



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Андриана М. Букоњић

**„СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ИСПИТИВАЊЕ**  
**БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА**  
**β-АМИНОКИСЕЛИНАМА”**

Докторска дисертација

Ментор: Доц. др Јована Богојески

Крагујевац, 2018. година

**САДРЖАЈ**

<b>1. УВОД</b> .....	2
1.1. Хемијске особине $\beta$ -аминокиселина.....	3
1.2. Биолошки значај $\beta$ -аминокиселина.....	5
1.3. Хемијске особине бакра.....	7
1.4. Биолошки значај бакра.....	11
1.4.1. Дисбаланс концентрације бакра у организму.....	12
1.4.2. Повезаност бакра и карцинома.....	13
1.4.3. Улога бакра у лечењу карцинома.....	15
1.5. Механизам дејства антитуморске активности бакар(II)-комплекса.....	17
1.6. Антимикробна активност.....	22
1.6.1. Антимикробно дејство Cu(II)-јона и бакар(II)-комплекса.....	24
<b>2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ</b> .....	26
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД</b> .....	28
3.1. Синтеза лигананда.....	29
3.2. Синтеза комплексних једињења.....	30
3.2.1. Поступак синтезе комплекса бакра(II) са Л1 лигандом, 2-(1-аминоциклохексил)сирћетном киселином.....	30
3.2.2. Поступак синтезе комплекса бакра(II) са Л2 лигандом, 2-(1-амино-4-( <i>tert</i> -бутил)циклохексил)сирћетном киселином.....	30
3.3. Инструментална мерења.....	31
3.3.1. Елементална микроанализа.....	31
3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија.....	31
3.3.3. Нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија.....	31
3.3.4. Електронска-парамагнетна-резонанција.....	31
3.3.5. Рендгентска структурна анализа.....	32
3.4. Испитивање стабилности комплексних једињења.....	33

3.5. Интеракција синтетисаних комплекса са ДНК.....	33
3.5.1. Припрема реагенаса.....	33
3.5.2. Кинетичка мерења.....	33
3.5.3. Апсорпциона спектроскопска мерења.....	34
3.5.4. Флуоресцентна мерења.....	35
3.5.5. Мерење вискозитета.....	37
3.6. Антитуморска активност.....	37
3.6.1. Припремање раствора испитиваних једињења и реагенаса.....	37
3.6.2. Ђелијска култура.....	38
3.6.3. Цитотоксични тестови.....	38
3.7. Антимикробна активност.....	42
3.7.1. Припремање раствора испитиваних једињења и реагенаса.....	42
3.7.2. Третирани микроорганизми и припрема суспензија.....	43
3.7.3. Микродилуциона метода.....	44
<b>4. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>46</b>
4.1. Синтеза и карактеризација.....	47
4.1.1. Синтеза $\beta$ -аминокиселина.....	47
4.1.2. Синтеза комплекса бакра(II) са $\beta$ -аминокиселинама.....	47
4.1.3. Елементална микроанализа синтетисаних комплекса.....	48
4.1.4. Нуклеарно-магнетно-резонантни спектри лиганата.....	48
4.1.5. Инфрацрвени спектри синтетисаних лиганата и комплекса.....	49
4.1.6. Спектри електронско-парамагнетне-резонанције.....	49
4.1.7. Кристална структура комплекса К1.....	50
4.2. Стабилности раствора комплексних једињења.....	52
4.3. Интеракција синтетисаних комплекса са молекулом ДНК.....	54
4.3.1. Супституционе реакције.....	54
4.3.2. UV-Vis апсорпциони спектри.....	55

---

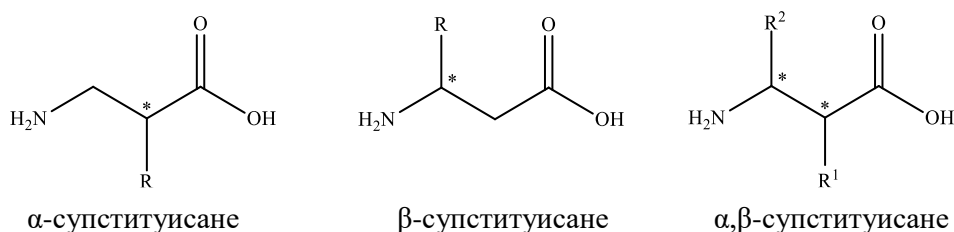
4.3.3. Флуоресцентни емисиони спектри.....	56
4.3.4. Вискозност.....	57
4.4. Антитуморска активност.....	58
4.4.1. Ћелијска варијабилност и IC <sub>50</sub> .....	58
4.4.2. Индукција апоптозе.....	59
4.5. Антимикробна активност.....	60
<b>5. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>63</b>
5.1. Синтеза и карактеризација β <sup>2</sup> -аминокиселина.....	64
5.2. Синтеза, карактеризација и стабилност раствора комплекса бабра(II) са β <sup>2</sup> -аминокиселина.....	65
5.3. Интеракција комплекса са ДНК молекулом.....	68
5.4. Антитуморска активност.....	72
5.5. Антимикробна активност.....	75
<b>6. ЗАКЉУЧАК.....</b>	<b>76</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>76</b>

# **1. УВОД**

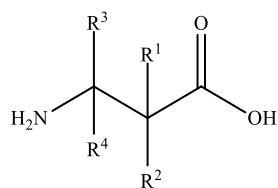
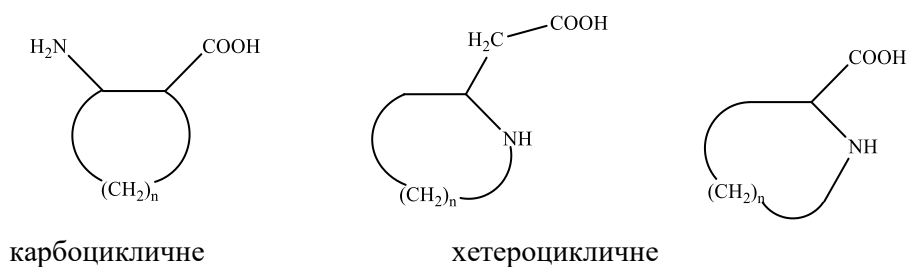
## 1.1. Хемијске особине $\beta$ -аминокиселина

Аминокиселине су веома важни органски молекули са amino ( $-\text{NH}_2$ ) и карбоксилном ( $-\text{COOH}$ ) функционалном групом и бочним ланцем који је специфичан за сваку аминокиселину [1]. До сада је познато око 500 природних аминокиселина које се у зависности од положаја функционалних група могу класификовати на  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$ -аминокиселине [2]. На основу структуре  $\beta$ -аминокиселина извршена је подела на линеарне ( $\alpha$ -супституисане,  $\beta$ -супституисане и  $\alpha,\beta$ -супституисане) и цикличне (карбоцикличне и хетероцикличне) (Слика 1). Цикличне могу имати amino и карбоксилну функционалну групу као супституенте на карбоцикличном прстену или amino групу која улази у састав прстена. Најједноставнија  $\beta$ -аминокиселина је 3-аминопропанска киселина ( $\beta$ -аланин) и за разлику од већине она није оптички активна [3].

### ЛИНЕАРНЕ $\beta$ -АМИНОКИСЕЛИНЕ



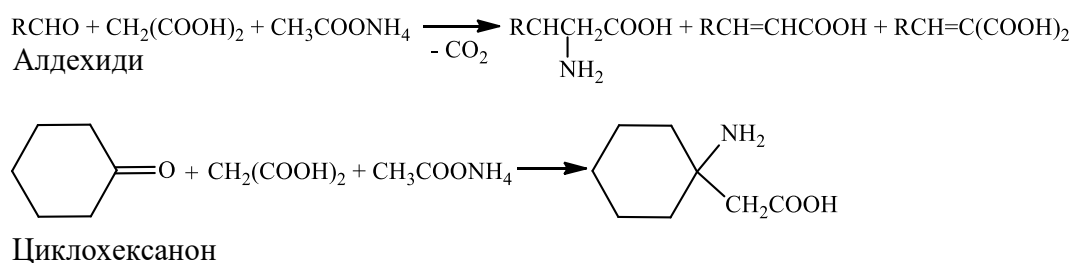
### ЦИКЛИЧНЕ $\beta$ -АМИНОКИСЕЛИНЕ



- $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4 = \text{H}$  ( $\beta$ -аланин);
- $\text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4 = \text{H}$  ( $\beta^2$ -аминокиселине);
- $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3 = \text{H}$  ( $\beta^3$ -аминокиселине);
- $\text{R}^3, \text{R}^4 = \text{H}$  ( $\beta^{2,2}$ -аминокиселине);
- $\text{R}^2, \text{R}^3 = \text{H}$  ( $\beta^{2,3}$ -аминокиселине);
- $\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{H}$  ( $\beta^{3,3}$ -аминокиселине);
- $\text{R}^4 = \text{H}$  ( $\beta^{2,3,3}$ -аминокиселине);
- $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4 \neq \text{H}$  ( $\beta^{2,2,3,3}$ -аминокиселине).

Слика 1. Структура  $\beta$ -аминокиселина

Добијање  $\beta$ -аминокиселина се последњих година углавном заснива на каталитичкој асиметричној синтези уз примену прелазних метала, органских катализатора или биокатализатора (ензима) [4,5]. Реакције које су катализоване металима најчешће обухватају реакције хидрогенизације, нуклеофилне адиције на  $\alpha,\beta$ -незасићена једињења и Манихове (Mannich) реакције [3-5]. Због велике енантиомерне селективности производа и мале количине катализатора, хидрогенизација у присуству родијума и рутенијума има широку примену, док су ограничења Манихових реакција и нуклеофилне адиције већа количина катализатора и приступачност нуклеофила [4]. Родионовом (Rodionov) реакцијом се од алифатичних и ароматичних алдехида могу добити значајне  $\beta$ -аминокиселине (Схема 1). Међутим, од испитиваних кетона је једино циклохексанон Родионовом реакцијом дао  $\beta$ -аминокиселину, док се ацетофенон, бензофенон, ацетон и етил-метил-кетон нису показали као погодни реагенси (Схема 1) [6].



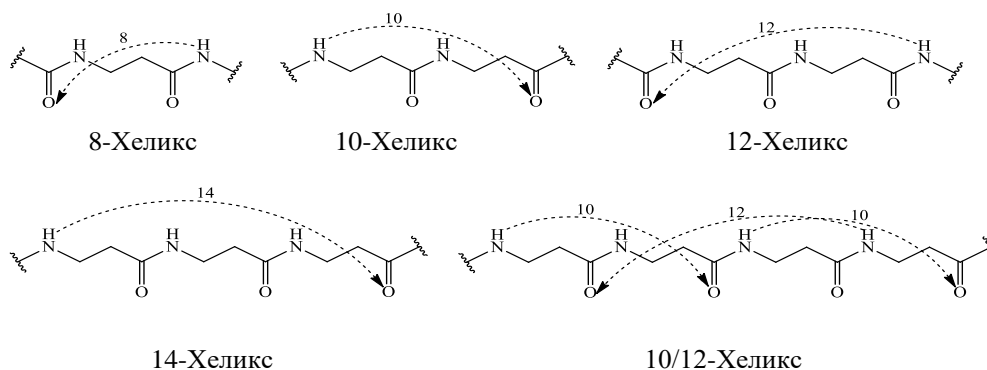
*Схема 1. Синтеза  $\beta$ -аминокиселина Родионовом реакцијом*

Реакције катализоване органским супстанцама су веома корисне методе, али и оне захтевају већу количину катализатора, дуже трају и често је потребан додатни корак у трансформацији до одговарајуће  $\beta$ -аминокиселине. Један од пожељних органских катализатора је (*S*)-пролин, природна и лако доступна аминокиселина [4]. Због све веће потребе да се избегне рацемска смеша  $\beta$ -аминокиселина и добију што чистији енантиомери, усавршавају се биокаталитичке методе, посебно оне које се заснивају на кинетичкој резолуцији и примени хидролитичких ензима [7,8].

Како би се детектовале синтетисане аминокиселине користе се различите аналитичке методе. Спектроскопске методе, UV-Vis апсорпција, флуоресценција и примена  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  нуклеарно-магнетно-резонантне спектроскопије дају потврду структуре [9,10]. Гасна и течна хроматографија имају значајну примену при доказивању и раздвајању енантиомера, док се рендгенском структурном анализом са великом прецизношћу утврђује структура [11]. Комплексирајућа способност аминокиселина

омогућила је развој електрохемијских сензора. Електроде које садрже бакар омогућавају осетљиву ампериметријску детекцију аминокиселина [12].

Са хемијског аспекта  $\beta$ -аминокиселине се не разликују значајно од  $\alpha$ -аминокиселина. Између амино групе једне  $\beta$ -аминокиселине и карбоксилне групе друге  $\beta$ -аминокиселине долази до формирања амидне везе и синтезе  $\beta$ -пептида у високом приносу. Спектроскопским методама и рендгенском структурном анализом су окарактерисани добијени пептиди. Уочена је значајна разлика у секундарној структури између  $\alpha$ - и  $\beta$ -пептида. Поређење аналогних секундарних структура ових пептида показује значајне разлике које се првенствено огледају у већој стабилности различитих  $\beta$ -хеликса (Слика 2). Супституенти на положајима  $\alpha$  и  $\beta$  у  $\beta$ -аминокиселинама фаворизују *gauche* конформације између  $\alpha$  и  $\beta$  угљеникових атома, што утиче на термодинамичку стабилност  $\beta$ -пептида [13,14]. Већа стабилност је запажена и према пептидазама, где  $\beta$ -пептиди изграђени од  $\beta$ -аминокиселине са остацима које садрже и  $\alpha$ -аминокиселине остају дуже неразграђени [15].



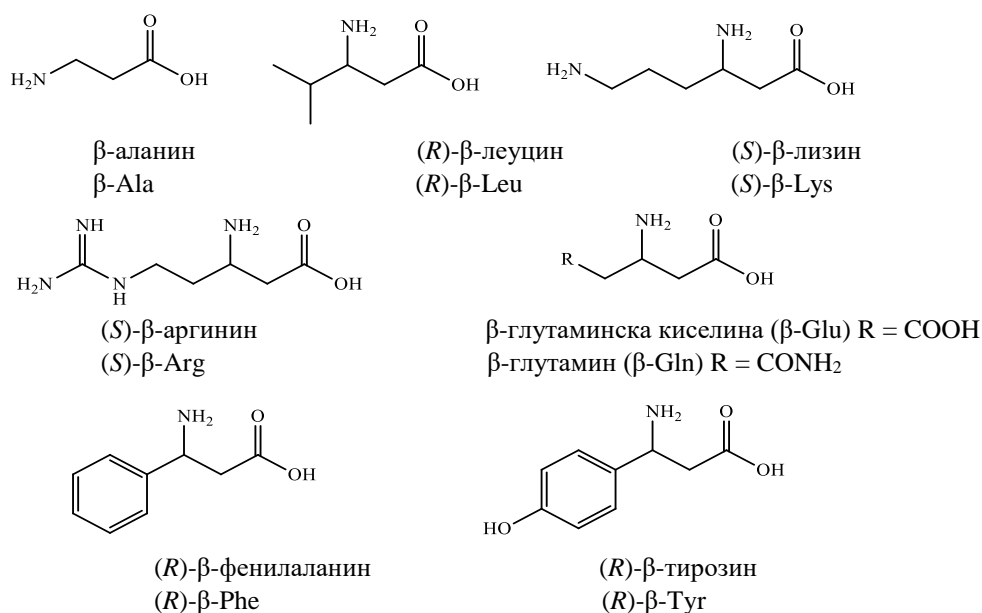
Слика 2. Хеликси које формирају  $\beta$ -пептиди

## 1.2. Биолошки значај $\beta$ -аминокиселина

За разлику од протеиногених  $\alpha$ -аминокиселина њихови  $\beta$ -аналози су доста мање заступљени у природи, али се могу наћи у великом броју живих организама, животиња, биљака и микроорганизама [16,17]. Заступљеност им није равномерна, тако да је до сада установљено да се само  $\beta$ -аланин и  $\beta$ -аминоизобутират налазе у свим организмима, јер су укључени у њихов примарни метаболизам. Углавном чине градивне јединице сложенијих биолошки значајних молекула (пептида, алкалоида, лактона), док је слободна форма  $\beta$ -аминокиселина знатно мање заступљена. До сада је у слободној



форми или као део молекула у природи пронађено осам  $\beta$ -аминокиселина са остацима који одговарају протеиногеним аминокиселинама (Слика 3) [16]. Прва откривена  $\beta$ -аминокиселина,  $\beta$ -аланин је и најраспрострањенија аминокиселина и градивна јединица коензима А. Код сисара се може наћи и у слободној форми, јер се производи као интермедијер при катаболизму урацила [16,17]. Заступљеност и активност цикличних  $\beta$ -аминокиселина и њихових деривата повезана је са величином цикличног система. Мањи молекули, три до четири члана, су веома ретки у природи и обично испољавају токсично дејство. Антигљивично дејство је већим делом карактеристика петочланих и шесточланих цикличних  $\beta$ -аминокиселина. Циклопентацин, циклична  $\beta$ -аминокиселина која се добро раствара у води и у *in vitro* условима, показује значајну антигљивичну активност против врсте *Candida albicans*. Хетероциклична  $\beta$ -аминокиселина (3-пролин карбоксилна киселина) постоји у два енантиомерна облика. Енантиомер *R* делује као селективни инхибитор  $\gamma$ -аминобутанске киселине (ГАБА), главног инхибиторног неуротрансмitera у централном нервном систему сисара [18].



Слика 3. Природне  $\beta$ -аминокиселине аналогне протеиногеним аминокиселинама

Интересовање за проучавање ових киселина је све веће првенствено због потенцијалног фармаколошког значаја, али и због њихове природне улоге. У фармацеутској употреби испитана су њихова хипогликемијска, антимикуробна и инсектицидна својства [19]. Од посебног интереса у медицинској хемији је терапија пептидима или пептидомиметцима који садрже  $\beta$ -аминокиселине и могу бити идеална

терапијска стратегија с обзиром на то су  $\beta$ -аминокиселине довољно сличне њиховим  $\alpha$  аналозима, али имају знатно боље фармакокинетичке карактеристике. Предност се огледа у повећаној биорасположивости и отпорности на деградацију која се може повезати са секундарном структуром  $\beta$ -пептида. Пептидомиметици могу функционисати као антимикуробна једињења, али је показано да могу деловати и као инхибитори протеазома и инхибитори природне аминокиселине глицина [20].

### 1.3. Хемијске особине бакра

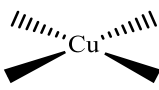
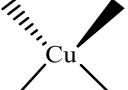
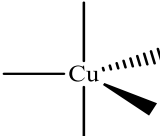
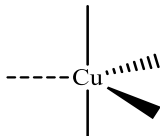
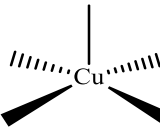
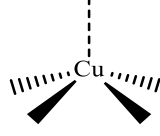
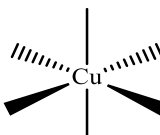
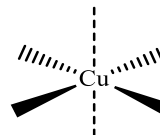
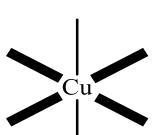
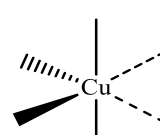
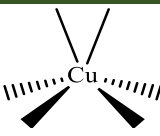
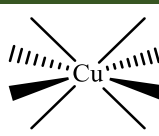
Бакар је 29. елемент у периодном систему елемената и припада групи прелазних метала [21]. Због једног неспареног електрона у  $s$ -орбитали сврстава се у IV групу (CAS, енгл. *Chemical Abstracts Service*) [22], односно 11. групу према новој класификацији (IUPAC, енгл. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) [23]. У једињењима се бакар најчешће налази у оксидационим стањима +1, +2 и +3, али су само бакар(II) једињења стабилна у воденим растворима [24]. Назив и симбол овог елемента изведени су од речи *aes cuprium* (касније *Cuprum*), а повезани су са снабдевањем Римљана бакром са Кипра. Одређене карактеристике бакра дате су у Табели 1 [21].

Табела 1. Опште карактеристике бакра

Карактеристике		Бакар
Општа својства	Симбол	Cu
	Атомски број	29
	Број природних изотопа	2
	Релативна атомска маса (u)	63,546
	Електронска конфигурација	[Ar] 3d <sup>10</sup> 4s <sup>1</sup>
Атомска својства	Електронегативност	1,9
	Метални радијус (pm)	128
	Ефективни јонски радијус (pm)	54 (3+), 73 (2+), 77 (1+)
	Енергија јонизације (kJ/mol)	745,3 (I), 1957,3 (II)
Физичка својства	Тачка топљења (°C)	1083
	Тачка кључања (°C)	2570
	Густина на 20°C (g/cm <sup>3</sup> )	8,95
	Електрична проводљивост 20°C ( $\mu\text{ohm cm}$ )	1,673

Према Пирсоновој класификацији  $\text{Cu(I)}$ -јон ( $[\text{Ar}]3d^{10}$ ) је „меког” карактера и формира дијамагнетична, безбојна комплексна једињења са органским и неогранским лигандима који као доноске атоме садрже сумпор (цистеин, метионин),  $sp^2$  хибридизован азот (пиридински и хистидински системи), фосфор (терцијарни фосфини) [25,26]. Ови комплекси обично имају линеарну структуру (координациони број, КБ = 2), тригонално-планарну (КБ = 3) или тетраедарску (КБ = 4) [26]. Као прелазна тврдо-мека киселина,  $\text{Cu(II)}$ -јон има способност да се координује са лигандима различите дентатности и преко доносних атома са различитим тврдо/меким карактеристикама по Пирсоновој класификацији [27-29]. Комплекси које гради  $\text{Cu(II)}$ -јон ( $[\text{Ar}]3d^9$ ) су парамагнетични, плаве боје и разноврсне геометријске структуре (Табела 2) [26].

Табела 2. Геометријске структуре бакар(II) комплекса

Cu(II)	
КБ = 4	 <p>Правилна квадратно-планарна структура</p>  <p>Спљоштена тетраедарска структура</p>
КБ = 5	 <p>Правилна тригонално-бипирамидална структура</p>  <p>Дисторгована тригонално-бипирамидална структура</p>  <p>Правилна квадратно-пирамидална структура</p>  <p>Дисторгована квадратно-пирамидална структура</p>
КБ = 6	 <p>Правилна октаедарска структура</p>  <p>Издужена октаедарска структура</p>  <p>Спљоштена октаедарска структура</p>  <p>Cis-дисторгована октаедарска структура</p>
КБ = 7	 <p>Хептакоординована структура</p>
КБ = 8	 <p>Октакоординована структура</p>

### 1.3.1. Комплексна једињења бакра(II) са аминокиселинама

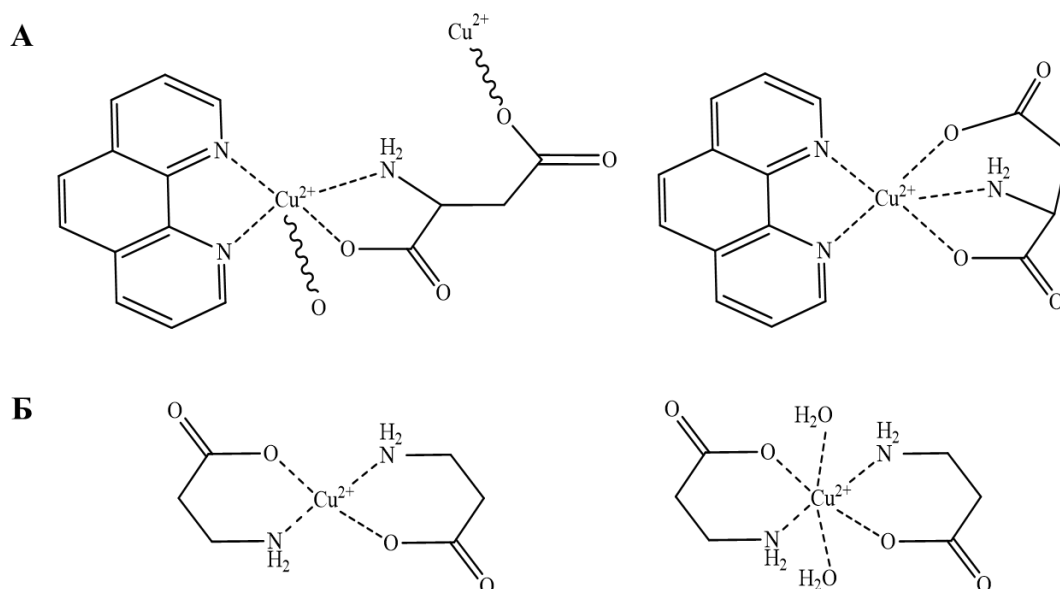
Бакар(II)-јон може да награди комплексна једињења са различитим  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - или  $\delta$ -аминокиселинама које се најчешће понашају као бидентатни лиганди, али могу бити и монодентатни или тридентатни у зависности од R остатка. Због великог значаја које имају, највећи број синтетисаних и проучених комплекса бакра чине  $\alpha$ -аминокиселине. Бакар(II)-јон формира стабилне комплексе са аминокиселинама кроз хелатизацију, тако што најпре долази до стварања квадратно-планарних комплекса, а затим може доћи и до координовања са атомима из бочног ланца аминокиселине [30]. Обично један бакар(II)-јон везује два молекула аминокиселине тако што се координовање врши преко кисеоника из карбоксилних група и преко азота из амино група формирајући два геометријска изомера (*cis*-/*trans*-) (Слика 4) [30,31].



Слика 4. Геометријски изомери бакар(II)-комплекса са аминокиселинама

Синтеза великог броја комплексних једињења захтева потребу за развојем метода њихове карактеризације, од којих су неке елементална микроанализа, инфрацрвена спектроскопија (IR), електронска-парамагнетна-резонанција (EPR), рендгентска структурна анализа. Упоредивањем IR спектра некоординованих аминокиселина и њихових очекиваних комплекса може се са великом сигурношћу установити да ли је дошло до координовања. Апсорпционе траке које потичу од протонване амино групе лиганда јављају се на око  $2900\text{ cm}^{-1}$ , док се асиметричне валенционе вибрације примарне амино групе јављају на око  $3300\text{ cm}^{-1}$  у спектру комплекса. Траке некоординованих карбоксилних група присутне су на  $1750\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ . При координовању депротонваних карбоксилних група појављују се траке на  $1650\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  [31,32]. EPR је спектроскопска метода која на основу детекције неспарених електрона пружа информацију о структури и начину успостављања хемијских веза у једињењу са парамагнетним особинама. Изглед EPR спектра и вредност g параметра могу да укажу на геометријску структуру комплекса [33,34]. Рендгенска дифракциона анализа је једна од најпоузданијих метода за одређивање структуре и начина координовања. Овом методом је окарактерисана

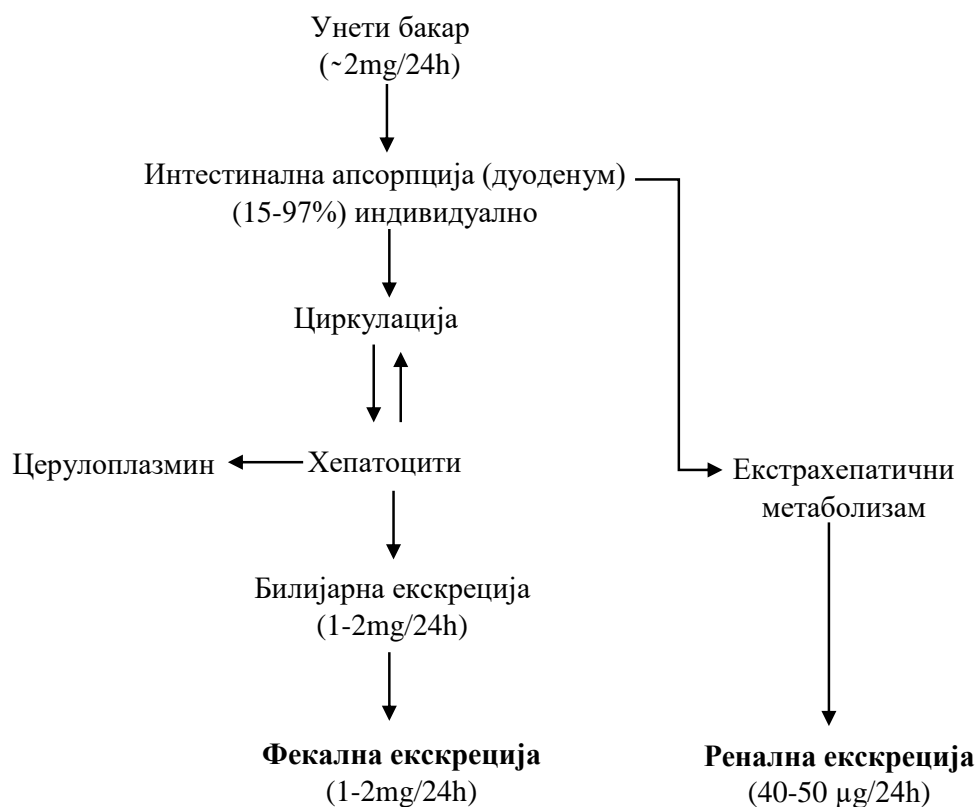
структура великог броја комплекса са аминокиселинама с почетком још од средине XX века до данас [30]. Установљено је да се аланин понаша као бидентатни лиганд и координовање остварује преко атома кисеоника и атома азота из функционалних група, са могућношћу формирања *cis*- и *trans*- геометријских изомера квадратно-планарне структуре [35]. Аспарагинска киселина се може класификовати и као  $\alpha$  и као  $\beta$ -аминокиселина. Због присуства још једне карбоксилне групе понаша се и као тридентатни лиганд. Пронађене су две различите пентакоординоване кристалне структуре бакар(II)-јона и аспарагинске киселине. У мономеру је аспарагинска киселина тридентатни лиганд, док се у полимеру преко кисеоника из карбоксилне групе бочног ланца координује за други бакар(II)-јон (Слика 5А) [36]. Најједноставнија  $\beta$ -аминокиселина,  $\beta$ -аланин координује се бидентатно за бакар(II)-јон формирајући *trans*- изомер квадратно-планарне геометријске структуре [37] или *trans*- изомер октаедарске структуре у којој два молекула аминокиселине чине основу, док су аксијално координовани молекули воде [38] (Слика 5Б). Различит начин координовања једне аминокиселине забележен је и на примеру  $\gamma$ -аминобутанске киселине. У једној структури две аминокиселине повезују два бакар(II)-јона *trans* двоструким премошћавањем формирајући бесконачан једнодимензиони ланац, док се друга структура састоји из бесконачних дводимензионих мрежа [39].



Слика 5. Координовање аспарагинске киселине (А) и  $\beta$ -аланина (Б) са бакар(II)-јоном

## 1.4. Биолошки значај бакра

Просечан унос бакра код одраслих особа варира од 0,6 до 1,6 mg дневно, а извори су углавном орашаста плодови, махунарке, шкољке, јетра [40,41]. Из гастроинтестиналног тракта, највећим делом из дуоденума, апсорбује се око 60% унетог бакра, који се у циркулацији везује за албумине и транспортује до јетре, а затим везан за церулоплазмин до периферних ткива. Само 10 до 15% бакра у жучи се ресорбује, а вишак се највећим делом излучује билијарном екскрецијом (Схема 2) [42,43]. Хомеостатски механизми регулишу све процесе од уноса метала до његове елиминације како би се спречила свака неуравнотеженост у концентрацији [44]. Количина бакра у организму износи 80 до 120 mg [45,46] и у највећем проценту је везан за протеине, док слободног има у просеку мање од једног атома по ћелији [47].



*Схема 2. Апсорпција, дистрибуција и елиминација унетог бакра*

И поред микрозаступљености у организму, утврђено је да бакар има веома важну улогу у биохемијским процесима како код бактеријских, тако и код ћелија еукариота. При физиолошким условима лако прелази из редукованог Cu(I) у оксидовани Cu(II)

облик који је и више заступљен у биолошким системима. Редокс активан бакар у ћелијама еукариота делује као кофактор за бројне ензиме који су потребни за одржавање хомеостазе организма. Ензими зависни од овог метала учествују у енергетском метаболизму, синтези везивног ткива, синтези катехоламина, заштити организма од слободних радикала (Табела 3) [48,49].

**Табела 3.** Ензими за чије функционисање је потребан редокс активан бакар

Бакар	Ензими	Функција
$\text{Cu}^+ \rightarrow \text{Cu}^{2+}$	Лизин оксидаза	Унакрсно повезивање колагена и еластина
	Cu/Zn супероксид дизмутаза	Детоксификација слободних радикала
	Васкуларни аденозни протеин 1	Оксидативна конверзија амина у алдехиде
	Церулоплазмин	$\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$
	Допамин- $\beta$ -хидроксилаза	Синтеза неуротрансмitera, конверзија допамина у норадреналин
	Цитохром оксидаза	Пренос електрона
	Семикарбазид-сензитивна аминоксидаза	Адхезија леукоцита на ендотелне ћелије
	Тирозиназа	Синтеза меланома
	Метионин синтетаза	Конверзија хомоцистеина у метионин

#### 1.4.1. Дисбаланс концентрације бакра у организму

Повишена или снижена концентрација бакра у организму примећена је код различитих болести и метаболичких поремећаја. Ниже вредности од референтних су пронађене код Менкесове и Паркинсонове болести, обољења која су праћена губитком протеина, као и код поремећаја у интестиналној апсорпцији и при примени парентералне исхране. Вилсонову болест, различите запаљенске процесе, карциноме, цирозу јетре и холестазе прати повишена концентрација бакра. Забележене су повишене серумске концентрације и код трудница и код особа које користе хормонске контрацептиве [49].

Посебна пажња је усмерена на проучавање генетски условљеног поремећаја у хомеостази овог метала [50]. Манкесова болест је најтежи облик дефицита бакра која

настаје услед генетских поремећаја на X хромозому, односно мутације на АТР7А гену који је одговоран за активност АТФ-азе, интрацелуларне пумпе која транспортује бакар до Голџијевог апарата. Код болесника је забележено значајно смањење апсорпције бакра из гастроинтестиналног тракта [51]. Клиничке манифестације су изузетно тешке, праћене неуролошким оштећењима, поремећајима у расту и развоју, хипотонијом и остеопорозом [52], као и поремећајима у функционисању бакар-зависних ензима [48,49]. Најчешће долази до смрти у раном неонаталном периоду, док су симптоми који се јаве касније у детињству мање озбиљни. Терапијски приступ подразумева субкутану и интравенску примену суплемената који садрже бакар (ацетатне соли) [53]. Вилсонова болест је генетски условљено обољење које се преноси аутозомно-рецесивно. Настаје услед дефекта на АТР7Б гену на хромозому број 13 који као последицу има поремећај у везивању јона бакра за транспортне протеине, церулоплазмин и немогућности да се бакар излучи путем жучи у дигестивне органе [54]. Акумулирају се велике количине бакра у јетри и мозгу, али и у другим органима. Клиничке манифестације укључују менталне промене, различите моторне абнормалности, фулминативну инсуфицијенцију јетре, бубрежну дисфункцију, хомолитичку анемију [55,56]. Лек избора у терапији Вилсонове болести је пенициламин који везујући бакар омогућава његово излучивање [57,58]. Међутим, озбиљна нежељена дејства овог лека довела су до развоја алтернативних хелатора [59].

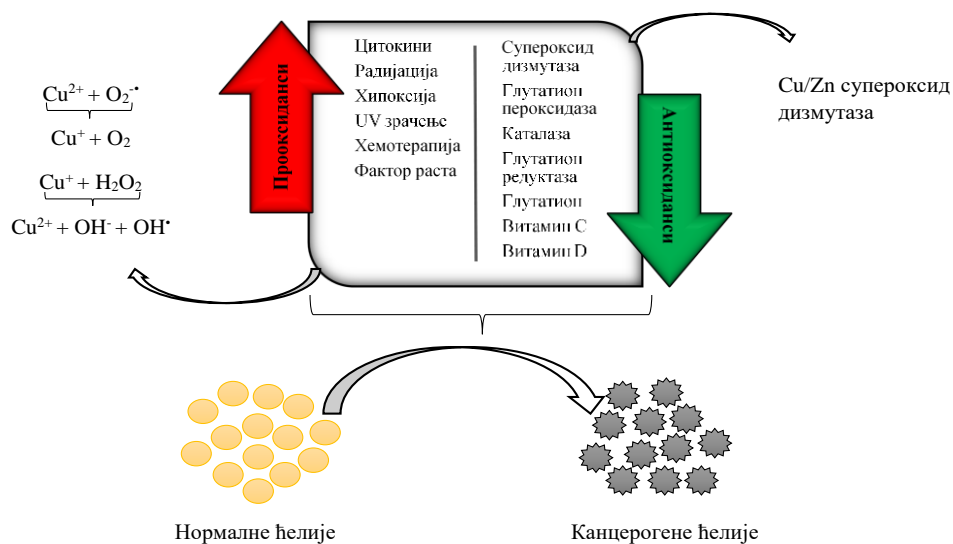
#### 1.4.2. Повезаност бакра и карцинома

Због редокс активности, бакар се може повезати са повећаном производњом слободних радикала и реактивних врста кисеоника ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ) који услед неравнотеже са антиоксидансима могу довести до оксидативног стреса [60,61]. Присуство реактивних једињења у дужем временском периоду доводи до оштећења ћелија. Иницијација и напредовање карцинома повезани су са мутацијом или оштећењем ДНК која настају услед оксидативног стреса и хроничног запаљења [62,63].

Међутим, резултати истраживања која повезују бакар и настанак карцинома су опречна. Код мишева који су у периоду од две године били изложени води за пиће која је садржала бакар(II)-сулфат у концентрацији од 20  $\mu$ М, није забележена повећана инциденца карцинома [64]. Ако се узму у обзир хомеостатски механизми регулације нивоа бакра у организму, потребно је при оваквим истраживањима пратити и серумску



концентрацију бакара [44]. Недостатак бакара се манифестује супресијом коштане сржи и анемијом [65,66], али је забележен и настанак вешеструких интестиналних неоплазми код мишева чија исхрана није садржала овај метал у задовољавајућој количини [67]. Свакако при тумачењу ових резултата треба сагледати и значај бакара при активности одређених ензима (Cu/Zn супероксид дизмутаза) [68] и имунолошког система [69] (Слика 6).



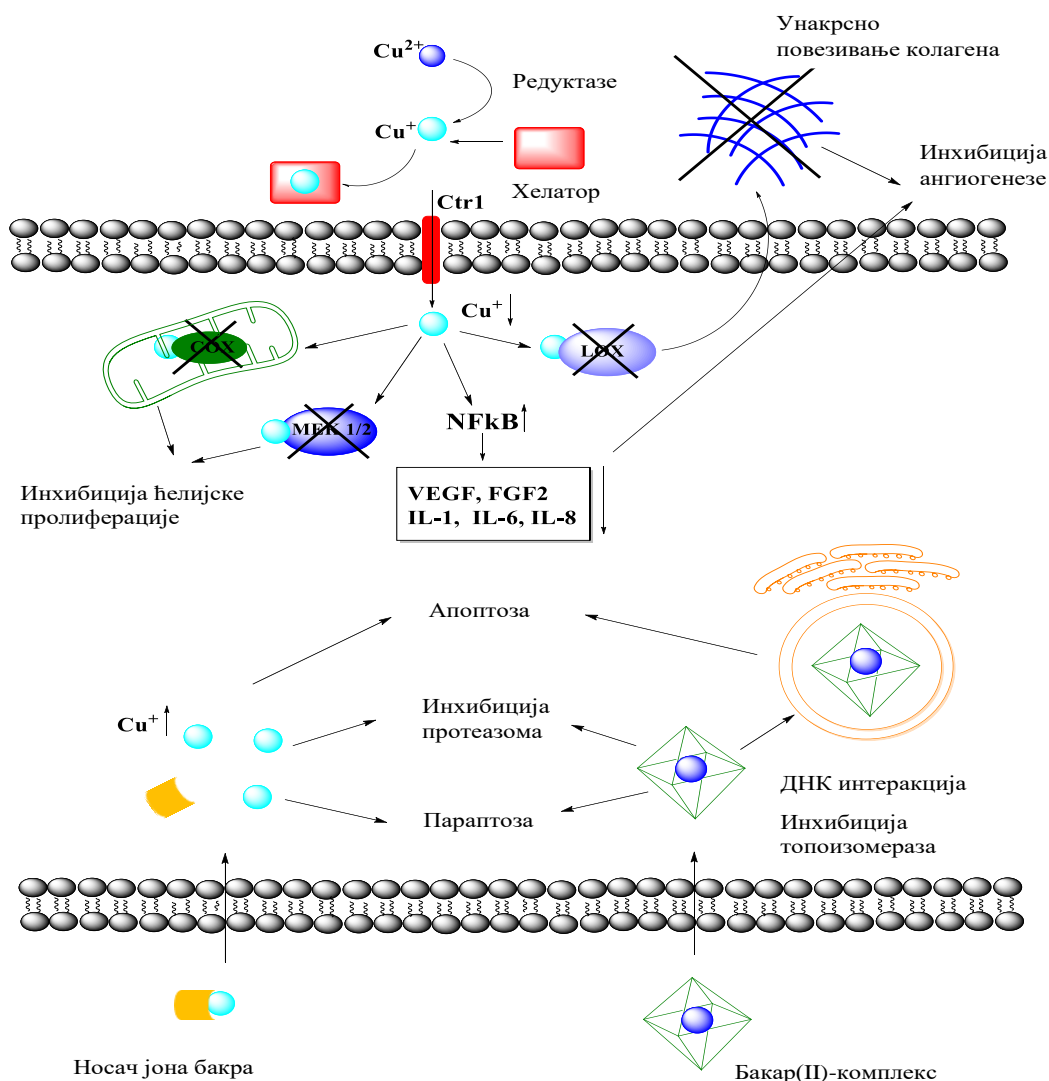
Слика 6. Могућа улога бакара у развоју карцинома

Мерење нивоа бакара у серуму особа оболелих од различитих врста карцинома може послужити као потенцијални биомаркер, с обзиром на то су забележене повећане серумске концентрације у лимфомима, сквамозном карциному, карциному плућа, леукемији, карциному дојке [70]. Механизми који доводе до повећања ове концентрације нису познати. До прогресије и раста карцинома више од 1-2 mm у пречнику долази услед активације стимулационих фактора ангиогенезе (васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF), фактор основног раста фибробласта, трансформишући фактор раста, цитокини) и њихове доминације у односу на инхибиторе (ангиостатин, ендостатин) [71,72]. И поред потврђених редокс активности и улоге у каскадној активацији слободних радикала, није потврђено да бакар може бити иницијатор развоја карцинома, али се показало да бакар има веома важну улогу у процесима ангиогенезе и бржем расту карцинома [73,74]. Метастаза карцинома се такође може повезати са повишеним концентрацијама бакара због његове значајне улоге у ангиогенези, која је основни предуслов метастатског потенцијала карцинома [75]. Међутим, бакар је неопходан и за активацију лизин

оксидазе која је важна у синтези колагена и еластина и доприноси расту и ширењу карцинома [76,77]. Показало се да је инактивација овог ензима потенцијални приступ у сузбијању метастаза карцинома [77].

### 1.4.3. Улога бакра у лечењу карцинома

Улога бакра у ангиогенези, повишена концентрација јона бакра у серуму и туморском ткиву оболелих особа, значај у активацији антиоксидативних ензима и имуног система и откриће комплексних једињења као потенцијалних хемиотерапеутика довели су до развоја троструког терапијског приступа (Слика 7) [78].



**Ctr1**-бакарни транспортер 1, **COX**-цитохром *c* оксидаза, **MEK ½**-митоген-активирана протеин киназа, **LOX**-лизин оксидаза, **NFkB**-нуклеарни фактор, **VEGF**-васкуларни ендотелни фактор раста, **FGF2**-фибробласни фактор раста, **IL**-интерлеукин

Слика 7. Терапијски приступ у лечењу карцинома [78]

Примена хелатора у смањењу концентрације бакра развијена је у циљу лечења Вилсонове болести, али се испитује и њихов утицај на контролу ангиогенезе и у спречавању раста и метастаза карцинома. Смањење интрацелуларне концентрације бакра утиче на функционисање ензима и концентрацију компоненти имуног система што заједно доводи до инхибиције ћелијске пролиферације, спречавање унакрсног повезивања колагена и инхибиције ангиогенезе [78] (Слика 7). Изазвани тумори мозга код зечева били су мањи, ограничени и слабо васкуларизовани у групи чија исхрана није имала довољне количине бакра и групи зечева на третману хелатором, пенициламином [79]. У мезотелиалним туморима мишева старости од шест до осам недеља мерен је ниво бакра атомском апсорпционом спектрофотометријом. Највеће концентрације су забележене у раном стадијуму развоја болести. Примена хелатора, пенициламина (2000  $\mu\text{g}$ ), триентина (700  $\mu\text{g}$ ) и тетратиомолибдата (500  $\mu\text{g}$ ) започета је при величини тумора од 20 до 25  $\text{mm}^2$  и бележи смањење концентрације бакра уз успоравање раста мезотелиома [80]. Значајни резултати претклиничких истраживања подстакли су клиничку примену хелатора код пацијената са метастатским карциномима различитог типа. Пацијенти са раним метастазама су имали позитиван исход примене тетратиомолибдата, али код пацијената са узнатредовалим метастазама резултат није био охрабрујућ [81].

Јонофоре имају улогу транспорта одређеног јона метала у ћелију услед чега долази до повећања његове биорасположивости. Механизми којима ова терапијска стратегија доводи до смрти канцерогене ћелије нису потпуно разјашњени, али се сматра да може доћи до инактивације протеазома или повећане концентрације слободних радикала и реактивних врста кисеоника (Слика 7) [78,82]. Дисулфирамин је јонофора која може да повећа концентрацију јона бакра у ћелијама карцинома. Његова првобитна клиничка примена је била у лечењу алкохолизма, али је управо при овој индикацији установљен и антиканцерогени потенцијал и започето детаљније клиничко проучавање [82].

Међу различитим синтетисаним комплексним једињењима бакра велики број је антитуморску активност остварио интеракцијом са молекулима ДНК, инхибицијом протеазома и инхибицијом топоизомераза (Слика 7). Комплекси овог јона метала могу довести до повећане производње реактивних врста кисеоника, слободних радикала, параптозе и апоптозе туморске ћелије [43,78].

## 1.5. Механизам дејства антитуморске активности бакар(II)-комплекса

Комплекси бабра имају шири спектар дејства и нижу токсичност од комплекса платине, што може да сугерише да је њихов механизам дејства другачији од комплекса платине који се ковалентно везују за ДНК [83]. Сматра се да су циљни путеви бакар(II)-комплекса који доводе до оштећења туморских ћелија првенствено ДНК молекула, али и топоизомеразе и протеазом (Схема 3) [43].



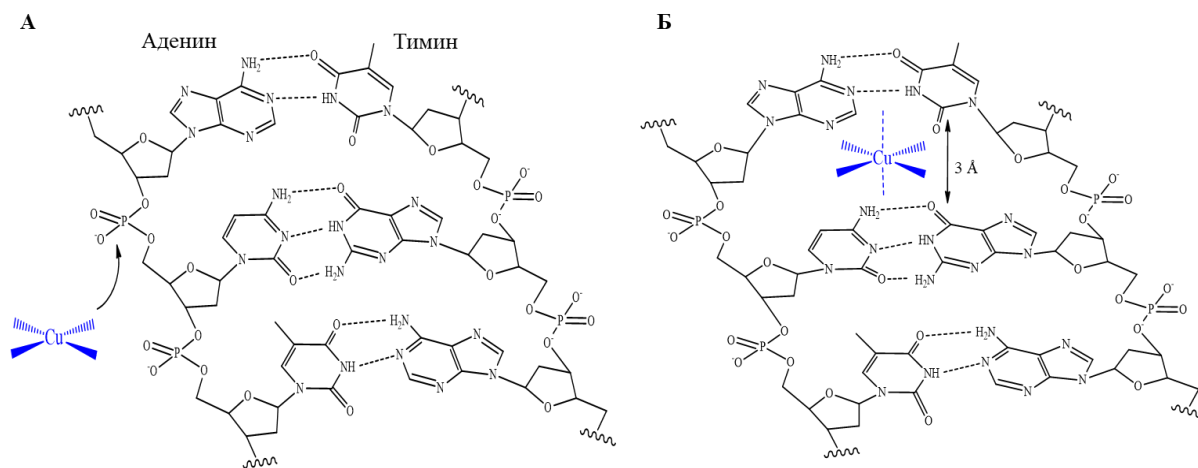
Схема 3. Механизам дејства бакар(II)-комплекса

Могућност интеракције једињења бабра и ДНК показана је кристалном структуром у којој се види да је бакар(II)-хлорид интераговао са молекулом ДНК, јер је дошло до везивања бабра за остатке гуанина на положају N7 [84]. За неке класе комплекса бабра установљени су и документовани начини интеракције са ДНК и сви су нековалентног

типа. У одређивању начина везивања физичко-хемијске карактеристике (планарност, хидрофобност, величина комплекса, геометријска структура) играју веома важну улогу [84-86].

Између два комплементарна ланца ДНК молекула поред парова база налазе се удубљења (жлебови) која су погодна места за везивање протеина и малих молекула. Разликује се велики (главни) жлеб ширине 22 Å и мали жлеб ширине 12 Å. Интеракција молекула и ДНК обавља се преко базних парова (G-C) у главном и (A-T) малом жлебу [84,87]. Углавном мали молекули, лекови при везивању за ДНК, преферирају интеракцију са малим жлебом, док се протеини и олигоелементи везују преко великог жлеба [88]. Селективност при избору места интеракције јавља се услед разлике у хемијским својствима, варијацијама у електростатичком потенцијалу, степенима хидратације, стерним ефектима... Лекови који на овај начин интерагују са ДНК обично имају карактеристичан облик полумесеца и изграђени су од неколико ароматичних хетероциклуса. Торзионе слободе унутар прстенастих система омогућавају молекулу да се прилагоди конформацији малог жлеба [87]. Непосредно пре везивања лека идентификују се погодне, специфичне секвенце ДНК молекула које заузимају распон од 16 до 18 базних парова [84]. Због већег електростатичког потенцијала и мањих стерних сметњи избор за интеракцију су А-Т секвенце. Интеракција се одвија формирањем водоничних веза између лека и А-Т базних парова [84,87], која се додатно стабилизује ван дер Валсовим (Van der Waals) интеракцијама [87].

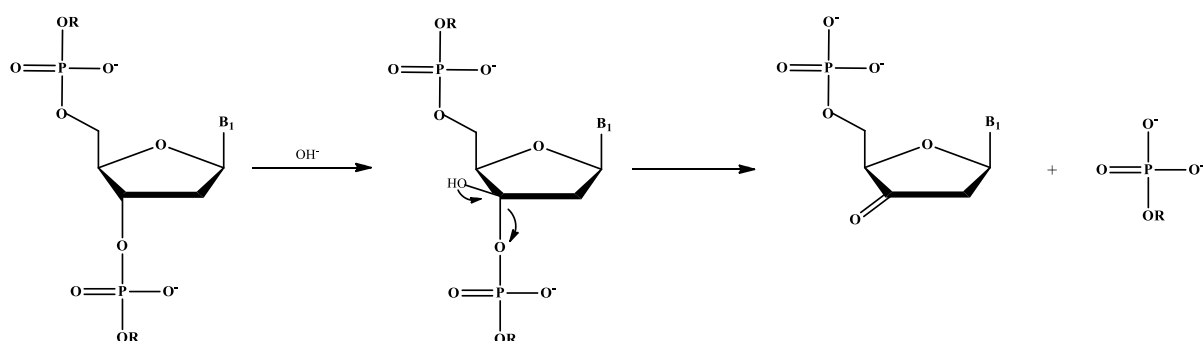
Интеркалацији, уметању комплексног молекула између суседних база ДНК, боље подлежу комплекси планарне геометријске структуре. Класични интеркалатори су планарни, ароматични катјони који имају могућност уметања под правим углом у двоструки хеликс. При овој интеракцији може доћи до продужетка ДНК молекула за око 3 Å [84,87]. Иако степен оштећења зависи од места интеракције, промене настале интеркалацијом су теже за ћелије у пролиферацији. Ово доприноси селективнијем деловању према канцерогеним ћелијама [84]. Потврђено је да је фосфат као део деоксирибозе специфична локација за приближавање комплекса (Слика 8А), а недавна истраживања показују да бакар(II)-комплекси бирају тимин-аденин-тимин секвенцу за почетак интеркалације. Процес се састоји од размицања суседних база и уметања комплексног једињења по аксијалним положајима (Слика 8Б) [89]. Главну улогу у одржању стабилности интеракције интеркалатора и ДНК молекула имају хидрофобне интеракције између ароматичних система лека и базних парова, али и електростатичке и водоничне везе доприносе стабилности [87].



Слика 8. (А и Б) Интеркалација бакар(II)-комплекса са молекулом ДНК

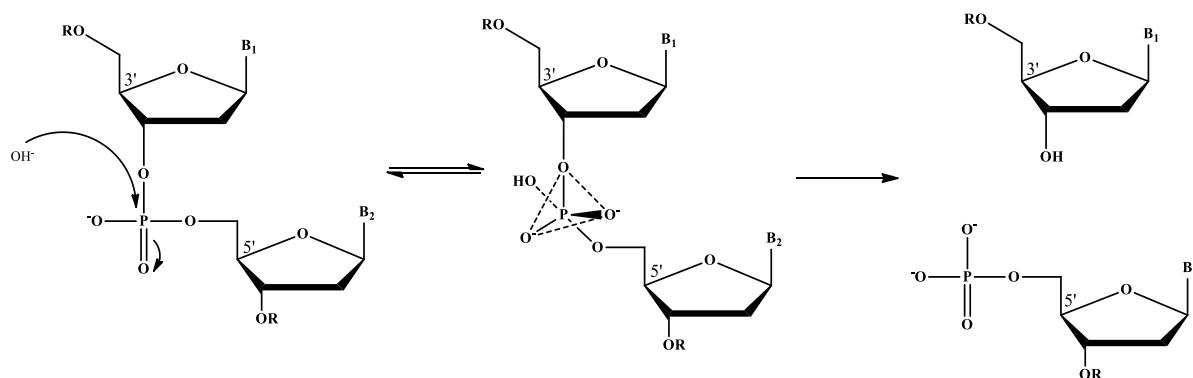
Електростатичке интеракције лека и ДНК молекула су углавном неспецифичне и дешавају се дуж спољашње стране ДНК хеликса. Овај вид интеракције може се јавити код металних катјона који помажу стабилизацији конформације ДНК. Органски катјони који се везују за жлеб или интеркалирају могу иницијално бити укључени у електростатичку интеракцију са негативно наелектрисаном фосфорном групом [85,87].

У неким ситуацијама бакар(II)-комплекси преузимају улогу хемијске нуклеазе и кроз оксидацију и хидролизу доводе до оштећења ДНК молекула. Оксидативно цепање укључује оксидацију деоксирибозе и оксидацију нуклеобаза и најчешће је фотоиндуковано или под дејством слободних радикала, односно реактивних кисеоничних врста [43,84]. Није селективан процес, већ може обухватити и угљенохидратне сегменте и нуклеинску основу. Обично се оксидација врши на С3' деоксирибозе (Слика 9) или је на нивоу нуклеобаза мета гуанин, због нижег оксидационог потенцијала [84].



Слика 9. Оксидативно оштећење молекула ДНК

При хидролитичком оштећењу молекула ДНК долази до цепања фосфодиестарских веза и раздвајања сегмената у присуству воде. Овај механизам је убрзан катализатором, односно металним јоном који може активирати напад нуклеофила ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^-$ ) [43,84]. Сматра се да при хидролизи нуклеофил напада фосфатни део при чему се формира координативни систем (КБ = 5) у коме затим долази до одвајања  $5'\text{PO}$  или чешће  $3'\text{PO}$  дела (Слика 10.) [84].



Слика 10. Хидролитичко оштећење молекула ДНК

Протеазоми су протеински комплекси који се налазе у једру и цитоплазми еукариотских ћелија и врше разградњу сувишних и оштећених протеина разлагањем њихових пептидних веза. Пре него што се изврши деградација, циљани протеин се обележава малим протеином, убиквитином, како би тако обележен био препознат од стране протеазома и разграђен у његовом активном месту. Протеазом се састоји од активног центра у коме се налазе пептидазе и два регулаторна молекула, капе које се налазе на крајевима и регулишу улазак протеина [90]. Протеазом представља део значајног механизма који регулише концентрацију протеина у ћелији. Активност овог система је укључена у многе ћелијске функције и од примарног је значаја за раст и метастазу карцинома. Канцерогене ћелије су осетљивије на инхибицију протеазома од нормалних ћелија што омогућава повољну стратегију у антиканцерогеној терапији и потенцијал у развоју нових лекова [43,91,92].

Антитуморско дејство бакар(II)-комплекси остварују и инхибицијом топоизомераза I и II [43,92], ензима који су неопходни за процес репликације ДНК. Топоизомераза I прекида један ланац двоструког хеликса, долази до релаксације и на крају до повезивања одвојенаг дела ланца ДНК, док топоизомераза II прекида оба ланца, које након релаксације повезује. Због значаја који имају у процесу репликације и

транскрипције, нуклеарне топоизомеразе су важни циљеви у хемиотерапији рака и представљају значајан терапијски приступ [93].

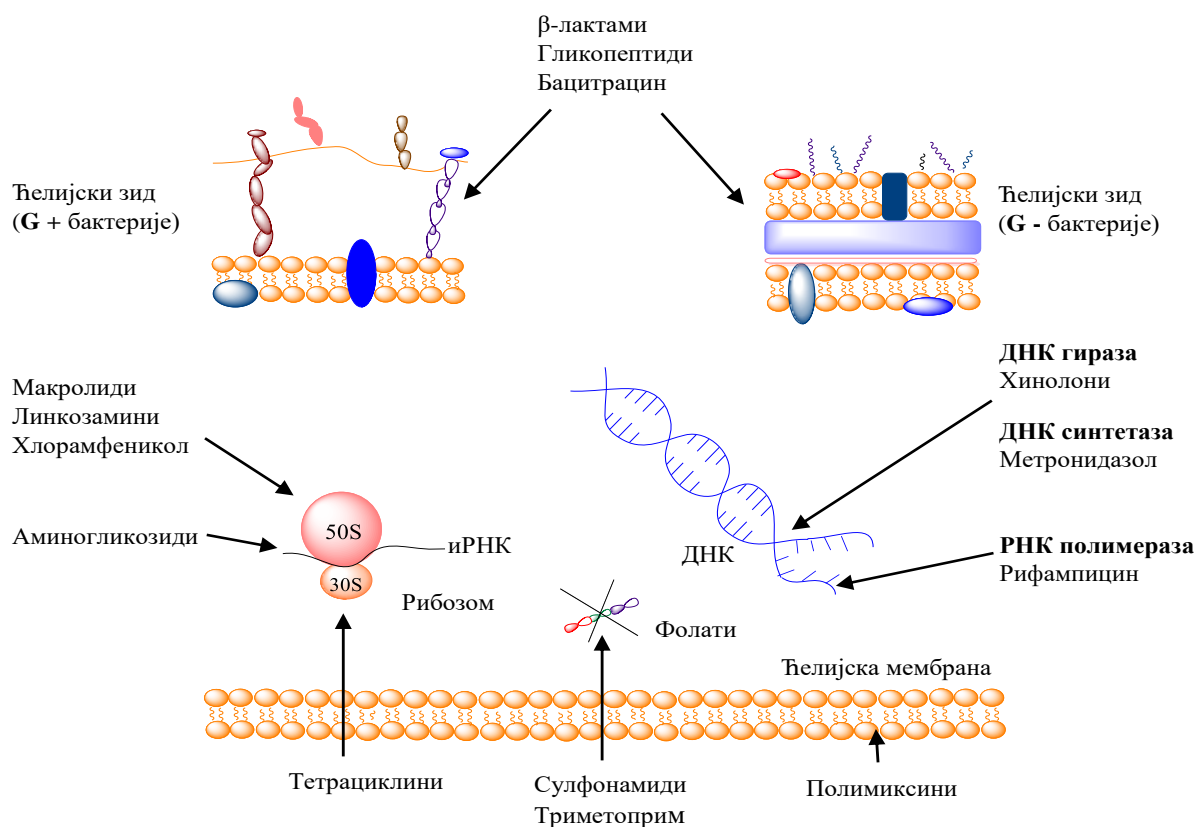
У зависности од врсте оштећења и немогућности сепарације истог у туморској ћелији се могу активирати сигнални путеви апоптозе, односно може доћи до ћелијске смрти. Сам процес апоптозе је контролисан, ограничен на појединачне ћелије и није праћен запаљењем за разлику од некрозе. Иницијалну фазу у апоптози могу имати спољашњи или унутрашњи фактори који доводе до оштећења ћелије, супстанце које се везују и активирају рецепторе на ћелијској мембрани или на једру или одсуство фактора раста, цитокина и хормона који су потребни за преживљавање [94]. Најзначајнији мембрански рецептори у активацији апоптозе су рецептори за цитокин, фактор некрозе тумора [94-96]. У фази контроле и интеграције долази до покретања процеса ћелијске смрти или до блокирања и одлагања ћелијске смрти. Уколико се не одложи ћелијска смрт, активирају се ензими који регулишу функцију митохондрија које постају пропустљивије услед чега долази до ослобађања цитохрома *c* и покретања апоптозе. Различити механизми настанка апоптозе завршавају се активацијом протолитичких ензима, каспаза, који разлажу ћелијске компоненте и формирају се апоптотска тела која се уклањају процесом фагоцитозе [94].

Многе класе комплекса бакра су синтетисане и *in vitro* проучене, са циљем да се развије потенцијални лек, али је само мали број доспео у претклиничка испитивања [43]. Истраживања за сада показују да антитуморска својства комплекса бакра углавном зависе од природе лиганата и дозорских атома, али се испитују и разлике у активности комплекса бакра(I) и бакра(II). Установљено је да се координовање бакра са лигандима најчешће остварује преко дозорских атома O, N, S и P. Значајну цитотоксичну активност показали су комплекси бакар(II)-јона који као лиганде садрже полидентатне Шифове базе, петочлане ароматичне хетероцикле (имидазол, пиразол, триазол) или шесточлане ароматичне хетероцикле (бипиридин-*bipy*) и терцијарне фосфине [26,43]. Већи потенцијал од *цисплатине* постигли су бинуклеарни комплекси бакра који се везују за два суседна фосфата на ДНК молекулу и доводе до инхибиције синтезе ДНК и смрти туморских ћелија различитог типа [43].



## 1.6. Антимикробна активност

Живе организме, изазиваче инфекција, можемо поделити према ћелијским карактеристикама на прокариоте и еукариоте. Ћелије прокариотских организама не садрже једру за разлику од ћелија еукариота. У поређењу са осталим паразитима бактерије проузрокују највећи број инфекција. Класификација бактерија на Грам-позитивне и Грам-негативне заснована је на њиховом различитом реаговању у присуству специфичних комбинација боја које је последица другачије грађе ћелијског зида. Грам-позитивне бактерије имају ћелијски зид једноставније структуре, од 15 до 50 nm дебљине, који се највећим делом састоји од пептидогликана (око 50%) и киселих полимера (40-45%), док протеина и полисахарида има од 5 до 10%. Ћелијски зид Грам-негативних бактерија је знатно сложеније структуре. Спољашњи део плазматске мембране окружује периплазматски простор, тањи пептидогликански слој и спољашња мембрана на чијој се површини налазе сложени полисахариди [97-99] (Слика 11).

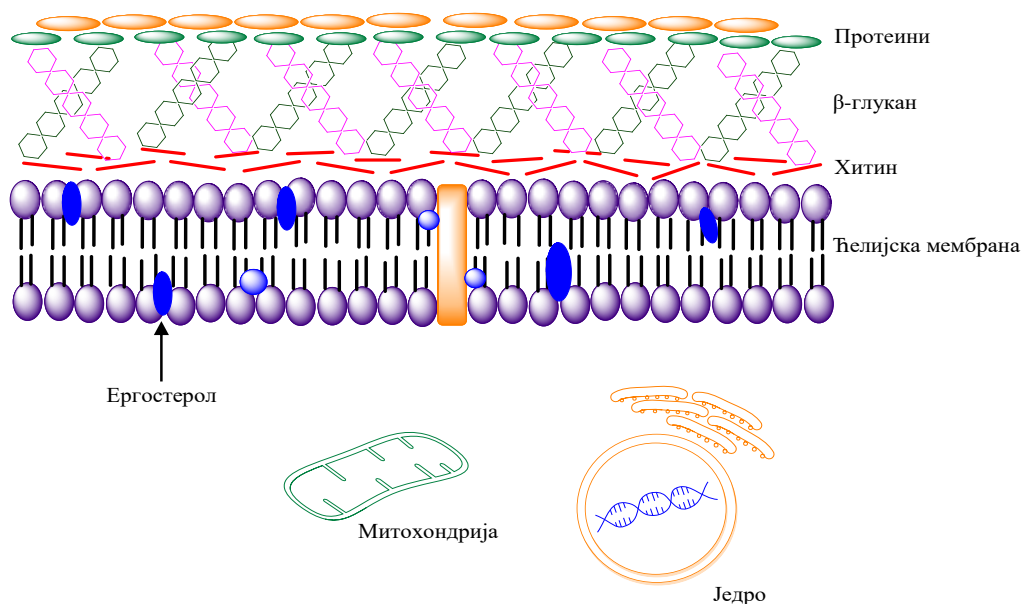


Слика 11. Механизам дејства антибиотика

Након открића антибиотика, хемијских једињења која стварају живи организми и који и при малим концентрацијама заустављају животне процесе у микроорганизмима, постигнути су значајни успеси у лечењу великог броја инфекција. Ови лекови могу да утичу на раст бактерије (бактериостатици) или могу да убијају бактерије (бактерициди). Антибиотици и синтетисани антимикиробни лекови своје дејство могу остварити утицајем на различите компоненте бактеријске ћелије (Слика 11).

Антибиотици из групе  $\beta$ -лактама (пеницилини, цефалоспорини, монобактами и карбапенеми) своје дејство испољавају спречавајући синтезу пептидогликана у ћелијском зиду бактерије. Они инхибирају транспептидациони ензим који унакрсно повезује пептидне ланце на основну структуру пептидогликана, а финални догађај је инактивација инхибитора аутолитичких ензима у ћелијском зиду, односно бактерицидно дејство. Бацитрацин и гликопептидни антибиотици такође инхибирају синтезу ћелијског зида, али се механизам дејства разликује од  $\beta$ -лактама [92,100]. Инхибиција синтезе протеина у бактеријској ћелији се остварује преко инактивације једне од подјединица рибозома. Тетрациклини своје бактериостатско дејство остварују везивањем за 30S субјединице рибозома, док се макролидни антибиотици, линкозамински антибиотици и хлорамфеникол везују за 50S субјединице. Аминогликозиди такође инхибирају синтезу бактеријских протеина, али тако што ометају везивање информационе РНК за рибозоме. Иако нису антибиотици у ужем смислу те речи, јер се добијају синтетским путем, сулфонамиди су веома значајни бактериостатици. Своје дејство остварују тако што инхибирају дихидроптероат синтетазу, спречавајући тако синтезу фолне киселине у бактеријској ћелији, која није у могућности да користи егзогену фолну киселину као хумане ћелије. Триметоприм такође спречава синтезу фолне киселине, али инхибицијом дихидрофолат редуктазе. Хинолони, синтетски антимикиробни лекови, инхибирајући ДНК гиразу делују бактерицидно. Циљно место дејства за полимиксине је ћелијска мембрана, док рифампицин блокира синтезу РНК у бактеријској ћелији [92].

Гљивичне инфекције, микозе, се могу поделити на површинске и системске гљивичне инфекције. Антигљивични лекови своје фунгистатско или фунгицидно дејство најчешће испољавају утицајем на синтезу нуклеинских киселина, синтезу ергостерола, синтезу ћелијског зида или дејством на ћелијску мембрану (Слика 12) [92,101].



Слика 12. Потенцијална места дејства антигљивичних лекова

Амфотерицин Б и нистатин су полиенски антибиотици који се везују за стеролне остатке у ћелијској мембрани гљивица што доводи до промена пермеабилности и транспортних функција мембране. Флуцитозин је синтетски антигљивични лек који се интрацелуларно преводи у активну форму, 5-флуороурацил, инхибитор ензима тимидилат синтазе. Синтезу ергостерола који је потребан за интегритет мембране ометају лекови из групе имидазола и триазола, док каспофунгин инхибира синтезу глуканске компоненте. Гризеофулвин је антибиотик који се везује за аднексе коже и кератин којим се гљивице хране и на тај начин уносе. Када доспе у ћелију везује се за микротубуле и ремети његову функцију [92,102].

Повећање броја гљивичних и бактеријских инфекција и све чешћа појава резистенције бактерија на антибиотике, као последица њихове повећане и нерационалне примене, довели су до развоја нових антимикуробних агенаса [102].

### 1.6.1. Антимикробно дејство $\text{Cu(II)}$ -јона и бакар(II)-комплекса

Јони различитих метала могу испољити токсичан ефекат на микроорганизме. Механизам којим доводе до антимикуробног дејства углавном зависи од врсте метала и обухвата дисфункцију протеина, производњу реактивних врста кисеоника, оштећење ћелијске мембране, интеракцију са храњивим материјама микроорганизма и

генотоксичност [103]. Токсична концентрација бакар(II)-јона доводи до стварања реактивних врста кисеоника, односно изазива оксидативни стрес. Сматра се да бакар катализује Фентонску реакцију или катализује настанак хидроксилних радикала. Бактерије и квасци који су изложени повишеним концентрацијама јона бакра повећавају регулацију гена који су укључени у процес елиминације слободних радикала и реактивних једињења [103,104]. Протеини микроорганизама су значајна мета за дејство бакра, вероватно везивањем за цистеин, што може довести до стварања протеин дисулфида и смањења антиоксидативних резерви, посебно глутатиона. Истраживања показују да се интегритет ћелијске мембране озбиљно може нарушити токсичним дејством јона метала, али се не може са сигурношћу рећи да овакво оштећење може да доведе до смрти ћелије. Бакар(II)-јон испољава токсично дејство пероксидацијом липида ћелијске мембране бактерија и квасаца и тако доприноси антимикуробном дејству. Биохемијски механизми липидне пероксидације дефинисани су за мембране еукариота које садрже висок проценат полинезасићених масних киселина, док су мембране бактерија изграђене од мононезасићених масних киселина. Због тога се не може сматрати да је овај начин дејства јона довољан да делује микробицидно [103].

Липофилна комплексна једињења лакше пролазе кроз ћелијски зид бактерија. Хелатизацијом се повећава липофилност што доприноси повећању антимикуробног дејства [105]. Комплексна једињења која садрже лиганде са N и O као донорским атомима остварују антибактеријски ефекат инхибицијом ензимске активности [106,107], а антимикуробном ефекту доприноси и постојање хидроксилних група [108]. Биолошка активност се остварује формирањем водоничних веза између донорских атома комплексних једињења са активним центрима различитих ћелијских компоненти при чему се ремете нормални процеси у бактеријској ћелији. Употреба антибиотика као лиганата при комплексирању са металним јонима може довести до повећања антимикуробне активности уз смањење резистенције [109]. Комплекси са хетероцикличним Шифовим базама могу бити значајни антимикуробни агенси. Одликују се стабилношћу и липофилношћу која се повећава услед делокализације  $\pi$ -електрона у хелатном прстену [110].

## **2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ**

На основу досадашњих сазнања постављене су следеће радне хипотезе истраживања:

- Реакцијом синтетисаних  $\beta$ -аминокиселина и бакар(II)-нитрата наглашена су комплексна једињења чији састав и структуру потврђују резултати елементарне микроанализе, инфрацрвене спектроскопије, електронско-парамагнетне-резонанције и рендгенске структурне анализе.
- При физиолошким условима долази до интеракције синтетисаних комплекса са молекулима СТ-ДНК (енгл. calf thymus) и НТ-ДНК (енгл. herring testes).
- Комплекси бакар(II) са  $\beta$ -аминокиселинама показују одређену антимикуробну и антитуморску активност.

Како би се испитала тачност наведених хипотеза дефинисани су следећи циљеви истраживања:

- Синтеза  $\beta$ -аминокиселина (2-(1-аминоциклохексил)сирћетне киселине – **Л1** и 2-(1-амино-4-(*tert*-бутил)циклохексил)сирћетне киселине – **Л2**) и одговарајућих комплекса бакар(II) са лигандима **Л1** и **Л2**.
- Структуре синтетисаних лиганата потврдити на основу инфрацрвене и нуклеарно-магнетно-резонантне спектроскопије.
- Структуре синтетисаних комплексних једињења претпоставити на основу резултата елементарне микроанализе, инфрацрвене спектроскопије и електронско-парамагнетне-резонанције.
- Структуре комплексних једињења потврдити на основу резултата рендгенске структурне анализе, ако за то постоји могућност.
- Могућност интеракције новосинтетисаних комплекса са молекулима СТ-ДНК и НТ-ДНК утврдити на основу кинетичких мерења, апсорпционо спектроскопских мерења, флуоресцентних мерења и мерења вискозитета ДНК раствора.
- Испитати потенцијалну биолошку активност (антимикуробну и антитуморску) комплекса бакар(II) са  $\beta$ -аминокиселинама.

## **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД**

### 3.1. Синтеза лиганада

Бидентатни лиганди,  $\beta$ -аминокиселине (2-(1-аминоциклохексил)сирћетна киселина – **Л1** и 2-(1-амино-4-(*terc*-бутил)циклохексил)сирћетна киселина – **Л2**), добијени су реакцијом циклохексанона (за **Л1**) или 4-*terc*-бутилциклохексанона (за **Л2**), малонске киселине и амонијум-ацетата у молском односу 1:1:1. Како би се уклонио угљен-диоксид, смеша циклохексанона (1 mol) или деривата циклохексанона (1 mol), малонске киселине (114,4 g) и амонијум-ацетата (177,1 g) у бутанолу (600 mL) рефлуктована је у периоду од 1,5h до 3h. Дестилацијом су уклоњена испарљива једињења чија је температура кључања до 135°C. Реакциона смеша је разблажена бутанолом (300 mL), а затим је поновљена дестилација у вакууму под притиском од 10 до 20 mmHg и температуром до тачке кључања дестилата (128-130°C). Добијено вискозно уље је охлађено до 20°C, третирано ацетоном (700 mL) уз мешање и остављено да одстоји најмање 10h. Синтетисане аминокиселине су одвојене филтрирањем, испиране ацетоном и сушене на 100°C. Поступак синтезе лиганада вршен је према публикованој процедури [6].

#### 2-(1-аминоциклохексил)сирћетна киселина – **Л1**

**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3424, 2945, 2166, 1619, 1570, 1492, 1467, 1383, 1266, 1200, 1133, 1060, 946, 899, 764, 717, 603.  **$^1\text{H NMR}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 1,25-1,47 (m, 6H, 3 $\text{CH}_2$ ), 1,47-1,58 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ), 2,09 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 42,5 (C-), 48,0 ( $\text{CH}_2$ - од сирћетне киселине); 41,2; 21,9; 22,6 ( $\text{CH}_2$ - од циклохексил групе); 177,3 (COOH).

#### 2-(1-амино-4-(*terc*-бутил)циклохексил)сирћетна киселина – **Л2**

**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3433, 2954, 2153, 1639, 1583, 1506, 1466, 1395, 1364, 1336, 1262, 1173, 1055, 950, 901, 764, 714, 623.  **$^1\text{H NMR}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 2,41 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,52-1,75 (m, 8H, 4 $\text{CH}_2$ ), 1,41 (s, H, CH), 0,49 (m, 9H, 3 $\text{CH}_3$ ).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 42,8 (C- од циклохексил групе), 48,0 ( $\text{CH}_2$ - од сирћетне киселине); 20,7; 39,6 ( $\text{CH}_2$ - од циклохексил групе); 32,5 (CH- од циклохексил групе); 27,6 ( $\text{CH}_3$ - од *terc*-бутил групе); 177,3 (COOH).



## 3.2. Синтеза комплексних једињења

Комплекс бабра(II) са 2-(1-аминоциклохексил)сирћетном киселином – **K1** и комплекс бабра(II) са 2-(1-амино-4-(*terc*-бутил)циклохексил)сирћетном киселином – **K2** синтетисани су директном реакцијом бакар(II)-нитрата трихидрата,  $\beta$ -аминокиселине (**L1** или **L2**) и литијум-хидроксида у стехиометријском молском односу 1:2:2.

### 3.2.1. Поступак синтезе комплекса бабра(II) са **L1** лигандом, 2-(1-аминоциклохексил)сирћетном киселином

Бакар(II)-нитрат трихидрат (0,1000 g, 0,4139 mmol) растворен је у дестилованој води (10 mL). Овом раствору је постепено додата  $\beta$ -аминокиселина (**L1** (0,1301 g, 0,8278 mmol)). Реакциона смеша је загревана на воденом купатилу уз мешање током 3h. Током овог периода је у малим количинама додавано 10 mL раствора литијум-хидроксида (0,0199 g, 0,8278 mmol). Раствор је затим филтриран и упарен до малих запремина, при чему је дошло до издвајања плавих кристала.

Принос: 0,1256 g (80,75%); **K1** =  $\text{CuC}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$  (M<sub>r</sub> = 375,95).

Израчунато: C, 51,12%; H, 7,51%; N, 7,45%. Нађено: C, 51,27%; H, 7,42%; N, 7,42%.

**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3375, 3293, 3243, 2933, 2865, 1576, 1408, 1375, 1198, 1139, 1065, 957, 804, 730, 678.

### 3.2.2. Поступак синтезе комплекса бабра(II) са **L2** лигандом, 2-(1-амино-4-(*terc*-бутил)циклохексил)сирћетном киселином

Бакар(II)-нитрат трихидрат (0,1000 g, 0,4139 mmol) растворен је у дестилованој води (10 mL). Овом раствору је постепено додата  $\beta$ -аминокиселина (**L2** (0,1766 g, 0,8278 mmol)). Реакциона смеша је загревана на воденом купатилу уз мешање током 3h. Током овог периода је у малим количинама додавано 10 mL раствора литијум-хидроксида (0,0199 g, 0,8278 mmol). Раствор је затим филтриран и упарен до малих запремина. Добијени талог комплекса одвојен је цеђењем, испиран дестилованом водом и сушен на ваздуху.

Принос: 0,1581 g (78,24%); **K2** =  $\text{CuC}_{24}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_4$  (M<sub>r</sub> = 488,16).

Израчунато: C, 59,05%; H, 9,08%; N, 5,74%. Нађено: C, 58,98%; H, 9,01%; N, 5,69%.

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3369, 3297, 3239, 2949, 2866, 1577, 1448, 1429, 1408, 1326, 1209, 1176, 1121, 1109, 993, 973, 959, 900, 733, 680.

### 3.3. Инструментална мерења

#### 3.3.1. Елементална микроанализа

Елементална микроанализа урађена је на Хемијском факултету Универзитета у Београду на апарату *Vario III C, H, N, S Elemental Analyzer* у *CHS* моду.

#### 3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија

Снимање инфрацрвених спектра лиганата и комплекса урађено је на спектрофотометру *Perkin-Elmer FTIR 31725X* применом технике КВг пилуле на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу.

#### 3.3.3. Нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија

Снимање нуклеарно-магнетно-резонантних спектра ( $^1\text{H}$  NMR и  $^{13}\text{C}$  NMR) лиганата је спроведено помоћу спектрофотометра *Varian Gemini-200 NMR* на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу. За растварање лиганата се користи  $\text{CDCl}_3$ , а хемијска померања су утврђена у односу на стандард тетраметилсилан (ТМС).

#### 3.3.4. Електронска-парамагнетна-резонанција

Спектри електронско-парамагнетне-резонанције (9,8 GHz) снимљени су на Физичком факултету Универзитета у Београду употребом *Bruker Elexsys II 540 EPR* спектрофотометра. Снимање је спроведено на собној температури, микроталасној снази од 6,325 mW, амплитуди модулације од 5 G, фреквенци модулације од 100 kHz и времену конверзије од 240 ms. Узорци (30  $\mu\text{l}$ , 0,5 mM) су припремљени растварањем комплекса у дејонизованој води (18 M $\Omega$ ). Спектри су снимљени и анализирани помоћу *Bruker Xepc* софтвера.

### 3.3.5. Рендгентска структурна анализа

Кристал (**K1**) погодан за рендгенску структурну анализу добијен је спором кристализацијом из воденог раствора испаравањем при собној температури у лабораторији за Фармацију, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Рендгенска структурна анализа кристала је извршена анализом X-зрака на Институту за хемију, Универзитета Р. Ј. Šafárik у Кошицама, Словачка.

Кристална структура **K1** утврђена је на *Oxford Diffraction Xcalibur2* дифрактометру који је опремљен детектором *Sapphire2 CCD* и користи графитну монохроматску МоКа радијацију ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ). *Crysalis CCD [111]* је коришћен за прикупљање података, док је *Crysalis RED [111]* коришћен за прецизирање ћелија, редукцију података и корекцију апсорпције. Структура је решена помоћу *SUPERFLIP [112]*, док је *Fourier* синтеза урађена коришћењем *SHELXL2013 [113]* и имплементирана у програму *WinGX [114]*. Анизотропски дислокацијски параметри су прочишћени за све атоме, осим водоникових. Анализа растојања и углова везе извршена је помоћу *SHELXL2013. DIAMOND [115]* је коришћен за молекуларну графику.

Комплекс **K1** кристалише у просторној групи  $P2_1/c$  моноклиничног кристалног система. Како би се одредили параметри јединичне ћелије употребљено је 4854 измерених рефлексија у области  $3,218^\circ < \Theta < 26,498^\circ$ . Преглед резимеа рендгенске дифракције и пречишћавање структуре за **K1** дат је у Табели 4.

Табела 4. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре *K1*

Емпиријска формула	$C_{16}H_{40}CuN_2O_{10}$	Кристална величина ( $mm^3$ )	0,1791-0,1594-0,1009
Молекулска маса (g/mol)	484,04	Запремина ( $\text{\AA}^3$ )	1081,95(12)
Температура (К)	173(2)	Густина ( $mg/m^3$ ) (израчунато)	1,486
Таласна дужина ( $\text{\AA}$ )	0,71073	Независне рефлексије	2243 [ $R(int) = 0,0197$ ]
Јединична ћелија <i>a</i> ( $\text{\AA}$ )	12,5128(8)	Фактори слагања <b>F2</b>	$R1 = 0,0319, wR2 = 0,0844$
Јединична ћелија <i>b</i> ( $\text{\AA}$ )/ $\beta$ ( $^\circ$ )	7,5423(3) / 115,544(7)	Финални <b>R</b> индекси	$R1 = 0,0399, wR2 = 0,0885$
Јединична ћелија <i>c</i> ( $\text{\AA}$ )	12,7063(7)	Метода побољшања	Пуна матрица најмањих квадрата на $F^2$
<b>F</b>	518	Подаци/ограничења/ параметри	2243 / 0 / 133

### 3.4. Испитивање стабилности комплексних једињења

Стабилност комплексних једињења је испитивана на Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу. Оба комплекса (**K1** и **K2**) су растворена у води, 10% раствору DMSO и у раствору PBS пуфера, тако да је концентрација сваког раствора била  $1 \cdot 10^{-4}$  М. Пре снимања UV-Vis спектра на UV-Vis спектрофотометру раствори комплексних једињења су стајали 1 h на собној температури. Стабилност комплекса **K1** и **K2** у раствору PBS пуфера измерена је и у временским интервалима од 0, 24 и 48 h коришћењем UV-Vis апсорпционог спектроскопског поступка.

### 3.5. Интеракција синтетисаних комплекса са ДНК

Интеракција комплексних једињења (**K1** и **K2**) са молекулом ДНК испитана је на Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

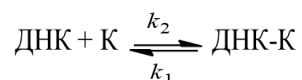
#### 3.5.1. Припрема реагенаса

СТ-ДНК, НТ-ДНК и етидијум бромид (EtBr) су набављени од *Sigma Chemicals Co.* (САД). Њихови раствори су припремљени коришћењем редестиловане воде. За подешавање рН вредности раствора ДНК на 7,2 употребљен је 0,01 М фосфатни пуфер (*Sigma Aldrich*). Истим пуфером су растворени комплекси (**K1** и **K2**) и направљени су  $1 \cdot 10^{-4}$  М раствори. Раствор ДНК није садржао протеине што потврђује однос UV апсорбанци између 1,8 и 1,9 ( $A_{260}/A_{280}$ ) на 260 nm и 280 nm. Концентрација раствора ДНК је одређена помоћу UV апсорбције на 260 nm ( $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Припремљени раствори су чувани на 277 K и коришћени у року од 5 дана.

#### 3.5.2. Кинетичка мерења

Механизам и кинетика супституционих реакција комплексних једињења (**K1** и **K2**) са молекулима СТ-ДНК и НТ-ДНК испитана је на *Stopped-flow* спектрофотометру (*Applied Photophysics*) у PBS (Фосфатни пуфер = 0,01 М,  $c(\text{NaCl}) = 0,137$  М,

$c(\text{KCl}) = 0,0027 \text{ M}$ ). Реакције супституције комплекса са СТ-ДНК и НТ-ДНК могу бити представљене реверзибилном хемијском реакцијом 1.



### Хемијска реакција 1.

Са К су означени **K1** или **K2**, ДНК је СТ-ДНК или НТ-ДНК,  $k_2$  је константа брзине другог реда за директну реакцију, која карактерише формирање производа, а  $k_1$  је константа брзине повратне реакције.

Све реакције су рачунате као реакције *pseudo*-првог реда на температури од 310 К и радној таласној дужини од  $\lambda = 260 \text{ nm}$ . Супституционе реакције започеле су када су се исте запремине раствора комплекса и ДНК из одвојених шприцева брзо помешале у комори *Stopped-flow* спектрофотометра. Температура оба погонска шприца, ћелија и комора за мешање одржавана је на 310 К. Како би се обезбедили услови реакције *pseudo*-првог реда концентрација ДНК је била најмање 10 пута већа у односу на концентрацију комплекса. Константа брзине *pseudo*-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , одређена је праћењем промене апсорбције раствора  $A_t$  са временом  $t$  на одређеној таласној дужини, на основу Једначине 1.

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

### Једначина 1.

Зависност  $\ln(A_t - A_\infty)$  од времена  $t$  је линеарна, тако да се из нагиба праве добија вредност за  $k_{\text{obsd}}$ . Величина  $A_\infty$  представља апсорбцију након „бесконечно” дугог временског интервала (обично после 8-10 полувремена реакције). Добијене константе представљају просечну вредност од четири до шест независних кинетичких мерења. Сва израчунавања извршена су помоћу компјутерског програма *Microsoft Excell 2010* и *OriginPro 8*.

### 3.5.3. Апсорпциона спектроскопска мерења

Интеракција комплекса (**K1** и **K2**) са ДНК одређена је на основу вредности константе везивања ( $K_b$ ) добијене помоћу UV-Vis спектrophотометрије. UV-Vis спекри су снимани на Perkin Elmer Lamda 35 или 25 double-beam спектrophотометру опремљеним са термостатираном кварцном Suprasil киветом (1,00 cm, 3 mL). Апсорпциона мерења су вршена у фосфатном пуферу (0,01 M, pH = 7,2). Серија раствора комплекс-ДНК је припремљена мешањем раствора комплекса константне концентрације (8  $\mu$ M) са инкрементима ДНК полазног раствора (1,25 mM). Како би се квантитативно упоредила јачина везивања комплекса, вредности константе везивања ( $K_b$ ) су одређене праћењем промена у апсорпцији на MLCT опсегу при повећању концентрације СТ-ДНК и НТ-ДНК помоћу једначине 2.

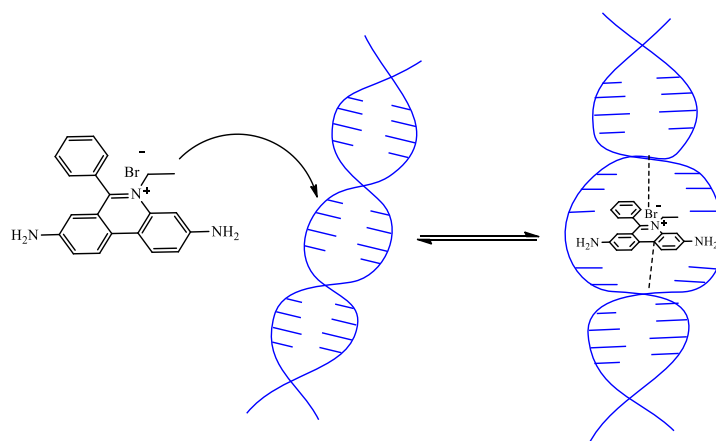
$$[\text{ДНК}]/(\epsilon_A - \epsilon_f) = [\text{ДНК}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]$$

*Једначина 2.*

Вредност константе  $K_b$  одређује се из односа нагиба и одсечка праве зависности  $[\text{ДНК}]^{-1}(\epsilon_A - \epsilon_f)$  од  $[\text{ДНК}]$ , где је  $\epsilon_A = A_{\text{obsd}}/[\text{комплекс}]$ ,  $\epsilon_f$  је коефицијент екстинкције за слободан комплекс и  $\epsilon_b$  је коефицијент екстинкције за комплекс у потпуно везаном облику.

### 3.5.4. Флуоресцентна мерења

Интеракција комплекса са СТ-ДНК и НТ-ДНК испитана је и на основу флуоресцентне спектроскопије. Флуоресцентна мерења су урађена на RF-1501 PC спектrophлуориметру (Shimadzu, Јапан) у опсегу од 550 до 750 nm (527 nm). Ширина ексцитационог и емисионог прореза (10 nm) и брзина снимања су константне за све експерименте. Интензитет флуоресценције је мерен на таласној дужини ексцитације (527 nm), а флуоресцентне емисије на 612 nm. У циљу додатног утврђивања способности везивања комплекса за ДНК испитиване су интеракције комплекса са ДНК у присуству EtBr. Овај планарни, катјонски молекул врши јаку интеркалацију између суседних база ДНК молекула (Слика 11) што доводи до емисије интензивне флуоресценције на око 600 nm.



Слика 11. Комплекс етидијум бромида и молекула ДНК

Јачина флуоресценције се може смањити након додавања другог молекула који би могао заменити EtBr у комплексу са ДНК или разградити секундарну структуру ДНК. Раствор ДНК-EtBr комплекса се припрема мешањем 50  $\mu\text{M}$  EtBr и 50  $\mu\text{M}$  ДНК, а затим се конкурентност испитује додатком раствора синтетисаних комплексних једињења ( $\text{pH} = 7,2$ ). Снимањем промене флуоресцентног емисионог спектра испитани су ефекти везивања комплекса за ДНК након додавања раствора комплекса (0-80  $\mu\text{M}$ ) у раствор ДНК-EtBr и периода инкубације од 5 минута.

Релативно везивање комплекса са СТ-ДНК и НТ-ДНК одређено је израчунавањем *Stern-Volmer* константне ( $K_{sv}$ ) из нагиба правих линија добијених из *Stern-Volmer* једначине (Једначина 3.)

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[Q]$$

Једначина 3.

$I_0/I$  представља интензитет емисије у одсуству и присуству комплекса (**K1** и **K2**),  $[Q]$  је укупна концентрација комплекса, а  $K_{sv}$  је *Stern-Volmer* константа која се добија из нагиба праве зависности  $I_0/I$  према  $[Q]$ .

Вредности константе везивања  $K_{bin}$  и број везујућих места ( $n$ ) су израчунате из Scatchard графика (ubaciti slike) применом Scatchard једначине (Једначина 4).

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

Једначина 4.

Број везујућих места ( $n$ ) и константе везивања ( $K_{bin}$ ) израчунати су из зависности  $\log(I_0-I)/I$  од  $\log[Q]$ .

### 3.5.5. Мерење вискозитета

Одређивањем вискозитета ДНК раствора у присуству различитих концентрација комплексних једињења може се установити да ли је дошло до промене дужине молекула ДНК. На основу вредности вискозитета одређује се тип интеракције комплекс-ДНК молекул. Вискозност ДНК раствора је мерена у присуству растуће концентрације комплекса (**K1** и **K2**). За сваки узорак је три пута мерено време протока дигиталном штоперицом, а затим је израчуната просечна вредност. Подаци су представљени као зависност  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  од  $c$ , где је  $\eta$  вискозност ДНК у присуству комплекса, а  $\eta_0$  је вискозитет само ДНК у пуферном раствору. Вредности вискозности израчунате су из разлике добијеног времена протока раствора ДНК и комплекса ( $t$ ) и времена протока само пуфера ( $t_0$ ) (Једначина 5).

$$\eta = (t - t_0)/t_0.$$

*Једначина 5.*

## 3.6. Антитуморска активност

Антитуморска активност синтетисаних комплекса испитана је у Центру за молекулску медицину и испитивање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

### 3.6.1. Припремање раствора испитиваних једињења и реагенаса

Растварањем синтетисаних комплекса (**K1** и **K2**) у 10% диметилсулфоксиду (DMSO) направљени су раствори концентрације 10 mM. Раствори су филтрирани кроз *Millipore* филтер чији је промер отвора 0,22 mm, а непосредно пре употребе су разблажени храњивим медијумом. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-бромид) је растворен (5 mg/mL) у раствору фосфатног пуфера (pH = 7,2) и филтриран кроз *Millipore* филтер (0,22 mm) пре употребе. Сви реагенси су набављени од *Sigma Aldrich*, Минхен, Немачка.



### 3.6.2. Ћелијска култура

Потенцијална антитуморска активност комплекса (**K1** и **K2**) испитана је на мишјим ћелијским линијама *in vitro* методом. У истраживању су коришћене ћелије карцинома колоне (СТ26), карцинома дојке (4Т1) и карцинома плућа (LLC1) које су култивисане у DMEM (енгл. Dulbecco's Modified Eagle's medium, *Sigma Aldrich*, Минхен, Немачка) са додатком 10% феталног говеђег серума (FBS, *Sigma Aldrich*, Минхен, Немачка), пеницилина (100 IU/mL) и стрептомицина (100 µg/mL) у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> и на температури од 37°C. Субконфлуентни монослојеви, у фази раста, су прикупљени кратким третирањем са 0,25% трипсином и 0,02% EDTA (етилендиаминтетрасирћетна киселина) у раствору PBS пуфера (енгл. Phosphate Buffered Saline, PAA Laboratories GmbH), а након тога испирани три пута у серуму без фосфатног пуферског система. Број виталних ћелија је одређиван методом искључивања након примене трипан плавог. Боја трипан плаво не пролази неоштећену ћелијску мембрану, тако да се живе ћелије не боје, док се мртве ћелије боје плаво (Слика 12).

### 3.6.3. Цитотоксични тестови

#### 3.6.3.1. МТТ – тест

Број и варијабилност туморских ћелија након примене раствора комплексних једињења одређен је колориметријским МТТ тестом [116]. Смањење варијабилности може бити последица апоптозе или некрозе ћелија.

Поступак теста: Митохондријални ензими дехидрогеназе у метаболички активним ћелијама редукују жуто обојену со тетразолијум бромида до љубичастог формазана (слика 12.). Интрацелуларно локализовани кристали формазана се растварају и квантификују спектрофотометријски. Интензитет боје се мери на *ELISA* читачу (*Zenyth 3100, Anthos Labtec Instruments*) читавањем на таласној дужини од 595 nm.

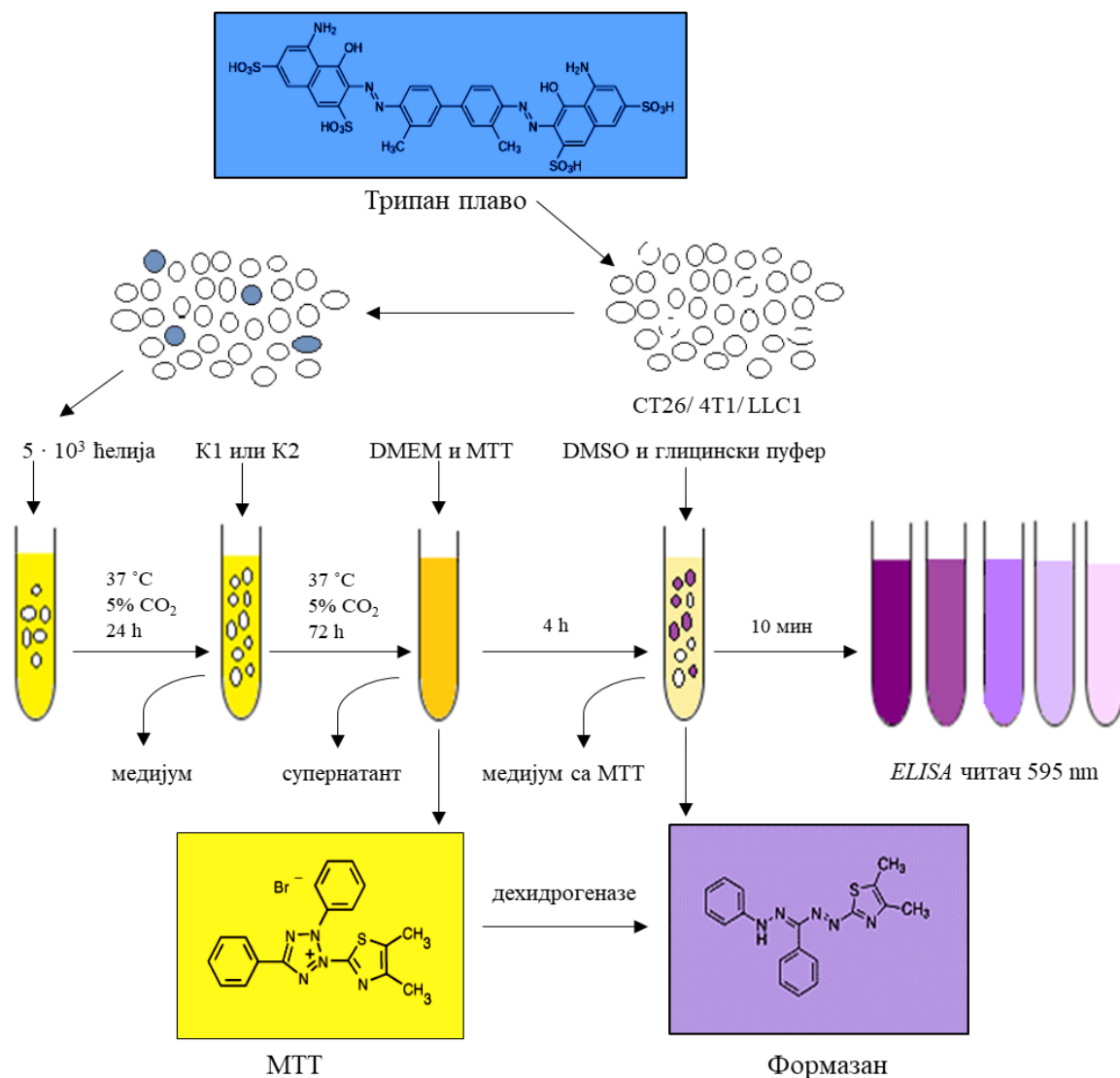
Ћелијске културе су разблажене медијумом до концентрације од  $5 \cdot 10^4$  ћелија/mL. У микротитар плоче са 96 бунарића сипано је по 100 µL, тако да је у бунару било по  $5 \cdot 10^3$  ћелија. Како би се одредила оптичка густина медијума (бленк) у посебне отворе је сипан медијум без ћелија. Након периода инкубације на 37°C у 5% CO<sub>2</sub>, медијум је одливен и замењен са 100 µL раствора испитиваних комплекса (**K1** или **K2**). Серијом

двоструких разблажења добијени су раствори комплексних једињења (**K1** или **K2**) чија је концентрација била од 1000  $\mu\text{M}$  до 7,8  $\mu\text{M}$  у триплекату. Ћелије се инкубирају током 72 h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Супернатант се затим уклања и у сваки бунар додаје 100  $\mu\text{L}$  DMEM са 15% раствором МТТ (5 mg/mL у PBS, 10  $\mu\text{L}$ ). После 4 h уклања се и медијум са МТТ и додаје DMSO (150  $\mu\text{L}$ ) са глицинским пуфером (20  $\mu\text{L}$ ) и мућка око 10 минута како би се растворили кристали формазана (Слика 12). Апсорбанца се читава у периоду од 30 минута. Вредности апсорбанце третираних ћелија се упоређују са вредностима апсорбанце нетретираних ћелија на основу чега је израчунато смањење или повећање вијабилности ћелија као последица дејства комплекса (**K1** или **K2**). Процент цитотоксичности је израчунат према једначини 6.

$$\text{цитотоксичност\%} = 100 - ((\text{E}-\text{B})/(\text{C}-\text{B}) \cdot 100)$$

*Једначина 6.*

Са **B** се означавају бунарићи у којима се налази само медијум, са **C** укупна вијабилност/спонтана смрт нетретираних циљних ћелија, а **E** се односи на вијабилност ћелија у експерименталним бунарићима.



Слика 12. Метода искључивања применом трипан плавог и схематски приказ тока колориметријског MTT теста

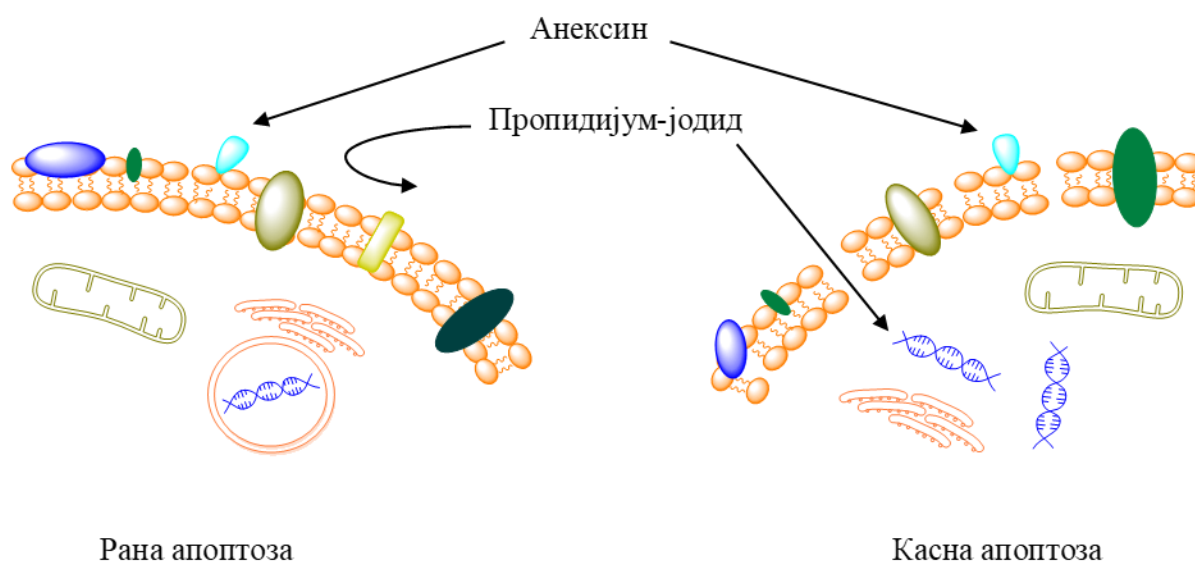
### 3.6.3.2. Тест апоптотичности

Апоптотични ефекат комплексних једињења (К1 или К2) на туморске ћелије испитан је применом анексин V-FITC и пропиридијум-јодида (PI). Протеин анексин V детектује рану фазу апоптозе, јер има способност да се везује за трансмембранске фосфолипиде. Интегритет ћелијске мембране остаје очуван у раној фази, али долази до губитка асиметрије мембранских фосфолипида, тако да фосфатидилсерин бива изложен на спољашњој страни ћелијске мембране и доступан за везивање (Слика 13). Пропиридијум-јодид је флуоресцентан интеркалирајући агенс који се користи да препозна

касну фазу апоптозе у којој долази до губитка интегритета ћелијске мембране и могућности његовог везивања за молекуле ДНК (Слика 13).

Ћелије СТ26 су култивисане у току ноћи у Т25 ћелијским флашковима. Након наведеног периода медијум је замењен раствором испитиваних једињења (**К1** или **К2**) концентрације 15  $\mu\text{M}$  и остављен у инкубатору 24 h на 37°C у 5%  $\text{CO}_2$ . Култивисане ћелије су два пута испране раствором фосфатног пуфера (PBS) и ресуспендоване у 1x везујућем пуферу (10x везујући пуфер: 0,1 M Непес/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM  $\text{CaCl}_2$ ) до концентрације од  $1 \cdot 10^6/\text{mL}$ . Након тога, у 100  $\mu\text{L}$  суспензије ћелија додато је 10  $\mu\text{L}$  анексин V-FITC и 20  $\mu\text{L}$  пропидијум-јодида. Ћелије су инкубиране 15 минута у мраку на собној температури (25°C), а затим је садржај ресуспендован у 400  $\mu\text{L}$  везујућег пуфера и анализиран током 1 часа коришћењем FACS Calibur (BD, San Jose, USA) и Flow Jo софтвера (Tri Star). Процент ћелија у раној апоптози, касној апоптози и проценат некротичних ћелија одређивани су коришћењем софтвера *CXP Cytometer*, *FlowJo* и *Flowing software v2.5*. Анексин V(+)/PI(-) указује на рану апоптозу, анексин V(+)/PI(+) на касну апоптозу, а код некрозе ћелија се јавља анексин V(-)/PI(+). Уколико није дошло до бојења ћелија, анексин V(-)/PI(-), значи да су ћелије вијабилне.

Да би се утврдио потенцијал за индукцију апоптотске смрти тестираних бакарних комплекса, извршена је проточна цитометријска анализа СТ26 ћелија обојених анексином и пропидијум-јодидом након 24h од изложености тестираним комплексима (концентрација 15  $\mu\text{M}$ ).



**Слика 13.** Утврђивање ране и касне апоптозе применом анексина и пропидијум-јодида

### 3.7. Антимикробна активност

Антимикробна активност је испитана на бактеријама и гљивама *in vitro* методом. Сва испитивања из ове области спроведена су у Лабораторији за микробиологију на Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

#### 3.7.1. Припремање раствора испитиваних једињења и реагенаса

Синтетисани комплекси (**K1** и **K2**) су растворени у DMSO (*Acros Organics*, Њу Џерзи, САД), а затим разблажени хранљивим медијумом до концентрације од 10%. Ресазурин је набављен од *Alfa Aesar GmbH & Co* (Карлсруе, Немачка). Доксициклин (*Галеника АД*, Београд) је растворен у течном хранљивом медијуму, Mueller–Hinton бујону (*Торлак*, Београд), док је флуконазол (*Pfizer Inc*, САД) растворен у Sabouraud декстрозном агару (*Торлак*, Београд). Mueller–Hinton бујон је намењен за одређивање минималних инхибиторних концентрација (МИК) антимикробних супстанци дилуционом методом. Ова стандардизована подлога садржи 17,5 g киселог казеин хидролизата, 2 g месног екстракта и 1,5 g скроба. Месни екстракт и хидролизат казеина су извори хранљивих протеина за микроорганизме, док скроб апсорбује токсине који настају као продукт метаболизма микроорганизама у току раста. При припреми подлоге наведена смеша (21 g) се помеша са 1000 mL хладне дестиловане воде, а затим уз мешање загрева до кључања и потпуног растварања. Раствор се разлије у епрувете и стерилише у аутоклаву 15 минута на 121°C. Готова подлога је бистар, жуто обојен раствор. Раст микроорганизама доводи до замућења подлоге. Sabouraud декстрозни агар се користи за изоловање и култивисање гљивица и квасаца. Састоји се од 40 g декстрозе, 15 g агра и 10 g пептона (Пептон Торлак). Декстроза и пептон обезбеђују хранљиве састојке микроорганизмима, а агар доводи до очвршћавања подлоге. У наведену смешу се дода 1000 mL хладне дестиловане воде и остави 15 минута да одстоји. Хранљиви медијум се пажљиво уз мешање загрева до кључања и растварања, а затим стерилише у аутоклаву (15 мин. на 121°C). Када се подлога охлади на 50°C, промеша се и разлије у Петри шоље. При хлађењу и очвршћавању ствара се бистар до благо опалесцентан гел жуте боје.

### 3.7.2. Третирани микроорганизми и припрема суспензија

Антимикробна активност лиганада (Л1 и Л2) и синтетисаних комплексних једињења (К1 и К2) испитивана је на 20 микроорганизма (Табела 5). Клинички изолати бактерија су поклон Института за јавно здравље у Крагујевцу, док су остали микроорганизми обезбеђени из култура одгајаних у Лабораторији за микробиологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Табела 5. Тестирани микроорганизми

МИКРООРГАНИЗМИ		
Бактерије		Гљивице
Грам-позитивне	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Penicillium expansum</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Грам-негативне	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	<i>Penicillium italicum</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170
	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATTC 204305
	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404

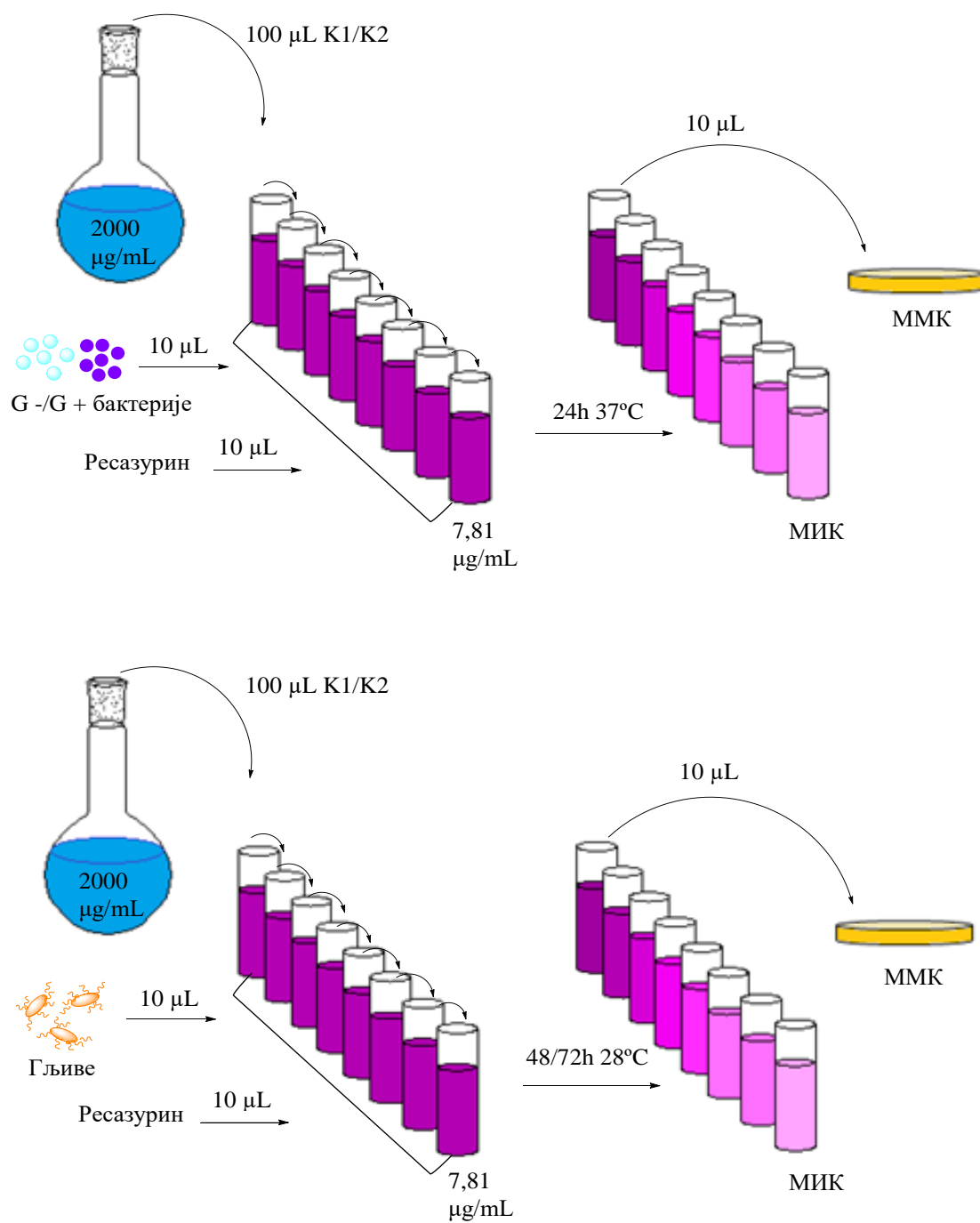
Бактеријске суспензије и суспензије гљива припремљене су методом директне колоније, тако што су микроорганизми узети са подлоге и суспендовани у 5 mL стерилног физиолошког раствора. Коришћењем денситометра (*DEN-1*, *BioSan*, Летонија) подешена је густина почетне суспензије и упоређена са 0,5 McFarland стандардом [117]. Вредност стандарда одговара суспензији бактерија која садржи  $10^8$  јединица за формирање колонија (CFU)/mL (енгл. *Colony-Forming Unit*) и суспензији квасаца која садржи  $10^6$  (CFU)/mL. Суспензија гљивичних спора припремљена је пажљивим одвајањем спора са растућег аспаргилуса. Почетне суспензије су додатно

разблажене стерилним физиолошким раствором (0,85%) у односу 1:100 за бактерије и односу 1:1000 за гљиве.

### 3.7.3. Микродилуциона метода

Минимална инхибиторна концентрација (МИК) и минимална микробицидна концентрација (ММК) комплексних једињења (**K1** и **K2**) одређене су микродилуционом методом [118]. Као позитивне контроле коришћени су доксицилин и флуконазол. Како би се искључио ефекат растварача (DMSO) на раст микроорганизама праћен је и његов утицај у концентрацији од 10%, као и утицај самих лиганата. У сваки од 96 бунарића микротитар плоче сипано је по 100  $\mu\text{L}$  хранљиве подлоге. Затим је у први ред микротитрационе плоче додато по 100  $\mu\text{L}$  раствора испитиваних једињења чије су почетне концентрације биле 2000  $\mu\text{g/mL}$ . Двоструким разблаживањем добијени су раствори концентрација у области од 1000 до 7,81  $\mu\text{g/mL}$ . По 10  $\mu\text{L}$  припремљене суспензије бактерија и гљива додаје се у сваки бунарић, а након тога и по 10  $\mu\text{L}$  ресазурина, индикатора ћелијског раста. Антимикробна активност испитиваних једињења проучена је при концентрацији бактерија од  $10^5$  CFU/mL и концентрацији спора гљива од  $10^3$  CFU/mL. Припремљене микротитар плоче са бактеријама инкубиране су у току 24 h на температури од 37°C, док су оне са гљивама инкубиране 48h или 72h на 28°C. У наведеним временским интервалима под дејством оксидоредуктаза живих микроорганизама ресазурин прелази у резорурфин, што се опажа променом боје из љубичасте у розе.

Минимална инхибиторна концентрација је дефинисана као најнижа концентрација испитиваних супстанци на којој није дошло до промене боје ресазурина. Минимална микробицидна концентрација је одређена пресејавањем 10  $\mu\text{L}$  узорка из удубљења у којима није уочен раст на плочаст агар. Концентрација синтетисаних лиганата и комплекса при којој после периода инкубације није уочен раст на плочастом агару биће дефинисана као минимална микробицидна концентрација.



Слика 14. Поступак микродилуционе методе



## **4. РЕЗУЛТАТИ**

## 4.1. Синтеза и карактеризација

### 4.1.1. Синтеза $\beta$ -аминокиселина

Бидентатни лиганди,  $\beta$ -аминокиселине (**Л1** и **Л2**) су синтетисане према поступку описаном у делу 3.1. (Схема 4.) у приносу од око 60%.

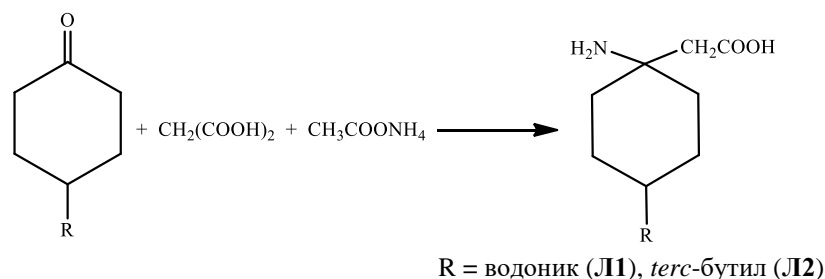


Схема 4. Синтеза  $\beta$ -аминокиселина

### 4.1.2. Синтеза комплекса бакра(II) са $\beta$ -аминокиселина

Поступак синтезе комплекса бакра(II) описан је у делу 3.2. (Схема 5.). Комплекс **К1** се издвојио у виду кристала плаве боје у приносу од 58,10% (0,1256 g), док је принос плавог праха (**К2**) био 78,24% (0,1581 g).

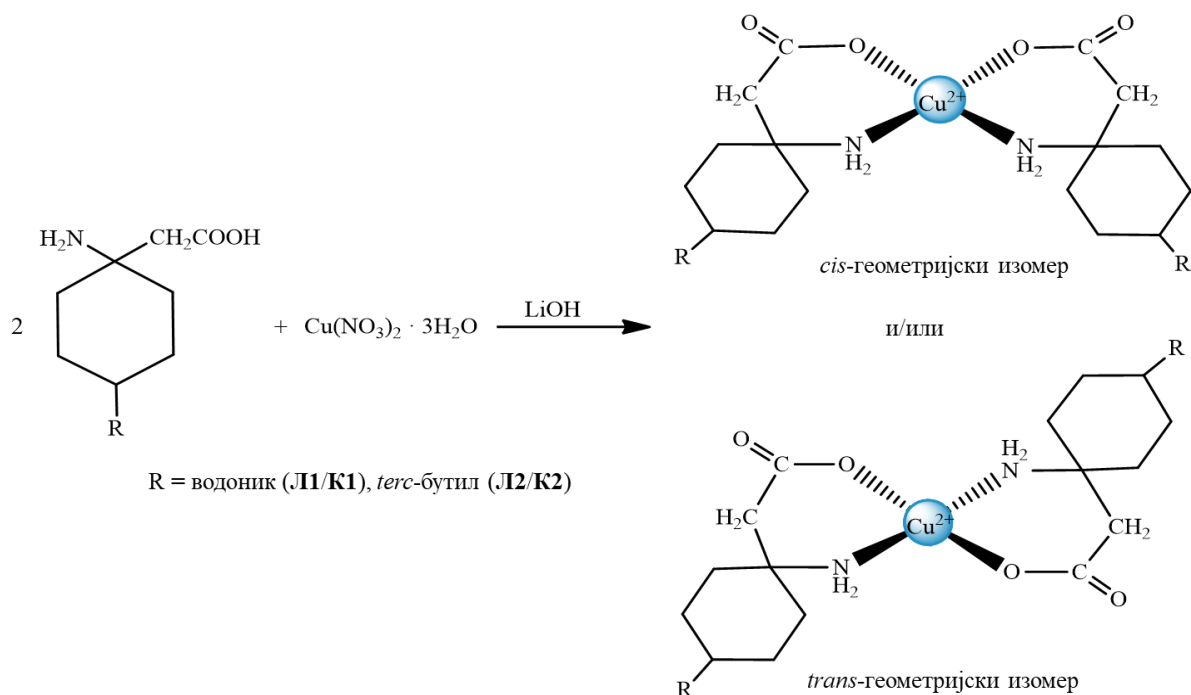


Схема 5. Синтеза комплекса бакра(II) са  $\beta$ -аминокиселинама

### 4.1.3. Елементална микроанализа синтетисаних комплекса

Елементалном микроанализом одређена је процентуална заступљеност угљеника, водоника и азота у узорцима за које се претпоставља да су комплексна једињења. Вредности елементалне микроанализе и израчунате вредности на основу очекиване молекулске формуле синтетисаних комплекса (**К1** и **К2**) су приказане у Табели 6.

Табела 6. Резултати елементална микроанализа

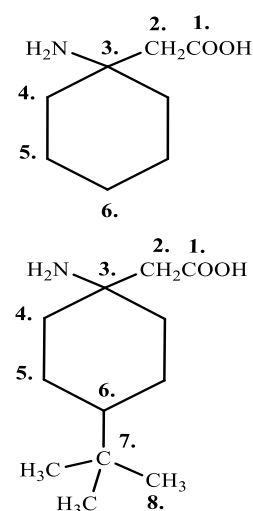
Хемијски елементи		С(%)	Н(%)	Н(%)
<b>К1</b> CuC <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (M <sub>r</sub> = 375,95)	Израчунато	51,12	7,51	7,45
	Нађено	51,27	7,42	7,42
<b>К2</b> CuC <sub>24</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (M <sub>r</sub> = 488,16)	Израчунато	59,05	9,08	5,74
	Нађено	58,98	9,01	5,69

### 4.1.4. Нуклеарно-магнетно-резонантни спектри (лиганада)

Сигнали H<sup>1</sup> NMR и <sup>13</sup>C NMR спектроскопије синтетисаних лиганда садрже пикове на одређеним вредностима хемијских померања која одговарају водониковим и угљениковим атомима лиганада (Табела 7).

Табела 7. Вредности хемијских померања (ppm) у <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C NMR спектру Л1 и Л2

Позиција	Л1		Л2	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1.	/	177,3	/	177,3
2.	2,41	48,0	2,41	48,0
3.	/	42,5	/	42,8
4.	1,75; 1,50	41,2	1,75; 1,50	39,6
5.	1,53; 1,43	21,9	1,52; 1,27	20,7
6.	1,49; 1,47	22,6	1,41	48,5
7.	/	/	/	32,5
8.	/	/	0,94	27,6



Напомена-приказани су само положаји једног од еквивалентних С и Н атома

#### 4.1.5. Инфрацрвени спектри синтетисаних лиганата и комплекса

У IR спектру лиганата уочавају се сигнали протонованих амино група ( $\approx 2950 \text{ cm}^{-1}$ ), док су код комплексних једињења уочене асиметричне валенционе вибрације примарне амино групе ( $\approx 3370 \text{ cm}^{-1}$ ). Оба комплекса показују јаке и оштре апсорпционе траке које потичу од асиметричних фреквенци истезања координованих карбоксилних група на око  $1650\text{-}1570 \text{ cm}^{-1}$ . Карактеристичне апсорпционе траке лиганата и комплекса приказане су у Табели 8.

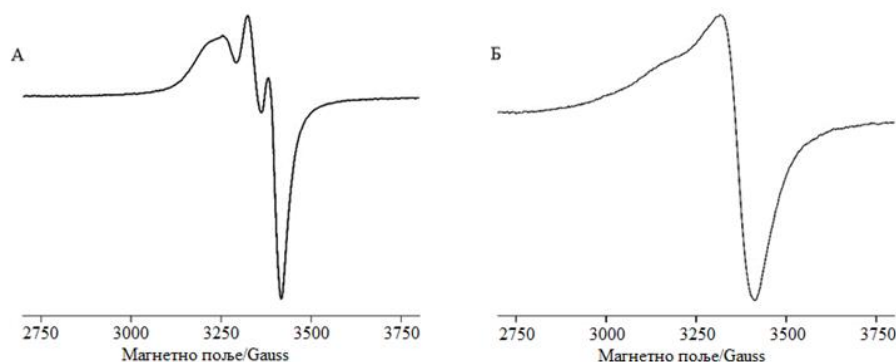
Табела 8. Најважније траке у IR траке ( $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ ) лиганата и комплекса

Једињења	$\nu(\text{NH}_3^+)_{\text{asym}}$	$\nu(\text{NH}_2)_{\text{asym}}$	$\nu(\text{COO})_{\text{asym}}$	$\nu(\text{COO})_{\text{sym}}$
Л1	2945(s)	/	1619(s)	1570(s)
Л2	2954(s)	/	1639(s)	1336(s)
К1	/	3375(s)	1576(s)	1408 (s)
К2	/	3369(s)	1577(s)	1448 (s)

\*s (strong) - траке јаког интензитета

#### 4.1.6. Спектри електронско-парамагнетне-резонанције

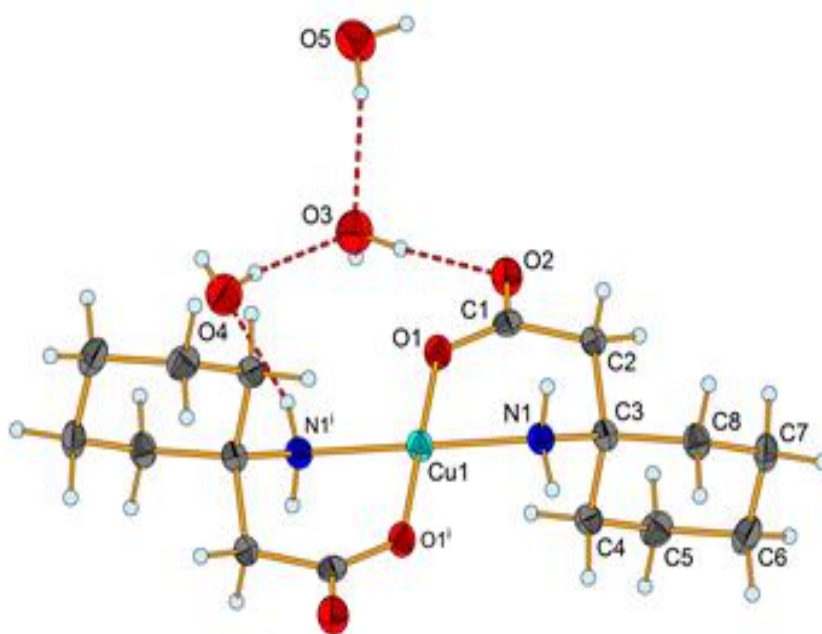
На Слици 15 су приказани EPR спектри водених раствора синтетисаних комплекса концентрације  $0,5 \text{ mM}$  при собној температури. Оба комплекса у EPR дају анизотропне спектре са аксијалном симетријом. Бакар(II)-јон у комплексним једињењима показује различиту координацију у воденом раствору, највероватније због различитих лиганата. Спектар који потиче од бакар(II)-јона из комплекса **К1** карактерише  $g_{\parallel} = 2,16$  и  $g_{\perp} = 2,07$ , док спектар комплекса **К2** показује слабо решен  $\text{Cu}$  ( $S=1/2$ ,  $I=3/2$ ) хиперфински слој са  $g_{\parallel} = 2,23$  и  $g_{\perp} = 2,09$ .



Слика 15. EPR спектри водених раствора комплекса **К1** (A) и **К2** (B)

#### 4.1.7. Кристална структура комплекса **K1**

Структура комплекса **K1** је приказана на Слици 16. Неутрални комплексни молекули се састоје од бакар(II)-јона и два бидентатно координована лиганда. Координовање лиганда са централним јоном метала је остварено преко кисеоника из депротонисаних карбоксилних група и преко азота из амино групе формирајући *transOtransN* геометријски изомер. Мононуклеарни комплекс је квадратно-планарне геометријске структуре са бакар(II)-јоном локализованим у центру симетрије.



**Слика 16.** Структура **K1** са термичким елипсоидима приказана са вероватноћом од 40%. \*Испрекидане линије представљају водоничне везе ( $i: -x + 1, -y, -z + 1$ )

Одабране дужине и углови веза за комплекс **K1** су приказани у Табелама 9 и 10. Неправилна (деформисана) квадратно-планарна структура комплекса потврђена је на основу вредности дужина веза (Cu-N, Cu-O) и углова веза ( $i = 1 - x, -y, 1 - z$ ) који одступају од  $90^\circ$ .

Табела 9. Углови веза у комплексном једињењу *KI*

Углови веза [°]			
O1-Cu1-N1 <sup>i</sup>	87,45(7)	C4-C3-C2	112,82(17)
O1 <sup>i</sup> -Cu1-N1	87,45(7)	N1-C3-C8	109,70(17)
O1-Cu1-N1	92,55(7)	C4-C3-C8	109,48(17)
C1-O1-Cu1	130,35(14)	C2-C3-C8	109,75(17)
C3-N1-Cu1	113,79(13)	C1-C2-C3	117,62(17)
O2-C1-O1	121,47(19)	C5-C4-C3	112,32(17)
O2-C1-C2	118,47(19)	C7-C8-C3	113,06(17)
O1-C1-C2	120,01(19)	C7-C6-C5	111,95(18)
N1-C3-C4	107,70(16)	C6-C7-C8	111,31(18)
N1-C3-C2	107,31(17)	C6-C5-C4	111,11(19)

Симетријске трансформације које се користе за стварање еквивалентних атома:  
*i*:  $-x + 1, -y, -z + 1$

Веза Cu-O је нешто краћа од Cu-N због краћег ковалентног радијуса атома кисеоника. Везе у карбоксилној групи лигананда су делокализоване (Табела 10), док су остале дужине веза типичне за C-C и C-H. Циклохексил група се налази у конформацији столице.

Табела 10. Дужине веза у комплексном једињењу *KI*

Дужине веза [Å]			
Cu1-O1	1,9238(15)	Циклохексан	
Cu1-N1	1,9852(17)	C3-C4	1,532(3)
O1-C1	1,280(3)	C3-C8	1,538(3)
O2-C1	1,245(3)	C4-C5	1,530(3)
N1-C3	1,500(3)	C8-C7	1,533(3)
C1-C2	1,520(3)	C6-C7	1,522(3)
C3-C2	1,536(3)	C6-C5	1,524(3)

Симетријске трансформације које се користе за стварање еквивалентних атома:  
*i*:  $-x + 1, -y, -z + 1$

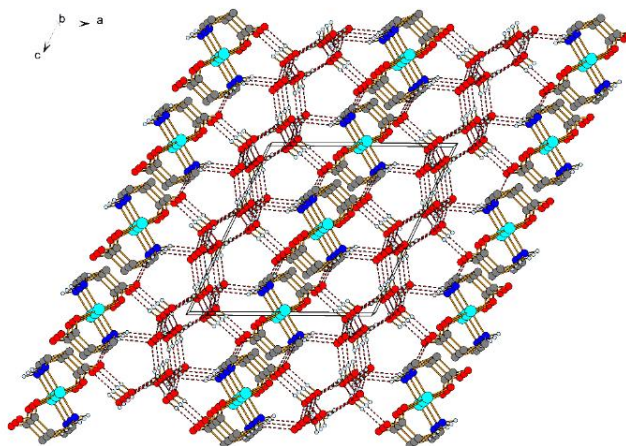
Три молекула кристалне воде су преко водоничних веза укључена у систем (Табела 11) и тако стабилизују саму структуру.

Табела 11. Водоничне везе молекула воде и комплексног једињења **K1** (Å и °).

D-H...A	$d(D-H)$	$d(H...A)$	$d(D...A)$	$\angle(DHA)$
N1-H2N1...O2 <sup>ii</sup>	0,91	2,07	2,958(2)	165,7
N1-H1N1...O4 <sup>i</sup>	0,91	2,24	3,131(2)	164,6
O3-H1O3...O2	0,87	1,91	2,773(2)	175,7
O3-H2O3...O5 <sup>iii</sup>	0,77	2,15	2,896(2)	166,0
O4-H1O4...O3	0,81	2,05	2,844(2)	167,5
O4-H2O4...O5 <sup>iv</sup>	0,77	2,28	3,052(2)	173,9
O5-H1O5...O3	0,84	2,05	2,867(2)	165,2
O5-H2O5...O4 <sup>v</sup>	0,83	2,06	2,892(2)	175,7

Трансформације симетрије коришћене за стварање еквивалентних атома: *i*:  $-x + 1, -y, -z + 1$ ; *ii*:  $-x + 1, y - 1/2, -z + 1/2$ ; *iii*:  $-x + 2, -y + 1, -z + 1$ ; *iv*:  $-x + 2, -y, -z + 1$ ; *v*:  $x, -y + 1/2, z - 1/2$ .

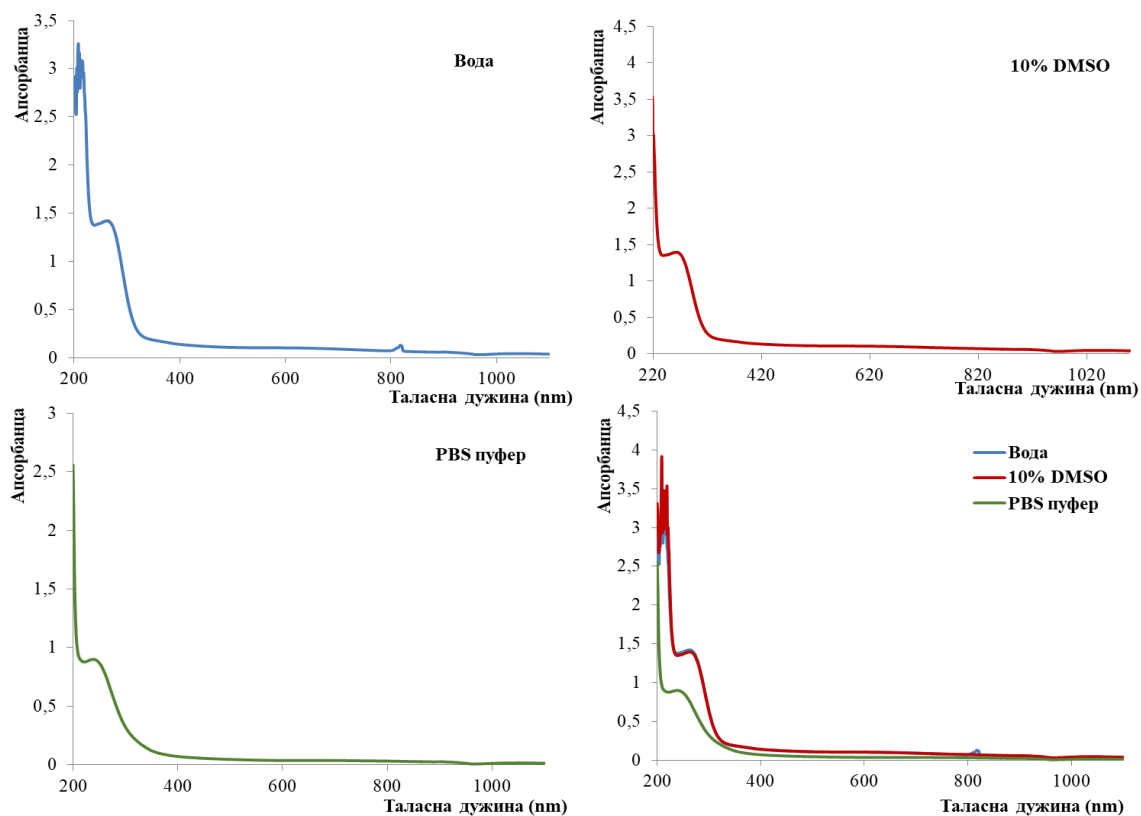
Сваки молекул воде је у очекиваном тетраедарском окружењу које чине други молекули воде, амино група или карбоксилна група. Комплексне јединице у структури формирају слојеве у *bc* равни, које су повезане кристалним молекулима воде преко водоничне везе како би се формирао бесконачан 3D систем (Слика 17).



Слика 17. Водоничне везе (испрекидане линије) формирају 3D супрамолекуларну структуру у **K1**. \* Атоми водоника који нису укључени у водоничне везе су изостављени ради јаснијег приказа.

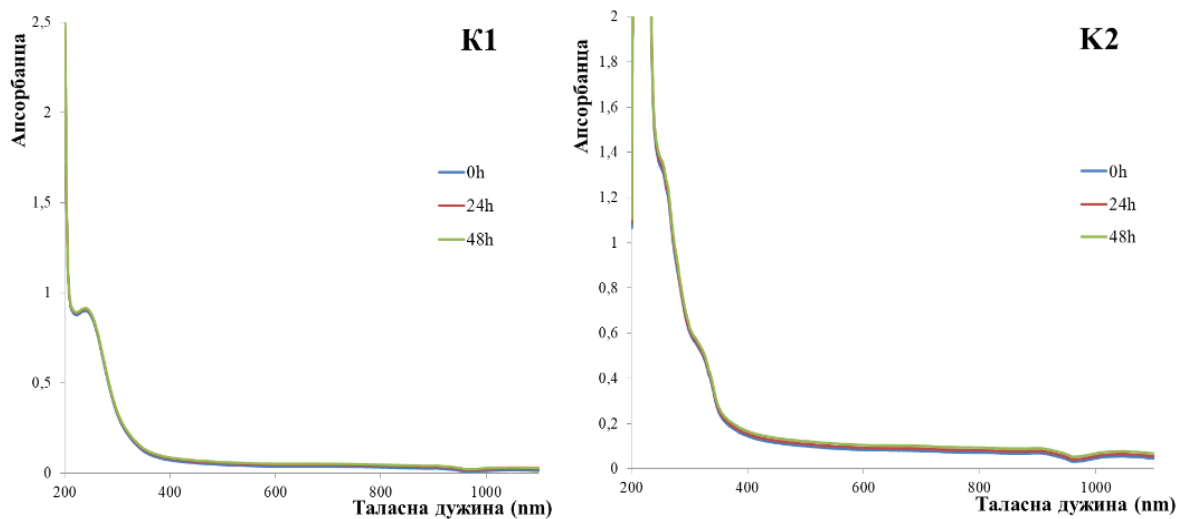
## 4.2. Стабилности раствора комплексних једињења

Раствори синтетисаних комплекса у води, 10% DMSO и раствору PBS остали су стабилни након 1h стајања на собној температури (Слика 18).



Слика 18. UV-Vis спектри комплекса **K1** ( $1 \cdot 10^{-4}$  M) у води, 10% DMSO и раствору пуфера

У пуферском раствору комплекси (**K1** и **K2**) показују стабилност у периоду од 48h (слика 19).



Слика 19. UV-Vis спектри синтетисаних комплекса у раствору пуфера



### 4.3. Интеракција синтетисаних комплекса са молекулом ДНК

#### 4.3.1. Супституционе реакције

Константа брзине другог реда,  $k_2$ , која карактерише формирање производа при реверзибилној реакцији супституције комплекса **K1** и **K2** са СТ-ДНК и НТ-ДНК је реда величине изнад  $10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (Табела 12). Комплекс **K1** лакше подлеже реакцијама супституције у поређењу са комплексом **K2**, док су вредности константе брзине другог реда,  $k_2$ , веће при супституционим реакцијама оба комплекса са НТ-ДНК (Табела 12).

**Табела 12.** Константе брзине другог реда,  $k_2$ , при реакцији комплекса **K1/K2** и НТ-ДНК/СТ-ДНК

Комплексна једињења	СТ-DNA $k_2[\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	НТ-DNA $k_2[\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$
<b>K1</b>	$(3,8 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(6,3 \pm 0,2) \cdot 10^3$
<b>K2</b>	$(2,9 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(3,4 \pm 0,1) \cdot 10^3$

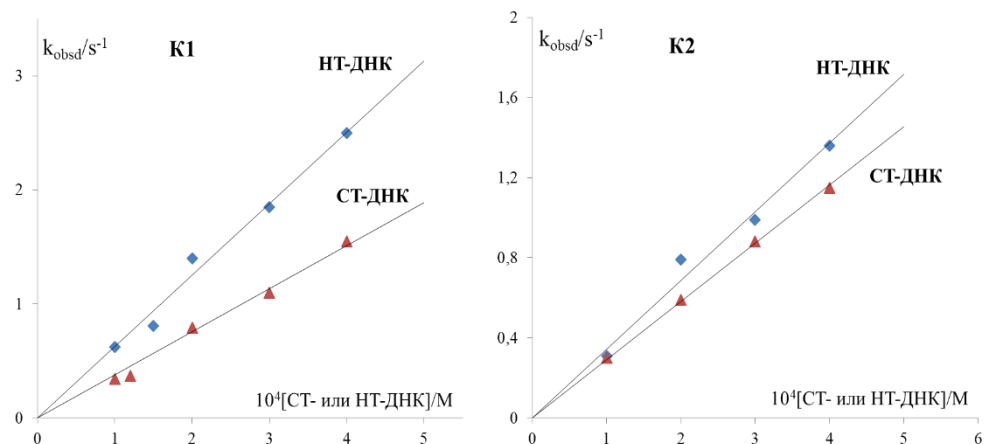
Свака константа брзине *pseudo*-првог реда,  $k_{obsd}$ , израчуната је на основу Једначине 1 као просечна вредност пет до шест независних мерења и у функцији је концентрације ДНК (Табела 13).

**Табела 13.** Константе брзине *pseudo*-првог реда,  $k_{obsd}$ , при реакцији комплекса **K1/K2** и НТ-ДНК/СТ-ДНК

Комплексна једињења	$10^{-4} C_{\text{СТ-ДНК}}/\text{M}$	$k_{obsd}/\text{s}^{-1}$	$10^{-4} C_{\text{НТ-ДНК}}/\text{M}$	$k_{obsd}/\text{s}^{-1}$
<b>K1</b>	4,00	1,55(6) <sup>a</sup>	4,00	2,50(6)
	3,00	1,10(6)	3,00	1,85(6)
	2,00	0,79(6)	2,00	1,40(6)
	1,20	0,37(6)	1,50	0,81(6)
	1,00	0,34(5)	1,00	0,62(6)
<b>K2</b>	4,00	1,15(6)	4,00	1,36(6)
	3,00	0,88(6)	3,00	0,99(6)
	2,00	0,59(6)	2,00	0,79(6)
	1,00	0,30(6)	1,00	0,31(6)

<sup>a</sup> Број понављања

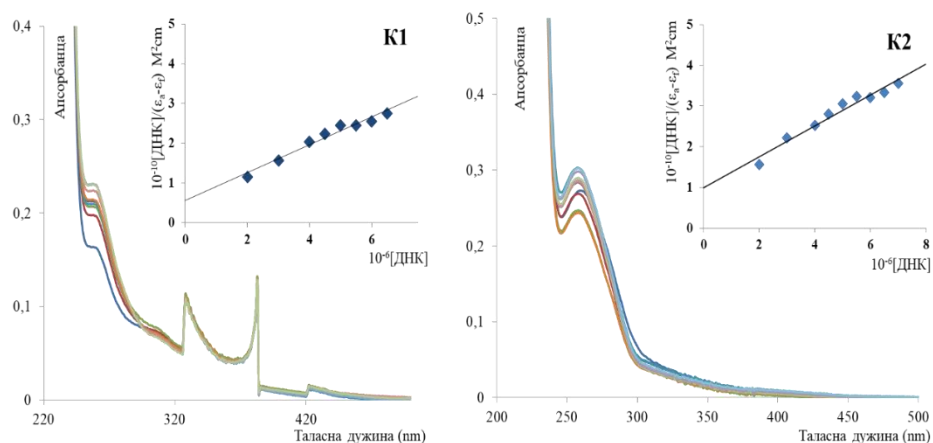
Вредности константе брзине *pseudo*-првог реда,  $k_{obsd}$ , су у корелацији са концентрацијом ДНК и при истим концентрацијама СТ-ДНК и НТ-ДНК су веће при супституцији са комплексом **K1**. Оба комплекса показују већи афинитет према НТ-ДНК (Слика 20).



Слика 20. Константе брзине *pseudo*-првог реда,  $k_{obsd}$ , приказане као функција концентрације СТ-ДНК и НТ-ДНК при реакцији са **K1** и **K2**.

### 4.3.2. UV-Vis апсорпциони спектри

Криве титрације за **K1** и **K2** у присуству СТ-ДНК или НТ-ДНК у различитим концентрацијама су дате на слици 21. Са повећањем концентрације СТ-ДНК и НТ-ДНК јавља се значајан хиперхромни ефекат са појавом новог опсега на 258, 262 и 266 nm, док у области од 300-500 nm нису уочене значајне промене у спектру (Слика 21).



Слика 21. UV-Vis титрациони спектри комплекса **K1** и **K2** при интеракцији са

СТ-ДНК

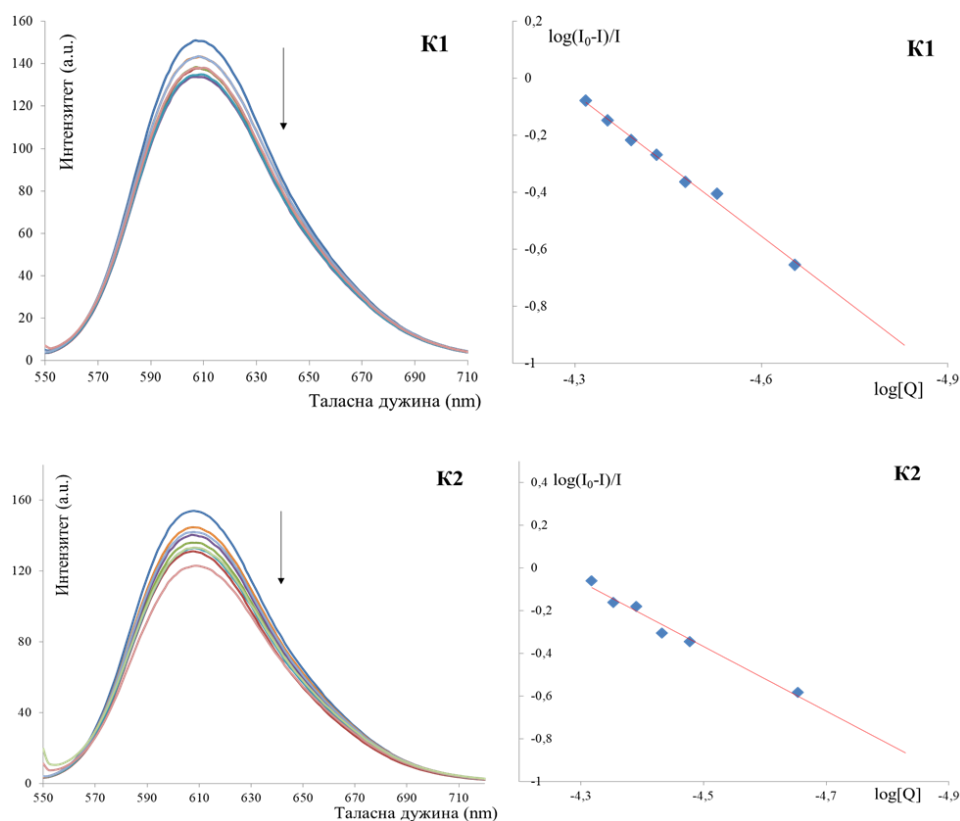
Вредности константе везивања,  $K_b$ , указују да је дошло до интеракције комплекса **K1** и **K2** са СТ-ДНК и НТ-ДНК. (Табела 14).

Табела 14. Вредности унутрашње константе везивања  $K_b$ .

Комплекси	<b>K1</b>	<b>K2</b>
Константе	$K_b [M^{-1}]$	$K_b [M^{-1}]$
СТ-DNA	$(5,9 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(3,8 \pm 0,1) \cdot 10^5$
НТ-DNA	$(6,2 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(4,0 \pm 0,1) \cdot 10^5$

### 4.3.3. Флуоресцентни емисиони спектри

Интеракција **K1** и **K2** са СТ-ДНК и НТ-ДНК довела је до значајног смањења у интензитету флуоресценције услед супституције EtBr из комплекса EtBr-ДНК. Повећањем концентрације **K1** или **K2** (0-10  $\mu M$ ) узрокује се значајно смањење интензитета флуоресценције са приметним црвеним померањем (Слика 22).



Слика 22. Флуоресцентни спектри титрације EtBr-СТ-ДНК и EtBr (10  $\mu M$ ) везаног за НТ-ДНК (10  $\mu M$ ) у присуству различитих количина комплекса **K1/K2**.

Интензитет флуоресценције на 606, 609, 611 или 612 nm (у зависности од комплекса) коришћен је за израчунавање *Stern-Volmer* константе,  $K_{sv}$ , на основу једначине 3 (Табела 15).

Табела 15. Вредности *Stern-Volmer* константе  $K_{sv}$

Комплекси	К1	К2
Константе	$K_{sv}[M^{-1}]$	$K_{sv}[M^{-1}]$
СТ-DNA	$(9,8 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(9,6 \pm 0,1) \cdot 10^3$
НТ-DNA	$(2,4 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(2,3 \pm 0,1) \cdot 10^4$

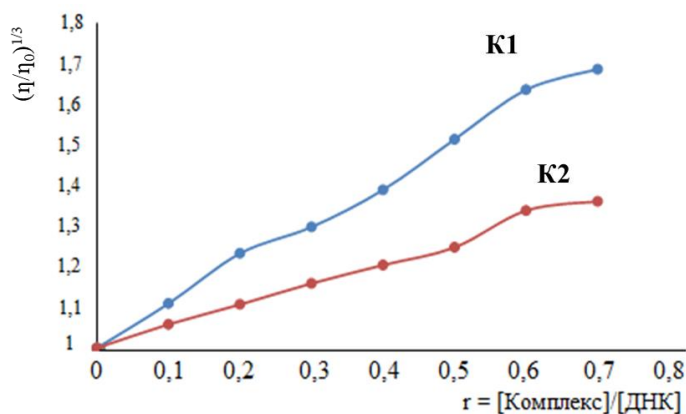
Подаци о интензитету флуоресценције се могу користити како би се одредио број везивних места ( $n$ ) и константа везивања комплексних једињења  $K_{bin}$  за СТ-ДНК или НТ-ДНК. Вредност константа везивања је реда величине изнад  $10^4$ , а броја везујућих места ( $n$ ) је у распону од 0,8 до 1,5, тако да можемо узети у обзир да је вредност ( $n$ ) приближно једнака 1 и указује на постојање једног места везивања комплекса за инкременте ДНК (Табела 16).

Табела 16. Вредности константа везивања ( $K_{bin}$ ) и броја везујућих места ( $n$ )

Комплекси	К1		К2	
	$K_{bin} [M^{-1}]$	$n$	$K_{bin} [M^{-1}]$	$N$
СТ-ДНК	$(2,7 \pm 0,1) \cdot 10^5$	1,4	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^4$	0,8
НТ-ДНК	$(4,3 \pm 0,1) \cdot 10^6$	1,4	$(2,7 \pm 0,1) \cdot 10^6$	1,5

#### 4.3.4. Вискозност

Додавање растућих концентрација комплексних једињења **К1/К2** у 0,01 mM раствору СТ-ДНК довело је до повећања релативног вискозитета ДНК раствора. У оба случаја вискозност се повећавала са повећањем концентрације комплексног једињења, али је при свакој концентрацији она била израженија при додатку **К1** (Слика 23).

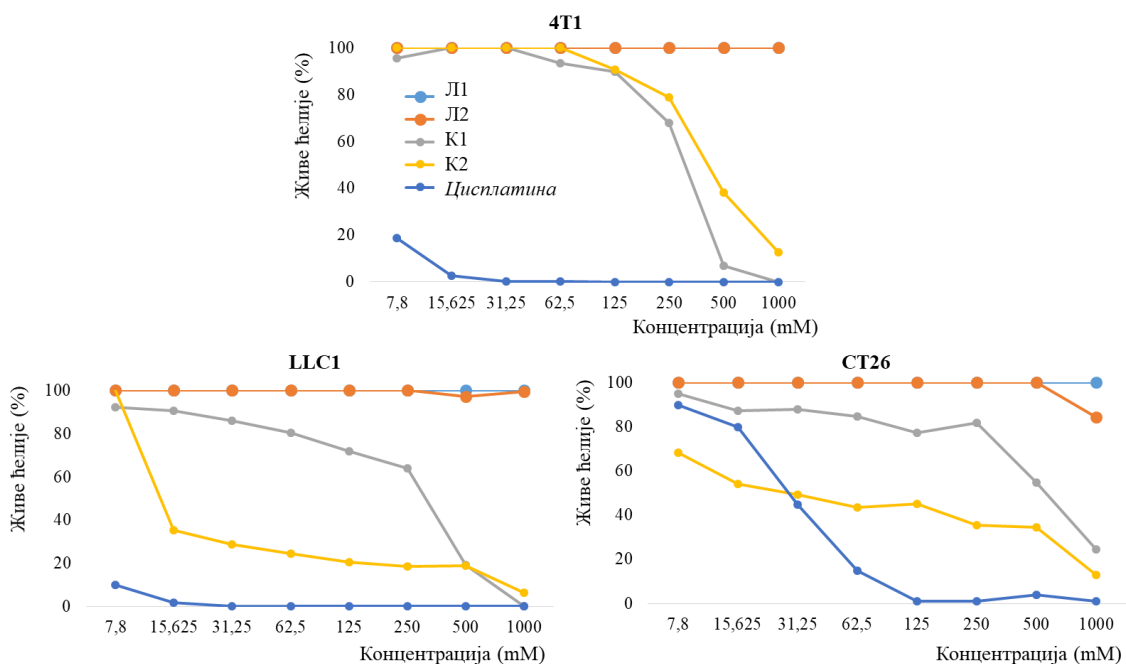


Слика 23. Релативно повећање вискозитета раствора СТ-ДНК при додатку различитих концентрација комплекса K1/K2

#### 4.4. Антитуморска активност

##### 4.4.1. Ћелијска варијабилност и IC<sub>50</sub>

Резултати МТТ теста показују да оба синтетисана лиганда (Л1 и Л2) не испољавају цитотоксични ефекат на све три тестиране ћелијске линије карцинома, чак ни при концентрацији од 1000 μm (Слика 24).



Слика 24. Ћелијска вијабилност (%) после 72 сата од третирања туморских ћелија лигандима и комплексима

Вредности  $IC_{50}$  указују на то да синтетисани комплекс **K1** има врло ниско цитотоксично дејство на тестираним ћелијским линијама карцинома, најниже према ћелијама СТ26 (Табела 17). Комплекс **K2** показује бољу цитотоксичну активност у поређењу са комплексом **K1**, посебно према мишјим ћелијама карцинома плућа, LLC1 (Табела 17).

**Табела 17.** Средње вредности  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) са стандардним девијацијама ( $\pm SD$ ) након 72h од примене испитиваних једињења на ћелијским линијама

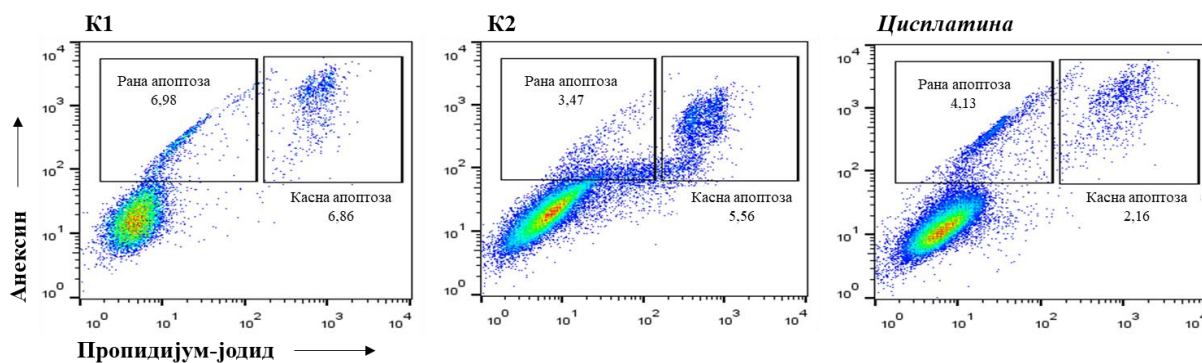
Испитивана једињења	Ћелијске линије		
	4T1	СТ26	LLC1
<b>K1</b>	221,87 $\pm$ 16,25	655,42 $\pm$ 118,67	195,90 $\pm$ 33,05
<b>K2</b>	390,58 $\pm$ 56,48	39,86 $\pm$ 7,09	15,61 $\pm$ 6,86
<b>L1</b>	>1000	>1000	>1000
<b>L2</b>	>1000	>1000	>1000
<b>Цисплатина</b>	<7,8	29,11 $\pm$ 5,87	<7,8

Иако су вредности  $IC_{50}$  за **K2** веће од вредности  $IC_{50}$  за *цисплатину* за одговарајуће ћелијске линије, цитотоксична активност **K2** према LLC1 ћелијским линијама је релативно висока (15,61  $\pm$  6,86). Цитотоксични ефекат оба комплекса једињења зависи од дозе. Смањење концентрације испитиваних једињења пратило је значајно повећање преживљавања туморских ћелија. Комплекси (**K1** и **K2**) готово да не показују цитотоксично дејство на 4T1 ћелијама до концентрације од 125  $\mu M$  (Слика 25), док је цитотоксични ефекат на ћелијама карцинома плућа LLC1 био мањи у односу на активност *цисплатине*. Комплекс **K2** показује бољу цитотоксичну активност на LLC1 и СТ26 у поређењу са **K1**. Међутим, ниже концентрације (7,8 и 15,625  $\mu M$ ) **K2** показале су бољи цитотоксични ефекат на СТ26 у поређењу са истим концентрацијама *цисплатине* (Слика 25).

#### 4.4.2. Индукција апоптозе

Наши резултати указују да након 24 сата тестирани комплекси индукују апоптотичку смрт СТ26 ћелија (Слика 25). Оба комплекса бакра (**K1** и **K2**) су имала већи цитотоксични ефекат на СТ26 у поређењу са *цисплатином* (концентрација 15  $\mu M$ ). Овај

налаз је у корелацији са резултатима МТТ теста који указује на бољи цитотоксични ефекат бакар(II)-комплекса у нижим концентрацијама на СТ26 ћелијама него *цисплатина* (15  $\mu\text{M}$ ).



Слика 25. Показатељ процента раних апоптотских, касних апоптотских и преживелих СТ26 ћелија након 24 часа третмана са комплексима **К1/К2** (15  $\mu\text{M}$ )

#### 4.5. Антимикробна активност

Резултати *in vitro* тестирања антимикробне активности за лиганде (**Л1** и **Л2**) и комплексе (**К1** и **К2**) са позитивним контролама приказани су у табелама 18, 19, 20 и 21. Све испитиване супстанце показале су селективну антимикробну активност. Вредности МИК и ММК за лиганде (**Л1** и **Л2**) били су у распону од 500 до > 1000  $\mu\text{g/mL}$ , а за комплексе у распону од 125 до > 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Уопштено гледано активност комплекса била је већа него активност одговарајућих лиганата. Између Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија није било разлике у осетљивости на испитиване супстанце. Најбољу антимикробну активност показује комплекс **К1** на *Pseudomonas aeruginosa*, али су и код овог комплекса вредности МИК и ММК биле знатно веће од оних које показује доксициклин (Табела 18).

Табела 18. Антибактеријска активност лиганда Л1 и комплекса К1

Врста / тестиране супстанце		Л1		К1		Доксициклин	
Бактерије		МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
Грам-позитивне	<i>Bacillus cereus</i>	> 1000	> 1000	1000	1000	0,98	7,81
	<i>Bacillus subtilis</i>	> 1000	> 1000	> 1000	>1000	0,11	1,95
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	> 1000	> 1000	1000	1000	1,95	31,25
	<i>Staphylococcus aureus</i>	> 1000	> 1000	1000	1000	0,45	7,81
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	> 1000	> 1000	1000	> 1000	0,22	3,75
Грам-негативне	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	> 1000	> 1000	1000	1000	15,63	62,5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 1000	> 1000	125	250	62,5	125
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	> 1000	> 1000	1000	1000	15,63	31,25
	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	> 1000	> 1000	1000	1000	3,91	31,25
	<i>Salmonella enterica</i>	> 1000	> 1000	1000	> 1000	15,63	31,25

Вредности МИК за К2 комплекс су биле у распону од 500 до > 1000 µg/mL, док вредност ММК истог комплекса није била испод 1000 µg/mL ни код једне испитиване бактерије (Табела 19).

Табела 19. Антибактеријска активност лиганда Л2 и комплекса К2.

Врста / тестиране супстанце		Л2		К2		Доксициклин	
Бактерије		МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
Грам-позитивне	<i>Bacillus cereus</i>	> 1000	> 1000	500	1000	0,98	7,81
	<i>Bacillus subtilis</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	0,11	1,95
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	> 1000	> 1000	1000	1000	1,95	31,25
	<i>Staphylococcus aureus</i>	> 1000	> 1000	500	1000	0,45	7,81
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	> 1000	> 1000	500	> 1000	0,22	3,75
Грам-негативне	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	> 1000	> 1000	1000	> 1000	15,63	62,5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 1000	> 1000	1000	1000	62,5	125
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	15,63	31,25
	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	> 1000	> 1000	1000	1000	3,91	31,25
	<i>Salmonella enterica</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	15,63	31,25

Бакар(II)-комплекси су показали умерену антифунгалну активност. Вредност МИК и за лиганд Л1 и за комплекс К1 је била у распону од 500 до > 1000 µg/mL, док вредност



ММК код обе супстанце и на свим испитиваним гљивама није била испод 1000 µg/mL (Табела 20).

**Табела 20.** Антигљивична активност лиганда Л1 и комплекса К1

Врста / тестиране супстанце	Л1		К1		Флуконазол	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	500	1000	500	1000	31,25	500
<i>Saccharomyces boulardii</i>	1000	> 1000	500	1000	7,81	31,25
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1000	1000	1000	> 1000	31,25	62,5
<i>Penicillium expansum</i>	> 1000	> 1000	1000	> 1000	250	500
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1000	> 1000	1000	> 1000	1000	1000
<i>Penicillium italicum</i>	500	> 1000	500	> 1000	250	500
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233	1000	1000	500	1000	500	1000
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170	> 1000	> 1000	500	1000	500	500
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	1000	1000	500	1000	1000	1000
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	1000	> 1000	500	> 1000	1000	1000

Најбољу антигљивичну активност показује комплекс К2 на *Penicillium italicum* и вредност МИК је иста као и она коју показује позитивна контрола, флуконазол (Табела 21).

**Табела 21.** Антигљивична активност лиганда Л2 и комплекса К2

Врста / тестиране супстанце	Л2		К2		Флуконазол	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1000	1000	500	1000	31,25	500
<i>Saccharomyces boulardii</i>	1000	> 1000	1000	> 1000	7,81	31,25
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	> 1000	> 1000	1000	> 1000	31,25	62,5
<i>Penicillium expansum</i>	> 1000	> 1000	1000	> 1000	250	500
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1000	> 1000	500	> 1000	1000	1000
<i>Penicillium italicum</i>	500	> 1000	250	> 1000	250	500
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233	1000	1000	500	1000	500	1000
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170	> 1000	> 1000	1000	> 1000	500	500
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	1000	> 1000	1000	1000	1000	1000
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	1000	> 1000	1000	> 1000	1000	1000

## **5. ДИСКУСИЈА**

Након веома добрих резултата које су показали комплекси платине у хемиотерапији, истраживање је усмерено и ка синтези комплекса других јона метала и испитивању њихове биолошке активности. Бакар је привукао посебну пажњу истраживача и са хемијског и са физиолошког аспекта. Прелазно тврдо-меке карактеристике, бакар(II)-јон чине погодним за координовање са различитим доносним атомима [27-29], а есенцијална улога коју има у организму [48,49], његове комплексе потенцијално мање токсичним. До сада је установљена генерално боља активност бакар(II)-комплекса у односу на бакар(I)-комплексе, али се сматра да биолошка активност комплекса у највећој мери зависи од комплексирајуће супстанце [43]. Због тога је избор лиганда верованто најзначајнији корак у синтези потенцијалног лека. Аминокиселине преко својих доносних атома лако формирају координативно-ковалентне везе са прелазним металима [30]. Иако се  $\beta$ -аминокиселине структурно незнатно разликују од  $\alpha$ -аминокиселина, њихова заступљеност у природи је мања и слабије су проучене. Након потврђене биолошке активности, установљене стабилније секундарне структуре  $\beta$ -пептида и улоге у фармакотерапији, расте и интересовање за испитивање ових аминокиселина [119]. Досадашња сазнања и развој метода за њихову синтезу чини их погодним лигандом за координовање са  $\text{Cu(II)}$ -јоном уз потенцијал за значајну биолошку активност и нижу токсичност комплекса.

### 5.1. Синтеза и карактеризација $\beta^2$ -аминокиселина

Лиганди који су коришћени при синтези комплексних једињења су деривати  $\beta$ -аминокиселина [2]. Могу се класификовати у  $\beta^2$ -аминокиселине, јер садрже супституисану циклохексил групу на другом угљениковом атому. Да би се уврстиле у категорију цикличних  $\beta$ -аминокиселина потребно је да имају амино и карбоксилну функционалну групу као супституенте на карбоцикличном прстену или амино групу која улази у састав прстена [3], што овде није случај. Једињења овог типа су често оптички активна, што представља један од проблема приликом селективне енантиомерне синтезе, међутим ови лиганди нису садржали хирални угљеников атом. Синтетисани су Родионовом реакцијом у којој је полазна компонента био циклохексанон, односно *terc*-бутилциклохексанон са приносом који је приближан очекиваном [6].

Нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија и инфрацрвена спектроскопија коришћене су да потврде претпостављену структуру синтетисаних аминокиселина. Сигнали  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  у NMR спектрима оба лиганда се јављају на очекиваним вредностима ppm за циклоалканске, алканске (Л2) и карбоксилне групе. NMR спектри лиганда (Л1) су у сагласности са спектром синтетисане  $\beta$ -аминокиселине Родионовом реакцијом [6], док се код Л2 јављају незнатна одступања у вредности ppm за  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  сигнале на истим позицијама (Табела 7) и додатни сигнали, један у  $^1\text{H}$  и два у  $^{13}\text{C}$  NMR спектру, који потичу од *terc*-бутил групе.  $^1\text{H}$  NMR спектри оба лиганда показују да се сигнали свих протона везаних за  $\text{sp}^3$  хибридизоване C атоме налазе на вредностима очекиваног хемијског померања од 0-2 ppm, осим протона на положају 2. где се због негативног индуктивног утицаја карбоксилне групе јавља сигнал на вишој вредности ppm. У протонским спектрима лиганда не уочавају се сигнали на око 12 ppm хемијског померања, на основу чега се може претпоставити да је карбоксилна група лиганда депротонувана. До највећег хемијског померања у  $^{13}\text{C}$  NMR спектру доводе C атом из карбоксилне групе (177,3 ppm), што је очекивано с обзиром на електронегативност C атома. Хемијски еквивалентни C и H атоми (по два пара на циклохексану оба лиганда и три еквивалентна C атома на *terc*-бутил групи Л2 као што се и очекивало показују исто хемијско померање.

## 5.2. Синтеза, карактеризација и стабилност раствора комплекса бакра(II) са $\beta^2$ -аминокиселинама

Након дисосовања соли, бакар(II)-нитрата трихидрата у воденом раствору очекује се да при додатку раствора лиганда бакар(II)-јон веже две аминокиселине, односно да се реакција одвија у молском односу 1:2. При додатку лиганда у реакциону смешу је у малим количинама додат и раствор литијум-хидроксида како би се услед повећања рН вредности омогућило боље депротоновање карбоксилних група у аминокиселинама. У светлу Пирсонове класификације може се очекивати координовање металног јона са доносним атомима азота и кисеоника из лиганда. Досадашње синтезе указују да бакар(II)-јон остварује четири координативно-ковалентне везе са два лиганда, односно координује се преко атома азота из амино групе и преко атома кисеоника из карбоксилне функционалне групе одговарајуће аминокиселине. У зависности од природе лиганда, односно од његове поларизабилности која диктира јачину лигандног поља зависи и да

ли ће неки тетракоординовани бакар(II)-јон да гради квадратно-планарне или тетраедарске комплексе [27]. Поред очекиване квадратно-планарне структуре, могу се јавити и геометријске структуре са координационим бројем 5 и координационим бројем 6, ако је дошло до координовања молекула растварача, воде у аксијалним положајима [30].

Како би се потврдила претпостављена структура синтетисаних комплекса урађена је карактеризација елементалном микроанализом и IR спектроскопијом. Резултати елементалне микроанализе за синтетисане комплексе (**K1** и **K2**) показују незнатна одступања од очекиваних вредности (Табела б). Међутим, на основу само ових анализа не може се са сигурношћу утврдити структура комплексног једињења и начин координовања. У циљу детаљнијег утврђивања начина координовања деривата β-аминокиселина (**L1** и **L2**) за централни јон метала снимани су инфрацрвени спектри. На основу асиметричних валенционих вибрација карбоксилних група може се утврдити постојање координативно-ковалентне везе. Уколико је координовање остварено преко карбоксилних група очекују се апсорпционе траке у области 1600-1650  $\text{cm}^{-1}$ , а ако није дошло до координовања са бакар(II)-јоном апсорпционе траке су у области 1700-1750  $\text{cm}^{-1}$  [120]. Све апсорпционе траке комплекса **K1** и **K2** налазе се у средњој (основној) инфрацрвеној области утврђеној према врсти енергетских прелаза. Утврђено је постојање двоструких, оштрих и јаких трака (1650-1570  $\text{cm}^{-1}$ ) код оба комплексна једињења које потичу од асиметричних фреквенција истезања карбоксилних група преко којих су β-аминокиселине координоване за јон метала. Инфрацрвени спектри комплексних једињења потврђују координовање бидентатних лиганата и преко атома азота. Асиметричне фреквенције истезања примарне амино групе забележене су на 3375  $\text{cm}^{-1}$  код **K1** и на 3369  $\text{cm}^{-1}$  код **K2**. Иако се код некоординованих β-аминокиселина појављују сигнали протоноване амино групе на 2944  $\text{cm}^{-1}$  код **L1** и на 2954  $\text{cm}^{-1}$  код **L2**, бакар(II)-комплексни не показују такве трака. Начин координовања лиганата (**L1** и **L2**) са бакар(II)-јоном није могуће са сигурношћу утврдити само на основу IR спектроскопије. IR спектри комплекса (**K1** и **K2**) не обухватају област далеког инфрацрвеног зрачења (400-100  $\text{cm}^{-1}$ ) која пружа информацију о вибрацијама молекула који садрже тешке атоме [120]. У овој области би се могле очекивати вибрације које потичу од Cu-O и Cu-N координативних веза. Фреквенце истезања M-N и M-O првенствено зависе од метала, док ће промена аминокиселине имати незнатан утицај. Установљено је да се при координовању са истом аминокиселином фреквенца повећава од Ni(II) до Pt(II) (Ni(II) < Cu(II) < Pd(II) < Pt(II)). При координовању глицина за

бакар(II)-јон у средњем инфрацрвеном спектру може се уочити сигнал на око  $480\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  Cu-N), а фреквенца од Cu-O се појављује у региону далеког инфрацрвеног зрачења, на око  $330\text{ cm}^{-1}$ . С обзиром да вибрације које потичу од координативних веза зависе од врсте метала, може се претпоставити да сигнали на  $482\text{ cm}^{-1}$  (**K1**) и  $485\text{ cm}^{-1}$  (**K2**) потичу од

Cu-N, док се фреквенце Cu-O не могу уочити у средњем инфрацрвеном спектру.

EPR спектроскопија је погодна метода за карактеризацију бакар(II)-комплекса. Ова метода је аналогна NMR спектроскопији, која се због парамагнетних карактеристика комплекса **K1** и **K2** није могла применити. Језгро  $\text{Cu}^{29}$  има атомски моменат и нуклеарни спин од  $3/2$ . Особине јона бакра омогућавају лако разрешавање структуре његових комплекса у 4 линије спектра. Вредност  $g$  фактора добијена методом служи за процену структуре комплекса. У тетраедарској и квадратно-планарној структури неспарени електрони се налазе у  $dx^2-y^2$  орбиталама дајући  $2B1g$  као основно стање са групама  $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,003$  [33,34]. EPR спектри комплекса **K1** и **K2** забележени у воденом раствору и при собној температури указују на квадратно-планарну геометријску структуру.

У случају квадратног распореда лиганда око централног јона метала два лиганда или два донорска атома у случају хелатног система налазе се на оси  $x$ , а два на оси  $y$ . Укупна енергија цепања  $d$ -орбитала код квадратно-планарне геометрије већа је него код октаедарске координације:  $\Delta_{\text{kvadr}} = 1,3 \Delta_{\text{okt}}$  [27]. Квадратно-планарна структура бакар(II)-комплекса укључује минорне интеракције дуж  $z$ -осе на растојању реда величине  $> 3,0 \text{ \AA}$  и јавља се код комплекса бакра(II) са монодентатним и бидентатним хелатним лигандима [121].

Најпоузданијом методом за карактеризацију структуре, рендгенском структурном анализом, утврђено је да је комплекс **K1** неутрални комплексни молекул који се састоји из централно постављеног Cu(II)-јона и два бидентатна лиганда. Углови веза измерених између атома који учествују у формирању координативних веза одступају од угла од  $90^\circ$  (Табела 9), тако да је комплекс неправилне квадратно-планарне структуре. Очекивана разлика у дужини веза између Cu-O и Cu-N (Табела 10) може се образложити краћим ковалентним радијусом атома кисеоника у односу на атом азота. Дужина координативних веза у комплексу **K1** је приближна дужини веза код дванаест бакар(II)-комплекса са различитим  $\beta$ -аминокиселинама пронађеним у бази кристалних структура, Cambridge Structural Database (CSD) [122]. Међутим, само један комплекс бакар(II)-јона и  $\beta$ -аминокиселине је квадратно-планаран као и **K1**, док се број

координованих лиганата у осталим комплексима повећава углавном због координовања молекула растварача. Комплекс са  $\beta$ -аланином, осим што има исту геометријску структуру и координује се преко кисеоника из депротоноване карбоксилне групе и азота из аминокиселине формирајући *transOtransN* геометријски изомер што је карактеристично и за **K1** комплекс. Установљено је чешће формирање *trans*-изомера, осим код комплекса са  $\beta$ -аминобутанском киселином који је *cis*-изомер октаедарске структуре са молекулима воде координованим у аксијалним положајима и бинуклеарног комплекса бакар(II)-јона и  $\beta$ -аланина. У бинуклеарном комплексу  $\beta$ -аланин се координује преко атома азота и оба атома кисеоника из депротоноване карбоксилне групе. Преко другог кисеоника успоставља се координовање за други Cu(II)-јон. Други бидентатни комплекс поред аспарагинске киселине садржи 1,10-фенантролин и нитрито лиганд. Аспарагинска киселина преко кисеоника из карбоксилне групе бочног низа повезује два Cu(II)-јона. У бази кристалних структура комплекса Cu(II)-јона и  $\beta$ -аминокиселина забележена су и два тринуклеарна комплекса. Један тринуклеарни комплекс се екваторијалним везама повезује за  $\beta$ -аланин, док је код другог комплекса преко азота и кисеоника из депротоноване карбоксилне групе за Cu(II)-јон координован  $\beta$ -аспартат. И поред могућности формирања полинуклеарних комплекса и аксијалног координовања растварача или донорског атома из бочног низа аминокиселине [122], комплекс **K1** је моноклеарне структуре стабилизоване са три молекула воде преко водоничних веза. Обзиром да је лиганд **L2** структурни аналог лиганда **L1** може се очекивати и да комплекс **K2** има сличну структуру комплексу **K1**.

У UV-Vis спектрима раствора комплексних једињења нису забележене промене у апсорпцији током времена. Комплекси остају стабилни у сва три коришћена растварача (Слике 18 и 19).

### 5.3. Интеракција комплекса са ДНК молекулом

Након карактеризације синтетисаних комплекса и испитивања њихове стабилности у различитим медијумима, проучаване су могућности интеракција са молекулима ДНК и потенцијална биолошка активност. С обзиром да је ДНК најчешће место дејства већег броја комплексних једињења као антиканцерогених агенаса [43], вршена су испитивања интеракције ДНК фрагмената са синтетисаним комплексима (**K1** и **K2**).

На основу досадашњих истраживања могло се претпоставити да ће синтетисани комплекси успоставити нековалентни тип интеракције са молекулом ДНК. Кинетичким мерењима је процењено постојање интеракција комплекса и ДНК. Како би се утврдило да ли је нековалентна интеракција електростатичког типа, интеркалативно везивање или жлеб, везивање примењене су UV-Vis спектрофотометријске и флуоресцентне спектроскопске методе, као и мерење вискозитета раствора ДНК молекула и присуству различите концентрације комплекса [123,124]. Резултати истраживања показују да исти молекул, потенцијални лек, може остварити интеракцију и на више начина [43]. Због добијања што примењивијих резултата који би могли да укажу на евентуално понашање синтетисаних комплекса у *in vivo* условима, мерења су извођена при подешеној рН вредности и температури, а улогу биолошких нуклеофила имали су СТ-ДНК и НТ-ДНК.

Вредности константи брзине (Табела 12) показују постојање интеракције између синтетисаних комплекса и нуклеофила при прилагођеним физиолошким условима. Нешто ниже вредности константе за **K2** вероватно су последица стерних сметњи при интеракцији.

UV-Vis апсорпциона спектрофотометрија је најједноставнија и најчешће коришћена техника за процену интеракције лек-ДНК [123,124]. У UV-Vis апсорпционом спектру ДНК јавља се широк опсег 200-350 nm у UV регији са максимумом апсорпције на 260 nm. Карактеристичан максимум је последица електронских транзиција хромофорских група пуринских и пиримидинских база. Обзиром на високу вероватноћу ових прелаза моларна апсорпција је реда величине око  $10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Моларна концентрација ДНК се овом техником одређује при мерењу апсорбанце на 260 nm таласне дужине, а односи апсорпције  $A_{260}/A_{280}$  и  $A_{260}/A_{230}$  могу да опишу чистоћу ДНК. Да је ДНК ослобођена од протеина и погодна за процену интеракције са потенцијалним леком говори однос који је у опсегу од 1,8-1,9 [124] СТ-ДНК и НТ-ДНК коришћене за процену интеракције са **K1** и **K2** нису садржале протеине и њихова измерена концентрација на 260 nm износи  $6600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Промене у спектрима слободне ДНК и раствора ДНК и неке друге супстанце могу да укажу на постојање и тип интеракције. Било која промена у секундарној структури дволанчаног хеликса ДНК настала под утицајем неког другог молекула се у спектру може манифестовати у виду хиперхромног ефекта (повећање интензитета апсорпције или хипохромног ефекта (смањење интензитета апсорпције)). Хипохромизам се јавља у случају када се секундарна структура молекула ДНК стабилизује електростатичким везивањем или интеркалацијом са другим молекулом, док се хиперхромизам јавља услед дестабилизације секундарне структуре



[123,124]. Значајно хиперхромно померање са појавом нових сигнала се уочава у UV-Vis спектрима (Слика 21) што јасно указује на јаку интеракцију између комплекса (**K1** и **K2**) и ДНК молекула. Молекули који са ДНК остварују интеракцију интеркалацијом обично у спектру показују хипохромизам и црвено померање. Интеркалаторни режим укључује интеракцију ароматичних хромофора базних парова и интеркалатора при чему се смањује електронска транзиција. Интензитет интеркалације је обично у сагласности са обимом хипохромизма. У типичном случају интеркалације у спектру се јавља хипохромизам већи од 35% и батохромни помак (помак максимума апсорпције према већим таласним дужинама) од 15 nm, док је у случају везивања за жлеб око 6-8 nm или без батохромизма [123]. Померање максимума апсорпције при интеракцији ДНК молекула са **K1** и **K2** није забележено. Дестабилизација и нарушавање секундарне структуре ДНК хеликса углавном воде ка појави хиперхромизма, који је посебно изражен након денатурације ДНК молекула. Водоничне везе између базних парова ограничавају резонанцију ароматичног прстена, па је апсорпција ДНК ограничена. Раскидањем водоничних веза и раздвајањем пуринских и пиримидинских база повећавају се електронске транзиције и апсорпција ДНК. Хиперхромизам може бити последица интеракције која доводи до делимичног отварања структуре хеликса. Могућа је појава овог ефекта услед електростатичког привлачења катјонског дела комплекса и фосфорне групе ДНК молекула која узрокује нарушавање секундарне структуре. Хиперхромизам се најчешће јавља при везивању за жлеб и при ковалентним интеракцијама [123,124].

Вредности унутрашње константе везивања су реда величине изнад  $10^5$  за оба комплекса (Табела 16) и сугерише да се интеракција комплекса **K1** и **K2** са фрагментима ДНК може остварити и интеркалацијом. Нешто нижа вредност ове константе за **K2** у односу на **K1** се може објаснити стерним сметњама које проузрокују *terc*-бутил групе и тако смањују интеракцију.

Флуоресцентна спектроскопија је због високе осетљивости и селективности посебно погодна метода за одређивање интеракције одређеног једињења са молекулом ДНК. Највећи интензитет флуоресценције показују једињења која садрже ароматични циклус у свом саставу, али и једињења која садрже алицикличне и алифатичне карбонилне структуре или конјуговане диенске системе. Постоји већи број различитих метода које се заснивају на флуоресцентној спектроскопији и користе се да одреде тип интеракције комплекса и ДНК молекула. У овом истраживању је праћена промена флуоресцентне емисије при испитивању конкурентних дисплазија. Ова метода користи

различите боје чији је афинитет и начин везивања за ДНК добро познат. Сматра се да било који молекула који би истиснуо боју са њеног места везивања везује по истом принципу [123,124]. Резултати показују значајно смањење интензитета флуоресценције са приметним црвеним померањем (Слика 22), што указује да је EtBr ослобођен из EtBr-ДНК комплекса и замењен синтетисаним комплексом (**K1/K2**). С обзиром да се EtBr понаша као интеркалатор, може се рећи да је то један од начина интеракције и комплексних једињења (**K1** и **K2**) са ДНК молекулом. Промена у интензитету флуоресценције се може користити за процену степена интеракције. Уколико би се комплекс везао на површини ДНК молекула, без интеркалације, промене у флуоресцентном спектру би биле незнатне. Резултати показују да су оба комплекса (**K1** и **K2**) довела до смањења интензитета флуоресценције која је у сагласности са вредностима *Stern-Volmer* константе и додатан је показатељ везивања комплекса за ДНК.

Мерење вискозитета је веома значајна техника за одређивање начина везивања потенцијалног лека за ДНК молекула. Због изузетне осетљивости ова хидродинамичка метода се сматра једном од најуспешнијих. Интеракција егзогеног молекула (комплексног једињења) са ДНК може да доведе до промене у дужини ДНК хеликса. Интеракције које проузрокују савијања молекула ДНК и његовог скраћивања, као што је случај при ковалентном везивању *цисплатине*, доводе до смањења релативног вискозитета. При везивању интеркалатора за хеликс, базе се удаљавају и продужава се ДНК молекула, односно долази до повећања вискозитета. Незнатно повећање вискозитета јавља се и при жлеб везивању, док површинско везивање комплекса за молекула ДНК нема утицај на промену релативног вискозитета [123]. Мерење вискозитета синтетисаних комплекса (**K1** и **K2**) спроведено је са циљем да се потврди вероватна интеркалација ових комплекса у ДНК хеликс. Повећање релативног вискозитета при додавању комплекса у раствор ДНК (Слика 23) сугерише да су оба комплекса интеркалатори који се у оквиру хеликса везују у аксијалним положајима размичући притом суседне базе и продужавајући молекула ДНК. Промена вискозитета је у складу са јачином интеракције, која је израженија при додатку комплекса **K1**. Ови резултати су у складу са вредностима константи добијених спектроскопским методама и вероватно је мања промена релативног вискозитета код **K2** последица слабије интеракције услед стерних сметњи алкил група.

Резултати истраживања углавном показују да се интеракција бакар(II)-комплекса са молекулом ДНК врши на више различитих начина. Комплекси бакар(II) са мешовитим лигандима  $[\text{Cu}(\text{SalCl-Gly})(\text{bipy})] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Cu}(\text{SalCl-Gly})(\text{H}_2\text{O})_2]$ ,

[Cu(SalCl-Ala)(H<sub>2</sub>O)], су показали потенцијал за оксидативно цепање ДНК молекула у присуству водоник-пероксида. Њихове константе везивања су мање од константе везивања класичног интеркалатора. Једино је [Cu(SalCl-Gly)(bipy)]·0,5H<sub>2</sub>O комплекс са највећом вредношћу константе везивања и највећим повећањем вискозитета окарактерисан и као интеркалатор. Бољу интеркалацију овог комплекса у односу на остале дало је увођење 2,2'-бипиридинског лиганда [125]. Константа везивања комплекса који садржи фенилаланин, [Cu(HPBM)(l-Phe)(H<sub>2</sub>O)]·ClO<sub>4</sub>, износи  $7,38 \cdot 10^{-4}$  и интеракцију са ДНК остварује преко малог жлеба [126]. Тернарни комплекси у којима је један од лиганда нека аминокиселина најчешће показују интеркалацију са ДНК молекулом што је у складу и са резултатима овог истраживања [127]. Иако је унутрашња константа везивања мања од  $10^6$ , што је случај и при интеракцији комплекса **K1** и **K2**, променом у интензитету флуоресценције и повећање вискозитета раствора ДНК указују на овај тип интеракције. Кординациона сфера је важна за интеракцију са ДНК, тако да су тернарни комплекси са аминокиселинама показали бољу супституцију са ДНК, од оних чија структура није квадратно-планарна [128].

Вредности израчунатих константи за **K1** и **K2** указују да ови комплекси имају добар афинитет за интеракцију са СТ-ДНК и НТ-ДНК. Боља интеракција комплекса **K1** у односу на комплекс **K2** је вероватно последица стерног ефекта *terc*-бутил групе у **K2**. У одређеној мери је забележена боља интеракција оба комплекса са НТ-ДНК, што може бити последица веће процентуалне заступљености гуанина у НТ-ДНК.

#### 5.4. Антитуморска активност

До сада је синтетисан, окарактерисан и биолошки испитан велики број комплекса јона бакра који су показали различиту антитуморску активност у поређењу са *цисплатином*, што указује да су различити механизми укључени у остваривању антиканцерогеног потенцијала [43].

Резултати који указују на интеракције **K1** и **K2** са СТ-ДНК и НТ-ДНК дали су подстицај да се испита њихова токсичност на три мишије ћелијске линије карцинома (4T1, СТ26, LLC1) МТТ методом. Комплекси су растворени у DMSO, а бланко узорци који су узети као контрола садржали су исту процентну концентрацију DMSO као и раствори комплекса. Због стабилности коју су комплекси показали у раствору DMSO и

пуферском систему није додатно проучаван самостални утицај повећане концентрације бакар(II)-јона који би настао услед потпуне дисоцијације комплексног једињења.

Ћелије карцинома дојке (4T1) су веома агресивне туморске ћелије. Због честе клиничке заступљености и метастатског потенцијала који је посебно отпоран на терапију, представљају погодан избор за испитивање нових фармакотерапеутика. Комплекси **K1** и **K2** готово да не показују цитотоксично дејство на 4T1. Комплекси бакар(II) који су садржали изомерне дипептиде изграђене од  $\alpha$ -аминокиселина (аланина и фенилаланин) показали су бољи цитотоксични ефекат у поређењу са цитотоксичношћу комплекса **K1** и **K2**. Оба пептидна комплекса показују сличну ефикасност према 4T1 ћелијама, са минималном токсичношћу према нетуморским ћелијама (фибробластима) у односу на *цисплатину* [129]. Комплексни молекул бакар(II)-јона који као фармакофорну групу садржи 1,4-диоксо-2-бутенил делује цитотоксично и генотоксично на 4T1 ћелије и при *in vivo* примени. Оштећење ДНК молекула и повећање ATM и p21 експресије, које изазива овај комплекс, доводи до заустављања ћелијског циклуса у G1 фази. До смрти 4T1 ћелија долази апоптозом која настаје услед повећане експресије BAX и каспазе 7 и смањене експресије BCL-2 гена. Цитотоксичност овог молекула ( $IC_{50} = 63,3 \mu\text{g/mL}$ , 72h) је мања од *цисплатине*, али значајно већа од оне коју су показали комплекси **K1** и **K2** [130] (Табела 17). Arindam Pramanik и сарадници су проучавали *in vivo* ефикасност бакар(II)-комплекса са дикето лигандом при циљаној испоруци до 4T1 ћелија. Установљено је да комплекс доводи до стварања реактивних врста кисеоника које изазивају оштећење ДНК молекула, као и деполаризацију митохондријалне мембране. Канцерогене ћелије умиру апоптозом која настаје услед оштећења митохондрија. Мишеви који су примали циљану испоруку *бис*(2,4-пентандион)бакар(II)-комплекса имали су већу стопу преживљавања и смањен волумен тумора у поређењу са неспецифичном испоруком лека [131].

На туморским ћелијама карцинома колона, СТ26, комплекс **K2** при нижим концентрацијама показује бољу активност у поређењу са *цисплатином*. Оба комплекса доводе до апоптозе туморских ћелија са израженим повећањем броја изумрлих ћелија у касној апоптози (Слика 25). Значајан цитотоксични ефекат на СТ26 ћелије забележен је и при примени комплекса бакар(II)-јона и метотрексата као лиганда. Комплексно једињење показује бољу ефикасност од  $\text{CuCl}_2$ , лиганда и *цисплатине* у прва 4 сата од периода инкубације. После 24 сата цитотоксични ефекат се значајно смањује, али су  $IC_{50}$  вредности комплекса и даље мање од  $IC_{50}$  вредности *цисплатине* [132]. Бинуклеарни комплекси бакар(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине нису показали

значајну антитуморску активност према СТ26 ћелијским линијама, док је њихов ефекат био значајно бољи према хуманим ћелијама карцинома колоне, НСТ-116 [133].

Од испитиваних ћелијских линија највећу осетљивост према синтетисаним комплексима показале су ћелије карцинома плућа, LLC1. Значајно висок цитотоксични потенцијал према овим ћелијама остварује комплекс **K2**.

И поред сталне потраге за развојем нових комплекса бакра(II) који ће показати значајну ефикасност према туморским ћелијама уз мању токсичност, још увек нема довољно података о *in vivo* истраживањима [43]. Volos и сарадници проучавали су *in vivo* активност комплекса бакра(II) са цијано и супституисаним цијано-дитиолато лигандима. Запажено је да повећање антитуморске активности није повезано са повећањем липофилности комплекса, већ са поларношћу тетраедарских и квадратно-планарних геометријских структура и електростатичким интеракцијама. Као најбољи антилеукемични агенс из ове серије комплекса показао се комплекс са тиазол/дитиолатним лигандима [134]. „Casiopéinas” је серија комплекса бакар(II)-јона и мешовитих хелатних лиганата са N,N и N,O донорским атомима од којих су неки показали обећавајућу *in vivo* активност на ћелијама колоректалног тумора [135].

Углавном су комплекси који остварују бољу интеракцију са молекулом ДНК показали и значајнији антиканцерогени потенцијал. Из серије комплекса са аминокиселинама, једино је  $[\text{Cu}(\text{SalCl-Gly})(\text{bipy})] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$  имао улогу интеркалатора. Овај комплекс је показао и највећу инхибицију преживљавања ћелија хуманог хепатоцелуларног карцинома јетре и хуманих ћелија карцинома плућа [125]. За комплексни молекул,  $[\text{Cu}(\text{HPBM})(\text{l-Phe})(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{ClO}_4$  установљено је да антитуморску активност, поред интеракције са ДНК преко малог жлеба, остварује и повећаним стварањем реактивних врста кисеоника. Вредности  $\text{IC}_{50}$  варирају у зависности од ћелијске линије и крећу се од  $5,7 \pm 0,1$  до  $8,3 \pm 0,6$   $\mu\text{M}$ , а апоптоза је забележена код Еса-109 ћелија [126].

Резултати антитуморске активности синтетисаних комплекса (**K1** и **K2**) нису били у сагласности са резултатима добијеним при испитивању интеракције комплекса и ДНК молекула. И поред јаче интеракције са СТ-ДНК и НТ-ДНК, комплекс **K1** је показао слабији цитотоксични потенцијал од **K2** на свим испитиваним ћелијским линијама. Ови резултати могу да укажу да комплекс **K2** антитуморски ефекат остварује и додатним механизмом, а не само дејством на ДНК.

## 5.5. Антимикробна активност

Антимикробна активност синтетисаних бакар(II)-комплекса испитана је на 20 различитих врста бактерија и гљива. Иако је познато да само повећање концентрације бакар(II)-јона у ћелији микроорганизама може да доведе до њене смрти, овај утицај није посебно праћен. Пре растварања комплекса у DMSO и припреми за микродилуциону методу, испитана је њихова стабилност у овом растварачу и утврђено је да не долази до нарушавања структуре комплекса. На овај начин је покушано да се искључи антимикробни утицај самог бакар(II)-јона и добијени резултати интерпретирају као антимикробна активност **K1** и **K2** комплекса. С обзиром да се зна да неке природне, цикличне β-аминокиселине показују антигљивично дејство, праћена је МИК и ММК лиганада.

Мононуклеарни и бинуклеарни комплекси бакра(II) координовани преко кисеоника из карбоксилне функционалне групе показују различите антимикробне активности. Неки бинарни и тернарни комплекси бакра(II) делују на бактерије боље од контроле, тетрациклина [136]. Бинуклеарни комплекси овог металног јона са лигандом који садржи карбоксилну групу показују значајну антибактеријску активност према *S. aureus* [137], док је код мононуклеарних комплекса антимикробна активност била селективна и умерена [138-142]. Као и у овом истраживању, мононуклеарни комплекси показују бољу антимикробну активност од лиганада, али је ова активност и даље мања од позитивних контрола или комплекса других метала са сличним лигандима [143-145]. Изузетак је истраживање које је показује да је антибактеријска активност бакар(II)-комплекса значајно боља од комплекса других метала са истим лигандима. Такође је забележено да неки мононуклеарни комплекси нису показали антимикробну активност за разлику од њихових лиганада [146].

Комплекси бакра(II) са аминокиселинама (глицином и фенилаланином) при концентрацији од 20 mg/ml нису показали значајну антимикробну активност за разлику од комплекса кадмијума и кобалта са истим лигандима и при истој концентрацији. Једињење код кога је забележена највећа зона инхибиције је Na[Cd(Phe)<sub>3</sub>], а затим Na[Co(Phe)<sub>3</sub>] и Na[Co(Gly)<sub>3</sub>]. Комплекс кадмијума са фенилаланином је показао већу активност према Грам-позитивним бактеријама (*S. Aureus*, *B. Subtilis* и *MRSA*) и према гљивама (*C. Albicans*) од контроле, акрифлавина, док су комплекси кобалта били ефикаснији према Грам-негативној бактерији (*P. Aeruginosa*) [147]. Комплекси бакра(II)

и кобалта(II) са аминокиселинама ( $[\text{Cu}(\text{L}_1)_2\text{H}_2\text{O}]$  и  $[\text{Co}(\text{L}_1)_2\text{H}_2\text{O}]$ , L-аминокиселина) су показали знатно бољу активност према Грам-позитивним бактеријама (*Bacillus cereus* и *Micrococcus luteus*) у односу на *E. coli*. Вредности пречника инхибиције су варирали од 0 до 30 mm у зависности од бактеријског соја и аминокиселине која је коришћена за хелирање са јоном метала. Генерално су бољу активност показали комплекси са леуцином и хистидином, умерену са метионином и фенилаланином, а мању са лизином и валином [148]. Антимикробна активност тернарних комплекса бабра(II) ( $[\text{Cu}(\text{ATS})(\text{A})]$ , ATS-2-аминометилтиофенил-4-бромсалицилалдехид, А-глицин, аланин, валин) испитана је на Грам-позитивним (*S. epidermidis* и *B. cereus*) и Грам-негативним (*E. coli* и *P. aeruginosa*) бактеријама и гљивама (*A. niger* ATCC 9029 и *A. fumigatus* ATCC 46645). Најбољу антимикробну активност показује комплекс са валином, док је најслабија активност забележена код комплекса са глицином, што се може повезати са њиховом липофилношћу [149]. Утицај прелазног металног јона је испитан координовањем трицина и хистидина са различитим прелазним металима (бакар(II), цинк(II) и кобалт(II)). Грам-позитивне бактерије показују већу осетљивост у односу на Грам-негативне бактерије што се може повезати са грађом ћелијског зида. Генерално, највећу активност показује комплекс са бабром, док је комплекс са кобалтом показао најмању активност [150].

Иако су  $\beta$ -аминокиселине производи метаболизма неких микроорганизама, запажено је да деривати цикличних  $\beta$ -аминокиселина могу деловати антимикробно. Међутим, самостална примена лиганата (Л1 и Л2) у овом истраживању није показала значајан антимикробни потенцијал. Ниска и селективна антимикробна активност коју су показали комплекси К1 и К2 вероватно је последица њихове смањене липофилности, због слабије хелатизације (квадратно-планарне геометријске структуре). С обзиром на N и O донорске атоме може се претпоставити да се антимикробна активност остварује инхибицијом ензимске активности у микроорганизму. Међутим, због ниског антимикробног потенцијала синтетисаних комплекса механизам њиховог дејства у бактеријској и ћелији гљиве није додатно испитиван.

## **6. ЗАКЉУЧАК**



На основу добијених резултата у овој Докторској дисертацији могу се извести следећи закључци:

Карактеризација комплекса бакра(II) са 2-(1-аминоциклохексил)сирћетном киселином (**K1**) и комплекса бакра(II) са 2-(1-амино-4-(*terc*-бутил)циклохексил)сирћетном киселином (**K2**):

- Састав синтетисаних комплекса је потврђен на основу резултата елементалне микроанализе који су у сагласности са израчунатим вредностима процентуалне заступљености угљеника, водоника и азота.
- У IR спектрима уочавају се карактеристичне траке које одговарају структури комплекса **K1** и **K2**.
- Резултати EPR спектроскопије указују да оба комплекса у воденом раствору имају квадратно-планарну геометријску структуру.
- Рендгенском структурном анализом установљено је да се координативно-ковалентна веза бакар(II)-јона и 2-(1-аминоциклохексил)сирћетне киселине остварује преко атома кисеоника из депротонованих карбоксилних група и преко атома азота из амино група у *transOtransN* положају, формирајући неутрални комплексни молекул (**K1**) квадратно-планарне структуре.

Интеракција синтетисаних комплекса са молекулом ДНК:

- Вредност константе брзине другог реда,  $k_2$  показује да долази до формирање производа при реверзибилној реакцији супституције комплекса **K1** и **K2** са СТ-ДНК и НТ-ДНК. Комплекс **K1** лакше подлеже реакцијама супституције у поређењу са комплексом **K2**, што је вероватно последица стерних утицаја *terc*-бутил групе. Супституција комплекса и ДНК је потврђена и на основу вредности константе брзине *pseudo*-првог реда,  $k_{obsd}$ , су у корелацији са концентрацијом ДНК.
- UV-Vis титрациони спектри и вредности константе везивања,  $K_b$  указују на интеракцију комплекса **K1** и **K2** и молекула ДНК.
- Значајно смањење интензитета флуоресценције са приметним црвеним померањем указује да је EtBr ослобођен из EtBr-ДНК комплекса и замењен синтетисаним комплексом (**K1/K2**). С обзиром да се EtBr понаша као

интеркалатор, може се рећи да је то један од начина интеракције и комплексних једињења (**K1** и **K2**) са ДНК молекулом.

- Повећање релативног вискозитета при додавању **K1/K2** у раствор ДНК сугерише да су оба комплекса интеркалатори који размичу суседне базе и продужавају молекул ДНК.

Антитуморска активност синтетисаних комплекса:

- **K1** и **K2** показују релативно низак цитотоксични ефекат на мишјим ћелијама карцинома дојке, умерен ефекат на ћелије карцинома колоне и релативно високу цитотоксичност према ћелијама карцинома плућа.
- Комплексна једињења индукују апоптозу ћелија карцинома колоне и при нижим концентрацијама имају бољу активност од *цисплатине*.
- Комплекс **K1** је показао јачу интеракцију са СТ-ДНК и НТ-ДНК од **K2**, али слабији цитотоксични потенцијал на свим испитиваним ћелијским линијама. Ови резултати могу да укажу да интеракција са ДНК није једини механизам за испољавање антитуморског ефекта комплекса **K2**.

Антимикробна активност синтетисаних комплекса:

- **K1** и **K2** испољавају ниску и селективну антимикробну активност која је вероватно је последица њихових слабих липофилних карактеристика.
- Између Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија није било разлике у осетљивости на испитиване супстанце, а најбољу антимикробну активност показује комплекс **K2** на *P. aeruginosa*.

## **7. ЛИТЕРАТУРА**

1. Petrović D, Slobodan, Mijin Ž, Dušan, Stojanović D. Nadežda, Hemija prirodnih organskih jedinjenja, Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 2009.
2. Wagner I, Musso H, New naturally occurring amino acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1983, 22(11): 816-28.
3. Juaristi, E. Structural Types of Relevant  $\beta$ -Amino Acid Targets. *Enantioselective Synthesis of  $\beta$ -Amino Acids*, 2<sup>nd</sup>, John Wiley and Sons, 2005.
4. Minnaard A, Feringa B, Szymanski W, Weiner B, Szymanski W, Janssen D et al. Recent advances in the catalytic asymmetric synthesis of beta-amino acids. *Chemical Society Reviews*. 2010; 39(5): 1656-91.
5. Weiner B. *New Methods towards the synthesis of betaamino acids*, Printpartners Ipskamp BV, Enschede, the Netherlands
6. Lebedev A, Lebedeva A, Sheludyakov V, Kovaleva E, Ustinova O, Kozhevnikov I. Competitive Formation of  $\beta$ -Amino Acids, Propenoic, and Ylidenemalonic Acids by the Rodionov Reaction from Malonic Acid, Aldehydes, and Ammonium Acetate in Alcoholic Medium. *Russian Journal of General Chemistry*, 2005; 75(7): 1113-24.
7. Liljeblad A, Kanerva L. Biocatalysis as a profound tool in the preparation of highly enantiopure  $\beta$ -amino acids. *Tetrahedron*. 2006; 62(25): 5831-54.
8. Tasnadi G, Forro E, Fulop F. An efficient new enzymatic method for the preparation of  $\beta$ -aryl- $\beta$ -amino acid enantiomers. *Tetrahedron Asymmetry*. 2008; (17): 2072.
9. Rossetti V, Lombard A, Determination of glutamate decarboxylase by highperformance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*. 1996; 681: 63–7.
10. Wang HF, Tsai YS, Lin ML, Ou AS, Comparison of bioactive components in GABA tea and green tea produced in Taiwan, *Food Chem*. 2006; 96: 648–53.
11. Hsieh MM, Chen SM, Determination of amino acids in tea leaves and beverages using capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection, *Talanta* 2007; 73: 326–31.
12. Luque G, Ferreyra N, Rivas G. Electrochemical sensor for amino acids and albumin based on composites containing carbon nanotubes and copper microparticles. *Talanta*. 2007; 71: 1282-87.
13. Cheng R, Gellman S, DeGrado W.  $\beta$ -Peptides: From Structure to Function. *Chem. Rev.* 2001; 101: 3219-32
14. Beke T, Somlai C, Perczel A. Toward a Rational Design of beta-Peptide Structures. *J Comput Chem*. 2006; 27: 20-38.

15. Seebach D, Overhand M, Kuehnle F, Martinoni B, Oberer L, Widmer H, et al.  $\beta$ -Peptides: Synthesis by Arndt-Eistert Homologation with Concomitant Peptide Coupling. Structure Determination by NMR and CD Spectroscopy and by X-Ray Crystallography. Helical Secondary Structure of a  $\beta$ -Hexapeptide in Solution and Its Stability towards Pepsin. 1996; 79(4): 913-41.
16. Thompson J, Morris C, Smith I. New Naturally Occurring Amino Acids. Annual Review Of Biochemistry. 1969; 38(1): 137-57.
17. A. K, M. G. H, M. D, J. M. Alicyclic  $\beta$ -amino acids in Medicinal Chemistry. Amino Acids. 2005; 29(2): 89-100.
18. Patočka J.  $\beta$ -amino acids and their natural biologically active derivatives. Derivatives of unusual alicyclic and heterocyclic  $\beta$ -amino acids. Mil. Med. Sci. Lett. 2011; 80: 2-11.
19. Del Borgo M, Kulkarni K, Aguilar M. Using beta-Amino Acids and beta-Peptide Templates to Create Bioactive Ligands and Biomaterials. Current Pharmaceutical Design. 2017; 23(26): 3772-85.
20. Kiss L, Mandity I, Fulop F. Highly functionalized cyclic beta-amino acid moieties as promising scaffolds in peptide research and drug design. Amino Acids 49(9): 1441-55.
21. Greenwood NN, Earnshaw A. Chemistry of the Elements, 2<sup>nd</sup>, School of Chemistry University of Leeds, U.K. 1998.
22. *Chemical Abstracts Service*
23. *International Union of Pure and Applied Chemistry*
24. Filipović I, Lipanović S. Opća i anorganska hemija. Školska knjiga, Zagreb 1982.
25. Hathaway BJ. Copper. Coord Chem Rev. 1983; 52: 87-169.
26. 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.
27. Milić N. Neorganska kompleksna i klasterna jedinjenja. Prirodno-matematički fakultet, 1998.
28. Murphy B, Hathaway B. The stereochemistry of the copper(II) ion in the solid statesome 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.
29. T. V. P, N. V. A. Complexes of Copper in Unstable Oxidation States. Russian Journal Of Coordination Chemistry. 2003; 29(11): 743-65.

30. Hakimi M, Aliabadi TS. Coordination Chemistry of Copper  $\alpha$ - Amino Acid Complexes. World Applied Programming. 2012; 2(10): 431-43.
31. Berestova T, Kuzina L, Amineva N, Faizrakhmanov I, Massalimov I, Mustafin A. ATR-FTIR spectroscopic investigation of the cis- and trans-bis-( $\alpha$ -amino acids) copper(II) complexes. Journal Of Molecular Structure. 2017; 1137: 260-66.
32. Nakamoto K. Infrared spectra of the inorganic and coordination compounds. New York: Willey; 1963.
33. Salvadori E, Roessler M, Salvadori E. Principles and applications of EPR spectroscopy in the chemical sciences. Chemical Society Reviews [serial on the Internet]. (n.d.), 47(8): 2534-53.
34. Szabó-Plánka T, Rockenbauer A, Györ M, Gaizer F. ESR study of copper(II) complexes of  $\alpha$ -amino acids. Coordination modes and metal-ligand bonds in frozen aqueous solutions. Journal Of Coordination Chemistry. 1988; 17(1): 69-83.
35. Alanin cis I trans
36. Baggio R, Calvo R, Brondino C, Garland M, Atria A, Spodine E. A Novel Structure of (l-Aspartato)(1,10-phenanthroline)copper(II) Hydrate. Acta Crystallographica: Section C. 1995; 51(3): 382-5.
37. Alanin tetra
38. Roseiro A, Adão P, Galvão A, Costa Pessoa J, Carvalho M, Botelho Do Rego A. Oxygen activation by copper camphor complexes. Inorganic Chemistry Frontiers. 2015; 2(11): 1019-28.
39. Crystal structure of copper (II) complexes with  $\omega$ -amino acids. 1973
40. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. Biomed Pharmacother. 2003; 57(9): 386-98.
41. Thiele DJ. Integrating trace element metabolism from the cell to the whole organism. J Nutr. 2003; 133(5 Suppl 1): 1579S-80S.
42. Kidane TZ, Farhad R, Lee KJ, Santos A, Russo E, Linder MC. Uptake of copper from plasma proteins in cells where expression of CTR1 has been modulated. Biometals. 2012; 25(4): 697-709.
43. Santini S, Pellei, M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C. Advances in copper complexes as anticancer agents. Chem Rev. 2013; 114(1): 815-62.
44. Lalioti V, Muruais G, Tsuchiya Y, Pulido D, Sandoval I. Molecular mechanisms of copper homeostasis. Frontiers In Bioscience. 2009; (13): 4878-903.

45. Gielen, M, Tiekink ER. Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine. John Wiley & Sons 2005.
46. Strohfeldt KA. Essentials of Inorganic Chemistry: For Students of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences and Medicinal Chemistry. John Wiley & Sons 2014.
47. Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*. 1999; 284(5415): 805-8.
48. Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. Essentiality of copper in humans. *American Journal Of Clinical Nutrition*. 1998; (5 SUPP): 952S.
49. Angelova M, Asenova S, Nedkova V, Koleva-Kolarova R. Copper in the human organism. *Trakia Journal Of Sciences*. 2011; 9(1): 88-98.
50. de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LW. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet*; 44(11): 673-88.
51. Tang J, Donsante A, Desai V, Patronas N, Kaler SG. Clinical outcomes in Menkes disease patients with a copper-responsive ATP7A mutation, G727R. *Mol Genet Metab*. 2008; 95(3): 174-81.
52. Menkes JH, Alter M, Steigleder GK, Weakley DR, Sung JH. A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics*. 1962; 29: 764-79.
53. Kaler SG, Holmes CS, Goldstein DS, Tang J, Godwin SC, Donsante A, Liew CJ, Sato S, Patronas N. Neonatal diagnosis and treatment of Menkes disease. *N Engl J Med*. 2008; 358(6): 605-14.
54. Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *Lancet*. 2007; 369(9559): 397-408.
55. Rodriguez-Castro KI, Hevia-Urrutia FJ, Sturniolo GC. Wilson's disease: A review of what we have learned. *World J Hepatol*. 2015; 7(29): 2859-70.
56. Brewer GJ, Askari FK. Wilson's disease: clinical management and therapy. *J Hepatol*. 2005; 42 Suppl(1): S13-21.
57. Członkowska A, Litwin T, Karliński M, Dziezyc K, Chabik G, Czerska M. D-penicillamine versus zinc sulfate as first-line therapy for Wilson's disease. *Eur J Neurol*. 2014; 21(4): 599-606.
58. Shimizu N, Yamaguchi Y, Aoki T. Treatment and management of Wilson's disease. *Pediatr Int*. 1999; 41(4): 419-22.

59. Ranucci G, Polishchuck R, Iorio R. Wilson's disease: Prospective developments towards new therapies. *World J Gastroenterol.* 2017; 23(30): 5451-6.
60. Gaetke L, Chow C. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2003; 189(1-2): 147-63.
61. Uriu-Adams J, Keen C. Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects Of Medicine.* 2005; 26(4-5): 268-98.
62. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *The Biochemical Journal.* 2007; 401(1): 1-11.
63. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010; 49(11): 1603-16.
64. 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.
65. Hayton BA, Broome HE, Lilenbaum RC. Copper deficiency-induced anemia and neutropenia secondary to intestinal malabsorption. *Am J Hematol.* 1995; 48(1): 45-7.
66. Myint ZW, Oo TH, Thein KZ, Tun AM, Saeed H. Copper deficiency anemia: review article. *Ann Hematol.* 2018; 97(9): 1527-34.
67. Davis CD, Newman S. Inadequate dietary copper increases tumorigenesis in the Min mouse. *Cancer Lett.* 2000; 159(1): 57-62.
68. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecularweight. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79(24): 7634-8.
69. Bonham M, O'Connor JM, Hannigan BM, Strain JJ. The immune system as a physiological indicator of marginal copper status? *Br J Nutr.* 2002; 87(5): 393-403.
70. Nivo bakra u karcinomu
71. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011; 473(7347): 298-307.
72. Ahluwalia A, Jones MK, Matysiak-Budnik T, Tarnawski AS. VEGF and colon cancer growth beyond angiogenesis: does VEGF directly mediate colon cancer growth via a non-angiogenic mechanism? *Curr Pharm Des.* 2014; 20(7): 1041-4.
73. Finney L, Vogt S, Fukai T, Glesne D. Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009; 36(1): 88-94.
74. Harris ED. A requirement for copper in angiogenesis. *Nutr Rev.* 2004; 62(2): 60-4.



75. MacDonald G, Nalvarte I, Smirnova T, Vecchi M, Aceto N, Dolemeyer A, et al. Memo is a copper-dependent redox protein with an essential role in migration and metastasis. *Sci Signal*. 2014; 7(329): ra56.
76. Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63(19-20): 2304-16.
77. Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, Seftor EA, Wiley EL, Fong SF et al. Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res*. 2005; 65(24): 11429-36.
78. Denoyer D, Masaldan S, La Fontaine S, Cater MA. Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. *Metallomics*. 2015; 7(11) :1459-76.
79. Brem SS, Zagzag D, Tsanaclis AM, Gately S, Elkouby MP, Brien SE. Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor. *Am J Pathol*. 1990; 137(5): 1121-42.
80. Crowe A, Jackaman C, Beddoes KM, Ricciardo B, Nelson DJ. Rapid copper acquisition by developing murine mesothelioma: decreasing bioavailable copper slows tumor growth, normalizes vessels and promotes T cell infiltration. *PloS One*. 2013; 8(8): e73684.
81. Brewer GJ, Dick RD, Grover DK, LeClaire V, Tseng M, Wicha M et al. Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study. *Clin Cancer Res*. 2000; 6(1): 1-10.
82. Allensworth JL, Evans MK, Bertucci F, Aldrich AJ, Festa RA, Finetti P et al. Disulfiram (DSF) acts as a copper ionophore to induce copper-dependent oxidative stress and mediate anti-tumor efficacy in inflammatory breast cancer. *Mol Oncol*. 2015; 9(6): 1155-68.
83. Kagawa TF, Geierstanger BH, Wang AH, Ho PS. Covalent modification of guanine bases in double-stranded DNA. The 1.2-Å Z-DNA structure of d(CGCGCG) in the presence of CuCl<sub>2</sub>. *J Biol Chem*. 1991; 266(30): 20175-84.
84. Sangeetha Gowda K.R. Blessy Baby Mathew, C.N. Sudhamani, H.S. Bhojya Naik. Mechanism of DNA Binding and Cleavage. *Biomedicine and Biotechnology*. 2014; 2(1): 1-9.
85. Streckowski L, Wilson B. Noncovalent interactions with DNA: An overview. *Mutation Research-Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*. 2007; 623: 3-13.

86. García-Ramos J, Galindo-Murillo R, Cortés-Guzmán F, Ruiz-Azuara L. Metal-Based Drug-DNA Interactions. *Journal Of The Mexican Chemical Society*. 2013; (3): 245-59.
87. Blackburn, G. M. Gait, M. J. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*; Oxford University Press: Oxford, 1990.
88. Bischoff G, Hoffmann S. DNA-binding of drugs used in medicinal therapies. *Curr Med Chem*. 2002 Feb;9(3):312-48. Review. PubMed PMID: 11860361.
89. Galindo-Murillo R, García-Ramos JC, Ruiz-Azuara L, Cheatham TE 3rd, Cortés-Guzmán F. Intercalation processes of copper complexes in DNA. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43(11): 5364-76.
90. 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(10): 7709-18.
91. Drexler HC. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(3): 855-60.
92. Janković SM, Prostran M, Todorović Z. *Farmakologija i toksikologija*. Medicinski fakultet 2007.
93. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*. 2001; 70: 369-413.
94. Živančević-Simović S, Đukić Aleksandar. *Opšta patološka fiziologija*. Medicinski fakultet 2006.
95. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 150845.
96. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015; 16(6): 2129-44.
97. Švabić-Vlahović M, Savić B, Ranin L, Đukić S, Berger-Jekić O, Nedeljković M. *Medicinska mikrobiologija, Savremena administracija* Beograd 2008.
98. Saier Jr. MH. *Encyclopedia of Microbiology (3rd Edition): Cell Membrane, Prokaryotic*, Academic press, 2009: 341-56.
99. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology: an introduction*. 7th ed. Pearson Education, San Francisco, CA 2002.
100. Green DW. The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin Ther Targets*. 2002 Feb;6(1):1-19. Review. PubMed PMID: 11901475.

101. Madigan MT, Clark DP, Stahl D, Martinko JM. Brock Biology of Microorganisms 13th edition. Benjamin Cummings. 2010.
102. Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(9): 719-27.
103. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol.* 2013 ;11(6): 371-84.
104. Festa RA, Thiele DJ. Copper at the front line of the host-pathogen battle. *PLoS Pathog.* 2012; 8(9): e1002887.
105. Lipo
106. Z.H. Chohan, A. Scozzafava, C.T. Supran. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2003: 17, 261.
107. Zahid H. Chohan Khalid M. Khan Claudiu T. Supuran. Synthesis of antibacterial and antifungal cobalt(II), copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes with bis-(1,1'-disubstituted ferrocenyl)thiocarbohydrazone and bis-(1,1'-disubstituted ferrocenyl)carbohydrazone. *Appl. Organomet. Chem.* 2004: 18(7), 305-10.
108. Çakir, Semiha, Biçer, Ender, Odabasoglu, Mustafa, & Albayrak, Çigdem. Electrochemical and spectroscopic study of 4-(Phenyldiazenyl)-2-[[tris (hydroxymethyl)methyl] aminomethylene]cyclohexa-3,5-dien-1(2H)-one: mechanism of the azo and imine electroreduction. *Journal of the Brazilian Chemical Society.* 2005; 16(4), 711-7.
109. Poole K. At the Nexus of Antibiotics and Metals: The Impact of Cu and Zn on Antibiotic Activity and Resistance. *Trends In Microbiology.* 2017; (10): 820.
110. Kumar S, Dhar DN, Saxena PN. Applications of metal complexes of Schiff bases-A review. 2009; 68: 181-7.
111. Oxford Diffraction, CrysAlis CCD, CCD Data Collection GUI. Oxford Diffraction Ltd. Oxford, UK (2007).
112. Palatinus L, Chapuis GJ. *Appl Crystallogr* 2007; 40: 786-90.
113. Sheldrick GM. *Acta Crystallogr Sect C: Cryst Struct Commun* 2015; 71: 3-8.
114. Farrugia LJ. *J Appl Crystallogr* 1999; 32: 837-8.
115. Brandenburg K. DIAMOND (Version 3.2i) Crystal Impact GbR, Bonn, Germany, 2009.
116. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.

117. Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(1): 60-76.
118. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 2007; 42(4): 321-4.
119. Del Borgo MP, Kulkarni K, Aguilar MI. Using  $\beta$ -Amino Acids and  $\beta$ -Peptide Templates to Create Bioactive Ligands and Biomaterials. *Curr Pharm Des.* 2017; 23(26): 3772-85.
120. Stuart B. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications [monograph on the Internet]. Chichester, West Sussex, England: J. Wiley; 2004.
121. Hathaway B, Hodgson P. Copper-ligand bond-lengths in axial complexes of the copper(II) ion. *Journal Of Inorganic And Nuclear Chemistry* [serial on the Internet]. 1973; 35(12): 4071-81.
122. Groom CR, Bruno IJ, Lightfoot MP, Ward SC. The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallogr B Struct Sci Cryst Eng Mater.* 2016; 72(Pt 2): 171-9.
123. Rehman SU, Sarwar T, Husain MA, Ishqi HM, Tabish M. Studying non-covalent drug-DNA interactions. *Arch Biochem Biophys.* 2015; 576: 49-60.
124. Sirajuddin M, Ali S, Badshah A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *J Photochem Photobiol B.* 2013; 124: 1-19.
125. Li A, Liu YH, Yuan LZ, Ma ZY, Zhao CL, Xie CZ, Bao WG, Xu JY. Association of structural modifications with bioactivity in three new copper(II) complexes of Schiff base ligands derived from 5-chlorosalicylaldehyde and amino acids. *J Inorg Biochem.* 2015; 146: 52-60.
126. Liu Y, Mo H, Lv Z, Shen F, Zhang C, Le X, et al. DNA binding, crystal structure, molecular docking studies and anticancer activity evaluation of a copper(II) complex. *Transition Metal Chemistry.* 2018; (3): 259.
127. Jia L, Xu XM, Xu J, Chen LH, Jiang P, Cheng FX et al. Synthesis, characterization, cytotoxic activities, and DNA-binding studies of ternary copper(II) complexes with new coumarin derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2010; 58(8): 1003-8.
128. Chikira M, Tomizawa Y, Fukita D, Sugizaki T, Sugawara N, Yamazaki T et al. DNA-fiber EPR study of the orientation of Cu(II) complexes of 1,10-phenanthroline and its derivatives bound to DNA: mono(phenanthroline)-copper(II) and its ternary complexes with amino acids. *J Inorg Biochem.* 2002; 89(3-4): 163-73.

129. Facchin G, Veiga N, Kramer MG, Batista AA, Várnagy K, Farkas E, Moreno V, Torre MH. Experimental and theoretical studies of copper complexes with isomeric dipeptides as novel candidates against breast cancer. *J Inorg Biochem.* 2016; 162: 52-61.
130. De Oliveira EJT, Pessatto LR, de Freitas RON, Pelizaro BI, Rabacow APM, Vani JM et al. New Bis copper complex ((Z) -4 - ((4-chlorophenyl) amino)-4-oxobut-2-enoyl) oxy): Cytotoxicity in 4T1 cells and their toxicogenic potential in Swiss mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018; 356: 127-38.
131. Pramanik A, Laha D, Dash SK, Chattopadhyay S, Roy S, Das DK, Pramanik P, Karmakar P. An in-vivo study for targeted delivery of copper-organic complex to breast cancer using chitosan polymer nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 68: 327-37.
132. Nagaj J, Kołkowska P, Bykowska A, Komarnicka UK, Kyzioł A, Jeżowska-Bojczuk M. Interaction of methotrexate, an anticancer agent, with copper(II) ions: coordination pattern, DNA-cleaving properties and cytotoxic studies. *Med Chem Res.* 2015; 24: 115-23.
133. Nikolić M, Mijajlović M, Jevtić V, Ratković Z, Novaković S, Radić G, 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. *Journal Of Molecular Structure.* 2016; 1116264-271.
134. Bolos CA, Chaviara AT, Mourelatos D, Iakovidou Z, Mioglou E, Chrysogelou E, Papageorgiou A. Synthesis, characterization, toxicity, cytogenetic and in vivo antitumor studies of 1,1-dithiolate Cu(II) complexes with di-, tri-, tetra- amines and 1,3-thiazoles. Structure-activity correlation. *Bioorg Med Chem.* 2009; 17(8): 3142-51.
135. Carvallo-Chaigneau F, Trejo-Solis C, Gomez-Ruiz C, Rodriguez-Aguilera E, Macias-Rosales L, Constantino-Casas F, et al. Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biomaterials.* 2008; (1): 17.
136. El-Gamel NE, Zayed MA. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activity evaluation of metal complexes of sparfloxacin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2011; 82(1): 414-23.
137. Siddiqi ZA, Khalid M, Kumar S, Shahid M, Noor S. Antimicrobial and SOD activities of novel transition metal complexes of pyridine-2,6-dicarboxylic acid containing 4-picoline as auxiliary ligand. *Eur J Med Chem.* 2010; 45(1): 264-9.

138. Siddiqi ZA, Sharma PK, Shahid M, Khalid M, Anjuli, Siddique A et al. Superoxide scavenging and antimicrobial activities of novel transition metal complexes of oxydiacetate dianion as primary ligand: spectral characterization, cyclic voltammetric investigations and crystal structure. *Eur J Med Chem.* 2012; 57: 102-11.
139. Chalkidou E, Perdih F, Turel I, Kessissoglou DP, Psomas G. Copper(II)-complexes with antimicrobial drug flumequine: structure and biological evaluation. *J Inorg Biochem.* 2012; 113: 55-65.
140. Creaven BS, Egan DA, Karcz D, Kavanagh K, McCann M, Mahon M et al. Synthesis, characterisation and antimicrobial activity of copper(II) and manganese(II) complexes of coumarin-6,7-dioxyacetic acid (cdoaH<sub>2</sub>) and 4-methylcoumarin-6,7-dioxyacetic acid (4-MeccdoaH<sub>2</sub>): X-ray crystal structures of [Cu(cdoa)(phen)<sub>2</sub>].8.8H<sub>2</sub>O and [Cu(4-Meccdoa)(phen)<sub>2</sub>].13H<sub>2</sub>O (phen=1,10-phenanthroline). *J Inorg Biochem.* 2007; 101(8): 1108-19.
141. Efthimiadou EK, Katsarou ME, Karaliota A, Psomas G. Copper(II) complexes with sparfloxacin and nitrogen-donor heterocyclic ligands: Structure-activity relationship. *J Inorg Biochem.* 2008; 102(4): 910-20.
142. Geeta B, Shrivankumar K, Reddy PM, Ravikrishna E, Sarangapani M, Reddy KK, Ravinder V. Binuclear cobalt(II), nickel(II), copper(II) and palladium(II) complexes of a new Schiff-base as ligand: synthesis, structural characterization, and antibacterial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2010; 77(4): 911-5.
143. Rajasekara M; Sreedaranb S; Prabub R; Narayananb V; Jegadeeshc R; Raamanc N et al. Synthesis, characterization, and antimicrobial activities of nickel(II) and copper(II) Schiff-base complexes. *Journal of Coordination Chemistry.* 2010; 63(1): 136–46.
144. K.S.Patel, J. C. Patel, H. R. Dholariya, V. K. Patel, K. D. Patel. Synthesis of Cu(II), Ni(II), Co(II), and Mn(II) Complexes with Ciprofloxacin and Their Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant and Anti-Tubercular Activity *Open Journal of Metal*, 2012, 2, 49-59
145. Al-Shaalan N. Synthesis, characterization and biological activities of Cu(II), Co(II), Mn(II), Fe(II), and UO<sub>2</sub>(VI) complexes with a new Schiff base hydrazone: O-hydroxyacetophenone-7-chloro-4-quinoline hydrazone. *Molecules.* 2011; 16(10): 8629-45.
146. Shebl M, Khalil S, Ahmed S, Medien H. Synthesis, spectroscopic characterization and antimicrobial activity of mono-, bi- and tri-nuclear metal complexes of a new Schiff base ligand. *Journal Of Molecular Structure.* 2010; (1-3): 39.

147. Aiyelabola TO, Ojo IA, Adebajo AC, Ogunlusi GO, Oyetunji O, Akinkunmi EO, Adeoye AO. Synthesis, characterization and antimicrobial activities of some metal (II) amino acids' complexes. *Advances in Biological Chemistry*. 2012;2(03):268.
148. Stănilă A, Braicu C, Stănilă S. Antibacterial activity of copper and cobalt amino acids complexes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2011;39(2):124-9.
149. Aljahdali MS, Abdelkarim AT, El-Sherif AA, Ahmed MM. Synthesis, characterization, equilibrium studies, and biological activity of complexes involving copper (II), 2-aminomethylthiophenyl-4-bromosalicylaldehyde Schiff base, and selected amino acids. *Journal of Coordination Chemistry*. 2014;67(5):870-90.
150. Zayed ME, Ammar RA. Some transition metal ions complexes of tricine (Tn) and amino acids: pH-titration, synthesis and antimicrobial activity. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2014;18(6):774-82.