



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



*Душан Љ. Томовић*

**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ИСПИТИВАЊЕ**  
**БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ БИНУКЛЕАРНИХ**  
**КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА S-АЛКЕНИЛ ДЕРИВАТИМА**  
**ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ**

Докторска дисертација

**Ментор: Проф. др Гордана П. Радић**

Крагујевац, 2018. године

# САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	5
<b>1.1. Бакар</b> .....	6
1.1.1. Хомеостаза бакра.....	7
1.1.2. Бакар и поремећаји људског здравља.....	7
1.1.3. Координовање јона бакра(II) у комплексним једињењима.....	11
<b>1.2. Тиосалицилна киселина</b> .....	13
1.2.1. Деривати тиосалицилне киселине и њихова примена.....	18
<b>1.3. Структура и карактеристике комплекса бакра(II) са тиосалицилном киселином као лигандом</b> .....	22
<b>1.4. Биолошка активност комплекса бакра(II)</b> .....	25
1.4.1. Антимикробна активност комплекса бакра(II) .....	25
1.4.2. Антитуморска активност комплекса бакра(II) .....	30
1.4.3. Интеракције са дезоксирибонуклеинском киселином (ДНК) .....	36
1.4.3.1. Интеракције бакар(II)-комплекса са нуклеобазама у ДНК.....	36
1.4.3.2. Комплекси бакра као инхибитори топоизомеразе I и II.....	42
1.4.3.3. Комплекси бакра као протеазом инхибитори.....	43
<b>2. ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	44
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	46
<b>3.1. Поступак синтеза лиганда</b> .....	47
<b>3.2. Поступак синтеза комплекса</b> .....	48
3.2.1. Синтеза комплекса бакар(II) са S-пропенил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1).....	48
3.2.2. Синтеза комплекса бакар(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2).....	48
<b>3.3. Анализе и методе мерења</b> .....	49
3.3.1. Елементална микроанализа.....	49
3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија.....	49

3.3.3. Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија.....	49
3.3.4. Магнетна мерења.....	50
3.3.5. Моларна проводљивост.....	50
3.3.6. Рендгентска структурна анализа.....	51
3.3.6.1. Рендгенска структурна анализа комплекса бакар(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине [Cu <sub>2</sub> (S-isobutenyl-thiosal) <sub>4</sub> (DMSO) <sub>2</sub> ] (C2).....	51
<b>3.4. Кинетичка мерења.....</b>	<b>52</b>
<b>3.5. Интеракције комплекса са ДНК.....</b>	<b>54</b>
3.5.1. Абсорпциона спектроскопска мерења.....	54
3.5.1.1. UV-Vis ДНК интеракције.....	54
3.5.1.2. UV-Vis абсорпционе студије.....	55
3.5.2. Флуоресцентна мерења.....	55
3.5.3. Мерења вискозности.....	56
<b>3.6. Биолошка испитивања.....</b>	<b>56</b>
3.6.1. <i>In vitro</i> антимикробна активност.....	56
3.6.1.1. Хранљиве подлоге и растварање испитиваних супстанци.....	56
3.6.1.2. Припремање и стандардизација суспензија.....	57
3.6.1.3. Испитивани микробиолошки агенси.....	58
3.6.1.4. Испитивање бактеријске осетљивости.....	59
3.6.1.4.1. Микродилуциона метода.....	59
3.6.2. <i>In vitro</i> антитуморска активност.....	61
3.6.2.1. Припремање раствора испитиваних једињења.....	61
3.6.2.2. Ћелијска култура.....	62
3.6.2.3. Цитотоксични тестови.....	62
3.6.2.3.1. МТТ колориметријски тест.....	62
<b>4. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>65</b>
<b>4.1. Синтезе и хемијска карактеризација.....</b>	<b>66</b>
4.1.1. Нови бакра(II)-комплекси са одговарајућим S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине, [Cu <sub>2</sub> (S-alkenyl-thiosal) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ].....	66

4.1.2. Елементална микроанализа новосинтетисаних бакар(II)- -комплекса.....	67
4.1.3. Инфрацрвени спектри S-алкенил деривата тиосалицилне киселине и добијених бакар(II)-комплекса.....	69
4.1.4. Нуклеарно-магнетно-резонанциони ( <sup>1</sup> H и <sup>13</sup> C) спектри S-алкенил деривата тиосалицилне киселине.....	69
4.1.5. Магнетна мерења.....	70
4.1.6. Моларна проводљивост.....	70
4.1.7. Кристална структура бинуклеарног комплекса бакар(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине, [Cu <sub>2</sub> (S-isobutenyl-thiosal) <sub>4</sub> (DMSO) <sub>2</sub> ] (C2).....	71
<b>4.2. Биолошка активност.....</b>	<b>76</b>
4.2.1. Супституционе реакције комплекса [Cu <sub>2</sub> (S-alkenyl-thiosal) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] са 5'-GMP.....	76
4.2.2. Интеракције испитиваних комплекса бакра(II) са ДНК.....	80
4.2.3. <i>In vitro</i> антимикуробна активност.....	83
4.2.4. <i>In vitro</i> антитуморска активност.....	87
<b>5. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>88</b>
5.1. Синтезе и хемијска карактеризација.....	89
5.2. Супституционе реакције комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине са 5'-GMP и њихова интеракција са ДНК.....	93
5.3. Испитивања <i>in vitro</i> антимикуробне активности комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине.....	96
5.4. Испитивања <i>in vitro</i> антитуморске активности комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине.....	98
<b>6. ЗАКЉУЧАК.....</b>	<b>101</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>106</b>

# **1. УВОД**

## 1.1. БАКАР

Бакар је важан биогени елемент који може показати биохемијску активност као есенцијалан метал у траговима, мада може бити састојак неких једињења која људи у организам уносе егзогеним путем. Улога бакра је повезана са церулоплазмином, албумином и другим протенима, а може наградити комплексе са различитим типовима лиганда који могу даље интераговати са биомолекулима, углавном протеинима и нуклеинским киселинама. Многобројне студије су потврдиле вишеструку улогу бакра у биолошким системима. Посебно је пажња усмерена на учешће бакра у хуманим болестима при чему је фокус на молекуларној физиологији транспорта бакра [1]. Актуелна истраживања су усмерена на испитивање хомеостазе бакра, његов утицај на метаболизам гвожђа као и улоге бакра у биолошким процесима који су физиолошки или патолошки код људи [2,3].

Повећано интересовање за комплексе бакра проистиче из њихове потенцијалне употребе као антибактеријских, антивирусних, анти-инфламаторних, антитуморских агенаса, инхибитора ензима или хемијских нуклеаза. Поједина истраживања су указала на изражену биохемијску активност комплекса бакра(II) са нестероидним антиинфламаторним лековима (NSAIDs). Бројни комплекси бакра(II) са нестероидним антиинфламаторним лековима показују повећани антиинфламаторни и антиулцерозни ефекат уз смањену гастроинтестиналну токсичност у поређењу са некомплексираним лековима [4]. Они обухватају класу потенцијалних антиинфламаторних лекова са мање израженим споредним ефектима за чије деловање је одговорна супероксид-дизмутаза (SOD)-миметичка активност. Друге студије су пак концентрисане на хемотерапеутска својства комплексних једињења бакра [5,6]. Многи аутори скрећу пажњу на антибактеријску и антивирусну активност комплекса бакра(II). На пример, показано је да се инфективност вируса инфлуенце А смањују након излагања бакарним површинама [7]. Механизам овог процеса није довољно разјашњен, али се сматра да до деградације вирусне нуклеинске киселине долази након интервенције јона бакра. Поред тога, проучавања у овој области могу бити од помоћи у дизајнирању и производњи бакар импрегнираних материјалом који поседују широк спектар антимикробне

активности. Значај тих материјала се огледа у потенцијалној деактивацији HIV или H1N1 вируса и антибиотик-отпорних бактерија [8].

### **1.1.1. Хомеостаза бакра**

Бакар унет путем исхране (органиски бакар) се прерађује у јетри и даље транспортује и изолује на безбедан начин. Неорганиски бакар, онај који се може наћи у пијаћој води и у препаратима који се користе као допуна исхрани, углавном заобилази јетру и доспева у крв у слободном облику. Такав бакар је потенцијално токсичан, јер може продрети кроз крвно-мождану баријеру [9].

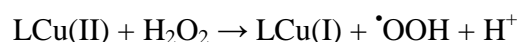
Око 50% просечне дневне потребе за уносом бакра, која износи око 25  $\mu\text{mol}$  (1,5 mg), се апсорбује из желуца или танког црева. Апсорбовани бакар се транспортује до јетре путем портног система циркулације везан за албумине, а затим преноси до периферних ткива, углавном везан за церулоплазмин, а у мањој мери за албумине. Вишак бакра излучује се путем жучи до црева одакле се из организма избацује преко фекалија (12,5  $\mu\text{mol}/24$  часа).

Бакар улази у састав бројних металоензима који су укључени у формирање хемоглобина, лек/ксенобиотик метаболизам, метаболизам угљених хидрата, биосинтезу катехоламина, умрежавање колагена, еластина и кератина из косе као и у антиоксидативним одбрамбеним механизмима [9]. Бакар-зависни ензими, попут цитохром Ц оксидаза, супероксид дисмутаза, фероксидаза, моноамин оксидаза и допамин  $\beta$ -монооксидаза функционишу у циљу смањења продукције реактивних кисеоничних врста или молекулског кисеоника. Симптоми који могу бити повезани са недостатком бакра код људи су нормоцитна, хипохромна анемија, леукопенија и остеопороза. Дефицит бакра се ретко прати у општој популацији [10].

### **1.1.2. Бакар и поремећаји људског здравља**

*Поремећаја повезани са оксидативним стресом.* Иако хомеостатски механизми играју значајну улогу у превенцији токсичности бакра, излагање повишеном нивоу бакра може довести до нежељених ефеката на здравље, укључујући анемију,

имунотоксичност, као и оштећења јетре и бубрега [11]. Ови ефекти углавном настају услед оксидативног оштећења мембрана или макромолекула. С обзиром на капацитет бакра за продукцију великих количина реактивних кисеоничних врста (РОС), вишак бакра може да доведе до здравствених поремећаја који су повезани са оксидативним стресом, од којих се многи могу делимично повезати са његовом редукционом активношћу. Бакар олакшава оксидативно оштећење ткива путем слободних радикала аналогно Фентоновој реакцији [12]. Применом електрон спин резонантне спектроскопије доказано је настајање хидроксилних радикала уз помоћ „spin-trapping“ технике. РОС се производе путем реакција фентонског типа на следећи начин (где L представља неки органски лиганд):



Недостатак бакра такође утиче, индиректно или директно, на компоненте оксидативног одбрамбеног система и као резултат тога повећава се продукција РОС и оксидативно оштећење липида, ДНК и протеина што је примећено у моделима хуманих ћелијских култура или код клиничких синдрома тешких недостатака бакра [2,13]. Поред тога, бакар се може везати за слободне тиолне групе цистеина узрокујући оксидацију и накнадно укрштање протеина што доводи до њиховог поремећаја (смањења) активности [14].

*Ацерулоплазминемиа.* Церулоплазмин је гликопротеин који садржи бакар и производи се у јетри, а притом везује око 95% бакра у серуму. Овај гликопротеин показује фероксидазну активност катализује превођење Fe(II) у Fe(III) јон који се затим преноси до трансферина. Потпуно одсуство серумског церулоплазмина (ацерулоплазминемиа) може довести до обиља гвожђа унутар ретикулоендотелијалног система и паренхималних ћелија [15]. Важно је напоменути да је ацерулоплазминемиа аутозомно рецесивни поремећај који доводи до измењеног метаболизма гвожђа. Прати га мутација алела за церулоплазмин на хромозому 3q [10]. На клиничком нивоу манифестације ацерулоплазминемие се карактеришу испољавањем: шећерне болести, пигментне дегенерације ретине, дистоније, екстрапирамидалних знакова, церебралне



атаксије и деменције. Иако оштећење мозга у ацерулоплазминемiji није довољно разјашњено, добро је познато да оксидативни стрес посредован гвожђем може бити повезан са смрћу неуронских ћелија [16].

*Вилсонова болест.* Вилсонова болест је аутозомно рецесивна болест која се карактерише поремећајем метаболизма бакра. Примарни је генетски дефект АТР7В гена [17]. Биолошка улога АТР7В гена је кодирање протеина за транспорт бакра који се налази на *tnas*-страни Голџијевог апарата и за пренос бакра у секреторни пут где ће бити анексиран у церулоплазмин и излучен у жуч [18]. Главни допринос патофизиологији Вилсонове болести је оксидативно оштећење посредовано бакром, активација путева ћелијске смрти и евентуално цурење бакра у плазма „базу“, што на крају доводи до нагомилавања вишка бакра у екстрахепатичним ткивима. Хепатично преоптерћење бакром повезано са Вилсоновом болешћу хистопатолошки се манифестује запаљењем и цитоскелетним променама у хепатоцитима. Долази до повећања јетре и на њој се јављају чворићи. Код већине болесника болест се манифестује постепеним развојем цирозе [19]. Клиничком сликом болести доминирају тешки неуролошки симптоми. Ако је дијагностикована на време, може се третирати на неколико начина, укључујући примену хелационих средстава, дијете са ограниченим уносом бакра и појачана цинк суплементација [20].

*Менкесова болест.* Менкесова болест је рецесивни поремћај узрокован дефектима у гену који кодира АТП-азу одговорну за транспорт бакра (АТР7А) [21]. Код људи, производ гена АТР7А функционише као интрацелуларна пумпа за транспорт бакра на *tnas*-страни Голџијевог апарата. Преузимање бакра и излучивање путем јетре су нормални код оболелих од ове болести, али је апсорпција бакра из гастроинтестиналног тракта озбиљно смањена. Због знатно смањене апсорпције бакра код оболелих од Менкесове болести, инкорпорација бакра у ензиме који га садрже, а који су неопходни за нормалан раст и развој, је редукована [22]. Периферна ткива показују тенденцију акумулирања бакра у виду бакарног металотионеина. На клиничком нивоу, Менкесова болест се карактерише прогресивним неуролошким оштећењем и смрћу у раном неонаталном периоду. Блокада интестиналне апсорпције бакра се значајно одражава на недостатак бакра у мозгу фетуса који је у развоју, што доводи до тешког оштећења мозга [10].

*Алцхајмерова болест.* То је најчешћи облик деменције који се карактерише прогресивним когнитивним и функционалним оштећењима. Пронађено је да је повећан ниво бакра у цереброспиналној течности који прати нормалну концентрацију бакра у плазми код пацијената са Алцхајмеровом болешћу [23], док су други истраживачи пријавили да је пронађен повишен ниво бакра у плазми код оболелих од поменуте болести. Осим тога, једном проспективном студијом је примећено да повећан унос бакра путем исхране у комбинацији са намирницама богатим засићеним и *trans*-масним киселинама може бити повезан са убрзаним слабљењем когнитивне функције [24]. Могућа повезаност бакра са испољавањем ове болести се огледа кроз интеракцију са прекурсорима амилоидног протеина и  $\beta$ -амилоидног пептида у самоагрегирајућим плаковима и неурофибриларним формацијама, карактеристичним за Алцхајмерову болест, што доприноси патогенези ове болести путем ћелијског оксидативног стреса [25]. Јони бакра могу индуковати агрегацију амилоидног пептида и производњу РОС који оксидују  $\beta$ -амилоидни пептид. Повишен ниво бакра инхибира производњу  $\beta$ -амилоидног пептида [9,26], док његов дефицит повећава секрецију тог пептида. Недостатак бакра резултира и повећаном продукцијом РОС и оксидативним оштећењем протеина [2]. Широко је прихваћено да код пацијената са Алцхајмеровом болешћу постоји абнормална дистрибуција бакра у мозгу са акумулацијом овог елемента у амилоидним плаковима и недостатком бакра у суседним ћелијама [27]. Међутим, неопходна су додатна истраживања како би се у потпуности расветлила улога јона бакра у овој болести.

*Инфламација.* Церулоплазмин делује као реактивни протеин акутне фазе у стресу и траумама. Као последица тога, повишене концентрације бакра су пронађене као одговор на упале, инфекције и различите хроничне болести, као што је артритис. Серумски ниво бакра је већи од нормалног код различитих инфламаторних болести код људи [28]. Виши ниво церулоплазмине је одговоран за повећање серумског нивоа бакра. Уочен је антиинфламаторни ефекат бакра и код људи. Са друге стране, акутне или хроничне упале активирају промене метаболизма бакра, што се одржава на промену нивоа бакра у серуму и ткивима [29]. Повећање серумског бакра у запаљењу може проузроковати повећање нивоа церулоплазмине, који је протеин акутне фазе. Добро је познато да је улога церулоплазмине код артритиса неутрализација слободно

радикалских кисеоничних врста, углавном анјонског супероксида, у покушају да се заустави хроничан процес [30,31].

*Канцер.* Повећан ниво церулоплазмина и бакра у различитим ткивима повезано је са прогресијом рака [32]. Иако прецизна улога бакра у развоју канцера тренутно није довољно позната, могуће је укључивање кроз производњу РОС у оксидативном стресу. Недавно је показано да су протеини бакра повезани са метаболичким променама у ћелијама карцинома и најважније играју улогу у ангиогенези стимулацијом пролиферације и миграције хуманих ендотелијалних ћелија [6].

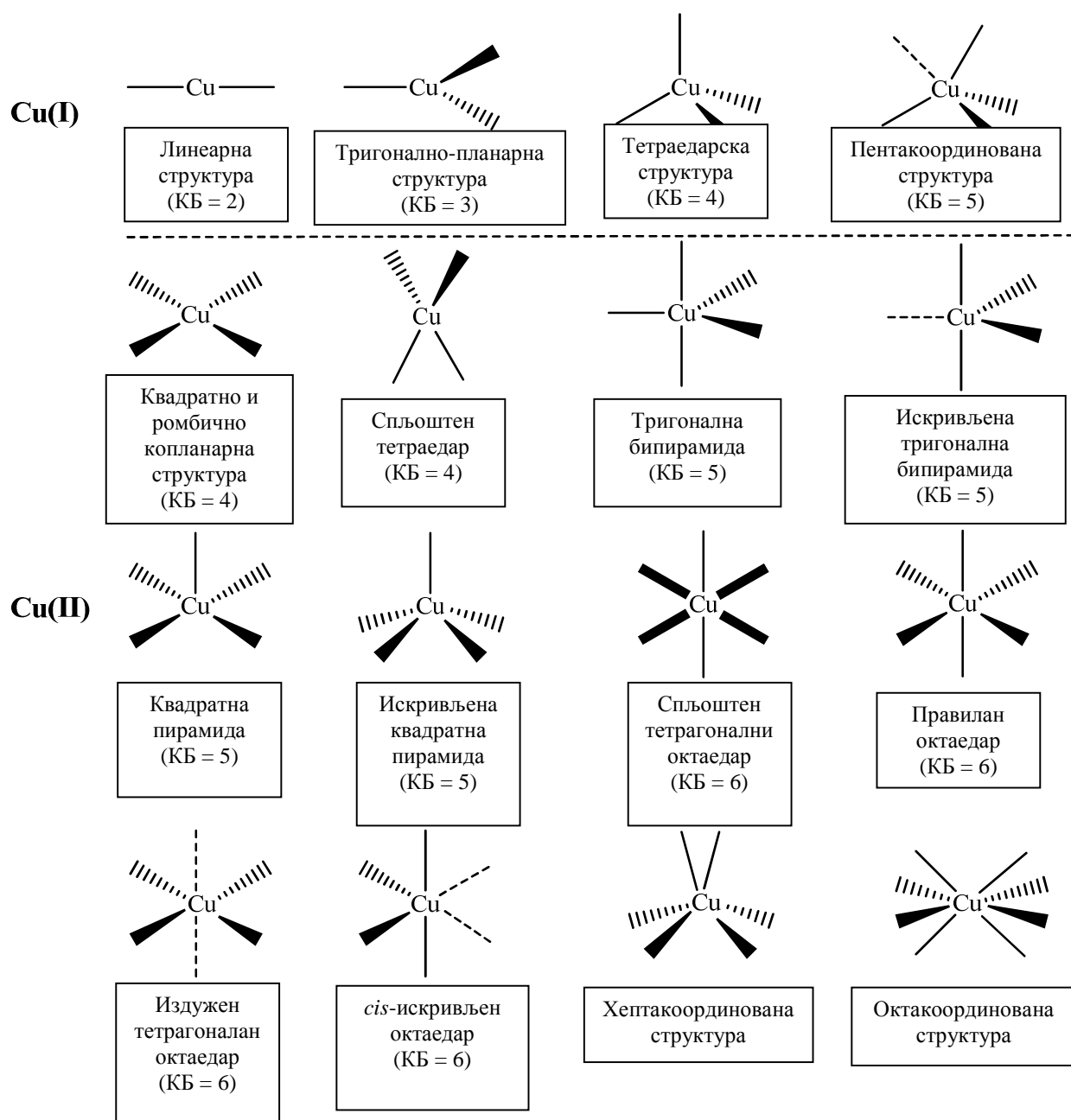
### 1.1.3. Координовање бакар(II)-јона у комплексним једињењима

Координациона хемија бакар(II)-јона је врло разноврсна, јер овај јон може да гради комплексе са лигандима различите дентатности. Електронска конфигурација  $\text{Cu}^{2+}$ -јона је  $(\text{Ar})3d^9$ . У највећем броју једињења у чији састав улази овај прелазни метал, бакар се налази у оксидационом стању +2. То није једино оксидационо стање овог елемента. Бакар се може у једињењима срести и у оксидационим стањима: 0, +1, +3 и +4.

Координциони број у комплексима бакра(II) варира од 4 до 8 (Слика 1). Најчешће се могу видети следеће геометријске структуре комплекса: квадратно-планарна (КБ = 4), тригонално бипирамидална или квадратно пирамидална (КБ = 5) и октаедарска (КБ = 6). Правилна октаедарска геометрија се врло ретко среће. Углавном комплекси са координционим бројем 6 имају умерену или благу Јан-Талерову (Jahn-Teller) дисторзију [33].

Велика разноликост геометријских структура омогућава координовање бакра(II)-јона са лигандима који могу бити потпуно различити што се дентатности тиче (од монодентатних до хексадентатних) као и са тврдим доносним атомима ( $sp^3$  хибризовани атоми азота и кисеоника).

Такође, редокс потенцијал физиолошки доступног  $\text{Cu(I)/Cu(II)}$  пара варира драматично у зависности од одговарајућег лигандног окружења (донорски атоми, геометрија и могућност хелатације) и рН [6].



Слика 1. Координациони бројеви и геометрија комплексних једињења бакра

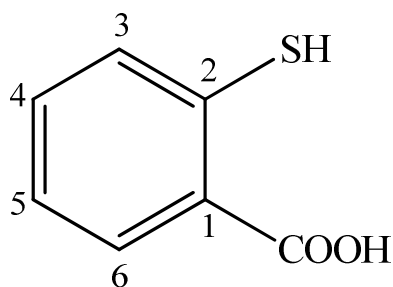
## 1.2. ТИОСАЛИЦИЛНА КИСЕЛИНА

Тиосалицилна киселина (2-меркаптобензоева киселина, *o*-HS-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-COOH) се може координовати са великим бројем јона метала, обично у депротонованој форми. То својство показује, јер се као лиганд може понашати као тврда (карбоксилат) и мека (тиолат) база. Координациона хемија тиосалицилне киселине као лиганда има дугу историју. Као ефективни лиганди тиосалицилне киселине помињу се тиоетри (RS-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-COOH) и карбоксилатни естри (HS-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-COOR) тиосалицилне киселине. Велику могућност координовања показују и азот-супституисани деривати 2-меркаптотоникотинске киселине и 3- и 4- изомери меркаптобензоеве киселине [34].

Тиосалицилна киселина је хибрид тиол-карбоксилне киселине познатије под алтернативним називима попут: 2-меркаптобензоева киселина, *орто*-меркаптобензоева киселина или 2-сулфанилбензоева киселина. Она је комерцијално лако доступна супстанца беличасте боје, без мириса, у чврстом агрегатном стању. Лако је растворљива у нижим алкохолима и у води при алкалним условима, док је растворљивост у води при нижим рН вредностима слабо изражена. Једињење је дипротична киселина са рКа вредностима 4,92 и 9,96 за први и други степен дисоцијације протона [35]. Ти наводи су према најновијим истраживањима другачији и износе за рКа1 = 3,76 ± 0,05 и рКа2 = 8,33 ± 0,07. <sup>1</sup>Н и <sup>13</sup>С NMR спектар тиосалицилне киселине представљен је у Табели 1, док је нумерација атома у поменутој киселини представљена на Слици 2.

**Табела 1.** Вредности хемијских померања за водоникове и угљеникове атоме у молекулу тиосалицилне киселине

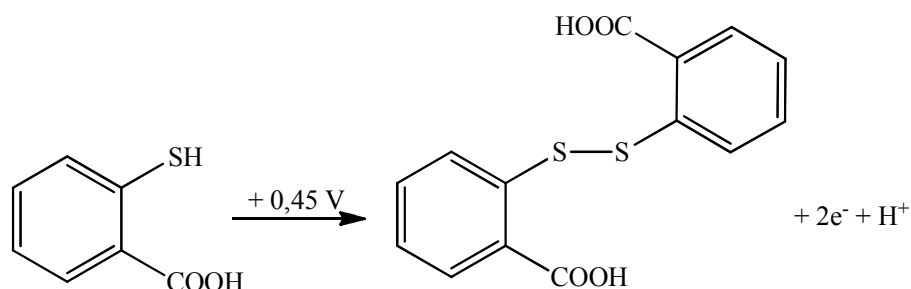
<sup>1</sup> H NMR спектар тиосалицилне киселине			<sup>13</sup> C NMR спектар тиосалицилне киселине		
	Растварач			Растварач	
	CDCl <sub>3</sub>	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO		CDCl <sub>3</sub>	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO
H3	7,31 dd (J 7,1; 1,2)	7,49 dd (J 8,1; 0,9)	C1	124,8	126,5
H4	7,35 ddd (J 7,5; 7,5; 1,4)	7,35 ddd (J 7,8; 7,8; 1,7)	C2	139,3	138,1
H5	7,10 ddd (J 7,5; 7,5; 1,2)	7,16 ddd (J 7,5; 7,5; 1,1)	C3	131,1	130,9
H6	8,12 dd (J 7,8; 1,8)	7,91 dd (J 8,0; 1,4)	C4	133,3	132,4
OH	неопажено	13,01 br	C5	124,8	124,6
SH	4,61 s	5,33 br	C6	132,7	131,4
			C=O	171,5	167,6



**Слика 2.** Обележавање атома у тиосалицилној киселини

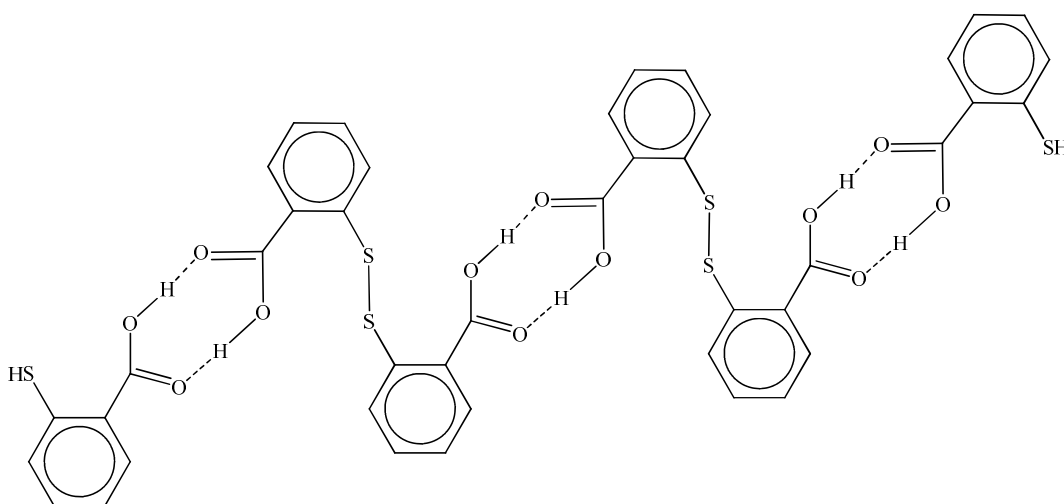
У чврстом агрегатном стању тиосалицилна киселина је постојана на ваздуху. У киселим условима, тиосалицилна киселина се јавља у непромењеном облику. Повећањем рН вредности средине 50% молекула оксидује до одговарајућег дисуфида  $\text{HOOC-C}_6\text{H}_4\text{-S-S-C}_6\text{H}_4\text{-COOH}$  (примећено при рН 6) што је интересантно за електрохемијска истраживања (Слика 3) [36]. На рН = 7, целокупна количина тиосалицилне киселине се оксидује до дисулфидне форме. То се може објаснити, бар

делимично, приликом покушаја добијања калцијумових, стронцијумових или баријумових соли тиосалицилне киселине у базном ( $\text{NH}_3$ ) раствору, када настају метални комплекси са дисулфидом тиосалицилне киселине [37].



**Слика 3.** Оксидација тиосалицилне киселине до одговарајућег дисулфида

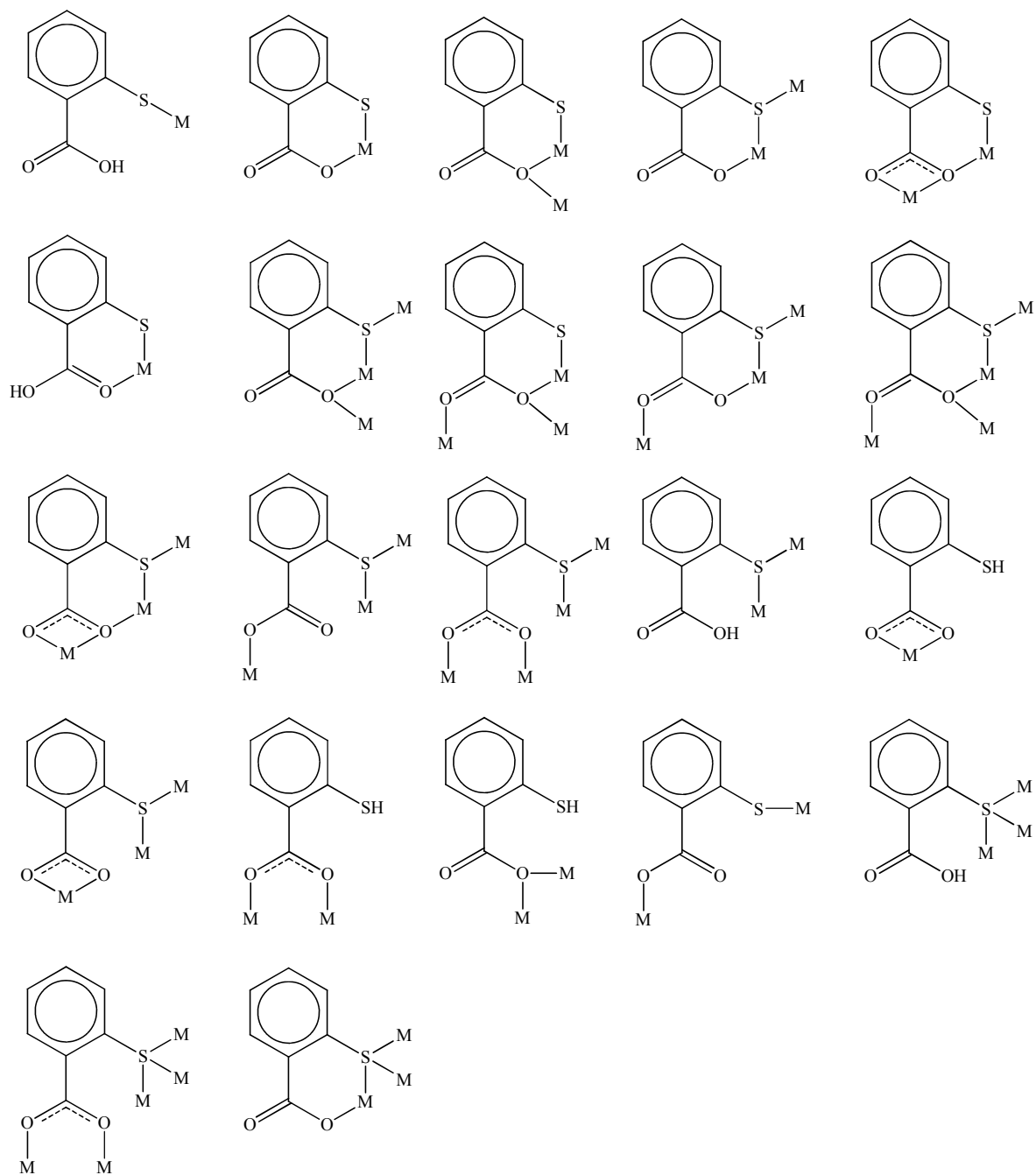
Рендгенском кристалном анализом потврђена је и тиол-дисулфидна ко-кристална структура  $\text{HS-C}_6\text{H}_4\text{-COOH HOOC-C}_6\text{H}_4\text{-S-S-C}_6\text{H}_4\text{-COOH}$  [36]. Основна јединица кристала је тетрамерна јединица формирана димеризацијом два молекула тиосалицилне киселине (димерна формација карбоксилне киселине), која се онда на сваком крају повезује са још једним молекулом тиосалицилне киселине, поново формирањем димера карбоксилне киселине (Слика 4).



**Слика 4.** Градивна јединица структуре кристала  
 $\text{HS-C}_6\text{H}_4\text{-COOH HOOC-C}_6\text{H}_4\text{-S-S-C}_6\text{H}_4\text{-COOH}$

Узимајући у обзир да тиосалицилна киселина у свом молекулу садржи и „тврде“ (кисеоникови атоми) и „меке“ (сумпоров атом) донорске атоме, као и то да карбоксилна и тиолна група имају способност да премосте различите градитеље комплекса, није изненађујуће што тиосалицилатни лиганд показује низ координационих могућности према различитим градитељима комплекса. Неки чешћи начини координовања, који су уочени у структурним метал-тиосалицилатних комплекса, приказани су на Слици 5. При представљању ових различитих начина координовања није разматрано протонено стање тиосалицилатног лиганда. У неким случајевима координовања неопходно је прво да дође до депротоновања карбоксилне групе тиосалицилатног лиганда. За комплексе у којима је начин везивања тиосалицилатног лиганда непознат, понекад се користи скраћеница *tsal* (или *Htsal* у случају монопротичног лиганда) [38].

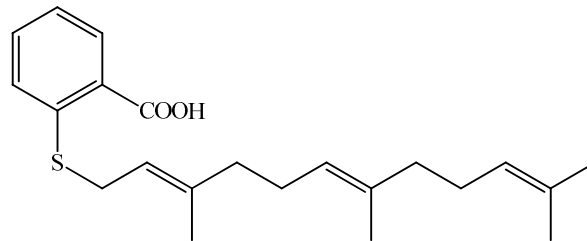




Слика 5. Најчешћи начини координовања тиосалицилне киселине у комплексним једињењима

### 1.2.1. Деривати тиосалицилне киселине и њихова примена

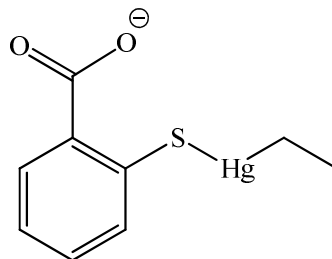
*S-trans, trans*-фарнезилтиосалицилне киселине (ФТС) (Слика 6) је нетоксични Рас антагониста [39-41]. Може да инхибира онкогено активирани Рас и заустави раст Рас-зависних тумора. Познато је да развој многих малигних обољења удружен са хроничном активацијом Рас сигналног система. Рас протеини припадају породици малих ГТПаза које делују као кључни регулатори ћелијских сигналних путева контролишући тако пролиферацију ћелија, њихову диференцијацију [42], миграције [43-45], преживљавање и смрт [46]. ФТС показује антиинфламаторну активност, а показало се да је ефикасна и код поновљених хематолошких малигнитета [39]. Салирасиб (фарнезилтиосалицилна киселина) је коришћен *in vitro* као потенцијални хемиотерапеутик избора код пацова који су оболели од глиобластома, јер не изазива неспецифичну неуротоксичност [41].



Слика 6. Структура фарнезилтиосалицилне киселине

Од 1931. године натријум-етилмеркуритиосалицилат (Тимеросал-Слика 7) је био коришћен као адитив бактерицидних и фунгицидних лекова (који су паковани и дистрибуирани у облику мулти-дозних ампула) и у вакцинама [47-50]. Више деценија од свог увођења у употребу је ово једињење коришћено без обраћања довољно пажње да ли може проузроковати неке опасне ефекте на људски организам услед његове примене путем интрамускуларних или интравенских инјекција. Метилжива („метилмеркурат“ MeHg) је токсин који се треба избегавати и у малим количинама, а налази се у намирницама као што су морски плодови и пиринач. Светска здравствена

организација (WHO - **W**orld **H**ealth **O**rganization) сматра да су мале дозе тимеросала безбедне за вишекратну примену вакцина код трудница и одојчади.



Слика 7. Структура тимеросала

Због сумње на неуротоксичне ефекте [47,48,51] код људи који су користили лекове где је тимеросал употребљаван као адјуванс, владине организације појединих земаља су препоручиле да се укине коришћење тимеросала као адјуванса. Привремено су 2001. године повучене из рутинских распореда вакцинисања код деце све такве вакцине у Европи и САД (мада је и даље у Сједињеним Америчким Државама у земљама које су погођене транзицијом присутан тимеросал у вакцинама против вируса свињског грипа H1N1) [47].

Docea и сарадници [52] су упоређивали токсичност тимеросала са метилмеркури једињењима је показала да је токсичност слична, али је запажена нешто повољнија фармакокинетика етилмеркури једињења јер се краће задржавају у крви. Пошто је главни орган где једињења живе испољавају токсичност мозак, ни краће време присуства у крви није довољан безбедносни фактор. Жива показује велики афинитет према атому сумпора. Овај елемент је присутан у облику тиола и дисулфида у пептидима, протеинима и ДНК. Жива развија своје неуротоксичне ефекте везивањем за тиоле или дисулфиде у нервном систему, чиме инхибира деловање ензима, доводи до промена у структури протеина или блокира биолошки активне тиоле [53]. Медицинске студије које се баве испитивањем токсичног потенцијала тимеросала и других једињења живе прате укупну количину живе која се може наћи у узорцима различитих људских ткива, крви, урина, фекалија или косе.

Због свог антимикуробног својства тимеросал се често налази у топикалним антисептичким растворима, али се користи и као конзерванс у вакцинама,

антитоксинима, у препаратима стероида за топикалну и интрамускуларну употребу, интрадермалним тестовима, козметичким препаратима, офталмолошким и отоларинголошким лековима и другим фармацеутским производима [51,54]. Због испољавања алергијских реакција на тимеросал код људи и појаве еколошких проблема, његова примена се све више напушта. Статистички значајна појава алергије на тимеросал је примећена код жена, здравствених радника и куvara [54].

Код особа са развијеним фотоконтактним дерматитисом након примене 0,5% пироксилама (нестероидни антиинфламаторни лек) показало се да је епикутани пач (“patch”) тест на тимеросал и тиосалицилну киселину позитиван [55,56]. Наиме, пацијенти који покажу контактну алергијску осетљивост на тимеросал и тиосалицилну киселину у великом су ризику да развију фотосензитивну реакцију на пироксилам [55,57].

Тиоксантони се такође могу добити реакцијом тиосалицилне киселине са крунским етрима (најчешће су то циклични олигомери етилен оксида) у присуству концентроване сумпорне киселине на собној температури (Схема 1). Они представљају важну класу биолошки активних једињења. Тиоксантонски прстен је заступљен у великом броју природних и синтетских једињења која могу показивати антитуморско и антипаразитско дејство. Екстракти добијени од биљака које садрже тиоксантоне су коришћени у традиционалној медицини [58].

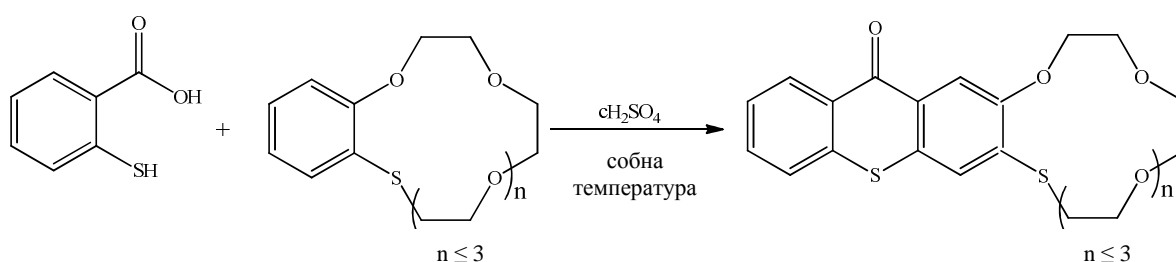


Схема 1. Синтетички пут за добијање тиоксантона

Неки амидни деривати тиосалицилне киселине имају фармакофоре сличне бензотиазепинима (дилтиазем) па могу *in vitro* блокирати калцијумске канале. Сходно томе ови деривати могу имати потенцијално значајну улогу у контроли крвног притиска. За остваривање фармаколошког ефекта одговорна је амидна група у дериватима чији синтетички пут је приказан на Схеми 2 [59].

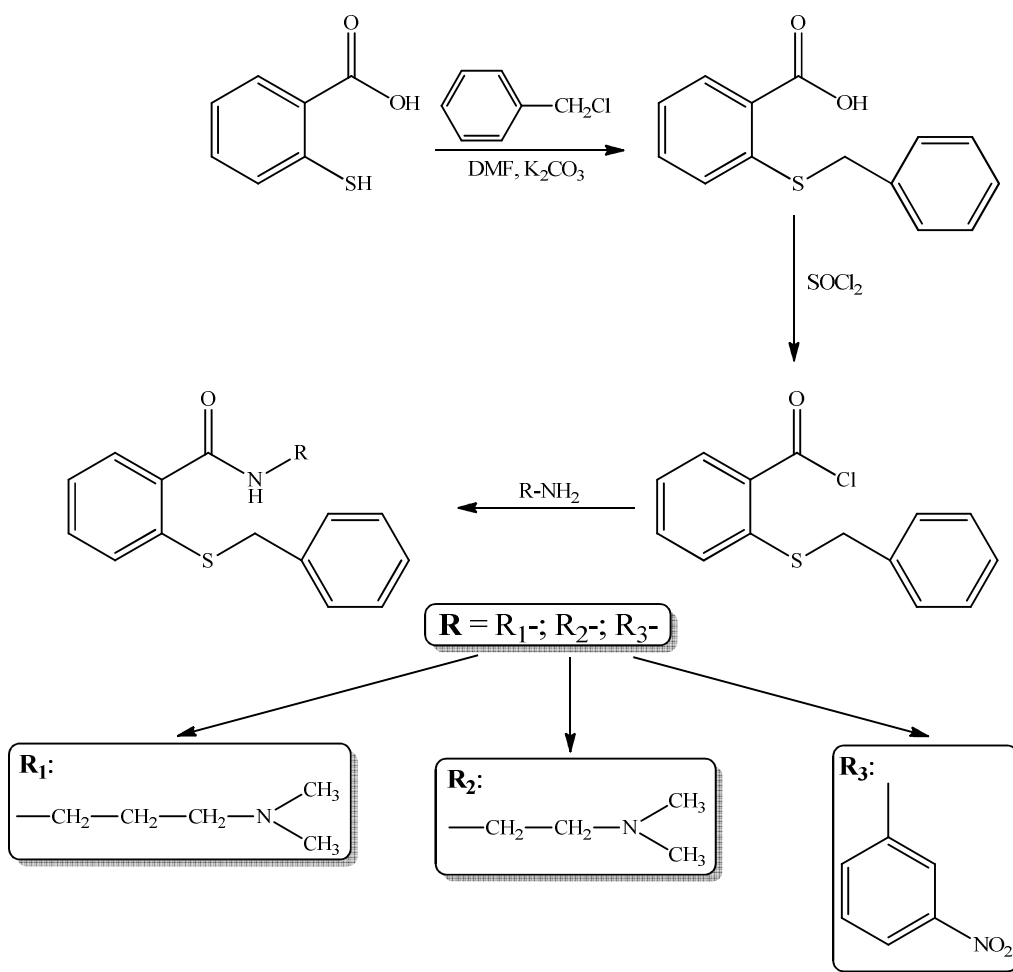
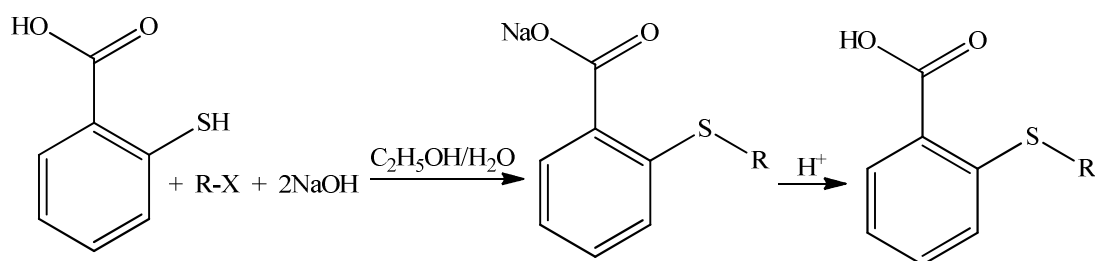


Схема 2. Добијање тиосалициламидних деривата

Тиосалицилна киселина и њени деривати имају многобројне примене, почевши од употребе код инфламаторних, алергијских и респираторних обољења па до потенцијалне примене у спречавању цирозе јетре. Као ефективни лиганди за координовање могу се користити тиоетри тиосалицилне киселине. Различити S-алкил (R = бензил-, метил-, етил-, пропил-, бутил-) [60-63] су припремљени алкиловањем

поменуते киселине уз помоћ одговарајућих алкил халогенида у алкалном водено-етанолном раствору (Схема 3) [60].

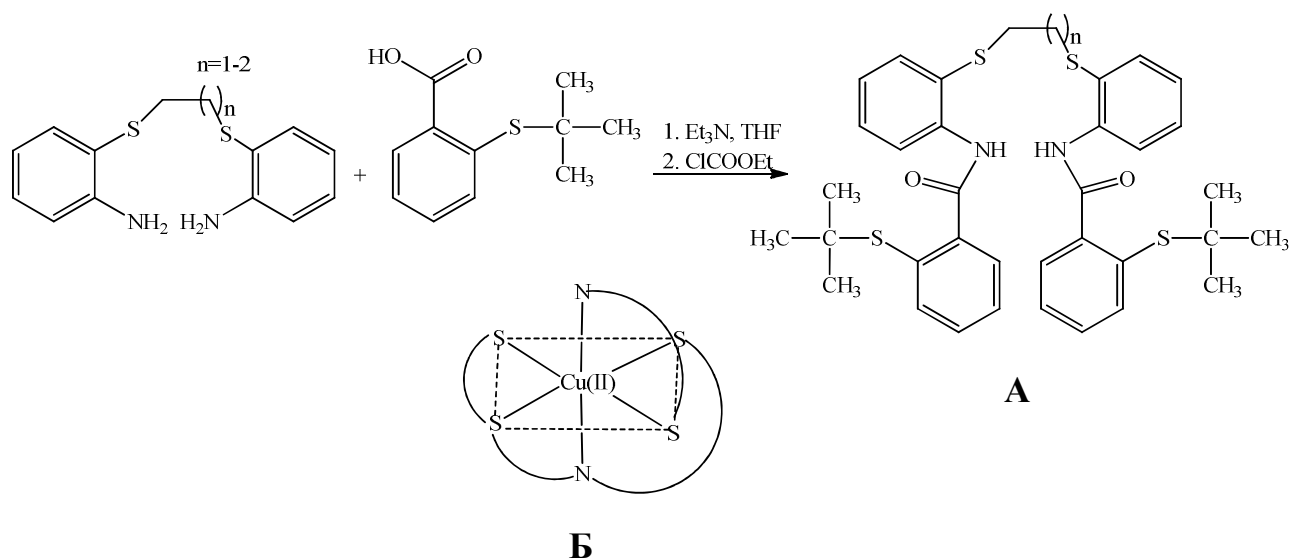


**Схема 3.** Реакција за добијање одговарајућих *S*-алкил деривата тиосалицилне киселине

### 1.3. СТРУКТУРА И КАРАКТЕРИСТИКЕ КОМПЛЕКСА БАКАР(II) СА ТИОСАЛИЦИЛНОМ КИСЕЛИНОМ КАО ЛИГАНДОМ

С обзиром да тиосалицилна киселина може да се координује на мноштво различитих начина и да поседује донорске атоме са различитим тврдо/меким карактеристикама по Пирсоновој класификацији, начин координовања за бакар(II)-јон потенцијално ће зависити од особина лиганда и услова у којима се одвијају реакције.

Бакар(II)-јон може да се комплексира са тиоетарским лигандима који су добијени од одговарајућег деривата тиосалицилне киселине (Схема 4), а да при том везивање буде остварено и преко донорски атоми који су меке Луисове базе. Наиме, из скице геометрије насталих комплекса се види да је бакар(II)-јон у екваторијалној равни повезан са четири атома сумпора из тиоетарских група, а у аксијалним позицијама координовање је остварено преко азотових донорских атома из новонасталих амидних група. Комплекси бакара са тиалато лигандима су стабилни у чврстом агрегатном стању. У растворима могу бити стабилни неколико дана, док уколико се изложе ваздуху већ после пар сати долази до деградације комплекса. Вредности магнетних мерења за бакар(II)-комплексе су у нормалном распону за хексакоординоване комплексе. У овом истраживању комплекси нису показали правилну октаедарску структуру, већ је била присутна умерена Јан-Талерова (Jahn-Teller) дисторзија [64].

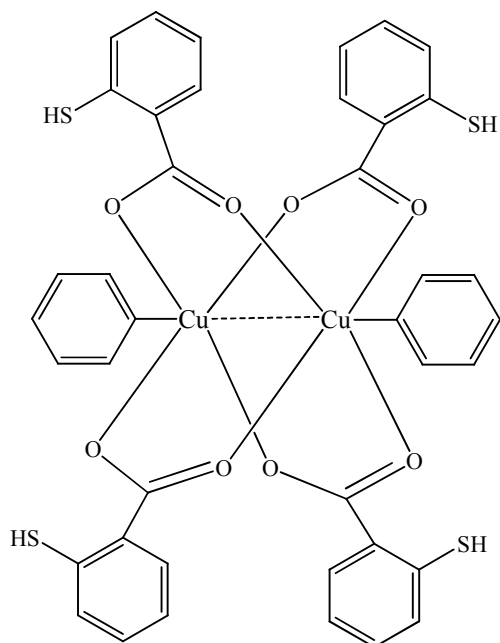


**Схема 4.** (А) Синтеза комплекса бакра(II) са тиоетарским лигандима

(Б) Геометрија насталих комплекса

Комплекси бакра(II) су веома стабилни у димерном облику, тако да више нису ретки случајеви у којима настају бинуклеарни комплекси са централним јонима овог прелазног метала. Иако се првенствено није очекивало координовање бакра(II)-јона са тврдим кисеониковим доносним атомима, у истраживању Ferrer и сарадника у реакцији бакра(II)-хлорида, тиосалицилне киселине (тиосалицилној киселини је додаван натријум-хидроксид како би се депротонувала) и пиридина настао је бинуклеарни комплекс где је бакар(II)-јон координован преко кисеоникових атома из тиосалицилне киселине и азотових атома из два молекула пиридина (Слика 8). У насталом комплексу метални центри су такође међусобно повезани [65].

Да је дошло до кординовања преко кисеоникових атома из карбоксилне групе говори подаци добијени из инфрацрвених спектра. Наиме, дошло је до померања вредности асиметричних вибрација у области нижих вредности што указује да се координовње десило преко кисеоникових атома депротоноване карбоксилне групе у молекулу тиосалицилне киселине.



**Слика 8.** Структура бинуклеарног комплекса бакра(II) са тиосалицилном киселином



## **1.4. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА БАКРА(II)**

### **1.4.1. Антимикробна активност комплекса бакра(II)**

Лечење инфективне болести и даље остаје важан и изазован проблем данашњице. Упркос великом броју антибиотика доступних за медицинску употребу, резистенције на њихово деловање у последњим деценијама створиле су значајну медицинску потребу за новим класама антимикробних средстава. Такође, постоји и потреба за откривањем нових једињења са антимикробном активношћу, који се разликује по механизму деловања од оних познатих класа антимикробних агенси према којима су многи клинички патогени развили резистенцију [66].

Прокариотски организми пружају далеко већу разноликост на молекуларном нивоу од еукариотских. Ова чињеница се темељи првенствено на структури и саставу њиховог ћелијског зида. Хемијски састав ћелијског зида Грам-негативних бактерија је знатно комплекснији од ћелијског зида Грам-позитивних бактерија, па зато не чуди њихова већа отпорност према медикаментозној терапији. Наиме, ћелијски зид Грам-негативних бактерија садржи, поред унутрашње, цитоплазматске мембране, спољашњу мембрану која је јединствен структурни ентитет за микроорганизме ове групе. Простор између две мембране је периплазма, где се не налази само пептидогликан (мурейн), већ и мноштво јединствених протеина. Асиметрични двослој спољашње мембране чине липополисахариди. Иако је спољашња мембрана липофилна, па се очекује лак пролазак као кроз фосфолипидни двослој, она представља заштитну баријеру за пролазак хидрофобних једињења. Спољашња мембрана садржи и многе специфичне протеине, који често пролазе кроз мембрану и функционишу као уски (а понекад и специфични) дифузиони канали за пропуштање молекула мале молекулске масе. Неки протеини могу имати улогу транспортера за које се са вишим афинитетом везују молекули веће молекулске масе. [67]. Грађа ћелијског зида Грам-позитивних бактерија је знатно једноставнија. Интегритет цитоплазматске мембране одржава дебео слој пептидогликана који је сачињен од наизменично поређаних молекула N-ацетилглукозамина и N-ацетилмураминске киселине повезаних гликозидним везама. У

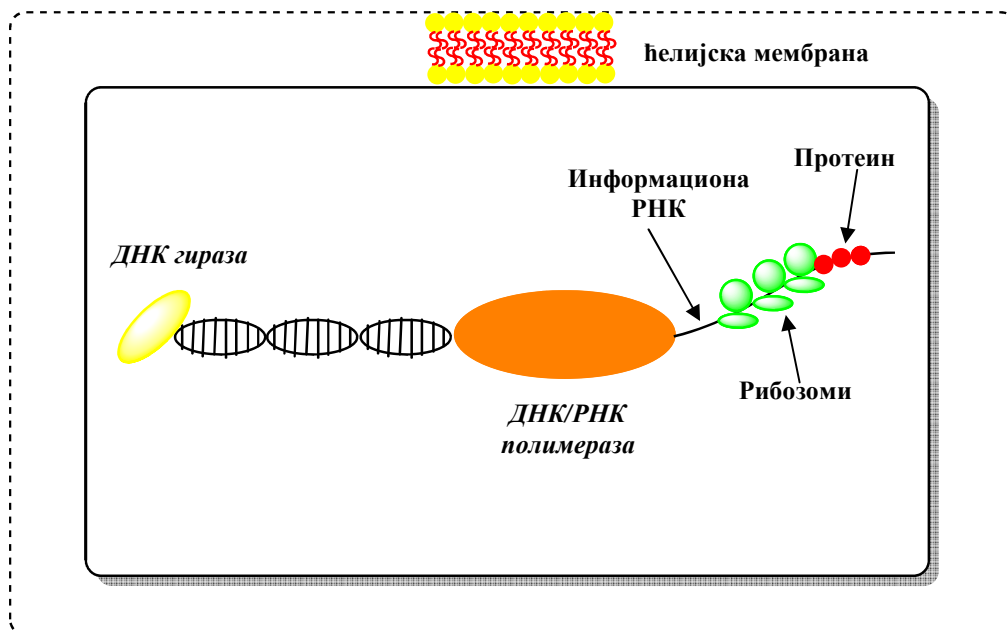
састав ћелијског зида Грам-позитивних бактерија улазе и липотеихоинска, теихоинска киселина, различити сахариди (маноза, арабиноза, галактоза) и протеини [68].

Антибиотици своје дејство на бактеријске ћелије остварују преко различитих механизма (Слика 9). Инхибитори синтезе ћелијског зида, као што су  $\beta$ -лактами (пеницилини, цефалоспорини, карбапенеми и монобактами), спречавају умрежавање пептидних ланаца пептидогликана и формирање ригидне структуре ћелијског зида [69]. Смањена осетљивост Грам-негативних бактерија на  $\beta$ -лактаме последица је структурне специфичности ћелијског зида ових бактерија и присуства липополисахаридног комплекса (ЛПС).

Антибактеријски ефекат се може постићи и блокадом синтезе протеина, па тако аминокликозиди (стрептомицин, гентамицин, амикацин итд.) и тетрациклини инхибирају 30S субјединице рибозома, док се макролиди, линкозамиди и хлорамфеникол везују за 50S субјединицу бактеријских рибозома и тако спречава елонгацију пептидног ланца.

Инхибиција синтезе ДНК постиже се деловањем на ДНК гиразу (топоизомераза II), а овај механизам антибактеријског дејства карактеристичан је за флуорохинолоне (ципрофлоксацин, енрофлоксацин). Рифампицин је инхибитор РНК полимеразе, а како овај ензим ћелија сисара није осетљив на рифампицин, омогућено је селективно дејство. Антибактеријски агенси који делују инхибицијом функција цитоплазматичне мембране (полмиксини), понашају се као катјонски детерџенти, односно површински активна једињења која мењају пермеабилност мембране. Инхибиција ћелијског метаболизма заснива се на заустављању бактеријске синтезе фолне киселине. Пошто ћелије сисара не синтетишу фолну киселину, омогућено је селективно дејство инхибитора фолата само на ћелије бактерија. Сулфонамиди се компетитивно везују за активно место дихидриптеорат синтетазе, чиме се инхибира синтеза дихидрофолата. Триметроприм инхибира други важан ензим у биосинтези фолне киселине – дихидрофолат редуктазу, коју синтетишу и ћелије сисара, а селективно дејство омогућено је услед већег афинитета триметроприма према бактеријској дихидрофолат редуктази [70].

Антимикробни агенси који доводе до реверзибилних промена испољавју привремени ефекат (бактериостатски или фунгистатски), док они који изазивају иреверзибилне промене делују трајним ефектом (бактерицидни или фунгицидни) [71].



**Инхибитори синтезе фолата:**

- Сулфонамиди
- Триметоприм

**Инхибитори РНК полимеразе:**

- Рифампицин

**Инхибитори функције хелијске мембране:**

- Амфотерицин Б
- Полимиксини

**Инхибитори синтезе хелијског зида:**

- $\beta$ -лактами: карбапенеми, цефалоспорини, монобактами, пеницилини
- Остали: бацитрацин, фосфомицин, ванкомицин

**Инхибитори ДНК гиразе:**

- Флуорохинолони

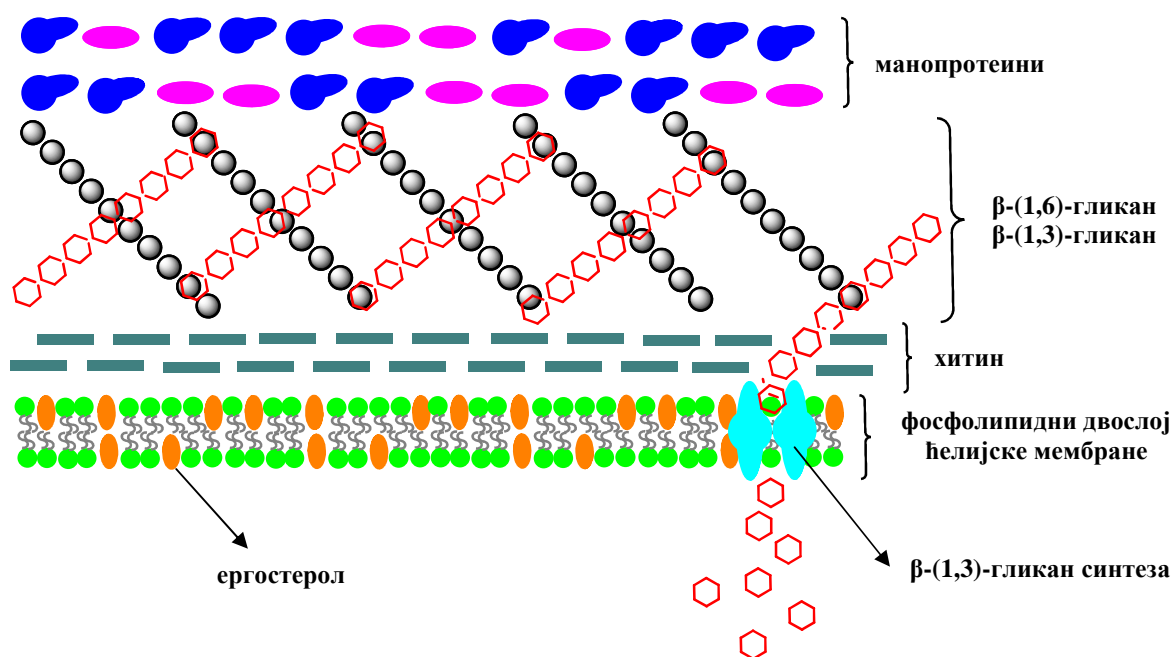
**Инхибитори синтезе протеина:**

- Аминогликозиди
- Хлорамфеникол
- Клиндамицин
- Макролиди
- Стрептограмини
- Тетрациклини

Слика 9. Места дејства антибактеријских агенаса

Различите структуре које улазе у састав ћелијског зида гљивица могу да буду мете деловања антигљивичних лекови (Слика 10). Они своје ефекте остварују најчешће на следеће начине:

- 1) везивањем за ергостерол у мембранама ћелија гљивица (амфотерицин Б, нистатин),
- 2) блокирањем синтезе прекурсора ергостерола (кетоконазол, миконазол),
- 3) инхибирањем синтезе глуканске компоненте ћелијског зида гљивица (каспофунгин),
- 4) везивањем за кератин из коже којим се гљивице хране (гризеофулвин),
- 5) ометањем синтезе РНК и ДНК инхибицијом ензима тимидилат синтаза (флуцитозин),
- 6) инхибирањем сквален епоксидазе што условљава накупљање токсичног сквалена у ћелијама гљивица (алиламини) [70].

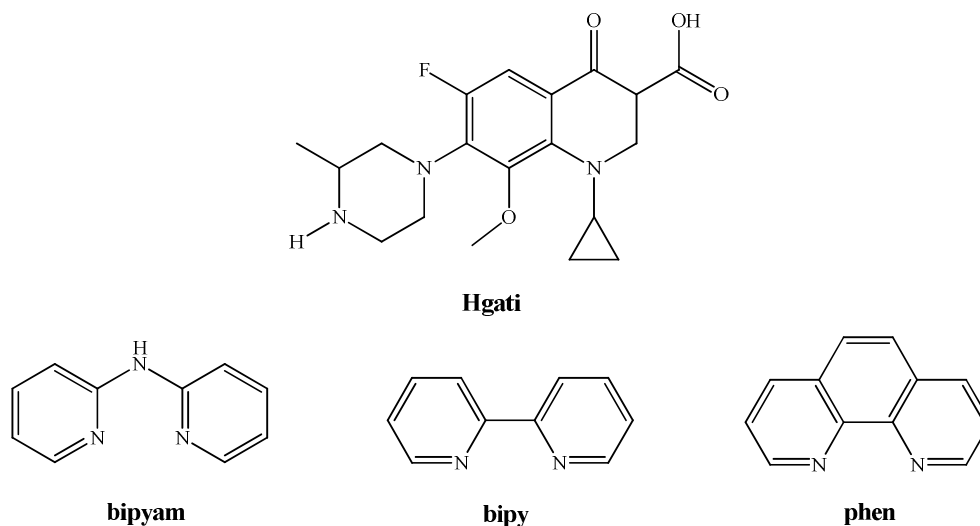


Слика 10. Ћелијска мембрана и ћелијски зид ћелије гљивица

У погледу антимикуробне активности доказано је да су комплекси бакра(II) са дериватима петочланих хетероцикличних система довели до инхибиције раста бактерија: *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* [72]. Модификацијом лиганда са

различитим хетероцикличним Шифовим базама синтетисани су комплекси са ширим спектром антибактеријске (*Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*) и антигљивичне (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Microsporium canis*, *Trichophyton longifusus*, *Fusarium soloni* и *Candida glabrata*) активности [73,74]. Нови концепт у унапређивању бактерицидног ефекта комплекса бакра(II) са новосинтетисаним лигандима заснива се на испитивању липофилности добијених једињења. Повећањем липофилности побољшава се продор комплекса на циљано место у бактеријама [75].

Такође, добијени су комплекси бакра(II) са неким хинолонима, што представља добар приступ у развоју лекова који показују антибактеријску активност уз могућност смањења нивоа резистенције [76]. Како би се проширио спектар деловања микробиолошких агенаса синтетисани су комплекси бакра(II) са гатифлоксацином (хинолон треће генерације) и 2,2'-бипиридиламином (bipyam), 2,2'-бипиридином (bipy), или 1,10-фенантролином (phen) као ко-лигандима (Слика 11). Испитивани комплекси су показали дејство како према Грам-позитивним (*B. subtilis*, *S. aureus*), тако и према Грам-негативним бактеријама (*X. campestris*, *E. coli*) у опсегу МИК (минимална инхибиторна концентрација) концентрација 0,19-1,53  $\mu\text{M}$  [77].



**Слика 11.** Структура лиганда - гатифлоксацина (*Hgati*) и колиганда - 2,2'-бипиридиламином (*bipyam*), 2,2'-бипиридином (*bipy*), или 1,10-фенантролином (*phen*)

На пољу побољшања антифунгалног ефекта тестиран је комплекс  $\text{Cu}^{2+}$  јона за молекула амфотерицина Б при концентрацији комплекса од 0.05 до 0.5  $\mu\text{M}$ . Побољшање антимикотичне активности амфотерицина Б-бакар(II) комплекса према гљивици соја *C. albicans*, у поређењу са почетним обликом антибиотика може бити резултат прооксидативне активности бакар(II)-јона. Наведени јони могу изазвати слободне радикалне реакције које доводе до пероксидације и разарања структуре липида, протеина и полисахарида. То такође може довести до оштећење мембрана и губитак есенцијалних јона и метаболита, што доводи до дехидрације и смрти ћелија гљивица [78].

#### 1.4.2. Антитуморска активност комплекса бакра(II)

Уобичајени терапијски приступи у лечењу рака првенствено имају за циљ ерадикацију неопластичних ћелија цитостатским и цитотоксичним ефектима. На основу ове претпоставке, класични антитуморски агенси, укључујући антрациклизине, антиметаболите и лекове из платинске групе, су развијени како би се остварило дејство на ћелије карцинома које су у пролиферативној фази. Нови приступ у системској терапији рака су омогућила знања о генетским покретачима малигних фенотипова [79].

*Цисплатина* је лек који је прописиван скоро половини пацијента са карциномом [80,81] и даље се сматра једним од најважнијих лекова у терапији рака. Упркос свом успеху, клиничка употреба *цисплатине* је ограничена због низа озбиљних нежељених ефеката и стицања резистенције ћелије карцинома на овај лек. Цисплатина своје дејство испољава ковалентно се везујући за ДНК ланац. Истраживање од интереса се баве изучавањем агенаса који показују способност остваривања нековалентне везе.

Ова ограничења су покренула експоненцијални раст у развоју алтернативних лекова на бази јона метала неплатинског типа, који имају алтернативне механизме деловања на различите врсте рака. Међу неплатинским једињењима, комплекси бакарним добили су посебну пажњу. Пошто су јони бакра ендогени јони метала претпоставља се да су мање токсични за нормалне ћелије него за ћелије рака. На основу ових запажања за комплексе бакра(II), очекује се да су мање токсични од комплекса платине, док задржавају ефективну цитотоксичност према ћелијама карцинома [82].

Повишен ниво церулоплазмине и бакра повезан је са прогресијом канцера. Присуство бакарних протеина је удружено са метаболичким променама у ћелијама рака. Тачна улога комплекса бакра у лечењу карцинома није довољно разјашњена [83,84]. Претпоставља се да је бакар укључен у генерисању РОС (реактивних кисеоничних врста) и процес ангиогенезе тако што стимулише пролиферацију и миграцију хуманих ендотелних ћелија [84,85]. Повишен ниво бакра је пронађен код многих типова хуманих карцинома, као што су карцином простате, дојке, дебелог црева, плућа и мозга. На основу наведеног, комплекси бакра могу бити од потенцијалног терапеутског значаја као антиангиогени молекули у лечењу различитих типова канцера [6,85,86].

Комплекси бакра(II) који имају цитотоксичну активност садрже као лиганде полидентатне Шифове базе, петочлане ароматичне хетероцикле (имидазол, пиразол, триазол), шесточлане ароматичне хетероцикле (phen и bipy), терцијарне фосфине. Координација лиганда у комплексима бакра (II) се остварује преко донорских атома кисеоника, азота, сумпора или фосфора [6,82,86].

O'Halloran TV је испитивао цитотоксичну активност комплекса бакра(II) на ћелијским линијама карцинома колона и показао да комплекс  $(\text{Cu}[\text{N-salicylidene}-(\text{glutamato})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{H}_2\text{O})$  у концентрацији од 50 и 100  $\mu\text{mol/L}$  показује изразиту цитотоксичну активност на хуманој ћелијској линији HT-29 карцинома колона после 72 сата утицаја. Апоптозу активира генерисање велике количине слободних радикала [87]. Такође су Marzano C и сарадници су показали да ацилдиазинил тиокарбазонски комплекси бакра(II) показује потенцијалну цитотоксичну активност на хуманим ћелијама аденокарцинома колона HT-29 ( $\text{IC}_{50} = 0,011-2,22 \mu\text{M}$ ) [82].

Раја и сарадници су демонстрирали цитотоксичну активност серије комплекса бакра(II) са 2-оксо-1,2-дихидрохинолин-3-карбалдехидним дериватима као лигандима. Наведени комплекси су били ефикасни у неутралисању радикала, а цитотоксичну активност су испољавали према хуманим ћелијским линијама карцинома грлића материце (HeLa), ларингеалног епитела (HEp-2), јетре (HepG2) и коже (A431) [88,89]. Бакар(II)-комплекси са семикарбазонским дериватима су показали одличну биолошку активност па се потенцијално размишља и о њиховој примени у сврху дијагностичких и терапијских радиофармака [90-92]. Комплекси  $\{[\text{Cu}_3(\text{ZL})_2(\text{H}_2\text{O})_6] \cdot 6\text{H}_2\text{O}\}_n$  (ZL = 1-хидрокси-2-(1H-имидазол-1-ил)етан-1,1-диилдифосфонска киселина) и

[Cu(IPrDP)<sub>2</sub>] $\cdot$ 3H<sub>2</sub>O (IPrDP = 1-хидрокси-2-(1H-имидазол-1-ил)пропан-1,1-диилдифосфонска киселина) је тестирана цитотоксична активност на хуманим ћелијским линијама карцинома плућа (A549), остеосаркома (U2OS), колона (HCT116), јетре (HepG2) и аденокарцинома дојке (MDA-MB-231) и при томе је утврђено да показују дозно- и временски-зависне цитотоксичне ефекте. Најбољи цитотоксични ефекат, који је сличан ефекту *цисплатине*, је примећен на ћелијским линијама HCT116. Комплекс са IPrDP лигандом је инхибирао пролиферацију ћелијских линија карцинома индуковањем застоја ћелијског циклуса у G2/M фази, показујући сличан механизам деловања као *цисплатина* [93].

Комплекси бакра(II) са дериватима 7H-2,6-диаминопурина и 4H-3,5-диамино-1,2,4-триазола су показали умерену антипролиферативну активност према хуманим ћелијским линијама карцинома дојке (MCF7), колона (HCT116) и јетре (HepG2). Према IC<sub>50</sub> вредностима редослед цитотоксичне активности опада у низу: MCF7 > HCT116 > HepG2. Активност је упоређена у односу на референтни лек, доксорубицин.

Различите студије потврђују да се истраживања у циљу синтезе и испитивања биолошких активности комплекса бакра(II) са тиосалицилном киселином као лигандом већ дуже време привлаче пажњу. Нова истраживања, у светлу испитивања цитотоксичног потенцијала комплекса бакра(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине су показали незнатно нижу цитотоксичну активност на хуманим HCT116 ћелијским линијама у односу на *цисплатину*, док је цитотоксични ефекат синтетисних комплекса бакра(II) на мишићим ћелијским линијама CT26 и CT26.CL25 у концентрацијама од 31,25 до 250  $\mu$ M био значајно мањи у поређењу са референтним леком [61,62].

И сами деривати тиосалицилне киселине који су од интереса као лиганди у овом истраживању могу дати значајан допринос у постизању антитуморског дејства. То најбоље осликава дизајнирање пегилованих коњугата са фарнезилтиосалицилном киселином у сврху носача у системима за испоруку лекова (нпр. паклитаксел) до циљаног места тј. ћелије канцера ради остваривања дејства.

Паклитаксел (ПТКС) је једна од првих терапијских линија избора код пацијента са малигним карциномом дојке, јајника, плућа и напредних форми Капоши саркома.



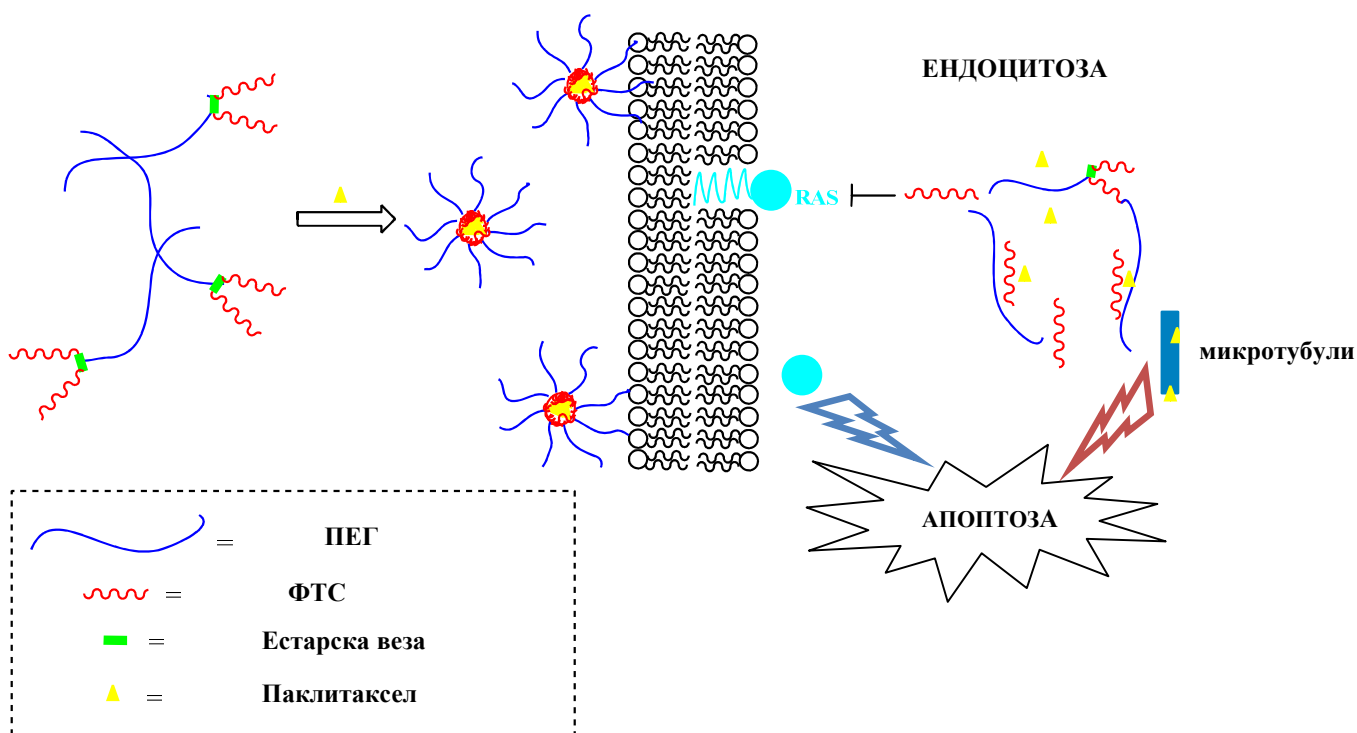
Механизам се заснива на ометању функционисања микротубула током ћелијске деобе. Успешну клиничку примену ПТКС ограничава лоша растворљивост у води и системска токсичност. Таксол је Cremophor EL®/етанолна формулација ПТКС која се клинички примењује. Међутим, Cremophor EL® може изазвати реакције хиперактивности, неуропатију и друге озбиљне нежељене ефекте [39,40].

Превазилажење ових проблема је омогућено развојем различитих система за испоруку лекова као што су липозоми, мицеле, дендримери, наночестице и хидрогели. Полимерне мицеле су нарочито интересантне, јер могу обезбедити „програмирано” ослобађање лека. Њихова мала величина честица (10-100 nm) у којима је инкапсулиран лек омогућава да он стигне до туморског ткива на које треба да оствари ефекат. Раније спроведене студије указују да је величина честица од 100 nm критична да би систем испоруке ефикасно доставио лек до циљаних ћелија рака [40,49,54,94-97]. Носачи у полимерним мицелама су направљени од фармаколошки инертних материјала, а све у циљу избегавања *in vivo* токсичности. Некад, због протуморске активности самих носача, може се постићи синергистички ефекат са испорученим леком.

Мицеле које су дизајниране као ПЕГ-хидрофобни коњулати лекова (пролекови) могу послужити за испоруку антитуморских лекова који су у води слабо растворни. Тај систем је формиран спајањем два молекула *S-trans*, *trans*-фарнезилтиосалицилне киселине (ФТС) на поли(етиленгликол) (ПЕГ, Молекулске масе = 5000) преко естарске везе (ПЕГ<sub>5K</sub>-ФТС<sub>2</sub>). ФТС представља хидрофобну регију полимерне мицеле.

Проантитуморска активност ФТС је задржана и након спајања са ПЕГ<sub>5K</sub>. Систем ПЕГ<sub>5K</sub>-ФТС<sub>2</sub> лако формира мале мицеле (20-30 nm) које су ефикасне у испоруци ПТКС. *In vivo* студија је показала да антитуморска активност ПТКС/ПЕГ<sub>5K</sub>-ФТС<sub>2</sub> мицела је знатно боља у поређењу са таксолом [39,98]. Даљим унапређењем ПЕГ-ФТС система формиране су ПТКС/ПЕГ<sub>5K</sub>-ФТС<sub>4</sub> мицеле које су се показале као још ефикасније формулације у инхибицији раста тумора *in vivo*. Њихов синтетички пут и механизам испоруке лека представљен је на Схеми 5 и Слици 12. Значајно побољшање је постигнуто и модулацијом ПЕГ са витамином Е [99,100] као и коњугацијом ПЕГ са два молекула ембелина [101,102]. Увођењем флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc) групе у ПЕГ<sub>5K</sub>-ФТС<sub>2</sub> систем (ПЕГ<sub>5K</sub>-Fmoc-ФТС<sub>2</sub>), повећан је капацитет и стабилност формулације мицеларних система за испоруку антитуморских лекова [103].





Слика 12. Испорука паклитаксела помоћу ПЕГ-ФТС система као носача

Фарнезилтиослицилна киселина је такође показала повољан ефекат на ћелијске линије малигног меланома тако што инхибира раст ћелија меланома својим цитостатским и проапоптотским дејством заустављајући ћелијски циклус у  $G_{114}$  или  $G_{2/M}$  фази. То је значајно, јер та врста тумора је лако развија резистенцију на стандардне терапијске опције. За разлику од других карцинома, меланоми немају обичну мутацију p53, али су присутни други дефекти апоптотског пута узроковани губитком ћелијског ефектора смрти Araf-1. Други апоптотски ефектори, као што су антиапоптотски протеин Bcl-2, често су прекомерно изражени у меланому. Повећана експресија Bcl-2 у меланому је повезана са смањеним одговором на хемотерапију и смањеним преживљавањем пацијената [97].

### 1.4.3. Интеракције са дезоксирибонуклеинском киселином (ДНК)

#### 1.4.3.1. Интеракције бакар(II)-комплекса са нуклеобазима у ДНК

Основни циљ бионеорганске хемије је да разјасни механизам деловања комплекса јона метала у биолошким системима. Као што је познато, нуклеинске киселине представљају основни генетски материјал ћелије. Из тог разлога представљају главну биолошку мету антиканцерогене терапије у људском телу. Стога, дизајнирање и синтеза комплекса јона прелазних метала који интерагују са ДНК, а запажена је њихова потенцијална цитотоксична активност, су постали веома важни последњих година [104,105]. Комплекси јона прелазних метала који могу при физиолошким условима да цепају (кидају) фосфо естарске везе, нарушавајући при том „кичму” полинуклеотидног ланца ДНК, привлаче све већу пажњу због своје потенцијалне примене као металолекови, алати у молекуларној биологији, регулатори експресије гена и друго. Студије које се баве интеракцијом комплекса прелазних метала са ДНК су од великог значаја за дизајн и синтезу нових потенцијалних лекова. Познато је да бакар(II)-јони имају битну улогу у биолошким системима и да улазе у састав неких фармаколошких агенаса. Многи комплекси бакра(II) који су показали потенцијално антиканцерогено дејство како у *in vitro* тако и у *in vivo* условима [105].

Показано је да бакар врсте имају широк спектар активности и нижу токсичност од оних које садрже платину као јон метала. Претпоставља се да комплекси бакра(II) имају другачији механизам од комплекса платине који имају способност да се ковалентном везом везују за молекулу ДНК. Међутим, врло је мало информација о деловању комплекса бакра на молекуларном нивоу. Већина истраживања су у последње време фокусирана на способност ових комплекса или њихових фрагмената да интерагују са ДНК. Такође, други ћелијски састојци, као што су топоизомеразе и протеазе мултипротеински комплекси су нове мете потенцијалног деловања.

Од 1969. године је примећено да бакар показује висок афинитет везивања према молекулу ДНК [106]. Опис кристалне структуре адукта који је настао у реакцији бакар(II)-хлорида са молекулом ДНК датира од 1991. године. Бакар је остварио везу преко N7 атома гуанина [107]. Ово везивање зависило је од величине комплекса бакра,

електронског афинитета и геометрије формираног производа. У основи интеракције малих молекула са ДНК се могу поделити на ковалентне (неповратне) или нековалентне (повратне) интеракције. Комплекси бабра су способни да остваре нековалентно везивање за двоструко хеликоидну структуру ДНК, уместо ковалентног везивања. Нековалентни типови интеракција са ДНК укључују: електростатичко, интеркалативно и ужлебљено везивање дуж главних или малих ДНК жлебова. У студијама о интеракцијама између ДНК и бакар(II)-јона које датирају из раних седамдесетих година прошлог века, када је за бакар(II)-јон, међу осталим двовалентним јонима метала, уочено да узрокује одмотавање и поновно намотавање двоструке спирале ДНК у зависности од експерименталних услова [108-112]. Пошто је бакар(II)-јон редокс активан јон, може изазвати оксидативно оштећење ДНК као и раскидање веза [113].

Координациона хемија бакар(II)-јона је веома „богата” и разноврсна тако да овај јон метала може градити комплексе са великим бројем лиганда који најчешће као донорске атоме имају атоме азота, кисеоника или сумпора. Уколико додатне групе на поменутим лигандима могу градити водоничне везе, електростатичке, хидрофобне или  $\pi$ - $\pi$  интеркције, то се одражава на побољшање афинитета везивања као и на бољу селективност у циљаном препознавању специфичних ДНК секвенци. Иако се бакар(II)-јони координативно-ковалентно везују са фосфатним групама и нуклеобазама - посебно за гуанин-цитозин (Г-Ц) базне парове [111,112], комплекси бабра(II) се додатно могу везати за молекуле ДНК преко нековалентних веза на шта утичу структура комплекса и природа лиганда.

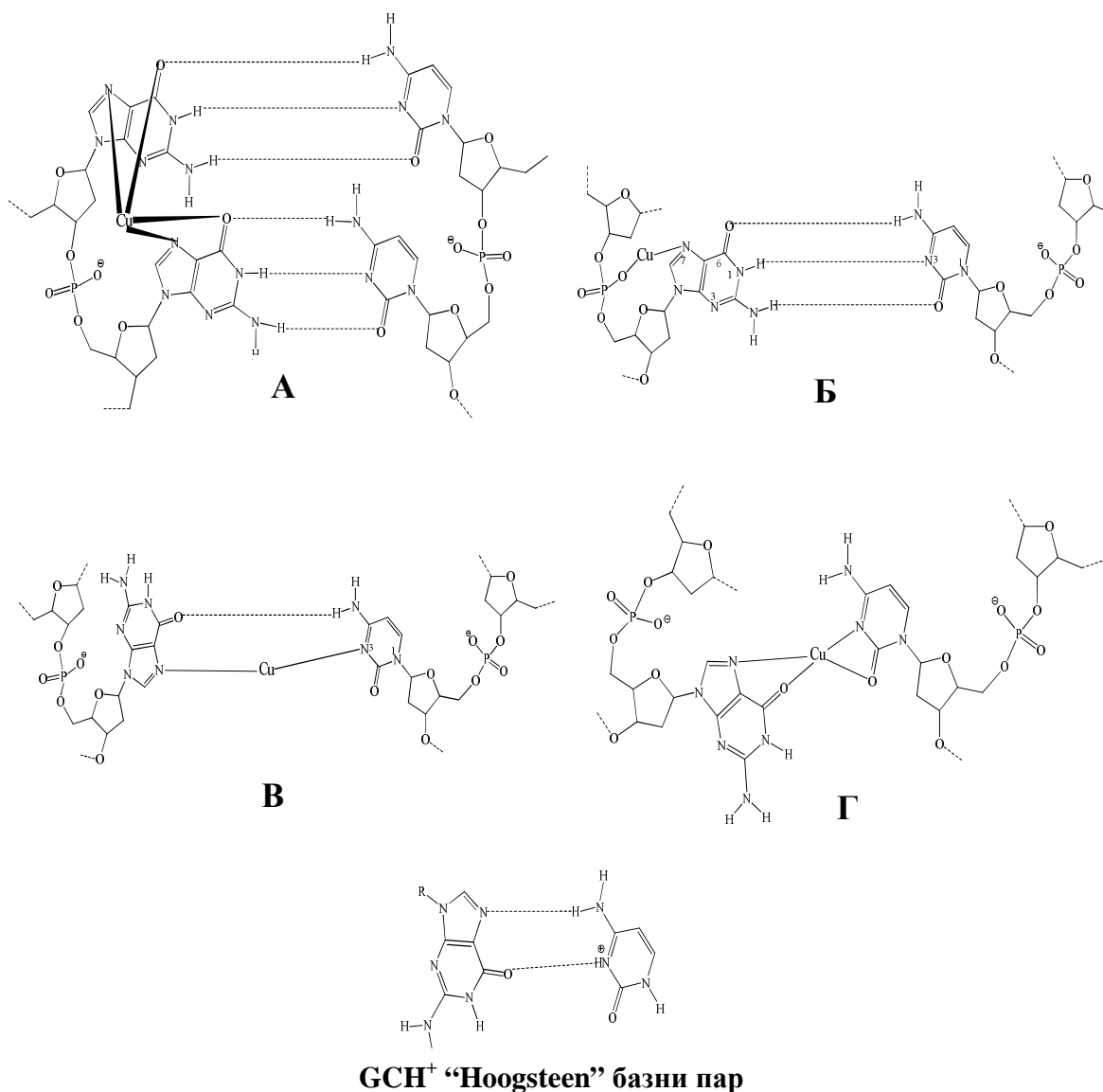
Директно везивање централног јона метала из бакар(II)-комплекса се најчешће врши за донорске атоме азота или кисеоника из нуклеобаза или фосфатних група у ДНК и то нековалентним интеркцијама као што су интеркалација, везивање за донорске атоме изложених страна жлебова, електростатичке интеракције. Све се то одражава на високе вредности константи везивања и може утицати на структуру ДНК и њене биолошке функције.  $\pi$ - $\pi$  интеркције између нуклеобаза и ароматичних лиганда додатно стабилизују везивање. N7 атом из гуанина и аденина и O4 атом из тимина су потенцијална места за интеракције у великом жлебу, док су у малом жлебу расположива следећа места: O2-цитозина, O2-тимина, N3-гуанина и N3-аденина. У обичној Б форми ДНК мали жлеб је узак и плитак, а велики жлеб је дубок и широк.

N7-гуанина је приоритетно место за координовање бакар(II)-јона, што потврђују раније публиковани радови [114]. У врло ниским концентрацијама могу се десити и неспецифична везивања за фосфатне групе из ДНК ланца [115,116].

Richard и срадници су 1973. године предложили могуће механизме везивања бакар(II)-јона за ДНК [117].

При ниским концентрацијама, бакар(II)-јон остварује интраланчану координацију за два суседна гуанина (Слика 13, А) при чему настаје „сендвич“ комплекс [115,117]. Уметање јона метала између два гуанина доводи до побољшања  $\pi$ -интеракција и водоничних веза са комплементарним цитозинима. Са повећањем концентрације формирају се N7-гуанин/фосфат хелати (Слика 13, Б). N7/PO хелација прекида водоничне везе у гуанин-цитозин пару и тако дестабилизују двоструки хеликс ДНК. Раздвајањем гуанин-цитозин парова N3 положај цитозина постаје доступан за везивање [117]. Овај начин хелације је примећен код делимично окупираног бакар(II)-јона у кристалној сруктури бакар(II)-d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> која је добијена кокристализацијом комплекса бакра(II) са олигонуклеотидом [118].

Остали модели везивања Cu<sup>2+</sup> јона за Г-Ц базне парове укључују формирање бакар посредованог Hoogsteen Г-Ц базног пара (Слика 13, В) што изискује промену конформације гликозидне везе гуанина из *anti*- у *sin*-конформацију. Такође је могуће везивање посредством N7/O6-гуанина и N3/O2-цитозина (Слика 13, Г).



**Слика 13.** Различити начини везивања бакар(II)-јона у ДНК молекулу

Доказано је да физичко-хемијске карактеристике, као што су планарност, хидрофобност и величина диимина, природа колиганда, као и координациона геометрија комплексних једињења игра важну улогу у начину везивања односно интеркалирања комплекса бабра у молекулу ДНК.

У многим случајевима, јон метала је деловао као неоргански модификатор органске кичме биоактивног молекула, а лиганди су показали ДНК афинитет и

специфичност. У том оквиру, посебна пажња је усредсређена на бакар(II) комплексе са N-донорским лигандима који су показали велику способност за интеракцију са ДНК и *in vitro* антитуморску активност. Деривати бакра који садрже 1,10-фенантролин или сродне диимино хелате су описани као цитотоксични агенси са израженим дејством, јер постижу IC<sub>50</sub> вредности и у микроларном оспеку. У складу са тим, многи новији радови извештавају о тернарним бакар(II)-комплексима заснованим на комбинацији бидентатних диимино лиганата (N-N = фенантролин (phen), бипиридин (bipy) или њихови супституисани деривати) и других колиганата (на пример, салицилна киселина [119], тетрациклини [120], терпиридин [121], имидазолидин-2-тионони [122], оксамидобензоат [123], хинолини [124], оксамид [125], сулфонамиди [126], антрацен [127], амини [128], кумарини [129] и фталати [130]).

*Selvakumar* и сарадници су испитујући неке имино диацетато бакар(II)-комплексе, који су садржали различите диимино лиганде, увидели да показују способност везивања за ДНК кроз парцијалну интеркалацију хетероцикличног прстена са базама полинуклеотидног ланца ДНК. Такође је примећено да увођење метил група на фенантролински прстен осим парцијалне интеркалације поменутог ароматичног система, омогућује јаче водоничне везе што се крајње одражава на бољу интеракцију са ДНК. Сличне резултате су показале и друге студије чиме је ојачана снага претпоставке да планарни и несупституисани диимински лиганди могу да интерагују са ДНК кроз режим интеркалације. Насупрот тога, лиганди са непланарним хетероцикличним ароматичним прстеновима имају слабије изражене интеркалаторске способности [131].

Поред лиганата типа хетероцикличних диимино пажњу заслужују и лиганди као што су: салфен [132], изоеуксантон [133], флавоноиди [134] и неке друге Шифове базе [88,135,136]. У свим овим студијама је примећено да планарна структура лиганата има кључну улогу у подстицању за везивање за ДНК. На афинитет комплекса бакра за интеракцију са молекулама ДНК, такође, утиче увођење лиганата који су подобни за  $\pi$ - $\pi$  интеракције [137].

У многим случајевима, интеракција комплексних једињења са ДНК доводи до деформација у структури ДНК, при чему је фаворизован процес расплитања ланца ДНК. Нови антинеопластични комплекси бакра(II) се понашају као „хемијске нуклеазе”, што се остварује на неколико начина: (1) оксидацијом нуклеобаза, (2) хидролизом



фосфоестарских веза и (3) оксидацијом шећерне (дезоксирибоза) компоненте. Због својих редукционих особина комплекси бакар(II) комплекса за развој агенаса који се користе за оксидативно цепање ДНК. Од 1986. године, Zue и сарадници показали су да комплекси бакра имају висок афинитет везивања за ДНК и функционишу као редокс катализатори [138]. Касније, многе студије су откриле да комплекси бакра промовишу цепање ДНК плазида преко оксидативног пута [124,126,139]. Сматра се да се деградација ДНК посредством комплекса бакра одиграва кроз реакције Фентоновог типа. Та реакција је извор ROS, као што су хидроксилни радикали [140] или различити метални интермедијери ( $\text{CuOH}^{2+}$  или  $\text{CuO}^+$  врсте) [141], који узрокују и директну оксидацију и цепање ДНК полинуклеотидног ланца [142].

Уопштено гледано, предпоставља се да су бакар(II) врсте у равнотежи са бакар(I) врстама. Последње се интеркалирају између базних парова ДНК услед планарности лиганата. Електростатичке интеракције између бакар(I) и фосфодиестарске „кичме“ условљава снажно везивање за ДНК. Бакар-оксо врсте циљано нападају С1'-Н деоксорибозних остатака, узрокујући цепање у ДНК [124]. Међутим, дефинитивно место „метализације“ на ДНК још увек није познато.

Са друге стране, у литератури су познати примери бакар(II)-комплекса који цепају ДНК хидролитичким механизмом [88,143-145]. О томе су први 1996. године писали Burstyn и сарадници наводећи да је бакар(II)-ТАСН комплекс (ТАСН = 1,4,7-триазоциклононан) цепао супернамотану ДНК како у аеробним, тако и у анаеробним условима, што је предоминантно указивало на хидролитички механизам цепања [146]. Важно је нагласити да оксидативни агенси цепају ДНК тако да настају фрагменти који нису исти као они који настају природном хидролизом и не могу да се разграде под дејством ензима [147].

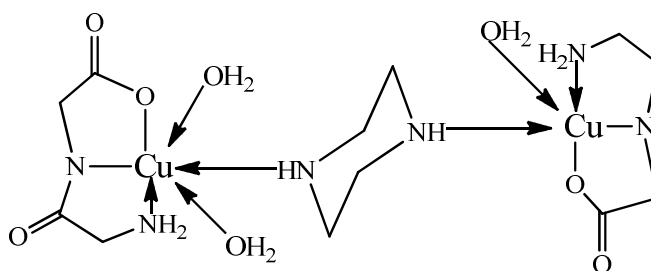
Истраживачи неке комплексе бакра зову „молекулским маказама“ (класичне хемијске нуклеазе), јер могу у молекулу ДНК изазвати једноструке или двоструке прекиде. Након оштећења ДНК ћелијски одговор се састоји у активацији механизма који су одговорни за поправку. Уколико њихова улога изостане долази до ћелијске смрти. Двоструки прекиди су чешће повезани са наступањем ћелијске смрти, јер се код једноструких прекида лакше исправљају одговарајућим ДНК механизма за поправку [148]. Апоптотска ћелијска смрт је најчешће последица оштећења ДНК. Међутим, то не

мора увек да буде случај, постоје радови који потврђују да процес апоптозе може бити активиран трансдукцијом сигнала у ћелијама које су третиране комплексима бакра. У неким случајевима, комплекси бакра(II) могу одређивати (детерминисати) усходну регулацију проапоптотских протеина и нисходну регулацију антиапоптотских протеина. Апоптоза индикована неким комплексима бакра(II) у Сасо-2 ћелијама је повезана са повећањем нивоа p53 протеина и смањењем експресије Bcl-2 [126]. Такође, учешће активације каспазе у посредованој ћелијској смрти узрокованој комплексима бакра још није потпуно разјашњена. Код врло малог броја деривата бакра(II), који узрокују апоптозу ћелија рака, је забележено да то чине кроз укључивање каспазе-3 [149] и/или активацију каспазе-9 [150].

#### 1.4.3.2. Комплекси бакра(II) као инхибитори топоизомеразе I и II

Интеракција комплекса бакра(II) са ДНК топоизомеразама и инхибиција њихове функције представља нови приступ у лечењу канцера. ДНК топоизомеразе I и II су ензими једра који одмотавају и замотавају ДНК, тако да имају важну функцију у ДНК репликацији и транскрипцији. Топоизомераза I пресеца један ланац двоструког хеликса ДНК, док топоизомераза II пресеца оба ланца ДНК. Након пресецања фосфатне осовине ДНК, долази до одмотавања и савијања ланца ДНК, затим репарира прекинуто место и на крају повезују оба ланца омогућавајући тако молекулу ДНК да се конвертује из једног тополошког изомера у други [151]. Агенси чије су биолошке мете деловања топоизомеразе се могу поделити у две групе: топоизомеразни отрови и каталитички инхибитори. Пошто су топоизомеразе неопходне за репликацију нуклеинских киселина, њиховом инхибицијом се спречава репликација ДНК туморских ћелија и смањује њихово неконтролисано дељење. Деривати  $\alpha$ -хетероцикличних тиосемикарбазона су показали способност да инхибирају топоизомеразу II како у *in vitro* тако и у *in vivo* условима [152]. Такође је испитиван потенцијал инхибиције топоизомеразе II и антиканцерогени ефекат на НерG2 ћелијске линије комплекса бакра(II) са хинолинским дериватима, јер је примећено да хинолински деривати могу поседовати проапоптотске карактеристике [153]. За разлику од поменутих комплекса бинуклерни комплекс бакра(II)  $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{L})_2(\text{ppz})(\text{H}_2\text{O})_4]$  (где је  $\text{H}_2\text{L}$  = дипептид глицилглицин; а  $\text{ppz}$  =

= пиперазин) (Слика 14) је пак способан да препозна одређене секвенце у молекулу ДНК, инхибира експресију топоизомеразе I и тиме контролише репликацију туморских ћелија. Овај комплекс доводи до оксидативног цепања ДНК и инхибиције активности топоизомеразе I при веома ниским концентрацијама  $IC_{50} = 12,5 \mu M$  [154].



**Слика 14.** Бинуклеарни комплекс бакра(II) са глицилглицином и пиперазином као лигандима

### 1.4.3.3. Комплекси бакра(II) као протеазом инхибитори

Протеозом је велики мултипротеински комплекс који се налази у једру и цитоплазми и селективно модулише и деградира интрацелуларне протеине. Еукариотски протеозом садржи једну 20S структурну јединицу (језгро) и две 19S регулаторне подјединице (капице). Језгро је шупље и у њему се врши разградња протеина. Крајеви језгра сарађују са 19S регулаторним подјединицама које садрже места за везивање убиквитина. Да би протеазом препознао и обрадио протеински супстрат мора бити повезана са убиквитином [155]. Након препознавања, протеини бивају преузети у 20S јединицу где су изложени дејству различитих пептидаза. Убиквитин протеазом-зависни систем деградације је неопходан за одвијање многих ћелијских функција, укључујући процесе који су од примарне важности за канцерогенезу као што је пролиферација, апоптоза, ангиогенеза и формирање метастазе [156]. Показано је да су ћелије рака осетљиве на инхибицију протеазома од нормалних ћелија. Циљано деловање на убиквитин-протеазом пут представља повољну стратегију у лечењу канцера [157], стога не чуди зашто је развој инхибитора протеазома као нових антиканцерогених агенаса у интензивном истраживању. Остваривање антитуморског

дејства комплекса бакра(II) преко механизма инхибиције протеазома први су описали Dou и сарадници. Они су показали да су испитивани комплекси бакра(II) селективно индуковали апоптотску смрт ћелија рака али не и нормалних ћелија.

## **2. ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА**

На основу свега приказаног у уводу постављена је следећа хипотеза:

Реакцијом S-алкенил деривата тиосалицилне киселине и бакар(II)-нитрата очекује се да настају бинуклеарни комплекси чији састав и структуру треба потврдити на основу резултата елементалне микроанализе, инфрацрвене спектроскопије, магнетних мерења, моларне проводљивости и рендгенске структурне анализе. Такође, можемо очекивати да ће S-алкенил деривати тиосалицилне киселине и одговарајући комплекси бакар(II) показати одређену биолошку активност.

У сврху провере радне хипотезе поставили смо следеће циљеве истраживања:

### **Генерални циљ**

Синтетисати S-алкенил деривате тиосалицилне киселине (алкенил = пропенил-(L1), и изобутенил-(L2)), и одговарајуће комплексе бакар(II) са наведеним бидентатним лигандима (C1 и C2).

### **Специфични циљеви**

1. Састав награђених једињења одредити на основу резултата елементалне микроанализе.
2. Структуру добијених бидентатних лиганата и одговарајућих комплексних једињења претпоставити на основу инфрацрвене (IR), нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR), резултата магнетних мерења и моларне проводљивости.
3. Стварну структуру добијених једињења потврдити и на основу резултата рендгенске структурне анализе, где год је то могуће.
4. Испитати интеракцију новосинтетисаних комплекса са молекулом гуанозин-5'-монофосфата, праћењем супституционих реакција при физиолошким условима. Такође треба утврдити постојање интеракције између синтетисаних комплекса и СТ-ДНК.
5. Испитати потенцијалну биолошку активност (антимикробну и антитуморску) S-алкенил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бинуклеарних комплекса бакар(II).

### **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ**

### 3.1. ПОСТУПАК СИНТЕЗЕ ЛИГАНАДА

S-алкенил деривати тиосалицилне киселине (алкенил = пропенил-(**L1**) и изобутенил-(**L2**)) су добијени реакцијом алкиловања тиосалицилне киселине одговарајућим алкенил-халогенидима, која се одвија у базној средини и смеси вода-етанол као растварачу. То подразумева да је у раствор добијен растварањем (1 mmol) тиосалицилне киселине у 50,00 mL 30% етанола додат раствор натријум-хидроксида (2,00 mmol у 5,00 mL дестиловане воде). У тако припремљену бистру реакциону смешу потом је постепено додаван у малим порцијама одговарајући алкенил-халогенид (2,00 mmol) који је претходно растворен у 5,00 mL етанола. Тако добијена реакциона смеша остављена је током ноћи на 60°C. Након тога раствор је пренет у кристализациону шољу и ради удаљавања етанола упарен је на воденом купатилу. У добијени водени раствор додат је (2,00 mM) раствор хлороводоничне киселине услед чега је настао бели талог одговарајућег S-алкенил деривата тиосалицилне киселине. Тако добијени производ је затим процеђен, испран великом количином дестиловане воде и осушен преко ноћи на вакууму [1].

S-пропенил дериват тиосалицилне киселине, (**L1**): Тачка топљења 180-181°C, бео прах, (S-propenyl-thiosal) = C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S (Mr = 194,25).

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3446, 3075, 2917, 2654, 2557, 1680, 1586, 1562, 1465, 1415, 1314, 1273, 1256, 1153, 1061, 1045, 889, 741, 701, 651, 551.

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 3,21 (d, 2H, -CH<sub>2</sub>), 5,92 (m, 1H, =CH), 4,93 (m, 2H, =CH<sub>2</sub>) 7,47-7,91 (m, 4H, -Ar).

**<sup>13</sup>C NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 38,2 (-CH<sub>3</sub>), 115,9 (=CH<sub>2</sub>), 136,5 (=CH), 125,3; 125,6; 130,2; 131,7; 133,8; 140,1 (-Ar), 172,0 (-COOH).

S-изобутенил дериват тиосалицилне киселине, (**L2**): Тачка топљења 182-183°C, бео прах, (S-isobutenyl-thiosal) = C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>S (Mr = 208,28).

**IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3445, 3076, 2967, 2647, 2556, 1676, 1585, 1562, 1463, 1412, 1317, 1272, 1253, 1154, 1061, 1046, 810, 743, 651, 550.

**<sup>1</sup>H NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 1,82 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 4,98 (m, 2H, =CH<sub>2</sub>), 3,44 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>), 7,42-8,30 (m, 4H, -Ar).

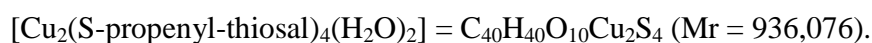


$^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 22,5 (- $\text{CH}_3$ ), 46,1 (- $\text{CH}_2$ ), 112,1 (=CH $_2$ ), 125; 126,5; 126,7; 133,2; 134,1; 142,6 (-Ar), 168,1 (-COOH).

## 3.2. ПОСТУПАК СИНТЕЗА КОМПЛЕКСА

### 3.2.1. Синтеза комплекса бакар(II) са S-пропенил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1)

Раствору добијеном растварањем 0,1000 g (0,4139 mmol) бакар(II)-нитрата трихидрата у 10,0 mL дестиловане воде, лагано је додаван S-пропенил дериват тиосалицилне киселине (0,1607 g; 0,8278 mmol). Реакциона смеша је загревана 3 сата на воденом купатилу, а током тог периода у малим порцијама је додаван водени раствор литијум-хидроксида (0,0199 g; 0,8278 mmol). Плави талог насталог бакар(II)-комплекса (C1) је одвојен цеђењем, испран дестилованом водом и сушен на ваздуху. Принос реакције: 0,1604 g (81,5%).



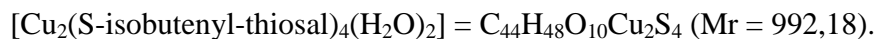
Изрaчунато: C, 51,77%; H, 4,56%; S, 13,49%. Нађено: C, 51,54%; H, 4,42%; S, 13,29%.  $\mu(294 \text{ K}) = 1,84 \mu\text{B}$ . Моларна проводљивост комплекса је 5,06  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (48 s).

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3441, 3076, 2918, 1610, 1549, 1460, 1435, 1400, 1281, 1258, 1229, 1156, 1062, 1044, 846, 744, 695, 658, 556.

### 3.2.2. Синтеза комплекса бакар(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2)

Раствору добијеном растварањем бакар(II)-нитрата трихидрата (0,1000 g; 0,4139 mmol) у 10,0 mL дестиловане воде, лагано је додаван S-изобутенил дериват тиосалицилне киселине (0,1723 g, 0,8278 mmol). Реакциона смеша је загревана 3 сата на воденом купатилу, а током тог периода у малим порцијама је додаван водени раствор литијум-хидроксида (0,0199 g, 0,8278 mmol). Плави талог насталог комплекса бакар(II) (C2) је одвојен цеђењем, испран дестилованом водом и сушен на ваздуху. Монокристали C2 комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$  погодни за рендгенску структурну анализу добијени су поступком споре прекристализације комплекса

[Cu<sub>2</sub>(S-isobutenyl-thiosal)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>] из система DMSO (диметилсулфоксид)-вода. Принос реакције: 0,2228 g (82,1%).



Изрaчунато: C, 53,66%; H, 5,10%; S, 12,73%. Нађено: C, 53,47%; H, 5,18%; S, 12,64%.  $\mu(294 \text{ K}) = 1,86 \text{ } \mu\text{В}$ . Моларна проводљивост комплекса је 9,43  $\mu\text{S/cm}$  (48 s).

**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3446, 2969, 2915, 1613, 1589, 1400, 1281, 1257, 1157, 1062, 847, 744, 719, 656, 510.

### 3.3. АНАЛИЗЕ И МЕТОДЕ МЕРЕЊА

#### 3.3.1. Елементална микроанализа

Елементална микроанализа (C, H, S) је извршена на Катедри за органску хемију Хемијског факултета Универзитета у Београду. Анализа је спроведена на апарату Vario III C, H, N, S Elemental Analyzer у CHS моду.

#### 3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија

Снимање инфрацрвених спектра свих синтетисаних једињења је извршено на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу помоћу спектрофотометра Perkin-Elmer FTIR 31725X. За снимање је коришћена техника KBr пилуле.

#### 3.3.3. Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија

Снимање нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра (<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C NMR) лигананда је спроведено на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу помоћу спектрофотометра Varian Gemini-200 NMR користећи D<sub>2</sub>O за синтетисане лиганде као растварач. Хемијска померања су дата у односу на триметилсилан (TMS), употребом DDS као инертног стандарда.

### 3.3.4. Магнетна мерења

Магнетна мерења синтетисаних комплекса вршена су на Хемијском факултету Универзитета у Београду на температури од 294 К Евансовим методом коришћењем апарата MSB (Magnetic Susceptibility Balance) - МК1 (Scherwood Scientific Ltd., Cambridge England) са  $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$  као калибрантом. Дијамагнетичне корекције израчунате су на основу Паскалових константи.

### 3.3.5. Моларна проводљивост

Моларна проводљивост ( $\Lambda$ ) свеже припремљених раствора комплекса бакара(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине (концентрације  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ ) у диметилсулфоксиду као растварачу мерена је на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу помоћу EC-Meter BASIC 30+ кондуктометра (CRISON) на температури од 20°C. Помоћу овог инструмента одређена је, мерењем електричног отпора  $R$  ( $\Omega$ ) у експерименталној ћелији (познате константе ћелије  $k$ ), најпре специфична проводљивост ( $\kappa$ ) раствора испитиваних комплекса, на основу једначине:

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

$$k = \frac{l}{A}$$

Константа кондуктометријске ћелије ( $k$ ) за EC-Meter BASIC 30+ износи  $1 \text{ cm}^{-1}$ . Моларна проводљивост раствора комплекса потом израчуната је на основу једначине:

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

где је  $C$  моларна концентрација комплекса изражена у  $\text{mol/dm}^3$ .

### 3.3.6. Рендгентска структурна анализа

Рендгенска структурна анализа је извршена у Лабораторији за теоријску физику и физику кондензоване материје института Винча анализом X-зрака.

#### 3.3.6.1. Рендгенска структурна анализа комплекса бакар(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$ (C2)

Монокристали погодни за рендгенску структурну анализу су добијени спором прекристализацијом из система DMSO-вода. Дифракциони подаци о монокристалној структури за комплекс,  $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$  (C2), сакупљени су на собној температури на дифрактометру Oxford Diffraction Gemini S који је опремљен са MoK $\alpha$  зрачним извором и CCD детектором. Обрађивање података и корекције емпиријске апсорпције извршене су помоћу софтвера CrysAlisPro [2]. Кристална структура је решена уз помоћ директних метода, коришћењем SIR2002 [3], а утачњена применом SHELXL програма [4]. Атоми водоника везани за угљеникове атоме су постављени на геометријски идеалним позицијама са C–H растојањима фиксираним на 0,93 Å од Csp<sup>2</sup> и 0,97 и 0,96 Å, од метилен и метил Csp<sup>3</sup>. Изотропни параметри померања постављени су на 1,2 Ueq и 1,5 Ueq од матичних угљеникових атома. Утврђено је да се DMSO лиганд налази у деформисаном положају на две позиције, са факторима заузимања локације 0,80 и 0,20. Третирање атома сумпора довело је до значајног побољшања модела кристалне структуре, док су параметри померања неуређених С атома били ограничени на изотропне параметре због нестабилности даљег пречишћавања. Основни кристалографски подаци, као и они који се односе на решавање и утачњавање структуре комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$ , су наведени у Табели 2. Програми PARST [5] и PLATON [6] су коришћени за извођење геометријских израчунавања, док је програм Mercury [7] коришћен за молекулску графику.

**Табела 2.** Основни кристалографски подаци и подаци неопходни за решавање и утачњавање структуре комплекса,  $[Cu_2(S\text{-isobutenyl-thiosal})_4(DMSO)_2]$  (C2)

Емпиријска формула	$C_{48}H_{56}O_{10}Cu_2S_6$
М	1112,4
Боја, кристални облик	Зелена, призма
Величина кристала (mm)	0,322 · 0,270 · 0,120
Температура (К)	293(2)
$\lambda$ (Å)	0,71073
Кристални систем	Моноклиничан
Просторна група	$P2_1/n$
Димензије јединичних компоненти	
$a$ (Å)	10,8516(4)
$b$ (Å)	10,2909(2)
$c$ (Å)	24,7049(8)
$\beta$ (°)	100,417(3)
$V$ (Å <sup>3</sup> )	2713,4(2)
$Z$	2
$D_{calc}$ (mg/m <sup>3</sup> )	1,366
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	1,066
$\theta$ опсег за прикупљање података (°)	од 2,59 до 28,94
Сакупљене рефлексције	12000
Независне рефлексције, $R_{int}$	6152; 0,0232
Комплетност (%) до $\theta = 26^\circ$	99,9
Метода побољшања	Матрица најмањих квадрата на $F^2$
Подаци / параметри	4576/308
Фактор слагања на основи $F^2$	1,021
Завршни $R_1/wR_2$ индекси [ $I > 2\sigma(I)$ ]	0,0486/0,1257

### 3.4. КИНЕТИЧКА МЕРЕЊА

Кинетика и механизам супституционих реакција бакар(II)-комплекса са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине као бидентатним лигандима изучавана је на Stopped-flow спекторфотометру у 25 mM Нерес пуферу, рН  $\approx$  7,2. Све реакције су изучаване као реакције псеудо-првог реда, што значи да је концентрација лиганда била

најмање 10 пута већа од концентрације комплекса. Супституционе реакције су изучаване на више температура (283, 288, 293, 303, 310 К).

Радна таласна дужина је одређена снимањем спектра смеше комплекса и лиганда у одређеним временским интервалима у опсегу таласних дужина између 220 и 450 nm. Таласна дужина на којој је највећа промена у апсорбанци у односу на време узета је као радна таласна дужина. Супституционе реакције су почете мешањем еквимоларних количина раствора комплекса и лиганда директно у Stopped-flow спектрофотометру. Концентрација лиганда је била у великом вишку (најмање 10 пута) у односу на концентрацију комплекса, како би се обезбедили услови реакције псеудо-првог реда. Спектрофотометријско одређивање константе брзине псеудо-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , врши се праћењем промене апсорпције раствора  $A_t$  у функцији времена  $t$  на одређеној таласној дужини, на основу једначине:

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

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 апсорпцију након „бесконечно” дугог временског интервала (обично после 8-10 полувремена реакције). За одређивање вредности константи коришћен је компјутерски програм Microsoft Excell 2007 и OriginPro 8. Експериментални подаци су представљени у Табелама 3 и 4.

**Табела 3.** Константе брзине реакције псеудо-првог реда у функцији концентрације нуклеофила и температуре у реакцији између комплекса *C1* и 5'-GMP (5'-гуанозин-монофосфат) на  $\text{pH} = 7,2$  (25 mM *Нерес* пуфер)

Т(К)	$10^4 C_{\text{ТУ}}/\text{M}$	Први корак $k_{\text{obsd1}}/\text{s}^{-1}$	Други корак $k_{\text{obsd2}}/\text{s}^{-1}$
310,0	2,40	800,57(6)	56,97(6)
	2,00	654,50(6)	46,14(6)
	1,40	351,00(6)	32,41(6)
	1,00	278,00(6)	22,30(6)
	0,50	125,00(5)	12,03(5)

<sup>a</sup>Број кинетичких мерења је представљен у заградама

**Табела 4.** Константе брзине реакције псеудо-првог реда у функцији концентрације нуклеофила и температуре у реакцији између комплекса **C2** и 5'-GMP (5'-гуанозин-монофосфат) на pH = 7,2 (25 mM HEPES пуфер).

T(K)	$10^4 C_{TU}/M$	Први корак $k_{obsd1}/s^{-1}$	Други корак $k_{obsd2}/s^{-1}$
310,0	2,40	1687(6)	131(6)
	2,00	1215(6)	99(6)
	1,40	869(6)	69(6)
	1,00	776(6)	57(6)
	0,50	427(5)	36(5)

<sup>a</sup>Број кинетичких мерења је представљен у заградама

### 3.5. ИНТЕРАКЦИЈЕ КОМПЛЕКСА СА ДНК

#### 3.5.1. Абсорпциона спектроскопска мерења

Интеракције комплекса са ДНК су проучаване помоћу UV-Vis спектрофотометрије у циљу одређивања константе везивања ( $K_b$ ). Фосфатни пуфер (0,01 M, pH = 7,4) је коришћен за абсорпциона мерења. Серија раствора комплекс-ДНК је припремљена мешањем раствора комплекса константне концентрације (8  $\mu$ M) са инкрементима ДНК полазног раствора (1,25 mM).

##### 3.5.1.1. UV-Vis ДНК интеракције

Основни раствор СТ-ДНК је припремљен у PBS (Фосфатни пуферски раствор = 0,01M,  $C_{NaCl} = 0,137$ ,  $C_{KCl} = 0,0027$  M, pH = 7,4) пуферу, дајући однос UV апсорбанција на 260 nm и 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) од око 1,8-1,9, што је указивало да је ДНК довољно слободна од протеина. Концентрација је утврђена на основу интензитета апсорпције на 260 nm ( $\epsilon = 6600 M^{-1} cm^{-1}$ ) [8]. UV-Vis спектри су добијени на Perkin-Elmer Lambda 35 или 25 спектрофотометру двоструког снопа, користећи кварцне кивете дужине 1,0 cm (3,0 mL).

### 3.5.1.2. UV-Vis абсорпционе студије

Да би се квантитативно упоређивала јачина везивања комплекса, интринзичке константе везивања  $K_b$  су одређене праћењем промена у абсорпцији MLCT опсега (преноса наелектрисања са централног јона метала на лиганде - Metal to Ligand Charge Transfer, MLCT) са повећањем концентрације СТ-ДНК, користећи једначину (1).

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

Где је  $K_b$  представља однос нагиба и одсечка на у оси графика зависности  $[\text{ДНК}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f)$  у функцији  $[\text{ДНК}]$ ,  $[\text{ДНК}]$  је концентрација ДНК у базним паровима,  $\varepsilon_A = A_{\text{obs}}/[\text{комплекс}]$ ,  $\varepsilon_f$  је коефицијент екстинкције за невезани комплекс и  $\varepsilon_b$  је коефицијент екстинкције за комплекс у потпуно везаном облику.

### 3.5.2. Флуоресцентна мерења

Интеракције комплекса са ДНК су испитиване и помоћу флуоресцентне спектроскопије. Мерења флуоресценције су одрађена на RF-1501 РС спектрофлуорометру (Shimadzu, Japan). Интензитет флуоресценције је мерен на таласној дужини екситације 527 nm, а флуоресцентне емисије на 612 nm. Ширина екситационог и емисионог прореза (10 nm) и брзина снимања су константне за све експерименте. Интеракције комплекса са ДНК су проучаване у присуству ЕБ (етидијум-бромид) да би се утврдило да ли комплекс може да замени ЕБ из његовог ДНК-ЕБ комплекса. ДНК-ЕБ комплекс је припремљен мешањем 50  $\mu\text{M}$  ЕБ и 50  $\mu\text{M}$  ДНК (pH = 7,4). Могући ефекти везивања комплекса за ДНК су проучавани снимањем промене флуоресцентног емисионог спектра након додавања раствора комплекса (0-80  $\mu\text{M}$ ) у раствор ДНК-ЕБ. Пре мерења систем је инкубиран на собној температури у току 5 минута. Емисија раствора је снимана у области од 550 до 750 nm.



Релативно везивање комплекса за СТ-ДНК одређено је израчунавањем константе гашења ( $K_{sv}$ ) из нагиба права добијених из Stern-Volmer-ове једначине (2).

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

Где су  $I_0$  и  $I$  интензитети емисије у одсуству и присуству гашења (за комплекс **C1** или **C2**),  $[Q]$  је укупна концентрација гашења (ДНК), а  $K_{sv}$  је Стерн-Волмерова (Stern-Volmer) константа гашења која се може добити из нагиба са графика зависности  $I_0/I$  у функцији  $[Q]$ .

### 3.5.3. Мерења вискозности

Вискозности ДНК раствора су одређиване у присуству повећаних количина комплекса **C1** и **C2**. Време протока је мерено помоћу дигиталне штоперице. За сваки узорак је мерење поновљено три пута, а затим је израчунато просечно време протока. Подаци су анализирани као  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  у односу на  $r$ , где је  $\eta$  вискозитет ДНК у присуству комплекса, а  $\eta_0$  је вискозност само ДНК у пуферском раствору. Вискозности су израчунате на основу посматраног времена протока за растворе који садрже ДНК ( $t$ ) кориговано за време протока само пуфера ( $t_0$ ),  $\eta = (t - t_0)/t_0$ .

## 3.6. БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА

### 3.6.1. *In vitro* антимикуробна активност

#### 3.6.1.1. Хранљиве подлоге и растварање испитиваних супстанци

Испитиване супстанце су растворене у диметилсулфоксиду, а затим разблажене течном хранљивом подлогом (Mueller–Hinton бујон) до концентрације раствора од 10 %. Диметилсулфоксид је купљен од Acros Organics, док је ресазурин набављен од Alfa Aesar. Доксициклин (Галеника АД, Београд), је растворен у Mueller–Hinton бујону

(Торлак, Београд), док су антимиотици, флуконазол (Pfizer Inc.) и кетоконазол (Sigma-Aldrich) растворени у декстрозном агару Sabouraud (Торлак, Београд).

Mueller–Hinton бујон је стандаризована подлога коју прописује Национални комитет за клиничке лабораторијске стандарде Америке. Погодна је за тестирање првенствено антибиотика из разлога што обезбеђује оптималне услове за већину брзорастућих аеробних и факултативно анаеробних бактерија. У састав подлоге улази: 2 g месног екстракта, 17,5 g казеин-хидролизата и 1,5 g скроба. Припрема се састоји у томе да се 21 g праха суспендује у 1000 mL хладне дестиловане воде. Подлога се пажљиво загрева до кључања док се потпуно не раствори. Потом се разлива у ерленмајере и стерилише у аутоклаву 15 минута на температури од 121°C.

Sabouraud декстрозни агар је неселективна подлога за узгој и одржавање патогених и непатогених гљивица, посебно дерматофита. Ниска рН вредност подлоге, која износи 5-6, је погодна за раст гљивица (посебно дерматофита), а има незнатно инхибиторно дејство на контаминирајуће бактерије у клиничким узорцима. Ова подлога се састоји од: 5 g панкреатичне дигестије казеина, 5 g пептичне дигестије животињског ткива, 40 g декстрозе и 15 g агара. Подлога има већу селективност за гљивице ако се дода хлорамфеникол.

### **3.6.1.2. Припремање и стандардизација суспензија**

Суспензије бактерија и гљива су припремљене тако што су колоније узимане директно са подлоге и суспендоване у 5 mL стерилног физиолошког раствора. Густина почетне суспензије је подешавана коришћењем денситометра (DEN-1, BioSan, Летонија), при чему је вршено упоређивање са 0,5 McFarland стандардом [9]. Како би се прилагодила густина према 0,5 McFarland стандарду, суспензије бактерија су садржале око  $10^8$  јединица за формирање колонија (CFU)/mL, а суспензије квасца су садржале око  $10^6$  CFU/mL. Суспензије гљивичних спора су припремљене пажљивим скидањем спора са растућих аспергила. Почетне суспензије су додатно разблажене у 0,85% стерилном физиолошком раствору у односу 1:100 за бактерије и односу 1:1000 за гљиве.

### 3.6.1.3. Испитивани микробиолошки агенси

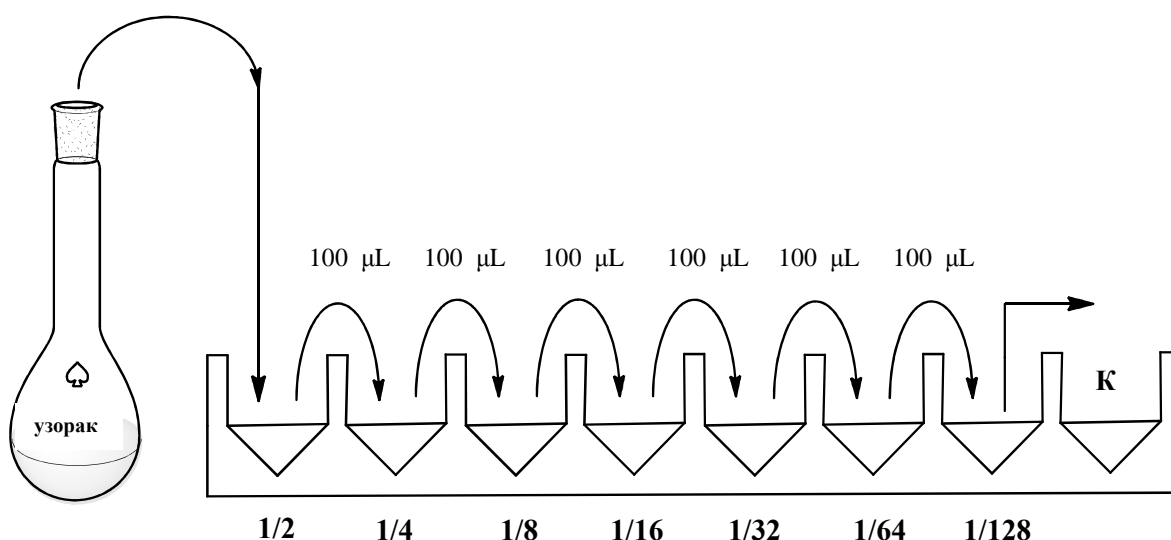
Антимикробна активности синтетисаних комплекса је испитана на Институту за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Антимикробна активност комплекса бакра(II) са одговарајућим S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине је одређена тестирањем 18 микроорганизама од чега су 9 врста бактерија и то 3 врсте пробиотских бактерија, 2 клиничка изолата и 4 стандардне врсте. Такође, тестиране су и 2 врсте квасца као и 7 врста филаментозних гљива што је представљено у Табели 5.

**Табела 5.** Испитивани микроорганизми који су употребљени за одређивање антимикробне активности комплекса бакра(II) са одговарајућим S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине

Бактерије	Грам-позитивне бактерије	<i>Bacillus cereus</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923
	Грам-негативне бактерије	<i>Salmonella enterica</i>
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853
		<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 12453
		<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922
	Пробиотске врсте бактерија	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832
Гљиве	Квасци	<i>Saccharomyces boulardii</i>
		<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231
	Филаментозне гљиве	<i>Penicillium expansum</i>
		<i>Penicillium chrysogenum</i>
		<i>Penicillium italicum</i>
		<i>Trichoderma viride</i> ATCC® 13233
		<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC® 204305
		<i>Aspergillus flavus</i> ATCC® 9170
<i>Aspergillus niger</i> ATCC® 16404		

### 3.6.1.4. Испитивање бактеријске осетљивости

Испитивање осетљивости бактерија дилуционом методом заснива се на одређивању минималне инхибиторне концентрације (МИК), као најниже концентрације испитиване супстанце која инхибира раст тестираних бактерија. Тако добијени резултати омогућавају квалитативну и квантитативну процену ефекта испитиваних једињења. Разликују се два типа дилуционих метода: микродилуциона и макродилуциона метода. Суштина дилуционе методе се огледа у припреми серије двоструких разблажења испитиваних супстанци (Слика 15).



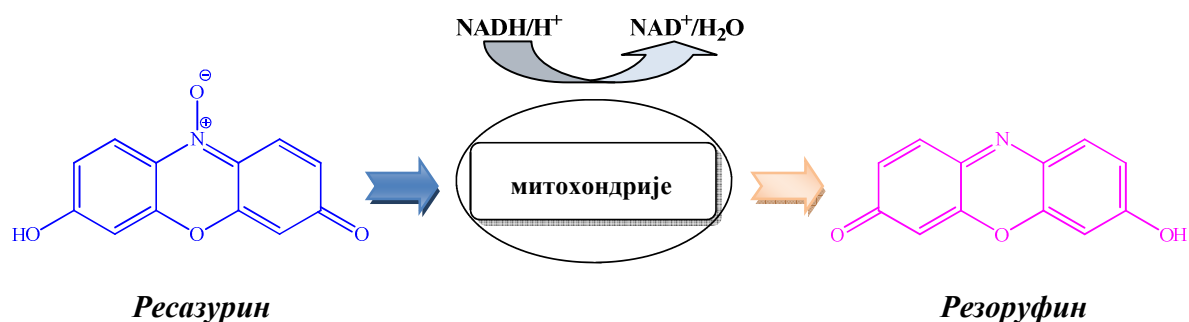
Слика 15. Припрема серије двоструких разблажења

#### 3.6.1.4.1. Микродилуциона метода

Антимикробна активност је испитивана микродилуционом методом са ресазурином [10]. Одређена је минимална инхибиторна концентрација (МИК) и минимална микробицидна концентрација (ММК).

Ресазурин је индикатор ћелијског раста. Има плаво-љубичасту (нефлуоресцентну) боју и не показује токсично деловање на бактеријске ћелије. У

периоду инкубације, ресазурин се редукује у резорурфин у присуству оксидоредуктаза живе ћелије (Слика 16). Очигледан доказ да је дошло до редукције је промена боје из плаво-љубичасте у розе. Крајњи производ редукције ресазурина је хидрорезорурфин који је безбојан и нефлуоресцентан.



Слика 16. Редукација ресазурина у резорурфин

За испитивање је коришћена микротитрациона плоча са 96 отвора у које је стављено по 100  $\mu\text{L}$  хранљиве подлоге, Mueller–Hinton бујон за бактерије и Sabouraud декстрозни агар за гљивице. По 100  $\mu\text{L}$  раствора испитиваних једињења почетне концентрације 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  је додато у први ред микротитрационе плоче. Двоструким разблажењем добијени су раствори концентрација у области од 1000 до 7,81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . У сваки бунарић је додато по 10  $\mu\text{L}$  ресазурин. Затим је додавано по 10  $\mu\text{L}$  суспензија бактерија и гљива. Тестирана једињења су испитана при концентрацији бактерија од  $10^5$  CFU/mL и концентрацији спора гљива од  $10^3$  CFU/mL. Припремљене плоче су инкубиране на 37°C током 24 сата за бактерије, на 28°C током 48 и 72 сата за гљиве. Минимална инхибиторна концентрација је дефинисана као најнижа концентрација испитиваних супстанци на којој није дошло до промене боје ресазурина из плаве у розу боју. Минимална микробицидна концентрација је одређена пресејавањем 10  $\mu\text{L}$  узорка из удубљења у којима није уочен раст на плочастом агару. Концентрација на којој после периода инкубације није уочен раст је дефинисана као минимална микробицидна концентрација.

Пошто концентровани диметилсулфоксид има бактерицидно дејство, постављена је контрола растварача којом је искључена могућност да диметилсулфоксид има утицај на раст микроорганизама до концентрације од 10%. Концентрација диметилсулфоксида је у експерименту и додатно смањена серијом двоструких разблажења, тако да не прелази 5%. Сваки експеримент је садржао три врсте контроле:

- 1) контролу раста (која подразумева присуство и раст бактерија без испитиване супстанце),
- 2) контролу стерилности (која подразумева одсуство живих бактерија) и
- 3) позитивну контролу (која подразумева присуство комерцијалног антибиотика).

Као позитивне контроле, у нашем истраживању, употребљени су доксициклин (антибиотик), флуконазол и кетоконазол (антимикотици).

### **3.6.2. *In vitro* антитуморска активност**

Испитивање антитуморске активности синтетисаних једињења је извршено у Центру за молекулску медицину и испитивање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу коришћењем МТТ теста.

#### **3.6.2.1. Припремање раствора испитиваних једињења**

Комплекси су растворени у 10% диметилсулфоксиду који је разблажен у дестилованој води до концентрације од 10 mM и филтриран кроз Millipore филтер промера отвора 0,22 mm. Ови раствори су разблажени у медијуму за гајење непосредно пре употребе. МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-бромид је растворен (5 mg/mL) у раствору соног фосфатног пуфера чија рН износи 7,2 и филтриран је кроз Millipore филтер промера отвора 0,22 mm пре употребе. Сви реагенси су набављени од Sigma Chemicals.

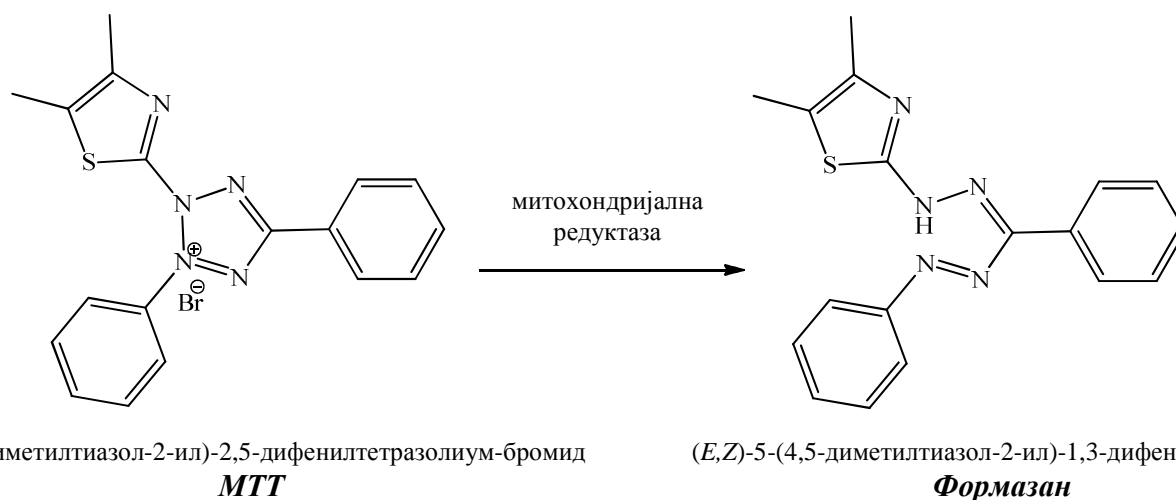
### 3.6.2.2. Ћелијска култура

Антитуморска активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине као лигандима, је испитивана *in vitro* на хуманим туморским ћелијама карцинома колона НСТ-116 (ATCC® CCL-247™). Ћелије су пребачене у DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) медијум (Sigma Aldrich, Минхен, Немачка) са 10% феталног говеђег серума (FBS-Fetal Bovine Serum, Sigma Aldrich, Минхен, Немачка), пеницилина (100 IU/mL), стрептомицина (100 µg/mL) у влажној атмосфери ваздуха са 5% CO<sub>2</sub> на температури од 37°C. Субконфлуентни монослојеви, у фази раста, су сакупљани кратким третирањем са 0,25% трипсином и 0,02% ЕДТА (етилендиаминтетрасирћетна киселина) који су растворени у соном фосфатном пуферу (PBS, PAA Laboratories GmbH), а након тога испрани три пута у соном фосфатном пуферском систему без серума. Број виталних ћелија је одређиван методом искључивања бојом уз помоћ трипан плавог. Наиме, трипан плаво је боја која може да прође само кроз оштећену ћелијску мембрану невијабилних ћелија и боји цитоплазму, док је код вијабилних ћелија ова могућност искључена.

### 3.6.2.3. Цитотоксични тестови

#### 3.6.2.3.1. МТТ колориметријски тест

Ефекти тестираних једињења на ћелијску вијабилност ће бити одређивани коришћењем МТТ колориметријском техником [11]. МТТ тест је метода која се заснива на индиректном одређивању процента преживелих ћелија. МТТ или 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум-бромид, је окарактерисан као кристал жуте боје, растворљив у води, који због позитивног наелектрисања лако пролази кроз ћелијску мембрану. У метаболички активним ћелијама МТТ се редукује до нерастворних љубичастих кристала формазана (Слика 17). Митохондријална редуктаза (сукцинат дехидрогеназа), која је иначе активна само у живим ћелијама, катализује ову реакцију, па је редукција првобитног једињења до плаво обојеног продукта формазана директно пропорционална броју живих ћелија.



**Слика 17.** Редуција тетразолијумове соли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромида (MTT) до формаза помоћу митохондријалне редуктазе.

НСТ-116 ћелије су биле разблажене у подлози за раст до  $5 \cdot 10^4$  ћелија/mL и аликвоту ( $5 \cdot 10^3$  ћелија/100 mL), а затим су пренете у 96 појединачних бунара. У посебне отворе је сипан медијум без ћелија како би се одредила оптичка густина самог медијума (бленк). Следећег дана подлога је била одливена и замењена са 100  $\mu$ L испитиваних једињења, при чему су серијом двоструких разблажења добијени раствори концентрација у опсегу од 1000  $\mu$ M до 7,8  $\mu$ M у подлози за раст. Свако разблажење је тестирано у трипликату. Ћелије ће се инкубирати на 37°C у присуству 5% CO<sub>2</sub> током 72 h. После инкубације супернатант је уклоњен и додат је 15% раствор МТТ (5 mg/mL PBS, 10  $\mu$ L) у DMEM медијуму без FBS и пренети у сваки бунарчић. Плоче су инкубиране још 4 сата на 37°C у 5% CO<sub>2</sub>. Након те инкубације медијум са МТТ је уклоњен, а диметилсулфоксид (150  $\mu$ L) и глицински пуфер (20  $\mu$ L) су сипани да би се растворили кристали формаза. Растварање кристала је потпомогнуто и вортексирањем плоча у трајању од 10 минута. Оптичка густина сваког бунарчића се одређује коришћењем мултифункционалног читача микротитар плоча Zenyth 3100 Multimode detector.



Ефекат испитиване супстанце се одређује поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму и интензитета који дају ћелије излагане испитиваној супстанци. Продуковани формазан се раствара у органским растварачима и интензитет боје се одређује спектрофотометријски на таласној дужини од 595 nm. Процент цитотоксичности ће бити израчунат коришћењем формуле:

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

**Б** - односи се на бунаре где је само медијум,

**С** - означава укупну вијабилност/спонтану смрт нетретираних циљних ћелија,

**Е** - односи се на експерименталне бунаре.

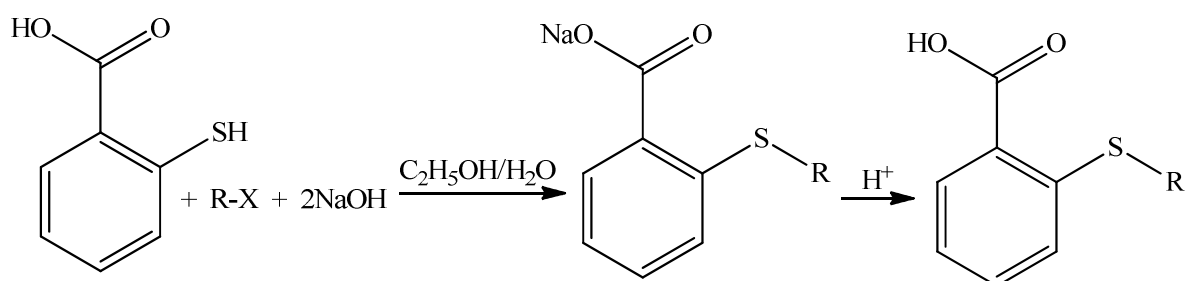
За сваки од тестираних комплекса процењивана је цитотоксичност у три одвојена експеримента.

## **4. РЕЗУЛТАТИ**

## 4.1. СИНТЕЗЕ И ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА

### 4.1.1. Нови бакар(II) комплекси са одговарајућим S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-alkenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$

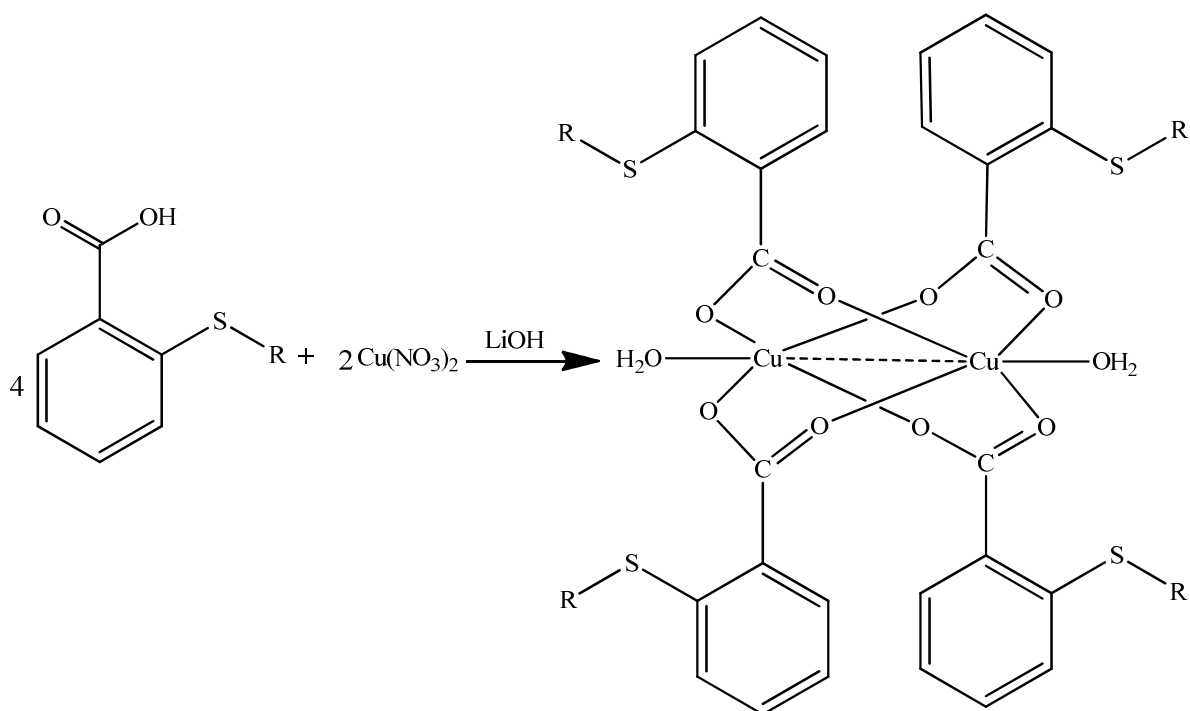
S-алкенил деривати тиосалицилне киселине (R = пропенил-(L1), изобутенил-(L2)) су припремљени алкиловањем поменуте киселине уз помоћ одговарајућих алкенил халогенида у алкалном водено-етанолном раствору (Схема 6) [1, 12].



R = пропенил (L1), изобутенил (L2)

Схема 6. Реакција за добијање одговарајућих S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине

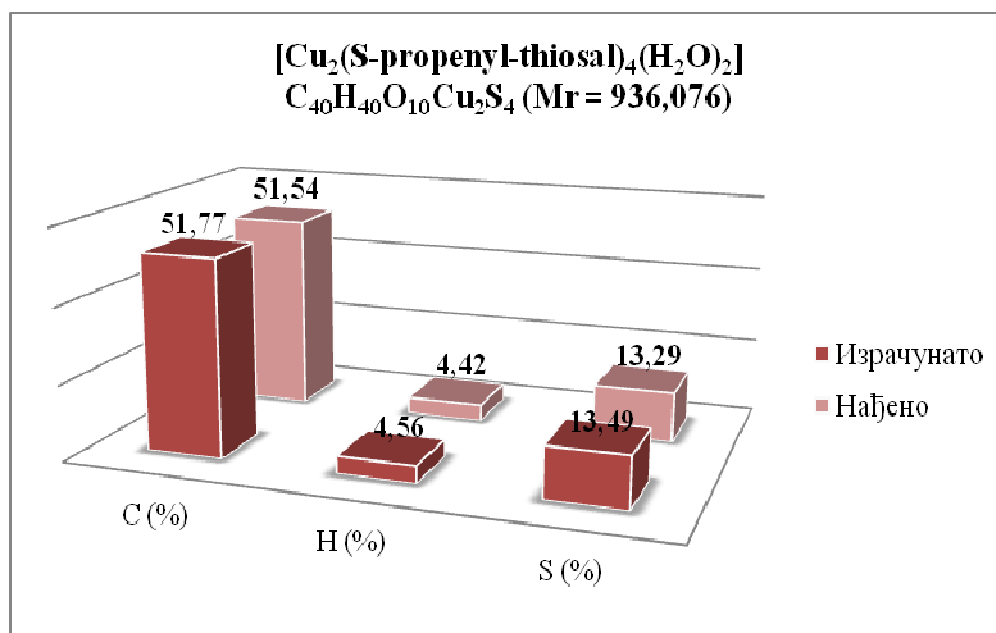
Комплекси бакар(II) ( $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ ) и  $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  су синтетисани у задовољавајуће добрим приносима (преко 80%). Директном реакцијом између бакар(II)-нитрата трихидрата и лиганда (S-пропенил дериват тиосалицилне киселине или S-изобутенил дериват тиосалицилне киселине) у воденом раствору добијени су одговарајући комплекси (Схема 7). Литијум-хидроксид је додаван у реакциону смешу како би се извршило депротонавање карбоксилне групе у молекулу лиганда, а самим тим и обезбедили услови да се формира координативно-ковалентна веза преко доносних атома кисеоника карбоксилне групе. Као крајњи производ синтезе настали су одговарајући бинуклеарни комплекси у којима два јона бакра међусобно повезују мономерне компоненте у димерну форму.



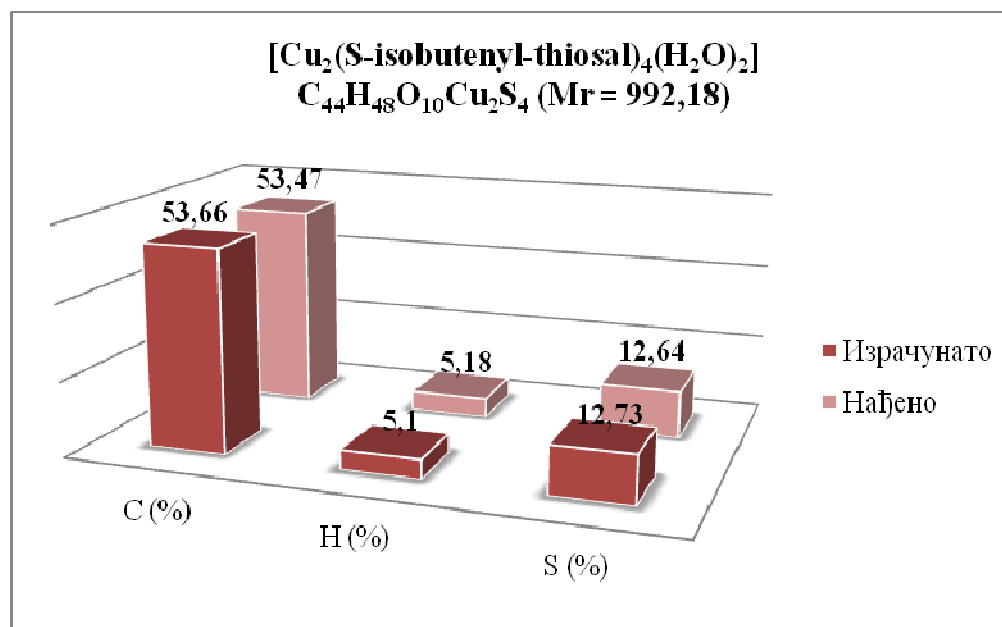
**Схема 7.** Реакција за добијање одговарајућих бакар(II)-комплекса са *S*-алкенил дериватима тиосалицилне киселине

#### 4.1.2. Елементална микроанализа новосинтетисаних бакар(II)-комплекса

Састав бинуклеарних комплекса бакра(II) са бидентатним лигандима типа *S*-алкенил деривата тиосалицилне киселине је представљен на Слици 18а и Слици 18б.



**Слика 18а.** Резултати елементалне микроанализе за бинуклеарни комплекс бакра(II) са *S*-пропенил дериватом тиосалицилне киселине



**Слика 18б.** Резултати елементалне микроанализе за бинуклеарни комплекс бакра(II) са *S*-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине

### 4.1.3. Инфрацрвени спектри S-алкенил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бакар(II)-комплекса

Како би се утврдио начин везивања S-алкенил деривата тиосалицилне киселине за бакар(II)-јон у наgraђеним комплексима, снимљени су инфрацрвени спектри слободних лиганата и синтетисаних комплекса. Најважније траке у инфрацрвеним спектрима S-алкенил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бинуклеарних бакар(II)-комплекса су приказане у Табели 6.

**Табела 6.** Најважније траке у инфрацрвеним спектрима S-алкенил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бинуклеарних бакар(II)-комплекса

ЛИГАНДИ/КОМПЛЕКСИ	-S-R	-COO <sup>-</sup> (as)	-COO <sup>-</sup> (sim)
S-propenyl-thiosal ( <b>L1</b> )	702( <i>m</i> )	1680( <i>s</i> )	1415( <i>s</i> )
S-isobutenyl-thiosal ( <b>L2</b> )	702( <i>m</i> )	1676( <i>s</i> )	1412( <i>s</i> )
[Cu <sub>2</sub> (S-propenyl-thiosal) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] ( <b>C1</b> )	696( <i>m</i> )	1610( <i>s</i> ) 1596( <i>s</i> )	1401( <i>s</i> )
[Cu <sub>2</sub> (S-isobutenyl-thiosal) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] ( <b>C2</b> )	697( <i>m</i> )	1613( <i>s</i> ) 1589( <i>s</i> )	1400( <i>s</i> )

s (strong) - траке јаког интензитета, m (medium) - траке средњег интензитета

### 4.1.4. Нуклеарно-магнетно-резонанциони (<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C) спектри S-алкенил деривата тиосалицилне киселине

Вредности хемијских померања за водоникове и угљеникове атоме у молекулима лиганата приказане су у Табеларном приказу 7.

**Табела 7.**  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR спектри S-алкенил деривата тиосалицилне киселине

	ЛИГАНДИ	
	S-propenyl-thiosal ( <b>L1</b> )	S- isobutenyl-thiosal ( <b>L2</b> )
$^1\text{H}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ppm)	3,21 (d, 2H, $-\text{CH}_2$ ), 5,92 (m, 1H, $=\text{CH}$ ), 4,93 (m, 2H, $=\text{CH}_2$ ) 7,47-7,91 (m, 4H, -Ar)	1,82 (s, 3H, $-\text{CH}_3$ ), 4,98 (m, 2H, $=\text{CH}_2$ ), 3,44 (t, 2H, $-\text{CH}_2$ ), 7,42-8,30 (m, 4H, -Ar)
$^{13}\text{C}$ NMR ( $\text{CDCl}_3$ , $\delta$ ppm)	38,2 ( $-\text{CH}_3$ ), 115,9 ( $=\text{CH}_2$ ), 136,5 ( $=\text{CH}$ ), 125,3; 125,6; 130,2; 131,7; 133,8; 140,1 (-Ar), 172,0 ( $-\text{COOH}$ )	22,5 ( $-\text{CH}_3$ ), 46,1 ( $-\text{CH}_2$ ), 112,1 ( $=\text{CH}_2$ ), 125; 126,5; 126,7; 133,2; 134,1; 142,6 (-Ar), 168,1 ( $-\text{COOH}$ )

#### 4.1.5. Магнетна мерења

Резултати магнетних мерења за бинуклеарне комплексе бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине дати су у Табели 8.

**Табела 8.** Вредности магнетних момената испитиваних комплекса бакра(II)

КОМПЛЕКСИ	$\mu_{\text{eff}}$
$[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ ( <b>C1</b> )	$\mu(294\text{K}) = 1,84 \mu_{\text{B}}$
$[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ ( <b>C2</b> )	$\mu(294\text{K}) = 1,86 \mu_{\text{B}}$

#### 4.1.6. Моларна проводљивост

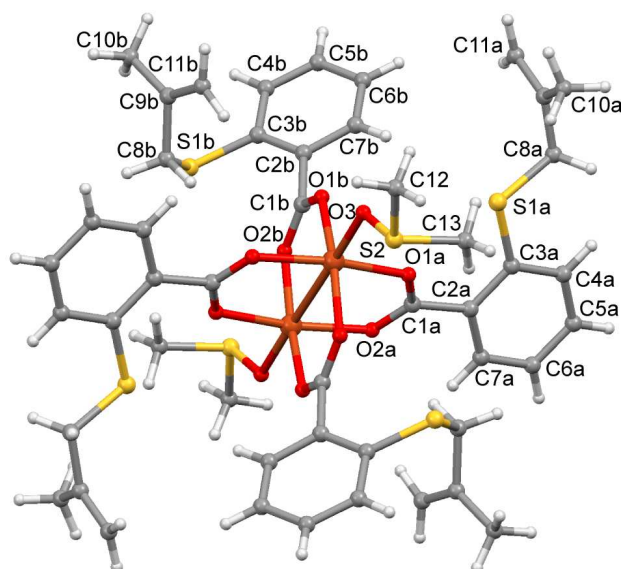
Вредности моларне проводљивости за испитиване комплексе бакра(II) су представљене у Табели 9.

**Табела 9.** Мерења моларне проводљивости бинуклеарних комплекса бабра(II) са *S*-алкенил дериватима тиосалицилне киселине

КОМПЛЕКСИ	$\Lambda_M, \text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$ (растварач)
$[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1)	5,06 (DMSO)
$[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2)	9,43 (DMSO)

**4.1.7. Кристална структура бинуклеарног комплекса бакар(II) са *S*-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине,  $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$  (C2)**

Рендгенском структурном анализом је потврђена структура комплекса бабра(II) са *S*-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине (C2), као што је приказано на Слици 19.



**Слика 19.** Кристална структура  $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$  (C2) и начин обележавања атома у молекулу комплекса



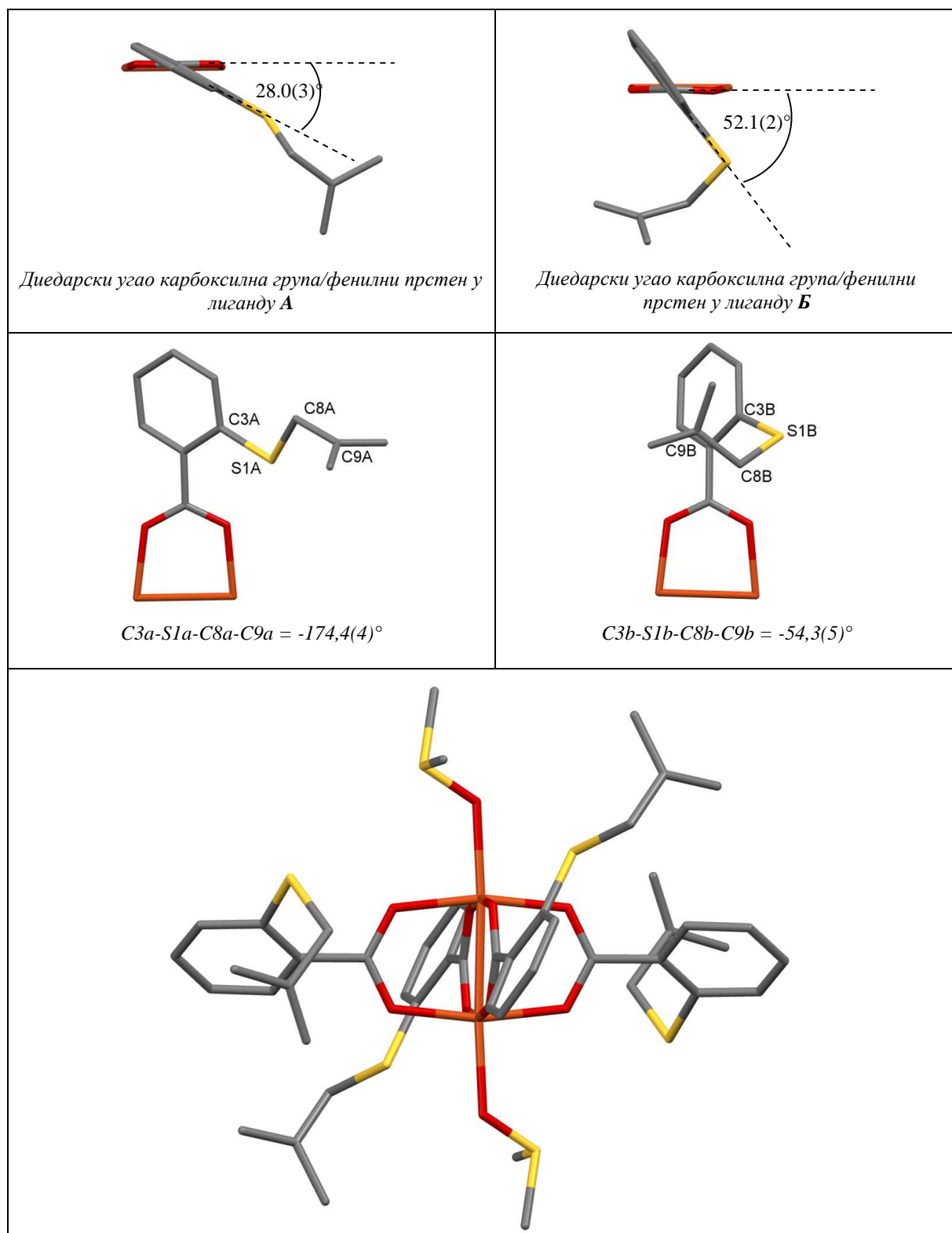
У Табели 10 су приказане одабране дужине и углови веза у молекулу испитиваног комплекса бакра(II) (C2).

**Табела 10.** Одабране дужине веза (Å) и углови веза (°) у комплексу C2

дужине веза (Å)		углови веза (°)	
Cu1...Cu1 <sup>i</sup>	2,6430(7)	O1a-Cu1-O1b	88,4(1)
Cu1-O1a	1,974(2)	O1a-Cu1-O2b <sup>i</sup>	89,8(1)
Cu1-O2a	1,968(2)	O1b-Cu1-O2a <sup>i</sup>	90,0(1)
Cu1-O1b	1,952(2)	O2a <sup>i</sup> -Cu1-O2b <sup>i</sup>	89,4(1)
Cu1-O2b	1,967(2)	O1a-Cu1-O3	98,1(1)
Cu1-O3	2,148(2)	O1b-Cu1-O3	98,1(1)
O1a-C1a	1,257(4)	O2a <sup>i</sup> -Cu1-O3	93,9(1)
O2a-C1a	1,254(4)	O2b <sup>i</sup> -Cu1-O3	93,9(1)
O1b-C1b	1,256(4)	O1a-Cu1-O2a <sup>i</sup>	168,1(1)
O2b-C1b	1,256(4)	O1b-Cu1-O2b <sup>i</sup>	167,98(9)
C3a-S1a	1,762(3)	C1a-C2a-C3a	127,8(3)
C8a-S1a	1,817(5)	O1a-C1a-O2a	125,7(3)
C3b-S1b	1,761(4)	O1b-C1b-O2b	125,6(3)
C8b-S1b	1,799(7)	Cu1 <sup>i</sup> -Cu1-O3	175,17(8)

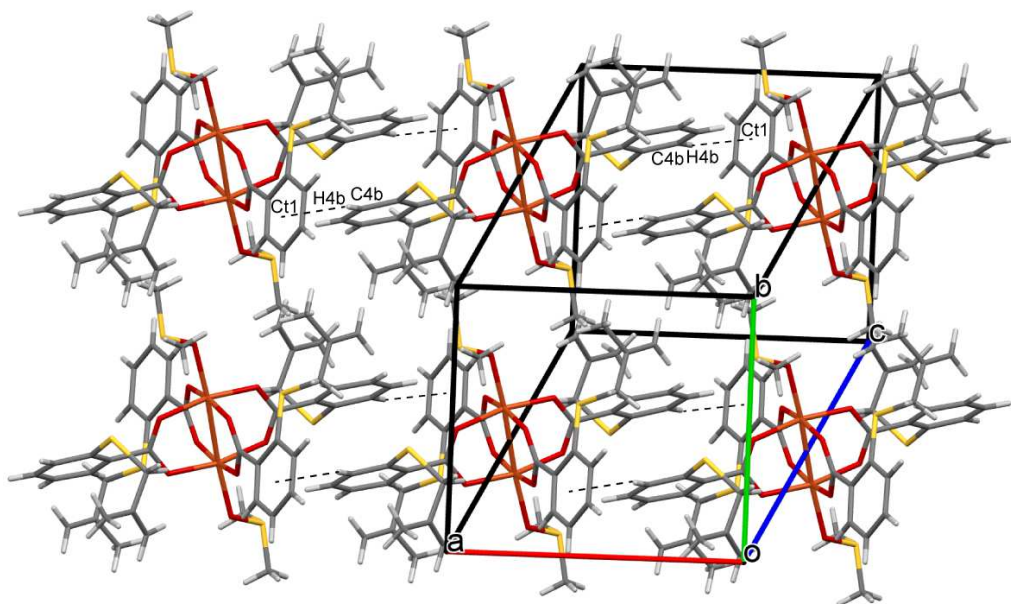
Симетријске операције: (i) -x, -y, -z+1.

У комплексу C2 лиганди А и Б показују значајне конформационе разлике што се може видети на Слици 20.



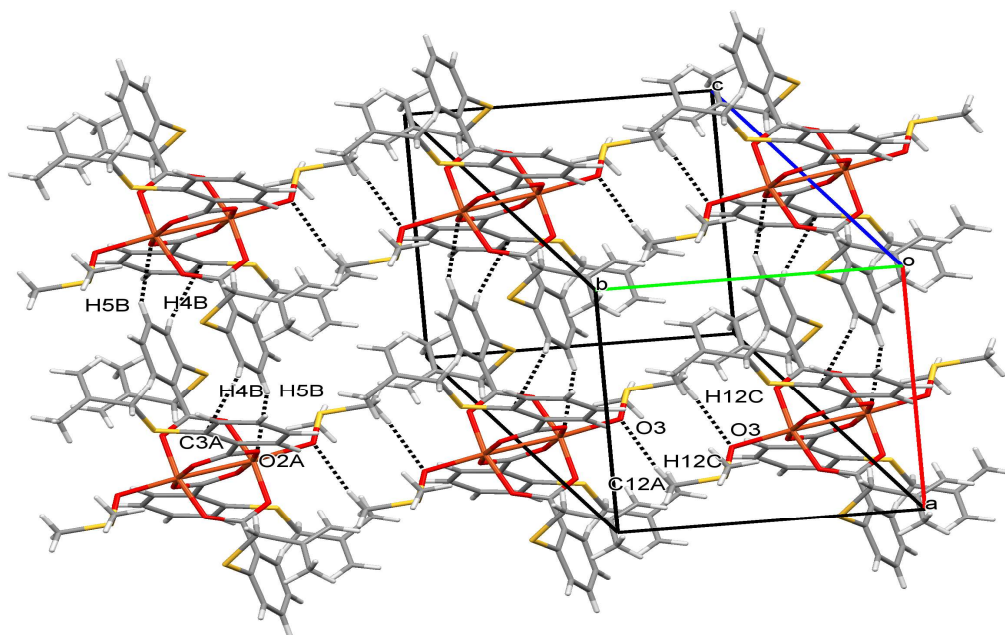
Слика 20. Различите конформације *S*-изобутил деривата тиосалицилне киселине као лиганд **A** (лево) и **B** (десно)

У кристалном паковању, слабе С-Н... $\pi$  интеракције између суседних ароматичних лиганата повезују молекуле комплекса у ланце који се протежу дуж *a* кристалографске осе [C4b-H4b... $\pi^i$ : C... Cg1 = 3,742(5); Н...Cg1 = 2,89 Å; С-Н...Cg1 154°; Cg1: центроид кроз C2a/C7a фенолних прстена; (i) = -x+1,-y,-z+1]. С-Н... $\pi$  интеракције су приказане испрекиданим линијама. Начин паковања молекула у кристалу приказан је на Слици 21.



**Слика 21.** Кристално паковање бинуклеарног комплекса бакар(II) са *S*-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине

Узимајући у обзир главну оријентацију аксијалног DMSO лиганда, посматрани су кратки и усмерни С-Н...О контакти између аксијалних лиганата [C12a-H12c...O3<sup>iii</sup>; Н...О 2,47 Å, С-Н...О 163°; (iii) -x,-y-1,-z+1] који повезују ланце молекула дуж *b* кристалографске осе (Слика 22).



**Слика 22.** Приказ стабилизације кристалне структуре молекула  $[Cu_2(S\text{-isobutenyl-thiosal})_4(DMSO)_2]$  (C2) slabим C–H... $\pi$  и C–H...O интеракцијама

У Табели 11. Приказане су интра и интермолекулске водоничне везе уочене рендгенском структурном анализом комплекса C2 (Å, °).

**Табела 11.** Одабране дужине веза (Å) и углови веза (°) у C2 комплексу

D–H...A	D–H (Å)	D...A (Å)	H...A (Å)	D–H...A (°)
C56–H56a...O1a	0,96	3,424(4)	2,55	150
C55–H55a...O3 <sup>i</sup>	0,96	3,347(4)	2,42	162
C5b–H5b...O2a <sup>ii</sup>	0,96	3,514(4)	2,63	157
C4b–H4b...Cg1 <sup>ii</sup>	0,96	3,744(6)	2,89	154

Cg1: центроид кроз C2a, C3a, C4a, C5a, C6a, C7a фенилни прстен;  
Симетријске операције: (i) -x,-y-1,-z+1; (ii) -x+1,-y,-z+1.

## 4.2. БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ

### 4.2.1. Супституционе реакције комплекса $[\text{Cu}_2(\text{S-alkenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ са 5'-GMP

Како би се испитао афинитет координовања нових комплекса са нуклеобазама, проучавали смо супституционе реакције комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C1) и  $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C2) са одабраним нуклеофилом 5'-GMP (5'-гуанозин-монофосфат) који је фрагмент ДНК (Схема 8).

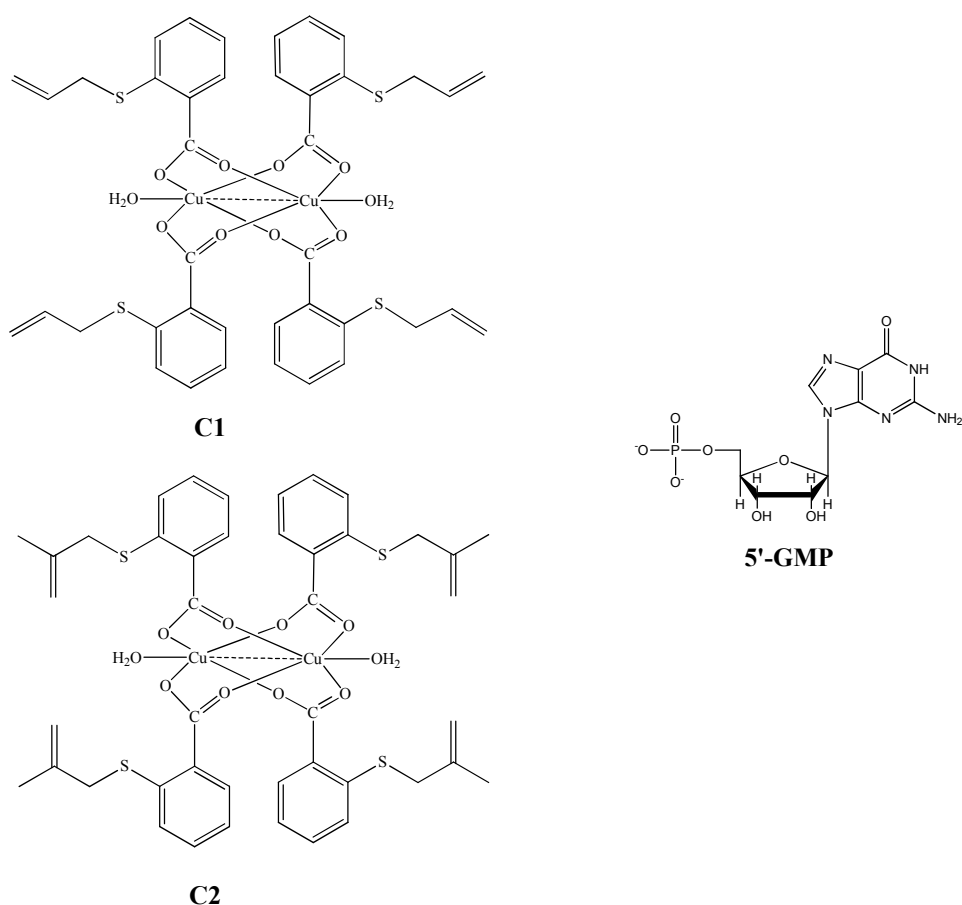
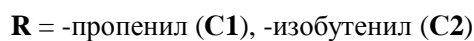
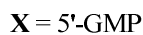
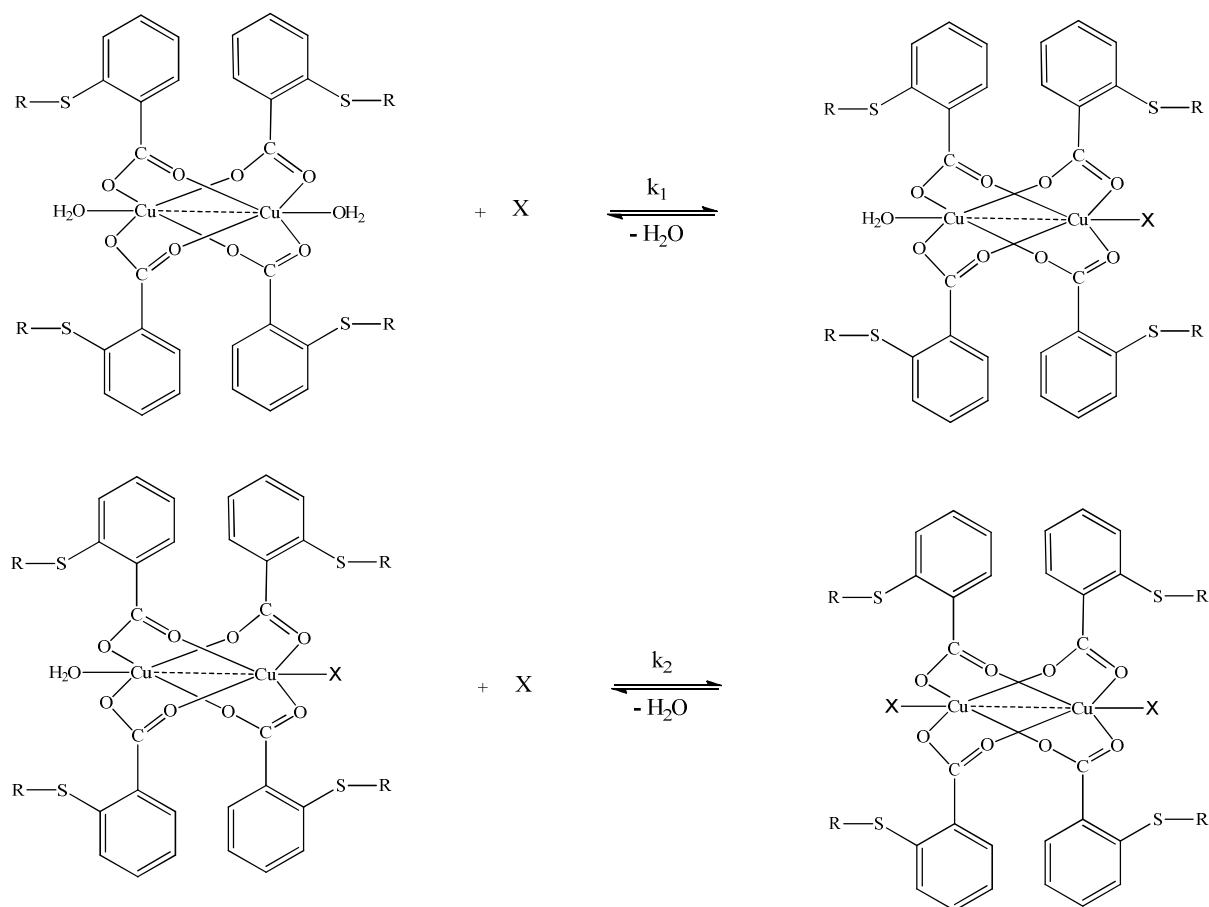


Схема 8. Структура новосинтетисаних бакар(II)-комплекса и 5'-GMP

Промена у апсорбнцији је праћена на одговарајућим таласним дужинама, као функција времена на 310 К и рН ≈ 7,2. Предложени реакциони путеви за све посматране супституционе процесе су представљени на Схеми 9. Реакције супституције код оба комплекса су се одвијале у два узастопна корака, која су зависна од концентрације нуклеофила.



**Схема 9.** Супституционе реакције комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине

Константе брзине реакција *псеудо*-првог реда су одређене са графика зависности  $k_{\text{obs}}$  у функцији укупне концентрације нуклеофила, према једначинама (1) и (2), где је

$\text{Nu} = 5\text{'-GMP}$ , где је нагиб крива обележен са  $k_1$  или  $k_2$ . У графику однос  $k_{\text{obs}1,2}$  у функцији концентрације нуклеофила приказана је као линеарна зависност за све комплексе и кораке супституције. Резултати су резимирани у Табели 12.

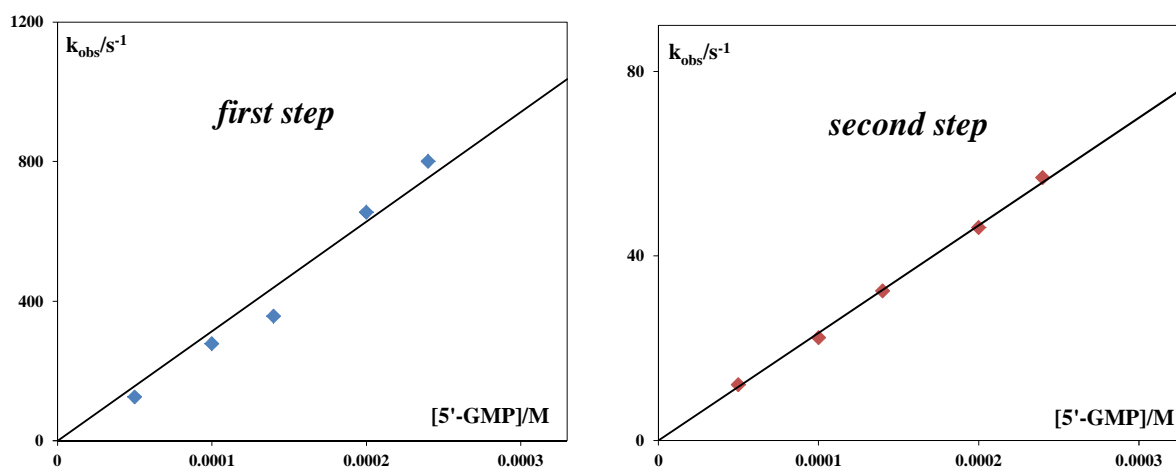
$$k_{\text{obs}1} = k_1[\text{Nu}] \quad (1)$$

$$k_{\text{obs}2} = k_2[\text{Nu}] \quad (2)$$

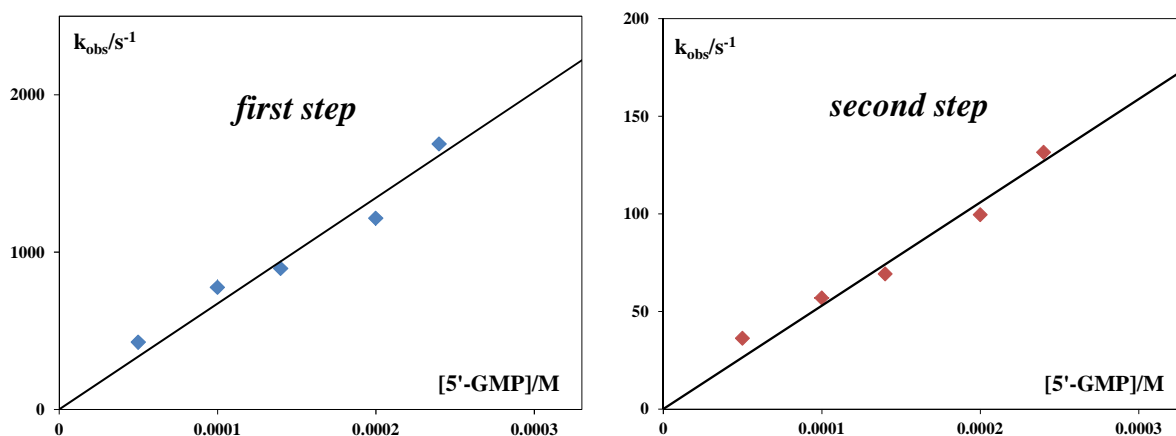
**Табела 12.** Константе брзина реакција супституције нових комплекса бакра(II) са 5'-GMP на  $\text{pH} = 7,2$  (25 mM *Hepes* пуфер) на 310 K

	5'-GMP	
	Први корак $k_2[\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	Други корак $k_2[\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$
Комплекс 1	$(6,7 \pm 0,2) 10^6$	$(5,2 \pm 0,1) 10^5$
Комплекс 2	$(3,1 \pm 0,1) 10^6$	$(2,3 \pm 0,1) 10^5$

На Сликама 23а и 23б је приказана зависност  $k_{\text{obs}}$  у односу на концентрацију нуклеофила за комплекс С1 и С2.



Слика 23а. Константе брзине реакције *псеудо*-првог реда у функцији концентрације нуклеофила за први и други корак реакција супституције комплекса C1 са 5'-GMP на  $pH = 7,2$  и 310 K у 25 mM *Нерес* пуфер

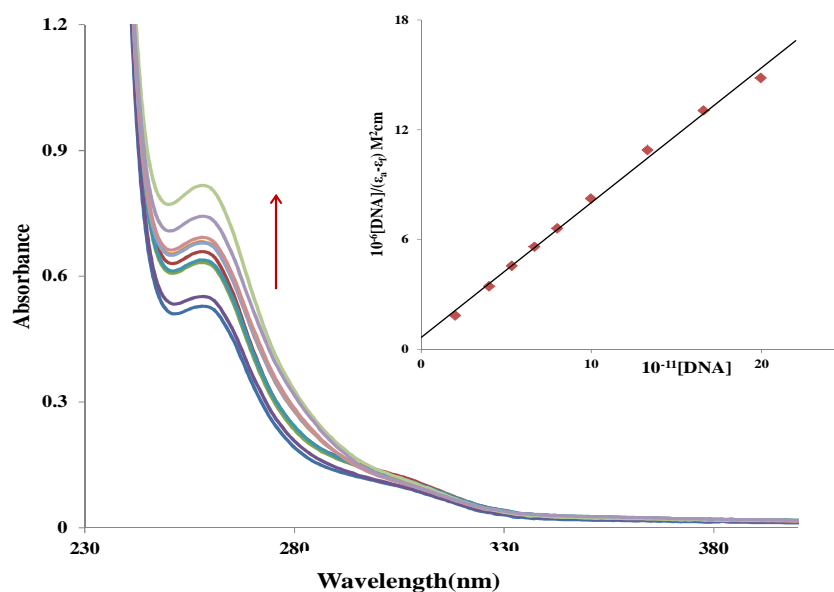


Слика 23б. Константе брзине реакције *псеудо*-првог реда у функцији концентрације нуклеофила за први и други корак реакција супституције комплекса C2 са 5'-GMP на  $pH = 7,2$  и 310 K у 25 mM *Нерес* пуфер



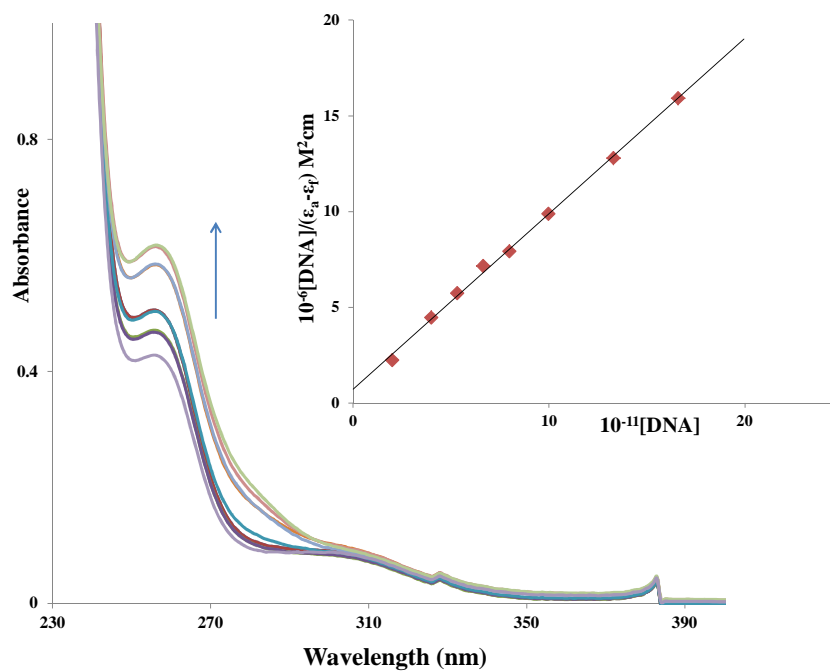
#### 4.2.2. Интеракције испитиваних комплекса бакра(II) са ДНК

Интеракције комплекса **C1** и **C2** са СТ-ДНК су испитане применом UV-Vis титрације. Спектри UV-Vis титрације за бинуклеарне комплексе бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине су приказани на Сликама 24а и 24б.



\* Стрелица показује хиперхромизам у спектралном опсегу

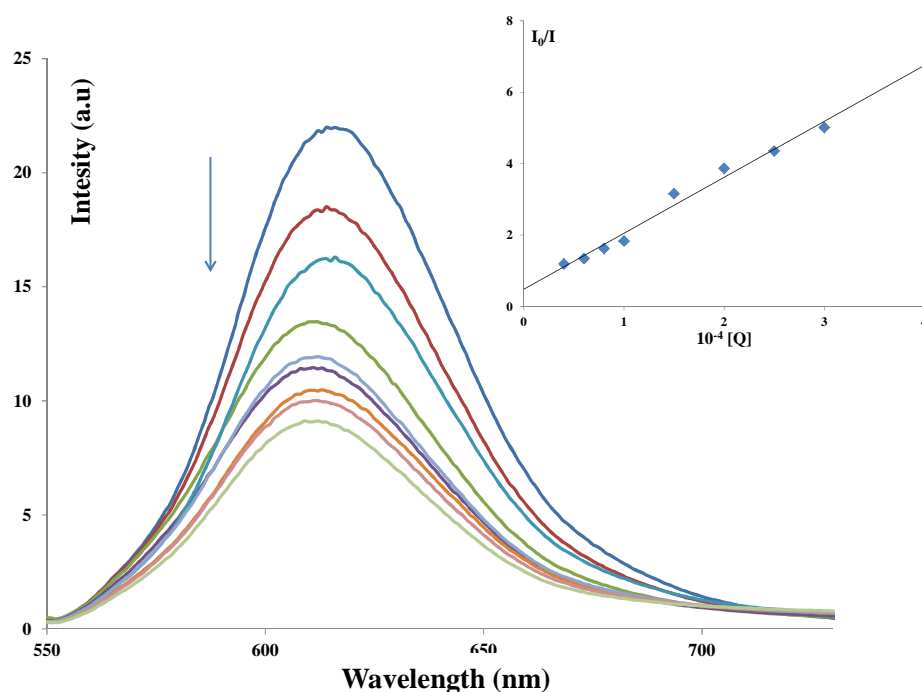
**Слика 24а.** Спектар UV-Vis титрације за комплекс **C1** ( $10 \mu\text{M}$ ) у PBS пуферу са утицајем повећања концентрације СТ-ДНК ( $0\text{-}15 \mu\text{M}$ ). \* Уз додатак график зависности  $[\text{ДНК}]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$  у функцији  $[\text{ДНК}]$ .



\* Стрелица показује хиперхромизам у спектралном опсегу

**Слика 246.** Спектар UV-Vis титрације за комплекс **C2** ( $10 \mu\text{M}$ ) у PBS пуферу са утицајем повећања концентрације СТ-ДНК ( $0\text{-}15 \mu\text{M}$ ). \* График зависности  $[\text{ДНК}]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$  у функцији  $[\text{ДНК}]$ .

Спектар флуоресцентне титрације за комплекс **C1** је представљен на Слици 25. Константа гашења за комплекс **C1** израчуната је коришћењем Стерн-Волмерове (Stern-Volmer) једначине што је приложено уз приказ спектра за поменути комплекс.



\* Стрелица показује промене интензитета флуоресценције након повећања концентрације комплекса **C1** (4-30  $\mu\text{M}$ ).

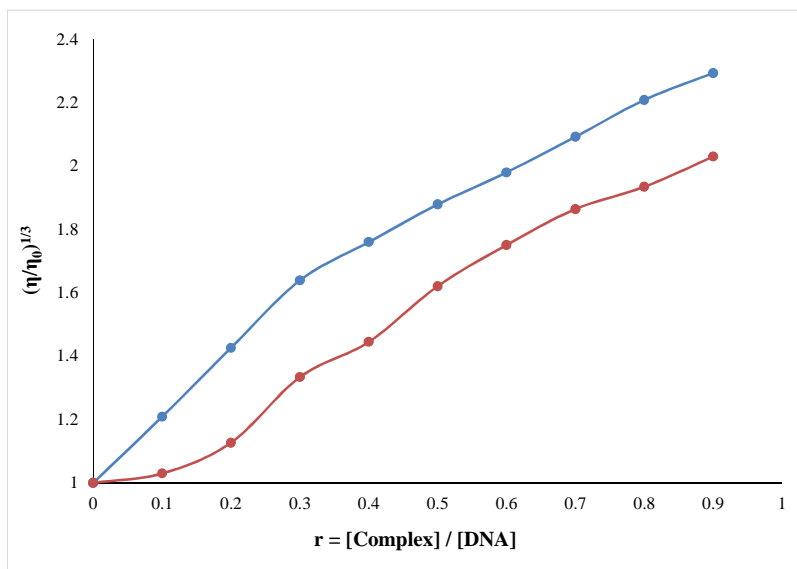
**Слика 25.** Спектар флуоресцентне титрације ЕБ (10  $\mu\text{M}$ ) везаног за ДНК (10  $\mu\text{M}$ ) у присуству различитих количина комплекса **C1**. \* Уз приказ је представљен Стерн-Волмеров график за флуоресцентну титрацију ЕБ-ДНК са комплексом **C1**.

Према константама приказаним у Табели 13, може се приметити да комплекси бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине снажно интерагују са СТ-ДНК, што је у сагласности са UV-Vis спектроскопским студијама.

**Табела 13.** Добијене константе за интеракцију између комплексних **C1** и **C2** са СТ-ДНК.

	СТ-ДНК	
	$K_b$ [ $\text{M}^{-1}$ ]	$K_{sv}$ [ $\text{M}^{-1}$ ]
Комплекс <b>1</b>	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^5$
Комплекс <b>2</b>	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^5$

У циљу даље карактеризације везивања испитиваних комплекса за ДНК, мерен је вискозитет раствора ДНК у присуству растућих количина комплекса **C1** и **C2** (Слика 26).



**Плава** линија представља комплекс **C1**, **црвена** линија представља комплекс **C2**.

**Слика 26.** Релативна вискозност  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  СТ-ДНК (0,01 mM) у пуферском раствору (Фосфатни пуферски систем = 0,01 M,  $C_{NaCl} = 0,137$ ,  $C_{KCl} = 0,0027$  M, pH = 7,4) у присуству комплекса **C1** and **C2** у растућим количинама ( $r$ ).

#### 4.2.3. *In vitro* антимикуробна активност

Резултати испивања *in vitro* антимикуробних активности за слободне лиганде и одговарајуће бакар(II) комплексе су приказани у Табели 14. Због прегледности резултата МИК и ММК вредности за доксициклин, флуконазол и кетоконазол, наведене су у Табели 15. Сва испитивана једињења показују умерене и селективне антимикуробне активности. Вредности МИК и ММК за новосинтетисане комплексе биле су у распону од 31,25 до > 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Најбољи резултати су и даље нижи од вредности за позитивне контроле.

**Табела 14.** *In vitro* антимикробна активност бидентатних лиганада S-алкенил деривата тиосалицилне киселине (L1 и L2) и одговарајућих бинуклеарних бакар(II)-комплекса (C1 и C2)

Испитиване врсте микроорганизама	L1		C1		L2		C2	
	МИК <sup>a</sup>	ММК <sup>b</sup>	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	250	500	31,25	500	1000	1000	500	500
<i>Lactobacillus plantarum</i>	500	1000	500	500	1000	1000	500	500
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	500	1000	500	1000	500	1000	500	500
<i>Bacillus cereus</i>	62,5	250	1000	1000	62,5	250	1000	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	1000	> 1000	1000	1000	> 1000	> 1000	1000	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 12453	> 1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000	> 1000	500	500
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	1000	> 1000	1000	> 1000	1000	> 1000	1000	> 1000
<i>Salmonella enteric</i>	500	1000	1000	1000	250	1000	1000	> 1000
<i>Saccharomyces boulardii</i>	500	1000	500	1000	1000	> 1000	500	1000
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231	1000	> 1000	1000	1000	1000	> 1000	500	500
<i>Penicillium chrysogenum</i>	250	1000	500	> 1000	500	> 1000	250	1000
<i>Penicillium italicum</i>	1000	1000	250	> 1000	500	> 1000	250	> 1000
<i>Penicillium expansum</i>	1000	1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC® 13233	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500	1000
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC® 9170	1000	1000	500	1000	1000	1000	500	1000
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC® 204305	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<i>Aspergillus niger</i> ATCC® 16404	> 1000	> 1000	500	1000	> 1000	> 1000	500	1000

<sup>a</sup> МИК вредности (µg/mL) – минимална инхибиторна концентрација

<sup>b</sup> ММК вредности (µg/mL) – минимална микробицидна концентрација

**Табела 15.** *In vitro* антимикробна активност позитивних контрола (доксциклин за бактерије; флуконазол и кетоконазол за гљивице)

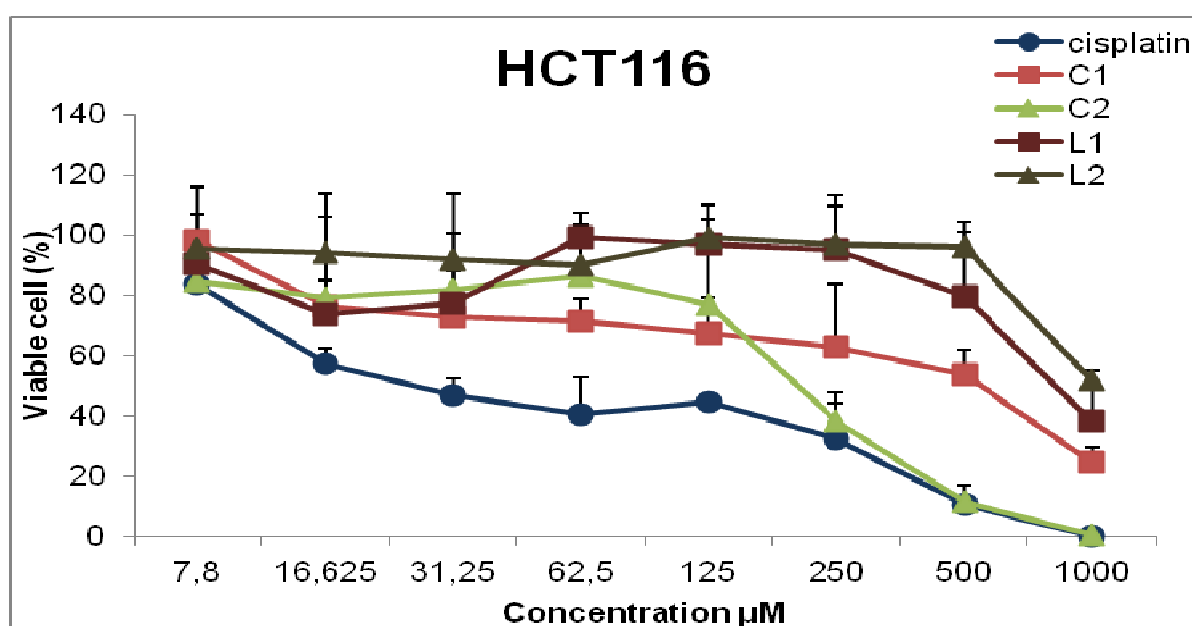
Испитиване врсте микроорганизама	Доксициклин		Флуконазол		Кетоконазол	
	МИК <sup>а</sup>	ММК <sup>б</sup>	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	31,25	62,50	/	/	/	/
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,45	7,81	/	/	/	/
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	1,95	15,63	/	/	/	/
<i>Bacillus cereus</i>	0,98	7,81	/	/	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	0,22	3,75	/	/	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	62,5	125	/	/	/	/
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 12453	15,63	62,5	/	/	/	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	15,63	31,25	/	/	/	/
<i>Salmonella enteric</i>	15,63	31,25	/	/	/	/
<i>Saccharomyces boulardii</i>	/	/	31,25	1000	/	/
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231	/	/	31,25	1000	31,25	/
<i>Penicillium chrysogenum</i>	/	/	62,5	500	62,5	/
<i>Penicillium italicum</i>	/	/	1000	1000	125	/
<i>Penicillium expansum</i>	/	/	/	/	62,5	/
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC® 13233	/	/	/	/	62,5	/
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC® 9170	/	/	62,50	125	125	/
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC® 204305	/	/	/	/	125	/
<i>Aspergillus niger</i> ATCC® 16404	/	/	62,5	62,5	62,5	/

<sup>а</sup> МИК вредности (µg/mL) – минимална инхибиторна концентрација

<sup>б</sup> ММК вредности (µg/mL) – минимална микробицидна концентрација; ”/“ – није тестирано.

#### 4.2.4. *In vitro* антитуморска активност

Испитивање *in vitro* антитуморске активности новосинтетисаних једињења (S-алкенил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бинуклеарних комплекса бакар(II)) је спроведено на хуманим ћелијама карцинома колона НСТ-116. Цитотоксична активност бидентатних лиганата и њихови одговарајући бакар(II)-комплекси на поменутој ћелијској линији након 24 часа представљена је на Слици 27.



\* Свака тачка представља средњу вредност и стандардну девијацију три експеримента са три понављања по дози.

Слика 27. Репрезентативни график преживљавања ћелија НСТ-116 након 24 часа раста ћелија у присуству одговарајућих комплекса бакра(II) и лиганд прекурсора\*

## **5. ДИСКУСИЈА**



После глобалног успеха клиничке примене *цисплатине* (*cis*-диамминдихлоридоплатина(II)-комплекс) у хемотерапији рака, настављено је са истраживањем и откривањем нових комплексних једињења са различитим јонима прелазних метала као новим антитуморским агенсима [12-17]. То је првенствено условио неповољан фармаколошки профил *цисплатине* (неселективно дејство, широк спектар нежељених ефеката, појава резистенције итд.). Истраживања у овој области усмерена су ка испитивању биолошки активних супстанци које се неће ковалентно везивати за ДНК ланац, већ ће показати способност остваривања нековалентне везе [12-14,16,17].

Интересовања све већег броја истраживачких група је фокусирано на комплексе бакра(II), што је подстакнуто присуством овог метала у металопротеина и металоензима [18,19], као и због антимикубног, антиинфламаторног и цитотоксичног потенцијала његових једињења [12-14,16,20]. Лиганди карбоксилатног типа су занимљиви за истраживања, јер карбоксилна група показује мноштво различитих начина координовања од којих су неки још неидентификовани [21]. То условљава формирање различитих врста структура комплекса бакра(II) у присуству органских лиганата [19,21, 22]. Лиганди са тиолном групом као што су тиосалицилна киселина и њени деривати су у фокусу испитивања јер се могу координовати са мноштвом јона прелазни метала [23-25]. Такође, као ефикасни лиганди за координовање се могу користити тиотри тиосалицилне киселине [26-28], што је случај и са нашим истраживањем.

## 5.1. Синтезе и хемијска карактеризација

Задатак ове Докторске дисертације је првенствено био да се синтетишу S-алкенил деривати тиосалицилне киселине (алкенил = пропенил-(L1), и изобутенил-(L2)) као бидентатни лиганди и одговарајући бинуклеарни комплекси бакар(II) (C1 и C2). Састав новосинтетисаних једињења је утврђен на основу резултата елементалне миклоанализе за угљеник, водоник и сумпор. Експериментално нађене вредности процентуалне заступљености угљеника, водоника и сумпора су у сагласности са израчунатим вредностима.

Инфрацрвени спектри су нам пружили вредне информације о начину координовања слободних S-алкенил деривата тиосалицилне киселине за централни јон метални у одговарајућим бакар(II)-комплексима. Асиметричне валенционе вибрације карбоксилне групе су првенствено коришћене у сврху утврђивања да ли се координација одвијала посредством депротоноване карбоксилне групе (апсорпционе траке су лоциране у области  $1600-1650\text{ cm}^{-1}$ ) или је изостала координација преко ове групе са централним јоном метала (у том случају се апсорпционе траке налазе у области  $1700-1750\text{ cm}^{-1}$ ) [29-31]. Снимљени спектри комплекса C1 и C2 су показали да је извршено координовање доносних атома карбоксилне групе лиганата за бакар(II)-јон. То потврђују апсорпционе траке лиганата у области на око  $1676-1680\text{ cm}^{-1}$  које потичу од асиметричних валенционих вибрација карбоксилних група, а њихово померање у област ниже фреквенције указује на настајње комплекса. Наиме, изоловани  $[\text{Cu}_2(\text{S-alkenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  комплекси су показали двоструке оштре и јаке асиметричне валенционе вибрације од карбоксилних група S-алкенил деривата тиосалицилне киселине координованих за централни јон метала на око  $1548-1615\text{ cm}^{-1}$ . То се може објаснити донацијом електрона од кисеоника у празне d-орбитале бакар(II)-јона. Запажене двоструке апсорпционе траке комплекса указују на малу разлику у координовању карбоксилних група лиганата за бакар(II)-јон. Присуство по две апсорпционе траке за карбоксилатни анион у инфрацрвеним спектрима комплекса указује на мале разлике у енергијама, које су последица присутних великих алкенил група као и њихов стерни утицај на фенил групе из тиосалицилне киселине. За апсорпционе траке -S-R није примећено значајно померање након координовања

лиганада за централни јон метала што је потенцијално указивало да сумпор није био донор атом приликом координовања.

Такође, јаке, оштре појединачне траке симетричне валенционе вибрације координованих карбоксилних група S-алкенил деривата тиосалицилне киселине су биле у очекиваној области (око  $1400\text{ cm}^{-1}$ ).

У спектрима комплекса се могу јавити додатне траке у области  $\approx 3400\text{ cm}^{-1}$ , заједно са тракама на  $\approx 890\text{ cm}^{-1}$  што означава присуство координоване воде. Утицај природе метал-лиганд везе најбоље потврђују новоформиране траке на  $\approx 400\text{ cm}^{-1}$ , које указују на  $\nu(\text{Cu-O})$  [32].

$^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR спектри су допринели да се са још већом сигурношћу уверимо у структуру S-алкенил деривата тиосалицилне киселине. Хемијска померања за угљеникове и водоникове атоме у молекулима нису одступала од резултата сродних студија [26,27], па смо, на основу претходно објављених резултата структурно сличних лиганада, претпоставили да су S-алкенил деривати тиосалицилне киселине координовани за централни јон метала и да су при томе настали бинуклеарни комплекси.

На  $^1\text{H}$  NMR спектрима оба лиганда су уочени мултиплитети сигнала који одговарају ароматичној области, што је приписано водониковим атомима из бензеновог прстена. Хемијска померања водоникових атома везаних за угљеникове атоме у алкенил остацима лиганада показују да се сигнали од протона у суседству атома угљеника са протонима на двоструким везама ( $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ ) налазе на вишим вредностима него они који у суседству имају  $sp^3$ -хибридизовне угљеникове атоме са протонима ( $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-$ ). То се може објаснити повећаном електронегативношћу угљеникових атома за шта је одговорно смањење удела s-орбитале у њиховим хибридованим орбиталама, што даље условљава да сваки пик који потиче од протона везаних за такве угљеникове атоме буде значајно померен ка вишим вредностима хемијског померања.

Број пикова у  $^{13}\text{C}$  NMR спектрима лиганада назначавала колико има неевалентних угљеникових атома у једињењу. Сигнали од угљеникових атома из алкенил остатака се налазе у различитим областима нижег поља. Они који су везани за атом сумпора су у области значајно нижих вредности, а они сигнали у областима нешто виших вредности су приписани угљеницима на двострукој вези. Хемијска померања

угљеникових атома из ароматичног језгра су примећена на  $\approx 130$  ppm, док у области вишег поља налазе сигнали од угљеникових атома из карбоксилних група лигананда.

На основу података из инфрацрвених и нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра није било могуће добити потпуни увид у структуру новосинтетисаних бакар(II)-комплекса са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине. Поузданије сагледавање структуре су омогућили резултати рендгенске структурне анализе.

У већини случајева бинуклеарни бакар(II) карбоксилатни комплекси имају општу хемијску формулу  $[\text{Cu}_2(\text{COOR})_4\text{L}_2]$  са типичном неутралном “paddle-wheel” структуром у којој сваки од четири карбоксилатна лигананда у екваторијлној равни је повезан са оба бакар(II)-јона. Сваки од атом бакра може да оствари координативно-ковалентне везе са по једним монодентатним лигандом у аксијалној позицији. Често се као лиганд у аксијалној позицији налази молекул растварача: ацетон, етанол, пиридин, тетраhydroфуран (THF), метил-цијанид ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), диметиламин (DMA) [33,34] или вода [22,35]. Кристално паковање се састоји од низа димерних јединица које су међусобно повезане slabим међумолекулским интеракцијама као што је водонична веза [36]. Тако добро дефинисани димерни комплекси се обимно истражују, посебно њихове магнетне особине и електрохемијско понашање у растворима [37,38].

На основу вредности моларне проводљивости, у диметилсулфоксиду као растварачу, синтетисане комплексе бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине можемо сврстати у неелектролите [39-43]. Врло мала проводљивост указује да су добијени комплекси неутрални [44,45]. Резултати магнетних мерења са вредностима  $\approx 1,90 \mu_B$  за бакра(II)-комплексе такође могу сугерисати на могуће заузимње искривљене октаедрске геометрије око централног јона метала [45,46]. Ове субнормалне вредности магнетног момента синтетисаних комплекса иду у прилог бинуклеарној структури комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине [45]. Бинуклеарни комплекси су стабилни у димерној форми [27,28]. Ниске вредности магнетних момента ( $\mu_{\text{eff}}$ ) такође указују на антиферромагнетичну интеракцију између два јона метала што је типично за бинуклеарне комплексе бакра(II) опште формуле:  $[\text{Cu}(\text{R-COO})_2\text{L}]_2$  [36,47,48]. Кључни фактор који одређује величину те интеракције, у димерним комплексима бакра(II) са лигандима карбоксилатног типа, је електронска структура мостног  $\text{COO}^-$  остатка [47-51].

Дужина алкил остатка у лиганду, као и јачина метал-лиганд везе су од изузетног значаја приликом одређивања својстава и примене комплексних једињења прелазних метала. Кристална структура и њено паковање су у функцији оба горе поменути утицаја. Показано је да лиганди карбоксилатног типа, који имају халогене елементе на  $\alpha$ -положају су сиромашни електронима (нпр. трифлуороацетатни анјон) и да имају тенденцију да фаворизују стварање мономерних облика бакар(II) карбоксилатних комплекса због слабије Cu-O везе. Насупрот тога, повећање релативне базности карбоксилатног остатка доводи до продужења Cu-Cu везе у бинуклеарним комплексима. Дужи алкил ланци утичу на додатну стабилизацију бинуклеарних и полинуклеарних комплекса током њихове синтезе, па се самим тим могу очекивати промене у кристалним структурама са джим ланцем алкил карбоксилата [38].

Рендгенском структурном анализом комплекса је показано да  $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$  (C2) комплекс кристалише у моноклиничној  $P2_1/n$  просторној групи. Монокристална структура комплекса састоји се од центросиметричних, динуклеарних комплексних молекула у којима су два бакар(II)-јона повезана са четири лиганда S-изобутенил деривата тиосалицилне киселине формирајући на тај начин „paddle-wheel“ тип структуре.

Сваки бакар(II) централни јон метала се налази у искривљеном квадратно-пирамидалном окружењу насталом од стране атома карбоксилатног кисеоника из лиганда у основној равни, и кисеониковог атома из DMSO молекула у аксијалној позицији. Бакар(II)-јон је измештен из равни квадратне основе према аксијалном кисеониковом атому за  $0,205(1) \text{ \AA}$ .

У нашем истраживању растојање Cu...Cu је  $2,6430(7) \text{ \AA}$ . То је незнатно дуже у односу на вредност дужине везе од  $2,614 \text{ \AA}$  која је нађена у димерном бакру(II)-ацетату [52], али је блиско упоредива с оним вредностима које су нађене у полиморфном комплексу  $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$ , који је показао вредности од  $2,6407(4) \text{ \AA}$  у полиморфу I и  $2,6398(9) \text{ \AA}$  у полиморфу II [53].

Дужине координатних веза у комплексу бакра(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине су у оквиру вредности које су нађене у комплексу са S-пропил дериватом као лигандом (од  $1,957(4)$  до  $1,982(4) \text{ \AA}$ ), као и оних које су измерене у еквивалентном комплексу бакра(II) са несупституисаним бензоатним лигандом (од

1,948 до 1,985 Å) [54]. У комплексу **C2**, лиганди А и Б показују значајне конформационе разлике. У истраживању Iqbal и сарадника је потврђено да структура комплекса може у мањој мери да зависи и од електронских својстава групе која се налази у *para* положају на фенилном прстену у односу на карбоксилну групу [38]. Стога, не чуде конформационе разлике у структури **C2** комплекса у нашем раду које су вероватно условљене стерним фактором волуминозне групе у *ortho* положају према карбоксилној групи.

Прва конформациона разлика се огледа у томе да су фенилни прстенови нађени у различитим ротацијама око формално једноструке C1-C2 везе, па диедарски углови између средњих равни фенилних прстенова C2/C7 и карбоксилних група износе 28,0(3)° у лигандима А и 52,1(2)° у лигандима Б. Максимални диедарски угао од 57,3° за комплексе овог типа примећен је у S-пропил деривату тиосалицилне киселине [53], док су у комплексу са бензоатним лигандима [54] одговарајући диедарски углови у распону од 7,9 до 22,4°. Друга конформациона разлика између два различита лиганда у молекулу **C2** комплекса се односи на S-изобутенил супституент, који у лиганду А заузима издужени облик са торзионим углом C3a-S1a-C8a-C9a од -174,4(3)°. У лиганду Б, веће извртање посматрано за фенил прстен је праћено изричитим преклапањем S-изобутенил супституента, што резултује торзионим углом C3b-S1b-C8b-C9b од -54,3(5)°. То преклапање S-изобутенилног дела у лиганду Б има важну улогу у распоређивању гломазног S-изобутенилног супституента поред S-диметилне групе аксијалних лиганда.

## **5.2. Супституционе реакције комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине са 5'-GMP и њихова интеракција са ДНК**

Након утврђивања стварне структуре комплекса, приступало се испитивању биолошких активности комплекса бакар(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине. Изучавање интеракција бакар(II)-комплекса са нуклеобазама је од изузетне важности јер је ДНК примарна мета антитуморских комплекса од којих је први цисплатина. Испитивања су показала претежно формирање монофункционалних

производа преко N7 азотовог атома гуанина при чему настају 1,2- или 1,3- интра/интерланчани адукти [55-57].

Реакције супституције код оба комплекса су се одвијале у два узастопна корака, која су зависна од концентрације нуклеофила. Као што се и очекивало, реакције супституције ових комплекса биле су веома брзе. Комплекс **C2** је показао већу реактивност према 5'-GMP од комплекса **C1**. Пошто се ови комплекси разликују само по **S**-алкенил групи, разлика у реактивности се може приписати јачем индуктивном ефекту изобутенил гупе у поређењу са пропенил групом. За оба комплекса, други корак супституције се одвија значајно спорије од првог корака.

Велика способност везивања бакар(II)-комплекса за ДНК се може приписати њиховој биокомпатибилности, великом афинитету према нуклеобазама и поседовању биолошки погодних редокс-потенцијала. Они могу „препознати“ одређене секвенце ДНК молекула, везати се за њих и следствено довести до промене у њиховом функционисању [58].

Константе везивања испитиваних комплекса за ДНК су упоредиве са онима које су нађене за неке бинуклеарне метал(II) комплексе [59,60]. Ове вредности су веома карактеристичне за једињења на бази метала која се везују за ДНК интеркалацијом.

Интеракције комплекса **C1** и **C2** са СТ-ДНК су испитиване применом UV-Vis титрације одређивањем интринзичких константи везивања ( $K_b$ ). Апсорпционе титрације комплекса су спроведене на собној температури при чему је коришћена фиксна концентрација комплекса (10  $\mu$ M) у PBS пуферу, а мењане су количине СТ-ДНК (0-15  $\mu$ M) [61,62]. Додавање СТ-ДНК у раствор било ког од испитиваних комплекса бакра(II) довело је до значајног хиперхромичног ефекта са појавом нове апсорпционе траке на 258 nm, али са безначајним променама апсорбције у опсегу 300-500 nm. Наведене опсервације сугеришу на снажну интеракцију између новосинтетисаних комплекса бакра(II) и СТ-ДНК преко спољашњих контаката, претпостављајући да се ради о водоничним везама и електростатичким интеракцијама [63,64]. Висока везивна природа комплекса метала може бити узрокована додатном  $\pi$ - $\pi^*$  интеракцијом посредством ароматичних фенил прстенова [65].

Интеракције комплекса **C1** и **C2** са СТ-ДНК су такође испитиване студијом измене са етидијум-бромидом (ЕБ). ЕБ флуоресцира слабо у слободном раствору (без

СТ-ДНК) [63,64], али у присуству СТ-ДНК је примећена јака емисија на  $\sim 600$  nm због интеркалације ЕБ између парова база ДНК. Додавање комплекса **C1** или **C2** у СТ-ДНК-ЕБ комплекс довело је до значајног гашења у интензитету флуоресценције, услед измене ЕБ [66,67]. Гашење флуоресценције је корисна метода за праћење молекуларних интеракција у хемијским и биолошким системима због своје високе осетљивости. Константе гашења за комплексе **C1** и **C2** су израчунате коришћењем Стерн-Волмерове (Stern-Volmer) једначине. Високе вредности  $K_{sv}$  за испитиване комплексе откривају интеркалативно везивање комплекса са СТ-ДНК [65]. Хидрофобна својства ових комплекса, који садрже S-алкенил остатаке везане за фенилни прстен, олакшавају везивање за ДНК.

Квантитативне студије измене са ЕБ су спроведене уз промену концентрације комплекса и праћење интензитета емисије ЕБ-ДНК [61,62]. Растућа концентрација комплекса **C1** или **C2** (0-30  $\mu$ M) резултирала је значајним смањењем интензитета флуоресценције, са приметним црвеним померањем. Стога се намеће закључак да су оба комплекса **C1** и **C2** способна да истисну молекул ЕБ из комплекса ЕБ-ДНК и па могу снажно интераговати са местима везивања за ДНК [68-70].

Према константама може се приметити да комплекси бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине снажно интерагују са СТ-ДНК, што је у сагласности са UV-Vis спектроскопским студијама.

Како би се даље окарактерисало везивање ових комплекса за ДНК, мерен је вискозитет раствора ДНК у присуству и одсуству комплекса. Вискозитет раствора ДНК је осетљив на промене у дужини ланца, тако да се, у одсуству података о кристалној структури, ово сматра најбитнијим доказом у идентификацији начина везивања за ДНК у раствору [71,72]. Додавање растућих количина (до  $r = 1,0$ ) комплекса **C1** и **C2** у ДНК раствор (0,01 mM) довело је до повећања релативне вискозности ДНК, која је била изражена након додавања комплекса **C1**. У случају класичне интеркалације, једињење се умеће између базних парова ДНК, што доводи до повећања вискозности ДНК. Јачина интеракције је обично пропорционална са повећањем вискозности ДНК. Према томе, посматрано повећање вискозности за комплексе бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине представља још један индикатор интеркалативне интеракције са ДНК.



### 5.3. Испитивања *in vitro* антимикуробне активности комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине

Антимикуробна активност лиганата и одговарајућих бакар(II)-комплекса испитана је на одабраним сојевима бактерија и гљива. Антимикуробно дејство је тумачено на основу вредности МИК и ММК. Нови концепт побољшања бактерицидног ефекта бакар(II)-комплекса са новосинтетисаним лигандима је базиран на липофилности добијених једињења. Повећање липофилности се одражава на побољшан пролазак комплекса до циљаног места у бактеријској ћелији [73].

Главна мета комплекса бакра(II) за испољавање бактерицидног дејства је бактеријски хромозом, иако се не могу искључити ни други интрацелуларни циљеви као што су РНК или протеини. Познато је да су координална једињења бакра редокс активна и да могу посредовати у цепању ДНК [74]. На пример, комплекс бакра(II) са 1,10-фенантролинским лигандом је био прва синтетисана хемијска нуклеаза [75]. Ова нуклеазна активност зависи од присуства егзогенних супстанци као што су аскорбати, тиоли и пероксиди које су неопходне како би се произвеле активне врсте које су одговорне за цепање ДНК [76,77]. Нуклеазна активност је важан механизам за остваривање дејства бакар(II) једињења. Као што је већ поменуто, ова активност зависи од присуства редукционих средстава, што у већини бактерија чине тиоли мале молекулске масе. У већини Грам-негативних бактерија тај тиолни молекул је глутатион, док је у неким Грам-позитивним бактеријама (укључујући *S. aureus*) присутан бацитилиол (BSH или Cys-GlcN-mal) [78].

Такође је утврђено да на ћелијама сисара платина(II) једињења испољавају много јачи ефекат од једињења бакра(II) или пладијума(II), што указује на то да начин деловања комплекса у ћелијама сисара је различит од оног који остварује у бактеријским ћелијама [79].

Грађа ћелијског зида бактерија може бити препрека комплексима бакра(II) за остваривање жељеног бактерицидног ефекта. Тенденција растварања наших комплекса у неводеним растварачима, нам је указала на њихов липофилни карактер. То је важан фактор којим појашњавамо зашто је јача антимикуробна активност према Грам-

позитивним него Грам-негативним бактеријама. Липополисахариди лоцирани са спољашње стране ћелијског зида Грам-негативних бактерија су хидрофилног карактера па онемогућавају пролазак једињења са хидрофобним особинама, док у структури ћелијског зида Грам-позитивних бактерија је теихојинска киселина која може бити мета за везивање бакар(II)-комплекса, па отуда израженије дејство на те сојеве бактерија.

Уопштено сагледавајући, у нашем истраживању, активности комплекса су биле веће или сличне у поређењу са одговарајућим слободним лигандима. Изузетак, где су слободни лиганди дали веће активности, су бактерије *Bacillus cereus* (за **L1** и **L2**) и *Salmonella enterica* (за **L2**). Грам-позитивне бактерије показале су нешто већу осетљивост него Грам-негативне сојеве. Међу Грам-позитивним бактеријама, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 је показао највећу отпорност (МИК/ММК су 1000/>1000 µg/mL). Пробиотске бактерије су показале највећу осетљивост. Најосетљивији је био *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, са МИК вредношћу од 31,25 µg/mL за комплекс **C1**. Свеукупно, комплекси бакра(II) показали су ниске антифунгалне активности. Тестирана једињења су имала мало или готово занемарљиво дејство на раст квасца и других гљивица, при чему су вредности МИК и ММК биле од 250 до > 1000 µg/mL.

У претходно публикованим резултатима са структурно сличним комплексима бакра(II) са одговарајућим S-алкил дериватима тиосалицилне киселине (алкил = метил; етил; пропил; бутил; бензил) вршена су испитивања на Грам-позитивним и Грам-негативним бактеријама, као и на гљивицама [26, 53]. Активности комплекса биле су веће или сличне од активности одговарајућих слободних лиганда. Сви тестирани комплекси показали су умерену или селективну антибактеријску активност и ниску антифунгалну активност, што је у складу са резултатима нашег истраживања.

Досадашња истраживања антимикробних активности динуклеарних и мононуклеарних бакар(II) комплекса са карбоксилатним типом лиганда дала су различите закључке. Неки бинуклеарни бакар(II) карбоксилатни комплекси не показују антибактеријску активност [80]. Недостатак специфичности сугерише да сензитивност различитих микроорганизама према комплексима није повезана само са различитим структурама ћелијских зидова [80]. Међутим, постоје и студије које показују добре антимикробне активности бакар(II) комплекса, укључујући активности које су боље и

од стандардних лекова [73,81-83]. Други бакар(II) карбоксилатни комплекси пак показују умерену антибактеријску активност [81-88], што је у складу са нашим ранијим истраживањем [26]. У већини студија, као и у овом случају, примећена је слаба антимикотична активност [81,85,86].

#### **5.4. Испитивања *in vitro* антитуморске активности комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине**

Хемијске карактеристике прелазних метала пружају могућност развоја нових антитуморских лекова са различитим механизмом деловања, тако да комплекси који садрже бакар или неке друге метале представљају нову генерацију алтернативних антитуморских агенаса. Casiopeínas® су мешавина више различитих хелатних комплекса бакра(II) који су дизајнирани тако да остваре слично дејство као цисплатина. Показано је да ова једињења испољавају неколико пута јачу цитотоксичну активност на ћелијама карцинома грлића материце од цисплатине [89]. Различити комплекси бакра(II) су такође цитотоксични према другим врстама ћелија карцинома код човека. Тернарни комплекс бакра(II) амино-кумарина са фенантролином инхибира раст РС3 хумане ћелије карцинома просте и HL-60 хумане ћелије мијелоидне леукемије [90]. Бензен-1,2-дитиол модификовани, на бази цисплатине, бакар(II) и цинк(II)-комплекси су показали широк спектар цитотоксичне активност према следећим ћелијским линијама хуманих карцинома укључујући: HeLa (хумани рак грлића материце), Hep2 (хумани канцер ларингеалног епитела), HepG2 (хумани рак јетре) и MCF-7 (хумане ћелије карцинома дојке) [91]. Третманом са 10-деацетилбакатин тиосемикарбазоном заустављен је раст само вијабилних MCF-7 ћелија карцинома дојке, док је додавање бакра у исто једињење довело до значајне ћелијске смртности [92].

У новије време, студије које се баве испитивањем цитотоксичне активношти бакра(II)-комплекса показале су да се механизам деловања заснива на интеркалацији у ДНК ланца и њеном цепању [93,94] или тако што индукују апоптотске сигналне механизме [95,96]. Frías González и сарадници су доказали да (μ<sub>4</sub>-оксо)тетра-μ<sub>4</sub>-ацетат{4-хидрокси-3,5-bis(морфолинометил)}тетра бакар(II)-комплекс има цитотоксичну активност на СеСа ћелијским линијама, са селективношћу за HeLa и

CaSki ћелије, док је примећено да испољава ниску цитотоксичност према нормалним фибробластима [97].

Један од важнијих фактора у процесу развоја нових хемиотерапеутских агенаса, који одређује даљу судбину неког једињења, у преклиничким и клиничким испитивањима је селективна токсичност. Познато је да је појава нежељених токсичних ефекта уско повезана са неселективним дејством антитуморских агенаса на здрава ткива. Антиканцерогени потенцијал једињења у нашем истраживању је упоређен са активношћу хемиотерапеутика на бази платине - цисплатином.

У нашој студији, МТТ тест за виабилност ћелија је показао да два новосинтетисана бидентатна лиганда и њихови одговарајући бакар(II)-комплекси након 24 часа показују цитотоксичну активност на ћелијама карцинома колона човека НСТ-116. Цитотоксични ефекат комплекса бакра(II) био је виши у односу на цитотоксичност лиганда, нарочито у концентрацији од 31,25 до 250  $\mu\text{M}$ . Комплекси бакра(II) су такође показали нешто нижу цитотоксичност у поређењу са цисплатином. Међутим, веће концентрације С2 (250-1000  $\mu\text{M}$ ) имале су готово једнаки цитотоксични ефекат на НСТ-116 ћелије као цисплатина.

И друге студије су пратиле *in vitro* антитуморску активност комплекса бакра(II) на хуманим ћелијама колоректалног карцинома колона [39,98,99]. Тако су комплекси бакра(II) са дериватима изатин тиокарбазона показали да је цитотоксична активност на ћелијама карцинома колона (НСТ-116) дозно-зависна са значајно ниским вредностима  $\text{IC}_{50}$  (0,08-8,6  $\mu\text{M}$ ). Утврђено је да је њихов ефекат јачи од 5-флуороурацила (7,3  $\mu\text{M}$ ). НСТ-116 ћелијска смрт се може приписати индукцији апоптозе, што доказују следеће апоптотске карактеристике као што су кондензовање језгра у облику полумесеца, истурења на мембрани и појава апоптотских тела у цитоплазми третираних ћелија. У студији која се бавила испитивањем преузимања и акумулције комплекса бакра(II) са бензимидазолским дериватима у НСТ-116 ћелијама је доказано да су густине бакра у језгру и митохондријама третираних НСТ-116 ћелија су биле 38,49 односно 3,03  $\mu\text{g/g}$  протеина, што је било више него у контролној групи ћелија (8,51  $\mu\text{g/g}$  протеина (језгро) односно 1,5  $\mu\text{g/g}$  протеина (митохондрије)). То сугерише да комплекси могу проћи кроз

мембрану ових ћелија и даље се акумулирати у језгрима и митохондријама, вршећи своје биолошке ефекте [100].

Позитивни резултати *in vitro* студија цитотоксичне активности сугеришу да комплекси бакра(II) имају потенцијал за примену као антитуморски лекови не-платинске групе [98]. Међутим, неопходно је даље истраживање механизма антитуморске активности ових комплекса [98,99].

## **6. ЗАКЉУЧАК**

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

**1. Нови комплекси бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине - синтеза и хемијска карактеризација:**

- Састав наглађених комплекса бакра(II) са S-алкенил деривата тиосалицилне киселине је потврђен на основу резултата елементалне микроанализе при чему је утврђено да су експериментално нађене вредности процентуалне заступљености за угљеник, водоник и сумпор у сагласности са израчунатим вредностима.
- Структура синтетисаних бидентатних лиганата претпостављена је на основу резултата инфрацрвене (IR) и нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR), док је структура одговарајућих комплекса претпостављена на основу резултата инфрацрвене (IR) спектроскопије, магнетних мерења и моларне проводљивости. Структура лиганата је потврђена и резултатима. Резултати побројаних мерења су потврдили да је са дошло до координовања бакар(II)-јона за донорске атоме у молекулу тиосалицилне киселине.
- Стварна структура синтетисаног комплекса бакра(II),  $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$  (C2), потврђена је на основу резултата рендгенске структурне анализе при чему се показало да су настали бинуклеарни комплекси где су два бакар(II)-јона повезана са четири лиганда S-изобутенил деривата тиосалицилне киселине

**2. Супституционе реакције комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине са 5'-GMP и њихова интеракција са ДНК:**

- Реакције супституције код оба комплекса су се одвијале у два узастопна корака, која су зависна од концентрације нуклеофила. Реакције супституције ових комплекса биле су веома брзе. Комплекс

$[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C2) је показао већу реактивност према 5'-GMP од комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C1).

- Високе вредности  $K_{sv}$  за испитиване комплексе указују на интеркалативно везивање комплекса са СТ-ДНК.
- Квантитативне студије измене са ЕБ су показале да растућа концентрација комплекса  $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C1) или  $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (C2) (0-30  $\mu\text{M}$ ) резултирала је значајним смањењем интензитета флуоресценције, што указује да су оба комплекса способна да истисну молекул ЕБ из комплекса ЕБ-ДНК, па се могу везати за одређена места у оквиру ДНК молекула.

### 3. Испитивања *in vitro* антимикробне активности комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине:

- Активности комплекса су биле веће или сличне у поређењу са одговарајућим слободним лигандима. Изузетак, где су слободни лиганди показали већу активност, су бактерије *Bacillus cereus* ((S-propenyl-thiosal) (L1) и (S-isobutenyl-thiosal) (L2)) и *Salmonella enterica* (за (S-isobutenyl-thiosal) (L2)).
- Грам-позитивне бактерије показале су нешто већу осетљивост него Грам-негативни сојеви. Међу Грам-позитивним бактеријама, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 је показао највећу отпорност. Пробиотичке бактерије су показале највећу осетљивост. Најосетљивији је био *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*. Комплекси бакра(II) показали су ниске антифунгалне активности.

### 4. Испитивања *in vitro* антитуморске активности комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине:

- Два новосинтетисана бидентатна лиганда и одговарајући бинуклеарни бакар(II)-комплекси након 24 часа показују цитотоксичну активност на



хуманим ћелијама карцинома колоне НСТ-116. Цитотоксични ефекат комплекса бакра(II) био је виши у односу на цитотоксичност лигананда.

- Комплекси бакра(II) су такође показали нешто нижу цитотоксичност у поређењу са *цисплатином*. Међутим, у већим концентрацијама примећено је да комплекс  $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$  (**C2**) има готово једнак цитотоксични ефекат на НСТ-116 ћелије као *цисплатина*.

## **7. ЛИТЕРАТУРА**

1. Puig S, Thiele DJ. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol.* 2002; 6(2): 171-80.
2. Uriu-Adams JY, Keen CL. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med.* 2005; 26(4-5): 268-98.
3. Crisponi G, Nurchi VM, Fanni D, Gerosa C, Nemolato S, Faa G. Copper-related diseases: from chemistry to molecular pathology. *Coord Chem Rev.* 2010; 254(7-8): 876-89.
4. Weder JE, Dillon CT, Hambley TW et al. Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized. *Coord Chem Rev.* 2002. 232(1-2): 95-126.
5. Gielen M, Edward T. *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents.* Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2005.
6. 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.
7. Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Inactivation of influenza A virus on copper versus stainless steel surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2007. 73(8):2748-50.
8. Lebon F, Boggetto N, Ledecq M et al. Metal-organic compounds: a new approach for drug discovery: N1-(4-methyl-2-pyridyl)-2,3,6-trimethoxybenzamide copper(II) complex as an inhibitor of human immunodeficiency virus 1 protease. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63(10): 1863-73.
9. Brewer GJ. The risks of copper toxicity contributing to cognitive decline in the aging population and to Alzheimer's disease. *J Am Coll Nutr.* 2009; 28(3): 238-42.
10. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. *Copper. Biomed Pharmacother.* 2003.57(9): 386-98.
11. 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.
12. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2003;189(1-2):147-63.
13. Hedera P, Peltier A, Fink JK, Wilcock S, London Z, Brewer GJ. Myelopolyneuropathy and pancytopenia due to copper deficiency and high zinc levels of unknown origin II.

- The denture cream is a primary source of excessive zinc. *Neurotoxicology*. 2009;30(6):996-9.
14. Cecconi I, Scaloni A, Rastelli G, Moroni M, Vilardo PG, Costantino L, Cappiello M, Garland D, Carper D, Petrash JM, Del Corso A, Mura U. Oxidative modification of aldose reductase induced by copper ion. Definition of the metal-protein interaction mechanism. *J Biol Chem*. 2002;277(44):42017-27.
  15. Harris ZL, Klomp LW, Gitlin JD. Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr*. 1998;67(5 Suppl):S972-7.
  16. Miyajima H. Aceruloplasminemia, an iron metabolic disorder. *Neuropathology*. 2003;23(4):345-50.
  17. Brewer GJ. Copper in medicine. *Curr Opin Chem Biol*. 2003; 7(2): 207-12.
  18. Gitlin JD. Wilson Disease. *Gastroenterology*. 2003; 125(6):1868-77.
  19. Müller T, Langner C, Fuchsbichler A, Heinz-Erian P, Ellemunter H, Schlenck B et al. Immunohistochemical analysis of Mallory bodies in Wilsonian and non-Wilsonian hepatic copper toxicosis. *Hepatology*. 2004;39(4):963-9.
  20. Brewer GJ, Askari FK. Wilson's disease: clinical management and therapy. *J Hepatol*. 2005;42 Suppl(1):S13-21.
  21. 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.
  22. DiDonato M, Sarkar B. Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Feb 27;1360(1):3-16.
  23. Basun H, Forssell LG, Wetterberg L, Winblad B. Metals and trace elements in plasma and cerebrospinal fluid in normal aging and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*. 1991;3(4):231-58.
  24. Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Schneider JA, Wilson RS, Scherr PA. Dietary copper and high saturated and trans fat intakes associated with cognitive decline. *Arch Neurol*. 2006;63(8):1085-8.
  25. Haeffner F, Smith DG, Barnham KJ, Bush AI. Model studies of cholesterol and ascorbate oxidation by copper complexes: relevance to Alzheimer's disease beta-amyloid metallochemistry. *J Inorg Biochem*. 2005;99(12):2403-22.

26. Hureau C, Faller P. Abeta-mediated ROS production by Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochimie*. 2009;91(10):1212-7.
27. Cater MA, McInnes KT, Li QX, Volitakis I, La Fontaine S, Mercer JF, Bush AI. Intracellular copper deficiency increases amyloid-beta secretion by diverse mechanisms. *Biochem J*. 2008 May 15;412(1):141-52.
28. Lewis AJ. The role of copper in inflammatory disorders. *Agents and Actions*. 1984; 15(5-6): 513-19.
29. Soylak M, Kirnap M. Serum copper and zinc concentrations of patients with rheumatoid arthritis from Kayseri-Turkey. *Fresen environ bull*. 2001; 10(4):409-10.
30. Zoli A, Altomonte L, Caricchio R, Galossi A, Mirone L, Ruffini MP, Magaró M. Serum zinc and copper in active rheumatoid arthritis: correlation with interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha. *Clin Rheumatol*. 1998;17(5):378-82.
31. Louro MO, Cocho JA, Mera A, Tutor JC. Immunochemical and enzymatic study of ceruloplasmin in rheumatoid arthritis. *J Trace Elem Med Biol*. 2000;14(3):174-8.
32. Gupte A, Mumper RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev*. 2009;35(1):32-46.
33. Murphy B, Hathaway B. The stereochemistry of the copper(II) ion in the solid-state—some recent perspectives linking the Jahn-Teller effect, vibronic coupling, structure correlation analysis, structural pathways and comparative X-ray crystallography. *Coord Chem Rev* 2003;243:237-62.
34. Vivekananda KV, Dey S, Wadawale A, Bhuvanesh N, Jain VK. Supramolecular 3-/4-Mercaptobenzoic Acid Complexes of Palladium(II) and Platinum(II) Stabilized by Hydrogen Bonding. *Eur J Inorg Chem*. 2014; 12: 2153-61.
35. Vlassopoulos D, Wood SA, Mucci A. Gold speciation in natural waters: II. The importance of organic complexing—Experiments with some simple model ligands. *Geochim Cosmochim Acta*. 1990; 54(6): 1575-86.
36. Rowland CE, Cantos PM, Toby BH, Frisch M, Deschamps JR. Controlling Disulfide Bond Formation and Crystal Growth from 2-Mercaptobenzoic Acid. *Cahill Cryst Growth Des*. 2011; 11(4): 1370-74.
37. Murugavel R, Baheti K, Anantharaman G. Reactions of 2-Mercaptobenzoic Acid with Divalent Alkaline Earth Metal Ions: Synthesis, Spectral Studies, and Single-Crystal X-

- ray Structures of Calcium, Strontium, and Barium Complexes of 2,2'-Dithiobis(benzoic acid). *Inorg Chem.* 2001; 40(27):6870-78.
38. Wehr-Candler T, Henderson W. Coordination chemistry of the thiosalicylate ligand. *Coord Chem Rev.* 2016;313: 111-55.
39. Sun J, Chen Y, Li K, Huang Y, Fu X, Zhang X, Zhao W, Wei Y, Xu L, Zhang P, Venkataramanan R, Li S. A prodrug micellar carrier assembled from polymers with pendant farnesyl thiosalicylic acid moieties for improved delivery of paclitaxel. *Acta Biomater.* 2016;43:282-291.
40. Zhang X, Huang Y, Zhao W, Chen Y, Zhang P, Li J, Venkataramanan R, Li S. PEG-farnesyl thiosalicylic acid telodendrimer micelles as an improved formulation for targeted delivery of paclitaxel. *Mol Pharm.* 2014 Aug 4;11(8):2807-14.
41. Goldberg L, Ocherashvilli A, Daniels D, Last D, Cohen ZR, Tamar G, Kloog Y, Mardor Y. Salirasib (farnesyl thiosalicylic acid) for brain tumor treatment: a convection-enhanced drug delivery study in rats. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(11):3609-16.
42. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993;366:643- 54.
43. Walsh AB, Bar-Sagi D. Differential activation of the Rac pathway by Ha-Ras and K-Ras. *J Biol Chem*2001;276:15609-15.
44. Joneson T, White MA, Wigler MH, Bar Sagi D. Stimulation of membrane ruffling and MAP kinase activation by distinct effectors of RAS. *Science* 1996;271:810-2.
45. Goldberg L, Kloog Y. A Ras inhibitor tilts the balance between Rac and Rho and blocks phosphatidylinositol 3-kinase-dependent glioblastoma cell migration. *Cancer Res.* 2006;66:11709-17.
46. Downward J. Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:49-54.
47. Trümpler S, Meermann B, Nowak S, Buscher W, Karst U, Sperling M. In vitro study of thimerosal reactions in human whole blood and plasma surrogate samples. *J Trace Elem Med Biol.* 2014;28(2):125-30.
48. Minami T, Miyata E, Sakamoto Y, Kohama A, Yamazaki H, Ichida S. Expression of metallothionein mRNAs on mouse cerebellum microglia cells by thimerosal and its metabolites. *Toxicology.* 2009;261(1-2):25-32.

49. Makani S, Gollapudi S, Yel L, Chiplunkar S, Gupta S. Biochemical and molecular basis of thimerosal-induced apoptosis in T cells: a major role of mitochondrial pathway. *Genes Immun.* 2002;3(5):270-8.
50. Park EK, Mak SK, Kültz D, Hammock BD. Evaluation of cytotoxicity attributed to thimerosal on murine and human kidney cells. *J Toxicol Environ Health A.* 2007;70(24):2092-5.
51. Migdal C, Foggia L, Tailhardat M, Courtellemont P, Haftek M, Serres M. Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling. *Toxicology.* 2010;274(1-3):1-9.
52. Dórea JG. Exposure to mercury during the first six months via human milk and vaccines: modifying risk factors. *Am J Perinatol.* 2007a;24:387-400.
53. Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol* 2006;36:609-62.
54. Suneja T, Belsito DV. Thimerosal in the detection of clinically relevant allergic contact reactions. *J Am Acad Dermatol.* 2001 Jul;45(1):23-7.
55. Serrano G, Bonillo J, Aliaga A, Cuadra J, Pujol C, Pelufo C, Cervera P, Miranda MA. Piroxicam-induced photosensitivity and contact sensitivity to thiosalicylic acid. *J Am Acad Dermatol.* 1990;23(3 Pt 1):479-83.
56. Santucci B, Cannistraci C, Cristaudo A, Camera E, Picardo M. Thimerosal positivities: the role of organomercury alkyl compounds. *Contact Dermatitis.* 1998;38(6):325-8.
57. Goncalo M, Figueiredo A, Goncalo S. Hypersensitivity to thimerosal: the sensitizing moiety. *Contact Dermatitis.* 1996;34(3):201-3.
58. Sharghi H, Beni AS. One-pot synthesis of novel thioxanthone crown ethers. *ARKIVOC.* 2007;13:1-7.
59. Joshi A, Shrivastava DN, Base CS. Synthesis, Characterization and Pharmacological Evaluation of Thiosalicylamide Derivative as a Class of Calcium Channel Blocker. *Int J Pharm Chem.* 2016;6(1):1-22.
60. Radić GP, Glodović VV, Radojević ID, Stefanović OD, Čomić LjR, Ratković ZR et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complex with same S-alkyl derivatives of thiosalicylic acids. Crystal structure of the *bis*(S-benzyl-thiosalicylate)-palladium(II)-complex, [Pd(S-bz-thiosal)<sub>2</sub>]. *Polyhedron.* 2012;31(1):69-

-76.

61. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Radojević ID, Čomić LjR et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-methyl derivatives of thiosalicylic acid. *Polyhedron*. 2014;79:80-7.
62. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Novaković SB, Bogdanović GA et al. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *J Mol Struct*. 2016;1116:264-71.
63. Bukonjić AM, Tomović DLj, Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR et al. Antibacterial, antibiofilm and antioxidant screening of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-propyl derivative of thiosalicylic acid. *J Mol Struct*. 2017; 1128:330-7.
64. Shukla R, Mandal S, Bharadwaj PK. Synthesis and characterization of copper(II) and nickel(II) complexes with ligands having  $N_2S_2^*S_2$  ( $S^* =$  thioether) donors: pseudo-reversible  $Cu^{III}/Cu^{II}$  couple. *Polyhedron*. 1993; 12(1): 83-8.
65. Ferrer, EG, PAM Williams. Synthesis and characterization of a dimeric complex of Cu(II) with thiosalicylic acid and pyridine. *Polyhedron*. 1997;16(19):3323-5.
66. Chohan ZH, Hazoor AS, Moulay HY, Taibi BH. Some new biologically active metal-based sulfonamide. *Eur J Med Chem*. 2010; 45:2893-2901.
67. Nikaido H. *Encyclopedia of Microbiology* (3<sup>rd</sup> Edition): Outer Membrane, Gram-Negative Bacteria, Academic press, 2009: 439-52.
68. Saier Jr. MH. *Encyclopedia of Microbiology* (3<sup>rd</sup> Edition): Cell Membrane, Prokaryotic, Academic press, 2009: 341-56.
69. Green DW. The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin Ther Tar*. 2002; 6: 1-20.
70. Janković SM. *Farmakologija i toksikologija*. 3 izd., Medicinski fakultet u Krajujvcu, Krajujvac, 2011: 525-79.



71. Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 2004; 38: 864-70.
72. Chohan ZH, Shad HA, Youssoufi MH, Hadda TB. Some new biologically active metal-based sulfonamide. *Eur J Med Chem.* 2010;45:2893-901.
73. Patil SA, Naik VH, Kulkarni AD, Badami PS. DNA cleavage, antimicrobial, spectroscopic and fluorescence studies of Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes with SNO donor coumarin Schiff bases. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2010;75(1):347-54.
74. Shebl M, Khalil SM, Ahmed SA, Medien HA. Synthesis, spectroscopic characterization and antimicrobial activity of mono-, bi- and trinuclear metal complexes of a new Schiff base ligand. *J Mol Struct.* 2010;980(1-3):39-50.
75. 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.
76. Katsarou ME, Efthimiadou EK, Psomas G, Karaliota A, Vourloumis D. Novel copper(II) complex of N-propyl-norfloxacin and 1,10-phenanthroline with enhanced antileukemic and DNA nuclease activities. *J Med Chem.* 2008;51(3):470-8.
77. Kostelidou A, Kalogiannis S, Begou OA, Perdih F, Turel I, Psomasa G. Synthesis, structure and biological activity of copper(II) complexes with gatifloxacin. *Polyhedron.* 2016; 119: 359-70.
78. Chudzik B, Tracz IB, Czernel G, Fiołka MJ, Borsuk G, Gagoś M. Amphotericin B-copper(II) complex as a potential agent with higher antifungal activity against *Candida albicans*. *Eur J Pharm Sci.* 2013 Aug 16;49(5):850-7.
79. Terenzi A, Pirker C, Keppler BK, Berger W. Anticancer metal drugs and immunogenic cell death. *J Inorg Biochem.* 2016;165:71-9.
80. Johnstone TC, Park GY, Lippard SJ. Understanding and improving platinum anticancer drugs-phenanthriplatin. *Anticancer research.* 2014;34: 471-6.
81. Zhang CX, Lippard SJ. New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol.* 2003;7:481-9.

82. Marzano C, Pellei M, Tisato F, Santini C. Copper Complexes as Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2009;9:185-211.
83. Goodman VL, Brewer GJ, Merajver SD. Copper deficiency as an anti-cancer strategy. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(2):255-63.
84. Iakovidis I, Delimaris I, Piperakis SM. Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach. *Mol Biol Int.* 2011;2011:594529.
85. Daniel KG, Gupta P, Harbach RH, Guida WC, Dou QP. Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:1139-51.
86. Prudhomme M. *Advances in Anticancer Agents in Medicinal Chemistry.* Clermont-Ferrand: Bentham Science Publishers; 2013(2).
87. O'Halloran TV. Transition metals in control of gene expression. *Science.* 1993;261(5122):715-25.
88. Raja DS, Bhuvanesh NSP, Natarajan K. Effect of N(4)-phenyl substitution in 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde semicarbazones on the structure, DNA/protein interaction, and antioxidative and cytotoxic activity of Cu(II) complexes, *Inorg Chem.* 2011;5: 12852-66.
89. Raja DS, Bhuvanesh NSP, Natarajan K. Structure-activity relationship study of copper(II) complexes with 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde (40-methylbenzoyl) hydrazone: synthesis, structures, DNA and protein interaction studies, antioxidative and cytotoxic activity. *J Biol Inorg Chem.* 2012; 17: 223-37.
90. Castle TC, Maurer RI, Sowrey FE, Went MJ, Reynolds CA, McInnes EJ et al. Hypoxia-targeting copper *bis*(selenosemicarbazone) complexes: comparison with their sulfur analogues, *J. Am. Chem. Soc.* 2003;125: 10040-49.
91. Paterson BM, Donnelly PS. Copper complexes of *bis*(thiosemicarbazones): from chemotherapeutics to diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev.* 2011;40: 3005-18.
92. Munira Haidad Ali S, Yan YK, Lee PPF, Khong KZX, Alam Sk M, Lim KH et al. Copper(II) complexes of substituted salicylaldehyde dibenzyl semicarbazones: synthesis, cytotoxicity and interaction with quadruplex DNA. *Dalton Trans.* 2014; 43: 1449-59.

93. Qiu L, Lv G, Guo L, Chen L, Luo S, Zou M, Lin J. Synthesis, crystal structure and antitumor effect of a novel copper(II) complex bearing zoledronic acid derivative. *Eur J Med Chem.* 2015;89:42-50.
94. Maher M, Ao H, Banke T, Nasser N, Wu NT, Breitenbucher JG, Chaplan SR, Wickenden AD. Activation of TRPA1 by farnesyl thiosalicylic acid. *Mol Pharmacol.* 2008;73(4):1225-34.
95. Alexandre H, Delsinne V, Goval JJ, Van Cauwenberge A. Effect of taxol and okadaic acid on microtubule dynamics in thimerosal-arrested primary mouse oocytes: a confocal study. *Biol Cell.* 2003;95(6):407-14.
96. Alexandre H, Delsinne V, Goval JJ. The thiol reagent, thimerosal, irreversibly inhibits meiosis reinitiation in mouse oocyte when applied during a very early and narrow temporal window: a pharmacological analysis. *Mol Reprod Dev.* 2003;65(4):454-61.
97. Smalley KS, Eisen TG. Farnesyl transferase inhibitor SCH66336 is cytostatic, proapoptotic and enhances chemosensitivity to cisplatin in melanoma cells. *Int J Cancer.* 2003;105(2):165-75.
98. Zhang X, Lu J, Huang Y, Zhao W, Chen Y, Li J et al. PEG farnesylthiosalicylate conjugate as a nanomicellar carrier for delivery of paclitaxel. *Bioconjugate Chem.* 2013; 24: 464-72.
99. Lu, J, Huang Y, Zhao W, Chen Y, Li J, Gao X et al. Design and characterization of PEG derivatized vitamin E as a nanomicellar formulation for delivery of paclitaxel. *Mol Pharmacol.* 2013; 10: 2880-90.
100. Mi Y, Liu Y, Feng SS. Formulation of Docetaxel by folic acid-conjugated d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol succinate 2000 (Vitamin E TPGS(2k)) micelles for targeted and synergistic chemotherapy. *Biomaterials.* 2011; 32: 4058-66.
101. Huang Y, Lu J, Gao X, Li J, Zhao W, Sun M et al. PEG-derivatized embelin as a dual functional carrier for the delivery of paclitaxel. *Bioconjugate Chem.* 2012; 23: 1443-51.
102. Lu J, Huang Y, Zhao W, Marquez RT, Meng X, Li J et al. PEG-derivatized embelin as a nanomicellar carrier for delivery of paclitaxel to breast and prostate cancers. *Biomaterials.* 2013; 34: 1591-600.
103. Xu J, Zhang X, Chen Y, Huang Y, Wang P, Wei Y, Ma X, Li S. Improved Micellar Formulation for Enhanced Delivery for Paclitaxel. *Mol Pharm.* 2017;14(1):31-41.

104. Lu J, Sun Q, Li JL, Jiang L, Gu W, Liu X et al. Two water-soluble copper(II) complexes: synthesis, characterization, DNA cleavage, protein binding activities and in vitro anticancer activity studies. *J Inorg Biochem.* 2014;137:46-56.
105. Baskaran S, Murali Krishnan M, Arumugham MN, Rakesh Kumar. DFT analysis and DNA binding, cleavage of copper(II) complexes. *J Mol Liq.* 2016; 221: 1045-53.
106. Eichhorn GL, Shin YA. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. *J Am Chem Soc.* 1968 Dec 18;90(26):7323-8.
107. 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.
108. Eichhorn GL, Clark P. Interactions of metal ions with polynucleotides and related compounds, V. The unwinding and rewinding of DNA strands under the influence of Cu(II) ions. *PNAS.* 1965; 53: 586-93.
109. Coates JH, Jordan DO, Srivastava VK. The binding of copper (II) ions to DNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1965; 20: 611-15.
110. Yatsimirskii KB, Kriss EE, Akhrameeva TI. Complex formation of copper ions with deoxyribonucleic acid. *Doklady Akademii Nauk SSSR.* 1966; 168: 840-3.
111. Daune M, Chambron J. Binding sites on DNA and stability of the double helix. *J Chim Phys Phys-Chim Biol.* 1968; 65: 72-7.
112. Schreiber JP, Daune M. Interaction of metallic ions with DNA. IV. Binding of cupric ion to DNA. *Biopolymers.* 1969; 8: 139-52.
113. Wende C, Lüdtke C, Kulak N. Copper complexes of N-donor ligands as artificial nucleases. *Eur J Inorg Chem.* 2014; 16: 2597-612.
114. Forster W, Bauer E, Schutz H, Berg H, Akimenko M, Minchenkova LE. Thermodynamics and kinetics of the interaction of copper(II) ions with native DNA. *Biopolymers.* 1979; 18: 625-61.
115. Sissoeff I, Grisvard J, Guille E. Studies on metal ions-DNA interactions: specific behaviour of reiterative DNA sequences. *Prog Biophys Mol Biol.* 1976; 31: 165-99.

116. Tajmir-Riahi HA, Langlais M, Savoie R. A laser Raman spectroscopic study of the interaction of calf-thymus DNA with Cu(II) and Pb(II) ions: metal ion binding and DNA conformational changes. *Nucleic Acid Res.* 1988; 16: 751-62.
117. Richard H, Schreiber JP, Daune M. Interactions of metallic ions with DNA, V. DNA renaturation mechanism in the presence of Cu<sup>2+</sup>. *Biopolymers.* 1973;12:1-10.
118. Rohner M, Medina-Molner A, Spingler B. N,N,O and N,O,N Meridional cis coordination of two guanines to copper(II) by d(CGCGCG)<sub>2</sub>. *Inorg Chem.* 2016; 55: 6130-40.
119. O'Connor M, Kellett A, McCann M, Rosair G, McNamara M, Howe O et al. Copper(II) complexes of salicylic acid combining superoxide dismutase mimetic properties with DNA binding and cleaving capabilities display promising chemotherapeutic potential with fast acting *in vitro* cytotoxicity against cisplatin sensitive and resistant cancer cell lines. *J Med Chem.* 2012;55(5):1957-68.
120. Silva PP, Guerra W, Silveira JN, Ferreira AM, Bortolotto T, Fischer FL et al. Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage. *Inorg Chem.* 2011;50(14):6414-24.
121. Abdi K, Hadadzadeh H, Weil M, Salimi M. Mononuclear copper(II) complex with terpyridine and an extended phenanthroline base, [Cu(tpy)(dppz)]<sup>2+</sup>: Synthesis, crystal structure, DNA binding and cytotoxicity activity. *Polyhedron.* 2012; 31(1): 638-48.
122. Pivetta T, Cannas MD, Demartin F, Castellano C, Vascellari S, Verani G et al. Synthesis, structural characterization, formation constants and *in vitro* cytotoxicity of phenanthroline and imidazolidine-2-thione copper(II) complexes. *J Inorg Biochem.* 2011;105(3):329-38.
123. Zheng YJ, Li XW, Li YT, Wu ZY, Yan CW. Synthesis and structure of new tetracopper(II) complexes bridged by 2-[N'-[2-(dimethylamino)ethyl]oxamido}benzoate: DNA-binding and anticancer activity. *J Photochem Photobiol B.* 2012;114:27-37.
124. Buchtík R, Trávníček Z, Vančo J. *In vitro* cytotoxicity, DNA cleavage and SOD-mimic activity of copper(II) mixed-ligand quinolinonato complexes. *J Inorg Biochem.* 2012;116:163-71.

125. Li XW, Tao L, Li YT, Wu ZY, Yan CW. Bimetallic complexes constructed from asymmetrical N,N'-bis(substituted)-oxamide: cytotoxicities, and reactivities towards DNA and protein. *Eur J Med Chem.* 2012 Aug;54:697-708.
126. García-Giménez JL, González-Alvarez M, Liu-González M, Macías B, Borrás J, Alzuet G. Toward the development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with N-(9H-purin-6-yl)benzenesulfonamide and 1,10-phenantroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocytes. Evaluation of p53 and Bcl-2 proteins in the apoptotic mechanism. *J Inorg Biochem.* 2009;103(6):923-34.
127. Aliaga-Alcalde N, Marques-Gallego P, Kraaijkamp M, Herranz-Lancho C, Dulk H, Gorner H et al. Copper Curcuminoids Containing Anthracene Groups: Fluorescent Molecules with Cytotoxic Activity. *J Inorg Chem.* 2010; 49: 9655-63.
128. Chen QY, Fu HJ, Huang J, Zhang RX. Synthesis, characterization, bioactivities of copper complexes with N-allyl di(picoly)amine. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2010;75(1):355-60.
129. Jia L, Xu XM, Xu J, Chen LH, Jiang P, Cheng FX, Lu GN, Wang Q, Wu JC, Tang N. 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.
130. Kellett A, O'Connor M, McCann M, McNamara M, Lynch P, Rosair G et al. *Bis*-phenanthroline copper(II) phthalate complexes are potent in vitro antitumour agents with 'self-activating' metallo-nuclease and DNA binding properties. *Dalton Trans.* 2011;40(5):1024-7.
131. Selvakumar B, Rajendiran V, Uma Maheswari P, Stoeckli-Evans H, Palaniandavar M. Structures, spectra, and DNA-binding properties of mixed ligand copper(II) complexes of iminodiacetic acid: the novel role of diimine co-ligands on DNA conformation and hydrolytic and oxidative double strand DNA cleavage. *J Inorg Biochem.* 2006;100(3):316-30.
132. Campbell NH, Karim NH, Parkinson GN, Gunaratnam M, Petrucci V, Todd AK, Vilar R, Neidle S. Molecular basis of structure-activity relationships between salphen metal complexes and human telomeric DNA quadruplexes. *J Med Chem.* 2012;55(1):209-22.

133. Wang H, Shen R, Wu J, Tang N. Antitumor activity and DNA-binding investigations of the Zn(II) and Cu(II) complexes with isoeuxanthone. *Chem Pharm Bull.* 2009; 57: 814-8.
134. Tang LJ, Chen X, Sun YN, Ye J, Lu J, Han Y et al. Synthesis and biological studies of 4',7,8-trihydroxy-isoflavone metal complexes. *J Inorg Biochem.* 2011; 105(12): 1623-29.
135. Roy S, Maheswari PU, Lutz M, Spek AL, Dulk H, Barends S. DNA cleavage and antitumour activity of platinum(II) and copper(II) compounds derived from 4-methyl-2-N-(2-pyridylmethyl)aminophenol: spectroscopic, electrochemical and biological investigation. *Dalton Trans.* 2009; 48: 10846-60.
136. Krishnamoorthy P, Sathyadevi P, Cowley AH, Butorac RR, Dharmaraj N. Evaluation of DNA binding, DNA cleavage, protein binding and in vitro cytotoxic activities of bivalent transition metal hydrazone complexes. *Eur J Med Chem.* 2011;46(8):3376-87.
137. Kellett A, Howe O, O'Connor M, McCann M, Creaven BS, McClean S, Foltyn-Arfa Kia A, Casey A, Devereux M. Radical-induced DNA damage by cytotoxic square-planar copper(II) complexes incorporating o-phthalate and 1,10-phenanthroline or 2,2'-dipyridyl. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(3):564-76.
138. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):307-20.
139. Buchtík R, Trávníček Z, Vančo J, Herchel R, Dvořák Z. Synthesis, characterization, DNA interaction and cleavage, and in vitro cytotoxicity of copper(II) mixed-ligand complexes with 2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinone. *Dalton Trans.* 2011;40(37):9404-12.
140. Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle-70 years later. *Redox Rep.* 2001;6(4):229-34.
141. Kremer ML. Mechanism of the Fenton reaction. Evidence for a new intermediate. *Phys Chem Chem Phys.* 1999; 1: 3595-605.
142. Fleming AM, Muller JG, Ji I, Burrows CJ. Characterization of 2'-deoxyguanosine oxidation products observed in the Fenton-like system Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/reductant in nucleoside and oligodeoxynucleotide contexts. *Org Biomol Chem.* 2011;9(9):3338-48.
143. Anbu S, Kandaswamy M, Kamalraj S, Muthumarry J, Varghese B. Phosphatase-like activity, DNA binding, DNA hydrolysis, anticancer and lactate dehydrogenase inhibition



- activity promoting by a new bis-phenanthroline dicopper(II) complex. *Dalton Trans.* 2011;40(28):7310-8.
144. Manikandamathavan VM, Parameswari RP, Weyhermüller T, Vasanthi HR, Nair BU. Cytotoxic copper(II) mixed ligand complexes: crystal structure and DNA cleavage activity. *Eur J Med Chem.* 2011;46(9):4537-47.
145. Rajalakshmi S, Weyhermüller T, Dinesh M, Nair BU. Copper(II) complexes of terpyridine derivatives: a footstep towards development of antiproliferative agent for breast cancer. *J Inorg Biochem.* 2012;117:48-59.
146. Hegg EL, Burstyn JN. Copper (II) macrocycles cleave single-stranded and double-stranded DNA under both aerobic and anaerobic conditions. *Inorg Chem.* 1996; 35(26): 7474-7481.
147. Hegg EL, Burstyn JN. Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry. *Coord Chem Rev.* 1998; 173(1): 133-165.
148. Povirk LF, Austin MJ. Genotoxicity of bleomycin. *Mutat Res.* 1991;257(2):127-43.
149. Chakraborty A, Kumar P, Ghosh K, Roy P. Evaluation of a Schiff base copper complex compound as potent anticancer molecule with multiple targets of action. *Eur J Pharmacol.* 2010;647(1-3):1-12.
150. Qiao X, Ma ZY, Xie CZ, Xue F, Zhang YW, Xu JY et al. Study on potential antitumour mechanism of a novel Schiff base copper (II) complex: Synthesis, Crystal structure, DNA binding, Cytotoxicity and Apoptosis induction activity. *J. Inorg. Biochem.* 2011; 105(5):728-37.
151. Qin Y, Meng L, Hu C, Duan W, Zuo Z, Lin L, Zhang X, Ding J. Gambogic acid inhibits the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by binding to its ATPase domain. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(9):2429-40.
152. Zeglis BM, Divilov V, Lewis JS. Role of metalation in the topoisomerase II $\alpha$  inhibition and antiproliferation activity of a series of  $\alpha$ -heterocyclic-N4-substituted thiosemicarbazones and their Cu(II) complexes. *J Med Chem.* 2011;54(7):2391-8.
153. Claassen G, Brin E, Crogan-Grundy C, Vaillancourt MT, Zhang HZ, Cai SX. Selective activation of apoptosis by a novel set of 4-aryl-3-(3-aryl-1-oxo-2-propenyl)-2(1H)quinolinones through a Myc-dependent pathway. *Cancer Lett.* 2009;274(2):243-9.



154. Tabassum S, Al-Asbahy WM, Afzal M, Arjmand F, Bagchi V. Molecular drug design, synthesis and structure elucidation of a new specific target peptide based metallo drug for cancer chemotherapy as topoisomerase I inhibitor. *Dalton Trans.* 2012;41(16):4955-64.
155. 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.
156. Dou QP, Smith DM, Daniel KG, Kazi A. Interruption of tumor cell cycle progression through proteasome inhibition: implications for cancer therapy. *Prog Cell Cycle Res.* 2003;5:441-6.
157. Drexler HC. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Feb 4;94(3):855-60.
158. Agilent, CrysAlis PRO, Agilent Technologies, Yarnton, Oxfordshire, England, 2013.
159. Burla MC, Camalli M, Carrozzini B, Cascarano GL, Giacovazzo C, Polidori G, Spagna R. SIR2002: the program. *J Appl Crystallogr.* 2003; 36(4): 1103-1103.
160. Sheldrick GM. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr, Sect A: Found Crystallogr.* 2007; 64(1): 112-22.
161. Nardelli M. PARST95—an update to PARST: a system of Fortran routines for calculating molecular structure parameters from the results of crystal structure analyses. *J Appl Crystallogr.* 1995; 28(5): 659-659.
162. Spek AL. Single-crystal structure validation with the program PLATON. *J Appl Crystallogr.* 2003; 36(1): 7-13.
163. Macrae CF, Edgington PR, McCabe P, Pidcock E, Shields GP, Taylor R et al. Mercury: visualization and analysis of crystal structures. *J Appl Crystallogr.* 2006; 39(3): 453-7.
164. Meadows KA, Liu F, Sou J, Hudson BP, McMillin DR. Spectroscopic and photophysical studies of the binding interactions between copper phenanthroline complexes and RNA. *Inorg Chem.* 1993; 32(13): 2919-23.
165. Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(1): 60-76.

166. 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.
167. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
168. Santini C, Pellei M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev*. 2014;114(1): 815-62.
169. Dittler-Klingemann AM, Orvig C, Ekkehardt Hahn F, Thaler F, Hubbard CD, Van Eldik R et al. Geometric Factors in the Structural and Thermodynamic Properties of Copper(II) Complexes with Tripodal Tetraamines. *Inorg Chem*. 1996; 35(26): 7798-7803.
170. Buvaylo EA, Kokozay VN, Vassilyeva OY, Skelton BW, Jezoerska J, Ozarowski A. A new Cu/Zn carboxylato-bridged 1D polymer: Direct synthesis, X-ray structure and magnetic properties. *Inorg Chim Acta*. 2011; 373(1): 27-31.
171. Solanki A, Sadhu MH, Patel S, Devkar R, Kumar SB. Ternary complexes of Copper(II) and Cobalt(II) Carboxylate with Pyrazole based ligand: Syntheses, Characterization, Structures and Bioactivities. *Polyhedron*. 2015; 102: 267-75.
172. Sundberg MR, Uggla R, Melník M. Comparison of the structural parameters in copper(II) acetate-type dimers containing distorted square pyramidal CuO<sub>4</sub>O and CuO<sub>4</sub>N chromophores. *Polyhedron*. 1996; 15(7): 1157-63.
173. Nomiya K, Kondoh Y, Onoue K, Kasuga NC, Nagano H, Oda M et al. Synthesis and characterization of polymeric, anionic thiosalicylato-Ag(I) complexes with antimicrobial activities. *J Inorg Biochem*. 1995; 58(4): 255-67.
174. Nomiya K, Yokoyama H, Nagano H, Oda M, Sakuma S. Synthesis and Characterization of Trisodium Salt of Bis(thiosalicylato)aurate(I): Na<sub>3</sub>[Au(TSA)<sub>2</sub>]·5H<sub>2</sub>O. *J Inorg Biochem*. 1995; 60(4): 289-97.
175. Gilbert JG, Addison AW, Nazarenko AY, Butcher RJ. Copper (II) complexes of new unsymmetrical NSN thioether ligands. *Inorg Chim Acta*. 2001;324(1):123-30.
176. Schoenberg LN, Cooke DW, Liu CF. Nuclear magnetic resonance determination of the absolute configuration of complexes of cobalt(III) with asymmetric tetradentate ligands. *Inorg Chem*. 1968;7:2386-93.

177. Swaminathan K, Busch DH. The synthesis and infrared absorption spectra of complexes of cobalt with pentadentate propylenediaminetetraacetic acid. *J Inorg Nucl Chem.* 1961;20(1):159-63.
178. Nakamoto K. Infrared spectra of the inorganic and coordination compounds. New York: Willey; 1963.
179. Karayannis NM, Mikulski CM, Sonsino SD, Bradshaw EE, Pytlewski LL. Isoxazole as a ligand. *Inorg Chim Acta.* 1975; 14: 195-200.
180. Agterberg FPW, ProvóKluit HAJ, Driessen WL, Reedijk J, Oevering H, Buijs W et al. Three dinuclear copper(II) carboxylates with the paddle-wheel cage structure as intermediates in copper(II) catalyzed oxidations of carboxylic acids. X-ray crystal structures of [tetrakis(diphenyl acetato- $\mu$ -O,O')bis(acetonitrile-N)dicopper(II)] tetrakis(acetonitrile), [tetrakis(diphenylacetato- $\mu$ -O,O')bis(acetone-O)dicopper(II)] and [tetrakis(1-phenyl-1-carboxylato- $\mu$ -O,O'-cyclopentane)-bis(ethanol-O)dicopper(II)] bis(ethanol). *Inorg Chim Acta.* 1998; 267(2): 183-92.
181. Morgan YR, Turner P, Kennedy BJ, Hambley TW, Lay PA, Biffin JR et al. Preparation and characterization of dinuclear copper-indomethacin anti-inflammatory drugs. *Inorg Chim Acta.* 2001; 324(1-2): 150-61.
182. Weder JE, Hambley TW, Kennedy BJ, Lay PA, Foran GJ, Rich AM. Determination of the Structures of Antiinflammatory Copper(II) Dimers of Indomethacin by Multiple-Scattering Analyses of X-ray Absorption Fine Structure Data. *Inorg Chem.* 2001; 40(6):1295-302.
183. Kozlevčar B, Leban I, Petrič M, Petriček S, Roubeau O, Reedijk J. Phase transitions and antiferromagnetism in copper(II) hexanoates: a new tetranuclear type of copper carboxylate paddle-wheel association. *Inorg Chim Acta.* 2004; 357(14): 4220-30.
184. Motreff A, Da Costa RC, Allouchi H, Duttine M, Mathoniere C, Duboc C et al. A fluorine copper(II)-carboxylate complex which magnetically and reversibly responds to humidity in the solid state. *J Fluorine Chem.* 2012; 134:49-55.
185. Iqbal M, Ahmad I, Ali S, Muhammad N, Ahmed S, Sohail M. Dimeric "paddlewheel" carboxylates of copper(II): Synthesis, crystal structure and electrochemical studies. *Polyhedron.* 2013; 50(1): 524-31.

186. Abd-Elzahera MM, Labiba AA, Mousa HA, Moustafa SA, Ali MM, El-Rashedy AA. Synthesis, anticancer activity and molecular docking study of Schiff base complexes containing thiazole moiety. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. 2016; 5(1): 85-96.
187. Andersen O. Principles and recent developments in chelation treatment of metal intoxication. Chem Rev. 1999;99:2683-710.
188. Chohan ZH, Pervez H, Rauf A, Khan KM, Supuran CT. Isatinderived antibacterial and antifungal compounds and their transition metal complexes. J Enzyme Inhib Med Chem. 2004;19:417-23.
189. Golcu A, Tumer M, Demirelli H, Wheatley RA. Cd(II) and Cu(II) complexes of polydentate Schiff base ligands: synthesis, characterization, properties and biological activity. Inorg Chim Acta. 2005;358:1785-97.
190. Joseyphus RS, Dhanaraj CJ, Nair MS. Synthesis and characterization of some Schiff base transition metal complexes derived from vanillin and l(+)-alanine. Transit Met Chem. 2006;31:699-702.
191. Geary WJ. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. Coord Chem Rev. 1971; 7(1): 81-122.
192. Raman N, Ravichandran S, Thangaraja C. Copper(II), cobalt(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of Schiff base derived from benzil-2,4-dinitrophenylhydrazone with aniline. J Chem Sci. 2004; 116(4): 215-19.
193. Hathaway BJ, Billing DE. The electronic properties and stereochemistry of mononuclear complexes of the copper(II) ion. Coord Chem Rev. 1970; 5(2): 143-207.
194. Jotham RW, Kettle SFA, Marks JA. Antiferromagnetism in transition-metal complexes. Part VI. Low-lying excited states of dinuclear copper(II) complexes with bridging multidentate Schiff's base groups and some related compounds. J Chem Soc, Dalton Trans. 1974;2:125-8.
195. Meier JL, Coughenour CE, Carlisle JA, Carlisle GO. The magnetic properties of a series of copper(II) aspirinates. Inorg Chim Acta. 1985;106:159-63.
196. Elmali A. The magnetic super-exchange coupling in copper(II) acetate monohydrate and a redetermination of the crystal structure. Turkish Journal of Physics. 2000;24:667-72.

197. Underhill AE, Bougourd SA, Flugge ML, Gale SE, Gomm PS. Metal complexes of anti-inflammatory drugs. Part VIII: Suprofen complex of copper(II). *J Inorg Biochem.* 1993; 144:139-44.
198. Van Niekerk JN, Schoening FR. A new type of copper complex as found in the crystal structure of cupric acetate,  $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . *Acta Crystallogr.* 1953; 6: 227-32.
199. Reyes-Ortega Y, Alcántara-Flores JL, Hernández-Galindo MC, Ramírez-Rosales D, Bernès S, Ramírez-García JC, Zamorano-Ulloa R, Escudero R. Magnetic properties and crystal structure of a one-dimensional phase of tetrakis( $\mu_2$ -benzoato-O,O')-bis(dimethyl sulfoxide)dicopper(II). *J Am Chem Soc.* 2005;127(46):16312-7.
200. Pratumwieng R, Soikum C, Chaveerach P, Chaveerach U. Binding studies of (N-(methylpyridin-2-yl)-amidino-O-methylurea)copper(II) complexes to four nitrogenous bases and 5'-GMP. *Inorg Chim Acta.* 2014;423: 421-29.
201. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature.* 1969; 222(5191): 385-6.
202. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(4): 307-20.
203. Kamath A, Naik K, Netalkar SP, Kokare DG, Revankar VK. Pyrazole-bridged late first row transition metal complexes derived from hexadentate compartmental ligand: synthesis, characterization, antibacterial activity, and DNA binding/cleavage studies. *Med Chem Res.* 2013; 22: 1948-56.
204. Qing J, Gu W, Liu H, Gao FX, Feng L, Yan SP et al. The first dinuclear copper(II) and zinc(II) complexes containing novel Bis-TACN: syntheses, structures, and DNA cleavage activities. *Dalton Trans.* 2007; 10: 1060-66.
205. Mao JW, Zhou H, Chen YF, Cheng GZ, Pan ZQ. Synthesis, structure, DNA interaction, and hydrolytic function toward bis(p-nitrophenyl) phosphate of a heterobinuclear macrocyclic complex. *Transit Met Chem.* 2012; 37(4): 385-91.
206. Long EC, Barton JK. *Acc Chem Res.* On demonstrating DNA intercalation. 1990; 23(9): 271-3.
207. Pasternack RF, Gibbs EJ, Villafranca JJ. Interactions of porphyrins with nucleic acids. *Biochemistry.* 1983;22(10):2406-14.

208. Koumoussi ES, Zampakou M, Raptopoulou CP et al. First palladium(II) and platinum(II) complexes from employment of 2,6-diacetylpyridine dioxime: synthesis, structural and spectroscopic characterization, and biological evaluation. *Inorg Chem.* 2012; 51: 7699-710.
209. Rizvi MA, Zaki M, Afzal M et al. Nuclear blebbing of biologically active organoselenium compound towards human cervical cancer cell (HeLa): in vitro DNA/HSA binding, cleavage and cell imaging studies. *Eur J Med Chem.* 2015; 90: 876-88.
210. Arthi P, Haleel A, Srinivasan P, Prabhu D, Arulvasu C, Kalilur Rahiman A. Antibacterial, DNA interaction and cytotoxic activities of pendant-armed polyamine macrocyclic dinuclear nickel(II) and copper(II) complexes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014;129:400-14.
211. LePecq JB, Paoletti C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. *J Mol Biol.* 1967; 27(1): 87-106.
212. Boger DL, Fink BE, Brunette SR, Tse WC, Hedrick MP. A simple, high-resolution method for establishing DNA binding affinity and sequence selectivity. *J Am Chem Soc.* 2001; 123(25): 5878-91.
213. Meyer-Almes FJ, Porschke D. Mechanism of intercalation into the DNA double helix by ethidium. *Biochemistry,* 1993; 32: 4246-53.
214. Liu ZC, Wang BD, Yang ZY, Li Y, Qin DD, Li TR. Synthesis, crystal structure, DNA interaction and antioxidant activities of two novel water-soluble  $\text{Cu}^{2+}$  complexes derivated from 2-oxo-quinoline-3-carbaldehyde Schiff-bases. *Eur J Med Chem.* 2009; 44(11): 4477-84.
215. Howe GM, Wu KC, Bauer WR. Binding of platinum and palladium metallointercalation reagents and antitumor drugs to closed and open DNAs. *Biochemistry,* 1976; 19: 4339-46.
216. Li DD, Tian JL, Gu W, Liu X, Yan SP. Four new copper(II) complexes with 1,3-tpbd ligand: Synthesis, crystal structures, magnetism, oxidative and hydrolytic cleavage of pBR322 DNA. *J Inorg Biochem.* 2010; 104(4): 431-41.

217. Jiang M, Li YT, Wu ZY, Liu ZQ, Yan CW. Synthesis, crystal structure, cytotoxic activities and DNA-binding properties of new binuclear copper(II) complexes bridged by N,N'-bis(N-hydroxyethylaminoethyl)oxamide. *J Inorg Biochem.* 2009;103(5):833-44.
218. 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.
219. Sigman DS, Mazumder A, Perrin DM. Chemical nucleases. *Chem Rev.* 1993; 93(6): 2295-2316.
220. Sigman DS, Graham DR, D'Aurora V, Stern AM. Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline-cuprous complex. Inhibition of *E. coli* DNA polymerase I. *J Biol Chem.* 1979; 254: 12269-72.
221. Reich KA, Marshall LE, Graham DR, Sigman DS. Cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline-copper ion complex. Superoxide mediates the reaction dependent on NADH and hydrogen peroxide. *J Am Chem Soc.* 1981; 103(12): 3582-4.
222. Veal JM, Merchant K, Rill RL. The influence of reducing agent and 1,10-phenanthroline concentration on DNA cleavage by phenanthroline + copper. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(12): 3383-8.
223. Newton GL, Rawat M, La Clair JJ, Jothivasan VK, Budiarto T, Hamilton CJ et al. Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in *Bacilli*. *Nat Chem Biol.* 2009; 5: 625–27.
224. Beeton ML, Aldrich-Wright JR, Bolhuis A. The antimicrobial and antibiofilm activities of copper(II) complexes. *J Inorg Biochem.* 2014; 140: 167-72.
225. Betanzos-Lara S, Gracia-Mora I, Granada-Macyas P, Flores-Alamo M, Barba-Behrens N. Synthesis, characterization, and biological activity of cobalt(II), nickel(II), copper(II), and zinc(II) complexes of secnidazole. *Inorg Chim Acta.* 2013; 397: 94-100.
226. El-Gamel NE, Zayed MA. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activity evaluation of metal complexes of sparfloxacin. *Spectrochim Acta Part A.* 2011;82:414-23.
227. Geeta B, Shrivankumar K, Muralidhar Reddy P. 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 Part A.* 2010; 77(4): 911-15.



228. Siddiqi ZA, Sharma PK, Shahid M, Khalid M, Anjuli, Siddique A, Kumar S. 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.
229. Abou-Hussein AA, Linert W. Synthesis, spectroscopic and biological activities studies of acyclic and macrocyclic mono and binuclear metal complexes containing a hard-soft Schiff base. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc.* 2012; 95: 596-609.
230. Amer S, El-Wakiel N, El-Ghamry H. Synthesis, spectral, antitumor and antimicrobial studies on Cu(II) complexes of purine and triazole Schiff base derivatives. *J Mol Struct.* 2013; 1049: 326-35.
231. 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-MecdoaH<sub>2</sub>): X-ray crystal structures of [Cu(cdoa)(phen)<sub>2</sub>].8H<sub>2</sub>O and [Cu(4-Mecdoa)(phen)<sub>2</sub>].13H<sub>2</sub>O (phen=1,10-phenanthroline). *J Inorg Biochem.* 2007; 101(8): 1108-19.
232. 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: 910-20.
233. Chalkidou E, Perdih F, Turer I, Kessissoglou PD, Psomas G. Copper(II) complexes with antimicrobial drug flumequine: structure and biological evaluation. *J Inorg Biochem.* 2012; 113: 55-65.
234. Gracia-Mora I, Ruiz-Ramirez L, Gomez-Ruiz C, Tinoco-Mendez M, MarquezQuinones A, Lira LR et al. Knight's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeinas, evaluated by an in vitro human and murine cancer cell line panel. *Met Based Drugs.* 2001; 8: 19-28.
235. Jia L, Xu XM, Xu J, Chen LH, Jiang P, Cheng FX. Synthesis, characterization, cytotoxic activities, and DNA-binding studies of ternary copper(II) complexes with new coumarin derivatives. *Chem Pharm Bull.* 2010; 58: 1003-8.
236. Raman N, Jeyamurugan R, Senthilkumar R, Raj Kapoor B, Franzblau SG. In vivo and in vitro evaluation of highly specific thiolate carrier group copper(II) and zinc(II)



- complexes on Ehrlich ascites carcinoma tumor model. *Eur J Med Chem.* 2010; 45: 5438-51.
237. Murugkar A, Unnikrishnan B, Padhye S, Bhonde R, Teat S, Triantafillou E et al. Hormone anchored metal complexes. 1. Synthesis, structure, spectroscopy and in vitro antitumor activity of testosterone acetate thiosemicarbazone and its metal complexes. *Met Based Drugs.* 1999; 6: 177-82.
238. Krishnamoorthy P, Sathyadevi P, Cowley AH, Butorac RR, Dharmaraj N. Evaluation of DNA binding, DNA cleavage, protein binding and in vitro cytotoxic activities of bivalent transition metal hydrazone complexes. *Eur J Med Chem.* 2011; 46: 3376-87.
239. Lakshmipraba J, Arunachalam S, Gandhi DA, Thirunalasundari T. Synthesis, nucleic acid binding and cytotoxicity of polyethyleneimine-copper(II) complexes containing 1,10-phenanthroline and l-valine. *Eur J Med Chem.* 2011; 46: 3013-21.
240. Boulsourani Z, Geromichalos GD, Repana K, Yiannaki E, Psycharis V, Raptopoulou CP et al. Preparation and pharmacochemical evaluation of mixed ligand copper(II) complexes with triethanolamine and thiophenyl-2 saturated carboxylic acids. *J Inorg Biochem.* 2011; 105: 839-49.
241. Tardito S, Isella C, Medico E, Marchio L, Bevilacqua E, Hatzoglou M et al. The thioxotriazole copper(II) complex A0 induces endoplasmic reticulum stress and paraptotic death in human cancer cells. *J Biol Chem.* 2009; 284: 24306-19.
242. Frías González SE, Angeles Anguiano E, Mendoza Herrera A, Escutia Calzada D, Ordaz Pichardo C. Cytotoxic, pro-apoptotic, pro-oxidant, and non-genotoxic activities of a novel copper(II) complex against human cervical cancer. *Toxicology.* 2013; 314(1): 155-65.
243. Qasem Ali A, Guan Teoh S, Eltaher Eltayeb N, Khadeer Ahamed MB, Abdul Majid AMS. Synthesis of copper(II) complexes of isatin thiosemicarbazone derivatives: In vitro anti-cancer, DNA binding, and cleavage activities. *Polyhedron.* 2014; 74: 6-15.
244. Qiu L, Lv G, Guo L, Chen L, Luo S, Zou M, Lin J. Synthesis, crystal structure and antitumor effect of a novel copper(II) complex bearing zoledronic acid derivative. *Eur J Med Chem.* 2015; 89: 42-50.

245. Hu J, Liao C, Guo Y, Yang F, Sang W, Zhao J. Copper(II) complexes inducing apoptosis in cancer cells, and demonstrating DNA and HSA interactions. *Polyhedron*. 2017; 132: 28-38.