



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Емина М. Мркалић

СИНТЕЗА И АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ
КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) СА ДЕРИВАТИМА
ДИАМИДА ОКСАЛНЕ И МАЛОНСКЕ КИСЕЛИНЕ

Докторска дисертација

Крагујевац, 2017.

<i>I. Аутор</i>	
Име и презиме:	Емина М. Мркалић
Датум и место рођења:	13.12.1981., Крагујевац
Садашње запослење:	Истраживач-сарадник
Наслов:	Синтеза и антитуморна активност комплекса паладијума(II) са дериватима диамида оксалне и малонске киселине
<i>II. Докторска дисертација</i>	
Број страница:	125
Број слика:	40
Број библиографских података:	237
Установа и место где је рад израђен:	Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област (УДК) :	Хемија(54) – Неорганска хемија(546)
Ментор:	Проф. др Зоран Д. Матовић
<i>III. Оцена и одбрана</i>	
Датум и пријава теме:	30. 01. 2013. године,
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:	ННВ природно-математичког факултета: 150/X-3, 27. 02. 2013. године Стручно Веће за природно-математичке науке: 198/8, 10. 04. 2013. године
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Др Зоран Д. Матовић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац Ужа научна област: Неорганска хемија 2. Др Срећко Трифуновић, редовни професор Природно-математички факултет, Крагујевац Ужа научна област: Неорганска хемија 3. Др Ратомир Јелић, ванредни професор Факултет медицинских наука, Крагујевац Ужа научна област: Фармацеутска хемија 4. Др сц. Гордана Богдановић, виши научни сарадник Институт за онкологију Војводине, Сремска Каменица Ужа научна област: Онкологија
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:	<ol style="list-style-type: none"> 1. Др Срећко Трифуновић, редовни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац Ужа научна област: Неорганска хемија 2. Др Ратомир Јелић, ванредни професор Факултет медицинских наука, Крагујевац Ужа научна област: Фармацеутска хемија 3. Др Бранимир Јованчићевић, редовни професор Хемијски факултет, Београд Ужа научна област: Примењена хемија
Датум одбране дисертације:	2017.

ЗАХВАЛНИЦА

Експериментални део ове дисертације урађен је у Институту за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу и део је пројекта који финансира Министарство просвете и науке Републике Србије (Пројекат: П41010).

Тему докторске дисертације, као и веома интересантне, иновативне и примењиве експерименте предложио је професор Зоран Матовић, редовни професор Природно-математичког факултета у Крагујевцу, коме се захваљујем на стручним сугестијама и помоћи приликом израде ове дисертације.

Захваљујем се члановима комисије др Ратомиру Јелићу, др Срећку Трифуновићу и др Бранимиру Јованчићевићу, на доприносу који су дали својим сугестијама и саветима приликом писања докторске дисертације.

Такође, захваљујем се колеги Пенгфеи Лију на разумевању и насебичној помоћи приликом извођења компјутационих експеримената.

*Захваљујем се професорки Снежани Марковић и члановима њене групе на тестовима цитотоксичности смеше синтетисаног комплекса [Pd(арох)] и биљке *L. Vulgare*.*

Захваљујем се др Гордани Богдановић и члановима њене групе на успешној сарадњи приликом израде ове дисертације.

Посебно желим да истакнем да сам имала ретку привилегију да радим у групи оданих и мени напасве драгих девојака. Драге моје, Марина, Марија, Мајо и Цецо желим од срца да вам се захвалим на разумевању, помоћи, саветима и разговорима, прелепим часовима дружења и подршци у свакој фази израде моје докторске дисертације.

САДРЖАЈ

СКРАЋЕНИЦЕ
СПИСАК СЛИКА
СПИСАК ШЕМА
СПИСАК ТАБЕЛА
ИЗВОД
SUMMARY

1. ОПШТИ ДЕО	1
1.1 Примена метала у медицини и лечењу обољења тумора	1
1.2 Комплекси паладијума(II) као потенцијални антитуморни агенси	4
1.3 Интеракција комплекса прелазних метала са дезоксирибонуклеинским киселинама DNK	11
1.4 Интеракције са протеинима	17
1.5 Киселине оксамидног и маламидног типа	22
1.6 Рачунарска хемија	28
1.6.1 Молекулска механика	29
1.6.2 Квантна механика	31
1.6.3 Молекулска динамика	32
2. ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА	35
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	36
3.1 Хемикалије и реагенси	36
3.2 Синтезе нових једињења	37
3.2.1 Калијум-(2,2'-[1,3-диоксопропан- 1,3диил)диимино]диацетато) паладијум(II) хидрат, K ₂ [Pd(mda)] · H ₂ O комплекс (1)	37

3.2.2 Калијум-(3,3'-[1,2-диоксоетан-1,2-диил)диимино]дипропионато)паладијум(II), $K_2[Pd(obb)]$ комплекс (2)	37
3.2.3 [N,N'-bis(3-аминопропил)етандиамидо] паладијум(II), [Pd(арох)] комплекс (3)	38
3.2.4 Калијум-хидроген 2-({[(3-аминопропил)амино](оксо)ацетил}амино)бензоато) трихидрат, $KH[Pd(obb)]_2 \cdot 3H_2O$ комплекс (4)	38
3.2.5 Дикалијум 2,2'-[(1,2-диоксоетан-1,2-диил)диимино] дибензоат, K_2H_2obbz (5)	38
3.2.6 3,3'-[(1,3-диоксопропан-1,3-диил)диимино] дипропанска киселина, H_4mdp (6)	39
3.2.7 Калијум-(2,2'-[(1,2-диоксоетан-1,2-диил)диимино] дибензоато) паладијум(II), $K_2[Pd(obbz)]$ (7)	39
3.2.8 Калијум-(3,3'-[(1,3-диоксопропан-1,3-диил)диимино] дипропионато)паладијум(II)-хидрат $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ (8)	39
3.3 Инструменти коришћени у анализама и испитивањима	40
3.4 Потенциометријска мерења	40
3.5 Спектрофотометријска мерења	42
3.6 Флуоресцентна мерења	43
3.7 МТТ тест цитотоксичности	44
3.8 Третман ћелија за детекцију апоптозе	45
3.8.1 Annexin V-FITC/7-AAD тест за одређивање апоптозе и некрозе проточном цитометријом	45
3.8.2 Детекција апоптозе акридин оранж/етидијум бромид двоструким бојењем	45
3.9 Western blot анализа	46
3.10 Анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом	47
3.11 Рачунарске методе	47
3.11.1 Квантна механика	47
3.11.2 Докинг метода	48

3.12 MM/MD и QM/MM/MD симулације	49
3.12.1 QM/MM	52
3.13 Рендгенска структурна анализа	53
3.13.1 Рендгенска структурна анализа H_4obbz лиганда (5)	53
3.13.2 Рендгенска структурна анализа $K_2[Pd(mda)] \cdot H_2O$ комплекса (1)	53
3.13.3 Рендгенска структурна анализа $KH[Pd(обар)]_2 \cdot 3H_2O$ комплекса (4)	54
3.13.4 Рендгенска структурна анализа $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ комплекса (8)	55
4. РЕЗУЛТАТИ	57
4.1 Синтеза амидних лиганда оксалне и малонске киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II)	57
4.2 Рендгенска структурна анализа синтетисаних једињења	60
4.3 Хемија водених раствора наших система	62
4.3.1 Константе протоновања синтетисаних лиганда и нуклеозидних анјона и константе формирања одговарајућих комплекса са јоном паладијума(II)	62
4.3.2 Хемијско-биолошка испитивања	63
4.3.2.1 Флуоресцентна спектроскопија	64
4.3.2.2 UV/Vis спектроскопија	65
4.4 <i>In vitro</i> цитотоксична активност	66
4.4.1 МТТ тест цитотоксичности	66
4.4.2 Western blot анализа	68
4.4.3 Ефекат H_4obbz и $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ једињења на апоптозу HeLa ћелијске линије	68
4.4.4 Проточна цитометрија	69
4.4.4.1 V/7-AAD бојени тест	69
4.4.4.2 Утицај $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz на поделу ћелијског циклуса HeLa ћелија 48 h	70
4.5 Докинг молекулска симулација	71
4.5.1 Понашање $[PdL]^{2-/-}$ комплекса према DNK	72

4.5.2 Понашање $[PdL]^{2-/-}$ комплекса према шаперонима	73
4.6 Молекулска динамика и резистентност ћелија	73
5. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА	77
5.1 Спектрални подаци синтетисаних лиганата и одговарајућих комплекса паладијума(II)	77
5.2 Рендгенска структурна анализа синтетисаних једињења	79
5.2.1 K_2H_2obbz лиганд	79
5.2.2 $K_2[Pd(mda)] \cdot H_2O$ комплекс	80
5.2.3 $KH[Pd(obap)]_2 \cdot 3H_2O$ комплекс	80
5.2.4 $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ комплекс	81
5.3 Хемија водених раствора	81
5.3.1 Константе протоновања синтетисаних лиганата и нуклеозидних анјона и константе формирања одговарајућих комплекса са јоном паладијума(II)	81
5.3.2 Формирање мешовитих комплекса паладијума(II) са <i>mda</i> и <i>Guo</i> , или <i>obap</i> , <i>арох</i> и <i>Ado</i> или <i>Cyt</i> као лигандима	86
5.3.3 Хемијско-биолошка испитивања	89
5.3.3.1 Интеракције са HSA протеином	89
5.3.3.2 Интеракције са DNK молекулом	90
5.3.4 UV-Vis спектроскопија	91
5.3.4.1 Интеракције са DNK молекулом	91
5.4 <i>In vitro</i> антитуморна активност	94
5.4.1 МТТ тест цитотоксичности и Вестерн Блот анализа	94
5.4.2 Проточна цитометрија	96
5.4.2.1 Annexin V/7-AAD бојени тест	96
5.4.2.2 H_4obbz и $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ индукују G0/G1 застој ћелијског циклуса у HeLa ћелијској линији	97
5.5 Докинг молекулска симулација	99
5.5.1 Понашање $[PdL]^{2-/-}$ комплекса према DNK	99
5.5.2 Понашање $[PdL]^{2-/-}$ ка шаперонима	102
5.6 Молекулска динамика и резистентност ћелија	104

6. ЗАКЉУЧАК	108
ЛИТЕРАТУРА	111
БИОГРАФИЈА	
СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА	

Скраћенице

DNK	Дезоксирибонуклеинска киселина
DACH	1,2-диаминциклохексан
NADH	Никотинамид аденин динуклеотид (редуковани)
NAD ⁺	Никотинамид аденин динуклеотид (оксидовани)
5'-GMP	Гуанозин-5'-монофосфат
5'-IMP	Инозин-5'-монофосфат
¹ H NMR	Протонска нуклеарна магнетна резонанца
CT-DNK	Дезоксирибонуклеинска киселина изолована из тимуса телета
UV-Vis	Ултра-љубичаста-видљива спектроскопија
HSA	Хумани серум албумина
ER	Ендоплазматични ректикулум
LDH	Лактат дехидрогеназа
HF	Харти Фок
DFT	Теорија функционала густине
MM	Молекулска механика
QM	Квантна механика
MM/QM	Молекулска механика/квантна механика
QM/MM/MD	Квантна механика/молекулска механика/молекулска динамика
IR	Инфра-црвени
¹³ C NMR	Угљеник-13 нуклеарна магнетна резонанца
IC50	Концентрација једињења која инхибира раст ћелије за 50% у поређењу са нетретираном контролом
PBS	Раствор фосфатног пуфера
V-FITC/7-AAD	<i>FITC</i> Анексин <i>V</i> кит за детекцију апоптозе са <i>7-AAD</i>
EB	Етидијум бромид
WB	Бестерн Блот
NMA	Нормалан начин анализе
RMSD	Квадратни корен средње девијације
Atox1	Антиоксидант 1 шаперон бакра

Слике

Слика 1.	Структуре комплекса платине са применом у клиничкој пракси	2
Слика 2.	Један од првих примера <i>trans</i> -паладијум(II) комплекса	6
Слика 3.	Структура паладијум(II) комплекса са дериватима 1,10-фенантролина	6
Слика 4.	Општа формула тиосемикарбазона	8
Слика 5.	Структуре антитуморних лекова	10
Слика 6.	Структуре првих примера паладоцикличних комплекса са бипиридином и фенантролином	11
Слика 7.	Конформације DNK: А- DNK (А); Десни хеликс (Б); Леви хеликс (В)	12
Слика 8.	Интра- и интер-ланчане везе цисплатине у молекулу DNK	13
Слика 9.	Механизам дејства цисплатине	14
Слика 10.	Хумани серум албумина (HSA)	19
Слика 11.	<i>bis</i> -ацетилацетонато паладијум(II), Pd(acac) ₂	21
Слика 12.	Структуре оксалне и малонске киселине	22
Слика 13.	Анјон диамида оксалне киселине	23
Слика 14.	<i>Cis</i> и <i>trans</i> конформациони изомери оксамида	23
Слика 15.	Структуре редокс <i>innocent</i> (А) и редокс <i>non-innocent</i> (Б) лиганда ...	26
Слика 16.	Ортер дијаграм молекулске структуре и паковања кристала (а) комплекса, K ₂ [Pd(mda)] · H ₂ O (1); паковање кристала унутар јединичне ћелије (b) комплекса, KН[Pd(обар)] ₂ · 3H ₂ O (4); паковање кристала	61
Слика 17.	Ортер дијаграм молекулске структуре и паковања кристала (а) лиганда, K ₂ H ₂ obbz (5a); паковање кристала дуж с осе и (b) комплекса, K ₂ [Pd(mdp)] · H ₂ O (8); паковање кристала дуж осе а	62
Слика 18.	десно: Експресија протеина апоптозом-испитивана Вестерн блот анализом, лево: Графички приказ дензитометрије података експресије протеина добијене WB анализом и обрађен ImageJ компјутерским програмом А: Нетретиране ћелије (контролни узорак)	69

- Слика 19. Различити подскупови апоптотских ћелија мерени АО/ЕВ флуоресцентним бојењем. HeLa ћелије су третиране са IC50 концентрацијама $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz 48 h. Вијабилне ћелије (VC) имају зелена једра дефинисане структуре, рано апоптотске ћелије (EA) имају светло зелена и касно апоптотске ћелије (LA) светло наранџаста до црвена једра кондензованог или фрагментисаног хроматина 70
- Слика 20. ММ MD систем који се састоји од Atox1 димера (преузето из референце [237]) и паладијум(II) комплекса (докован између два Atox1 мономера применом Аутодока [181]) 74
- Слика 21. RMSD вредности паладијум(II) комплекса и целог система дуж 10 и 3 трајекторија ММ MD и QM/MM MD динамике 75
- Слика 22. 1H NMR и ^{13}C NMR спектри H_4mdp лиганда и $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ комплекса 79
- Слика 23. Дистрибуциони дијаграм: Pd-mda и Pd-obr врста у односу концентрација = 2:1 и укупној концентрацији паладијума 2,5 mM ... 83
- Слика 24. Дистрибуциони дијаграм: Pd-mdp врста у односу концентрација = 2:1 и укупној концентрацији паладијума 2,5 mM 84
- Слика 25. Дистрибуциони дијаграми [Pd(A)] врста, A = Guo, Ado и Cyt 85
- Слика 26. Дистрибуциони дијаграм [Pd(mda)(Guo)] комплекса за концентрациони однос $[Pd]/[mda]/[Guo] = 1:1:1$ и са укупном концентрацијом паладијума од 1 mM 86
- Слика 27. Дистрибуциони дијаграми [Pd(obap(Ado))] и [Pd((obap)(Cyt))] за концентрациони однос $[Pd]/[(obap)]/[Ado/Cyt] = 1:1:1$ и са укупном концентрацијом паладијума од 1 mM 87
- Слика 28. Дистрибуциони дијаграми [Pd(арох(Cyt))] и [Pd(арох)(Ado)] за концентрациони однос $[Pd]/[(арох)]/[Ado/Cyt] = 1:1:1$ и са укупном концентрацијом паладијума од 1 mM 88
- Слика 29. Емисиони спектар HSA у присуству различитих $[Pd(mdp)]^{2-}$ концентрација (T = 298 K, pH = 7,4). [HSA] = 2,0 μ M, (a-h): 0,0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 8,0 и Стерн-Волмеров дијаграм 90
- Слика 30. **(А-лево)** Флуоресцентни емисиони спектар DNK у одсуству (испрекидана линија) и присуству растуће количине $[Pd(L)]^{2-/-}$

- (обојена пуна линија). Стерн-Волмерови дијаграми; **(Б-десно)** Флуоресцентни емисиони спектар DNK (---) и EB-DNK (---) у одсуству и присуству растуће количине $[Pd(L)]^{2-/-}$ (обојена пуна линија). Стерн-Волмеров дијаграми 92
- Слика 31. Апсорциони спектри $[Pd(L)]^{2-/-}$ комплекса ($4,0 \cdot 10^{-5}$ M) у одсуству и присуству растуће количине DNK: $r = 0,0-1,2$. Дијаграм $[DNK]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ са $[DNK]$ 93
- Слика 32. Осетљивост HeLa ћелијске линије испитивана МТТ тестом на комерцијалне лекове Pt и испитиване комплексе Pd 95
- Слика 33. Annexin V-FITC/7-AAD детекција апоптозе проточном цитометријом. (А-С) Тачкице на дијаграму илуструју дистрибуцију вијабилних, ћелија ране апоптозе, касне апоптозе и некротичних ћелија у нетретираној контроли (С) и третираних $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz HeLa ћелија. Доњи леви квадрант одговара Annexin V-7-AAD-вијабилним ћелијама, доњи десни Annexin V+7-AAD-ћелијама ране апоптозе (ЕА), горњи десни угао Annexin V+7-AAD-ћелијама касне апоптозе (LА) и горњи леви угао Annexin V-7-AAD-некротичним ћелијама (NC). (D) Процент апоптотских и некротичних ћелија у контроли и третираним ћелијама су просек три независна експеримента 97
- Слика 34. Анализа ћелијског циклуса. (А-С) Хистограми представљају три независна експеримента и демонстрирају дистрибуцију ћелијског циклуса унутар нетретиране контроле (С) и третираних $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz HeLa ћелија. (D) Оба једињења индукују упоредив пад у S фази и пораст у G0/G1 фази ћелијског циклуса 99
- Слика 35. Предпостављени начин везивања $[PdL]^{2-}$ комплекса за везивно место DNK додекамера код 1AIO (А) и 29-мер DNK/10-мер RNK код 3M3Y (В) 101
- Слика 36. 3D $[Pd(обар)]^{7-}/12$ -мер интеракције (заједно са мапом електростатичке површине) и шематски дијаграм $[Pd(обар)]^{7-}$ и $[Pd(mda)]^{2-}$ -DNK главних интермолекулских интеракција 102

Слика 37.	3D [Pd(обар)] ⁻ /HSP интеракције: (а) и (с) представљају Grp78 и (b) и (d) представљају Hsc70	104
Слика 38.	(а) Конформација Atox1-[Pd(mdp)] ²⁻ -Atox1 након 900 ps QM(PM6)/MD прорачуна; (б) Оптимизоване и преклопљене структуре [Pd(mdp)(CYS11)] ²⁻ комплекса узетог из QM и QM/MM прорачуна	106
Слика 39.	PM6 и B3LYP/SDD оптимизовани фрагмент средње Atox1-[Pd(L)] ⁿ⁻ -Atox1 конформације узете из три QM/MD трајекторије	107
Слика 40.	Највероватнији механизам дејства лека према ћелијама тумора	110

Шеме

Шема 1.	Шифове базе 1, 2 ; Аминоалкохоли 3, 4	8
Шема 2.	Начини везивања N,N' -bis-супституисаних оксамида	26
Шема 3.	Структуре неких лиганата маламидног типа	28
Шема 4.	Модел молекулске симулације	34
Шема 5.	Синтеза тетрадентатних H_4mda и H_4obr лиганата и одговарајућих комплекса паладијума(II)	57
Шема 6.	Синтеза тетрадентатних H_3obar и H_2aroh лиганата и одговарајућих комплекса паладијума(II)	58
Шема 7.	Синтеза H_4obbz и H_4mbr лиганата и одговарајућих комплекса паладијума(II)	59

Табеле

Табела 1.	Основни кристалографски подаци и параметри рафинисања структуре K_2H_2obbz лиганда	53
Табела 2.	Основни кристалографски подаци и параметри рафинисања структуре комплекса $K_2[Pd(mda)] \cdot H_2O$	54
Табела 3.	Кристалографски подаци и параметри рафинисања су наведени структуре комплекса $KH[Pd(обар)]_2 \cdot 3H_2O$	55
Табела 4.	Кристалографски подаци и параметри рафинисања структуре комплекса $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$	56
Табела 5.	Резултати елементалне микроанализе синтетисаних једињења	60
Табела 6.	Дужине (\AA) и углови ($^\circ$) веза синтетисаних паладијум(II) комплекса и K_2H_2obbz лиганда	61
Табела 7.	Константе протоновања лиганада L (mda, обр, mdp, обар, арох или A) и константе стабилности бинарних система PdL (mda, обр, mdp, обар, арох или A) на $25^\circ C$ у 0,1 M NaCl	63
Табела 8.	Константе стабилности тернарних комплекса Pd(II), M = Pd(II), L = mda, обар или арох и A = Guo, Ado или Cyt ($25^\circ C$ и I = 0,10 M NaCl)	64
Табела 9.	Параметри гашења флуоресценције и параметри везивања код интеракције комплекса [PdL] са хуманим серумским албумином (HSA) .	64
Табела 10.	Константе везивања DNK (K_b) и број везивних места (n) за комплексе [PdL] (L = mdp, mda, обар)	65
Табела 11.	Константе везивања DNK (K_b) и Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) за комплексе [PdL] (L = mdp, mda и обар) израчунате на основу UV-Vis спектра	65
Табела 12.	Цитотоксична активност лиганада и комплекса <i>in vitro</i> са IC50 вредностима (μM) ^a	67
Табела 13.	Јачина интеракције (слободне енергије везивања (ΔG) и константе инхибиције (K_i)) и главна структурна својства везивног Z додекамера 1AIO предвиђеног молекулским доковањем	72
Табела 14.	Докинг резултати [PdL] ^{2-/-} комплекса и различитих лиганада према DNK и HSP протеинима	73
Табела 15.	ΔG вредности добијене MMPBSA и MMGBSA анализом ^a	76

ИЗВОД

У оквиру ове дисертације синтетисани су паладијум(II) комплекси са хелатним лигандима амидног типа. Синтетисани су деривати диамида малонске и оксалне киселине са аминокиселинским остацима, остацима антранилне киселине или пропандиаминским остацима везаним за обе стране амидне јединице. Деривати оксалне киселине: (3,3'-[1,2-диоксоетан-1,2-диил]диимино] дипропионска киселина) (H_4obp); (N,N' -bis(3-аминопропил) етандиаמיד) ($H_2арох$); (2-({[(3-аминопропил)амино] (оксо)ацетил}амино) бензоева киселина) ($H_3obар$); (2,2'-[1,2-диоксоетан-1,2-диил]диимино] (H_4obbz) и малонске киселине: (2,2'-[1,3-диоксопропан-1,3-диил]диимино] дисирћетна киселина) (H_4mda) и 3,3'- [(1,3-диоксопропан-1,3-диил]диимино] дипропанска киселина (H_4mdp) су коришћени за синтезу и испитивање биолошке активности одговарајућих паладијум(II) комплекса.

Прва фаза дисертације подразумевала је примену потенциометријских метода у циљу испитивања стабилности водених раствора самих лиганата, смеше паладијум(II) јона и одговарајућих лиганата у различитим концентрационим односима, као и Pd-L-A система да би се испитао утицај бинарних комплекса [PdL] на нуклеозиде који улазе у састав DNK. Испитивање интеракција синтетисаних једињења и молекула HSA и DNK вршено је применом флуоресцентне и апсорпционе спектроскопије. Добијени резултати су показали да постоји добро везивање наших система са биолошки значајним молекулима, што нас је довело до следеће фазе која је подразумевала *in vitro* експерименте.

Биолошка активност ових једињења *in vitro* испитана је применом МТТ теста цитотоксичности и метода за детекцију апоптозе. Експериментално добијени резултати су у сагласности са теоријским и указују да биолошка активност комплекса паладијума(II) веома зависи од структуре азот-кисеоник доворских лиганата. Највећу осетљивост је показала HeLa ћелијска линија, а посебно када су у питању $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz једињења.

Недавне студије су показале да се код неких паладијум(II) комплекса са хелат О-донорским лигандима може очекивати да индукују ER стрес и једру независну сигнализацију апоптозе. У складу са тим испитиван је (теоријски и експериментално) потенцијални механизам деловања лека који подразумева интеракције HSP протеина (протеин топлотног шока) и шаперона (Grp78 из ендоплазматског ретикулума (ER) и Hsc70 из цитосола) и $[Pd(L)]^{n-}$ јединице испитиваних система. Између одабраних макромолекула, где су наши комплекси рачунски симулирани, група шаперон протеина (Grp78 из ER и Hsc70 из цитосола) су се показали као бољи домаћини од олигонуклеотида (DNK). Такође, Вестерн Блот анализа проналази да је експресија Bcl-2 протеина и цепање PARP у складу са нашим претпоставкама.

Анализа ћелијског циклуса вршена је применом електрофоретске Вестерн блот анализе и проточне цитометрије. Резултати су показали да антитуморна активност паладијум(II) комплекса са различитим врстама лиганата на HeLa хуманим ћелијама изазивају апоптозу на каспаза-зависан начин. Такође, испитиван је потенцијални механизам дејства $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz једињења на малигној HeLa ћелијској линији. Резултати су показали да тестирана једињења индукују апоптозу у великом проценту испитиваних ћелија. Поред тога, прогресија ћелијског циклуса HeLa ћелија третираних овим једињењима показују заустављање синтезе DNK и повећање ћелијске популације у G0/G1 фази као могући механизам који покреће апоптозу.

На крају, применом класичне и QM/MM молекулске динамике истражене су конформационе промене, слободне енергије везивања лиганата-рецептора и њихове ковалентне интеракције и предложен механизам дејства испитиваних система. Утврђена је приметна корелација између IC50 (токсичност) и ΔG (слободне везивне енергије) вредности код синтетисаних једињења.

На основу добијених резултата, пре свега када су у питању $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и $K_2[Pd(mda)] \cdot H_2O$ комплекси, у плану је следећа фаза испитивања фармаколошких својстава паладијумових лекова.

SUMMARY

As part of this thesis palladium(II) complexes were synthesized with chelate amide type ligands. There were synthesized the derivatives of malonic and oxalic acid from the amino acid residues, residues of an anthranilic acid or propandiamine residues bounded to both sides of the amide units. Oxalic acid derivatives: (3,3'-[1,2-dioksoethane-1,2diy]diamines] dipropionic acid) (H₄obp); (N,N'-bis(3-aminopropyl)ethanediamide) H₂apox); (2-(((3-aminopropyl)amino] (oxo)acetyl} amino)benzoic acid) (H₃obap), (2,2'-[(1,2-dioksoetan-1,2-diy]diamines] (H₄obbz) and malonic acid: (2,2'-[1,3-dioksopropan-1,3diy]diamines] diacetic acid) (H₄mda) and 3,3'-[(1,3-dioksopropan-1,3-diy]diamines] dipropionic acid (H₄mdp), the ligands were prepared and used for synthesis and biology tests of the corresponding palladium(II) complexes.

The first phase of this thesis, involved the application of potentiometric methods in order to investigate the stability of aqueous solutions of ligands, a mixture of palladium(II) ions and the corresponding ligands in different relations of concentration, and Pd-L-A system in order to investigate the effect of binary complexes [PdL] to nucleosides entering in DNA. The fluorescent and absorption spectroscopy were used to see interactions of the synthesized compounds and HSA and DNA molecules. The results showed that there is a good binding of our system with biologically significant molecules, which led us to the next phase, involving the *in vitro* experiments.

The *in vitro* biological activity of these compounds was examined by the MTT cytotoxicity assay and methods for detecting apoptosis. Experimental results correspond with theoretical and indicate that the biological activity of the palladium(II) compounds is highly dependent on the structure of the nitrogen-oxygen donor ligands. HeLa cell line has been shown the highest sensitivity, especially in the case of K₂[Pd(mdp)] · H₂O and H₄obbz compounds.

Recent studies have shown that some palladium(II) complexes with chelating O-donor ligands may be expected to induce an ER stress and core independent apoptosis signaling. Accordingly, it was investigated (theoretically and experimentally) a potential mechanism of drug action which involves the interaction of proteins HSP (heat shock protein) and the chaperone (Grp78 from the endoplasmic reticulum (ER) and HSC70 from the cytosol) and [Pd(L)]ⁿ units. Between chosen macromolecules, where our compounds were computationally

simulated, the group of chaperon proteins (Grp78 from ER and Hsc70 from cytosol) have evinced as better hosts than oligonucleotides (DNA). Also, Western Blot analysis found that the expression of Bcl-2 protein and the cleavage of PARP are in accordance with our assumptions.

Analysis of cell cycle was performed by method of electrophoretic analysis of the Western blot and flow cytometry. The results showed that the antitumor activity of palladium(II) complexes with different types of ligands on the HeLa human cells induce apoptosis in caspase-dependent manner. Also, it was examined a potential mechanism of action of $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ and H_4obbz compounds to malignant HeLa cell line. The results showed that the tested compounds induce apoptosis in a large percentage of the examined cells. In addition, the progression of the cell cycle of HeLa cells treated with these compounds, show the stopping of DNA synthesis and an increase of the cell population in the G0/G1 phase as a possible mechanism by which trigger apoptosis.

Finally, classical and QM/MM molecular dynamics were used for studied conformational change, free energy of binding ligands and their receptor-covalent interactions, and proposed mechanism of action of the tested system. There was a noticeable correlation between the IC50 (toxicity) and ΔG (free binding energies) values of the synthesized compounds.

The results, especially when it comes to $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ and $K_2[Pd(mda)] \cdot H_2O$ complexes, indicate the next phase of pharmacological properties of our drugs.

1. ОПШТИ ДЕО

1.1 Примена метала у медицини и лечењу обољења тумора

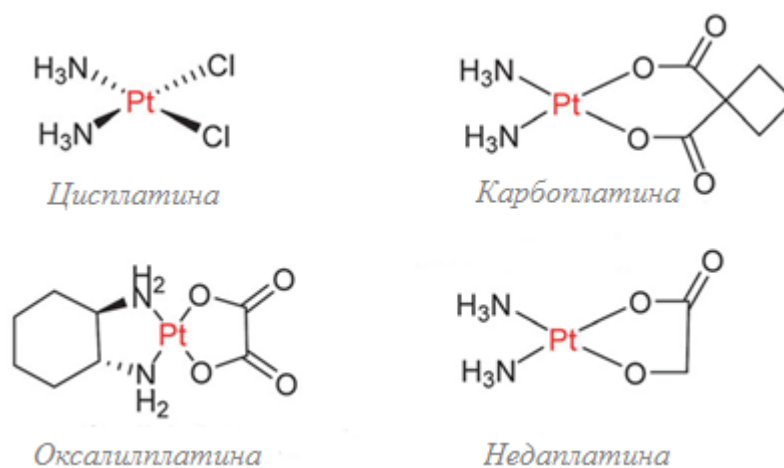
Неколико хиљада година пре нове ере примећена су лековита својства метала. Извештаји о употреби неорганских једињења у лечењу разних болести појавили су се још пре 3500 година када је суспензија рђе (оксид гвожђа) коришћена као лек за импотенцију, а једињења гвожђа за лечење анемије. 2500 година пре нове ере забележена су и прва лековита својства злата. Једињења на бази сребра коришћена су за лечење инфекција, а једињења арсена за лечење сифилиса.

Примена метала у медицини дуго је била под знаком питања због велике токсичности. Велики број био-есенцијалних метала присутних у траговима неопходних за здравље сисара и њихова одступања од нормалних концентрација узрок су разних болести. Ово нас упућује на то да је неопходно успоставити баланс између терапијске користи са једне, и штетних пратећих ефеката са друге стране.

Медицина данас подразумева примену бројних лекова на бази метала за лечење болести различите природе. Тако се, на пример, једињења на бази волфрама користе код пацијената оболелих од сиде [1], једињења хелата користе се у третману Вилсонове болести (тровање бакром) [2], једињења цинка(II) у лечењу херпеса [3], дијететски суплементи на бази калцијума, мангана и селена за поновно успостављање равнотеже у организму, једињења бизмута(III) код гастроинтестиналних поремећаја, за лечење дијабетеса користе се једињења ванадијума, а једињења злата у лечењу реуматоидног артритиса [4]. Једињења на бази метала веома су битна и у дијагностици где се користе као контраст-реагенси. Тако се комплекси на бази Gd(III), Fe(III) и Mn(II) користе у магнетној резонантној спектроскопији [5], а једињења која садрже радиоизотопе ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{57}Co , ^{67}Ga , ^{97}Ru и ^{103}Ru детектују се γ -сцинтилационим камерама [6].

Помак у примени једињења метала у терапији догодио се открићем антитуморне активности цисплатине 1869. године од стране Барнета Розенберга (Barnett Rosenberg). Розенберг је испитујући ефекте деловања електричног поља на процес раста бактерија *Escherichia coli* сасвим случајно дошао до револуционарног открића биолошке

активности формираног једињења платине. Ово једињење зауставља деобу ћелије блокирајући репликацију ДНК, а добијено је у реакцији између платинске електроде и амонијум хлорида из пуфера. *Cis*-диаминдихлоридоплатина(II) (Слика 1) позната је од 1845. године [7,8], с тим да пре 1970. године није било објашњено њено антитуморно дејство [8,9,10]. Више од три деценије након усвајања као хемотерапеутског средства, цисплатина је и даље један од најпродаванијих антитуморних лекова. Користи се у лечењу тумора тестиса, јајника, главе и врата, бешике, грлића материце и рака лимфома [11]. Међутим, примена цисплатине ограничена је бројним недостацима и споредним ефектима које изазива: ефикасна је за ограничен број тумора, неки тумори испољавају стечену или унутрашњу отпорност, доводи до мучнине, нарушавање структуре коштане сржи а иначе је веома токсична [12].



Слика 1. Структуре комплекса платине са применом у клиничкој пракси

Ово је навело научнике широм света да раде на проналажењу лека веће ефикасности и мање токсичности. Синтетисано је на хиљаде комплекса платине који су били тестирани на ћелијским линијама тумора и оцењени као антитуморни агенси, али је само пар дошло у фазу клиничког испитивања. Поред цисплатине одобрени за клиничку примену су и њени директни аналози: карбоплатина (carboplatin) {диамин[1,1-циклобутандикарбоксилато(2)]-О,О'-платина(II)}, оксалилплатина (oxaliplatin) {*cis*-диминциклохексаноксалато(2)-О,О'-платина(II)} [13] и недаплатина (nedaplatin) [*cis*-димин(гликолато-О,О')платина(II)] (у Јапану) [14] (Слика 1).

Упоредо се радило на новим приступима развоја антитуморних агенаса. Ово се пре свега односи на синтезу комплексних једињења који садрже јоне других прелазних метала као што су рутенијум, паладијум, родијум, злато и други.

Охрабрујући резултати добијени су испитивањем Ru(III) комплекса, и то *trans*-[RuCl₄(DMSO)(Im)]ImH (NAMI-A, где је Im = имидазол) [15] и *trans*-[RuCl₄(Ind)₂]IndH (KP1019, где је Ind = индазол) [16] који се налазе у фази клиничког испитивања.

С обзиром на електронску конфигурацију Rh(I), Rh(II) и Rh(III) јона (d⁸, d⁷ и d⁶) и да су изоелектронски са Pt(II), Pt(III) и Pt(IV) јонима очекивало се да и комплекси родијума испоље антитуморну активност. Темељно су испитивани бинуклеарни комплекси родијума(II), чија су физичко-хемијска својства и реактивност такви да припадају групи најперспективнијих антитуморних комплекса [17]. Такође, обећавајућа антитуморна својства карактеришу амидне комплексе родијума [18,19]. Многи од тестираних Rh(III) комплекса показују не само антитуморну већ и антимицробну активност [20,21].

Неки тетраедарски Au(I) фосфински комплекси показали су широк спектар антитуморне активности *in vivo*, посебно на цисплатина резистентним ћелијским линијама [22]. Убрзо након примене цисплатине у клиничкој пракси, Au(III) комплекси који су изоелектронског и изоструктурног карактера са комплексима Pt(II), па самим тим и њени аналози, испитивани су у смислу потенцијалне биолошке активности. Ограничавајући фактор Au(III) комплекса представља њихова нестабилност и чињеница да лако подлежу редукцији под физиолошким условима [23]. Међутим, последњих година синтетисано је неколико Au(III) једињења која укључују лиганде који стабилизују Au(III) центар [24,25].

Откриће антитуморне активности цисплатине и њена широка примена у клиничкој пракси упркос бројним недостацима, довело је до развоја медицинске неорганске хемије. Ово је област која данас завређује највећу пажњу с обзиром на висок проценат популације оболелих од разних врста тумора [26]. Основни принципи на којима се заснивају истраживања су:

(а) комплексирање јонима метала у циљу заштите лека од ензимске деградације (што инертност одређене метал-лиганд везе омогућава),

(б) синтеза комплекса метала бољих хидрофобних/хидрофилних својстава у односу на слободни лиганд. Ово пре свега може унапредити процесе транспорта у ткивима,

(в) Синтеза пролекова, тј. комплекса метала који могу ослободити активни лек у специфичним органима, а истовремено њихова активност може бити појачана комбинацијом ефеката лиганада и остатака из метала.

Истраживачке групе широм света већ деценијама раде на дизајну и синтези потенцијалних метал-базираних лекова [27].

1.2 Комплекси паладијума(II) као потенцијални антитуморни агенси

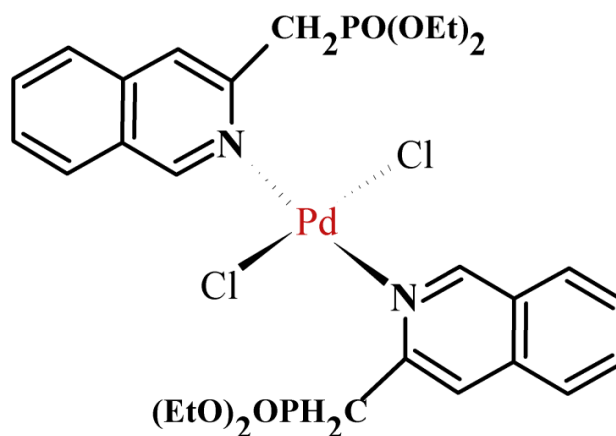
Откриће паладијума веже се за 1803. годину и енглеског хемичара Вилиама Х. Воластона (William H. Wollaston), који је остао анониман све док није успео да схвати и објасни све особине новооткривеног метала [28]. 1805. године Воластон је говорио испред Краљевског друштва у Лондону о својствима новог метала и како може бити изолован из платине. Паладијум је добио име према у то време откривеном астероиду, Палас (Pallas).

Паладијум, чији је атомски број 46, је смеша шест стабилних изотопа присутних у следећим процентима: ^{102}Pd (1,0%), ^{104}Pd (11,1 %), ^{105}Pd (22,3%), ^{106}Pd (27,3%), ^{108}Pd (26,5%) и ^{110}Pd (11,7%). Члан је платинске групе и припада другој серији прелазних метала. Има велику примену у катализаторима за аутомобиле. Користи се као катализатор за реакције хидрогенације/дехидрогенације, као и за краковање нафте. Метал се користи и за израду накита, на пример белог злата (легура злата обезбојена додавањем паладијума), израду сатова, хируршких инструмената, у стоматологији и за израду електричних контаката. Примењује се за пречишћавање водоника јер гас лако дифундује преко загрејаног паладијума.

Открићем антитуморних својстава цисплатине и њеном применом у клиничкој пракси [8] порасло је интересовање према истраживању потенцијално активних комплекса других метала и лиганада. Посвећена је посебна пажња комплексима платинске групе метала, па је у том смислу паладијум(II) посебно интересантан као конституент алтернативних лекова. Ово је сасвим очекивано с обзиром на геометријску сличност као и процесе формирања комплекса паладијума(II) и платине(II). На сличност

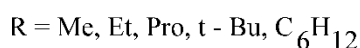
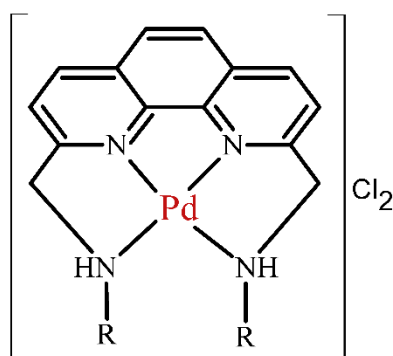
ова два метала у погледу хемијских својстава указује и њихов положај у периодном систему елемената. Њихова најстабилнија оксидациона стања су + 2 и + 4. Оксидационо стање (+ 2) карактерише d^8 електронска конфигурација одговорна за формирање дијамагнетичних квадратно планарних комплекса dsp^2 хибридизације. То је истовремено и уобичајено оксидационо стање у једињењима. Ретко су комплекси пентакоординовани, тригонално бипирамидалне геометрије. Оба метала су окарактерисана као меке Луисове (Lewis) киселине, па самим тим очекивано формирају јаче везе са азот или сумпор доносним лигандима (меке Луисове базе), него са кисеоником као дозором (тврда Луисова база). Примена комплекса паладијума(II) у медицини ограничена је у поређењу са осталим металима. Ово је приписано великој термодинамичкој и кинетичкој лабилности. Степен лабилности у измени лиганда на паладијум центру је знатно виши (10^5 пута) у односу на платину, па отуда и њихова брза хидролиза и процеси који лако доводе до дисоцијације и формирања веома реактивних врста које не могу да достигну своје фармаколошке циљеве [29], што је основни узрок њихове ниже антитуморне активности. Тако награђене реактивне врсте могу да реагују са многим другим биомолекулима присутним у организму, изражавајући високу токсичност. Управо из тих разлога, први комплекси паладијума, *cis*-Pd(NH₃)₂Cl₂ и *cis*-Pd(DACH)₂Cl₂ имали су ниску антитуморну активност у поређењу са одговарајућим комплексима платине [30]. Значајну примену има радиоактивни изотоп паладијума (¹⁰³Pd) у третману брзо растућег тумора простате високог степена [30,31]. Може се закључити да развој потенцијалних антитуморних лекова на бази паладијума подразумева стабилизацију металног центра. Ово се може постићи снажном координацијом лиганда и адекватним избором одлазеће групе, то јест групе која није изразито лабилна како би лек могао да одржи свој структурни интегритет *in vivo* довољно дуго.

Примена гломазних монодентатних лиганда на бази N-донора (меке базе), утицала је захваљујући стерним ефектима на уређење геометрије око паладијум(II) јона у смислу настајања *trans*-комплекса. *Trans*-изомери паладијум(II) комплекса су показали бољу цитотоксичност у односу на *cis*-изомере. Наиме, код једног од првих *trans*-комплекса паладијума је присуство моноетилфосфонатних и диетилфосфонатних остатака довело до настајања комплекса боље растворљивости, самим тим и веће антитуморне активности (Слика 2) [32].



Слика 2. Један од првих примера *trans*-паладијум(II) комплекса

Значајни су такође комплекси паладијума(II) на бази пиридина, анилина, амина, α -диимина, лиганата природних производа [32], као и 1,10-фенантролина [33] због цитотоксичности која је упоредива са цисплатином и њеним аналозима. Претпоставља се да у одређеним случајевима до побољшања цитотоксичне активности долази услед присуства N-H везаног водоника погодног за грађење водоничних веза. Ово омогућава ефективније везивање металних јона са фрагментима нуклеинских киселина који садрже N -донорске лиганде.



Слика 3. Структура паладијум(II) комплекса са дериватима 1,10-фенантролина

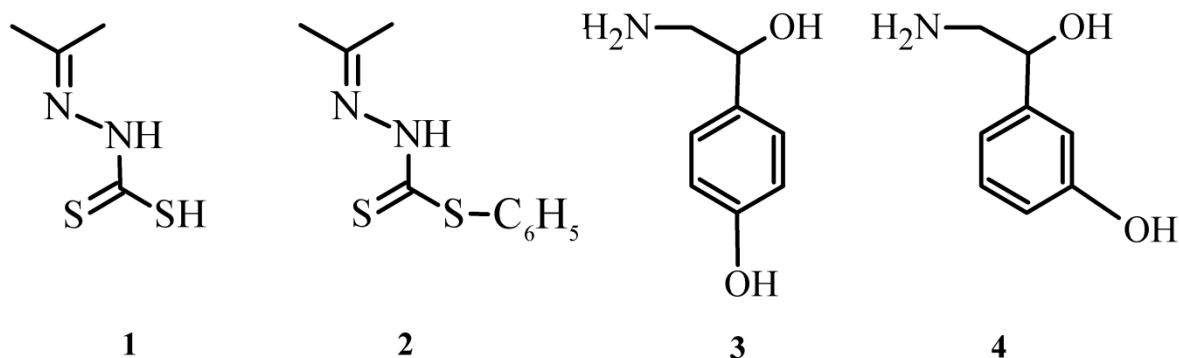
Неки комплекси паладијума(II) са 1,10-фенантролином као лигандом, (мононуклеарни и динуклеарни) показују значајну цитотоксичну активност [34]. Активност мононуклеарних комплекса многоме зависи од структуре (Слика 3), то јест од природе алкил остатка. Повећање липофилности алкил остатка повољно утиче на повећање цитотоксичности комплекса. Ово је сасвим очекивано пошто липофилнији молекули неупоредиво лакше пролазе кроз ћелијску мембрану, па самим тим у већем проценту доспевају до циља.

Градивне јединице протеина који чине чак двадесет посто људског организма (ћелије, мишићи и ткива) су аминокиселине. Битне су за одвијање многих важних телесних функција. Њихова структура је таква да у воденом раствору веома тешко подлежу дисоцијацији, што је један од кључних разлога за њихову успешну примену у координовању јона прелазних метала. Лиганди овог типа показали су веома битан стабилизациони ефекат на иначе лабилан паладијум(II) јон [33].

Дас (Das) и Ливингстон (Livingstone) [35] сугерисали су синтезу S,N-хелатних комплекса паладијума(II), као потенцијалних антитуморних агенаса. Објашњење су базирали првенствено на томе да S,N хелати не подлежу хидролизи лако. Коришћење лиганата који поседују такве особине је довело до побољшања антитуморне активности комплекса. Такође, слични ефекти су запажени код лиганата чија липофилност дозвољава лакши пролаз комплекса кроз ћелијску мембрану.

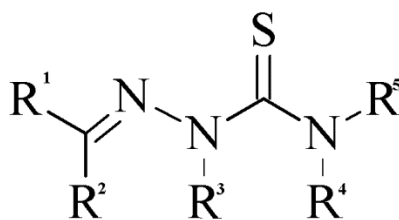
Тренутно је у фази испитивања потенцијална улога лиганата на бази сумпора као хемопротектанта при хемотерапији платинским лековима. Посебно су тиокарбонил, тиол и дитиокарбамати показали способност да ублаже нефротоксичне ефекте цисплатине [36]. Дитиокарбамати утичу на повећање стабилности различитих оксидационих стања јона прелазних метала [37]. Смањење цитотоксичних ефеката лекова на бази платине се заснива на селективном уклањању платине из ензим-тиол комплекса, а заснива се на нуклеофилном нападу атома сумпора на платински остатак. Они имају потенцијал да заштите здрава ткива без утицаја на цитотоксичну активност основних лекова [38].

Цитотоксичност упоредива са цитотоксичношћу цисплатине добијена је код неких комплекса паладијума са Шифовим базама (Шема 1-1,2) и дитиокарбаматима третираним аминоалкохолима као лигандима (Шема 1-3,4) [39].



Шема 1. Шифове базе 1, 2; Аминоалкохоли 3,4

Обећавајућу антитуморну активност показали су комплекси паладијума(II) са тиосемикарбазонима као лигандима (Слика 4). Њихова антитуморна активност у многоме зависи од типа ћелија тумора, што чини целу класу једињења врло занимљивом јер указује на селективност. Истовремено, тешко је извући из литературе опште закључке за целу класу једињења јер њихова активност свакако има више од једне потенцијалне мете у ћелији. Јон метала утиче на повећање активности или доприноси ублажавању споредних ефеката самог лиганда [40].



Слика 4. Општа формула тиосемикарбазона

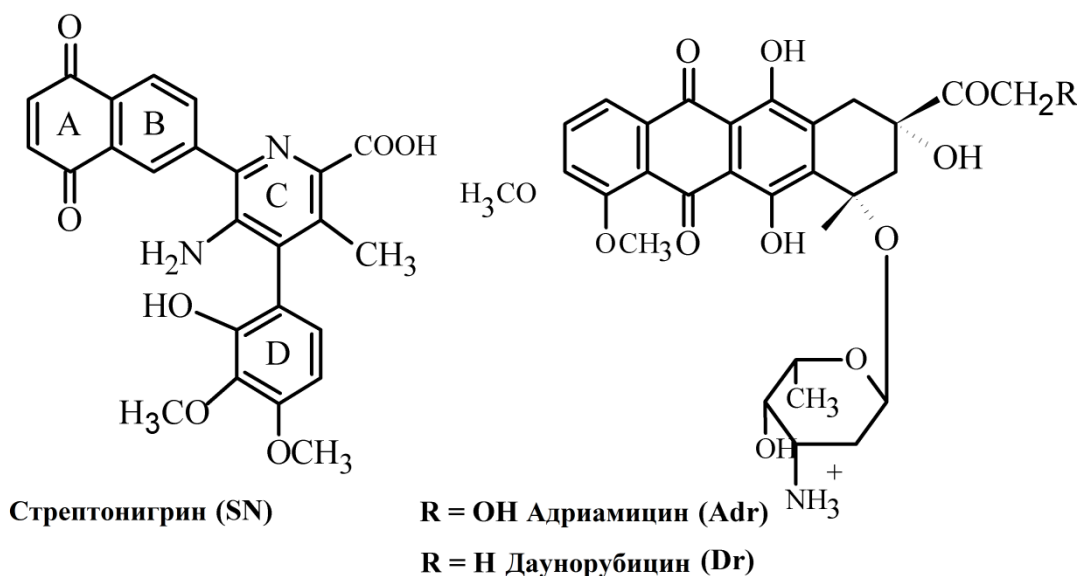
Комплекси паладијума са лигандима овог типа на разним ћелијским линијама, показали су антитуморну активност сличну или чак већу од цисплатине и аналога [39].

Напредак у развоју нових комплекса паладијума(II) које карактерише значајна цитотоксична активност са смањеним нежељеним ефектима постигнута је коришћењем

аминских лиганата. 1980-их, Гил (Gill) и Патраја (Puthraya) са сарадницима [29,41] синтетисали су неколико паладијум(II) комплекса са аминоклидима, који су показали активност упоредиву или већу од цисплатине. Резултати указују на добру растворљивост комплекса у води и слабији ефекат нефротоксичности. Ови комплекси би могли имати потенцијалну примену у терапији гастроинтестиналних тумора. Паладијум(II) комплекси са неутралним лигандима као што су амини, пиримидин, пиридин и арил групе показали су антипролиферативну и/или антитуморну активност [42].

Веома је битно поменути и комплексе паладијума(II) са цитотоксичним лековима, Стрептонирином (Streptonigrin, SN) и Адриамицином (Adriamycin, Adr) као типичним представницима ових лекова. Примена Стрептонирина (SN, Слика 5) у својству антитуморног агенса је ограничена и поред изражених цитотоксичних својстава. Ограничење је приписано великој токсичности. Стрептонирин редукован *in situ* од стране NADH индукује једноланчано цепање у кружној ДНК. Ово цепање укључује кисеоник и комплексе јона метала који су хелатирани антитуморним лековима. Праћењем реакције оксидације NADH кисеоником, а катализоване Pd(II)-SN комплексом, закључено је да је у одсуству кисеоника Pd(II)-SN комплекс у стању да катализује оксидацију NADH, док слободан Стрептонирин није у стању да то уради у одсуству NADH дехидрогеназе [33].

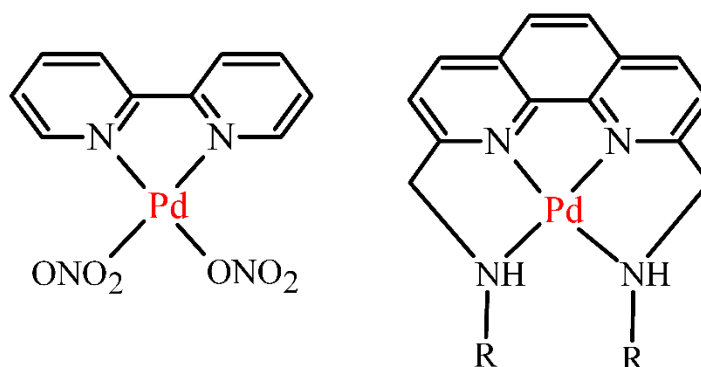
Антрациклични антибиотици, Адриамицин (Adriamycin (Adr)) и Даунорубицин (daunorubicin (Dr)) (Слика 5), имају велику примену у третману различитих тумора. Адриамицин је антитуморни агенс разноврсног клиничког дејства. Његову примену ограничава акутна и хронична токсичност. Кардиотоксичност као резултат хроничне токсичности ограничава трајање терапије, а самим тим и трајање ремисија у неким ситуацијама. Заправо, Adr у присуству NADH дехидрогеназе на дозно зависан начин повећава формирање супероксида који прати кинетику засићења, тј. показује око 50% од ефекта изазваног слободним леком. Комплекс (Adr:Pd(II) = 2:2) за разлику од слободног лека не катализује проток електрона од NADH до молекулског кисеоника преко NADH дехидрогеназе. Ово указује на побољшање терапеутског индекса лека кроз комплексирање са паладијум(II) јоном [33].



Слика 5. Структуре антитуморних лекова

Значајна група једињења у смислу потенцијалних антитуморних агенаса су паладоциклични комплекси. Координацијом атома метала са различитим мултидентатним лигандима добијају се мононуклеарни комплекси циклопаладата. У зависности од присутног јона метала мултидентатни лиганди имају способност прилагођавања својих стерних и електронских својстава. Очекивано, и у овом случају су од посебне важности N донорски лиганди, пре свега *N,N'*-бидентатно координовани. Истакнуту важност имају комплекси паладијума са 2,2'-бипиридином и 1,10-фенантролином као основним лигандима (Слика 6), али и њиховим модификацијама које су постигнуте увођењем различитих супституената. Ово су и првосинтетисани комплекси са поменутиим лигандима. Резултати указују да цитотоксична активност варира у зависности од присутних супституената [32].

Синтетисани су и бројни комплекси са сумпор донорским лигандима. Запажену антипролиферативну активност показали су са лигандима на бази дитиокарбамата. У случају ових комплекса остварује се *S,S*-координација захваљујући способности лиганада да награде изразито стабилне везе са прелазним металима. Испитивана цитотоксичност синтетисаних мононуклеарних, динуклеарних, тетрануклеарних, као и хетеробинуклеарних циклопаладата указује на то да су тетра- и ди-нуклеарни комплекси знатно цитотоксичнији у односу на мононуклеарне.



Слика 6. Структуре првих примера паладоцикличних комплекса са бипиридином и фенантролином

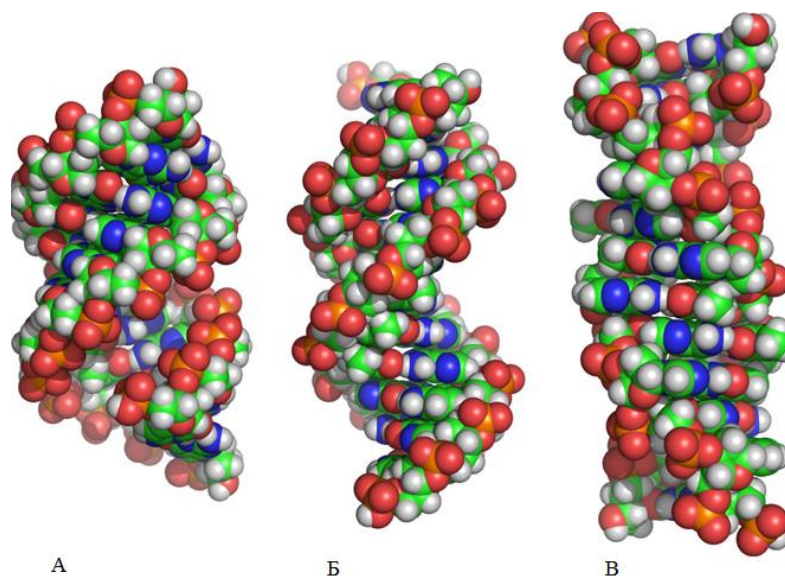
Хетеробиметални паладоциклични комплекси су показали бољу цитотоксичну активност у поређењу са хомобиметалним комплексима. Ово се пре свега односи на платина-паладијум системе, а објашњава се потенцијално већом способношћу генерисања моћнијих линија одбране за разноврсне ћелијске линије тумора [32].

Сви досадашњи резултати говоре у прилог потенцијалне примене комплекса паладијума(II) у лечењу обољења тумора. У том смислу, унапређење као основни и највећи задатак поставља дизајнирање самих система. Пре свега, будући комплекси паладијума(II) требало би да буду одличне растворљивости, стабилности, изражене липофилности у биолошким системима, као и да изазивају минималне споредне ефекте. Посебно је битно водити рачуна о избору лиганда као кључних елемената који могу довести до постизања наведеног. Неопходно је посветити се и темељном испитивању и утврђивању механизма њиховог дејства.

1.3 Интеракција комплекса прелазних метала са дезоксирибонуклеинским киселинама DNK

Значајан биополимер у организму човека је молекул DNK. При физиолошким условима (релативно висока хидратација и ниска јонска сила) формира различите конформације као последица интеракција унутар молекула (Слика 7). Најзаступљенији конформер је десни хеликс DNK, познат као B-DNK (Слика 7, Б). Ово је истовремено и

прва описана структура ДНК од стране Вотсона (Watson) и Крика (Crick) 1953 [43]. У окружењу релативно ниске хидратације ДНК усваја конформацију А која је доста шира и компактнија (Слика 7, А), док се у растворима високе јонске јачине ($\geq 2,5$ М NaCl) јавља Z-ДНК (Слика 7, В), односно лево оријентисани двоструки хеликс [44,45].



Слика 7. Конформације ДНК: А-ДНК (А); Десни хеликс (Б); Леви хеликс (В)

Улога ДНК је чување и преношење кодираних генетских података, што подразумева репликацију, транскрипцију или обраду као РНК и превођење у протеине. Ови процеси су иницирани, регулисани и раскинути молекулима који се на карактеристичне начине везују за одређена места у нуклеинским киселинама, попут атома кисеоника из фосфатних група или атома кисеоника и азота из пуринских и пиримидинских база. У складу са тим, синтетички молекули који реагују са нуклеинским киселинама имају потенцијалну примену као биофизички и терапеутски агенси [46].

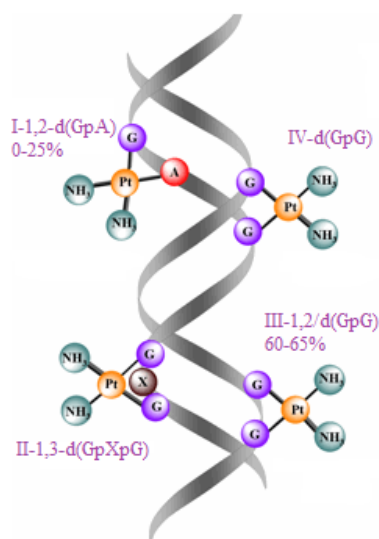
Темељним испитивањем механизма дејства цисплатине, као најзаступљенијег лека у терапији малигнух обољења, утврђено је да долази до нереверзибилног или реверзибилног везивања за молекулу ДНК. Реверзибилно везивање подразумева формирање ковалентних веза између јона платине и атома азота из пуринских и пиримидинских база, пре свега N7-атома азота из гуанина, N7 и N1-атома из аденина и N3-атома из цитозина и тимина [47,48]. На бази NMR спектроскопије и рендгенских

кристалних структура, утврђено је да долази до формирања интраланчаних веза између металног центра и:

- I. Суседних молекула аденина и гуанина
- II. Два суседна гуанина међусобно раздвојена базом
- III. Два суседна гуанина

Као и интерланчане везе између:

- IV. Цисплатине и два гуанина [49]



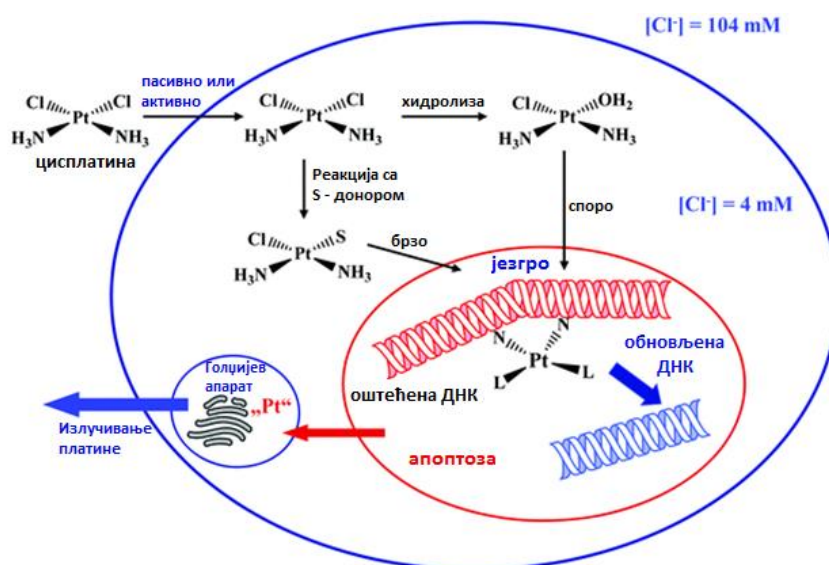
Слика 8. Интра- и интер-ланчане везе цисплатине у молекулу DNK

Цисплатина-DNK адукти настали формирањем интраланчаних веза са два гуанина (Слика 8, III–до 65%) и са аденином и гуанином (Слика 8, I–до 25%) су најзаступљенији.

Код реверзибилног везивања долази до нековалентних интеракција, и то:

- Интеркалације између базних парова
- Везивања унутар самог ланца DNK или
- Екстерног електростатичког везивања [50,51]

Цисплатина пролази кроз ћелијску мембрану (механизмом који није до краја утврђен), унутар ћелије подлеже хидролизи, то јест долази до супституције хлоридног јона због ниске концентрације интрацелуларног хлорида ($\sim 4 \text{ mM}$), па се формира *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ (Слика 9). Хидролизоване врсте директно интерагују са ДНК који је препознат као примарна биолошка мета [52-54,55,56-64,12], а добијени адукти сматрају се одговорним за фармаколошку активност лека (Слика 9).



Слика 9. Механизам дејства цисплатине

Механизам подразумева четири фазе:

- I. Унос цисплатине у ћелију
- II. Активација
- III. ДНК везивање
- IV. Одговор ћелије

Прва фаза подразумева достављање биолошки ефективније концентрације једињења до оболелог ткива, то јест тумора, са циљем унапређења антитуморне терапије једињења на бази платине. Утврђена су два могућа механизма: пасивна дифузија и укључивање мембранских транспортера у виду коњугованих молекула који циљају мембранске рецепторе прекомерно присутне у ћелијама тумора [65].

Висока концентрација јона хлорида у крви и екстрацелуларној течности ($> 100 \text{ mM}$) спречава превремено активирање или нежељене реакције директне супституције лиганда. Релативно ниска концентрација хлоридних јона у цитосолу унутар ћелија фаворизује формирање активираних аква врста које реагују даље са интраћелијским нуклеофилима попут DNK база, формирајући при том бифункционалне интраланчане платина-DNK адукте [63,64]. Настали платина-DNK адукти ремете ћелијске процесе транскрипције и репликације узрокујући дисторзију DNK. Ово доводи до низа процеса који укључују препознавање и везивање ових адуката од стране протеина са HMG (високо мобилне групе) доменом, и активирање апоптозе [66]. Цисплатина унутар ћелије подлеже и реакцијама са биомолекулима који садрже сумпор што може произвести два различита ефекта. Уколико цисплатина реагује са сумпором присутним у виду тиолне групе долази до избацивања из ћелије [67]. Међутим, уколико се веже за молекул у чији састав улази тиоетарска група, могућа су два пута: уколико је награђена веза слаба, долази до везивања за DNK, а ако то није случај бива избачен из ћелије [68,69].

Предност већине комплекса метала је да могу да се понашају као пролекови то јест као деривати лека који могу да пролазе кроз процесе трансформације *in vivo* ослобађајући при том активне врсте, са побољшаним физичко-хемијским, биофармацеутским и фармакокинетичким особинама. Терапеутици на бази метала, активацију пролека могу реализовати фотохемијским процесом [70], оксидацијом или редукцијом метала или лиганда, или супституцијом лиганда. У случају Pt(IV) комплекса, у основи инертнијих једињења, мања је вероватноћа деактивације *in vivo* пре проласка кроз мембрану ћелије тумора, па је логично што се понашају као пролекови. Значи да практично први корак њихове активације укључује редукцију *in vivo* са пратећим губитком аксијалних лиганда, генеришући тако платина(II) центар који се везује за DNK. Особине, као што су липофилност, редукциони потенцијал, стабилност и биолошко циљање без промене активности смањеног, биолошки активног комплекса

генерисаног у ћелијама тумора могу се модификовати увођењем одговарајућих аксијалних лиганата [62].

Антитуморна активност се заснива на класичним ковалентним и нековалентним интеракцијама, то јест интеркалацији и грађењу водоничних веза. Интеркалација је својствена молекулима способним да се уметну између парова азотних база у молекулу DNK, пре свега планарним ароматичним системима. Грађење водоничних веза [71] између комплекса и DNK остварује се преко атома кисеоника из фосфатних група и атома азота из база.

Код неких система долази и до ковалентних и нековалентних интеракција. У том смислу, битан је избор лиганата како би интеракције биле симултане. Неки од полу-сендвич-аренских рутенијум(II) комплекса показали су обећавајуће *in vitro* и *in vivo* антитуморно дејство [72]. Ова монофункционална једињења се координују за N7 атом гуанина DNK ланца, што је употпуњено интеркалацијом арена, као и грађењем водоничних веза између хелатних лиганата и C6O гуанина [73]. На овај начин долази до јединственог везивања за дуплекс DNK и структурне дисторзије које су изразито различите од запажених код цисплатине [74].

На основу истраживања ковалентних интеракција цисплатине и DNK, испитиване су и интеракције неких соли паладијума(II) са DNK мономерима и олигомерима. Неке паладијум(II) соли интерагују са олигонуклеотидом [d(CGCGAATTCGCG)]₂ показујући да долази до селективног везивања са T8 имино, као и G4, и N7 атомима. Остварене интеракције између додекамера моно и бифункционалних паладијум(II) врста показују одређени степен селективности. Монофункционални комплекси селективно се вежу за G2 и G10 базе. Бифункционалне врсте показују селективно везивање за N7 у односу на G4, док Pd(aq)²⁺ врсте више утичу на G2 и на G4.

Катсару (E. Katsarou) и Хадјилиадис (N. Hadjiliadis) са сарадницима испитивали су тернарне системе паладијума(II) са нуклеобазама-нуклеозидима и пептидима као најједноставнијим моделима DNK-Pt-протеин веза. Паладијум(II) комплекси *trans*-структуре, то јест *trans*-Cl₂Pd(glyglyOH)₂ и *trans*-Pd(glyvalOH)₂, показују селективност са додекануклеотидом [d(CGCGAATTCGCG)]₂, нападајући прво G4, а затим G2 базе додекамера, као и у случају Pd(aq)²⁺ врсте. То указује на интраланчано везивање GNG(G2G3G4)(N7-N7) паладијума(II) са додекамер дуплексом.

Потврђено је да интрамолекуларске N—H···O (фосфат) водоничне везе играју важну улогу у стабилизацији N7-координованих (амин) M(II) комплекса (M = Pd, Pt) за 5'-GMP³⁻ и 5'-IMP³⁻ у раствору.

Испитиване су и интеракције комплекса паладијума(II) са DNK нуклеобазама [Pd(phen)Cl₂] и [Pd(bipy)Cl₂] комплекса. У оба случаја добијени су бинуклеарни комплекси код којих су паладијум(II) јони хелатирани једним phen или bipy лигандом, док су два паладијум(II) катјона повезана са два лиганда аденина, а N3 и N9 атоми аденина координовани за паладијум(II), што је потврђено ¹H NMR спектроскопијом [34].

Како многи комплекси паладијума(II) показују високу активност на ћелијским линијама резистентним према цисплатини, претпоставља се да могу имати биохемијски механизам дејства другачији од цисплатине. Заиста, према досадашњим истраживањима комплекси паладијума(II) интерагују са полинуклеотидима углавном нековалентним везивањем, тачније интеркалирају се у молекула DNK. Тако, у случају мононуклеарног комплекса паладијума(II) са пиридил-диоксим лигандом, на основу UV-Vis апсорпционе спектрофотометрије интеракција како слободног лиганда тако и комплекса са DNK изолованом из тимуса телета (CT DNA) је показала да се једињења вежу за DNK, а циклични волтамограм раствора комплекса у присуству DNK као и мерења вискозитета су показала да се интеракција углавном одвија кроз интеркалацију [75].

Паладијум(II) комплекси са 1,10-фенантролином и бутилдитиокарбаматом показали су *in vitro* цитотоксична својства вишеструко боља у односу на цисплатину. Експериментални резултати указују да долази до интеркалације комплекса, као и јонских интеракција [76].

У случају паладоцикличних комплекса, доказивање цитотоксичне активности остварене путем интеркалације је стриктно везано за присуство планарног и високо стабилног ароматичног металоцикла [77,78].

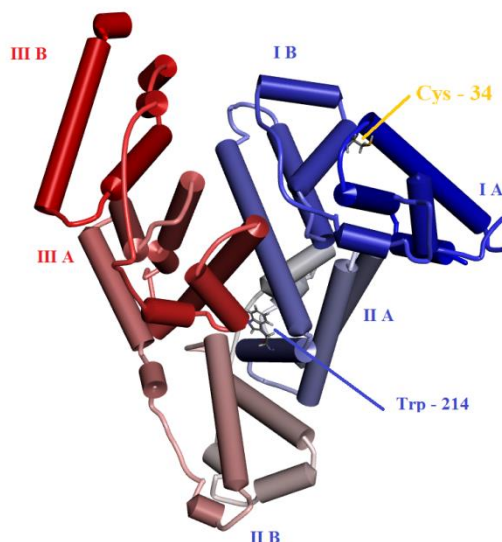
1.4 Интеракције са протеинима

Интеракције комплекса прелазних метала и различитих протеина/ензима имају суштински значај у индукцији биолошких ефеката [79]. Њихова улога је битна у смислу оријентације активности потенцијалног лека, код одређивања укупног фармаколошког и токсиколошког профила комплекса метала, али и идентификације циљаног протеина за

различите групе једињења на бази метала. У циљу одређивања молекуларног механизма активности метала и пружања увида у потенцијалне нуспојаве које се могу догодити, битно је и утврђивање природе њихове интеракције са биомолекулима на молекуларном нивоу. Информације о хемијској специјацији и месту везивања метала, од суштинског су значаја за увид у метал-биолиганд интеракције. Утврђивање биодистрибуције (у простору и времену) одређеног једињења метала, као и анализа различитих путева који доприносе уносу и протоку метала је критичан аспект у овој области истраживања [80].

Основна реакција комплекса, у чији састав улазе "меке" Луисове (Lewis) киселине, са пептидима и протеинима заснива се на везивању S и N -донорских група присутних у овим молекулима захваљујући аминокиселинама на бази тиола, имидазола и гуанидина као основних изграђивачких јединица поменутих класа једињења. Битна је улога транспортних протеина крвне плазме, мембранских транспортних протеина, пептида попут глутатиона и металотионеина, као и бројних ензима.

Албумин хуманог серума (HSA) је најзаступљенији транспортни протеин крвне плазме (Слика 10). На основу рендгенске кристалне структуре утврђено је да се једноланчани (66 kDa) протеин, састоји се од три домена који формирају молекул у облику срца [81,82]. У оквиру сваког домена налазе се два поддомена који су претежно спирални и широко умрежени са неколико дисулфидних мостова. Аминокиселинска секвенца садржи укупно 17 дисулфидних мостова, један слободан тиол (Cys 34) и један триптофан (Trp-214) [83,84]. Присуство албумина омогућава транспорт различитих супстрата, укључујући катјоне метала, хормоне и већину терапеутских лекова. Доказано је да дистрибуција, слободна концентрација и метаболизам разних лекова могу бити значајно измењени као резултат њиховог везивања за албумин [85]. Главна места везивања супстрата у молекулу албумина су хидрофобне шупљине смештене у поддомен ПА и ША и имају слична хемијска својства [86]. Методе флуоресценције се успешно примењују за испитивање интеракција малих молекула са албумином [87]. Триптофан (Trp-214) у хидрофобној шупљини поддомена ПА одговоран је за унутрашњу флуоросценцију албумина [88]. Када HSA интерагује са другим молекулом



Слика 10. Хумани серум албумина (HSA)

[89], долази до конформационих промена, асоцијације, или везивања супстрата за HSA што доводи до промена интензитета флуоресценције [90].

Металопротеини, тј. металотионеини (MT) могу везати јоне тешких метала присутних у организму. Они су присутни у веома високом проценту у живим организмима, укључујући и биљке. MT сисара су састављени од 61 или 62 аминокиселине, а од тога у састав чак 20 АК улазе остаци цистеина [91]. Захваљујући присуству сулфхидрилних група изражен је високок афинитет за катјоне тешких метала што метал-везивне цитосолне MT, чини примењивим у процесима детоксикације тешких метала и минерализацији метаболизма *in vivo* [92-97]. Истраживања су показала да су MT важна везивна места за платину, па индуковање MT форми може имати заштитни механизам против нефротоксичности изазване комплексима платине, док је резистенција на цисплатину приписана присуству MT у ћелијама тумора [92,98-101]. Синтеза комплекса паладијума(II) који би показали сличну активност проистекла је из аналогије између платина(II) и паладијум(II) јона [102-104]. Паладијум(II) јони могу снажно да вежу већ постојеће MT молекуле *in vivo*, поготово у бубрезима. Паладијум(II) унапређује неоксидативну олигомеризацију MT *in vitro*, а паладијум(II) се првенствено акумулира у олигомерним производима [105].

Незанемарљиву антитуморну активност показали су комплекси галијума, КР46 и галијум tris-малтолат [106]. Механизам дејства је приписан инхибицији ензима рибонуклеотид редуктазе (RR) који катализује конверзију рибонуклеотида у дезоксирибонуклеотиде. Дешава се у току транзиције из G1 у S фазу ћелијског циклуса као предуслов за DNK репликацију, а високо је изражен у ћелијама тумора.

Мегерс (Meggers) и сарадници синтетисали су кинетички инертне органометалне комплексе рутенијума [107]. Синтетисани комплекси представљају потенцијалне инхибиторе различитих киназа. Рутенијум стауроспорин је недавно испитиван као инхибитор гликоген синтетазе-киназе, као главни регулатор локализације и експресије p53. У иначе хеморезистентним ћелијама меланома комплекс рутенијума потенцијално активира p53 и индукује апоптозу [108].

Хексакарбонил дикобалт комплекси показују обећавајућу активност на неколико хуманих ћелијских линија тумора [109]. Оно што комплексе овог типа чини посебно интересантним је инхибиција циклооксигеназе која одлаже раст тумора и побољшава реакцију организама на конвенционалне терапије.

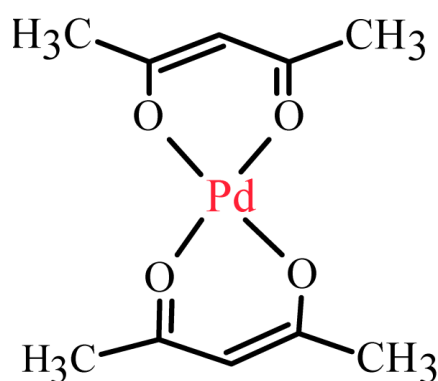
Недавно су идентификоване цистеин катепсин протеазе као важна класа ензима за препознавање тумора. Катепсин В и L су укључени у више фаза развоја тумора. Инхибицију катепсина В индукују линеарни злато(I) комплекси са тиолатним и фосфинским лигандима [110], динуклеарни комплекси паладијума(II) (бифосфински паладоциклични комплекси) [111] и неколико оксоренијум(V) комплекса [112].

Комплекси циклопалата са дифенилфосфином и фероценом индукују лизозомну пермеабилитацију K562 хуманих ћелија леукемије што доводи до апоптозе [113]. Специфично дејство паладоцикличних комплекса на органеле одговорно је за уочену антитуморну активност. Као последица специфичне каталитичке активности када долази до везивања суседних тиола присутних у митохондријалној мембрани протеина са формирањем дисулфидних веза, паладоциклични комплекси индукују митохондријалну пермеабилитацију и ослобађање цитохрома c.

Лекови на бази платине практично минимално делују на развијене ћелије тумора плућа (NSCLC) [114,115], па се интензивно ради на развоју иновативних терапеутика који би индуковали ћелијску смрт на начин који се разликује од до сада објашњених механизма интеракције са DNK [116]. Основни разлог је синтеза нових врста цитотоксичних лезија које могу избећи ћелијску DNK репарацију и/или иницирање

смрти туморних ћелија алтернативним механизмима на нивоу органела или генома. Као цитосолна мета и нови проапоптотски пут антиканцерогених агенаса објашњен је ендоплазматични ретикулум (ER) стрес [117]. У ER под дејством интрацелуларних и екстрацелуларних стимуланаса се акумулира велика група неувијених протеина, што чини ћелије неспособним за одржавање ER хомеостазе, па активирају програмирану ћелијску смрт. Апоптоза индукована овим путем заобилази резистенцију тумора на традиционалне лекове [118].

Комплекс паладијума(II) са bis-ацетилацетонатом [119] (Слика 11) на развијеним ћелијама тумора H460 дозно-зависно увећава експресију СНОР гена, што није случај код антитуморних агенаса примењених у клиничкој пракси, па на тај начин индукује апоптозу ћелије активирањем ER стреса. ER стрес индукована апоптоза ћелија тумора представља нов сигнални пут за развој теарпеутика примењивих у лечењу канцера.

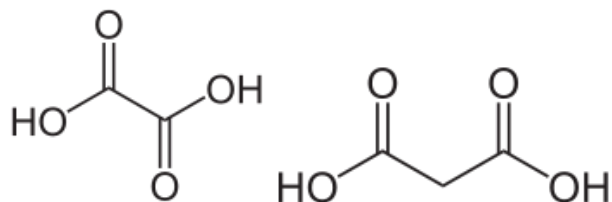


Слика 11. bis-ацетилацетонато паладијум(II), Pd(acac)₂

Упркос вишедеценијском истраживачком раду, јасно је да су интеракције комплекса прелазних метала са молекулом ДНК недовољно испитано поље и да има пуно простора за напредак. Неопходно је испитати потенцијални механизам дејства ново-синтетисаних лекова. Испитивања на нивоу везивања протеина ће у већини случајева значајно утицати на обим дистрибуције и степен елиминације лекова, а самим тим и на концентрацију лека присутног у организму. Студије о овом аспекту могу пружити информације о структурним особинама које директно утичу на терапијску ефективност лекова и стога су занимљива област хемије и биомедицинских наука.

1.5 Киселине оксамидног и маламидног типа

Оксална (етан дикиселина) и малонска (пропан дикиселина) најједноставније су засићене дикарбоксилне киселине (Слика 12). Улога ових киселина као и њихових деривата веома је важна у бројним биохемијским процесима.

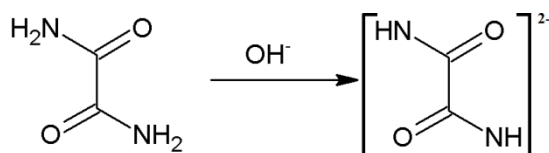


Слика 12. Структуре оксалне и малонске киселине

Коњуговане базе оксалне киселине (оксалати) су конкуритивни инхибитори ензима лактат дехидрогеназе (LDH) [120]. LDH катализује претварање пирувата у млечну киселину (крајњи производ ферментације (анаеробни процес) оксидујући коензим NADH у NAD^+ и H^+). Анаеробни енергетски метаболизам који се одвија кроз гликолизу подразумева обнављање нивоа NAD^+ . Ћелије тумора преференцијално користе анаеробни метаболизам, инхибиција LDH инхибира формирање и раст тумора [121] што деривате оксалне киселине чини потенцијално интересантним у лечењу тумора.

Класичан пример конкурентног инхибитора је малонска киселина. Она делује на сукцинат дехидрогеназу у респираторном електрон-транспортном ланцу. Диетил естар малонске киселине користи се у синтезама витамина B1 и B6, барбитурата и бројних других биолошки значајних једињења. Запажена је улога диамида ових киселина, што је темељно проучавано у току претходних неколико деценија.

Дианјон карбоксамида HNC(=O)CONH^{2-} (Слика 13) се у својим комплексима понаша као бидентатни лиганд захваљујући присуству јаких електрон донорских амидних атома азота. Оно што умногоме ограничава његову примену је веома мала растворљивост карбоксамида у уобичајеним растварачима, слаба киселост и хидролитичко разлагање у алкалном раствору.

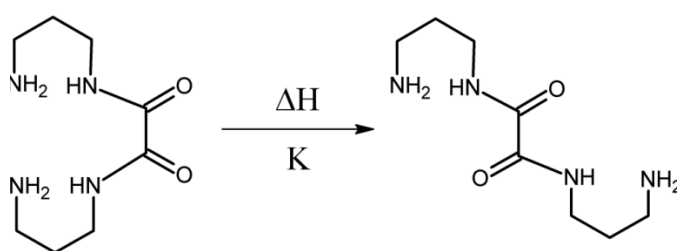


Слика 13. Анјон диамида оксалне киселине

Ове тешкоће могу се скоро потпуно превазићи превођењем у N,N' -bis супституисане оксамиде [122], које нерадо подлежу хидролизи и боље су растворљивости. N,N' -супституисани карбоксамиди могу да усвоје *cis* или *trans* конформације у комплексима метала (Слика 14). *Cis* изомер незнатно је нестабилнији, за 2,25 Kcal од *trans* изомера што је утврђено применом *ab initio* прорачуна коришћених за испитивање стабилности конформера [123].

Симетрични *cis* или *trans* конформери, а у новије време и асиметрични [124] N,N' -дисупституисани оксамиди се користе као мостни лиганди за изградњу изолованих и проширених структура [122,125].

Тетрадентатни лиганди карбоксамида који садрже две амидне и две амино групе су најшире проучавани. Лиганди отвореног ланца (диамини као реактанти) или макроциклични лиганди (линеарни тетраамини) добијени су у реакцији диестара

Слика 14. *Cis* и *trans* конформациони изомери оксамида

оксалне киселине или оксалил хлорида са аминима. Синтетисани су три- и тетрадентатни лиганди карбоксамидног типа, и то деривати малонске и оксалне киселине, са

две амидне и једном или две карбоксилатне групе [126,127,128]. Синтетички приступ је подразумевао интеракцију између оксалил хлорида или диетил малоната и одговарајућих аминокиселина. Поступци за синтезу макроцикличних карбоксамидних лиганата који укључују стварање Шифових база у реакцијама одговарајућих функционализованих оксамида отворених ланаца са диаминима су доста компликованији.

N,N' -супституисани лиганди карбоксамида су веома популаран предмет истраживања у координационој и супрамолекуларној хемији, а то је и очекивано из више разлога:

- I. Природа лиганата је таква да омогућава варијацијом координационих супституената образовање комплекса, то јест једињења прелазних метала чије се укупно наелектрисање и поларност могу мењати.
- II. Јака базност координованих депротонваних амидних азота испољава стабилизујући ефекат на висока оксидациона стања крајњег првог реда јона прелазних метала, укључујући никел(III), бакар(III) и гвожђе(IV).
- III. Способност карбоксамидног фрагмента да се понаша као мостни лиганд чини оксамидне комплексе веома погодним за дизајн хомо- и хетеро-металних олигонуклеарних врста.

Карактеристика ове врсте лиганата јесте да они представљају мост између металних центара узрокујући јаке антиферромагнетне интеракције, што их чини веома погодним за развој нових магнетних материјала [129].

Присуство метала високих оксидационих стања подразумева се у бројним ензимским системима [130], што је још један од битних разлога за проучавање и стабилизацију високо валентних металних центара. Улога једињења карбоксамидног типа може бити веома значајна. Ензим нитрил хидратаза (NHase) који катализује конверзију од нитрила до амида у неколико микроорганизама садржи не-хем ниско спински гвожђе(III) центар на активном месту. Гвожђе у NHase ензиму не мења своје оксидационо стање у току процеса, већ делује као Луисова (Lewis) киселина у нитрил-амид трансформацији, што није случај код већине других не-хем биолошких система на бази гвожђа(IV). Кристална структура ензима је показала да је атом гвожђа координован са три атома сумпора из цистеина, два депротонвана амидна атома азота и вероватно

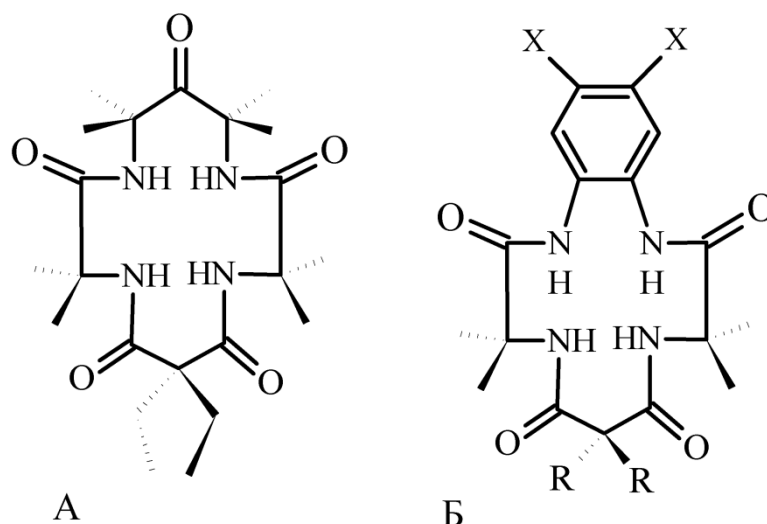
молекулом воде. Резултати темељног испитивања ових система указују на то да тиолне групе стабилизују гвожђе(II) активни центар, а самим тим се намеће закључак да у случају гвожђе(III) центра ту улогу имају депротоновани амидни атоми азота. Управо ово је био повод за синтезу и испитивање система гвожђа(III) са координованим амидним атомима азота као донорима [131].

Цитохром P450 и пероксидазе, ензими на бази гвожђа(IV) и оксопорфирина, селективно и ефикасно катализују оксидацију различитих органских супстрата. Дизајнирање металних комплекса који активирају H_2O_2 или O_2 , али су сами инертни према оксидацији представља основу за синтезу ефикасних оксидационих катализатора, као система који би били у стању да опонашају ензиме који функционишу као оксидациони катализатори. Међу њима, метални комплекси на бази порфирина, сулфованих фталоцијанина, и гвожђе(III) комплекси са тетраамидним макроцикличним лигандима (Fe-TAMLs) су се показали као веома функционални у опонашању пероксидаза. Пероксидазе су се показале као веома активне у процесима оксидације загађивача околине, па је активнији рад на развоју ових система веома важан [132].

У том смислу, синтетисани су тетрадентатни лиганди: редокс "*innocent*", и редокс "*non-innocent*". Макроциклични редокс *innocent* лиганд (Слика 15А) има високу отпорност на оксидативну деградацију и изузетно јак сигма-донорски капацитет који потиче од депротонованог амидног азота и успешно стабилизује ретке високо-валентне центре прелазних метала (Cr(V), Fe(IV) и Ni(III)).

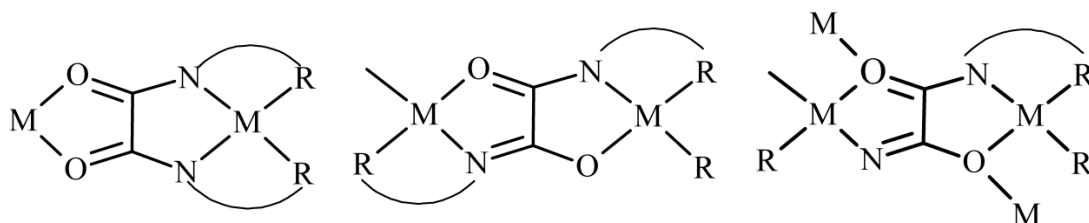
Редокс *non-innocent* лиганди могу одговорити електронски и структурно на промене оксидационог стања комплекса метала (Слика 15Б). Утврђено је да би специфична комбинација величине прстена, нпр, 5,5,5,6-TAML лиганада, могла да утиче на повећану хидролитичку стабилност система за Mn(V), Co(III), Cr(V), као и за низ комплекса гвожђа [130].

Развијени су различити метални комплекси на бази тетраамидо макроцикличних лиганада (TAML), који су сада углавном патентирани и користе се у неколико индустријских грана.



Слика 15. Структуре редокс *innocent* (А) и редокс *non-innocent* (Б) лигананда

Најзаступљенија стратегија у изградњи полимера на бази металних комплекса је методологија изградње блокова. Једна од најистакнутијих карактеристика карбоксамидних лигананда је подложност трансформацији између *cis*- и *trans*-конформација, што их чини лако примењивим у поменуте сврхе. У молекулима *cis*-оксамида омогућено је грађење дискретних полинуклеарних врста захваљујући постојању два различита координациона места (Шема 2). *Bis*-тридентатни карактер оксамида *trans*-конформације, омогућава формирање *trans*-оксамидо-мостних бинуклеарних јединица са упражњеним координационим местом (Шема 2) које се могу понашати као практични изграђивачки блокови за даље повезивање са другим мостним групама [133].

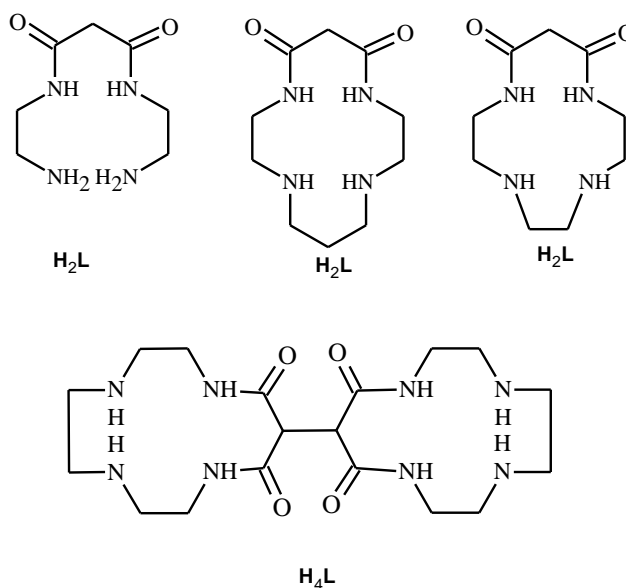


Шема 2. Начини везивања *N,N'*-bis-супституисаних оксамида

Тако је несиметричан бакар(II) прекурсор $[\text{Cu}(\text{oxbe})]^{2-}$ ($\text{oxbe} = N$ -бензоат- N' -(2-аминоетил)оксамид) искоришћен за грађење 3D хетерометалних супрамолекулских координационих полимера. Исти прекурсор је употребљен за синтезу хомометалних комплекса. Као резултат добијен је нови 3D комплекс, први пример код кога су присутне и *cis*-оксамидо и *trans*-оксамидо мостне јединице. Магнетна својства су карактеристика синтетисаног система [124].

Синтетисана је такође серија N,N' -bis(3-аминопропил) супституисаних оксамид-мостних бинуклеарних комплекса бакра(II). На основу спектралних, електрохемијских и магнетних особина комплекса уочене су промене истих са малим варијацијама у окружењу лиганда [134]. Такође, запажена магнетна својства забележена су и код бинуклеарних комплекса никла(II) са: оксамидним-мостним лигандима [129], N,N' -дисупституисаним-оксамидним мостним лигандима [130], као и у случају N,N' -bis(фенил-супституисаних) оксамида [135]. Супрамолекуларна структура у којој су Cu(II) - Ni(II) ентитети повезани водоничним везама понашају се као молекуларни магнети [136].

Комплекси јона првог реда прелазних метала, посебно бакра(II) и никла(II) са малонамидним лигандима су интензивно изучавани (Шема 3). Истражен је прилично ограничен број комплекса касних прелазних метала са оваквом врстом лиганда (на пример, паладијум(II) и платина(II)). Генерално, стереохемија 3d и тежих прелазних метала се доста разликује, али у конкретном случају малонамидних лиганда сви d^8 јони метала (никал(II), паладијум(II), платина(II)) су склони да формирају сличне квадратно-планарне нискоспинске врсте у којима су амидне групе депротоноване. Ово је добар пример за објашњење ефеката измене изоелектронских метала, на пример у случају NMR карактеризације комплекса [137].



Шема 3. Структуре неких лиганата маламидног типа

На основу вишеструких биолошких функција ових система, намеће се закључак да би лиганди карбоксамидног типа у чији састав улази $-N_2O_2-$ хромофора могли бити успешно примењени у синтези комплекса прелазних метала, са превасходним циљем синтезе једињења потенцијалне антитуморне активности. Резултати испитивања алтернативних механизма дејства већ синтетисаних комплекса, односно механизма који се разликују од дејства цисплатине указују на велики потенцијал метала који су слабе Луисове (Lewis) киселине.

1.6 Рачунарска хемија

Теоријски модели заснивају се на примени теоријских и математичких принципа за решавање хемијских проблема. Молекулско моделирање подразумева примену рачунарске хемије за стварање, манипулацију, израчунавање и предвиђање реалистичних молекулских структура, као и предвиђање и симулацију разних биолошких процеса. Рачунарски приступ је подељен у две широке категорије:

1. Молекулска механика (Беркерт (Berkert) и Алинџер (Allinger), 1982) [138]

2. Квантна механика (Хере и сарадници (Hehre et al.), 1986) [139]

У зависности од примене Шредингерове једначине или његове еквиваленте матрице квантна механика се углавном користи у форми:

- *Ab initio* метода
- DFT - Теорија функционала густине
- Семи-емпиријских метода

1.6.1 Молекулска механика

Молекулска механика се заснива на примени закона класичне физике на молекуле занемарујући присуство електрона. Методе ММ су потпуно емпиријске. Молекул посматрају као сфере одређених маса међусобно повезаних опругама [140]. Молекулска механика користи једноставан алгебарски израз (поље силе) за изражавање укупне енергије система:

$$E = \sum_i^{\text{veze}} E_i^{\text{истезање}} + \sum_i^{\text{uglovi veza}} E_i^{\text{савијање}} + \sum_i^{\text{diedarski uglovi}} E_i^{\text{увртање}} + \sum_i \sum_j^{\text{nevezani atomi}} E_{ij}^{\text{nevezani}}$$

Укупна потенцијална енергија система представља збир доприноса који проистичу из везивних и невивних интеракција. Везивне интеракције се односе на одступања од идеалних дужина (истезање/сабијање), углова (савијање) и диедарских углова (увијање) веза, а невивне на ван дер Валсове (van der Waals) и Кулонове (Coulomb) интеракције. Поље силе дефинише и типове атома. Сваки атом је на основу експерименталних резултата или квантно механичких прорачуна окарактерисан атомском масом, ван дер Валсовим полупречником и парцијалним наелектрисањем.

Као резултат одступања од идеалних дужина веза услед истезања или сабијања, долази до пораста енергије везе и управо је пропорционална квадрату екстензије:

$$\Delta E_{\text{истезање}} = K_{\text{истезање}} (l - l_{\text{eq}})^2$$

где је, $k_{\text{istezanje}}$ -константа пропорционалности; l -дужина истезања везе, а l_{eq} -равнотежна дужина везе. Уколико се енергија равнотежне дужине l_{eq} посматра као нулта вредност, уместо $\Delta E_{\text{istezanje}}$ можемо писати $E_{\text{istezanje}}$:

$$E_{\text{istezanje}} = k_{\text{istezanje}} (l - l_{\text{eq}})^2$$

Одступања од идеалних углова веза манифестују се кроз пораст енергије система и управо је пропорционална квадрату повећања угла:

$$E_{\text{savijanje}} = k_{\text{savijanje}} (a - a_{\text{eq}})^2$$

где је, $k_{\text{savijanje}}$ -константа пропорционалности; a -величина дисторгованог угла, а a_{eq} -права величина угла коју молекула поседује.

Ротацијом око просте везе мења се диедарски (торзиони) угао од 0° до 360° , геометрија и енергија молекула. Даљом ротацијом око просте везе за сваких 360° , енергија варира са променом диедарског угла у синусној или косинусној зависности. За системе ниже симетрије, крива торзионе потенцијалне енергије је доста сложена и представља комбинацију синусне или косинусне функције:

$$E_{\text{uvrtanje}} = k_0 + \sum_{r=1}^n k_r [1 + \cos(r\theta)]$$

Потенцијална енергија система појединачних атома који нису директно везани, и нису повезани заједничким атомом, или су у различитим молекулима, представљена је типичним невезивним ван дер Валсовим (van der Waals) и Кулоновим (Coulomb) интеракцијама:

$$E^{\text{nevezivni}}(\mathbf{r}) = E^{\text{VDV}}(\mathbf{r}) + E^{\text{K}}(\mathbf{r})$$

1.6.2 Квантна механика

Квантно механичке методе се баве интеракцијама између јегара и електрона. Заснивају на решавању Шредингерове једначине:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi$$

где је \hat{H} -Хамилтонијанов оператор, E -енергија атома или молекула, а Ψ -таласна функција.

Хамилтонијанов оператор молекулског система који се састоји од M нуклеуса и N електрона може да се изрази као:

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \frac{1}{2} \sum_{A=1}^M \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}$$

Прва два члана се односе на кинетичку енергију електрона и језгара, док преостала три члана дефинишу потенцијалну енергију привлачења између језгара и електрона и потенцијалну енергију одбијања између електрона и језгара. Набла ∇^2 (Nabla) је Лапласов (Laplace) оператор и дефинише се као збир других извода функције (у картезијановим координатама):

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$$

У циљу решења Шредингерове једначине за било који систем сложенији од водоника уводе се различите апроксимације: Борн-Опенхајмерова (Born-Oppenheimer) апроксимација, Хартри-Фокова апроксимација и Ротхан-Холове једначине.

Теорија функционала густине (Density functional theory-DFT). Основа ове теорије лежи у Хоенберг-Коновој теорему по којој је енергија основног стања одређена искључиво густином електрона.

$$E = E[\rho(r)]$$

Хоенберг (Hohenberg) и Кон (Kohn) [147] су доказали да се густина електрона покорава *варијационом принципу* (односно, енергија која одговара датој густини електрона је већа или једнака екзактној енергији).

Сложеност проблема, временска ограничења, компјутерски и други ограничавајући фактори одређују који метод је примењив. Веома битно за све рачунарске методе је следеће:

- ***Јединствена вредност енергије (за дефинисан систем било која метода мора дати јединствену вредност за енергију)***
- ***Сагласност величини (величина грешке расте са порастом молекула)***
- ***Покоравање варијационом принципу (енергија основног стања неког система је увек већа од енергије која одговара екзактној таласној функцији)***

Обе методе (ММ и QM) употпуњују једна другу у настојањима да се разуме хемијско и биолошко понашање на молекулском нивоу.

Хибридне QM/MM методе имају широку примену у моделирању локалних електронских промена у великим биомолекулским системима. Основна идеја је да опишу хемијски активне области (попут области у оквиру којих су присутни комплекси платине и других тешких метала сродних својстава) применом електронских структурних метода.

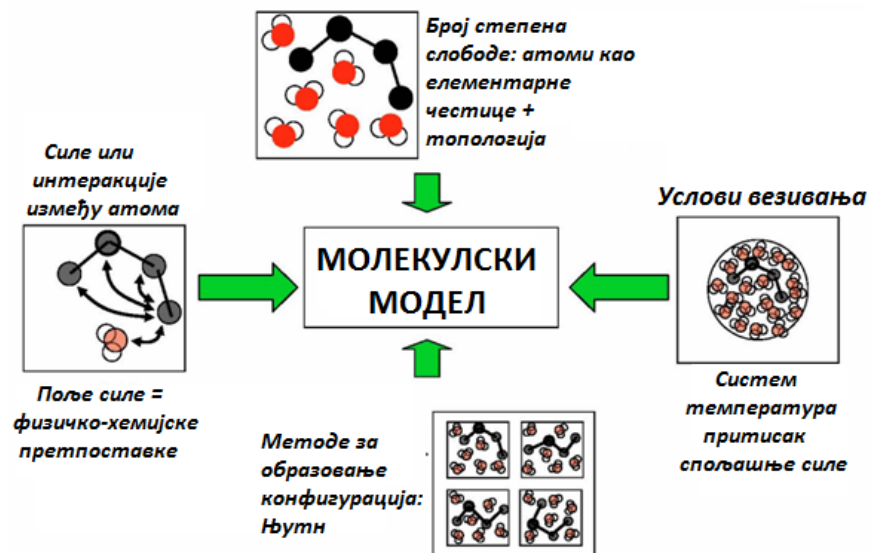
1.6.3 Молекулска динамика

Компјутерске симулационе методе нам омогућавају моделирање биолошких система у лабораторијским условима и предвиђање њихових особина кроз стварање репрезентативних конфигурација ових малих репликација на такав начин да се могу добити вредности структурних и термодинамичких својстава [148,149]. Симулација омогућава испитивање понашања атомских и молекулских система од временске зависности, обезбеђујући на тај начин детаљну слику о начину конформационих промена система.

Молекулска динамика је област рачуарске хемије која путем молекулско динамичких симулација (MD) омогућава проучавање комплекса и динамичке процесе који се дешавају у биолошким системима. Заснива се на примени молекулске механике (MM), квантне механике (QM) као и комбинованих квантно-механичких и молекулско-механичких метода (QM/MM).

Молекулско динамичке симулације представљају одличну апроксимацију за широк спектар система, стога су моћно средство у хемији, физици, биологији и науци о материјалима. Веома су корисне у испитивањима стабилности протеина, конформационих промена, савијања протеина, транспорта јона у биолошким системима и другим процесима који се одвијају у живим системима. Такође, значајно доприносе унапређењу у области дизајна лекова што је од посебне важности у настојањима да се дизајнирају нова једињења побољшаних терапеуских својстава, а смањених нежељених ефеката. Ова техника омогућава природну временску еволуцију система што омогућава предвиђања структурних, динамичких и термодинамичких својства супстанци директно из основних интеракција између молекула, који пружају сваки детаљ о томе како се систем, сачињен од више делова, мења од једне до друге конформације [150-152].

Први корак у процесу молекулско динамичке симулације (Шема 4) представља избор модела који ће се користити за описивање интеракција унутар система и дефинисање услова (на пример, број честица, почетна температура). Друго, неопходно је покренути интеграцију одабиром почетних вредности система (обично су то почетне координате $\{r(0)\}$ и скуп почетних брзина $\{v(0)\}$). Полазећи од задате конфигурације следи фаза уравнотежења, током које систем еволуира од почетне конфигурације. Термодинамичке и структурне особине се морају пажљиво пратити током ове фазе, све док се не постигне стабилност. На крају уравнотежења долази финална фаза, током које може да се израчуна просечна вредност симулације. Коначно, динамички процес симулације се детаљно анализира у конформационом смислу као и зарад добијања жељених термодинамичких параметара.



Шема 4. Модел молекулске симулације

2. ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА

Узевши у обзир наведено у уводу, у оквиру ове дисертације постављени су следећи циљеви:

- ✓ Синтеза деривата диамида оксалне и малонске киселине, као и одговарајућих комплекса паладијума(II)
- ✓ Карактеризација синтетисаних једињења применом елементарне микроанализе, спектроскопских метода (IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, UV-Vis) и метода рендгенске структурне анализе (где је то могуће)
- ✓ Испитивање равнотежа у систему паладијум(II) јона са одговарајућим лигандима у воденом раствору
- ✓ Испитивање интеракција синтетисаних једињења са биолошки значајним молекулима, албумином хуманог серума (HSA) и дезоксирибонуклеинским киселинама (DNK).
- ✓ Испитивање биолошке активности *in vitro* синтетисаних једињења применом *MTT* теста цитотоксичности и *АО/ЕВ* флуоресцентне микроскопије.
- ✓ Анализа ћелијског циклуса применом методе проточне цитометрије и електрофоретске Вестерн блот анализе.
- ✓ Примена симулационих метода (докинг и молекулска динамика) компјутерске хемије у циљу коначног дефинисања механизма дејства синтетисаних комплекса паладијума(II).

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1 Хемикалије и реагенси

Сви комерцијално доступни реагенси били су аналитичког степена чистоће и коришћени су без претходног пречишћавања. KOH, NaOH, NaOD, D₂O, DMSO-d₆, HCl, NaCl, PdCl₂, K₂[PdCl₄], гуанозин, аденозин, цитидин, хумани серум албумин (HSA) и DNK изолован из тимуса телета (CT DNA) добијени су од Sigma-Aldrich Chemical Co. Лиганди, H₄mda (2,2'-[1,3-диоксопропан-1,3-диил]диимино] дисирћетна киселина), H₄obp (3,3'-[1,2-диоксоетан-1,2-диил]диимино] дипропионска киселина), H₃obap (2-({[(3-аминопропил)амино](оксо)ацетил}амино) бензоева киселина), H₂арох (N,N'-bis(3-аминопропил)етандиамид), H₄obbz (2,2'-[(1,2-диоксоетан-1,2-диил]диимино] дибензоева киселина) синтетисани су према већ публикованим процедурама [126-128]. Бидестилована вода је коришћена за припремање раствора.

Електронски апсорпциони и емисиони спектри мерени су у циљу испитивања интеракција синтетисаних једињења и биолошки значајних молекула (DNK и HSA) у фосфатном и Tris-HCl пуферу (pH = 7,4) и 0,15 M NaCl због одржавања јонске јачине раствора. Полазни раствор HSA (20 μM) припремљен је у 0,05 M фосфатном пуферу и чуван у мраку на 0–4 °C. Полазни раствор CT DNA је припремљен растварањем DNK у 10 mM Tris-HCl пуферу. Концентрација DNK раствора (0,119 mM по нуклеотиду) је одређена спектрофотометријски у адекватно разблаженим узорцима, на основу коефицијента моларне абсорптивности 6600 M⁻¹cm⁻¹ на 260 nm. Раствори су чувани на 4 °C и коришћени у наредна 4 дана.

Цитотоксична активност синтетисаних једињења испитивана је на следећим ћелијским линијама: Hs294T (меланом), K562 (хронична мијелоидна леукемија), MCF-7 (хумани аденокарцином дојке), A549 (хумани карцином плућа), HT-29 (хумани колоректални аденокарцином), HeLa (хумани аденокарцином цервикса) MRC-5 (фибробласти плућа хуманог фетуса) и HCT-116 (колоректални карцином). Ћелије су гајене у Dulbecco-овом модификованом Eagle медијуму (DMEM) са 4,5% глюкозе, додатком 10% феталног говеђег серума (FBS, Sigma), раствора антибиотика и

антимикотика (Sigma). Ћелије су суб-култивисане два пута недељно, а суспензија појединачних ћелија је добијена применом 0,1% раствора трипсина у EDTA (Serva). Све ћелијске линије су култивисане на 37 °C, у атмосфери 5% CO₂ засићеном воденом паром. За све тестове су коришћене ћелије у експоненцијалној фази раста. Густина ћелија (број ћелија по јединици запремине) и проценат вијабилних ћелија су одређени по раније објављеној процедури [153]. Вијабилност ћелија коришћених током теста је износила преко 95%.

3.2 Синтезе нових једињења

3.2.1 Калијум-(2,2'-[1,3-диоксопропан-1,3-диил]диимино]диацетато) паладијум(II) хидрат, K₂[Pd(mda)] · H₂O комплекс (1)

Водени раствор K₂PdCl₄ (0,1632 g, 0,0005 mol) укапан је у водену суспензију H₄mda (0,109 g, 0,0005 mol) киселине. Добијеној смеши је постепено укапаван раствор КОН (5%) до постизања рН 9,0. Раствор је мешан 30 минута, профильтриран и филтрат остављен пар дана на собној температури. Након третирања етанолом (96%) добијени су жути кристали. Принос: 0,054 g (27 %).

Резултати елементалне микроанализе свих комплекса и лиганата синтетисаних у оквиру ове дисертације добијени у сагласности су са теоријски израчунатим вредностима. Израчунато за C₇H₈K₂N₂O₇Pd: C, 20,17; H, 1,93; N, 6,72; Нађено: C, 20,58; H, 1,68; N, 6,35%. ¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ(ppm) 4,0 (s, 2H, -CH₂), 4,8 (s, 4H, -CH₂). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O): δ(ppm) 188,3, 162,9, 56,7, 46,2. IR (KBr, ν_{max}/cm⁻¹ 1670 (COO)). UV-Vis, λ_{max/nm}: 300 и 350.

3.2.2 Калијум-(3,3'-[1,2-диоксоетан-1,2-диил]диимино]дипропионато) паладијум(II), K₂[Pd(obp)] комплекс (2)

Раствор K₂PdCl₄ (0,1632 g, 0,0005 mol) додат је у водену суспензију H₄obp (0,1161 g, 0,0005 mol) киселине. Смеша је третирана воденим раствором КОН (5%) до постизања рН 9,0. Добијени раствор је мешан 30 минута, профильтриран, упарен на мању запремину и третиран EtOH (96%). Добијени су кристали жуте боје. Принос: 0,09 g (45%). Израчунато за C₈H₈K₂N₂O₆Pd: C, 23,28; H, 1,95; N, 6,79; Нађено: C, 22,95; H, 2,23; N, 6,68%. ¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ(ppm) 2,5 (t, ³J = 6, 4H, -CH₂), 3,5 (t, ³J = 8, 4H, -CH₂). ¹³C

NMR (50 MHz, D₂O): δ (ppm) 185,1, 163,6, 41,9, 39,6. IR (KBr, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1661 (COO)). UV-Vis, λ_{\max}/nm : 309.

3.2.3 [N,N'-bis(3-аминопропил)етандиамидо] паладијум(II), [Pd(арох)] комплекс (3)

H₂арох лиганд (0,303 g, 0,0015 mol) је растворен у 5 ml воде, а затим третиран раствором K₂PdCl₄ (0,163 g, 0,0005 mol) уз интензивно мешање раствора. pH вредност раствора је одржавана у интервалу 7-8 додавањем раствора KOH. Резултујући раствор је након филтрирања остављен на собну температуру. Добијени су жути кристали у приносу 0,081 g (52,95%). Израчунато за C₈H₁₆N₄O₂Pd: C, 31,33; H, 5,26; N, 18,27. Нађено: C, 31,02; H, 5,33; N, 17,98%. Тачка топљења: 220 °C. IR (KBr, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1592 (CO)); ¹H NMR (200 MHz; DMSO-d₆): δ (ppm) 3,2 (m, 2H, -CH₂), 2,7 (t, 2H, -CH₂), 1,7 (t, 2H, -CH₂); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) 160,3, 36,8, 36,2, 27,2. UV-Vis, λ_{\max}/nm : 249.

3.2.4 Калијум-хидроген 2-([[(3-аминопропил)амино](оксо)ацетил}амино)бензоато) трихидрат, KH[Pd(обар)]₂ · 3H₂O комплекс (4)

H₃обар лиганд (0,132 g, 0,0005 mol) растворен је у 5 ml воде и неутралисан раствором KOH (0,084 g 0,0015 mol). Неутралисаном раствору додат је раствор (0,163 g, 0,0005 mol) K₂PdCl₄, резултујући раствор мешан 60 минута на 40 °C и профилиран. Комплекс паладијума након пар дана кристалише у облику жутих кристала. Принос: 0,1g (47,4%). Израчунато за C₂₄H₂₅KN₆O₁₁Pd₂: C, 34,89; H, 3,03; N, 10,17%. Нађено: C, 34,67; H, 3,95; N, 11,05. Тачка топљења: 258 °C. IR (KBr, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1603 (COO) и 1541 (CO)); ¹H NMR (200 MHz; DMSO-d₆): δ (ppm) 8,7 (1H, dd, ArH), 7,9 (1H, dd, ArH), 7,1 (1H, m, ArH), 6,8 (1H, m, ArH), 4,2 (2H, t, -CH₂), 2,9 (2H, t, -CH₂), 2,4 (2H, m, -CH₂); ¹³C NMR (50 MHz; DMSO-d₆): δ (ppm) 169,0, 167,2, 146,5, 133,3, 129,3, 127,0, 122,8, 120,1, 41,6, 36,4, 30,5. UV-Vis, λ_{\max}/nm : 288 и 336.

3.2.5 Дикалијум 2,2'-[(1,2-диоксоетан-1,2-диил)диимино]добензоат, K₂H₂obbz (5)

У раствор H₄obbz (0,328 g, 0,001 mol) киселине укапан је раствор калијум хидроксида (0,112 g, 0,002 mol) уз интензивно мешање, са циљем растварања киселине. Добијени раствор је остављен у фрижидеру. После неколико дана уочени су транспарентни кристали погодни за рендгенску дифракциону анализу. Принос, 0,26 g (59,6%). Израчунато за C₁₆H₁₀K₂N₂O₈: C, 44,03; H, 2,31; N, 6,42. Нађено: C, 43,90; H, 2,28; N, 6,40. ¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ (ppm) 6,8 (m, 2H, ArH), 7,3 (m, 2H, ArH), 7,7 (m, 2H,

ArH), 7,9 (m, 2H, ArH). ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 178,8, 150,5, 134,8, 133,8, 127,1, 123,0, 120,6, 120,4. IR (KBr, $\nu_{\text{max}/\text{cm}^{-1}}$ 3268 (NH), 1701 (COOH)).

3.2.6 3,3'-[(1,3-диоксопропан-1,3-диил)диимино] дипропанска киселина, H_4mdp (6)

У раствор β -аланина (4,2 g, 0,052 mol) у NaOH (2,08 g, 0,052 mol) лагано је укапаван етанолни раствор диетилмалоната (2,96 ml, 0,026 mol). Реакциона смеша је рефлуктована 3 h, а након тога и дестилована у циљу уклањања вишка етанола. Добијени раствор закишељен је 6 M HCl (pH = 2,0). Киселина је исталожена у виду праха беле боје. Принос је 3,60 g (60 %). Израчунато за $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6$: C, 43,90; H, 5,73; N, 11,38. Нађено: C, 43,26; H, 4,96; N, 11,04. Тачка топљења 201 °C. ^1H NMR (200 MHz, D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 2,6 (t, $^3\text{J} = 6$, 4H, $-\text{CH}_2$), 3,2 (s, 2H, $-\text{CH}_2$), 3,5 (t, $^3\text{J} = 6$, 4H, $-\text{CH}_2$). ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 179,4, 172,2, 46,2, 38,4, 36,6. IR (KBr, $\nu_{\text{max}/\text{cm}^{-1}}$ 3322 (NH), 1712 (COOH)).

3.2.7 Калијум-(2,2'-[(1,2-диоксоетан-1,2-диил)диимино] дибензоато) паладијум(II), $\text{K}_2[\text{Pd}(\text{obbz})]$ (7)

Раствор H_4obbz (0,328 g, 0,001 mol) делимично је неутралисан додатком раствора KOH (pH ~ 7), а затим је укапан водени раствор K_2PdCl_4 (0,326g, 0,001 mol). Резултујући раствор заалкалисан је раствором KOH (pH = 8), мешан 1 h, профилиран и остављен на собној температури. Добијен је прах жуте боје. Принос, 0,42 g (60,15%). Тачка топљења: 207 °C. Израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{K}_2\text{N}_2\text{O}_6\text{Pd}$: C, 37,76; H, 1,58; N, 5,51. Нађено: C, 38,58; H, 2,56; N, 5,93. ^1H NMR (200 MHz, D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 7,2 (m, 2H, ArH), 7,5 (m, 2H, ArH), 7,9 (dd, $J = 6,8$, 1,2, 2H, ArH), 8,4 (dd, $J = 8,2$, 1,1, 2H, ArH). ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 177,1, 161,5, 139,8, 134,9, 133,9, 127,5, 122,7. IR (KBr, $\nu_{\text{max}/\text{cm}^{-1}}$ 1671(COO)). UV-Vis, $\lambda_{\text{max}/\text{nm}}$: 212 и 310.

3.2.8 Калијум-(3,3'-[(1,3-диоксопропан-1,3-диил)диимино] дипропионат)паладијум(II)-хидрат $\text{K}_2[\text{Pd}(\text{mdp})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8)

Раствору H_4mdp (0,246 g, 0,001 mol) је укапан раствор K_2PdCl_4 (0,326 g, 0,001 mol), а након тога и раствор KOH до постизања pH 9. Смеша је мешана на собној температури 30 минута, профилирана и филтрат третиран раствором EtOH (96%). Комплекс кристалише у облику жутих кристала. Принос, 0,21 g (47,7%). Израчунато за $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{K}_2\text{N}_2\text{O}_7\text{Pd}$: C, 24,32; H, 2,70; N, 6,29. Нађено: C, 23,85; H, 2,63; N, 6,15. Тачка топљења: 274 °C. ^1H NMR (200 MHz, D_2O): $\delta(\text{ppm})$ 2,6 (t, $^3\text{J} = 6$, 4H, $-\text{CH}_2$), 3,1 (t, $^3\text{J} = 6$,

4H, -CH₂), 3,5 (s, 2H, -CH₂). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O): δ(ppm) 185,3, 174,7, 50,9, 45,2, 41,2. IR (KBr, ν_{max}/cm⁻¹ 1623 (COO)). UV-Vis, λ_{max}/nm: 315.

3.3 Инструменти коришћени у анализама и испитивањима

За сва синтетисана једињења, микроанализе за C, H и N изведене су у Микроаналитичкој лабораторији Хемијског факултета, Универзитета у Београду.

IR спектри у области 400-4000 cm⁻¹ снимани су на Perkin-Elmer FT-IR спектрофотометру Spectrum One, користећи технику KBr пилуле.

Протонски, ¹H и ¹³C NMR спектри су снимани на Varian VXR-300 MHz спектрометру. Као растварачи коришћени су DMSO-d₆ и D₂O. Померања су изражена у виду δ(ppm) вредности у односу на триметил-силилпропан-3-сулфонат (TSP) као референтни стандард.

Сви апсорпциони спектри су снимани на Perkin-Elmer Lambda 35 спектрофотометру. За ова мерења коришћени су 1 · 10⁻⁴ M водени раствори комплекса.

Снимања емисионих флуоресцентних спектра су вршена на RF-1501 PC спектрофлуориметру (Shimadzu, Japan).

Потенциометријска мерења су вршена на Consort C830 pH-метру опремљеном Metrohm Dosimat модел 665 аутоматском биретом и комбинованом стакленом електродом. Ова електрода је калибрисана коришћењем стандардних раствора пуфера на pH 4 и 7.

Тачке топљења су мерене на Stuart melting апарату са тачношћу од ± 1 °C.

3.4 Потенциометријска мерења

Комплексирање Pd(II)-јона са лигандима (L = H₄mda, H₄obr, H₃ovar, H₂арох, H₄mdp, гуанозином, аденозином и цитидином) проучавано је потенциометријским мерењима у 0,1 M натријум хлоридној средини, на 25 °C.

За ова проучавања направљена је серија раствора Pd(II)-јона и лиганата у којима је однос концентрација Pd/L 1:1, 1:2 и 2:1. Све pH-титрације изведене су у титрационом суду са двоструким зидом, при чему су коришћени узорци запремине од 20 ml. Температура раствора је одржавана константном (25,0 ± 0,1 °C) сталном циркулацијом

термостатиране воде кроз двоструки зид титрационе посуде. Титрације су извођене у атмосфери азота како би се обезбедило потпуно одсуство кисеоника и угљеник(IV) оксида. У сваки испитивани раствор додавана је тачно одређена количина хлороводоничне киселине да би се одмах на почетку избегло комплексирање или хидролиза. Испитивани раствори припремани су у 0,1 М NaCl средини и титровани потенциометријски, раствором натријум-хидроксида (0,0874 М). Титрације су вршене у рН опсегу од 2 до 12.

Константе протоновања лиганда, као и константе стабилности бинарних комплексних врста формираних у раствору одређене су испитивањем састава различитих могућих модела проучаваних система. Образовање једноставних комплекса између јона метала М и лиганда L типа $M_pH_qL_r$, може се приказати следећом реакцијом (1):



$M = Pd^{2+}$; $L = H_4mda, H_4obr, H_3obar, H_2arox, H_4mdp$, нуклеозиди

$$\beta_{p,q,r} = \frac{[M_pH_qL_r]}{[M]^p [H]^q [L]^r} \quad (2)$$

где је $\beta_{p,q,r}$ константа стабилности комплекса, а L означава депротоновани облик лиганда.

Константе стабилности тернарних система формираних у раствору између Pd(II), L и A према општој равнотежи (3) (наелектрисања су изостављена због једноставности):



A = Гуанозин, Аденозин и Цитидин

при константној температури и јонској јачини израчунате су према релацији (4):

$$\beta_{p,q,r,l} = \frac{[\text{Pd}]^p [\text{H}]^q [\text{L}]^r [\text{A}]^l}{[\text{Pd}]^p [\text{H}]^q [\text{L}]^r [\text{A}]^l} \quad (4)$$

Све константе протоновања киселина и константе стабилности комплекса су одређене коришћењем HYPERQUAD програма [154], а дистрибуција врста присутних у раствору је израчуната коришћењем програма Hyss2006 [155].

3.5 Спектрофотометријска мерења

У циљу одређивања константи везивања комплекса паладијума(II) за молекулу СТ DNA снимани су апсорпциони спектри раствора комплекса PdL и СТ DNA при чему су концентрације PdL комплекса одржаване константним ($4,0 \cdot 10^{-5}$ M) док је концентрација СТ DNA варирана од 0 до $4,5 \cdot 10^{-5}$ M ($[\text{комплекс}]/[\text{CTDNA}] = 0,0-2,5$). На основу добијених података израчунате су унутрашње константе везивања [156] према једначини (5):

$$\frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[\text{DNA}]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} \quad (5)$$

где су, ε_f и ε_b екстинкциони коефицијенти слободног и везаног комплекса. Екстинкциони коефицијент, ε_f је одређен из калибрационе криве која је добијена снимањем апсорбанце изолованог комплекса различитих концентрација. Екстинкциони коефицијент, ε_a је израчунат из Ламберт Беровог (*Lambert-Beer*) закона као однос између измерене апсорбанце испитиваног раствора A_{obs} и концентрације комплекса у њему, $(A_{\text{obs}} - A_{\text{DNA}})/[\text{комплекс}]$. Апсорбанце DNA, A_{DNA} за све испитиване концентрације DNA су одређене у одвојеном експерименту. Добијени резултати су приказивани графички као зависност $[\text{СТ DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ од $[\text{СТ DNA}]$. Нагиб добијене праве има вредност, $1/(\varepsilon_b - \varepsilon_f)$ и пресек са Y осом једнак $1/K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)$. Константа стабилности (везивања), K_b се добија из односа нагиба и пресека.

3.6 Флуоресцентна мерења

Испитивање интеракција синтетисаних комплекса са биомолекулима, вршено је снимањем емисионих флуоресцентних спектра. Испитивања су вршена са молекулима HSA и DNK изолованог из тимуса телета (CT DNA).

Флуоресцентни емисиони спектри HSA-комплекс система снимани су у области од 300–440 nm са ексцитацијом на 295 nm, при чему је концентрација HSA била константна ($2,0 \cdot 10^{-6}$ M), а концентрација комплекса варирана од 0 до $8,0 \cdot 10^{-6}$ M. Ширина прореза између ексцитације и емисије била је 10 nm.

Флуоресцентни спектри синтетисаних комплекса и молекула CT DNA, снимани су при константној концентрацији CT DNA ($2,5 \cdot 10^{-5}$ M), док је концентрација комплекса варирана од 0 до $4,5 \cdot 10^{-5}$ M ($[\text{комплекс}]/[\text{CTDNA}] = 0,0 - 2,5$).

У циљу испитивања компетитивне реакције синтетисаних комплекса и етидијум бромида (3,8-диамино-5-етил-6-фенилфенантридинијум бромид, EB) везаног за CT DNA снимани су флуоресцентни спектри CT DNA-EB у присуству синтетисаних комплекса. Етидијум бромид је типичан молекул који се веже интеркаларно за DNA. Промене у флуоресцентним спектрима CT DNA-EB у присуству других молекула, често се користе за испитивање интеракција између DNK и присутних молекула који могу бити метални комплекси.

Емисиони спектри CT DNA-EB, концентрација DNK била је идентична концентрацији EB ($2,5 \cdot 10^{-5}$) у одсуству и присуству различитих концентрација комплекса, [PdL] комплекси су снимани у опсегу 300–400 nm са ексцитацијом на 323 nm. Промене флуоресценције показују да комплекс интерагује са DNK, односно истискује EB из молекула DNK.

Коришћењем једначине (6) израчунате су константе, K_{sv} (Стерн-Волмерова константа), формирања [PdL] комплекса са DNK [90].

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (6)$$

где F_0 и F представљају интензитет флуоресценције пре и после додатка комплекса, K_q – биомолекулска константа гашења, τ_0 –време живота флуорофоре у одсуству комплекса ($\tau_0 = 10^{-8}$ s) и $[Q]$ -концентрација слободног комплекса.

Константа стабилности (K_a) и број везујућих места (n) за макромолекулу може се израчунати коришћењем једначине (7) [127]:

$$\log F_0 - F / F = \log K_a + n \log [Q] \quad (7)$$

Вредност K_a се може добити из пресека праве $\log F_0 - F / F = f(\log [Q])$ са ординатом, а број везујућих места (n) из нагиба праве.

3.7 МТТ тест цитотоксичности

МТТ тест је колориметријска метода којом се одређује проценат преживелих ћелија, односно процењује инхибиција раста. МТТ тест се заснива на редукцији тетразолијумске соли (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолијум бромид) до формазана, до које долази услед интеракције са митохондријалном дехидрогеназом у вијабилним, метаболички активним ћелијама. Туморске ћелије у експоненцијалној фази раста су засејане у микротитар плоче са 96 бунара ($10 \cdot 10^3$ ћелија по бунару у 100 μ l хранљивог медијума) и инкубиране 20 h да би ћелије адхерирале за подлогу. Тестиране супстанце су додаване (10 μ l/бунару) у све бунаре осим контролних у концентрацијама које су десет пута веће од финалних. Бунари који садрже ћелије без тестираних супстанци су коришћени као контрола. Бунари без ћелија који садрже медијум са испитиваним супстанцама коришћени су као слепе пробе. Микротитар плоче су инкубиране 48 h на 37 °C, у атмосфери са 5% CO₂ и засићеној воденом паром. Три сата пре краја инкубационог периода 10 μ l раствора МТТ-а (5 mg/ml) је додато у све бунаре. После 3 h инкубације на 37 °C, кисели-изопропанол (100 μ l 0,04 N HCl у изопропанолу) је додат у све бунаре и након неколико минута стајања на собној температури, како би се омогућило растварање љубичастих кристала формазана, апсорбанца је мерена на спектрофотометру (Multiscan MCC340, Labsystems) на 540/690 nm. Количина раствореног формазана директно је пропорционална броју живих ћелија, па је цитотоксичност израчуната према формули (8):

$$(1 - A \text{ узорка} / A \text{ контроле}) \times 100 \quad (8)$$

где је А измерена абсорбанца. Активност супстанце је изражена као IC50 вредност (концентрација једињења која инхибира раст ћелија за 50%). IC50 вредности једињења одређене су Median effect анализом [157]. За испитивање цитотоксичног ефекта изведена су два независна експеримента у којима је свака концентрација испитиваних једињења тестирана у по четири бунара.

3.8 Третман ћелија за детекцију апоптозе

Ћелије су засејане у микротитар плоче са 6 бунара ($5 \cdot 10^5$ ћелија/бунару), а затим третиране доксорубицином и испитиваним једињењима 48 h. Као контрола су коришћене нетретиране ћелије. Узорци третираних и контролних ћелија су коришћени за детекцију апоптозе проточном цитометријом, флуоресцентном микроскопијом и Вестерн блот анализом. Вијабилност је одређена *trypan blue dye-exclusion* тестом [158].

3.8.1 Annexin V-FITC/7-AAD тест за одређивање апоптозе и некрозе проточном цитометријом

Бојење је изведено према протоколу произвођача (Beckman Coulter, USA). Укратко, HeLa ћелије су третиране концентрацијама еквивалентним IC50 вредностима одговарајућих једињења, односно медијумом (контрола). Након третмана (48 h, 37 °C, 5% CO₂, апсолутна влажност) ћелије су сакупљене, опране у PBS-у и ресуспендоване у ледено хладном пуферу (Binding buffer). Суспензија ћелија ($1 \cdot 10^5$ ћелија) је обојена са 10 µl Annexin V-FITC и 20 µl 7-AAD и инкубирана 15 минута на + 4 °C. Узорци су анализирани помоћу проточног цитометра (Cytomics FC500, Beckman Coulter, USA). За одређивање процента вијабилних (AnnVneg/7AADneg), рано апоптотичних (AnnVpos/7AADneg), касно апоптотичних (AnnVpos/7-AADpos) и некротичних ћелија (AnnVneg/7-AADpos) коришћен је компјутерски програм Flowing Software (<http://www.flowingsoftware.com/>), а резултати су представљени као dot plot-ови.

3.8.2 Детекција апоптозе акридин оранж/етидијум бромид двоструким бојењем

За одређивање типа ћелијске смрти који индукују испитиване супстанце користили смо двоструко бојење флуоресцентним бојама акридин оранж и етидијум бромид (АО/ЕВ) [159]. Акридин оранж улази и у вијабилне и у невијабилне ћелије,

интеркалира се у дволанчану нуклеинску киселину (DNK) и емитује зелену флуоресценцију. Етидијум бромид улази само у невијабилне ћелије, интеркалира се у DNK и емитује црвену флуоресценцију. На основу емитоване флуоресценције, морфологије ћелије и изгледа једра могу се разликовати четири типа ћелија. Вијабилне ћелије имају нормалну морфологију и зелено једро са организованом структуром, док су рано апоптотичне ћелије мање, округле, хроматин је кондензован услед чега је једро униформно зелено, или је једро фрагментисано. Касно апоптотичне ћелије су округле и имају наранџасто/црвено једро са кондензованим или фрагментисаним хроматином. Некротичне ћелије имају наранџасто/црвено једро са организованом структуром.

Након третмана HeLa ћелија са IC50 вредностима тестираних једињења 9 μ l HeLa ћелија ($0,5 \cdot 10^6$ ћелија/ml) је помешано са 1 μ l смеше боја АО/ЕВ (АО: 100 mg/ml; ЕВ: 100 mg/ml). Због брзог уласка флуоресцентних боја у ћелију, морфологија ћелија је одмах анализирана на флуоресцентном микроскопу (Leica DM1000, Немачка). Сlike су снимљене са 400 x Canon PC 1089 камером.

3.9 Western blot анализа

Вестерн блот анализа је метода којом се протеини раздвајају под дејством електричног поља, а затим детектују помоћу специфичних антитела и визуализују додавањем супстрата, при чему се емитује светлост (хемилуминисценција).

Концентрација протеина у ћелијском лизату је одређена Bradford методом у микротитар плочама са 96 бунара (ThermoLab Systems, Multiscan Accent spectrophotometer) користећи говеђи серум албумин као стандард. Маркери молекулске масе протеина добијене су из Amersham Biosciences. 50 μ g протеина по узорку је нанесено на гел и раздвојено у електричном пољу. Протеини са гела су пренесени електрофоретским путем на поливинилиден дифлуорид (PVDF) мембрану Hybond-P (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL), а затим инкубирани са примарним антителима: анти-Bcl-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN), анти-поли (ADP-ribose) полимераза (PARP) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), анти-Caspase-3 (R&D Systems, Minneapolis, MN) и анти- α -, β - и γ -Actin (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Протеини су детектовани помоћу Enhanced chemiluminescence (ECL Plus) kit-a (Amersham Biosciences) који садржи секундарна антитела коњугована са пероксидазом.

Блотови су развијени помоћу ECL Plus detection system-а, а хемилуминисцентни сигнал је детектован на Hyperfilm-у (Amersham Biosciences).

3.10 Анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом

Ћелијски циклус је анализиран према описаној процедури [160]. HeLa ћелије су инкубиране у медијуму (контрола) или са испитиваним једињењима H₄obbz и K₂[Pd(mdp)] · H₂O у концентрацијама која одговарају IC₅₀ вредностима, 48 h на 37 °C, у атмосфери са 5% CO₂. Након инкубације ћелије су сакупљене, испране у PBS-у и коначно фиксиране преко ноћи у ледено хладном 70% етанолу. После фиксације, ћелије су испране, ресуспендоване у PBS-у који садржи 500 µg/ml RNaseA и инкубиране 30 минута на 37 °C у мраку. Бојење се изводи са 5µl пропидијум јодида (10 mg/ml). После 15 минута инкубације у мраку ћелије су анализиране помоћу Cytomics FC500 флоуцитометра (Beckman Coulter, USA). Садржај DNK је дефинисан коришћењем Flowing Software-а, а дистрибуција ћелијског циклуса је приказана хистограмом.

3.11 Рачунарске методе

3.11.1 Квантна механика

За проналажење оптималних геометрија квадратно планарних паладијум(II) комплекса коришћене су стандардна квантно-механичка DFT метода (Amsterdam density functional—ADF2007.01) [161-163] са Воско-Вилк-Нусар (Vosko–Wilk–Nussair, VWN) параметризацијом за апроксимацију локалне густине (LDA) и OPBE XC то јест OPTX предложеном разменом 2001. године од стране Ханди-Коен (Handy–Cohen) и са корелационом корекцијом градијента коју су представили 1996. године Перде-Бурк-Ерзенхоф (Perdew–Burke–Ernzerhof) [164]. Израчунавања су вршена без ограничења симетрије. Различите геометрије појединачних хелатних система (полазећи било од кристалних структура или преоптимизованих молекулском механиком) биле су оптимизоване до максимума и са вредношћу промене квадратног корена аритметичке средине квадрата геометрија испод 0,01 и 0,007 Å. За све атоме коришћене су орбитале Слејтеровог типа (STO), базни сет triple-ξ quality са поларизационом функцијом (TZP тип IV) из ADF базе. Сви базни сетови су преузети из ZORA приступа (ZORA се односи

редовну апроксимацију нултог реда [165-169]). За релативистичке прорачуне са тешким атомима попут паладијума, ZORA метод је препоручени приступ. Све оптимизације геометрија су вршене применом COSMO солватационог поља (*vide infra*). ADF параметри су коришћени за све COSMO солватационе параметре, заједно са неоптимизованим радијусом паладијума $r(\text{Pd}) = 1,975 \text{ \AA}$. Следствени прорачуни фреквенција на истом нивоу потврђују да су оптимизоване структуре у основном стању без имагинарних фреквенција. QM прорачуни такође су урађени користећи Gaussian 09A01 електронски пакет [170]. У оквиру ових прорачуна примењени су хибридни Бекеов (Becke) три-параметарски измењивачки функционал, заједно са Ли-Јанг-Пар (Lee–Yang–Parr) корелационим функционалом (B3LYP) [171,172]. Штутгарт-Дрезден-ов (Stuttgart–Dresden) ефективни коренски потенцијал (ECP) у комбинацији са валенционим базним сетом (SDD) је коришћен за прорачуне испитиваних система [173-175]. Стационарне тачке су окарактерисане као енергетски минимум проценом Хесиан (Hessian) индекса на одговарајућим потенцијалним енергетским површинама. Област SCF конвергенције (10^{-8} au) је коришћена за појединачне јединичне (*single point*) прорачуне.

3.11.2 Докинг метода

Молекулски докинг лиганада и паладијум(II) комплекса је симулиран на тродимензионалним рендгенским структурама Липард (Lippard) DNK додекамер дуплекса, PDB код 1AIO (слично 3LPV, 1GPG и 1LU5 структурама) [176], 29-мер дуплекс, PDB код 3M3Y [177], Grp78 (PDB код 3ldl) [178] Hsc70 (PDB код 3fzf) [179]. Секвенца DNK (у случају 1AIO) 5'-ССТСТGGTCTCC-3' добијена је после уклањања 1,2-cis- $\{\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\}^{2+}$ молекула. 29-мер DNK везан са 10-мер RNK добијен је после уклањања дела протеина и пириплатине из 3M3Y молекула. Докинг процеси су спроведени применом Autodock 4.2 софтвера опремљеним графичким интерфејсом (GUI) Auto-DockTools (ADT 1.5.6rc3) [180]. ADT је искоришћен за подешавање DNK и молекула лиганада: Гастајгерове (Gasteiger) шарже су израчунате, молекули воде су уклоњени и сви атоми водоника су додати, а неполарни атоми водоника су припојени атомима угљеника. 3D структуре и NPA атомске шарже молекула лиганада и одговарајућих комплекса добијене су на нивоу B3LYP/SDD/PCM (вода) прорачуна. Pdbqt фајле лиганада су генерисане коришћењем Rasoon софтвера [181] како би задржале оригиналне NPA шарже. ADT је такође употребљен за генерисање докинг

инпут фајли. У свим докинг експериментима је коришћена кутија величине $60 \times 60 \times 60$ тачака у x , y , и z правцима, а мапе су у центру између: G30 и G31 база DNK 1A1O (или у центру DG18 близу 29-mer из 3M3Y). Размак решетке $0,375 \text{ \AA}$ (приближно четвртина дужине угљеник-угљеник ковалентне везе) и функција удаљености диелектричне константе су коришћени за израчунавање енергетских мапа. Педесет рачуна генерисано је употребом Lamarckian Genetic Algorithm претраживача. Уобичајена подешавања су коришћена са почетном популацијом од 150 насумично постављених јединица, са максималним бројем од $2,5 \cdot 10^5$ енергетских евалуација, и максималним бројем $2,7 \cdot 10^4$ симулација. Одабране су стопе мутације од 0,02 и 0,8. Слободне торзије су примењене за све киселине. Изабране су позе са најбољим резултатом вишеструког доковања истих једињења. Анализа DNK-комплекс једињења се заснивала на водоничним везама и блиским контактима. Вредности слободних енергија везивања (ΔG) и константи инхибиције (K_i) су добијени из докинг прорачуна. Комплекси су оптимизовани квантно-механичким прорачунима и са Миликеновим (Millikan) шаржама коришћеним у докинг процесу. Како јон паладијума у Аутодок (Autodock) програму није параметризован, коришћени су параметри за јон мангана.

3.12 MM и QM/MM/MD симулације

Молекуларна динамика је извршена помоћу МСРВ приступа [182] са циљем параметризације нових паладијум(II) комплекса. За структурно моделирање и анализу података је коришћен AmberTools15 [183], док је `pmemd.cuda` [184,185] у оквиру пакета AMBER14 [186] коришћен у MD симулацији. Полазећи од цисплатина-Atox1 димера [187] (код 3IWX) и испитиваних моделираних комплекса добијене су полазне структуре протеин-лиганд комплекса (НАН1 Atox димер протеина са сваким комплексом паладијума). Хетероатоми заједно са молекулима воде су уклоњени из полазне структуре 3IWX. Полазна испитивана једињења садрже пет различитих Atox1-[PdL]-Atox1 система симулираних MM и QM/MM приступима. Добијене су ΔG вредности (MMGBSA и MMPBSA методама) на начин описан у наставку.

За QM прорачуне у процесу параметризације коришћен је Gaussian03 Rev E.01 [188]. Сваки комплекс оптимизован је на основу B3LYP [171,172,189,190]/SDD [191,192] нивоа теорије. Након тога је МСРВ.ру у оквиру AmberTools15 пакета коришћен за

добијање параметара поља силе веза и углова које се односе на централни Pd^{2+} јон на основу QM прорачуна: Равнотежна растојања везе и вредности углова су добијени на основу оптимизоване структуре, док су константе силе добијене на основу Картезијанових (Cartesian) Хесиан (Hessian) матрица и применом Семинарио (Seminarо) методе [193]. Торзиони параметри који се односе на централни јон метала су третирано као нулти са неким изузецима за које су торзије прилагођене како би се одржала планарност $[\text{Pd}(\text{mdp})]^{2-}$ и $[\text{Pd}(\text{obbz})]^{2-}$ комплекса. Мерц-Колманова (Merz-Kollman) популациона анализа [194] је извршена да би се добио електростатички потенцијал на основу оптимизоване структуре, током којих је VDW радијус Pd^{2+} јона третиран са вредношћу $1,303 \text{ \AA}$, преузет из сета параметара за TIP3P модел воде [195] од Лија и сарадника (Lee et. al.) [196]. Antechamber [197] у оквиру AmberTools15 је коришћен за RESP (restrained electrostatic potential) подешавање шарже пет комплекса. Преостале везе, углови и торзиони параметри (који се не односе на централни Pd^{2+} јон) за лиганде који садрже паладијум базирани су на Оквирном Амбер Пољу Силе (GAFF) [180] са верзијом 1.8, док је протеински систем симулиран уз употребу параметара ff14SB поља силе. Квалитет добијеног поља силе за лиганде тестиран је на основу прорачуна RMSD вредности између QM оптимизоване и MM минимизираних структуре.

MM минимизирање је извршено помоћу NAB (Nucleic Acid Builder) модула у оквиру AmberTools15: прва минимизација је изведена употребом коњугованог алгоритма минимизације са критеријумом конвергенције енергетског градијента од $5 \cdot 10^{-5} \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-1}$ и максимално 20000 корака, затим још једно минимизирање извршено помоћу Њутн-Рапсон (Newton-Raphson) алгоритма са критеријумом конвергенције енергетског градијента од $2 \cdot 10^{-12} \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-1}$ и максимално 50 корака. На основу прве параметризације RMSD вредности MM минимизираних структура $[\text{Pd}(\text{mda})]^{2-}$, $[\text{Pd}(\text{mdp})]^{2-}$, $[\text{Pd}(\text{obap})]^{-}$, $[\text{Pd}(\text{obbz})]^{2-}$ и $[\text{Pd}(\text{арох})]$ лиганата биле су 0,54, 0,26, 0,64, 0,87, и 0,15 \AA , у односу на QM оптимизоване. Затим су неки диедарски параметри коориговани у $[\text{Pd}(\text{mda})]^{2-}$, $[\text{Pd}(\text{obap})]^{-}$ и $[\text{Pd}(\text{obbz})]^{2-}$ комплексима како би боље задржали планарност и при томе смо смањили RMSD на 0,36, 0,16, и 0,19 \AA . Да би се потврдила параметризација, изведене су анализе MM нивоа и упоређене са QM добијеним резултатима. Добијени су R2 фактори линеарног слагања $[\text{Pd}(\text{mda})]^{2-}$, $[\text{Pd}(\text{mdp})]^{2-}$, $[\text{Pd}(\text{obap})]^{-}$, $[\text{Pd}(\text{obbz})]^{2-}$ и $[\text{Pd}(\text{арох})]$ комплекса 0,9898, 0,9897, 0,9877, 0,9778 и 0,9933.

На основу најбоље рангираних структура из Аутодока (Autodock) [181,198] припремљене су полазне структуре протеин-лиганд комплекса (Atox1 димер протеина са сваким комплексом паладијума). Правоугаона кутија TIP3P34 са водом као растварачем ($\sim 75 \text{ \AA} \times 72 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$) се користила за солватисање система молекулима воде најмање $1,5 \text{ \AA}$ удаљеним од протеина. Позитивно наелектрисање система неутралисано је присуством Cl^- јона са VDW параметрима преузетим од Лија (Lee et. al.) [199]. Геометрија солватисаног протеин-лиганд комплексног система оптимизована је кроз четири фазе минимизације. Извршено је 1000 корака најригорозније минимизације, као и 1000 корака коњуговане минимизације за сваку од прве три фазе. Ограничење од $200 \text{ mol} \cdot \text{kcal}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ је додато свим атомима у протеин-лиганд комплексу у првој фази, тешким атомима у протеин-лиганд комплексу у другој фази, а леђним C, CA и N атомима у протеину и тешким атомима у комплексу у трећој фази. Четврта фаза минимизирања извршена је у 2000 корака најригорозније минимизације и после тога 3000 корака коњугованог минимизирања са $20 \text{ mol} \cdot \text{kcal}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ ограничења леђних N, CA и C атома, као и тешких атома у лигандима. Након тога MD симулација у трајању од 1 ns је изведена у NVT условима како би се систем загрејао од 0 до 298,15 K, затим је систем уравнотежен за време од 1 ns на 298,15 K, такође у NVT условима. Након тога, да би се урадила корекција густине и даље уравнотежење система додатна 1 ns MD симулације је изведена на 298,15 K и 1 атмосфери у NPT условима. Ове MD симулације су урађене са ограничењима од $10 \text{ mol} \cdot \text{kcal}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ на бочним N, CA и C атомима протеина као и тешким атомима комплекса, у односу на почетне структуре сваке фазе. На крају, 20 ns молекулске динамике извршено је на 298,15 K у NVT условима без икаквих ограничења. За даљу анализу сачувани су конформациони резултати за сваких 10 ps динамике са укупно прикупљених 2000 узорака. Резултати претходних истраживања [200] указују да би више независних узорковања могли понудити боље резултате. Овде смо поставили 10 независних рачуна за сваки комплекс. За време од 200 ns динамике прикупљено је укупно 20000 узорака за сваки комплекс. За електростатичке интеракције ширег домета коришћен је Евалдов (Ewald) приступ мреже честица (PME) [201-203], уз периодични гранични услов и уз границу домета интеракција од 8 \AA током трајања симулације. SHAKE [204] је коришћен да би смо ограничили дужине веза тешких атома и атома водоника са толеранцијом од 10^{-5} \AA , док је алгоритам три тачке коришћен за молекуле воде [205]. Температура је контролисана Лангевиновим (Langevin) алгоритмом са

фреквенцијом судара од $1,0 \text{ ps}^{-1}$ у свим MD симулацијама. Притисак је контролисан помоћу Берендсеновог (Berendsen) баростата [206] са временом релаксације притиска од $1,0 \text{ ps}$ у NPT кораку постизања равнотеже.

Применом MMGBSA и MMPBSA метода за добијање промене енталпија везивања лиганда на основу 2000 корака израчунате су слободне енергије везивања. Промена ентропије везивања добијена је применом нормализованог метода анализе лиганда на основу $1/10$ од 2000 корака. Анализа MMGBSA вршена је применом модификованог GB модела Онуфријева и сарадника (Onufriev et. al.) [207] са концентрацијом соли од $0,1 \text{ M}$. MMPBSA анализа је изведена у условима $0,1 \text{ M}$ јонске силе, $0,005 \text{ kcal/mol} \cdot \text{Å}^2$ површинског напона и без корекције доприноса слободне енергије из неполарних интеракција. Нормализован метод анализе је изведен у условима $0,1 \text{ M}$ јонске силе на $298,15 \text{ K}$ са GB моделом Хокинса и сарадника (Hawkins et. al.) [208].

3.12.1 QM/MM

Применом РМ6 семи-емпиријске QM методе [209] третирали су [PdL] комплекси паладијума и бочни ланац атома четири суседна CYS остатка (смештени у QM област), док је други део система представљен AMBER ff14SB пољем силе [210]. Просечна конформација класичне MD симулације узета је као полазна структура за QM/MM прорачуне. Изведено је $3 \times 300 \text{ ps}$ узорковања на 300 K без икаквих ограничења. Три корака симулације су извршена у NVT условима. У овим симулацијама је коришћен временски корак од 2 fs , и Лангевиновог (Langevin) термостат за контролу температуре са фреквенцијом судара третираном са 1 ps^{-1} . Редовни РМЕ приступ је коришћен за процену удаљених QM-QM и MM-MM електростатичких интеракција, док су обе QM и MM електростатичке енергије као и QM-QM сила дугог домета израчунате на основу QM компатибилне РМЕ методе. SHAKE је коришћен за све везе које укључују атоме водоника у обе QM и MM области. За молекуле воде је коришћен SHAKE тродимензионални алгоритам.

3.13 Рендгенска структурна анализа

3.13.1 Рендгенска структурна анализа K_2H_2obbz лиганда (5)

Монокристали лиганда димензија $0,20 \times 0,20 \times 0,40 \text{ mm}^3$ снимани су SMART APEX дифрактометром опремљеним CCD детектором, МоК α зрачењем ($\lambda = 0,71073$) и корекцијом апсорпционих ефеката према SADABS процедуре [211]. Фазни проблем је решен директним методама, а структуре рафинисане full-matrix методом најмањег квадрата на свим F2 користећи SHELXL97 [212] имплементиран у програмском пакету WINGX [213]. Фактори расипања неутралног атома узети су из међународне табеле за рендгенску кристалографију [214]. Сlike структура добијене су коришћењем ORTEPIII [215]. Основни кристалографски подаци, као и параметри рафинисања дати су у табели 1.

Табела 1. Основни кристалографски подаци и параметри рафинисања структуре K_2H_2obbz лиганда

Формула	K_2H_2obbz	$\alpha/^\circ$	90,00
Хемијска формула	$C_8H_5KNO_4$	$\beta/^\circ$	90,00
Молекулска маса	218,23	$\gamma/^\circ$	120,00
Тачка топљења /K	293(2)	Запремина јединичне ћелије / \AA^3	4448,1(17)
$\lambda / \text{\AA}$	МоК α , 0,71073	Густина / Mg m^{-3}	1,466
Димензије кристала /mm	0,20 x 0,20 x 0,40	Број сакупљених рефлексја	10544
Кристални систем	Тригоналан	Број независних рефлексја	2281
Просторна група	R3	R_{int}	0,090
$a/\text{\AA}$	28,145(4)	Број употребљених рефлексја ($I > 2\sigma(I)$)	958
$b/\text{\AA}$	28,145(4)	R_1	0,0781
$c/\text{\AA}$	6,484(1)	$wR(F^2)$	0,3043

3.13.2 Рендгенска структурна анализа $K_2[Pd(mda)] \cdot H_2O$ комплекса (1)

Одговарајући, жуто обојени кристали облика паралелопипеда су добијени прекристализацијом из воде. Кристал димензија $0,21 \times 0,20 \times 0,08 \text{ mm}^3$ је монтиран на врху стакленог влакна и изнивелисан на Bruker SMART APEX CCD дифрактометру [216]. Укупно 1800 узорака је сакупљено за време излагања од 10,0 секунди по узорку. Укупно време прикупљања података било је 8 h. Коначна јединична ћелија је добијена након интеграције 6222 рефлексја из xyz центроида. Подаци интензитета су кориговани

за Лоренцове (Lorenz) и поларизационе ефекте уз варирање скале за пропадање и апсорпцију: примењена је корекција апсорпције вишеструким-скенирањем, на основу интензитета симетрије-везаних рефлексија мерених по различитим угаоним подешавањима и свођењем на F_0^2 . Програмски пакет SHELXTL је коришћен за одређивање просторне групе (XPREP) [216]. Јединична ћелија је идентификована као моноклинична, а просторна група као P21/a. Структура је решена применом директних метода SIR-97 [217]. Сви прорачуни рафинисања су вршени на HP XW6200 (Intel XEON 3.2 Ghz)/Debian-Linux рачунару на Гронинген Универзитету применом програмских пакета SHELXL [212] (рафинисање методом најмањих квадрата). Кристалографски подаци и параметри рафинисања су наведени у табели 2.

Табела 2. Основни кристалографски подаци и параметри рафинисања структуре комплекса $K_2[Pd(mda)] \cdot H_2O$

Формула	$K_2[Pd(mda)] \cdot H_2O$	$\alpha / ^\circ$	90,00
Емпиријска формула	$C_7H_8N_2O_7PdK_2$	$\beta / ^\circ$	103,671(1)
Молекулска маса	416,77	$\gamma / ^\circ$	90,00
Тачка топљења /K	100(1)	Запремина јединичне ћелије / \AA^3	1184,44(13)
Димензије кристала /mm	0,21 x 0,20 x 0,08	Густина / g cm^{-3}	2,405
Кристални систем	Моноклиничан	Број сакупљених рефлексија	10447
Просторна група	P21/a, 14	Број независних рефлексија	2900
$a / \text{\AA}$	7,2535(5)	Број употребљених рефлексија	2680
$b / \text{\AA}$	18,026(5)	R_I	0,0469
$c / \text{\AA}$	9,3228(5)	$wR(F^2)$	0,1331

3.13.3 Рендгенска структурна анализа $KH[Pd(obap)]_2 \cdot 3H_2O$ комплекса (4)

Монокристал димензија $0,254 \times 0,086 \times 0,064 \text{ mm}^3$ комплекса је постављен на стаклено влакно Oxford Diffraction Gemini S четворокружног гониометра опремљеног Sapphire CCD детектором. Растојање кристал-детектор је 45,0 mm, а за експеримент је коришћено монохроматско графитно зрачење $MoK\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). Структура је решена коришћењем директне методе Sir 97 програма [216,218] и рафинисана применом full-matrix методе најмањих квадрата на F2 употребом SHELXL-97 програма [219] имплементираног у WinGX програмском пакету [213]. Не-водонични атоми су рафинисани анизотропно. У завршној фази рафинације, H атоми су геометријски позиционирани и рафинисани применом модела јахача са заменом фиксних изотропних

параметара (са изузетком оних који су укључени у неодређени молекула, па не могу бити позиционирани на овај начин). Доприноси из неодређеног молекула воде су уклоњени рутинском применом SQUEEZE (PLATON) [220] и резултат прорачуна је везан за CIF фајлу. Рафинисање 5463 посматраних рефлексија достигло је индекс неслагања $R = 0,0763$. Накнадна разлика Фуриерове (Fourier) мапе показала је регионе преостале електронске густине (највиша вредност = $4,6 \text{ e } \text{Å}^{-3}$), углавном сведене на шупљине. Ова чињеница је протумачена као неодређености растварача (вода). Моделирали смо ове прилично изражене пикове електронске густине, као што су густине атома кисеоника из воде Ow, OwA, OwB.

Табела 3. Кристалографски подаци и параметри рафинисања структуре комплекса $\text{KN}[\text{Pd}(\text{obap})]_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Формула	$\text{KN}[\text{Pd}(\text{obap})]_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$\alpha / ^\circ$	71,249(5)
Емпиријска формула	$\text{C}_{24} \text{H}_{25} \text{KN}_6 \text{O}_{11} \text{Pd}_2$	$\beta / ^\circ$	77,923(5)
Молекулска маса	825,40	$\gamma / ^\circ$	76,403(5)
Тачка топљења /К	293(2)	Запремина јединичне ћелије / Å^3	1548,9(12)
Димензије кристала /mm	0,254 x 0,086 x 0,064	Густина / Mg m^{-3}	1,770
Кристални систем	Триклинчан	Брос сакупљених рефлексија	10061
Просторна група	P -1	Број независних рефлексија	5463
$a / \text{Å}$	7,873(5)	R_{int}	0,0385
$b / \text{Å}$	13,741(5)	Број употребљених рефлексија ($I > 2\sigma(I)$)	417
$c / \text{Å}$	15,723(5)	R_1	0,0763
		$wR(F^2)$	0,2047

U_{eq} вредност једног Ow атома у односу на просечну U_{eq} вредност за неводоничне атоме је висока, али нисмо се бавили тиме јер није од значаја. Кристалографски подаци и параметри рафинисања су дати у табели 3.

3.13.4 Рендгенска структурна анализа $\text{K}_2[\text{Pd}(\text{mdp})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ комплекса (8)

Лаганим испаравањем воденог раствора на собној температури добијени су монокристали комплекса. Кристалографски подаци су прикупљени помоћу SMART APEX дифрактометра опремљеног CCD детектором, $\text{MoK}\alpha$ зрачењем ($\lambda = 0,71069$) и корекцијом апсорпционих ефеката према SADABS процедуре [211]. Фазни проблем је решен директним методама и структуре су рафинисане full-matrix методом најмањег квадрата на свим F2 користећи SHELXL97 [212] имплементиран у програмском пакету WINGX [213]. Фактори расипања неутралног атома узети су из међународне табеле за

рендгенску кристалографију [214]. Сlike структура су добијене коришћењем ORTEP III [215] програма. Кристалографски подаци, као и параметри рафинисања су дати у табели 4.

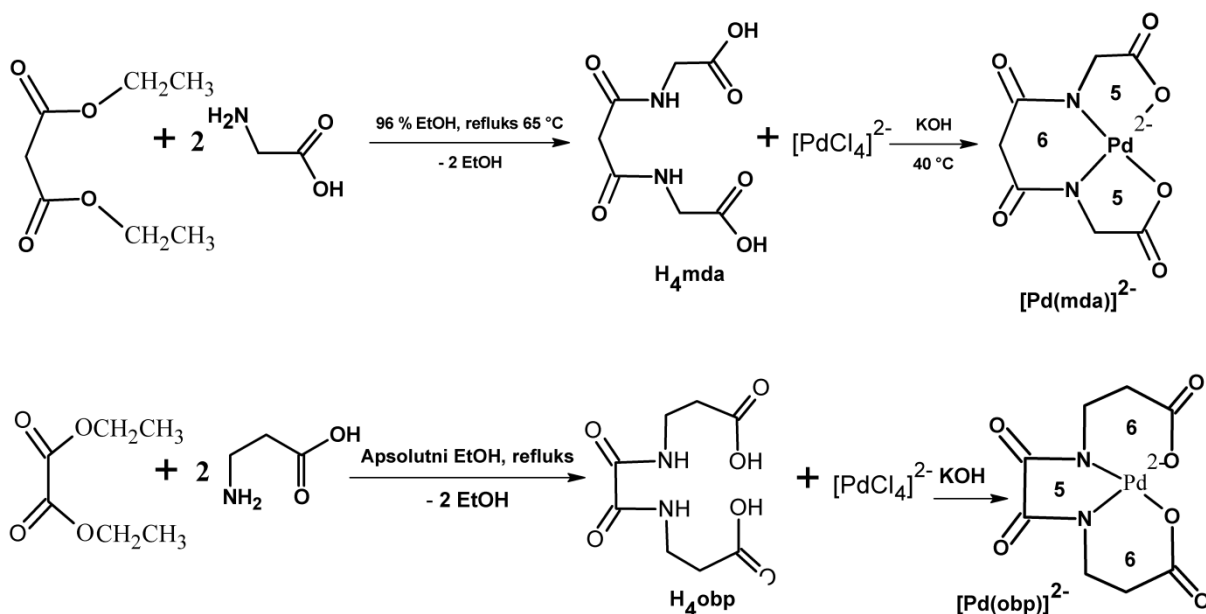
Табела 4. Кристалографски подаци и параметри рафинисања структуре комплекса $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$

Формула	$K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$	$\alpha / ^\circ$	90,00
Хемијска формула	$C_9 H_{12} K_2 N_2 O_7 Pd$	$\beta / ^\circ$	97,40
Молекулска маса	444.81	$\gamma / ^\circ$	90,00
Тачка топљења / К	293(2)	Запремина јединичне ћелије / \AA^3	685,3(8)
$\lambda / \text{\AA}$	MoK α , 0,71073	Густина / $Mg m^{-3}$	2,156(3)
Димензије кристала / mm	0,20 x 0,40 x 0,50	Број сакупљених рефлексја	11082
Кристални систем	Моноклиничан	Број независних рефлексја	2255
Просторна група	$P2_1/m$	R_{int}	0,027
$a / \text{\AA}$	4,222(3)	Број употребљених рефлексја ($I > 2\sigma(I)$)	2113
$b / \text{\AA}$	17,471(11)	R_I	0,0192
$c / \text{\AA}$	9,368(6)	$wR(F^2)$	0,0480

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 Синтеза амидних лиганата оксалне и малонске киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II)

У оквиру ове дисертације синтетисани су тетрадентатни лиганди карбоксамидног типа као и одговарајући комплекси паладијума(II). Присуство пептидне везе, иначе присутне у великом броју биомолекула, чини лиганде овог типа веома интересантним.

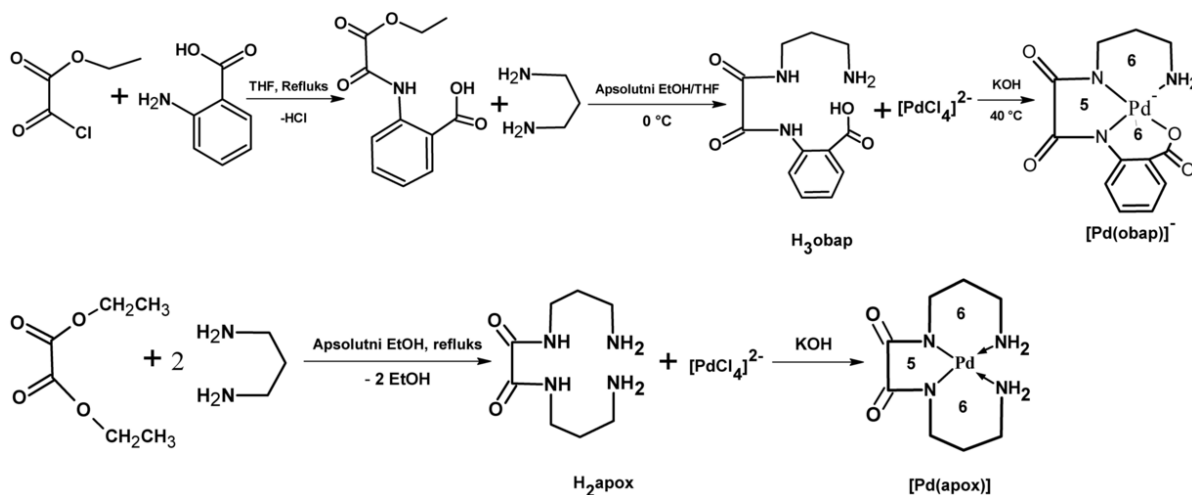


Шема 5. Синтеза тетрадентатних H_4mda и H_4obp лиганата и одговарајућих комплекса паладијума(II)

Код комплекса паладијума(II) са овим типом лиганата граде се веома стабилне везе остварене путем координације амидног атома азота и јона паладијума(II) и лабилне везе између атома кисеоника и јона паладијума(II).

Као што је приказано шемом 5 тетрадентатни N_2O_2 лиганди (H_4mda и H_4obp) синтетисани су у реакцији етанолног раствора диетилмалоната/диетилхлоридата са неутралисаним воденим раствором глицина или β -аланина у моларном односу 1:2.

У наредној фази, ове дисертације, у бочни низ деривата оксалне киселине уведено је ароматично језгро и диамински ланац и тиме је добијен лиганд N_3O хромофоре (H_3obap). Синтеза је извршена је у две фазе.



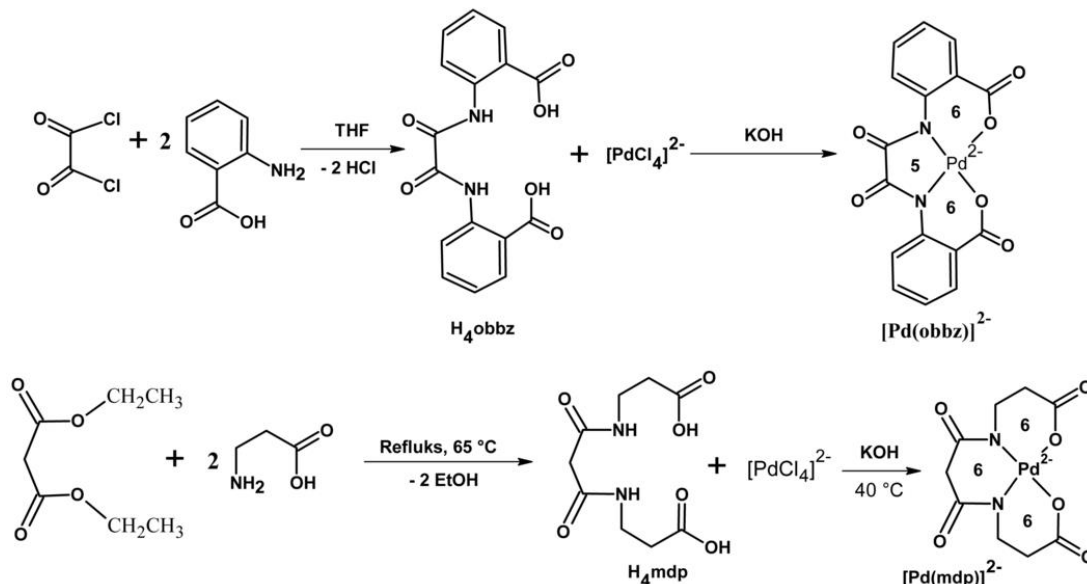
Шема 6. Синтеза тетрадентатних H_3obap и H_2apox лиганата и одговарајућих комплекса паладијума(II)

Прва фаза реакције подразумевала је синтезу интермедијера (етил оксамат бензоеве киселине) у реакцији етил-оксалил-хлорида са антранилном киселином. У другој фази лиганд је синтетисан кондензацијом добијеног интермедијера са 1,3-пропандиамином присутним у вишку (Шема 6). Лиганд је исталожен из реакционе смеше без подешавања pH вредности.

Тетрадентатни $-N-N-N-N-$ лиганд (H_2apox) је добијен у реакцији раствора 1,3-пропандиамин (апсолутни етанол) са етил оксалил хлоридом (Шема 6).

Резултати испитивања цитотоксичне активности претходно синтетисаних једињења указали су да деривати малонске киселине са аминокиселинским остацима у бочном ланцу показују бољу биолошку активност од деривата оксалне киселине. У том смислу, извршена је модификација H_4obp лиганата увођењем једне $-CH_2-$ групе у леђни

прстен, док смо структуру H_3 обар лиганда модификовали увођењем још једног ароматичног језгра(остатак антранилне киселине). Синтеза модификованих лиганата (H_4obbz и H_4mdp) представљена је шемом 7.



Шема 7. Синтеза H_4obbz и H_4mdp лиганата и одговарајућих комплекса паладијума(II)

Лиганд H_4obbz синтетисан је према раније објављеној процедури Кана и сарадника (Kahn et. al.) [128]. Растворени лиганд у присуству раствора калијум-хидроксида кристалисао је као дикалијумова со, 2,2'-[(1,2-диоксоетан-1,2-диил диимино)] дикарбоксилне бензоеве киселине (K_2H_2obbz) у облику погодном за рендгенску структурну анализу.

У реакцији етанолног раствора диетилмалоната са β -аланином добијен је нови лиганд (H_4mdp). Смеша је рефлугована три сата. Лиганд је исталожен подешавањем рН вредности раствором 6 М хлороводоничне киселине.

Синтезе одговарајућих комплекса паладијума(II) у реакцијама добијених лиганата и K_2PdCl_4 приказани су шемама 5, 6 и 7.

За сва синтетисана једињења урађена је елементална микроанализа (Табела 5). Спектрални подаци (UV-Vis, IR, 1H NMR и ^{13}C NMR) потврђују предложене молекулске

формуле (дато у експерименталном делу), а у случају паладијум(II) комплекса подржавају квадратно планарну геометрију. Молекулска структура неких синтетисаних једињења потврђена је рендгенском структурном анализом.

Табела 5. Резултати елементалне микроанализе синтетисаних једињења

Лиганд - Комплекс	Боја	Нађено (израчунато %)		
		С	Н	Н
H ₄ mda	Бела	38,46 (38,52)	4,28 (4,65)	12,58 (12,81)
K ₂ [Pd(mda)]·H ₂ O	Жута	20,58 (20,17)	1,68 (1,93)	6,35 (6,72)
H ₄ obp	Бела	42,00 (41,38)	5,28 (5,21)	11,92 (12,06)
K ₂ [Pd(obp)]	Жута	22,95 (23,28)	2,23 (1,95)	6,68 (6,79)
H ₃ obap	Бела	54,35 (54,33)	5,79 (5,70)	16,12 (15,84)
KH[Pd(obap)] ₂ ·3H ₂ O	Жута	34,67 (34,89)	3,95 (3,03)	11,05 (10,17)
H ₂ apox	Бела	47,12 (47,51)	9,05 (8,97)	27,30 (27,70)
[Pd(apox)]	Жута	31,02 (31,33)	5,33 (5,26)	17,98 (18,27)
H ₄ obbz	Бела	57,86 (58,54)	3,52 (3,68)	8,49 (8,53)
K ₂ [Pd(obbz)]	Жута	38,58 (37,76)	2,56 (1,58)	5,93 (5,51)
H ₄ mdp	Бела	43,26 (43,90)	4,96 (5,73)	11,04 (11,38)
K ₂ [Pd(mdp)]·H ₂ O	Жута	23,85 (24,32)	2,63 (2,70)	6,15 (6,29)

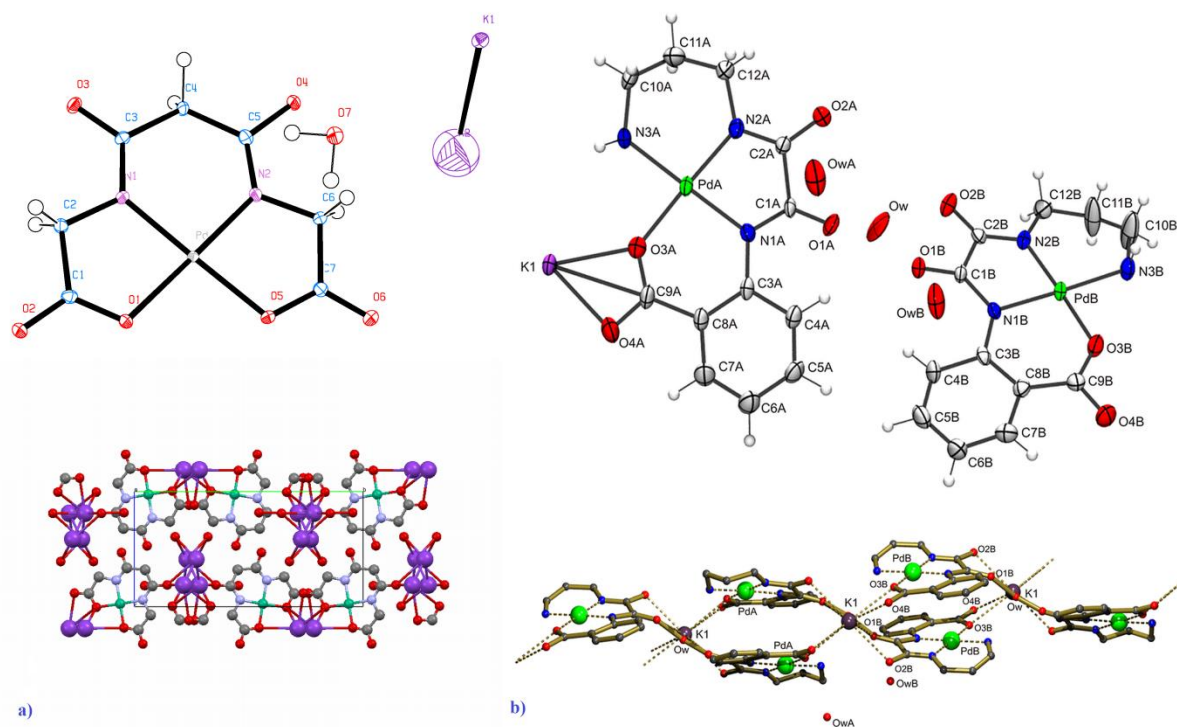
4.2 Рендгенска структурна анализа синтетисаних једињења

Погодни кристали K₂H₂obbz лиганда и паладијум(II) комплекса са H₄mda, H₃obap и H₄mdp лигандима скенирани су рендгенском дифракционом анализом. На овај начин одређене су структуре K₂H₂obbz, K₂[Pd(mda)]·H₂O, KH[Pd(obap)]₂·3H₂O и K₂[Pd(mdp)]·H₂O молекула. У експерименталном делу су дати кристалографски подаци (Табеле 1, 2, 3 и 4), а дужине и углови веза у табели 6.

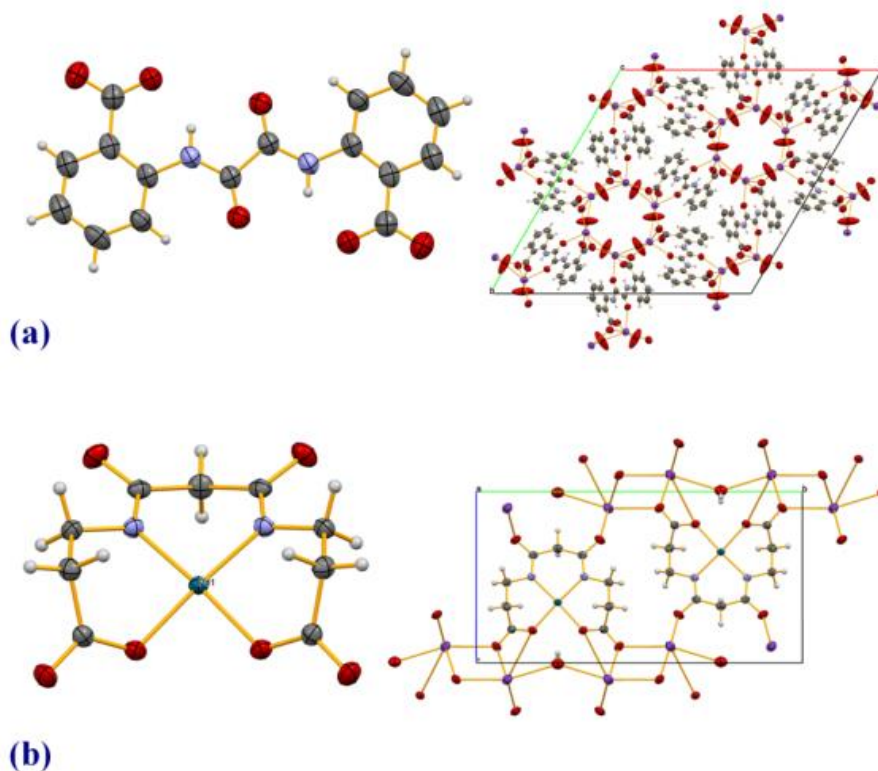
Идентификација атома, конфигурација ањонског остатка, као и паковање молекула у јединичној ћелији приказани су у ORTEP-у (Слика 16 и 17).

Табела 6. Дужине (Å) и углови (°) веза синтетисаних паладијум(II) комплекса и K_2H_2obbz лиганда

$K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$		$K_2[Pd(mda)] \cdot H_2O$		$KH[Pd(obap)]_2 \cdot 3H_2O$		K_2H_2obbz	
Дужине веза							
Pd1-N1	1,982(2)	Pd-N1	1,950(1)	Pd1-O3A	1,995(6)	N1-C3	1,410
Pd1-N1	1,982(2)	Pd-N2	1,946(1)	Pd1-N1A	1,984(6)	N1-C3	1,410
Pd1-O1	2,039(1)	Pd-O1	2,025(1)	Pd1-N2A	1,962(6)	N1-C8	1,332
Pd1-O1	2,039(1)	Pd-O5	2,035(1)	Pd1-N3A _{amine}	2,028(6)	N1-C8	1,332
						C8-O3	1,230
						C8-O3	1,230
						C1-O2	1,258
						C1-O2	1,258
						C1-O1	1,249
						C1-O1	1,249
Углови веза							
O1-Pd1-N1	175,9(5)	O1-Pd-N2	176,3	N1A-Pd1-N3A	177,5		
N1-Pd1-O1	175,9 (5)	N1-Pd-O5	178,6	N2A-Pd1-O3A	177,8		
O1-Pd1-N1	92,5 (5)	O1-Pd-N1	83,8	O3A-Pd1-N3A	86,6		
O1-Pd1-O1	83,7 (4)	O1-Pd-O5	97,1	N3A-Pd1-N2A	95,6		
O1-Pd1-N1	92,5 (5)	O5-Pd-N2	83,6	O3A-Pd1-N1A	94,3		
N1-Pd1-N1	91,2 (5)	N1-Pd-N2	95,4	N1A-Pd1-N2A	83,5		



Слика 16. Ортер дијаграм молекулске структуре и паковања кристала (a) комплекса, $K_2[Pd(mda)] \cdot H_2O$ (1); паковање кристала унутар јединичне ћелије (b) комплекса, $KH[Pd(obap)]_2 \cdot 3H_2O$ (4); паковање кристала



Слика 17. Ортер дијаграм молекулске структуре и паковања кристала (a) лиганда, K_2H_2obbz (5a); паковање кристала дуж с осе и (b) комплекса, $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ (8); паковање кристала дуж осе а

4.3 Хемија водених раствора

4.3.1 Константе протоновања синтетисаних лиганата и нуклеозидних анјона и константе формирања одговарајућих комплекса са јоном паладијума(II)

Протоновање лиганата и нуклеозидних анјона, као и комплексирање јона паладијума(II) извршено је према процедури описаној у експерименталном делу. Добијени резултати су обрађени рачунски Нурегquad2006 програмом. У табели 7 су приказане израчунате вредности константи протоновања и константи стабилности бинарних PdL и PdA комплекса, као и статистички параметри.

Табела 7. Константе протоновања лигананда L (mda, obp, mdp, obap, apox или A) и константе стабилности бинарних система PdL (mda, obp, mdp, obap, apox или A) на 25 °C у 0,1 М NaCl

Log $\beta_{p,q,r}^b$ Pd ²⁺	L				A		
	mda	obp	mdp	obap	apox	Ado	Cyt
(0, 1, 1)	11,49 (9)	11,84 (5)	10,90(7)	9,85 (3)	10,05 (4)	3,52 (2)	4,11 (1)
(0, 2, 1)	23,51 (5)	23,52 (3)	22,39(3)	18,64 (3)	18,91 (4)	-	-
(0, 3, 1)	27,27 (5)	28,18 (3)	2,07(3)	21,60 (6)	-	-	-
(0, 4, 1)	30,36 (5)	32,11 (3)	30,86(3)	-	-	-	-
(1, 1, 1)	24,66 (2)	25,67 (2)	-	-	-	-	-
(1, 2, 1)	-	-	27,70(8)	24,85 (9)	24,86 (6)	-	-
(1, 0, 1)	22,52 (3)	22,57 (2)	20,35(6)	14,38 (8)	15,89 (4)	14,20 (4)	6,73 (4)
(1, -1, 1)	10,78 (6)	13,48 (4)	16,28(8)	6,67 (4)	6,60 (7)	5,77 (8)	-
(1, -2, 1)	-	2,73 (5)	5,89(9)	-	-	-	-4,59 (5)
(1, 0, 2)	-	-	-	-	-	18,42 (8)	11,43 (2)
(1, -1, 2)	-	-	-	-	-	9,59 (9)	5,68 (4)
(2, 2, 1)	-	-	-	-	30,19 (9)	-	-
(2, 0, 1)	-	-	-	20,85 (9)	22,94 (8)	-	-
(2, -1, 1)	-	-	-	16,11 (7)	18,65 (7)	-	-
(2, -2, 1)	-	-	-	-	11,41 (6)	-	-
Статистика	$\chi^2= 12,87$ s = 1,60	$\chi^2= 11,94$ s = 1,19	$\chi^2=12,05$ s=1,58	$\chi^2= 12,3$ s = 1,98	$\chi^2= 13,8$ s = 1,37	$\chi^2= 12,7$ s = 2,02	$\chi^2= 14,8$ s = 1,67

^a p, q и r су стехиометријски коефицијенти који одговарају Pd(II), H⁺, mda/obp/mdp/obap/apox или A

^b стандардне девијације дате су у заградама

Константе стабилности тернарних комплекса који су формирано између паладијума(II), L и A (према општој равнотежи описаној у експерименталном делу) дате су у табели 8.

4.3.2 Хемијско-биолошка испитивања

Општи облик, особине и потенцијал молекула који се уносе у ћелијску цитоплазму дала су нам хемијска испитивања. Истраживања хемијско-биолошких и биолошких својстава синтетисаних једињења имала су за циљ да се утврди њихова биолошка активност. Испитивана је цитотоксична активност на малигним ћелијама, интеракције комплекса са молекулима DNK и HSA, као и утврђивање природе смрти ћелија применом Вестерн блот анализе и анализе проточне цитометрије. Општа резистентност ћелија праћена је одређивањем енергије слободног везивања између [PdL] јединице и димера шаперона бакра Atox1 [221].

Табела 8. Константе стабилности тернарних комплекса Pd(II), M = Pd(II), L = mda, обар или арох и A = Guo, Ado или Cyt (25 °C и I = 0,10 M NaCl)

Врсте (p,q,r,l) ^a	Log $\beta_{p,q,r,l}$ ^b				
	Pd ²⁺				
	mda	Обар		арох	
	Guo	Ado	Cyt	Ado	Cyt
(0, 2, 0, 1)	11,25 (6)	-	-	-	-
(0, 1, 0, 1)	9,13 (4)	-	-	-	-
(1, 3, 1, 1)	-	39,89 (6)	-	39,08 (5)	-
(1, 2, 1, 1)	-	-	31,47 (8)	-	31,46 (5)
(1, 1, 1, 1)	-	29,33 (4)	26,48 (7)	29,90 (1)	26,25 (6)
(1, 0, 1, 1)	30,14 (7)	21,24 (5)	20,29 (4)	21,74 (2)	19,05 (2)
(1, 0, 1, 2)	34,25 (8)	-	-	-	-
(1, -1, 1, 1)	20,89 (9)	11,38 (8)	11,39 (6)	12,42 (3)	10,91 (8)

^ap,q,r и l су стехиометријски коефицијенти који одговарају Pd(II), H⁺, обар или арох и Ado или Cyt. ^bстандардне девијације дате су у заградаи.

4.3.2.1 Флуоресцентна спектроскопија

Испитивање интеракција између синтетисаних комплекса и молекула HSA вршено је снимањем флуоресцентних емисионих спектара. Флуоресцентни емисиони спектри HSA снимани су у одсуству и присуству различитих концентрација [PdL] (L = обар, mda или mdp) комплекса. У табели 9 су дате одговарајуће Стерн-Волмерове константе гашења (K_{SV}) добијене за [PdL]-HSA комплексе и бимолекулске константе гашења (K_q). На основу спектралних података одређене су и константе везивања (K_a) и број везујућих места (n) (Табела 9).

Табела 9. Параметри гашења флуоресценције и параметри везивања код интеракције комплекса [PdL] са хуманим серуским албумином (HSA)

Комплекс	K_{SV} ($\times 10^4 M$)	K_q ($\times 10^{12} Ms^{-1}$)	R^a	K_a ($\times 10^4 M$)	n	R^a	Референце
[Pd(обар)] ⁻	2,73	2,73	0,9966	5,56	1,06	0,9934	127
[Pd(mda)] ²⁻	3,23	3,23	0,9752	2,11	0,97	0,9679	127
[Pd(mdp)] ²⁻	6,23	6,23	0,9928	3,89	0,96	0,9895	128

^a R линеарни корелациони коефицијент

На основу емисионих спектара DNK и спектара EB-DNK комплекса у одсуству и присуству [PdL] (L = mdp, mda или обар) одређене су константе везивања синтетисаних комплекса за DNK и за EB-DNK комплекс (Табела 10).

Табела 10. Константе везивања DNK (K_b) и број везивних места (n) за комплексе [PdL] ($L = \text{mdp}, \text{mda}$ и obap)

Комплекс	У одсуству EB		У присуству EB	
	$K_a (M^{-1})$	n	$K_a (M^{-1})$	n
[Pd(mdp)] ²⁻	$4,7 \cdot 10^4$	1,2	$1,4 \cdot 10^4$	1,2
[Pd(mda)] ²⁻	$2,1 \cdot 10^5$	1,0	$8,5 \cdot 10^4$	0,9
[Pd(obap)] ⁻	$2,6 \cdot 10^4$	1,1	$9,8 \cdot 10^3$	1,0

4.3.2.2 UV-Vis спектроскопија

Апсорпциона спектроскопија је врло једноставна, али ефикасна метода која се користи за истраживање структурних промена које се дешавају приликом формирања комплекса. Такође, на основу добијених резултата UV-Vis спектроскопије могу се израчунати константе стабилности (везивања) комплекса.

У овим студијама праћена је промена UV-Vis спектра DNK у одсуству и присуству [PdL] комплекса, за различите [комплекс]/DNK односе (r) (описано у експерименталном делу). Израчунате вредности K_b дате су у табели 11.

Табела 11. Константе везивања DNK (K_b) и Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) за комплексе [PdL] ($L = \text{mdp}, \text{mda}$ и obap) израчунате на основу UV-Vis спектра

Комплекс	У одсуству EB			У присуству EB	
	$K_b (M^{-1})$	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_q (M^{-1}s^{-1})$	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_q (M^{-1}s^{-1})$
[Pd(mdp)] ²⁻	$3,3 \cdot 10^4$	$5,4 \cdot 10^3$	$5,4 \cdot 10^{11}$	$2,9 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^{11}$
[Pd(mda)] ²⁻	$3,5 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^{13}$	$2,3 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^{13}$
[Pd(obap)] ⁻	$1,6 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^{12}$	$1,1 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^{12}$

4.4 *In vitro* цитотоксична активност

4.4.1 МТТ тест цитотоксичности

Цитотоксична активност лиганата синтетисаних у првој фази, као и одговарајућих комплекса паладијума(II) испитивана је на четири хумане ћелијске линије: хроничне мијелоидне леукемије (K562), хуманог аденокарцинома цервикса (HeLa), меланома (Hs294T) и фибробластима плућа хуманог фетуса (MRC-5).

Касније синтетисани паладијум(II) комплекси испитивани су на више хуманих малигних ћелијских линија, а пре свега хуманом аденокарциному цервикса (HeLa), линије која је дала најбоље резултате у случају првобитно синтетисаних система. Испитивања су вршена и на хуманом аденокарциному дојке (MCF-7), хуманом карциному плућа (A549) и хуманом колоректалном аденокарциному (HT-29). Цитотоксична активност синтетисаних лиганата и одговарајућих комплекса паладијума(II) испитивана је применом стандардног МТТ теста 48 h након третмана ћелија. Комерцијални антитуморни агенси, цисплатина (*cisplatin*), карбоплатина (*carboplatin*) и доксорубицин (DOX) су коришћени као референтна једињења (Табела 12).

Одговор ћелијске линије K562 био је слаб, како на комерцијалне лекове платине тако и на испитивана једињења. Према IC50 вредностима, само H₄mda индукује инхибицију раста од 50% при концентрацији од 0,01 M, док су остала једињења била активна при много вишим концентрацијама (≥ 10 M). Највећу осетљивост према свим испитиваним једињењима показала је HeLa ћелијска линија. У поређењу са карбоплатином, једињења H₄mda и одговарајући комплекс паладијума(II) су била приближно 10^3 – $3 \cdot 10^3$ пута активнија на HeLa ћелијама. Лиганд H₄obr и одговарајући комплекс паладијума(II) показали су 1,5 до 2 пута већу активност у поређењу са карбоплатином. Сва једињења, осим K₂[Pd(obp)] комплекса, показују високу активност при најнижим концентрацијама у поређењу са оба једињења платине. За цео спектар концентрација киселине су задржале сличну и умерену активност. Hs294T ћелије су показале мању осетљивост на једињења платине у односу на HeLa ћелије. Hs294T ћелије су осетљивије на сва испитивана једињења у поређењу са карбоплатином.

И у случају касније синтетисаних једињења HeLa је показала највећу осетљивост. H₄obbz је показао јаку цитотоксичност према HT-29 и HeLa ћелијским линијама (приближно два пута активнији од доксорубицина), док је неактиван на MCF-7 и A549

ћелијским линијама. Комплекс $K_2[Pd(obbz)]$ је умерено активан према HeLa, а H_4mdp лиганд према A549 ћелијској линији. Значајну цитотоксичну активност према испитиваним ћелијским линијама (MCF-7, A549, HT-29 и HeLa) показује само $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$, док $[Pd(арох)]$ показује мању активност. $H_2арох$ инхибира раст A549 ћелијске линије слично референтном једињењу, а показао је 4 пута јачи цитотоксични ефекат на HT29 линију. $H_3обар$ је активан само на ћелијама хуманог аденокарцинома цервикса, док $KH[Pd(обар)]_2 \cdot 3H_2O$ има снажну антипролиферативну активност према овој, али и према MCF-7 ћелијској линији. Ови резултати указују да синтетисани лиганди и паладијум(II) комплекси имају побољшане антипролиферативне ефекте на неким хуманим ћелијским линијама. Битно је истаћи да је само $H_4обр$ лиганд био активан према здравим ћелијским линијама (MRC-5).

Табела 12. Цитотоксична активност лиганата и комплекса *in vitro* са IC50 вредностима (μM)^a

	K562	Hs294T	MCF-7	A549	HT29	HeLa	MRC-5
<i>cis</i> Pt	>100	10,02	-	-	-	2,02	0,48
carbo Pt	100	25,61	-	-	-	13,45	3,96
H_4mda	0,004	22,55	-	-	-	0,01	>100
$H_4обр$	19,43	0,90	-	-	-	8,78	0,21
$K_2[Pd(mda)] \cdot H_2O$	74,05	0,24	-	-	-	0,004	>100
$K_2[Pd(обр)]$	30,04	5,65	-	-	-	6,38	>100
H_4obbz (C)	-	-	>100	>100	0,36	0,63	>100
$K_2[Pd(obbz)]$ (D)	-	-	>100	>100	>100	42,86	>100
H_4mdp (E)	-	-	>100	21,26	>100	>100	>100
$K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ (F)	-	-	8,42	0,75	4,24	6,83	>100
$H_2арох$ (G)	-	-	>100	8,16	2,09	>100	>100
$[Pd(арох)]$ (H)	-	-	57,39	16,27	18,9	17,39	>100
$H_3обар$ (I)	-	-	>100	>100	>100	19,18	>100
$KH[Pd(обар)]_2 \cdot 3H_2O$ (J)	-	-	2,21	>100	>100	1,19	>100
Doxorubicin (B)	-	-	0,75	7,86	0,32	1,17	0,12

* IC₅₀ концентрација једињења која инхибира раст ћелије за 50% у поређењу са нетретираном контролом. Вредности потичу од три независна експеримента. Коefицијенти варијације су мањи од 10%.

Антипролиферативна и проапоптотска активност $[Pd(арох)]$ комплекса [222] испитивана је и у комбинацији са метанолним екстрактом *L. vulgare* на HCT-116 ћелијској линији МТТ тестом. Коришћене су различите комбинације $[Pd(арох)]$ комплекса и биљних екстраката са циљем проналажења комбинација које показују

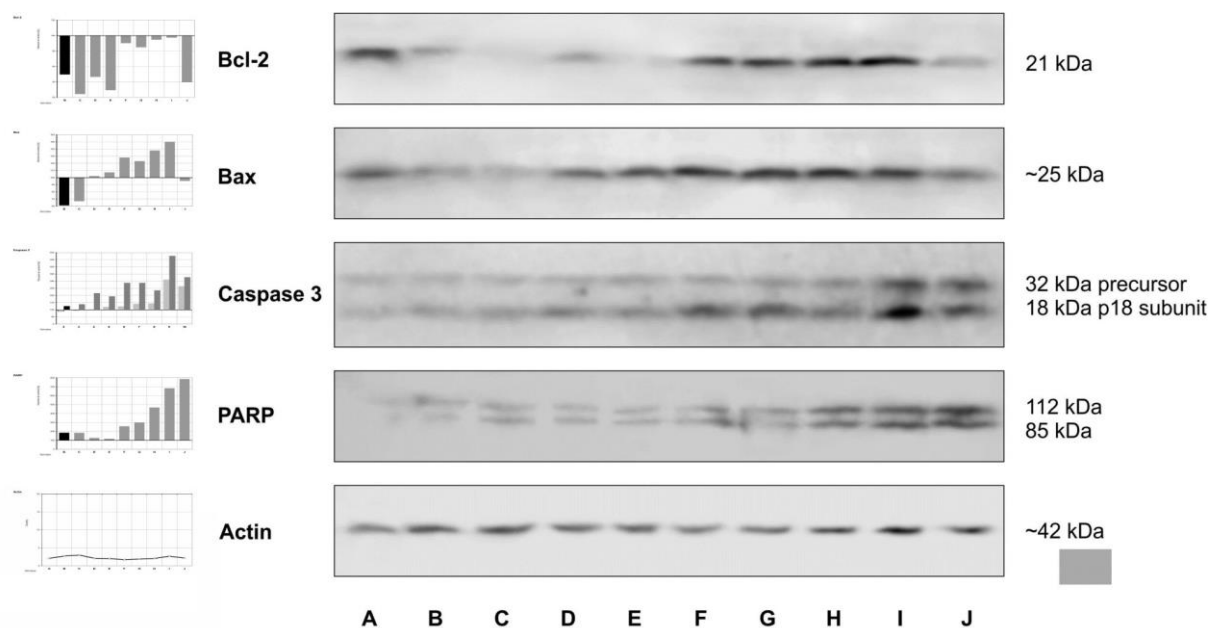
највећи потенцијал за смањење вијабилности НСТ-116 ћелија. Комбиновани тестови су изведени коришћењем одговарајућих концентрација метанолног екстракта *L. vulgare* (1, 50, 100 и 250 $\mu\text{g/ml}$) са одговарајућим концентрацијама $[\text{Pd}(\text{арох})]$ комплекса (100 и 250 μM). Вијабилност ћелија мерена је после 24 h (за ћелије третиране $[\text{Pd}(\text{арох})]$ комплексом након 3 и 6 h од изложености ћелија биљном екстракту) и после 72 h (за ћелије третиране $[\text{Pd}(\text{арох})]$ комплексом након 24 h од изложености ћелија биљним екстрактима). Резултати МТТ теста указују да *L. vulgare* екстракти у комбинацији са $[\text{Pd}(\text{арох})]$ комплексом имају повећан ефекат инхибиције раста НСТ-116 ћелијске линије. Додавање $[\text{Pd}(\text{арох})]$ комплекса значајно смањује IC_{50} вредности (рачунато у односу на концентрацију биљног екстракта), иако индивидуални третман комплексом указује на веома слабу антипролиферативну активност. Најбоља антипролиферативна активност је детектована у комбинацији са биљним екстрактом (250 μM $[\text{Pd}(\text{арох})]$) након третмана после 72 h, када IC_{50} вредности износе чак $4,8 \pm 0,6$.

4.4.2 Western blot анализа

Резултати електрофоретске Вестерн блот анализе указују да тестирана једињења битно утичу на експресију протеина. На слици 18 се види значајна промена укупног износа Bcl-2 протеина у односу на контролу. Експресија Bcl-2 је виша у узорцима F-I, а Вах протеина је повећана од стране свих тестираних супстанци, у поређењу са доксорубицином. Испитивани комплекси и лиганди (Слика 18) повећавају експресију каспазе-3, што јасно указује на њено учешће у процесима апоптозе третираних ћелија. У случају тестираног лиганда H_4obbz забележен је мањи утицај на ћелијски садржај каспазе-3. $\text{H}_3\text{овар}$ индукује највишу експресију каспазе у односу на сва тестирана једињења и контролу. Анализа је такође показала протеолитичко цепање PARP у HeLa ћелијама након третмана са свим испитиваним супстанцама, у зависности од њихове структуре. $\text{KH}[\text{Pd}(\text{овар})]_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ индукује PARP цепање највећој мери (Слика 18).

4.4.3 Ефекат H_4obbz и $\text{K}_2[\text{Pd}(\text{mdp})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ једињења на апоптозу HeLa ћелијске линије

Резултати добијени МТТ тестом цитотоксичности потврђени су применом флуоресцентне микроскопије АО/ЕВ двоструко обојених ћелија на испитиваним једињењима (Слика 19).

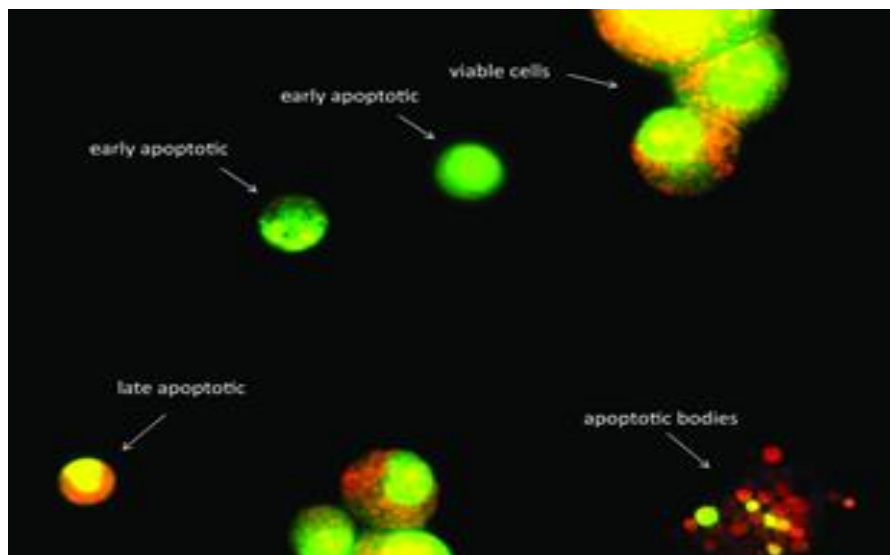


Слика 18. десно: Експресија протеина апоптозом-испитивана Вестерн блот анализом, **лево:** Графички приказ дензитометрије података експресије протеина добијене WB анализом и обрађен ImageJ компјутерским програмом; A: Нетретиране ћелије (контролни узорак)

4.4.4 Проточна цитометрија

4.4.4.1 V/7-AAD бојени тест

Да би смо истражили начин на који одређена једињења индукују смањење одрживости HeLa ћелијске линије, природа ћелијске смрти је процењивана на основу Annexin V/7-AAD бојеног теста. Како су комплекс и лиганд ($K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz) показали највећу цитотоксичност према испитиваним ћелијским линијама, ова једињења смо користили за даља тестирања. HeLa ћелије су третиране 48 h са IC50 концентрацијама ових једињења или само медијумом (контрола).



Слика 19. Различити подскупови апоптотских ћелија мерени АО/ЕВ флуоресцентним бојењем. HeLa ћелије су третиране са IC50 концентрацијама $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz 48 h. Вијабилне ћелије (VC) имају зелена једра дефинисане структуре, рано апоптотске ћелије (EA) имају светло зелена и касно апоптотске ћелије (LA) светло наранџаста до црвена једра кондензованог или фрагментисаног хроматина

4.4.4.2 Утицај $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz на поделу ћелијског циклуса HeLa ћелија 48 h

Третман HeLa ћелија са $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz једињењима резултирао је значајним смањењем процента ћелија у S фази заједно са пратећом акумулацијом ћелија спојених у фази G0/G1. Третман са испитиваним једињењима скоро у потпуности је зауставио синтезу DNK као скоро несталу S фазу, а број ћелија у S фази био је практично немерљив (0,4% и 0,6% респективно). Осим тога, тестирана једињења индукују повећање броја ћелија акумулираних у G0/G1 фази. Процент HeLa акумулираних ћелија у G0/G1 фази повећан је са 74,9% (контрола) на 81,7% и 79,6 % када су третиране са $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz . HeLa ћелије нису показале никакве промене у фази G2/M ћелијског циклуса.

4.5 Докинг молекулска симулација

Оштећење DNK молекула означено је као главни узрок антипролиферативног ефекта лекова на бази платине, па отуда и претпоставка да испитивани системи испољавају антитуморна својства због интеракције са DNK фрагментом. У прилог томе говоре и резултати студија водених раствора $[Pd(mda)]^{2-}$ и $[Pd(obp)]^{2-}$ система, као и остварених PdL^{2-} -Guo интеракција. Испитивање потенцијалних интеракција између синтетисаних комплекса и основних макромолекула вршено је применом докинг симулација. Докинг симулација је изведена на два DNK молекула: додекамеру (12-мер) са 1AIO кодом [176,223] где се цисплатина везује бифункционално, и 29-мер DNK-10-мер RNK са кодом 3M3Y [177] где се пириплатина монофункционално веже за DNK лезије присутне на активном (+ 1) месту. Идеја је била да се на основу разлика слободне енергије утврди да ли су синтетисани комплекси паладијума теоретски везани за DNK на бифункционалан или монофункционалан начин. Допустили смо паладијум(II) комплексном анјону, као и H_2L^{2-} врстама да докују олигонуклеотиде. H_2L^{2-} врсте су изабране као најфаворизованија врста у физиолошком рН опсегу (видети студије раствора). Главне карактеристике предвиђеног везивања за DNK додекамер (1AIO) и водоничне везе као главне лиганд-DNK (RNK) интеракције у случају када испитивана једињења докују 29-мер DNK-RNK 3M3Y код, дате су у табели 13.

У међувремену, резултати до којих су дошле друге истраживачке групе су нас навели да се позабавимо испитивањем потенцијалног механизма дејства синтетисаних комплекса из мало другачијег угла. Наиме, Ванг (Wang) и сарадници [119] су дошли до закључка да прекомерна експресија СНОР протеина изазвана комплексима паладијума доводи до апоптозе ћелија тумора. Такође, Мациас (Macias) и сарадници [178] сматрају да је Grp78 (регулациони протеин глукозе) прекомерно присутан у малигним ћелијама неопходан за преживљавање онкогеног стреса. Повишен метаболизам глукозе доводи до њеног губитка, ниске рН вредности и тешке хипоксије, што су услови под којима малигне ћелије преживљавају, а све то су фактори који изазивају ER стрес и активацију Grp78 покретача [172].

Према овим ауторима, успешна инхибиција експресије Grp78 у ER или цитосолних HSP70 протеина (протеини топлотног удара) могу изменити опстанак малигних ћелија. IC50 вредности испитиваних комплекса (паладијум(II) комплекси са mda и обар хелатима) указују да би требало испитати њихове способности да докују

поједине макромолекуле (DNK и шапероне), како би се предвидео могућ механизам њиховог дејства.

Табела 13. Јачина интеракције (слободне енергије везивања (ΔG) и константе инхибиције (K_i) и главна структурна својства везивног Z додекамера 1AIO предвиђеног молекулским доковањем

Лиганд	Релевантни остаци укључени у везивање	Јачина интеракције	
		ΔG (kcal/mol)	K_i (mM)
Cisplatina		-1,58	69,57
H ₂ mda ²⁻	Водоничне везе између кисеоника лиганда и DA39, DG40 и DA41	-3,32	97,95
H ₂ obp ²⁻	Водоничне везе између кисеоника лиганда и DA41, DA42 и DA44	-1,40	93,4
[Pd(mda)] ²⁻	Водоничне везе између кисеоника лиганда и DA39, DG40 и DA41; ковалентне(јонске) интеракције паладијума са DA41 и DG40	-2,29	20,82
[Pd(obp)] ²⁻	Слабе водонично везивне интеракције	1,72(0,51)*	-
<i>Јачина интеракција (слободна енергија везивања (ΔG) и константе инхибиције (K_i) и главне структурне особине везивања лиганда и паладијум(II) комплекса за DNA 29-мер RNA 10-мер 3МЗУ предвиђених молекуларним докингом</i>			
Пириплатина		-4,65	0,392
H ₂ mda ²⁻	Водоничне везе атома кисеоника са DC15, DC16 и DC17	0,42	-
H ₂ obp ²⁻	Водоничне везе атома кисеоника са G9, A10, C11 и DG18	-1,50	79,64
[Pd(mda)] ²⁻	Водоничне везе атома кисеоника са DC16 и DC17, слабе коваленте (јонске) интеракције паладијума са азотом из DC17	0,53	-
[Pd(obp)] ²⁻	Ниске водонично везивне интеракције са slabим ковалентним (јонским) интеракцијама паладијума са атомом азота и кисеоника из DC17	0,88	-

* Нема горзија око паладијума.

4.5.1 Понашање [PdL]^{2-/} комплекса према DNK

Изабран је додекамер DNK дуплекс као у претходном експерименту [126] (редоследа 5'-ССТСТG*G*ТСТСС-3') који је садржи један 1,2-cis-[Pt(NH₃)₂]²⁺ (1AIO код). Докинг процес је благо модификован, тако да смо комплексима ограничили могућност

ротације и извршили незнатне модификације на молекулу рецептора (видети експериментални). Слободне енергије (ΔG) које описују афинитет комплекса ка везивању DNK дате су у табели 14.

4.5.2 Понашање $[PdL]^{2-/-}$ комплекса према шаперонима

Grp78 протеин (pdb код 3ldl) [178] пореклом из ER и Hsc70 протеин (pdb код 3fzf) [179] из цитосола су коришћени као рецептори у процесу доковања. Најбољи докинг резултати комплекс-DNK и комплекс-протеин су приказани у табели 14.

Табела 14. Докинг резултати $[PdL]^{2-/-}$ комплекса и различитих лиганата према DNK и HSP протеинима

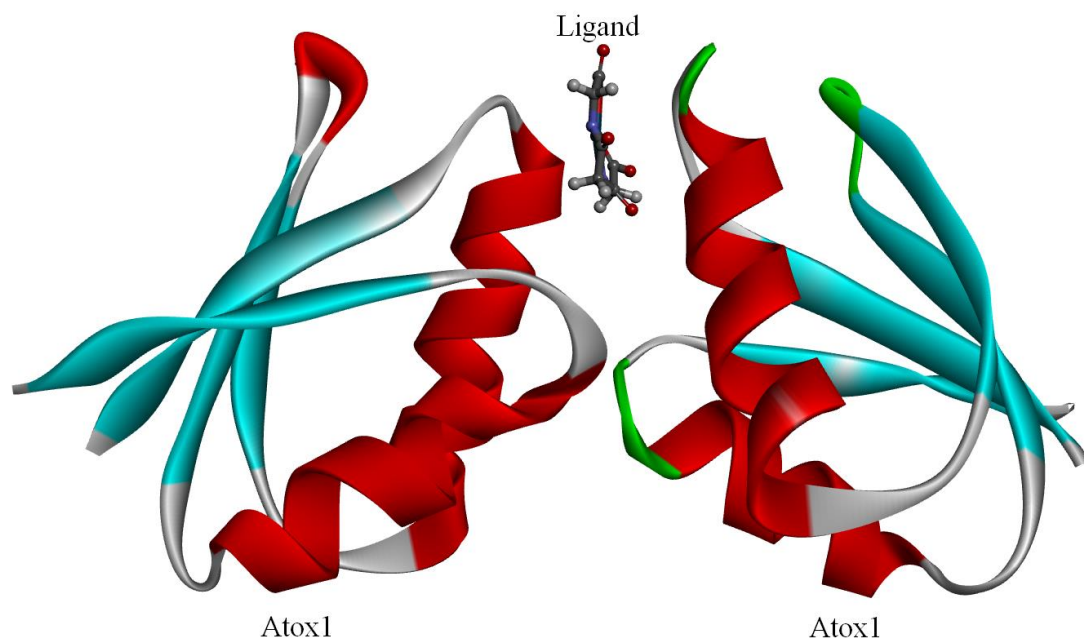
Лиганд	Макромолекули					
	12-мерDNK PВcode=1aio		Хумани Grp78 PDBcode=3ldl		Хумани Hsc70 PDBcode=3fzf	
	Слободна енергија везивања ΔG (kcal mol ⁻¹)	Докована константа инхибиције, K _i (μM)	ΔG (kcal mol ⁻¹) (Ехр) ^a	Докована K _i (μM) (Ехр, K _i (μM))	ΔG	Докована K _i (μM) (Ехр, K _i (μM))
$[Pd(mda)]^{2-}$	-2,81	8700	-5,7	66,61	-5,03	205,38
$[Pd(obap)]^{-}$	-3,65	850	-6,61	14,39	-5,92	45,93
<i>cis</i> - $[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$	-4,87	270				
ADP^b			-6,62 (-7,26)	14,13 (2,17)	-6,13	32,04 (0,11)
R1=NH₂ R2=H (5)			-5,69 (-6,64)	67,56 (6,80)	-4,59	431,29 (4,46)
R1=NHMe R2=C6H5Et (6)			-7,27	4,69 (0,99)	-5,51	91,71 (1,1)
R1=NHC6H5Cl₂ R2=H (7)			-8,24 (-8,34)	0,92 (0,99)	-7,22	5,10 (4,31)
R1=NHC6H5Cl₂ R2= Et C6H5CN (8)			-8,99 (-11,76)	0,26 (0,08)	-7,37	3,97 (0,12)

^a Подаци су узети из референци 184 и 185 (ΔG вредности су израчунати на основу експерименталних података по обрасцу $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$).

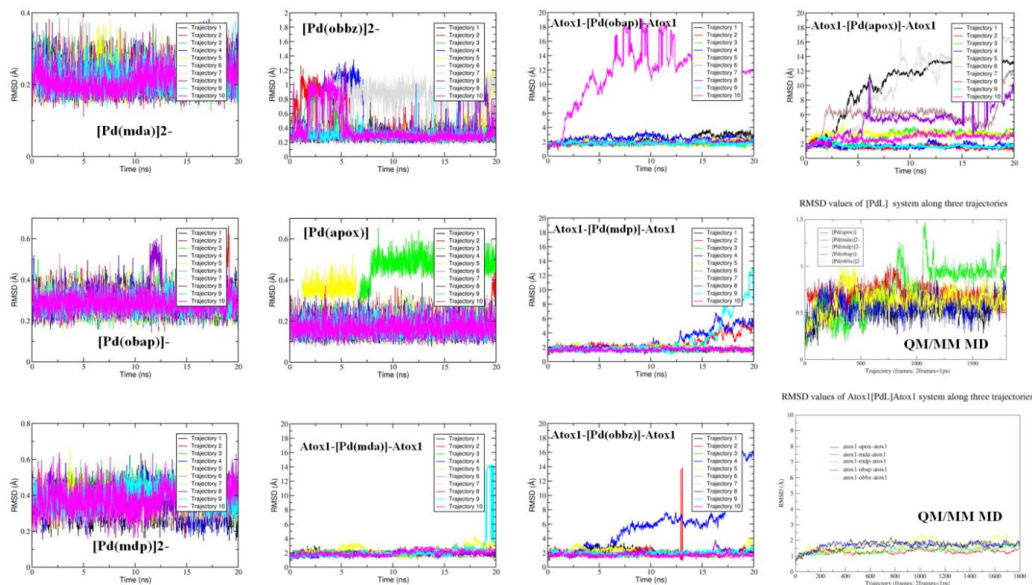
^b Лиганди болд/курзив узети су из референци 184 и 185 и представљају деривате аденозина са супституентима у положају 8 код хетероцикличних база (R1) и положају 5-хидроксил код шећера (R2) и ADP представља аденозин фосфат

4.6 Молекулска динамика и резистентност ћелија

Експериментални поступак о параметризацији комплекса паладијума(II) и основна процедура о MD рачуну дати су у експерименталном делу овог рада. Испитиване су интеракције између паладијум(II) комплекса и аро-Atox1 димера (Слика 20) како би смо видели колико снажно Atox1 везује ове агенсе, поређењем слободних енергија везивања Atox1- $[Pd(L)]$ -Atox1.



Слика 20. ММ MD систем који се састоји од Atox1 димера (преузето из референце [237]) и паладијум(II) комплекса (докован између два Atox1 мономера применом Аутодока [181])



Слика 21. RMSD вредности паладијум(II) комплекса и целог система дуж 10 и 3 трајекторија MM MD и QM/MM MD динамике

RMSD вредности тешких атома у комплексу и леђних N, CA и C атома у Atox1 димеру дуж 10 трајекторија (за сваки комплекс вршено је 10 независних прорачуна) су израчунати и приказани на слици 21. Генерално, RMSD вредности комплекса су мале (~ 0,3 Å) са неким изузецима због конформационих промена комплекса ([Pd(obbz)] и [Pd(арох)]). На основу изведених MD симулација били смо у стању да покренемо MMPBSA/MMGBSA методе за одређивање слободне енергије везивања комплекса у систему.

За израчунавање слободних везујућих енергија између Atox1 димера и сваког комплекса, било је неопходно добити промене енталпија везаних лиганда на основу 20000 узорак за сваки комплекс. Извршили смо MMGBSA и MMPBSA анализе коришћењем MMPBSA.py [224] у оквиру AmberTools15 пакета. Резултати MMPBSA и MMGBSA анализе су приказани у табели 15.

Нормализован начин анализе (NMA) је примењен да би се добила промена ентропије везаног комплекса базиране на 1/20 од 20000 узорак. Слободне енергије везивања израчунате су на основу промена енталпије и ентропије:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

GB модел према Хавкинсу (Hawkins) и сарадницима [225,208] је коришћен за MMGBSA анализу применом раније одређених параметара [226], са концентрацијом соли 0,1 М. MMPBSA анализе су изведене у условима 0,1 М јонске силе и 0,005 kcal/mol·Å² површинског напона, без корекције слободне енергије из доприноса неполарних интеракција. Нормализован начин анализе (NMA) је изведен у условима 0,1 М јонске силе на 298,15 К користећи исти GB модел као у MMGBSA анализама.

Табела 15. ΔG вредности добијене MMPBSA и MMGBSA анализом^a

	Укупан узорак				Ефективно везан узорак			
	MMGBSA	MMPBSA	MMGBSA + NMA	MMPBSA + NMA	MMGBSA	MMPBSA	MMGBSA + NMA	MMPBSA + NMA
[Pd(mda)] ²⁻	-17,4±4,6	-15,9±6,6	-4,7±6,3	-3,2±7,9	-17,4±4,6	-15,9±6,6	-4,7±6,3	-3,2±7,9
[Pd(mdp)] ²⁻	-26,3±7,9	-19,3±8,5	-10,1±9,2	-3,1±9,7	-26,3±7,9	-19,3±8,5	-10,1±9,2	-3,1±9,7
[Pd(obap)]	-26,6±7,3	-20,0±6,8	-11,3±8,7	-4,7±8,2	-29,0±4,7	-21,8±5,6	-13,5±6,1	-6,3±6,8
[Pd(obbz)] ²⁻	-29,2±5,6	-18,4±7,3	-13,5±7,6	-2,8±9,0	-29,4±4,4	-18,4±7,2	-13,9±6,2	-2,9±8,4
[Pd(apox)]	-6,8±6,3	-3,5±4,1	2,5±13,9	5,8±13,0	-11,5±4,2	-4,9±4,0	3,2±6,0	9,8±5,9

^a kcal/mol

QM/MM молекулска динамика је изведена да додатно истражи суштинске карактеристике интеракција између протеин димера и комплекса паладијума(II). Очекује се да цистеински остаци интерагују са комплексним јединицама, тако да су стављени у QM област заједно са атомима који припадају комплексима паладијума. PM6 семиемпиријски метод уведен од стране Роса Валкера (Ross Walker) у оквиру Amber14 пакета је коришћен као QM метод. Како овај метод није детаљно истражен направили смо тестове минимизације структура комплекса применом Gaussian 09 (B3LYP/SDD), MOPAC12 (PM6) и Amber14 (PM6). RMSD вредности преклопљених структура свих комплекса биле су испод 0,5 Å.

5. ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

5.1 Спектрални подаци синтетисаних лиганата и одговарајућих комплекса паладијума(II)

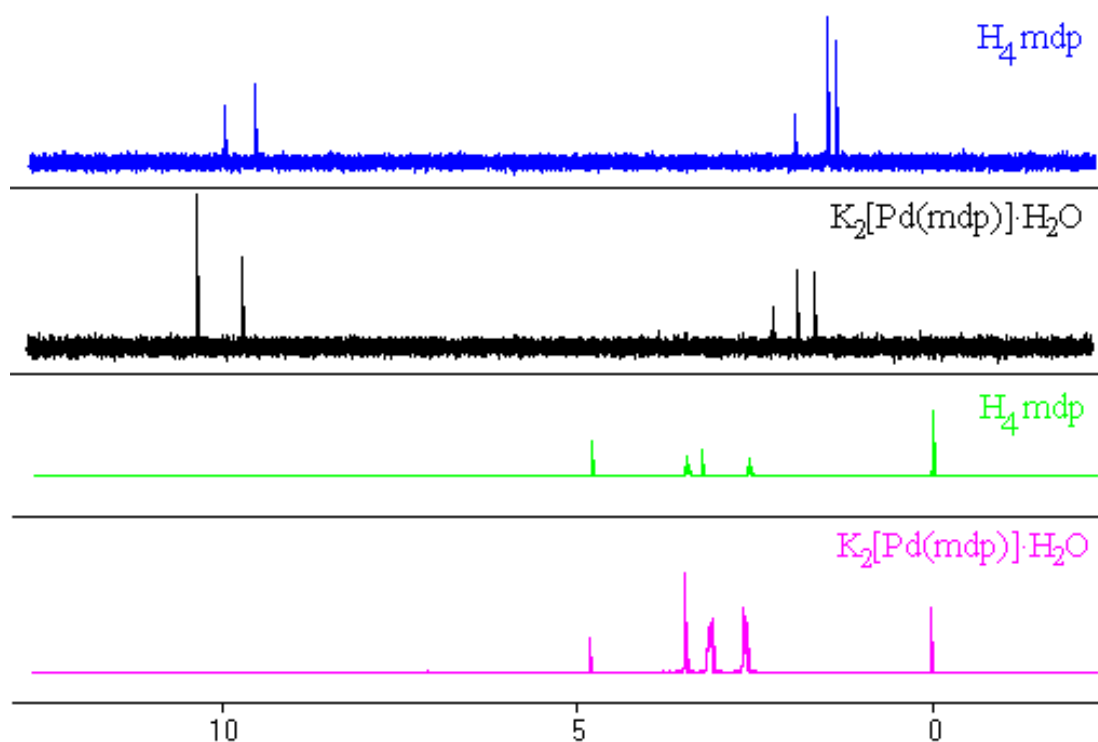
У оквиру ове дисертације синтетисано је шест лиганата оксамидног то јест маламидног типа (четири N_2O_2 , један N_3O и N_4 хромофоре) као и одговарајући комплекси паладијума(II). Као полазне супстанце за синтезу лиганата коришћени су естри оксалне (малонске) киселине или оксил-хлорид у комбинацији са одговарајућим аминокиселинама, антранилном киселином и/или пропандиамином. Структура лиганата је таква да садрже најмање два тешко одлазећа протона који потичу од награђене амидне везе (-CONH-) и један или два лако одлазећа протона из карбоксилних група. Изузетак је само један лиганд који садржи два тешко одлазећа протона из амидне везе. У складу са тим, лиганди су полидентатног карактера за металне јоне способне да депротонују амидо групе. Ово се пре свега односи на јоне попут бакра(II), паладијума(II) или платине(II), узимајући у обзир интеракције ових јона са пептидним групама или сличним амидо-карбоксилатним лигандима испитиваним до сада. Очекивано, H_4mda , H_4obp , H_4obbz и H_4mdp лиганди се понашају као тетрабазне киселине са по два лако и два тешко одлазећа протона, H_3obar лиганд као тробазна киселина са једним лако и два тешко одлазећа протона, а H_2arox као двобазна киселина са два тешко одлазећа протона. Одговарајући жуто обојени комплекси паладијума(II) добијени су у еквимоларним реакцијама између раствора $K_2[PdCl_4]$ и делимично неутралисаних лиганата. У молекулима комплекса $K_2[Pd(obp)]$, $KH[Pd(obar)]_2 \cdot 3H_2O$, $[Pd(arox)]$ и $K_2[Pd(obbz)]$ формиран су леђни петочлани и по два бочна шесточлана прстена, док комплекс $K_2[Pd(mda)] \cdot H_2O$ садржи шесточлани леђни и два петочлана бочна прстена. Комплекс $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ садржи три шесточлана прстена (један леђни и два бочна) што у битној мери утиче на његово понашање у воденом раствору (видети хемију водених раствора).

На основу резултата елементарне микроанализе (Табела 5, страна 60) за С, Н и N, утврђено је да су сва синтетисана једињења (лиганди и комплекси) у складу са предложеним молекулским формулама.

Инфрацрвени спектри амидо-карбоксилатних лиганата садрже траке које одговарају асиметричним фреквенцијама за NH, COOH групе и то (идеално) у опсегу: 3400-3250, 1750-1700 cm^{-1} . У случају наших система траке приписане присуству –NH група су у опсегу од 3332-3268, као и 1719-1666 cm^{-1} за COOH групе (дато у експерименталном делу) што потврђује да су лиганди полибазне киселине. Одсуство трака приписаних асиметричним фреквенцијама –NH група у IR спектрима паладијум(II) комплекса указује да је дошло до координације обе амидо групе присутне у молекулима лиганата. Такође, асиметричне фреквенције истезања карбоксилата узете су као критеријум за разликовање између протонисаних карбоксилних група (1700-1750 cm^{-1}) и координисаних карбоксилних група (1600-1650 cm^{-1}) [227]. Траке средњег интензитета у опсегу од 1603-1671 cm^{-1} (дато у експерименталном делу) у спектрима наших комплекса недвосмислено указују да је дошло до координације карбоксилних група за паладијум(II) јон.

Сви синтетисани паладијум(II) комплекси су дијамагнетични, квадратно планарне геометрије. На основу електронских апсорпционих спектра присуство централног атома паладијума у добијеним комплексима потврђено је присуством једне или две траке у области 200-400 nm (дато у експерименталном делу), као последица $d\pi-\pi^*$ прелаза [228]. У складу са очекивањима, дешавају се три спин-дозвољена $d-d$ прелаза из нижих d нивоа до празне $d_{x^2-y^2}$ орбитале, и то из основног стања $^1A_{1g}$ у побуђена стања $^1A_{2g}$, $^1B_{1g}$ или 1E_g у смеру повећања енергије. Најјаче лигандно поље запажено је у случају комплекса са H_4mda лигандом, што је објашњено присуством два планарна петочлана ацетатна прстена у односу на два шесточлана прстена у случају осталих комплекса.

Положаји 1H и ^{13}C NMR сигнала (видети експериментални) су у складу са структуром лиганата и синтетисаних комплекса. У принципу, сигнали комплекса су померени ка нижем пољу у односу на сигнале лиганата [227]. Ово је потврђено хемијским померањем протона комплекса односу на слободан лиганд. Тако се у спектрима лиганата K_2H_2obbz јављају сигнали фенил група у распону од δ 6,8-8,3 ppm, а одговарајућег комплекса у опсегу од δ 7,2-8,4 ppm што су хемијска померања уобичајена за овај тип паладијум(II) комплекса [227]. Протонски NMR спектри H_4mdr лиганата показују сигнале метилених група у распону од δ 2,58-3,46 ppm и комплекса δ 2,63-3,5 ppm, а у ^{13}C NMR спектрима се јавља очекиван број сигнала атома угљеника на одговарајућим положајима [227] (Слика 22).



Слика 22. ^1H NMR и ^{13}C NMR спектри H_4mdp лиганда и $\text{K}_2[\text{Pd}(\text{mdp})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ комплекса

5.2 Рендгенска структурна анализа синтетисаних једињења

5.2.1 $\text{K}_2\text{H}_2\text{obbz}$ лиганд

Лиганд H_4obbz (Табела 1, страна 53) кристалише као дикалијумова со 2,2'-[(1,2-диоксоетан-1,2-диил)диимино] дикарбоксилне бензоеве киселине, где је јон калијума координован за карбоксилни атом кисеоника O_2 и амидни атом кисеоника O_3 . Кристалише као стабилнији *trans* конформер у хексагоналној просторној групи $\text{R}\bar{3}$, док у комплексу усваја *cis* конформацију. Независна асиметрична јединица лиганда има C_s симетрију. Дужина везе $\text{C}8\text{--O}3$ је 1,23 (1) Å и $\text{C}8\text{--N}1$ 1,332 (7) Å, што је типично за пептидне везе (Табела 6, страна 61). Интрамолекулске водоничне везе формиране су између $\text{N}(1)\dots\text{O}(2)$ 2,630 (8) Å $^\circ$ и $\text{O}1(\text{W})\dots\text{O}2$ 2,855 Å $^\circ$.

5.2.2 $K_2[Pd(mda)] \cdot H_2O$ комплекс

Свака асиметрична јединица садржи једну формулу јединице, која се састоји од четири дела: анјонског комплекса паладијума(II), два катјона калијума и солватисаног молекула воде са неодређеним положајем атома. Моноклинична јединична ћелија садржи шеснаест одвојених јединица, четири анјона, осам катјона и четири молекула воде. Паладијум(II) јон координује четири атом-донора из лиганда: два депротонована карбоксилна атома кисеоника и два депротонована амидна атома азота. Растојања су у опсегу 1,946 (5) и 2,036 (4) Å (Табела 2, страна 54) и упоредива су са добијеним за сродне диамидо паладијум(II) комплексе [17,30]. Атом угљеника (4) из шесточланог леђног прстена је благо померен из просечне равни ($\rho = 0,1250$ Å). *Cis* и *trans* углови око паладијум(II) јона у опсегу од 83,84 (17) 97,12 (15) и 176,28 (17) до 178,63 (17) показују занемарљиву дисторзију. Комплексни анјон је готово планаран у целисти са два глицинато петочлана прстена и усваја конформацију квази полустолице шесточланог прстена диамида. Електрон резонантно померање је детектовано од C(5)–N(2) до C(5)–O(4) дајући карактер двоструке везе C(5)=N(2) [1,287 (7) Å] и готово једоструку везу C(5)–O(4) [1,319 (7) Å]. Други пар веза показује обрнуто дејство. Два јона калијума имају различиту околинину. K1 је окружен са шест атома кисеоника из различитих молекула лиганата градећи неправилну четворострану призму, а K2 представља веома искривљену квадратну пирамиду. Најкраће растојање између два јона калијума (K1 ... K2) је 2,776 Å.

5.2.3 $KH[Pd(ovar)]_2 \cdot 3H_2O$ комплекс

Свака асиметрична јединица садржи једну формулу јединице, која се састоји комплекса паладијума(II) са негативним наелектрисањем -2, два катјона, K^+ и H^+ и три атома кисеоника из воде. Триклинична јединица ћелије садржи четрнаест дискретних јединица: четири анјона, четири катјона и шест молекула воде. Оба паладијум(II) јона су тетракоординована. Паладијум(II) јон координује два депротонована амидна атома азота, један депротоновани кисеоник из карбоксилата и један аминок атом азота. Растојања су у опсегу 1,957(8) и 2,061(9) Å (Табела 3, страна 55). *Cis* углови око паладијум(II) јона су у распону од 83,1(3) до 95,8(4)° и *trans* углови од 177,5(4) до 177,8(3)°. Координациона геометрија оба атома паладијума је квадратно планарна са малим одступањима за везивне атоме (за Pd(1) раван 0,044 Å и за Pd(2) раван 0,046 Å) од координационе равни. Очекивано, растојање између атома паладијума и аминског азота (2,028–2,061 Å) је дуже

од растојања између паладијума и амидног азота (1,957–1,984 Å). Наиме, интеракција паладијум(II) јона са јонизованим амидним атомима азота је јача него са чисто ковалентно везаним аминским азотом. Шесточлани пропиламински прстен усваја конформацију полустолице.

5.2.4 $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ комплекс

Комплекс кристалише у моноклиничној просторној групи P21/m. Асиметрична јединица комплекса обухвата пола анјонског молекула лиганда што указује на Cs симетрију. Моноклинична јединична ћелија садржи четрнаест одвојених јединица, два анјона, осам катјона и четири молекуле воде. Паладијум(II) јон координован је са амидним атомом азота (Pd–N дужина везе је 1,982(2) Å) и карбоксилним атомом кисеоника (Pd–O дужина везе је 2,039(1) Å). Растојања између Pd–O у анјону су очекивано већа од Pd–N веза што је упоредиво са вредностима пријављеним код аналогних комплекса [130,131]. Карактеристично за конфигурацију $4d^8$ прелазних метала, углови веза [O1-Pd1-N1] 175,99(5) и [O1-Pd1-O1] 83,73(4) одступају од идеалних углова (180° и 90°) изазивајући деформацију квадратно планарне геометрије комплекса. У комплексу су формирана три хелатна шесточлана прстена. Леђни N,N' хелатни прстен усваја конформацију лађе са параметрима уклапања $q_2 = 0,6065(14)$ Å, $q_3 = -0,0714(14)$ Å и $\varphi_2 = 180(13)^\circ$. Два бочна симетрична- N,O хелатна прстена усвајају конформације увијене лађе са параметрима уклапања $q_2 = 0,7552(13)$ Å, $q_3 = 0,0040(14)$ Å и $\varphi_2 = 186,08(11)^\circ$. Ово је упоредиво са идеалним вредностима $q_3 = 0$, $q_2 > 0$ и $\varphi_2 = 0$ за конформацију лађе, а $q_3 = 0$, $q_2 > 0$ и $\varphi_2 = 90^\circ$ за конформацију увијене лађе. Све дужине веза су у опсегу пријављених вредности (Табела 4, страна 56).

5.3 Хемија водених раствора

5.3.1 Константе протоновања синтетисаних лиганда и нуклеозидних анјона и константе формирања одговарајућих комплекса са јоном паладијума(II)

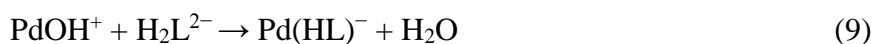
N-донорски лиганди, попут конституената нуклеинских киселина, имају афинитета ка паладијум(II) јону што може имати важне биолошке импликације. То је посебно битно у смислу интеракције са DNK молекулима чему је приписана антитуморна активност сродних комплекса. У циљу испитивања интеракција паладијума(II) и његових комплекса са молекулима DNK било је неопходно одредити

понашање синтетисаних лиганата, њихове константе протоновања, као и њихове интеракције са паладијумом(II). За ова испитивања урађене су потенциометријске титрације водених раствора самих лиганата, као и смеше паладијум(II) јона и одговарајућег лиганда у различитим концентрационим односима. Да би се испитао утицај бинарних комплекса [PdL] на нуклеозиде који улазе у састав ДНК урађене су потенциометријске титрације система PdLA у којима је однос Pd:L:A био различит.

Резултати испитивања и израчунате вредности константи протоновања лиганата и константи стабилности бинарних система приказани су у табели 7 (страница 63). Из табеле 7 се може видети да Pd(II) јон гради са свим испитиваним лигандима бинарни комплекс типа [PdL]. Најстабилније комплексе Pd(II) јон гради са mda и obr лигандима (табела 7, страница 63), а најмање стабилан комплекс је потврђен са цитозиним. Са mdp, ovar и арох лигандима Pd(II) јон гради протоноване комплексе типа [PdH₂L]. Мешовито хидролитички комплекс, [Pd(OH)L] (1,-1,1) граде сви лиганди, осим Cyt, са Pd(II) јоном. Комплекс [Pd(OH)₂L] (1,-2,1) је потврђен у систему PdL (L = obr и mdp).

У мешовитим системима PdLA израчунате константе стабилности тернарних комплекса дате су у табели 8 (страница 64). Pd(II) јон гради тернарне комплекс типа [PdLA] са свим испитиваним лигандима. У неким системима је потврђено постојање протонованих комплекса (Табела 8), а мешовито хидролитички комплекси, типа [Pd(OH)LA] (1,-1,1,1), се формирају са свим испитиваним лигандима. Најстабилнији комплекс се формира у систему Pd-mda-Guo, а најмање стабилан у систему Pd-арох-Cyt. Само гуанозин са Pd(II) јоном гради комплекс [Pd(mda)Guo₂] (1,0,1,2).

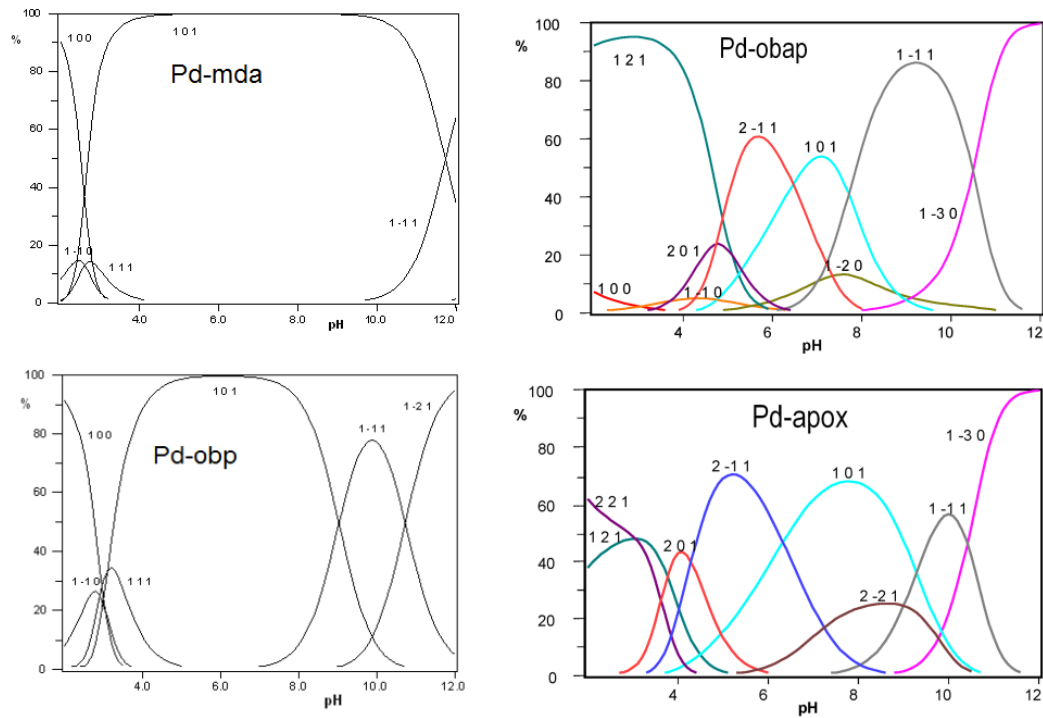
Дистрибуциони дијаграми [PdL] комплекса, за однос концентрација [L]/[Pd²⁺] = 2(1):1(2) приказани су на слици 23. Са слике се може видети да при нижим рН вредностима доминирају протоновани комплекси, чија је максимална концентрација на рН ~ 3. Протоновани комплекси се највероватније образују у реакцији јонских врста које су доминантне у рН области од 2,0–4,0 према једначини (9).



Протоновани комплекс [Pd(HL)]⁻ (1,1,1) повећањем рН вредности губи протон и гради бинарни комплекс [PdL]²⁻ (1,0,1) по реакцији која је приказана једначином (10):

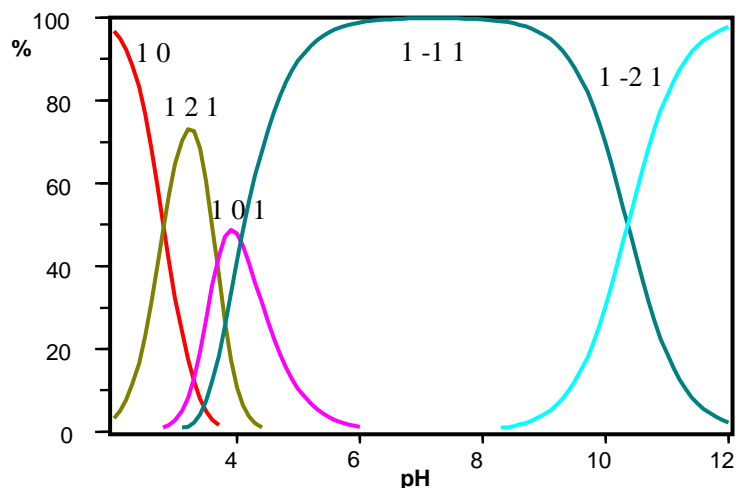


Ови комплекси се углавном формирају у области рН од 4 до 10, а максималну концентрацију постижу на физиолошкој рН вредности (око 7,5).



Слика 23. Дистрибуциони дијаграм: Pd-mda и Pd-obp врста у односу концентрација = 2:1 и укупној концентрацији паладијума 2,5 mM

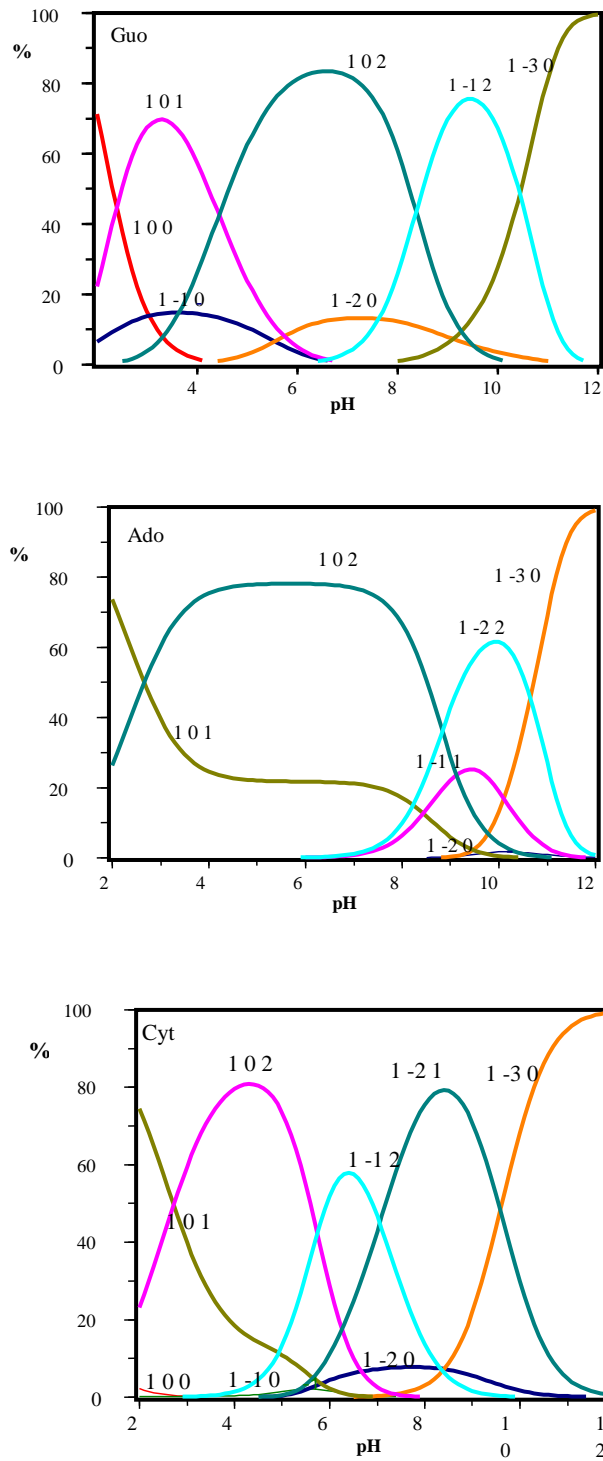
Изузетак је, у односу на испитиване системе, $[\text{Pd}(\text{mdp})]^{2-}$ (1,0,1) комплекс чија је максимална концентрација на рН ~ 4. Са повећањем базности средине гради се мешовити хидролитички комплекс $[\text{Pd}(\text{OH})(\text{mdp})]^{3-}$ (1,-1,1) са максималном концентрацијом (99,5%) на рН = 7, што је чини најзаступљенијом врстом у физиолошком опсегу рН вредности (Слика 24). У свим осталим системима мешовити хидролитички комплекс почиње да се формира тек на рН изнад 9.



Слика 24. Дистрибуциони дијаграм: Pd-mdp врста у односу концентрација = 2:1 и укупној концентрацији паладијума 2,5 mM

У случају комплекса са mdp лигандом, формиран комплекс ($[\text{Pd}(\text{OH})\text{mdp}]^{3-}$) (1,-1,1) је потврђен при физиолошкој pH вредности и у складу је са резултатима добијеним у оквиру QM/MM симулација (видети ниже). Поређењем вредности $\log \beta_{1,0,1}$ тетракоординованих лиганата, може се закључити да mda и obr лиганди формирају комплексе сличних стабилности, док је комплекс са mdp лигандом нешто стабилнији.

Дистрибуциони дијаграми DNK конституената, као што су аденозин и цитидин са Pd^{2+} јоном у односу 1:1 и 1:2 указују да комплекси аденозина доминирају на pH ~ 8, а комплекси цитидина на pH < 5. Комплекс аденозина је стабилнији од комплекса цитидина (Табела 7, страна 63), што је очекивано обзиром на то да аденозин има два везивна центра (N1 и N7), а цитидин само један (N3). Дистрибуциони дијаграм јасно показује да су (1,0,1) и (1,0,2) комплексне врсте достигле максималну



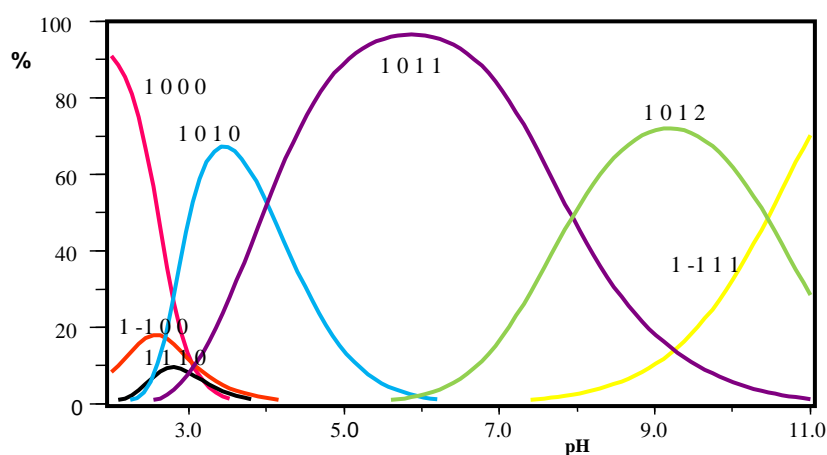
Слика 25. Дистрибуциони дијаграми $[Pd(A)]$ врста, $A = Guo, Ado$ и Cyt

концентрацију (~ 20% и 80%) на рН 4,0–8,0, што је у оквиру физиолошког опсега. Мешовити хидролитички комплекси (1,-1,1) и (1,-1,2) доминирају на рН > 8 (Слика 25).

Доминантни комплекс на нижим рН вредностима је (1,0,1) комплекс цитидина, са максималном концентрацијом на $\text{pH} < 2$. Основни прстен пиримидина има само један базни азот (N3) и у депротонованим облику цитидин нема могућност формирања протонваних комплекса. Комплекс цитидина (1,0,2) је доминантна врста у рН региону 3,0–5,0, са максималном концентрацијом од 80% на $\text{pH} \sim 4,5$. Мешовити хидролитички комплекси (1,-2,1) и (1,-1,2) су преобладајући на $\text{pH} > 5$. Афинитет N-донорских лиганата, попут DNK конституената, према Pd^{2+} јону може имати значајну биолошку улогу.

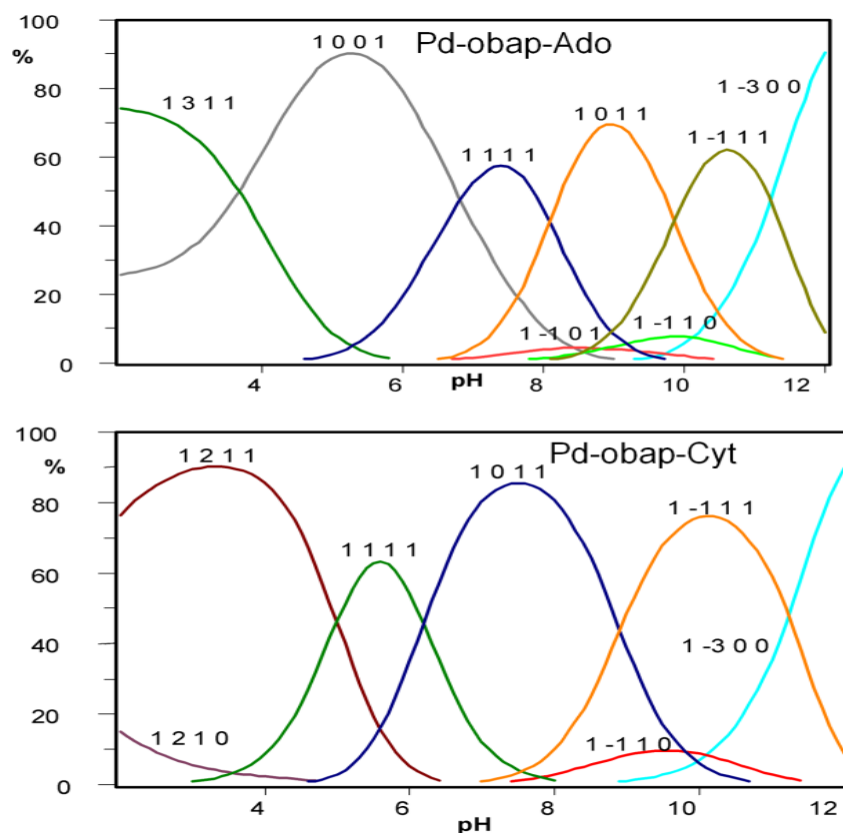
5.3.2 Формирање мешовитих комплекса паладијума(II) са *mda* и *Guo*, или *obar*, *арох* и *Ado* или *Сут* јонима као лигандима

Експериментални услови и обрада резултата (Табела 8, страна 64) објашњени су код бинарних система. Дистрибуциони дијаграми присутних врста у $[\text{Pd}(\text{mda})(\text{Guo})]$ систему (Слика 26), а за однос концентрација $[\text{Pd}]/[\text{mda}]/[\text{Guo}] = 1:1:2$ указује да на нижим рН вредностима ($\text{pH} < 4$) доминира бинарни паладијум(II) комплекс, док са порастом рН (5-10) преовладавају тернарни комплекси. Комплекс (1,0,2,1) је присутан у рН региону 3,0-10,0, са максималном концентрацијом на рН 6 кад почиње да се формира комплекс (1,0,1,2) и максималну концентрацију достиже на рН ~ 9 , док (1,-1,1,1) комплекс почиње да се формира при рН 8 и његова концентрација расте са порастом рН.

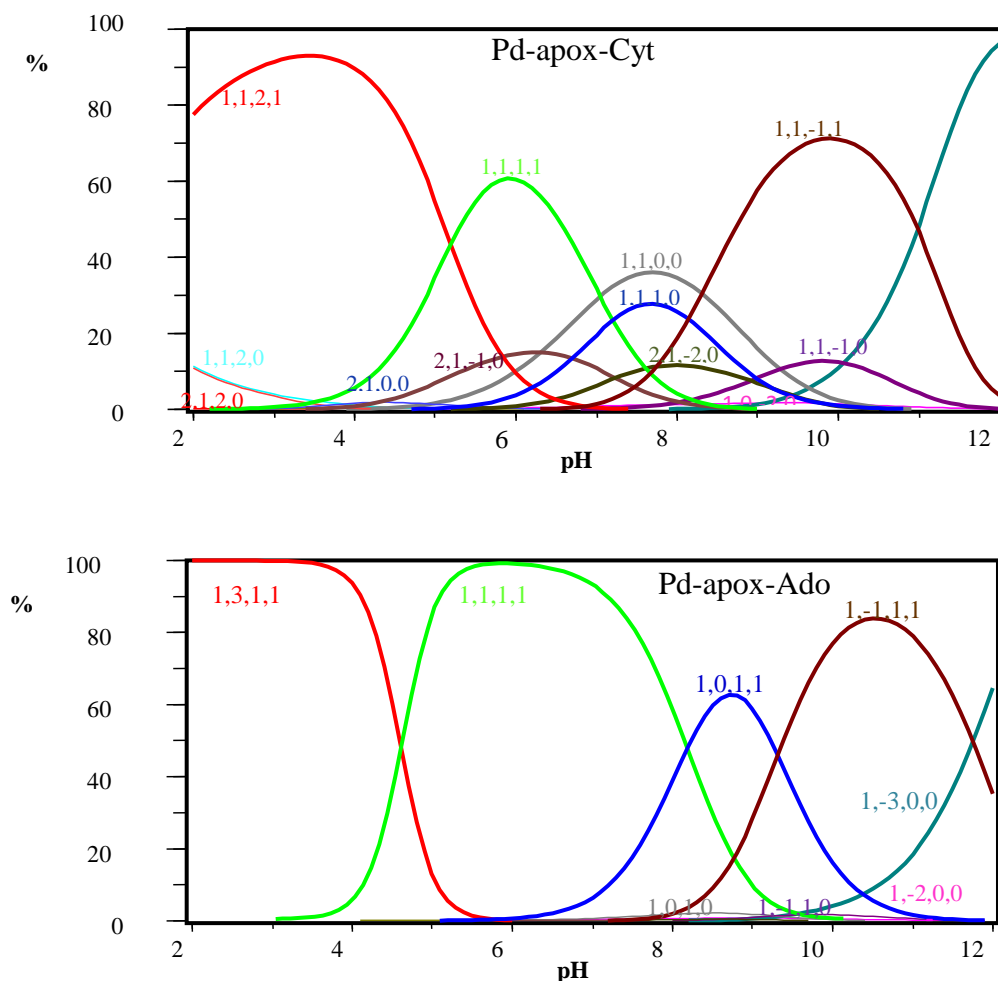


Слика 26. Дистрибуциони дијаграм $[\text{Pd}(\text{mda})(\text{Guo})]$ комплекса за концентрациони однос $[\text{Pd}]/[\text{mda}]/[\text{Guo}] = 1:1:1$ и са укупном концентрацијом паладијума од 1 mM

Дистрибуциони дијаграми врста присутних у $[\text{Pd}(\text{обар})(\text{Адо}/\text{Сyt})]$ и $[\text{Pd}(\text{арох})(\text{Адо}/\text{Сyt})]$ системима за концентрациони однос $[\text{Pd}]/[\text{L}]/[\text{Адо}/\text{Сyt}] = 1:1:1$ приказани су на слици 27 и 28. $\text{pK}_a = \log \beta_{1,1,1,1} - \log \beta_{1,0,1,1}$ вредности протонисаних PdH_2LA (1,1,1,1) обар и арох комплекса су 8,12 и 8,16. Ове вредности су ниже од добијених за амидне групе обар и арох ($\text{pK}_a = 9,85$ и $10,05$), што указује да депротонисани тернарни комплекси вероватно настају депротоновањем амидних група лиганата при повећању pH раствора (Слика 27 и 28).



Слика 27. Дистрибуциони дијаграми $[\text{Pd}(\text{обар})(\text{Адо})]$ и $[\text{Pd}(\text{обар})(\text{Сyt})]$ за концентрациони однос $[\text{Pd}]/[(\text{обар})]/[\text{Адо}/\text{Сyt}] = 1:1:1$ и са укупном концентрацијом паладијума од 1 mM



Слика 28. Дистрибуциони дијаграми $[Pd(\text{apox}(\text{Cyt}))]$ и $[Pd(\text{apox})(\text{Ado})]$ за концентрациони однос $[Pd]/[(\text{apox})]/[\text{Ado}/\text{Cyt}] = 1:1:1$ и са укупном концентрацијом паладијума од 1 mM

Релативна стабилност тернарних комплекса у односу са константама стабилности одговарајућих бинарних комплекса може се изразити са величином $\Delta \log K$. $\Delta \log K$ представља разлику између константи стабилности тернарних (Слика 27 и 28) и два одговарајућа бинарна комплекса и показује тенденцију ка формирању тернарних врста [229]. Може се израчунати према следећој једначини (11):

$$\Delta \log K = \log \beta_{MLA}^M - (\log \beta_{ML}^M + \log \beta_{MA}^M) \quad (11)$$

Негативна вредност $\Delta \log K$ указује да је тернарни комплекс мање стабилан од одговарајућег бинарног комплекса, односно то може да укаже да се не формира тернарни

комплекс у испитиваном систему. Међутим, то не значи да не долази до формирања тернарних комплекса. Негативна вредност $\Delta \log K$ може да значи да су бинарни комплекси стабилнији од тернарних комплекса. На $\Delta \log K$ вредност могу да утичу и други фактори: електростатички, структурни, стерни, врсте везе и геометријска конфигурација. С друге стране, позитивна вредност $\Delta \log K$ указује да су тернарни комплекси стабилнији од одговарајућих бинарних комплекса. Вредности $\Delta \log K$ за комплексе Pd(обар)Адо, Pd(обар)Сут, Pd(арох)Адо и Pd(арох)Сут су: -0,42, -0,82, -1,07 и -3,66. На основу израчунатих $\Delta \log K$ вредности може се закључити да комплекс [Pd(обар)] гради са аденозином најстабилнији мешовити комплекс.

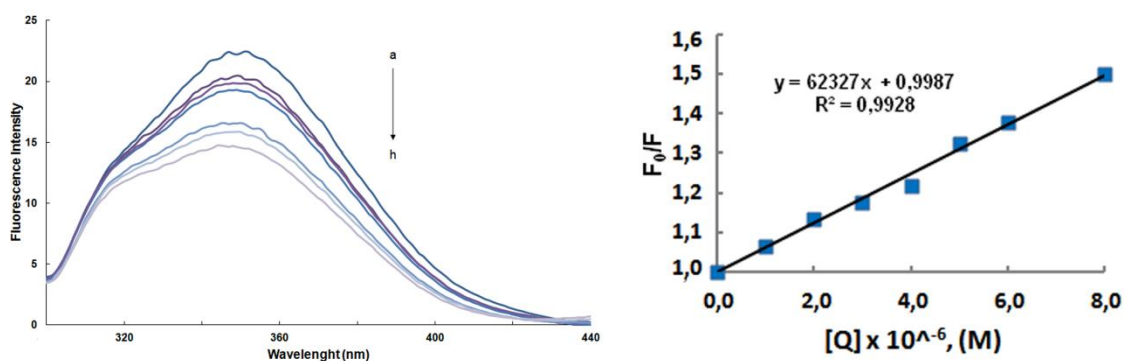
5.3.3 Хемијско-биолошка испитивања

Хемијско-биолошка и биолошка својства синтетисаних једињења испитивана су применом: флуоресцентне и апсорпционе спектроскопије за испитивање интеракција са DNK и HSA биомолекулима, МТТ теста за утврђивање цитотоксичности, тертмана за детекцију апоптозе, Вестерн блот анализе и проточне цитометрије за анализу ћелијског циклуса. Општа резистентност ћелија праћена је одређивањем слободне енергије везивања између [PdL] јединице и димера шаперона бакра Atox1 [221]. Циљ ових испитивања био је утврђивање биолошке активности синтетисаних једињења и предвиђање потенцијалног механизма њиховог дејства.

5.3.3.1 Интеракције са HSA протеином

На ефикасност лека битно може утицати степен везаности лека за протеине присутне у крвној плазми. Слабије везан лек је ефикаснији и лакше може дифундовати кроз ћелијске мембране. Протеин крвне плазме за који се лекови најчешће везују, а уједно и најзаступљенији, је албумин хуманог серума (HSA). Флуоресцентна спектроскопија може дати неке информације о везивању малих молекула за протеин, као што су: механизам везивања, начин везивања, константе везивања, места везивања као и интермолекулска растојања. У нашем раду испитиване су интеракције везивања [PdL] (L = mdp, mda и обар) комплекса за хумани серумски албумин. Ефекат [Pd(mdp)]²⁻ комплекса на интензитет флуоресценције HSA на 298 K приказан је на слици 29. Са слике се може видети да се интензитет флуоресценције HSA смањује са порастом концентрације комплекса, што указује да комплекс [Pd(mdp)]²⁻ интерагује са албумином.

Обрадом добијених спектра израчунате су константе везивања и број везујућих места (Табела 9, страна 64). Из табеле се може видети да константа стабилности (K_a) има највећу вредност за комплекс [Pd(obap)]-HSA ($5,56 \cdot 10^4$). Комплекс [Pd(mda)]-HSA је показао најмању стабилност, што значи да се [Pd(mda)]²⁻ веже за албумин најслабијим везама. Број везујућих места за сва три комплекса је ~ 1 , што указује да се сви комплекси вежу за једно везујуће место у албумину [127].



Слика 29. Емисиони спектар HSA у присуству различитих [Pd(mdp)]²⁻ концентрација (T = 298 K, pH = 7,4). [HSA] = 2,0 μM, (a–h): 0,0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 8,0 и Стерн-Волмеров дијаграм

5.3.3.2 Интеракције са DNK молекулом

Активност антитуморних лекова је углавном фокусирана на инхибицији репликације DNK молекула, што нас је навело на испитивање евентуалних интеракција синтетисаних комплекса са DNK биомолекулом. Три су својствена начина лиганд-комплекс везивања за молекул DNK: електростатичко везивање фосфатне групе, везивање у жлеб између ланаца и интеркалација. Етидијум бромид (ЕВ) је типичан индикатор интеркалације, па се промене уочене у флуоресцентним спектрима ЕВ-DNK комплекса често користе за испитивање интеракција између DNK и комплекса прелазних метала. Додавање [PdL] (L = mda, mdp и обар) комплекса молекулу DNK доводи до повећања или смањења емисије (Слика 30, десно), што указује да се испитивани комплекси везују за молекул DNK.

Такође, интензитет емисионог спектра EB-DNA опада при додатку испитиваних комплекса (Слика 30 лево). Ово смањење интензитета емисије указује на конкурентно везивање комплекса [PdL] за DNK молекулу и истискивање EB. Вредности константи везивања (K_b) испитиваних комплекса Pd(II) јона за молекулу DNK у одсуству и присуству EB су дате у табели 10 (страница 65).

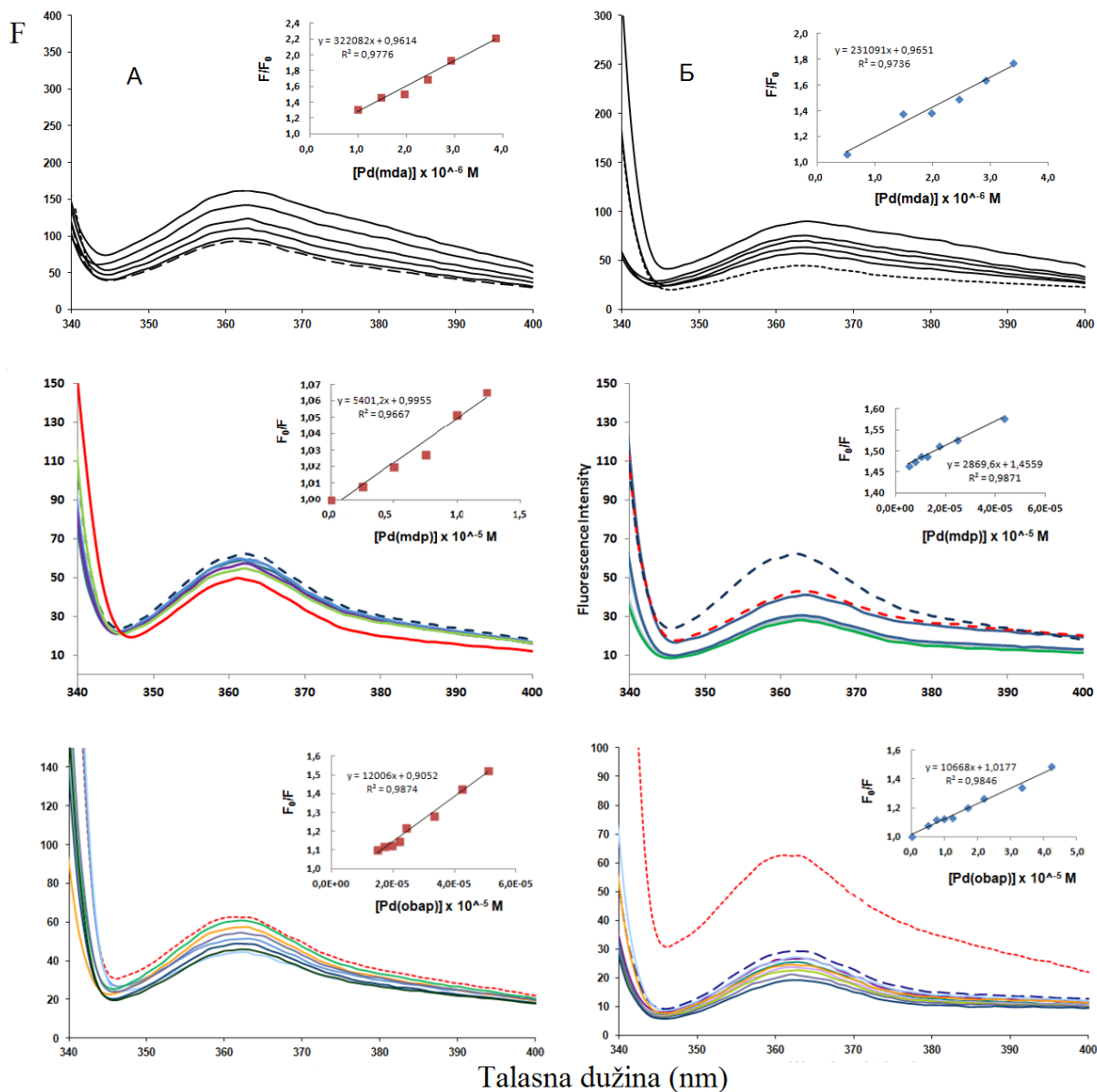
Комплекс [Pd(mda)]²⁻ гради најстабилнији комплекс са молекулом DNK ($K_b = 2,1 \cdot 10^5$). Ова вредност константе указује на релативно јаку везу [Pd(mda)]²⁻ комплекса са DNK. У присуству EB вредност константе се смањује ($K_b = 8,5 \cdot 10^4$) што значи да постоји конкуренција у везивању EB и [Pd(mda)]²⁻ комплекса за молекулу DNK. На основу смањења константе у присуству EB може се извести закључак да се [Pd(mda)]²⁻ комплекс веже за молекулу DNK делимично интеркаларно. Исти закључак се може донети и за комплексе [Pd(mdp)]²⁻ и [Pd(obap)]⁻ јер и њихове константе имају нижу вредност у присуству EB. Ова два комплекса показују мањи афинитет везивања за DNK у односу на комплекс [Pd(mda)]²⁻.

5.3.4 UV-Vis спектроскопија

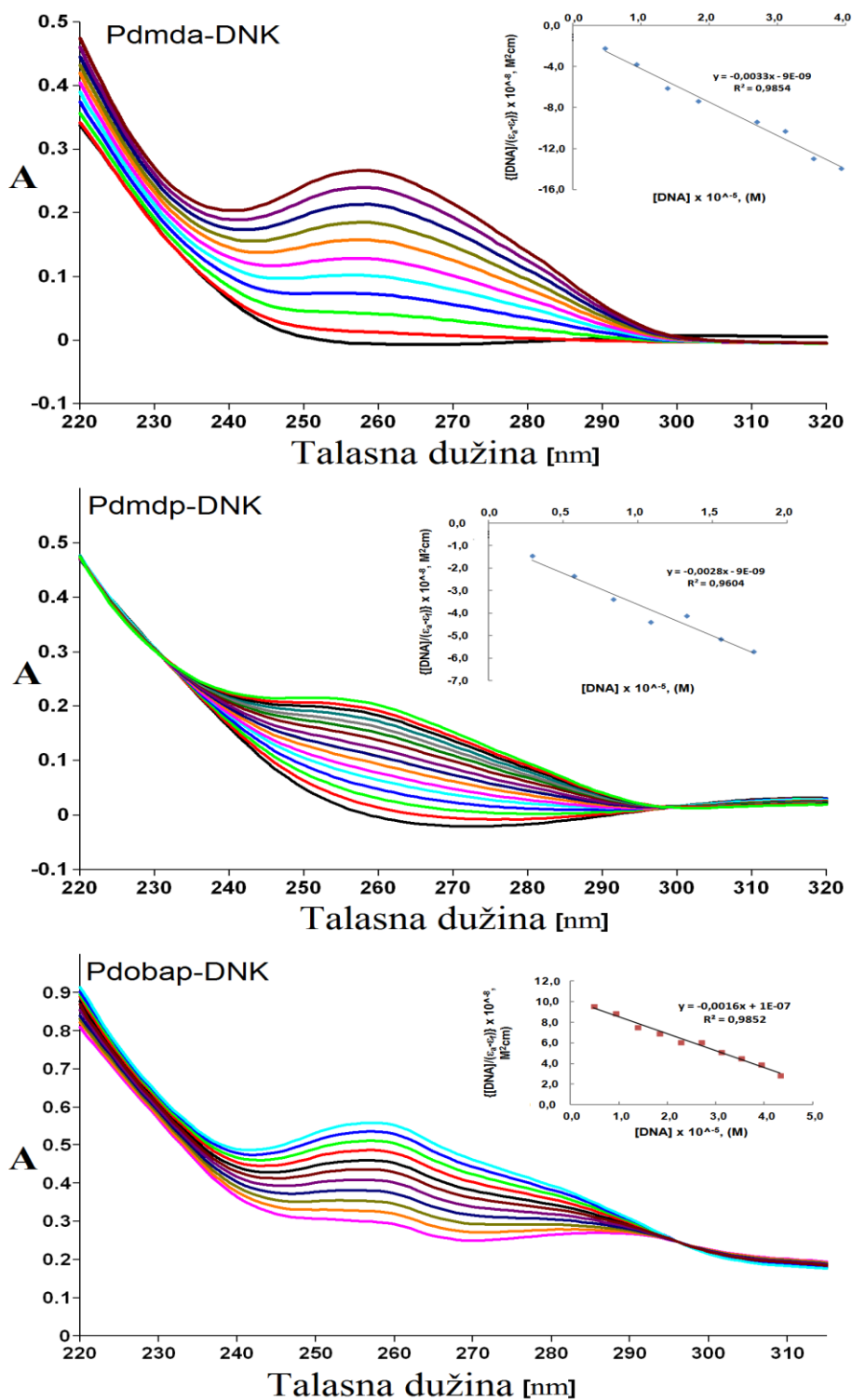
Апсорпциона спектроскопија је корисна техника за испитивање интеракција између малих молекула и DNK. Промене уочене у UV-Vis спектрима током титрације указују на начин везивања испитиваног комплекса за DNK.

5.3.4.1 Интеракције са DNK молекулом

UV-Vis спектри комплекса [Pd(mdp)]²⁻, [Pd(obap)]⁻ и [Pd(mda)]²⁻ константне концентрације у одсуству и присуству растуће концентрације DNK приказани су на слици 31.



Слика 30. (А-лево) Флуоресцентни емисиони спектар DNK у одсуству (испрекидана линија) и присуству растуће количине $[Pd(L)]^{2-/-}$ (обојена пуна линија). Стерн-Волмерови дијаграми; **(Б-десно)** Флуоресцентни емисиони спектар DNK (---) и EB-DNK (— — —) у одсуству и присуству растуће количине $[Pd(L)]^{2-/-}$ (обојена пуна линија). Стерн-Волмеров дијаграми



Слика 31. Апсорпциони спектри $[Pd(L)]^{2-/-}$ комплекса ($4,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) у одсуству и присуству растуће количине DNK: $r = 0,0-1,2$. Дијаграм $[DNK]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ са $[DNK]$

Са слике се може видети да се интезитет апсорпције комплекса повећава после додавања DNK, што указује на јасну интеракцију између DNK и комплекса. Комплекс Pd(II) се може везати за дволанчану DNK са различитим везујућим режимима на основу структуре и типа лиганда. DNK-двострука спирала има много водоник везујућих места која су доступна у споредним и главним каналима (жлебовима). Зато постоји вероватноћа да амино група алифатичног лиганда у Pd(II) комплексу формира водоничне везе са DNK, и овакве интеракције могу допринети повећању интезитета апсорпције UV-Vis спектра. С друге стране, испитивани комплекси паладијума, који поседују метилenske групе на лигандима могу се везати за DNK ван дер Валсовим силама (интеракције између метил групе лиганда и метил групе тимина). Хиперхромни ефекат може бити као последица и електростатичких интеракција између позитивно наелектрисаних катјона и негативно наелектрисаних фосфатних анијона који се налазе на периферији двоструког хеликса DNK. Такође, није искључена вероватноћа интеркаларног повезивања испитиваних комплекса са базним паровима у DNK.

Константа везивања (K_b) комплекса за DNK била је одређена из апсорпционих спектра комплекса у одсуству и присуству растуће концентрације DNK. Вредности (K_b) константи су дате у табели 11 (страна 65). Из табеле се може видети да су K_b вредности испитиваних комплекса ниже од константе класичног интеркалатора EB. Ова чињеница сугерише да интеркалација између базних парова није главни начин интеракције комплекса Pd(II) са DNK. Од испитиваних комплекса, комплекс $[Pd(mda)]^{2-}$ има највећу вредност K_b константе (Табела 11, страна 65), што указује да овај комплекс показује најјаче интеракције са DNK.

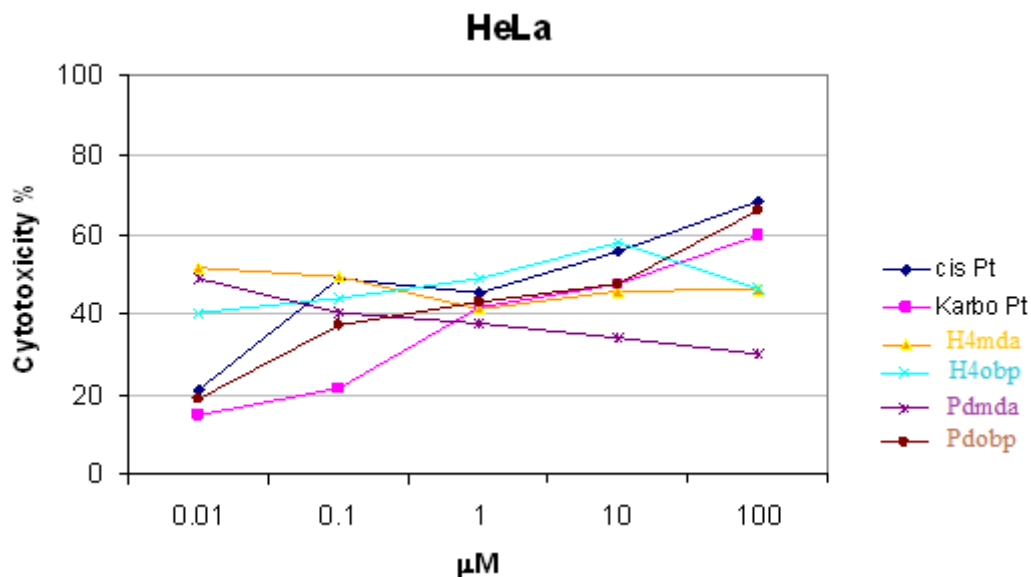
5.4 *In vitro* антитуморна активност

5.4.1 МТТ тест цитотоксичности и Вестерн блот анализа

Ћелијски одговор на тестиране лиганде и једињења паладијума(II) био је другачији (Табела 12, страна 67). Највећу осетљивост према готово свим испитиваним једињењима синтетисаним у првој фази наших истраживања показала је HeLa ћелијска линија. Највећу цитотоксичност је показао комплекс $K_2[Pd(mda)] \cdot H_2O$ (Слика 32).

Комплекси и лиганди синтетисани у другој фази наших истраживања, као и Доксорубицин (контрола) инхибирају раст HeLa ћелија, а степен инхибиције зависи од

концентрације испитиване супстанце. Тип одговора за сва тестирана једињења је исти у свим испитиваним временима.



Слика 32. Осетљивост HeLa ћелијске линије испитивана МТТ тестом на комерцијалне лекове Pt и испитиване комплексе Pd

Осетљивост HCT-116 ћелијске линије на екстракт *L. vulgare* повећана је у присуству [Pd(арох)] комплекса. Објашњење лежи у синергистичком ефекту *L. vulgare* екстракта и [Pd(арох)] комплекса, што је одлична смерница за даља истраживања.

Већина хемотерапеутика индукује апоптозу која је карактеристична по значајнијој експресији Вах протеина. Експерименти су показали да испитивана једињења утичу управо на експресију Вах протеина (Слика 18, страна 69). Експресија Вах протеина је благо повећана код свих тестираних супстанци у односу на контролу, осим H4obbz лиганда и референтног једињења (доксорубицин). Такође, потврђено је да апоптоза у разним хуманим чврстим туморима може бити индукована у одсуству било какве промене на нивоу Вах протеина [230]. Каспазе, породица аспартат-специфичних цистеин протеаза, играју критичну улогу у програмираној ћелијској смрти. Каспазе су важни медијатори у покретању и извршењу апоптотских сигнала [231]. Апоптотска

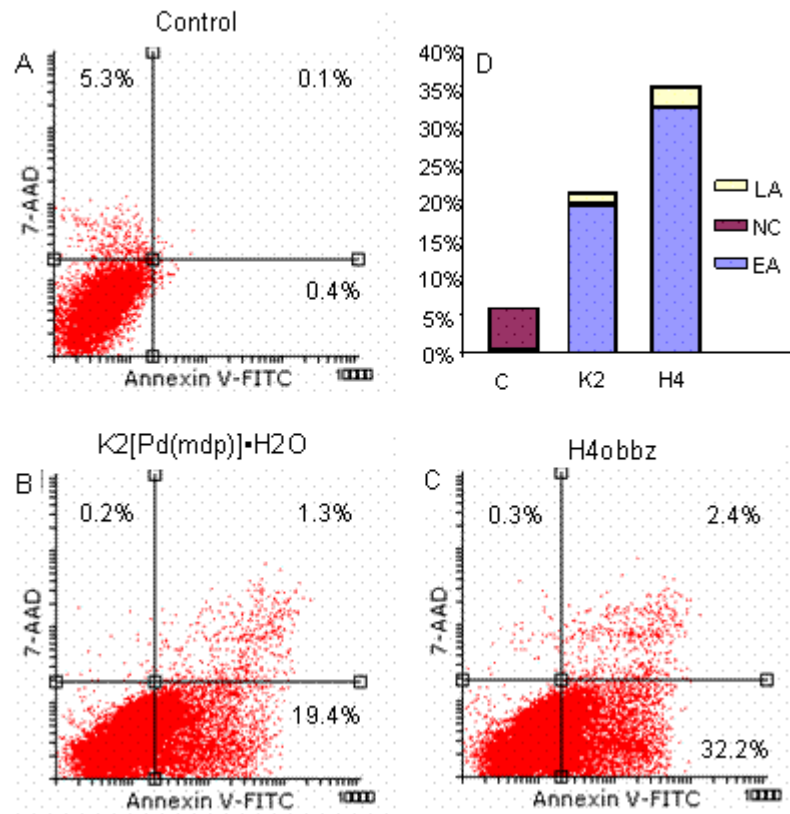
морфологија ћелија може да буде индукована не само активношћу каспазе већ и деловањем осталих породица протеаза. Антитуморни агенси могу индуковати ћелијску смрт апоптозом на каспаза-зависни или каспаза-независни начин [232]. То значи да се апоптоза може покренути без активације каспазе, као и да активација каспазе не доводи увек до ћелијске смрти [233]. Да би смо утврдили да ли наши системи индукују апоптозу активацијом каспазе-3, оцењивали смо ниво експресије прекурсора и активне подјединице каспазе-3 у HeLa ћелијама третираним лигандима и паладијум(II) комплексима. Вестерн блот анализа је показала експресију протеина, прекурсора каспазе-3, у HeLa ћелијама третираним свим испитиваним једињењима, али је експресија активне субјединице била другачија и зависила од структуре једињења и времена експозиције. Активација каспазе-3 је праћена цепањем бројних нижих протеина укључујући поли-(ADP-рибозу) полимеразу (PARP). PARP је укључен у механизам обнове DNK и њено цепање је биохемијско обележје апоптозе [233]. Резултати *in vitro* су показали да антитуморна активност паладијум(II) комплекса са различитим врстама лиганата на HeLa хуманим ћелијама изазивају апоптозу на каспаза-зависан начин.

У сагласности са резултатима добијеним МТТ тестом цитотоксичности, флуоресцентна микроскопија АО/ЕВ двоструко обојених ћелија потврдила је промене у морфологији ћелија репрезентативних за апоптозу: скупљање и заокруживање ћелија, кондензација хроматина, пропадање једра и фрагментација, као и стварање мехурића и формирање апоптотских тела (Слика 19, страна 70). Ови резултати додатно потврђују да паладијум(II) комплекси индукују ћелијску смрт углавном путем апоптозе.

5.4.2 Проточна цитометрија

5.4.2.1 Annexin V/7-AAD бојени тест

Анализом резултата проточне цитометрије тестираних H_4obbz и $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ једињења јасно је да је примарни начин смрти HeLa ћелија био апоптоза, са занемарљивим уделом некротичних ћелија. Оба једињења значајно су увећала удео апоптозе HeLa ћелија, у високом проценту ране апоптозе, док је некротичних ћелија, иако у ниском проценту, било приметно само у контролним ћелијама (Слика 33).



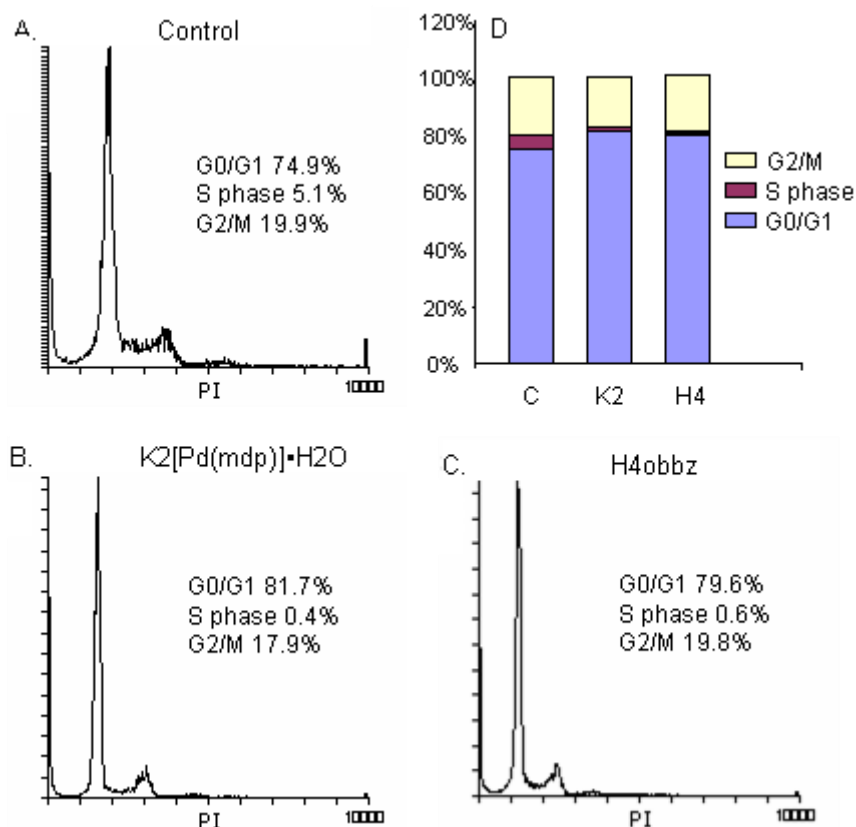
Слика 33. Annexin V-FITC/7-AAD детекција апоптозе проточном цитометријом. (A-C) Тачкице на дијаграму илуструју дистрибуцију вијабилних, ћелија ране апоптозе, касне апоптозе и некротичних ћелија у нетретираној контроли (C) и третираних $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz HeLa ћелија. Доњи леви квадрант одговара Annexin V-7-AAD-вијабилним ћелијама, доњи десни Annexin V+7-AAD-ћелијама ране апоптозе (EA), горњи десни угао Annexin V+7-AAD-ћелијама касне апоптозе (LA) и горњи леви угао Annexin V-7-AAD-некротичним ћелијама (NC). (D) Процент апоптотских и некротичних ћелија у контроли и третираним ћелијама су просек три независна експеримента

5.4.2.2 H_4obbz и $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ индукују G_0/G_1 застој ћелијског циклуса у HeLa ћелијској линији

Добијени резултати су показали да већина активних једињења ($K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz) индукују апоптозу у великом проценту испитиваних ћелија. Поред тога, прогресија ћелијског циклуса HeLa ћелија третираних овим једињењима показују заустављање синтезе ДНК и повећање ћелијске популације у G_0/G_1 фази као могући механизам који покреће апоптозу (видети резултате). Нагомилани докази указују на то

да спој прогресије ћелијског циклуса и програмиране ћелијске смрти или спречавају или индукују апоптозу. Машинерија ћелијског циклуса има бројне регулационе молекуле који прате и регулишу напредовање ћелијског циклуса. Ови регулациони молекули се активирају након оштећења ДНК и застоја у расту изазваног штетом омогућавајући ћелији да се опорави и поправи оштећења ДНК. Ако се штета не може поправити, покреће се програмирана ћелијска смрт и ћелија се елиминише апоптозом. Тако, нестанак фазе S и заустављање у G0/G1 фази, изазвано $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz једињењима, указује на блокаду синтезе ДНК и инхибиције топоизомеразе II и I као могућег механизам који покреће апоптозу [234] (Слика 34).

Такође, недавно смо предложили [127] да ER стрес може бити један од механизма којим се објашњава деловање синтетисаних лекова. Међутим, и поред врло вероватног PdL^{2-} - протеин (ER шаперон) адукта нисмо искључили могућност да лекови интерагују са ДНК мада са смањеним интензитетом. WB анализа проналази да је експресија Bcl-2 и цепање PARP у складу са нашим претпоставкама. Росети (Rosati) и сарадници показују да нови ER стрес-активиран каспазом каскадно, а инициран од стране каспазе-4 и укључујући каспазу-8 и -3, игра важну улогу у спонтаној Bcl-2 апоптози ћелије [235]. Они такође да тврде да ER стрес изазива сигнале преживљавања у Bcl-2 ћелијама повећањем експресије GRP78 и показују да је ER стрес битан окидач за Bcl-2 апоптозу ћелија, па сугерише да те генетске и фармаколошке манипулације ER сигнализације могу представљати важну терапеутску стратегију. Ми верујемо да се испитивани комплекси добро уклапају са наведеним и даље подржавају механизам ER стреса као реалне опције за хелате паладијум(II) комплекса.



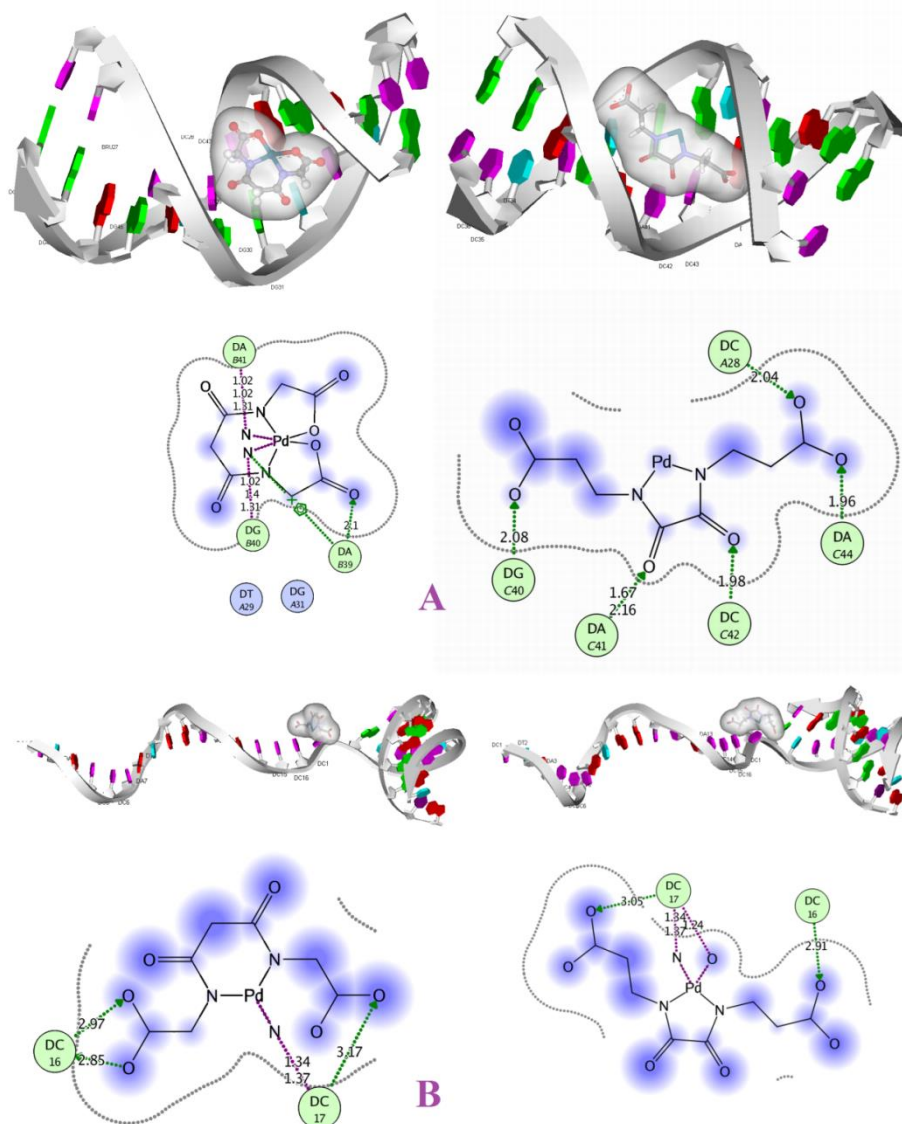
Слика 34. Анализа ћелијског циклуса. (А-С) Хистограми представљају три независна експеримента и демонстрирају дистрибуцију ћелијског циклуса унутар нетретиране контроле (С) и третираних $K_2[Pd(mdp)] \cdot H_2O$ и H_4obbz HeLa ћелија. (D) Оба једињења индукују упоредив пад у S фази и пораст у G0/G1 фази ћелијског циклуса

5.5 Докинг молекулска симулација

5.5.1 Понашање $[PdL]^{2-}$ комплекса према DNK

Поред добре активности везивања за DNK (Табела 13, страна 72), вреди напоменути да су оксамидо/маламидо лиганди интераговали са DNK на други начин у односу на цисплатину. Сва испитивана једињења (Слика 35А) успостављају водонично везивне интеракције са остацима активних места у случају оба DNK молекула. Међутим, $[Pd(mda)]^{2-}$ анјон поред водоничне везе успоставља бифункционалне ковалентне/јонске интеракције остварене кроз паладијума.....азот (DA41 и DG40) 1A1O код, што додатно стабилизује комплекс PdL^{2-} -DNK лезије (Табела 13, страна 72). На основу редоследа

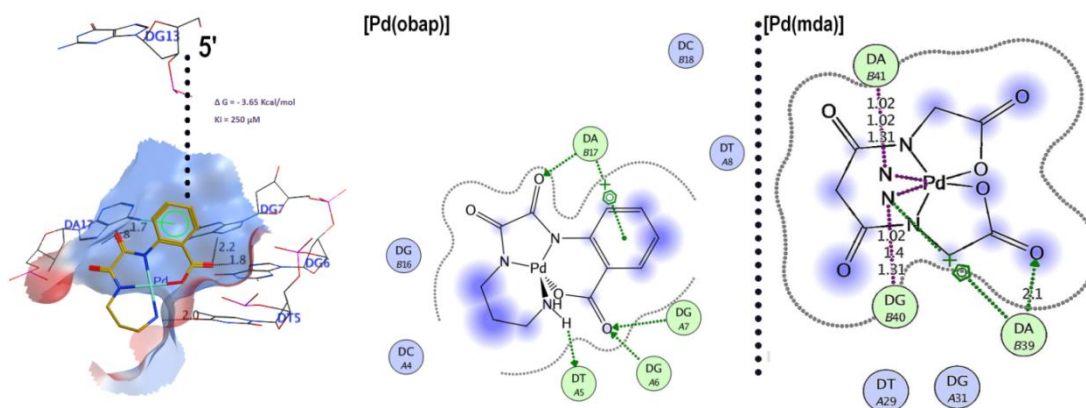
везивања лиганада за додекамер очигледно је да једињења H_4mda^{2-} и $[Pd(mda)]^{2-}$ имају предност у односу на цисплатину што је у складу са њиховом цитотоксичном активношћу према HeLa ћелијама (Табела 12, страна 67). Када једињења докују 29-мер DNK - RNK (3M3Y код), водоничне везе су главне лиганд – DNK (RNK) интеракције (Табела 13, страна 72, Слика 35B). Међутим, очигледно је да слободне енергије везивања испитиваних једињења (ΔG) нису конкурентне пириплатини која је природно везана за DG18 29-мер. H_2obp^{2-} врста има довољно велику енергију везивања да би се сматрала конкурентом пириплатини, док су сва остала једињења показала само слабу интеракцију са овим олигонуклеотидима. Резултати докинг симулације нас наводе на закључак да испитивани комплекси интерагују са DNK базама асоцијативним S_N2 механизмом, при чему се врши замена једне, а након тога и друге карбоксилне групе. Лиганди су тетраденатни, али имајући у виду горе дату дискусију и чињеницу да два су амидна азота чврсто везана за јон паладијума, а два карбоксилна кисеоника према константама стабилности (на пример, $[PdHmda]^-$ се разликује само за два реда величине од $[Pdmda]^{2-}$) нису толико чврсто везани (видети дискусију хемије водених раствора) можемо закључити да се замена азота из базе DNK највероватније врши преко S_N2 механизма. Паладијум је у стању да веже пети лиганд кроз механизам измене координованих атома. Докинг резултати дају (Слика 35A) грубу слику докованог молекула тако да не можемо очекивати праву квадратно планарну геометрију око паладијума. Међутим, очигледно је да су у свим, осим у случају $[Pd(obp)]^{2-}$ врсте, координациона квадратно планарна места око паладијума окупирана са једним или два атома DNK (база). Оба приступа (слободне торзије и без торзија) примењена на доковање комплекса паладијума откривају исти редослед "слободна енергија: активност лека". У случају $[Pdmda]^{2-}$ (Слика 35A) асоцијативни Pd–mda–DNK (база) комплекс указује на могућу брзу замену два карбоксилата из координационе сфере.



Слика 35. Предпостављени начин везивања $[PdL]^{2-}$ комплекса за везивно место DNK додекамера код 1A10 (A) и 29-мер DNK/10-мер RNK код 3M3Y (B)

Најбољи резултати слободних енергија (ΔG) које описују афинитет везивања комплекса за DNK молекул, постигнути су у случају $[Pd(obap)]^-$ и $[Pd(mda)]^{2-}$ [126] комплекса (Табела 14, страна 73). Разлика од око 1 kcal mol^{-1} благо фаворизује $[Pd(obap)]^-$ комплекс. Добијене K_i вредности испитиваних комплекса указују на веће разлике у инхибицији, то јест $[Pd(obap)]^-$ има чак 10 пута већу активност везивања него $[Pd(mda)]^{2-}$ комплекс. Главне интеракције палладијум(II) комплекса са олигонуклеотидима

илустроване су на слици 35. Оба једињења интерагују путем водоничних веза са остацима активних места DNK ланца. Међутим, $[Pd(obap)]^-$ комплекс очигледно формира чвршћу везу са DNK путем водоничних веза и π -аренских интеракција. У случају овог комплекса доминира везивање $[Pd(mda)]^{2-}$ за додекамер преко В ланца (Слика 36), док $[Pd(obap)]^-$ углавном користи А ланац да се уклопи у главни жлеб 1А10 олигомера.



Слика 36. 3D $[Pd(obap)]^-/12$ -мер интеракције (заједно са мапом електростатичке површине) и шематски дијаграм $[Pd(obap)]^-$ и $[Pd(mda)]^{2-}$ -DNK главних интермолекулских интеракција

5.5.2 Понашање $[PdL]^{2-/}$ ка шаперонима

Урађено је укупно четрнаест симулационих експеримената. За поређење су коришћени већ тестирани лиганди на њихову инхибиторну активност према одабраним HSP протеинима [178,179]. Ови лиганди су изведени из аденозина и представљају комерцијалне или ново припремљене аналоге. Супституенти су промењени на положају 8 хетероцикличне базе (R1) и положају 5-хидроксил шећера (R2). Утврђено је да су неки од ових лиганада, посебно 6 и 7 (Табела 14, страна 73) веома снажни HSP инхибитори. За сваки протеин су узети подаци најбољих докинг резултата (ΔG и K_i) инхибиторне активности лиганада. Код експерименталних и теоретских (ΔG и K_i/K_d) параметара [178,179] постигнуто је добро слагање.

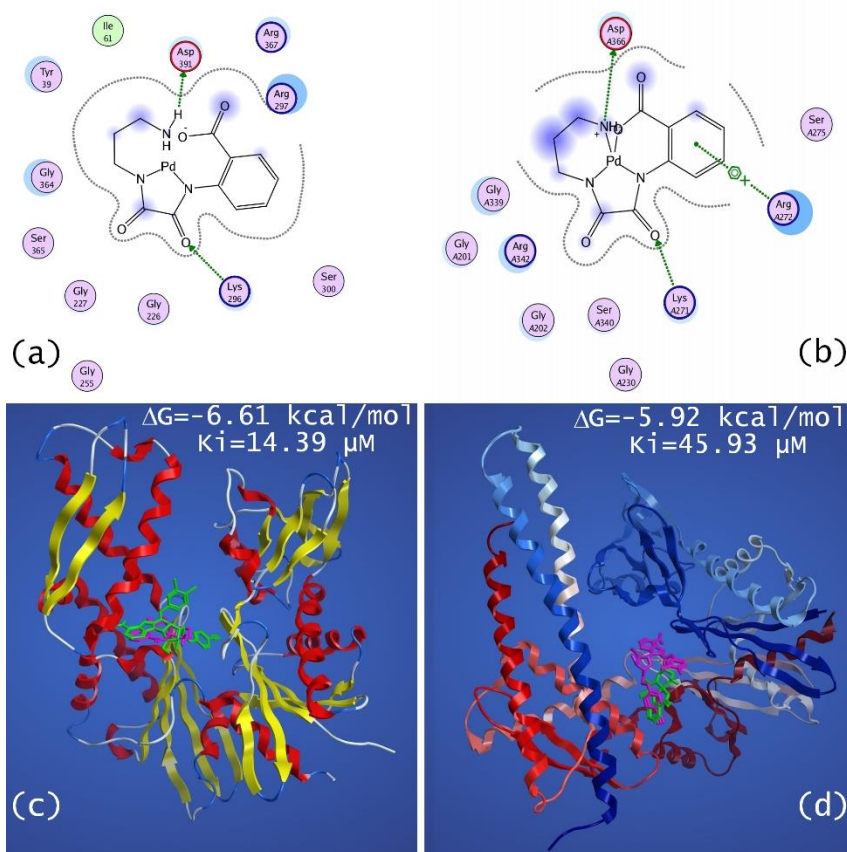
Вредности слободних енергија указују на разлику између везивања једињења и протеина. ΔG вредности за Grp78 су израчунате на основу експерименталних података [178,179] док су за Hsc70 добијене из наших докинг резултата. Разлике у енергијама

везивања између комплекса паладијума и деривата аденозина за Grp78 и Hsc70 су око 3 и 2 kcal mol⁻¹.

На основу претходног, изгледа да су бољи избор за поређење константе инхибиције (K_i). У случају испитиваних комплекса за Grp78 и Hsc70, K_i вредности су 14,39 (66,1) и 45,93 (205,38) μ M конкурентне са K_i вредностима аденозинских деривата, а посебно у случају [Pd(mda)]²⁻ комплекса. Пажљивом анализом података датих у табели 14 (страна 73), минорна предност може се дати [PdL]-Hsc70 у односу на [PdL]-Grp78 везивање.

Главне интеракције у [Pd(obap)]⁻ комплексу са Grp78 и Hsc70 протеинима су приказане на слици 37. Нековалентне интеракције између паладијум(II) комплекса и Grp78 протеина потичу од: интеракција Lys296 који се понаша као дозор водоника карбонилном кисеонику и Asp391 водоник акцептора амино (-NH₂) групе остварених на растојању од 2,7 Å и 1,7 Å (Слика 37а). Истом анализом у случају Hsc70 протеина утврђено је да се главни везивни мод постиже код Lys271 (H-донор) и Asp366 (H-акцептор) (Слика 37 б). Додатна стабилизација постигнута је арен-катјонским слагањем између Arg272 и бензеновог прстена комплексног ањона.

Слике 37с и 37d показују положаје докованог једињења 7 (Табела 14, страна 73) и [Pd(obap)]⁻ комплекса за Grp78 и Hsc70. Постоји преклапање ароматичних региона ових једињења за оба рецептора као и Arg297 (Grp78) и Arg272 (Hsc70) укључених у стабилизацију комплекс/протеин адукта.



Слика 37. 3D [Pd(обар)]/HSP интеракције: (a) и (c) представљају Grp78 и (b) и (d) представљају Hsc70

5.6 Молекулска динамика и резистентност ћелија

По аналогији са комплексима платине(II), ефикасност комплекса паладијума(II) је ограничена смањеним уносом у цитоплазму и повећаним излучивањем што смањује могућност интеракције ових комплекса са макромолекулима. Због тога, студије о механизму резистентности комплекса паладијума(II) и њихове интеракције са макромолекулима могу нам дати одговор о различитим активностима на ћелијском нивоу. На пример, Боал (Boal) и Росензвиг (Rosenzweig) [187] су дали доказе за везу између резистентности цисплатине и хуманог хомеостатског протеина бакра Atox1 и АТР7А или АТР7В (протеини Менкес и Вилсонове болести). Наиме, ови аутори су решили структуре цисплатине везане за Atox1 рендгенском анализом. Показали су да

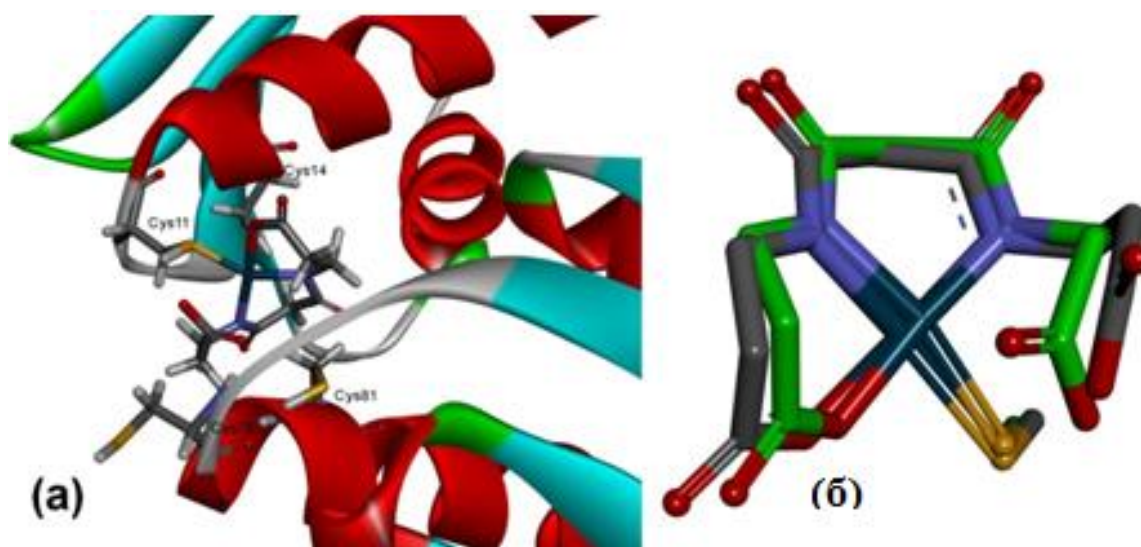
платина може бити везана за Atox1 и у 1:1 и 1:2 односу. Шаперон бакра Atox1 везује бакар(I) са конзервираним CXXC мотивом и доставља га N-терминалном домену који служи за везивање метала (MBDs) АТР7В и АТР7А, који су Cu(I) специфични P1В-тип АТР-аза [236]. Свака хумана Cu(I) АТР-аза има шест MBDs, који такође везују Cu(I) са CXXC мотивима и личе на Atox1 у укупној структури [237]. Стога се сматра да је Atox1, транспортни протеин метала, способан да интерагује са комплексима утичући на њихово излучивање из цитоплазме. Имајући у виду наведено, одлучили смо да испитамо интеракцију између синтетисаних паладијум(II) комплекса и аро-Atox1 димера, како би видели колико јако Atox1 везује ове агенсе у поређењу са Atox1-[Pd(L)]-Atox1 слободним енергијама везивања.

Резултати MMPBSA и MMGBSA анализе (Табела 15, страна 76) нису праве слободне везивне енергије пре разматрања промене ентропије. У MMPBSA и MMGBSA анализама израчунавамо резултате на основу укупног узорковања и узорковања ефективних везивних трајекторија (видети резултате). Постигнуто је добро слагање између два сета резултата. Прорачуни MMGBSA + NMA и MMPBSA + NMA су показали да свих 5 лиганата (осим [Pd(арох)]) имају повољно везивање са протеином димера Atox1. Предвиђене ΔG вредности у разумном опсегу (у распону од - 4 до - 14 kcal/mol за MMGBSA + NMA резултате, а од - 2 до - 6 kcal/mol за MMPBSA + NMA резултате). Штавише, и MMGBSA и MMGBSA + NMA резултати показали су сличан редослед промене слободних енергија везивања 5 комплекса: $[Pd(obbz)]^{2-} > [Pd(obap)]^- > [Pd(mdp)]^{2-} > [Pd(mda)]^{2-} > [Pd(арох)]$. Док су резултати MMPBSA + NMA показали редослед промене слободних енергија везивања: $[[Pd(obap)]^- > [Pd(obbz)]^{2-} \sim [Pd(mda)]^{2-} \sim [Pd(mdp)]^{2-} > [Pd(арох)]$.

Резултати добијени на основу QM/MM симулација, а изведених са циљем да додатно истраже суштинске карактеристике интеракција између протеина димера и комплекса паладијума(II), представљају солидну основу за даље бављење QM/MM динамиком. Урађено је укупно 900 ps (3 · 300 ps) у случају сваке лиганд-рецептор динамике. Након детаљног прегледа три путање у случају сваке Atox1-[PdL]-Atox1 јединице може се закључити следеће:

- ✓ Atox1-[PdL]-Atox1 јединице се понашају слично као што је то био случај у класичној динамици.

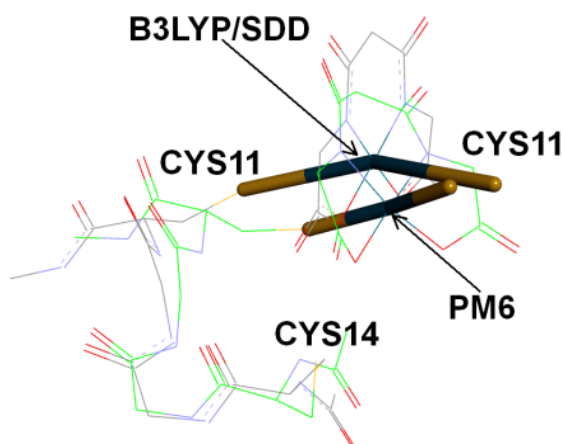
- ✓ Нема ковалентних интеракција између цистеинских остатака и комплекса, осим у случају $[\text{Pd}(\text{mdp})]^{2-}$ комплекса.
- ✓ Комплекс $[\text{Pd}(\text{mdp})]^{2-}$ интерагује са CYS11 остатком на такав начин да је један карбоксилат одвојен од центра паладијума и супституисан сумпором из цистеинског остатка. Коначна геометрија јединице комплекса (PdN_2OS) унутар лиганд-протеин система је квадратно планарна са Pd-S дужином везе од 2,294 Å (Слика 38а). Такво понашање $[\text{Pd}(\text{mdp})]^{2-}$ је у складу са студијом воденог раствора овог комплекса где је утврђено присуство $[\text{Pd}(\text{OH})(\text{mdp})]^{3-}$ (1,-1,1) врсте што указује на отварање прстена и истовремену координацију OH^- групе.
- ✓ Секундарна структура јединице протеина је скоро очувана.



Слика 38. (а) Конформација Atox1- $[\text{Pd}(\text{mdp})]^{2-}$ -Atox1 након 900 ps QM(PM6)/MD прорачуна; (б) Оптимизоване и преклопљене структуре $[\text{Pd}(\text{mdp})(\text{CYS11})]^{2-}$ комплекса узетог из QM и QM/MM прорачуна

Даље, користећи све три путање издвојили смо просечну конформацију за сваки систем. Потом смо користили део молекула који чини комплекс паладијума(II), и CXXC мотиве са сваке стране протеина. Намера је била да додатно потврдимо ове конформације

њиховом минимизацијом користећи PM6 и Gaussian 09 (B3LYP/SDD) методе. Резултати показују да је PM6 метод дао краће CYS11-[PdL]-CYS11 (S-Pd-S) растојање од B3LYP/SDD за око 3 Å, међутим, уз грубо очување секундарне структуре остатака (Слика 39). У случају [Pd(mdp)(CYS11)]²⁻ преклопљених PM6 и B3LYP/SDD структура добије се коефицијент преклапања од 0,935 (Слика 38б).



Слика 39. PM6 и B3LYP/SDD оптимизовани фрагмент средње Atox1-[Pd(L)]ⁿ-Atox1 конформације узете из три QM/MD трајекторије

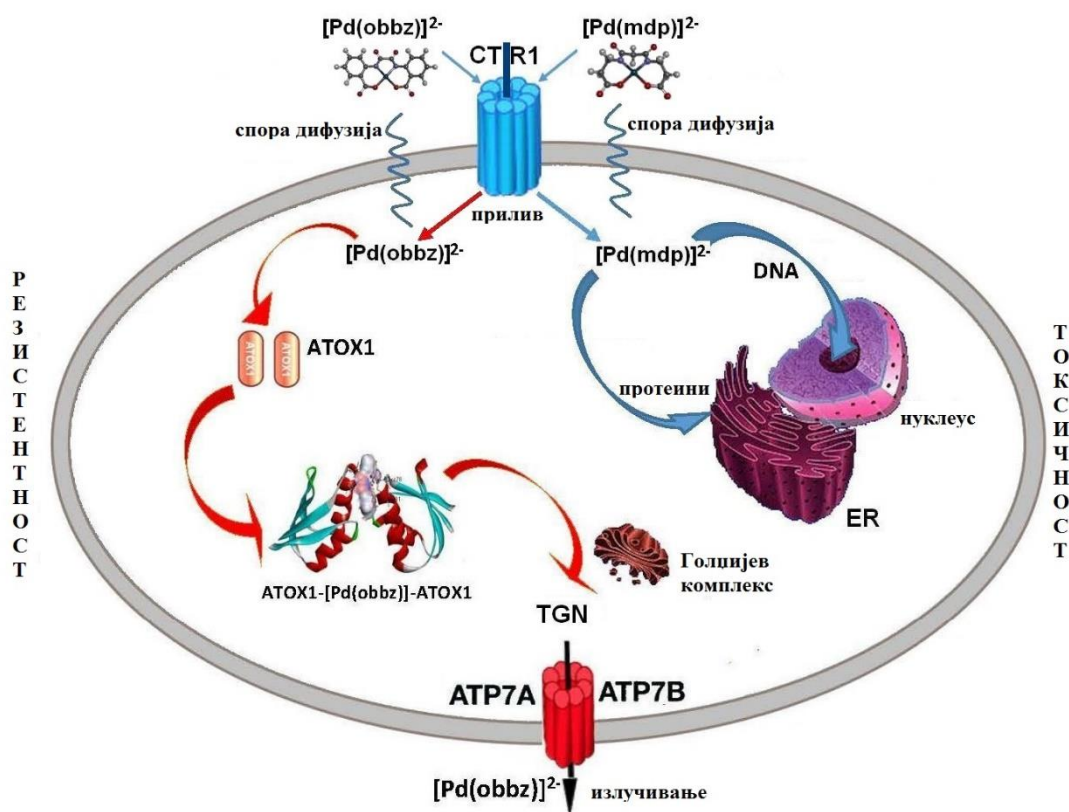
6. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове дисертације синтетисано је осам нових супстанци, од тога две киселине и шест комплекса паладијума(II). Једињења су окарактерисана применом спектроскопских метода, а у случају једног лиганда и три комплекса паладијума(II) структура је потврђена рендгенском структурном анализом. Применом потенциометријских мерења испитана је стабилност синтетисаних једињења у воденом раствору, као и стабилност система награђених у присуству нуклеозида. Интеракције паладијум(II) система са важним биомолекулима, попут HSA и DNK, испитиване су применом спектроскопских метода (емисиона и апсорпциона спектроскопија). Испитана је биолошка активност награђених једињења (антитуморно деловање потенцијалних кандидата за лекове) као и механизам њиховог дејства на малигне ћелије.

Сумирајући експерименталне и теоретске резултате можемо извести неколико закључака важних за интеракцију између наших комплекса паладијума(II) и малигних ћелија:

- ✓ Прво, у овој дисертацији је потврђена изражена сумња у вези теорије о комплексима паладијума(II) неупотребљивим у смислу кандидата за лекове антитуморних својстава.
- ✓ Такође је важно да смо потврдили чињеницу да су паладијум(II) комплекси супституисаних амида оксалне и малонске киселине веома добри антипролиферативни агенси у случају малигних ћелија.
- ✓ Постоји континуирано побољшање у смислу токсичности и селективности у току нашег истраживања [126,127].
- ✓ Комплекс [Pd(арох)] је у комбинацији са метанолним екстрактом *L.vulgare* на НСТ-116 ћелијској линији показао бољи антипролиферативни ефекат са нижим IC50 вредностима, него када је третирање вршено само комплексом.

- ✓ Неколико комплекса $[\text{Pd}(\text{mdp})]^{2-}$, $[\text{Pd}(\text{mda})]^{2-}$ и $[\text{Pd}(\text{арох})]$ имају значајан утицај на апоптозу ћелије. Можда најбоље особине показује $[\text{Pd}(\text{mdp})]^{2-}$ комплекс који због своје способности за отварање прстена омогућава евентуална додатна везивања централног паладијума са аминокиселинама протеина.
- ✓ Студије равнотежа у растворима (флуоресцентна и UV-Vis спектроскопија) базиране на интеракцијама $[\text{Pd}(\text{L})]^n$ комплекса и протеина (HSA) или DNK (CT DNA) указују на њихово добро везивање. Ово говори у прилог добром потенцијалу награђене HSA- $[\text{PdL}]$ транспортне јединице која не нарушава структуру комплекса, а према вредностима добијених константи стабилности јасно је да је способна да ослободи *лековекандидате* за интеракцију са ћелијом.
- ✓ Користећи класичну и QM/MM молекулску динамику били смо у стању да истражимо конформационе промене, слободне енергије везивања лигананда-рецептора и њихове ковалентне интеракције. Постоји приметна корелација између IC50 вредности (токсичност) и ΔG (слободне везивне енергије). Уопштено говорећи, $[\text{Pd}(\text{mdp})]^{2-}$ и $[\text{Pd}(\text{арох})]$ комплекси са највишим вредностима ΔG изазивају добар одговор свих третираних ћелија. Супротно, $[\text{Pd}(\text{obbz})]^{2-}$ и $[\text{Pd}(\text{обар})]^-$ са најнижим вредностима ΔG изазивају промену једне или две ћелијске линије, што је у складу са занемарљиво до умереним IC50 вредностима ових комплекса.
- ✓ На крају, предлажемо највјероватнији механизам деловања лекова према малигним ћелијама (Слика 40). Ово укључује:
 - ◆ фазу уласка лекова путем споре дифузије, или преко једног од транс-мембранских канала (као што је CTR1)
 - ◆ ћелијски одговор било кроз формирање atox1- $[\text{PdL}]$ комплекса или интеракција једињења паладијума(II) са протеинима присутним у ER, или једарном DNK
 - ◆ излучивање лекова ниске-потенције кроз познат atox1- $[\text{PdL}]$ комплекс/TGN/ATP7A(ATP7B) механизам.



Слика 40. Највероватнији механизам дејства лека према ћелијама тумора

ЛИТЕРАТУРА

- [1] G.-S. Kim, D.A. Judd, C.L. Hill, R.F. Schinazi, *J. Med. Chem.* **37** (1994) 816–820.
- [2] S. Lutsenko, *Curr. Opin. in Chem. Biol.* **14** (2010) 211–217.
- [3] D.W. Hutchinson, *Antiviral Research* **5** (1985) 193–205.
- [4] Research Subcommittee of the Empire Rheumatism Council (1960) *Ann Rheum Dis* 19:95-117.
- [5] R.C. Gamble, P.G. Schmidt, Contrast agents for NMR imaging, U.S. Patent 4728575, 1988.
- [6] C.-Y. Ke, C.J. Mathias, M.A. Green, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56** (2004) 1143–1160.
- [7] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature* **698** (1965) 4972.
- [8] B. Rosenberg, L. Van Camp, J.E. Trosko, V.H. Mansour, *Nature* **222** (1969) 385.
- [9] B. Rosenberg, L. Van Camp, *Cancer Res.* **30** (1970) 1799-1802.
- [10] R. J. Kociba, S. D. Sleight, B. Rosenberg, *Cancer Chemother. Rep.* **54** (1970) 325-328.
- [11] P. J. Loehrer, L. H. Einhorn, *Ann. Intern. Med.* **100** (1984) 704-713. M. Morris, P. J. Eifel, J. Lu, P. W. Grigsby, C. Levenback, R. E. Stevens, M. Rotman, D. M. Gershenson, D.G. Mutch, *N. Engl. J. Med.* **340** (1999) 1137-43. P. G. Rose, B.N. Bundy, E. B. Watkins, J. T. Thigpen, G. Deppe, M. A. Maiman, D. L. Clarke-Pearson, S. N. Insalaco, *Engl. J. Med.* **340** (1999) 1144-53. H. M. Keys, B. N. Bundy, F. B. Stehman, L. I. Muderspach, W. E. Chafe, C. L. Suggs, J. L. Walker, D. Gersell, *N. Engl. J. Med.* **340** (1999) 1154-61.
- [12] E. Wong and C.M. Giandomenico, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2451–2466.
- [13] L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer* **7**, (2007) 573–584.

- [14] S. Mabuchi, T. Kimura, *Chemother. Res. Pract.* **2011** (2011) 1–10.
- [15] J. M. et al. Rademaker-Lakhai, *Clin. Cancer Res.* **10** (2004) 3717–3727.
- [16] M. A. et al. Jakupec, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **43** (2005) 595–596.
- [17] F.A. Cotton, R.A. Walton, *Multiple Bonds Between Metal Atoms*, Clarendon Press, Oxford, 1993.
- [18] B. P. Esposito, S. B. Zyngier, A. R. Souza, R. Najjar, *Metal-Based Drugs* **4** (1997) 333–338.
- [19] B. P. Esposito, S. B. Zyngier, R. Najjar et al., *Metal-Based Drugs* **6** (1999) 17–18.
- [20] M. J. Cleare, P. C. Hydes, in H. Sigel, ed., *Metal Ions Biol. Syst.* **11** (1980) 1–62.
- [21] G. Mestroni, E. Alessio, A. Sessanta o Santi et al., *Inorg. Chim. Acta* **273** (1998) 62–71.
- [22] P. J. Barnard, and S. J. Berners-Price, *Coord. Chem. Rev.* **251** (2007) 1889–1902.
- [23] C. F. III Shaw, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2589–2600.
- [24] C.-M. et al. Che, *Chem. Commun. (Camb.)* **14** (2003) 1718–1719.
- [25] C. et al. Gabbiani, *Inorg. Chem.* **47** (2008) 2368–2379.
- [26] N. P. Farrell, “*Uses of Inorganic Chemistry in Medicine*”, The Royal Society of Chemistry, London, UK (1999).
- [27] E. Weder, T. W. Hambley, B. J. Kennedy, P. A. Lay, G. J. Foran, A. M. Rich, *Inorg. Chem.* **40** (2001) 1295. Q. Zhou, T. W. Hambley, B. J. Kennedy, P. A. Lay, P. Turner, B. Warwick, J. R. Biffin, H. L. Regtop, *Inorg. Chem.* **39** (2000) 3742.
- [28] R. Hastings, *The Chemist*, **7** (1846) George Peirce. 388-389.
- [29] D. S. Gill, in: M. P. Hacker, E. B. Douplr, I. H. Krakoff (Eds.), *Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy*, Nijhoff, Boston (1984) 267–278.
- [30] L. Potters, Y. Cao, E. Calugaru, T. Torre, P. Fearn, X. H.Wang, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **50** (2001) 605.
- [31] N. N. Stone, P. G. Stock, *Eur. Urol.* **41** (2002) 427.
- [32] A. R. Kapdi and I. J. S. Fairlamb, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 4751.
- [33] E. Gao, C. Liu, M. Zhu, H Lin, Q. Wu and L. Liu, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **9** (2009) 356-368.

- [34] G. Zhao, H. Sun, H. Lin, S. Zhu, X. Su, Chen, *J. Inorg. Biochem.*, **72**(3-4) (1998) 173-177.
- [35] M. Das, S. E. Livingstone, *Br. J. Cancer* **37** (1978) 466.
- [36] V. Alverdi, L. Giovagnini, C. Marzano, R. Seraglia, F. Bettio, R. S. Sitran Graziani, D. Fregona, *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004) 1117–1128.
- [37] G. Hogarth, E. J. C. Richards, C. R. Rainford-Brent, S. E. Kabir, I. Richards, J. D. E. T. Wilton-Ely, Q. Zhang, *Inorg. Chim. Acta* **362** (2009) 2020–2026.
- [38] D. L. Bodenner, P. C. Dedon, P. C. Keng, R. Borch *Cancer Res.* **46** (1986) 2745–2750.
- [39] A. Garoufis, S. K. Hadjidakou, N. Hadjiliadis, *Coordination Chemistry Reviews* **253** (2009) 1384–1397.
- [40] D. Kovala-Demertzi, T. Varadinova, P. Genova, P. Souza, M. A. Demertzis, *Bioinorg. Chem. Appl.* (2007), ID 56165.
- [41] K. H. Puthraya, T. S. Srivastava, A. J. Amonkar, M. K. Adwankar, M. P. Chitnis, *J. Inorg. Biochem.* **26** (1986) 45.
- [42] G. Enjun, Z. Mingchang, W. Qiong, L. Lei, L. Hongyan, L. Fuchun, H. Yun, W. Lei, S. Qunzhi, Z. Wangzhong, *Chin. J. Chem.* **28**, (2010) 213–220.
- [43] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **171** (1953) 737.
- [44] A. H. - J. Wang, G. J. Quigley, A. Rich, *Nucleic Acids Res.* **6** (1979) 3879.
- [45] F. M. Pohl, T. M. Jovin, *J. Mol. Biol.* **67** (1972) 375.
- [46] S. Neidle, *Nucleic Acid Structure and Recognition*, OUP, Oxford, UK, 2002. D. S. Johnson and D. L. Boger, in *Comprehensive Supramolecular Chemistry* **4** (Eds.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, and F. Vögtle), Pergamon, Oxford (1996).
- [47] S. E. Sherman, D. Gibson, A. H. Wang, S. J. Lippard, *Science* **230** (1985) 412–417.
- [48] D. J. Hodgson, *The Stereochemistry of Metal Complexes of Nucleic Acid Constituents*, in: S. J. Lippard (Ed.), *Progress in Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc. (2007) 211–254.
- [49] M. Crul, R. C. A. van Waardenburg, J. Beijnen, J. H. Schellens, *Cancer Treat. Rev.* **28** (2002) 291–303.
- [50] S. Sharma, S. K. Singh, M. Chandra, D. S. Pandey, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 458-466.

- [51] C. Metcalfe, J. A. Thomas, *Chem. Soc. Rev.* **32** (2003) 215-224.
- [52] K. S. Lovejoy, R.C. Todd, S. Zhang et al., *Proc Natl Acad Sci USA* **105** (2008) 8902–8907.
- [53] L. S. Hollis, A. R. Amundsen, E. W. Stern, *J. Med. Chem.* **32** (1989) 128–36.
- [54] H. S. Feigelson, B. E. Henderson, *Estrogens and breast cancer. Carcinogenesis* **17** (1996) 2279–2284.
- [55] K. R. Barnes, A. Kutikov, S. J. Lippard, *Chem. Bio.* **11** (2004) 557–564.
- [56] S. Mukhopadhyay, C. M. Barnes, A. Haskel, S. M. Short, K. R. Barnes, S. J. Lippard, *Bioconjugate Chem.* **19** (2008) 39–49.
- [57] N. W. S. Kam, T. C. Jessop, P. A. Wender, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 6850–6851.
- [58] M. Bottini, F. Cerignoli, M. I. Dawson, A. Magrini, N. Rosato, T. Mustelin, *Biomacromolecules* **7** (2006) 2259–2263.
- [59] Y. Liu, D–C. Wu, W-D. Zhang et al. *Angew Chem. Int. Ed* **44** (2005) 4782–4785.
- [60] N. W. S. Kam, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 6021–6026.
- [61] R. P. Feazell, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 8438–8439.
- [62] T. W. Hambley, A. R. Battle, G. B. Deacon et al., *J. Inorg. Biochem.* **77** (1999) 3–12.
- [63] G. L. Cohen, J. A. Ledner, W. R. Bauer, H. M. Ushay, C. Caravana, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 2487–2488.
- [64] P. M. Takahara, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996) 12309–12321.
- [65] D. P. Gately, S. B. Howell, *Br. J. Cancer* **67** (1993) 1171–1176.
- [66] D. Wang, and S. J. Lippard, *Nat. Rev. Drug Discov.* **4** (2005) 307–320.
- [67] D. Petrovic, B. Stojimirovic, B. Petrovic, Z. M. Bugarcic, Ž. D. Bugarcic, *Bioorg. Med. Chem.* **15** (2007) 4203–4211.
- [68] K. J. Barnham, M. I. Djuran, P. del Socorro Murdoch, P. J. Sadler, *Journal of the Chemical Society, Chem. Commun.* (1994) 721.
- [69] M. I. Djuran, E. L. M. Lempers, J. Reedijk, *Inorg. Chem.* **30** (1991) 2648–2652.

- [70] N. J. Farrer, and P. J. Sadler, *Aust. J. Chem.* **61** (2008) 669–674.
- [71] A. Fedier, C. Poyet, D. Perucchini, T. Boulikas, D. Fink, *Anti-Cancer Drug.* **17** (2006) 315–323.
- [72] R.E. Aird et al., *Br. J. Cancer* **86** (2002) 1652–1657.
- [73] H. et al. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 3064–3082.
- [74] H. et al. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (2003) 14623–14628.
- [75] E. S. Koumoussi, M. Zampakou, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, C. M. Beavers, S. J. Teat, G. Psomas and T. C. Stamatatos, *Inorg. Chem.* **51** (2012) 7699–7710.
- [76] H. Mansouri-Torshizi, M. Saeidifar, A. Divsalar, A. A. Saboury, and S. Shahraki, *Bull. Korean Chem. Soc.* **31** (2010) 2 435.
- [77] A. Crispini, M. Ghedini, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1997) 75-80.
- [78] M. Ghedini, I. Aiello, A. Crispini, A. Golemme, M. La Deda, D. Pucci, *Coord. Chem. Rev.* **250** (2006) 1373-1390.
- [79] G. Sava, A. Bergamo, P. J. Dyson, *Dalton Trans.* **40** (2011) 9069–9075.
- [80] L. A. Ba, M. Doering, T. Burkholz, C. Jacob, *Metallomics* **1** (2009) 292–311.
- [81] T. Wanga, B. Xianga, Y. Wang, C. Chen, Y. Dong, H. Fang, M. Wang, *Colloids. Surf. B: Biointerfaces* **65** (2008) 113.
- [82] B. Meloun, L. Mora´vek, V. Kotska, *FEBS Lett.* **58** (1975) 134–137.
- [83] P. A. Zunszain, J. Ghuman, T. Komatsu, E. Tsuchida, S. Curry, *BMC Struct. Biol.* **3** (2003) 6.
- [84] K. Yamasaki, T. Maruyama, U. Kragh-Hansen, M. Otagiri, *Biochim. Biophys. Acta* **1295** (1996) 147–157.
- [85] A. R. Timerbaev, C. G. Hartinger, S. S. Aleksenko, B. K. Keppler, *Chem. Rev.* **106** (2006) 2224–2248.
- [86] D. C. Carter, J. X. Ho, *Adv. Protein Chem.* **45** (1994) 153.
- [87] Y. Y. Yue, X. G. Chen, J. Qin, X. J. Yao, *B: Biointerfaces* **69** (2009) 51–57.
- [88] O. K. Abou-Zied, O. I. K. Al-shihi, *Journal of the American Chemical Society* **130** (2008) 10793–10802.

- [89] E. Froehlich, J. S. Mandeville, C. J. Jennings, R. Sedaghat-Herati, H. A. Tajmir-Riahi, *The Journal of Physical Chemistry. B* **113** (2009) 6986–6993.
- [90] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed. Springer, New York, (2006).
- [91] D. H. Hamer, *Annu. Rev. Biochem.* **55** (1986) 913±951.
- [92] P. J. Sadler, *Adv. Inorg. Chem.* **36** (1991) 1±48.
- [93] P. Palumaa, O. Zerbe, M. Vasak, *Biochemistry* **32** (1993) 2874-2879.
- [94] D. M. Templeton, M. G. Cherian, in: J. F. Riordan, B. L. Vallee (Eds.), *Methods in Enzymology*, **205** Academic Press, New York, (1991) 11-25.
- [95] P. Chen, P. Onana, C. F. Shaw III, D. H. Petering, *Biochem. J.* **317** (1996) 389-394.
- [96] K. B. Nielson, C. L. Atkin, D. R. Winge, *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 5342-5348.
- [97] S. L. Kelley, A. Basu, B. A. Teicher, M. P. Hacker, D. H. Hamer, J. S. Lazo, *Science* (Washington DC) **241** (1988) 1813-1815.
- [98] B. L. Zhang, H. Huang, W. X. Tang, *J. Inorg. Biochem.* **58** (1995) 1-8.
- [99] W. Q. Zhong, Q. Zhang, Y. Yan, S. Yue, B. L. Zhang, W. X. Tang, *J. Inorg. Biochem.* **66** (1997) 159-164.
- [100] J. S. Lazo, in: S. B. Howell (ed.), *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy* Plenum Press, New York (1991) 315-322.
- [101] W. Q. Zhong, Q. Zhang, Y. Yan, S. Yue, B.L. Zhang, W. X. Tang, *J. Inorg. Biochem.* **66** (1997) 179-185.
- [102] K. J. Barnham, M. I. Djuran, U. Frey, M. A. Mazid, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1994) 65±68.
- [103] P. Castan, E. Colacio-Rodriguez, A. L. Beauchamp, S. Cros, S. Wimmer, *J. Inorg. Biochem.* **38** (1990) 225-239.
- [104] I. A. Zakharova, J. V. Salyn, L. V. Tatjanenko, Y. S. Mashkovsky, G. Ponticelli, *J. Inorg. Biochem.* **15** (1981) 89-92.
- [105] Q. Zhang, W. Zhong, B. Xing, W. Tang, Y. Chen, *Journal of Inorganic Biochemistry* **72** (1998) 195-200.
- [106] M. A. Jakupec, and B. K. Keppler, *Curr. Top. Med Chem.* **4** (2004) 1575–1583.
- [107] E. et al. Meggers, *Synlett* **8**, (2007) 1177–1189.

- [108] K. S. M. et al. Smalley, *Cancer Res.* **67** (2007) 209–217.
- [109] I. et al. Ott, *Expert Opin. Ther. Pat.* **18** (2008) 327–337.
- [110] S. S. et al. Gunatilleke, *J. Biol. Inorg. Chem.* **13** (2008) 555–561.
- [111] C. R. et al. Oliveira, *Chem. Biol. Interact.* **177** (2009) 181–189.
- [112] R. et al. Mosi, *J. Med. Chem.* **49** (2006) 5262–5272.
- [113] C. M. Barbosa, C. R. Oliveira, F. D. Nascimento, M. C. Smith, D. M. Fausto, M. A. Soufen, E. Sena, R. C. Araújo, I. L. Tersariol, C. Bincoletto, and A. C. Caires, (2006) *Biphosphinic palladacycle complex mediates lysosomal-membrane.*
- [114] J. Cosaert, E. Quoix, *Br. J. Cancer* **87** (2002) 825–833.
- [115] T. C. Johnstone, J. J. Wilson, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.* **52** (2013) 12234–12249.
- [116] G. Momekov, A. Bakalova, M. Karaivanova, *Curr. Med. Chem.* **12** (2005) 2177–2191.
- [117] H. Yu, J. Su, Y. Xu, J. Kang, H. Li, L. Zhang, H. Yi, X. Xiang, F. Liu, Sun, L. *Eur. J. Cancer* **47** (2011) 1585–1594.
- [118] C. Gallerne, A. Prola, C. Lemaire, *Biochim. Biophys. Acta* **1833** (2013) 1356–1366.
- [119] Y. Wang, J. Hu, Y. Cai, S. Xu, B. Weng, K. Peng, X. Wei, T. Wei, H. Zhou, X. Li, G. Liang, *J. Med. Chem.* **56** (2013) 9601-9611.
- [120] N. William, A. Winer, A. Glaid, G. Schwert, (1958), "Lactic Dehydrogenase V. inhibition by Oxamate and Oxalate". *Journal of Biological Chemistry.*
- [121] A. Le, C. Cooper, A. Gouw, R. Dinavahi, A. Maitra, L. Deck, R. Royer, D. V. Jagt, G. Semenza, C. Dang, 14 December (2009) *Proceedings of the National Academy of Sciences.* doi: 10.1073/pnas.0914433107
- [122] H. Ojima and K. Nonoyama, *Coord. Chem. Rev.* **92** (1988) 85.
- [123] R. Ruiz, J. Faus, F. Lloret, M. Julve, Y. Journaux, *Coord. Chem. Rev.* **193–195** (1999) 1069–1117.
- [124] Bao-Lin Liu, J. Dang, Shuang-Quan Zang, Yan-Xia Wang, Ruo-Jie Tao, *Inorganic Chemistry Communications* **14** (2011) 31–34.
- [125] J. L. Real, R. Ruiz, J. Faus, F. Lloret, M. Julve, Y. Journaux, M. Philoche-levisalles, C. J. Bois, *Chem. Soc., Dalton Trans.* (1994) 3769. J. L. Sanz, B. Cervera, R. Ruiz, C. Bois, J. Faus, F. Lloret, M. Julve, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1996) 1359. J. M. Bominguez- Vera, N. Gulvez, E. Colacio, R. Cuesta, J.-P. Costes, J.-P. Laurent, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*

- (1996) 861. A. Bencini, C. Benelli, A. C. Fabretti, G. Frachini, D. Gatteschi, *Inorg. Chem.* **25** (1986) 1063.
- [126] Z. D. Matović, E. Mrkalić, G. Bogdanović, V. Kojić, A. Meetsma and R. Jelić, *J. Inorg. Biochem.* **121** (2013) 134–144 and references therein.
- [127] E. M. Mrkalić, R. Jelić, O. R. Klisurić, Z. D. Matović, *Dalton Transactions*, 2014.
- [128] E. M. Mrkalić, R. Jelić, G. Pelos^c, V. Kojić, D. Jakimov, P. Li, S. Popović, D. Baskić, Z. D. Matović, Chemistry and Biology of palladium(II) complexes with chelate N2O2 framework. Structural, solution and computational study, submitted to *Inorganic Chemistry*
- [129] S. P. Gavrish, Y. D. Lampeka, P. Lightfoot and H. Pritzkow, *Dalton Trans.* (2007) 4708–4714.
- [130] A. Chanda, D. L. Popescu, F. Tiago de Oliveira, E. L. Bominaar, A. D. Ryabov, E. Muñck, T. J. Collins, *Journal of Inorganic Biochemistry* **100** (2006) 606–619.
- [131] J. C. Noveron, M. M. Olmstead and P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **37** (1998) 1138–1139.
- [132] C. Panda, M. Ghosh, T. Panda, R. Banerjee and S. S. Gupta, *Chem. Commun.* **47** (2011) 8016–8018.
- [133] Yan-Tuan Li, W. Sun, Yong-Jun Zheng, Zhi-Yong Wu, Cui-Wei Yan, *J. Inorg. Organomet. Polym.* **21** (2011) 182–188.
- [134] Fun, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2004) 872–878.
- [135] M. D. Santana, G. Garcia, C. Vicente-Hernandez, L. Garcia, J. Perez, T. Rojo, L. Lezama, *Journal of Organometallic Chemistry* **693** (2008) 2009–2016.
- [136] J. Tercero, C. Diaz, J. Ribas, E. Ruiz, J. Mahí'a, and M. Maestro, *Inorganic Chemistry*, **41(25)** (2002).
- [137] S. P. Gavrish, Y. D. Lampeka, H. Pritzkow and P. Lightfoot, *Dalton Trans.* **39** (2010) 7706–7713.
- [138] U. Berkert and N. L. Allinger, American Chemical Society (1982) 339.
- [139] J. L. Hehre et al., *Journal of Computational Chemistry*, John Wiley, New York, (1986) 548.
- [140] S. Marković, Z. Marković, *Molekulska modeliranje*, Centar za naučno-istraživački rad Srpske akademije nauka i umetnosti i Univerziteta u Kragujevcu, Kragujevac (2012).
- [141] M. Born, R. Oppenheimer, *Ann. Phys.* **84** (1927) 457.

- [142] D.R. Hartree, *Math. Proc. Cambridge*. **24** (1927) 89.
- [143] C. C. J. Roothaan, *Rev. Mod. Phys.* **23** (1951) 69.
- [144] G. G. Hall, P. Roy. *Soc. A, Math. Phys.* **205** (1951) 541.
- [145] F. Jensen, *Introduction to computational chemistry*, John Wiley & Sons (1999) Chichester.
- [146] S. N. Bachrach, *Computational organic chemistry*, John Wiley & Sons (2007), Hoboken, New Jersey.
- [147] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev. B* **136** (1964) 864.
- [148] P. Carloni, U. Rothlisberger, M. Parrinello, *Acc. Chem. Res* **35** (2002) 455.
- [149] R. J. Deeth, C. J. Diedrich, *Biol. Inorg. Chem.* **15** (2010) 117.
- [150] M. P. Allen, D. J. Tildesley, *Computer simulation of liquids*; Oxford University Press: Oxford, 1990.
- [151] *Computational Biochemistry and Biophysics*; O. M. Becker, A. D. MacKerell Jr., B. Roux, M. Watanabe, Eds. Marcel Dekker: New York, 2001.
- [152] A. R. Leach, *Molecular modelling: principles and applications*; Pearson Education: Harlow 2001.
- [153] G. Bogdanović, J. Raletić-Savić, N. Marković, *Arch. Oncol.* (1984) **2** 181-184.
- [154] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta*, **43** (1996) 1739–1753.
- [155] L. Alderighi, P. Gans, A. Lenco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca, *Coord. Chem. Rev.* **184** (1999) 311–318.
- [156] A. Wolfe, G.H. Shimer Jr., T. Meehan, *Biochemistry* **26** (1987) 6392–6396.
- [157] Mosmann, T. *Journal of Immunological Methods* **65** (1983) 55-65.
- [158] *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (1995) A. Doyle, J. B. Griffiths, D. G. Newell, Ed. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, England.
- [159] D. Baskić, S. Popović, P. Ristić, N. N. Arsenijević, *Cell Biol. Int.* **30(11)** (2006) 924-932.
- [160] A. J. Krishan, *Cell Biol.* **66(1)** (1975) 188-93.

- [161] ADF2009.01., ADF2007.01. ADF2004.01.SCM, Theoretical Chemistry, Vrije Universiteit Amsterdam, The Netherlands, 2012. (<http://www.scm.com>. accessed on may 2012).
- [162] C. F. Guerra, J. G. Snijders, G. te Velde, E. J. Baerends, *Theor. Chem. Acc.* **99** (1998) 391–403.
- [163] G. te Velde, F. M. Bickelhaupt, S. J. A. van Gisbergen, C. F. Guerra, E. J. Baerends, J. G. Snijders, T. Ziegler, *J. Comput. Chem.* **22** (2001) 931–967.
- [164] M. Swart, A. W. Ehlers, K. Lammertsma, *Mol. Phys.* **102** (2004) 2467–2470.
- [165] E. van Lenthe, A. E. Ehlers, E. J. Baerends, *J. Chem. Phys.* **110** (1999) 8943–8952.
- [166] E. van Lenthe, E. J. Baerends, J. G. Snijders, *J. Chem. Phys.* **99** (1993) 4597–4611.
- [167] E. van Lenthe, E. J. Baerends, J. G. Snijders, *J. Chem. Phys.* **101** (1994) 9783–9792.
- [168] E. van Lenthe, J. G. Snijders, E. J. Baerends, *J. Chem. Phys.* **105** (1996) 6505–6517.
- [169] E. van Lenthe, R. van Leeuwen, E. J. Baerends, J. G. Snijders, *Int. J. Quantum Chem.* **57** (1996) 281–293.
- [170] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian 09, Revision A.1, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [171] A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **38** (1998) 3098–3100.
- [172] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **38** (1988) 785–789; A. D. Becke, *The Journal of chemical physics* **98** (1993) 5648–5652.
- [173] K. Pang, S. M. Quan, G. Parkin, *Chem. Commun.* (2006) 5015–5016.
- [174] G. Yang, C. Jin, J. Hong, Z. Guo, L. Zhu, *Spectrochim. Acta A* **60** (2004) 493–509.
- [175] Y. Zhang, L. Zhang, H. Tao, X. Sun, L. Zhu, *Spectrochim. Acta A* **59** (2003) 3187–3195.

- [176] P. M. Takahara, A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *Nature* **377** (1995) 649–652.
- [177] D. Wang, G. Zhu, X. Huang, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** (2010) 9584–9589.
- [178] A. T. Macias, D. S. Williamson, N. Allen, J. Borgognoni, A. Clay, Z. Daniels, P. Dokurno, M. J. Drysdale, G. L. Francis, C. J. Graham, R. Howes, N. Matassova, J. B. Murray, R. Parsons, T. Shaw, A. E. Surgenor, L. Terry, Y. Wang, M. Wood and A. J. Massey, *J. Med. Chem.* **54** (2011) 4034–4041.
- [179] D. S. Williamson, J. Borgognoni, A. Clay, Z. Daniels, P. Dokurno, M. J. Drysdale, N. Foloppe, G. L. Francis, C. J. Graham, R. Howes, A. T. Macias, J. B. Murray, R. Parsons, T. Shaw, A. E. Surgenor, L. Terry, Y. Wang, M. Wood and A. J. Massey, *J. Med. Chem.* **52** (2009) 1510–1513; A. J. Massey, D. S. Williamson, H. Browne, J. B. Murray, P. Dokurno, T. Shaw, A. T. Macias, Z. Daniels, S. Geoffroy, M. Dopson, P. Lavan, N. Matassova, G. L. Francis, C. J. Graham, R. Parsons, Y. Wang, A. Padfield, M. Comer, M. J. Drysdale and M. Wood, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **66** (2010) 535–545.
- [180] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **30** (2009) 2785–2791.
- [181] S. Forli, Raccoon AutoDock VS: an automated tool for preparing AutoDock virtual screenings Available from <http://autodock.scripps.edu/resources/raccoon>.
- [182] Q. Li, T. Cheng, Y. Wang, S.H. Bryant, *Drug Discov Today*. **15** (23-24) (2010) 1052–1057.
- [183] D. Case, J. Berryman, R. Betz, D. Cerutti, T. Cheatham III, T. Darden, R. Duke, T. Giese, H. Gohlke, A. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T. Lee, S. LeGrand, P. Li, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. Merz, G. Monard, P. Needham, H. Nguyen, H. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D. Roe, A. Roitberg, R. Salomon-Ferrer, C. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R. Walker, J. Wang, R. Wolf, X. Wu, D. York, P. Kollman, AMBER 2015, University of California, San Francisco: 2015.
- [184] A. W. Götz, M. J. Williamson, D. Xu, D. Poole, S. Le Grand, R. C. Walker, *Journal of Chemical Theory and Computation*, **8** (2012) 1542.
- [185] R. Salomon-Ferrer, A. W. Götz, D. Poole, S. Le Grand, R. C. Walker, *Journal of Chemical Theory and Computation* **9** (2013) 3878-3888.
- [186] D. Case, V. Babin, J. Berryman, R. Betz, Q. Cai, D. Cerutti, T. Cheatham III, T. Darden, R. Duke, H. Gohlke, A. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. Merz, F. Paesani, D. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R. Walker, J. Wang, R. Wolf, X. Wu, P. Kollman, *Amber 14*, University of California, San Francisco: 2014.

- [187] 3IWX: A. K. Boal, A. C. Rosenzweig, *J. Am. Chem. Soc.* **131** (2009) 14196-14197.
- [188] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. J. A. Montgomery, T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, Gaussian 03, revision E. 01. *Gaussian Inc., Wallingford, CT* 2004, 26.
- [189] A. D. Becke, *The Journal of Chemical Physics* **98** (1993) 1372-1377.
- [190] Jr, T. H. Dunning, P. J. Hay, H. F. Schaefer III, In *Methods of electronic structure theory*; Plenum Press New York: **3** (1976) 1-28.
- [191] D. Andrae, U. Haeussermann, M. Dolg, H. Stoll, H. Preuss, *Theoretica chimica acta* **77** (1990) 123-141.
- [192] J. M. Seminario, *International Journal of Quantum Chemistry* **60** (1996) 1271-1277.
- [193] B. H. Besler, K. M. Merz, P. A. Kollman, *Journal of Computational Chemistry* **11** (1990) 431-439.
- [194] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *The Journal of Chemical Physics* **79** (1983) 926-935.
- [195] P. Li, B. P. Roberts, D. K. Chakravorty, K. M. Merz, *Journal of Chemical Theory and Computation*, **9** (2013) 2733-2748.
- [196] J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman, D. A. Case, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **25** (2006) 247-260.
- [197] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, *Journal of computational chemistry*, **25** (2004) 1157-1174.
- [198] *Molecular Operating Environment (MOE)*, 2013.08; Chemical Computing Group Inc.: 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, 2015.
- [199] P. Li, L. F. Song, K. M. Merz, *Journal of Chemical Theory and Computation* **11** (2015) 1645-1657.

- [200] P. C. Su, C. C. Tsai, S. Mehboob, K. E. Hevener, M. E. Johnson, *Journal of computational chemistry* 2015.
- [201] T. Darden, D. York, L. Pedersen, *The Journal of Chemical Physics* **98** (1993) 10089-10092.
- [202] T. E. Cheatham III, J. L. Miller, T. Fox, T. A. Darden, P. A. Kollman, *Journal of the American Chemical Society* **117** (1995) 4193-4194.
- [203] H. G. Petersen, *The Journal of chemical physics* **103** (1995) 3668.
- [204] J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. Berendsen, *Journal of Computational Physics* **23** (1977) 327-341.
- [205] S. Miyamoto, P. A. Kollman, *Journal of computational chemistry* **13** (1992) 952-962.
- [206] H. J. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. Haak, *The Journal of chemical physics* **81** (1984) 3684-3690.
- [207] A. Onufriev, D. Bashford, D. A. J. Case, *Phys. Chem. B.* **104(15)** (2000) 3712–3720.
- [208] G. D. Hawkins, C. J. Cramer, D. G. J. Truhlar, *Phys. Chem.* **100** (1996) 19824–19839.
- [209] A. W. Götz, M. A. Clark, R. C. Walker, *J. Comput. Chem.* **35(2)** (2014) 95–108.
- [210] R. Salomon-Ferrer, D. A. Case, R. C. Walker, *WIREs Comput. Mol. Sci.* **3** (2013) 198-210.
- [211] G. Sheldrick, *SADABS: Siemens Area Detector Absorption Correction Software*, University of Goettingen, Germany, 1996.
- [212] G. Sheldrick, *SHELXL97. Program for Structure Refinement*, University of Goettingen, Germany, 1997.
- [213] L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **A32** (1999) 837.
- [214] *International Tables for X-Ray Crystallography*, Kynoch Press, 4, Birmingham, UK, 1974, 4.
- [215] C. K. Johnson, M. N. Burnett, *ORTEP III. Report ORNL-6895*, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA, 1996.
- [216] A. Altomare, M. C. Burla, M. Camalli, G. L. Casciarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. G. G. Moliterni, G. Polidori, R. Spagna, *J. Appl. Crystallogr.* **32** (1999) 115–119.
- [217] In: A. J. C. Wilson (Ed.), *International Tables for Crystallography*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands, 1992.

- [218] A. Altomare, M. C. Burla, M. Cavalli, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Gagliardi, A. G. Moliterni, G. Polidori and R. Spagna, *Sir97: A New Program For Solving and Refining Crystal Structures*, Istituto di Ricerca per lo Sviluppo di Metodologie Cristallografiche CNR, Bari, 1997.
- [219] SHELXS-97 and SHELXL-97: G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **64** (2008) 112–122.
- [220] A. L. Spek, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **65** (2009) 148–155.
- [221] F. Arnesano, L. Banci, I. Bertini, I. C. Felli, M. Losacco and G. Natile, *Journal of the American Chemical Society* **133(45)** (2011) 18361-18369.
- [222] M. G. Ćurčić, M. S. Stanković, E. M. Mrkalić, Z. D. Matović, D. D. Banković, D. M. Cvetković, D. S. Đačić, S. D. Marković, *Int. J. Mol. Sci.* **13** (2012) 2521-2534.
- [223] R.C. Todd, S.J. Lippard, *J. Inorg. Biochem.* **104** (2010) 902–908.
- [224] B. R. Miller III, T. D. McGee Jr, J. M. Swails, N. Homeyer, H. Gohlke, A. E. Roitberg, *Journal of Chemical Theory and Computation* **8** (2012) 3314-3321.
- [225] G. D. Hawkins, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *Chemical Physics Letters* **246** (1995) 122-129.
- [226] V. Tsui, D. A. Case, *Biopolymers* **56** (2000) 275-291.
- [227] Z. D. Matović, B. Ristić, M. Joksović, S. R. Trifunović, *Transition Met. Chem.* **25** (2000) 720–726; Z. D. Matović, V. D. Miletić, G. Samardžić, G. Pelosi, S. Ianelli, S. Trifunović, *Inorg. Chim. Acta* **358** (2005) 3135–3144.
- [228] S. B. Halligudi, K. N. Bhatt, N. H. Khan, R. I. Kurashy, K. Venkatsubramanian, *Polyhedron* **15** (1996) 2093.
- [229] H. Sigel, *Metal Ions in Biological Systems: Mixed Ligand Complexes*, Marcel Dekker, New York, **2** (1973) 3.
- [230] N. Khanna, H. N. Jayaram, N. Singh, *Life Sci.* **75** (2004) 179-190.
- [231] S. Kumar, M. Vogler, D. Dinsdale, M. J. S. Dyer, G. M. Cohen, *Cell Death and Differentiation* **14** (2007) 32-43. E. Solary, N. Droin, A. Bettaieb, L. Corcos, M.-T. Dimanche-Boitrel, C. Garrido, *Leukemia* **14** (2000) 1833-1849. C. A. Guimaraes, R. Linden, *Eur. J. Biochem.* **271** (2004) 1638-1650. L. Galluzzi, O. Kepp, G. Kroemer, *Oncogene* **31** (2012) 2805-2808.
- [232] R. Kim, M. Emi, K. Tanabe, Uchida, K. Y. Arihiro, *Eur. J. Surg. Oncol.* **32** (2006) 269-277. G. Kromer, S. J. Martin, *Nat. Med.* **11** (2005) 725-730.

- [233] A. Hasenjager, B. Gillissen, A. Muller, G. Normand, P. G. Hemmati, M. Schuler, B. Dorken, P. T. Daniel, *Oncogene* **23** (2004) 4523-4535.
- [234] X. Huang, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, *Cell Cycle* **2(6)** (2003) 614-619.
- [235] E. Rosati, R. Sabatini, G. Rampino, G. De Falco, M. Di Ianni, F. Falzetti, K. Fettucciari, B. Bartoli, I. Screpanti, P. Marconi *Blood* **116** (2010) 2713-2772.
- [236] S. Lutsenko, A. Gupta, J. L. Burkhead, V. Zuzel, *Arch. Biochem. Biophys.* **476** (2008) 22–32.
- [237] A. K. Boal, A. C. Rosenzweig, *Chem. Rev.* **109** (2009) 4760–4779.

БИОГРАФИЈА



Емина М. Мркалић рођена је 13. 12. 1981. године у Крагујевцу. Основну школу и Прву техничку школу завршила је у Крагујевцу. На Природно-математички факултет у Крагујевцу, група Хемија, смер истраживање и развој, уписала се школске 2000/01. године где је и дипломирала школске 2006/07. године са просечном оценом 9,07. На последипломске студије Природно-математичког факултета у Крагујевцу (смер Неорганска хемија) уписала се школске 2007/08. године.

Бави се истраживачким радом у области испитивања интеракција комплекса паладијума(II) са биолошки значајним лигандима. У звање истраживача-сарадника, у Институту за хемију на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, изабрана је 2012. године и до сада је успешно изводила експерименталну наставу на више предмета на основним студијама биологије и хемије. Била је стипендиста Министарства за науку и технолошки развој (број Пројекта 142013) од 2008 до 2011. год., а од 2011. године је ангажована на пројекту (број Пројекта III41010) које финансира Министарство просвете и науке Републике Србије.

У току докторских студија, 2012. године је боравила три месеца на Аристотел универзитету у Солуну (Грчка).

СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

1. Списак научних радова

1.1. Научни радови публиковани у врхунским часописима међународног значаја (M21):

- 1.1.1. Emina M. Mrkalić, Ratomir M. Jelić, Olivera R. Klisurić and Zoran D. Matović, "Synthesis of novel palladium(II) complexes with oxalic acid diamide derivatives and their interaction with nucleosides and proteins. Structural, solution, and computational study," *Dalton Transactions*, **43**, 15126-15137 (2014).

ISSN:1477-9226, IF₂₀₁₄ = 4.197, DOI: 10.1039/C3DT53384K

- 1.1.2. Zoran D. Matović, Emina Mrkalić, Gordana Bogdanović, Vesna Kojić, Auke Meetsma and Ratomir Jelić, "Antitumor effects of a tetradentate amido-carboxylate ligands and corresponding square-planar palladium(II) complexes toward some cancer cells. Crystal structure, DFT modeling and ligand to DNA probe Docking simulation," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **121**, 134-144 (2013).

ISSN: 0162-0134, M21, IF₂₀₁₃ = 3.274, DOI:10.1016/J.JINORGBIO.2013.01.006

- 1.1.3. Emina Mrkalić, Ariadni Zianna, George Psomas, Maria Gdaniec, Agnieszka Czapik, Evdoxia Coutouli-Argyropoulou, Maria Lalia-Kantouri, "Synthesis, characterization, thermal and DNA-binding properties of new zinc complexes with 2-hydroxyphenones," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **134**, 66–75 (2014).

ISSN: 0162-0134, IF₂₀₁₃ = 3.452, DOI:10.1016/J.JINORGBIO.2014.01.019

1.2. Научни радови објављени у међународним часописима (M23):

- 1.2.1. Milena G. Ćurčić, Milan S. Stanković, Emina M. Mrkalić, Zoran D. Matović, Dragić D. Banković, Danijela M. Cvetković, Dragana S. Đačić, Snežana D. Marković, "Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Methanolic Extracts from *Ligustrum vulgare* L. as an Individual Treatment and in Combination with Palladium Complex, *Int. J. Mol. Sci.*," **13** (2) 2521-2534 (2012).

ISSN: 1422-0067, IF₂₀₁₂ = 2.464, DOI:10.3390/IJMS13022521

2. Списак научних саопштења на међународним и националним конференцијама

2.1. Саопштења на међународним научним конференцијама штампана у изводу (M34):

2.1.1. Z.D. Matović, V.D. Miletić, E.M. Mrkalić, M.S. Ćendić, G. Bogdanović, V. Kojić, "Molecular Modeling, Structure and Antitumor Activity of Pd(II) complexes with carboxylate derivatives of oxalic and malonic acid diamides",
10th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2010, Thessaloniki, Greece

2.1.2. Žižić J, Ćurčić M, Obradović A, Mrkalić E, Matović Z, Ćendić M, Djurdjević P, Živić D, Marković S., "Evaluation of antiproliferative activity of new palladium complexes and mechanism of cell death on HCT-116 and MDA-MB-231 cell lines"
Scientific Conference with International Participation "Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research", Kragujevac 2011, ISBN 978-86-7760-064-8

2.1.3. Marina Ćendić, Maja B. Đukić, Emina M. Mrkalić, Marija S. Jeremić, Zoran D. Matović "Upravljanje komunalnim i industrijskim otpadom na teritoriji grada Kragujevca"
THE 6TH SYMPOSIUM CHEMISTRY AND ENVIRONMENTAL PROTECTION – ENVIROCHEM 2013 Vršac, Serbia

2.2. Саопштења на националним научним конференцијама штампана у изводу (M64):

2.2.1. Marina Ćendić, Emina Mrkalić, dr Zoran Matović, mr Vesna Matović, dr Vesna Miletić, "Globalno zagrevanje i lokalni ekološki akcioni plan grada Kragujevca",
5. Nacionalna konferencija o kvalitetu života, 2010, Kragujevac

2.2.2. Matović, V. Miletić, M. Ćendić, E. Mrkalić, P. van Koningsbruggen, A. Meetsma, "Structure and DFT analyse of complex [Ni(H₂O)₆][Ni(ed3a)(H₂O)]₂·2H₂O",
XVII Konferencija srpskog kristalografskog društva, 2010, Ivanjica

2.1.3. Emina Mrkalić, Giorgio Pelosi, Zoran Matović,
"SYNTHESIS AND CRYSTAL STRUCTURE OF POTASSIUM-(MALAMIDON,N'-DIPROPIONATO)PALLADIUM(II)-HYDRATE, C₉H₁₂K₂N₂O₇Pd",
21st CONFERENCE OF THE SERBIAN CRYSTALLOGRAPHIC SOCIETY, 2014.

Uzice, Serbia.

- 2.2.4.** Marija Jeremić, Zoran Matović, Emina Mrkalić, Peter Comba, Hubert Wadepohl, "SYNTHESIS AND CRYSTAL STRUCTURE OF *cis*-equatorial-AQUAETHYLENEDIAMINE-*N,N,N'*-TRIACETATORHODIUM(III) MONOHYDRATE, [Rh(ed3a)H₂O] x H₂O", XXII Конференција СКД – 22nd *Conference of the SCS*, 2015. Smederevo, Serbia

3. Радови у процесу рецензије:

- 3.1.** Emina M. Mrkalić, Ratomir Jelić, Giorgio Pelosi, Vesna Kojić, Dimitar Jakimov, Pengfei Li, Suzana Popović, Dejan Baskić, Zoran D. Matović, "*Chemistry and Biology of palladium(II) complexes with chelate N2O2 framework. Structural, solution and computational study*"– submitted to *Inorganic Chemistry*

У оквиру истраживачког рада везаног за докторску дисертацију, публикована су 3 рада у међународним часописима са SCI листе (радови под редним бројевима 1.1.1., 1.1.2. и 1.2.1. (напомена: (а) у публикацији означеној редним бројем 1.2.1. резултати дисертације се односе на синтезу новог комплекса, [Pd(арох)] чија је биолошка активност испитивана. (б) рад 3.1 је такође проистекао из ове дисертације и у фази је рецензије у часопису са SCI листе



Antitumor effects of a tetradentate amido-carboxylate ligands and corresponding square-planar palladium(II) complexes toward some cancer cells. Crystal structure, DFT modeling and ligand to DNA probe Docking simulation

Zoran D. Matović^{a,*}, Emina Mrkalić^a, Gordana Bogdanović^b, Vesna Kojić^b, Auke Meetsma^c, Ratomir Jelić^d

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, SRB-34000 Kragujevac, Serbia

^b Institute of Oncology Sremska Kamenica, Novi Sad, Institutski put 4, Sremska Kamenica, SRB-21204, Serbia

^c Stratingh Institute for Chemistry and Chemical Engineering, University of Groningen, Nijenborgh 4, NL-9747 AG Groningen, The Netherlands

^d Faculty of Medicinal Science, University of Kragujevac, S. Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 October 2012

Received in revised form 4 January 2013

Accepted 8 January 2013

Available online 16 January 2013

Keywords:

Palladium(II) complexes

Antitumor activity

Crystal structure

DFT modeling

Docking

ABSTRACT

Novel square-planar palladium(II) complexes with O–N–N–O-type ligands H₄mda (H₄mda = malamido-*N,N'*-diacetic acid) and H₄obp (H₄obp = oxamido-*N,N'*-di-3-propionic acid) were prepared and characterized. The ligands coordinate to the palladium(II) ion via two pairs of deprotonated ligating atoms with square chelation. A four coordinate, square-planar geometry was verified crystallographically for the K₂ [Pd(mda)]·H₂O complex. The binary and ternary systems of Pd(II) ion with H₄mda or H₄obp (L) as primary ligands and guanosine (A) as secondary ligand were studied in aqueous solutions in 0.1 M NaCl ionic medium at 25 °C by potentiometric titrations. In addition, calculations based on density functional methods (DFT) were carried out. A natural bonding orbital analysis indicated that the Pd–N bonds are three-centric in nature and mainly governed by charge transfer via a strong delocalization of the oxygen lone pair with “p” character into the bonding Pd–N orbital. Mononuclear palladium(II) complexes together with amido acid *N,O*-containing ligands were tested against several tumor cells and reveal significant antitumor activity and lower resistance of tumor cells *in vitro* than cisplatin. In this paper, interactions of palladium complexes with DNA are discussed in order to provide guidance and determine structure and antitumor activity relationships for continuing studies of these systems. Docking simulation on DNA dodecamer or 29-mer (Lippard solved crystal structures), suggests several favorable interactions with the hydrogen pocket/binding site for the incoming ligands. These results support amidoacids/Pd complexes as novel antitumor drugs and suggest that their potent cell life inhibition may contribute to its anti-cancer efficacy.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Oxamide type compounds comprise a very interesting family in coordination chemistry. Furthermore, in the presence of transition-metal ions and provided that the substituted oxamide can form five- or six-membered chelate rings, the amide deprotonates and co-ordinates simultaneously at low pH. *N,N'*-bis(substituted)oxamidates are well known as versatile bridging ligands, which can afford symmetric and asymmetric oxamidate bridges by their *cis-trans* conformational change [1,2].

The complexes of copper(II) with oxamido-derived tetradentate ligands, composed of oxalic and amino acid (β -alaninate, glycine or anthranilic acid) [3–11] have been studied by many research groups. The d-electron configuration and size of the central metal ion [12–14] could have significant influence on the geometry in O–N–N–O-type and related complexes. The complexes, especially of copper(II) and

nickel(II), with malonamide-derived ligands (Scheme 1), readily accessible *via* aminolysis reactions of malonic esters with polyamines, have been studied extensively [11–17]. At the same time, a rather limited number of complexes of the late transition metals, e.g. palladium(II) [18,19], platinum(II) [20,21], rhenium(V) [22] and technetium(V) [23], with this kind of ligand have been thoroughly characterized up to date [24].

Extensible research efforts have been made to develop novel metal-based antitumor complexes with the aim of improving effectiveness and reducing the severe side effects of the current clinical platinum chemotherapeutic agents such as cisplatin and its analogues [25,26]. Special attention has been paid to platinum complexes with different structural features from those of already used drugs [27–31] and complexes of the other platinum-group metals like ruthenium, rhodium, palladium and iridium [32–35].

The coordination chemistry of palladium(II) is very similar to that of platinum(II), but the higher lability in ligand exchange at Pd centre (10⁵ times greater than Pt) may cause rapid hydrolytic processes leading to the dissociation of the complex and formation of very reactive

* Corresponding author. Tel.: +381 34336223; fax: +381 34335040.
E-mail address: zmatovic@kg.ac.rs (Z.D. Matović).



Cite this: *Dalton Trans.*, 2014, **43**, 15126

Synthesis of novel palladium(II) complexes with oxalic acid diamide derivatives and their interaction with nucleosides and proteins. Structural, solution, and computational study†

Emina M. Mrkalić,^a Ratomir M. Jelić,^b Olivera R. Klisurić^c and Zoran D. Matović*^a

Novel palladium complexes, $\text{KH}[\text{Pd}(\text{obap})]_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**3**) with oxamido-*N*-aminopropyl-*N'*-benzoic acid and $[\text{Pd}(\text{apox})]$ (**4**) with *N,N'*-bis(3-aminopropyl)ethanediamide, were synthesized. Exhaustive synthetic, solution and structural studies of the two Pd(II) complexes are reported. The binary and ternary systems of the Pd(II) ion with H_2apox or H_3obap as primary ligands and nucleosides (Ado or Cyt) as secondary ligands, are investigated in order to better understand their equilibrium chemistry. The relative stabilities of the ternary complexes are determined and compared with those of the corresponding binary complexes in terms of their $\Delta\log K$ values. The species distribution of all complexes in solution is evaluated. Fluorescence spectroscopy data shows that the fluorescence quenching of HSA is a result of the formation of the $[\text{PdL}]\text{-HSA}$ complex. The structure of complex **3** is confirmed using X-ray crystallography. The results are compared to those obtained for palladium complexes of similar structures. Density functional theory (DFT) has been applied for modelling and energetic analysis purposes. The nature of the Pd–N(O) bond interaction is analyzed using NBO. We report here docking simulation experiments in order to predict the most probable mechanism of pro-drug-action. The next free binding energy order of the best scores from the $[\text{PdL}]\text{-DNA}$ docking simulations, *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+} > [\text{Pd}(\text{obap})] > [\text{Pd}(\text{mda})]$, has been observed in the case of DNA alteration. For the ER and cytosolic stress mechanisms the results of the docking simulations to the chaperons Grp78 and Hsc70 are promising for possible applications as potent protein inhibitors (K_i of $[\text{Pd}(\text{mda})]/\text{GRP78}$ being $\sim 66 \mu\text{M}$ and K_i for $[\text{Pd}(\text{obap})]/\text{HSC70}$ being $14.39 \mu\text{M}$).

Received 1st December 2013,
Accepted 29th July 2014

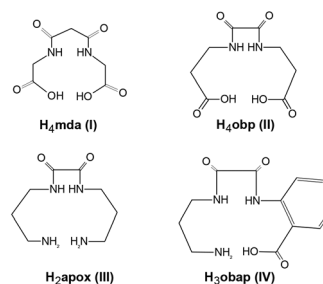
DOI: 10.1039/c3dt53384k

www.rsc.org/dalton

1. Introduction

The strong basicity of the coordinated amide nitrogen atoms of oxamide-type compounds exerts a stabilizing influence on the high oxidation state of late first-row transition metal ions.¹ At the same time, the insolubility of oxamido-derived ligands in common solvents and their hydrolysis limit their coordination ability as ligands. These difficulties can be almost overcome by introducing additional *N*-substituted coordinating groups, which are more reluctant to undergo hydrolysis and exhibit higher solubility. Furthermore, in the presence of tran-

sition-metal ions, the substituted oxamides form five- or six-membered chelate rings (Scheme 1), as the amide deprotonates and coordinates simultaneously at low pH. To our knowledge, there are not many complexes of the late transition metals, *e.g.*, palladium(II)^{2–4} and platinum(II)⁵, with this type of ligand that have been thoroughly characterized. During the last decade, we published works dealing with the behaviour of copper(II) toward similar chelate ligands.⁶



Scheme 1 Malonamide and oxamide derived ligands.

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: zmatovic@kg.ac.rs; Fax: +381 34335040; Tel: +381 34336223

^bFaculty of Medicinal Science, University of Kragujevac, S. Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^cDepartment of Physics, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 4, 21000 Novi Sad, Serbia

† Electronic supplementary information (ESI) available: Fig. S1–S12; Tables S13–S14. CCDC 905386. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c3dt53384k

Article

Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Methanolic Extracts from *Ligustrum vulgare* L. as an Individual Treatment and in Combination with Palladium Complex

Milena G. Ćurčić ^{1*}, Milan S. Stanković ¹, Emina M. Mrkalić ², Zoran D. Matović ²,
Dragić D. Banković ³, Danijela M. Cvetković ¹, Dragana S. Đačić ¹ and Snežana D. Marković ¹

- ¹ Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia; E-Mails: mstankovic@kg.ac.rs (M.S.S.); c_danijela@yahoo.com (D.M.C.); draganadjacic@kg.ac.rs (D.S.D.); smarkovic@kg.ac.rs (S.D.M.)
- ² Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia; E-Mails: emrkalic@kg.ac.rs (E.M.M.); zmatovic@kg.ac.rs (Z.D.M.)
- ³ Department of Mathematics, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia; E-Mails: dragic@kg.ac.rs (D.D.B.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: milenacurcic@kg.ac.rs;
Tel.: +381-34-336-223; Fax: +381-34-335-040.

Received: 27 December 2011; in revised form: 23 January 2012 / Accepted: 15 February 2012 /
Published: 22 February 2012

Abstract: The aim of this study is to examine the growth inhibitory effects of methanolic leaf and fruit extracts of *L. vulgare* on HCT-116 cells over different time periods and their synergistic effect with a Pd(apox) complex. The antiproliferative activity of plant extracts alone or in combination with the Pd(apox) complex was determined using MTT cell viability assay, where the IC₅₀ value was used as a parameter of cytotoxicity. Results show that antiproliferative effects of *L. vulgare* extracts increase with extension of exposure time, with decreasing IC₅₀ values, except for 72 h where the IC₅₀ values for methanolic leaf extract were lower than for the fruit extract. The Pd(apox) complex alone had a weak antiproliferative effect, but combination with *L. vulgare* extracts caused stronger effects with lower IC₅₀ values than with *L. vulgare* extracts alone. The type of cell death was explored by fluorescence microscopy using the acridin orange/ethidium bromide method. Treatments with plant extracts caused typical apoptotic morphological changes in HCT-116 cells and co-treatments with Pd(apox) complex caused higher levels of apoptotic cells than treatment with plant extracts alone. The results indicate that *L. vulgare* is a

Chemistry and Biology of palladium(II) complexes with chelate N₂O₂ framework. Structural, solution and computational study

Emina M. Mrkalić^a, Ratimir Jelić^b, Giorgio Pelosi^c, Vesna Kojić^d, Dimitar Jakimov^d, Pengfei Li^e, Suzana Popović^b, Dejan Baskić^b, Zoran D. Matović^{a,1}*

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Kragujevac, SRB-34000, Serbia

^b University of Kragujevac, Faculty of Medical Science, S. Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^c Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica Chimica Fisica, Università di Parma, Parma, I-43100, Italy

^d Institute of Oncology Sremska Kamenica, Novi Sad, Institutski put 4, Sremska Kamenica, SRB-21204, Serbia

^e Department of Chemistry, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824-1322, United States

Keywords: Palladium(II) complexes; Crystal structure; Solution studies; Apoptosis;

Molecular dynamics

*Corresponding author. Tel.: +38134336223; fax: +38134335040.

E-mail address: zmatovic@kg.ac.rs

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Емина М. Мркалић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

СИНТЕЗА И АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) СА
ДЕРИВАТИМА ДИАМИДА ОКСАЛНЕ И МАЛОНСКЕ КИСЕЛИНЕ

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

Овом Изјавом такође потврђујем:

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

У Крагујевцу, 05.12.2016. године



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Емина М. Мркалић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

СИНТЕЗА И АНТИТУМОРНА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) СА
ДЕРИВАТИМА ДИАМИДА ОКСАЛНЕ И МАЛОНСКЕ КИСЕЛИНЕ

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

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

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

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 05.12.2016. године



потпис аутора

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