-1-етансулфонска киселина). Како би се одредио механизам реакције и параметри активације (ΔS^\ddagger and ΔH^\ddagger), супституција комплекса **K1** са 5'-GMP додатно је снимана на 288 К and 298 К. Реакције су започете мешањем једнаких запремина раствора комплекса и нуклеофила директно у комори спектрофотометра. Сва кинетичка мерења су изведена под условима реакције *псеудо*-првог реда (концентрација нуклеофила је била најмање 10 пута већа од концентрације комплекса). Константе реакција *псеудо*-првог реда, k_{obsd} , израчунате су као средња вредност четири до шест независних кинетичких мерења на спектрофотометру, коришћењем програма *Pro Data SX program*.

3.4. Интеракције комплекса са ДНК

Интеракције комплекса бакра са лигандима спроводе се на Институту за хемију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

3.4.1. Апсорпциона спектроскопска мерења

Интеракције комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине (**K1-K4**) и СТ-ДНК проучаване су на *Uv-Vis* спектрофотометру *Perkin-Elmer Lambda 35* или 25 спектрофотометром са двоструким снопом применом кварцних кивета величине 1,00 cm у циљу испитивања могућих начина везивања комплекса са молекулом ДНК, као и одређивања константе везивања, K_b . Серија раствора комплекса са молекулом ДНК припремљена је мешањем раствора комплекса константне концентрације (6,7 μM) и инкрементима ДНК полазног раствора (2,23 mM).

Експерименти су извођени на температури $T = 298$ К. Вредност константе везивања, K_b , израчуната је применом једначине 1 [138]:

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

K_b се израчунава из односа нагиба и одсечка праве $[\text{ДНК}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f) = f([\text{ДНК}]$), где је $[\text{ДНК}]$ концентрација ДНК, $\varepsilon_A = A_{\text{obsd}}/[\text{комплекс}]$, ε_f је екстинциони коефицијент некоординованог комплекса, а ε_b је екстинциони коефицијент координованог комплекса.

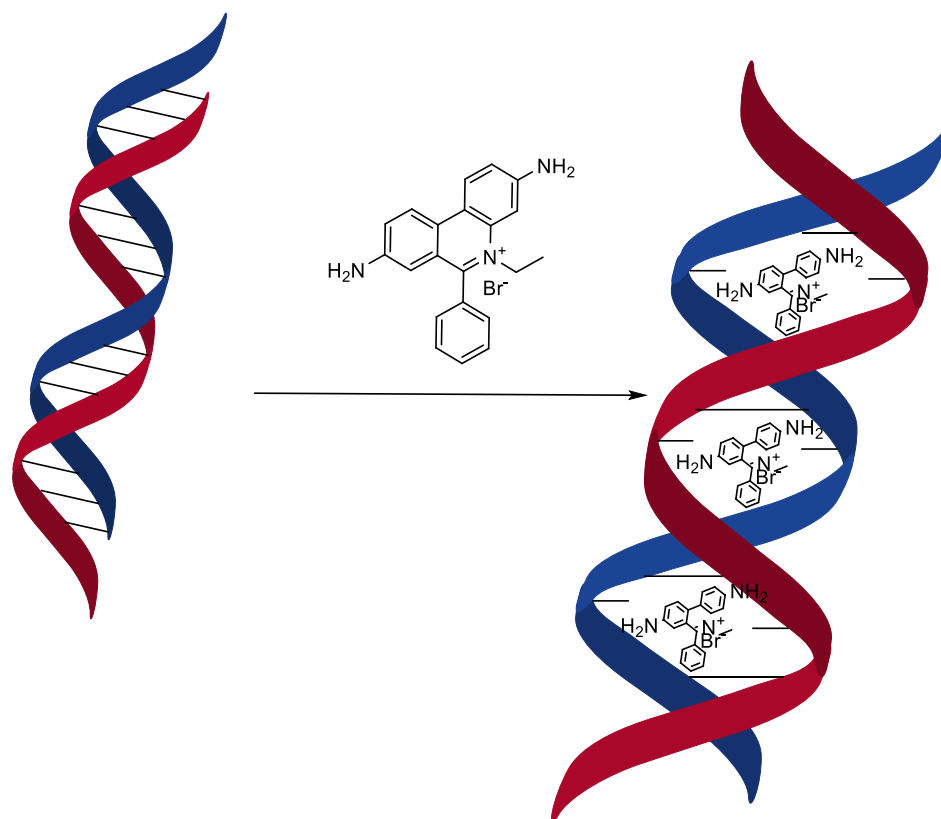
3.4.2. Флуоресцентна мерења

Интеракције комплекса са ДНК испитиване су и помоћу флуоресцентне спектроскопије. Флуоресцентна мерења спроведена су на спектрофлуометру *RF-1501 PC* (*Shimadzu*, Јапан). Интеракције комплекса са ДНК се проучавају у присуству ЕБ да би се утврдило да ли комплекс може да замени ЕБ из његовог ДНК-ЕБ комплекса (Слика 12). ДНК-ЕБ комплекс припрема се мешањем $18,6 \mu\text{M}$ ЕБ и $18,6 \mu\text{M}$ ДНК у $0,01$ М раствору *PBS* пуфера, $\text{pH} = 7,2$. Могући ефекти везивања комплекса за ДНК проучавају се снимањем промене флуоресцентног емисионог спектра након додавања раствора комплекса у раствор ДНК-ЕБ. Пре мерења систем се инкубира на собној температури у току 5 минута. Интензитет флуоресценције мери се на таласној дужини ексцитације од 527 nm, а флуоресцентне емисије на 612 nm. Емисија раствора снима се у области од 550 до 750 nm.

Релативна константа везивања комплекса за СТ-ДНК одређена је израчунавањем Стерн-Волмерове (*Stern-Volmer*) константне (K_{sv}) из нагиба правих линија добијених из Стерн-Волмерове једначине (2) [139]:

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

где су I_0 и I емисиони интензитети у одсуству и присуству комплекса (**K1-K4**), $[Q]$ је укупна концентрација комплекса, док је K_{sv} Стерн-Волмерова константа која се добија из нагиба праве зависности I_0/I према $[Q]$.



Слика 12. Интеркалација молекула етидијум бромида између комплементарних парова у молекулу ДНК

3.5. Интеракција комплекса са хуманим серумским албумином

Интеракције комплекса бакра са лигандима спроведене су на Институту за хемију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Студије везивања за албумин су спроведене при константним концентрацијама ХСА (2 μM) и различитим концентрацијама комплекса (**К1**– **К4**) у распону од 2 до 20 μM ($r = [\text{ХСА}]/[\text{комплекс}] = 1-10$). Спектри флуоресценције снимани су у рангу таласних дужина 300-500 nm, док је таласна дужина екситације 295 nm. Спектри флуоресценције комплекса снимани су под истим експерименталним условима, при чему није забележена флуоресцентна емисија.

Вредности Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) израчунате су применом Стерн-Волмерове једначине (3) [139]:

$$I_0/I = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (3)$$

где I_0 и I представљају флуоресценцију хуманог серумског албумина у одсуству и присуству комплекса (**K1 – K4**), τ_0 је просечан полуживот хуманог серумског албумина без комплекса на око 10^{-8} s, а $[Q]$ је концентрација комплекса.

Константа везивања (K) и број везујућих места на албумину (n) израчунати су коришћењем *Scatchard* једначине (4) [140]:

$$(\Delta I/I_0)/[Q] = nK - K\Delta I/I_0 \quad (4)$$

3.6. Молекулски докинг комплекса бакра(II) са S,O-тетрадентатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине са молекулом ДНК и хуманим серумским албумином

Молекулске структуре испитиваних комплекса бакра(II) са S,O-тетрадентатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине које су коришћене у симулацијама молекулског уклапања су претходно енергетски оптимизоване и окарактерисане испитивањем вибрационих фреквенција, коришћењем функционалне B3LYP [141] у комбинацији са def2-SVP базичним сетом [142,143], применом *GAUSSIAN* програма [144].

Добијене молекулске структуре су доковане у структурне фрагменте макромолекула ДНК и ХСА. Структурне координате које представљају фрагменте канонске Б-ДНК (*PDB*: 1BNA), ДНК са интеркалационом празнином (*PDB*: 1Z3F) и ХСА (*PDB*: 1AO6), преузете су из протеинске базе (<http://www.rcsb.org>). Молекули воде, лиганди и хетеромолекули (нпр. елиптицин из 1Z3F) су уклоњени из кристалне структуре уколико су били присутни. Конформационо флексибилни комплекси су уклапани у ригидне структуре ДНК и ХСА протеина, применом *Molegro Virtual Docker* програма (*MVD*, верзија 2013.6.0.1) [137].

Параметри докинга били су следећи: резолуција мреже везујућег места била је 0,3 Å, максималан број интеракција 1500, величина популације 50, енергетска граница 100,00 и максималан број корака 300.

Максимална величина популације од 100 и максимални број интеракција од 10000 примењивани су за свако понављање. Као алгоритам за претрагу коришћен је MolDock SE, са бројем понављања подешеним на 100 и бројем генерисаних поза на 10.

Процена остварених везујућих интеракција између испитиваних комплекса и ДНК/ХСА описана је применом *Molegro Virtual Docker* функција скоровања: MolDock, Docking, Rerank и Hbond.

Вредности *Molegro Virtual Docker* функција су представљени на релативан начин (са изостављеним јединицама) [137]. Доковане позе са најнижим вредностима функција су представљене применом молекулског графичког програма *CHIMERA* (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>).

3.6. *In vitro* антитуморска активност

Антитуморска активност синтетисаних једињења спроведена је у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

3.6.1. Припремање раствора испитиваних једињења

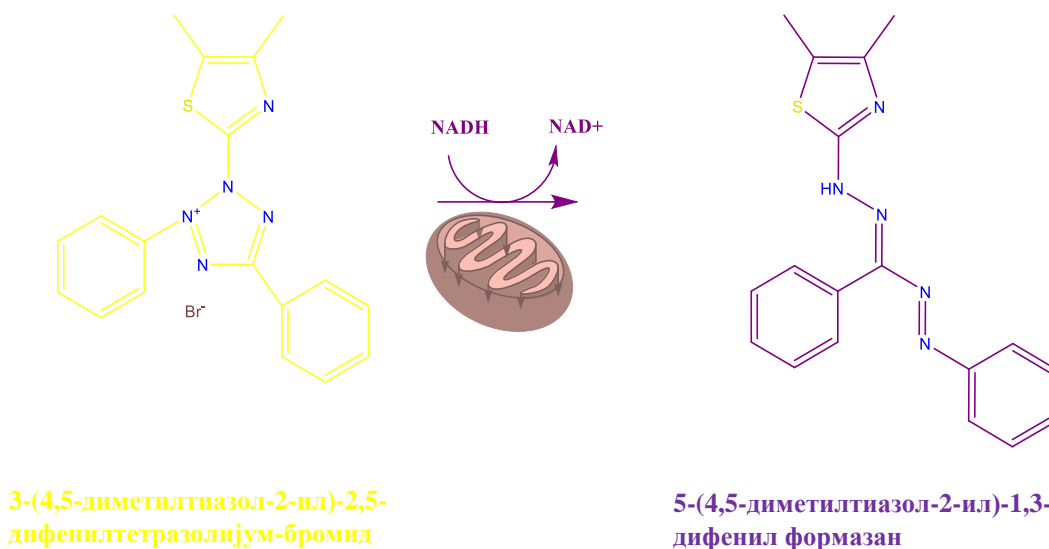
Комплекси (**K1-K4**) растворени су у 10% диметилсулфоксиду разблаженим са дестилованом водом у циљу добијања концентрације од 10 mM и филтрирани кроз *Millipore* филтер промера отвора 0,22 mm. Затим су раствори комплекса разблажени у *DMEM* медијуму (енг. *Dulbecco`s Modified Eagles Medium*) непосредно пре употребе. МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид (5 mg/ml) је растворен у раствору фосфатног пуфера (pH=7,2) и филтриран кроз *Millipore* филтер промера отвора 0,22 mm пре употребе. Сви реагенси набављени су од *Sigma Aldrich Chemicals*.

3.6.2. Ћелијске културе

Антитуморска активност комплекса бакра(II) са тетрадентатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине испитивана је *in vitro* на туморским ћелијама карцинома колона НСТ-116 (ATCC® CCL-247™), карцинома плућа А549 (ATCC® CCL-185™) и карцинома дојке MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™). Ћелије су одржаване у *DMEM* раствору (*Sigma Aldrich, Munich, Germany*) са додатком 10% феталног говеђег серума (*FBS, Sigma Aldrich, Munich, Germany*), пеницилина (100 IU/ml), стрептомицина (100 µg/ml) у влажној атмосфери коју чине 95% ваздуха/5% CO₂, на температури од 37°C. Субконфлуентни монослојеви, у фази раста, сакупљени су кратким третирањем са 0,25% трипсином и 0,02% етилендиаминтетраацетатом у раствору фосфатног пуфера (*PBS, PAA Laboratories GmbH*), а након тога испирани три пута у серуму без фосфатног пуферског система. Број виталних ћелија одређиван је методом искључивања бојом користећи трипан плаво.

3.6.3. Тестови цитотоксичности. МТТ тест.

МТТ тест коришћен је за одређивање метаболичке активности ћелија. Заснива се на редукцији жуто обојеног једињења, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-бромида (МТТ), под дејством митохондријалне редуктазе код метаболички активних ћелија до љубичастих кристала формазана (Слика 13). Антитуморска активност испитиваних једињења испитана је поређењем интензитета боје коју дају ћелије изложене само медијуму и интензитета боје коју дају ћелије изложене испитиваним супстанцама. Продуковани формазан је растворен у органским растварачима и интензитет боје одређиван спектрофотометријски на таласној дужини од 570 nm.



Слика 13. Редуција МТТ-а до формаза у митохондријама

Број ћелија израчунат је коришћењем *Neubauer*-ове коморе уз искључење мртвих ћелија тј. ћелија обојених трипан плавим. Ћелије су разблажене до густине $3 \cdot 10^4$ ћелија/ml. У микротитар плоче са 96 отвора сипано је 100 μ l (3000 ћелија) суспензије по отвору. У посебне отворе сипан је медијум без ћелија како би се одредила оптичка густина самог медијума-бленк. Плоча је преко ноћи инкубирана на температури од 37° C и у присуству 5% CO₂. За 24 сата ћелије су адхерирале на подлогу, па је медијум одливен и промењен са 100 μ l комплекса раствореног у комплетном медијуму различитих концентрација. Испитивани комплекси су растварени у диметилсулфоксиду и свако разблажење испитивано у трипликату и понављано у три независне серије. У контролне отворе поново је сипан медијум. Плоча је инкубирана 72 сата под истим условима. По истеку инкубације, из свих отвора је уклоњена течност и додато по 100 μ l чистог *DMEM*-а са 15% МТТ раствором (5 mg/ml у *PBS*-у). Плоче су инкубирани још 4 сата. По истеку инкубације медијум је одливен и у сваки отвор сипано по 150 μ l диметилсулфоксида и 20 μ l глицинског пуфера (pH=10,5). Плоче су вортексоване до растварања кристала формаза и оптичка густина узорака измерена мултифункционалним читачем микротитар плоча, *Zenyth 3100* на таласној дужини од 595 nm. Процент мртвих ћелија израчунат је на основу формуле:

$$\% \text{ цитотоксичности} = 100 - \left(\frac{E-B}{K-B} \times 100 \right)$$

Е-представља отвор са испитиваним супстанцама;

Б-бленк (медијум);

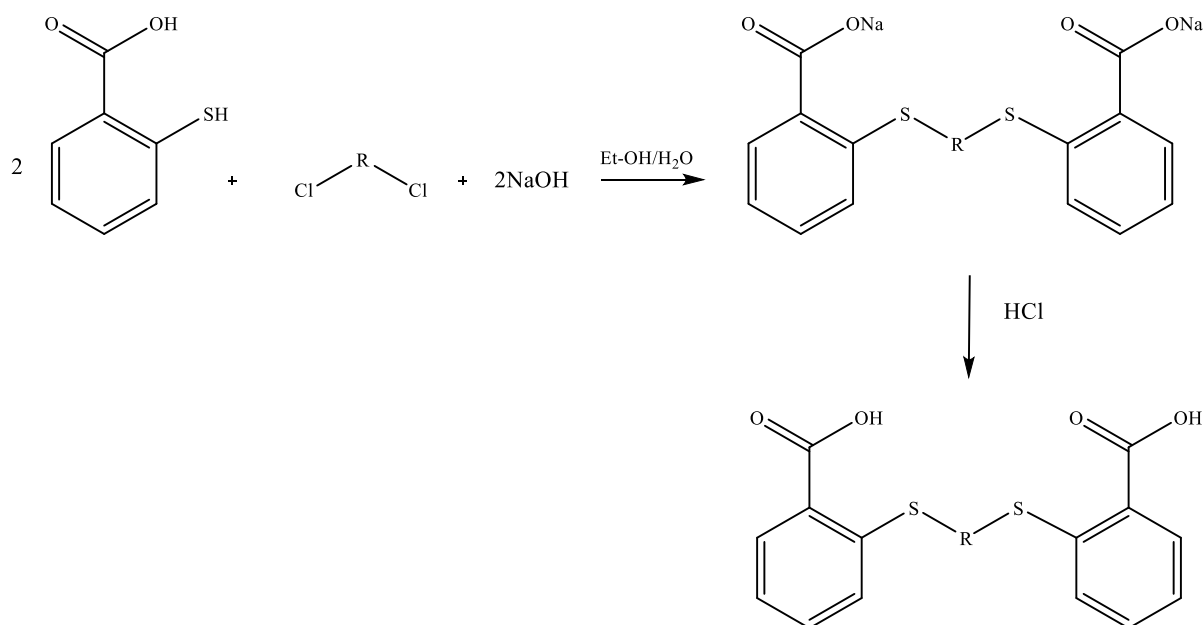
К-представља отвор са нетретираним ћелијама.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Синтеза и карактеризација

4.1.1. Синтеза S,O – тетрадентатних лиганата и одговарајућих комплекса бакра(II)

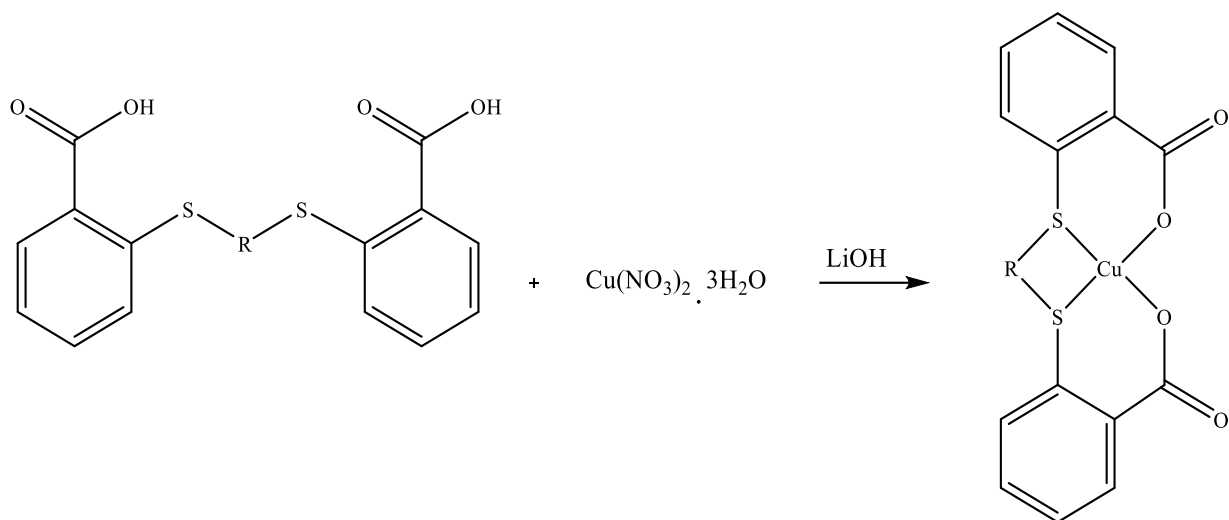
S,O-тетрадентатни лиганди, деривати тиосалицилне киселине са етиленским- (Л1), пропиленским- (Л2), бутиленским- (Л3) и пентиленимским- (Л4) мостом добијају у реакцији између тиосалицилне киселине, одговарајућег алкил-дихалогенида и натријум хидроксида у молском односу 2:1:2, у водено-етанолном растварачу, према већ описаном поступку (Схема 6).



R = етилен- (Л1); пропилен- (Л2); бутилен- (Л3); пентиленим- (Л4)

Схема 6. Реакција добијања S,O-тетрадентатних лиганата деривата тиосалицилне киселине

Одговарајући комплекси бакра(II) синтетисани су у директној реакцији S,O-тетрадентатних лиганата, деривата тиосалицилне киселине, бакар(II)-нитрата трихидрата уз постепени додатак литијум хидроксида у молском односу 1:1:2. Литијум хидроксид се додаје у циљу депротоновања карбоксилне групе и омогућавања грађења координативно-ковалентне везе између бакар(II)-јона и кисеоника из карбоксилне групе. Производ реакција представљају четири мононуклеарна комплекса бакра(II) (К1-К4) (Схема 7).

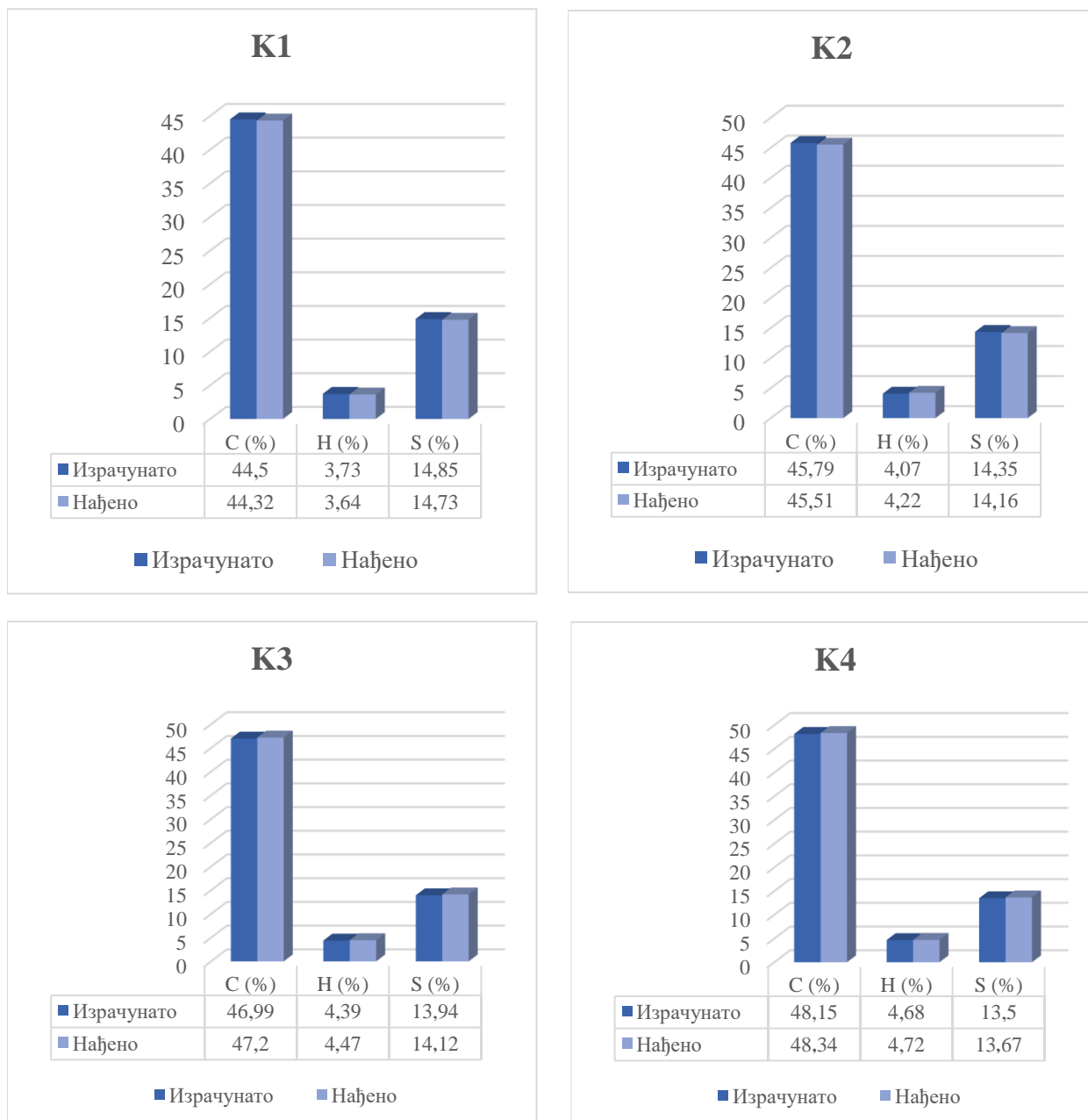


R = етилен- (Л1), пропилен- (Л2), бутилен- (Л3), пентилен- (Л4);

Схема 7. Реакција добијања комплекса бакра(II) са *S,O*-тетраденатним лигандима дериватима тиосалицилне киселине

4.1.2. Елементална микроанализа комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима

Тачна процентуална заступљеност атома угљеника, водоника и сумпора добијена је на основу резултата елементалне микроанализе. Резултати су приказани на следећем графику (Слика 14).



Слика 14. Резултати микроанализе за комплексе бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине (K1-K4)

4.1.3. Инфрацрвени спектри S,O-тетраденатних лиганата, деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса бакра(II)

У циљу утврђивања начина координовања доворских атома лиганата за бакар(II)-јон, снимљени су инфрацрвени спектри лиганата и комплекса. Најважније траке из добијених спектра приказане су у Табели 10.

Табела 10. Најважније траке у инфрацрвеним спектрима слободних лиганата и награђених комплекса

Једињење (Л-лиганд, К-комплекс)		-S-R	-COO ⁻ (as)	-COO ⁻ (sim)
S,O-етилен-тиосалицилна киселина	Л1	652(w)	1683(s)	1410,1253(s)
[Cu(S,O-етилен-тиосалицилна киселина)]	К1	658(w)	1591(s)	1401(s)
S,O-пропилен-тиосалицилна киселина	Л2	651(w)	1678(s)	1414, 1256(s)
[Cu(S,O-пропилен-тиосалицилна киселина)]	К2	656(w)	1590(s)	1400(s)
S,O-бутилен-тиосалицилна киселина	Л3	653(w)	1677(s)	1413, 1254(s)
[Cu(S,O-бутилен-тиосалицилна киселина)]	К3	659(w)	1597(s)	1399(s)
S,O-пентилен-тиосалицилна киселина	Л4	652(w)	1676(s)	1411, 1251(s)
[Cu(S,O-пентилен-тиосалицилна киселина)]	К4	657(w)	1591(s)	1400(s)

4.1.4. Нуклеарно-магнетно-резонанциони спектри S,O-тетраденатних лиганата, деривата тиосалицилне киселине

Како би се додатно утврдила структура синтетисаних лиганата, осим елементарне микроанализе и инфрацрвене спектроскопије, синтетисана једињења су снимљена и ¹H и ¹³C нуклеарно-магнетно-резонантном спектроскопијом. Хемијска померања за водоникове и угљеникове атоме приказана су у Табели 11.

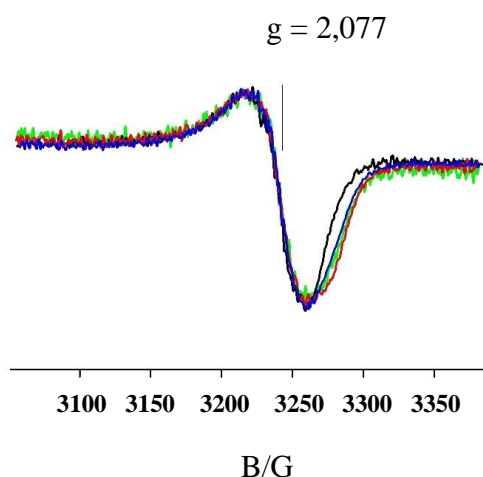
Табела 11. ^1H и ^{13}C спектри *S,O*-тетраденатних лиганада, деривата тиосалицилне киселине

	S,O-етилен- тиосалицилна киселина	S,O-пропилен- тиосалицилна киселина	S,O-бутилен- тиосалицилна киселина	S,O-пентилен- тиосалицилна киселина
	Л1	Л2	Л3	Л4
^1H NMR	3,21 (s, 4H, -CH ₂) 7,19-7,27 (m, 2H, -Ar) 7,38-7,56 (m, 4H, -Ar) 7,88 (dd, 2H, -Ar)	1,84-1,99 (m, 2H, -CH ₂) 3,0-3,11 (m, 4H, -CH ₂) 7,16-7,26 (m, 2H, -Ar) 7,30-7,56 (m, 4H, -Ar) 7,86 (dd, 2H, -Ar)	1,78-1,8 (m, 4H, -CH ₂) 2,93-2,99 (m, 4H, -CH ₂) 7,15-7,23 (m, 2H, -Ar) 7,39-7,54 (m, 4H, -Ar), 7,86 (dd, 2H, -Ar)	1,62-1,73 (m, 6H, -CH ₂) 2,88-2,91 (m, 4H, -CH ₂) 7,15-7,22 (m, 2H, -Ar) 7,37-7,54 (m, 4H, -Ar) 7,86 (dd, 2H, -Ar)
^{13}C NMR	30,2 (-CH ₂), 124,4; 125,9; 128,9; 131; 132,5; 139,6 (-Ar), 167,5 (-COOH)	30 (-CH ₂), 31,2 (-CH ₂), 124,1; 125,7; 128,8; 130,9; 132,3; 140 (-Ar), 167,5 (-COOH)	27,4 (-CH ₂), 30,6 (-CH ₂), 123,9; 125,8; 128,6; 130,9; 132,3; 140,7 (-Ar), 167,5 (-COOH)	28 (-CH ₂), 28,1 (-CH ₂), 31 (-CH ₂), 123,8; 125,8; 128,7; 130,7; 132,1; 140,7 (-Ar), 167,4 (-COOH)

4.1.5. Електронска парамагнетна резонанција

Спектри комплекса **K1-K4** који су снимани на температури од 77 K у диметилсулфоксиду показују изотропне сигнале на $g = 2,077$ ($I = 3/2$) са ширином линије од 42 G (**K1**) и 46 G (**K2-K4**). Спектри не показују аксијалну симетрију ($g_x = g_y = g_{\perp}$, и $g_z = g_{\parallel}$), ни карактеристично хиперfino цепање услед нуклеарног спина бакра ($I = 3/2$), који су карактеристични за квадратно-планарне комплексе бакра [145,146].

ЕПР спектри комплекса растворених у диметилсулфоксиду приказани су на Слици 15.



Слика 15. ЕПР спектри на температури од 77 К комплекса **К1** (црна боја), **К2** (црвена боја), **К3** (зелена боја) и **К4** (плава боја) растворених у диметилсулфоксиду. Експериментални параметри: микроталасна фреквенција 9,4 GHz, микроталасна снага 1 mW, модуациона амплитуда 10 G, модуациона фреквенција 100 kHz.

4.1.6. Моларна проводљивост

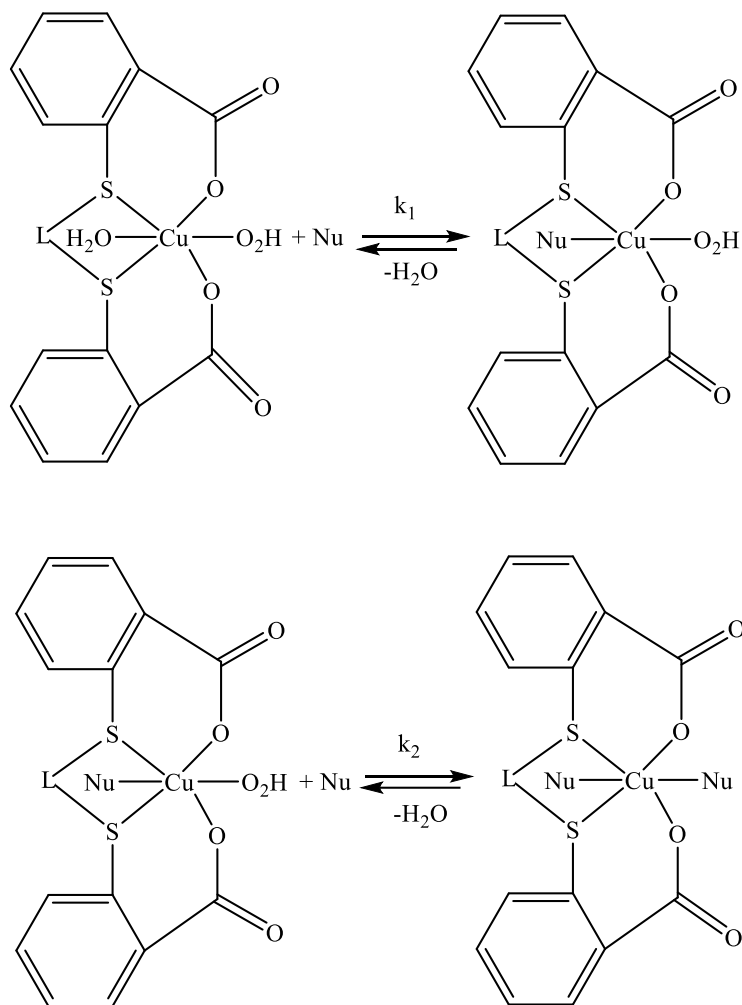
Испитивање моларне проводљивости спроведено је како би се утврдило да ли су синтетисани комплекси електролити или неелектролити у диметилсулфоксиду као растварачу. Вредности моларних проводљивости дате су у Табели 12.

Табела 12. Мерења моларне проводљивости комплекса бакра(II) са S, O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине

Комплекси		$\Lambda M, S cm^2 mol^{-1}$
[Cu(S,O-етилен-тиосалицилна киселина)]	К1	14,79
[Cu(S,O-пропилен-тиосалицилна киселина)]	К2	10,15
[Cu(S,O-бутилен-тиосалицилна киселина)]	К3	2,85
[Cu(S,O-пентилен-тиосалицилна киселина)]	К4	9,07

4.2. Кинетичка мерења

У циљу испитивања координовања синтетисаних комплекса са биогеним молекулима, испитиване су супституционе реакције комплекса бакра(II) (**K1-K4**) са нуклеофилима који садрже сумпор (*L*-метионин и *L*-цистеин) и азот (*5'*-*GMP*) као хетероатоме. Резултати кинетичких мерења за испитиване супституционе реакције комплекса **K1-K4** са *L*-метионином, *L*-цистеином и *5'*-*GMP* показују да се супституција одиграва у два узастопна корака (Схема 8):



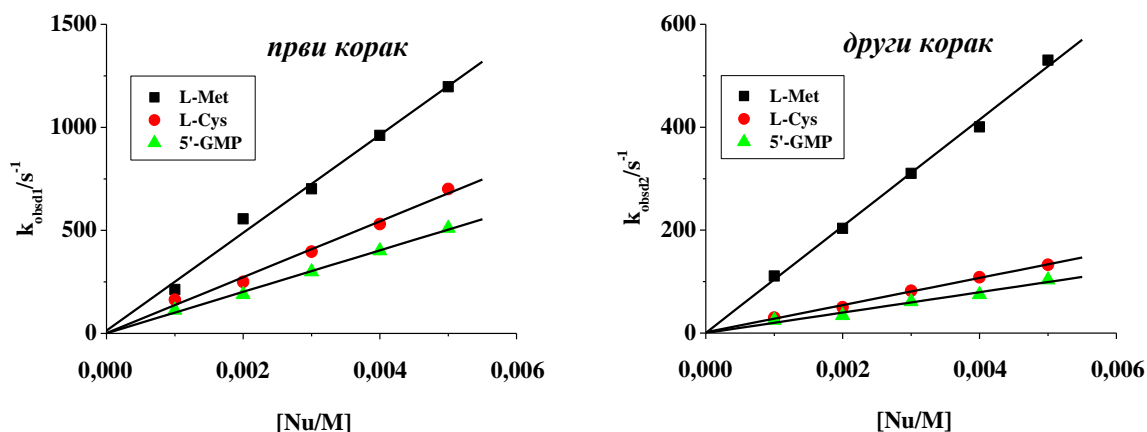
L = -(CH₂)₂-, -(CH₂)₃-, -(CH₂)₄-, -(CH₂)₅-; Nu = L-Met, L-Cys, 5'-GMP

Схема 8. Супституционе реакције комплекса бакра(II) (**K1-K4**) са нуклеофилима

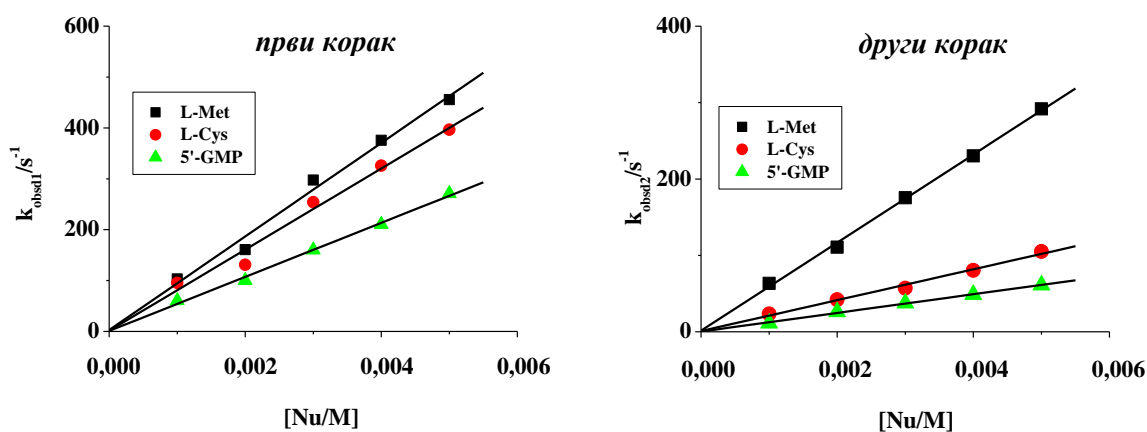
Реакције карактеришу константе другог реда за први и други корак супституције, k_1 и k_2 . Вредности константи k_1 и k_2 израчунате су из графика зависности k_{obsd} у односу на концентрацију нуклеофила за оба корака супституције, према следећој једначини:

$$k_{\text{obsd}1/2} = k_{1/2}[\text{Nu}] \quad (5)$$

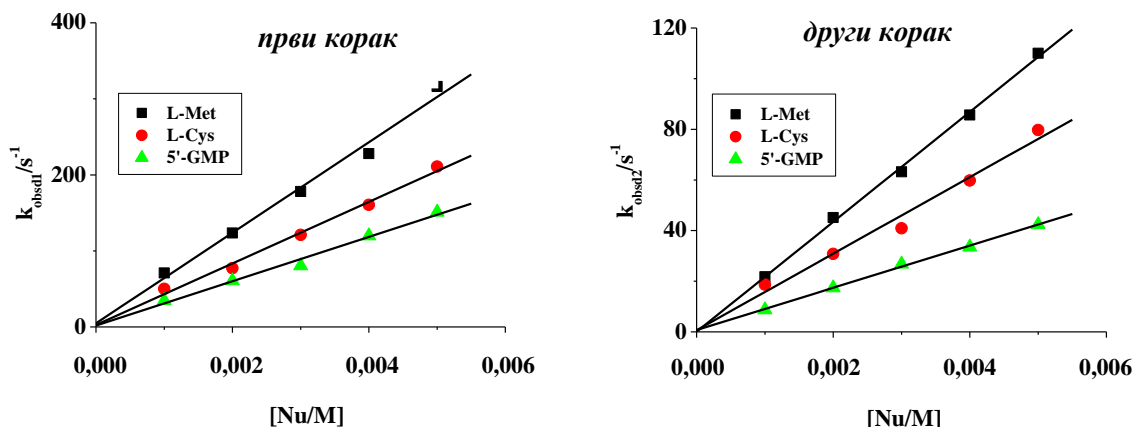
Графици за прву и другу супституциону реакцију приказани су на Сликама 16-19, док су вредности константи k_1 and k_2 приказани у Табелама 13 и 14.



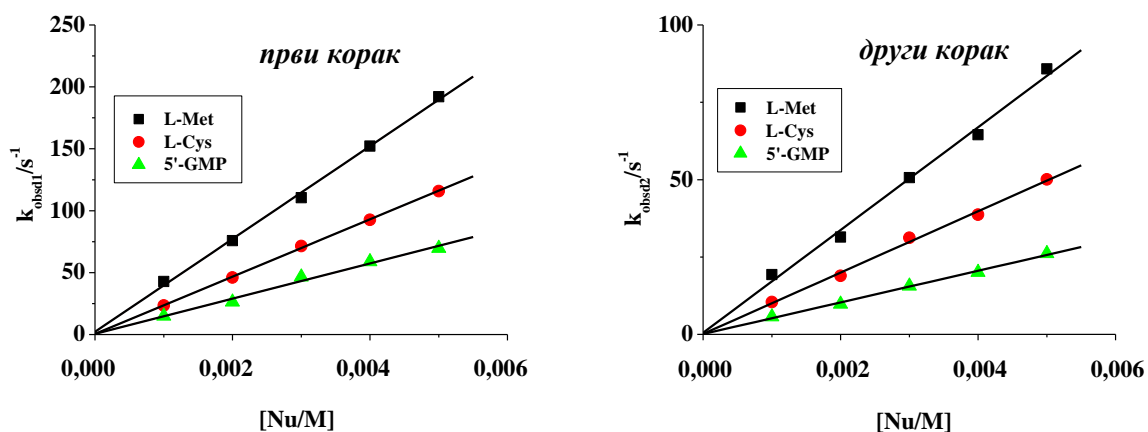
Слика 16. Константе псеудо-првог реда за први ($k_{\text{obsd}1}$) и други ($k_{\text{obsd}2}$) корак супституције комплекса **K1** са L-Met, L-Cys and 5'-GMP приказане у функцији концентрације лиганда на $\text{pH} = 7,2$ (25 mM *Нерес* пуфер) и 310 K



Слика 17. Константе псеудо-првог реда за први ($k_{\text{obsd}1}$) и други ($k_{\text{obsd}2}$) корак супституције комплекса **K2** са L-Met, L-Cys and 5'-GMP приказане у функцији концентрације лиганда на $\text{pH} = 7,2$ (25 mM *Нерес* пуфер) и 310 K



Слика 18. Константе псеудо-првог реда за први (k_{obsd1}) и други (k_{obsd2}) корак супституције комплекса **K3** са L-Met, L-Cys and 5'-GMP приказане у функцији концентрације лиганда на $pH = 7,2$ (25 mM *Нерес* пуфер) и 310 K



Слика 19. Константе псеудо-првог реда за први (k_{obsd1}) и други (k_{obsd2}) корак супституције комплекса **K4** са L-Met, L-Cys and 5'-GMP приказане у функцији концентрације лиганда на $pH = 7,2$ (25 mM *Нерес* пуфер) и 310 K

Табела 13. Константе псеудо-првог реда у функцији концентрације лиганда за реакције супституције комплекса **K1** са *L*-метионном и *L*-цистеином на $pH = 7,2$ (25 mM *Hepes* пуфер) и 310 K

Лиганди	λ [nm]	10^3 [L]/M	k_{obsd1}/s^{-1}	k_{obsd2}/s^{-1}
<i>L</i> -Метионин	260	1	212,86(5) ³	110,98(6)
		2	555,70(4)	203,42(6)
		3	701,98(4)	310,24(5)
		4	960,80(5)	400,71(4)
		5	1196,56(4)	530,40(6)
<i>L</i> -Цистеин	280	1	163,29(4)	30,13(5)
		2	250,10(6)	50,18(4)
		3	396,91(6)	82,06(4)
		4	530,50(4)	108,60(5)
		5	700,98(4)	132,90(5)

Табела 14. Константе псеудо-првог реда у функцији концентрације лиганда за реакције супституције комплекса **K1** са 5'-GMP на $pH = 7,2$ (25 mM *Hepes* пуфер) и температурама од 288 K, 298 K и 310 K

	λ [nm]	10^3 [L]/M	k_{obsd1}/s^{-1}	k_{obsd2}/s^{-1}	
5'-GMP	288 K	320	1	64,87(5)	12,44(4)
			2	130,20(4)	22,30(4)
			3	195,60(4)	35,90(4)
			4	254,68(5)	45,30(5)
			5	320,80(5)	57,60(5)
5'-GMP	298 K	320	1	80,30(5)	17,58(5)
			2	148,90(5)	31,68(4)
			3	243,50(5)	50,06(4)
			4	306,20(4)	66,40(4)
			5	390,10(4)	81,79(5)
5'-GMP	310 K	320	1	113,07(4)	24,84(5)
			2	188,65(5)	33,86(4)
			3	298,83(5)	61,10(6)
			4	400,77(4)	74,90(5)
			5	510,59(5)	103,29(5)

³ Број понављања

Табела 15. Константе псеудо-првог реда у функцији концентрације лиганата за реакције супституције комплекса **K2** са L-метионном, L-цистеином и 5'-GMP на $pH = 7,2$ (25 mM HEPES пуфер) и 310 K

Лиганди	λ [nm]	10^3 [L]/M	k_{obsd1}/s^{-1}	k_{obsd2}/s^{-1}
L-Met	280	1	103,18(4)	63,27(5)
		2	160,73(4)	110,80(4)
		3	297,54(5)	175,30(4)
		4	375,80(4)	230,20(4)
		5	455,39(6)	291,85(5)
L-Cys	280	1	95,18(5)	23,30(4)
		2	130,90(5)	42,10(5)
		3	254,08(5)	56,94(5)
		4	325,79(5)	80,45(5)
		5	396,36(4)	105,03(6)
5'-GMP	315	1	60,36(4)	11,30(5)
		2	100,09(4)	26,01(4)
		3	160,10(6)	37,60(4)
		4	210,07(5)	48,77(4)
		5	270,85(6)	60,98(4)

Табела 16. Константе псеудо-првог реда у функцији концентрације лиганата за реакције супституције комплекса **K3** са L-метионном, L-цистеином и 5'-GMP на $pH = 7,2$ (25 mM HEPES пуфер) и 310 K

Лиганди	λ [nm]	10^3 [L]/M	k_{obsd1}/s^{-1}	k_{obsd2}/s^{-1}
L-Met	260	1	70,88(5)	21,76(5)
		2	123,50(4)	45,11(4)
		3	178,09(5)	63,20(4)
		4	227,98(4)	85,61(5)
		5	316,31(6)	110,03(5)
L-Cys	262	1	50,09(6)	18,65(4)
		2	77,25(5)	30,80(5)
		3	121,08(5)	40,91(5)
		4	160,60(5)	59,77(5)
		5	210,92(4)	79,73(5)
5'-GMP	313	1	34,55(4)	8,70(4)
		2	60,66(4)	17,40(4)
		3	80,30(5)	26,76(4)
		4	119,60(5)	33,50(4)
		5	150,90(6)	42,30(4)

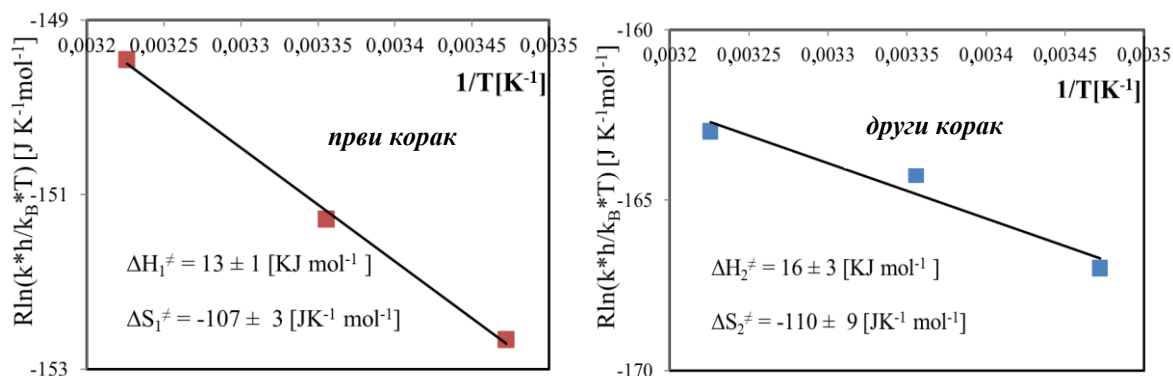
Табела 17. Константе псеудо-првог реда у функцији концентрације лиганда за реакције супституције комплекса **K4** са L-метиониом, L-цистеином и 5'-GMP на $pH = 7,2$ (25 mM *Hepes* пуфер) и 310 K.

Лиганди	λ [nm]	10^3 [L]/M	k_{obsd1}/s^{-1}	k_{obsd2}/s^{-1}
L-Met	260	1	42,76(4)	19,29(4)
		2	75,80(4)	31,42(6)
		3	110,42(5)	50,65(4)
		4	152,13(4)	64,50(4)
		5	192,04(6)	85,78(5)
L-Cys	280	1	23,40(6)	10,45(4)
		2	46,07(5)	18,90(5)
		3	71,45(5)	31,20(5)
		4	92,66(5)	38,70(5)
		5	115,80(4)	50,10(5)
5'-GMP	320	1	14,84(6)	5,65(5)
		2	26,26(4)	9,79(4)
		3	46,47(5)	15,63(4)
		4	58,80(5)	20,03(4)
		5	69,59(6)	26,09(4)

Табела 18. Константе другог реда у супституционим реакцијама за комплексе **K1-K4** са нуклеофилима L-Met, L-Cys и 5'-GMP при $pH = 7,2$ (25 mM *Hepes* пуфер) и температури $T=310$ K

Комплекс	Лиганд	k_1 [$M^{-1}s^{-1}$]	k_2 [$M^{-1}s^{-1}$]
K1	L-Met	$(24 \pm 2) \times 10^4$	$(10,3 \pm 0,3) \times 10^4$
	L-Cys	$(13,6 \pm 0,8) \times 10^4$	$(2,64 \pm 0,09) \times 10^4$
	5'-GMP	$(10,1 \pm 0,4) \times 10^4$	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^4$
K2	L-Met	$(9,2 \pm 0,6) \times 10^4$	$(5,8 \pm 0,1) \times 10^4$
	L-Cys	$(7,9 \pm 0,6) \times 10^4$	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^4$
	5'-GMP	$(5,3 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,22 \pm 0,03) \times 10^4$
K3	L-Met	$(5,9 \pm 0,4) \times 10^4$	$(2,11 \pm 0,05) \times 10^4$
	L-Cys	$(4,1 \pm 0,2) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$
	5'-GMP	$(2,9 \pm 0,2) \times 10^4$	$(8,3 \pm 0,2) \times 10^3$
K4	L-Met	$(3,7 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,66 \pm 0,08) \times 10^4$
	L-Cys	$(2,31 \pm 0,03) \times 10^4$	$(9,9 \pm 0,3) \times 10^3$
	5'-GMP	$(1,42 \pm 0,09) \times 10^4$	$(5,1 \pm 0,1) \times 10^3$

Активациони параметри, промена ентропије активирања, ΔS^\ddagger и промена енталпије активирања, ΔH^\ddagger израчунати су за оба супституциона корака комплекса 1 са 5'-GMP (Слика 20) применом Ејрингове једначине. Добијене вредности за први и други корак супституције су $\Delta S_1^\ddagger = -107 \pm 3$ [JK⁻¹ mol⁻¹], $\Delta H_1^\ddagger = 13 \pm 1$ [KJ mol⁻¹] и $\Delta S_2^\ddagger = -110 \pm 9$ [JK⁻¹ mol⁻¹], $\Delta H_2^\ddagger = 16 \pm 3$ [KJ mol⁻¹] (редом).



Слика 20. Ејрингови дијаграми за први и други корак супституције комплекса **K1** са 5'-GMP на pH = 7,2 у 25 mM *Нерес* пуферу

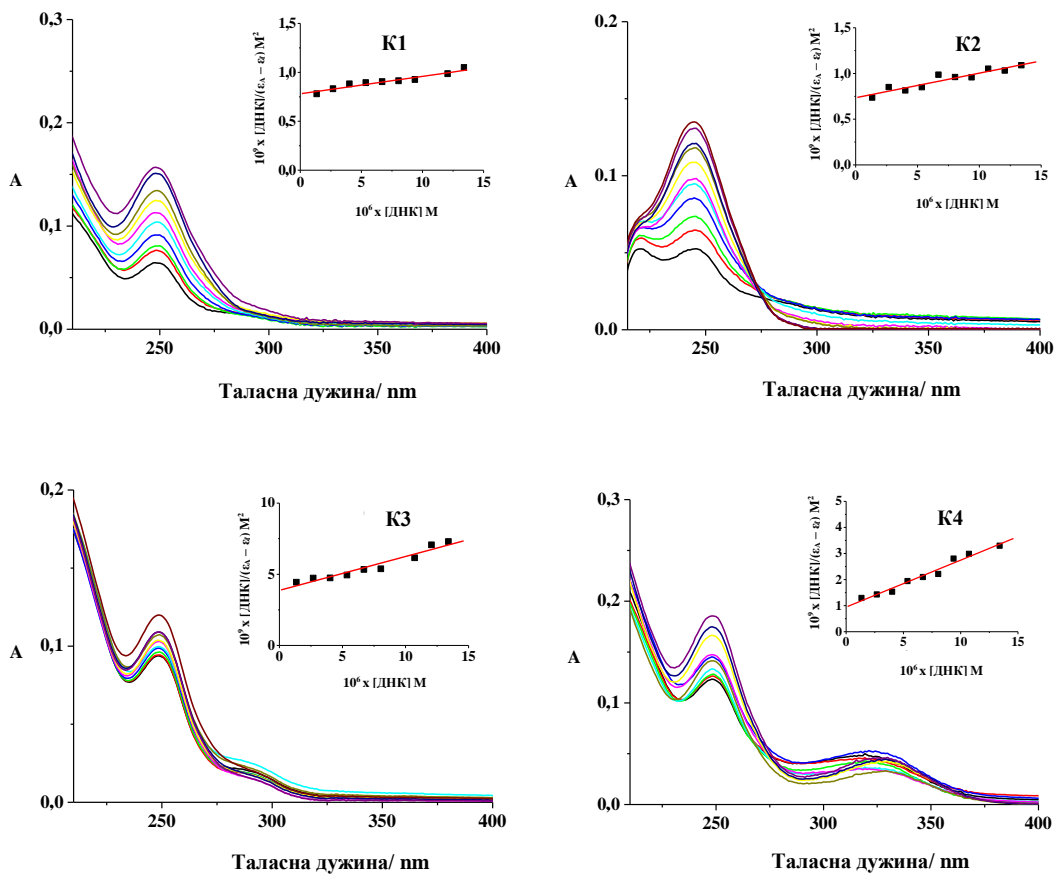
4.3. Интеракције са молекулом ДНК

4.3.1. Апсорпциона спектроскопска анализа

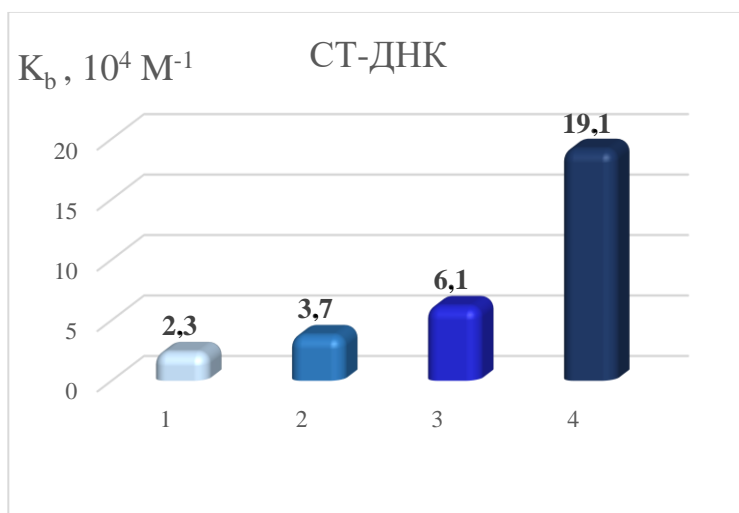
Апсорпциони спектри комплекса **K1-K4** у одсуству и присуству СТ-ДНК приказани су на Слици 21. Како би се утврдила снага интеракције испитиваних комплекса и СТ-ДНК, израчуната је и интринзичка константа везивања (K_b) из графика приказаног на Слици 22, а вредности су приказане у Табели 19.

Табела 19. Константе везивања за ДНК за комплексе **K1-K4**

Комплекс	K_b [M ⁻¹]
K1	$2,3 (\pm 0,1) \times 10^4$
K2	$3,7 (\pm 0,1) \times 10^4$
K3	$6,1 (\pm 0,1) \times 10^4$
K4	$1,91 (\pm 0,02) \times 10^5$



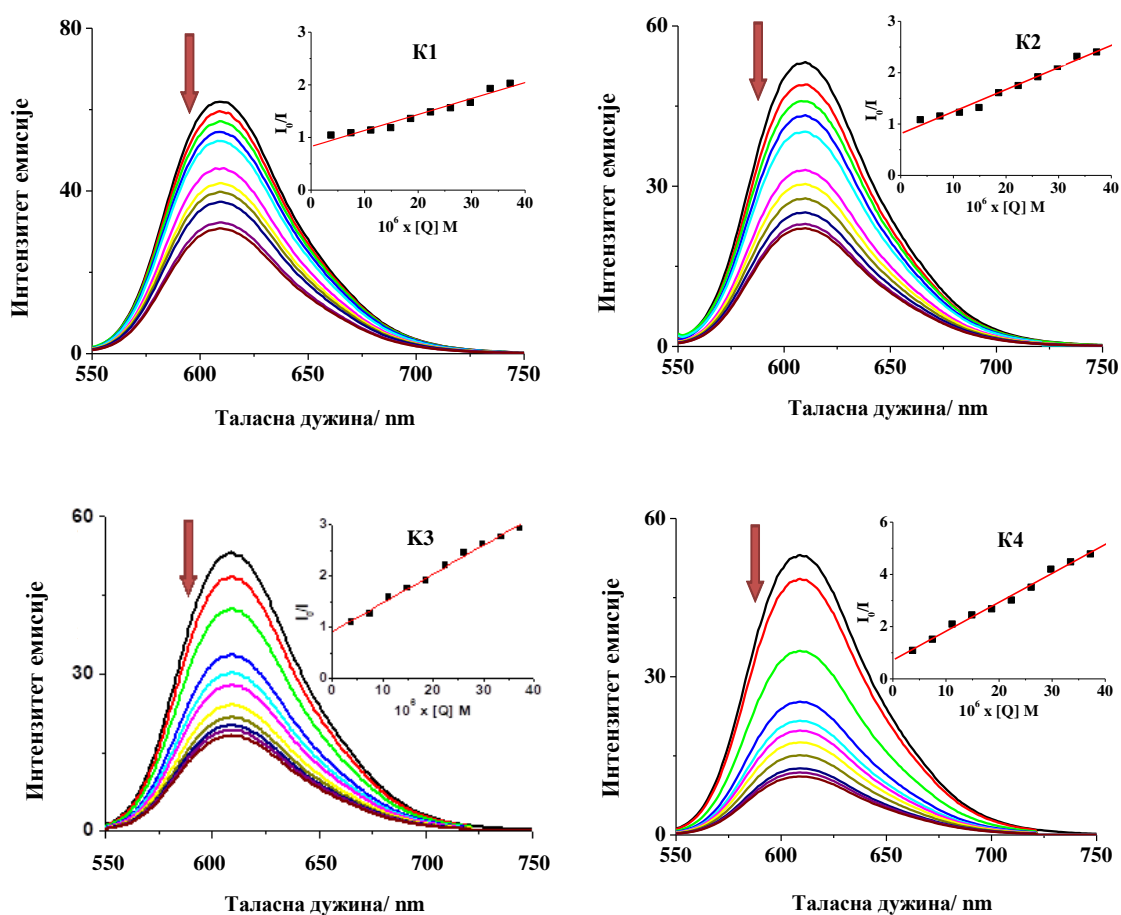
Слика 21. Апсорпциони спектри комплекса **K1-K4** при 298 K у PBS пуферу (енг. *Phosphate buffer saline*) по додатку СТ-ДНК. $[комплекс] = 6,7 \mu M$, $[ДНК] = (0-13,4) \mu M$. Стрелице показују промену апсорбанце са повећањем концентрације ДНК. Додатак: График зависности $[ДНК]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ у функцији $[ДНК]$



Слика 22. Поређење K_b вредности за комплексе **K1-K4**

4.3.2. Флуоресцентна емисиона спектроскопија

Интеракција комплекса **K1-K4** са СТ-ДНК додатно је испитивана емисионом спектроскопијом са етидијум бромидом. Крива смањења флуоресценције етидијум бромида у одсуству и присуству комплекса **K1-K4** приказани су на Слици 23. Као што се може приметити додатком раствора комплекса у раствор етидијум бромид-ДНК изазива значајно смањење интензитета флуоресценције.



Слика 23. Емисиони спектри етидијум бромида везаног за ДНК у присуству комплекса **K1-K4**. $[EB] = 1,86 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[ДНК] = 1,86 \times 10^{-5} \text{ M}$; $[\text{комплекс}] = (0-3,72) \times 10^{-5}$; $\lambda_{ex} = 527 \text{ nm}$. Стрелица показује промену интензитета флуоресценције са повећањем концентрације комплекса. Уметнути график представља дијаграм зависности I_0/I у функцији $[Q]$

Стерн-Волмерови дијаграми комплекса ЕБ-ДНК (Уметнути дијаграми на Слици 23) потврђују гашење флуоресцентне емисије. Стерн-Волмерова константа гашења (K_{sv}) одређена је из нагиба криве графика зависности I_0/I у функцији $[Q]$, а резултати су приказани у Табели 20.

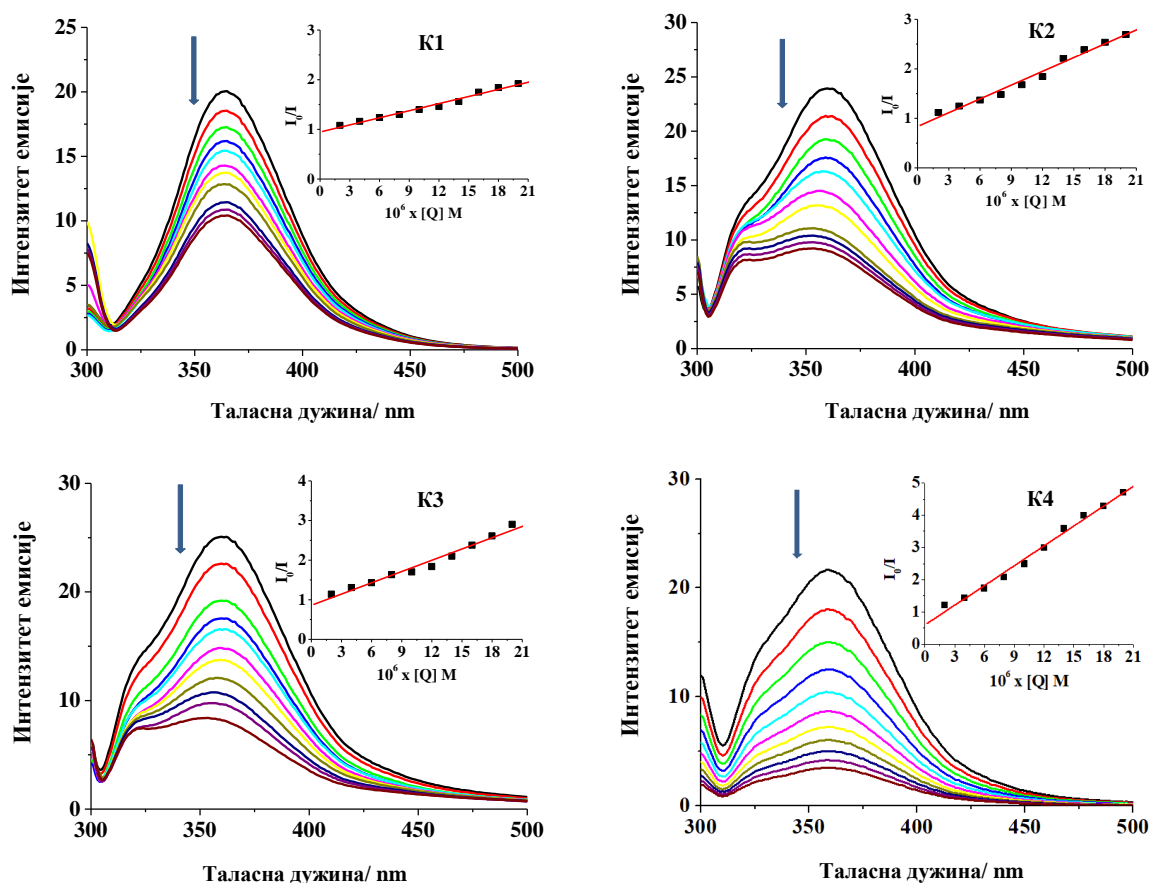
Табела 20. Стерн-Волмерове константе из ЕБ-ДНК флуоресценције за комплексе **K1-K4**

Комплекс	$K_{sv}(EB)$ [M^{-1}]
K1	$3,1 (\pm 0,2) \times 10^4$
K2	$4,3 (\pm 0,2) \times 10^4$
K3	$5,7 (\pm 0,2) \times 10^4$
K4	$1,11 (\pm 0,04) \times 10^5$

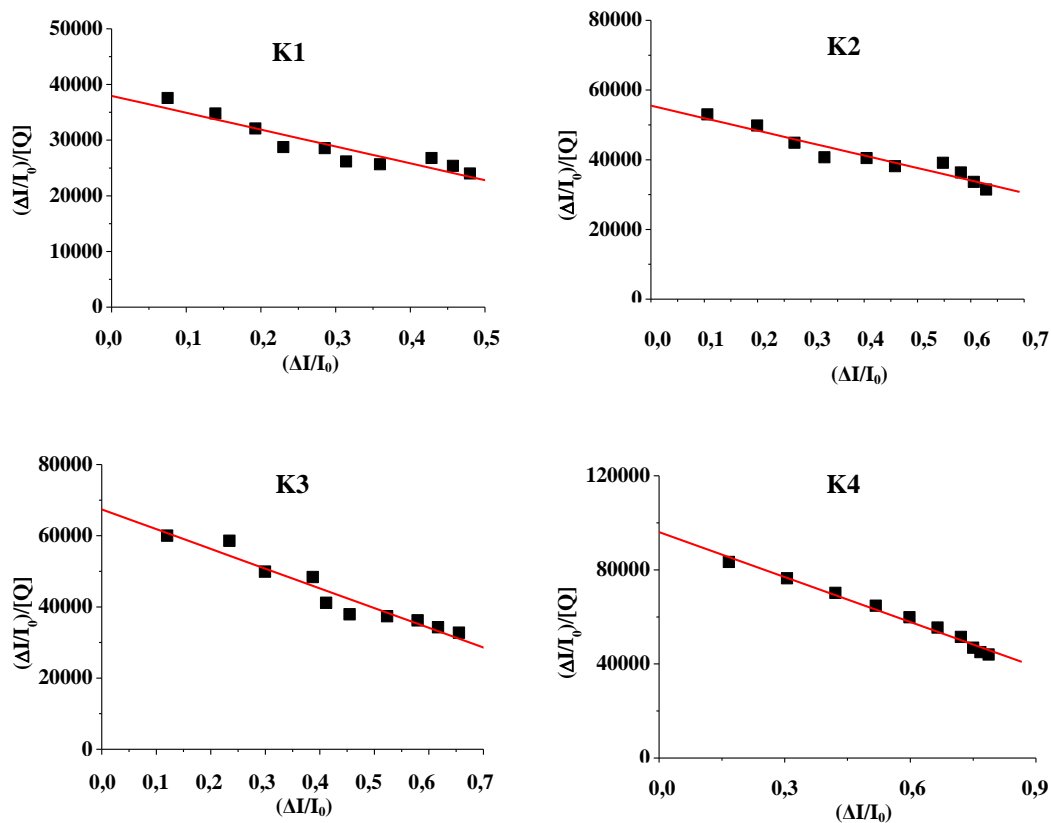
4.4. Интеракције са хуманим серумским албумином

У овој дисертацији представљене су и интеракције комплекса **K1-K4** са хуманим серумским албумином (ХСА) применом флуоресцентне спектроскопије. С обзиром да у структури ХСА постоји остатак аминокиселине триптофан (Трп-214), раствор хуманог серумског албумина показује јаку флуоресценцију на таласној дужини од 362 nm, након ексцитације на таласној дужини од 295 nm.

Вредности Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) и вредности константе гашења (k_q) израчунати су применом Стерн-Волмерове једначине гашења из уметнутог графика на Слици 24. Вредности константе везивања за хумани серумски албумин (K), и број везивних места на албумину (n) израчунати су применом *Scatchard* једначине и *Scatchard*-овог дијаграма (Слика 25). Све добијене вредности приказане су у Табели 21. Сви испитивани комплекси показују добру способност гашења флуоресценције хуманог серумског албумина.



Слика 24. Емисиони спектри ХСА у присуству комплекса **K1-K4**. $[ХСА] = 2 \mu M$, $[комплекс] = 0-20 \mu M$, $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$. Стрелица показује промену интензитета са повећањем концентрације комплекса. Уметнути график представља дијаграм зависности I_0/I у функцији $[Q]$



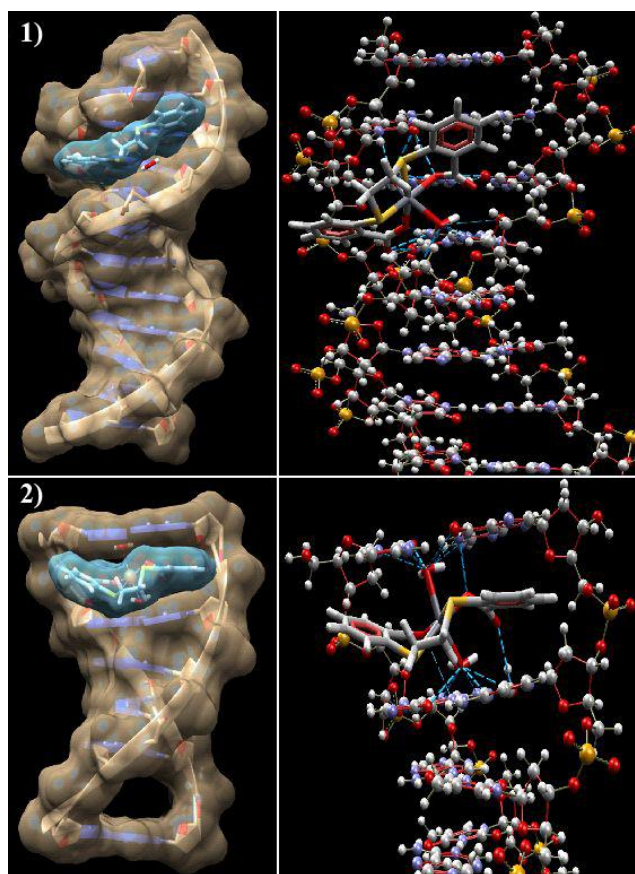
Слика 25. Scatchard-ови дијаграми за комплексе K1-K4

Табела 21. ХСА везујуће константе и остали параметри (K_{sv} , k_q , K , n) за комплексе K1-K4

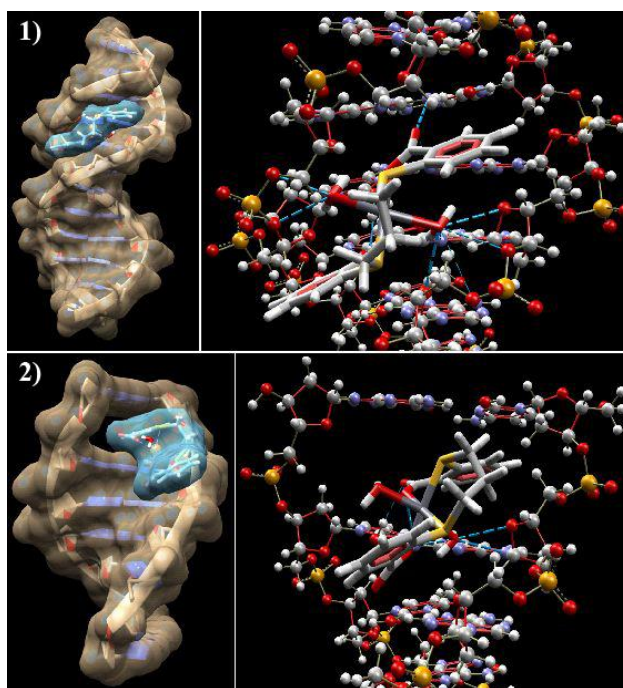
Комплекс	$K_{sv}(\text{HSA}) [\text{M}^{-1}]$	$k_q [\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	$K [\text{M}^{-1}]$	n
K1	$4,8 (\pm 0,2) \times 10^4$	$4,8 (\pm 0,2) \times 10^{12}$	$3,1 (\pm 0,1) \times 10^4$	1,2
K2	$9,3 (\pm 0,1) \times 10^4$	$9,3 (\pm 0,4) \times 10^{12}$	$3,6 (\pm 0,1) \times 10^4$	1,4
K3	$9,6 (\pm 0,1) \times 10^4$	$9,6 (\pm 0,1) \times 10^{12}$	$5,5 (\pm 0,2) \times 10^4$	1,2
K4	$2,05 (\pm 0,07) \times 10^5$	$2,05 (\pm 0,07) \times 10^{13}$	$6,4 (\pm 0,2) \times 10^4$	1,4

4.5. Молекулски докинг комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине са молекулом ДНК и хуманим серумским албумином

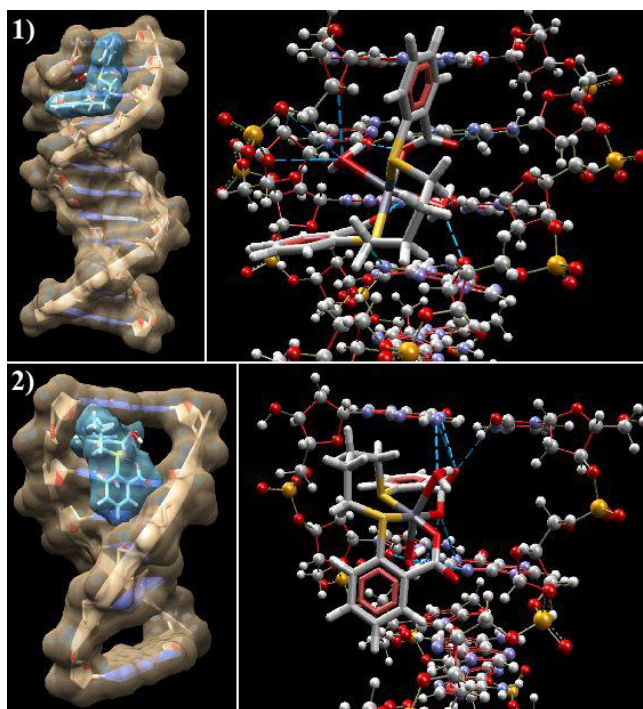
Испитивани комплекси су доковани у ригидне структуре две различите врсте ДНК фрагмената, које представљају: 1. канонску Б-ДНК (PDB 1BNA) или 2. ДНК са интеркалационом празнином (PDB 1Z3F) које су одабране како би се успешно проучиле обе врсте интеракција (мали жлеб или интеркалација) комплекса. Након тога, упоређивани су резултати оба типа ДНК молекулског уклапања. 1BNA је кристална структура синтетског ДНК додекамера, док је 1Z3F кристална структура 6 *bp* ДНК фрагмента у комплексу са интеркалирајућим агенсом, елиптицином (који је уклоњен пре уклапања). Најстабилније конформације комплекса са молекулом ДНК приказане су на Сликама 26-29, док су најбоље рангиране конформације, које су добијене на основу коришћених функција, приказане у Табели 22.



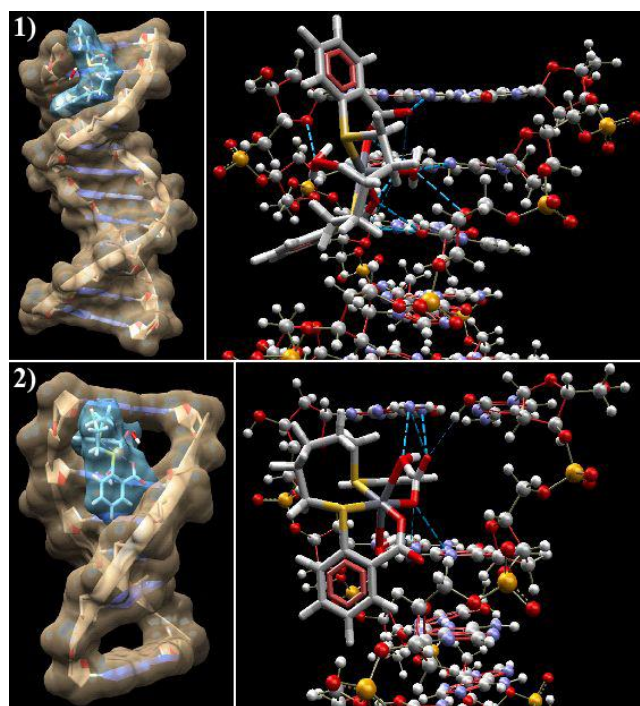
Слика 26. Модел молекулског уклапања испитиваног комплекса **KI** у структуру: 1) канонске Б-ДНК (1BNA) и 2) интеркалационог међупростора (1Z3F). Водоничне везе које се граде између комплекса и ДНК молекула представљене су плавим испрекиданим линијама.



Слика 27. Модел молекулског уклапања испитиваног комплекса **K2** у структуру: 1) канонске Б-ДНК (1BNA) и 2) интеркалационог међупростора (1Z3F). Водоничне везе које се граде између комплекса и ДНК молекула представљене су плавим испрекиданим линијама.



Слика 28. Модел молекулског уклапања испитиваног комплекса **K3** у структуру: 1) канонске Б-ДНК (1BNA) и 2) интеркалационог међупростора (1Z3F). Водоничне везе које се граде између комплекса и ДНК молекула представљене су плавим испрекиданим линијама.

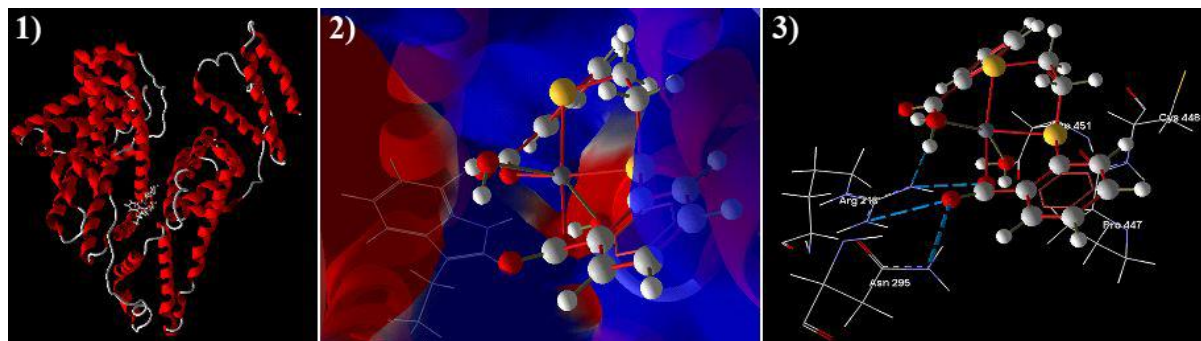


Слика 29. Модел молекулског уклапања испитиваног комплекса **K4** у структуру: 1) канонске Б-ДНК (**1BNA**) и 2) интеркалационог међупростора (**1Z3F**). Водоничне везе које се граде између комплекса и ДНК молекула представљене су плавим испрекиданом линијама.

Табела 22. Вредности докинг скорова приликом молекулског уклапања испитиваних комплекса (**K1-K4**) у структуру ДНК молекула

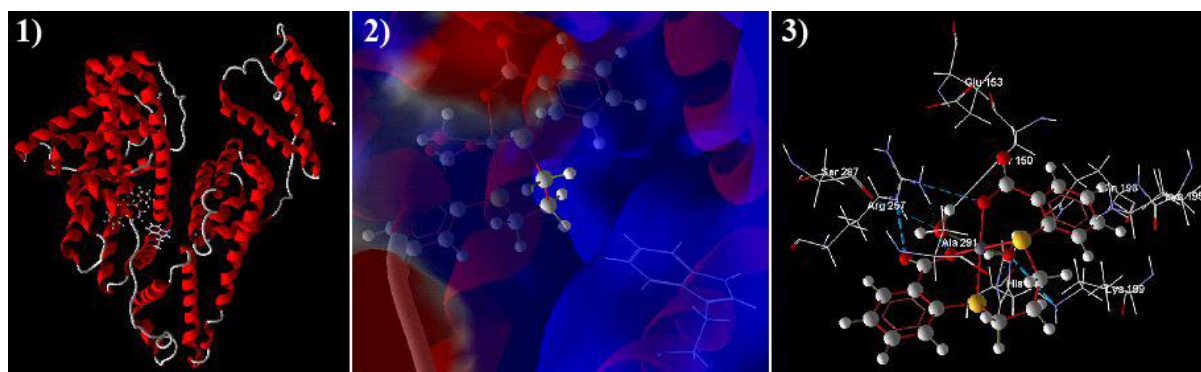
<i>PDB ID</i> ДНК	ДНК докинг				
	Комплекс	<i>MolDock</i>	<i>Rerank</i>	<i>Hbond</i>	<i>Docking</i>
1BNA – канонска празнина	K1	-137,86	-79,93	-27,95	-144,84
	K2	-157,28	-79,69	-28,75	-143,22
	K3	-141,24	-79,95	-24,91	-149,13
	K4	-147,51	-70,55	-28,25	-133,62
1Z3F – интеркалациона празнина	K1	-115,14	-66,25	-28,05	-119,18
	K2	-122,35	-64,68	-16,06	-119,38
	K3	-134,89	-70,11	-21,34	-130,45
	K4	-141,12	-66,71	-13,51	-128,34

Такође, применом молекулског докинга испитивана је и врста интеракције између комплекса **K1-K4** и хуманог серумског албумина. Везујуће интеракције између комплекса **K1-K4** и ХСА представљене су на Сликама 30-33, док су најбоље рангиране конформације, који су добијене на основу коришћених функција, приказане у Табели 23.



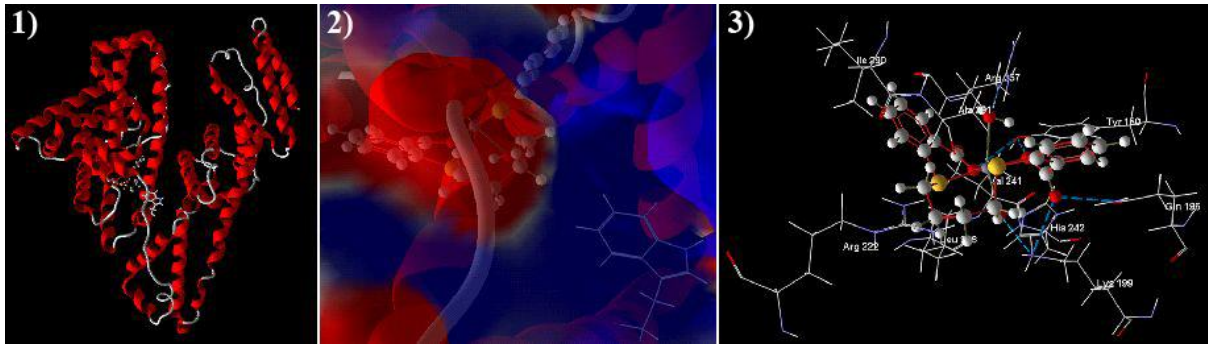
Слика 30. Најповољније просторне оријентације комплекса **K1** са ХСА према *Hbond* вредностима:

- 1) молекулско уклапање комплекса у односу на протеински ланац ХСА;
 - 2) електростатички приказ комплекса унутар активног места ХСА;
 - 3) везујуће место испитиваних комплекса на ХСА протеину и одговарајући аминокиселински остаци представљени су моделом штапића.
- * Водоничне везе приказане су плавим испрекиданим линијама



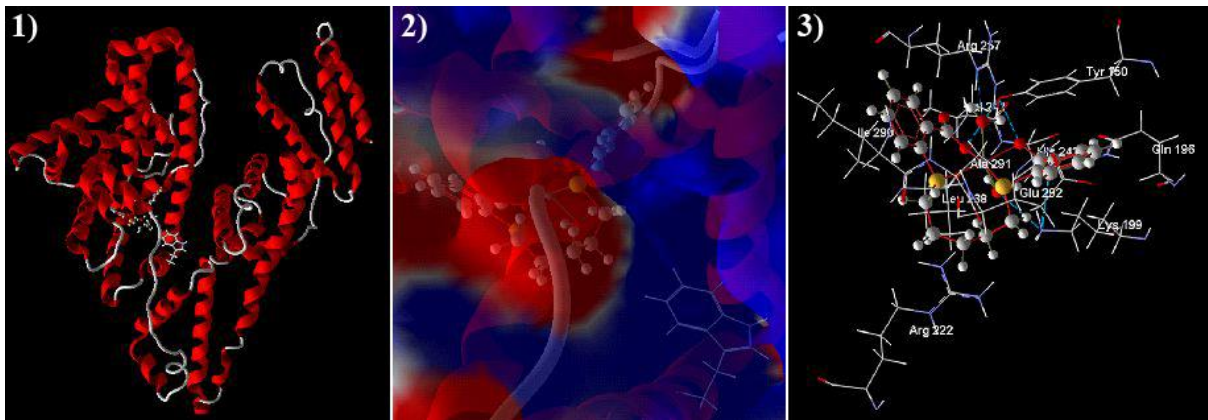
Слика 31. Најповољније просторне оријентације комплекса **K2** са ХСА према *Hbond* вредностима:

- 1) молекулско уклапање комплекса у односу на протеински ланац ХСА;
 - 2) електростатички приказ комплекса унутар активног места ХСА;
 - 3) везујуће место испитиваних комплекса на ХСА протеину и одговарајући аминокиселински остаци представљени су моделом штапића.
- * Водоничне везе приказане су плавим испрекиданим линијама



Слика 32. *Најповољније просторне оријентације комплекса **K3** са ХСА према Hbond вредностима:*

- 1) молекулско уклапање комплекса у односу на протеински ланац ХСА;
 - 2) електростатички приказ комплекса унутар активног места ХСА;
 - 3) везујуће место испитиваних комплекса на ХСА протеину и одговарајући аминокиселински остаци представљени су моделом штапића.
- * Водоничне везе приказане су плавим испрекиданим линијама



Слика 33. *Најповољније просторне оријентације комплекса **K4** са ХСА према Hbond вредностима:*

- 1) молекулско уклапање комплекса у односу на протеински ланац ХСА;
 - 2) електростатички приказ комплекса унутар активног места ХСА;
 - 3) везујуће место испитиваних комплекса на ХСА протеину и одговарајући аминокиселински остаци представљени су моделом штапића.
- * Водоничне везе приказане су плавим испрекиданим линијама

Табела 23. Најниже вредности слободне енергије везивања испитиваних комплекса са ХСА.

Комплекс	MolDock	Rerank	Hbond	Docking	Аминокиселинске секвенце ^a
K1	-105,54	-81,38	-7,71	-114,27	Asn-295(H), Arg-218(H), Asp-451, Pro-447, Cys-448
K2	-107,79	-62,21	-7,27	-119,71	Tyr-150(H), Arg-257(H), Lys-199(H), His-242, Glu-153, Gln-196, Lys-195, Ala-291, Ser-287(H)
K3	-122,47	-56,56	-6,16	-126,47	Arg-222, His-242(H), Lys-199(H), Ile-290, Arg-257(H), Ala-291, Leu-238, Val-241, Tyr-150(H), Gln-196(H)
K4	-130,87	-80,59	-6,11	-134,78	Val-241, Tyr-150(H), Arg-222, Ala-291, Arg-257(H), Glu-292, His-242, Gln-196(H), Leu-238, Lys-199(H)

^a(H) указује на везивање аминокиселина са комплексом формирањем водоничних веза

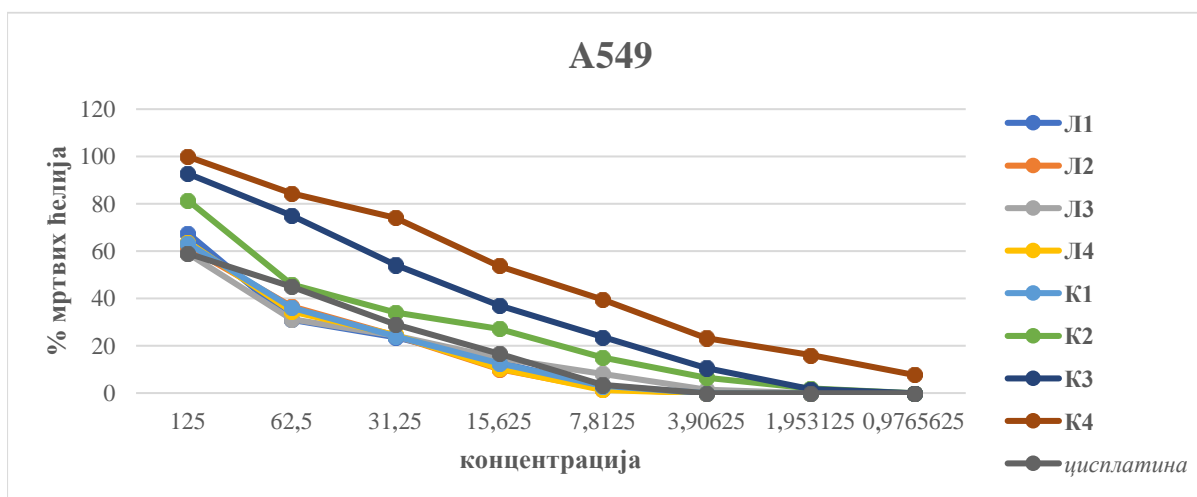
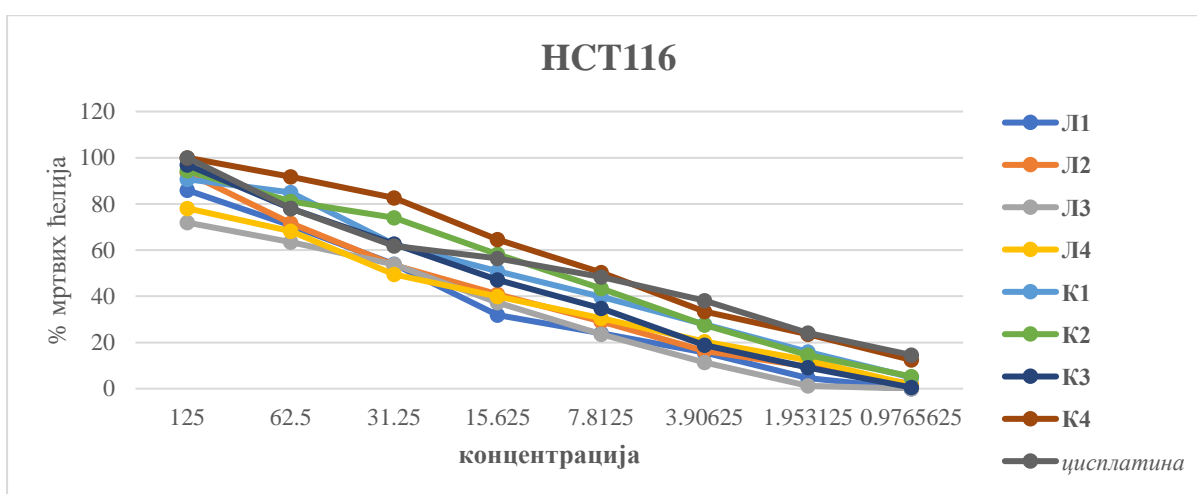
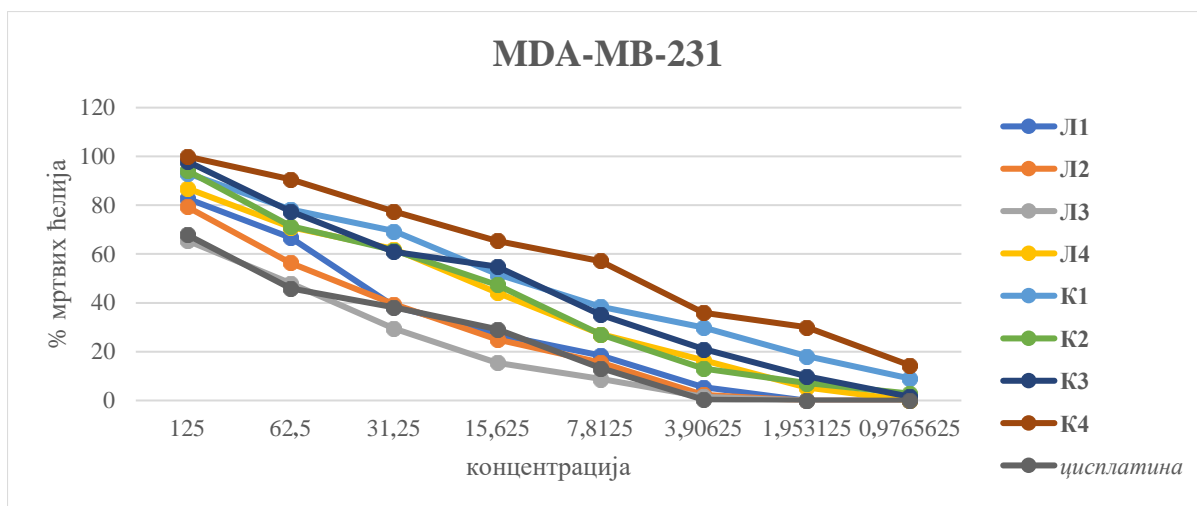
Испитивани комплекси се веома добро прилагођавају њиховим за везивање који се налазе унутар места I (субдомен IIА) чему у прилог иду добијени резултати слободне енергије везивања приказани у Табели 23.

4.6. *In vitro* антитуморска активност S,O-тетраденатних лиганата, деривата тиосалицилне киселине и комплекса бакра(II)

МТТ тест спроведен је у циљу испитивања цитотоксичности новосинтетисаних комплекса бакра(II) са S,O – тетраденатним лигандима дериватима тиосалицилне киселине на вијабилност хуманих ћелија карцинома дојке, колона и плућа. Резултати показују да су сва испитивана једињења цитотоксична за хумане ћелије карцинома дојке (MDA-MB-231), хумане ћелије карцинома колона (HCT-116) и хумане епителне ћелије карцинома плућа (A549). Цитотоксични ефекти наведених комплекса су дозно-зависни, односно уочено је да са смањењем концентрације свих испитиваних једињења долази до значајног раста вијабилности туморских ћелија. Испитивана једињења показују умерену и високу цитотоксичност на испитиване туморске ћелије (Слика 34). IC₅₀ вредности тестираних једињења добијених МТТ тестом, након излагања током 72 сата дате су у Табели 24.

Табела 24. IC₅₀ вредности тестираних једињења добијених МТТ тестом, након излагања током 72 сата

Комплекси/Ћелијске линије	MDA-MB-231	HCT-116	A549
IC₅₀ ± стандардна девијација (µM)			
Л1	41,64±2,67	25,11±1,38	29,37±1,51
Л2	42,69±2,03	20,08±0,94	28,46±1,74
Л3	72,19±2,94	22,16±1,17	29,17±1,39
Л4	28,78±1,98	20,57±1,15	28,16±1,45
К1	24,59±1,45	16,16±1,04	28,85±1,82
К2	26,83±1,71	14,11±0,86	25,44±1,56
К3	23,19±1,59	17,44±1,05	18,65±1,17
К4	22,27±1,61	12,71±0,88	12,89±0,93
cisPt	43,53±2,28	22,32±1,74	23,81±1,42



Слика 34. *In vitro* цитотоксичност новосинтетисаних лиганада на хумане ћелије карцинома дојке (MDA-MB-231), колоректалног карцинома колона (HCT-116) и епителујалне ћелије карцинома плућа (A549)

5. ДИСКУСИЈА

Бакар, као биогени елемент, посебно привлачи пажњу научника, те се годинама испитује терапијска улога његових комплекса, најчешће као бакар(II)-јона. Неки комплекси налазе се и у фази клиничких испитивања, али пошто ниједан није одобрен за хуману употребу, континуирано се ради на синтези нових комплекса са побољшаним фармаколошким карактеристикама у односу на постојећу терапију. Њихова улога нарочито је значајна у терапији тумора.

Разлог за координовање бакра(II) са лигандима који су деривати тиосалицилне киселине јесте што она садржи донорске атоме кисеоника и сумпора са којима се бакар(II)-јон добро координује, али и због терапијског дејства који је показао дериват тиосалицилне киселине, ФТС. Узимајући у обзир да ФТС представља једини *Ras* инхибитор који се нашао у другој фази клиничких испитивања, постојала је добра претпоставка да ће лиганди сличног типа градећи комплексе са багром дати једињења са добром активношћу [147].

5.1. Синтеза и карактеризација S,O-тетраденатних лиганада, деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса бакра(II)

Први циљ овог рада била је синтеза S,O-тетраденатних лиганада који су деривати тиосалицилне киселине и који у својој структури садрже етиленски, пропиленски, бутиленски, односно пентилениски мост као и синтеза одговарајућих комплекса бакра(II) са поменутиим лигандима. Како би се утврдила процентуална заступљеност угљеника, водоника и сумпора новосинтетисаних једињења, спроведена је микроанализа. Добијени експериментални резултати су у складу са теоријским прорачунима, што указује да је састав угљеника, водоника и сумпора тачан за све испитиване лиганде и награђене комплексе. Овом методом није се могла претпоставити структура синтетисаних једињења, па је у циљу њихове детаљније анализе спроведено снимање инфрацрвених и нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра.

Инфрацрвени спектри су искоришћени за одређивање типа координовања комплекса формираних између бакар(II)-јона и синтетисаних лиганада. Геометрија комплекса бакра(II) може се само претпоставити на основу резултата инфрацрвених спектра. На основу претходно публикованих резултата са сличним лигандима, претпостављено је да се координовање десило преко два атома сумпора из тиоетарских група [6,115] и преко два атома кисеоника из две карбоксилне групе [148]. Критеријум који је коришћен да би се одредило да ли је карбоксилна група протонувана (апсорпционе траке би требало да буду у рангу $1700-1750\text{ cm}^{-1}$) или депротонувана и координувана за централни јон метала (када су апсорпционе траке у рангу $1600-1700\text{ cm}^{-1}$) биле су асиметричне валенционе вибрације карбоксилне групе [149].

Присуство тиоетарске групе у *o*- положају у односу на карбоксилну групу може бити разлог због кога су асиметричне валенционе вибрације које потичу од карбоксилних група лиганада постављене на нижим таласним дужинама у спектру, него што је очекивано (Табела 10). Исте траке код одговарајућих комплекса налазе се на нижим таласним дужинама, и указују на депротоновање карбоксилне групе и координовање са јоном метала [150].

Одступање од теоријских вредности [151] последица је конјугације карбоксилне групе са ароматичним прстеном. Апсорпционе траке тиоетарске -S-R групе ($651-653 \text{ cm}^{-1}$) код слободних лиганада померене су ка вишим таласним дужинама након координовања ($656-659 \text{ cm}^{-1}$), што говори у прилог координовању преко атома сумпора из тиоетарских група лиганада [152].

За детаљнију анализу синтетисаних лиганада снимљени су ^1H и ^{13}C НМР спектри. На основу познатих хемијских померања присутних у спектрима тиосалицилне киселине, али и спектрима лиганада сличног типа (S-алкил и S-алкенил деривата), може се са већом сигурношћу тврдити да су претпостављене структуре синтетисаних лиганада тачне [5,116,118].

Мултиплицитети сигнала који се јављају у ^1H спектрима, могу се приписати водониковим атомима у ароматичној области и потичу из бензеновог прстена. Хемијска померања нису одступала од литературних вредности за ову врсту сигнала [153]. У зависности од броја метиленских група присутних у мостовима између два молекула тиосалицилне киселине, дошло је до појаве једног (етиленски мост), односно два сигнала (пропиленски-, бутиленски- и пентилениски мост). Ова хемијска померања присутна су на нешто вишим вредностима ppm-а (1,62-3,21 ppm) у односу на вредности које су карактеристичне за ову групу (1,3 ppm). Разлог томе је утицај негативног индуктивног ефекта атома сумпора за који су метиленске групе везане. Наиме, смер кретања валентних електрона сумпора је исти као и смер спољашњег магнетног поља што доводи до ефекта индукције магнетног поља. Интересантно је да као и у спектрима тиосалицилне киселине, недостаје пик у протонском спектру који потиче из карбоксилне групе [154].

Број пикова присутних у ^{13}C спектрима лиганада даје нам податак о броју нееквивалентних угљеникових атома у молекулима (8 за Л1, 9 за Л2 и Л3 и 10 за Л4), што што је у складу са њиховим претпостављеним структурама. Хемијска померања из аромата (Табела 11) у складу су са референтним вредностима за угљеникове атоме из бензеновог прстена (110-170 ppm). На нешто вишим вредностима налазе се пикови који потичу из угљеника карбоксилне групе, који су такође у оквиру референтних вредности. С обзиром да у окружењу метиленских група које потичу из мостова између два молекула тиосалицилне киселине нема присутних незасићења, њихова хемијска померања се такође слажу са подацима из литературе [153].

ЕПР спектри могу бити од велике користи за бољу карактеризацију комплексних једињења која садрже јоне са бар једним неспареним електроном, као што су јони прелазних метала, органски слободни радикали итд. Ова метода представља паралелу НМР спектроскопији која испитује нуклеарни спин молекула. Једноставна примена ЕПР спектроскопије користи бакар(II)-јон, електронске конфигурације $3d^9$, који представља нарочито добар пример јона метала са могућношћу грађења комплекса различите геометрије (тетра-, пента- и хекса-координовани). Геометрија комплекса утиче на електронске особине бакар(II)-јона, на редослед енергетских нивоа d орбитала, као и на енергију основног стања за одговарајућу геометрију комплекса [154].

Добијени ЕПР спектри показују да нема карактеристичног хиперфиног цепања услед нуклеарног спина бакра и да комплекси не поседују аксијалну симетрију. Ово може бити последица координовања бакра за два атома сумпора који се налазе у структури награђених комплекса. Наиме, показано је да природа лиганада са којима се врши координовање бакар(II)-јона има утицаја на магнитуду константе хиперфиног цепања, $A_{||}$, као и на вредност $g_{||}$ [155]. Штавише, показано је да лиганди који садрже

сумпор као донорски атом суштински смањују g_{\parallel} вредност у поређењу са лигандима са азотом и кисеоником као донорским атомима. За аксијалне симетричне комплексе типа CuS_4 карактеристичне су g_{\parallel} вредности у рангу 2,06 – 2,10 [156]. Овакви спектри указују на вероватну октаедарску структуру награђених комплекса.

5.2. Супституционе реакције комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине са L-метионином, L-цистеином и 5'GMP

Добро је познато да је интеракција комплекса неких прелазних метала, нарочито комплекса платине(II), са молекулом ДНК кључан фактор за испољавање њихове антитуморске активности. Интеракција комплекса платине(II) са молекулом ДНК одвија се углавном преко азота у позицији N7 гуанина, док је много ређе везивање преко N7 аденина, односно N1 и N3 цитозина. Са друге стране, нежељена дејства која се јављају услед примене ове групе лекова последица су интеракције са биомолекулима који садрже атом сумпора [157-160]. Узимајући све наведено у обзир, од великог је значаја испитивање интеракција комплекса метала који се примењују у терапији са биомолекулима који садрже азот и сумпор као хетероатоме. Циљ је побољшање безбедносног профила постојећих платинских антитуморских лекова и развијање нових деривата који показују боље терапијске карактеристике. У овом раду испитивана је интеракција комплекса бакра(II) са лигандима који садрже сумпор (*L*-метионин и *L*-цистеин) и азот (*5'*-GMP). На основу добијених резултата, може се закључити да је ред реактивности испитиваних комплекса следећи: **K1 > K2 > K3 > K4**. То указује да комплекс **K1** који садржи две метиленске групе у бочном низу инертног лиганда показује највећу реактивност, док је најмање реактиван комплекс **K4** који садржи пет метиленских група. На основу овога можемо закључити да увођење додатних метиленских група у бочни ланац инертног лиганда (у овом случају комплекса бакра(II)) изазива стерне сметње, што успорава реакције супституције. Осим тога, поређењем вредности константе другог реда за оба корака супституције, k_1 и k_2 , може се уочити да је други корак супституције спорији од првог код свих испитиваних комплекса. Такође, добијени резултати показују да је реактивност испитиваних лиганда иста за све комплексе бакра(II) и прати следећи редослед: *L*-Met > *L*-Cys > *5'*-GMP. Лиганди који садрже сумпор, попут *L*-Met и *L*-Cys су много бољи нуклеофили од *5'*-GMP који представља *N*-донорски лиганд. Такође, на основу добијених вредности може се закључити и да су тиоетри (*L*-Met) нешто реактивнији у поређењу са тиолима (*L*-Cys). Оваква реактивност може се објаснити присуством метил групе на атому сумпора *L*-Met која повећава његову нуклеофилност услед присутног позитивног индуктивног ефекта. Ниске вредности за промену енталпије активирања, ΔH^\ddagger , као и негативне вредности за промену ентропије активирања, ΔS^\ddagger иду у прилог асоцијативном механизму за реакције супституције, што је у складу са раније објављеним резултатима за неке комплексе бакра(II) [161,162].

5.3. Интеракције комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине са молекулом ДНК и хуманим серумским албумином

Узимајући у обзир да је ДНК молекул мета великог броја антитуморских лекова који се заснивају на комплексима метала, од великог је значаја одређивање јачине њихове интеракције. Једна од најзначајнијих метода је електронска апсорпциона спектроскопија. Афинитет везивања комплекса **K1-K4** за СТ-ДНК испитиван је применом апсорпционе спектроскопске анализе, праћењем спектралних промена комплекса по додатку ДНК. Додатком ДНК у раствор свих испитиваних комплекса настају сличне спектралне промене у апсорпционом спектру комплекса, јавља се значајни хиперхромни ефекат са појавом нове траке на 250 nm. Хиперхромизам са појавом новог сигнала у *Uv-Vis* спектру сугерише на снажно везивање свих испитиваних комплекса, **K1-K4**, за молекул ДНК [162-164]. На основу добијене вредности константе K_b примећује се снажна интеракцију свих испитиваних комплекса Cu(II) са СТ-ДНК. Ред реактивности комплекса је следећи: **K1 < K2 < K3 < K4**, што значи да најбољу интеракцију са СТ-ДНК остварује комплекс **K4**. Комплекс **K4** показује и бољу интеракцију са СТ-ДНК у поређењу са класичним интеркалатором (Табела 19), етидијум бромидом, чија је вредност $K_b = (1,23 \pm 0,07) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ [165].

Како би се додатно потврдила интеракција синтетисаних комплекса са ДНК молекулом, спроведена је и флуоресцентна емисиона спектроскопија са етидијум бромидом. Етидијум бромид је класичан интеркалатор који показује значајну емисиону флуоресценцију када се интеркалира између базних парова у молекулу ДНК. Међутим, у присуству неких једињења (комплекса **K1-K4**) који могу да интерагују са молекулом ДНК и замене етидијум бромид, јавља се смањење сигнала. Добијени резултати показују интеракцију комплекса са молекулом ДНК, чиме потврђују да могу да замене интеркалирани етидијум бромид [166]. Високе вредности константи гашења указују на то да сви испитивани комплекси бакра(II) имају велики афинитет да истисну ЕБ и да се снажно вежу за ДНК. Из вредности константи гашења K_{sv} комплекса (Табела 20) закључује се да највећи афинитет за ДНК молекул има комплекс **K4**, што је у складу и са резултатима апсорпционе спектроскопије. Поређењем добијених вредности Стерн-Волмерове константе са већ публикованим резултатима за комплексе бакра(II) са S-алкил и S-арил дериватима тиосалицилне киселине [162], запажају се сличне вредности константе везивања ($10^4 \cdot \text{M}^{-1}$). Неки комплекси бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине показују вредности K_{sv} око $10^5 \cdot \text{M}^{-1}$ [119], што значи да поседују бољи афинитет везивања за ДНК молекул од испитиваних једињења. Избор инертног лиганда у унутрашњој сфери комплекса може утицати на снагу интеракције комплекса и ДНК молекула, што доприноси проналаску лека са бољом антитуморском активношћу.

Познато је да серумски албумини могу да вежу и транспортују велики број супстанци, попут аминокиселина, стероида, јона метала, као и друге фармацеутске молекуле путем крвне плазме до одговарајућих ткива. Стога је неопходно испитати интеракцију између серумских албумина и комплекса прелазних метала као биолошки активних једињења. Иако сви испитивани комплекси бакра(II) поседују способност снажног везивања за хумани серумски албумин, највећи афинитет има комплекс **K4**. Такође, на основу добијених n вредности (Табела 21), може се закључити да на албумину постоји једно место за везивање испитиваних комплекса [167].

5.4. Молекулски докинг комплекса бакра(II) са S,O-тетрадентатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине са молекулом ДНК и хуманим серумским албумином

Додатна потврда интеракције комплекса са ДНК молекулом спроведена је *in silico*, молекулским докингом. Симулацијом молекулског уклапања, може се предвидети највероватнија конформација и интеракције малих молекула са макромолекулима, тј. у овом случају комплекса метала са биомолекулима. Применом симулације молекулског уклапања могуће је предвидети интеракцију између комплекса бакра(II) (комплекс **K1-K4**) са молекулом ДНК и ХСА. Најбоља конформација испитиваних комплекса са најнижим вредностима слободне енергије везивања издвојена је како би се утврдила највероватнија просторна оријентација једињења унутар двоструког хеликса ДНК молекула и на везујућим местима хуманог серумског албумина. Резултати су представљени тако да се негативније вредности односе на већи афинитет комплекса према испитиваним макромолекулима.

Резултати докинга указују на то да сви комплекси показују сличну могућност уклапања са оба ДНК фрагмента, односно имају способност да интерагују или са малим жлебом или интеркалацијом. Интеркалацију омогућавају фенил групе комплекса. Бољу флексибилност фенил група омогућава дужи алифатични остатак, чиме се постиже потпунија интеркалација и добијају се ниже вредности енергије везивања. Ипак, у случају интеракције са малим жлебом, дужина алифатичног низа нема пресудни утицај на интеракцију и резултати докинга су врло слични за све испитиване комплексе. Управо због тога је комплекс **K4** показао најниже вредности енергије везивања према ДНК фрагментима. Уопштено гледајући, резултати докинга у складу су са експерименталним резултатима апсорпционих спектроскопских испитивања за интеракцију са ДНК молекулом, и за испитиване комплексе прате следећи редослед: **K1 < K2 < K3 < K4**. Утицај алифатичног низа огледа се и у интеракцији са малим жлебом. Комплекс **K1** поседује најкраћи низ, етиленски, алифатични ланац и услед смањене флексибилности може да се оријентише само на један начин где је метални центар далеко од ДНК молекула. Погодна конформација испитиваних комплекса у интеракцији са молекулом ДНК повећава могућност формирања великог броја водоничних веза које свеукупно додатно стабилизују систем који чине испитивани комплекс и ДНК молекул.

Al-asbahu и сарадници спровели су анализу молекулског уклапања бакар(II) комплекса са N,O-бидентатним лигандима, дериватима салицилалдехида у структуру Б-ДНК која је коришћена и у овој дисертацији [168]. Резултати ове истраживачке групе показују да испитивани бакар(II) комплекси остварују углавном електростатичке интеракције при молекулском уклапању у структуру ДНК молекула. Слично комплексима испитиваним у овој дисертацији ароматичне групе лиганата остварују нековалентне π - π стекинг интеракције са π електронима базних парова ДНК остварујући притом хидрофобне интеракције које додатно стабилизују адукт комплекс-ДНК молекул. *Kathiresan* и сарадници приказали су молекулско уклапање бакар(II) комплекса са S,N,O- тридентатним фенолатним лигандом у структуру ДНК молекула коришћењем софтвера *AutoDock Tools* [169]. Резултати ове студије показују да поменути комплекс пре свега ступа у интеракцију са функционалним групама ДНК молекула, пру чему не доводи до прекида двоструког хеликса ДНК. Са друге стране, *Kamran* и сарадници представили су молекулско уклапање два бинуклерана комплекса бакра(II) са N,O-лигандима у структуру молекула ДНК [170]. Слично нашим комплексима, испитивана

једињења интерагују или са малим жлебом или интеракалцијом, остварујући пет односно три водоничне интеракције са пурињским базама аденином и гуанином.

Хумани серумски албумин представља негликолизирани полипептидни ланац, чија је терцијарна структура облика срца, сачињена од 8 алфа хеликса. У оквиру ове структуре издвајају се три домена (I, II, III), а у оквиру сваког од њих по два субдомена (A, B). Два главна везујућа места, која су локализована на субдоменима IIА и IIIА, у литератури су означена као Судлова места I и II. Резултати студије *Tabassum*-а и сарадника указују да се новосинтетисани комплекс бакра везује у оквиру хидрофобне шупљине субдомена IIА и налази се у непосредној близини хидрофобних остатака аминокиселина Lys-195, Trp-214, Ala-215, Arg-218, Leu-219, Val-216, Ala-291 и Glu-292. Осим хидрофобних интеракција формиран систем је додатно стабилизован водоничним везама и slabим електростатичким интеракцијама [171].

Анализом резултата молекулског докинга група аутора је утврдила место везивања комплекса бакра који садржи цефтобипрол и фенантролин као лиганде за хумани серумски албумин. Најстабилнија конформација остварује везе са аминокиселинама у оквиру субдомена IIIА (Судлово место II). Аминокиселинске секвенце од значаја за формирање ових интеракција су Val-493, Asp-494, Glu-495, Thr-496, Tyr-497, Val-498, Pro-499, Lys-500, Leu-532, Val-533, Lys-534, Lys-536, Pro-537 и Lys-538. Поред споменутих аминокиселина које формирају хидрофобни цеп, уочена је и једна водонична веза између водоника у оквиру комплекса бакра и аминокиселине Glu495 у оквиру хуманог серумског албумина [172].

На основу добијених резултата докинга у овој докторској дисертацији, који показују да се електростатичке и водоничне интеракције граде са аминокиселинама које припадају субдомени II, изводи се закључак да се везивање за ХСА дешава у овом субдомени (I место) што је у складу са резултатима експерименталних испитивања. Наиме, показано је да са повећањем количине комплекса долази до гашења флуоресценције ХСА услед интеракције комплекса са остатком аминокиселине триптофан (Trp-214). Овакви резултати су у складу са другим испитивањима који се односе на интеракције комплекса бакра са ХСА [168]. Афинитет испитиваних комплекса према ХСА прати следећи редослед: $K1 < K2 < K3 < K4$, и ови резултати у складу су са експерименталним вредностима везивања за албумин.

5.5. *In vitro* антитуморска активност комплекса бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине

Бионеорганска хемија и синтеза комплексних једињења у терапијске сврхе добила је на значају открићем антитуморске активности *цисплатине* [173]. Нежељена дејства која се јављају као последица њене примене, урођена и стечена резистенција туморских ћелија на лек представљали су основ за синтезу нових хемиотерапеутика са бољом ефикасношћу и токсиколошким профилем [174]. Међу прелазним металима који су коришћени за синтезу издвојио се бакар као биогени елемент. Успешна терапија комплекса бакра подразумева да се у обзир узму, како хемијске карактеристике јона бакра(II), тако и карактеристике донорских атома лиганата. На тај начин утиче се на однос липофилности и хидрофилности награђеног комплекса, пролазак кроз фосфолипидни двослој, растворљивост у екстрацелуларној течности, модификују се тврде, односно меке особине метала и утиче се на реакције са комплексима других

метала, односно комплексирање јона бакра(II) са ендогеним лигандима. Карактеристике јона бакра(II) јесу да најчешће гради комплексе са координационим бројем 4-6, координовање са великим бројем лиганата који као донорске атоме садрже азот, сумпор, кисеоник и фосфор, и комплексе различите геометрије. То свеобухватно омогућава велики избор лиганата приликом синтезе [37,62,68].

У раду *Singh NK* [175] и сарадника испитивана је антитуморска активност комплекса бакра(II) са тиосемикарбазонима. Комплекси бакра(II) са *N*-алкилованим изатин тиосемикарбазонима у својој структури поред донорских атома азота садрже сумпор и кисеоник. Њихова цитотоксичност испитивана је на већем броју ћелијских линија, међу којима се налази и ћелијска линија A549. IC₅₀ вредност износила је 82,56 μM , што је у поређењу са резултатима истраживања спроведених у овој дисертацији вишеструко већа вредност. Примећено је и да бољу антитуморску активност показује комплекс који има волуминознију групу (бензил остатак), док се она значајно смањује код *N*-алкил и *N*-арил деривата. У овој докторској дисертацији су једињења са дужим алифатичним бочним остатком такође показала да поседују бољу цитотоксичност у односу на лиганде и комплексе који садрже краћи низ.

Casiopéinas[®] су комплекси бакра(II) са различитим хелатним лигандима (бипиридин или фенантолин са глицином или ацетилацетонатом као секундарним лигандима) који као донорске атоме садрже азот и кисеоник [176]. Иако још увек нису у потпуности разјашњени механизми којим ови комплекси делују цитотоксично, познато је да доводе до дисфункције митохондрија и оксидативног оштећења, да се интеркалирају између базних парова у молекулу ДНК, да доводе до оштећења ДНК и хидролизе фосфата [45,177,178]. Ови комплекси показали су цитотоксичност на више туморских ћелијских линија у *in vitro* и *in vivo* истраживањима. Такође, показују ниску токсичност према здравим хуманим ћелијама, због чега се интензивно истражују. Један од њих је и комплекс који у структури садржи диметилувани фенантролин и глицин као лиганде (*Casiopéina Hgly* или *Cas Hgly*) [179] у дози од 5 $\mu\text{mol/l}$ индуковао је елиминацију интрацелуларног глутатиона код 75% хуманих ћелија карцинома плућа (A549) уз дозно-зависни одговор. Овај комплекс доводи до настанка глутатион дисулфида што је његова неактивна форма, при чему се смањује способност неутрализације слободних радикала у туморским ћелијама и повећава цитотоксичност цитостатика [180,181]. Исти комплекс на ћелијама неуробластома учествује у процесима ћелијске апоптозе и аутофагије [182,183]. Његова цитотоксичност је откривена је и на хуманим ћелијама карцинома дојке (MDA-MB-231), при чему је IC₅₀ вредност износила 1,55 μM , а доказано је и да утиче на метаболизам угљених хидрата и нуклеотида и да показује брже дејство у поређењу са референтном *цисплатином* [184]. *Casiopéina III-ia* (комплекс са дисупституисаним бипиридином и ацетилацетонатом као помоћним лигандом) и *Casiopéina Hgly* испитују се клинички у терапији колоректалног карцинома колоне и леукемије [45].

Цитотоксичност комплекса према ћелијској линији карцинома колоне НСТ-116 доказана је и на једињењима сличног типа, бинуклеарним комплексима бакра који су *S*-алкил и *S*-алкенил деривати тиосалицилне киселине (види увод) и садрже донорске атоме кисеоника [117,118]. Комплекси *S*-алкил типа индукују дозно-зависну цитотоксичност која је врло слична оној коју показује *цисплатина*, док је код комплекса са лигандима *S*-алкенил типа цитотоксичност слична *цисплатини* тек при високим концентрацијама (250-1000 $\mu\text{mol/l}$) [185].

Антитуморска активност комплекса бакра(II) код којих је бакар координован за атоме сумпора и кисеоника [186], како је претпостављено и у овој дисертацији, са

дериватима *N*-бензоилтиоуреа испитивани су на мишијим линијама аденокарцинома дојке [187]. Комплекс који у *p*-положају садржи нитро групу има бољу цитотоксичност у односу на несупституисани и комплекс са хлором у *o*-положају 48 сати након излагања ћелија комплексима. Аутори сматрају да се његова цитотоксичност јавља као последица стварања нитрофенил анјон радикала и супероксид анјон радикала који настају под утицајем ензима NADPH цитохром P₄₅₀ редуктазе. Цитотоксичност у високом проценту повећава грађење комплекса са лигандима који су деривати ацилтиоуреа у поређењу са тестираним лигандима.

У овој дисертацији синтетисани лиганди и комплекси бакра(II) тестирани су у циљу испитивања њихове антитуморске активности на хуманим ћелијама колоректалног карцинома колона (HCT-116), плућа (A549) и дојке (MDA-MB-231). Од свих испитиваних једињења, најбољу цитотоксичност према свим ћелијским линијама показао је комплекс **K4**. При концентрацији од 7,8125 μM , наведени комплекс показао је цитотоксичност за више од 50% MDA-MB-231 и HCT-116 ћелија, док је двоструко већа концентрација (15,625 μM) била неопходна за елиминацију више од 50% A459. Треба нагласити и да је комплекс **K4** индуковао цитотоксичност свих туморских ћелија при најнижим концентрацијама (1,953125 μM и 0,9765625 μM) и при овим концентрацијама, антитуморска активност комплекса **K4** је од три до седам пута већа од активности осталих једињења. Овај комплекс је показао бољу цитотоксичност и у поређењу са стандардом, *цисплатином*. Узимајући у обзир наведене карактеристике испитиваних једињења, као и резултате интеракција са ДНК молекулом, ХСА, молекулског докинга са истим молекулима, може се закључити да комплекс **K4** представља добар кандидат за будућа фармаколошка испитивања у пољу терапије карцинома колона, дојке и плућа.

6. ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата који су приказани у овој Докторској дисертацији, могу се извести следећи закључци:

1. Синтеза и карактеризација S,O-тетраденатних лиганата (Л1-Л4), деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса бакра(II) (К1-К4):

- Микроанализа синтетисаних лиганата и одговарајућих комплекса бакра(II) са наведеним лигандима, потврдила је да су експерименталне вредности у складу са теоријским прорачунима за састав угљеника, водоника и сумпора;
- За утврђивање структуре синтетисаних лиганата и комплекса примењене су инфрацрвена спектроскопија, нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија, електронска парамагнетна резонанција и моларна проводљивост;
- Карактеристичне траке из инфрацрвених спектра комплекса указују на депротоновање карбоксилне групе и координовање преко атома кисеоника и сумпора;
- Резултати моларне проводљивости потврђују да су синтетисани комплекси неелектролити;
- На основу спектра електронске парамагнетне резонанције претпостављена је октаедарска геометрија наглађених комплекса;

2. Кинетичка мерења

- Супституционе реакције комплекса **К1-К4** са *L*-метионином, *L*-цистеином и 5'-*GMP* показују да се супституција одиграва у два узастопна корака. Реакције карактеришу константе другог реда за оба корака супституције;
- Ред реактивности испитиваних комплекса последица је њихове структуре, па најмању реактивност показује комплекс **К4** због стерних сметњи узрокованих структуром;
- Други корак супституције спорији од првог код свих испитиваних комплекса;
- Реактивност испитиваних лиганата иста је за све комплексе бакра(II) и показује да су лиганди који садрже сумпор, попут *L*-метионина и *L*-цистеина, много бољи нуклеофили од 5'-*GMP* који представља N-донорски лиганд;

3. Интеракције молекула са СТ-ДНК и ХСА

- Додатком ДНК у раствор свих испитиваних комплекса јавља се значајни хиперхромни ефекат са појавом нове траке на 250 nm;
- Вредности константе K_b указују на снажно везивање свих испитиваних комплекса са СТ-ДНК. Најбољу интеракцију са СТ-ДНК остварује комплекс **К4**;
- Додатак раствора комплекса у раствор етидијум бромид-ДНК изазива значајно смањење интензитета флуоресценције, чиме се потврђује интеракција комплекса са молекулом ДНК. Томе у прилог говоре и вредности Стерн-Волмерове константе гашења;
- Комплекс **К4** показује и најбољу способност везивања за ХСА. На основу добијених резултата, може се закључити да на албумину постоји једно место за везивање испитиваних комплекса;

4. Молекулски докинг

- Сви комплекси показују веома сличне вредности слободне енергије везивања према оба фрагмента ДНК, што указује на могућност интеракције са малим жлебом или интеркалацијом. Интеркалацију омогућавају присутне фенил групе, при чему бољу флексибилност фенил група омогућавају дужи алифатични низови између група, који се налази у структури комплекса **K4**;
- Најбоље резултате показао је комплекс **K4**, што се слаже и са резултатима апсорпционе спектроскопске анализе и емисионе флуоресценције за интеракције са молекулом ДНК;
- Резултати компјутерског уклапања показали су да се везивање са ХСА дешава у субдомену ПА (место I), што је у складу са експерименталним резултатима емисионе флуоресцентне спектроскопије;

5. *In vitro* антитуморска активност

- Резултати МТТ теста показују да су сва испитивана једињења цитотоксична за хумане ћелије карцинома дојке (MDA-MB-231), хумане ћелије карцинома колоне (HCT-116) и хумане епителне ћелије карцинома плућа (A549);
- Цитотоксични ефекти наведених комплекса су дозно-зависни, односно уочено је да са смањењем концентрације свих испитиваних једињења долази до значајног раста вијабилности туморских ћелија. Испитивана једињења показују умерену и високу цитотоксичност на испитиване туморске ћелије;0
- Од свих испитиваних једињења, најбољу цитотоксичност показао је комплекс **K4** на свим испитиваним туморским линијама.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Vlassopoulos D, Wood SA, Mucci A. Gold speciation in natural waters: II. The importance of organic complexing-Experiments with some simple model ligands. *Geochim Cosmochim Acta*. 1990; 54(6): 1575-86.
2. Rowland CE, Cantos PM, Toby BH, Frisch M, Deschamps JR, Cahill CL. Controlling disulfide bond formation and crystal growth from 2-mercaptobenzoic acid. *Cryst Growth Des*. 2011;11(4):1370–4.
3. Fuks L, Gniazdowska E, Koźmiński P. Tricarbonylrhenium(I) complexes with anionic ligands containing S and O donor atoms – potential radiopharmaceutical precursors. *Polyhedron*. 2010;29(1):634–8.
4. Nomiya K, Yokoyama H, Nagano H, Oda M, Sakuma S. Synthesis and characterization of trisodium salt of bis(thiosalicylato)aurate(I). *J. Inorg. Biochem*. 1995; 297(1):289–97.
5. Wehr-candler T, Henderson W. Coordination chemistry of the thiosalicylate ligand. *Coord Chem Rev*. 2016;313:111–55.
6. Liu D, Chen M, Fang D, Jia AQ, Zhang QF. Synthesis and crystal structures of diaryl thioethers and aryl benzyl thioethers derived from thiosalicylic acid. *J Chem Crystallogr*. 2018;102(1–2):2026–34.
7. Geier DA, Sykes LK, Geier MR. A review of Thimerosal (Merthiolate) and its ethylmercury breakdown product: specific historical considerations regarding safety and effectiveness. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2007;10(8):575-96.
8. Dórea JG. Low-dose Thimerosal (ethyl-mercury) is still used in infants` vaccines: Should we be concerned with this form of exposure? *J Trace Elem Med Biol*. 2018;49:134-139.
9. Dórea JG, Farina M, Rocha JB. Toxicity of ethylmercury (and Thimerosal): a comparison with methylmercury. *J Appl Toxicol*. 2013;33(8):700-11.
10. WHO (<https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/vaccines-quality/thiomersal>)
11. Zhang X, Lu J, Huang Y, Zhao W, Chen Y, Li J, Gao X, Venkataramanan R, Sun M, Stolz DB, Zhang L, Li S. PEG-farnesylthiosalicylate conjugate as a nanomicellar carrier for delivery of paclitaxel. *Bioconjug Chem*. 2013;24(3):464-72.
12. Bahadur Gurung A, Bhattacharjee A. Significance of Ras Signaling in Cancer and Strategies for its Control. *Oncology & Hematology Review* 2015;11(2):147–52.
13. Zhang X, Huang Y, Zhao W, Chen Y, Zhang P, Li J, et al. PEG-Farnesyl thiosalicylic acid telodendrimer micelles as an improved formulation for targeted delivery of paclitaxel. *Mol Pharm*. 2014;11(8):2807–14.
14. Molina JR, Adjei AA. The Ras/Raf/MAPK pathway. *J Thorac Oncol*. 2006;1(1):7-9.
15. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3291-310.
16. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989;49(17):4682-9.
17. Gimple RC, Wang X. RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry. *Front Oncol*. 2019;9:965.
18. Furuse J, Kurata T, Okano N, Fujisaka Y, Naruge D, Shimizu T, Kitamura H, Iwasa T, Nagashima F, Nakagawa K. An early clinical trial of Salirasib, an oral RAS inhibitor, in Japanese patients with relapsed/refractory solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018;82(3):511-519.
19. Badar T, Cortes JE, Ravandi F, O'Brien S, Verstovsek S, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Borthakur G. Phase I study of S-trans, trans-farnesylthiosalicylic acid (Salirasib), a

- novel oral RAS inhibitor in patients with refractory hematologic malignancies. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15(7):433-438.e2.
20. Jaggi AS, Singh N. Analgesic potential of intrathecal farnesyl thiosalicylic acid and GW 5074 in vincristine-induced neuropathic pain in rats. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(5):1295-301.
 21. Jaggi AS, Singh N. Intrathecal delivery of farnesyl thiosalicylic acid and GW 5074 attenuates hyperalgesia and allodynia in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Neurol Sci*. 2013;34(3):297-304.
 22. Kafri M, Kloog Y, Korczyn AD, Ferdman-Aronovich R, Drory V, Katzav A, Wirguin I, Chapman J. Inhibition of Ras attenuates the course of experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol*. 2005;168(1-2):46-55.
 23. Koseoglu MM, Ozdilek BA, Djakbarova U, Gulusur A. Targeting Ras activity prevented amyloid beta-induced aberrant neuronal cell cycle re-entry and death. *Curr Alzheimer Res*. 2016;13(11):1267–1276.
 24. Kloog Y, Cox AD, Sinensky M. Concepts in Ras-directed therapy. *Expert Opin Investig Drugs*. 1999;8(12):2121–2140.
 25. Wang Y, Chen T, Yuan Z, et al. Ras inhibitor S-trans, trans-farnesylthiosalicylic acid enhances spatial memory and hippocampal long-term potentiation via up-regulation of NMDA receptor. *Neuropharmacology*. 2018;139:257–267.
 26. Wang X, Wang Y, Zhu Y, Yan L, Zhao L. Neuroprotective effect of S-trans, trans-farnesylthiosalicylic acid via inhibition of RAS/ERK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13:4053–63.
 27. Rodrigues Goulart H, Kimura EA, Peres VJ, Couto AS, Aquino Duarte FA, Katzin AM. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(7):2502-9.
 28. 1. Porta EOJ, Bofill Verdager I, Perez C, Banchio C, Ferreira De Azevedo M, Katzin AM, et al. Repositioning Salirasib as a new antimalarial agent. *Medchemcomm*. 2019;10(9):1599–605.
 29. Wu JJ, Yuan XM, Huang C, An GY, Liao ZL, Liu GA, Chen RX. Farnesyl thiosalicylic acid prevents iNOS induction triggered by lipopolysaccharide via suppression of iNOS mRNA transcription in murine macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2019;68:218-225.
 30. Barceloux DG. Copper. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1999;37(2):217-30.
 31. Scheiber I, Dringen R, Mercer JF. Copper: effects of deficiency and overload. *Met Ions Life Sci*. 2013;13:359-87.
 32. Pierson H, Yang H, Lutsenko S. Copper Transport and Disease: What Can We Learn from Organoids? *Annu Rev Nutr*. 2019;39(1):75–94.
 33. Kaplan JH, Maryon EB. How Mammalian Cells Acquire Copper: An Essential but Potentially Toxic Metal. *Biophys J*. 2016;110(1):7–13.
 34. Turnlund JR. Human whole-body copper metabolism. *Am J Clin Nutr*. 1998;67(5):960–4.
 35. Collins JF. Copper nutrition and biochemistry and human (patho)physiology. *Adv Food Nutr Res*. 2021;96:311-364.
 36. Bost M, Houdart S, Oberli M, Kalonji E, Huneau JF, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J Trace Elem Med Biol*. 2016;35:107-15.
 37. Marzano C, Pellei M, Tisato F, Santini C. Copper Complexes as Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med Chem*. 2009;9(2):185–211.

38. Espinoza A, Le Blanc S, Olivares M, Pizarro F, Ruz M, Arredondo M. Iron, copper, and zinc transport: Inhibition of divalent metal transporter 1 (DMT1) and human copper transporter 1 (hCTR1) by shRNA. *Biol Trace Elem Res.* 2012;146(2):281–6.
39. Lelièvre P, Sancey L, Coll JL, Deniaud A, Busser B. The multifaceted roles of copper in cancer: a trace metal element with dysregulated metabolism, but also a target or a bullet for therapy. *Cancers (Basel).* 2020;12(12):3594.
40. de Romaña DL, Olivares M, Uauy R, Araya M. Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 2011.
41. Osredkar J. Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *J Clin Toxicol.* 2011; S3:001.
42. Prohaska JR. Role of copper transporters in copper homeostasis. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(3):826S–9S.
43. Öhrvik H, Thiele DJ. How Copper Traverses Cellular Membranes Through the Mammalian Copper Transporter 1, Ctr1. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1314:32–41.
44. Rouzer CA. Metals and DNA repair. *Chemical Research in Toxicology.* 2010;23(3):1517–1518.
45. Krasnovskaya O, Naumov A, Guk D, et al. Copper Coordination Compounds as Biologically Active Agents. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):3965.
46. Brewer GJ. Copper in medicine. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2003;7(2):207–212.
47. Gitlin JD. Wilson Disease. *Gastroenterology.* 2003;125(6):1868–1877.
48. Hasan NM, Lutsenko S. Regulation of copper transporters in human cells. *Curr Top Membr.* 2012;69:137-161.
49. Lee J, Petris MJ, Thiele DJ. Characterization of mouse embryonic cells deficient in the ctr1 high affinity copper transporter. Identification of a Ctr1-independent copper transport system. *J Biol Chem.* 2002;277(43):40253-9.
50. Llanos RM, Mercer JF. The molecular basis of copper homeostasis copper-related disorders. *DNA Cell Biol.* 2002;21(4):259-70.
51. Vairo FPE, Chwal BC, Perini S, Ferreira MAP, de Freitas Lopes AC, Saute JAM. A systematic review and evidence-based guideline for diagnosis and treatment of Menkes disease. *Mol Genet Metab.* 2019;126(1):6-13.
52. Milanino R, Conforti A, Franco L, Marrella M, Velo G. Copper and inflammation--a possible rationale for the pharmacological manipulation of inflammatory disorders. *Agents Actions.* 1985;16(6):504-13.
53. Jiang L, Song D, Chen H, Zhang A, Wang H, Cheng Z. Pilot Study of ⁶⁴CuCl₂ for PET Imaging of Inflammation. *Molecules.* 2018;23(2):502.
54. Sarkar J, Das S, Aich S, Bhattacharyya P, Acharya K. Antiviral potential of nanoparticles for the treatment of Coronavirus infections. *J Trace Elem Med Biol.* 2022;72:126977.
55. Andreou A, Trantza S, Filippou D, Sipsas N, Tsiodras S. COVID-19: The Potential Role of Copper and N-acetylcysteine (NAC) in a Combination of Candidate Antiviral Treatments Against SARS-CoV-2. *In Vivo.* 2020;34(3):1567-88.
56. Arredondo M, Mendiburo M, Flores S, Singleton S, Garrick M. Mouse divalent metal transporter 1 is a copper transporter in HEK293 cells. *Biometals.* 2014;27:115–123.
57. Barritt JD, Viles JH. Truncated amyloid-β(11-40/42) from Alzheimer disease binds Cu²⁺ with a femtomolar affinity and influences fiber assembly. *J. Biol. Chem.* 2015;290:27791–802.
58. Drew SC. The Case for Abandoning Therapeutic Chelation of Copper Ions in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2017;11:317.

59. Sarell CJ, Wilkinson SR, Viles JH. Substoichiometric levels of Cu²⁺ ions accelerate the kinetics of fiber formation and promote cell toxicity of amyloid- β from Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2010;285(53):41533-40.
60. Conry R. *Copper: Inorganic & Coordination Chemistry*. 2006.
61. Crichton R. *Biological Inorganic Chemistry: A New Introduction to Molecular Structure and Function*. 2nd ed. Oxford: Elsevier; 2012.
62. Tisato F, Marzano C, Porchia M, Pellei M, Santini C. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med Res Rev*. 2010;30(4):708-49.
63. Murphy B, Hathaway B. The stereochemistry of the copper(II) ion in the solid-state – Some recent perspectives linking the Jahn-Teller effect, vibronic coupling, structure correlation analysis, structural pathways and comparative X-ray crystallography. *Coord Chem Rev*. 2003;243:237–62.
64. Melník M, Kabešová M, Koman M, Macáškova L, Garaj J, Holloway CE, et al. Copper(II) coordination compounds: classification and analysis of crystallographic and structural data iii. Dimeric compounds. *J Coord Chem*. 1998;45(1–4):147–359.
65. Crichton RR. Copper – Coping with Dioxygen. *Biol Inorg Chem*. 2012;279–96.
66. Majumder S, Dutta P, Choudhuri SK. The role of copper in development of drug resistance in murine carcinoma. *Med Chem*. 2005;1(6):563-73.
67. Kuo HW, Chen SF, Wu CC, Chen DR, Lee JH. Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biol Trace Elem Res*. 2002;89(1):1-11.
68. Santini C, Pellei M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev*. 2014;114(1):815-62.
69. Yamane Y, Sakai K, Umeda T, Murata N, Ishizeki S, Ogihara I, Takahashi A, Iwasaki I, Ide G. Suppressive effect of cupric acetate on DNA alkylation, DNA synthesis and tumorigenesis in the liver of dimethylnitrosamine-treated rats. *Gan*. 1984;75(12):1062-9.
70. Skrajnowska D, Bobrowska-Korczak B, Tokarz A, Bialek S, Jezierska E, Makowska J. Copper and resveratrol attenuates serum catalase, glutathione peroxidase, and element values in rats with DMBA-induced mammary carcinogenesis. *Biol Trace Elem Res*. 2013;156(1-3):271-278.
71. Ishida S, Andreux P, Poitry-Yamate C, Auwerx J, Hanahan D. Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(48):19507-12.
72. Soncin F, Guitton J-D, Cartwright T, Badet J. Interaction of human angiogenin with copper modulates angiogenin binding to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:604–610.
73. Xie H, Kang YJ. Role of copper in angiogenesis and its medicinal implications. *Curr Med Chem*. 2009;16(10):1304-14.
74. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473(7347):298-307.
75. McAuslan BR, Reilly W. Endothelial cell phagocytosis in response to specific metal ions. *Exp Cell Res* 1980;130:147–157.
76. Cater MA, Pearson HB, Wolynec K, Klaver P, Bilandzic M, Paterson BM, Bush AI, Humbert PO, La Fontaine S, Donnelly PS, Haupt Y. Increasing intracellular bioavailable copper selectively targets prostate cancer cells. *ACS Chem Biol*. 2013;8(7):1621-31.
77. Zhang H, Chen D, Ringler J, Chen W, Cui Q, Ethier S, et al. Zhang H, Chen D, Ringler J, Chen W, Cui QC, Ethier SP, Dou QP, Wu G. Disulfiram treatment facilitates phosphoinositide 3-kinase inhibition in human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Can Res* 70: 3996-4004. *Cancer Res*. 2010;70:3996–4004.

78. Brar SS, Grigg C, Wilson KS, Holder WD Jr, Dreau D, Austin C, Foster M, Ghio AJ, Whorton AR, Stowell GW, Whittall LB, Whittle RR, White DP, Kennedy TP. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner in vitro, in mice and in a patient with metastatic disease. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(9):1049-60.
79. Wehbe M, Malhotra AK, Anantha M, et al. Development of a copper-clioquinol formulation suitable for intravenous use. *Drug Deliv Transl Res.* 2018;8(1):239-251.
80. Qi J, Wang X, Liu T, Kandawa-Schulz M, Wang Y, Zheng X. Synthesis, antiproliferative activity and mechanism of copper(II)-thiosemicarbazone complexes as potential anticancer and antimicrobial agents. *J Coord Chem.* 2020;73(7):1208–21.
81. Jungwirth U, Kowol CR, Keppler BK, Hartinger CG, Berger W, Heffeter P. Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(4):1085-1127.
82. Liao Y, Zhao J, Bulek K, Tang F, Chen X, Cai G, Jia S, Fox PL, Huang E, Pizarro TT, Kalady MF, Jackson MW, Bao S, Sen GC, Stark GR, Chang CJ, Li X. Inflammation mobilizes copper metabolism to promote colon tumorigenesis via an IL-17-STEAP4-XIAP axis. *Nat Commun.* 2020;11(1):900.
83. Chen X, Zhang X, Chen J, Yang Q, Yang L, Xu D, Zhang P, Wang X, Liu J. Hinokitiol copper complex inhibits proteasomal deubiquitination and induces paraptosis-like cell death in human cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2017;815:147-155.
84. Zeeshan M, Murugadas A, Ghaskadbi S, Rajendran RB, Akbarsha MA. ROS dependent copper toxicity in Hydra-biochemical and molecular study. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2016;185-186:1-12.
85. Sangeetha S, Murali M. Non-covalent DNA binding, protein interaction, DNA cleavage and cytotoxicity of [Cu(quamol)Cl]·H₂O. *Int J Biol Macromol.* 2018;107:2501-2511.
86. Denoyer D, Masaldan S, La Fontaine S, Cater MA. Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. *Metallomics.* 2015;7(11):1459-76.
87. Eichhorn GL, Clark P. Interactions of metal ions with polynucleotides and related compounds. v. the unwinding and rewinding of DNA strands under the influence of copper (II) ions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1965;53(3):586-593.
88. Sissoëff I, Grisvard J, Guillé E. Studies on metal ions-DNA interactions: specific behaviour of reiterative DNA sequences. *Prog Biophys Mol Biol.* 1976;31(2):165-99.
89. Tajmir-Riahi HA, Langlais M, Savoie R. A laser Raman spectroscopic study of the interaction of calf-thymus DNA with Cu(II) and Pb(II) ions: metal ion binding and DNA conformational changes. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(2):751–62.
90. Kazakov SA, Hecht SM. Nucleic Acid-Metal Ion Interactions. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry.* 2011.
91. Richard H, Schreiber JP, Daune MP. Interactions of metallic ions with DNA. V. DNA Renaturation Mechanism in the Presence of Cu²⁺. *Biopolymers.* 1973;12:1-10.
92. Shamsi MH, Kraatz H-B. Interactions of Metal Ions with DNA and Some Applications. *J Inorg Organomet Polym Mater.* 2013;23(1):4–23.
93. Rohner M, Medina-Molner A, Spingler B. N,N,O and N,O,N Meridional cis Coordination of Two Guanines to Copper(II) by d(CGCGCG)₂. *Inorg Chem.* 2016;55(12):6130–40.
94. Sagripanti JL, Goering PL, Lamanna A. Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991;110(3):477-85.
95. Bischoff G, Hoffmann S. DNA-binding of drugs used in medicinal therapies. *Curr Med Chem.* 2002;9(3):312-48.

96. Pages BJ, Ang DL, Wright EP, Aldrich-Wright JR. Metal complex interactions with DNA. *Dalton Trans.* 2015;44:3505-26.
97. Rauf S, Gooding JJ, Akhtar K, Ghauri MA, Rahman M, Anwar MA, Khalid AM. Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA interaction. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;37(2):205-17.
98. Selvakumar B, Rajendiran V, Uma Maheswari P, Stoeckli-Evans H, Palaniandavar M. Structures, spectra, and DNA-binding properties of mixed ligand copper(II) complexes of iminodiacetic acid: the novel role of diimine co-ligands on DNA conformation and hydrolytic and oxidative double strand DNA cleavage. *J Inorg Biochem.* 2006;100(3):316-30.
99. Skok Ž, Zidar N, Kikelj D, Ilaš J. Dual Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II and Other Cancer-Related Targets. *J Med Chem.* 2020;63(3):884–904.
100. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol. Cancer* 2015; 14: 48–62.
101. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: The balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019; 20: 175–193.
102. Jayaraju D, Kondapi AK. Anti-cancer copper salicylaldehyde complex inhibits topoisomerase II catalytic activity. *Curr Sci.* 2001;81(7):787–92.
103. Zeglis BM, Divilov V, Lewis JS. Role of metalation in the topoisomerase II α inhibition and antiproliferation activity of a series of α -heterocyclic-N4-substituted thiosemicarbazones and their Cu(II) complexes. *J Med Chem.* 2011;54(7):2391-8.
104. Marzano C, Severin E, Pani B, Guiotto A, Bordin F. DNA damage and cytotoxicity induced in mammalian cells by a tetramethylfuroquinolinone derivative. *Environ Mol Mutagen.* 1997;29(3):256-64.
105. Seng HL, Wang WS, Kong SM, Alan Ong HK, Win YF, Raja Abd Rahman RN, Chikira M, Leong WK, Ahmad M, Khoo AS, Ng CH. Biological and cytoselective anticancer properties of copper(II)-polypyridyl complexes modulated by auxiliary methylated glycine ligand. *Biometals.* 2012;25(5):1061-81.
106. Momose I, Tatsuda D, Ohba S, Masuda T, Ikeda D, Nomoto A. In vivo imaging of proteasome inhibition using a proteasome-sensitive fluorescent reporter. *Cancer Sci.* 2012;103:1730–1736.
107. Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 1994;269:7709–7718.
108. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. *Molecular cell biology.* 5th ed. New York: W.H. Freeman and CO; 2004. pp 66–72.
109. Daniel KG, Gupta P, Harbach RH, Guida WC, Dou QP. Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:1139–1151.
110. Xiao Y, Chen DI, Zhang X, et al. Molecular study on copper-mediated tumor proteasome inhibition and cell death. *Int J Oncol.* 2010;37(1):81-87.
111. Cvek B, Milacic V, Taraba J, Dou QP. Ni(II), Cu(II), and Zn(II) diethyldithiocarbamate complexes show various activities against the proteasome in breast cancer cells. *J Med Chem.* 2008;51:6256–6258.
112. Nair C, Nigam HL. Spectral and magnetic studies on Ni(II), Cu(II), Rh(III), Pd(II), and Pt(II) complexes of thiosalicylic acid. *Indian J Chem.* 1974; 12: 769-70.
113. Bott RC, Healy PC, Sagatys DS. Electrochemical synthesis and structural characterization of the trinuclear copper(I)-copper(II) complex:

- Bis[bis(triphenylphosphine)copper(I)] [bis(thiosalicylate)copper(II)]. *Chem Commun.* 1998;369(21):2403–4.
114. Ferrer EG, Williams PAM. Synthesis and characterization of a dimeric complex of CuII with thiosalicylic acid and pyridine. *Polyhedron.* 1997;16(19):3323–5.
 115. Bhowon MG, Jhaumeer-Laulloo S, Moosun S, Humphreys L, Coles S, Fowdram R, et al. Formation and Structural Characterization of Metal Complexes derived from Thiosalicylic acid. *Zeitschrift fur Anorg und Allg Chemie.* 2017;643(18):1167–72.
 116. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Radojević ID, Čomić LjR et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-methyl derivatives of thiosalicylic acid. *Polyhedron.* 2014; 79: 80-7.
 117. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Novaković SB, Bogdanović GA et al. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *J Mol Struct.* 2016; 1116: 264-71.
 118. Tomović DLj, Bukonjić AM, Kočović A, Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, et al. Synthesis, characterization and cytotoxicity of binuclear copper(II)-complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. *Ser J Exp Clin Res.* 2017;18(1):13-18
 119. Tomović DLj, Bukonjić AM, Jevtić VV, Ratković ZR, Bogojeski JV, Đeković A et al. DNA binding, antibacterial and antifungal activities of copper(II) complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. *Transit Met Chem.* 2018;43(2): 137-148.
 120. Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules.* 2015;20(7):13384-13421.
 121. Dar AM, Mir S. Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *J Anal Bioanal Tech.* 2017;8:356.
 122. Ricci CG, Netz PA. Docking studies on DNA-ligand interactions: building and application of a protocol to identify the binding mode. *J Chem Inf Model.* 2009;49(8):1925-35.
 123. Holt PA, Chaires JB, Trent JO. Molecular docking of intercalators and groove-binders to nucleic acids using Autodock and Surflex. *J Chem Inf Model.* 2008;48:1602-15.
 124. Tse WC, Boger DL. Sequence-selective DNA recognition: natural products and nature's lessons. *Chem Biol.* 2004;11(12):1607-17.
 125. Dolenc J, Borštnik U, Hodošček M, Koller J, Janežič D. An ab initio QM/MM study of the conformational stability of complexes formed by netropsin and DNA. The importance of van der Waals interactions and hydrogen bonding. *J Mol Struct: THEOCHEM.* 2005;718(1):77–85.
 126. Shahabadi N, Maghsudi M. Multi-spectroscopic and molecular modeling studies on the interaction of antihypertensive drug; methyldopa with calf thymus DNA. *Mol Biosyst.* 2014;10(2):338-47.
 127. Mendez CM, McClain CJ, Marsano LS. Albumin therapy in clinical practice. *Nutr Clin Pract.* 2005;20(3):314-20.
 128. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med.* 2012;33(3):209-90.
 129. Bratty MA. Spectroscopic and molecular docking studies for characterizing binding mechanism and conformational changes of human serum albumin upon interaction with Telmisartan. *Saudi Pharm J.* 2020;28(6):729-736.

130. Reichel A. Addressing central nervous system (CNS) penetration in drug discovery: basics and implications of the evolving new concept. *Chem. Biodivers.* 2009;6:2030–2049.
131. Howard M.L., Hill J.J., Galluppi G.R., McLean M.A. Plasma protein binding in drug discovery and development. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2010;13:170–187.
132. Curry S. Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2009;24:342–357.
133. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* 1976;12:1052–1061.
134. Zsila F. Subdomain IB Is the third major drug binding region of human serum albumin: Toward the three-sites model. *Mol. Pharm.* 2013;10:1668–1682.
135. Radić GP, Glođović VV, Radojević ID, Stefanović OD, Čomić LjR, Ratković ZR et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complex with same alkyl derivates of thiosalicylic acids: Crystal structure of the *bis*(S-benzyl-thiosalicylic acidicylate)-palladium(II)-complex, [Pd(S-bz-thiosalicylic acid)₂]. *Polyhedron.* 2012; 31(1): 69-76.
136. Di miza F, Fountoulaki S, Papadopoulos AN, Kontogiorgis CA, Tangoulis V, Raptopoulou CP, et al. Non-steroidal antiinflammatory drug-copper(II) complexes: Structure and biological perspectives. *Dalt Trans.* 2011;40(34):8555–68.
137. Dimiza F, Perdih F, Tangoulis V, Turel I, Kessissoglou DP, Psomas G. Interaction of copper(II) with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and diclofenac: synthesis, structure, DNA- and albumin-binding. *J Inorg Biochem.* 2011;105(3):476–89.
138. Pyle AM, Rehmann JP, Meshoyrer R, Turro NJ, Barton JK, Kumar C V. Mixed-Ligand complexes of ruthenium(II): Factors governing binding to DNA. *J Am Chem Soc.* 1989;111(8):3051–8.
139. Lakowicz JR, Weber G. Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry.* 1973;12(21):4161-70.
140. Wu SS, Yuan WB, Wang HY, Zhang Q, Liu M, Yu KB. Synthesis, crystal structure and interaction with DNA and HSA of (N,N'-dibenzylethane-1,2-diamine) transition metal complexes. *J Inorg Biochem.* 2008;102(11).
141. Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys.* 1993;98(7):5648–52.
142. Andrae D, Häußermann U, Dolg M, Stoll H, Preuß H. Energy-adjusted ab initio pseudopotentials for the second and third row transition elements. *Theor Chim Acta.* 1990;77(2):123–41.
143. Weigend F, Ahlrichs R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Phys Chem Chem Phys.* 2005;7(18):3297–305.
144. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. Gaussian09 Revision D.01, Gaussian Inc. Wallingford CT. Gaussian 09 Revision C.01. 2010. p. Gaussian Inc., Wallingford CT.
145. Hyde JS, Froncisz W. The Role of Microwave Frequency in EPR Spectroscopy of Copper Complexes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1982;11:391-417.
146. Hagen WR. EPR spectroscopy as a probe of metal centres in biological systems. *Dalton Trans.* 2006; 37:4415-34.
147. Huang Q, Liao G, Zhuang X, Yang M, Yao J, Deng J, et al. Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid conjugated with IR783 dye exhibits improved tumor-targeting and altered anti-breast cancer mechanisms in mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2021.

148. Hermindez W, Spodine E, Beyer L, Schrtider U, Richter R, Ferreira J, et al. Synthesis, characterization and antitumor activity of copper(II) complexes, [CuL₂] [HL1-3=N,N-diethyl-N'-(R-benzoyl)thiourea (R=H, o-Cl and p-NO₂)]. *Bioinorg Chem Appl.* 2005;3(3–4):299–316.
149. Swaminathan K, Busch DH. The synthesis and infrared absorption spectra of complexes of cobalt with pentadentate propylenediaminetetraacetic acid. *J Inorg Nucl Chem.* 1961;20(1–2):159–63.
150. Nakamoto K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. *Handbook of Vibrational Spectroscopy.* 2001.
151. Kizilcikli I, Kurt YD, Akkurt B, Genel AY, Birteksöz S, Otük G, Ulküseven B. Antimicrobial activity of a series of thiosemicarbazones and their Zn(II) and Pd(II) complexes. *Folia Microbiol (Praha).* 2007;52(1):15-25.
152. Nandiyanto A, Oktiani R, Ragadhita R. How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material. *Indones J Sci Technol.* 2019;4:97–118.
153. Gunawan R, Nandiyanto ABD. How to read and interpret 1h-nmr and 13c-nmr spectrums. *Indones J Sci Technol.* 2021;6(2):267–98.
154. Garribba E, Micera G. The determination of the geometry of Cu(II) complexes. An EPR spectroscopy experiment. *J Chem Educ.* 2006;83(8):1229–32.
155. Peisach J, Blumberg WE. Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 1974;65:691-708.
156. Hoffmann SK, Goslar J, Lijewski S, Zalewska A. EPR and ESE of CuS₄ complex in Cu(dmit)₂: g-Factor and hyperfine splitting correlation in tetrahedral Cu–sulfur complexes. *J. Magn. Res.* 2013;236:7-14.
157. Alessio E. *Bioinorganic Medicinal Chemistry.* Bioinorganic Medicinal Chemistry. 2011.
158. Čočić D, Jovanović S, Rajković S, Petrović B. Kinetics and mechanism of the substitution reactions of dinuclear platinum(II) complexes with important biomolecules. *Inorganica Chim Acta.* 2018;482:635–42.
159. Lippert B. *Cisplatin: Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug.* First. *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug.* Zürich: Wiley-VCH; 1999.
160. Bugarčić Z, Bogojeski J, Petrović B, Hochreuther S, Eldik R. Mechanistic studies on the reactions of platinum(II) complexes with nitrogen- and sulfur-donor biomolecules. *Dalton Trans.* 2012;41:12329–45.
161. Ertürk H, Hofmann A, Puchta R, van Eldik R. Influence of the bridging ligand on the substitution behaviour of dinuclear Pt(ii) complexes. An experimental and theoretical approach. *Dalt Trans.* 2007;(22):2295–301.
162. Jovanović S, Bogojeski J, Nikolić MV, Mijajlović M, Tomović DL, Bukonjić AM, et al. Interactions of binuclear copper(II) complexes with S-substituted thiosalicylate derivatives with some relevant biomolecules. *J Coord Chem.* 2019;72(10):1603–20.
163. Milutinović MM, Bogojeski J V., Klisurić O, Scheurer A, Elmroth SKC, Bugarčić ŽD. Synthesis and structures of a pincer-type rhodium(III) complex: Reactivity toward biomolecules. *Dalt Trans.* 2016;45(39):15481–91.
164. Čočić D, Jovanović S, Nišavić M, Baskić D, Todorović D, Popović S, et al. New dinuclear palladium(II) complexes: Studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interactions and cytotoxic activity. *J Inorg Biochem.* 2017;175:67–79.
165. Despaigne AAR, Da Silva JG, Da Costa PR, Dos Santos RG, Beraldo H. ROS-mediated cytotoxic effect of copper(II) hydrazone complexes against human glioma cells. *Molecules.* 2014;19(11):17202–20.

166. Boger DL, Fink BE, Brunette SR, Tse WC, Hedrick MP. A simple, high-resolution method for establishing DNA binding affinity and sequence selectivity. *J Am Chem Soc.* 2001;123(25):5878–91.
167. Petrović A, Živanović M, Puchta R, Čočić D, Scheurer A, Milivojević N, et al. Experimental and quantum chemical study on the DNA/protein binding and the biological activity of a rhodium(III) complex with 1,2,4-triazole as an inert ligand. *Dalt Trans.* 2020;49(26):9070–85.
168. Al-asbahy WM, Shamsi M. Synthesis and characterization of Copper-based anticancer compound; in vitro interaction studies with DNA/HSA, SOD mimetic, cytotoxic activity and molecular docking investigation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2021;39(4): 1431-1446.
169. Kathiresan S, Muges S, Murugan M, Ahamed F, Annaraj J. Mixed-ligand copper(II)-phenolate complexes: structure and studies on DNA/protein binding profiles, DNA cleavage, molecular docking and cytotoxicity. *RSC advances*, 2016;6(3): 1810-1825.
170. Kamran AW, Ali S, Tahir MN, Zahoor, M, Wadood A, Iqbal M. Binuclear copper(II) complexes: Synthesis, structural characterization, DNA binding and in silico studies. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2020; 85(6): 751-764.
171. Tabassum S, Al-Asbahy WM, Afzal M, Arjmand F. Synthesis, characterization and interaction studies of copper based drug with human serum albumin (HSA): spectroscopic and molecular docking investigations. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 2012;114:132-9.
172. Shahabadi N, Fili SM, Kashanian S. Human serum albumin interaction studies of a new copper (II) complex containing ceftobiprole drug using molecular modeling and multispectroscopic methods. *J Coord Chem.* 2018;71(2):329-41.
173. Jung Y, Lippard SJ. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev.* 2007;107(5):1387-407.
174. Gust R, Beck W, Jaouen G, Schönenberger H. Optimization of cisplatin for the treatment of hormone-dependent tumoral diseases: Part 2: Use of non-steroidal ligands. *Coord Chem Rev.* 2009;253(21):2760–79.
175. Singh NK, Kumbhar AA, Pokharel YR, Yadav PN. Anticancer potency of copper(II) complexes of thiosemicarbazones. *J Inorg Biochem.* 2020;210:111134.
176. Becco L, García-Ramos JC, Azuara LR, Gambino D, Garat B. Analysis of the DNA interaction of copper compounds belonging to the Casiopeínas® antitumoral series. *Biol Trace Elem Res.* 2014;161(2):210-5.
177. Serment-Guerrero J, Bravo-Gomez ME, Lara-Rivera E, Ruiz-Azuara L. Genotoxic assessment of the copper chelated compounds Casiopeínas: Clues about their mechanisms of action. *J Inorg Biochem.* 2017;166:68-75.
178. Machado PHA, Paixão DA, Lino RC, et al. A selective CuII complex with 4-fluorophenoxyacetic acid hydrazide and phenanthroline displays DNA-cleaving and pro-apoptotic properties in cancer cells. *Sci Rep.* 2021;11(1):24450.
179. Kachadourian R, Brechbuhl HM, Ruiz-Azuara L, Gracia-Mora I, Day BJ. Casiopeína II gly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology.* 2010;268(3):176-83.
180. Mytilineou C, Kramer BC, Yabut JA. Glutathione depletion and oxidative stress. *Parkinsonism Relat Disord.* 2002;8(6):385-7.
181. Ortega AL, Mena S, Estrela JM. Glutathione in cancer cell death. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):1285-1310.
182. García-Ramos JC, Gutiérrez AG, Vázquez-Aguirre A, Toledano-Magaña Y, Alonso-Sáenz AL, Gómez-Vidales V, Flores-Alamo M, Mejía C, Ruiz-Azuara L. The

- mitochondrial apoptotic pathway is induced by Cu(II) antineoplastic compounds (Casiopeínas®) in SK-N-SH neuroblastoma cells after short exposure times. *Biometals*. 2017;30(1):43-58.
183. Vázquez-Aguirre A, Gutiérrez AG, Esparza RM, Hernández-Lemus E, Ruiz-Azuara L, Mejía C. Autophagy Promotes Survival of CHP-212 Neuroblastoma Cells Treated With Casiopeínas®. *Anticancer Res*. 2019;39(7):3687-3695.
 184. Resendiz-Acevedo K, García-Aguilera ME, Esturau-Escofet N, Ruiz-Azuara L. ¹H-NMR metabolomics study of the effect of cisplatin and Casiopeina IIgly on MDA-MB-231 breast tumor cells. *Front Mol Biosci*. 2021;8:742859.
 185. Natarajan R, Jeyamurugan R, Raj Kapoor B, Magesh V. Metal-based antitumor, cytotoxic and antimicrobial activity: Pharmacological evaluation of Knoevenagel condensate β-diketone Schiff base thiosemicarbazone Cu(II) and Zn(II) complexes. *Appl Organomet Chem*. 2009;23:283–90.
 186. Binzet G, Kavak G, Külçü N, Özbey S, Flörke U, Arslan H. Synthesis and characterization of novel thiourea derivatives and their nickel and copper complexes. Trabocchi A, editor. *J Chem*. 2013;2013:536562.
 187. Hernández W, Spodine E, Beyer L, Schröder U, Richter R, Ferreira J, Pavani M. Synthesis, characterization and antitumor activity of copper(II) complexes, [CuL₂] [HL1-3=N,N-diethyl-N'-(R-benzoyl)thiourea (R=H, o-Cl and p-NO₂)]. *Bioinorg Chem Appl*. 2005;3(3-4):299-316.

8. ПРИЛОГ



Complexes of copper(II) with tetradentate S,O-ligands: Synthesis, characterization, DNA/albumin interactions, molecular docking simulations and antitumor activity

Ana S. Živanović^a, Andriana M. Bukonjić^{a,*}, Snežana Jovanović-Stević^b, Jovana Bogojeski^c, Dušan Čočić^c, Ana Popović Bijelić^d, Zoran R. Ratković^c, Vladislav Volarević^{e,f}, Dragana Miloradović^c, Dušan Lj. Tomović^a, Gordana P. Radić^a

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

^b University of Kragujevac, Institute for Information Technologies, Department of Science, Jovana Cvijika bb, 34000 Kragujevac, Serbia

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

^d University of Belgrade – Faculty of Physical Chemistry, Studentski trg 12-16, 11158 Belgrade, Serbia

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

^f Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

S,O-ligands
Copper(II)-complexes
Interactions
Docking
Biological activity

ABSTRACT

Four new complexes of copper(II) with S,O-tetradentate ligands, derivatives of thiosalicylic acid, encompassing an ethylene-, propylene-, butylene- and pentylene- bridge, were synthesized and characterized by microanalysis, molecular conductance and infrared (IR) spectra. The structures were assumed based on the previously mentioned analyses and confirmed with the results of electron paramagnetic resonance (EPR) spectra. The reactivity of complexes towards L-methionine (L-Met), L-cysteine (L-Cys) and guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) was also examined. Complex C1 ([Cu(S,O-ethylene-thiosalicylic acid)(H₂O)₂]) containing two inert methylene groups in the side chain of ligand shows the highest reactivity, while the least reactive is complex C4 ([Cu(S,O-pentylene-thiosalicylic acid)(H₂O)₂]) with five methylene groups. All complexes showed the highest reactivity towards L-Met and the lowest reactivity towards 5'-GMP. The interactions of complexes C1-C4 with calf thymus DNA (ct-DNA) were examined by ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption and fluorescence spectral studies, revealing good DNA interaction abilities. All synthesized complexes C1-C4 show to interact with human serum albumin (HSA) with high values of binding constants. Complexes interaction with DNA/HSA was also confirmed using molecular docking simulations. All synthesized complexes reduce viability of human colon, breast and lung cancer cells, evaluated by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) colorimetric technique. The complex [Cu(S,O-pentylene-thiosalicylic acid)(H₂O)₂] showed the highest binding affinity constants to DNA/HSA and highest cytotoxicity, thus presenting a good candidate for further pharmacological research in the field of colon, breast and lung cancer therapy.

1. Introduction

The discovery of the cytotoxic potential of cisplatin resulted in an

increase in the synthesis of new complexes with a better pharmacological and toxicological profile [1,2], with complex compounds of copper (II) occupying a special place [3]. Copper is an essential microelement

Abbreviations: IR, infrared; NMR, nuclear magnetic resonance; L-Met, L-methionine; L-Cys, L-cysteine; 5'-GMP, guanosine-5'-monophosphate; ct-DNA, calf thymus DNA; UV-Vis, ultraviolet-visible; HSA, human serum albumin; DNA, deoxyribonucleic acid; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; ROS, Reactive Oxygen Species; FTS, S-trans-farnesyl thiosalicylic acid; Ras, Reticular Activating System; DMSO, dimethyl sulfoxide; EPR, Electron paramagnetic resonance; Hepes buffer, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; EB, ethidium bromide; PBS, phosphate buffered saline; UV, ultraviolet; Anal. Calc., Analytical calculations; FBS, fetal bovine serum; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; Asn, asparagine; Arg, Arginine; Asp, Aspartic acid; Pro, Proline; Cys, Cysteine; Tyr, Tyrosine; Lys, Lysine; His, Histidine; Glu, Glutamic acid; Gln, Glutamine; Ala, Alanine; Ser, Serine; Ile, Isoleucine; Val, Valine; Leu, Leucine.

* Corresponding author.

E-mail address: andriana.bukonjic@medf.kg.ac.rs (A.M. Bukonjić).

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111861>

Received 27 December 2021; Received in revised form 2 May 2022; Accepted 8 May 2022

Available online 13 May 2022

0162-0134/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

9. БИОГРАФИЈА

Маг. фарм. Ана С. Живановић (рођена Станковић) рођена је 22.08.1992. у Приштини. Основну школу завршила је као носилац Вукове дипломе, а потом и Прву крагујевачку гимназију, друштвено-језички смер са одличним успехом. Интегрисане академске студије фармације на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписала је 2011. године и дипломирала 2016. године са просечном оценом 9,42 (девет и 42/100). Стручни испит за магистра фармације положила је пред комисијом Министарства здравља 23.02.2017. године.

Школске 2016/17. године уписала је докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Истраживања у фармацији. Усмени докторски испит положила је 2018. године са оценом 9. Учествовала је на XXVI конференцији Српског кристалографског друштва, XV конференцији Удружења психијатара Србије, као и 56. Конгресу студената биомедицинских наука са интернационалним учешћем.

Од 27. децембра 2018. године запослена је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу у звању истраживач – приправник на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Синтеза, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине неорганских једињења и одговарајућих комплекса метала” (евиденциони број пројекта - ОИ172016) чији је руководилац проф. др Срећко Трифуновић. Као фацилилатор укључена је у наставу на Катедри за фармацеутску хемију од фебруара 2019. године, где сада ради као сарадник у настави. Течно говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

Дана 26. фебруара 2020. године на седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу усвојен је Извештај о оцени научне заснованости теме докторске дисертације под називом „Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса бакра(II) са S,O - тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине“.

Ана С. Живановић је аутор и коаутор седам научних радова објављених у целости у домаћим и међународним часописима на SCI листи, као и шеснаест саопштења на конференцијама од домаћег и међународног значаја.

10. БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Živanović AS**, Bukonjić AM, Jovanović-Stević S, Bogojeski J, Čočić D, Bijelić AP, Ratković ZR, Volarević V, Miloradović D, Tomović DL, Radić GP. Complexes of copper(II) with tetradentate S,O-ligands: Synthesis, characterization, DNA/albumin interactions, molecular docking simulations and antitumor activity. *J Inorg Biochem.* 2022; 233:111861. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111861.
2. Nedeljković NV, Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Radić GP, **Stanković AS**. Interaction of bioessential metal ions with quinolone antibiotics: structural features and biological evaluation. *Inorganica Chimica Acta.* 2021; 527: 120585. doi: 10.1016/j.ica.2021.120585 **M22 IF = 2,545 (2020)**
3. Nedeljković N, Nikolić M, **Stanković A**, Jeremić N, Tomović D, Bukonjić A, Radić G, Mijajlović M. Virtual screening, drug-likeness analysis and molecular docking study of potential severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 main protease inhibitors. *Turkish Journal of Chemistry.* 2021. (doi: 10.3906/kim-2103-20) **M23 IF = 1,239 (2020)**
4. Dimitrijević J, Arsenijević AN, Milovanović MZ, Arsenijević NN, Milovanović JZ, **Stanković AS**, Bukonjić AM, Tomović DLj, Ratković ZR, Potočňák I, Samoľová E, Radić GP. Synthesis, characterization and cytotoxic activity of binuclear copper(II)-complexes with some S-isoalkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-isopropyl derivative of thiosalicylic acid. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2020; 208:111078. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2020.111078 **M21 IF = 3,348 (2016)**
5. Bukonjić AM, Tomović DLj, **Stanković AS**, Jevtić VV, Ratković ZR, Bogojeski JV, Milovanović JZ, Đorđević DB, Arsenijević AN, Milovanović MZ, Potočňák I, Trifunović SR, Radić GP. Synthesis, characterization and biological activity of copper(II) complexes with ligands derived from β -amino acids. *Transition Metal Chemistry* 2019; 44(1):66-76. **M23 IF = 1,261 (2017)**
6. Milutinović S, **Stanković A**, Ivanović S, Trgovčević S, Kilibarda T. Compilation and Testing the Reliability of Questionnaires about the Fear of Blood Extraction (Venipuncture) among Students of Medical Faculty of Kragujevac. *Acta Facultatis medicae Naissensis.* 2021;38(1):294-309. Doi:10.5937/afmnai38-25165 **M51**
7. **Stanković AS**, Kasalović MP, Bukonjić AM, Mijajlović MŽ, Tomović DLj, Nikolić MV. Biological activity of Au(III) complexes. *Ser J Exp Clin Res.* 2019. doi: 10.2478/sjecr-2019-0050 **M51**

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ана С. Живановић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса

бакра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселин

која је одбрањена на **Факултету медицинских наука**

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,

да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 23.06.2022. године,

Ана Живановић

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ана С. Живановић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса

бабра(II) са S,O-тетраденатним лигандима, дериватима тиосалицилне киселине

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

1) Ауторство

2) **Ауторство - делити под истим условима**

3) Ауторство - без прерада

4) Ауторство - некомерцијално

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 23.06.2022. године,



потпис аутора

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