



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Ангелина З. Цаковић

**УТИЦАЈ СТРУКТУРЕ ИНЕРТНИХ N,N,N -
ЛИГАНАДА НА РЕАКТИВНОСТ И БИОЛОШКУ
АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА РОДИЈУМА(III) И
ОСМИЈУМА(II) У ПРИСУСТВУ И ОДСУСТВУ
НЕТОКСИЧНИХ КОСОЛВЕНАТА**

докторска дисертација

Крагујевац, 2025



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Angelina Z. Caković

**THE EFFECT OF THE STRUCTURE OF INERT
N,N,N-LIGANDS ON THE REACTIVITY AND
BIOLOGICAL ACTIVITY OF RHODIUM(III) AND
OSMIUM(II) COMPLEXES IN THE PRESENCE
AND ABSENCE OF NON-TOXIC COSOLVENTS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2025

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Ангелина З. Цаковић
Датум и место рођења: <i>03.10.1993., Смедеревска Паланка, Република Србија</i>
Садашње запослење: <i>Истраживач-сарадник (научна област: хемија), Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>
Докторска дисертација
Наслов: УТИЦАЈ СТРУКТУРЕ ИНЕРТНИХ N,N,N-ЛИГАНАДА НА РЕАКТИВНОСТ И БИОЛОШКУ АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА РОДИЈУМА(III) И ОСМИЈУМА(II) У ПРИСУСТВУ И ОДСУСТВУ НЕТОКСИЧНИХ КОСОЛВЕНАТА
Број страница: 178
Број слика: 63
Број библиографских података: 333
Установа и место где је рад израђен: <i>Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>
Научна област (УДК): <i>546, Хемијске науке</i>
Ментор: <i>др Јована Богојески, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: одлука бр. IV-01-655/12 датум 14.09.2022. године.

Породици

Искрено се захваљујем својој менторки, др Јовани Богојески, на изузетном вођству, подршци и посвећености током читавог трајања докторских студија. Њено знање, стрпљење и спремност да увек подели савет били су од посебног значаја за израду овог рада.

Захваљујем члановима комисије на издвојеном времену, пажњи и конструктивним коментарима, који су значајно допринели унапређењу квалитета докторске дисертације.

Посебну захвалност упућујем колегиницама и колегама из лабораторије на успешној сарадњи, размини идеја и свакодневној помоћи.

Најдубљу и најискренију захвалност дугујем својој породици, која је била мој највећи ослонац и подршка. Захваљујем се својим родитељима, брату Душану, као и бабама и дедама, који су ме пратили од првих корака, бодрили и пружали подршку током читавог школовања и професионалног развоја. Посебно сам захвална свом супругу Филипу на стрпљењу, разумевању и непрекидној подршци, као и нашем сину Алекси, који је својим осмехом и загрљајима уносио ведрину и радост у сваки дан. Такође, захваљујем и породици свог супруга на помоћи у свим важним тренуцима.

На крају, захвална сам свима који су на било који начин били уз мене и допринели мом путу до овог тренутка. Ваше присуство и подршка учинили су овај успех могућим.

Апстракт

Малигни тумори представљају један од највећих изазова савремене медицине, пре свега због високог морталитета, али и ограничења постојећих терапијских приступа, као што су системска токсичност према здравим ткивима и развој резистенције код туморских ћелија. У настојању да се превазиђу наведени изазови, истраживања се усмеравају ка комплексима прелазних метала, који се издвајају својим хемијским и биолошким својствима. Посебну пажњу привлаче комплекси родијума и осмијума, захваљујући својој структурној флексибилности, могућности прецизног подешавања реактивности и способности селективне интеракције са биолошки релевантним метама. Досадашња истраживања потврђују изражену цитотоксичну активност ових комплекса, као и њихов потенцијал за селективно деловање на туморске ћелије, што их чини веома перспективним кандидатима за развој нових, ефикаснијих и селективнијих антитуморских агенаса.

У оквиру ове докторске дисертације синтетисано је укупно петнаест комплексних једињења, десет комплекса Rh(III) и пет комплекса Os(II), са различитим класама лиганата, укључујући *dien*, пиридинске и тиазол-пиридинске деривате, као и камфор деривате *bis*-пиридилпиридина. Сви синтетисани комплекси су окарактерисани применом елементарне микроанализе, NMR и масене спектроскопије, док је структура појединих комплекса додатно потврђена методом рендгенске структурне анализе.

Испитиване су супституционе реакције комплекса са биолошки релевантним лигандима, интеракције са ДНК и серумским албуминима, липофилност и *in vitro* цитотоксична активност према различитим ћелијским линијама. Применом DFT методе и докинг симулација додатно су анализирани афинитети комплекса ка биолошки значајним метама, као и типови интеракција и места везивања. Посебна пажња посвећена је испитивању утицаја јонских течности као косолвената на активност комплекса Rh(III) и Os(II), при чему су испитане супституционе реакције, интеракције са биомолекулима и цитотоксична активност у њиховом присуству.

Кључне речи

- Rh(III) комплекси
- Os(II) комплекси
- Јонске течности
- Антитуморски агенси
- Кинетика супституције
- Интеракције са ДНК и серумским албумином
- Синергистички ефекти
- Цитотоксичност
- Биолошка активност комплекса

Abstract

Malignant tumors represent one of the greatest challenges in modern medicine due to their high mortality rates and the limitations of current therapeutic approaches, such as toxicity to healthy tissues and the development of resistance in tumor cells. To overcome these challenges, attention is being focused on transition metal complexes, which are distinguished by their chemical and biological properties. Among these, rhodium and osmium complexes have garnered particular interest due to their structural adaptability, ability to fine-tune reactivity, and capacity to interact with biologically relevant targets. Previous studies have demonstrated their significant cytotoxic activity and potential for selective action, making them promising candidates for the development of more effective and selective antitumor agents.

This doctoral dissertation presents the synthesis of a total of fifteen complexes, ten Rh(III) complexes and five Os(II) complexes, incorporating various ligand classes, including *dien*, pyridine, thiazole-pyridine derivatives, and camphor-based *bis*-pyridylpyridine derivatives. All synthesized complexes were thoroughly characterized using elemental microanalysis, NMR, and mass spectrometry, while the structure of some complexes was further confirmed by X-ray crystallography.

The dissertation investigates substitution reactions of the complexes with biologically relevant ligands, interactions with DNA and serum albumins, lipophilicity, and *in vitro* cytotoxic activity against various cell lines. Additionally, DFT methods and docking simulations were applied to analyze the complexes' affinities for biologically significant targets, as well as the nature of their interactions and binding sites. Special emphasis was placed on examining the influence of ionic liquids as cosolvents on the activity of Rh(III) and Os(II) complexes, including substitution reactions, interactions with biomolecules, and cytotoxicity in their presence.

Keywords

- Rh(III) complexes
- Os(II) complexes
- Ionic liquids
- Antitumor agents
- Substitution kinetics
- DNA and serum albumin interactions
- Synergistic effects
- Cytotoxicity
- Biological activity of complexes

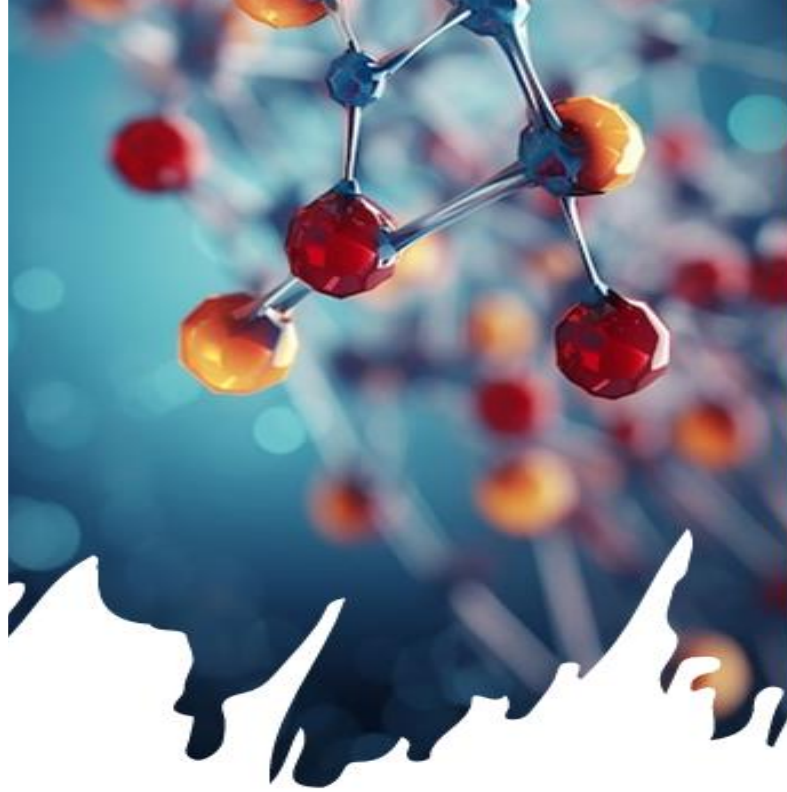
САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ОПШТИ ДЕО	3
2.1. ТУМОР	4
2.1.1. Врсте тумора	5
2.1.2. Генетске промене туморских ћелија.....	5
2.1.3. Утицај болести на квалитет живота и терапија.....	6
2.2. ХЕМИОТЕРАПИЈА	7
2.2.1. Комплекси платине у хемиотерапији	8
2.2.2. Неплатински комплекси прелазних метала у терапији тумора	9
2.3. АНТИТУМОРСКА СВОЈСТАВА КОМПЛЕКСА РОДИЈУМА	11
2.3.1. Трихлоридородијум(III) комплекси	12
2.3.2. Дихлоридородијум(III) комплекси	13
2.3.3. Монохлоридородијум(III) комплекси	14
2.3.4. Супституционо инертни Rh(III) комплекси	16
2.3.5. Комплекси Rh(III) инхибитори инфламаторних медијатора	17
2.3.6. Комплекси Rh(III) инхибитори изомераза	18
2.3.7. Комплекси Rh(III) инхибитори деметилаза	19
2.3.8. Комплекси Rh(III) инхибитори киназа	20
2.4. АНТИТУМОРСКА СВОЈСТАВА КОМПЛЕКСА ОСМИЈУМА	21
2.4.1. Комплекси осмијума као аналози NAMI-A и KP1019	22
2.4.2. Os(II)-аренски комплекси	24
2.4.3. Осмијум нитридо комплекси	26
2.4.4. Осмијум карбонил комплекси	27
2.4.5. Осмијум RVOX комплекси	27
2.5. ЈОНСКЕ ТЕЧНОСТИ	28
2.5.1. Опште карактеристике јонских течности	29
2.5.2. Биокompatibilне јонске течности	30
2.5.3. Јонске течности и комплекси метала	31
ПРЕДМЕТ ИСТРАЖИВАЊА	34
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	35
3.1. РЕАГЕНСИ И РАСТВОРИ	36
3.2. ИНСТРУМЕНТАЛНЕ МЕТОДЕ	37
3.3. СИНТЕЗА КОМПЛЕКСА	37
3.3.1. Синтеза комплекса Rh(III)	37
3.3.2. Синтеза комплекса Os(II)	41

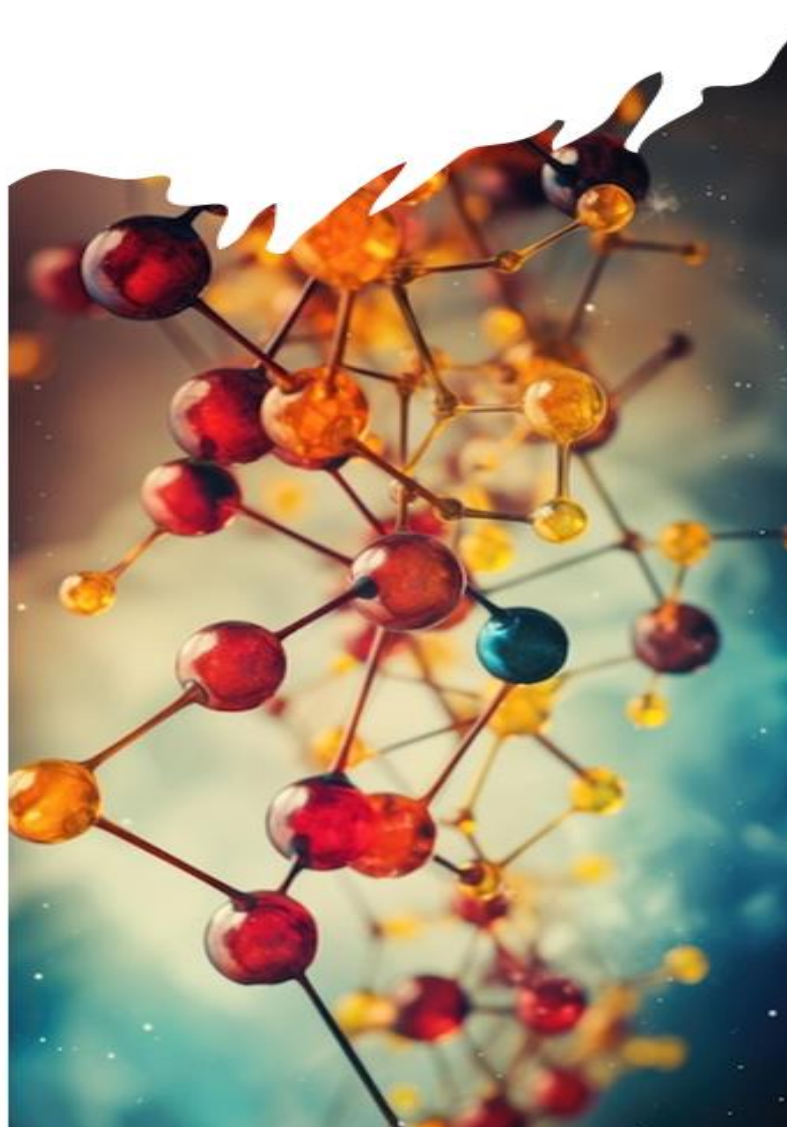
3.3.3. Рендгенско-структурна анализа комплекса	42
3.4. ЈОНСКЕ ТЕЧНОСТИ КАО КОСОЛВЕНТИ	50
3.5. КИНЕТИЧКА МЕРЕЊА	50
3.6. ИСПИТИВАЊЕ ИНТЕРАКЦИЈА КОМПЛЕКСА СА ДНК	51
3.6.1. Испитивање интеракција апсорпционом спектроскопијом	51
3.6.2. Испитивање интеракција флуориметријом	52
3.6.2.1. Испитивање интеркалационе способности комплекса у присуству етидијум-бромида	52
3.6.2.2. Испитивање везивања комплекса и Hoechst 33258 за мали жлеб ДНК	52
3.6.3. Испитивање интеркалационе способности комплекса са ДНК мерењем вискозности	53
3.6.4. Испитивање интеркалационе способности комплекса са ДНК мерењем термалне денатурације	53
3.6.5. Испитивање интеракција комплекса са ДНК методом гел електрофорезе	53
3.7. ИСПИТИВАЊЕ ИНТЕРАКЦИЈА КОМПЛЕКСА СА СЕРУМСКИМ АЛБУМИНОМ	54
3.7.1. Испитивање интеракције комплекса са HSA у присуству маркера	54
3.8. ИСПИТИВАЊЕ ЛИПОФИЛНОСТИ КОМПЛЕКСА	55
3.9. МЕТОДЕ КОМПЈУТЕРСКЕ ХЕМИЈЕ	55
3.9.1. DFT метода	55
3.9.2. Симулације молекулског докинга	56
3.10. БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА	56
3.10.1. Припрема ћелија и култивација	56
3.10.2. <i>In vitro</i> цитотоксична активност (MTT тест)	56
3.10.3. <i>In vitro</i> истраживање редокс статуса	57
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	59
4.1. СИНТЕЗА И СТРУКТУРНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА КОМПЛЕКСА	60
4.1.1. Синтеза и структурна карактеризација комплекса Rh(III)	60
4.1.1.1. Рендгенско-структурна анализа [RhL2Cl3] (Rh2) комплекса	61
4.1.1.2. Рендгенско-структурна анализа [RhL7Cl3] (Rh7) комплекса	62
4.1.2. Синтеза и структурна карактеризација комплекса Os(II)	63
4.1.2.1. Рендгенско-структурна анализа [Os(L4)Cl ₂ H ₂ O] (Os2) комплекса ...	64
4.2. ИСПИТИВАЊЕ СУПСТИТУЦИОНИХ РЕАКЦИЈА КОМПЛЕКСА	65
4.2.1. Супституционе реакције комплекса Rh(III)	66
4.2.2. Супституционе реакције комплекса Os(II)	68
4.2.3. Активациони параметри супституционих реакција комплекса Rh(III) и Os(II)	70
4.2.4. Утицај јонских течности на супституционе реакције комплекса Rh(III) и Os(II)	71
4.3. ИСПИТИВАЊЕ ИНТЕРАКЦИЈА КОМПЛЕКСА СА ДНК	76

4.3.1. Испитивање интеракција апсорпционом спектроскопијом	76
4.3.1.1. Испитивање интеракција комплекса Rh(III)	77
4.3.1.2. Испитивање интеракција комплекса Os(II)	79
4.3.1.3. Испитивање интеракција комплекса Rh(III) и Os(II) са ДНК у присуству јонских течности	80
4.3.2. Испитивање интеракција флуориметријом	84
4.3.2.1. Испитивање интеркалационе способности комплекса у присуству етидијум-бромида	84
4.3.2.1.1. Испитивање интеракција комплекса Rh(III)	84
4.3.2.1.2. Испитивање интеракција комплекса Os(II)	86
4.3.2.1.3. Испитивање интеркалационе способности комплекса у присуству етидијум-бромида и јонских течности	87
4.3.2.2. Испитивање везивања комплекса и Hoechst 33258 за мали жлеб ДНК	90
4.3.2.2.1. Испитивање интеракција комплекса Rh(III)	91
4.3.2.2.2. Испитивање интеракција комплекса Os(II)	92
4.3.3. Испитивање интеркалационе способности комплекса Rh(III) и Os(II) са ДНК мерењем вискозности	94
4.3.3.1. Утицај јонских течности на интеркалационе способности комплекса Rh(III) са ДНК мерењем вискозности	96
4.3.4. Испитивање интеркалационе способности комплекса Rh(III) са ДНК мерењем термалне денатурације	97
4.3.5. Испитивање интеракције комплекса Os(II) са ДНК методом гел електрофорезе	98
4.4. ИСПИТИВАЊЕ ИНТЕРАКЦИЈА КОМПЛЕКСА СА HSA И BSA	99
4.4.1. Испитивање интеракција комплекса Rh(III) са HSA и BSA	100
4.4.2. Испитивање интеракција комплекса Os(II) са HSA и BSA	103
4.4.3. Испитивање интеракција комплекса Rh(III) и Os(II) са HSA у присуству маркера	105
4.4.4. Испитивање интеракција комплекса Rh(III) и Os(II) са HSA у присуству јонских течности	105
4.4.5. FRET тест	107
4.5. ИСПИТИВАЊЕ ЛИПОФИЛНОСТИ КОМПЛЕКСА Rh(III)	107
4.6. МЕТОДЕ КОМПЈУТЕРСКЕ ХЕМИЈЕ	108
4.6.1. DFT метода: Термодинамичка анализа и релативна стабилност комплекса Rh(III)	108
4.6.2. Симулације молекулског докинга	113
4.6.2.1. Симулације молекулског докинга за ДНК интеракције	113
4.6.2.2. Симулације молекулског докинга за HSA интеракције	117
4.7. БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА КОМПЛЕКСА Rh(III) и Os(II)	120
4.7.1. <i>In vitro</i> цитотоксична активност (MTT тест)	121
4.7.1.1. <i>In vitro</i> цитотоксична активност комплекса Rh(III)	121
4.7.1.2. <i>In vitro</i> цитотоксична активност комплекса Os(II)	124
4.7.1.3. <i>In vitro</i> цитотоксична активност испитиваних комплекса у присуству јонских течности	126
4.7.2. <i>In vitro</i> истраживање редокс статуса	126
4.7.2.1. <i>In vitro</i> истраживања редокс статуса комплекса Rh(III)	129

4.7.2.2. <i>In vitro</i> истраживања редокс статуса комплекса Os(II)	135
5. ЗАКЉУЧАК	140
6. ЛИТЕРАТУРА	
7. ПРИЛОГ	
8. БИОГРАФИЈА	



1. УВОД



1. УВОД

Тумори представљају један од наизазовнијих проблема савременог друштва, са високом стопом смртности и сложеном патофизиологијом.¹⁻³ Карактеришу се неправилном, убрзаном и неконтролисаном пролиферацијом ћелија,⁴ која може захватити различите органе и ткива, укључујући плућа, кости, дојке, простату и дигестивни тракт.⁵⁻⁹ Етиологија настанка тумора укључује бројне факторе, као што су генетске мутације, вирусне инфекције и структурне аномалије ДНК.^{4,10} Због сложености лечења тумори значајно оптерећују здравствени систем и економију, док оболелима и њиховим породицама нарушавају квалитет живота.¹¹⁻¹⁵ Иако савремене методе лечења, као што су хемиотерапија и радиотерапија, постижу значајне резултате, њихова клиничка ефикасност остаје ограничена услед нежељених ефеката и развоја резистенције.^{16,17} Због тога је неопходан развој нових терапијских стратегија који ће превазићи ова ограничења, обезбедити већу селективност према туморским ћелијама и смањити токсичне ефекте на здраво ткиво.

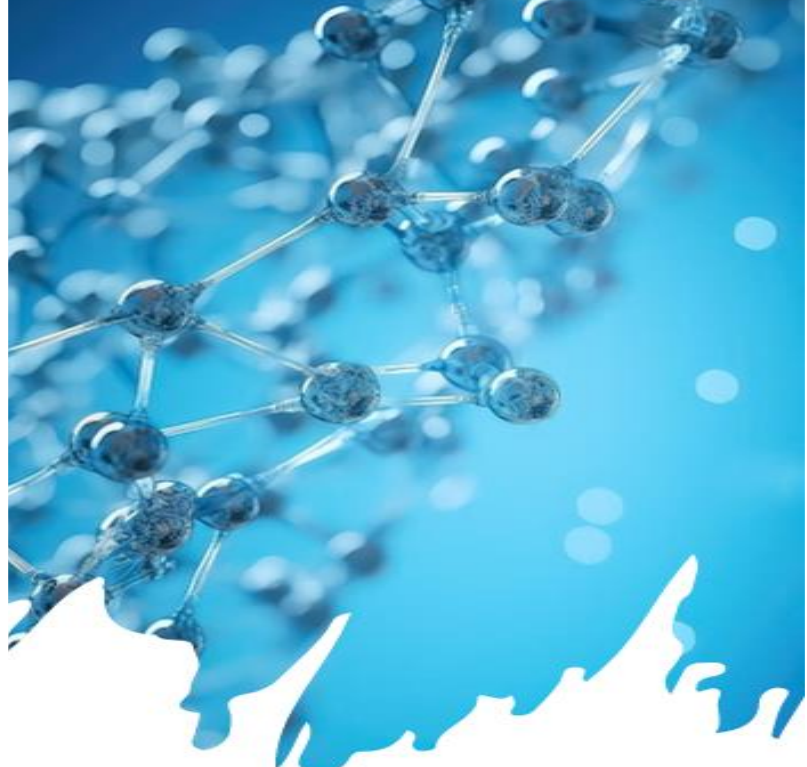
Комплекси прелазних метала, захваљујући својим јединственим хемијским својствима и структурној разноврсности, представљају значајан сегмент савремене хемије са широком применом у различитим научним и технолошким областима.¹⁸⁻²³ Са биомедицинске перспективе, они су посебно значајни због своје способности да утичу на биолошке процесе и регулишу функцију ћелија, што их чини потенцијалним кандидатима за развој ефикаснијих и селективнијих терапијских приступа.²²⁻²⁷ Открићем антитуморске активности цисплатине и њеним одобрењем за клиничку примену, започела је примена комплекса прелазних метала у терапији тумора.²⁸⁻³⁰ Међутим, примена комплекса платине у терапији тумора праћена је бројним нежељеним ефектима, укључујући високу токсичност, оштећење бубрега, периферну неуропатију, губитак слуха, мучнину и развој резистенције. Ови нежељени ефекти подстичу потребу за истраживањем нових, алтернативних терапијских агенаса.^{16,17} Комплекси родијума и осмијума сматрају се перспективним кандидатима за развој нових антитуморских агенаса због селективности у интеракцијама са биомолекулима, циљаног деловања и разноврсних структура и механизма деловања.³¹⁻⁴⁰

Родијум (Rh⁴⁵), племенити метал из платинске групе метала (8. група, пета периода Периодног система елемената), препознатљив по својој сребрно-сивој боји и металном сјају. Карактерише га висока отпорност на корозију, изражена каталитичка својства и стабилности у различитим оксидационим стањима.^{21,41-43} Октаедарска координација у комплексним једињењима омогућава везивање широког спектра лиганата, што доприноси њиховој структурној разноврсности и биолошкој прилагодљивости. Савремена истраживања све више указују на то да стабилност и кинетичка инертност комплекса родијума, које су се некада сматрале ограничавајућим факторима, заправо омогућавају прецизно усмеравање ка специфичним биолошким метама. Комплекси родијума обухватају различите класе једињења са специфичним механизмима деловања. Цитотоксични ефекат може проистећи из директне интеракције са ДНК, изазивањем оштећења генетског материјала, инхибицијом ензима кључних за ћелијски метаболизам и репарацију, утицаја на пролиферацију и апоптозу.^{31-34,37,38} Поред тога, фотохемијска својства одређених комплекса омогућавају прецизну активацију унутар туморског ткива, чиме се повећава селективност и ефикасност терапије.⁴⁶

Осмијум (Os^{76}), такође племенити метал из платинске групе метала (9. група, шеста периода Периодног система елемената), препознатљив је по свом плавичасто-сивом металном сјају, високој густини и стабилношћу у различитим оксидационим стањима. Комплекси осмијума одликују се изузетном стабилношћу, захваљујући спорој супституцији лиганада и отпорности на хидролизу.^{21,41-43} Хемијске карактеристике осмијума, као што су виши оксидациони бројеви, кинетичка стабилност и способност да у биолошким срединама остане активан дужи временски период, указују на велики потенцијал ових комплекса за примену у биомедицинским истраживањима. Комплекси осмијума представљају структурно разноврсну класу једињења са специфичним механизмима деловања. Слично комплексима родијума, комплекси осмијума могу испољити цитотоксичност директном интеракцијом са ДНК, оштећењем генетског материјала, инхибицијом ензима неопходних за опстанак туморских ћелија, нарушавањем пролиферације и изазивањем апоптозе. Такође, могу индуковати оксидативни стрес, инхибирати виталне биохемијске процесе у туморским ћелијама или модулирати имунолошки одговор.^{33,35,36,39,40}

У оквиру ове докторске дисертације синтетисано је и окарактерисано укупно петнаест комплексних једињења, од којих десет комплекса родијума(III) и пет комплекса осмијума(II). За синтезе ових комплекса коришћени су различитих типова лиганада, као што су *dien*, деривати пиридина, тиазол-пиридина и камфорски *bis*-пиридилпиридински деривати. Испитана је кинетика супституционих реакција комплекса са биолошки релевантним лигандима, интеракције са ДНК и албуминима, као и липофилност. Кинетика супституционих реакција комплекса испитана је применом UV-Vis спектрофотометрије чиме су утврђени њихови афинитети према биолошки значајним лигандима (5'-GMP, L-Met, GSH), као и активациони параметри реакција. Интеракције са ДНК испитане су применом UV-Vis и флуоресцентном спектроскопијом у присуству етидијум-бромида и Hoechst33258, као и методама термалне денатурације, мерења вискозности и електрофорезом. Ови експерименти омогућили су одређивање афинитета комплекса према ДНК молекулу, као потенцијалној циљаној мети, као и механизма њиховог везивања. Интеракције са албуминима (HSA и BSA) испитане су флуоресцентном спектроскопијом уз употребу маркера еозина и ибупрофена, као и применом FRET теста, што је омогућило одређивање афинитета и места везивања комплекса на албумин. Додатно, извршена су DFT мерења и докинг симулације за комплексе и испитиване биомолекуле, како би се добио детаљнији увид у структурне и енергетске аспекте интеракција комплекса са биолошким метама. Испитана је цитотоксичност комплекса према различитим ћелијским линијама (Hela, HCT-116 и MRC-5), као и утицај комплекса на редокс статус туморских и здравих ћелија (ROS, GSH, нитрити). С обзиром на то да је ограничена растворљивост често један од главних изазова у примени комплексних једињења, сва истраживања су спроведена и у присуству јонских течности као потенцијалних косолвента. Испитан је њихов утицај на интеракције комплекса са биолошким метама и цитотоксичност, уз процену могућих синергијских ефеката.

Ова докторска дисертација пружа детаљније разумевање интеракција комплекса родијума и осмијума са биолошким молекулама, утицај структуре лиганада и примене јонских течности као косолвента. Испитивање цитотоксичности комплекса омогућава процену њиховог терапијског потенцијала, што представља основу за развој нових, прецизнијих и ефикаснијих антитуморских лекова.

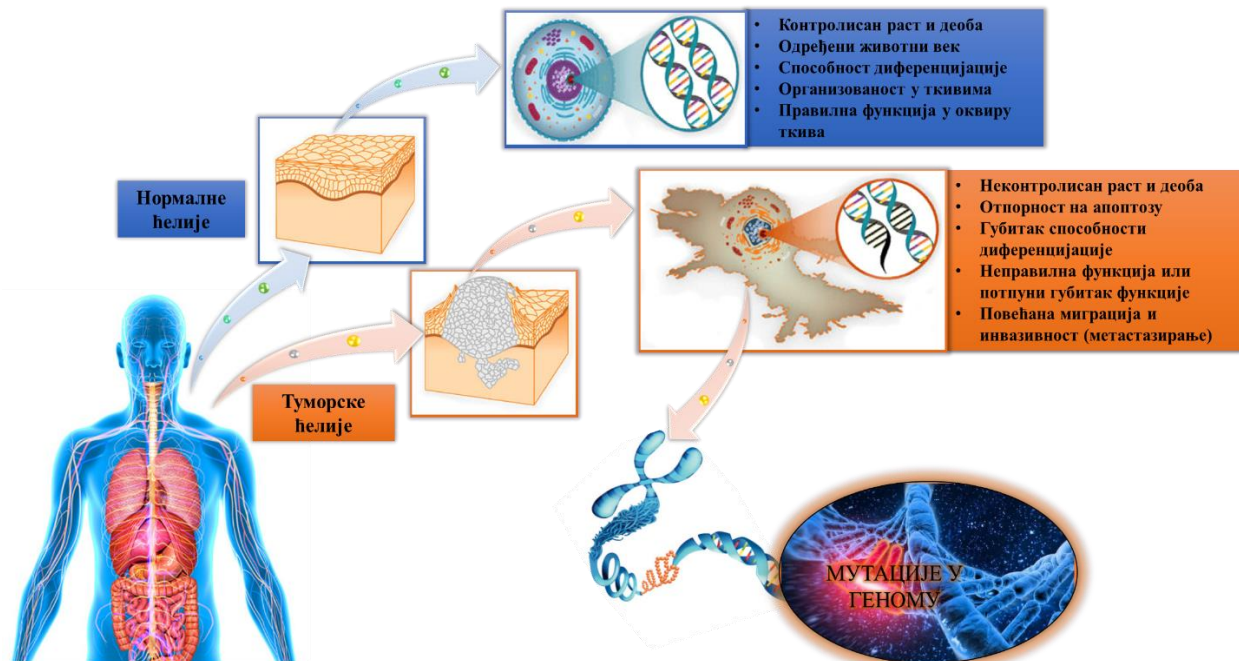


2. ОПШТИ ДЕО



2.1. ТУМОР

Тумор, један од водећих узрока смртности широм света, дефинисан је као болест промена сигналних путева и метаболизма која доводи до неконтролисане пролиферације ћелија.¹⁻⁴ Тумори настају кроз сложен процес трансформације нормалних ћелија у туморске кроз више фаза, почевши од претуморских лезија до развоја малигних тумора. У здравом организму, нове ћелије настају путем строго контролисаних процеса раста, диференцијације и ћелијске деобе.⁴ Међутим, када дође до поремећаја у овој прецизној регулацији, абнормалне или оштећене ћелије могу почети неконтролисано да расту и да се деле, што доводи до настанка тумора, Слика 2.1. Губитак контроле над ћелијским растом, који је карактеристичан за туморске ћелије, представља резултат кумулативних абнормалности у различитим ћелијским регулаторним системима.¹⁻⁴



Слика 2.1. Разлике између нормалних и туморских ћелија.

Откриће да туморске ћелије настају из нормалних ћелија представља један од најзначајнијих доприноса онкологији у двадесетом веку. Са напретком молекуларне биологије постало је јасно да се туморске ћелије развијају из здравих ћелија које пролазе кроз бројне мутације, што доводи до губитка нормалне диференцијације, неконтролисаног раста и способности инвазије у здраво ткиво.^{3,4,10} Разумевање разлика између нормалних и туморских ћелија представља основу за развој циљаних терапија јер пружа увид у основне механизме туморигенезе, Табела 2.1.

Табела 2.1. Карактеристике туморских и нормалних ћелија.

	Нормална Ћелија	Туморска Ћелија
<i>Ћелијски циклус</i>	Тачно регулисан ћелијски циклус	Неконтролисан раст и деоба
<i>Раст и регулација</i>	Одговарају на сигнале за раст и подложне су контактної инхибицији	Мутације у генима омогућавају неконтролисану пролиферацију и дељење.
<i>Диференцијација</i>	Високо диференциране и обављају специфичну функцију у организму.	Губе диференцијацију и оригиналну функцију.
<i>Реакција на оштећења</i>	Активирају механизме апоптозе у случају оштећења.	Често развијају отпорност на апоптозу.
<i>Метастазе</i>	Не улазе у околно ткиво и не шире се ван изворног места.	Инвазивно улазе у околно ткиво и шире се ван изворног места.

2.1.1. Врсте тумора

Тумор може настати као резултат абнормалне пролиферације било које врсте ћелија у организму, што објашњава постојање више од стотину различитих типова тумора.⁴⁻⁹ Кључна класификација тумора у патологији подразумева разликовање бенигних и малигних облика. Бенигни тумори, као што је обична кожна брадавица, ограничени су на своју првобитну локацију и не нападају околно здраво ткиво, нити се шире на удаљене делове тела. С друге стране, малигни тумори поседују способност инвазивног раста, продиру у суседна нормална ткива и шире се путем циркулаторног или лимфног система, процес познат као метастазирање.⁴⁷ Способност метастазирања чини малигне туморе изузетно опасним, јер омогућава ширење туморских ћелија на удаљене органе и ткива, чиме се значајно компликује терапијски приступ и дијагностика болести.⁴⁷

2.1.2. Генетске промене туморских ћелија

Тумори настају као резултат генетских промена у здравим ћелијама, Табела 2.2, где мутације у геному играју кључну улогу у развоју болести.⁴⁸ Генетске мутације у ћелијама могу настати услед наследних предиспозиција, изложености туморогеним супстанцама или грешака насталих током репликације ДНК. Ове промене могу убрзати раст ћелија, ослабити механизме за поправку оштећеног генског материјала и подстакнути ангиогенезу, односно формирање нових крвних судова који снабдевају тумор хранљивим материјама.^{4,48}

Табела 2.2. Гени чије мутације доприносе развоју тумора.

Врста гена	Опис	Улога у туморогенези
<i>Онкогени</i>	Гени који управљају нормалним растом и развојем ћелија Мутације изазивају неконтролисани раст ћелија и развој тумора.	Подстичу неконтролисани раст ћелија.
<i>Туморски супресорски гени</i>	Гени који регулишу ћелијски циклус и спречавају неправилан раст ћелија Мутације уништавају њихову функцију и доводе до настанка тумора.	Супротстављају се неконтролисаном расту ћелија.
<i>Гени за одржавање стабилност генома</i>	Гени који учествују у одржавању стабилности генома и поправци оштећења у ДНК. Мутације повећавају ризик од развоја тумора.	Спречавају накупљање генетских промена које доводе до настанка тумора.

Већина малигних тумора има вишеструке генетске промене у онкогенима, као и генима за супресију тумора.⁴⁸ Онкогени индукују аберантни раст кроз повећање функције, док тумор супресорски гени доприносе онкогенези кроз губитак функције. Обе врсте мутација доводе до појаве малигних тумора уз повећање броја мутација како се тумор развија из бенигног у малигни. Сваки тумор поседује јединствену комбинацију генетских промена, што доводи до све сложенијих генетских профила у различитим фазама његовог развоја.⁴⁸ Ове генетске промене доприносе хетерогености и комплексности тумора, омогућавајући им да избегну или одговоре на различите терапијске приступе.

2.1.3. Утицај болести на квалитет живота и терапија

Сваке године у свету се дијагностикује око 20 милиона нових случајева малигних тумора, од којих 9,7 милиона има смртни исход.²⁻³ Процењује се да ће у наредних 25 година овај број порасти за 75%. У Србији се сваке године пријави око 40.000 нових случајева малигних обољења, док број смртних исхода износи приближно 20.000.⁴⁹ Малигни тумори имају утицај на физичко и психичко здравље пацијената, као и на њихову финансијску стабилност, што додатно оптерећује породице, заједнице и здравствене системе.¹¹⁻¹⁵

Лечење обухвата различите терапијске приступе, као што су хирургија, радиотерапија и системске терапије, укључујући хемиотерапију, хормонске третмане и циљану биолошку терапију.^{1,10} Избор терапије зависи од врсте тумора, стадијума болести и општег здравственог стања пацијента. Лечење није усмерено само на болест, већ и на свеобухватну подршку пацијентима. Поред хемиотерапије, пацијентима се пружају психолошка помоћ, нутриционистичко саветовање и физикална терапија. Овај мултидисциплинарни приступ осигурава целовиту негу, доприносећи побољшању квалитета живота пацијената током и након лечења.

2.2. ХЕМИОТЕРАПИЈА

Хемиотерапија, као један од најефикаснијих терапијских приступа у онкологији, представља системску примену више од 100 антинеоплазматских лекова са циљем уништавања малигних туморских ћелија.^{50,51} Избор хемиотерапије зависи од врсте и величине тумора, његове локализације и општег здравственог стања пацијента.⁵⁰⁻⁵² Хемиотерапија се може користити самостално или у комбинацији са другим терапијама, као што су хируршка интервенција или зрачење,⁵¹ за смањење тумора пре операције или за уништавање преосталих малигних ћелија након интервенције. Савремена хемиотерапија представља једну од најчешће примењених метода лечења тумора. Применом широког спектра антинеопластичних лекова она значајно доприноси ефикасности у борби против малигних обољења.⁵³

Антинеопластични лекови, познати и као цитостатици, делују на различите начине, али им је заједнички циљ инхибиција раста и деобе малигних ћелија, Табела 2.3. Цитостатици се могу примењивати интравенски, орално, инјекцијом или топички.⁵³

Табела 2.3. Класификација антитуморских једињења.

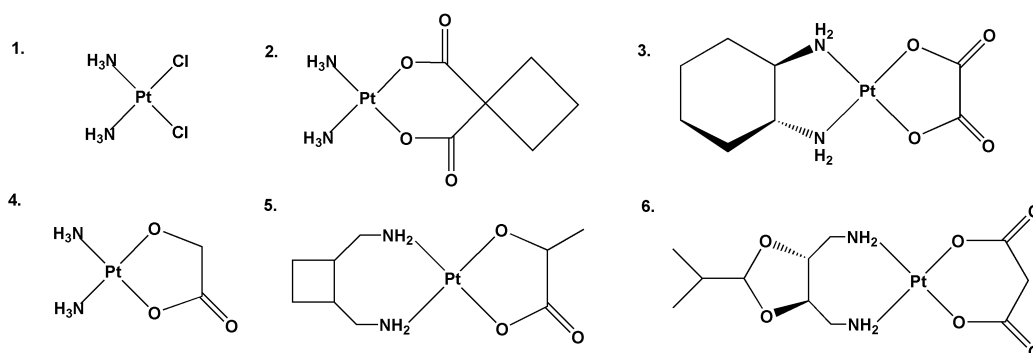
Класа једињења	Пример
<i>Алкилирајућа једињења</i>	циклофосфамид, хлорамбуцил, мелпхалан, цисплатина, карбоплатина, ифосфамид
<i>Антиметаболити</i>	5-флуороурацил, метотрексат, гемцитабин
<i>Антитуморски антибиотици</i>	доксорубицин, епирубицин, блеомицин, митомицин
<i>Митотички инхибитори</i>	паклитаксел, доцетаксел, винкрестин, винбластин
<i>Инхибитори топоизомеразе</i>	етопозид, иринотекан, топотекана

Већина цитостатика делује тако што омета митозу (ћелијску деобу) и селективно делује на ћелије које се брзо деле и изазивају њихову апоптозу. Способност цитостатика да спрече митозу се остварује кроз различите механизме, као што су оштећење ДНК и инхибиција деобе ћелија. Због утицаја на ћелијску деобу, тумори с високом стопом раста показују већу осетљивост на хемиотерапију, јер је већи део циљаних ћелија активно у фази деобе.⁵⁰⁻⁵³ Међутим, хемиотерапија може имати и значајне нежељене ефекте због неселективности ка здравим ћелијама које се брзо деле, као што су ћелије коштане сржи, дигестивног тракта и фоликула косе. Ово може довести до низа компликација као што су имуносупресија, анемија, мучнина, повраћање и губитак косе.⁵⁴ Због ових нежељених ефеката, истраживања се стално усмеравају ка проналажењу нових, прецизнијих терапија које би минимизирале оштећење здравих ткива и побољшале квалитет живота пацијената.

2.2.1. Комплекси платине у хемиотерапији

Комплекси платине (цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина) представљају основу многих хемиотерапијских приступа и доказано су делотворни у лечењу различитих врста малигних тумора, Слика 2.2.²⁸⁻³⁰ Карбоплатина је ефикасна у терапији тумора јајника, плућа, бешике, као и тумора главе и врата, док се цисплатина примењује за лечење тумора тестиса, јајника, бешике, главе, врата и стомака.

Комплекси платине могу се користити као самостални агенси или у комбинацији са другим цитостатикима, што пружа додатне могућности за оптимизацију терапијских ефеката.^{51,52} На пример, комбинација MVAC (метотрексат, винкрестин, доксорубицин, цисплатина) примењује се у терапији унапредовалог малигног тумора бешике, док се ECF (епирубицин, цисплатина, 5-флуороурацил) и ECX (епирубицин, цисплатина, капецитабин) користе у лечењу малигних тумора стомачних органа. FOLFIRINOX (оксалиплатина, 5-флуороурацил, фолна киселина) је ефикасан у терапији малигног колоректалног тумора и малигног тумора гуштераче, док се MAP/MAPIE (доксорубицин, цисплатина, метотрексат, ифосфамид, етопозид) примењује у лечењу малигних тумора костију.



Слика 2.2. Комплекси платине који су регистровани за употребу у лечењу тумора:
1. цисплатина, 2. карбоплатина, 3. оксалиплатина, 4. недаплатина, 5. лобаплатина,
6. хептаплатина.

Цитостатици на бази платине представљају неизоставни аспект савремене терапије различитих малигних тумора и успешно се примењују већ више од четири деценије.^{28-30, 51-55} Њихова суштинска улога у терапији тумора огледа се у чињеници да се приближно половина пацијената који примају хемиотерапију третира овим лековима. Основни механизам антитуморског деловања платинских комплекса заснован је на њиховој способности да продру у туморске ћелије и формирају интраланчане унакрсне везе, које доводе до модификација структуре ДНК. Поред тога, механизам деловања обухвата инхибицију транскрипције и индукцију програмиране ћелијске смрти (апоптозе).⁵⁶

Ипак, упркос значајним терапеутским могућностима, потпун терапијски потенцијал комплекса платине није остварен због недовољне селективности према малигним туморским ћелијама. Цитостатици на бази платине често не разликују малигне од здравих ћелија, што доводи до бројних нежељених ефеката, као што су имуносупресија, нефротоксичност, неуротоксичност, мукозитис и алопеција.¹⁶⁻¹⁷ Такође, појава

резистентности туморских ћелија на комплексе платине представља значајан изазов у терапији.^{16,17} Међутим, примена интензивне хидратације, комбинованих цитостатика и заштитних средстава за ублажавање специфичних нежељених ефеката омогућила је коришћење повећаних доза комплекса платине у лечењу резистентних облика малигних тумора. У настојању да се ублаже негативни ефекти примене комплекса платине у хемиотерапији, актуелна истраживања усмеравају се на развој нових цитостатика који би могли да превазиђу постојеће нежељене ефекте и да обезбеде боље терапијске исходе.

2.2.2. Неплатински комплекси прелазних метала у терапији тумора

Разумевање биолошких и хемијских процеса који доводе до настанка тумора омогућило је идентификацију нових терапијских мета, омогућавајући прецизније и ефикасније приступе лечењу. Комплекси прелазних метала издвајају се као перспективни кандидати захваљујући способности специфичног везивања за циљане биомолекуле, чиме се значајно унапређује селективност терапије и смањују нежељени ефекти.^{22-27,57} Развој комплекса метала као лекова захтева пажљиву оптимизацију њихових АДМЕ својстава (апсорпција, дистрибуција, метаболизам и излучивање) како би се постигла оптимална концентрација на месту деловања.⁵⁸

Претерана стабилност комплекса може довести до смањења њихове биолошке активности, али она такође може послужити као основа за развој пролекова, који се активирају само при специфичним физиолошким условима, као што су кисела средина туморског ткива или присуство одређених ензима. Оваквим приступом се омогућава контролисање терапијског ефекта и смањење нежељених ефеката. Додатно, параметри као што су стереохемија, редокс својства и термодинамичке карактеристике играју кључну улогу у одређивању њихове ефикасности и биоактивности. Прецизан дизајн и анализа ових параметара омогућавају развој нових антитуморских агенаса који не само да показују већу селективност према туморским ћелијама, већ истовремено смањују ризик од нежељених ефеката, чиме значајно унапређују терапијски потенцијал ових једињења.⁵⁷⁻⁵⁹

Иако су комплекси платине постали златни стандард у онколошкој терапији, њихова примена је ограничена због појаве резистенције туморских ћелија, изражене системске токсичности и недовољне селективности.^{16,17} Ова ограничења подстакла су истраживања усмерена на развој комплекса других прелазних метала, Слика 2.3, који показују потенцијал за већу селективност, побољшане фармаколошке особине и мању токсичност, отварајући нове могућности у онколошкој терапији.^{22-27, 32-39, 60-93}

Комплекси различитих прелазних метала, као што су титан,^{64,65} злато,⁶⁶⁻⁶⁸ галијум,^{71,72} иридијум,^{60,73,74} паладијум,^{75,76} манган,^{77,78} бакар,⁷⁹⁻⁸¹ рутенијум,⁸²⁻⁸⁴ родијум,^{32, 37,38, 85-87} хром,^{88,89} и осмијум,^{35,36,39,90-93} показали су значајан антитуморски потенцијал.^{22-27,63} На пример, комплекси хрома и паладијума показују антитуморску активност кроз индукцију апоптозе и оксидативног стреса. Комплекси мангана и злата инхибирају раст туморских ћелија тако што изазивају оксидативни стрес, док комплекси злата додатно делују као инхибитори протеинских тирозин киназа и индукују апоптозу.

ПЕРИОДНИ СИСТЕМ ЕЛЕМЕНАТА

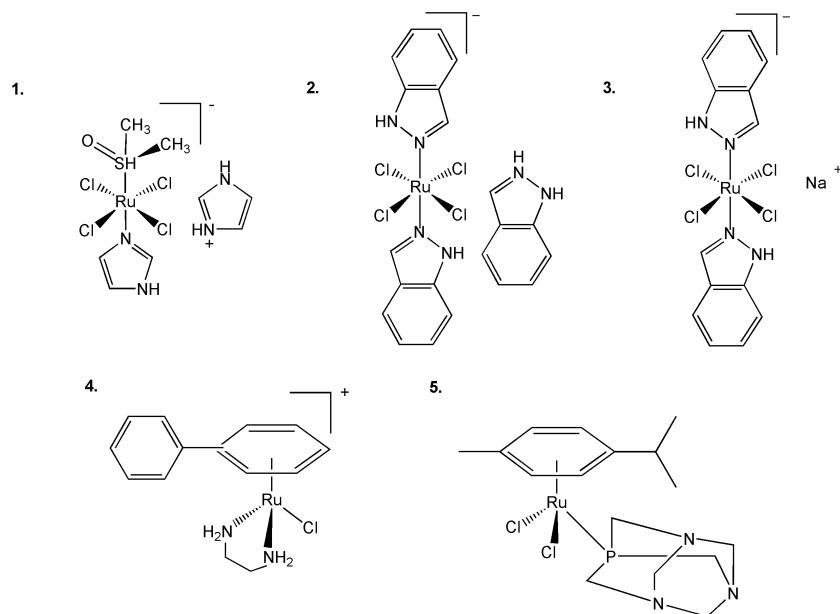
1 H																	18 He						
2 Li	4 Be																	13 B	14 C	15 N	16 O	17 F	18 Ne
11 Na	12 Mg																	13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr						
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe						
55 Cs	56 Ba	57-71 Ln Lanthanides	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn						
87 Fr	88 Ra	89-103 Ac Actinides	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Cn	113 Nh	114 Fl	115 Mc	116 Lv	117 Ts	118 Og						

ЕЛЕМЕНТИ ИСПИТИВАНЕ

АНТИТУМОРСКЕ АКТИВНОСТИ

Слика 2.3. Периодни систем елемената са истакнутим неплатинским елементима чија се антитуморска активност активно испитује.

Комплекси рутенијума су привукли велику пажњу због обећавајуће активности, при чему су поједини комплекси стигли до клиничких испитивања, Слика 2.4. Преклиничка испитивања комплекса као што су NAMI-A, KP1019, KP1339, RAPTA-C и RM175 показала су значајну ефикасност код метастаза чврстих тумора и високу цитотоксичност.⁹⁴⁻⁹⁶ Међутим, ниједан од ових комплекса није успео да прође кроз финалне фазе клиничких испитивања, нити је добио одобрење за терапијску примену.

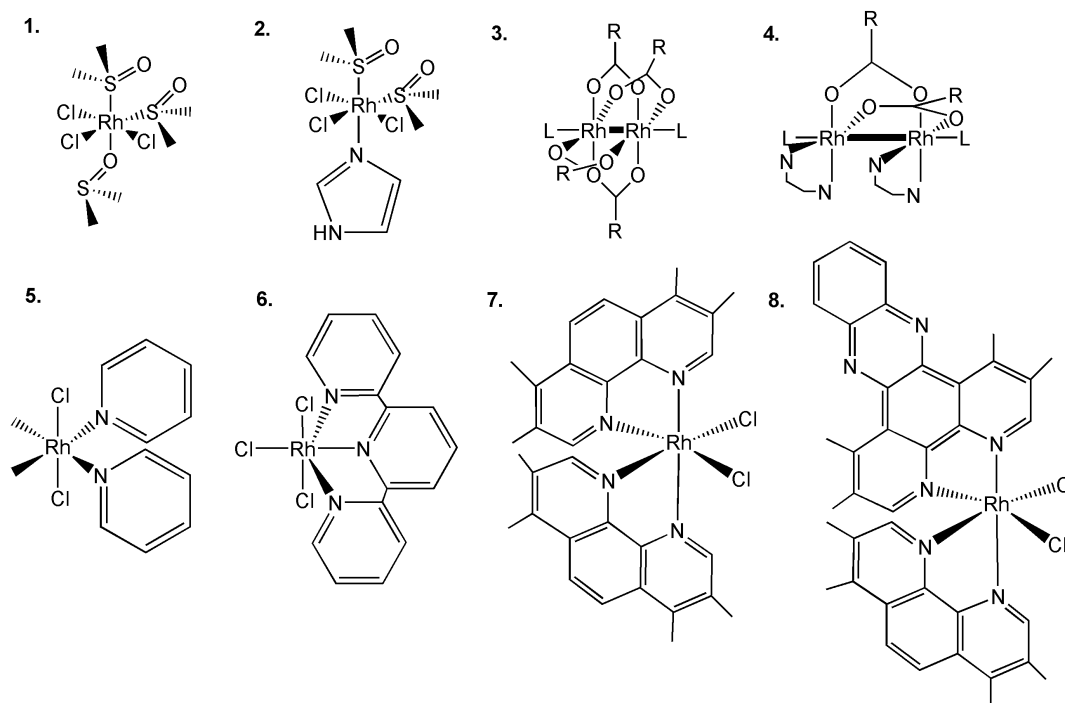


Слика 2.4. Комплекси рутенијума у клиничким испитивањима (1. NAMI-A, 2. KP1019, 3. KP1339, 4. RM175, 5. RAPTA-C).

2.3. АНТИТУМОРСКА СВОЈСТАВА КОМПЛЕКСА РОДИЈУМА

До недавно, истраживања о потенцијалној примени комплексних једињења метала 9. групе Периодног система у медицини, посебно оних са оксидационим бројем +3, била су ограничена.^{97,98} Први подаци о антитуморским својствима соли Rh(III), $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, појавили су се још 1953. године, више од деценије пре открића антитуморске активности цисплатине.^{99,100} Међутим, незаинтересованост за испитивање антитуморске активности комплекса Rh(III) била је често повезана са кинетичком инертношћу и слабом растворљивошћу. На пример, константа *псеудо* првог реда за супституцију молекула воде у октаедарском комплексу $[\text{Rh}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ знатно је нижа, за око четири реда величине, у поређењу са истом константом за квадратно-планарни комплекс $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$.¹⁰¹ Такође, супституционе реакције лиганда у структурном аналогу комплекса KP1019, $[\text{ImH}][\text{trans}\{-\text{RhCl}_4(\text{Im})_2\}]$, теку знатно спорије у односу на Ru(III) комплекс, при чему комплекс Rh(III) није показао биолошку активност.¹⁰² Ir(III) комплекси аналогни комплексу NAMI-A још спорије подлежу реакцијама супституције и такође су кинетички инертни и биолошки неактивни.^{102, 103} Ова запажања довела су до закључка да недостатак хемијске реактивности код многих Rh(III) и Ir(III) комплекса може бити повезана са одсуством антитуморске активности, чак и при високим концентрацијама.¹⁰³

Упркос претпоставкама о одсуству антитуморске активности, током година су различити комплекси родијума показали значајну биолошку активност. На пример, антитуморска својства комплекса $[\text{Rh}_2\text{L}_2(\text{RCOO})_4]$ (где је L = H_2O или други солвент) доказана су пре око четрдесет година, али су токсични ефекти ограничили њихову примену. Комплекси Rh(I), као што су $[\text{RhNH}_3(\text{COD})\text{Cl}]$ и $[\text{RhNH}_3(\text{COD})(\text{acac})\text{Cl}]$ (где COD = *cis*-1,5-циклооктадиен), показали су *in vivo* активност против Ерлиховог асцитесног тумора.^{97,98,104,105} Поред тога, дериват ацетилацетоната је инхибирао раст ћелија леукемије и саркома, и показао антиметастатску активност. Касније је потврђена и значајна *in vivo* активност бројних меридијалних комплекса родијума.^{102,106} Упркос овим повременим значајним открићима антитуморске активности појединих комплекса родијума, однос између структуре, активности и цитотоксичности Rh(III) једињења интензивно се проучава тек последњих година. Ово је додатно потврђено чињеницом да су рани радови на тему комплекса родијума и иридијума до 2006. године били сажети у два прегледна рада. Слика 2.5. приказује комплексе Rh(III) који су показали значајну антитуморску активност.



Слика 2.5. Структурне формуле комплекса родијума који су показали значајну антитуморску активност.

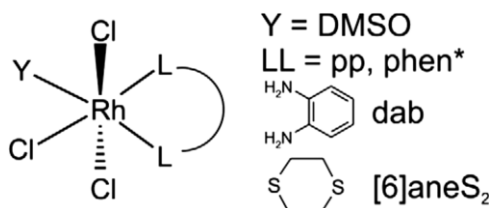
2.3.1. Трихлоридородијум(III) комплекси

Комплекси трихлоридородијума(III) познати су по значајној антитуморској активности, укључујући високу цитотоксичност и способност индукције апоптозе у различитим типовима туморских ћелија. Антитуморска активност ових комплекса доказана је још у педесетим годинама прошлог века. Каснија истраживања потврдила су ефективност одређених меридијалних комплекса, као што су $[\text{RhCl}_3(\text{NH}_3)_3]$ и $[\text{RhCl}_3(\text{DMSO}-j\text{S})_2(\text{L})]$ (где је $\text{L} = \text{NH}_3$ или Im), према туморским ћелијама јајника, плућа и дебелог црева.^{102,106}

Упркос обећавајућим резултатима, истраживања односа структуре и активности (SAR) и механизма деловања ових комплекса дуго су изостајала. Побољшање њихових биолошких својстава у великој мери се ослања на увођење цитотоксичних лиганда способних за интеракцију са специфичним ћелијским метама. На пример, замена амонијачних лиганда имидазолним или додавање полипиридилних лиганда (*pp*) доводе до значајног повећања цитотоксичности.

Полипиридилни лиганди (*pp*) су посебно интересантни због свог потенцијала да се везују за ДНК, као и због могућег утицаја на редокс својства и хидрофобност комплекса. Истраживања су се усредредила на неутралне комплексе попут $\text{mer}-[\text{RhCl}_3(\text{DMSO})(\text{pp})]$ ¹⁰⁸⁻¹¹⁰, који су детаљно проучавани у погледу своје цитотоксичности и утицаја на туморске ћелије. На пример, комплекс $\text{mer}-[\text{RhCl}_3(\text{DMSO})(5,6\text{-Me}_2\text{phen})]$ ¹¹¹ је показао значајну инхибицију пролиферације ћелија леукемије у ниском микромоларном опсегу, изазивајући екстензивну апоптозу уз минималну некрозу.

Комплекси као што су *mer,cis*-[RhCl₃(DMSO-S)(py)₂] (где је *py* = пиридин) и *mer*-[RhCl₃(*terpy*)] (где је *terpy* = терпиридин), показали су изражену активност према ћелијама леукемије и тумора дојке.^{112,113} Комплекс *fac*-[RhCl₃([9]aneNS₂)] ([9]aneNS₂ = 1-аза-4,7-дителиацклононан),¹¹⁴ је показао сличну активност према ћелијама тумора јајника као цисплатина. Мериђијални комплекси типа *mer*-[RhCl₃(Y)(LL)], показали су значајну антитуморску активност, Слика 2.6.



Слика 2.6. Структура *mer*-[RhCl₃(Y)(LL)], где је LL = *pp*, *phen*, *dab* (1,2-диаминобензен) и [6]aneS₂ (1,4-дителиацклогексан).

Комплекси трихлоридородијума(III) са полипиридилним лигандима показују знатно већу цитотоксичност у односу на самосталне полипиридилне лиганде, као што су *bpy*, *dppn*, 5-Cl*phen*, 5-NO₂*phen* и 5,6-Me₂*phen*.^{110,115-117} Ова повећана активност наглашава важност интеракције између централног метала и лиганда у постизању антитуморске ефикасности. Изомеризација ових комплекса такође игра значајну улогу у њиховој активности.¹¹⁸ На пример, прелазак у *fac* изомер доводи до смањења антитуморске активности код комплекса који садрже лиганде попут *phen*, *dpy* и *dppn*. Са друге стране, присуство DMSO као лиганда истакнуто је као кључни фактор за антитуморску активност.¹¹⁹⁻¹²¹ Комплекси типа *mer*-[RhCl₃(Y)(*phen*)], који као лиганд садрже воду или метанол уместо DMSO, показују значајно нижу активност. Липофилност комплекса се смањује увећањем CH₃OH лиганда у комплекс, због могуће супституције са хлоридо лигандом, што доводи до смањења антитуморске активности због ниских интрацелуларних концентрација комплекса *mer/fac*-[RhCl₃(CH₃OH)(*phen*)]. Насупрот томе, комплекси као што су *mer*-[RhCl₃(DMSO)(*phen*)] и *mer*-[RhCl₃(DMSO)(*dppz*)], показали су знатно више интрацелуларне концентрације, што указује на то да је висок ниво уласка у ћелије повезан са јаком цитотоксичношћу.^{117,119,120}

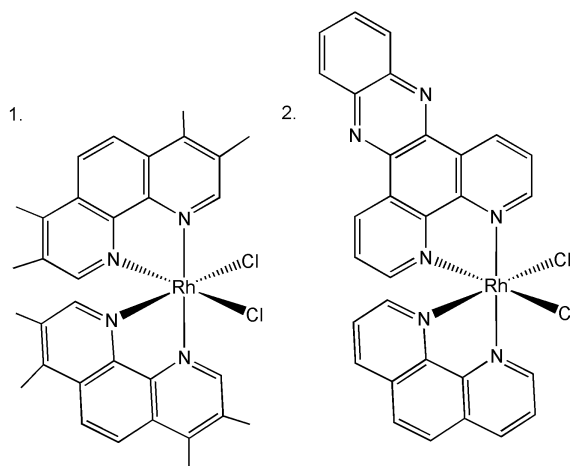
Комплекси *fac*-[RhCl₃(DMSO)(*bpy*)] и *mer*-[RhCl₃(DMSO)(*phen*)] показали су високу цитотоксичност према ћелијама тумора плућа и дебелог црева, праћену и умереним смањењем величине тумора током *in vivo* испитивања.^{46,121}

2.3.2. Дихлоридородијум(III) комплекси

Дихлоридородијум(III) комплекси, приказани на Слици 2.7., проучавани су као потенцијални фототоксични агенси у терапији туморских ћелија.¹²²⁻¹²⁴ Механизам фототоксичности заснива се на чињеници да под дејством светлости ови комплекси пролазе фотоиндуковану замену Cl/H₂O лиганда, која омогућава брзо ослобађање хлорида и ковалентно везивање комплекса за ДНК. Овај процес активира цитотоксично дејство само под дејством светлосног зрачења, што је од суштинског значаја за селективност терапије.

Примена комплекса $cis-[RhCl_2(phen)_2]Cl$ у фотохемиотерапији је ограничена због његове умерене хидрофобности, која спречава пролазак кроз ћелијске мембране тумора. Међутим, тетраметиловање фенантролинских лиганда у комплексу $cis-[RhCl_2(3,4,7,8-Me_4phen)_2]Cl$ значајно повећава хидрофобност, што омогућава лакши унос у туморске ћелије. Овај фотоактивни комплекс ефикасно инхибира раст ћелија меланома.¹²²⁻¹²⁴

Посебно се истичу и комплекси са *dppz* (2,3-bis(пиридин-2-ил)пиридо[3,2-f]хиназолин) лигандом, који показују изузетну фототоксичност према ћелијама тумора грла, простате и плућа. Њихова селективност и способност да изазову токсичност искључиво под дејством светлости чине их обећавајућим кандидатима за фотодинамичку терапију.¹²⁴



Слика 2.7. Структуре дихлорородијум(III) комплекса: 1. $cis-[RhCl_2(3,4,7,8-Me_4phen)_2]^+$ и 2. $cis-[RhCl_2(dppz)(phen)]^+$.

2.3.3. Монохлоридородијум(III) комплекси

а) Циклопентадијенил комплекси

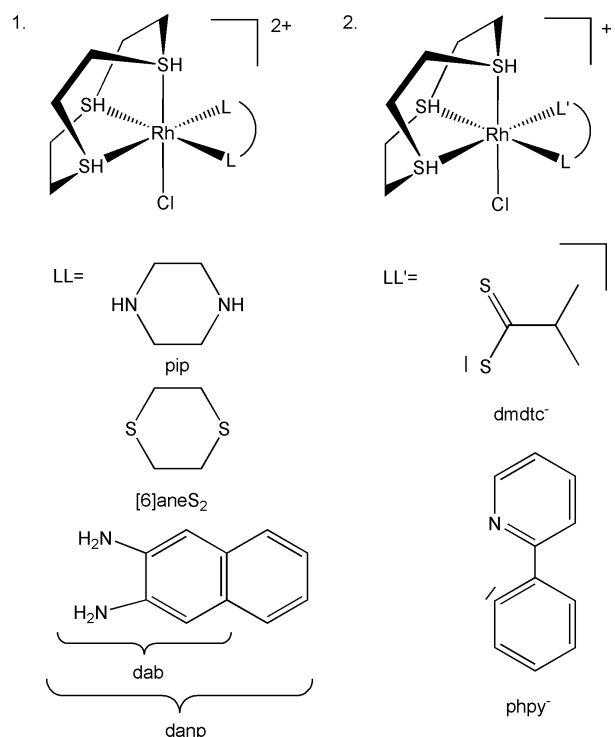
Замена три молекула воде у хексааква катјонским комплексима $[Rh(H_2O)_6]^{3+}$ са циклопентадијенил лигандима повећава лабилност преосталих аква лиганда, што се огледа у повећању константе брзине реакције супституције молекула воде за око 14 пута у односу на иницијални комплекс.¹²⁵ Комплекси са полипиридил лигандима, као што је $[(\eta^5-Cp^*)RhCl(pp)]^+$, брзо пролазе измену хлорида молекулом воде због *trans*- ефекта анјонског Cp^* лиганда. Претпоставља се да ће хлоридо комплекси бити доминантни у екстрацелуларним течностима, док ће активација бити повољнија у цитоплазми ћелије и у ћелијском језгру због Cl/H_2O размене.¹²⁶

Комплекси $[(\eta^5-Cp^*)RhCl(pp)](CF_3SO_3)$ показали су антипролиферативну активност према туморским ћелијама дојке, дебелог црева, и бубрега.¹²⁶⁻¹³² Комплекси са *dppz*, *phen* или 5,6-Me₂phen лигандима показују сличну антитуморску активност, при чему величина лиганда мало утиче на активност комплекса.¹²⁶⁻¹²⁹ Комплекси $Cp^*Rh(III)$ са анјонским лигандима као што су хинолин-2-карбоксилат (*qnoI*) испитани су као антитуморски агенси

на ћелијама меланома, глиобластома, као и туморским ћелијама дебелог црева.^{128,130-132} Комплекси са *прох* (N-метокси-2-метилпиридин) лигандом испољавају цитотоксичност изазивањем некрозе туморских ћелија, док комплекси са фенантролинским лигандима изазивају апоптозу туморских ћелија, уз повећање нивоа реактивних кисеоничних врста (ROS).^{128,131,132} Комплекси са фенантролинским лигандима показују различите ефекте на метаболизам туморских ћелија дојке, указујући на могућу интеракцију са ћелијским мембранама и митохондријама. Студије на изолованим митохондријама показале су да комплекси прекидају респирацију и ослобађају цитохром C, што указује на могући антимиохондријски ефекат.

б) Комплекси са тритиоциклононаном

Комплекси са 1,4,7-тритиоциклононаном показују занимљива својства у поређењу са аналогним $\text{Cr}^*\text{Rh(III)}$ комплексима,¹³³⁻¹³⁵ нарочито због ограничене способности цикличног тиостара $[\text{9}]_{\text{ane}}\text{S}_3$ да неутралише позитивно наелектрисање. Ова особина доводи до знатно споријих супституција хлорида молекулом воде унутар Rh(III) комплекса у поређењу са аналогним $\text{Cr}^*\text{Rh(III)}$ комплексима. Синтетисани су комплекси типа $[(\text{9}]_{\text{ane}}\text{S}_3)\text{RhCl(LL)}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$, као и монокатјонски комплекси са анјонским *dmdtc* и *phpy* лигандима, Слика 2.8.¹³⁶⁻¹³⁸ Истраживања сугеришу да се фрагменти $\{([\text{9}]_{\text{ane}}\text{S}_3)\text{-Rh(pp)}\}^{2+}$ преференцијално координују са *O* и *N* доворским атомима унутар ћелија.



Слика 2.8. Структуре комплекса типа 1: $[(\text{9}]_{\text{ane}}\text{S}_3)\text{-RhCl(LL)}](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$, где је LL = *pip* (пиперидин), $[\text{6}]_{\text{ane}}\text{S}_2$ (1,4-дитијајциклохексан), *dab* (1,2-диаминобензен) и *danp* (2,3-диаминонафтален), и комплекса типа 2: $[(\text{9}]_{\text{ane}}\text{S}_3)\text{-RhCl(LL')}] (\text{CF}_3\text{SO}_3)$, где је LL' = *dmdtc* (диметилдитиокарбамат) и *phpy* (2-фенилпиридинат).

Антипролиферативна активност ових комплекса зависи од типа лиганда, као што су *bpy*, *phen*, *dpq* и *dppz*.^{136,139,140} За *dppz* и *dpq* комплексе се претпоставља да значајну улогу у њиховом механизму деловања имају ДНК интеракције. Комплекси са *bpy*, *bpm* и *tap* показују изненађујуће високу активност. Поред тога, *bpm* и $[6]aneS_2$ комплекси су индуковали високе нивое реактивних кисеоничних врста (ROS), што сугерише да присуство ароматичног хелатног лиганда није предуслов за индукцију ROS.

в) Комплекси са три(пиразолил)метаном

Ефекат на биолошку активност полусендвич $Rh(III)$ комплекса коришћењем *tpm* (три(пиридил)метиламид) лиганда проучаван је за комплексе опште формуле $[(tpm)RhCl(LL)]X_2$ ($LL = dab, bpm, tap, dpq, dppz$; $X = Cl$; $LL = bpy, phen$; $X = PF_6$).^{141,142} Примећена је корелација између активности и површине лиганда у серији *phen*, *dpq* и *dppz*, а ДНК интеркалација потврђена је за *dppz* комплекс. Цитотоксичност комплекса $[(tpm)RhCl(dppz)]Cl_2$ према ћелијама тумора бубрега, дојке и дебелог црева била је знатно већа у поређењу са здравим ћелијама, указујући на селективност при деловању. Поређење ефеката различитих *fac* колиганда на активност полусендвич $Rh(III)$ комплекса са *pp* показало је следеће:

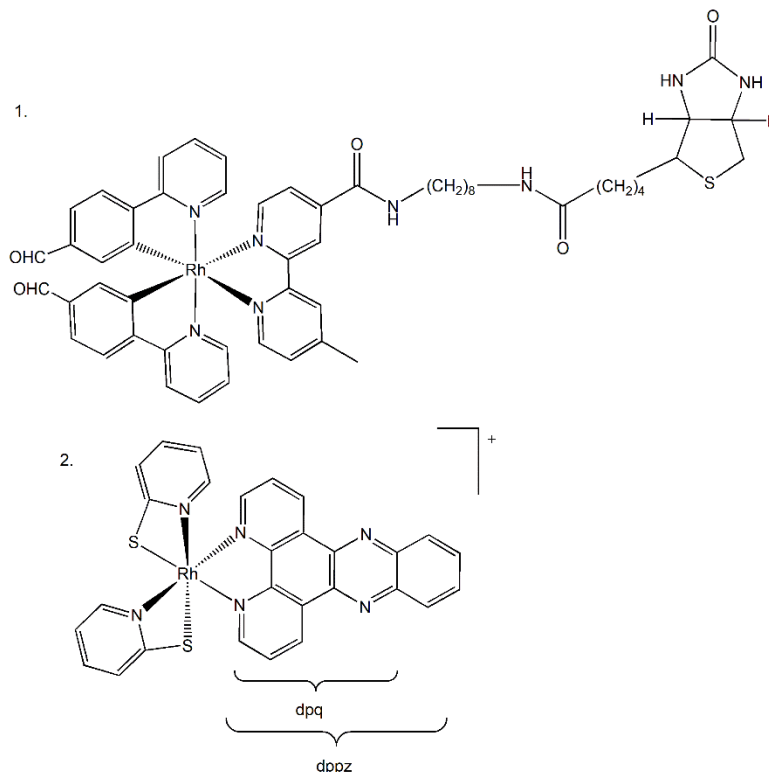
- Cp^* и *tpm* су значајно активнији од $[9]aneS_3$ за *pp* = *bpy*,
- *tpm* и $[9]aneS_3$ су активнији од Cp^* за *pp* = *phen*,
- $[9]aneS_3$ је активнији од Cp^* и *tpm* за *pp* = *dpq*,
- $[9]aneS_3$ је активнији од Cp^* и *tpm* за *pp* = *dppz*.

Повећана цитотоксичност *tpm* лиганда у серији *bpy*–*dppz* може се објаснити његовом већом хидрофобношћу. Унос комплекса $[(tpm)RhCl(dpq)]Cl_2$ у туморске ћелије био је значајано увећан у поређењу са уносом његовог $CpRh(III)$ аналога.

2.3.4. Супституционо инертни $Rh(III)$ комплекси

Синтетисани су различити инертни комплекси $Rh(III)$ као структурни аналози познатих антитуморских лекова или као супстрати за активна места ензима.¹⁴³⁻¹⁴⁷ У одсуству редокс активности, њихов механизам деловања зависи од нековалентних интеракција као што су интеркалација или формирање водоничних веза. Поређењем цитотоксичности комплекса типа $[(\eta^5-Cp^*)-RhL(pp)]^+$ ($L = Cl$, *pp* = *dpq*–*dppn*) са комплексима који садрже јаке нуклеофиле, као што су *TMTU*, 1-бензентхиолат (*BS*) и 2-нафталентиолат (*NpS*), показано је да иако су *TMTU* комплекси боље улазили у ћелије, њихова цитотоксичност према ћелијама тумора дојке и дебелог црева остала је слична хлоридо комплексима.¹²⁹ Комплекс $[(\eta^5-Cp^*)Rh(TMTU)(dppz)](CF_3SO_3)_2$ показује јако интеркалационо својство, док интрамолекуларске π – π интеракције у комплексима $[(\eta^5-Cp^*)-Rh(L)(dppz)](CF_3SO_3)$ спречавају интеркалацију ових комплекса. Комплекси $Rh(III)$ са *BS* и *NpS* показују већу активност према ћелијама тумора дојке, док су мање ефикасни против брзо пролиферирајућих ћелија тумора дебелог црева. Ова разлика у активности може бити резултат повећане липофилности, коју узрокују ароматични прстенови у комплексима, што побољшава њихову способност да циљају ћелије тумора дојке.^{129,143-147}

Луменисцентни три(хелатни) Rh(III) комплекси са супстратима као што су индол и биотин показују сличну цитотоксичност као цисплатина према туморским ћелијама дебелог црева.¹⁴³⁻¹⁴⁷ Комплекси са биотином су показали нешто већу цитотоксичност у поређењу са комплексима који садрже само дуг хидрокарбонски ланац или индолску групу, Слика 2.9.



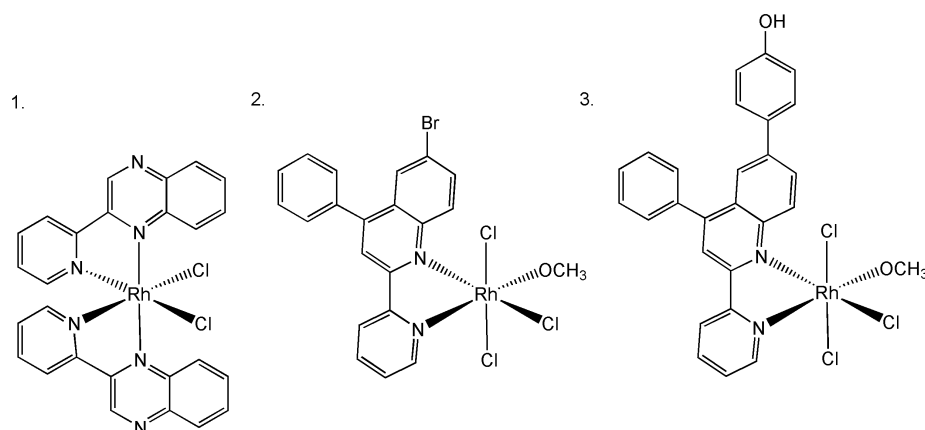
Слика 2.9. Структуре комплекса: 1. луменисцентни биотинилато Rh(III) *bis*(пиридилбензалдехид) фрагменат и 2. комплекс OC-6-23-[Rh(2-S-*py*)₂(*pp*)]Cl, где је 2-S-*py* = пиридин-2-тиолат, а *pp* = *dpq*, *dppz*.

Супституционално инертни три(хелатни) са *pp* лигандима циљају специфичне секвенце ДНК, показујући значајну цитотоксичност и висок унос у ћелије.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Доказана је висока цитотоксичност Rh(III) три(хелатора) типа [Rh{(CH₃)₂NCS₂)₂(*pp*)]⁺ и OC-6-23-[Rh(2-S-*py*)₂(*pp*)]⁺ према туморским ћелијама дојке и дебелог црева.¹⁵¹⁻¹⁵³

2.3.5. Комплекси Rh(III) инхибитори инфламаторних медијатора

Инхибитори инфламаторних медијатора, као што су PAF и тромбин, играју важну улогу у контроли упалних процеса. PAF је глицерофосфолипидни медијатор који учествује у бројним физиолошким процесима, али у прекомерним количинама може довести до упале и изазвати алергије, дијабетес, астму и тумор.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Тромбин је ензим који учествује у згрушавању крви, конвертујући фибриноген у фибрин.¹⁵⁷ Октаедарски комплекс родијума приказан на Слици 2.10. под бројем 1 показао је значајну инхибиторну активност PAF-ом

индуковане агрегације тромбоцита (PRP) и тромбином индуковане агрегације.^{158,159} Доказано је да број бидентатних лиганата, као и октаедарска структура комплекса, утичу на њихову биолошку активност.



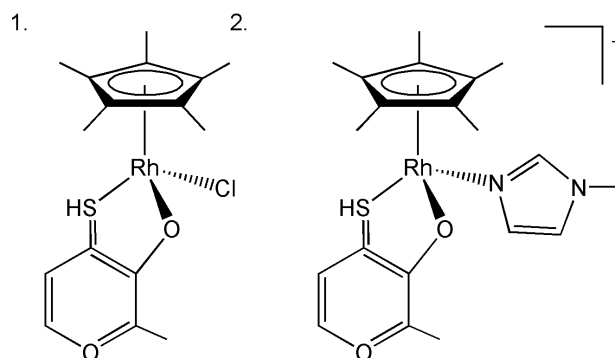
Слика 2.10. Структуре комплекса *cis*-[Rh(L1)₂Cl₂]Cl (1), [Rh(L4)(CH₃O)Cl₃]Cl (2), и [Rh(L5)(CH₃O)Cl₃]Cl (3).

Комплекси 2 и 3 са Сlike 2.10. показали су значајну биолошку активност, при чему је комплекс 2 показао већу инхибиторну активност у поређењу са комплексом 3.^{160,161} Поређење активности комплекса са једним бидентатним *N*[^]*N* лигандом са комплексом 1 који има два бидентатна лиганда, показало је да присуство бидентатних лиганата утиче на инхибиторну активност. Такође, присуство бромидо супституента значајно повећава инхибиторну активност комплекса 2 у односу на комплекс 3.

2.3.6. Комплекси Rh(III) инхибитори изомераза

Топоизомераза IIα (topoIIα, Top2) је есенцијални ензим у репликацији ДНК, који представља значајну мету при терапији различитих типова тумора, укључујући туморе дојке, плућа, простате, саркоме и хематолошке малигнитете.¹⁶² Откриће лекова као што су етапозид и доксорубин, који делују кроз специфичну интеракцију са топоизомеразом II, подстакло је интензивна истраживања нових лекова са сличним механизмом деловања.^{163,164}

Два Rh(III) комплекса на бази тиомалтола, означена као комплекс 1 и комплекс 2, Слика 2.11., испољавају инхибиторски ефекат каталитичке активности топоизомеразе II.¹⁶² Њихова активност је проучавана на ћелијским линијама тумора плућа, дебелог црева, дојке и саркома, где су оба комплекса показала способност интеракције са ДНК и изазивања прелома двоструког ланца. Комплекс 2 је показао већу активност у поређењу са својим хлоридним аналогом, комплексом 1. Додатно, комплекс 2 је довео и до благог повећања нивоа реактивних кисеоничких врста (ROS), што је вероватно допринело већој стопи прелома ДНК у туморским ћелијама. У поређењу са мербароном, познатим инхибитором топоизомеразе II, оба комплекса су значајно индуковала апоптозу ћелија.¹⁶⁵



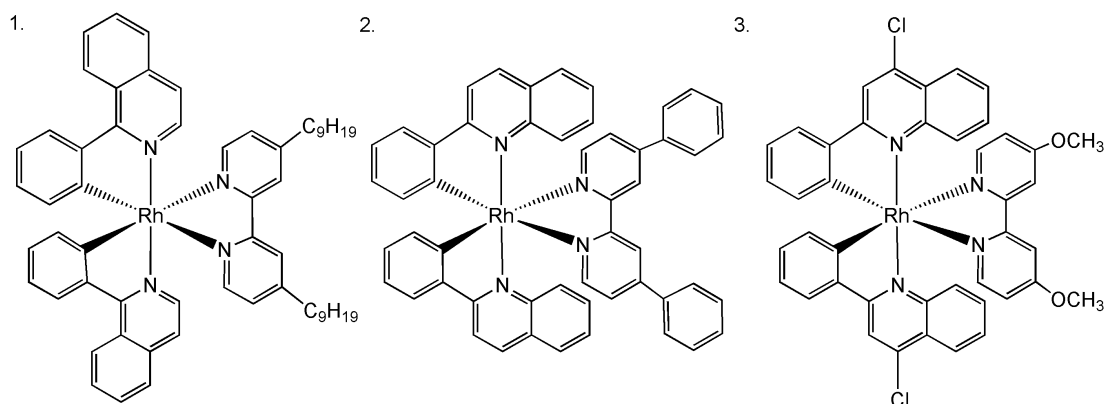
Слика 2.11. Структуре комплекса родијума који садрже тиомалтолову групу и делују као инхибитори топоизомеразе IIa.

2.3.7. Комплекси Rh(III) инхибитори деметилаза

Деметилазе су ензими одговорни за уклањање метил група са нуклеинских киселина, протеина и других молекула. Ови ензими имају кључну улогу у регулацији различитих ћелијских процеса, укључујући пролиферацију, диференцијацију и апоптозу.^{166,167} Протеин JMJD3, као проинфламаторни модулатор, посебно је значајан у овом контексту. Комплекс Rh(III), означен као комплекс 1, Слика 2.12., представља први селективни инхибитор JMJD3 на бази метала. У поређењу са већином JMJD3 инхибитора, који често нису селективни према деметилазама са JMJD доменом, комплекс 1 показује изузетну селективност.^{168,169}

Лизин-специфична деметилаза 5A (KDM5A) је ензим чија је хиперекспресија повезана са повећаном пролиферацијом, метастазама и отпорношћу на терапије код тумора дојке, простате и плућа.¹⁷⁰ Комплекс 2 са Сlike 2.12., представља први комплекс метала који делује као селективан, потентан и директан инхибитор KDM5A.¹⁷¹ Централни јон метала у овом комплексу игра кључну улогу у инхибицији активности KDM5A и заустављању ћелијског циклуса у G1 фази. Овај комплекс показује значајно антипролиферативно дејство на ћелијским линијама рака дојке.

Лизин-специфична хистон деметилаза 1A (LSD1) је ензим чија је повишена експресија повезана са убрзаном пролиферацијом и метастазама туморских ћелија.¹⁷² Комплекс 3 са Сlike 2.12., представља снажан инхибитор LSD1 и уједно први инхибитор овог ензима на бази метала.¹⁷³⁻¹⁷⁵

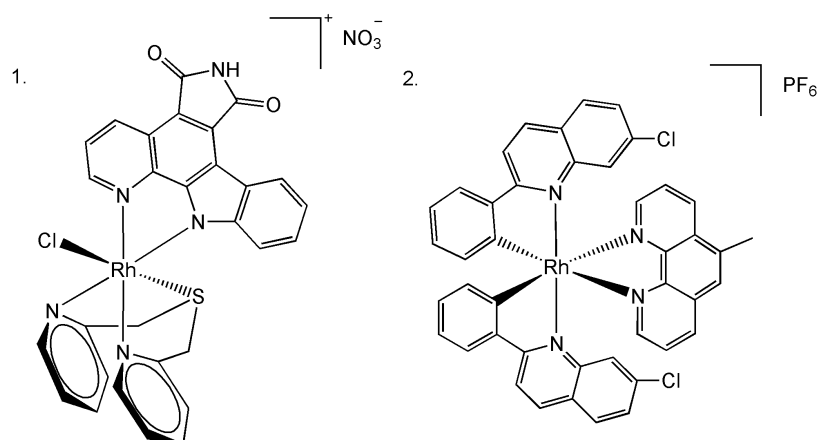


Слика 2.12. Структуре комплекса Rh(III) као првих селективних инхибитора димераза.

2.3.8. Комплекси Rh(III) инхибитори киназа

Протеинске киназе су ензими који катализују фосфорилацију протеина додавањем фосфатне групе са АТР-а на супstrate, чиме играју кључну улогу у метаболичким и сигналним путевима који регулишу бројне биолошке процесе. Инхибитори протеинских киназа могу се користити у терапији различитих болести, укључујући туморе, блокирањем активности једне или више протеинских киназа.^{175,176} Пиридокарбазол комплекси Rh(III) са ацикличним тридентатним лигандима показују потенцијал као инхибитори протеинских киназа. Комплекс 1, Слика 2.13., показао је снажну инхибицију Pim1 киназе, смањујући њену активност на мање од 1%.^{177,178}

Wee1 киназа, која игра кључну улогу у расту и деоби ћелија на прелазу G2/M, представља потенцијалну молекуларну мету за туморе дојке.^{179,180} Комплекс 2, Слика 2.13., показао је значајну моћ инхибиције Wee1 киназе, изазивајући смањену фосфорилацију и инхибирајући њену активност у *in vitro* условима.¹⁸¹

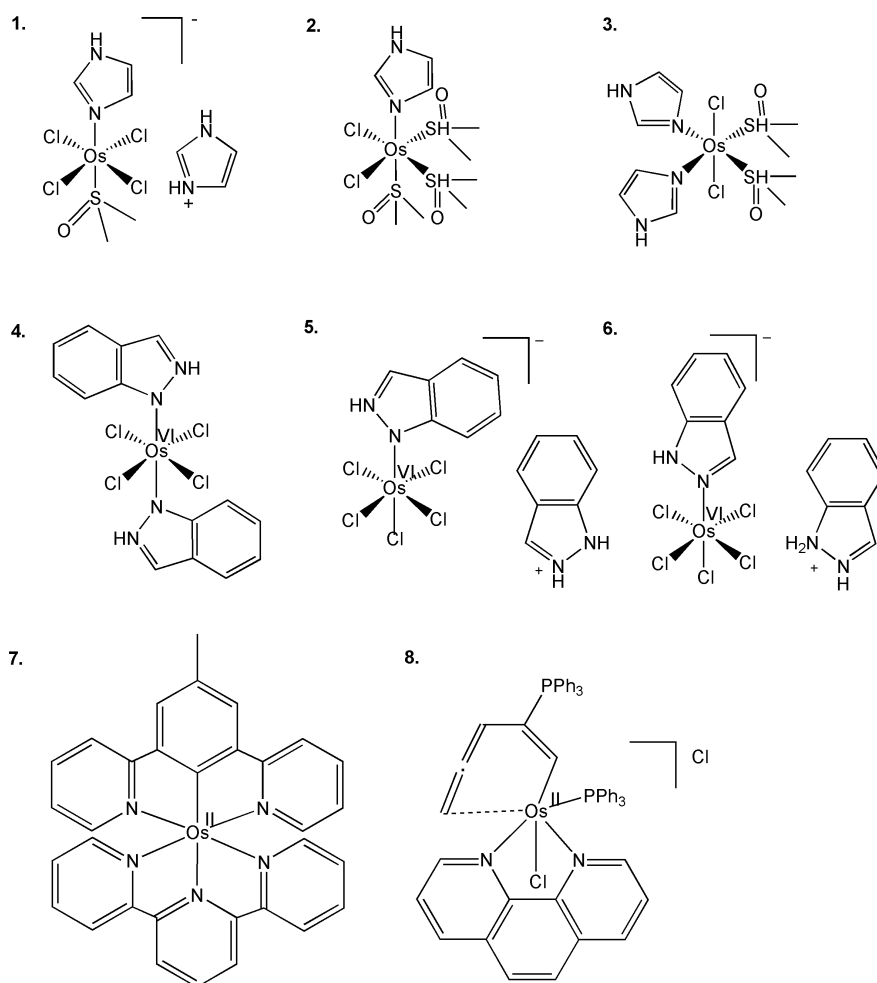


Слика 2.13. Структуре комплекса Rh(III) који показују антитуморску активност као инхибитори киназа.

Антитуморски потенцијал комплекса родијума дуго је био недовољно истражен. Иако су ови комплекси показали значајну стабилност и хемијску инертност, њихова примена у медицинским истраживањима углавном је била занемарена у корист комплекса платине и рутенијума. Међутим, последњих година, интересовање за комплексе родијума је порасло због њихових јединствених карактеристика, које омогућавају развој нових антитуморских агенаса са специфичним биолошким својствима. Ови комплекси су показали обећавајућу антитуморску активност путем интеракције са ДНК или протеинима, инхибиције ензима, индукције оксидативног стреса, фотоцитотоксичности и активирања путева апоптозе. Међутим, механизам њиховог деловања још увек није у потпуности разјашњен, што наглашава потребу за даљим истраживањима у циљу бољег разумевања њиховог деловања у организму.

2.4. АНТИТУМОРСКА СВОЈСТАВА КОМПЛЕКСА ОСМИЈУМА

Осмијум, најтежи метал 8. групе Периодног система емелмената, представља обећавајућу алтернативу платини и рутенијуму у области антитуморске терапије.⁴¹⁻⁴³ Комплекси осмијума, које одликују склоност ка вишим оксидационим стањима, спорија кинетика при размени лиганата, јача π -донација у нижим оксидационим стањима и интензивно купловање спин орбитала, показују потенцијал као антитуморски агенси, циљано делујући на ћелије тумора и спречавајући њихов раст и дељење.¹⁸²⁻¹⁸⁶ Иако механизам деловања комплекса осмијума још увек није у потпуности разјашњен, верује се да антитуморску активност показују интеракцијом са молекулом ДНК у туморским ћелијама, узрокујући њене промене у структури и функцији. Поред тога, комплекси осмијума показали су антитуморску активност и везивањем за одређене протеине. Иако се комплекси осмијума још увек не примењују у клиничкој пракси, истраживања указују на значајан потенцијал у лечењу малигних тумора. При синтези комплекса осмијума коришћени су различити синтетички приступи и системи лиганата, често с циљем добијања структурних аналога добро проучених комплекса рутенијума. Ова истраживања довела су до развоја широког спектра структурно разноврсних комплекса осмијума, укључујући моноклеарне формације, полинуклеарне кластере и оргаоосмијум једињења, која су карактеристична по разноврсним хемијским и биолошким својствима, Слика 2.14.¹⁸⁷⁻¹⁹¹



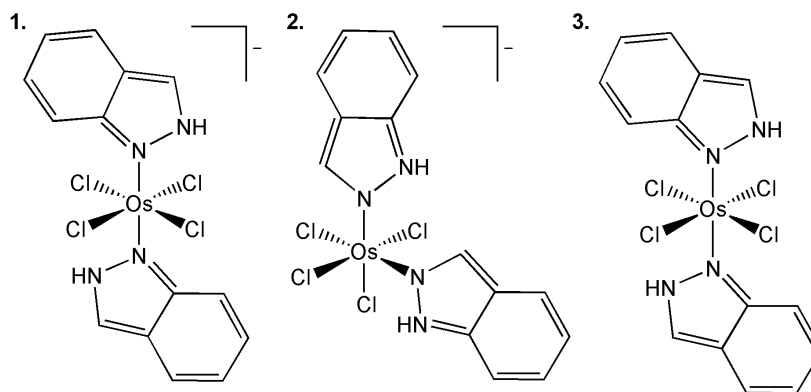
Слика 2.14. Структурне формуле комплекса осмијума аналогни комплексима рутенијума.

2.4.1. Комплекси осмијума као аналози NAMI-A и KP1019

Комплекси Ru(III), попут NAMI-A, KP1019 и KP1339, послужили су као темељ за истраживање и развој структурних аналога осмијума, са циљем унапређења њихових биолошких својстава. У поређењу са једињењима рутенијума, комплекси осмијума, нарочито Os(II) и Os(III), истичу се својом изузетном отпорношћу на хидролизу, чак и у растворима који не садрже хлориде.^{183,192-197} Ова отпорност доводи до битних разлика у биолошкој активности. На пример, Os(II) комплекси који садрже више диметил-сулфоксидних (DMSO) лиганда показују ниску биолошку активност, док је Os(III) аналог NAMI-A показао значајну антипролиферативну активност, која превазилази активност сличних комплекса рутенијума.^{183,192-197}

Истраживања су показала да, у поређењу са комплексима рутенијума, као што је NAMI-A, аналогни комплекси осмијума показују већу цитотоксичност путем другачијег механизма деловања.¹⁹² Док NAMI-A брзо хидролизује у различите облике рутенијума под физиолошким условима, што омогућава лак улазак у ћелије и постизање фармаколошких ефеката, аналогни комплекси осмијума су инертнији. Али упркос томе што не хидролизују, они показују већу цитотоксичност у *in vitro* условима. Ова открића су била изненађујућа и указују на то да хидролиза можда није пресудна за биолошку активност комплекса осмијума, што отвара нове могућности за развој антитуморских лекова на бази осмијума.¹⁹³

У истраживању односа структуре и активности између KP1019 и аналогних комплекса осмијума, посебан фокус је био на аналогним Os(IV) комплексима опште формуле $[\text{Os}^{\text{IV}}\text{Cl}_4(\text{Hazol})_2]$, где „Hazol“ лиганди представљају 1H-пиразол, 2H-индазол, 1H-имидазол и 1H-бензамидазол.^{185,194} Ови комплекси су показали инертност у воденим растворима и сличну биолошку активност према туморским ћелијама као и KP1019. За Os(IV) аналоге са индазолом, утврђено је да се индазол везује преко N1 атома у комплексима $[\text{Os}^{\text{IV}}\text{Cl}_4(2\text{H-indazole})_2]$ и $(\text{H}_2\text{Ind})[\text{Os}^{\text{IV}}\text{Cl}_5(2\text{H-indazole})]$, или преко N2 атома у $(\text{H}_2\text{Ind})[\text{Os}^{\text{IV}}\text{Cl}_5(1\text{H-indazole})]$. Комплекси осмијума су при испитивању *in vivo* активности показали или инхибицију раста туморских ћелија или смањење некрозе тумора уз продужење животног века миша.^{195,196} Оно што је занимљиво код ових комплекса (KP1019 аналога) јесте доступност великог броја изомера који варирају у зависности од тога како се координује индазол лиганд.¹⁸³ На пример, *trans*-изомер 1, Слика 2.15., има 2H-индазол таутомер, док *cis*-изомер има 1H-индазол таутомер. Ова могућност да се 1H-индазол таутомеризује у 2H-индазол може бити од великог биолошког значаја. Комплекси 2 и 3 (Слика 1.15.) су мање цитотоксични, а самим тим и мање активни. Комплекс који се показао као најактивнији јесте *trans* 2H-индазол комплекс 1, Слика 1.15.



Слика 2.15. Структура 1H-индазол и 2H-индазол комплекса.

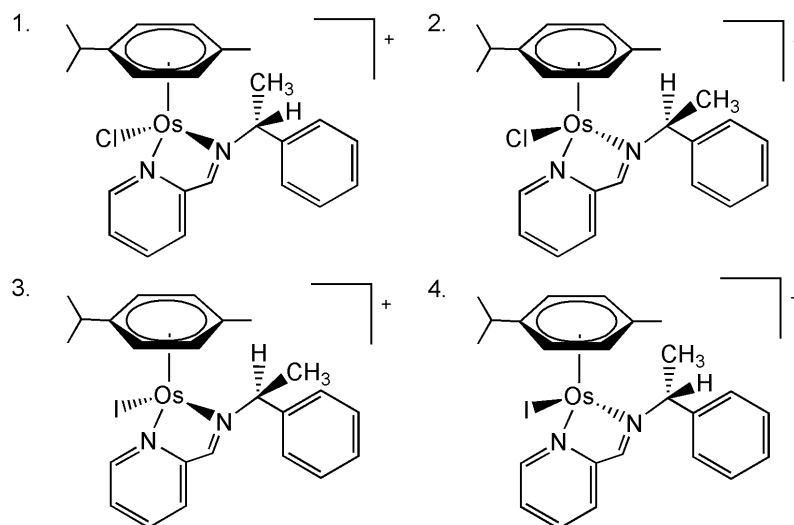
2.4.2. Os(II)-аренски комплекси

Os(II)-аренски комплекси представљају доста истражене стабилне комплексе осмијума који су показали обећавајућу антитуморску активност. Os(II)-аренски комплекси су често инертни према ваздуху, влаги и другим агресивним условима, чиме се омогућава већа примена.

Дејство путем редокс активности

Арена комплекси Os(II) опште формуле $[\text{Os}(\eta^6\text{-arene})(\text{XY})\text{Z}]^+$ (где је XY = азопиридински дериват, Z = Cl или I, а arene = *p*-цимен или бифенил) показују редокс активност формирањем реактивних облика кисеоника (POC) у ћелијама, при чему замена *p*-цимена са бифенилом и хлорида са јодидом значајно побољшава њихову антитуморску активност.¹⁹⁸ Бидентатни азопиридински (*azpy*) лиганд делује као σ -донор и снажан π -акцептор, тако да постоји снажна донација електрона из центра метала азопиридинском лиганду, што има значајан утицај на укупну реактивност комплекса. Азопиридински комплекси са електрон-донорским или електрон-акцепторским групама показују већу активност у поређењу са несупституисаним аналозима. Азопиридински лиганди по себи нису цитотоксични према туморским ћелијама јажника. Међутим, када су координовани са Os(II)(арена) фрагментима, испољавају антитуморску активност на ћелијске линије тумора јажника, дојке, простате, плућа, дебелог црева и бешике.¹⁹⁹ Комплекс $[\text{Os}(\eta^6\text{-}p\text{-цимен})(\text{Azpy-NMe}_2)\text{I}]\text{PF}_6$ (FY026) показао је десет пута већу антитуморску активност у поређењу са цисплатином. У *in vivo* тестовима успорио је раст туморских ћелија дебелог црева без примећене токсичности у другим органима.^{200,201}

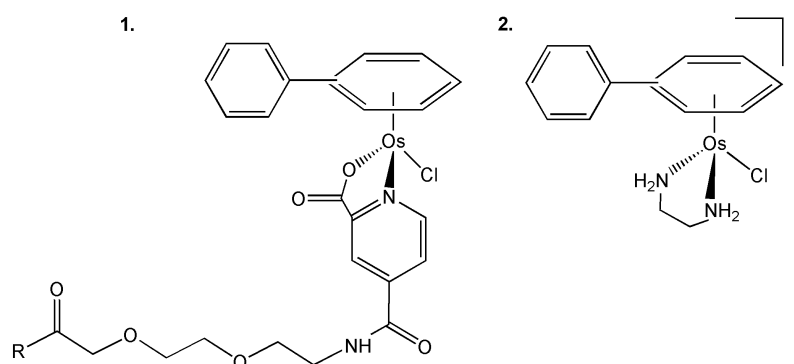
Увођење иминопиридинских *N,N'*-лиганада уместо азопиридинских довело је до развоја Os(II) комплекса са сличном активношћу, који хидролизују и накнадно се везују за гуанин.^{199,202} Активни иминопиридински комплекси су изазвали значајно повећање нивоа POC у туморским ћелијама.^{203,204} Истраживања њихове редокс активности показала су да ови комплекси оксидују NADH у NAD^+ , што се може десити формирањем Os–H интермедијера у воденом раствору, доводећи до поремећаја редокс сигналних путева у туморским ћелијама. Код комплекса Os(II) са пиколонатама опште формуле $[(\eta^6\text{-arene})\text{Os}(\text{pic})\text{Cl}]$, где је $\eta^6\text{-arene}$ бензен, бифенил или *p*-цимен, а pic 2-пиколинска киселина, активност зависи пре свега од халогених лиганда, Слика 2.16.²⁰⁵ Комплекси осмијума са јодидо лигандом (3 и 4) су значајно активнији, показујући већу селективност према туморским ћелијама у односу на здраве ћелије. Ово откриће наглашава значај халогених лиганда у дизајну антитуморских агенаса на бази осмијума.



Слика 2.16. Комплекси осмијума са р-цименом као лигандом.

Дејство путем везивања за ДНК

Поједини арена комплекси осмијума испољавају активност преко везивања за ДНК.²⁰⁵⁻²⁰⁹ Аренски комплекс Os(II) са пиколонатама, представљен као 1 на Слици 2.17., показао је цитотоксичност сличну карбоплатини према туморским ћелијама јајника. Овај комплекс садржи бидентатно везан пиколилат лиганд коњугован са октреотидом (у структури обележен са R), цикличним пептидом који се везује за соматостатински рецептор. Важно је напоменути да је овај рецептор прекомерно изражен код малигних тумора, што га чини кључном метом за тумор-селективне агенсе.²¹¹⁻¹³



Слика 2.17. Аренски комплекси осмијума који су показали антитуморску активност преко ДНК интеракције.

Осмијум аналог комплексу рутенијума RM175, $[(\eta^6\text{-biphenyl})\text{Os}(\text{en})\text{Cl}]\text{PF}_6$, приказан на Слици 2.17. под бројем 2, је показао обећавајућу антипролиферативну активност према ћелијама тумора плућа и јајника, и то у ниском микромоларном опсегу.^{40,210,211} Овај аренски комплекс Os(II) везује се за гуанин из ДНК, што је очекивано, али је интересно откриће

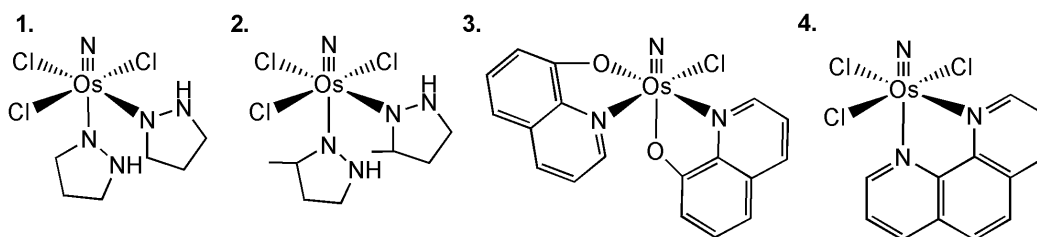
да се такође везује и за цитозин, што је необично за лекове на бази метала и указује на разлику у активности овог комплекса осмијума у односу на комплексе платине.

Занимљиво је и да замена неутралног *N,N*-везаног етилендиамина са ањонским *O,O*-лигандом доводи до стварања осмијум-аренских комплекса са изузетно ниском цитотоксичношћу и брзим стопама хидролизе. Ниска активност комплекса осмијума са *O,O*-лигандима приписана је њиховој малој стабилности у воденом раствору и накнадном формирању неактивног комплекса $[(\eta^6\text{-arena})\text{Os}(\mu\text{-OH})_3\text{Os}(\eta^6\text{-arena})]^+$.^{212,213} Кординацијом *S,N*-хелатних лиганда са Os(II) (арена) фрагментима настају изузетно стабилни комплекси који су погодни за оралну примену. Os(II) -арена комплекси са ањонским *N,O*-лигандима су показали значајну стабилност у воденим растворима.^{214,215}

2.4.3. Осмијум нитридо комплекси

Осмијум нитридо комплекси су познати по великој стабилности и инертности према атмосферским условима и другим реактивним агенсима, што олакшава руковање и складиштење, чинећи их идеалним за индустријску примену. Нитридо лиганди делују као јаки π -акцепторски лиганди, у интеракцији са *d*-орбиталама јона метала, и утичу на електронску структуру и реактивност. Сходно томе, ови комплекси се могу подвргнути разноврсним хемијских реакција. Осмијум у овим комплексима има оксидационо стање +6 и гради стабилну троструку Os-N везу. Док су се раније ови комплекси користили искључиво у реакцијама преноса азотових атома у катализи, откривено је да одређени комплекси поседују антитуморска својства.²¹⁶⁻²¹⁸

На Слици 2.18. приказани су Os(VI) нитридо комплекси са пиразол лигандима (1 и 2), Os(VI) нитридо комплекс са кинолинато лигандом (3) и Os(VI) нитридо комплекс са дииминским лигандом (4), који су показали значајну антитуморску активност.^{218,219} Истраживања су показала да нитридо комплекси осмијума делују на туморске ћелије тако што индукују апоптозу кроз ометање ћелијских путева и инхибирање њихове пролиферације. Велика стабилност и ниска цитотоксичност према здравим ћелијама чине ове комплексе перспективним кандидатима за развој нових хемиотерапеутских лекова.



Слика 2.18. Os(VI) нитридо комплекси који су показали цитотоксичну активност.

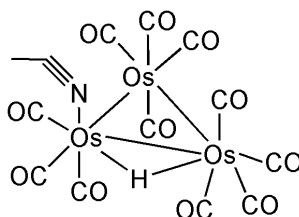
Упркос потенцијалним предностима, синтеза и карактеризација осмијум нитридо комплекса може бити изазовна због осетљивости лиганд-метал интеракција и потенцијалног формирања више изомера. Пажљив одабир лиганда и реакционих услова је

кључан за добијање чистих и добро дефинисаних комплекса за даље проучавање и примену у антитуморској терапији.

2.4.4. Осмијум карбонил комплекси

Карбонил комплекси осмијума представљају интересантну класу једињења, а одликују се разноврсним структурама и реактивностима.^{187-191,220} Једна од кључних карактеристика осмијум карбонил комплекса је њихова способност да формирају стабилне метал-метал везе, што може довести до формирања димерних или олигомерних структура. Метал-метал интеракције играју значајну улогу у одређивању реактивности и селективности комплекса, што је од пресудне важности у контексту антитуморске терапије.

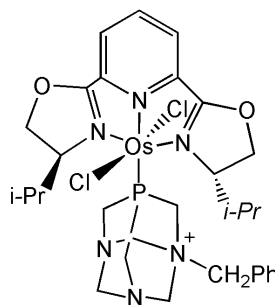
Тризонијум карбонилни кластери осмијума показали су значајну антитуморску активност према туморским ћелијама дојке у условима смањеног нивоа естрогена.^{188,189} Комплекс приказан на Слици 2.19. је показао највећу цитотоксичност и узроковао апоптозу туморских ћелија. За цитотоксичност ових једињења је битно присуство лабилне ацетонитрилне групе која олакшава формирање ковалентних биолошких адуката.²²⁰ Ослобађање угљен-моноксида такође би могло додатно повећати цитотоксичност, али да би се ова претпоставка потврдила потребно је спровести додатна истраживања и клиничка испитивања.



Слика 2.19. Осмијум карбонил кластер који је показао значајну антитуморску активност.

2.4.5. Осмијум PBOX комплекси

PBOX комплекси рутенијума који садрже фосфин лиганд (РТА) показали су добру антитуморску активност и растворљивост. Из тог разлога је испитана и антитуморска активност Os(II) комплекса који садрже РТА и *S,S*-пибокс лиганде. Комплекси осмијума који су аналогни RАРТА-С комплексу рутенијума ($\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cymene})\text{Cl}_2(\text{TRP})$) показују способност интеракције са протеинима преко ДНК, што је кључно за њихову антитуморску активност.^{182,221-225} Комплекс приказан на Слици 2.20. показао је највећу цитотоксичност ка ћелијама тумора грлића материце у микромоларном распону уз индукцију апоптозе попут аналогног комплекса рутенијума. Са аспекта селективности, комплекс осмијума аналоган RАРТА-С показао је изражену селективност према туморским ћелијама, што указује на његову способност да циљано нападне и уништи туморске ћелије, смањујући истовремено оштећење здравих ћелија.



Слика 2.20. Један од најактивнијих пибокс комплекс осмијума.

Антитуморски потенцијал комплекса осмијума дуго је био недовољно истражен. Иако су ови комплекси показали изузетну стабилност и инертност према хидролизи и замени лиганда, углавном су проучавани као инертни модели ради бољег разумевања механизма деловања комплекса рутенијума. Ипак, интересовање за комплексе осмијума значајно је порасло последњих година, јер њихова јединствена својства отварају могућности за дизајн нових једињења са занимљивим биолошким карактеристикама. Ови комплекси су показали антитуморску активност кроз везивање за ДНК или протеине, стварање реактивних врста и индукцију апоптозе. Међутим, прецизан механизам њиховог деловања још увек није у потпуности разјашњен, што захтева додатна истраживања ради бољег разумевања њиховог деловања у организму.

2.5. ЈОНСКЕ ТЕЧНОСТИ

Увођење новог лека на тржиште праћено је бројним изазовима. Један од највећих изазова је повећање растворљивости лекова са слабом растворљивошћу у води и ограниченом апсорпцијом у гастроинтестиналном тракту. Растворљивост је кључна за биорасположивост лека, што је разлог због којег се истраживања све више усмеравају на развој метода за њено побољшање. Класични растварачи попут диметил сулфоксида (DMSO), диметилформамида (DMF) и пиридина су ефикасни у растварању тешко растворљивих супстанци, али због своје токсичности, запаљивости и испарљивости нису погодни за употребу.²²⁶ Зато је неопходно истраживање нових, биокompatibilних растварача који могу побољшати биофармацеутске перформансе лекова без изазивања штетних ефеката.

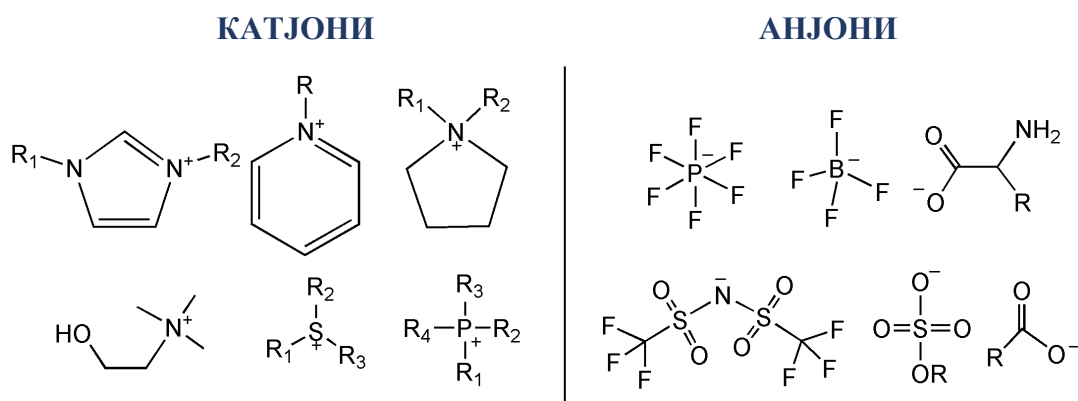
Појава јонских течности (IL) пружила је нову перспективу за лекове са недовољном растворљивошћу и биорасположивошћу.²²⁶⁻²⁴⁴ Интересовање за примену јонских течности у формулацијама лекова расте због њихових повољних карактеристика, као што су лакоћа синтезе и могућност прилагођавања физичко-хемијских и биолошких својстава. Јонске течности одликује незапаљива природа, хемијска и термичка стабилност, као и добра јонска проводљивост, што их чини обећавајућим за модификацију у складу са жељеним физичким, хемијским и биолошким својствима. Њихова употреба као растварача или косолвената може побољшати биорасположивост лекова, а такође могу служити као појачивачи

пермеабилности и стабилизатори протеина.²³⁴⁻²³⁶ Додатно, јонске течности се истражују и у области дијагностике и терапије тумора, што их чини значајним фактором у развоју савремених терапијских метода.^{231,238,239}

2.5.1. Опште карактеристике јонских течности

Јонске течности (IL) чине специфичну класу једињења која се дефинише као течности у потпуности састављене од јона са тачком топљења испод 100°C. Прва јонска течност, етиламонијум-нитрат ([EtNH₃]⁺NO₃⁻), откривена је 1914. године. Иако је била течна при собној температури, није привукла значајно интересовање у то време. Тек много касније, овај проналазак је довео до развоја нове класе растварача са изузетним својствима.²⁴⁰

Јонске течности се могу добити комбинацијом различитих катјона и анјона, а њихове карактеристике чине их занимљивим и еколошки прихватљивим. Ове течности нису експлозивне нити запаљиве, што их чини одличном заменом за токсичне и лако испарљиве органске раствараче, па се често називају и „зеленим“ растварачима.^{226,241} Избором одговарајућих јона могу се добити јонске течности са специфичним физичко-хемијским особинама. У већини случајева, јонске течности садрже велике асиметричне органске катјоне и органске или неорганске анјоне. Најчешће заступљени катјони су фосфонијум, сулфонијум, имидазолијум, пиридинијум, пиролидинијум, оксазолијум или пирозолијум. Као анјони најчешће се користе: *bis*(трифлуорометилсулфонил)имид, трифлуорометилсулфат, дицијанамида (N(CN)₂), тетрафлуороборат (BF₄⁻) и хексафлуорофосфат (PF₆⁻), Слика 2.21.^{240,241-244} Формирање јонских течности резултат је јонских интеракција и водоничних веза између катјона и анјона.



Слика 2.21. Структуре различитих катјона и анјона које улазе у састав јонских течности.

Јонске течности се одликују специфичним карактеристикама које произилазе из њихове структуре, као што су течно агрегатно стање, висока термичка и хемијска стабилност, низак напон паре и ниске тачке топљења, уз велику растворљивост органских и неорганских једињења.^{226,240,241}

Термичка стабилност и тачке топљења испод 100°C резултат су смањених електростатичких интеракција, слабе способности кристализације, асиметрије контрајона и дисперзије наелектрисања, што их чини јединственим растварачима са широким спектром примена. На термичку стабилност јонских течности већином утиче природа анјона, при чему се стабилност повећава са већом хидрофилношћу анјона. Избор несиметричног катјона доводи до ниже тачке топљења јонских течности. Такође, природа анјона значајно утиче на ову особину. Јонске течности које остају течне на собној температури познате су као RTIL (јонске течности на собној температури). Захваљујући ниском напону паре, јонске течности не испаравају лако и могу остати течне при температурама изнад 300 °C.^{226,240,241}

Због могућности прецизног подешавања својстава путем пажљивог одабира катјона и анјона, јонске течности се често описују као „дизајнерски растварачи“.²⁴⁰ Ова флексибилност омогућава јонским течностима да се прилагоде специфичним потребама, пружајући им значајне предности у односу на конвенционалне раствараче и доприносећи њиховом еколошки прихватљивијем профилу.

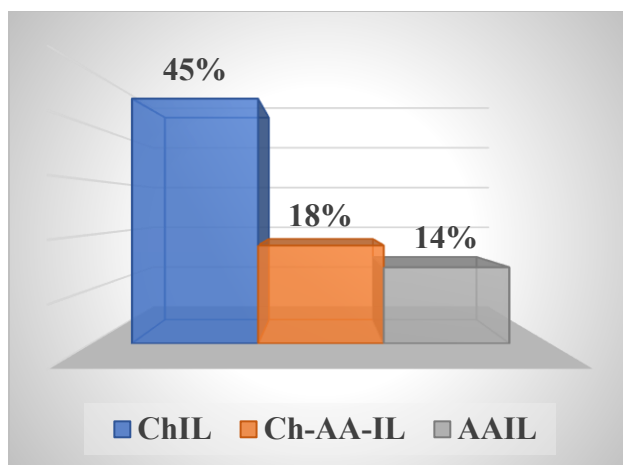
2.5.2. Биокомпатибилне јонске течности

Већина јонских течности (IL) које садрже имидазолијум, фосфонијум и пиридинијум катјоне карактерише се одређеном токсичношћу и ниском биоразградљивошћу, што ограничава њихову примену у фармацији и медицини. Због тога је развијен концепт биокомпатибилних јонских течности (Bio-IL), које представљају еколошки прихватљиву и одрживу алтернативу за употребу у медицинским и другим индустријским процесима.^{241,245-249}

Синтеза Bio-IL укључује употребу природних производа, примарне и секундарне метаболите, њихове синтетичке аналоге, активне фармацеутске састојке и друга биоактивна једињења. Природне супстанце, као што су органске киселине, шећери, аминокиселине, терпени и пурини, често се користе при синтези Bio-IL. Примена природних производа у синтези IL је у складу са принципима зелене хемије, што је довело до значајног интересовања за Bio-IL.²⁴⁵⁻²⁴⁹

Последњих година, научна истраживања су усмерена на дизајн биоразградивих и биокомпатибилних IL (Bio-IL), које налазе примену у различитим областима: као растварачи и/или катализатори у хемијским реакцијама, биокатализи, у нанотехнологији, а недавно су истраживане за употребу у биомедицинским областима. Висока стабилност и биокомпатибилност јонских течности чине их погодним за примену као активних фармацеутских састојака и/или носача (емулзије, микроемулзије) у различитим иновативним системима за испоруку лекова.²²⁶⁻²⁴²

Истраживања од 2020. године углавном су била усмерена на јонске течности базиране на холину (ChIL),²⁴⁹⁻²⁵² 45% свих објављених радова, Слика 2.22. Јонске течности на бази аминокиселина (AAIL),²⁵³⁻²⁵⁴ као нови и перспективни зелени медијуми, чиниле су 14% истраживања. Такође, истражене су и комбинације холина и аминокиселина за синтезу био-базираних јонских течности, односно Ch-AA-IL.



Слика 2.22. Класификација Bio-ILa на основу њиховог састава који се помињу у литератури за период између 2020. и 2022. године.

Холин је природни есенцијалан метаболит који игра кључну улогу у синтези ацетилхолина, неуротрансмитера важног за функционисање нервног система, метаболизму липида и одржавању интегритета ћелијских мембрана, чиме доприноси здрављу и нормалном функционисању организма.²⁵⁵ Јонске течности на бази холина су нарочито значајне због своје биокompatбилности, што подразумева њихову способност да се безбедно користе у биолошким системима. Ниска токсичност и лако разлагање у природним условима чине их погодним за примене у медицинским и еколошким контекстима.^{249-252,256,257}

2.5.3. Јонске течности и комплекси метала

Јонске течности, као неконвенционални растварачи, имају значајан утицај на различите хемијске реакције, укључујући неорганске, органске и електрохемијске процесе. Истраживање активности комплекса метала у различитим растворима, нарочито у јонским течностима, је од великог значаја за оптимизацију својстава и реактивности комплекса. Такође, разумевање ових интеракција може отворити нове могућности за њихову примену у различитим научним и индустријским областима.

Истраживање утицаја јонских течности на реактивност комплекса метала започето је проучавањем кинетике и механизма брзих супституционих реакција Pd(II) комплекса, $[\text{Pd}(\text{terpy})\text{Cl}]^+$, где је *terpy* 2,2':6',2''-терпиридин.^{258,259} Испитиване су супституционе реакције различитих неутралних и ајонских нуклеофила у јонским течностима које као катјон садрже $[\text{emim}]^+$ (1-етил-3-метилимидазолијум), и различите ајоне (EtOSO_3 , NTf_2 , dca , итд.). У поређењу са воденим растворима, брзине реакција у јонским течностима су биле знатно смањене због интеракција између ајона јонских течности и електрофилног центра паладијума, које отежавају приступ нуклеофила центру метала. Висок вискозитет јонских течности такође је допринео успоравању реакција због споријег дифузионог кретања. Код ајонских нуклеофила уочена је формација јонских парова који утичу на кинетику реакције и указују на комплекснији механизам са интермедијерним формама.

Такође, откривено је да структура ањона јонске течности има значајан утицај на механизам реакције. На пример, ањони као што је дицианамид ($[dca]^-$) могу изазвати спонтану замену иницијалног лиганда, што доводи до формирања нових комплексних облика који су мање реактивни према спољашњим нуклеофилима.²⁵⁹

Један од главних аспеката примене јонских течности са комплексима метала јесте њихов утицај на кинетику и механизам реакције, што је нарочито видљиво при реакцијама супституције код комплекса Pd(II) и Pt(II), као што су $[Pt(apa)Cl]Cl$ ($apa = 2,6-bis(аминoметил)пиридин$) и $[Pt(ppp)Cl]Cl$ ($ppp = 2,2':6',2''-терпиридин$).²⁶⁰ Утврђено је да јонске течности типа $[bmim][NTf_2]$ (1-бутил-3-метилимидазолијум *bis*(трифлуорометилсулфонил)имид) и $[emim][OTf]$ (1-етил-3-метилимидазолијум трифторметансулфонат) могу значајно успорити брзину замене лиганда у поређењу са конвенционалним растварачима као што су вода и метанол. Овај ефекат је последица јаке интеракције ањона јонске течности са центром метала, што доводи до стабилизације прелазног стања и смањења брзине реакције. Утицај јонских течности на успоравање брзине супституције код комплекса Pd(II) и Pt(II) је веома значајан, јер може довести до смањења споредних реакција у организму и тиме смањити нежељене ефекте.²⁶⁰ Ова својства могу побољшати ефикасност и безбедност терапијских примена ових комплекса.

Проучавањем биолошких интеракција *N*-хетероцикличних карбенских комплекса Au(I) у различитим јонским течностима, као што су $[bmim][PF_6]$ и $[bmim][BF_4]$, откривено је да ове течности могу значајно утицати на стабилност и активност комплекса у биолошким условима.²⁶¹ Присуство различитих јонских течности може изменити редокс потенцијал комплекса Au(I), што утиче на њихову интеракцију са биомолекулима попут ДНК и протеина. Јонске течности су такође показале потенцијал за подешавање биолошких активности комплекса злата, јер могу контролисати растворљивост и стабилност комплекса, чиме се повећавају њихови антитуморски ефекти. На пример, јонске течности као што су $[bmim][PF_6]$ и $[bmim][BF_4]$ пружају повољне услове за интеракцију комплекса са биомолекулима, што може бити кључно за развој нових антитуморских агенаса са побољшаном ефикасношћу и смањеним нежељеним ефектима.²⁶¹

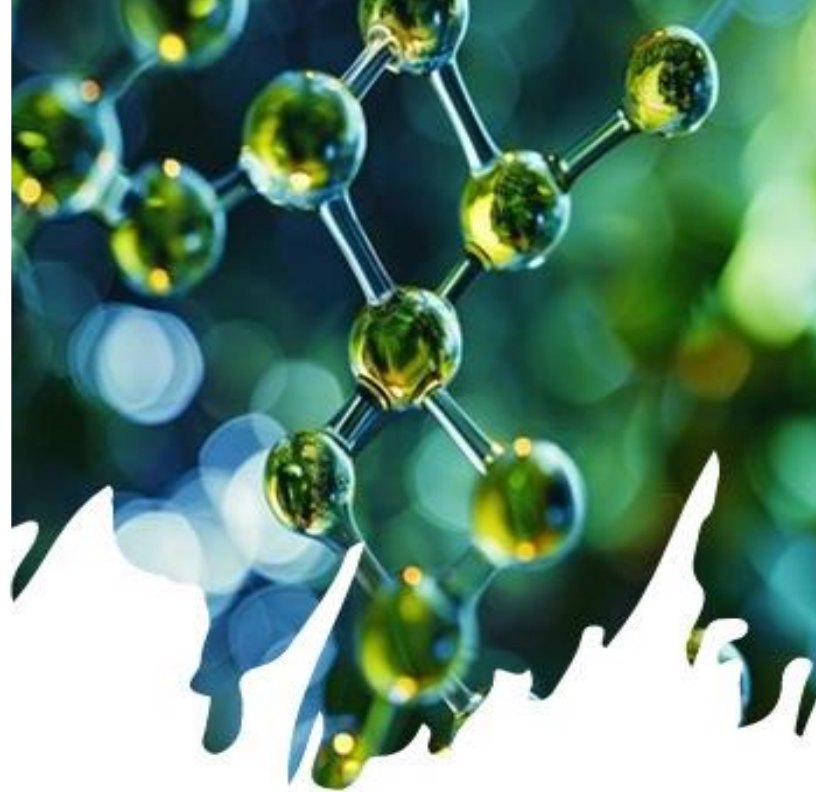
Показано је да јонске течности могу утицати на енталпијске и ентропијске параметре формирања комплекса. У студијама са Li^+ јонима у јонским течностима попут $[emim][NTf_2]$ и $[emim][ClO_4]$, утврђено је да ове течности значајно мењају термодинамичке параметре реакције, утичући на енталпијски и ентропијски допринос у формирању комплекса. На пример, у $[emim][NTf_2]$, комплексирање Li^+ са терпиридином (*terpy*) било је вођено енталпијом, док је у $[emim][ClO_4]$ процес био вођен ентропијом. Слично томе, код *N*-хетероцикличних карбенских комплекса Au(I), комплексирање у $[bmim][PF_6]$ било је енталпијски вођено, док је у $[bmim][BF_4]$ процес био ентропијски вођен.²⁶¹ У електрохемијским процесима јонске течности показују значајан утицај, нарочито на пренос електрона. У истраживањима фeroценских комплекса гвожђа утврђено је да вискозитет јонских течности може значајно утицати на брзину електронског преноса. Иако би се могло очекивати да висока вискозност успори реакцију, забележена је неочекивано висока брзина, што указује на присуство специфичних механизма преноса електрона, као што је „*hopping*” електрона кроз структуре јонских течности.

Истраживања показују да јонске течности могу значајно утицати на брзину и механизам реакција замене лиганда код комплекса метала, као што су Pd(II), Pt(II) и Au(I).²⁵⁹⁻²⁶¹ Ови ефекти настају због интеракција између компоненти јонске течности и реагујућих врста, као и због физичких својстава самих течности, попут вискозитета, поларности и способности формирања специфичних интеракција са реагентима. С друге стране, јонске течности могу побољшати стабилност комплекса и њихову интеракцију са циљним биомолекулама као што су ДНК и протеини. Ово указује на могућност прецизног подешавања реакционих услова и својстава комплекса у складу са захтевима специфичних биолошких или хемијских апликација. Тип јонске течности, укључујући њене специфичне анијоне и катјоне, игра кључну улогу у овим процесима, јер може утицати на термодинамичке параметре реакције, као што су енталпија и ентропија. Додатно, јонске течности пружају нове могућности у дизајну лекова, нарочито у развоју нових антитуморских агенаса. Њихова способност да стабилизују комплексе и модификују њихове биолошке активности чини их корисним за оптимизацију интеракција са циљаним метама. Јонске течности могу да се користе за побољшање растворљивости и стабилности комплекса у физиолошким условима, што омогућава већи терапеутски ефекат уз смањене нежељене ефекте. Њихова примена обећава значајне предности у развоју нових катализатора, реакционих медијума и лекова, али захтева и даља детаљна истраживања, како би се њихов потенцијал у потпуности искористио.

Предмет истраживања

Предмет истраживања ове докторске дисертације обухвата:

- Синтезу и карактеризацију Rh(III) и Os(II) комплекса са тридентатним *N,N,N* - лигандима:
 1. [Rh(L1)Cl₃] - L1= N1-(2-аминоетил)етан-1,2-диен
 2. [Rh(L2)Cl₃] - L2= *bis*(пиридин-2-илметил)амин
 3. [Rh(L3)Cl₃] - L3=2-(6-(пиридин-2-ил)пиридин-2-ил)пиридин
 4. [Rh(L4)Cl₃] - L4= 2,6-*bis*(5-терт-бутил-1H-пиразол-3-ил)пиридин
 5. [Rh(L5)Cl₃] - L5= 2,6-*bis*(5-терт-бутил-1-метил-1H-пиразол-3-ил)пиридин
 6. [Rh(L6)Cl₃] - L6 = 2,6-*bis*((4S,7R)-1,7,8,8-тетраметил-4,5,6,7-тетрахидро-1H-4,7- метаноиндазол-3-ил)пиридин
 7. [Rh(L7)Cl₃] - L7 = 2,6-*bis*((4S,7R)-1,7,8,8-тетраметил-4,5,6,7-тетрахидро-1H-4,7- метаноиндазол-3-ил)пиридин
 8. [Rh(L8)Cl₃] - L8= N2,N6-*bis*(5-метилтриазол-2-ил)пиридин-2,6-дикарбоксиамид
 9. [Rh(L9)Cl₃] - L9= N2,N6-ди(бензотиазол-2-ил)пиридин-2,6-дикарбоксиамид
 10. [Rh(L7)(1,2,4-триазол)₂Cl] - L7= 2,6-*bis*((4S,7R)-1,7,8,8-тетраметил-4,5,6,7-тетрахидро-1H-4,7- метаноиндазол-3-ил)пиридин
 11. [Os(L3)Cl₃] - L3= 2-(6-(пиридин-2-ил)-2-yl)pyridine
 12. [Os(L4)Cl₃] - L4= 2,6-*bis*(5-терт-бутил-1H-пиразол-3-ил)пиридин
 13. [Os(L5)Cl₃] - L5= 2,6-*bis*(5-терт-бутил-1-метил-1H-пиразол-3-ил)пиридин
 14. [Os(L8)Cl₃] - L8= N2,N6-*bis*(5-метилтриазол-2-ил)пиридин-2,6-дикарбоксиамид
 15. [Os(L9)Cl₃] - L9= N2,N6-ди(бензотиазол-2-ил)пиридин-2,6-дикарбоксиамид
- Испитивање супституционих реакција комплекса са биолошки значајним нуклеофилима: гуанозин-5'-монофосфатом (5'-GMP), глутатионом и L-метионином.
- Испитивање интеракција комплекса са молекулима ДНК и HSA/BSA, уз примену маркера за одређивање начина и места везивања.
- Проучавање супституционих реакција, интеракција и цитотоксичности у присуству и одсуству биокомпатибилних косолвената на бази хинолина и агматина.
- Примену компјутерске хемије - DFT метода за проучавање кинетике и стабилности комплекса, као и молекулског докинга за анализу интеракција са биолошким молекулима.
- *In vitro* истраживања цитотоксичности испитиваних комплекса на више ћелијских линија (HCT-116, HeLa, SW-480, MRC-5), као и истраживања утицаја комплекса на редокс статус ћелија.



3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО



3.1. РЕАГЕНСИ И РАСТВОРИ

Током синтеза комплекса као полазне супстанце коришћене су соли $\text{RhCl}_3 \times \text{nH}_2\text{O}$ и $\text{OsCl}_3 \times 3\text{H}_2\text{O}$, набављене од компаније Sigma Aldrich. Лиганди диетилентриамин (*dien*), *bis*(пиридин-2-илметил)амин, 1,2,4-триазол и 2,2':6',2''-терпиридин (*terpy*) су комерцијално доступни и набављени су од компаније Sigma Aldrich. Лиганди: 2,6-*bis*(5-терт-бутил-Н-пиразол-3-ил)пиридин (L4), 2,6-*bis*(5-терт-бутил-1-метил-1Н-пиразол-3-ил)пиридин (L5), 2,6-*bis*((4S,7R)-7,8,8-триметил-4,5,6,7-тетрахидро-1Н-4,7-метаноиндазол-3-ил)пиридин (L6), 2,6-*bis*((4S,7R)-1,7,8,8-тетраметил-4,5,6,7-тетрахидро-1Н-4,7-метаноиндазол-3-ил)пиридин (L7), N2,N6-*bis*(5-метилтиазол-2-ил)пиридин-2,6-дикарбоксиамид (L8) и N2,N6-ди(бензо[d]тиазол-2-ил)пиридин-2,6-дикарбоксиамид (L9) су синтетисани према раније објављеним процедурама.²⁶²⁻²⁶⁵

Глутатион (GSH), L-метионин (L-Met) и гуанозин-5'-монофосфат (5'-GMP), набављени су од компаније Acros Organics. Раствори за кинетичка мерења припремани су у HEPES пуферу (4-(2-хидроксиетил)-1-пиперазинетансулфонска киселина, 30 mM) са додатком NaCl (30-50 mM) набављени од компаније Sigma Chemicals Co.

Интеракције синтетисаних комплекса са макромолекулама испитиване су при pH = 7,4 у фосфатном пуферу (PBS) набављеним од компаније Sigma Aldrich. ДНК говеђег тимуса, хумани серумски албумин (HSA), говеђи серумски албумин (BSA), ибупрофен и еозин Y набављени су од компаније Sigma Chemicals Co. Етидиум-бромид (ЕБ) и 4-[6-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1Н-бензимидазол-2-ил]-1Н-бензимидазол-2-ил]фенол трихидрохлорид (Hoechst 33258) набављени су од компаније Sigma Chemicals Co. За потребе електрофорезе коришћена је ДНК из семене течности лососа, набављена од компаније Carl Roth (Karlsruhe, Germany). *Tris*-пуфер, сирћетна киселина и ЕДТА за припрему ТАЕ пуфера набављени су од компаније Sigma Aldrich.

При одређивању биолошке активности коришћени су DMEM (Dulbecco-модификовани Eagleov медијум) и трипсин-EDTA набављени од компаније Sigma Aldrich. Диметилсулфоксид (DMSO) и пеницилин/стрептомицин набављени су од Thermo Fisher Scientific, док су 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолијум бромид (MTT), и фетални биков серум (FBS) набављени од компанија Gibco и Invitrogen.

Етанол, изопропанол, DMF, DMSO и хлороформ набављени су од компаније Sigma Aldrich. У испитивању синергистичког ефекта са комплексима примењене су јонске течности, од којих је 1-етил-3-метилимидазолијум-етилсулфат комерцијално набављена, док су остале: холин-никотинат, холин-биотинат, холин-γ-аминобутират, холин-аскорбат, холин-сирингат, холин-бензоат, холин-салицилат, агматин-никотинат, агматин-аскорбат, агматин-салицилат и агматин-ибупрофенат добијене из Лабораторије за аналитичку хемију професора др Милана Вранеша, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду.²⁶⁶⁻²⁶⁹

Сви раствори су складиштени на 277 K и коришћени у року од пет дана. За припрему свих раствора коришћена је бидестилована вода, Millipore квалитета. Сва коришћена хемијска једињења била су највише чистоће, комерцијално доступна и коришћена су без даљег прећишћавања.

3.2. ИНСТРУМЕНТАЛНЕ МЕТОДЕ

За карактеризацију синтетисаних комплексних једињења коришћене су различите инструменталне методе. Елементална микроанализа (C, H, N) урађена је на Elementar Vario MICRO елементалном анализатору. NMR спектри синтетисаних комплексних једињења снимани су на Varian Gemini 2000 спектрометру, при чему су сигнали дати у ppm јединицама у односу на TMS као стандард. Масени спектри снимљени су на Waters Quadrupole-TOF Synapt 2G спектрометру уз употребу електроспреј јонизације (ESI).

Кинетичка мерења испитивана су спектрофотометријски на UV-Vis Perkin Elmer Lambda 35 и 25 double-beam спектрофотометру опремљеним термостатираном 1,00 cm кварцном киветом, при чему је температура контролисана на $\pm 0,1$ °C.

Интеракције комплекса са ДНК и хуманим серумским албумином (HSA) испитиване су спектрофотометријски на истим спектрофотометрима, као и на RF-1501 PC спектрофлуориметру Shimadzu (Јапан), са ширинама екситације и емисије од 10 nm. Одређивање вискозности праћено је на Ubbelodhe вискозиметру, термостатираном на $25 \pm 0,1$ °C.

Електрофореза је урађена на систему MupidOne Agarose (Nippon Genetics Europe, Düren, Germany) при напону од 9 V cm^{-1} на собној температури.

3.3. СИНТЕЗА КОМПЛЕКСА

3.3.1. Синтеза комплекса Rh(III)

Комплекси **Rh1-9**, опште формуле **[Rh(L1-9)Cl₃]**, синтетисани су полазећи од RhCl₃ x nH₂O (100 mg, 0,380 mmol) раствореног у 50 mL апсолутног етанола, и одговарајућих лиганата L1–9 (0,380 mmol, 1 eq), чије су структуре приказане на Слици 2.1. Раствор лиганата у 20 mL етанола додат је у капима у раствор соли RhCl₃ x nH₂O уз стално мешање и благо загревање. Реакциона смеша је затим рефлугована преко ноћи, при чему је дошло до формирања жуто-наранџастог талог. По завршетку реакције талог је филтриран, испран етанолом ради уклањања нечистоћа и сушен на ваздуху до константне масе.²⁷⁰⁻²⁷⁶

L1		Диетилентриамин
L2		<i>bis</i> (пиридин-2-илметил)амин
L3		2,2':6',2''-терпиридин
L4		2,6- <i>bis</i> (5- <i>tert</i> -бутил-1Н-пиразол-3-ил)пиридин
L5		2,6- <i>bis</i> (5- <i>tert</i> -бутил-1-метил-1Н-пиразол-3-ил)пиридин
L6		2,6- <i>bis</i> ((4S,7R)-1,7,8,8-тетраметил-4,5,6,7-тетрахидро-1Н-4,7-метаноиндазол-3-ил)пиридин
L7		2,6- <i>bis</i> ((4S,7R)-7,8,8-триметил-4,5,6,7-тетрахидро-1Н-4,7-метаноиндазол-3-ил)пиридин
L8		N2,N6- <i>bis</i> (5-метилтиазол-2-ил)пиридин-2,6-дикарбоксиамид
L9		N2,N6-ди(бензо[d]тиазол-2-ил)пиридин-2,6-дикарбоксиамид

Слика 3.1. Структурне формуле лигананда L1-9.

Резултати карактеризације комплекса **Rh1-9** приказани су у наставку:

[Rh(L1)Cl₃] (Rh1) комплекс: полазећи од 40,4 mg L1 лиганда добијено је 75.9 mg (63%) **Rh1** комплекса као жути прах. Синтетисан по раније публикованој процедури.²⁷⁰
¹H NMR (500 MHz, d₆-dmso): δ = 2,81 (m, CH₂, 4H); 3,14 (m, CH₂, 2H); 2,4 (s, NH, 2H) ppm;
 Израчунато за C₄H₁₃Cl₃N₃Rh: C: 15,38; H: 4,19; N: 13,45. Нађено: C: 15,32; H: 4,1; N: 13,15.
ESI-MS: [M-Cl]: Израчунато: 307,9; Нађено: 307,1.

[Rh(L2)Cl₃] (Rh2) комплекс: полазећи од 78,1 mg L2 лиганда добијено је 140.3 mg (88%) **Rh2** комплекса као жуто-наранџасти прах.²⁷⁵
¹H NMR (500 MHz, d₆-dmso): δ = 4,34 (s, 4H, CH₂); 7,47 (m, 2H, py); 7,65 (m, 2H, py); 7,89 (m, 2H, py); 9,22 (d, 2H, py) ppm;
 Израчунато за C₁₂H₁₃Cl₃N₃Rh: C: 35,28; H: 3,21; N: 10,29. Нађено: C: 34,72; H: 3,06; N: 10,15.

ESI-MS: [M-Cl]: Израчуноато: 406,92; Нађено: 406,87.

[Rh(L3)Cl₃] (Rh3) комплекс: полазећи од 88,5 mg L3 лиганда добијено је 136 mg (75.5%) **Rh3** комплекса као наранџасти прах. Синтетисан по раније публикованој процедури.^{270,271}

¹H NMR (500 MHz, d₆-dmso): δ 7,96 (m, H₅, H_{5'}); 8,39 (dt, H₄, H_{4'}, ³J₃₄=³J₄₅=7,8 Hz, ⁴J₄₆=1,5 Hz); 8,55 (t, H_{4'}, ³J_{3'4'}=³J_{4'5'}=8,1 Hz); 8,78 (d, H₃, H_{3'}); 8,82 (d, H_{3'}, H_{5'}); 9,28 (d, H₆, H_{6'}, ³J₅₆=5,0 Hz) ppm;

Израчуноато за C₁₅H₁₁Cl₃N₃Rh: C: 40,71; H: 2,51; N: 9,50. Нађено: C: 40,80; H: 2,88; N: 9,24.

ESI-MS: [M-Cl]: Израчуноато: 442,53; Нађено: 442,65.

[Rh(L4)Cl₃] (Rh4) комплекс: полазећи од 122,75 mg L4 лиганда добијено је 162,26 mg (78%) **Rh4** комплекса као жути кристали. Синтетисан по раније публикованој процедури.²⁷³

¹H NMR (500 MHz, d₆-dmso): δ = 8,19 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, пиридин); 7,30 (t, 1H, ³J_{HH} = 7,6 Hz, пиридин); 7,22 (s, 2H, пиразол); 2,47 (s, 18H, C(CH₃)₃) ppm.

Израчуноато за C₁₉H₂₅Cl₃N₅Rh: C: 42,84; H: 4,73; N: 13,15. Нађено: C: 40,80; H: 2,88; N: 9,24.

ESI-MS: [M-Cl]: Израчуноато: 531,02; Нађено: 531,07.

[Rh(L5)Cl₃] (Rh5) комплекс: полазећи од 133,4 mg L5 лиганда добијено је 155,40mg (73%) **Rh5** комплекса као жути прах.²⁷⁴

¹H NMR (500 MHz, d₆-dmso): δ = 7,82 (d, meta-Ar-CH, 2H); 7,57 (t, para-Ar-CH, 1H); 6,71 (s, CH₃N-CCHC, 2H); 3,8 (s, NCH₃, 6H); 1,84 (s, C(CH₃)₃, 18H) ppm.

Израчуноато за C₂₁H₂₉Cl₃N₅Rh: C: 44,98; H: 5,21; N: 12,49. Нађено: C: 44,90; H: 5,18; N: 12,41.

ESI-MS: [M-Cl]: Израчуноато: 559,05; Нађено: 558,98.

[Rh(L6)Cl₃] (Rh6) комплекс: полазећи од 162,5 mg L6 лиганда добијено је 196 mg (81%) **Rh6** комплекса као жуто-наранџасти прах.²⁷⁰

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ = 8,1 (t, J_{HH} = 7,8 Hz, para-Ar-CH, 1H); 7,82 (d, J_{HH} = 7,8 Hz, meta-Ar-CH, 2H); 6,94 (br s, NH, 2H); 3,35 (d, J_{HH} = 3,9 Hz, HCCH₂CH₂, 2H); 2,41–2,37 (m, HCCH₂CH₂, 2H); 2,10–2,04 (m, HCCH₂CH₂, 2H); 1,65–1,48 (m, HCCH₂CH₂ и HCCH₂CH₂, 4H); 1,38 (s, CCH₃, 6H); 1,08 (s, C(CH₃)₃, 6H); 0,89 (s, C(CH₃)₃, 6H) ppm;

¹³C NMR (126 MHz, CD₃CN): δ = 158,9 (ortho-Ar-C, 2C); 146,0 (HN-CCC, 2C); 139,2 (para-Ar-CH, 1C); 135,4 (HN-CCC, 2C); 127,0 (meta-Ar-CH, 2C); 121,0 (HN-CCC, 2C); 63,2 (CCH₃, 2C); 52,1 (C(CH₃)₂, 2C); 50,5 (HCCH₂CH₂, 2C); 36,3 (HCCH₂CH₂, 2C); 29,8 (HCCH₂CH₂, 2C); 25,0 (C(CH₃)₂, 2C); 21,6 (C(CH₃)₂, 2C); 11,2 (CCH₃, 2C) ppm.

Израчуноато за C₂₇H₃₃Cl₃N₅Rh: C: 50,92; H: 5,22; N: 11,00. Нађено: C: 51,26; H: 5,93; N: 11,14.

ESI-MS: [M-Cl]: Израчуноато: 635,09; Нађено: 635,18.

[Rh(L7)Cl₃] (Rh7) комплекс: полазећи од 173,1 mg L7 лиганда добијено је 189,5 mg (75%) **Rh7** комплекса као жути прах.²⁷⁰

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ = 8,14 (dd, J_{HH} = 8.5 Hz, meta-Ar-CH, 2H); 7,82 (t, J_{HH} = 8.5 Hz, para-Ar-CH, 1H); 4,38 (s, NCH₃, 6H); 3,33 (d, J_{HH} = 3.8 Hz, HCCH₂CH₂, 2H); 2,31 – 2,05 (m, HCCH₂CH₂, 2H); 2,05 – 1,91 (m, HCCH₂CH₂, 2H); 1,52 – 1,33 (m, HCCH₂CH₂ и HCCH₂CH₂, 4H); 1,41 (s, CCH₃, 6H); 1,08 (s, C(CH₃)₂, 6H); 0,78 (s, C(CH₃)₂, 6H) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, CD₃CN): δ = 159,9 (CH₃N–CCC, 2C); 151,9 (ortho-Ar-C, 2C); 143,8 (CH₃N–CCC, 2C); 140,1 (para-Ar-CH, 1C); 128,9 (CH₃N–CCC, 2C); 119,5 (meta-Ar-CH, 2C); 63,6 (CCH₃, 2C); 53,7 (C(CH₃)₂, 2C); 47,8 (HCCH₂CH₂, 2C); 38,5 (NCH₃, 2C); 32,6 (HCCH₂CH₂, 2C); 26,7 (HCCH₂CH₂, 2C); 19,6 (C(CH₃)₂, 2C); 18,3 (C(CH₃)₂, 2C); 10,0 (CCH₃, 2C) ppm;

Израчунато за C₂₉H₃₇Cl₃N₅Rh: C: 52,39; H: 5,61; N: 10,53. Нађено: C: 52,26; H: 5,53; N: 10,01.

ESI-MS: [M-Cl]: Израчунато: 663,12; Нађено: 663,17.

[Rh(L8)Cl₃] (Rh8) комплекс: полазећи од 136,5 mg L8 лиганда добијено је 156 mg (73%) **Rh8** комплекса као наранџасти прах.²⁷⁶

¹H NMR (500 MHz, d-CHCl₃): δ = 13,2 (s, NH, 2H); 8,50 (d, ³J = 7,8 Hz, py-CH_{meta}, 2H); 8,17 (t, ³J = 7,8 Hz, py-CH_{para}, 1H); 7,20 (s, tiazol, 2H); 2,28 (s, CH₃, 6H) ppm.

Израчунато за C₁₅H₁₃Cl₃N₅O₂RhS₂: C: 31,68; H: 2,30; N: 11,31; Нађено: C: 31,21; H: 2,21; N: 11,09.

ESI-MS: [M-Cl]: Израчунато: 566,86; Нађено: 566,37.

[Rh(L9)Cl₃] (Rh9) комплекс: полазећи од 163,9 mg L9 лиганда добијено је 164 mg (74%) **Rh9** комплекса као наранџасти прах.²⁷⁶

¹H NMR (500 MHz, d-CHCl₃): δ = 13,75 (s, NH, 2H); 8,63 (d, ³J = 7,8 Hz, py-CH_{meta}, 2H); 8,50 (t, ³J = 7,8 Hz, py-CH_{para}, 1H); 8,19 (d, ⁴J = 8,0 Hz, phe-CH_{meta1}, 2H); 7,87 (d, ⁴J = 8,0 Hz, phe-CH_{orto}, 2H); 7,55–7,40 (m, phe-CH_{meta2}, 2H) ppm.

Израчунато за C₂₁H₁₃Cl₃N₅O₂RhS₂: C: 39,36; H: 2,04; N: 10,93. Нађено: C: 39,21; H: 1,97; N: 10,91.

ESI-MS: [M-Cl]: Израчунато: 638,86; Нађено: 638,79.

Комплекс **Rh10**, формуле **[Rh(L6)(1,2,4-triazole)₂Cl]Cl₂** синтетисан је реакцијом соли RhCl₃ x nH₂O (100 mg, 0,380 mmol), растворене у 40 mL етанола, са раствором лиганда L6 (162,48 mg, 0,380 mmol) у 10 mL етанола и раствором лиганда 1,2,4-триазола (52,48 mg, 0,760 mmol) у 10 mL етанола, који су додати уз мешање. Реакциона смеша је рефлуктована 12 сати, након чега је мешана још 4–5 сати уз благо загревање. Током реакције раствор је променио боју у светложуту, а формиран је жути талог. Добијени талог је филтриран, испран етанолом и осушен на вакууму.²⁷⁷

[Rh(L6)(1,2,4-triazole)₂Cl]Cl₂ (Rh10) комплекс: полазећи од 162,48 mg L6 и 52,48 mg 1,2,4-триазола лиганда добијено је 267,8 mg (91%) **Rh10** комплекса као жути прах.²⁷⁷

¹H NMR (500 MHz, d₆-dmsO): δ = 8,41 (t, J_{NH} = 7,8 Hz, paraAr-CH, 1H); 8,24 (d, J_{NH} = 7,8 Hz, meta-Ar-CH, 2H); 8,19 (br s, NH, 2H-1,2,4-триазол); 7,11 (br s, NH, 2H); 3,65 (bs, HCCH₂CH₂, 2H); 2,17–1,93 (m, HCCH₂CH₂, 2H); 1,43–1,21 (m, HCCH₂CH₂, 2H); 1,04–0,86 (m, HCCH₂CH₂ и HCCH₂CH₂, 4H); 1,41 (s, CCH₃, 6H); 1,01 (s, CCH₃, 6H); 0,97 (s, CCH₃, 6H); 7,05 (4H, 1,2,4-триазол) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, d₆-dmsO): δ = 158,2 (HN–CCC, 2C); 151,8 (ortho-Ar-C, 2C); 140,6 (HN–CCC, 2C); 138,4 (para-Ar-CH, 1C); 119,8 (HN–CCC, 2C); 118,3 (meta-Ar-CH, 2C); 100,3 (CCH₃, 2C); 100,2 (C(CH₃)₂, 2C); 31,8 (HCCH₂CH₂, 2C); 31,1 (HCCH₂CH₂, 2C); 30,16 (HCCH₂CH₂, 2C); 26,6 (C(CH₃)₂, 2C); 29,5 (C(CH₃)₂, 2C); 29,4 (CCH₃, 2C); 151,36 (1,2,4-triazole, 4C) ppm;

Израчунато за C₃₁H₃₉Cl₃N₁₁Rh: C: 48,04; H: 5,07; N: 19,88. Нађено: C: 49,05; H: 5,22; N: 18,78.

ESI-MS: $[M-Cl]^{2+}$: Израчунаато: 352,35; Нађено: 352,26.

3.3.2. Синтеза комплекса Os(II)

Комплекси **Os1–5**, опште формуле $[Os(L)Cl_2H_2O]$, синтетисани су полазећи од $OsCl_3 \times 3H_2O$ (100 mg, 0,380 mmol), раствореног у 20 mL изопропанола, и одговарајућих лиганата L3, L4, L5, L8 и L9 (0,380 mmol, 1 eq), чије су структуре приказане на Слици 1. Раствор лиганда у 20 mL изопропанола додаван је у капима у раствор $OsCl_3 \times 3H_2O$ уз стално мешање. Реакциона смеша је затим рефлуксована три дана, током чега је дошло до формирања тамнозеленог или тамнопурпурног талог. По завршетку реакције талог је филтриран, испран изопропанолом ради уклањања нечистоћа и сушен у вакууму до константне масе.^{268,276, 278}

$[Os(L3)Cl_2H_2O]$ (Os1) комплекс: полазећи од 66,7 mg L3 лиганда добијено је 103,3 mg (67%) **Os1** комплекса као тамнопурпурни прах.²⁶⁸

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8,83 (m, пиридин, 2H); 8,71 (m, пиридин, 2H); 8,50 (d, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, пиридин, 2H); 7,95 (m, пиридин, 1H); 7,35 (m, пиридин, 2H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3CN): δ = 155,70 (s, пиридин, 2C); 155,70 (s, пиридин, 2C); 148,62 (s, пиридин, 2C); 138,01 (s, пиридин, 1C); 137,37 (s, пиридин, 2H); 123,85 (s, пиридин, 2H); 121,42 (s, пиридин, 2H) ppm;

Израчунаато за $C_{15}H_{13}Cl_2 N_5O$ s: C: 35,16; H: 2,56; N: 8,20. Нађено: C: 34,87; H: 2,43; N: 8,01.

ESI-MS: $[M-Cl]$: Израчунаато: 540,13; Нађено: 540,17.

$[Os(L4)Cl_2H_2O]$ (Os2) комплекс: полазећи од 92,2 mg L4 лиганда добијено је 150,4 mg (78%) **Os2** комплекса као тамнозелени прах.²⁶⁸

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7,92 (d, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, пиридин, 2H); 7,26 (t, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, пиридин, 1H); 6,88 (s, пиразол, 2H); 1,45 (s, CH_3 , 18H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3CN): δ = 158,9 (o-Ar-C, 2C); 148,8 (HN-CCHC, 2C); 146,0 (HN-CCHC, 2C); 136,9 (p-Ar-CH, 1C); 118,4 (m-Ar-CH, 2C); 100,0 (HN-CCHC, 2C); 29,5 ($C(CH_3)_3$, 2C); 29,1 ($C(CH_3)_3$, 6C) ppm.

Израчунаато за $C_{19}H_{27}Cl_2 N_5O$ s: C: 37,87; H: 4,52; N: 11,62. Нађено: C: 37,10; H: 4,45; N: 11,14.

ESI-MS: $[M-Cl]$: Израчунаато: 602,13; Нађено: 603,15.

$[Os(L5)Cl_2H_2O]$ (Os3) комплекс: полазећи од 103,6 mg L5 лиганда добијено је 133,8 mg (72%) **Os3** комплекса као тамнозелени прах.²⁶⁸

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7,85 (d, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, пиридин, 2H); 7,26 (t, $^3J_{HH}$ = 7.6 Hz, пиридин, 1H); 6,91 (s, пиразол, 2H); 4,08 (s, NCH_3 , 6H); 1,44 (s, CH_3 , 18H) ppm.

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3CN): δ = 152,7 (H_3CN -CCHC, 2C); 151,35 (o-Ar-C, 2C); 148,7 (CH_3N -CCHC, 2C); 137,7 (p-Ar-CH, 1C); 118,6 (m-Ar-CH, 2C); 103,1 (CH_3N -CCHC, 2C); 39,7 (NCH_3 , 2C); 31,4 ($C(CH_3)_3$, 2C); 29,7 ($C(CH_3)_3$, 6C) ppm.

Израчунаато за $C_{21}H_{27}Cl_2 N_5O$ s: C: 40,00; H: 4,95; N: 11,11. Нађено: C: 39,21; H: 4,53; N: 10,89.

ESI-MS: $[M-Cl]$: Израчунаато: 630,13; Нађено: 630,16.

[Os(L8)Cl₂H₂O] (Os4) комплекс: полазећи од 102,5 mg L8 лиганда добијено је 156 mg (73%) **Os4** комплекса као тамнозелени прах.²⁷⁶

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 13,2 (s, NH, 2H); 8,94 (d, ³J = 7.8 Hz, py-CH_{meta}, 2H); 8,71 (t, ³J = 7.8 Hz, py-CH_{para}, 1H); 7,52 (s, tiazol, 2H); 2,56 (s, CH₃, 6H) ppm.

Израчуноато за C₁₅H₁₅Cl₂N₅O₃OsS₂: C: 28,21; H: 2,37; N: 10,97. Нађено: C: 28,01; H: 2,21; N: 10,50.

ESI-MS: [M-Cl]: Израчуноато: 638,58; Нађено: 638,61.

[Os(L9)Cl₂H₂O] (Os5) комплекс: полазећи од 163,9 mg L9 лиганда добијено је 123.06 mg (74%) **Os5** комплекса као тамнопурурно-браон прах.²⁷⁶

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7,85 (d, ³J_{HH} = 7.6 Hz, пиридин, 2H); 7,26 (t, ³J_{HH} = 7.6 Hz, пиридин, 1H); 6,91 (s, пиразол, 2H); 4,08 (s, NCH₃, 6H), 1,44 (s, CMe₃, 18H) ppm.

Израчуноато за C₂₁H₁₅Cl₂N₅O₃Os: C: 35,49; H: 2,13; N: 9,85. Нађено: C: 34,98; H: 2,09; N: 9,77.

ESI-MS: [M-Cl]: Израчуноато: 710,64; Нађено: 710,71.

3.3.3. Рендгенско-структурна анализа комплекса

Кристализација комплекса **Rh2** и **Os2** постигнута је спором дифузијом воде у раствор комплекса у DMSO, док је комплекс **Rh6** кристалисао применом споре дифузије n-хексана у раствор комплекса у метилен-хлориду.^{268,270,275} Овим поступцима добијени су жути монокристали комплекса родијума и тамни кристали комплекса осмијума, погодни за рендгенско-структурну анализу.

Рендгенска дифракциона анализа комплекса **[Rh(L2)Cl₃] (Rh2)** урађена је на собној температури уз коришћење графитне монокроматисане МоK α радијације (λ = 0.71073 Å) на Oxford Diffraction Gemini S дифрактометру.²⁷⁵ Подаци су прикупљени и интегрисани софтверима *CrysAlisPro* и *CrysAlis RED*, а просторна група одређена је анализом Лауеових класа и систематски одсутних рефлексија. Корекција ефекта апсорпције извршена је применом *Multi-scan* методе и *SCALE3 ABSPACK* алгоритма. Структура је решена коришћењем *OLEX2* и *SHELXT* програма, а рафинација коришћењем *SHELXL-2018/3*. За геометријски прорачун молекула коришћен је софтвером *PLATON*, а молекулски графици су припремљени у програму *MERCURY*. Кристалографски подаци и параметри за комплекс **Rh2** дати су у Табелама 3.1. и 3.2.

Табела 3.1. Кристалографски подаци и параметри рафинације за комплекс **Rh2**.²⁷⁵

<i>Подаци о кристалу</i>		
Хемијска формула	C ₁₂ H ₁₂ Cl ₃ N ₃ Rh	
Молекулска маса (<i>M_r</i>)	203,75	
Кристални систем	Триклиничан	
Просторна група	P ⁻¹	
Параметри ћелије	<i>a</i> = 7,0301 (4) Å	α = 94,549° (7)
	<i>b</i> = 10,1491 (7) Å	β = 103,201° (7)
	<i>c</i> = 11,6779 (11) Å	γ = 108,713° (6)

Запремина (V)	757,72 (10) Å ³
Z	2
D_x	1,786 Mg m ⁻³
Коефицијент апсорпције (μ)	1,64 mm ⁻¹
Величина кристала	0,60 × 0,37 × 0,33 mm ³
Облик кристала	Призма
Боја	Жута
<i>Прикупљање података</i>	
Дифрактометар	Xcalibur, Sapphire3, Gemini
Корекција апсорпције	Multi-Scan
Минимална и максимална трансмисија	$T_{\min}=0,791$, $T_{\max}=1,000$
Прикупљене, независне и посматране рефлексије [$I > 2\sigma(I)$]	6030, 3426, 2958
R_{int}	0,038
Опсег углова θ	$\theta_{\max} = 29,2^\circ$, $\theta_{\min} = 2,2^\circ$
Опсег индекса (h, k, l)	$h = -9 \rightarrow 8$, $k = -13 \rightarrow 13$, $l = -7 \rightarrow 15$
<i>Рафинација</i>	
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$, $wR(F^2)$	0,0409; 0,1117
R [сви подаци], $wR2$	0,0494; 0,1187
Goodness-of-fit (S)	1,097
Број рефлексија, параметара и рестрикција	3426, 172, 0
$\rho_{\max}$, $\rho_{\min}$	$\Delta\rho_{\max}=1,27 \text{ eÅ}^{-3}$; $\Delta\rho_{\min}=-0,90 \text{ eÅ}^{-3}$
CCDC број	2241826

Табела 3.2. Издвојени геометријски параметри за комплекс **Rh2**.²⁷⁵

Дужине веза [Å]			
Rh1—N2	2,023 (3)	N2—C12	1,333 (6)
Rh1—N3	2,029 (4)	N2—C4	1,343 (5)
Rh1—N1	2,053 (3)	N1—C3	1,480 (6)
Rh1—Cl2	2,3519 (10)	N1—C1	1,486 (6)
Rh1—Cl3	2,3535 (12)	N3—C8	1,346 (6)
Rh1—Cl1	2,3544 (11)	N3—C2	1,347 (5)
Углови веза [°]			
N2—Rh1—N3	88,32 (14)	N1—Rh1—Cl3	91,55 (11)
N2—Rh1—N1	83,00 (13)	Cl2—Rh1—Cl3	91,20 (4)
N3—Rh1—N1	82,10 (14)	N2—Rh1—Cl1	95,31 (10)
N2—Rh1—Cl2	173,98 (10)	N3—Rh1—Cl1	94,62 (10)
N3—Rh1—Cl2	91,35 (10)	N1—Rh1—Cl1	176,33 (10)
N1—Rh1—Cl2	91,00 (10)	Cl2—Rh1—Cl1	90,71 (4)
N2—Rh1—Cl3	88,48 (11)	Cl3—Rh1—Cl1	91,66 (4)
N3—Rh1—Cl3	173,19 (10)	C1—N1—Rh1	107,3 (3)

Торзиони углови [°]			
Rh1—N1—C1—C2	33,1 (4)	Rh1—N1—C3—C4	−17,9 (5)
Rh1—N2—C4—C9	178,7 (3)	Rh1—N2—C12—C11	179,7 (4)
Rh1—N2—C4—C3	−4,6 (5)	Rh1—N3—C8—C7	174,2 (4)
Rh1—N3—C2—C5	−175,4 (4)	C5—C2—C1—N1	154,9 (4)
Rh1—N3—C2—C1	6,5 (5)	N3—C2—C1—N1	−27,0 (6)

Рендгенска дифракциона анализа комплекса **[Rh(L6)Cl₃] (Rh6)** урађена је под истим условима, користећи исту опрему и методологију.²⁷⁰ Дисперговани молекули растварања уклоњени су применом *SQUEEZE* у софтверу *PLATON*. Кристалографски подаци и параметри за комплекс **Rh6** дати су у Табелама 3.3. и 3.4.

Табела 3.3. Кристалографски подаци и параметри рафинације за комплекс **Rh6**.²⁷⁰

<i>Подаци о кристалу</i>	
Хемијска формула	C ₂₉ H ₃₇ Cl ₃ N ₅ Rh
Молекулска маса (<i>M_r</i>)	664,89
Кристални систем	Орторомбичан; <i>P</i> ₂ ₁ ₂ ₁
Параметри ћелије (Å)	<i>a</i> =13,4941 (3) Å <i>b</i> =19,4283 (4) Å <i>c</i> =28,9799 (13) Å
Запремина (<i>V</i>)	7597,6 Å ³ (4)
<i>Z</i>	8
Тип зрачења	Mo <i>Kα</i>
Број рефлексија	9233
Коефицијент апсорпције (<i>μ</i>)	0,68 mm ^{−1}
Облик кристала	Призма
Боја	Жута
Величина кристала	0,51 × 0,42 × 0,14
<i>Прикупљање података</i>	
Дифрактометар	Xcalibur; Sapphire3; Gemini
Корекција апсорпције	Multi-scan
Минимална и максимална трансмисија	<i>T</i> _{min} =0,882; <i>T</i> _{max} =1,000
Број измерених; независних и посматраних рефлексија (<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>))	27626; 13398; 10655
<i>R</i> _{int}	0,052
Опсег углова <i>θ</i>	<i>θ</i> _{max} = 25,0°; <i>θ</i> _{min} = 2,5°
(sin <i>θ</i> /λ) _{max}	0,595 Å ^{−1}
Опсег индекса (<i>h</i> , <i>k</i> , <i>l</i>)	<i>h</i> = −16 → 11; <i>k</i> = −23 → 15; <i>l</i> = −34 → 29
<i>Рафинација</i>	
<i>R</i> [<i>F</i> ² > 2 σ (<i>F</i> ²); <i>wR</i> (<i>F</i> ²); <i>S</i>	0,084; 0,228; 1,04
Број рефлексија, параметара и рестрикција	13398, 701, 13
Обрада Н-атома	Параметри Н-атома су ограничени

$\rho_{\max}; \rho_{\min}$

Параметар апсолутне структуре

 $\Delta\rho_{\max}=0,96 \text{ e } \text{\AA}^{-3}; \Delta\rho_{\min}=-2,41 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$

0,05 (3)

Табела 3.4. Издвојени геометријски параметри за комплекс **Rh6**.²⁷⁰

Дужине веза [°]		
	Молекул А	Молекул Б
Rh1—N3	2,027 (9)	1,975 (9)
Rh1—N4	2,063 (14)	2,051 (14)
Rh1—N2	2,080 (12)	2,051 (12)
Rh1—Cl1	2,332 (4)	2,319 (5)
Rh1—Cl3	2,337 (4)	2,341 (4)
Rh1—Cl2	2,351 (3)	2,362 (3)
Углови веза [°]		
N3—Rh1—N4	78,7 (4)	78,4 (5)
N3—Rh1—N2	80,4 (4)	79,6 (4)
N4—Rh1—N2	158,3 (4)	157,8 (4)
N3—Rh1—Cl1	91,8 (3)	90,9 (3)
N4—Rh1—Cl1	89,1 (4)	85,4 (4)
N2—Rh1—Cl1	86,0 (3)	92,1 (4)
N3—Rh1—Cl3	87,0 (3)	86,7 (3)
N4—Rh1—Cl3	91,2 (4)	93,1 (4)
N2—Rh1—Cl3	93,2 (3)	88,5 (4)
Cl1—Rh1—Cl3	178,73 (15)	177,38 (17)
N3—Rh1—Cl2	176,3 (3)	176,5 (3)
N4—Rh1—Cl2	100,9 (3)	101,1 (4)
N2—Rh1—Cl2	100,3 (3)	101,1 (3)
Cl1—Rh1—Cl2	91,82 (17)	92,51 (19)
Cl3—Rh1—Cl2	89,33 (16)	89,87 (17)
Торзиони углови [°]		
Rh1—N2—N1—C1	154,1 (11)	-178,1 (12)
Rh1—N2—N1—C12	-19 (2)	6 (2)
Rh1—N2—C3—C4	7,3 (15)	-3,8 (15)
Rh1—N3—C4—C5	-175,6 (10)	-175,0 (10)
Rh1—N3—C8—C7	173,5 (10)	172,1 (11)
Rh1—N3—C8—C9	-1,7 (16)	-6,1 (16)
Rh1—N4—C9—C10	179,5 (10)	166,9 (11)
Rh1—N4—C9—C8	11,6 (17)	-5,5 (16)

Рендгенска дифракциона анализа комплекса **[Os(L4)Cl₂H₂O]** (**Os2**) урађена је на собној температури при чему је појединачни кристал постављен на *Hampton Research CryoLoop*TM са перфлуорисаним уљем и пребачен у хлађени гасни ток дифрактометра.²⁶⁸ Кристалографски подаци и параметри за комплекс **Os2** дати су у Табелама 3.5., 3.6. и 3.7.

Табела 3.5. Кристалографски подаци и параметри рафинације за комплекс **Os2**.²⁶⁸

<i>Подаци о кристалу</i>	
Хемијска формула	C ₂₃ H ₃₈ Cl ₂ N ₅ O ₃ OsS ₂
Молекулска маса маса (<i>M_r</i>)	757,80
Кристални систем	Орторомбичан
Просторна група	<i>Pbca</i>
Параметри ћелије	a = 10,0149(3) Å α = 90° b = 19,5277(5) Å β = 90° c = 29,9561(9) Å γ = 90°
Запремина (<i>V</i>)	5858,5(3) Å ³
<i>Z</i>	8
Густина (рачуната)	1,718 Mg/m ³
Број рефлексија	66071
Коефицијент апсорпције (<i>μ</i>)	11,510 mm ⁻¹
Облик кристала	Игличаст
Боја кристала	Таман
Величина кристала	0,078 x 0,020 x 0,012 mm ³
<i>Прикупљање података</i>	
Дифрактометар (режим скенирања)	XtaLAB Synergy; Single source HyPix (ω scan)
Корекција апсорпције	<i>Gaussian</i>
Минимална и максимална трансмисија	<i>T_{min}</i> =0,529; <i>T_{max}</i> =0,962
Број измерених и независних рефлексија	66071; 6158 [R(int) = 0,0778];
Опсег углова θ	θ _{max} = 77,572°; θ _{min} = 4,529 °
Комплетност до θ = 67,684°	99,9 %
Опсег индекса (<i>h, k, l</i>)	<i>h</i> = -12→12; <i>k</i> = -24→23; <i>l</i> = -31→37
<i>F</i>	3016
Температура	100(2) K
Таласна дужина	1,54184 Å
<i>Рафинација</i>	
Метода рафинације	Метод најмањих квадрата на <i>F</i> ²
Коначни <i>R</i> индекси [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	<i>R</i> 1 = 0,0346; <i>wR</i> 2 = 0,0876
<i>R</i> [сви подаци], <i>wR</i> 2	<i>R</i> 1 = 0,0431; <i>wR</i> 2 = 0,0919
<i>Goodness-of-fit</i> (<i>S</i>) за <i>F</i> ²	1,037
Број рефлексија, параметара и рестрикција	6158, 338, 0
ρ _{max} ; ρ _{min}	Δρ _{max} =1,461 e Å ⁻³ ; Δρ _{min} =-

Табела 3.6. Атомске координате (10⁴) и еквивалентни изотропни параметри померања ($\text{\AA}^2 \times 10^3$). U(eq) је дефинисан као једна трећина трага ортогонализованог U_{ij} тензора.²⁶⁸

	X	Y	Z	U(eq)
Os(1)	5575,7(2)	3487,9(2)	6423,0(2)	17,1(1)
Cl(1)	3847,7(10)	4309,5(5)	6491,2(3)	23,5(2)
Cl(2)	7146,3(10)	2593,7(5)	6359,0(3)	22,8(2)
S(1)	5945,1(11)	3799,2(6)	5701,8(3)	23,6(2)
O(1)	5149(4)	3503,4(19)	5333,7(12)	38,6(9)
N(1)	3268(4)	2408,3(18)	6142,0(11)	21,4(7)
N(2)	4064(4)	2739,5(18)	6428,6(11)	19,1(7)
N(3)	5331(3)	3288,5(17)	7083,2(11)	16,6(6)
N(4)	6915(3)	4130,0(17)	6686,7(11)	18,9(7)
N(5)	7705(3)	4632,5(17)	6523,4(12)	20,1(7)
C(1)	1332(5)	1601(2)	6102,1(15)	25,4(9)
C(2)	608(5)	2068(3)	5773,0(18)	35,6(11)
C(3)	2057(5)	1016(3)	5851,5(18)	35,8(11)
C(4)	331(5)	1295(3)	6431,5(16)	31,9(11)
C(5)	2355(4)	2019(2)	6355,4(14)	20,7(8)
C(6)	2583(4)	2101(2)	6808,6(14)	21,1(8)
C(7)	3653(4)	2551(2)	6844,2(13)	18,3(8)
C(8)	4359(4)	2857(2)	7219,6(14)	19,1(8)
C(9)	4124(4)	2762(2)	7669,9(14)	20,6(8)
C(10)	4911(4)	3113(2)	7975,6(14)	20,1(8)
C(11)	5927(4)	3552(2)	7829,3(14)	20,9(8)
C(12)	6106(4)	3641,7(19)	7374,0(13)	17,1(8)
C(13)	6995(4)	4117(2)	7149,3(13)	17,3(8)
C(14)	7894(4)	4610(2)	7277,5(13)	20,2(8)
C(15)	8288(4)	4926(2)	6876,6(14)	21,1(8)
C(16)	9201(4)	5544(2)	6828,1(15)	22,6(9)
C(17)	8662(6)	6108(2)	7133,8(16)	36,8(12)
C(18)	10612(5)	5357(3)	6965(2)	46,6(15)
C(19)	9192(5)	5806(3)	6348,9(17)	32,7(11)
C(20)	5815(5)	4701(3)	5638,7(17)	32,4(11)
C(21)	7658(5)	3706(3)	5554,1(17)	35,4(11)
S(2)	6290,4(13)	732,0(7)	5097,8(5)	39,2(3)
O(2)	4879(4)	936(2)	5184,7(13)	42,8(9)
C(22)	7278(7)	1467(3)	5223(2)	51,3(15)
C(23)	6479(7)	736(4)	4506(2)	62,5(19)
O(3)	3923(4)	2270,9(19)	5266,0(11)	34,3(8)

Табела 3.7. Издвојени геометријски параметри за комплекс **Os2**.²⁶⁸

Дужине веза [°]			
Os(1)-N(4)	1,999(3)	N(5)-C(15)	1,338(5)
Os(1)-N(3)	2,030(3)	C(1)-C(5)	1,514(6)
Os(1)-N(2)	2,104(3)	C(1)-C(2)	1,527(7)
Os(1)-S(1)	2,2743(10)	C(2)-C(3)	1,533(7)
Os(1)-Cl(2)	2,3579(10)	C(3)-C(4)	1,523(7)
Os(1)-Cl(1)	2,3687(10)	C(4)-C(5)	1,527(6)
S(1)-O(1)	1,478(4)	C(5)-C(6)	1,518(6)
S(1)-C(20)	1,775(5)	C(6)-C(7)	1,535(6)
S(1)-C(21)	1,781(5)	C(7)-C(8)	1,521(6)
N(1)-N(2)	1,338(5)	C(8)-C(9)	1,507(6)
N(1)-C(5)	1,351(5)	C(9)-C(10)	1,510(6)
N(1)-H(1)	0,8800	C(10)-C(11)	1,533(7)
N(2)-C(7)	1,362(5)	C(11)-C(12)	1,518(6)
N(3)-C(8)	1,352(5)	C(12)-C(13)	1,507(6)
N(3)-C(12)	1,355(5)	C(13)-C(14)	1,525(6)
N(4)-N(5)	1,352(5)	C(14)-C(15)	1,518(6)
N(4)-C(13)	1,388(5)	C(15)-C(16)	1,520(6)
Углови веза [°]			
N(4)-Os(1)-N(3)	75,53(10)	N(2)-C(7)-C(8)	120,6(3)
N(4)-Os(1)-N(2)	74,94(10)	C(6)-C(7)-C(8)	124,9(3)
N(3)-Os(1)-N(2)	75,10(10)	N(3)-C(8)-C(7)	125,1(3)
N(4)-Os(1)-S(1)	166,27(8)	N(3)-C(8)-C(9)	117,3(3)
N(3)-Os(1)-S(1)	91,28(8)	C(7)-C(8)-C(9)	117,5(3)
N(2)-Os(1)-S(1)	92,36(8)	N(3)-C(12)-C(11)	117,7(3)
N(4)-Os(1)-Cl(2)	94,76(8)	N(3)-C(12)-C(13)	124,5(3)
N(3)-Os(1)-Cl(2)	168,13(8)	C(11)-C(12)-C(13)	117,8(3)
N(2)-Os(1)-Cl(2)	91,55(8)	N(4)-N(5)-C(15)	120,8(3)
S(1)-Os(1)-Cl(2)	85,71(3)	N(5)-C(15)-C(14)	115,3(3)
N(4)-Os(1)-Cl(1)	94,73(8)	N(5)-C(15)-C(16)	120,6(3)
N(3)-Os(1)-Cl(1)	91,64(8)	C(14)-C(15)-C(16)	124,1(3)
N(2)-Os(1)-Cl(1)	164,32(8)	N(1)-N(2)-C(7)	122,8(3)
S(1)-Os(1)-Cl(1)	88,06(3)	N(2)-C(7)-C(6)	114,4(3)
Cl(2)-Os(1)-Cl(1)	87,61(3)	N(2)-C(7)-C(8)	120,6(3)
Os(1)-S(1)-O(1)	112,71(13)	C(6)-C(7)-C(8)	124,9(3)
Os(1)-S(1)-C(20)	106,16(15)	N(3)-C(8)-C(7)	125,1(3)
Os(1)-S(1)-C(21)	106,80(15)	N(3)-C(8)-C(9)	117,3(3)

O(1)-S(1)-C(20)	108,78(19)	C(7)-C(8)-C(9)	117,5(3)
O(1)-S(1)-C(21)	106,10(19)	N(3)-C(12)-C(11)	117,7(3)
C(20)-S(1)-C(21)	106,02(17)	N(3)-C(12)-C(13)	124,5(3)
N(2)-N(1)-C(5)	115,4(3)	C(11)-C(12)-C(13)	117,8(3)
N(2)-N(1)-H(1)	111,6	N(4)-N(5)-C(15)	120,8(3)
C(5)-N(1)-H(1)	108,5	N(5)-C(15)-C(14)	115,3(3)
N(1)-N(2)-C(7)	122,8(3)	N(5)-C(15)-C(16)	120,6(3)
N(2)-C(7)-C(6)	114,4(3)	C(14)-C(15)-C(16)	124,1(3)

Торзиони углови [°]

C(5)-N(1)-N(2)-C(7)	0,5(5)	C(7)-C(8)-C(9)-C(10)	-179,2(4)
C(5)-N(1)-N(2)-Os(1)	-173,1(3)	C(8)-C(9)-C(10)-C(11)	-0,3(6)
C(13)-N(4)-N(5)-C(15)	0,9(4)	C(9)-C(10)-C(11)-C(12)	1,6(6)
Os(1)-N(4)-N(5)-C(15)	173,8(3)	C(8)-N(3)-C(12)-C(11)	1,4(6)
N(2)-N(1)-C(5)-C(6)	-0,4(5)	Os(1)-N(3)-C(12)-C(11)	176,5(3)
N(2)-N(1)-C(5)-C(1)	179,4(4)	C(8)-N(3)-C(12)-C(13)	-174,8(3)
C(2)-C(1)-C(5)-N(1)	-52,5(5)	Os(1)-N(3)-C(12)-C(13)	0,3(4)
C(4)-C(1)-C(5)-N(1)	-172,5(4)	C(10)-C(11)-C(12)-N(3)	-2,2(6)
C(3)-C(1)-C(5)-N(1)	68,0(5)	C(10)-C(11)-C(12)-C(13)	173,3(4)
C(2)-C(1)-C(5)-C(6)	127,2(5)	N(5)-N(4)-C(13)-C(14)	-2,0(5)
C(4)-C(1)-C(5)-C(6)	7,2(7)	Os(1)-N(4)-C(13)-C(14)	-176,5(3)
C(3)-C(1)-C(5)-C(6)	-112,3(5)	N(5)-N(4)-C(13)-C(12)	174,7(3)
N(1)-C(5)-C(6)-C(7)	0,2(5)	Os(1)-N(4)-C(13)-C(12)	0,2(4)
C(1)-C(5)-C(6)-C(7)	-179,6(4)	N(3)-C(12)-C(13)-C(14)	175,2(4)
N(1)-N(2)-C(7)-C(6)	-0,4(4)	C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	-0,6(8)
Os(1)-N(2)-C(7)-C(6)	175,0(3)	N(3)-C(12)-C(13)-N(4)	-0,3(5)
N(1)-N(2)-C(7)-C(8)	-179,0(3)	C(11)-C(12)-C(13)-N(4)	-176,1(4)
Os(1)-N(2)-C(7)-C(8)	-3,6(4)	N(4)-C(13)-C(14)-C(15)	2,3(4)
C(5)-C(6)-C(7)-N(2)	0,1(5)	C(12)-C(13)-C(14)-C(15)	-173,5(5)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	178,4(4)	N(4)-N(5)-C(15)-C(14)	0,6(5)
C(12)-N(3)-C(8)-C(9)	0,0(6)	N(4)-N(5)-C(15)-C(16)	-176,6(4)
Os(1)-N(3)-C(8)-C(9)	-174,9(3)	C(13)-C(14)-C(15)-N(5)	-1,8(5)
C(12)-N(3)-C(8)-C(7)	178,8(3)	C(13)-C(14)-C(15)-C(16)	175,2(4)
Os(1)-N(3)-C(8)-C(7)	3,9(4)	N(5)-C(15)-C(16)-C(18)	-115,0(5)
N(2)-C(7)-C(8)-N(3)	0,0(5)	C(14)-C(15)-C(16)-C(18)	68,2(6)
C(6)-C(7)-C(8)-N(3)	-178,2(4)	N(5)-C(15)-C(16)-C(19)	6,8(6)
N(2)-C(7)-C(8)-C(9)	178,7(4)	C(14)-C(15)-C(16)-C(19)	-170,1(4)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	0,5(8)	N(5)-C(15)-C(16)-C(17)	125,3(4)
N(3)-C(8)-C(9)-C(10)	-0,6(6)	C(14)-C(15)-C(16)-C(17)	-51,5(6)

3.4. ЈОНСКЕ ТЕЧНОСТИ КАО КОСОЛВЕНТИ

Од јонских течности коришћених као косолвенти, јонска течност IL1 је комерцијално доступна, док су IL2-12 нетоксичне јонске течности синтетисане према објављеним процедурама.²⁶⁶⁻²⁶⁹ Јонске течности IL2-8 припадају групи течности на бази холина (IL2 је холин никотинат, IL3 је холин биотинат, IL4 је холин γ -аминобутират, IL5 је холин аскорбат, IL6 је холин сирингат, IL7 је холин бензоат, IL8 је холин салицилат), док су IL9-12 јонске течности на бази агматина (IL9 је агматин никотинат, IL10 је агматин аскорбат, IL11 је агматин салицилат и IL12 је агматин ибупрофенат).

3.5. КИНЕТИЧКА МЕРЕЊА

Кинетичка мерења изведена су спектрофотометријски праћењем промене апсорбанце на радној таласној дужини у функцији времена. Радне таласне дужине одређене су снимањем спектра у опсегу од 220 до 500 nm након мешања раствора комплекса са нуклеофилима, при чему је за свако мерење изабрана таласна дужина са најизраженијом временском променом апсорпције. Испитивани су биолошки важни нуклеофили GSH, L-Met и 5'-GMP, а реакције су праћене на температури од 310 K. Код појединих система кинетичка мерења су додатно испитивана на 288 и 298 K ради одређивања активационих параметара.^{279,280}

Кинетичка мерења су изведена при условима *pseudo*-првог реда, при чему је концентрација нуклеофила била најмање десет пута већа од концентрације комплекса. Реакције су инициране додавањем 0,50 mL раствора нуклеофила у 2,50 mL термички изједначеног раствора комплекса у кварцној кивети, а праћење реакција је трајало најмање осам полувремена реакције. Константе брзине *pseudo*-првог реда (k_{obsd}) израчунате су као средње вредности два до три независна кинетичка UV-Vis мерења. Вредности су одређене применом једначине (1), која описује кинетику реакције *pseudo*-првог реда, праћењем промене апсорпције раствора (A_t) у функцији времена (t) на специфичној радној таласној дужини.

$$\ln(A_t - A_\infty) = \ln(A_0 - A_\infty) - k_{\text{obsd}}t \quad (1)$$

У једначини 1 зависност $\ln(A_t - A_\infty)$ од времена t је линеарна, што омогућава израчунавање константе брзине *pseudo*-првог реда (k_{obsd}) на основу нагиба праве. Вредност A_∞ представља апсорпцију раствора након што реакција достигне равнотежу, односно након 8-10 полувремена реакције. Константе брзине реакције другог реда (k_1) добијене су анализом зависности k_{obsd} од концентрације нуклеофила. Ова зависност је такође линеарна, а константа брзине реакције (k_1) израчуната је из нагиба праве применом једначине (2).

$$k_{\text{obsd}} = k_1[\text{Nu}] + k_{-1}[\text{Cl-}] \quad (2)$$

У једначини 2, k_1 представља константу брзине директне, а k_{-1} константу брзине повратне реакције супституције. Вредности константи и других термодинамичких параметара израчунате су коришћењем програма *Microsoft Excel 2010* и *OriginPro 8*.

Познавање вредности константе брзине хемијске реакције на најмање три температуре омогућава одређивање термодинамичких параметара активирања. За реакције које су праћене на три различите температуре одређене су промена енталпије активирања ($\Delta H^\ddagger$) и промена ентропије активирања ($\Delta S^\ddagger$).^{279,280} Ови активациони параметри израчунати су применом логаритамског облика Ејрингове једначине (3).

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = -\frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \ln\left(\frac{k'}{h}\right) \pm \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (3)$$

У једначини 3, k представља константу брзине, T је температура, $\Delta H^\ddagger$ и $\Delta S^\ddagger$ су енталпија и ентропија активирања, R , k' и h су гасна, Болцманова и Планкова константа. Из линеарне зависности $\ln(k/T)$ од $1/T$ могу се одредити активациони параметри, $\Delta H^\ddagger$ и $\Delta S^\ddagger$, из нагиба и одсечка праве,

3.6. ИСПИТИВАЊЕ ИНТЕРАКЦИЈА КОМПЛЕКСА СА ДНК

3.6.1. Испитивање интеракција апсорпционом спектроскопијом

Интеракције комплекса са ДНК испитиване су UV-Vis апсорпционом спектроскопијом у растворима са фиксном концентрацијом комплекса (8 μM) и променљивим концентрацијама ДНК (0–40 μM), што одговара моларним односима од 0 до 4,5. Концентрација ДНК одређена је на основу апсорбанце на 260 nm ($\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), док је однос A_{260}/A_{280} (1,8–1,9) потврдио одсуство протеина.²⁸¹ Спектри су снимани на 298 K у 0,01 M фосфатном пуферу (PBS) при pH 7,4. Константа везивања (K_b) израчуната је применом Волф-Шимерове једначине (3).²⁸²

$$\frac{[\text{ДНК}]}{(\epsilon_A - \epsilon_f)} = \frac{[\text{ДНК}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (4)$$

У једначини 4 $[\text{ДНК}]$ представља концентрацију ДНК, $\epsilon_A = A_{\text{obsd}}/[\text{комплекс}]$ је моларни коефицијент апсорпције посматраног комплекса, ϵ_f је коефицијент апсорпције слободног комплекса и ϵ_b је коефицијент апсорпције везаног комплекса. Константа везивања (K_b) израчунава се из односа нагиба и одсечка графика $[\text{ДНК}]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ у односу на $[\text{ДНК}]$.

3.6.2. Испитивање интеракција флуориметријом

3.6.2.1. Испитивање интеркалационе способности комплекса у присуству етидијум-бромида

Флуориметријом је испитана способност комплекса да измести етидијум-бромид (ЕБ) из ДНК-ЕБ, чиме је одређен њихов интеркалациони потенцијал. Интензитет флуоресценције ЕБ мерен је при екситацији на 527 nm и емисији на 612 nm, у раствору са фиксним концентрацијама ДНК и ЕБ (10 μ M) и променљивом концентрацијом комплекса (0–50 μ M) на 298 K.

Флуоресцентни спектри снимани су у опсегу 550–750 nm, при чему је емисија потицала искључиво од ДНК-ЕБ, јер комплекси нису флуоресцирали у датом опсегу. Ширина оптичких прореда за екситацију и емисију износила је 10 nm, а брзина скенирања током свих мерења одржавана је константном. Смањење флуоресцентне емисије услед додатка комплекса указује на постепено измештање ЕБ из ДНК-ЕБ. Стерн-Волмерова константа (K_{sv}) смањења флуоресценције одређена је применом једначине (5).²⁸³

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (5)$$

У једначини 5 $[Q]$ представља концентрацију комплекса, I_0 и I представљају интензитете емисије у одсуству и у присуству комплекса, а K_{sv} представља Стерн-Волмерову константу. Вредности Стерн-Волмер-ове константе (K_{sv}) израчунате су из нагиба графика линеарне зависности I_0/I у односу на $[Q]$.

3.6.2.2. Испитивање везивања комплекса и Hoechst 33258 за мали жљеб ДНК

Флуориметријом је испитана способност комплекса да измести Hoechst 33258 (Ное) из Ное-ДНК, чиме је одређен афинитет везивања у малом жљебу ДНК. Интеракција је праћена мерењем флуоресцентне емисије Ное при екситацији на 346 nm у раствору са фиксним концентрацијама ДНК и Ное (10 μ M) и променљивом концентрацијом комплекса (0–50 μ M) на 298 K.

Флуоресцентни спектри снимани су у опсегу 360–600 nm, при чему је емисија потицала искључиво од Ное-ДНК, будући да комплекси нису показивали флуоресценцију у датом опсегу. Оптички прореди за екситацију и емисију били су 10 nm, а брзина скенирања одржавана је константном током свих мерења. Стерн-Волмерова константа (K_{sv}) смањења флуоресценције одређена је применом једначине (5).²⁸³

3.6.3. Испитивање интеркалационе способности комплекса са ДНК мерењем вискозности

Вискозитет раствора ДНК одређен је коришћењем термостатисаног вискозиметра на $298,01 \pm 0,1$ К. Промене вискозитета праћене су у присуству комплекса родијума и осмијума, као и уз додавање јонских течности (IL) као косолвената.

Време протока раствора мерено је дигиталном штоперицом, при чему је сваки узорак анализиран шест пута, а резултати су представљени као средње вредности. Добијени подаци приказани су у облику $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ у односу на r , где је η вискозитет ДНК раствора у присуству комплекса, а η_0 вискозитет почетног раствора ДНК у PBS (pH 7,4). Вискозитет је израчунат на основу времена протока раствора кроз капилару (t), коригованог за време протока пуферског раствора (t_0), према једначини (6).^{284,285}

$$\eta = (t-t_0)/t_0 \quad (6)$$

3.6.4. Испитивање интеркалационе способности комплекса са ДНК мерењем термалне денатурације

Термална денатурација ДНК ($150 \mu\text{M}$) одређена је спектрофотометријски праћењем апсорбанце на 260 nm у одсуству и присуству комплекса ($50 \mu\text{M}$). Мерења су праћена у температурском опсегу од $313,15 \text{ K}$ до $363,15 \text{ K}$ (40 до 90°C), са брзином загревања од 1 K min^{-1} , у 10 mM PBS раствору (pH 7,4) који садржи 1% DMSO. Вредности температуре топљења ДНК (T_m) одређене су из графика (dA_{260}/dT у односу на T) добијеног из профила топљења.^{286,287}

3.6.5. Испитивање интеракција комплекса са ДНК методом гел електрофорезе

Интеракције комплекса и ДНК испитане су и методом гел електрофорезе, коришћењем $50 \mu\text{g}$ ДНК из семене течности лососа инкубиране са комплексом у концентрацијама од 0 , 20 , 40 и $60 \mu\text{g}$. Реакције су изведене на $310,15 \text{ K}$ током 24 h у мраку. Формирани комплекс/ДНК адукти анализирани су електрофорезом на $0,8\%$ агарозном гелу у *Tris*-базном пуферу са сирћетном киселином и ЕДТА (ТАЕ $1\times$), уз додатак $1 \mu\text{L}$ раствора етидијум-бромида (10 mg mL^{-1}) по милилитру гела. Раствор пуфера (ТАЕ $50\times$) припремљен је растварањем 241 g *Tris*-базе у води, додавањем $57,1 \text{ mL}$ ледене сирћетне киселине и 100 mL 500 mM раствора ЕДТА (pH 8,0), након чега је запремина подешена на 1 L .^{268,277}

3.7. ИСПИТИВАЊА ИНТЕРАКЦИЈА КОМПЛЕКСА СА СЕРУМСКИМ АЛБУМИНОМ

Интеракције комплекса са серумским албуминима (BSA и HSA) испитане су спектрофотометријски методом гашења флуоресценције. Мерења су праћена на собној температури при рН 7,4 у 0,01 М фосфатном пуферу (PBS). Раствор албумина је екситован на 295 nm, а емисиони спектри снимани су у опсегу од 300 до 500 nm. Ширине прореда за екситацију и емисију биле су 10 nm, а брзина скенирања је одржавана константном током свих мерења. Концентрација раствора албумина је била константна (2 μ M), док је концентрација комплекса била од 0 до 30 μ M. Додатак растућих концентрација комплекса довео је до значајног смањења емисије флуоресценције на око 352 nm. Смањење флуоресцентне емисије услед додатка комплекса указује на интеракцију комплекса са албумином.

Стерн-Волмерова константа K_{sv} одређена је применом Стерн-Волмерове једначине (5) у којој су I_0 и I интензитети флуоресценције пре и након додатка комплекса, а $[Q]$ је концентрација испитиваног комплекса. Константа везивања и број везивних места одређени су применом Хилове једначине (7).²⁸⁸

$$\log \left[\frac{I_0 - I}{I} \right] = \log K + n \log [Q] \quad (7)$$

У једначини 7 I_0 и I представљају интензитете флуоресценције HSA у одсуству и у присуству комплекса, K је константа везивања, n број везивних места по молекулу албумина, а $[Q]$ концентрација комплекса.

3.7.1. Испитивање интеракције комплекса са HSA у присуству маркера

Тачно место везивања комплекса на HSA одређено је спектрофлуориметријски преко конкурентног везивања у присуству маркера за специфична везивна места. Флуоресцентни спектри снимани су на 298 K у 0,01 М фосфатном пуферу (PBS) при рН 7,4. Раствор албумина је екситован на 295 nm, а емисиони спектри су снимани у опсегу од 300 до 500 nm. Ширине прореда за екситацију и емисију биле су 10 nm, а брзина скенирања је одржавана константном током свих мерења. Као специфични маркери коришћени су еозин Y и ибупрофен.^{289,290} Концентрације раствора албумина и маркера биле су еквимоларне и константне (2 μ M), док су раствори комплекса додати у растућим концентрацијама до односа 5.

3.7.2. FRET тест

Флуоресцентни резонантни пренос енергије (FRET) представља неструктивну спектроскопску методу која пружа информације о релативној оријентацији и удаљености

између донорских (Trp 214, D) и акцепторских флуорофора (комплекс, A). У складу са Ферстеровом теоријом, ефикасност преноса енергије између донора и акцептора (E), просечна удаљеност (r) и критична удаљеност за 50% преноса енергије (R_0) израчунате су помоћу следећих једначина (6,7).²⁹¹

$$E = \frac{R_0^6}{(R_0^6 + r^6)} = 1 - \frac{I}{I_0} \quad (8)$$

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{25} K^2 n^{-4} \Phi_D J \quad (9)$$

I и I_0 представљају интензитете флуоресценције донора у присуству и одсуству акцептора. Биохемијски параметри укључују оријентациони фактор простора $K^2 = 2/3$, индекс преламања медијума $n = 1,33$ и квантну ефикасност флуоресценције донора $\Phi_D = 0,118$. Резонантни пренос је ефикаснији када је спектрално преклапање између емисије донора и апсорпције акцептора велико. Ефекат спектралног преклапања између емисије донора и спектра апсорпције акцептора (J) израчунат је помоћу следеће једначине (8).^{290,292}

$$J = \int_0^\infty I(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 / \int I(\lambda) d(\lambda) \quad (10)$$

$I(\lambda)$ представља кориговани интензитет флуоресценције донора у опсегу таласних дужина од λ до $\lambda + \Delta\lambda$, а $\varepsilon(\lambda)$ је коефицијент екстинкције акцептора при таласној дужини λ .

3.8. ИСПИТИВАЊЕ ЛИПОФИЛНОСТИ КОМПЛЕКСА

Липофилност комплекса одређена је методом раније описаном у литератури.²⁹³ Испитивани комплекси растворени су у диметилсулфоксиду (DMSO), након чега су додати у систем вода/п-октанол. Смеша је подвргнута интензивном мешању током 1 сата на собној температури како би се остварила расподела комплекса између фаза. Након тога, раствори су остављени 24 сата да се фазе потпуно раздвоје. Концентрације комплекса у обе фазе одређене су спектрофотометријском анализом. Логаритамски коефицијенти расподеле ($\log P$) израчунати су применом једначине (11), где је C_0 концентрација комплекса у п-октанолу, а C_w концентрација у воденој фази.

$$\log P = \log(C_0/C_w) \quad (11)$$

3.9. МЕТОДЕ КОМПЈУТЕРСКЕ ХЕМИЈЕ

3.9.1. DFT метода

У овим испитивањима коришћене су B3LYP/LANL2DZp хибридне DFT калкулације са псеудопотенцијалима за тешке елементе и поларизационим функцијама за валентне

електроне. Оптимизација структура спроведена је уз ограничења симетрије, а вибрационе фреквенције потврдиле су да су структуре енергетски минимуми. Релативне енергије кориговане су за вибрациону нулту тачку (ZPE). Утицај воде као растварача апроксимиран је применом CPCM формализма. За све прорачуне коришћен је програм *Gaussian*.²⁹⁴⁻²⁹⁸

3.9.2. Симулације молекулског докинга

Структурне координате фрагмената канонског Б-ДНК (PDB: 1BNA)²⁹⁹ и ДНК са интеркалационим размаком (PDB: 1Z3F)³⁰⁰, као и хуманог серум албумина (HSA; PDB: 2BXD)³⁰¹ преузете су из Протеинске базе података (<http://www.rcsb.org>). 1BNA представља кристалну структуру 30 синтетичког ДНК, док 1Z3F представља кристалну структуру ДНК фрагмента са интеркалираним антитуморским агенсом, елиптицином. Неполарни водонични атоми су спојени у *AutoDockTools* (<http://autodock.scripps.edu>), а координате су конвертоване у *PDBQT* формат.

За сваку изведену симулацију, резолуција решетке и параметри су подешени у *Molegro Virtual Docker* (MVD). Током симулација, најповољније структуре су задржане и визуализоване помоћу програма *CHIMERA* (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>), а резултати су анализирани на основу *MVD* функција као што су *MolDock*, *Docking*, *Rerank* и *Hbond*.³⁰² Грид мапе су израђене у *AutoGrid4* користећи координате за 1BNA или 1Z3F, тако да покривају цео молекул ДНК. Параметри за Rh/Os и Cl атоме израчунати су помоћу *Gaussian16* и интегрисани у *PDBQT*. Ове мапе су коришћене за даље оптимизације и процену интеракција комплекса са ДНК/HSA молекулима.

3.10. БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА

3.10.1. Припрема ћелија и култивација

У испитивањима коришћене су хумане ћелијске линије колоректалног карцинома (HCT-116), хумана ћелијска линија аденокарцинома грлића материце (HeLa) и хумана ћелијска линија колоректалног тумора (SW-480), док је као контрола служила хумана ћелијска линија здравих фибробласта плућа (MRC-5) добијене из *American Type Culture Collection* (ATCC). Ћелијске линије HeLa, HCT-116, SW-480 и MRC-5 култивисане су у комплетном DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) медијуму, који је садржао 10% феталног говеђег серума, 100 IU/mL пеницилина и 100 µg/mL стрептомицина, у контролисаној атмосфери инкубатора на температури од 37°C, уз 5% CO₂.

3.10.2. *In vitro* цитотоксична активност (MTT тест)

Цитотоксични ефекти испитиваних комплекса одређени су стандардизованим MTT³⁰³ тестом (протокол Лабораторије за биоинжењеринг СВ-005). Жута тетразолијумова со, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид (MTT) прелази у карактеристичан љубичасти формазан услед активности митохондријалне редуктазе у

метаболички активним ћелијама. Проценат живих ћелија приказан је у односу на примењену концентрацију комплекса и упоређен са контролом (нетретиране ћелије). У плочама са 96 бунарића засејано је 10.000 ћелија, које су култивисане 24 сата на 37°C у атмосфери са 5% CO₂ у комплетном ДЕММ медијуму. Након 24 сата инкубације ћелије су третиране медијумом који је садржао испитиване комплексе у концентрацијама од 0,1 – 1 – 10 – 50 – 100 – 500 μМ. Након 24 и 72 сата третмана вијабилност ћелија процењена је праћењем редукције МТТ супстанце (Acros Organics, 158990010) у љубичасте кристале формазана, који су затим растворени у диметилсулфоксиду (DMSO) (Fisher Chemical, D/4121/PB15). Интензитет љубичасте боје, односно апсорбанце, мери се на ELISA читачу (Rayto 2100C) на 550 nm.

3.10.3. *In vitro* истраживање редокс статуса

Испитиван је утицај комплекса на промену нивоа супероксид анјон радикала (O₂^{•-}) (протокол Лабораторије за биоинжењеринг СВ-006), нитрита (NO₂⁻) (протокол Лабораторије за биоинжењеринг СВ-007) и редукованог глутатиона (GSH) (протокол Лабораторије за биоинжењеринг СВ-008) на туморске и здраве ћелијске линије.

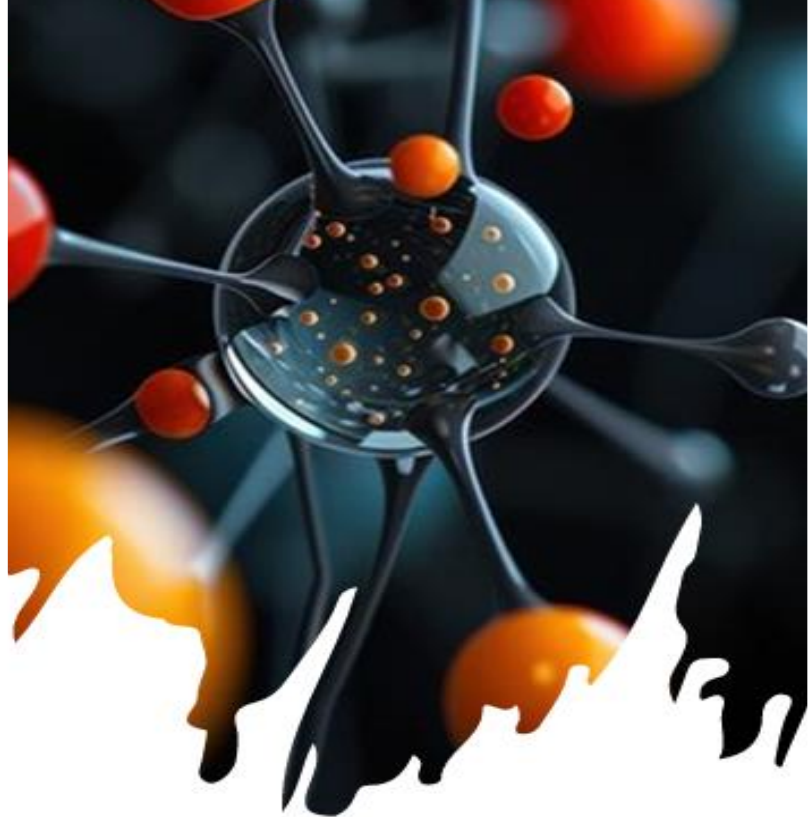
Супероксидни анјон радикал (O₂^{•-}) одређен је стандардизованим NBT протоколом, који се заснива на редукцији нитроплавог тетразолијума (Nitro Blue Tetrazolium Chloride - Acros Organics, BP108-1) у нитроплави формазан, па након тога мерењу интензитета апсорпције љубичастих кристала на 630 nm.³⁰⁴ У плочама са 96 бунарића засејано је 30.000 ћелија које су инкубиране под контролисаним условима 24 сата. Након инкубације ћелије су третиране са 100 μL раствора комплекса у концентрацијама од 1 до 100 μМ. Након 24 и 72 сата третмана, произведени O₂^{•-} је процењен додавањем 10 μL NBT раствора (2,5 mg/mL у PBS). Након 3 сата инкубације, ћелије су опране са топлим PBS и метанолом како би се уклонио екстрацелуларни O₂^{•-}. Након тога, 100 μL 2M КОН је додато за отварање ћелијске мембране и инкубирано 15 минута на собној температури, након чега је додато 100 μL DMSO за растварање формазанских кристала.

Нитрити (NO₂⁻) могу бити индикатори за NO и друге реактивне азотне врсте (RNS) у ћелијама. Нитрити су детектовани коришћењем Гриесове методе, тј. реакције диазотизације нитрита са сулфаниламидом (SA) (Karl Roth, 4716-100G) и (NED) (Karl Roth, 4342-25G) који дају стабилно жуто азотно једињење, чији се интензитет апсорпције мери на 492 nm.³⁰⁵ Попут NBT протокола, у плочама са 96 бунарића засејано је 30.000 ћелија које су третиране у истом концентрационом опсегу као код NBT методе. Након 24 сата инкубације 50 μL супернатанта из сваког бунарића је пренето на другу плочу, уз додавање 50 μL SA и NED. Након 15 минута инкубације измерена је апсорпција.

Редуковани глутатион (GSH) је део механизма првобитне одбране ћелија против ксенобиотика и редокс баланса. Испитивање је засновано на оксидацији редуковане форме глутатиона помоћу DTNB да би се формирала жута 5'-тио-2-нитробензоична киселина (TNB), чији интензитет боје се мери на 405 nm помоћу ELISA читача.³⁰⁶ У плочама са 96 бунарића засејано је 30.000 ћелија које су инкубиране 24 сата под контролисаним условима и третиране у истом концентрационом опсегу као код NBT и Гриесове методе. Након инкубације плоче су центрифугиране 10 минута на 1000 g/4°C. Супернатант је уклоњен и замењен са 100 μL хладне 2,5% сулфосалицилне киселине (Centrohema, 0213). Након инкубације од 15 минута на 4°C, плоче су поново центрифугиране 15 минута на 1000 g/4°C.

50 μL супернатанта је пренето на другу плочу са додавањем 100 μL 1 mM DTNB раствора. Након инкубације од 5 минута на собној температури измерена је апсорпција.

Сви редокс параметри израчунати су у односу на број вијабилних ћелија.



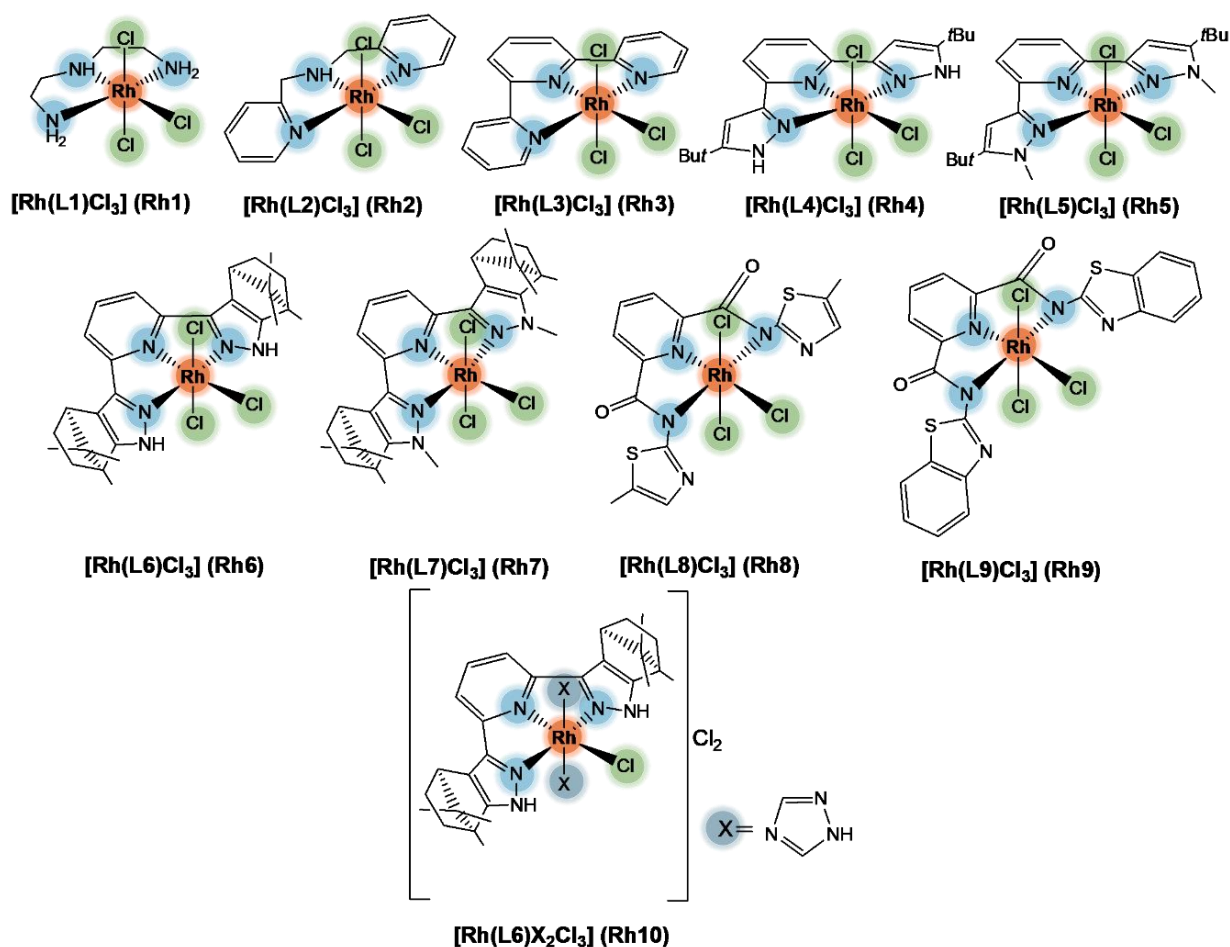
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА



4.1. СИНТЕЗА И СТРУКТУРНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА КОМПЛЕКСА

4.1.1. Синтеза и структурна карактеризација комплекса Rh(III)

Синтетисано је десет комплексних једињења Rh(III), означених као **Rh1-10**, са лигандима *dien*-ом, дериватима пиридина, камфорским дериватима *bis*-пиридилпиридина, као и дериватима тиазол-пиридина.²⁷⁰⁻²⁷⁷ Сви синтетисани комплекси Rh(III) добијени су полазећи од $\text{RhCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ и одговарајућих лиганата у етанолу. Синтезе комплекса **Rh1-9** изведене су у еквимоларном молском односу (комплекс : лиганд = 1:1), док је при синтези комплекса **Rh10** молски однос благо измењен због присуства два различита лиганда. Детаљан поступак синтезе комплекса описан је у Експерименталном делу, 3.3.1., док су структурне формуле добијених комплекса приказане на Слици 4.1.



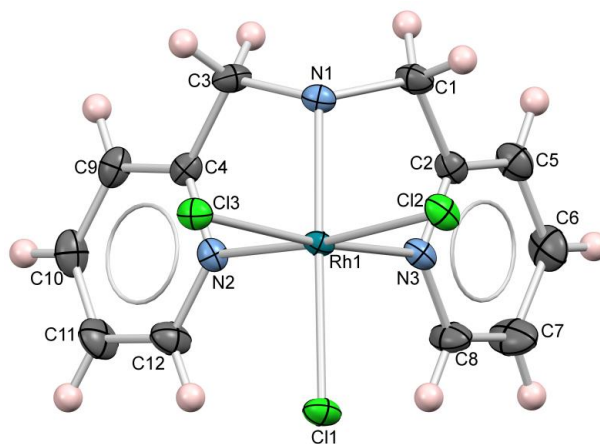
Слика 4.1. Структурне формуле синтетисаних комплексних једињења Rh(III).

Карактеризација синтетисаних комплекса **Rh1-10** извршена је применом елементалне микроанализе, NMR и MS спектроскопије, а резултати ових анализа приказани су у Експерименталном делу 3.3.1.

Елементалне анализе комплекса показале су врло добро слагање са саставом комплекса $[\text{Rh}(\text{L1-9})\text{Cl}_3]$ и $[\text{Rh}(\text{L6})(1,2,4\text{-triazole})_2\text{Cl}]\text{Cl}_2$. Спектри ^1H и ^{13}C NMR указују на формирање искључиво једне врсте комплекса, при чему су сигнали лиганда (пиразол, пиридин, камфор и др.) значајно померени у односу на слободне лиганде. Комплекси су даље карактерисани ESI-MS масеном спектрометријом, где главни пикови у спектрима одговарају самим комплексима или фрагментима комплекса. Поред тога, за комплексе **Rh2** и **Rh7** добијени су кристали погодни за рендгенску структурну анализу, којом су структуре ових комплекса додатно потврђене.

4.1.1.1. Рендгенско-структурна анализа $[\text{RhL2Cl}_3]$ (**Rh2**) комплекса

Рендгенска структурна анализа потврдила је састав комплекса $[\text{RhL2Cl}_3]$ и показала да овај комплекс има благо дисторзовану октаедарску геометрију. Структура комплекса **Rh2** приказана је на Слици 4.2.²⁷⁵



Слика 4.2. Структура $[\text{RhL2Cl}_3]$ (**Rh2**) комплекса.

Лиганд L2 је тридентатно координован за Rh(III) јон, формирајући октаедарски комплекс у којем преостала три координациона места заузимају јони хлора. Координација N,N,N-атома из L2 доводи до формирања два петочлана прстена, што обезбеђује додатну стабилност комплекса. Геометријске карактеристике, укључујући дужине веза и торзионе углове, приказане су у Табелама 3.1. и 3.2. у Експерименталном делу 3.3.

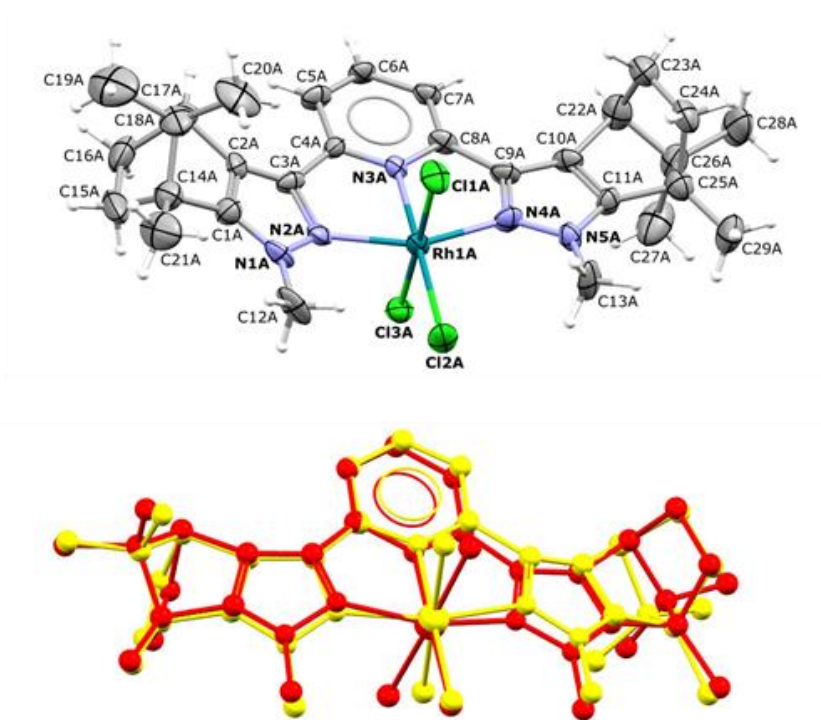
Из података у Табели 3.2. може се уочити да постоје благе варијације у дужинама Rh-N веза, које се крећу од 2.023(3) до 2.053(3) Å. Најдужа веза је између Rh(III) јона и аксијалног атома азота. Сличан тренд примећен је и код Rh-Cl веза, чије дужине варирају између 2.3519(10) и 2.3544(11) Å. Посебно је значајан просторни однос два фенил-прстена

у лиганду L2, који су готово перпендикуларни, са углом од $83,37(2)^\circ$. Стерне интеракције између фенил-прстенова су минималне, што доприноси стабилности комплекса.

Уочене геометријске карактеристике и дужине веза резултат су електронских и стерних својстава лиганда L2, као и *trans*-утицаја аксијално координованих атома азота, што је у складу са структурама сличних комплекса раније описаних у литератури.²⁷⁵

4.1.1.2. Рендгенско-структурна анализа [RhL7Cl₃] (Rh7) комплекса

Рендгенска структурна анализа потврдила је састав комплекса [RhL7Cl₃] и показала благо дисторзовану октаедарску геометрију. Структура комплекса Rh7 приказана је на Слици 4.3.²⁷⁰



Слика 4.3. Структура [RhL7Cl₃] (Rh7) комплекса.

Лиганд L7 је тридентатно координован за Rh(III) јон, формирајући октаедарски комплекс. Резултати структурне анализе, укључујући дужине карактеристичних веза, приказани су у Табелама 3.3. и 3.4. у Експерименталном делу 3.3. Како је наведено у Табели 3.4., веза Rh(1)—N(3), која повезује Rh(III) јон са атомом азота из пиридинског прстена, краћа је у односу на друге везе између Rh(III) јона и атома азота.

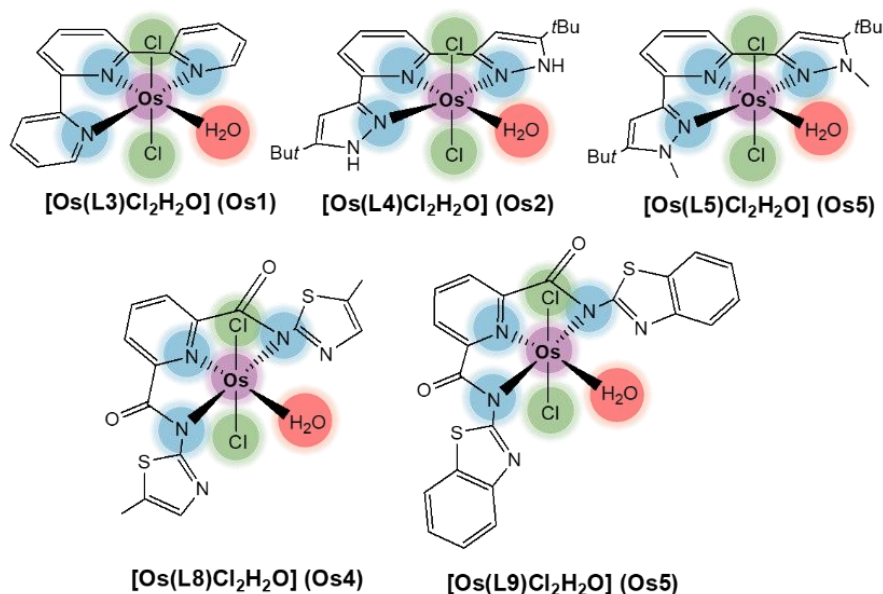
Тридентатна координација *N,N,N*-донорског лиганда ствара изражени *trans*-утицај на атом Cl2, што доводи до приближавања централног атома азота Rh(III) јону и узрокује нешто већу дужину везе Rh1—Cl2, која је идентична у молекулима А и В.

Углови веза N3—Rh1—Cl1 у оба молекула (А и В) су мало већи од 90°, док су углови N3—Rh1—Cl3 мањи од 90°. Ове разлике одражавају стерни утицај волуминозног L6 хелатног лиганда. Група Rh1Cl2N2N3N4 је готово планарна, а највеће одступање од средње равни у оба молекула износи само 0,111(9) Å за атом N3А. Поређењем углова у молекулу А (21,0(7)° и 10,7(7)°) и истих равни у молекулу В (5,2(7)° и 17,4(7)°), уочава се да је молекул А више одступио од планарности. Ово указује на постојање благе разлике у конформацијама молекула А и В комплекса **Rh7**, што је додатно потврђено анализом торзионих углова.

Скраћење везе између Rh(III) јона и атома азота из пиридинског прстена у складу је са резултатима претходних истраживања и повезано је са повећаном електрофилношћу Rh(III) јона. Наиме, пиридински прстен преузима део наелектрисања са метала, чинећи га додатно позитивним. Овај ефекат је посебно карактеристичан за Pt(II) и Pd(II) комплексе. Овај утицај одражава се и на дужину Rh—Cl веза, при чему је веза Rh(1)—Cl(2) најдужа, што потврђује *trans*-утицај координованог пиридина.^{270,275}

4.1.2. Синтеза и структурна карактеризација комплекса Os(II)

Синтетисано је пет комплексних једињења Os(II), означених као **Os1-5**, са лигандима дериватима пиридина, као и дериватима тиазол-пиридина.^{268,276} Комплекси Os(II) добијени су полазећи од OsCl₃ × 3H₂O и одговарајућих лиганата. Синтезе комплекса **Os1-5** изведене су у еквимоларном молском односу (комплекс : лиганд = 1:1) у изопропанолу. Детаљан поступак синтезе ових комплекса описан је у Експерименталном делу 3.3.2, док су структурне формуле добијених комплекса приказане на Слици 4.4.



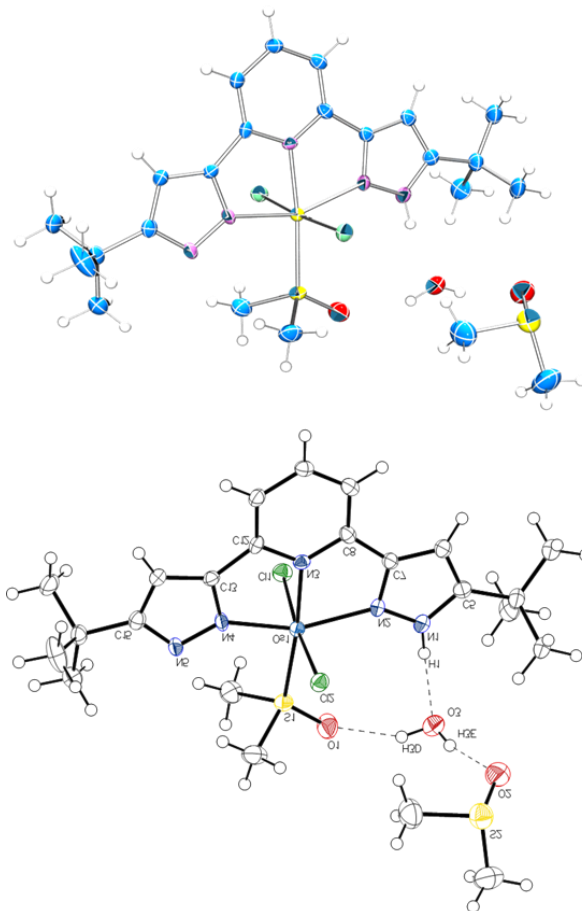
Слика 4.4. Структурне формуле синтетисаних комплексних једињења Os(II).

Карактеризација синтетисаних комплекса **Os1-5** извршена је применом елементалне микроанализе, NMR и MS спектроскопије, а резултати ових анализа приказани су у Експерименталном делу 3.3.2.

Елементалне анализе ових комплекса показале су врло добру сагласност са саставом комплекса $[\text{OsLCl}_2\text{H}_2\text{O}]$. Спектри ^1H и ^{13}C NMR указују на формирање искључиво једне врсте комплекса, при чему су сигнали лигананда значајно померени у односу на сигнале слободних лигананда. Комплекси су даље карактерисани ESI-MS масеном спектрометријом где главни пикови у спектрима одговарају комплексу и фрагментима комплекса. Поред тога, за комплекс **Os2** добијени су кристали погодни за рендгенску структурну анализу, којом је структура овог комплекса додатно потврђена.

4.1.2.1. Рендгенско-структурна анализа $[\text{Os}(\text{L4})\text{Cl}_2\text{H}_2\text{O}]$ (**Os2**) комплекса

Рендгенска структурна анализа потврдила је састав комплекса $[\text{Os}(\text{L4})\text{Cl}_2\text{H}_2\text{O}]$ и благо дисторзовану октаедарску геометрију. Структура комплекса **Os2** приказана је на Слици 4.5.



Слика 4.5. Структура $[\text{OsL4Cl}_2(\text{dmsO})]\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot\text{DMSO}$ (**Os2**) комплекса.

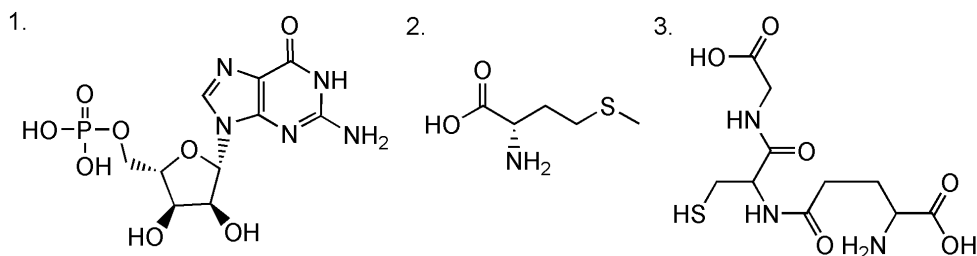
Лиганд L4 је тридентатно координован за Os(II) јон, формирајући октаедарски комплекс. Добијени подаци као и вредности дужина веза приказане су у Табелама 3.5-3.7. у Експерименталном делу 3.3. Током процеса кристализације из раствора DMSO и воде, координован молекул H₂O је замењен DMSO молекулом. У добијеном комплексу тридентатни *N,N,N*-доноратни лиганд, који је готово планаран и везан је меридијално.

Анализа показује да се централни атом осмијума налази на удаљености од 0.959(2) Å изнад равни коју формирају атоми азота (N2-N3-N4). Истовремено, атом сумпора координованог DMSO молекула је готово у равни инертног лиганда, са одступањем од 0.039(9) Å у односу на раван. Аксијалне позиције у комплексу заузимају хлоридо лиганди, чиме се додатно дефинише геометрија комплекса. На Слици 4.5. се могу уочити и водоничне везе између кристалисаних молекула H₂O, DMSO и молекула комплекса. Ове интеракције играју важну улогу у стабилизацији целокупне кристалне структуре.

4.2. ИСПИТИВАЊЕ СУПСТИТУЦИОНИХ РЕАКЦИЈА КОМПЛЕКСА

Реактивност Rh(III) и Os(II) комплекса испитана је у реакцијама супституције са 5'-GMP, L-Met и GSH, чије су структуре приказане на Слици 4.6. При томе су анализиране везивне карактеристике, стерни фактори и нуклеофилност одабраних биомолекула.

Сви испитивани комплекси садрже лабилне хлоридо лиганде, подложне замени биолошким молекулима. L-Met и GSH су изабрани као представници *S*-донорских нуклеофила, с обзиром на њихову високу унутарћелијску концентрацију и улогу у одржавању редокс хомеостазе, док је 5'-GMP проучаван као *N*-донорски нуклеофил, релевантан за интеракцију са ДНК молекулом.^{306,307}



Слика 4.6. Структурне формуле испитиваних нуклеофила: 1. 5'-GMP, 2. L-Met и 3. GSH

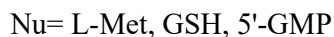
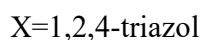
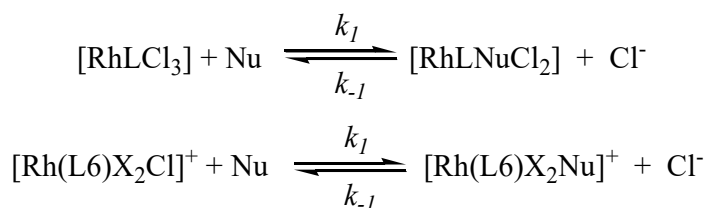
Испитивање афинитета комплекса према овим нуклеофилима омогућава процену њихове стабилности у физиолошким условима, као и њиховог потенцијала за везивање за ДНК. Посебно је важно утврдити у којој мери комплекси могу одржати своју способност интеракције са ДНК у присуству конкурентских *S*-донорских нуклеофила, попут L-Met и GSH, који би могли утицати на њихову биорасположивост и механизам деловања у ћелијама.^{306,307}

Један од кључних изазова у примени комплекса платине у хемиотерапији представља њихова склоност да се везују за *S*-донорске протеине и мале молекуле као што је глутатион. Ова интеракција може ограничити доступност комплекса за везивање са ДНК, што непосредно утиче на њихову цитотоксичност.^{16,55,56,306,307} Ова истраживања доприносе бољем разумевању механизма деловања комплекса и њихове стабилности у физиолошким условима, као и способности да задрже селективну интеракцију са ДНК упркос присуству конкурентних *S*-донорских лиганда.

Кинетика супституције хлорида лиганда праћена је UV-Vis спектрофотометријом, мерењем промене апсорбанце у функцији времена. Концентрације нуклеофила одржаване су најмање десетоструко већим у односу на концентрацију комплекса, чиме су обезбеђени услови *pseudo*-првог реда. Реакције су праћене у физиолошким условима, у раствору који садржи 25 mM HEPES пуфер и 50 mM NaCl, чиме се сузбија солволиза и одржава рН на 7,2. Све реакције су праћене на температури од 310 K, што одговара физиолошким условима. Додатно, поједине реакције су испитиване на три различите температуре ради одређивања термодинамичких параметара и бољег разумевања реакционог механизма.

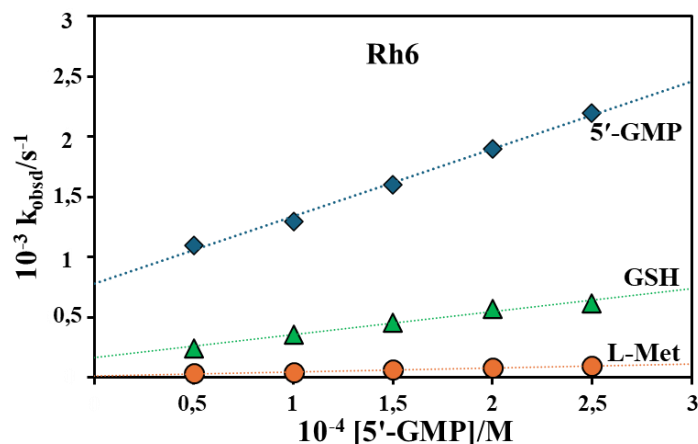
4.2.1. Супституционе реакције комплекса Rh(III)

Супституција лабилног хлорида лиганда код испитиваних комплекса Rh(III), **Rh1-10**, одвија се у складу са механизмом приказаним на Шеми 4.1.^{270,274-277} Брзине реакција супституције одређене су из линеарне зависности k_{obsd} од укупне концентрације нуклеофила према једначини (2) из Експерименталног дела 3.5. Директан нуклеофилни напад описује се константом брзине k_1 , док су реверзибилне реакције представљене константом k_{-1} .



Шема 4.1. Шематски приказ реакција супституције комплекса **Rh1-10** са испитиваним нуклеофилима.

Кинетички подаци који описују супституцију хлорида лиганда код комплекса **Rh1-10** дати су у Табелама 4.1. и 4.3., док је на Слици 4.7 приказан добијени график зависности константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , од концентрације нуклеофила за комплекс са лигандом камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh6**).



Слика 4.7. График зависности константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , као функција концентрације нуклеофила за реакцију комплекса **Rh6** са 5'-GMP, L-Met и GSH. Реакције су праћене при pH = 7,2 и температури од 310 K у раствору 25 mM HEPES пуфера и 50 mM NaCl.

Табела 4.1. Константе брзина реакција супституције комплекса **Rh1-10** са L-Met, GSH и 5'-GMP одређене на 310 K и при pH = 7,2 (25 mM HEPES/50 mM NaCl).^{270,274-277}

	L-Met		GSH		5'-GMP	
	$10^1 k_I$ $M^{-1}s^{-1}$	$10^4 k_{-I}$ $M^{-1}s^{-1}$	$10^1 k_I$ $M^{-1}s^{-1}$	$10^4 k_{-I}$ $M^{-1}s^{-1}$	$10^1 k_I$ $M^{-1}s^{-1}$	$10^4 k_{-I}$ $M^{-1}s^{-1}$
Rh1	$0,21 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$0,54 \pm 0,1$	$0,11 \pm 0,01$	$3,21 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,01$
Rh2	$0,24 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,01$	$1,92 \pm 0,2$	$0,16 \pm 0,01$
Rh3	$0,34 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$0,72 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	$4,0 \pm 0,1$	$0,11 \pm 0,01$
Rh4	$1,6 \pm 0,1$	$0,18 \pm 0,01$	$3,1 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,01$	$17,3 \pm 0,2$	$0,34 \pm 0,01$
Rh5	$2,1 \pm 0,1$	$0,21 \pm 0,01$	$3,4 \pm 0,1$	$0,12 \pm 0,01$	$18,6 \pm 0,2$	$0,58 \pm 0,01$
Rh6	$2,4 \pm 0,1$	$0,20 \pm 0,01$	$4,0 \pm 0,1$	$0,11 \pm 0,01$	$27,1 \pm 0,1$	$0,80 \pm 0,20$
Rh7	$3,8 \pm 0,2$	$0,20 \pm 0,01$	$19 \pm 0,1$	$0,16 \pm 0,01$	$56,0 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,2$
Rh8	$2,4 \pm 0,2$	$0,28 \pm 0,01$	$3,9 \pm 0,1$	$0,32 \pm 0,01$	$15,1 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,01$
Rh9	$3,6 \pm 0,2$	$0,22 \pm 0,01$	$5,4 \pm 0,1$	$0,34 \pm 0,03$	$33,4 \pm 0,1$	$0,40 \pm 0,02$
Rh10	$9,4 \pm 0,1$	$0,56 \pm 0,01$	$13,1 \pm 0,1$	$0,48 \pm 0,01$	$3,1 \pm 0,1$	$0,11 \pm 0,01$

Комплекси **Rh1-9** показују различиту реактивност према испитиваним нуклеофилима, при чему је редослед реактивности следећи: 5'-GMP > GSH > L-Met. Већа реактивност комплекса према 5'-GMP може се објаснити већим афинитетом комплекса родијума према нуклеофилима који садрже атоме азота, будући да Rh(III) јони, који спадају у групу тврдо-меких киселина, имају већи афинитет према *N*-донорским лигандима.²⁷⁰⁻²⁷⁶ Релативно нижа реактивност L-Met у поређењу са GSH може бити последица стерних ефеката метил групе у структури L-Met, што отежава приступ активном центру комплекса. Међу испитиваним нуклеофилима, 5'-GMP се издваја као снажан конкурент *S*-донорским биомолекулима за интеракцију са комплексима родијума. Познато је да комплекси платине

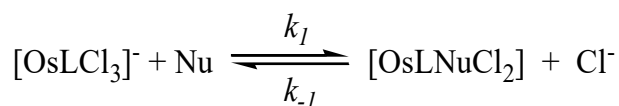
који се користе у хемиотерапији имају израженији афинитет према S-донорским молекулама, што доприноси њиховим нежељеним ефектима током терапије.^{16,55,56} За разлику од комплекса платине, испитивани Rh(III) комплекси показују значајно већу реактивност према 5'-GMP, што указује на то да би ДНК могла бити примарна мета ових комплекса унутар ћелије.

Резултати супституционих реакција указују на значај електронских и стерних ефеката инертних лиганата на реактивност комплекса Rh(III) према испитиваним нуклеофилима. Комплекс са *dien* лигандом (**Rh1**) показао је најмању реактивност у испитиваној серији, осим у реакцији са 5'-GMP, где је био активнији од комплекса са бипиридинским лигандом (**Rh2**). Комплекс са бипиридинским лигандом (**Rh2**) био је реактивнији од **Rh1** у реакцији са GSH и L-Met. Комплекс са терпиридинским лигандом (**Rh3**) је знатно реактивнији од **Rh1** и **Rh2**, али око 10 пута мање у поређењу са комплексима који садрже камфор деривате *bis*-пиразолилпиридинских лиганата (**Rh6** и **Rh7**).). Комплекс који у својој структури има *bis*-пиразолилпиридински лиганд (**Rh4**) показао је умерену реактивност, док је комплекс са истим типом лиганда, али са додатом метил групом (**Rh5**), реаговао нешто брже, што указује на умерен утицај стерних фактора. Комплекси који у својој структури имају камфор деривате *bis*-пиразолилпиридина (**Rh6** и **Rh7**) су најреактивнији у серији, при чему је комплекс **Rh7** показао највећу реактивност, упркос стерном ефекту присутних метил група. У серији комплекса са тиазолпиридинским лигандима, комплекс са метил групом (**Rh8**) имао је нижу реактивност, док је комплекс са бензеновим прстеном (**Rh9**) знатно реактивнији, што се може приписати индукционим и резонантним ефектима бензеновог прстена.

Комплекс који садржи камфор дериват *bis*-пиразолилпирида и два 1,2,4-тризола (**Rh10**) је показао реактивност према свим испитаним нуклеофилима. Реакција супституције је најбржа са GSH као нуклеофилом, нешто спорија са L-Met, док је реакција са 5'-GMP око десет пута спорија. У поређењу са структурно сличним комплексима (**Rh6** и **Rh7**), комплекс **Rh10** показује сличну брзину реакције са GSH, али значајно спорију реакцију са 5'-GMP. С друге стране, брзина реакције комплекса **Rh10** са L-Met је 2-3 пута већа, што указује на то да стерни ефекти имају значајан утицај на брзину супституције.

4.2.2. Супституционе реакције комплекса Os(II)

Реакција супституције лабилног хлорида лиганда код испитиваних комплекса Os(II), **Os1-5** одвија се у складу са механизмом приказаним на Шеми 4.2. Супституционе реакције комплекса Os(II) праћене у строго контролисаним условима при pH 7,2 (25 mM HEPES пуфер) и у 50 mM NaCl ради сузбијања солволизе. Због високе концентрације Cl⁻ јона у раствору, комплекси ће бити присутни у облику [OsLCl₃]⁻, где је L = L3-L9.^{268,276} Брзине реакција супституције одређене су из линеарне зависности k_{obsd} од укупне концентрације нуклеофила, према једначини (2) из Експерименталног дела 3.5. Директан нуклеофилни напад описује се константом брзине k_1 , док је реверзибилна реакција представљена константом k_{-1} .

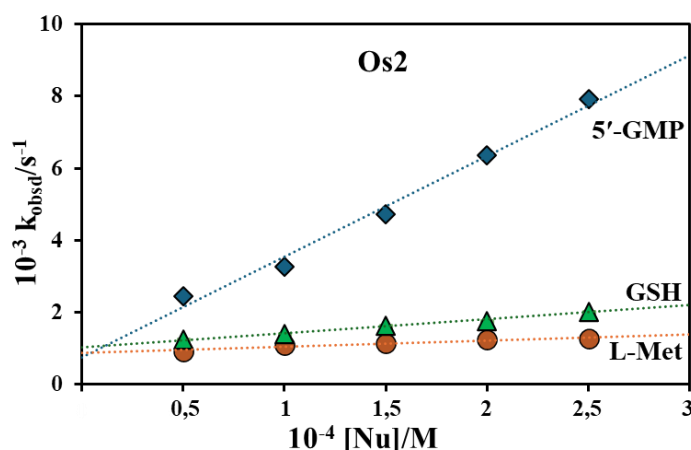


L= L3-L9

Nu= L-Met, GSH, 5'-GMP

Шема 4.2. Шематски приказ реакција супституције комплекса **Os1-5** са испитиваним нуклеофилима.

Кинетички подаци који описују супституцију хлоридо лиганда код комплекса **Os1-5** дати су у Табелама 4.2. и 4.3., док је добијени график зависности константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , од концентрације нуклеофила са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os2**) приказан на Слици 4.8.



Слика 4.8. График зависности константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , као функција концентрације нуклеофила за реакцију комплекса **Os2** са 5'-GMP, L-Met и GSH.

Реакције су извођене при pH = 7,2 и температури од 310 K у раствору 25 mM HEPES пуфера и 50 mM NaCl.

Табела 4.2. Константе брзина реакција супституције комплекса **Os1-5** са L-Met, GSH и 5'-GMP одређене на 310K при pH = 7,2 (25 mM HEPES/50 mM NaCl).^{268,276}

	L-Met		GSH		5'-GMP	
	$10^1 k_1$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^4 k_{-1}$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^1 k_1$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^4 k_{-1}$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^1 k_1$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$10^4 k_{-1}$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Os1	$0,24 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,02$	$1,76 \pm 0,15$	$0,23 \pm 0,02$	$17,6 \pm 0,1$	$0,10 \pm 0,03$
Os2	$0,39 \pm 0,02$	$1,04 \pm 0,04$	$2,0 \pm 0,02$	$0,87 \pm 0,05$	$28,5 \pm 0,2$	$0,65 \pm 0,47$
Os3	$0,34 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,03$	$1,8 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,04$	$28,1 \pm 0,3$	$0,63 \pm 0,29$
Os4	$1,8 \pm 0,2$	$0,23 \pm 0,01$	$2,7 \pm 0,1$	$0,29 \pm 0,02$	$7,2 \pm 0,1$	$0,42 \pm 0,01$
Os5	$2,9 \pm 0,1$	$0,28 \pm 0,01$	$3,7 \pm 0,2$	$0,33 \pm 0,01$	$17,6 \pm 0,1$	$0,11 \pm 0,01$

Комплекси **Os1-5** показују различиту реактивност према испитиваним нуклеофилима, при чему је редослед реактивности следећи: $5'\text{-GMP} > \text{GSH} > \text{L-Met}$. Већа реактивност комплекса према $5'\text{-GMP}$ може се објаснити афинитетом комплекса осмијума према нуклеофилима који садрже атоме азота. Os(II) јон, као и Rh(III) јон који спада у групу тврдо-меких киселина, показује већи афинитет према N -донорским лигандима у поређењу са S -донорским нуклеофилима. Испитивани комплекси осмијума показују изразит афинитет према $5'\text{-GMP}$, што указује да би ДНК могла бити примарна мета ових комплекса унутар ћелије.^{268,276}

Резултати супституционих реакција указују на значај електронских и стерних ефеката инертних лиганда на реактивност комплекса Os(II) према испитиваним нуклеофилима. Комплекс са терпиридинским лигандом (**Os1**) показао је најмању реактивност према GSH и L-Met у испитиваној серији, док је према $5'\text{-GMP}$ показао већу или исту активност од комплекса са тиазол-пиридинским лигандима (**Os4** и **Os5**). Значајно већу реактивност имали су комплекси са *bis*-пиразолилпиридинским лигандима (**Os2** и **Os3**), који су у серији показали највећу активност према $5'\text{-GMP}$. Комплекс **Os2**, који садржи атом водоника, реаговао је брже од комплекса **Os3**, код којег су стерни ефекти присутних метил група смањили реактивност. Комплекси са тиазол-пиридинским лигандима (**Os4** и **Os5**) показали су различиту реактивности, али већу у односу на остале испитиване комплексе осмијума према GSH и L-Met . Комплекс **Os4**, који у својој структури садржи метил групу, био је мање реактиван у односу на **Os5**, који у својој структури садржи бензенов прстен са израженим индуктивним и резонантним ефектима. Оба комплекса реаговала су са $5'\text{-GMP}$ спорије у односу на **Os2** и **Os3**.

Поређење са структурно сличним комплексима родијума указује да комплекси **Os1-5** углавном имају ниже вредности константи брзине супституционих реакција. Једини изузетак је комплекс са терпиридинским лигандом (**Os1**), који је, упркос најнижој реактивности међу комплексима осмијума, ипак био реактивнији од аналогног комплекса родијума (**Rh3**). Код осталих комплекса редослед реактивности у зависности од лиганда остао је непромењен.

4.2.3. Активациони параметри супституционих реакција комплекса Rh(III) и Os(II)

Нуклеофилне супституционе реакције код комплексних једињења могу се одвијати кроз три механизма: дисоцијативни (D), асоцијативни (A) и механизам измене (I). Дисоцијативни механизам подразумева формирање интермедијера са координационим бројем мањим за један у односу на полазни комплекс, док асоцијативни механизам укључује формирање интермедијера са координационим бројем већим за један. Механизам измене карактерише одсуство интермедијера, при чему готово истовремено долази до раскидања веза са одлазећим лигандом и формирања везе са нуклеофилом.^{279,280}

За одређивање механизма супституције од значаја су активациони параметри промена енталпије активирања ($\Delta H^\ddagger$) и промена ентропије активирања ($\Delta S^\ddagger$), који се одређују из температурске зависности константе брзине реакције применом Ејрингове једначине (једначина (3) из Експерименталног дела 3.5.). Вредности $\Delta S^\ddagger$ посебно су важне за разликовање асоцијативног, дисоцијативног или механизма измене. Негативне вредности

$\Delta S^\ddagger$ указују на асоцијативни механизам, што је резултат смањења неуређености система услед везивања нуклеофила за комплекс. Насупрот томе, позитивне вредности $\Delta S^\ddagger$ сугеришу дисоцијативни механизам, јер раскид везе између јона метала и одлазећег лиганда доводи до повећања неуређености система.

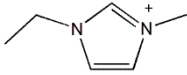
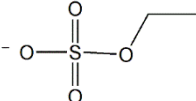
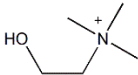
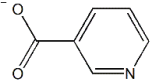
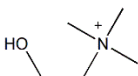
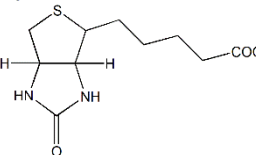
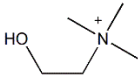
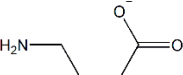
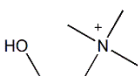
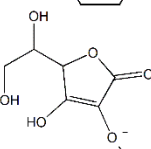
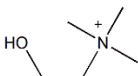
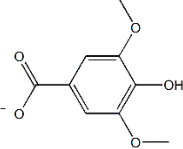
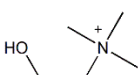
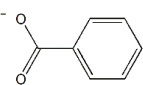
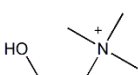
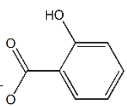
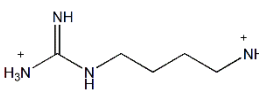
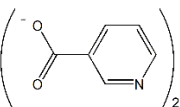
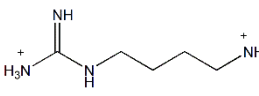
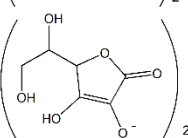
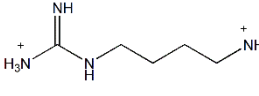
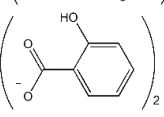
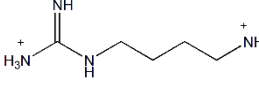
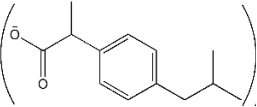
Активациони параметри за испитиване комплексе са различитим нуклеофилима, добијени коришћењем Ејрингове једначине (Експериментални део), приказани су у Табели 4.3. Добијене негативне вредности $\Delta S^\ddagger$ за супституционе реакције свих испитиваних комплекса указују на асоцијативни механизам супституције.^{268,270,274-277}

Табела 4.3. Активациони параметри, $\Delta H^\ddagger$ и $\Delta S^\ddagger$, за супституционе реакције комплекса **Rh1-10** са испитиваним нуклеофилима L-Met, GSH и 5'-GMP.^{268,270,274-277}

	5'-GMP		GSH		L-Met	
	$\Delta H^\ddagger$ kJ mol ⁻¹	$\Delta S^\ddagger$ J K ⁻¹ mol ⁻¹	$\Delta H^\ddagger$ kJ mol ⁻¹	$\Delta S^\ddagger$ J K ⁻¹ mol ⁻¹	$\Delta H^\ddagger$ kJ mol ⁻¹	$\Delta S^\ddagger$ J K ⁻¹ mol ⁻¹
Rh1	11 ± 2	-112 ± 6	/	/	10 ± 1	-103 ± 3
Rh2	10 ± 1	-123 ± 8	17 ± 2	-125 ± 5	/	/
Rh3	35 ± 5	-154 ± 16	/	/	/	/
Rh4	17 ± 2	-118 ± 5	/	/	14 ± 2	-112 ± 4
Rh5	21 ± 1	-126 ± 9	/	/	/	/
Rh6	40 ± 2	-120 ± 8	26 ± 1	-183 ± 2	/	/
Rh7	10 ± 2	-212 ± 8	/	/	17 ± 6	-210 ± 20
Rh8	25 ± 3	-117 ± 7	/	/	/	/
Rh9	31 ± 2	-118 ± 5	/	/	/	/
Rh10	10 ± 2	-111 ± 7	/	/	12 ± 1	-114 ± 7
Os1	12 ± 2	-157 ± 7	/	/	/	/
Os2	23 ± 1	-154 ± 4	24 ± 2	-147 ± 6	/	/
Os3	28 ± 2	-102 ± 6	/	/	/	/
Os4	15 ± 3	-137 ± 4	/	/	/	/
Os5	21 ± 2	-148 ± 7	/	/	/	/

4.2.4. Утицај јонских течности на супституционе реакције комплекса Rh(III) и Os(II)

Реакције супституције комплекса **Rh1-10** и **Os1-5** испитиване су у присуству различитих јонских течности (IL1-12), Слика 4.9., које су коришћене као косолвенти. С обзиром на то да су комплекси осмијума и родијума показали значајно већи афинитет према 5'-GMP у односу на L-Met и GSH, кинетичка испитивања супституционих реакција спроведена су искључиво у присуству овог нуклеофила. Експерименти су изведени под идентичним условима као и у одсуству јонских течности, при чему су јонске течности додаване у молском односу 1:1 у односу на комплексе. Циљ истраживања био је да се утврди утицај јонских течности на вредности константи брзине супституционих реакција. Добијени резултати приказани су у Табелама 4.4. и 4.5.^{268,270,274-277}

IL1			1-Етил-3-метилимидазолијум-етилсулфат
IL2			Холин-никотинат
IL3			Холин-биотинат
IL4			Холин-гама-аминобутират
IL5			Холин-аскорбат
IL6			Холин-сирингат
IL7			Холин-бензоат
IL8			Холин-салицилат
IL9			Агматин-никотинат
IL10			Агматин-аскорбат
IL11			Агматин-салицилат
IL12			Агматин-ибупрофенат

Слика 4.9. Структуре, називи и ознаке испитиваних јонских течности.

Табела 4.4. Константе брзине супституционих реакција комплекса **Rh1-10** са 5'-GMP у присуству јонских течности IL1-12 као косолвената (однос комплекса и јонске течности био је 1:1) при pH = 7,2 (25 mM HEPES) у присуству 50 mM NaCl.^{270,274-277}

	DMF	IL1	IL2	IL3	IL4	IL5	IL6	IL7	IL8	IL9	IL10	IL11	IL12
	10 ¹ k	10 ¹ k	10 ¹ k	10 ¹ k	10 ¹ k	10 ¹ k	10 ¹ k	10 ¹ k	10 ¹ k	10 ¹ k	10 ¹ k	10 ¹ k	10 ¹ k
Rh1	3,2±0,1	39,5±0,2	39,3±0,1	41,1±0,3	41,3±0,1	33,3±0,3	40,6±0,1	29,1±0,1	35,7±0,2	7,1±0,2	13,1±0,1	8,0±0,2	9,3±0,3
Rh2	1,9±0,2	29,0±0,2	44,6±0,1	32,9±0,1	15,2±0,1	16,6±0,2	34,4±0,4	18,4±0,2	31,5±0,1	7,2±0,4	10,3±0,3	4,7±0,1	6,3±0,1
Rh3	4,0±0,1	31,0±0,3	49,3±0,1	36,0±0,1	17,0±0,1	21,0±0,1	38,0±0,1	24,0±0,1	26,3±0,2	13,0±0,1	15,0±0,3	7,0±0,2	9,0±0,2
Rh4	18,3±0,1	31,2±0,2	25,4±0,1	23,5±0,1	24,2±0,2	19,7±0,1	16,2±0,1	23,8±0,1	26,3±0,1	12,1±0,1	9,8±0,3	11,3±0,1	9,3±0,1
Rh5	17,6±0,1	29,4±0,1	24,6±0,3	22,8±0,1	23,1±0,1	18,4±0,1	14,6±0,2	22,6±0,1	23,4±0,1	11,5±0,1	9,2±0,1	10,2±0,1	8,7±0,2
Rh6	27,1±0,1	33,1±0,2	/	/	/	/	/	/	30,5±0,1	/	/	13,6±0,2	/
Rh7	56,0±0,1	52,4±0,1	69,3±0,4	48,4±0,3	31,6±0,3	34,5±0,1	53,4±0,2	34,2±0,2	52,7±0,1	23,5±0,1	28,5±0,1	15,3±0,2	21,7±0,1
Rh8	15,1±0,1	23,6±0,1	/	/	/	/	/	/	21,1±0,3	/	/	8,5±0,2	/
Rh9	33,4±0,1	38,2±0,2	/	/	/	/	/	/	36,9±0,1	/	/	12,1±0,2	/
Rh10	3,1±0,1	21,2±0,2	32,8±0,1	30,2±0,3	22,5±0,1	24,6±0,1	31,2±0,1	22,5±0,3	27,5±0,2	13,2±0,1	17,6±0,3	12,1±0,1	15,5±0,2

Табела 4.5. Константе брзине супституционих реакција комплекса **Os1-5** са 5'-GMP у присуству јонских течности IL1-12 као косолвената (однос комплекса и јонске течност био је 1:1) при pH = 7,2 (25 mM HEPES) у присуству 50 mM NaCl. ^{268,276}

	DMF	IL1	IL2	IL3	IL4	IL5	IL6	IL7	IL8	IL9	IL10	IL11	IL12
	10^1k	10^1k	10^1k	10^1k	10^1k	10^1k	10^1k	10^1k	10^1k	10^1k	10^1k	10^1k	10^1k
Os1	17,6±0,2	36,5±0,4	53,3±0,5	49,1±0,1	47,7±0,5	38,1±0,2	33,7±0,5	48,0±0,4	40,1±0,5	/	19,3±0,3	/	/
Os2	28,0±0,3	44,1±0,4	51,1±0,1	43,6±0,3	36,5±0,3	38,6±0,2	31,2±0,2	39,6±0,2	33,4±0,2	/	29,1±0,4	/	/
Os3	28,5±0,2	42,0±0,2	47,6±0,5	38,9±0,3	33,2±0,3	35,8±0,2	31,5±0,3	38,5±0,3	36,4±0,3	/	30,4±0,2	/	/
Os4	7,2±0,2	19,4±0,3	/	/	/	/	/	/	15,8±0,1	/	17,9±0,4	/	/
Os5	17,6±0,2	31,1±0,2	/	/	/	/	/	/	28,7±0,4	/	22,6±0,3	/	/

Резултати су показали да су јонске течности (IL1-12) значајно допринеле побољшању растворљивости и стабилности слабо растворљивих комплекса **Rh1-10** и **Os1-5**. Поред тога, оне су унапредиле њихова кинетичка својства у поређењу са стандардним органским растварачима, попут DMF-а, чиме су се истакле као обећавајући косолвенти. Додавање минималних количина јонских течности у HEPES раствор довело је до значајног побољшања како растворљивости комплекса тако и брзине супституције. Ово указује да чак и ниске концентрације јонских течности могу произвести значајан ефекат, док се претпоставља да би веће концентрације додатно појачале овај позитиван утицај.

Међу испитиваним јонским течностима највећу ефикасност показале су комерцијална јонска течност (IL1) и јонске течности са холинијум-катјоном (IL2-9). Претпоставља се да су јонске течности допринеле стабилизацији комплекса, олакшавајући супституцију хлоридо лиганда и побољшавајући координацију са лигандама као што је 5'-GMP. IL2 је показала највеће повећање вредности константи брзине супституције, што се приписује њеним специфичним електронским и стерним својствима, као и нетоксичности. Иако је IL1, као комерцијално доступна јонска течност, показала високу ефикасност, синтетисане јонске течности IL2-8, због своје биокомпатибилности, представљају пожељнији избор за биолошку примену.

Реакције супституције у присуству јонских течности за комплексе родијума са *dien* лигандом (**Rh1**), бипиридинским лигандом (**Rh2**) и терпиридинским лигандом (**Rh3**) показале су значајно веће вредности константи брзине супституције у поређењу са комплексима који садрже *bis*-пиразолилпиридинске лиганде (**Rh4** и **Rh5**), као и са комплексима који садрже лиганде камфор деривате *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7** и **Rh10**). И код ових комплекса је уочено повећање вредности константе, али не у истом степену. Реакције супституције наведених Rh(III) комплекса су испитане у присуству свих јонских течности (IL1-12). Реакције супституције комплекса који садржи лиганд камфор дериват *bis*-пиразолилпиридина (**Rh6**), као и комплекса са тиазол-пиридинским лигандима (**Rh8** и **Rh9**) су испитане у присуству три јонске течности (IL1, IL8 и IL10), при чему је присуство ових јонских течности значајно повећало вредности константе у поређењу са стандардним растварачем, Табела 4.4.

Реакције супституције за комплексе осмијума са терпиридинским лигандом (**Os1**), са *bis*-пиразолилпиридинским лигандима (**Os2** и **Os3**) и са тиазол-пиридинским лигандима (**Os4** и **Os5**), показале су значајно веће вредности константи брзине супституције у присуству јонских течности. Реакције комплекса **Os1-3** испитане су у присуству свих јонских течности (IL1-12), док су реакције комплекса **Os4** и **Os5** испитане у присуству три јонске течности (IL1, IL8 и IL11).

Примена јонских течности допринела је побољшавању растворљивости и повећању вредности константи брзине супституције комплекса **Rh1-10** и **Os1-5** са 5'-GMP. Биокомпатибилна и нетоксична својства ових течности чине их погодним за примену у биолошким системима, док њихова ефикасност у замени стандардних органских растварача представља важан корак ка зеленој хемији.

4.3. ИСПИТИВАЊЕ ИНТЕРАКЦИЈА КОМПЛЕКСА СА ДНК

Развој нових антитуморских лекова представља комплексну и захтевну област истраживања која подразумева детаљно разумевање интеракција између потенцијалних терапијских агенаса и биолошких молекула, посебно са дезоксирибонуклеинском киселином (ДНК). Као примарни носилац генетских информација и регулатор бројних ћелијских процеса, ДНК је од кључног значаја за одржавање виталних функција и представља једну од главних биолошких мета многих антитуморских агенаса.³⁰⁸ На пример, цисплатина, један од најуспешнијих и најзаступљенијих лекова у овој области, испољава своју терапијску активност ковалентним везивањем за ДНК, што доводи до инхибиције транскрипције и репликације, а самим тим и до апоптозе туморских ћелија.⁵⁶

Комплекси метала представљају једну од перспективнијих група једињења за развој нових антитуморских агенаса због могућности разноврсних интеракција са ДНК. Њихова способност да формирају и ковалентне и нековалентне везе са ДНК омогућава дизајн молекула са специфичним механизмима деловања који могу превазићи ограничења постојећих лекова.^{309,310} Ковалентне интеракције подразумевају директно везивање јона метала за азотне базе или фосфатне групе ДНК, што може довести до токсичних ефеката због недостатка селективности. Нековалентне интеракције укључују интеркалацију, електростатичке интеракције и везивање за жљебове ДНК. Интеркалација је процес уметања планарних молекула или лиганата између базних парова ДНК. Овај механизам стабилизује ДНК структуру, мења њену конфигурацију и блокира виталне процесе, као што су транскрипција и репликација. Комплекси са ароматичним лигандима (на пример, фенантролин или терпиридин) показују изузетан интеркалативни потенцијал. Везивање за жљебове подразумева интеракцију молекула са великим или малим жљебовима ДНК. Ове интеракције се остварују преко водоничних веза и Ван дер Валсових интеракција, при чему се структура ДНК минимално мења, али се ефективно блокирају процеси неопходни за ћелијски опстанак.^{309,310}

Разумевање ових механизма отвара могућност за синтезу агенаса са прецизним дејством, који могу превазићи ограничења постојећих терапија и значајно унапредити терапију тумора. За проучавање начина интеракције комплекса метала са ДНК користе се различите методе, као што су UV-Vis спектрофотометрија, флуоресцентна спектроскопија, циркуларни дихроизам, термална денатурација, мерење вискозности и циклична волтаметрија.

4.3.1. Испитивање интеракција апсорпционом спектроскопијом

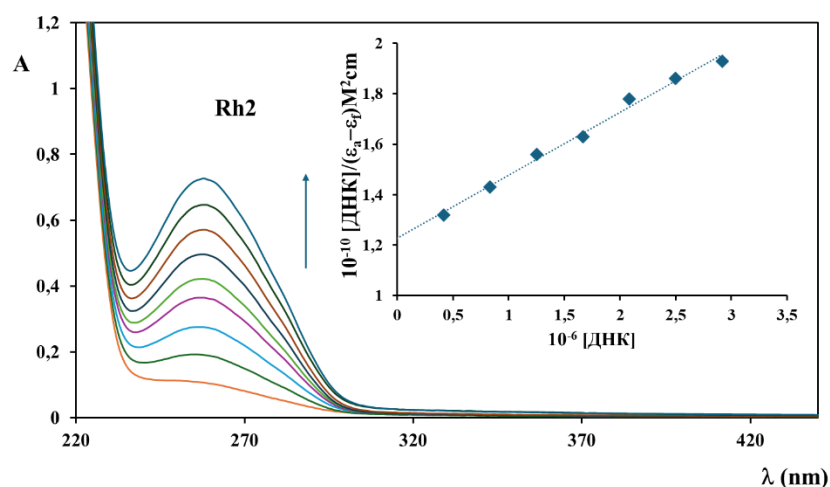
Електронска апсорпциона спектроскопија представља једну од најзаступљенијих метода за проучавање интеракција између комплекса метала и молекула ДНК. Промене у апсорпционим спектрима при различитим моларним односима [комплекс]/[ДНК], уз повећање концентрације ДНК, могу довести до смањења (хипохромизам) или повећања (хиперхромизам) интензитета апсорпције праћеним благим померањем максималне таласне дужине.³¹¹ Комплекси метала који се везују за ДНК путем интеркалације обично изазивају

хипохромизам и батохромизам (померање ка већим таласним дужинама), што указује на јаке интеракције ароматичних хромофора са базним паровима унутар ДНК. С друге стране, хиперхромни ефекат је повезан са спољашњим електростатичким интеракцијама или парцијалним одмотавањем хеликс структуре ДНК.³¹¹

Поред ових спектралних промена, вредност константе везивања (K_b) представља кључан параметар за утврђивање типа интеракције. За класичне интеркалаторе, вредности K_b се крећу у распону од 10^6 до 10^7 , док ниже вредности обично указују на електростатичко везивање или делимично интеркалационо понашање комплекса.³¹¹⁻³¹³

4.3.1.1. Испитивање интеракција комплекса Rh(III)

Интеракције комплекса **Rh1-10** са ДНК молекулом праћене су електронском апсорпционом спектроскопијом.^{270,274-277} Апсорпциони спектар комплекса са бипиридинским лигандом (**Rh2**) у присуству растућих концентрација ДНК приказан је на Слици 4.10. Експерименти су изведени на собној температури, уз константну концентрацију комплекса и постепено повећање моларног односа [ДНК]/[комплекс] до вредности 5. Додавање ДНК у раствор комплекса **Rh2** довело је до израженог хиперхромног ефекта на таласној дужини од 258 nm, уз благо померање апсорпционог максимума.



Слика 4.10. UV-Vis титрациони спектар комплекса **Rh2**, 8 μM , у PBS раствору (pH 7,4) са растућим концентрацијама ДНК у распону моларних односа 0,5-5. Стрелица указује на хиперхромизам.

Уметнути график: Приказ зависности $[\text{ДНК}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ од $[\text{ДНК}]$.

Код свих испитиваних комплекса родијума уочени су хиперхромизам и померања апсорпционих трака ка већим таласним дужинама (батохромно - црвено померање) са повећањем концентрације ДНК. Експериментално добијени резултати за све испитиване комплексе **Rh1-10** показали су апсорпциони максимум на око 258 nm. Константа везивања, K_b , одређена је на основу једначине (4) из Експерименталног дела 3.6., а добијене вредности су приказане у Табели 4.6.^{270,274-277}

Електростатичке интеракције комплекса са ДНК обично доводе до хиперхромизма уз пратеће плаво померање апсорпционих трака у UV-Vis спектрима. Насупрот томе, интеркалациони механизам карактеришу хиперхромизам и црвено померање. У случају испитиваних комплекса, уочени хиперхромизам и црвено померање, заједно са вредностима константи везивања реда величине 10^4 , Табела 4.6, указују на могућност парцијалне интеркалације и екстерног везивања за ДНК.^{312,313} Ипак, имајући у виду ограничења UV-Vis спектроскопије у дефинисању тачног механизма везивања, неопходно је било спровести додатна испитивања применом комплементарних метода.

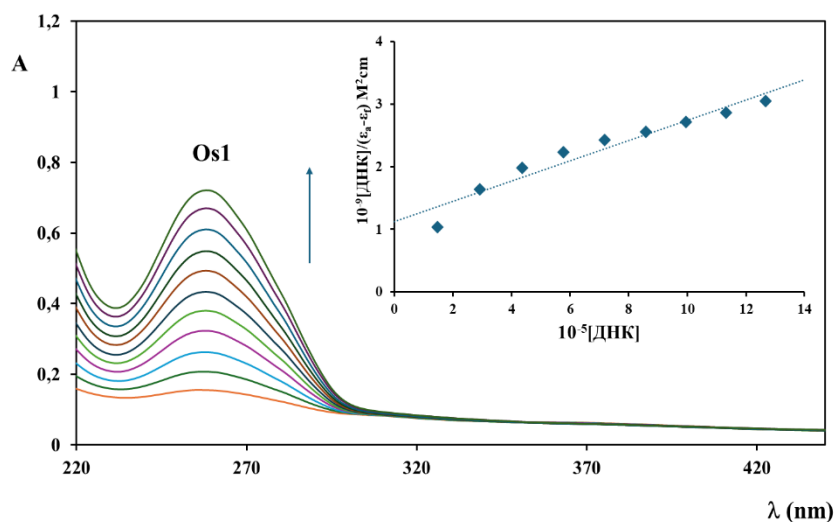
Табела 4.6. Константе везивања (K_b) и Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) за интеракције испитиваних комплекса **Rh1-10** и ДНК.^{270,274-277}

	ДНК	
	$K_b [M^{-1}]$	$K_{sv} [M^{-1}]$
Rh1	$(2,6 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh2	$(4,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(3,4 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh3	$(7,0 \pm 0,1) \times 10^4$	$(3,8 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh4	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh5	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh6	$(5,0 \pm 0,1) \times 10^4$	$(5,0 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh7	$(8,3 \pm 0,1) \times 10^4$	$(5,5 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh8	$(5,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,2 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh9	$(3,0 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh10	$(2,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^4$

Испитивани комплекси родијума показали су умерену интеракцију са молекулом ДНК, са константом везивања реда 10^4 . Етидијум-бромид, познати интеркалатор, има знатно већу константу везивања са ДНК молекулом, $K_b = (1,2 \pm 0,1) \times 10^5 M^{-1}$.^{273,314} Комплекс са *dien* лигандом (**Rh1**) показао је константу везивања вишу од комплекса са *bis*-пиразолилпиридинским лигандима (**Rh4** и **Rh5**), али сличну комплексу са лигандама камфор дериватима *bis*-пиразолилпиридина и триазолом (**Rh10**). Комплекс са бипиридинским лигандом (**Rh2**) имао је нешто већу вредност, али и даље нижу у поређењу са комплексима са терпиридином (**Rh3**), лигандама камфор дериватима *bis*-пиразолилпиридина (**Rh6** и **Rh7**) и тиазол-пиридинским лигандом (**Rh8**). Комплекс са терпиридинским лигандом (**Rh3**) показао је већу константу везивања у односу на **Rh1** и **Rh2**, али мању у поређењу са комплексима са лигандима камфор дериватима *bis*-пиразолилпиридина и тиазол-пиридинским лигандима. Комплекси са *bis*-пиразолилпиридинским лигандима (**Rh4** и **Rh5**) имали су сличне вредности константе везивања, али најниже у испитиваној серији. Комплекс са камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh6**) имао је већу константу везивања у односу на **Rh4** и **Rh5**, али сличну као комплекс са тиазол-пиридинским лигандом (**Rh8**). Комплекс са лиганом камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7**) показао је највишу вредност константе везивања у испитиваној серији. Комплекс са тиазол-пиридинским лигандом (**Rh9**) имао је нешто већу вредност константе у поређењу са комплексом **Rh8**, али је показао нижу у односу на комплексе **Rh6** и **Rh7**.

4.3.1.2. Испитивање интеракција комплекса Os(II)

Интеракције комплекса **Os1-5** са ДНК молекулом праћене су електронском апсорпционом спектроскопијом.^{268,276} Апсорпциони спектар комплекса са терпиридинским лигандом (**Os1**) у присуству растућих концентрација ДНК приказан је на Слици 4.11. Испитивања су урађена на собној температури, уз константну концентрацију комплекса и постепено повећање моларног односа [ДНК]/[комплекс] до односа 5. Додавање ДНК у раствор комплекса **Os1** довело је до израженог хиперхромног ефекта на таласној дужини од 258 nm, уз благу промену апсорпционог максимума.



Слика 4.11. UV-Vis титрациони спектар комплекса **Os1**, 8 μM , у PBS раствору (pH 7,4) са растућим концентрацијама ДНК у распону моларних односа 0,5-5. Стрелица указује на хиперхромизам у спектралној траци.

Уметнути график: Приказ зависности $[\text{ДНК}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ од $[\text{ДНК}]$.

Апсорпциони спектри свих комплекса осмијума показују да, са повећањем концентрације ДНК, долази до хиперхромизма и померања апсорпционих трака ка већим таласним дужинама (батохромно - црвено померање). Експериментално добијени резултати за све испитиване комплексе **Os1-5** показали су да имају апсорпциони максимум на око 265 nm. Константа везивања, K_b , одређена је на основу једначине (4) из Експерименталног дела 3.6., а добијене вредности су приказане у Табели 4.7.^{268,276}

На основу уоченог хиперхромизма, црвеног померања и вредности константи везивања реда величине 10^4 , Табела 4.7, може се претпоставити да испитивани комплекси остварују интеракцију са ДНК путем парцијалне интеркалације или екстерног везивања на површини хеликса^{312,313} Испитивани комплекси осмијума показали су умерену интеракцију са молекулом ДНК, са вредностима константе везивања реда 10^4 . У поређењу са етидијум-бромидом, константе везивања комплекса осмијума су знатно ниже.^{273,314}

Табела 4.7. Константе везивања (K_b) и Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) за интеракције испитиваних комплекса **Os1-5** и ДНК.^{268,276}

	ДНК	
	$K_b [M^{-1}]$	$K_{sv} [M^{-1}]$
Os1	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,6 \pm 0,1) \times 10^4$
Os2	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,4 \pm 0,1) \times 10^4$
Os3	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^4$
Os4	$(3,3 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^4$
Os5	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^4$

Комплекс са терпиридинским лигандом (**Os1**) показао је најнижу вредност константе K_b у серији, што указује на његов најслабији афинитет према ДНК у испитиваној серији комплекса. Комплекси са пиразол-пиридинским лигандима (**Os2** и **Os3**) показали су сличне вредности K_b , које су биле веће у односу на комплекс **Os1**. Највеће вредности константе K_b показали су комплекси са тиазол-пиридинским лигандима (**Os4** и **Os5**), при чему се комплекс са метил групом, **Os4**, издвојио као најреактивнији. Иако су уочене разлике у афинитету, вредности K_b за све испитиване комплексе остале су у оквиру истог реда величине (10^4), што указује на сличну укупну способност везивања за ДНК.

У поређењу са структурно сличним комплексима родијума, комплекси осмијума показали су нешто ниже вредности константи везивања за ДНК, али истог реда величине. Ове разлике могу проистећи из специфичних електронских својстава метала или просторној организацији лиганда, што утиче на интеракцију са молекулом ДНК. Иако комплекси осмијума имају релативно сличан афинитет према ДНК, њихов тачан начин везивања и потенцијал интеракције не могу се прецизно утврдити само на основу UV-Vis спектроскопских метода.

4.3.1.3. Испитивање интеракција комплекса Rh(III) и Os(II) са ДНК у присуству јонских течности

За комплексе **Rh1-10** и **Os1-5** апсорпционе титрације у присуству јонских течности праћене су на собној температури, са циљем испитивања утицаја јонских течности као косолвената на интеракције са молекулом ДНК. Јонске течности су коришћене у припреми раствора комплекса родијума и осмијума, при чему је однос јонских течности и комплекса био 2:1, осим за комплексе **Os1-3**, где је овај однос био 1:1. Експерименти су изведени при константој концентрацији комплекса ($8 \mu M$) и јонских течности ($16 \mu M$ за однос 2:1 или $8 \mu M$ за однос 1:1), док је концентрација ДНК повећавана до моларног односа 5.

Прво су испитиване интеракције јонских течности са молекулом ДНК у одсуству комплекса, при чему је утврђено да јонске течности не интерагују директно са молекулом ДНК. Поређење вредности константи везивања (K_b) добијених у одсуству јонских течности са онима у њиховом присуству указује на минималан утицај јонских течности на интеракције комплекса са ДНК.

У оквиру истраживања испитиване су једна комерцијална јонска течност (IL1) и једанаест биокompatibilних јонских течности (IL2-12), синтетисаних од компоненти које су нетоксичне за људски организам, Слика 4.9. Ове јонске течности садрже катјоне попут холина (IL2-8) и агматина (IL9-12). Упркос различитим структурним карактеристикама, добијене вредности константи везивања (K_b) остале су истог реда величине. Резултати испитивања за све комплексе родијума и осмијума дати су у Табелама 4.8. и 4.9.^{268,270, 274-277}

На основу резултата приказаних у Табелама 4.8. и 4.9., може се закључити да присуство јонских течности (IL) као косолвената благо утиче на вредности константи везивања (K_b) испитиваних комплекса родијума и осмијума са молекулом ДНК, при чему ред величине остаје исти као код класичних органских растварача попут DMF-а.

Код комплекса родијума уочен је различит ефекат присуства јонских течности на вредности K_b константи. Комплекси са *dien*-ским лигандом (**Rh1**), бипиридинским лигандом (**Rh2**), *bis*-пиразолилпиридинским лигандима (**Rh4** и **Rh5**) и камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh6**), тиазол-пиридинским лигандима (**Rh8** и **Rh9**) показали су исте или благо повећане вредности K_b у присуству свих испитиваних јонских течности. Комплекси са терпиридинским лигандом (**Rh3**), камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7**), као и са камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина и два 1,2,4-триазола (**Rh10**) су показали нешто ниже вредности K_b у присуству јонских течности.

Код комплекса осмијума, комплекси са терпиридинским лигандом (**Os1**) и *bis*-пиразолилпиридинским лигандима (**Os2** и **Os3**) имали су највеће вредности K_b у присуству IL2, док су вредности за комплексе са тиазол-пиридинским лигандима (**Os4** и **Os5**) биле нешто ниже у присуству свих испитиваних јонских течности.

Резултати су показали да јонске течности са холин-катјоном углавном доводе до већих вредности K_b константи у поређењу са течностима које садрже агматин. Разлике у вредностима K_b испитиваних комплекса у присуству јонских течности могу се приписати и различитим структурама ањонског дела јонских течности. Ова запажања указују на то да пажљивим избором катјона и ањона јонске течности можемо контролисати реактивност комплекса према биомолекулима као што је ДНК.

Иако је током супституционих реакција уочен изражен ефекат присуства јонских течности, њихов утицај на вредности константи везивања (K_b) био је релативно слаб. Ова разлика може се приписати већој структурној комплексности и волуминозности ДНК у односу на 5'-GMP, као и могућој потреби за вишим концентрацијама јонских течности како би се постигао израженији ефекат. Вредности K_b , које су остале истог реда реактивности (10^4), указују на то да јонске течности не ометају интеракцију комплекса са ДНК молекулом, те се могу сматрати погодним косолвентима у биолошким системима.

Табела 4.8. Константе везивања (K_b [M^{-1}]) за интеракције испитиваних комплекса **Rh1-10** са ДНК у присуству јонских течности IL1-12 и DMF као косолвената (однос комплекса и јонске течности био је 1:2) при pH = 7,4 (PBS).^{270,274-277}

	DMF	IL1	IL2	IL3	IL4	IL5	IL6	IL7	IL8	IL9	IL10	IL11	IL12
	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$
Rh1	2,6±0,1	2,9±0,1	2,8±0,1	3,1±0,1	3,4±0,1	2,8±0,1	2,6±0,1	2,7±0,1	2,9±0,1	2,2±0,1	2,7±0,1	2,6±0,1	2,6±0,1
Rh2	4,1±0,1	4,7±0,1	4,9±0,1	4,6±0,1	4,3±0,1	4,5±0,1	4,3±0,1	4,5±0,1	4,7±0,1	4,4±0,1	4,1±0,1	4,2±0,1	4,2±0,1
Rh3	7,0±0,1	4,3±0,1	4,6±0,1	4,5±0,1	4,1±0,1	4,2±0,1	4,5±0,1	4,4±0,1	4,5±0,1	3,8±0,1	3,9±0,1	3,7±0,1	4,1±0,1
Rh4	1,3±0,1	2,1±0,1	2,0±0,1	1,7±0,1	1,9±0,1	1,5±0,1	1,4±0,1	1,8±0,1	1,9±0,1	1,4±0,1	1,3±0,1	1,4±0,1	1,3±0,1
Rh5	1,2±0,1	2,0±0,1	1,9±0,1	1,5±0,1	1,8±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1	1,7±0,1	1,9±0,1	1,4±0,1	1,3±0,1	1,3±0,1	1,2±0,1
Rh6	5,0±0,1	5,1±0,2	/	/	/	/	/	/	5,2±0,1	/	4,6±0,2	/	/
Rh7	8,3±0,1	5,2±0,1	5,6±0,1	5,4±0,1	5,2±0,1	5,3±0,1	5,5±0,1	5,1±0,1	5,5±0,1	4,7±0,1	4,9±0,1	4,6±0,1	4,5±0,1
Rh8	5,1±0,1	5,6±0,1	/	/	/	/	/	/	5,7±0,1	/	5,1±0,1	/	/
Rh9	3,0±0,1	3,8±0,1	/	/	/	/	/	/	3,9±0,1	/	3,6±0,1	/	/
Rh10	2,5±0,1	2,2±0,1	2,3±0,1	2,1±0,1	1,8±0,1	1,7±0,1	1,6±0,1	2,1±0,1	2,3±0,1	1,5±0,1	1,3±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1

Табела 4.9. Константе везивања (K_b [M^{-1}]) за интеракције испитиваних комплекса **Os1-10** са ДНК у присуству јонских течности IL1-12 и DMF као косолвената (однос комплекса и јонске течности био је 1:2) при pH = 7,4 (PBS).^{268,276}

	DMF	IL1	IL2	IL3	IL4	IL5	IL6	IL7	IL8	IL9	IL10	IL11	IL12
	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$	$10^{-4}K_b$
Os1	1,3±0,1	1,2±0,1	2,1±0,1	1,8±0,1	1,1±0,1	1,0±0,1	1,5±0,1	1,7±0,1	1,5±0,1	/	0,7±0,1	/	/
Os2	1,4±0,1	1,3±0,1	2,7±0,1	1,0±0,1	0,9±0,1	1,0±0,1	0,7±0,1	1,9±0,1	1,1±0,1	/	1,1±0,1	/	/
Os3	1,4±0,1	1,2±0,1	2,3±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	1,0±0,1	0,4±0,1	1,3±0,1	1,1±0,1	/	0,7±0,1	/	/
Os4	3,3±0,1	2,5±0,1	/	/	/	/	/	/	2,6±0,1	/	2,1±0,1	/	/
Os5	2,2±0,1	1,9±0,1	/	/	/	/	/	/	1,7±0,1	/	1,6±0,1	/	/

4.3.2. Испитивање интеракција флуориметријом

Флуориметрија представља прецизан и поуздан метод за испитивање интеракција молекула са ДНК, допуњујући податке добијене апсорпционом спектроскопијом. Ова техника омогућава утврђивање начина везивања молекула за ДНК, укључујући интеркалацију, везивање за мали и велики жљеб, електростатске интеракције и, у неким случајевима, ковалентно везивање.³¹¹ Интеркалација је један од најчешћих механизма ДНК везивања, при чему долази до уметања планарних делова комплекса или лигананда између базних парова ДНК, што доводи до структурних промена у дволанчаној спирали. Овај тип интеракције се испитује коришћењем етидијум-бромида (ЕБ), који служи као класичан интеркалациони агенс.³¹⁵⁻³¹⁷ Везивање за мали жљеб ДНК омогућава специфичну интеракцију молекула са низовима база у малом жљебу, при чему се структура ДНК минимално мења, али се истовремено ефективно ометају процеси неопходни за ћелијски опстанак. Ова врста интеракције може се испитати коришћењем Hoechst 33258 (Ное), класичног агенса за везивање у малом жљебу.^{317,318} Поред тога, неки молекули могу се везивати у велики жљеб, где се обично налазе протеини транскрипције и други регулаторни фактори. Електростатске интеракције настају када се молекули са позитивним наелектрисањем неспецифично везују за негативно наелектрисан фосфатни део ДНК. Ове интеракције су слабије и реверзибилне, али могу утицати на стабилност комплекса. Иако је флуориметрија углавном намењена испитивању нековалентних интеракција, промене у флуоресценцији могу указивати и на ковалентно везивање, нарочито у присуству комплекса који овим начином интеракције модификују структуру ДНК.³¹¹

Испитивање интеракција комплекса са молекулом ДНК у присуству класичних агенаса, као што су ЕБ и Ное 33258, омогућава детаљније разумевање механизма везивања. Промене у флуоресцентним спектрима ДНК-ЕБ или ДНК-Ное 33258 у присуству различитих концентрација комплекса пружају значајне информације о њиховој способности да интеркалирају између база или да се везују за мали жљеб ДНК.

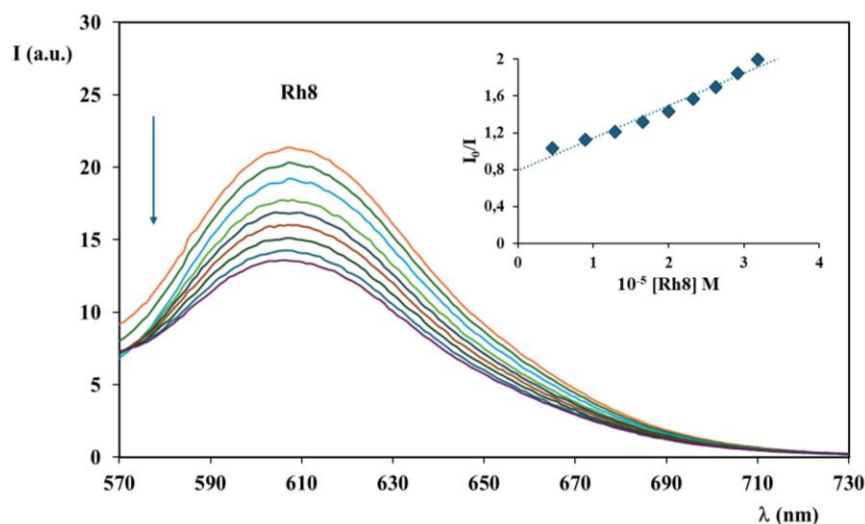
4.3.2.1. Испитивање интеркалационе способности комплекса у присуству етидијум-бромида

Да би се проценила интеркалациона способност комплекса родијума и осмијума, интеракције са ДНК молекулом испитиване су флуориметријом уз примену етидијум-бромида (ЕБ). ЕБ је мали молекул који у слободном раствору показује низак интензитет флуоресценције. Међутим, приликом интеркалације између база молекула ДНК интензитет флуоресцентне емисије значајно се повећава, са максималном емисијом на око 612 nm.^{315,316} Ако испитивани комплекс поседује способност интеркалације, он може да истисне ЕБ из комплекса ЕБ-ДНК. Овај процес доводи до смањења интензитета флуоресценције, што представља директан доказ о интеркалационој способности испитиваног комплекса.

4.3.2.1.1. Испитивање интеракције комплекса Rh(III)

Испитане су интеракције комплекса **Rh1-10** са ДНК молекулом у присуству етидијум-бромида (ЕБ). За комплексе **Rh3**, **Rh6**, **Rh7** и **Rh10**, праћена је промена емисионог интензитета раствора са константном концентрацијом ДНК-ЕБ (10 μ M), уз постепено

повећавање концентрације комплекса до 10 μM . За преостале испитиване комплексе, концентрација ДНК-ЕБ износила је 5 μM , док је концентрација комплекса постепено повећавана до моларног односа 5.^{270,274-277} Пример емисионог спектра раствора ДНК-ЕБ, након додавања растућих концентрација комплекса са тиазол-пиридинским лигандом (**Rh8**), приказан је на Слици 4.12.



Слика 4.12. Емисиони спектар ДНК-ЕБ система у присуству комплекса **Rh8**. Концентрације: [ЕБ] = [ДНК] = 10 μM , [комплекс] = 0-10 μM ; таласна дужина екситације (λ_{ex}) = 527 nm. Стрелице илуструју промене у интензитету емисије са повећањем концентрације комплекса **Rh8**.

Уметнути график: Зависност I_0/I од концентрације комплекса **Rh8**.

На Слици 4.12. представљена је зависност интензитета емисије ЕБ везаног за ДНК у одсуству и присуству комплекса **Rh8** у функцији таласне дужине. Додавање растућих концентрација комплекса **Rh8** доводи до значајног смањења интензитета емисије на око 610 nm, што указује на конкуренцију између комплекса и ЕБ при везивању за ДНК. Смањење интензитета флуоресценције ДНК-ЕБ комплекса указује да испитивани комплекс може да истисне ЕБ из ЕБ-ДНК једињења тј. да показују интеркалациони афинитет за везивање са молекулом ДНК. Додатак растуће концентрације комплекса **Rh8** у раствор ДНК-ЕБ доводи до смањења интензитета флуоресценте емисије за 43,5 % од почетне вредности.

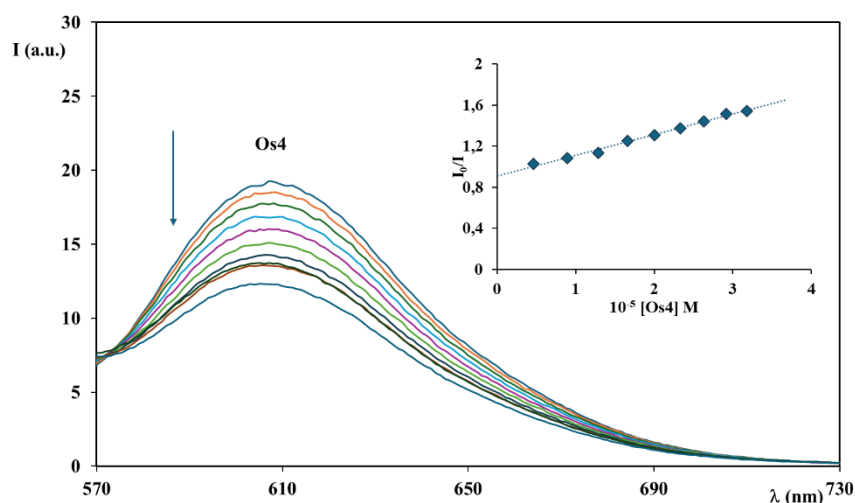
Стерн-Волмерове константе за све испитиване комплексе **Rh1-10** израчунате су применом Стерн-Волмерове једначине (5) из Експерименталног дела 3.6., а добијени резултати су наведени у Табели 4.6. На основу ових резултата може се закључити да сви испитивани комплекси родијума показују афинитет за интеркалацију, при чему су K_{sv} константе реда величине 10^4 .^{270,274-277}

Комплекс са *dien*-ским лигандом (**Rh1**) и комплекс са тиазол-пиридинским лигандом (**Rh9**) показали су сличне вредности K_{sv} константи, али нешто ниже у односу на остале комплексе. Комплекси са бипиридинским лигандом (**Rh2**) и терпиридинским лигандом

(**Rh3**) имали су нешто ниже вредности K_{sv} константи у поређењу са комплексима који садрже камфор деривате *bis*-пиразолилпиридина (**Rh6** и **Rh7**), али сличне комплексу са тиазол-пиридинским лигандом (**Rh8**). Комплекси са *bis*-пиразолилпиридинским лигандима (**Rh4** и **Rh5**), као и комплекс са камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина и два 1,2,4-триазола (**Rh10**), показали су најниже вредности K_{sv} константи, приближно четири пута ниже у односу на најреактивнији комплекс **Rh7**. Највеће вредности K_{sv} константи забележене су код комплекса са камфор дериватима *bis*-пиразолилпиридина (**Rh6** и **Rh7**), при чему је комплекс **Rh7** показао нешто већу вредност.

4.3.2.1.2. Испитивање интеракција комплекса Os(II)

Флуориметријским мерењима је испитана интеркалациона способност за комплексе **Os1-5** у присуству етидијум-бромид (ЕБ). Процес титрације гашења флуоресценције обухватио је праћење емисионог интензитета раствора са константном концентрацијом ДНК-ЕБ (5 μM), док је концентрација испитиваних комплекса постепено повећавана до моларног односа 5.^{268,276} Пример емисионог спектра раствора ДНК-ЕБ константне концентрације, након додавања растућих концентрација комплекса **Os4**, приказан је на Слици 4.13.



Слика 4.13. Емисиони спектар ДНК-ЕБ система у присуству комплекса **Os4**. Концентрације: [ЕБ] = [ДНК] = 10 μM , [комплекс] = 0-10 μM ; таласна дужина екситације (λ_{ex}) = 527 nm. Стрелице илуструју промене у интензитету емисије са повећањем концентрације комплекса **Os4**.

Уметнути график: Зависност I_0/I од концентрације комплекса **Os4**.

На Слици 4.13. приказана је зависност интензитета емисије етидијум-бромид (ЕБ) везаног за ДНК у одсуству и присуству комплекса **Os4** у функцији таласне дужине. Додавање све већих концентрација комплекса **Os4** доводи до значајног смањења емисионог интензитета при око 610 nm, што указује на конкуренцију између комплекса и ЕБ за везивање са ДНК.^{315,316} Ово смањење интензитета флуоресценције показује да комплекс **Os4** може да истисне ЕБ из ЕБ-ДНК комплекса, потврђујући интеркалациони афинитет за

везивање са молекулом ДНК. Додатак растуће концентрације комплекса **Os4** у раствор ДНК-ЕБ доводи до смањења интензитета флуоресценте емисије за 36,4% од почетне вредности. Исти ефекат је уочен и код других испитиваних комплекса осмијума.

Вредности Стерн-Волмерових константи, K_{sv} , за све испитиване комплексе **Os1-5** израчунате су према Стерн-Волмеровој једначини (5) из Експерименталног дела 3.6., док су добијени резултати представљени у Табели 4.7.^{268,276} На основу добијених вредности може се закључити да сви испитивани комплекси осмијума показују интеркалациону способност са молекулом ДНК, са константама везивања реда величине 10^4 . Комплекс са терпиридинским лигандом (**Os1**), комплекс са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os3**) и комплекс са тиазол-пиридинским лигандом (**Os4**) показали су сличне K_{sv} вредности. Комплекс са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os2**) имао је највећу K_{sv} константу, скоро дупло већу у односу на остале комплексе. Најнижу вредност у серији показао је комплекс са тиазол-пиридинским лигандом (**Os5**).

У поређењу са аналогним комплексима родијума, комплекси осмијума су показали K_{sv} константе истог реда величине (10^4). Комплекс осмијума са терпиридинским лигандом (**Os1**) имао је нешто већу K_{sv} константу у односу на аналогни комплекс родијума (**Rh3**). Такође, уочене су разлике у редоследу реактивности код комплекса са тиазол-пиридинским и терпиридинским лигандима. У серији комплекса осмијума, терпиридински комплекс (**Os1**) имао је већу K_{sv} константу од тиазол-пиридинског комплекса са метил групом (**Os4**). Насупрот томе, код комплекса родијума, тиазол-пиридински комплекс са метил групом (**Rh8**) имао је знатно већу K_{sv} константу у односу на терпиридински комплекс (**Rh3**). Комплекси осмијума са *bis*-пиразолилпиридинским лигандима (**Os2** и **Os3**) показали су више K_{sv} константе од аналогних комплекса родијума (**Rh4** и **Rh5**), при чему је комплекс **Os2** имао скоро четири пута већу вредност у односу на **Rh4**. Такође, у серији комплекса осмијума, комплекси са *bis*-пиразолилпиридинским лигандима имали су највише вредности K_{sv} константи, док су у серији комплекса родијума, комплекси са овим лигандима показали најниже вредности. Комплекс осмијума са тиазол-пиридинским лигандом који садржи метил групу (**Os4**) имао је дупло мању K_{sv} константу у односу на аналогни комплекс родијума (**Rh8**). Док су комплекси осмијума и родијума са тиазол-пиридинским лигандом који садржи бензенов прстен (**Os5** и **Rh9**) показали сличне вредности K_{sv} константе.

4.3.2.1.3. Испитивање интеркалационе способности комплекса у присуству етидијум-бромиди и јонских течности

За комплексе **Rh1-10** и **Os1-5** флуориметријске титрације у присуству јонских течности праћене су на собној температури, са циљем испитивања утицаја јонских течности као косолвената на интеркалациону способност комплекса. Јонске течности су коришћене при припреми раствора комплекса, при чему је однос јонске течности и испитиваних комплекса био 2:1, осим за комплексе **Os1-3** где је однос јонске течности и испитиваних комплекса био 1:1. Експерименти су праћени при константој концентрацији ДНК-ЕБ раствора, док је концентрација испитиваних комплекса постепено повећавана до моларног односа 5. Поређењем вредности K_{sv} константи добијених у одсуству јонских течности са онима у њиховом присуству указује на минималан утицај јонских течности на интеракцију комплекса са ДНК. Резултати испитивања дати су у Табелама 4.10. и 4.11.^{268,270,274-277}

Табела 4.10. Стерн-Волмерове константе (K_{sv} [M^{-1}]) за интеракције испитиваних комплекса **Rh1-10** са ДНК у присуству ЕБ и јонских течности IL1-12 и DMF као косолвената (однос комплекса и јонске течности био је 1:2) при pH = 7,4 (PBS).^{270,274-277}

	DMF	IL1	IL2	IL3	IL4	IL5	IL6	IL7	IL8	IL9	IL10	IL11	IL12
	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$
Rh1	2,2±0,1	2,6±0,1	2,5±0,1	2,6±0,1	2,7±0,1	2,4±0,1	2,3±0,1	2,3±0,1	2,5±0,1	2,0±0,1	2,2±0,1	2,1±0,1	2,3±0,1
Rh2	3,4±0,1	3,7±0,1	3,8±0,1	3,6±0,1	3,4±0,1	3,5±0,1	3,6±0,1	3,5±0,1	3,7±0,1	3,4±0,1	3,2±0,1	3,3±0,1	3,3±0,1
Rh3	3,8±0,1	4,2±0,1	4,4±0,1	4,3±0,1	3,9±0,1	4,1±0,1	4,3±0,1	4,2±0,1	4,3±0,1	3,6±0,1	3,7±0,1	3,5±0,1	3,8±0,1
Rh4	1,4±0,1	1,7±0,1	1,8±0,1	1,5±0,1	1,7±0,1	1,5±0,1	1,5±0,1	1,6±0,1	1,8±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1
Rh5	1,2±0,1	1,5±0,1	1,5±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1	1,3±0,1	1,3±0,1	1,4±0,1	1,5±0,1	1,3±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1
Rh6	5,0±0,1	5,3±0,2	/	/	/	/	/	/	5,4±0,1	/	4,9±0,1	/	/
Rh7	5,5±0,1	5,6±0,1	5,9±0,1	5,8±0,1	5,6±0,1	5,7±0,1	5,8±0,1	5,5±0,1	5,8±0,1	5,2±0,1	5,3±0,1	5,2±0,1	5,1±0,1
Rh8	4,2±0,1	4,7±0,1	/	/	/	/	/	/	4,6±0,1	/	4,4±0,1	/	/
Rh9	2,0±0,1	2,6±0,2	/	/	/	/	/	/	2,4±0,1	/	2,2±0,1	/	/
Rh10	1,3±0,1	2,2±0,1	2,3±0,1	1,8±0,1	1,7±0,1	1,7±0,1	1,6±0,1	1,9±0,1	2,0±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1

Табела 4.11. Стерн-Волмерове константе (K_{sv} [M^{-1}]) за интеракције испитиваних комплекса **Os1-5** са ДНК у присуству ЕБ и јонских течности IL1-12 и DMF као косолвената (однос комплекса и јонске течности био је 1:2 или 1:1) при рН = 7,4 (PBS).^{268,276}

	DMF	IL1	IL2	IL3	IL4	IL5	IL6	IL7	IL8	IL9	IL10	IL11	IL12
	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$	$10^{-4}K_{sv}$
Os1	2,6±0,1	3,2±0,1	3,6±0,1	3,2±0,1	3,1±0,1	2,8±0,1	2,6±0,1	3,4±0,1	3,1±0,1	/	2,1±0,1	/	/
Os2	4,4±0,1	3,5±0,1	3,7±0,1	3,5±0,1	3,2±0,1	3,2±0,1	2,9±0,1	3,4±0,1	3,1±0,1	/	3,1±0,1	/	/
Os3	2,9±0,1	3,4±0,1	3,7±0,1	3,1±0,1	2,6±0,1	2,6±0,1	2,1±0,1	3,4±0,1	3,1±0,1	/	2,7±0,1	/	/
Os4	2,1±0,1	1,9±0,1	/	/	/	/	/	/	2,1±0,1	/	1,7±0,1	/	/
Os5	1,8±0,1	1,7±0,1	/	/	/	/	/	/	1,7±0,1	/	1,6±0,1	/	/

На основу резултата приказаних у Табелама 4.10. и 4.11., може се закључити да присуство јонских течности (IL) благо утиче на вредности константи K_{sv} комплекса. Константе су остале истог реда величине (10^4), што указује на минималан утицај јонских течности на интеракције путем интеркалационог механизма са молекулом ДНК.^{268,270, 274-277}

UV-Vis и флуоресцентна спектроскопска мерења показала су добру усаглашеност резултата. Код **Rh1-10** комплекса добијене су сличне вредности константи у присуству у одсуству јонских течности. Јонске течности са холинским катјоном углавном су довеле до већих вредности K_{sv} у поређењу са онима које садрже агматин. Уочено је благо повећање вредности константи везивања у присуству IL1-8, док су константе у присуству IL9-12 биле сличне или благо смањене. Ови резултати су у складу са кинетичким и UV-Vis мерењима.

Код комплекса осмијума, највећа вредност K_{sv} константе за испитиване комплексе забележена је у присуству IL2, при чему су све вредности константе остале истог реда величине (10^4). Код комплекса са терпиридинским лигандом (**Os1**) и са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os3**) уочене су одређене разлике у вредностима константи при примени јонских течности као косолвената, док су за комплексе са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os2**) и тиазол-пиридинским лигандима (**Os4** и **Os5**) добијене вредности константи у присуству јонских течности биле нешто ниже. Међутим, није уочен утицај катјона јонских течности на вредности K_{sv} константи као код комплекса родијума.

Вредности K_{sv} константи остале истог реда величине у присуству јонских течности, што указује да јонске течности нису имале негативан утицај на интеракције комплекса са ДНК нити су значајно смањиле константе у поређењу са применом DMF.

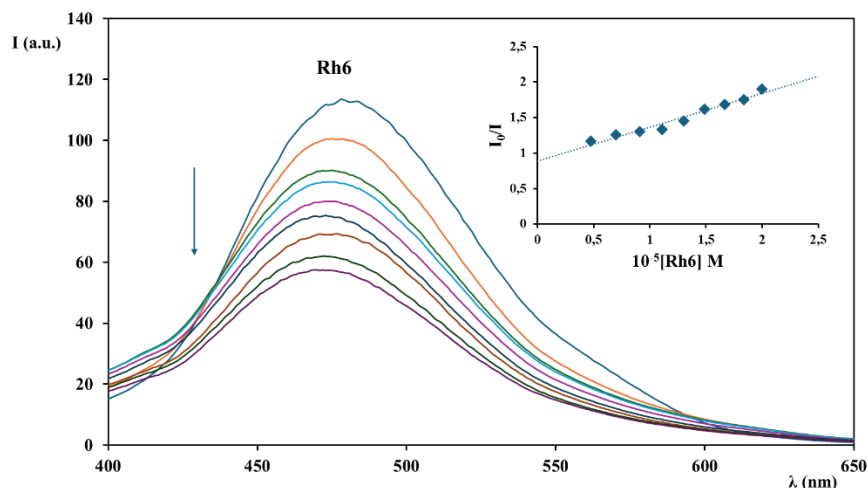
4.3.2.2. Испитивање везивања комплекса и Hoechst 33258 за мали жлеб ДНК

Да би се испитао афинитет комплекса родијума и осмијума за везивање за мали жлеб молекула ДНК, праћено је конкурентно везивање комплекса и Hoechst 33258 (Ное). Ное представља синтетички дериват *N*-метил пиперазина, познат по својој високој селективности за А:Т богате секвенце у малом жлебу Б-ДНК. Основна карактеристика Ное молекула је слаба флуоресценција у слободном стању, док додатак ДНК доводи до значајног повећања интензитета емисије флуоресценције при таласној дужини од 460-470 nm. Овај ефекат се објашњава повећањем планарности молекула Ное у везаном стању, што стабилизује његову интеракцију са ДНК.^{317,318}

Механизам везивања за мали жлеб карактеристичан је за мале молекуле, укључујући лекове и органске боје, док се макромолекули обично везују за велики жлеб. Када Ное и испитивани комплекси конкуришу за исто везивно место, додавање комплекса доводи до опадања интензитета флуоресценције указујући на истискивање Ное са места везивања, што омогућава процену афинитета испитиваних комплекса за везивање за мали жлеб молекула ДНК.^{317,318}

4.3.2.2.1. Испитивање интеракција комплекса Rh(III)

Флуориметријским мерењима испитана је способност комплекса **Rh1-10** да се везују за мали жљеб молекула ДНК у присуству Ное 33258 (Ное).^{270,274-277} Праћен је емисиони интензитет раствора ДНК-Ное константне концентрације, са постепеним повећањем концентрација комплекса до односа 5. Пример емисионог спектра раствора ДНК-Ное константне концентрације након додавања растућих концентрација комплекса са лигандом камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh6**) приказан је на Слици 4.14.



Слика 4.14. Емисиони спектар флуоресцентне титрације ДНК-Ное раствора у присуству различитих концентрација комплекса **Rh6**. Концентрација Ное и ДНК била је 5 μM , а стрелица указује на промене интензитета флуоресценције са повећањем концентрације **Rh6** комплекса у молском односу 0-5.

Уметнути график: Зависност I_0/I од концентрације комплекса **Rh6**.

Додавање растућих концентрација комплекса **Rh6** доводи до значајног смањења интензитета емисије при око 470 nm, што указује на конкурентно везивање комплекса и Ное за молекул ДНК. Са повећањем концентрације комплекса **Rh6** у раствору интензитет емисије је смањен за 42,9% у односу на почетну вредност, чиме је потврђен афинитет комплекса **Rh6** за везивање за мали жљеб ДНК. Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) за све испитиване комплексе **Rh1-10** израчунате су применом Стерн-Волмерове једначине (5) из Експерименталног дела 3.6. Резултати су представљени у Табели 4.12.^{270,274-277}

Испитивани комплекси родијума показали су умерену интеракцију са молекулом ДНК преко малог жљеба, при чему су константе везивања биле благо ниже у односу на оне добијене у присуству етидијум-бромида (ЕБ), али су остале истог реда величине. Редослед реактивности комплекса остао је непромењен у поређењу са резултатима добијеним применом ЕБ. Ипак, резултати указују на нешто мањи афинитет за везивање за мали жљеб у односу на интеркалациони механизам.

Табела 4.12. Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) за интеракције испитиваних комплекса **Rh1-10** са ДНК у присуству етидијум-бромида (ЕБ) и Ное.

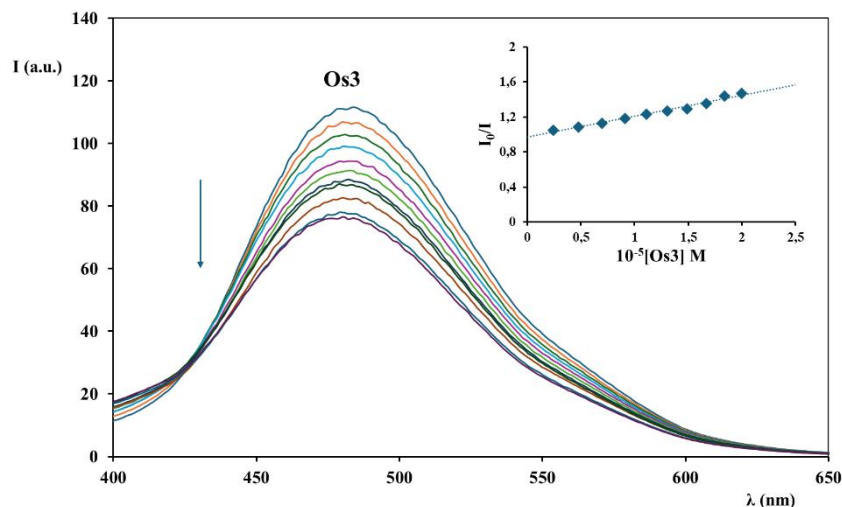
	ДНК	
	ЕБ	Ное
	$K_{sv} [M^{-1}]$	$K_{sv} [M^{-1}]$
Rh1	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh2	$(3,4 \pm 0,1) \times 10^4$	$(3,1 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh3	$(3,8 \pm 0,1) \times 10^4$	$(3,5 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh4	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh5	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh6	$(5,0 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,6 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh7	$(5,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(5,3 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh8	$(4,2 \pm 0,1) \times 10^4$	$(3,8 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh9	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh10	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^4$

На основу добијених резултата флуоресцентне емисије у присуству ЕБ и Ное, може се закључити да испитивани комплекси **Rh1-10** не показују изражену селективност при везивању за ДНК молекула, с обзиром на то да су показали способност интеракције и путем интеркалације и путем везивања за мали жљеб. Ова карактеристика указује на могућност деловања комплекса на више начина, што може бити корисно за њихову примену у биолошким системима, јер омогућава флексибилност у механизмима интеракције са ДНК.

4.3.2.2.2. Испитивање интеракција комплекса **Os(II)**

Флуориметријским мерењима испитана је способност комплекса **Os1-5** да се везују за мали жљеб молекула ДНК у присуству Ное 33258 (Ное).^{268,276} Праћен је емисиони интензитет раствора ДНК-Ное константне концентрације (5 μ M), са постепеним повећањем концентрација комплекса до односа 5. Пример емисионог спектра раствора са константном концентрацијом ДНК-Ное након додавања растућих концентрација комплекса са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os3**) приказан је на Слици 4.15.

Додавање растућих концентрација комплекса **Os3** довело је до значајног смањења интензитета емисије при око 470 nm, што указује на конкурентно везивање између комплекса **Os3** и Ное за молекула ДНК. Повећање концентрације комплекса **Os3** у раствору довело је до смањења интензитета емисије за 33,1% у односу на почетну вредност, чиме је потврђен афинитет комплекса **Os3** према малом жљебу ДНК. Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) за све испитиване комплексе **Os1-5** израчунате су применом Стерн-Волмерове једначине (5) из Експерименталног дела 3.6. Резултати су приказани у Табели 4.13.^{268,276}



Слика 4.15. Емисиони спектар флуоресцентне титрације ДНК-Ное раствора у присуству различитих концентрација комплекса **Os3**. Концентрација Ное и ДНК била је 5 μM , а стрелица указује на промене интензитета флуоресценције са повећањем концентрације **Os3** комплекса у молском односу 0-5.

Уметнути график: Зависност I_0/I од концентрације комплекса **Os3**.

Табела 4.13. Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) за интеракције испитиваних комплекса **Os1-5** са ДНК у присуству етидијум-бромида (ЕБ) и Ное.

	ДНК	
	ЕБ	Ное
	$K_{sv} [\text{M}^{-1}]$	$K_{sv} [\text{M}^{-1}]$
Os1	$(2,6 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^4$
Os2	$(4,4 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,4 \pm 0,1) \times 10^4$
Os3	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,4 \pm 0,1) \times 10^4$
Os4	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^4$
Os5	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$

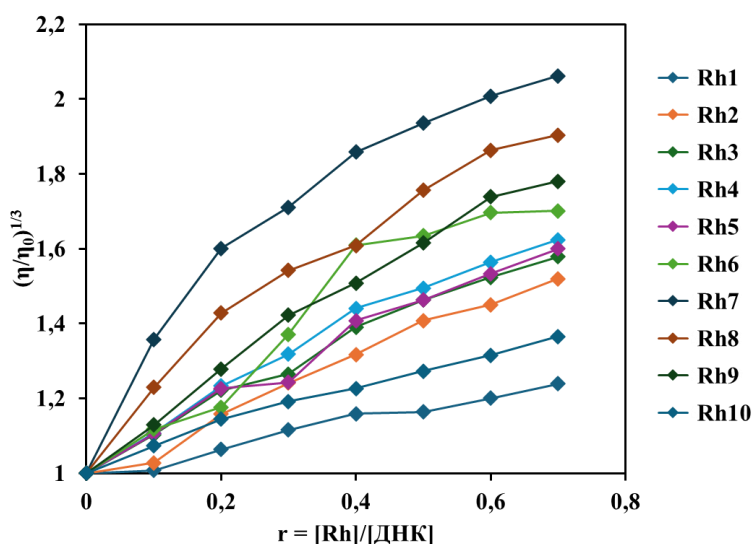
Испитивани комплекси осмијума показали су умерену интеракцију са молекулом ДНК преко малог жљеба, при чему су комплекси **Os1-5** имали благо ниже константе у поређењу са резултатима добијеним када се користио етидијум-бромид (ЕБ), али истог реда величине. Изузетак је комплекс са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os2**), који је показао исте вредности константи како за интеркалацију, тако и за интеракцију преко малог жљеба са ДНК молекулом. Комплекси осмијума су показали мало ниже вредности константи у поређењу са структурно сличним комплексима родијума, што је у складу са другим методама испитивања ДНК интеракција.

Испитивани комплекси осмијума, као и комплекси родијума, нису показали изражену селективност при везивању за ДНК. Показали су способност интеракције са ДНК молекулом и путем интеркалације и путем везивања за мали жљеб, указујући на могућност интеракције комплекса са ДНК преко различитих механизма деловања.

4.3.3. Испитивања интеркалационе способности комплекса Rh(III) и Os(II) са ДНК мерењем вискозности

Мерење вискозности је важна метода за испитивање интеракција комплекса са молекулом ДНК. Ова техника омогућава прецизније одређивање начина интеракције, посебно у одсуству података о кристалној структури.^{311,319} Вискозност раствора ДНК се мења са променом дужине ДНК ланца, што је директан индикатор начина везивања. Класичан механизам интеркалације подразумева убацивање молекула између базних парова, при чему долази до продужења ДНК ланца и повећањем вискозности раствора. Додатак класичног интеркалатора, као што је етидијум-бромид (ЕБ), изазива континуирано повећање вискозности. Јачина интеркалације обично је пропорционална степену повећања вискозности раствора ДНК.³²⁰

Додавање растућих концентрација испитиваних комплекса родијума (до моларног односа $r = 1.0$) у раствор ДНК (0.01 mM) довело је до умереног повећања релативне вискозности, Слика 4.16.^{270,274-277} Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ одређена је на основу једначине (6) из Експерименталног дела 3.6.



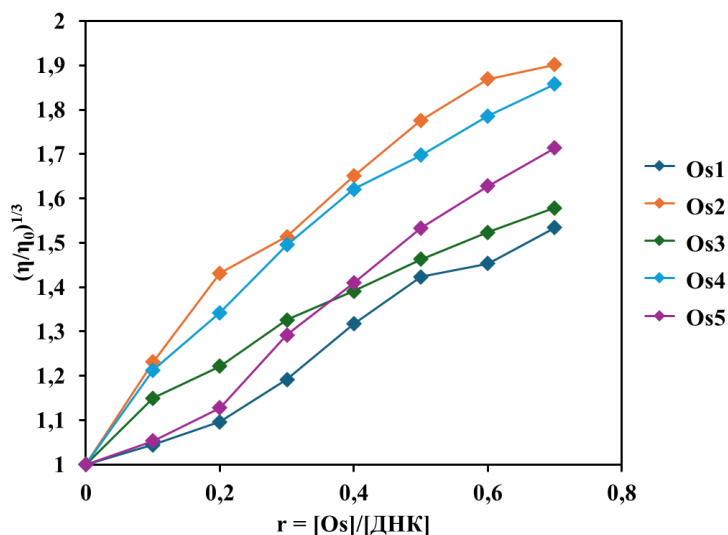
Слика 4.16. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ ДНК раствора у 10 mM PBS у присуству растућих концентрација испитиваних комплекса **Rh1-10**.

Комплекс са *dien*-ским лигандом (**Rh1**) показао је најмање повећање вискозности раствора, што је у складу са структуром његовог лиганда, који нема ароматичне прстенове, за разлику од осталих испитиваних комплекса. Познато је да је за интеркалацију комплекса између ланаца ДНК најчешће потребна волуминозна и ригидна структура лиганда, тако да су добијени резултати у складу са структуром комплекса **Rh1**.

Комплекси са бипиридинским лигандом (**Rh2**), терпиридинским лигандом (**Rh3**), *bis*-пиразолилпиридинским лигандима (**Rh4**, **Rh5**), камфор дериватима *bis*-пиразолилпиридина (**Rh6**, **Rh7**) и тиазол-пиридинским лигандима (**Rh8** и **Rh9**) показали су умерен пораст вискозности ДНК раствора при повећању концентрације комплекса до $r =$

1.0. Како се број прстенова у структури испитиваних комплекса повећавао, вискозност раствора се повећавала. Комплекс са лигандом камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7**) показао је највеће повећање вискозности ДНК раствора. Међутим, код комплекса са камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина и два 1,2,4-триазола (**Rh10**) забележен је само благи пораст вискозности раствора, сличан оном код комплекса **Rh1**. Ови резултати су у складу са подацима добијеним путем UV-Vis и флуоресцентних мерења, као и са структурама испитиваних комплекса.

Додавање растућих концентрација испитиваних комплекса осмијума (до моларног односа $r = 1.0$) у раствор ДНК (0.01 mM) довело је до умереног повећања релативне вискозности, Слика 4.17.^{268,276} Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ одређена је на основу једначине (6) из Експерименталног дела 3.6. Релативна вискозност ДНК умерено је порасла и са додатком растућих концентрација комплекса **Os1-5** до $r = 1.0$.

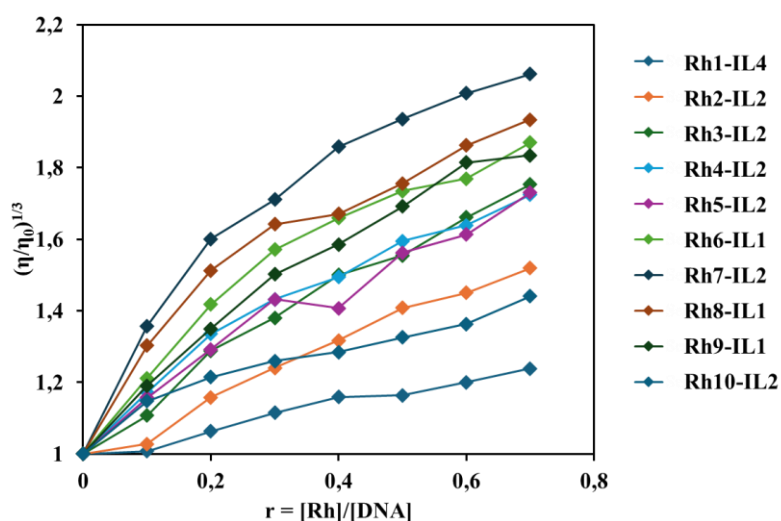


Слика 4.17. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ ДНК раствора у 10 mM PBS у присуству растућих концентрација испитиваних комплекса **Os1-5**.

Комплекс са терпиридинским лигандом (**Os1**) показао је мање повећање вискозности раствора у односу на аналогни комплекс родијума (**Rh3**). Комплекс са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os2**) показао је највеће повећање вискозности ДНК раствора. У поређењу са структурно сличним комплексима родијума, комплекси осмијума са *bis*-пиразолилпиридинским лигандима (**Os2**, **Os3**) показали су веће повећање вискозности у односу на аналогне комплексе родијума (**Rh4**, **Rh5**). Ови резултати су у складу са подацима добијеним UV-Vis и флуоресцентним мерењима. Насупрот томе, комплекси осмијума са терпиридинским (**Os1**) и тиазол-пиридинским лигандима (**Os4**, **Os5**) показали су мање повећање вискозности раствора у односу на аналогне комплексе родијума (**Rh3**, **Rh8**, **Rh9**).

4.3.3.1. Утицај јонских течности на интеркалационе способности комплекса Rh(III) са ДНК мерењем вискозности

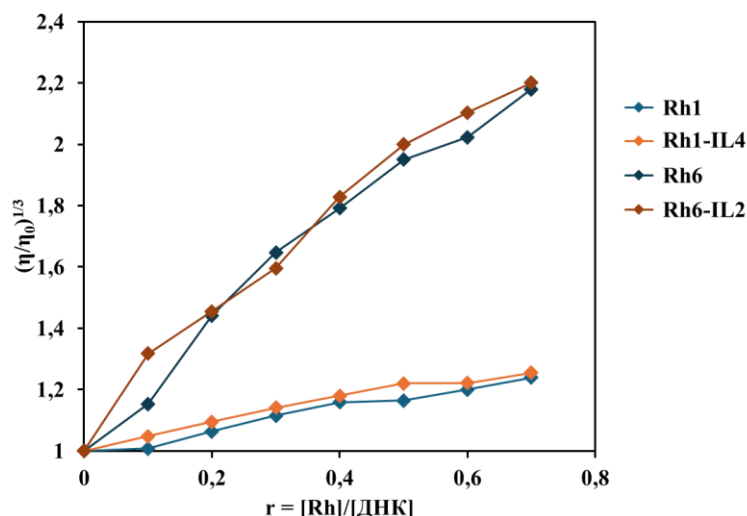
Испитан је ефекат јонских течности (IL) као косолвента на интеркалацију комплекса родијума мерењем вискозности раствора. Мерења су извршена у присуству само једне јонске течности за сваки комплекс, Слика 4.18. Изабране јонске течности одређене су на основу претходних испитивања, где је њихово присуство показало највише вредности константи за ДНК интеракције. Тако је за мерење вискозности коришћена IL4 као косолвент за комплекс **Rh1**, IL2 за комплексе **Rh2-5**, **Rh7** и **Rh10**, и IL1 за комплексе **Rh6**, **Rh8** и **Rh9**.^{268,270,274-277} На Слици 4.18. приказан је утицај јонских течности као косолвената комплекса родијума на вискозност ДНК раствора.



Слика 4.18. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ ДНК раствора у 10 mM PBS у присуству растућих концентрација испитиваних комплекса родијума у присуству одређених јонских течности као косолвената.

За све испитиване комплексе добијено је благо повећање вискозности раствора у присуство IL, указујући да присуство IL није значајно повећало могућност интеркалације испитиваних комплекса.

На Слици 4.19. приказан је утицај јонских течности и комплекса са *dien*-ским лигандом (**Rh1**) и лигандом камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7**) на вискозност ДНК раствора. Комплекс **Rh1** је показао најмање повећање вискозности, док је комплекс **Rh7** показао највеће повећање вискозности у одсуству јонских течности. Резултати приказани на Слици 4.19. показују да су јонске течности као косолвенти довеле до малих повећања вискозности раствора у поређењу са резултатима у одсуству јонских течности.



Слика 4.19. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ ДНК раствора у 10 mM PBS у присуству растућих концентрација комплекса **Rh1** и **Rh7** у присуству и одсуству јонских течности као косолвената.

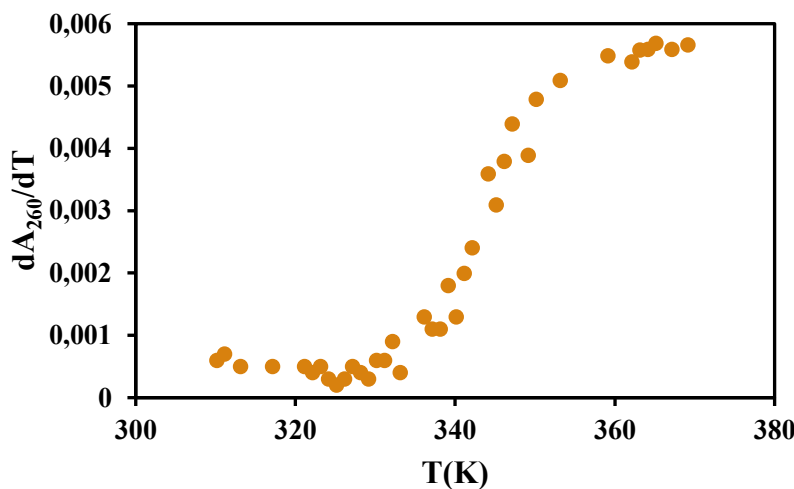
Поређењем резултата добијених UV-Vis и флуоресцентном спектроскопијом, као и мерењима вискозности можемо закључити да су испитиване јонске течности погодни косолвенти за испитиване комплексе. Вредности константи везивања у њиховом присуству показале су само благо повећање или су остале на истом нивоу као у органским растварачима, што указује да јонске течности не ремете интеракцију комплекса са ДНК.

4.3.4. Испитивања интеркалационе способности комплекса Rh(III) са ДНК мерењем термалне денатурације

Испитивање термалне денатурације ДНК пружа кључне информације о начину везивања комплекса за ДНК и представља једну од кључаних метода за потврду интеркалационих особина.^{311,321} Ова метода омогућава процену механизма интеркалације кроз промене у температури топљења ДНК (T_m). Стабилност двоструке спирале ДНК директно утиче на вредност T_m . Када комплекс интерагује са ДНК молекулом долази до промене T_m ДНК раствора, зависно од јачине интеракција. Интеркалацијом комплекса између база ДНК обично долази до значајног повећања T_m , јер долази до стабилизације структуре ДНК спирале. Насупрот томе, мање промене у T_m указују на то да се комплекс везује за жљехове ДНК или на њену површину. Да би се везивање сматрало интеркалацијом, очекује се значајно повећање T_m (ΔT_m), често веће од 10 K. С друге стране, везивање комплекса за жљехове или површину ДНК обично долази до мањег повећања T_m , често испод 5 K.

Испитивања термалне денатурационе ДНК (150 μ M) спроведене су праћењем апсорпције на 260 nm у одсуству и присуству комплекса родијума (50 μ M), са температурним опсегом од 40-90 K и брзином повећања температуре од 1 K/min при pH 7,4. Значајан пораст T_m раствора ДНК у присуству испитиваних комплекса у односу на T_m самог раствора ДНК указује на интеркалацију као механизам интеракције. Уколико до

промене температуре топљења не дође, интеркалација није присутна. На Слици 4.20. приказан је график (dA_{260}/dT у зависности од T) добијен на основу профила тољења ДНК раствора у присуству комплекса **Rh10**. Температура топљења ДНК раствора износила је 348,12K, док је у присуству комплекса **Rh10** повећана на 359,15K. Пораст температуре топљења ДНК за $\Delta T_m = 11,03K$ приписује се интеркалацији комплекса **Rh10**.



Слика 4.20. График зависности dA_{260}/dT од T добијеног на основу профила тољења ДНК раствора.

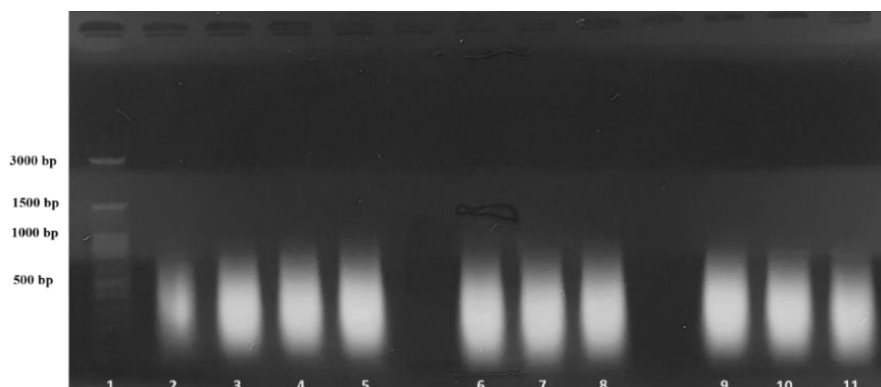
Код испитаних комплекса родијума (**Rh4-10**) уочена су значајна повећања T_m ДНК, указујући на интеркалациони механизам дејства али са вредностима близу граничним вредностима ($\Delta T_m = 10,3-13,6$). Комплекси са камфорским дериватима *bis*-пиразолилпиридинским показали су највеће вредности. Резултати добијени методом термалне денатурације у сагласности су са резултатима добијеним флуоресцентном спектроскопијом и мерењем вискозности, пружајући доказе о интеракције комплекса са ДНК.^{270,274-277}

4.3.5. Испитивања интеракције комплекса Os(II) са ДНК методом гел електрофорезе

Електрофореза се примењује за анализу ДНК интеракција, јер омогућава визуализацију и процену промена у структури или мобилности ДНК изазваних везивањем испитиваних супстанци. Ова метода је посебно важна у токсиколошким и фармаколошким истраживањима, јер омогућава разумевање механизма деловања нових лекова, укључујући њихов утицај на ДНК. Као једноставна и ефикасна метода електрофореза доприноси процени биолошке активности и селективности супстанци, што је од суштинског значаја у развоју терапеутских агенаса.³²²

Електрофореза омогућава детекцију промена у мобилности ДНК услед директне интеракције са комплексима, што може довести до структурних промена у молекулу и утицати на њено кретање кроз гел. На Слици 4.21. приказани су резултати утицаја

комплекса **Os1-3** на померање електрофоретске мобилности ДНК.²⁶⁸ Тачан механизам везивања за ДНК се не може прецизно одредити само електрофорезом, међутим, тип интеракције значајно утиче на електрофоретску мобилност. Ковалентне интеракције, у којима комплекс формира трајне везе са ДНК, обично доводе до веће промене у мобилности, док електростатичке и површинске интеракције, које су слабије, узрокују мање приметне промене. Интеркалацијом, где долази до уметања комплекса између база ДНК, често долази до успореног кретања ДНК молекула током електрофорезе.



Слика 4.21. Поређење миграције **Os1-3/ДНК** на 0.8% агарозном гелу. Гледано са леве стране: трака 1 - маркер; трака 2 - слободна ДНК; траке 3, 4 и 5 - ДНК инкубирана са **Os2** (1, 3 и 5 μL раствора **Os2** од 10 mM); траке 6, 7 и 8 - ДНК инкубирана са **Os3** (1, 3 и 5 μL раствора **Os3** од 10 mM); траке 9, 10 и 11 - ДНК инкубирана са **Os1** (1, 3 и 5 μL раствора **Os1** од 10 mM).

Резултати добијени електрофорезом указују на умерену интеракцију комплекса са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os2**) и молекула ДНК, док су комплекси са терпиридинским лигандом (**Os1**) и *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os3**) показали слабију интеракцију.

4.4. ИСПИТИВАЊА ИНТЕРАКЦИЈА КОМПЛЕКСА СА HSA И BSA

Албумин, најзаступљенији серумски протеин, представља кључну мету у фармакокинетици и фармакодинамици нових терапеутских агенаса. Његова улога у транспорту лекова и везивању хидрофобних супстанци од пресудног је значаја за одређивање биорасположивости, дистрибуције и ефикасности фармаколошких једињења.³²³⁻³²⁶ Поред регулације осмотског притиска и одржавања равнотеже течности између васкуларног и интерстицијалног простора, албумин делује као складиште лекова, што може продужити њихов полуживот и модификовати динамику ослобађања у организму. Његова антиоксидативна својства смањују оксидативни стрес, чиме се потенцијално унапређује терапијски одговор, док улога као резервоара аминокиселина подржава регенеративне процесе. Ове особине чине испитивање интеракција са албумином веома значајним у истраживању, развоју и процени нових терапеутских агенаса.

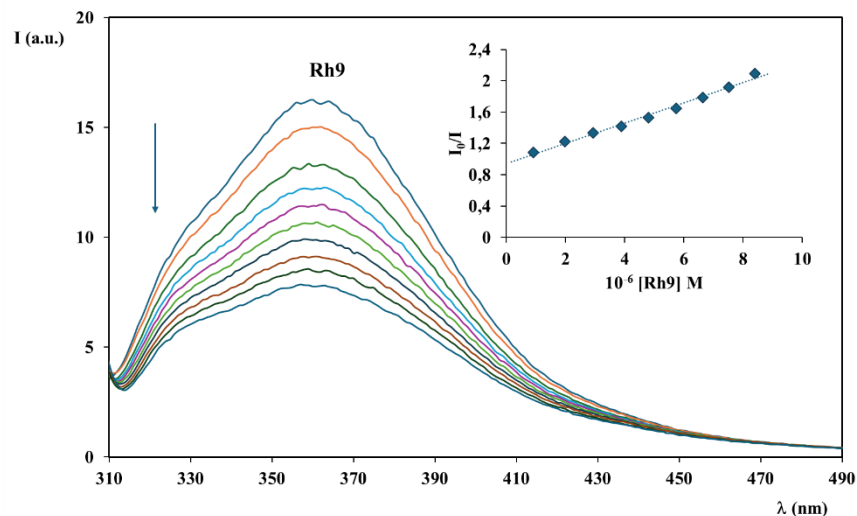
Хумани серум албумин (HSA) је протеин са комплексном тродимензионалном структуром, који се састоји од 585 аминокиселина организованих у три домена (I, II, III), при чему сваки домен садржи два поддомена (А и Б). Структуром доминира α -хеликсна конфигурација, која чини 67% молекула, док 17 дисулфидних мостова доприносе њеној стабилности. Говеђи серум албумин (BSA), са 75% структурне хомологије са HSA, представља модел погодан за истраживање интеракција. Основна разлика између ових протеина огледа се у броју триптофанских остатака—два у BSA (Trp-134 и Trp-213) и један у HSA (Trp-214). Комплекси метала се селективно везују за поддомене IIА и IIIА оба протеина, што је од значаја за проучавање њихових биохемијских својстава.^{323,324,326-329}

Флуоресцентна спектроскопија је високосензитивна техника која омогућава испитивање интеракција између серумских албумина и различитих супстанци, укључујући комплексе метала. Ова метода пружа кључне информације о механизму и месту везивања на протеину. Флуоресцентна титрација је стандардна техника за одређивање афинитета и специфичности интеракција, уз примену одређених маркера као што су еозин Y (за поддомен IIА) и ибупрофен (за поддомен IIIА) ради одређивања тачног места везивања.³²⁹⁻³³²

4.4.1. Испитивање интеракција комплекса Rh(III) са HSA и BSA

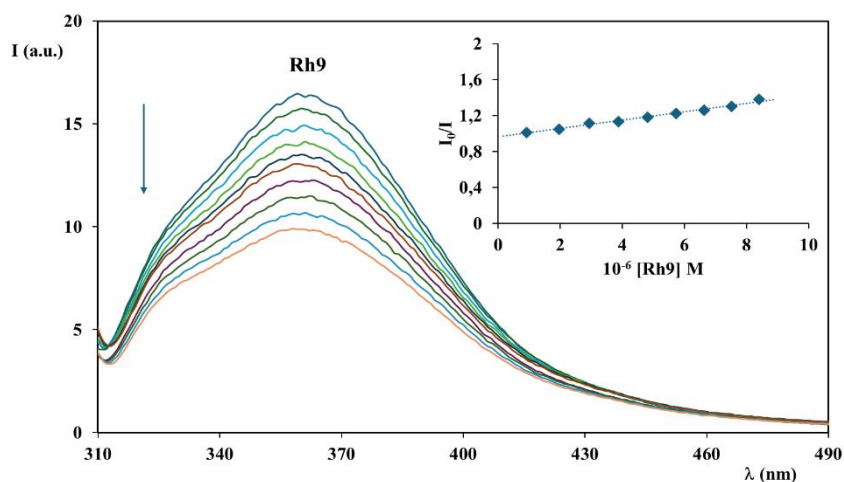
Флуориметријом су испитане интеракције комплекса **Rh1-10** са серумским албуминима (HSA и BSA) праћењем флуоресцентне емисије раствора албумина након екситације на 295 nm, при чему је емисија потицала искључиво од триптофанских остатака у протеинској структури. Концентрација раствора албумина била је константна (2 μ M), док су раствори комплекса додати у растућим концентрацијама до односа 5.^{270,274-277}

Додавањем комплекса **Rh1-3** и **Rh6-9** раствору HSA/BSA у растућим концентрацијама уочено је смањење интензитета флуоресценције, што указује на интеракцију између комплекса и протеина. На пример, емисиони спектри раствора HSA и BSA у присуству комплекса **Rh9** (Слике 4.22. и 4.23.) показују изражено смањење интензитета флуоресценције, што указује на могуће промене у терцијалној структури протеина, изазване интеракцијом са комплексом.³²⁸ Стерн-Волмерова константа (K_{sv}) која квантитативно описује интеракцију комплекса и протеина, израчуната је применом Стерн-Волмерове једначине (5) из Експерименталног дела 3.6., која приказује линеарну зависност између I_0/I и концентрације комплекса.



Слика 4.22. Емисиони спектар флуоресцентне титрације HSA раствора у присуству различитих концентрација комплекса **Rh9**. Концентрација HSA била је 2 μM , а стрелица указује на промене интензитета флуоресценције са повећањем концентрације **Rh9** комплекса у молском опсегу 0-10 μM , $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.

Уметнути график: Зависност односа I_0/I од концентрације комплекса **Rh9**.



Слика 4.23. Емисиони спектар флуоресцентне титрације BSA раствора у присуству различитих концентрација комплекса **Rh9**. Концентрација BSA била је 2 μM , а стрелица указује на промене интензитета флуоресценције са повећањем концентрације **Rh9** комплекса у молском опсегу 0-10 μM , $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.

Уметнути график: Зависност односа I_0/I од концентрације комплекса **Rh9**.

Додатаком комплекса **Rh4**, **Rh5** и **Rh10** раствору HSA/BSA забележен је пораст флуоресценције при таласној дужини од око 367 nm, што може указивати на то да сами комплекси флуоресцирају у том опсегу таласних дужина. Да би се ова појава детаљније истражила, снимљени су емисиони спектри комплекса различитих концентрација без присуства HSA/BSA. Корекцијом вредности флуоресценције раствора за флуоресценцију самих комплекса, конструисан је график који је омогућио израчунавање коригованих

вредности константи. Вредности K за интеракцију комплекса **Rh1-10** са серумским албумином, како самостално тако и у присуству маркера (еозин и ибупрофен), применом Хилове једначине (7) из Експерименталног дела 3.7, приказане су у Табели 4.14.^{270,274-277}

Табела 4.13. Константе (K) за интеракције испитиваних комплекса **Rh1-10** са HSA и BSA у одсуству и присуству маркера.

	BSA $K [M^{-1}]$	HSA $K [M^{-1}]$	HSA-Еозин $K [M^{-1}]$	HSA-Ибупрофен $K [M^{-1}]$
Rh1	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^4$	$(0,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(0,8 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh2	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh3	$(2,4 \pm 0,1) \times 10^4$	$(3,4 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,9 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh4	$(2,7 \pm 0,1) \times 10^4$	$(3,0 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,6 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh5	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,7 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh6	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^4$	$(3,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh7	$(3,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(3,9 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh8	$(11,6 \pm 0,1) \times 10^4$	$(13,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(8,9 \pm 0,1) \times 10^4$	$(12,5 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh9	$(4,3 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,7 \pm 0,1) \times 10^4$	$(3,2 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,4 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh10	$(5,7 \pm 0,1) \times 10^4$	$(6,6 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(5,5 \pm 0,1) \times 10^4$

На основу добијених вредности константи, K , за све испитиване комплексе **Rh1-10**, може се закључити да комплекси родијума добро интерагују са албуминима, при чему су константе везивања реда величине 10^4 . Добијене вредности константи за интеракцију са серумским албумином указују на нешто већи афинитет испитиваних комплекса за HSA у односу на BSA.

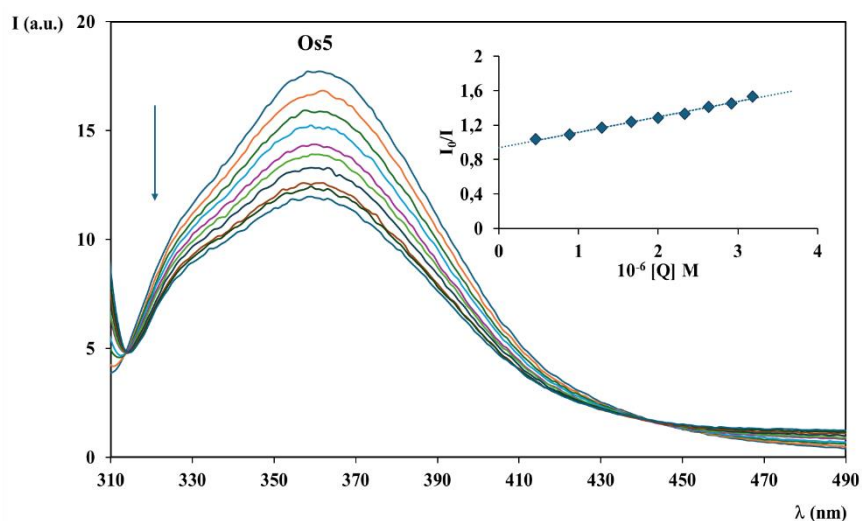
Комплекс са *dien*-ским лигандом (**Rh1**) показао је најнижу вредност константе за интеракцију са серумским албумином. Вредности константе су постепено расле од комплекса са бипиридинским лигандом (**Rh2**) до комплекса са камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7**), док је највиша вредност забележена код комплекса са тиазол-пиридинским лигандом (**Rh8**). Комплекси са тиазол-пиридинским лигандом (**Rh9**) и са камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина и два 1,2,4-триазола (**Rh10**) показали су ниже вредности константи од комплекса **Rh8**. Вредност константе за комплекс **Rh10** била је приближно три пута мања у односу на вредност добијену за комплекс **Rh8**.

Редослед реактивности испитиване серије Rh(III) комплекса према албуминима углавном је био сличан оном уоченом при интеракцијама са ДНК, али су забележена и одређена одступања. На пример, комплекс **Rh8** је показао већи афинитет за интеракцију са албумином него комплекс **Rh7**, који је показао највећи афинитет за интеракцију са ДНК. Слично томе, комплекс **Rh10** показао је већи афинитет за интеракцију са албумином у односу на ДНК. Ови резултати указују на могуће различите механизме везивања и селективност комплекса према различитим биомолекулима, што може бити од значаја за њихову потенцијалну биолошку примену.

4.4.2. Испитивање интеракција комплекса Os(II) са HSA и BSA

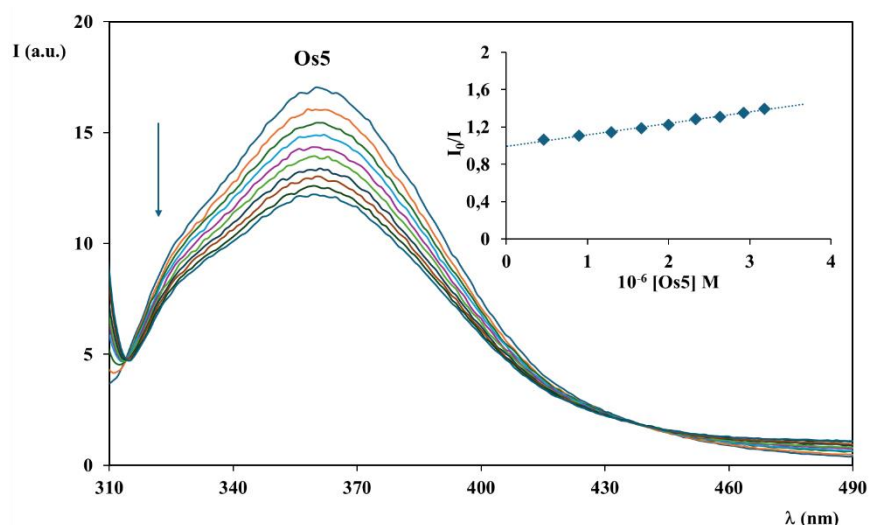
Интеракције комплекса **Os1-5** са серумским албуминима (HSA и BSA) испитане су применом флуориметрије.^{268,276} Раствори албумина су ексцитовани на таласној дужини од 295 nm, при чему је флуоресцентна емисија потицала од остатка триптофана. Концентрација раствора албумина била је константна (2 μM), док су раствори комплекса додати у растућим концентрацијама до односа 5. Додатак комплекса **Os1**, **Os4** и **Os5** у раствор HSA довео је до постепеног смањења интензитета флуоресценције, што указује на интеракцију између комплекса и албумина. Емисиони спектри раствора HSA и BSA у присуству комплекса **Os5** (Слике 4.24. и 4.25.) показују изражено смањење интензитета флуоресценције, што указује на могуће промене у терцијарној структури протеина, изазване интеракцијом са комплексом. Смањење интензитета флуоресценције приписује се променама у терцијарној структури протеина, највероватније изазваним модификацијама у микросредини триптофанских остатака након везивања комплекса.³²⁸

Додатак комплекса **Os2** и **Os3** раствору HSA/BSA довело је до пораста флуоресценције при таласној дужини око 360 nm, што указује на то да ови комплекси сами по себи флуоресцирају у том спектралном опсегу. Исто запажање је уочено и код комплекса родијума са истим лигандима. Корекцијом измерених вредности флуоресценције раствора албумина за флуоресценцију самих комплекса конструисани су графици који су омогућили израчунавање Стерн-Волмерових константи (K_{sv}) применом Стерн-Волмерове једначине (5) из Експерименталног дела 3.6. Вредности Стерн-Волмерових константи за интеракцију комплекса **Os1-5** са серумским албуминима, како самостално тако и у присуству маркера (еозин и ибупрофен), приказане су у Табели 4.14.^{268,276}



Слика 4.24. Емисиони спектар флуоресцентне титрације HSA раствора у присуству различитих концентрација комплекса **Os5**. Концентрација HSA била је 2 μM , а стрелица указује на промене интензитета флуоресценције са повећањем концентрације **Os5** комплекса у молском опсегу 0-10 μM , $\lambda_{ex} = 295 \text{ nm}$.

Уметнути график: Зависност I_0/I од концентрације комплекса **Os5**.



Слика 4.25. Емисиони спектар флуоресцентне титрације BSA раствора у присуству различитих концентрација комплекса **Os5**. Концентрација BSA била је 2 μM , а стрелица указује на промене интензитета флуоресценције са повећањем концентрације **Os5** комплекса у молском опсегу 0-10 μM , $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.

Уметнути график: Зависност I_0/I од концентрације комплекса **Os5**.

Табела 4.14. Константе (K) за интеракције испитиваних комплекса **Os1-5** са HSA и BSA у одсуству и присуству маркера

	BSA $K [\text{M}^{-1}]$	HSA $K [\text{M}^{-1}]$	HSA-Еозин $K [\text{M}^{-1}]$	HSA-Ибупрофен $K [\text{M}^{-1}]$
Os1	$(4,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,6 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^4$	$(3,6 \pm 0,1) \times 10^4$
Os2	$(6,0 \pm 0,1) \times 10^4$	$(6,0 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,6 \pm 0,1) \times 10^4$
Os3	$(4,8 \pm 0,1) \times 10^4$	$(5,2 \pm 0,1) \times 10^4$	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^4$	$(3,7 \pm 0,1) \times 10^4$
Os4	$(6,8 \pm 0,1) \times 10^4$	$(7,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(6,4 \pm 0,1) \times 10^4$
Os5	$(4,2 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(2,6 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,1 \pm 0,1) \times 10^4$

На основу добијених вредности Стерн-Волмерових константи, K_{sv} , за све испитиване комплексе **Os1-5**, може се закључити да комплекси осмијума добро интерагују са албуминима, при чему су константе везивања реда величине 10^4 . Добијене вредности константи за интеракцију испитиваних комплекса са серумским албуминима указују на већи афинитет ка HSA у односу на BSA. Најнижа вредност константе у испитиваној серији је забележена код комплекса са терпиридинским лигандом (**Os1**), док је највиша код комплекса са тиазол-пиридинским лигандом (**Os4**).

Вредности се крећу у уском опсегу, при чему су комплекс са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os2**) и комплекс **Os4** показали више вредности константе у односу на комплексе са терпиридином (**Os1**), *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os3**) и тиазол-пиридинским лигандом (**Os5**). Комплекси осмијума су показали сличан редослед реактивности као при интеракцијама са ДНК, осим комплекса са тиазол-пиридинским лигандом (**Os4**), за који су добијене знатно више вредности константи

везивања. Ова појава је уочена и код аналогног комплекса родијума (**Rh8**) са истим лигандом.

Поређењем вредности константи комплекса осмијума са аналогним комплексима родијума, уочено је да генерално комплекси осмијума показују већи афинитет за серумске албумине. Изузетак представљају комплекси **Os4** и **Rh8**. Иако је **Os4** показао већу вредност константе у односу на остале комплексе осмијума, аналогни комплекс родијума **Rh8** показао је већи афинитет за интеракцију са албуминима.

4.4.3. Испитивање интеракција комплекса Rh(III) и Os(II) са HSA у присуству маркера

Место везивања испитиваних комплекса Rh(III) и Os(II) на молекулу HSA одређено је флуоресцентном титрацијом у присуству маркера. Еозин Y је коришћен као маркер за место I (субдомен IIА), а ибупрофен за место II (субдомен IIIА).³²⁹⁻³³² Екситација је извршена на таласној дужини од 295 nm, у опсегу емисије од 300-500 nm. HSA и маркери су додати у еквимоларним концентрацијама (2 μ M), док су раствори комплекса додати у растућим концентрацијама до односа 5. Код комплекса родијума и осмијума који су показали флуоресценцију у датом опсегу, промене у емисији комплекса са HSA, у одсуству и присуству маркера, праћене су након корекције вредности за флуоресценцију комплекса.^{268,270,274-277} Уколико се комплекс везује за исто место као и одговарајући маркер, долази до такмичења између комплекса и маркера за везивање, што доводи до значајних променама у вредности константе везивања. Резултати из Табела 4.20. и 4.21. показују да је на вредност константи највише утицало присуство маркера еозин Y, што указује да се комплекси родијума и осмијума преференцијално везују за место I на субдомену IIА. Предпоставља се да комплекси остварују везивање на месту I претежно хидрофобним интеракција, иако улогу водоничних веза, ван дер Валсових сила, електростатичких интеракција и стерних контаката није могуће у потпуности искључити. Међутим, благо смањење константи везивања у присуству ибупрофена указује на могућност делимичне интеракције комплекса са местом II. Докинг прорачуни су спроведени како би се потврдило да ли се комплекси везују за место I, као и да ли везивање ибупрофена за место II утиче на приступ комплекса месту I или указује на конкуренцију између комплекса и ибупрофена за исто везивно место.

4.4.4. Испитивање интеракција комплекса Rh(III) и Os(II) са HSA у присуству јонских течности

Флуориметријске титрације комплекса **Rh1-10** и **Os1-5** са HSA изведене су на собној температури и у присуству јонских течности, како би се испитао утицај јонских течности као косолвената на интеракције комплекса са HSA.^{268,270,274-277} Јонске течности су коришћене при припреми раствора комплекса, при чему је однос јонске течности и испитиваних комплекса био 2:1, осим за комплексе **Os1-3**, где је однос јонске течности и испитиваних комплекса био 1:1. Експерименти су праћени при константој концентрацији HSA (2 μ M), док је концентрација испитиваних комплекса постепено повећавана до моларног односа 5. Вредности K_{sv} за интеракцију комплекса Rh(III) и Os(II) са серумским албумином, HSA, како самостално тако и у присуству јонских течности (IL), приказане су у Табелама 4.15. и 4.16. За ова мерења коришћена је само једна јонска течност у присуству

које су забележене највише вредности константи током испитивања. Утврђено је да су IL1, IL2 и IL4, најоптималнији избор, на основу чињенице да су континуирано давале највише вредности константи при испитивањима ДНК интеракција. Тако, IL4 се користила као косолвент за комплекс **Rh1**, IL2 за комплексе **Rh2-5**, **Rh7** и **Rh10**, док су мерења за комплексе **Rh6**, **Rh8** и **Rh9** вршена у присуству IL1. Интеракције комплекса осмијума испитиване су у присуству IL2 за комплексе **Os1-3** и IL1 за комплексе **Os4** и **Os5**. Добијени резултати указују да јонске течности благо утичу на интеракције комплекса родијума и осмијума са HSA, при чему су константе везивања остале истог реда величине, али су показале тенденцију благог повећања.

Табела 4.15. Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) за интеракције комплекса **Rh1-10** са HSA у одсуству и присуству одређених јонских течности.

	DMF $K_{sv} [M^{-1}]$	IL1 $K_{sv} [M^{-1}]$	IL2 $K_{sv} [M^{-1}]$	IL4 $K_{sv} [M^{-1}]$
Rh1	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^4$	/	/	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^4$
Rh2	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^4$	/	$(3,5 \pm 0,1) \times 10^4$	/
Rh3	$(3,4 \pm 0,1) \times 10^4$	/	$(4,1 \pm 0,1) \times 10^4$	/
Rh4	$(3,0 \pm 0,1) \times 10^4$	/	$(3,7 \pm 0,1) \times 10^4$	/
Rh5	$(2,7 \pm 0,1) \times 10^4$	/	$(3,5 \pm 0,1) \times 10^4$	/
Rh6	$(3,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(4,6 \pm 0,1) \times 10^4$	/	/
Rh7	$(3,9 \pm 0,1) \times 10^4$	/	$(4,2 \pm 0,1) \times 10^4$	/
Rh8	$(13,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(14,3 \pm 0,1) \times 10^4$	/	/
Rh9	$(4,7 \pm 0,1) \times 10^4$	$(5,5 \pm 0,1) \times 10^4$	/	/
Rh10	$(6,6 \pm 0,1) \times 10^4$	/	$(6,9 \pm 0,1) \times 10^4$	/

Табела 4.16. Стерн-Волмерове константе (K_{sv}) за интеракције комплекса **Os1-5** са HSA у одсуству и присуству одређених јонских течности.

	DMF $K_{sv} [M^{-1}]$	IL1 $K_{sv} [M^{-1}]$	IL2 $K_{sv} [M^{-1}]$
Os1	$(4,6 \pm 0,1) \times 10^4$	/	$(5,2 \pm 0,1) \times 10^4$
Os2	$(6,0 \pm 0,1) \times 10^4$	/	$(6,7 \pm 0,1) \times 10^4$
Os3	$(5,2 \pm 0,1) \times 10^4$	/	$(5,8 \pm 0,1) \times 10^4$
Os4	$(7,1 \pm 0,1) \times 10^4$	$(7,9 \pm 0,1) \times 10^4$	/
Os5	$(4,5 \pm 0,1) \times 10^4$	$(5,2 \pm 0,1) \times 10^4$	/

Испитиване јонске течности показале су се као погодни косолвенти за комплексе родијума и осмијума. Иако није дошло до значајног повећања K_{sv} константи у поређењу са константама добијеним у органском растварачу (DMF), важно је истаћи да јонске течности нису негативно утицале на интеракције комплекса са HSA, нити су довеле до смањења вредности K_{sv} . Ова испитивања потврђују применљивост јонских течности као алтернативних косолвената комплекса метала као потенцијалних антитуморских агенаса.

4.4.5. FRET тест

Флуоресцентни резонантни пренос енергије (FRET) представља неструктивну спектроскопску методу која пружа информације о релативној оријентацији и удаљености између донорске (Trp 214, D) и акцепторске флуорофоре (комплекс, A). У складу са Ферстеровом теоријом, ефикасност преноса енергије између донора и акцептора (E), просечна удаљеност између њих (r) и критична удаљеност за 50% преноса енергије (R_0) израчунате су помоћу једначина (8,9) из Експерименталног дела 3.7.^{289,290} Резонантни пренос је ефикаснији када је спектрално преклапање између емисије донора и апсорпције акцептора велико. Ефекат спектралног преклапања између емисије донора и спектра апсорпције акцептора (J) израчунат је помоћу једначине (10) из Експерименталног дела 3.7.²⁹¹ Све израчунате вредности за испитиване комплексе приказане су у Табели 4.15.^{268,270,277}

Табела 4.15. FRET резултати између испитиваних комплекса и HSA.

Комплекс	J^a [nm^4/Mcm]	E^b	R_0^c [$\text{\AA}$]	r^d [$\text{\AA}$]
Rh6	$3,56 \times 10^9$	0,22	4,83	5,48
Rh7	$4,28 \times 10^9$	0,25	4,98	5,73
Rh10	$8,71 \times 10^9$	0,15	5,16	6,86
Os1	$8,28 \times 10^8$	0,25	3,49	4,21
Os2	$5,01 \times 10^9$	0,33	4,71	5,32
Os3	$2,02 \times 10^9$	0,27	4,05	4,76

^a Интеграл преклапања

^b Ефикасност преноса енергије

^c Ферстерово растојање на којој је ефикасност трансфера енергије 50%

^d Удаљеност D-A

Пошто се удаљености између донора и акцептора налазе у распону од 2 до 8 $\text{\AA}$ и добијена вредност r задовољава услов $0.5R_0 < r < 1.5R_0$, резултати указују на висок степен вероватноће да је пренос енергије између HSA и испитиваних комплекса изводљив и функционално значајан. Ови резултати указују на могућност стабилне и биолошки релевантне интеракције испитиваних комплекса са HSA, што потенцијално има значај у контексту њихове даље фармакокинетичке и терапијске примене.

4.5. ИСПИТИВАЊА ЛИПОФИЛНОСТИ КОМПЛЕКСА Rh(III)

Истраживања су показала да липофилност комплекса значајно утиче на њихову потенцијалну биолошку активност. Добро је познато да једињења са већом липофилношћу обично показују већи степен уласка у ћелије, чинећи их ефикаснијим као терапеутска средства.³³³ Коефицијент расподеле ($\log P$) између хидрофобног октанола и хидрофилне водене фазе представља кључни показатељ липофилности једињења и његове способности да продре кроз ћелијску мембрану. Клинички примењивана терапеутска средства,

укључујући комплексе метала, углавном имају $\log P$ вредности у опсегу од -0,4 до 5,6. Коефицијент расподеле ($\log P$) одређен је на основу једначине (11) из Експерименталног дела 3.8.

Сви испитивани комплекси родијума показују $\log P$ вредности које се налазе у оптималном распону липофилности од $0 \leq \log P \leq 0,90$. Комплекси са бипиридинским (**Rh2**), *bis*-пиразолилпиридинским (**Rh4**), камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7**) и камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина и са два 1,2,4-триазола (**Rh10**), показали су знатно веће $\log P$ вредности (0,64; 0,71; 0,87 и 0,73) у поређењу са осталим комплексима, што указује на њихову склоност према октанолној фази. Ова карактеристика комплекса **Rh2**, **Rh4**, **Rh7** и **Rh10** указује на то да би дати комплекси могли лакше пролазити кроз липидне мембране.

4.6. МЕТОДЕ КОМПЈУТЕРСКЕ ХЕМИЈЕ

Компјутерска хемија игра значајну улогу у истраживању и развоју комплекса метала са потенцијалним терапијским својствима. Она омогућава боље разумевање хемијских и биолошких карактеристика комплекса, неопходних за оптимизацију структуре и функције ових молекула. Применом савремених теоријских метода, попут DFT (теорија функционала густине) калкулација и молекуларног докинга, могуће је брже и прецизније анализирати интеракције и реактивност комплекса метала у биолошким системима.

DFT калкулације пружају вредне информације о електронској структури комплекса, омогућавајући проучавање њихове стабилности, енергетских нивоа и могућих реактивних путева. Овај приступ је посебно важан за разумевање механизма деловања комплекса метала, као и за идентификацију њихових кључних структурних елемената који доприносе биолошкој активности. Кроз DFT анализу могу се предвидети физичко-хемијске особине комплекса, као што су редокс потенцијали, диполни моменти и интермолекуларне интеракције.

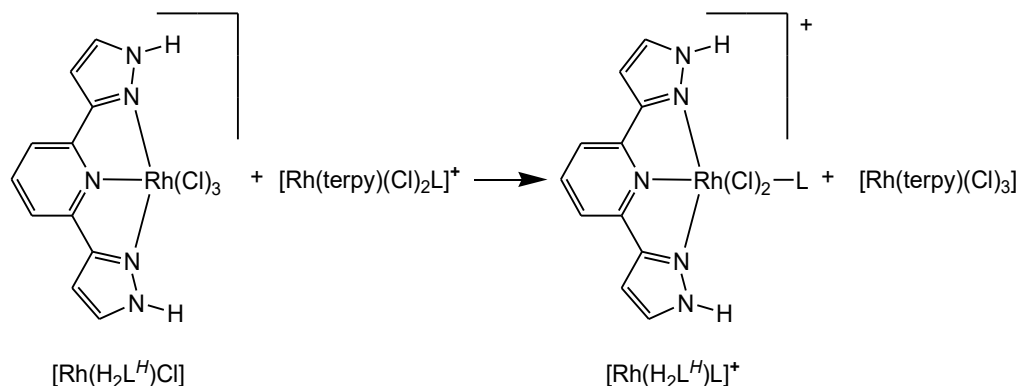
Докинг калкулације представљају једну од кључних техника у компјутерској хемији, пружајући увид у молекулске интеракције између комплекса метала и биолошких мета, као што су протеини, ензими или нуклеинске киселине. Ова метода омогућава предвиђање оријентације и афинитета комплекса у активном месту циљног молекула кроз симулацију енергетски најповољнијих конфигурација. На основу добијених резултата могуће је идентификовати потенцијалне биолошке ефекте, разјаснити механизме деловања и оптимизовати структуре за специфичне медицинске примене.

4.6.1. DFT метода: Термодинамичка анализа и релативна стабилност комплекса Rh(III)

Применом DFT метода одређена су термодинамичка својстава и релативне стабилности комплекса Rh(III), применом модел-једначина заснованих на лигандима 2,6-ди(1H-пиразол-3-ил)пиридину (H_2L^H) и 2,6-*bis*((4S,7R)-7,8,8-триметил-4,5,6,7-тетрахидро-1H-4,7-метаиндазол-3-ил)пиридину (H_2L^*). Прва модел-једначина приказана на Шеми 4.3. служи за процену стабилности комплекса са лигандом H_2L^* у односу на традиционалне

терпиридинске комплексе, док су друга и трећа модел-једначина приказане на Шемама 4.4. и 4.5. омогућиле испитивање координације монодентатних лиганата (Gua , $\text{S}(\text{CH}_3)_2$, HSCH_3) у односу на Cl^- јон.^{270,277}

Термодинамичка својства и релативна стабилност комплекса Rh(III) испитивана су поређењем лиганда $\text{H}_2\text{L}^{\text{H}}$ (2,6-ди(1Н-пиразол-3-ил)пиридин), који представља лиганд без ометајућих супституената и терпиридин лиганда. На Шеми 4.3. је приказана модел-једначина 1.



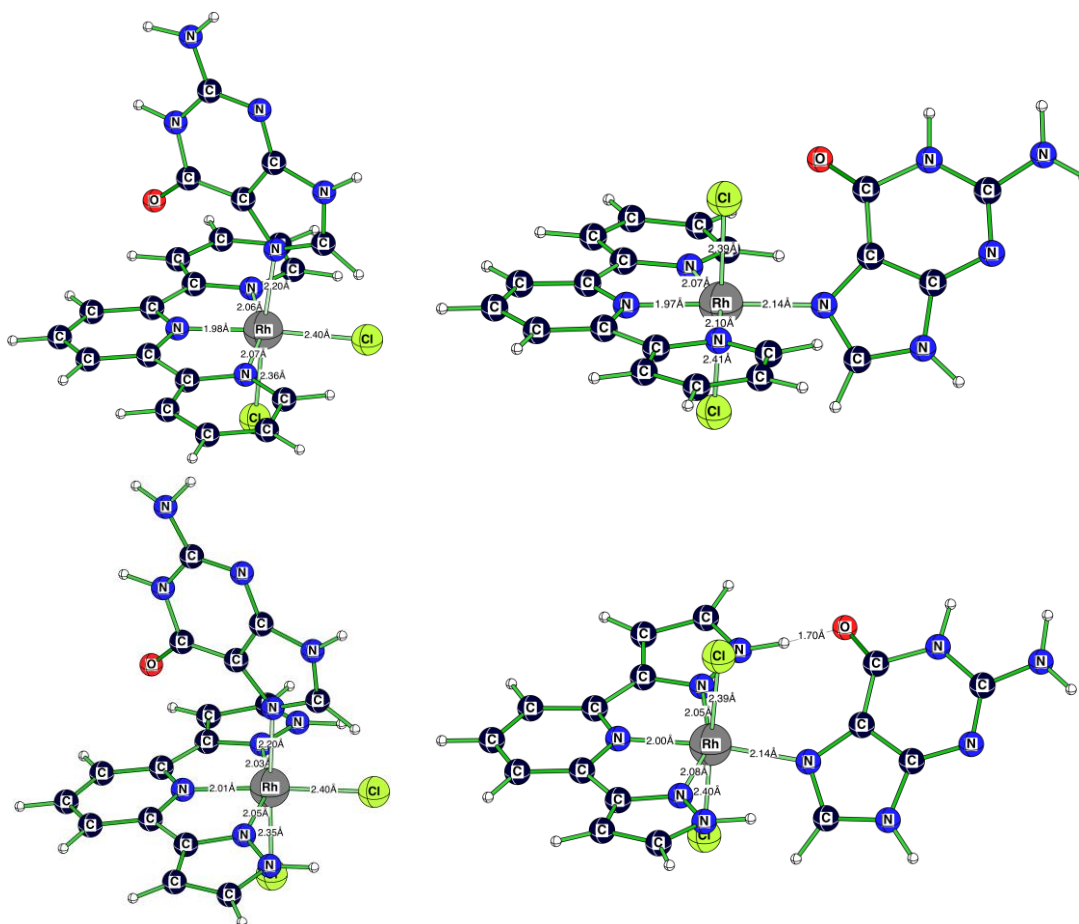
Шема 4.3. Модел-једначина 1 за одређивање (B3LYP/LANL2DZp) релативне стабилности $[\text{Rh}(\text{H}_2\text{L}^{\text{H}})(\text{Cl})_2\text{L}]^+$ у односу на $[\text{Rh}(\text{terpy})(\text{Cl})_2\text{L}]^+$ у присуству лиганата (L : Gua , $\text{S}(\text{CH}_3)_2$, HSCH_3).

Табела 4.16. Израчунате релативне стабилности [kcal mol^{-1}] за модел јендачину 1 B3LYP : $\text{RB3LYP/LANL2DZp} + \text{ZPE(B3LYP/LANL2DZp)}$ B3LYP(CPCM) : $\text{RB3LYP(CPCM)/LANL2DZp} // \text{RB3LYP/LANL2DZp} + \text{ZPE(B3LYP/LANL2DZp)}$.²⁷⁰

Лиганд (L)	<i>Cis</i>		<i>Trans</i>	
	B3LYP	B3LYP(CPCM)	B3LYP	B3LYP(CPCM)
HS-CH ₃	1,51	-0,72	2,78	-1,40
CH ₃ -S-CH ₃	-0,98	-0,98	2,40	-2,11
TU	1,37	-0,41	1,88	-0,95
Gua	1,23	-2,40	-3,94	-5,53
Imi	0,96	-0,09	3,70	-0,13

Како показују подаци у Табели 4.16. у гасној фази, без обзира на то да ли се истражују *trans*- или *cis*-комплекси, општи тренд указује на већу стабилност терпиридинских комплекса, уз два изузетка: диметил сулфид у *cis* комплексу и гуанин у *trans*- комплексу. Код *trans* комплекса са гуанином формира се водонична веза од 1,7 Å између CO-групе у гуанину и NH-групе у $\text{H}_2\text{L}^{\text{H}}$ лиганду, Слика 4.26. Ова умерена предност терпиридинских комплекса вероватно проистиче из нешто мањих димензија $\text{H}_2\text{L}^{\text{H}}$ лиганда у поређењу са терпиридином, што доводи до слабије стабилизације наелектрисања. Када се укључе ефекти растварача у прорачун, $\text{Rh}^{\text{III}}\text{-H}_2\text{L}^{\text{H}}$ комплекси постају термодинамички фаворизовани, при чему је *cis*-

$[\text{Rh}(\text{H}_2\text{L}^{\text{H}})(\text{Cl})_2\text{Gua}]^+$ стабилнији за више од 5 kcal/mol. Генерално, може се закључити да су оба типа комплекса приближно једнако стабилна.



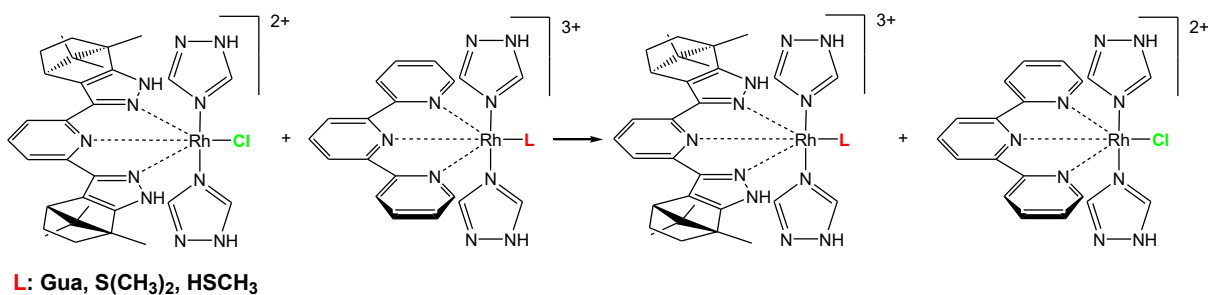
Слика 4.26. Израчунате (B3LYP/LANL2DZp) структуре *cis*- и *trans*- $[\text{Rh}(\text{terpy})(\text{Cl})_3\text{Gua}]^+$, као и за *cis*- и *trans*- $[\text{Rh}(\text{H}_2\text{L}^{\text{H}})(\text{Cl})_2\text{Gua}]^+$ комплекса.²⁷⁰

У свим испитиваним терпиридинским комплексима растојање између азота централног пиридинског дела и Rh^{III} центра је за ~1,5% мање него у $\text{H}_2\text{L}^{\text{H}}$ системима. С друге стране, N-Rh везе у екваторијалној равни, које су *cis*- у односу на централни пиридински прстен, код *terpy* лиганда су ~2% дуже. Тип тридентатног лиганда не утиче значајно на Rh-L растојање, али Rh-L координација је више под утицајем *trans*-ефекта пиридина или Cl^- , зависно од испитиваног изомера. Ови подаци указују да је просечна Rh-N координација у свим комплексима слична и да је $\text{H}_2\text{L}^{\text{H}}$ лиганд добра алтернатива терпиридинском лиганду.

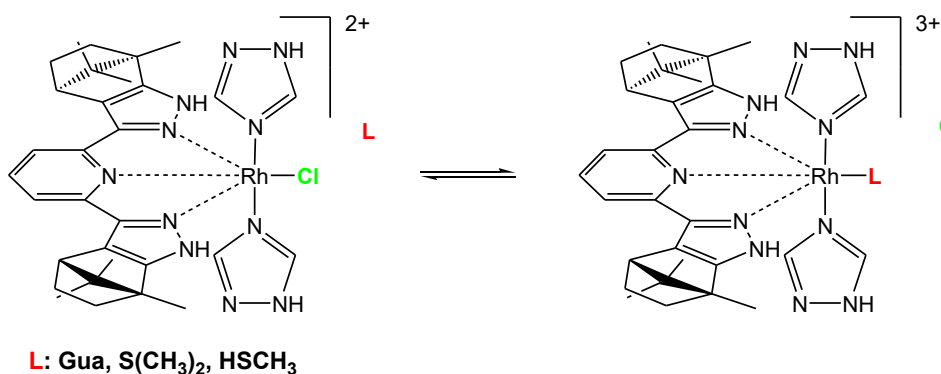
Октаедарски комплекси нуде три могућности: две еквивалентне позиције *cis*- у односу на централни пиридински део и једну *trans*- позицију. За процену термодинамичке равнотеже, упоређивана је стабилност *cis*- и *trans*- изомера модела комплекса $[\text{Rh}(\text{H}_2\text{L}^{\text{H}})(\text{Cl})_2\text{L}]^{n+}$ и $[\text{Rh}(\text{terpy})(\text{Cl})_2\text{L}]^{n+}$, где је *cis*- изомер у свим случајевима узет као референтна вредност.

Како је приказано на Слици 4.26., примена CPCM модела растварача смањује енергетски јаз између *cis*- и *trans*- изомера, што доводи до изједначавања њихове стабилности. Ипак, општи тренд, како у гасној фази тако и након примене модела растварача, фаворизује *trans*- изомере. Ово је вероватно зато што лиганд L има више слободног простора испред хелатног лиганда у *trans*- позицији у односу на *cis*- позицију, где је L изнад или испод хелатног прстена.

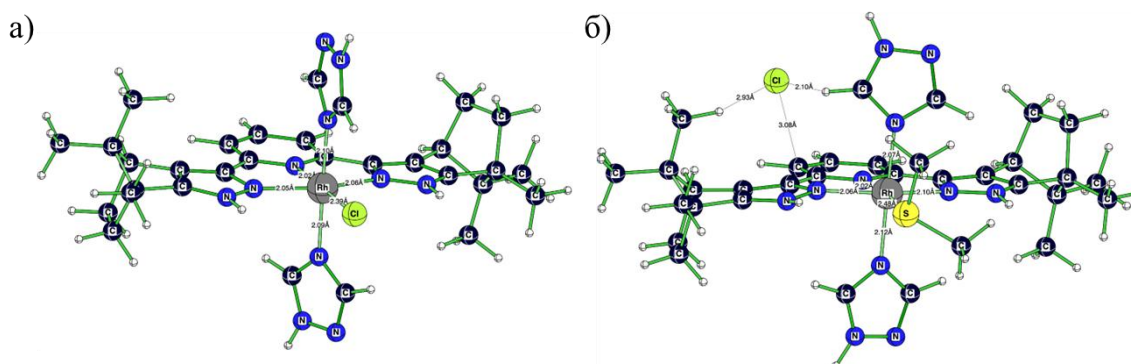
Термодинамичка својства и релативна стабилност комплекса Rh(III) испитана су конструкцијом две модел-једначине (Шеме 4.4. и 4.5.) засноване на лиганду 2,6-bis((4S,7R)-7,8,8-триметил-4,5,6,7-тетрахидро-1H-4,7-метаиндазол-3-ил)пиридин (H_2L^*). Модел-једначина 2 на Шеми 4.4. има за циљ процену релативне стабилности у поређењу са аналогним терпиридинским комплексима (Слика 4.27.a). Насупрот томе, модел-једначина 3 на Шеми 4.5. је дизајнирана да процени преференцијалну координацију монодентатних лиганда (Gua, $S(CH_3)_2$, $HSCH_3$) у поређењу са Cl^- јоном. За добијање увида у утицај растварача, у обе једначине примењен је уобичајени имплицитни CPCM модел.²⁷⁷



Шема 4.4. Модел-једначина 2 за одређивање релативне стабилности комплекса $[Rh(H_2L^*)(1,2,4\text{-triazole})_2Cl]^{2+}$ у односу на $[Rh(terpy)(1,2,4\text{-triazole})_2Cl]^{2+}$ комплекс.²⁷⁷



Шема 4.5. Модел-једначина 3 за одређивање релативне стабилности изомерног система $\{[Rh(H_2L^*)(1,2,4\text{-triazole})_2Cl]L\}^{2+}$ у односу на $\{[Rh(H_2L^*)(1,2,4\text{-triazole})_2L]Cl\}^{2+}$.²⁷⁷



Слика 4.27. Израчунате (B3LYP/LANL2DZp) структуре: а) $[\text{Rh}(\text{H}_2\text{L}^*)(1,2,4\text{-triazole})_2\text{Cl}]^{2+}$ и б) $\{[\text{Rh}(\text{H}_2\text{L}^*)(1,2,4\text{-triazole})_2(\text{SCH}_3)_2]\text{Cl}\}^{2+}$.²⁷⁷

Табела 4.17. Израчунате релативне стабилности [kcal mol^{-1}] за претходно приказане модел једначине B3LYP: RB3LYP/LANL2DZp + ZPE(B3LYP/LANL2DZp) B3LYP(CPCM): RB3LYP(CPCM)/LANL2DZp // RB3LYP/LANL2DZp + ZPE(B3LYP/LANL2DZp).²⁷⁷

Лиганд (L)	Модел-једначина 2		Модел-једначина 3	
	B3LYP	B3LYP(CPCM)	B3LYP	B3LYP(CPCM)
HS-CH ₃	-14.83	-5.09	48.47	24.57
CH ₃ -S-CH ₃	-14.12	-5.49	45.87	22.02
Gua	-15.51	-4.87	40.72	22.72

На основу модел-једначина 2 и 3 и као што показују резултати из Табеле 4.17. и Сlike 4.27., независно од тога да ли је поређење у гасној фази или применом CPCM модела, терпиридински комплекс родијума је генерално фаворизован ако је координован хлоридо лиганд, као и кад је неутрални лиганд L координован за $[\text{Rh}(\text{H}_2\text{L}^*)(1,2,4\text{-triazole})_2]^{3+}$ фрагмент. Применом CPCM модела енергија реакције модела за сва три лиганда L (Gua, S(CH₃)₂, HSCH₃) смањује се за 30%, што указује на значајно бољу стабилизацију H₂L* лиганда, који је једну трећину већи у односу на терпиридински лиганд. Већи број атома који нису водоник у H₂L* лиганду омогућава бољу стабилизацију укупног позитивног наелектрисања комплекса $[\text{Rh}(\text{H}_2\text{L}^*)(1,2,4\text{-triazole})_2\text{Cl}]^{2+}$ (Слика 4.27.a).

Модел-једначина 3 омогућава детаљнију анализу преференцијалног координационог модела Rh^{III} центра. Ова једначина (са и без CPCM модела) наглашава стабилизацију смањењем наелектрисања на металном центру. У свим случајевима, системи са координованим хлоридо лигандом $\{[\text{Rh}(\text{H}_2\text{L}^*)(1,2,4\text{-triazole})_2\text{Cl}]\text{L}\}^{2+}$ и неутралним лигандом у другој координационој сфери знатно су стабилнији од изомерних комплекса $\{[\text{Rh}(\text{H}_2\text{L}^*)(1,2,4\text{-triazole})_2\text{L}]\text{Cl}\}^{2+}$, где је неутрални лиганд L координован, а Cl⁻ се налази у другој координационој сфери (Слика 4.27.b). Иако се резултати DFT прорачуна могу наизглед разликовати од кинетичких експеримената, потребно је узети у обзир да експериментални услови укључују високе концентрације нуклеофила и водени растварач, који значајно стабилизује одлазак хлоридо лиганда кроз формирање водоничних веза.²⁷⁷

4.6.2. Симулације молекулског докинга

За испитивање интеракција испитиваних комплекса Rh(III) и Os(II) са ДНК и HSA коришћене су симулације молекуларног докинга. Предвиђен најбољи положај комплекса са најнижом енергијом коришћен је за најповољнију геометрију молекула унутар двоструког хеликса ДНК, као и за везивање унутар шупљине HSA. За процену афинитета везивања комплекса са ДНК/HSA коришћене су функције MolDock, Docking, Rerank и Hbond.³⁰²

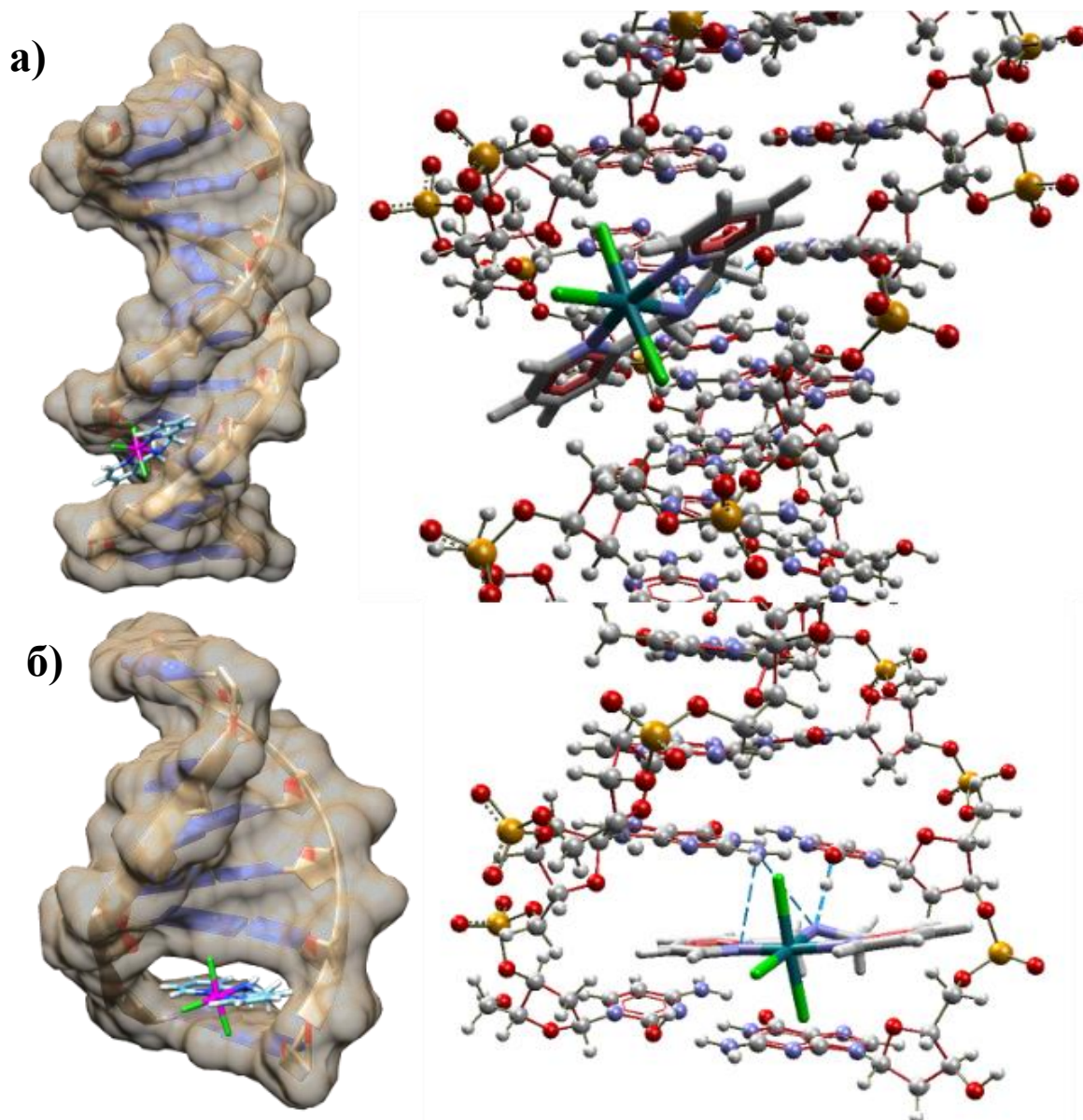
4.6.2.1. Симулације молекулског докинга за ДНК интеракције

За испитивање могућности интеркалације или везивања у мали жљеб ДНК испитиваних комплекса Rh(III) и Os(II), примењене су симулације молекуларног докинга. Комплекси су доковани у два различита фрагмента ДНК: (а) канонски Б-ДНК (PDB 1BNA), који представља кристалну структуру синтетичког ДНК додекамера, и (б) ДНК са интеркалационим отвором (PDB 1Z3F), која је кристална структура фрагмента од шест базних парова у комплексу са интеркалирајућим антитуморским агенсом, елиптицином.

Најбоље доковане структуре комплекса при интеракцији са ДНК молекулом за по један комплекс родијума и осмијума приказане су на Сликама 4.28. и 4.29, а најбоље рангирани положаји према коришћеним функцијама наведени су у Табелама 4.18. и 4.19.^{268,270,274-77}

Према резултатима добијеним применом Molegro Virtual Docker-a (на пример, MolDock вредности) приказаним у Табели 4.18, испитивани комплекси показују висок степен структурне комплементарности са ДНК молекулом. Резултати докинга указују да испитивани комплекси показују сличне афинитете за интеракцију са ДНК путем интеркалације или везивања за мали жљеб. Поређење резултата из Табеле 4.18. даје следећи редослед афинитета за ДНК везивање: **Rh10 > Rh8 > Rh9 > Rh7 > Rh6 > Rh3 > Rh2 > Rh1**. Комплекси који садрже планарне лиганде показују већу афинитетност према ДНК структурама. Чак и присуство стерно велике камфорне групе у испитиваним комплексима повољно утиче на интеракције са ДНК молекулом. Са порастом броја прстенова у комплексу дошло је до веће могућности за интеркалацију. Комплекс са *dien* лигандом (**Rh1**), који има најнижи афинитет према ДНК хеликсу према MolDock вредностима, најпогоднији је за формирање потенцијалних водоничних веза које могу додатно стабилизovati ДНК-комплекс систем. Поред тога, комплекси са камфорским лигандима показали су да остварују интеракције у малом жљебу Б-ДНК фрагмента, као и сличан потенцијал за интеркалацију у отвор створен интеркалирајућим лигандом елиптицином, са процењеним афинитетима везивања у микроларном опсегу за оба начина. Интеркалација комплекса са камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина и два 1,2,4-триазола (**Rh10**) у отвор створен елиптицином може бити остварена или преко L6 или 1,2,4-триазолне групе, при чему се интеркалација преко L6 лиганда показује нешто повољнијом.^{270,274-77}

Ови резултати су у складу са експерименталним UV-Vis и флуоресцентним студијама, додатно потврђујући антитуморски потенцијал испитиваних комплекса Rh(III).



Слика 4.28. Компјутерски модел доковања који илуструје интеракције између комплекса **Rh2** и ДНК: а) са канонским отвором (1BNA); б) са интеркалационим отвором (1Z3F) (испрекидане линије приказују могућност формирања водоничних веза).

Табела 4.18. Докинг вредности за за ДНК интеракције комплекса **Rh1-10**.^{270,274-77}

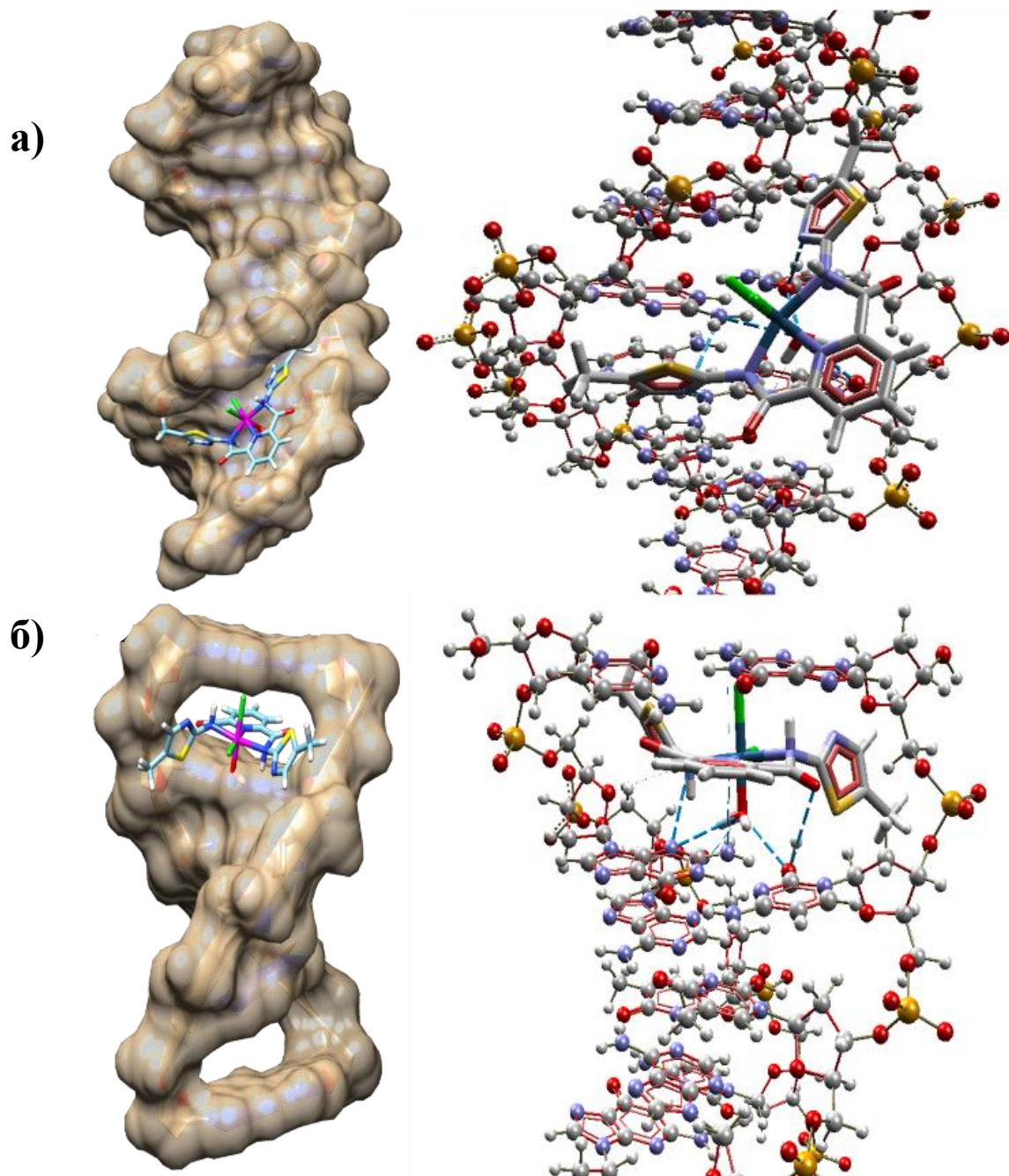
	PDB ID од ДНК	MolDock	Rerank	Docking
Rh1	1Z3F	-60,64	-34,61	-58,28
	1BNA	-70,75	-40,69	-68,71
Rh2	1Z3F	-90,86	-46,88	-86,01
	1BNA	-100,28	-52,57	-97,88
Rh3	1Z3F	-111,22	-55,79	-109,04
	1BNA	-107,43	-53,50	-105,27
Rh6	1Z3F	-117,36	-42,27	-115,73
	1BNA	-128,84	-55,36	-126,15
Rh7	1Z3F	-130,97	-56,13	-127,24
	1BNA	-151,21	-68,31	-148,95
Rh8	1Z3F	-164,15	-82,11	-159,87
	1BNA	-162,56	-82,32	-157,95
Rh9	1Z3F	-154,35	-75,64	-150,16
	1BNA	-154,21	-76,06	-151,23
Rh10	1Z3F	-180,363	-77,828	-177,239
	1BNA	-175,648	-74,556	-173,240
		-184,274	-80,091	-181,604

Табела 4.19. Докинг вредности за ДНК интеракције комплекса **Os2-5**.^{268,276}

	PDB ID од ДНК	MolDock	Rerank	Docking
Os2	1Z3F	-141.79	-72.54	-138.49
	1BNA	-141.03	-71.96	-139.01
Os4	1Z3F	-151.15	-74.15	-148.31
	1BNA	-149.37	-73.53	-140.61
Os5	1Z3F	-143.86	-67.22	-141.13
	1BNA	-141.47	-69.31	-138.36

Вредности молекуларног докинга из Табеле 4.19. показују да комплекс са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os2**) показује једнаку способност за интеракцију са ДНК путем интеркалације или везивања за мали жљеб, док комплекси са тиазол-пиридинским лигандима (**Os4** и **Os5**) показују већу склоност ка интеркалацији. Могућност везивања за мали жљеб и интеркалације **Os2** комплекса се приписује специфичној геометрији лиганда, која својом планарношћу омогућава да цео комплекс стане између базних парова ДНК као и у мали жљеб ДНК хеликса. Значајна разлика између ова два типа интеракције лежи у могућности појаве водоничних веза током интеркалације, захваљујући близини азотових атома лиганда донорима водоничних веза у базним паровима ДНК што изостаје у случају интеракције у малом жљебу. За комплексе **Os4** и **Os5** интеркалација у ДНК хеликс извршена је преко пиридинског дела инертног лиганда. Поред тога, комплекс/ДНК системи су

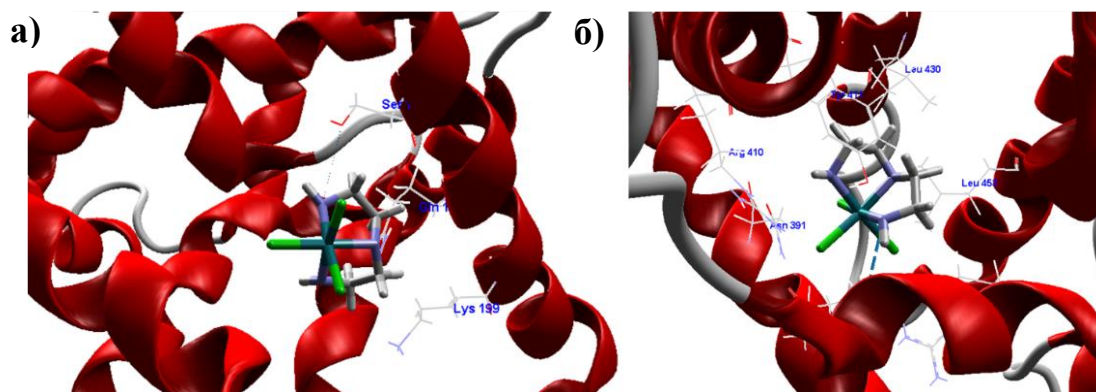
додатно стабилизовани формирањем водоничних веза између хетероатома инертних лиганата. Ови резултати су у складу са експериментално добијеним резултатима конкурентног везивања са етидијум-бромидом и Hoechst бојом.^{268,276}



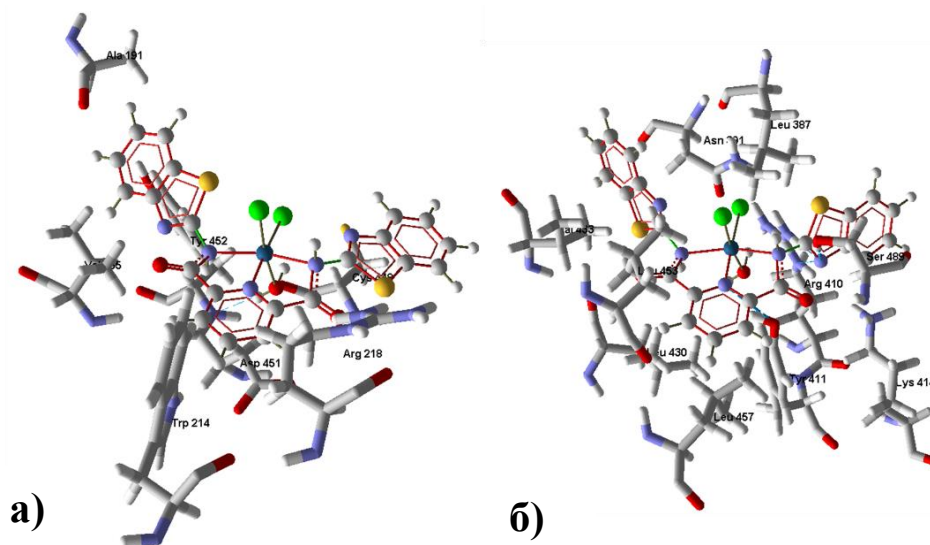
Слика 4.29. Компјутерски модел доковања који илуструје интеракције између комплекса **Os4** и ДНК: а) са канонским отвором (1BNA); б) са интеркалационим отвором (1Z3F) (правац цртаних линија приказује могућност формирања водоничних веза).

4.6.2.2. Симулације молекулског докинга за HSA интеракције

Симулација молекулског докинга урађена је ради испитивања интеракција комплекса Rh(III) и Os(II) са молекулом хуманог серумског албумина (HSA). Анализа је обухватила везивање ових комплекса у поддоменима IIА (место везивања I) и IIIА (место везивања II) HSA молекула. Добијене вредности докинг параметара за испитиване комплексе у поддоменима IIА и IIIА приказане су у Табелама 4.20 и 4.21. Најповољније докинг структуре комплекса приказане су на Сликама 4.30. и 4.31. Изабрани аминокиселински остаци (изабрани применом енергетског прага од 0.625) приказани су као модели у облику штапова (водоничне везе су приказане плавим испрекиданим линијама).^{268,270,274-77}



Слика 4.30. Најбоље доковане структуре комплекса **Rh1** при интеракцији са HSA молекулом према вредностима водоничних веза: а) Комплекс у поддомену IIА HSA протеина, б) Комплекс у поддомену IIIА HSA протеина.



Слика 4.31. Најбоље доковане структуре комплекса **Os5** при интеракцији са HSA молекулом према вредностима водоничних веза: а) Комплекс у поддомену IIА HSA протеина, б) Комплекс у поддомену IIIА HSA протеина.

Табела 4.18. Докинг вредности за комплексе **Rh1-10** доковане у везивна места **IIA** и **IIIA** **HSA** протеина.^{270,274-77}

	Протеин HSA	MolDock	Rerank	Hbond	Docking	Аминокиселински остаци ^{б,ц}
Rh1 ^{а,б}	IIA	-66.47	-48.51	-0.25	-63.32	Lys-199, Gln-196, Ser-192(H)
	IIIA	-47.63	-34.18	-2.46	-48.28	Ser-489(H), Asn-391, Arg-410, Arg-485, Leu-387, Tyr-411(H), Leu-430, Leu-453
Rh2 ^{а,б}	IIA	-91.13	-62.59	-0.17	-88.59	Ser-192, Lys-195(H), Glu-153, Glu-292, Arg-257, Tyr-150, His-242
	IIIA	-58.47	-46.63	-0.26	-56.68	Tyr-411(H), Leu-457, Arg-485, Leu-387, Leu-453, Asn-391, Val-433, Phe-403, Arg-410
Rh3 ^{а,б}	IIA	-91.13	-62.48	0	-88.62	Ile-190, Ile-264, Ala-291, Leu-238, Leu-219
	IIIA	-57.46	-52.16	0	-54.51	Leu-407, Phe-403, Leu-387, Asn-391, Leu-453, Val-433, Ile-388, Arg-485, Tyr-411
Rh7 ^{а,б}	IIA	-132.92	-109.66	-1.29	-131.05	Lys-444(H), Pro-339, Gln-221, Arg-218
	IIIA	-121.96	-57.52	0	-106.02	Glu-383, Arg-410, Ser-489, Lys-414, Glu-492
Rh8 ^а	IIA	-153.69	-119.29	-0.59	-123.33	Ser-192, Leu-219, Arg-257,
Rh8 ^б	IIA	-141.15	-117.62	-1.31	-115.27	Ala-291, Tyr-150, His-242, Lys-199, Lys-195(H)
Rh8 ^{а,б}	IIIA	-162.16	-106.12	-1.85	-150.81	Ala-449, Phe-403, Asn-391, Leu-407, Tyr-411(H), Ser-489(H), Leu-457, Leu-453, Val-433
Rh9 ^а	IIA	-141.04	-103.56	-0.23	-140.36	Val-455, Asp-451, Cys-448,
Rh9 ^б	IIA	-133.52	-46.61	-0.96	-133.07	Pro-447, Arg-218(H), Arg-222(H), Trp-214, Leu-219
Rh9 ^а	IIIA	-157.52	-117.16	-0.71	-165.01	Tyr-477(H), Asn-391, Leu-457, Leu-430, Leu-453, Val-433,
	IIIA	-147.67	-105.11	-3.18	-156.23	Arg-410(H), Leu-387(H), Ser-489(H)
Rh10 ^{а,б}	IIA	-199.312	-91.379	-5.562	-177.327	/
	IIIA	-151.107	-84.835	-15.722	-145.693	

^а Најповољније по MolDock функцији.

^б Најповољније по Hbond функцији.

^ц (H) означава присуство водоничне везе између аминокиселинског остатка и комплекса.

Табела 4.19. Докинг вредности за комплексе **Os1-5** доковане у везивна места ПА и ША HSA протеина.^{268,276}

	Протеин HSA	MolDock	Rerank	Hbond	Docking	Интеракције са аминокиселинским остацима ^{б,ц}
Os2^а	ПА	-123.94	-74.59	0	-121.88	Phe-206, Trp-214, Ala-213, Arg-209
Os2^б	ПА	-115.34	-72.65	-0.14	-166.69	
Os2^а	ША	-97.31	-51.13	0	-87.69	Leu-391, Arg-485, Tyr-411, Phe-403, Asn-391, Ile-388
Os2^б	ША	-93.57	-50.16	-0.32	-81.17	
Os4^а	ПА	-146.41	-101.81	-1.93	-139.61	Arg-218(H), Tyr-452(H), Asp-451, Cys-448(H), Pro-447(H), Leu-198
Os4^б	ПА	-148.68	-118.89	-6.34	-130.85	
Os4^{а,б}	ША	-162.16	-106.12	-1.85	-150.81	Ala-449, Phe-403, Asn-391, Leu-407, Tyr-411(H), Ser-489(H), Leu-457, Leu-453, Val-433
Os5^{а,б}	ПА	-139.98	-105.64	-0.82	-150.85	Arg-218(H), Tyr-452(H), Cys-448(H), Asp-451, Trp-214, Ala-191, Val-455
Os5^а	ША	-157.52	-117.16	-0.71	-165.01	Tyr-477(H), Asn-391, Leu-457, Leu-430, Leu-453, Val-433, Arg-410(H), Leu-387(H), Ser-489(H)
Os5^б	ША	-147.67	-105.11	-3.18	-156.23	

^а Најповољније по MolDock, Docking, и Rerank функцијама.

^б Најповољније по Hbond функцији.

Вредности молекулског докинга указују да се комплекси родијума успешно смештају у поддомене IIА и IIIА молекула HSA, са одређеним разликама у афинитетима и стабилности везивања.^{270,274-77} Према молекулским докинг симулацијама, поддомен IIА (место везивања I) је повољнији за смештај комплекса са *dien*-ским лигандом (**Rh1**), бипиридинским лигандом (**Rh2**), терпиридинским лигандом (**Rh3**), камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7**) и са камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина и два 1,2,4-триазола (**Rh10**). То је углавном последица веће шупљине поддомена IIА у односу на поддомен IIIА, што омогућава ефикасније смештање волуминозних октаедарских комплекса родијума. Афинитет комплекса према HSA прати тренд **Rh10** > **Rh7** > **Rh3** ≥ **Rh2** > **Rh1**, што указује на различите интеракције између комплекса и протеина.

Посебно је уочено да **Rh10** комплекс формира значајан број водоничних веза са аминокиселинским остацима HSA, што додатно стабилизује HSA-комплекс систем. Ове водоничне везе се сматрају једним од кључних фактора за успешно транспортовање лека кроз тело, јер обезбеђују чвршће и стабилније интеракције са протеином.

Комплекси са тиазол-пиридинским лигандима (**Rh8** и **Rh9**) показали су способност везивања за оба поддомена HSA, при чему се поддомен IIIА (место II) издваја као повољнији. Већи афинитет за везивање је уочен код комплекса **Rh8**. Формирање водоничних веза код оба комплекса додатно стабилизује HSA-комплекс систем.

Истраживањем је утврђено да се комплекси осмијума могу сместити у поддомене IIА и IIIА молекула HSA. Према резултатима докинг симулација поддомен IIА (место везивања I) је повољније место за смештај комплекса са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os2**), што је у складу са резултатима компетитивних експеримената и може се приписати мање стерно захтевном окружењу везујућег места IIА. На основу резултата симулације везивања, субдомен IIIА (место везивања II) је мало повољнији за комплексе са тиазол-пиридинским лигандима (**Os4** и **Os5**), што је у складу са експерименталним резултатима компетитивних мерења са HSA протеином. Афинитет за смештање комплекса у HSA молекулу показује општи тренд **Os4** > **Os5** за оба испитивана субдомена, и показују могућност формирања водоничних веза у оба субдоменска окружења, што додатно може стабилизovati HSA-комплекс систем и сматра се једним од значајних фактора за успешно транспортовање лека кроз тело.^{268,276}

4.7. БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА КОМПЛЕКСА Rh(III) и Os(II)

Испитивање биолошке активности у претклиничким испитивањима, са фокусом на одређивање *in vitro* цитотоксичности и редокс статуса ћелија, представља важан корак при процени потенцијала комплекса као ефикасних терапијских средстава у онкологији. Одређивање цитотоксичности врши се применом МТТ теста, методом која омогућава мерење метаболичке активности ћелија кроз њихову способност да редукују тетразолијумске соли у нерастворљиви формазан. Количина формираног формазана је директно пропорционална броју живих (метаболички активних) ћелија, чиме се обезбеђује поуздана и квантитативна анализа цитотоксичности испитиваних комплекса. Поред тога, анализа редокс статуса пружа детаљан увид у механизме деловања комплекса, нарочито у контексту њиховог утицаја на ниво реактивних кисеоничних врста (Reactive Oxygen Species - ROS). Повећана продукција ROS може довести до оксидативног оштећења ДНК, протеина и липида, што у крајњем исходу доводи до апоптозе или

некрозе туморских ћелија. С обзиром на то да редокс стрес игра кључну улогу у апоптози, регулацији пролиферације и ћелијском одговору на терапију, ова анализа је од изузетног значаја. Комбинацијом ових анализа може се утврдити степен цитотоксичности комплекса и одредити начин на који испитивани комплекси остварују своје биолошко дејство, укључујући њихову способност да поремете редокс равнотежу у туморским ћелијама.

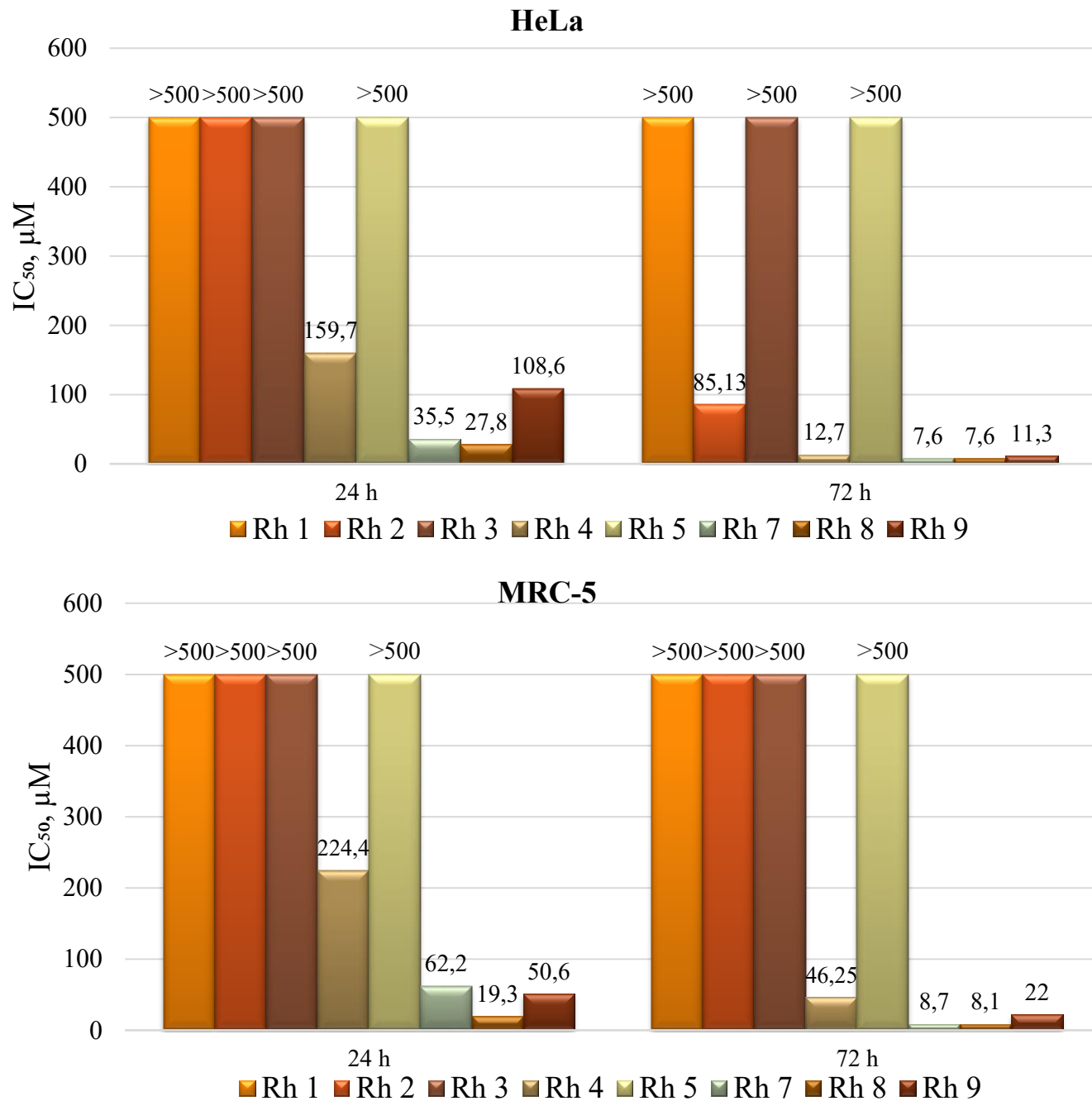
4.7.1. *In vitro* цитотоксична активност (MTT тест)

Испитана је цитотоксична активност комплекса **Rh1-10** и **Os1-5** према ћелијским линијама тумора дебелог црева (HCT-116), тумора грлића материце (HeLa), колоректалног тумора (SW-480) и нормалних фибробласта плућа (MRC-5) користећи *in vitro* методе, укључујући стандардизовани MTT тест за процену ћелијске виталности, при чему је полумаксимална инхибиторна концентрација (IC_{50}) коришћена као мерило њихове активности.^{268,270,274-77}

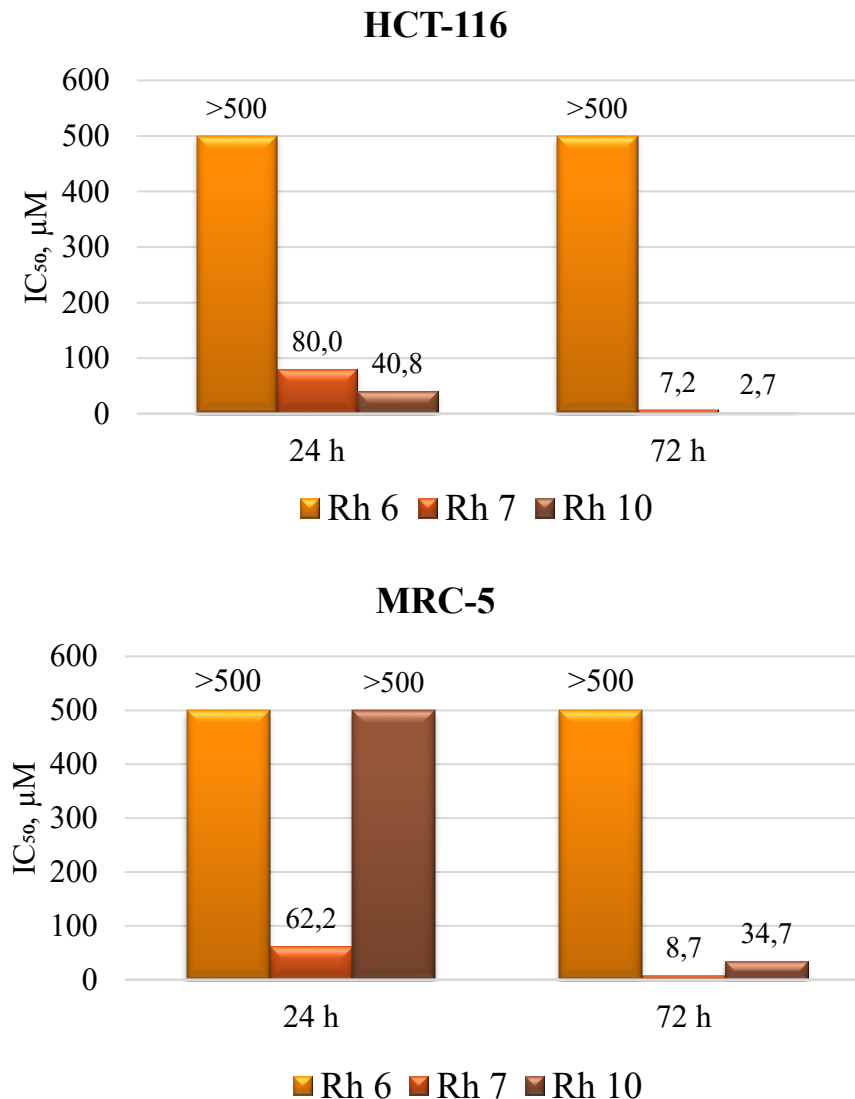
4.7.1.1. *In vitro* цитотоксична активност комплекса Rh(III)

Испитивани комплекси **Rh1-10** показали су различите цитотоксичне профиле према испитиваним ћелијским линијама, Слике 4.32. и 4.33. и Табела 4.20.^{270,274-77} Према HeLa ћелијској линији комплекси са *dien*-ским лигандом (**Rh1**), терпиридинским лигандом (**Rh3**) и са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Rh5**) и комплекс са лигандом камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh6**) нису испољили значајну цитотоксичност под испитиваним условима. При третману овим комплексима IC_{50} вредности су биле веће од 500 μM како за HeLa тако и за MRC-5 ћелијске линије. Комплекс са бипиридинским лигандом (**Rh2**) показао је значајну цитотоксичност према HeLa ћелијама ($IC_{50} = 85,13 \mu M$ након 72 сата од третмана), док је утицај на MRC-5 ћелије био знатно слабији, што указује на селективност према туморским ћелијама. С друге стране, комплекси са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Rh4**), комплекс са лигандом камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7**) и са тиазол-пиридинским лигандима (**Rh8** и **Rh9**) показали су снажну цитотоксичност на обе испитиване ћелијске линије, HeLa и MRC-5, али без селективности према туморским ћелијама.

Према HCT-116 ћелијској линији испитана је активност комплекса са терпиридинским (**Rh3**), камфор дериватима *bis*-пиразолилпиридина (**Rh6** и **Rh7**) и са камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина и два 1,2,4-триазола (**Rh10**), као и њихових одговарајућих лиганда. Комплекси **Rh3** и **Rh6** нису показали цитотоксичност под испитиваним условима. Комплекс **Rh7** испољио је најизраженију цитотоксичност, са IC_{50} вредностима од 80,01 μM након 24 сата и 7,26 μM након 72 сата, при чему је уочена зависност од концентрације и времена. Комплекс **Rh10** показао је значајну цитотоксичност зависну од концентрације и времена, али уз уочену селективност према туморским ћелијама. На линији HCT-116, IC_{50} вредност за **Rh10** износила је 2,7 μM након 72 сата од третмана, док је за MRC-5 ћелије износила 34,7 μM . Ова селективна цитотоксичност према туморским ћелијама, уз минималан ефекат на здраве ћелије након 24 сата ($IC_{50} > 500 \mu M$), чини **Rh10** посебно перспективним за даљи развој циљаних антитуморских терапија. Лиганди L3, L6, L7 и 1,2,4-триазол који се налазе у овим комплексима, самостално нису испољили значајну цитотоксичност према испитиваним ћелијским линијама.



Слика 4.32. Поређење IC_{50} вредности комплекса родијума **Rh1-9** на HeLa и MRC-5 ћелијским линијама након 24 и 72 сата од третмана.



Слика 4.33. Поређење IC₅₀ вредности комплекса родијума **Rh6**, **Rh7** и **Rh10** на HCT-116 и MRC-5 ћелијским линијама након 24 и 72 сата од третмана.

Веома важан параметар утицаја лека на туморе је индекс селективности (SI), који представља однос IC₅₀ вредности код здравих MRC-5 ћелија према IC₅₀ вредностима код туморских ћелија. Комплекс с бипиридинским лигандом (**Rh2**) је показао већу селективност према HeLa ћелијама у поређењу са здравим MRC-5 ћелијама: SI_{72h}=5,87. Комплекси са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Rh4**), камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7**) и са тиазол-пиридинским лигандима (**Rh8** и **Rh9**) нису показали селективност према туморским ћелијама. Комплекс са камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина и два 1,2,4-триазола (**Rh10**) је такође показао већу селективност према HCT-116 ћелијама у поређењу са здравим MRC-5 ћелијама: SI_{24h}=104,16, а након 72 сата од третмана SI_{72h}=12,85.

Табела 4.20. Цитотоксични ефекти испитиваних комплекса родијума и лигананда након 24h и 72h од третмана.^{270,274-77}

	HeLa		HCT-116		MRC-5	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
Rh1	>500	>500	/	/	>500	>500
Rh2	>500	85,13	/	/	>500	>500
Rh3	>500	>500	/	/	>500	>500
Rh4	159,69	12,68	/	/	224,38	46,25
Rh5	>500	>500	>500	>500	>500	>500
Rh6	/	/	>500	>500	>500	>500
Rh7	35,53	7,59	62,17	8,69	80,01	7,26
Rh8	27,8	7,6	/	/	19,3	8,1
Rh9	108,6	11,3	/	/	50,6	22
Rh10	/	/	>500	34,7	40,8	2,7
L3	/	/	/	/	16,32	0,09
L6	/	/	/	/	267,28	224,81
L7	/	/	/	/	>500	215,83
L10	/	/	474.8	>500	>500	>500

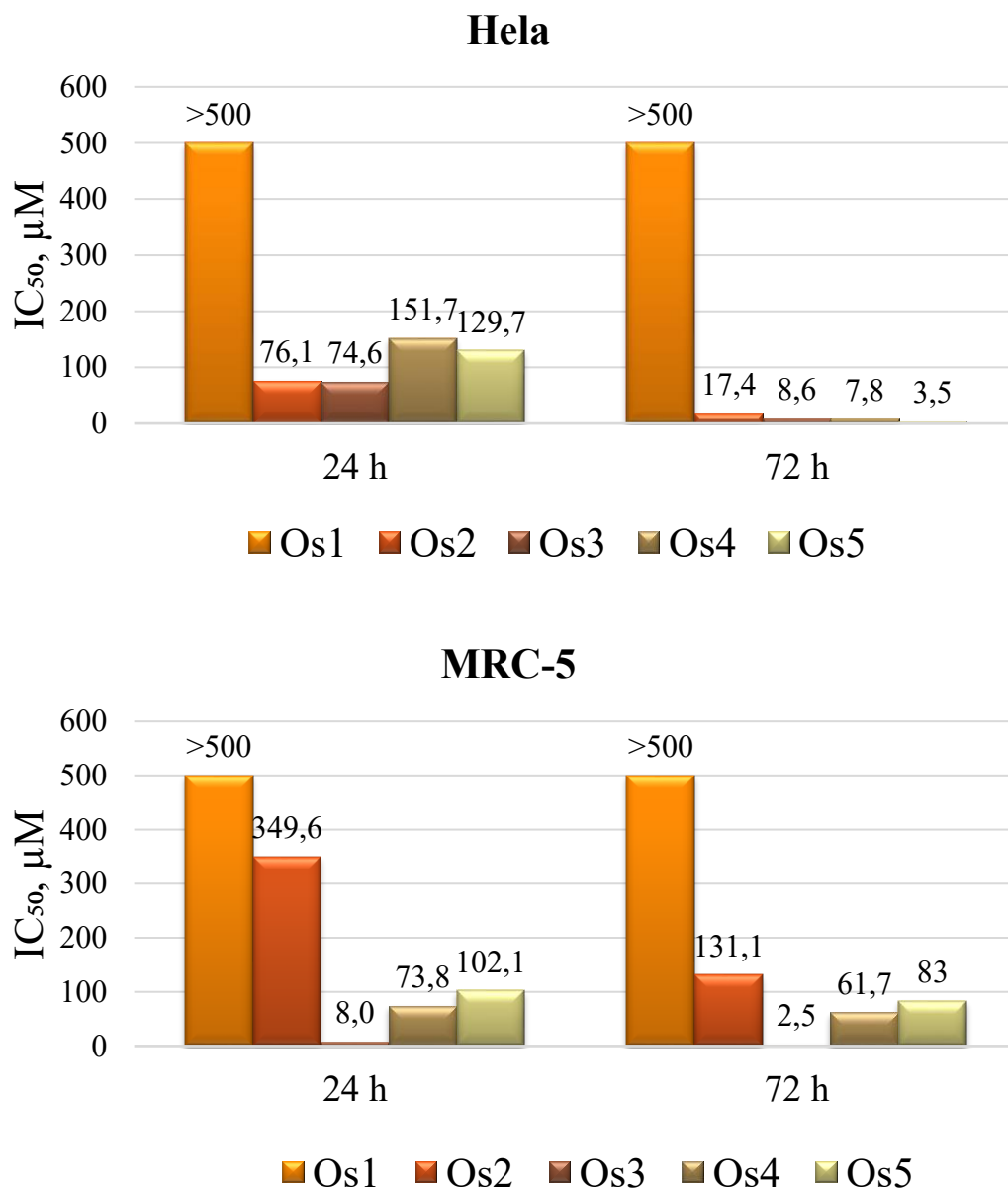
Од испитиваних комплекса родијума посебно су се истакли комплекси **Rh2** и **Rh10**, који су показали значајану цитотоксичну активност уз селективност према туморским ћелијама. Комплекси **Rh4** и **Rh7-9** показали су значајану цитотоксичну активност, али нису показали довољну селективност.

4.7.1.2. *In vitro* цитотоксична активност комплекса Os(II)

Испитивани комплекси **Os1-5** показали су различите цитотоксичне профиле према испитиваним ћелијским линијама, Слика 4.34. и Табела 4.21. Цитотоксичност комплекса **Os1-3** испитана је на HeLa, HCT116, SW-480 и MRC-5 ћелијским линијама, док је за комплексе **Os4** и **Os5** испитана на HeLa и MRC-5 ћелијским линијама.^{268,276}

Према HeLa ћелијским линијама комплекс са терпиридинским комплексом (**Os1**) није испољио цитотоксичност, док су комплекси са *bis*-пиразолилпиридинским лигандима (**Os2** и **Os3**) показали значајану цитотоксичну активност, уз слабији утицај на MRC-5 ћелије, што указује на њихову селективност према туморским ћелијама. Насупрот томе, **Os1** није био токсичан за MRC-5 ћелије. Комплекси **Os2** и **Os3** били су активнији од комплекса са тиазол-пиридинским лигандима (**Os4** и **Os5**), нарочито 24 сата након третмана. Комплекс **Os3** је испољио највећу активност према HeLa ћелијама међу испитиваним комплексима након 24 сата, али је након 72 сата његов ефекат био сличан као код комплекса **Os5**. При томе, комплекс **Os5** је показао већу селективност према туморским ћелијама. Комплекси **Os4** и **Os5** испољили су сличну цитотоксичну активност према HeLa ћелијској линији, нарочито 72 сата након третмана.

Цитотоксичност комплекса **Os1-3** додатно је испитана и према две колоректалне ћелијске линије, HCT-116 и SW-480. Комплекс **Os1** је показао значајну цитотоксичност, са израженијим дејством на SW-480 ћелије у поређењу са HCT-116. Комплекс **Os2** је показивао концентрационо и временски зависну цитотоксичност, са најизраженијим ефектом на SW-480, док су HCT-116 ћелије показале већу отпорност, нарочито након 24 сата. Комплекс **Os3** је од испитиваних комплекса испољио највећи цитотоксични ефекат према SW-480 ћелијама, који је био концентрационо и временски зависан, док је према HCT-116 ћелијама показао умерену активност.



Слика 4.34. Поређење IC₅₀ вредности комплекса **Os1-3** на HeLa и MRC-5 ћелијским линијама након 24 и 72 сата од третмана.

Табела 4.21. Цитотоксични ефекти (IC_{50} вредности) испитиваних комплекса осмијума након 24h и 72h од третмана.^{268,276}

	HeLa		HCT-116		SW-480		MRC-5	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
Os1	>500	>500	175,82	283,88	256,55	47,17	>500	>500
Os2	76,13	17,4	121,56	216,42	143,55	33,75	349,59	131,08
Os3	7,97	2,47	99,07	191,63	6,99	2,29	74,6	8,56
Os4	151,7	7,8	/	/	/	/	73,8	61,7
Os5	129,7	3,5	/	/	/	/	102,1	83

Комплекс са терпиридинским лигандом (**Os1**) показао је умерену селективност према HCT-116 ћелијама ($SI_{24h} = 2,84$, $SI_{72h} = 1,76$), док је селективност према SW-480 ћелијама била најизраженија ($SI_{24h} = 1,95$, $SI_{72h} = 10,60$). Комплекс са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os2**) био је најефикаснији према HeLa ћелијама, са индексом селективности од $SI_{24h} = 4,59$ и $SI_{72h} = 7,53$ у односу на здраве MRC-5 ћелије. С друге стране, комплекс са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os3**) није показао специфичну селективност према туморским ћелијама са SI вредностима од 0.01 до 1.08, у зависности од врсте туморских ћелија. Комплекси са тиазол-пиридинским лигандима (**Os4** и **Os5**) нису показали селективност према HeLa ћелијама у поређењу са MRC-5 ћелијама. Од испитиваних комплекса родијума, посебно су се истакли комплекси **Os1** и **Os2**, који су показали значајан цитотоксични ефекат уз селективност према туморским ћелијама.

Поређењем структурно аналогних комплекса осмијума и родијума уочене су одређене разлике у активности. Комплекс са терпиридинским лигандом (**Os1**) као и аналогни комплекс родијума (**Rh3**), нису показали цитотоксичну активност према HeLa и MRC-5 ћелијским линијама. Међутим, комплекси осмијума са *bis*-пиразолилпиридинским лигандима (**Os2** и **Os3**) су показали већу цитотоксичну активност према HeLa ћелијској линији од аналогних комплекса родијума (**Rh4** и **Rh5**). Комплекс **Os2** је показао већу активност и селективност од комплекса **Rh4**. Такође, комплекс **Os3** је показао највећу цитотоксичност према HeLa ћелијској линији у оквиру испитиване серије комплекса осмијума, док аналогни комплекс родијума, **Rh5**, није показао цитотоксичну активност. Комплекси са тиазол-пиридинским лигандима (**Os4** и **Os5**) показали су слабију цитотоксичну активност према HeLa ћелијској линији 24 сата након третмана у поређењу са аналогним комплексима родијума (**Rh8** и **Rh9**). Међутим, након 72 сата активност ових комплекса је била јача, али није примећена селективност у дејству као ни код комплекса родијума.

4.7.1.3. *In vitro* цитотоксична активност испитиваних комплекса у присуству јонских течности

In vitro цитотоксична активност синтетисаних комплекса испитана је и у присуству јонских течности, како би се одредио укупан ефекат ових система на ћелијску вијабилност. У првој фази истраживања, испитане су цитотоксичне особине свих дванаест јонских

течности (IL1-IL12), ради идентификације евентуалног цитотоксичног утицаја самих јонских течности на ћелије. Коришћењем константне концентрације од 100 μ M, одређени су кандидати са најнижом инхибиторном активношћу, погодни за даља испитивања. Међу тестираним јонским течностима посебно су се издвојиле IL1 и IL11 по релативно ниском утицају на вијабилност ћелија.

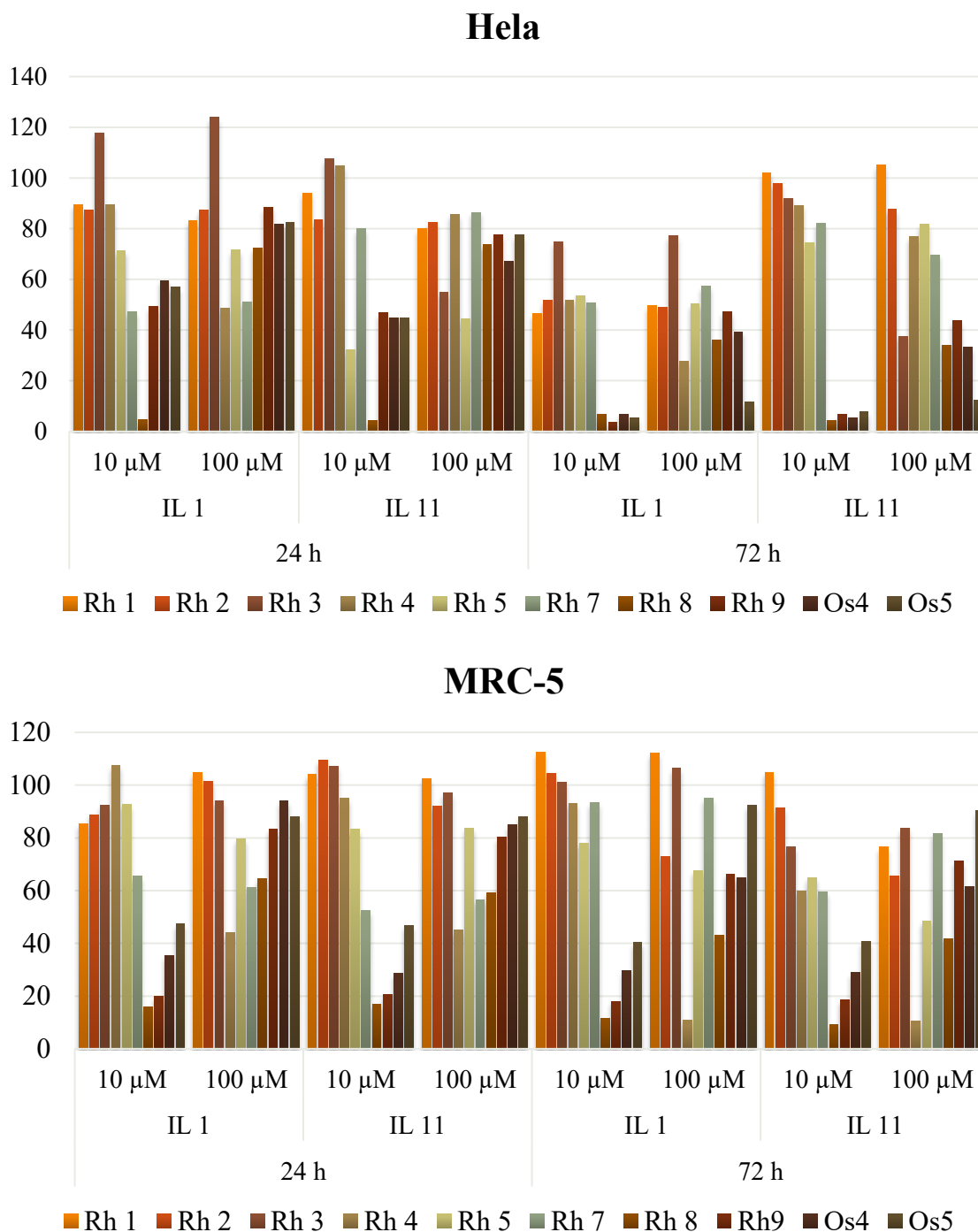
Избор јонских течности IL1 и IL11 није био заснован искључиво на њиховом повољном цитотоксичном профилу, већ су у разматрање узете и њихове хемијске карактеристике. Оваквим приступом обезбеђена је употреба јонских течности које, при испитиваној концентрацији, не испољавају значајну токсичност која би могла нарушити поузданост резултата, као и одабир оних чија би специфична својства могла допринети потенцијалном побољшању антитуморске активности комплекса.

На основу добијених резултата и анализе структуре може се претпоставити да ове јонске течности поседују особине које омогућавају синергистичко деловање са испитиваним комплексима, потенцијално утичући на њихову биорасположивост, стабилност или унос у ћелије, чиме се може повећати укупна терапијска ефикасност ових система.

Цитотоксичност комплекса са диенским (**Rh1**), бипиридинским (**Rh2**), терпиридинским (**Rh3**), камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7**) и тиазол-пиридинским лигандима (**Rh8**, **Rh9**, **Os4** и **Os5**) испитана је у присуству јонских течности IL1 и IL11, Слика 4.35.^{275,276}

Испитивани комплекси са диенским (**Rh1**), бипиридинским (**Rh2**), терпиридинским (**Rh3**), камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7**) и тиазол-пиридинским лигандима (**Rh8**, **Rh9**, **Os4** и **Os5**) показали су различите цитотоксичне профиле у зависности од присуства јонских течности IL1 и IL11. Самостално, ови комплекси су испољили цитотоксични ефекат на HeLa ћелијама, док је присуство јонских течности значајно утицало на њихову активност. Комплекс **Rh1** у присуству IL1 довео је до смањења вијабилности ћелија у односу на самосталну примену овог комплекса, поготово 72 сата након третмана. Код комплекса **Rh2**, присуство IL1 није значајно утицало на вијабилност ћелија, док је истовремена примена комплекса **Rh3** и **Rh7** са IL1 довела до њеног повећања. Присуство IL11 углавном није утицало на вијабилност, осим у случају комплекса **Rh2**, где је примећено смањење, што указује на потенцијално појачавање цитотоксичности.^{275,276}

Код MRC-5 ћелија, истовремена примена испитиваних комплекса са IL1 и IL11 у појединим случајевима довела је до повећане вијабилности у односу на самосталну примену комплекса родијума, што указује на могући заштитни ефекат. Утицај јонских течности на активност комплекса родијума разликовао се у зависности од структуре комплекса и ћелијске линије, при чему је у појединим случајевима уочен потенцијал за селективно дејство ка туморским ћелијама. Утицај IL1 и IL11 на цитотоксичну активност испитиваних комплекса сугерише да избор јонске течности може бити кључан у оптимизацији терапеутске ефикасности и селективности комплекса родијума и осмијума.^{275,276}



Слика 4.35. Поређење вредности валијабилности HeLa и MRC-5 ћелијских линија након 24 и 72 сата од третмана комплексима родијума **Rh1-7** у присуству јонских течности IL1 и IL11.

4.7.2. *In vitro* истраживање редокс статуса

Вијабилност ћелија, која представља важан показатељ ефикасности и токсичности лекова у претклиничким студијама, директно је повезана са очувањем редокс равнотеже у ћелијама. Поремећаји у овом осетљивом балансу, узроковани ксенобиотицима, укључујући и комплексе метала, често доводе до прекомерне продукције слободних радикала, као што су супероксид-анјони и нитрити. Овај процес иницира оксидативни стрес који узрокује оштећење ћелијских структура и, у крајњем исходу, ћелијску смрт.

Параметри редокс статуса служе као кључни индикатори општег стања ћелије, будући да је редокс равнотежа неопходна за нормално функционисање ћелија. У здравим и туморским ћелијама ова равнотежа се природно разликује, али свака промена, било спољним или унутрашњим утицајима, доводи до дисфункције са различитим биолошким последицама. Хемиотерапеутски агенси који садрже јон метала као централни атом комплекса посебно су ефикасни у нарушавању овог баланса. Они често изазивају значајно повећање концентрације реактивних кисеоничних врста (Reactive Oxygen Species - ROS) и реактивних азотних врста (Reactive Nitrogen Species - RNS), што доводи до оксидативног стреса и оштећења биомакромолекула, попут ДНК, липида и протеина.

У том контексту, разликовање ефеката на здраве и туморске ћелије је од изузетне важности. Док туморске ћелије, због већег базалног оксидативног стреса, показују већу осетљивост на даље повећање ROS и RNS, здраве ћелије углавном остају мање погођене. Ова селективност представља основ за развој ефикасних и циљаних терапијских приступа који повећавају цитотоксични ефекат на туморске ћелије уз минимално оштећење нормалних ткива.

4.7.2.1. *In vitro* истраживања редокс статуса комплекса Rh(III)

Модулација редокс статуса посредством испитиваних комплекса родијума са диенским (**Rh1**), бипиридинским (**Rh2**), терпиридинским (**Rh3**), *bis*-пиразолилпиридинским (**Rh4** и **Rh5**), камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7**), тиазол-пиридинским (**Rh8** и **Rh9**) и са камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина и два триазол лиганда (**Rh10**) пружа увиде у њихове механизме деловања као потенцијалних антитуморских агенаса.^{274,275,277} Три кључна редокс параметра: ниво супероксид-анјон радикала, ниво нитрита и садржај глутатиона (GSH), мерени су како би се утврдио оксидативни утицај ових комплекса на HeLa, HCT-116 и MRC-5 ћелијске линије.

Супероксид-анјон радикали ($O_2^{\cdot-}$). Садржај супероксид-анјон радикала је испитиван стандардизованом NBT методом.³⁰⁴ Овај параметар је важан за процену стања редокс статуса ћелије. Третман комплексима родијума, **Rh1-3** и **Rh7**, довео је до значајног повећања нивоа супероксид-анјон радикала у HeLa ћелијама, примарног индикатора оксидативног стреса, Слика 4.36. Ови радикали, који често представљају прекурсоре још реактивнијих и штетнијих врста, указују на покретање оксидативне каскаде која може довести до оштећења и смрти ћелија. У MRC-5 ћелијама примећено је мање изражено повећање $O_2^{\cdot-}$, што указује на различиту осетљивост ових ћелија на испитиване комплексе.

Комплекс **Rh4** довео је до значајног повећања нивоа супероксид-анјон радикала у HeLa ћелијама, док је код комплекса **Rh5** уочено мало мање повећање нивоа.

За комплекс **Rh10** испитиван је утицај лиганда и комплекса. У НСТ-116 ћелијама, лиганд није значајно променио ниво $O_2^{\cdot-}$, док је комплекс **Rh10** изазвао значајну продукцију $O_2^{\cdot-}$ у зависности од дозе и времена. Производња $O_2^{\cdot-}$ у НСТ-116 ћелијама била је много већа него у MRC-5 ћелијама. Лиганд је у MRC-5 ћелијама након 24 сата индуковао веома мало повећање $O_2^{\cdot-}$, док је након 72 сата његов ниво остао скоро непромењен. Повећање $O_2^{\cdot-}$ узрокује оксидативни стрес, који може довести до оштећења биомакромолекула, нарочито ДНК, што потенцијално доводи до ћелијске смрти. Упоредивши са кривом вијабилности ћелија, примећен је већи пад вијабилности ћелија након 24 сата у односу на 72 сата, што је утицало и на IC_{50} вредности. У поређењу са лигандом, комплекс **Rh10** је изазвао веће повећање $O_2^{\cdot-}$ након 72 сата, што се поклапа са стопом вијабилности ћелија.

Познато је да многи антитуморски лекови своју активност испољавају дејством на редокс равнотежу и тиме изазивају апоптозу ћелија. Овај механизам се ослања на чињеницу да је базални оксидативни стрес у малигним туморским ћелијама већи него у здравим, те додатно повећање овог стреса може бити пресудно за смрт малигних туморских ћелија, док здраве ћелије остају мање угрожене.

Нитрити (NO_2^-). Промена садржаја нитрита испитивана је применом Griess протокола.³⁰⁵ Ниво нитрита се често сматра индикатором присуства реактивних азотних врста (RNS), посебно азот-монооксида (NO). Тумачење нитрита без других RNS параметара и профила експресије гена и протеина је отежано због високе реактивности NO, посебно са $O_2^{\cdot-}$ и другим реактивним врстама. Ипак, ниво нитрита пружа увид у општи редокс статус ћелије. Нивои нитрита, који могу служити као маркер присуства азот-оксида, били су повећани након третмана испитиваним комплексима родијума (**Rh1-5** и **Rh7**), Слика 4.37. У HeLa ћелијама овај пораст нитрита додатно указује на промоцију оксидативног стреса, што може довести до различитих облика оштећења ћелијских компоненти. У MRC-5 ћелијама овај ефекат је био присутан, али мање изражен.

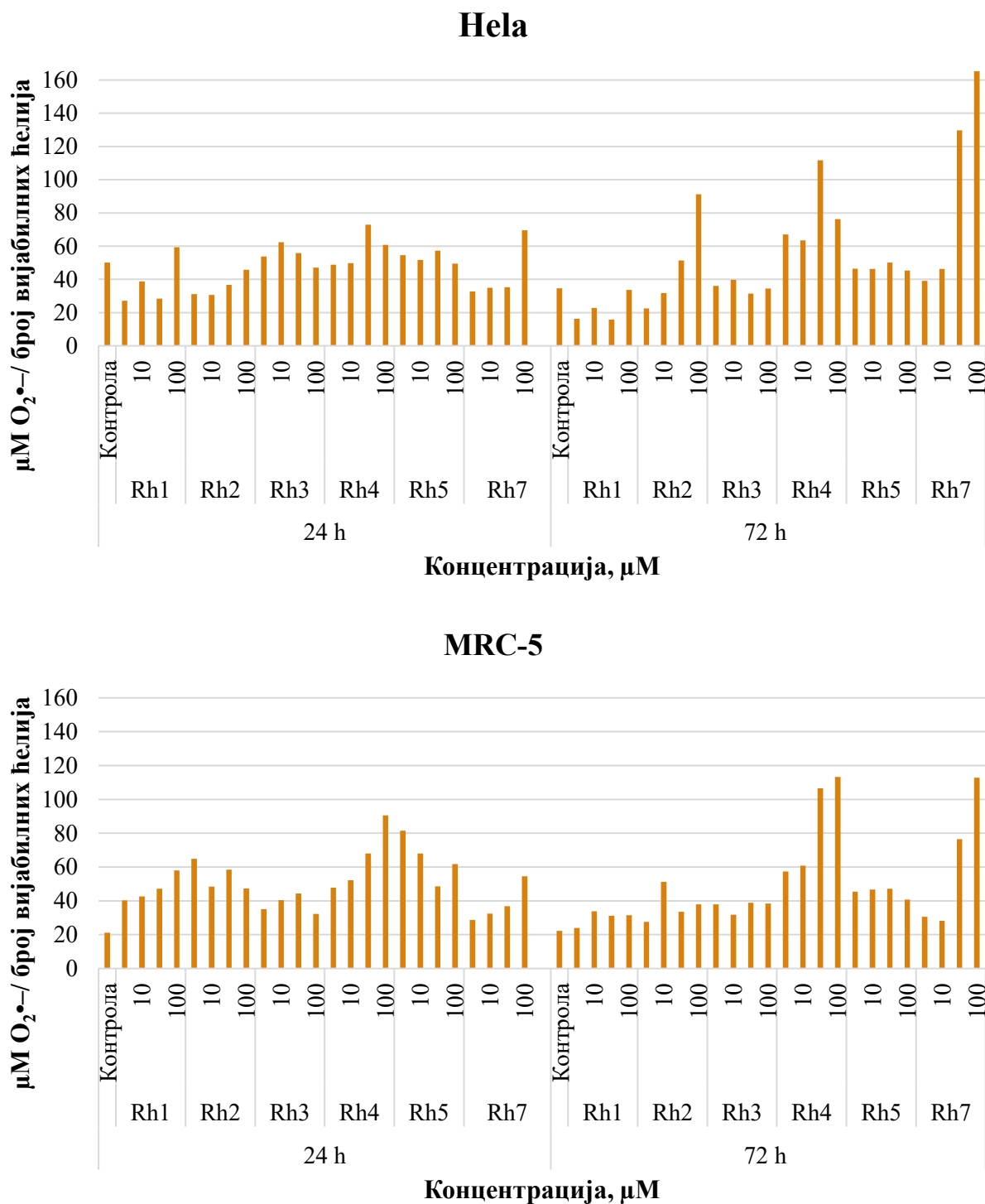
За комплекс **Rh10** испитиван је утицај лиганда и комплекса. У НСТ-116 ћелијама, лиганд није изазвао значајну промену нивоа нитрита, док је комплекс **Rh10** довео до значајног повећања. Као и код $O_2^{\cdot-}$, већи ниво нитрита примећен је у туморским ћелијама него у здравим, што указује на могућност RNS-индукованог поремећаја биохемијских механизма у ћелијама. Код MRC-5 ћелија, резултати показују да је лиганд изазвао смањење нивоа нитрита при нижим концентрацијама, док су више концентрације изазвале повећање нитрита након 24 сата. После 72 сата, ниво нитрита постепено је растао са повећањем концентрације лиганда. Комплекс **Rh10** није утицао на ниво нитрита након 24 сата, али је после 72 сата изазвао значајно повећање.

Глутатион (GSH). Најзначајнија промена у HeLa ћелијама при третману испитиваним комплексима родијума (**Rh1-3** и **Rh7**) била је значајно смањење нивоа GSH, Слика 4.38. Глутатион је критичан антиоксидативни молекул који неутралише слободне радикале и реактивне врсте кисеоника (ROS). Смањење нивоа глутатиона указује на нарушавање ћелијског одбрамбеног механизма против оксидативног стреса, што ћелије чини подложнијим оштећењима и дисфункцији.³⁰⁶ Промене у редокс параметрима код MRC-5 ћелија, међутим, биле су мање изражене, што указује на различиту осетљивост ових ћелија на комплексе родијума. Иако је примећено благо повећање супероксид-анјон радикала и нивоа нитрита, што указује на покретање оксидативног одговора, нивои GSH у

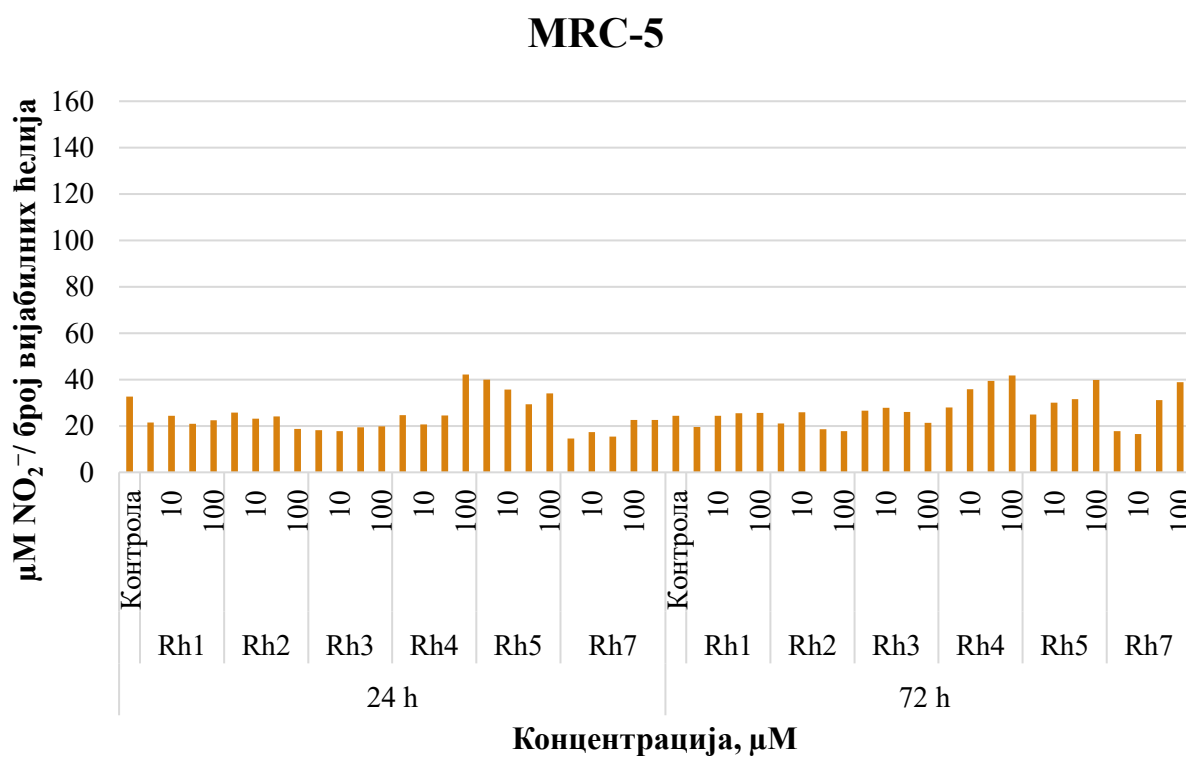
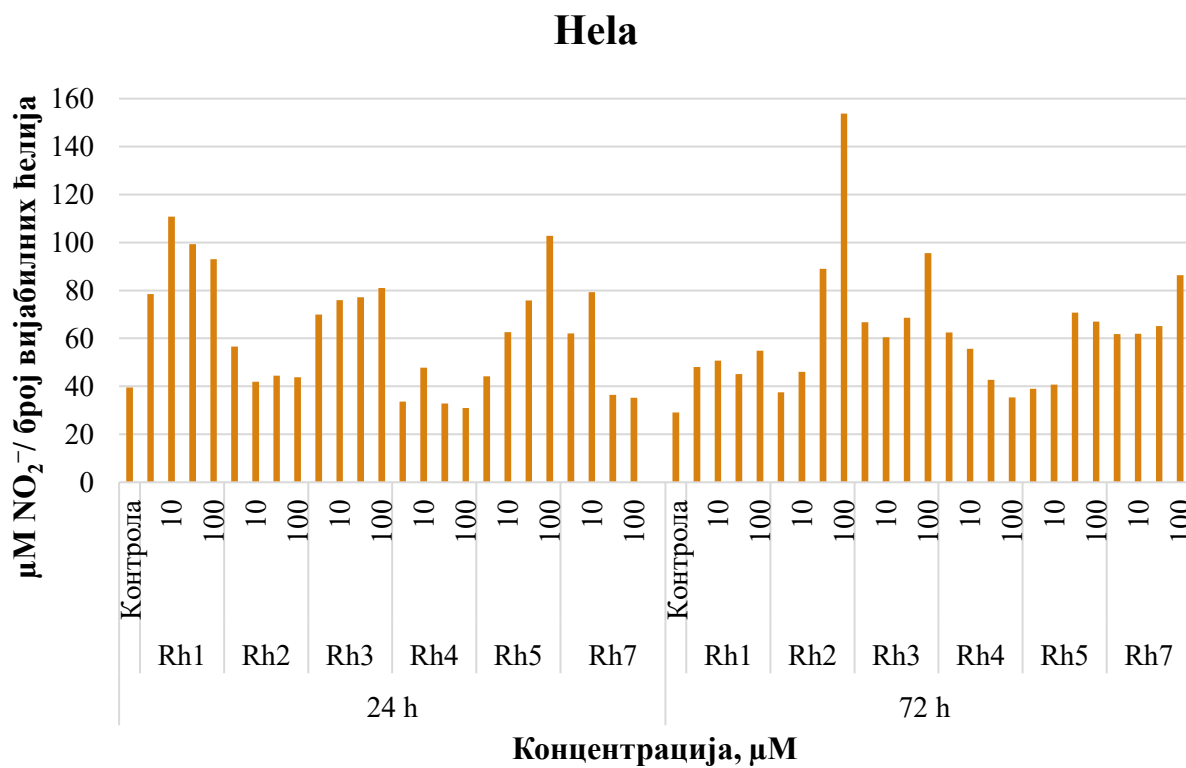
MRC-5 ћелијама нису били значајно смањени као у HeLa ћелијама. Ова суптилна разлика истиче селективну токсичност комплекса родијума, који су способни да изазову значајан оксидативни стрес у ћелијама тумора, истовремено штитећи здраве ћелије и одржавајући бољу редокс равнотежу.

За комплекс **Rh10** испитиван је утицај комплекса и лиганда, пошто су оба препозната као ксенобиотици, који изазивају продукцију ROS/RNS. GSH реагује са новонасталим једињењима и ROS, што индукује брзи одговор ћелије у виду синтезе нових количина GSH. Код MRC-5 ћелија, пошто лиганд није значајно индуковао промену нивоа $O_2^{\bullet-}$ и нитрита, ни ниво GSH није значајно промењен. Супротно томе, комплекс **Rh10** је значајно повећао продукцију GSH у обе ћелијске линије.

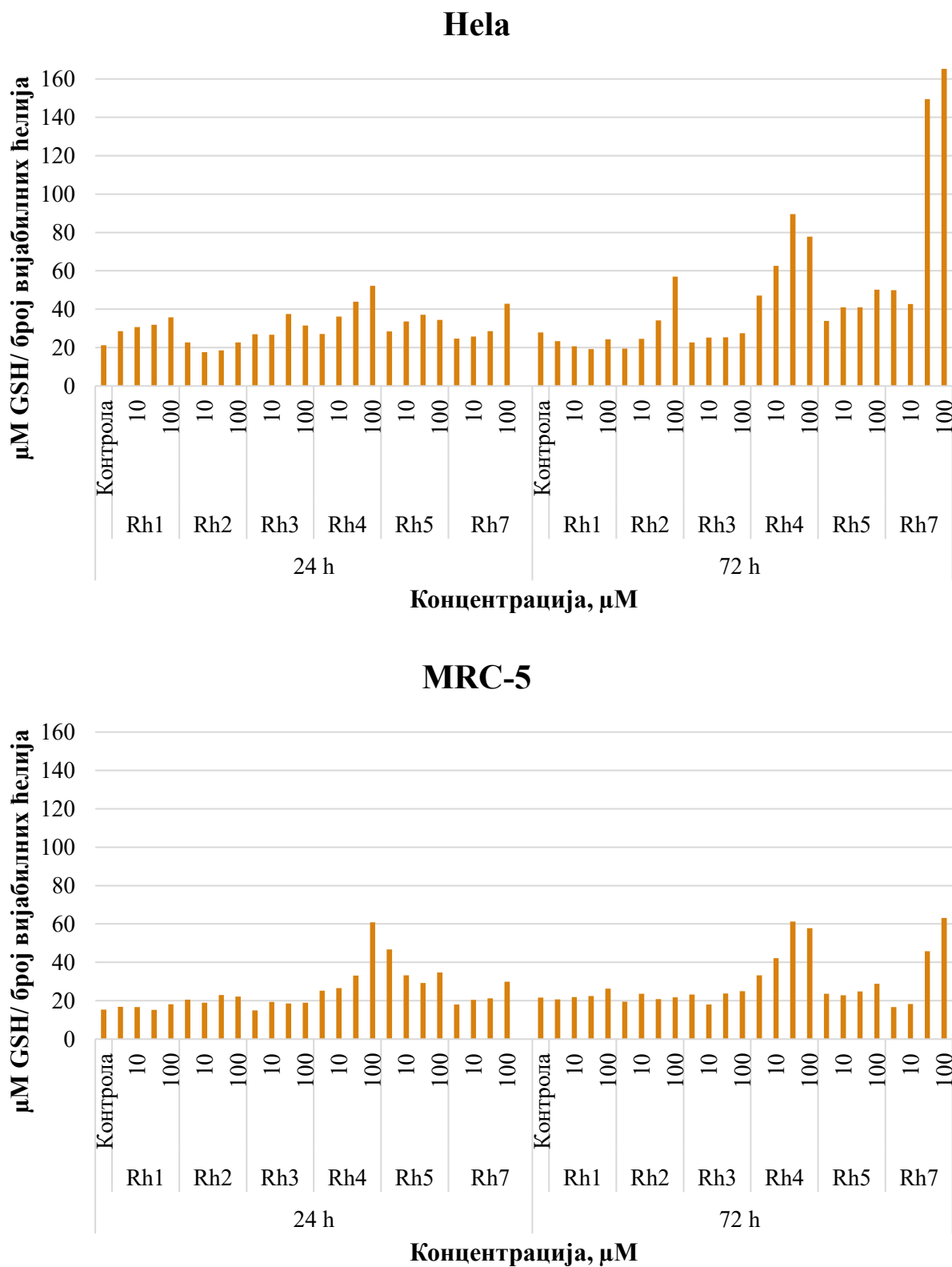
Корелација између повећане продукције ROS и смрти HeLa ћелија подржава хипотезу да је цитотоксичност комплекса родијума посредована механизмом оксидативног стреса. Значајно повећање супероксид-анјон радикала и нитрита, у комбинацији са смањењем GSH у HeLa ћелијама, указује да су ћелије тумора мање способне да се супротставе повећаном оксидативном оптерећењу, што доводи до њихове смрти. С друге стране, способност MRC-5 ћелија да одрже више нивое GSH упркос оксидативном стресу изазваном комплексима родијума може објаснити њихову релативну отпорност на цитотоксичне ефекте испитиваних комплекса.



Слика 4.36. Поређење нива супероксид-анјон радикала ($\text{O}_2^{\bullet-}$) у HeLa и MRC-5 ћелијским линијама након 24 и 72 сата од третмана комплексима родијума **Rh1-7**.²⁷⁴



Слика 4.37. Поређење нивоа нитрита (NO_2^-) у HeLa и MRC-5 ћелијским линијама након 24 и 72 сата од третмана комплексима родијума **Rh1-7**.^{274,275,277}



Слика 4.38. Поређење нивоа редукваног глутатиона (GSH) у HeLa и MRC-5 ћелијским линијама након 24 и 72 сата од третмана комплексима родијума **Rh1-7**.^{274,275,277}

4.7.2.2. *In vitro* истраживања редокс статуса комплекса Os(II)

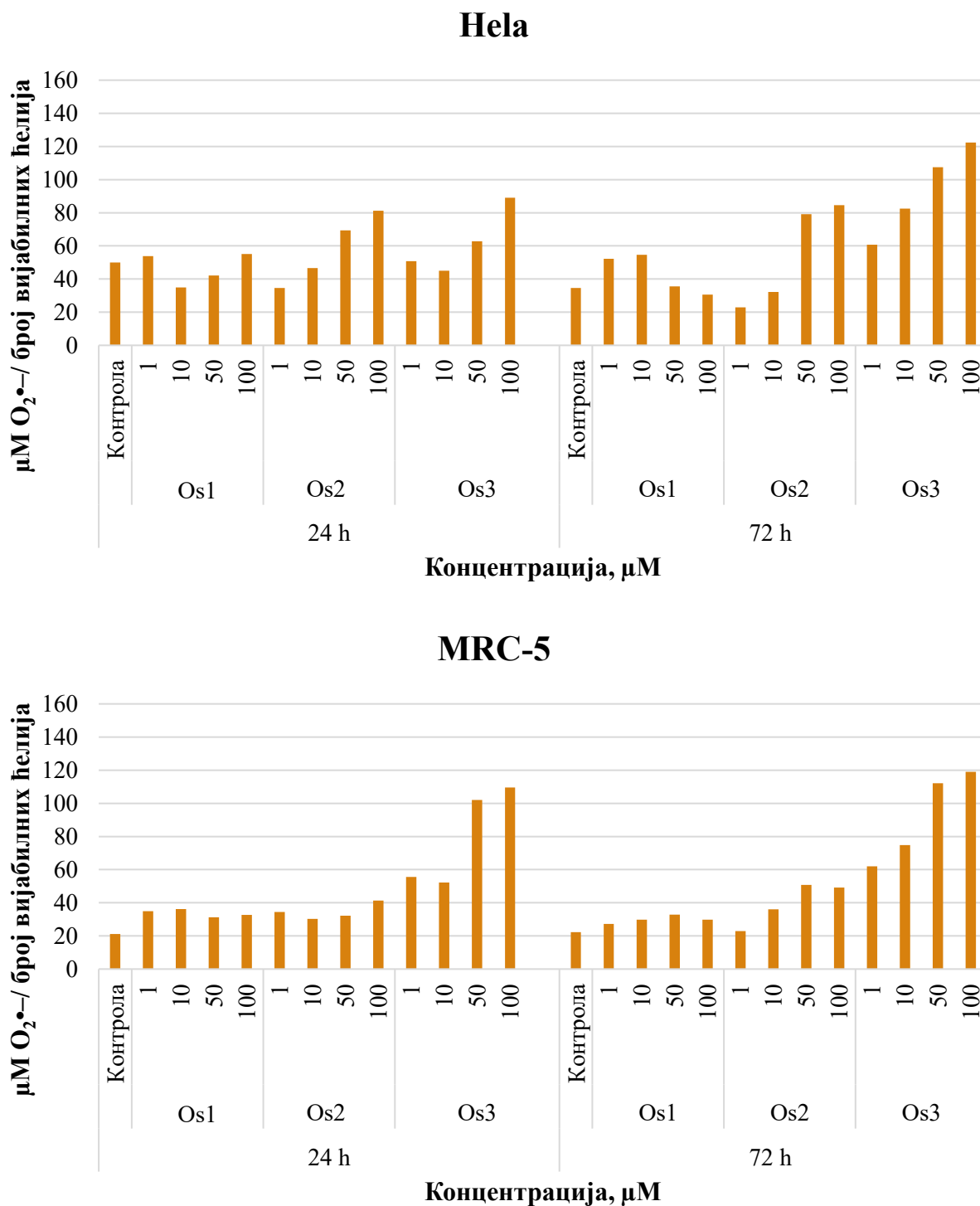
Супероксид-анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$). Резултати добијени на HeLa ћелијама, Слика 4.39., показују да је комплекс **Os2** изазвао најзначајније повећање нивоа $O_2^{\cdot-}$, посебно након 72 сата од третмана.^{268,304} Комплекс **Os3** је такође изазвао повећање, али у мањој мери, док је **Os1** чак смањио садржај $O_2^{\cdot-}$ у истом временском интервалу. На MRC-5 ћелијама није утврђена значајна промена нивоа $O_2^{\cdot-}$ при третману са комплексима **Os1** и **Os2**, док је **Os3** изазвао повећање зависно од времена и дозе. На основу ових мерења уочено је значајно оксидативно оштећење HeLa ћелија при третману са комплексима **Os2** и **Os3**, као и оксидативни стрес MRC-5 ћелија у третману са **Os3**. Хемијски изазвано прекомерно стварање слободних радикала обично доводи до повећане цитотоксичности, што је у складу са МТТ резултатима. Комплекси који су повећали производњу слободних радикала истовремено су показали већу цитотоксичност.

Нитрити (NO_2^-). Код резултата приказаних на Слици 4.40. може се уочити сличан одговор ћелија као код мерења $O_2^{\cdot-}$.^{268,305} Комплекси **Os2** и **Os3** су изазвали значајно повећање нивоа NO_2^- на HeLa ћелијама, док комплекс **Os1** није у значајној мери променио овај параметар. На MRC-5 ћелијама примећено је повећање продукције NO_2^- само у третману са **Os3**. Цитотоксични тест је открио снажну токсичност комплекса **Os2** и **Os3** на обе ћелијске линије. Комплекс **Os2** је показао специфичност према HeLa ћелијама, док је **Os3** био специфичан према MRC-5 ћелијама. Резултати испитивања $O_2^{\cdot-}$ и NO_2^- указују на сличан утицај комплекса **Os2** и **Os3**, при чему индукција оксидативног стреса у ћелијама доводи до повећане цитотоксичности. Комплекс **Os1** није утицао на редокс равнотежу, те се није манифестовао ни цитотоксични ефекат.

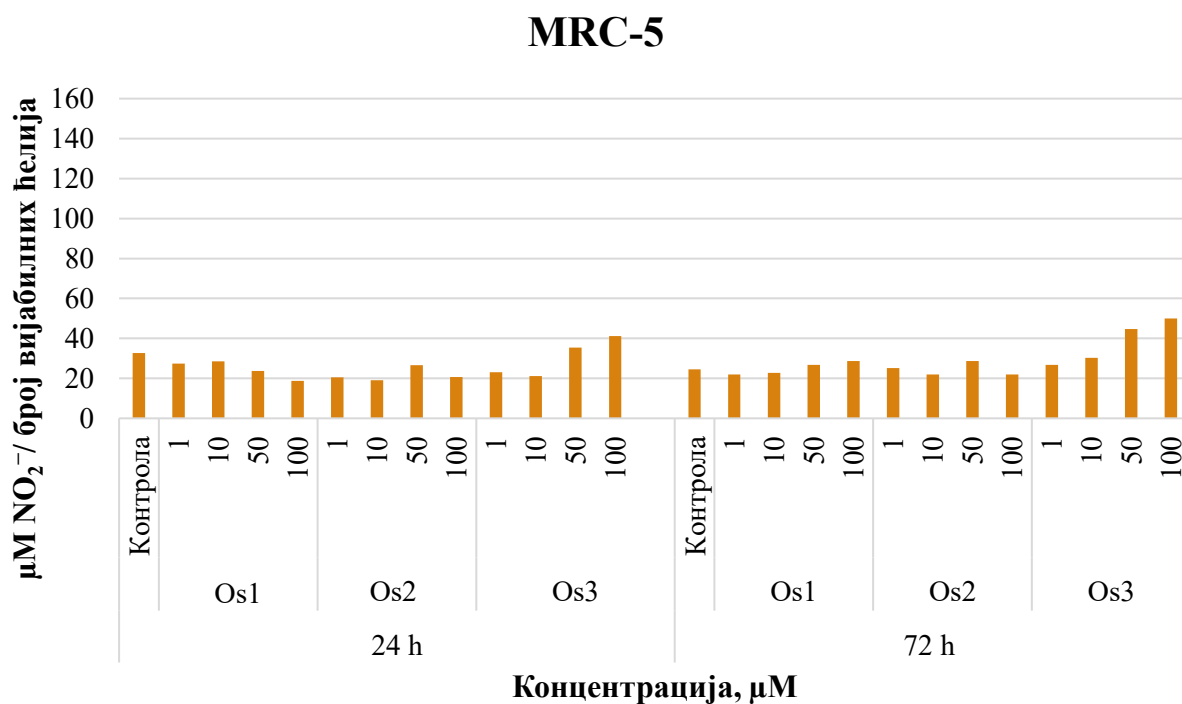
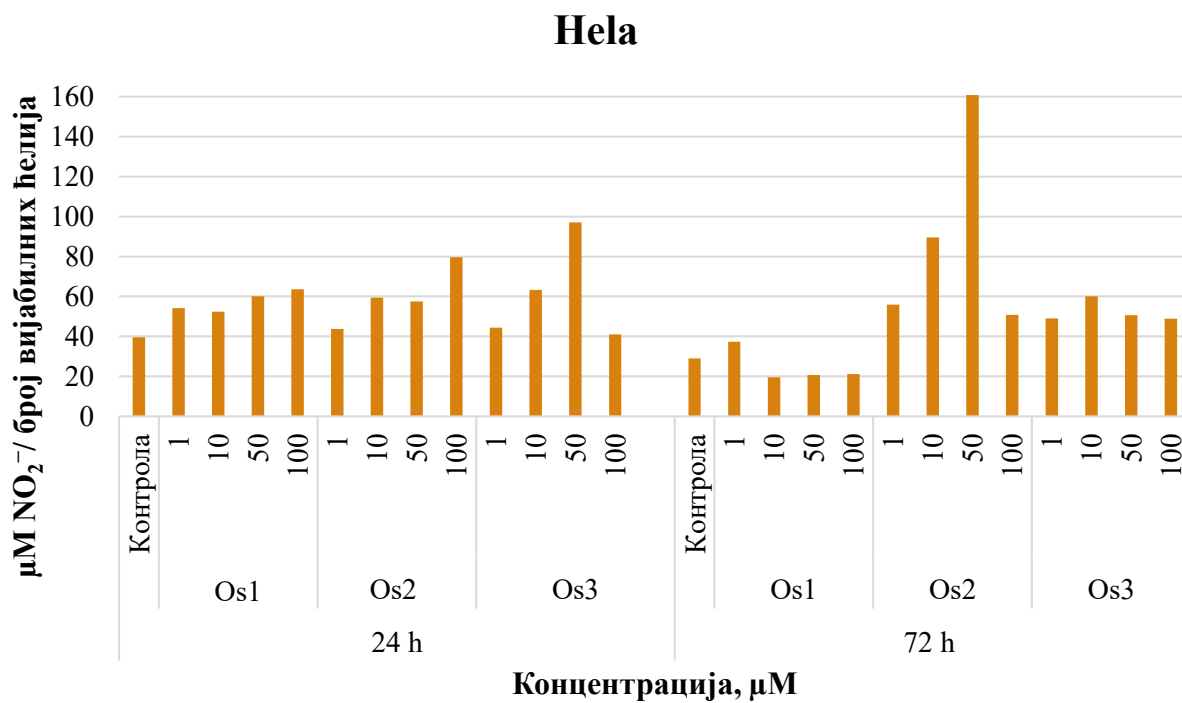
Редуковани глутатион (GSH). Промена концентрације GSH представља индикатор нивоа оксидативног стреса у ћелијама.³⁰⁶ GSH као први одговор ћелија на ксенобиотику, укључујући појачану продукцију ROS/RNS, повећава се у третманима који индукују прекомерну продукцију $O_2^{\cdot-}$ и NO_2^- . Резултати приказани на Слици 4.41., показују да су комплекси **Os2** и **Os3** узроковали значајно повећање концентрације GSH на HeLa ћелијама, док комплекс **Os1** није довео до повећања концентрације. С друге стране, највеће повећање GSH у зависности од времена и дозе забележено је при третману комплексом **Os3** на MRC-5 ћелијама.

Резултати указују на јак прооксидативни карактер испитиваних комплекса **Os2** и **Os3** на HeLa ћелијама, као и комплекса **Os3** на MRC-5 ћелијама. Значајна селективност комплекса **Os2** према туморским ћелијама указује на потенцијал за даље истраживање у оквиру антитуморских студија. Комплекс **Os3** је показао значајну цитотоксичност према туморским ћелијама, али и мањак селективности у односу на здраве ћелије, док комплекс **Os1** није показао ефекат на испитиваним ћелијским линијама. Иако је цитотоксичност тестирана као примарна, у суштини се ROS/RNS први генеришу у ћелијама, што значајно ремети редокс равнотежу и омета нормалне физиолошке процесе који воде ка ћелијској смрти.

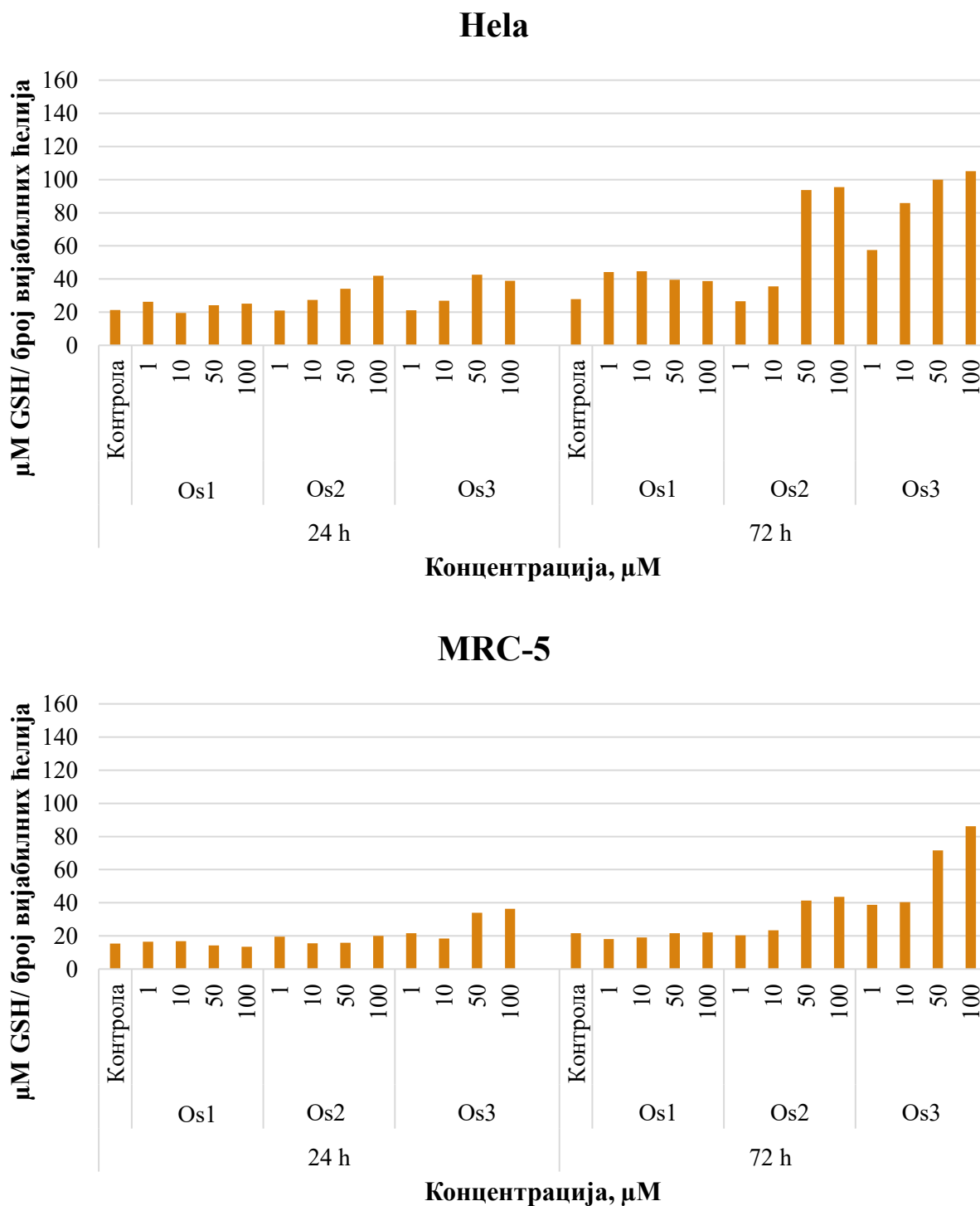
Разлике у редокс статусу између туморских и здравих ћелија су од суштинског значаја за разумевање терапијског потенцијала испитиваних комплекса родијума и осмијума. Она указује на могућност искоришћавања повећане осетљивости туморских ћелија на оксидативна оштећења, уз минимално нарушавање функционалности нормалних ћелија. Ова селективност је веома пожељна у антитуморској терапији, јер омогућава цитотоксичност усмерену ка туморским ћелијама уз истовремено очување здравог ткива.



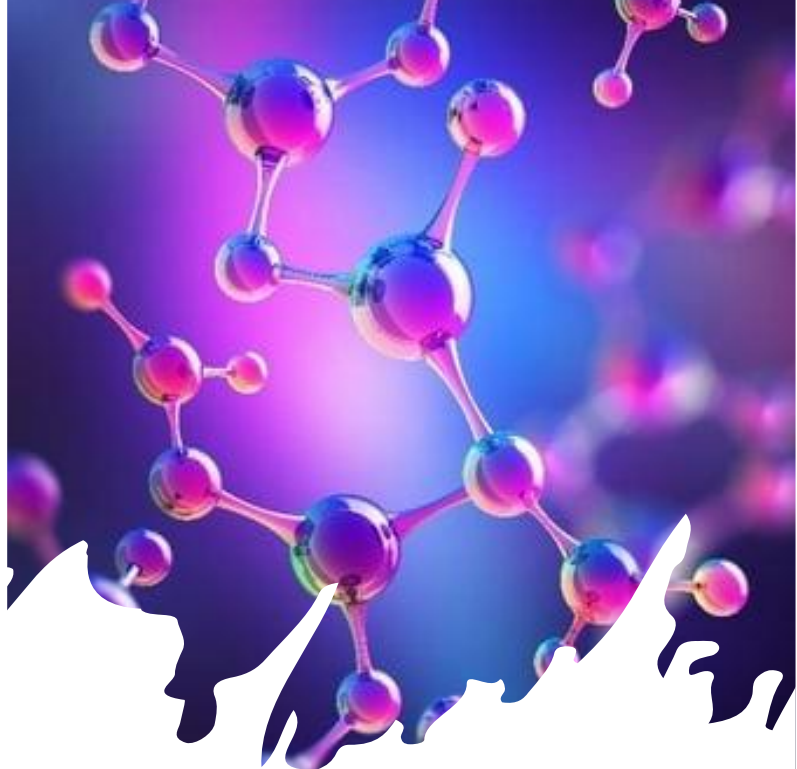
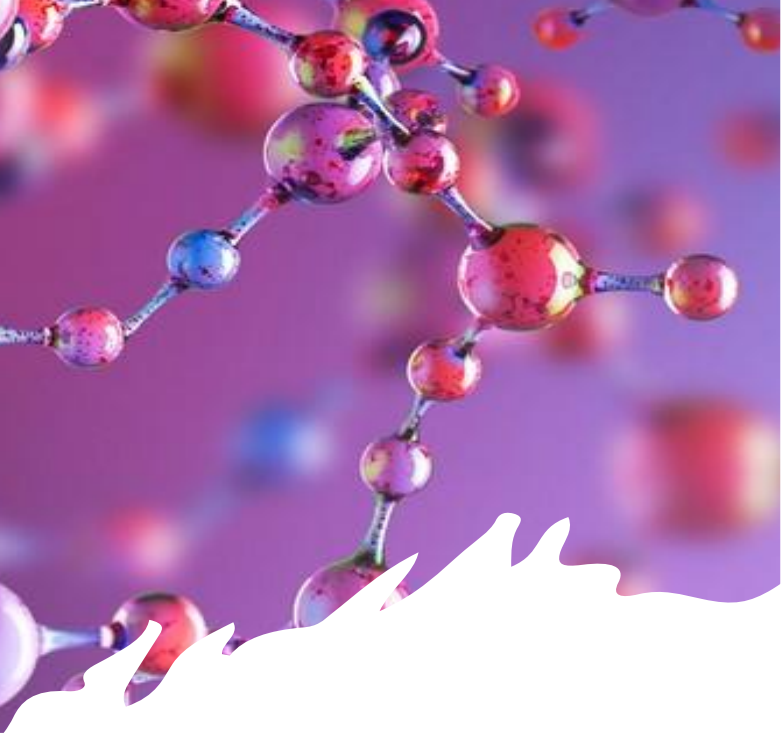
Слика 4.39. Поређење нивоа супероксид-анјон радикала ($O_2^{\bullet-}$) у HeLa и MRC-5 ћелијским линијама након 24 и 72 сата од третмана комплексима осмијума **Os1-3**.²⁶



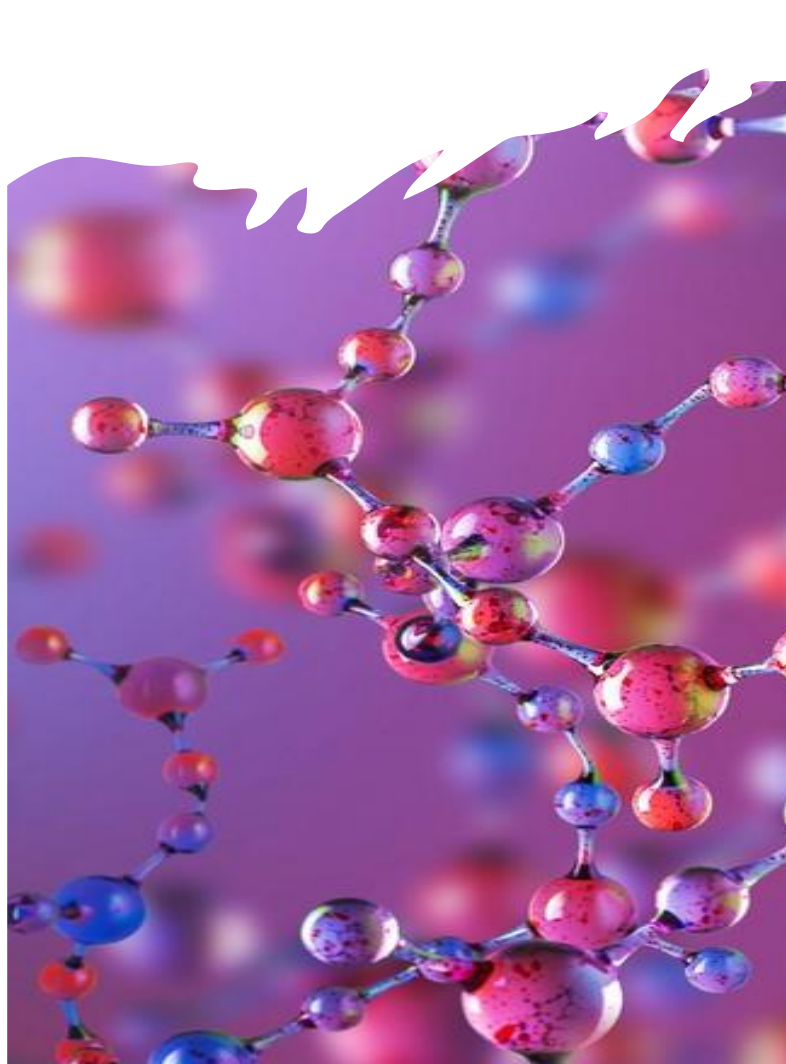
Слика 4.40. Поређење нивоа нитрита (NO_2^-) у HeLa и MRC-5 ћелијским линијама након 24 и 72 сата од третмана комплексима осмијума **Os1-3**.²⁶⁸



Слика 4.41. Поређење нивоа редукваног глутатиона (GSH) у HeLa и MRC-5 ћелијским линијама након 24 и 72 сата од третмана комплекса осмијума **Os1-3**.²⁶⁸



5. ЗАКЉУЧАК



5. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове докторске дисертације приказана је синтеза, структурна карактеризација и испитивање биолошке активности Rh(III) и Os(II) комплекса са различитим типовима лиганада.

Синтеза и карактеризација комплекса

- Синтетисано је укупно петнаест комплексних једињења, десет Rh(III) комплекса, **Rh1-10**, и пет Os(II) комплекса, **Os1-5**.
- Комплекси су добијени реакцијом одговарајућих соли метала са лигандима *dien*-ом, дериватима пиридина, камфор дериватима *bis*-пиразолилпиридина и тиазол-пиридинским дериватима.
- Комплекси су окарактерисани елементалном микроанализом, NMR и масеном спектроскопијом, а структура појединих комплекса додатно је потврђена рендгенском структурном анализом.
- Потврђена је октаедарска геометрија свих испитиваних комплекса, са сличностима у дужинама Rh–N и Os–N веза, уз мање варијације условљене природом лиганада.

Кинетика супституционих реакција

- Rh(III) и Os(II) комплекси показали су афинитет за везивање са L-Met, GSH и 5-GMP, а највећу реактивност је показао 5'-GMP што указује да је ДНК једна од могућих биолошких мета ових комплекса.
- DFT методом потврђени су афинитети комплекса и механизми супституције који су у складу са експерименталним подацима.
- Rh(III) комплекси показали су већу реактивност у поређењу са аналогним Os(II) комплексима, при чему су се посебно истакли комплекси са *bis*-пиразолилпиридинским лигандима.

Интеракција са ДНК

- Rh(III) и Os(II) комплекси показали су афинитет за интеракције са ДНК (константе реда 10^4 M^{-1}), при чему је уочено више начина везивања, укључујући парцијалну интеркалацију и везивање у мали жљоб.
- Афинитет испитиваних комплекса за везивање са ДНК је потврђен докинг симулацијама.

- По јачини интеракције су се посебно издвојили Rh(III) комплекси са камфор дериватом *bis*-пиразолилпирида (**Rh6** и **Rh7**) и Os(II) комплекс са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os2**).
- Rh(III) комплекси су у просеку показали нешто већи афинитет за интеракције са ДНК од аналогних Os(II) комплекса.

Везивање за серумски албумин

- Rh(III) и Os(II) комплекси су показали афинитет за интеракције са HSA и BSA.
- Os(II) комплекси су показали нешто већи афинитет за интеракције са HSA у односу на аналогне Rh(III) комплексе.
- Везивање се претежно одвија на везивном месту I (IIA поддомен), што је потврђено упоредним експериментима и докинг симулацијама.
- FRET анализа указала је на потенцијалан биолошки значај везивања комплекса са албумином.

Липофилност комплекса

- Rh(III) комплекси су показали $\log P$ вредности у оптималном опсегу 0-0,90, што указује на добру равнотежу хидрофилности и липофилности неопходну за пролаз кроз ћелијске мембране и потенцијалну биолошку примену.
- По повољним липофилним својствима посебно су се истакли комплекси са бипиридинским (**Rh2**), *bis*-пиразолилпиридинским (**Rh4**), камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7**) и камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина и два триазолска лиганда (**Rh10**).

Цитотоксичност и селективност

- Већина испитиваних Rh(III) и Os(II) комплекса је показала значајан цитотоксични ефекат.
- Међу испитиваним комплексима, посебно су се издвојили Rh(III) комплекси са бипиридинским лигандом (**Rh2**) и камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина и са два триазолска лиганда (**Rh10**), као и Os(II) комплекси са терпиридинским (**Os1**) и *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os2**), који су показали изразито јак цитотоксичан ефекат и висок степен селективности
- Изражен цитотоксичан ефекат, али без значајне селективности показали су и Rh(III) комплекси са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Rh4**), камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина (**Rh7**) и са тиазол-пиридинским лигандима

(**Rh8** и **Rh9**), као и Os(II) комплекси са *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os3**) и са тиазол-пиридинским лигандима (**Os4** и **Os5**).

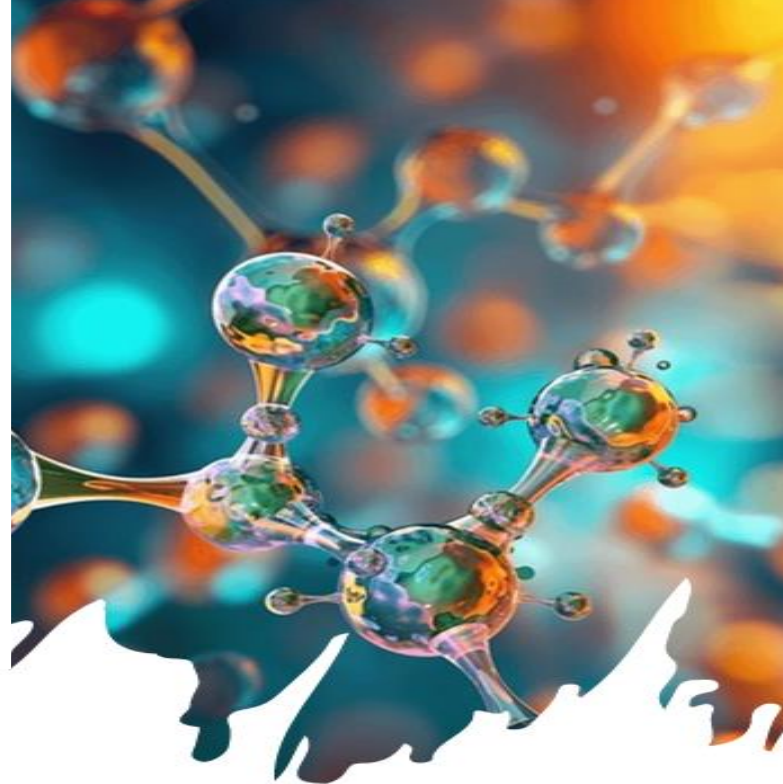
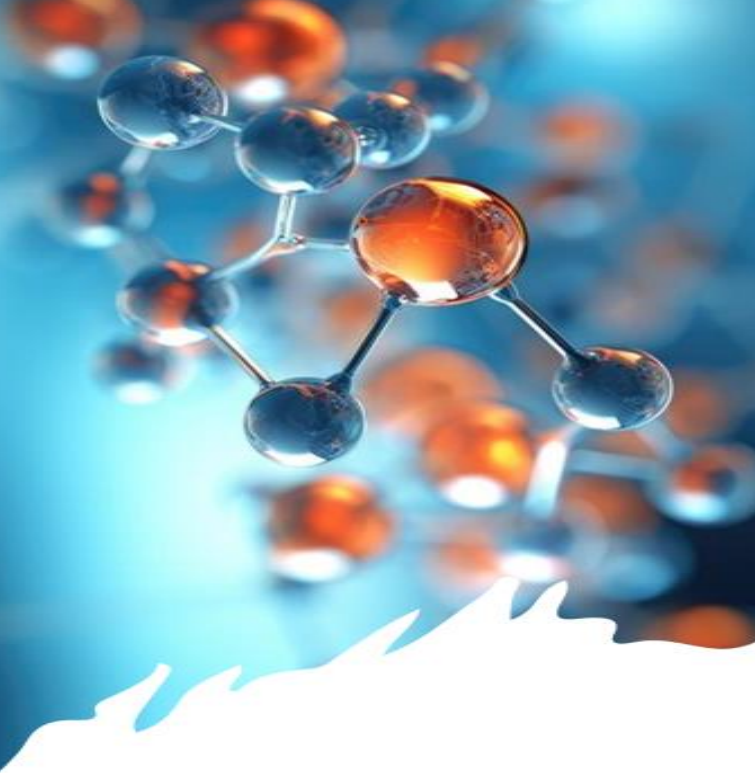
Редокс особине и оксидативни стрес

- Испитивани Rh(III) и Os(II) комплекси индикују оксидативни и нитрозивни стрес у туморским ћелијама, уз повећане нивое ROS и RNS, као и снижене нивое GSH.
- Здраве ћелије су углавном остале неоштећене, што указује на селективни механизам дејства.

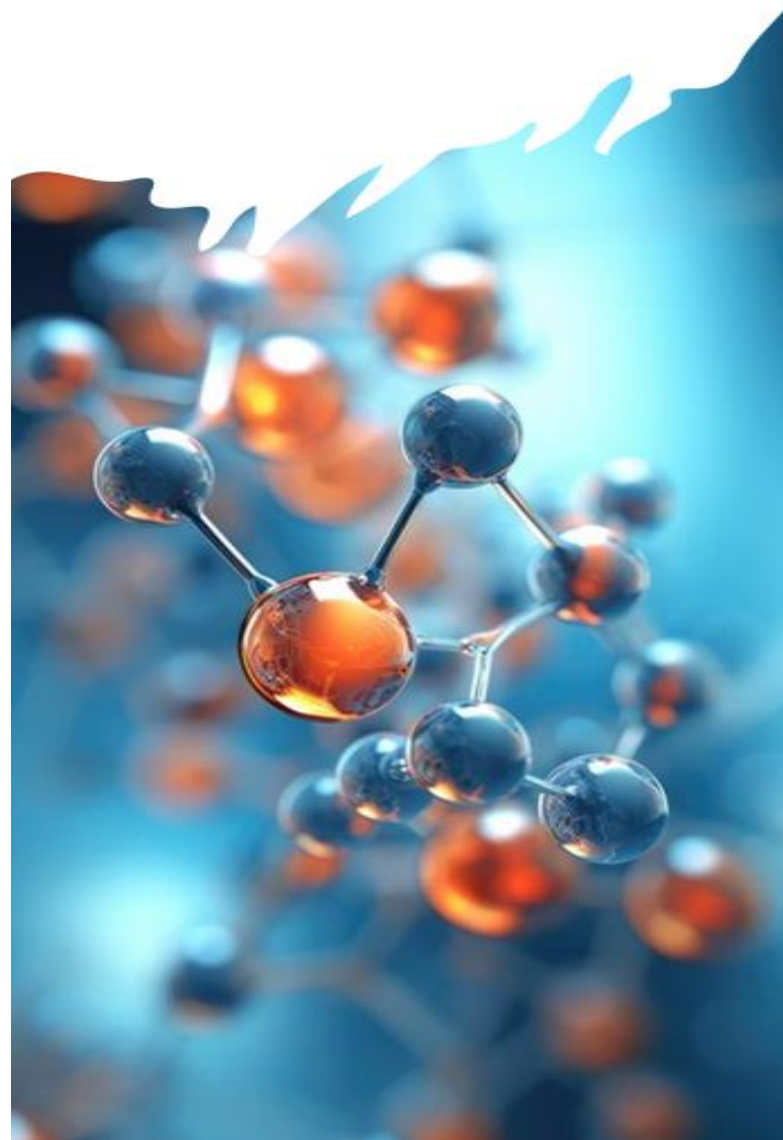
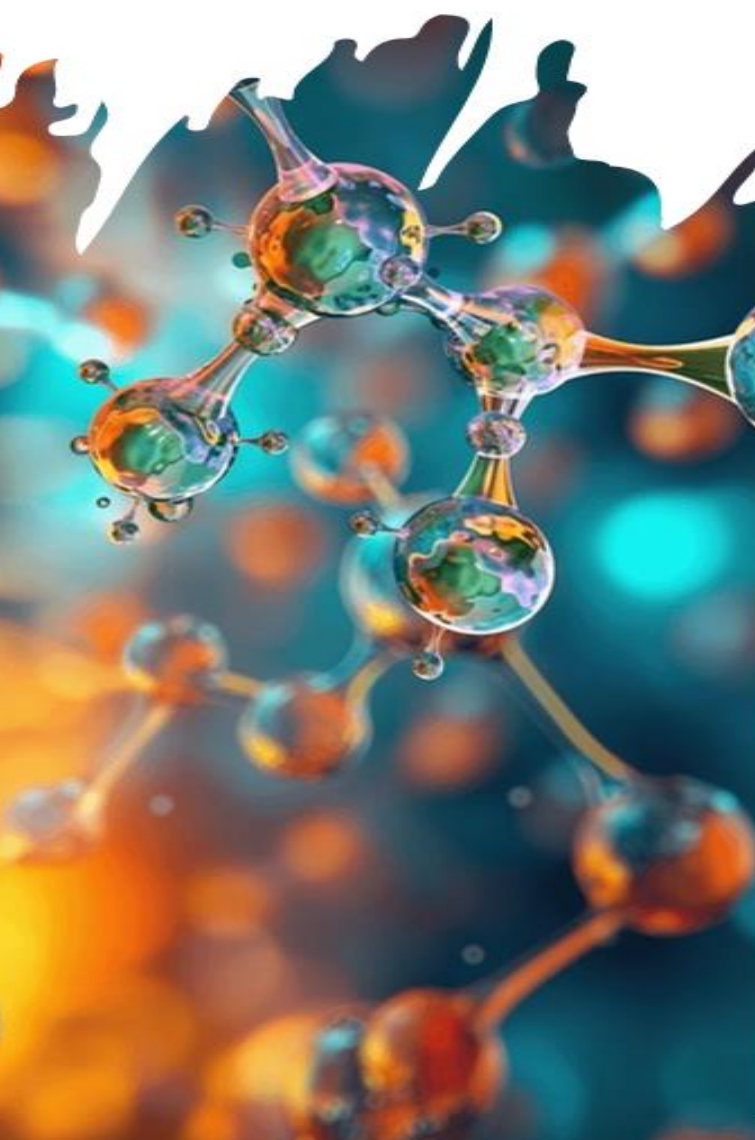
Улога јонских течности

- Примена јонских течности као косолвената значајно је побољшала растворљивост и стабилност испитиваних комплекса Rh(III) и Os(II), уз значајно повећање константи брзине супституције са 5'-GMP.
- У присуству јонских течности није дошло до значајних промена у типу или јачини интеракција комплекса са ДНК и HSA, што указује на очуван афинитет према биолошким молекулима.
- Присуство јонских течности IL1 и IL10 довео је до значајних промена цитотоксичне активности комплекса Rh(III) и Os(II): присуство IL1 је појачало њихово антипролиферативно дејство, док је присуство IL10 допринео смањењу токсичности према здравим ћелијама.
- Јонске течности, у зависности од свог састава и особина, могу утицати на биолошку активност комплекса и представљају еколошки прихватљиве алтернативе конвенционалним косолвентима у истраживањима комплекса метала са потенцијалном антитуморском активношћу.

Може се закључити да испитивани Rh(III) и Os(II) комплекси показују изразит афинитет према 5'-GMP и ДНК, при чему интеракције са ДНК укључују парцијалну интеркалацију и везивање у мали жљеб. Комплекси такође показују способност везивања за серумски албумин, док утврђена липофилност појединих Rh(III) комплекса указује на потенцијал за ефикасан транспорт кроз ћелијске мембране. Присуство јонских течности није значајно утицало на начин везивања за биолошке мете, али је допринело побољшању растворљивости, биорасположивости, селективности и укупне биолошке активности комплекса. Као најперспективнији комплекси су се издвојили Rh(III) комплекси са бипиридинским лигандом (**Rh2**) и камфор дериватом *bis*-пиразолилпиридина и два триазолска лиганда (**Rh10**). Од испитиваних Os(II) комплекса издвојили су се комплекси са терпиридинским лигандом (**Os1**) и *bis*-пиразолилпиридинским лигандом (**Os2**).



6. ЛИТЕРАТУРА



6. ЛИТЕРАТУРА

1. *Cancer*, https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.
2. WHO report on cancer: Setting priorities, investing wisely and providing care for all. World Health Organization, **2020**. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330745>.
3. J. Ferlay, M. Ervik, F. Lam, M. Laversanne, M. Colombet, L. Mery, M. Piñeros, A. Znaor, I. Soerjomataram, F. Bray, *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. **2024**, <https://gco.iarc.who.int/today>.
4. G. M. Cooper, *The Cell: A Molecular Approach*, second ed., Sinauer Associates, Sunderland (MA), **2000**.
5. Z. Yan, M. Y. Leong, G. H. Lim, Discordant correlation of breast adenoid cystic carcinoma on imaging and pathology: A case report and literature review on surgical management, *Int. J. Surg. Case Rep.* **2018**, 42, 196.
6. C. Melzer, R. Hass, J. von der Ohe, H. Lehnert, H. Ungefroren, The role of TGF- β and its crosstalk with RAC1/RAC1b signaling in breast and pancreas carcinoma, *Cell Commun. Signal.* **2017**, 15, 19.
7. S. Filleur, K. Volz, T. Nelius, Y. Mirochnik, H. Huang, T. A. Zaichuk, M. S. Aymerich, S. P. Becerra, R. Yap, D. Veliceasa, E. H. Shroff, O. V. Volpert, Two functional epitopes of pigment epithelial-derived factor block angiogenesis and induce differentiation in prostate cancer, *Cancer Res.* **2005**, 65, 5144.
8. E. Karekla, W.-J. Liao, B. Sharp, J. Pugh, H. Reid, J. Le Quesne, D. Moore, C. Pritchard, M. Mac Farlane, J. H. Pringle, Ex Vivo Explant Cultures of Non-Small Cell Lung Carcinoma Enable Evaluation of Primary Tumor Responses to Anticancer Therapy, *Cancer Res.* **2017**, 77, 20292039.
9. I. Aldecoa, C. Montironi, N. Planell, M. Pellise, G. Fernandez-Esparrach, A. Gines, S. Delgado, D. Momblan, L. Moreira, M. Lopez-Ceron, N. Rakislova, G. Martinez-Palli, J. Balust, J. A. Bombi, A. de Lacy, A. Castells, F. Balaguer, M. Cuatrecasas, Endoscopic tattooing of early colon carcinoma enhances detection of lymph nodes most prone to harbor tumor burden, *Endosc. Other Interv. Tech.* **2017**, 31, 723.
10. C. D. M. Fletcher, K. K. Unni, F. Mertens, *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*, WHO Classification of Tumours, third ed., volume 5, IARC publications, **2002**.
11. C. Martel, D. Georges, F. Bray, J. Ferlay, G. M. Clifford, Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis, *Lancet Glob Health.* **2020**, 8, 180.
12. A. Jemal, E. M. Ward, C. J. Johnson, K. A. Cronin, J. Ma, A. B. Ryerson, A. Mariotto, A. J. Lake, R. Wilson, R. L. Sherman, R. N. Anderson, S. J. Henley, B. A. Kohler, L. Penberthy, E. J. Feuer, H. K. Weir, Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival, *J. Natl. Cancer Inst.* **2017**, 109, 1.
13. Z. Zheng, X. Han, J. Zhao, M. P. Banegas, R. Tucker-Seeley, A. Rai, S. A. Fedewa, W. Song, A. Jemal, K. R. Yabroff, Worry About Daily Financial Needs and Food Insecurity Among Cancer Survivors in the United States, *Am. J. Prev. Med.* **2020**, 59, 68.
14. J. A. Bytnar, J. Lin, C. D. Shriver, K. Zhu, Racial Differences in Brain Cancer Characteristics and Survival: An Analysis of SEER Data, *Cancer Cause. Control*, **2019**, 30, 1283.

15. Z. Zheng, X. Han, J. Zhao, M. P. Banegas, R. Tucker-Seeley, A. Rai, S. A. Fedewa, W. Song, A. Jemal, K. R. Yabroff, Financial Hardship, Healthcare Utilization, and Health Among U.S. Cancer Survivors, *Am. J. Prev. Med.* **2020**, *59*, 68.
16. J. T. Hartmann, H. P. Lipp, Toxicity of Platinum Compounds, *Expert Opin Pharmacother* **2003**, *4*, 889.
17. D. M. Cheff, M. D. Hall, A Drug of Such Damned Nature.1 Challenges and Opportunities in Translational Platinum Drug Research, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 4517.
18. L. Lindoy, Metallosupramolecular Chemistry, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 811.
19. R. W. Saalfrank, H. Maid, A. Scheurer, Supramolecular Coordination Chemistry: The Synergistic Effect of Serendipity and Rational Design, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8924.
20. M. Beller, C. Bolm, *Transition Metals for Organic Synthesis: Building Blocks and Fine Chemicals*, WILEY-VCH, Weinheim, **2004**.
21. E. Alessio, *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2011**.
22. K. L. Summers, A Structural Chemistry Perspective on the Antimalarial Properties of Thiosemicarbazone Metal Complexes, *Mini Rev Med Chem.* **2019**, *19*, 569.
23. J. C. Dabrowiak, *Metals in Medicine*, Second Edition, Wiley, **2017**.
24. P. Jia, R. Ouyang, P. Cao, X. Tong, X. Zhou, T. Lei, Y. Zhao, N. Guo, H. Chang, Y. Mi, S. Zhou, Review: recent advances and future development of metal complexes as anticancer agents, *J. Coord. Chem.* **2017**, *70*, 2175.
25. A. M. F. Phillips, A. J. L. Pombeiro, Transition Metal-Based Prodrugs for Anticancer Drug Delivery, *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 7476.
26. P. Jia, R. Ouyang, P. Cao, X. Tong, X. Zhou, T. Lei, Y. Zhao, N. Guo, H. Chang, Y. Miao, S. Zhou, Review: Recent Advances and Future Development of Metal Complexes as Anticancer Agents, *J. Coord. Chem.* **2017**, *70*, 2175.
27. S. K. Nandanwar, H. J. Kim, Anticancer and Antibacterial Activity of Transition Metal Complexes, *Chemistryselect* **2019**, *4*, 1706.
28. P. J. Dyson, G. Sava, Metal-based antitumour drugs in the post genomic era, *Dalton Trans.* **2006**, *16*, 1929.
29. E. Wong, C. M. Giandomenico, Current status of platinum-based antitumor drugs, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2451.
30. M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, Antitumour metal compounds: more than theme and variations, *Dalton Trans.* **2008**, *2*, 183.
31. U. Das, B. Kar, S. Pete, P. Paira, Ru(II), Ir(III), Re(I) and Rh(III) Based Complexes as next Generation Anticancer Metallo-pharmaceuticals, *Dalton Trans.* **2021**, *32*, 11259.
32. W. Da, H. T. Jones, J.-B. Lin, B. A. Blight, Synthesis and Characterization of New Co(II), Rh(III), and Pt(II) Guanidine and Thiourea Complexes, *Can. J. Chem.* **2023**, *101*, 177.
33. P. Štarha, Z. Trávníček, Non-Platinum Complexes Containing Releasable Biologically Active Ligands, *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *395*, 130.
34. R. K. Gupta, R. Pandey, G. Sharma, R. Prasad, B. Koch, S. Srikrishna, P. Z. Li, Q. Xu, D. S. Pandey, DNA Binding and Anti-Cancer Activity of Redox-Active Heteroleptic Piano-Stool Ru(II), Rh(III), and Ir(III) Complexes Containing 4-(2-Methoxypyridyl)Phenyldipyrromethene, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 3687.
35. C. C. Konkankit, S. C. Marker, K. M. Knopf, J. J. Wilson, Anticancer Activity of Complexes of the Third Row Transition Metals, Rhenium, Osmium, and Iridium, *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 9934.
36. M. Hanif, M. V. Babak, C. G. Hartinger, Development of Anticancer Agents: Wizardry with Osmium, *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 1640.
37. A. Mrkvicová, E. Peterová, I. Nemec, R. Křikavová, D. Muthná, R. Havelek, P. Kazimírová, M. Řezáčová, P. Štarha, Rh(III) and Ru(II) Complexes with Phosphanyl–

- Alkylamines: Inhibition of DNA Synthesis Induced by Anticancer Rh Complex, *Future Med. Chem.* **2023**, *15*, 1583.
38. M. Sohrabi, M. Saeedi, B. Larijani, M. Mahdavi, Recent Advances in Biological Activities of Rhodium Complexes: Their Applications in Drug Discovery Research, *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *216*, 113308.
39. P. Singh, B. Sarkar, M. Sieger, M. Niemeyer, J. Fiedler, S. Záliš, W. Kaim, Reversible electron transfer in ruthenium nitrosyl complexes, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4602.
40. A. F. A. Peacock, A. Habtemariam, S. A. Moggach, A. Prescimone, S. Parsons, P. J. Sadler, Chloro half-sandwich osmium(II) complexes: Influence of chelated N,N-ligands on hydrolysis, guanine binding, and cytotoxicity, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 4049.
41. B. F. G. Johnson, *Inorganic Chemistry of the Transition Elements*, volume 5, The Chemical Society, **1977**.
42. S. E. Livingstone, *Chemistry of Ruthenium, Rhodium, Palladium, Osmium, Iridium and Platinum*, Texts in Inorganic Chemistry, Elsevier, **1975**.
43. G. R. Watts, Ed Kurt Swars, *Gmelin Handbook of Inorganic and Organometallic Chemistry - 8th edition*, Springer Berlin, Heidelberg, **1991**.
44. A. F. A. Peacock, S. Parsons, P. J. Sadler, Tuning the hydrolytic aqueous chemistry of osmium arene complexes with N,O-chelating ligands to achieve cancer cell cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3348.
45. I. N. Stepanenko, B. Cebrián-Losantos, V. B. Arion, A. A. Krokhin, A. A. Nazarov, B. K. Keppler, En Route to Osmium Analogues of KP1019: Synthesis, Structure, Spectroscopic Properties and Antiproliferative Activity of trans-[Os^{IV}Cl₄(Hazole)₂], *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2*, 400.
46. Y. Geldmacher, M. Oleszak, W. S. Sheldrick, Rhodium(III) and iridium(III) complexes as anticancer agents, *Inorg. Chim. Acta* **2012**, *393*, 84.
47. A. Ahmad, *Introduction to Cancer Metastasis*, Elsevier, **2017**.
48. Fred Bunz, *Principles of Cancer Genetics*, third edition, Springer, **2022**.
49. WHO, World Health Organization, Cancer Today, Serbia: <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/688-serbia-fact-sheet.pdf>
50. T. J. Priestman, *Cancer Chemotherapy: an Introduction*, third edition, Springer **2012**.
51. M. M. Olsen, K. Le Febvre, S. L. Walker, E. Prechtel Dunphy, *Chemotherapy and Immunotherapy Guidelines and Recommendations for Practice*, second edition, Oncology Nursing Society, **2023**.
52. D. C. Baquiran, J. Gallagher, *Lippincott's Cancer Chemotherapy Handbook*, second edition, Lippincott Williams & Wilkins (LWW), **2001**.
53. H.-P. Lipp, J. T. Hartmann, A. Stanley, *Cytostatic drugs*, Side Effects of Drugs Annual, Elsevier, **2005**.
54. M. J. Dodd, *Managing Side Effects of Chemotherapy and Radiation Therapy: A Guide for Nurses and Patients*, Appleton & Lange, **1987**.
55. A. Kopacz-Bednarska, T. Król, Selected platinum complexes in standard and modern anti-cancer therapies, *Nowotwory J. Oncol.* **2022**, *72*, 96.
56. S. Dasari, P. B. Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action, *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *740*, 364.
57. S. K. Nandanwar, H. J. Kim, , Anticancer and Antibacterial Activity of Transition Metal Complexes, *ChemistrySelect* **2019**, *4*, 1706.
58. Scientific guideline, clinical evaluation of anticancer medicinal products: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-clinical-evaluation-anticancer-medicinal-products-revision-6_en.pdf

59. U. Ndagi, N. Mhlongo, M. E. Soliman, Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective, *Drug Des. Devel. Ther.* **2017**, *11*, 599.
60. A. Kastl, A. Wilbuer, A. L. Merkel, L. Feng, P. Di Fazio, M. Ocker, E. Meggers, Dual anticancer activity in a single compound: visible-light-induced apoptosis by an antiangiogenic iridium complex, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1863.
61. B. Peña, A. David, C. Pavani, M. S. Baptista, J.-P. Pellois, C. Turro, K. R. Dunbar, Cytotoxicity Studies of Cyclometallated Ruthenium(II) Compounds: New Applications for Ruthenium Dyes, *Organometallics* **2014**, *33*, 1100.
62. F. Noor, A. Wüstholtz, R. Kinscherf, N. A. Metzler-Nolte, A Cobaltocenium–Peptide Bioconjugate Shows Enhanced Cellular Uptake and Directed Nuclear Delivery, *Angew. Chem.* **2005**, *44*, 2429.
63. I. Ott, R. Gust, Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2007**, *340*, 117.
64. V. S. P. Beckhove, O. Oberschmidt, A.R. Hanauske, C. Pampillon, M. T. N.J. Sweeney, K. Strohsfeldt, Antitumor activity of Titanocene Y against freshly explanted human breast tumor cells and in xenografted MCF-7 tumors in mice, *Anti Canc. Drugs* **2007**, *18*, 311.
65. T. Zhao, P. Wang, X. Zhang, N. Liu, W. Zhao, Y. Zhang, P. Yuan, S. Li, M. Yang, Z. Yang, T. Huhn, Anti-tumoral Titanium^(IV) Complexes Stabilized with Phenolato Ligands and Structure-Activity Relationship, *Curr. Top. Med. Chem.* **2023**, *23*, 1835.
66. J. Quero, J. C. Royo, B. Fodor, M. C. Gimeno, J. Osada, M. J. Rodríguez-Yoldi, E. Cerrada, Sulfonamide-Derived Dithiocarbamate Gold(I) Complexes Induce the Apoptosis of Colon Cancer Cells by the Activation of Caspase 3 and Redox Imbalance. *Biomedicines*, *Biomedicines* **2022**, *10*, 1437.
67. T. Scattolin, G. Tonon, E. Botter, S. G. Guillet, N. V. Tzouras, S. P. Nolan, Gold(I)-N-Heterocyclic Carbene Synthons in Organometallic Synthesis, *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*, e202301961.
68. S. Radisavljevic, B. Petrovic, Gold(III) Complexes: An Overview on Their Kinetics, Interactions With DNA/BSA, Cytotoxic Activity, and Computational Calculations, *Frot. Chem.* **2020**, *8*, 379.
69. W. A. Wani, U. Baig, S. Shreaz, R. A. Shiekh, P. F. Iqbal, E. Jameel, A. Ahmad, S. H. Mohd-Setapar, M. Mushtaque, L. T. Hun, Recent advances in iron complexes as potential anticancer agents, *New J. Chem.* **2016**, *40*, 1063.
70. U. Basu, M. Roy, A. R. Chakravarty, Recent advances in the chemistry of iron-based chemotherapeutic agents, *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *417*, 213339.
71. C. R. Chitambar, „10. Gallium complexes as anticancer drugs.“ *Metallo-Drugs: Development and Action of Anticancer Agents*, edited by Astrid Sigel, Helmut Sigel, Eva Freisinger and Roland K.O. Sigel, Berlin, Boston: De Gruyter, **2018**, 281.
72. C. R. Chitambar, Gallium Complexes as Anticancer Drugs, *Met. Ions Life Sci.* **2018**, 18.
73. T. Yang, M. Zhu, M. Jiang, F. Yang, Z. Zhang, Current status of iridium-based complexes against lung cancer, *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 1025544.
74. L. Krasnov, S. Tatarin, D. Smirnov, S. Bezzubov, IrCytoToxDB: a dataset of iridium(III) complexes cytotoxicities against various cell lines, *Sci Data* **2024**, *11*, 870.
75. T. Scattolin, V. A. Voloshkin, F. Visentin, S. P. Nolan, A critical review of palladium organometallic anticancer agents, *Cell Rep. Phys. Sci.* **2021**, *2*, 100446.
76. D. Cocic, S. Jovanovic-Stevic, R. Jelic, S. Matic, S. Popovic, P. Djurdjevic, D. Baskic, B. Petrovic, Homo- and hetero-dinuclear Pt(ii)/Pd(ii) complexes: studies of hydrolysis, nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interactions, DFT calculations, molecular docking and cytotoxic activity, *Dalton Trans.* **2020**, *49*, 14411.

77. L. Cai, Y. Wang, Y. Chen, H. Chen, T. Yang, S. Zhang, Z. Guo, X. Wang, Manganese(II) complexes stimulate antitumor immunity via aggravating DNA damage and activating the cGAS-STING pathway, *Chem. Sci.* **2023**, *14*, 4375.
78. I. R. Prihantono, W. Raya I, Potential anticancer activity of Mn (II) complexes containing arginine dithiocarbamate ligand on MCF-7 breast cancer cell lines, *Ann. Med. Surg. (Lond)* **2020**, *60*, 396.
79. P. Ji, P. Wang, H. Chen, Y. Xu, J. Ge, Z. Tian, Z. Yan, Potential of Copper and Copper Compounds for Anticancer Applications, *Pharmaceuticals (Basel)* **2023**, *16*, 234.
80. C. Molinaro, A. Martoriat, L. Pelinski, K. Cailliau, Copper Complexes as Anticancer Agents Targeting Topoisomerases I and II, *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 2863.
81. N. K. Singh, A. A. Kumbhar, Y. R. Pokharel, P. N. Yadav, Anticancer potency of copper(II) complexes of thiosemicarbazones, *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *210*, 111134.
82. S. Y. Lee, C. Y. Kim, T. G. Nam, Ruthenium Complexes as Anticancer Agents: A Brief History and Perspectives, *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, *14*, 5375.
83. B. S. Murray, M. V. Babak, C. G. Hartinger, P. J. Dyson, The development of RAPTA compounds for the treatment of tumors, *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *306*, 86.
84. M. Bashir, I. A. Mantoo, F. Arjmand, S. Tabassum, I. Yousuf, An overview of advancement of organoruthenium(II) complexes as prospective anticancer agents, *Coord. Chem. Rev.* **2023**, *487*, 215169.
85. M. M. Hossain, K. Soha, A. Rahman, A. Auwal, T. U. H. Pronoy, K. M. Rashel, M. Nurujjaman, H. Rahman, T. G. Roy, J. A. Khanam, F. Islam, Rhodium complex [RhLI₂]: a novel anticancer agent inducing tumor inhibition and apoptosis, *Discov. Oncol.* **2024**, *15*, 782.
86. Y.-Q. Gu, K. Yang, Q.-Y. Yang, H.-Q. Li, M.-Q. Hu, M.-X. Ma, N.-F. Chen, Y.-H. Liu, H. Liang, Z.-F. Chen, Rhodium(III)–Picolinamide Complexes Act as Anticancer and Antimetastasis Agents via Inducing Apoptosis and Autophagy, *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 9592.
87. T.-M. Khan, N. S. Gul, X. Lu, R. Kumar, M. I. Choudhary, H. Liang, Z.-F. Chen, Rhodium(III) complexes with isoquinoline derivatives as potential anticancer agents: in vitro and in vivo activity studies, *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 11469.
88. A. J. Ahmed, M. F. Alias, Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Evaluation of Cr (III) and Rh(III) Complexes Derived from A New Mannich Base, *Iraqi J. Sci.* **2024**, *65*, 4853.
89. M. Chen, X. Huang, H. Shi, J. Lai, L. Ma, T.-C. Lau, T. Chen, Cr(V)–Cr(III) in-situ transition promotes ROS generation to achieve efficient cancer therapy, *Biomaterials* **2021**, *276*, 120991.
90. T. Nabiyeva, C. Marschner, B. Blom, Synthesis, structure and anti-cancer activity of osmium complexes bearing π -bound arene substituents and phosphane Co-Ligands: A review, *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *201*, 112483.
91. J. Hildebrandt, N. Häfner, D. Kritsch, H. Görls, M. Dürst, I. B. Runnebaum, W. Weigand, Highly Cytotoxic Osmium(II) Compounds and Their Ruthenium(II) Analogues Targeting Ovarian Carcinoma Cell Lines and Evading Cisplatin Resistance Mechanisms, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4976.
92. P. Zhang, H. Huang, Future potential of osmium complexes as anticancer drug candidates, photosensitizers and organelle-targeted probes, *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 14841.
93. A. Hernández-García, L. Marková, M. Dolores Santana, J. Prachařová, D. Bautista, H. Kostrhunová, V. Novohradský, V. Brabec, J. Ruiz, J. Kašpárková, Cyclometalated Benzimidazole Osmium(II) Complexes with Antiproliferative Activity in Cancer Cells Disrupt Calcium Homeostasis, *Inorg. Chem.* **2023**, *62*, 6474.

94. E. Alessio, L. Messori, NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry, *Molecules* **2019**, *24*, 1995.
95. M. Bashir, I. A. Mantoo, F. Arjmand, S. Tabassum, I. Yousuf, An overview of advancement of organoruthenium(II) complexes as prospective anticancer agents, *Coord. Chem. Rev.* **2023**, *487*, 215169.
96. J. Coverdale, T. Laroia-McCarron, I. Romero-Canelón, Designing ruthenium anticancer drugs: what have we learnt from the key drug candidates?, *Inorganics* **2019**, *7*, 31.
97. I. Haiduc, C. Silvestru, "Cobalt, Rhodium and Iridium" in Organometallics in Cancer Chemotherapy, CRC Press, Boca Raton, Florida, **1990**, 169.
98. N. Katsaros, A. Anagnostopoulou, Rhodium and its compounds as potential agents in cancer treatment, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *42*, 297.
99. A. Taylor, N. Carmichael, The Effect of Metallic Chlorides on the Growth of Tumor and Nontumor Tissue, *Cancer Studies* **1953**, *2*, 36.
100. B. Rosenberg, L. Van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents, *Nature* **1965**, *222*, 385.
101. L. Helm, A. E. Merbach, Water exchange on metal ions: experiments and simulations, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *187*, 151.
102. G. Mestroni, E. Alessio, A. Sessanti o Santi, S. Geremia, A. Bergamo, G. Sava, A. Boccarelli, A. Schettino, M. Coluccia, Rhodium(III) analogues of antitumour-active ruthenium(III) compounds: The crystal structure of [ImH][trans-RhCl₄(Im)₂] (Im=imidazole), *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *273*, 62.
103. L. Messori, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, P. Zanello, A. Bergamo, G. Sava, P. Mura, molecular structure, solution chemistry and biological properties of the novel [ImH][trans-IrCl(Im)(DMSO)], (I) and of the orange form of 4 [(DMSO)H][trans-IrCl(DMSO)], (II), complexes, *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *95*, 37.
104. P. Qu, H. He, X. Liu, Antitumor activity and mechanism of rhodium complexes, *Prog. Chem.* **2006**, *18*, 1646.
105. R. G. Hughes, J. L. Bear, A. P. Kimball, Synergistic effect of rhodium(II) acetate and anabinosylcyto-sine on L210, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **1972**, *13*, 120.
106. M. J. Cleare, P. C. Hydes, *Metal Ions in Biological Systems*, Marcel Dekker, New York, **1980**, 1.
107. M. J. Cleare, Transition metal complexes in cancer chemotherapy, *Coord. Chem. Rev.* **1974**, *12*, 349.
108. M. Harlos, I. Ott, R. Gust, H. Alborzinia, S. Wölfl, A. Kromm, W. S. Sheldrick, Synthesis, Biological Activity, and Structure–Activity Relationships for Potent Cytotoxic Rhodium(III) Polypyridyl Complexes, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3024.
109. Y. Geldmacher, K. Splith, I. Kitanovic, H. Alborzinia, S. Can, R. Rubbiani, Mhd.A. Nazif, P. Wefelmeier, A. Prokop, I. Ott, S. Wölfl, I. Neundorf, W. S. Sheldrick, Cellular impact and selectivity of half-sandwich organorhodium(III) anticancer complexes and their organoiridium(III) and trichloridorhodium(III) counterparts, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17*, 631.
110. M. Dobroschke, Y. Geldmacher, I. Ott, M. Harlos, L. Kater, L. Wagner, R. Gust, W. S. Sheldrick, A. Prokop, Cytotoxic rhodium(III) and iridium(III) polypyridyl complexes: structure-activity relationships, antileukemic activity, and apoptosis induction, *Chem. Med. Chem.* **2009**, *4*, 177.
111. Y. Geldmacher, I. Kitanovic, H. Alborzinia, K. Bergerhoff, R. Rubbiani, P. Wefelmeier, A. Prokop, R. Gust, I. Ott, S. Wölfl, W. S. Sheldrick, Cellular Selectivity and Biological

- Impact of Cytotoxic Rhodium(III) and Iridium(III) Complexes Containing Methyl-Substituted Phenanthroline Ligands, *Chem. Med. Chem.* **2011**, 6, 429.
112. P. Colamarino, P. Orioli, Crystal and molecular structure of trichloro(dimethyl sulphoxide)bispyridinerhodium(III), *Dalton Trans.* **1976**, 845.
113. F. P. Pruchnik, P. Jakimowicz, Z. Ciunik, J. Zakrewska-Czerwinska, A. Oplolski, J. Wietrzyk, E. Wojdat, Rhodium(III) complexes with polypyridyls and pyrazole and their antitumor activity, *Inorg. Chim. Acta* **2002**, 334, 59.
114. D. A. Medvetz, K. D. Satkheff, T. Schreiber, P. D. Custer, K. Hindi, M. D. Panzner, D. D. Blanco, M. J. Taschner, C. A. Tessier, W. J. Youngs, Ovarian Cancer Activity of Cyclic Amine and Thiaether Metal Complexes, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 1703.
115. F. P. Dwyer, E. Mayhew, E. M. F. Roe, A. Shulman, Inhibition of Landschütz Ascites Tumour Growth by Metal Chelates Derived from 3,4,7,8-Tetramethyl-1,10-phenanthroline, *Br. J. Cancer* **1965**, 19, 195.
116. L. Salassa, Polypyridyl Metal Complexes with Biological Activity, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, 2011, 4931.
117. M. A. Scharwitz, I. Ott, R. Gust, A. Kromm, W. S. Sheldrick, Synthesis, cellular uptake and structure-activity relationships for potent cytotoxic trichloridoiridium(III) polypyridyl complexes, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102, 1623.
118. M. Oleszak, Design und zelluläre Effekte von zytotoxischen Rhodium(III)- und Iridium(III)-Komplexen mit substituierten 1,10-Phenanthrolin-Liganden, *Dissertation*, Ruhr-Universität Bochum, **2009**.
119. R. Bieda, I. Ott, R. Gust, W. S. Sheldrick, Cytotoxic rhodium(III) polypyridyl complexes containing the tris(pyrazolyl)methane coligand: synthesis, DNA binding properties and structure-activity relationships, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 102, 3821.
120. J. C. Martinou, D. R. Green, Breaking the mitochondrial barrier, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, 2, 63.
121. U. Śliwińska, F. P. Pruchnik, I. Pelińska, S. Ułaszewski, A. Wilczok, A. Zajdel, Synthesis, structure and antitumor activity of [RhCl₃(N-N)(DMSO)] polypyridyl complexes, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102, 1947.
122. E. L. Menon, R. Perera, M. Navarro, R. J. Kuhn, H. Morrison, Phototoxicity against Tumor Cells and Sindbis Virus by an Octahedral Rhodium Bisbipyridyl Complex and Evidence for the Genome as a Target in Viral Photoinactivation, *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 5373.
123. D. Loganathan, H. Morrison, Effect of ring methylation on the photophysical, photochemical and photobiological properties of cis-dichlorobis(1,10-phenanthroline)rhodium(III)Chloride, *Photochem. Photobiol.* **2006**, 82, 237.
124. M. R. Kim, H. Morrison, S. I. Mohammed, Effect of a photoactivated rhodium complex in melanoma, *Anti-Cancer Drugs* **2011**, 22, 896.
125. L. Dadci, H. Elias, U. Frey, A. Hörnig, U. Koelle, A. F. Merbach, H. Paulus, J. S. Schneider, π -Arene Aqua Complexes of Cobalt, Rhodium, Iridium, and Ruthenium: Preparation, Structure, and Kinetics of Water Exchange and Water Substitution, *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 306.
126. Z. Liu, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, S. A. Fletcher, A. Kisova, O. Vrana, L. Salassa, P. C. A. Bruijninx, G. J. Clarkson, V. Brabec, P. J. Sadler, Organometallic half-sandwich iridium anticancer complexes, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 3011.
127. S. Schäfer, I. Ott, R. Gust, W. S. Sheldrick, Influence of the polypyridyl (pp) ligand size on the DNA binding properties, cytotoxicity and cellular uptake of organoruthenium(II) complexes of the types $[(\eta^6\text{-C}_6\text{Me}_6)\text{Ru}(\text{L})(\text{pp})]^n+$ (L = Cl, n = 1; L = (NH₂)₂CS, n = 2), *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 3034.

128. Y. Geldmacher, K. Splith, I. Kitanovic, H. Alborzinia, S. Can, R. Rubbiani, Mhd. A. Nazif, P. Wefelmeier, A. Prokop, I. Ott, S. Wölfl, I. Neundorf, W. S. Sheldrick, Cellular impact and selectivity of half-sandwich organorhodium(III) anticancer complexes and their organoiridium(III) and trichloridorhodium(III) counterparts, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17*, 631.
129. A. Gilewska, B. Barszcz, J. Masternak, K. Kazimierzczuk, J. Sitkowski, J. Wietrzyk, E. Turlej, Similarities and differences in d6 low-spin ruthenium, rhodium and iridium half-sandwich complexes: synthesis, structure, cytotoxicity and interaction with biological targets, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2019**, *24*, 591.
130. S. Wirth, C. J. Rohbogner, M. Cieslack, J. Kazmierczak-Baranska, S. Donevski, B. Nawrot, I. P. Lorenz, Rhodium(III) and iridium(III) complexes with 1,2-naphthoquinone-1-oximate as a bidentate ligand: Synthesis, structure, and biological activity, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 429.
131. U. Sliwinska, F.P. Pruchnik, S. Ulaszewski, M. Latocha, D. Nawrocka-Musial, Properties of η^5 -pentamethylcyclopentadienyl rhodium(III) and iridium(III) complexes with quinolin-8-ol and their cytostatic activity, *Polyhedron* **2010**, *29*, 1653.
132. Y. Geldmacher, R. Rubbiani, P. Wefelemeier, A. Prokop, I. Ott, W. S. Sheldrick, Synthesis and DNA-binding properties of apoptosis-inducing cytotoxic half-sandwich rhodium(III) complexes with methyl-substituted polypyridyl ligands, *J. Organomet. Chem.* **2011**, *696*, 1023.
133. S. C. Rowle, G. Adams, S. R. Cooper, Crown thioether chemistry. Synthesis and structural investigation of 1,5,9-trithiacyclododecane (trithia-12-crown-3) and its copper(II) chloride adduct, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1988**, 93.
134. C. Landgrafe, W. S. Sheldrick, Structure and reactions of the thioether half-sandwich ruthenium(II) complexes $[\text{Ru}(\text{MeCN})_3([\text{9}] \text{aneS}_3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2$ and $[\text{Ru}(\text{MeCN})_2(\text{PPh}_3)([\text{9}] \text{aneS}_3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2([\text{9}] \text{aneS}_3= 1,4,7\text{-trithiacyclononane})$, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 1885.
135. K. Brandt, W. S. Sheldrick, Synthesis, structure and reactivity of the thioether half-sandwich rhodium(III) complex $[\text{RhCl}(\text{MeCN})_2([\text{9}] \text{aneS}_3)][\text{CF}_3\text{SO}_3]_2([\text{9}] \text{aneS}_3= 1,4,7\text{-trithiacyclononane})$, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 1237.
136. R. Bieda, I. Ott, M. Dobroschke, A. Prokop, R. Gust, W. S. Sheldrick, Structure-activity relationships and DNA binding properties of apoptosis inducing cytotoxic rhodium(III) polypyridyl complexes containing the cyclic thioether $[\text{9}] \text{aneS}(3)$, *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 698.
137. R. Bieda, M. Dobroschka, A. Triller, I. Ott, M. Spehr, R. Gust, A. Prokop, W. S. Sheldrick, Cell-Selective, Apoptosis-inducing Rhodium(III) Crown Thiaether Complexes, *Chem. Med. Chem.* **2010**, *5*, 1123.
138. R. Bieda, I. Kitanovic, H. Alborzinia, A. Meyer, I. Ott, S. Wölfl, W. S. Sheldrick, Antileukemic activity and cellular effects of rhodium(III) crown thiaether complexes, *Biomaterials* **2011**, *24*, 645.
139. Z. Liu, L. Salassa, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, G. J. Clarkson, P. J. Sadler, Contrasting reactivity and cancer cell cytotoxicity of isoelectronic organometallic iridium(III) complexes, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 5777.
140. Z. Liu, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, G. J. Clarkson, P. J. Sadler, Organometallic Iridium(III) Cyclopentadienyl Anticancer Complexes Containing C,N-Chelating Ligands, *Organometallics* **2011**, *30*, 4702.
141. R. Bieda, I. Ott, R. Gust, W. S. Sheldrick, Cytotoxic Rhodium(III) Polypyridyl Complexes Containing the Tris(pyrazolyl)methane Coligand: Synthesis, DNA Binding Properties and Structure–Activity Relationships, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, *25*, 3821.
142. R. Bieda, *Dissertation*, Ruhr-Universität Bochum, **2010**.

143. A. Wilbuer, D. H. Vlecken, D. J. Scmitz, K. Krähling, K. Harms, C. P. Bagowski, E. Meggers, Iridium Complex with Antiangiogenic Properties, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3839.
144. A. Kastl, A. Wilbuer, A.L. Merkel, L. Feng, P. D. Fazio, M. Ocker, E. Meggers, Dual anticancer activity in a single compound: visible-light-induced apoptosis by an antiangiogenic iridium complex, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1863.
145. A. Vessieres, S. Top, W. Beck, E. Hillard, G. Jaouen, Metal complex SERMs (selective oestrogen receptor modulators). The influence of different metal units on breast cancer cell antiproliferative effects, *Dalton Trans.* **2006**, *4*, 529.
146. J. E. Debreceni, A. Bullock, G. E. Attila, D. S. Williams, H. Bregman, S. Knapp, E. Meggers, Ruthenium half-sandwich complexes bound to protein kinase Pim-1, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1580.
147. G. I. Pascu, A. C. G. Hotze, C. Sanchez-Cano, B. M. Kariuki, M. J. Hannon, Dinuclear ruthenium(II) triple-stranded helicates: luminescent supramolecular cylinders that bind and coil DNA and exhibit activity against cancer cell lines, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 4374.
148. K. K.-W. Lo, P.-K. Lee, J. S.-Y. Lau Synthesis, characterization, and properties of luminescent organoiridium(III) polypyridine complexes appended with an alkyl chain and their interactions with lipid bilayers, surfactants, and living cells, *Organometallics* **2008**, *27*, 2998.
149. J. S.-Y. Lau, P.-K. Lee, K. H.-K. Tsang, C. H.-C. Ng, Y.-W. Lam, S.-H. Cheng, K. K.-W. Lo, Luminescent Cyclometalated Iridium(III) Polypyridine Indole Complexes—Synthesis, Photophysics, Electrochemistry, Protein-Binding Properties, Cytotoxicity, and Cellular Uptake, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 708.
150. K. Y. Zhang, K. K.-W. Lo, Synthesis, Properties, and live-cell imaging studies of luminescent cyclometalated iridium(III) polypyridine complexes containing two or three biotin pendants, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 6011.
151. S.-K. Leung, K. Y. Kwok, K. Y. Zhang, K. K.-W. Lo, Design of Luminescent Biotinylation Reagents Derived from Cyclometalated Iridium(III) and Rhodium(III) Bis(pyridylbenzaldehyde) Complexes, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 4984.
152. B. A. Jackson, J. K. Barton, Recognition of DNA Base Mismatches by a Rhodium Intercalator, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12986.
153. F. Hackenberg, L. Oehninger, H. Alborzinia, S. Can, I. Kitanovic, Y. Geldmacher, M. Kokoschka, S. Wölfl, I. Ott, W. S. Sheldrick, Highly cytotoxic substitutionally inert rhodium(III) tris(chelate) complexes: DNA binding modes and biological impact on human cancer cells, *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 991.
154. C. Demopoulos, R. Pinckard, D. Hanahan, Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-snglycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipidchemical mediators), *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 9355.
155. V. D. Papakonstantinou, N. Lagopati, E. C. Tsilibary, C. A. Demopoulos, A. I. Philippopoulos, A review on platelet activating factor inhibitors: could a new class of potent metal-based anti-inflammatory drugs induce anticancer properties?, *Bioinorg. Chem. Appl.* **2017**, *1*, 6947034.
156. G.-J. Fan, Y.-H. Kang, Y. N. Han, B. H. Han, Platelet-activating factor (PAF) receptor binding antagonists from *Alpinia officinarum*, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **2007**, *17*, 6720.
157. A. K. Mukherjee, S. P. Mackessy, Biochemical and pharmacological properties of a new thrombin-like serine protease (Russelobin) from the venom of Russell's Viper (*Daboia russelii russelii*) and assessment of its therapeutic potential, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2013**, *1830*, 3476.

158. A. B. Tsoupras, A. Papakyriakou, C. A. Demopoulos, A. I. Philippopoulos, Synthesis, biochemical evaluation and molecular modeling studies of novel rhodium complexes with nanomolar activity against Platelet Activating Factor, *J. Inorg. Biochem.* **2013**, 120, 63.
159. A. I. Philippopoulos, N. Tsantila, C. A. Demopoulos, C. P. Raptopoulou, V. Likodimos, P. Falaras, Synthesis, characterization and crystal structure of the cis-[RhL₂Cl₂]Cl complex with the bifunctional ligand (L) 2-(20-pyridyl) quinoxaline. Biological activity towards PAF (Platelet Activating Factor) induced platelet aggregation, *Polyhedron* **2009**, 28, 3310.
160. A. Margariti, V. D. Papakonstantinou, G. M. Stamatakis, C. A. Demopoulos, G. Schnakenburg, A. K. Andreopoulou, P. Giannopoulos, J. K. Kallitsis, A. I. Philippopoulos, Substituted pyridine-quinoline ligands as building blocks for neutral rhodium (III) complexes. Synthesis, structural characterization studies and anti-platelet activity towards the Platelet-Activating Factor (PAF), *Polyhedron* **2020**, 178, 114336.
161. S. Antonopoulou, T. Nomikos, H. C. Karantonis, E. Fragopoulou, C. Demopoulos, *PAF, a Potent Lipid Mediator, Bioactive Phospholipids: Role in Inflammation and Atherosclerosis*, A. D. Tselepis, Ed., Transworld Research Network, Kerala, **2008**, 85.
162. T. A. Jarvinen, M. Tanner, V. Rantanen, M. Barlund, Å. Borg, S. Grenman, J. Isola, Amplification and deletion of topoisomerase IIa associate with ErbB- 2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer, *Am. J. Pathol.* **2000**, 156, 839.
163. M. S. Legina, J. J. Nogueira, W. Kandioller, M. A. Jakupec, L. Gonzalez, B. K. Keppler, Biological evaluation of novel thiomaltol-based organometallic complexes as topoisomerase IIa inhibitors, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2020**, 25, 451.
164. A. K. Larsen, A. E. Escargueil, A. Skladanowski, Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy, *Pharmacol. Ther.* **2003**, 99, 167.
165. M. Schmidlehner, L. S. Flocke, A. Roller, M. Hejl, M. A. Jakupec, W. Kandioller, B. K. Keppler, Cytotoxicity and preliminary mode of action studies of novel 2- aryl-4-thiopyrone-based organometallics, *Dalton Trans.* **2016**, 45, 724.
166. T. Akiyama, S. Wakabayashi, A. Soma, S. Sato, Y. Nakatake, M. Oda, M. Murakami, M. Sakota, N. Chikazawa-Nohtomi, S. B. Ko, Transient ectopic expression of the histone demethylase JMJD3 accelerates the differentiation of human pluripotent stem cells, *Development* **2016**, 143, 3674.
167. D. Yang, H. Okamura, J. Teramachi, T. Haneji, Transient ectopic expression of the histone demethylase JMJD3 accelerates the differentiation of human pluripotent stem cells, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2016**, 1863, 650.
168. T.-S. Kang, C.-N. Ko, J.-T. Zhang, C. Wu, C.-Y. Wong, D.-L. Ma, C.-H. Leung, Rhodium (III)-based inhibitor of the JMJD3-H3K27me3 interaction and modulator of the inflammatory response, *Inorg. Chem.* **2018**, 57, 14023.
169. H. U. M. Kaniskan, M. L. Martini, Inhibitors of protein methyltransferases and demethylases, J. Jin, *Chem. Rev.* **2018**, 118, 989.
170. G.-J. Yang, C.-N. Ko, H.-J. Zhong, C.-H. Leung, D.-L. Ma, Structure-based discovery of a selective KDM5A inhibitor that exhibits anti-cancer activity via inducing cell cycle arrest and senescence in breast cancer cell lines, *Cancers* **2019**, 11, 92.
171. G. J. Yang, W. Wang, S. W. F. Mok, C. Wu, B. Y. K. Law, X. M. Miao, K. J. Wu, H. J. Zhong, C. Y. Wong, V. K. W. Wong, Selective inhibition of lysine-specific demethylase 5A (KDM5A) using a rhodium (III) complex for triple-negative breast cancer therapy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 13091.

172. L. P. Saunders, A. Ouellette, R. Bandle, W. C. Chang, H. Zhou, R. N. Misra, M. Enrique, D. T. Braddock, Identification of small-molecule inhibitors of autotaxin that inhibit melanoma cell migration and invasion, *Mol. Canc. Therapeut.* **2008**, 7, 3352.
173. H.-J. Zhong, L. Lu, K.-H. Leung, C. C. Wong, C. Peng, S.-C. Yan, D.-L. Ma, Z. Cai, H.-M. D. Wang, C.-H. Leung, An iridium (III)-based irreversible protein-protein interaction inhibitor of BRD4 as a potent anticancer agent, *Chem. Sci.* **2015**, 6, 5400.
174. L. Lu, L.-J. Liu, W.-c. Chao, H.-J. Zhong, M. Wang, X.-P. Chen, J.-J. Lu, R.-N. Li, D.-L. Ma, C.-H. Leung, Identification of an iridium (III) complex with antibacterial and anti-cancer activity, *Sci. Rep.* **2015**, 5, 1.
175. I. Melnikova, J. Golden, Targeting protein kinases, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 993.
176. P. Cohen, Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century?, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 309.
177. S. Mollin, R. Riedel, K. Harms, E. Meggers, Octahedral rhodium (III) complexes as kinase inhibitors: control of the relative stereochemistry with acyclic tridentate ligands, *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 148, 11.
178. R. Rajaratnam, E. K. Martin, M. Dorr, K. Harms, A. Casini, E. Meggers, Correlation between the stereochemistry and bioactivity in octahedral rhodium prolinato complexes, *Inorg. Chem.* **2015**, 54, 8111.
179. D. R. Kellogg, Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division, *J. Cell Sci.* **2003**, 116, 4883.
180. K. Do, J.H. Doroshow, S. Kummar, Wee1 kinase as a target for cancer therapy, *Cell Cycle* **2013**, 12, 3348.
181. G.-J. Yang, H.-J. Zhong, C.-N. Ko, S.-Y. Wong, K. Vellaisamy, M. Ye, D.-L. Ma, C.-H. Leung, Identification of a rhodium (III) complex as a Wee1 inhibitor against TP53-mutated triple-negative breast cancer cells, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 2463.
182. M. Hanif, A. A. Nazarov, C. G. Hartinger, W. Kandioller, M. A. Jakupec, V. B. Arion, P. J. Dyson, B. K. Keppler, Osmium(II)–versus ruthenium(II)–arene carbohydrate-based anticancer compounds: similarities and differences, *Dalton Trans.* **2010**, 39, 7345.
183. J. G. E. Büchel, A. Gavriluta, M. Novak, S. M. Meier, M. A. Jakupec, O. Cuzan, C. Turta, V. B. A. B. Tommasino, E. Jeanneau, G. Novitchi, D. Luneau, Striking difference in antiproliferative activity of ruthenium- and osmium-nitrosyl complexes with azole heterocycles, *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 6273.
184. I. N. Stepanenko, B. Cebrián-Losantos, V. B. Arion, A. A. Krokhin, A. A. Nazarov, B. K. Keppler, The complexes $[\text{OsCl}_2(\text{azole})_2(\text{dmso})_2]$ and $[\text{OsCl}_2(\text{azole})(\text{dmso})_3]$: synthesis, structure, spectroscopic properties and catalytic hydration of chloronitriles, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 2, 400.
185. G. E. Büchel, I. N. Stepanenko, M. Hejl, M. A. Jakupec, B. K. Keppler, V. B. Arion, En route to osmium analogues of KP1019: synthesis, structure, spectroscopic properties and antiproliferative activity of trans- $[\text{Os}(\text{IV})\text{Cl}_4(\text{Hazole})_2]$, *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 7690.
186. A. F. A. Peacock, P. J. Sadler, the complexes $[\text{OsCl}_2(\text{azole})_2(\text{dmso})_2]$ and $[\text{OsCl}_2(\text{azole})(\text{dmso})_3]$: synthesis, structure, spectroscopic properties and catalytic hydration of chloronitriles, *Chem. - An Asian J.* **2008**, 3, 1890.
187. D. Colangelo, A. L. Ghiglia, A. R. Ghezzi, M. Ravera, E. Rosenberg, F. Spada, D. Osella, Water-soluble benzoheterocycle triosmium clusters as potential inhibitors of telomerase enzyme, *ChemMedChem J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99, 505.
188. K. V. Kong, W. K. Leong, S. P. Ng, T. H. Nguyen, L. H. K. Lim, Osmium carbonyl clusters: a new class of apoptosis inducing agents, *Chem. Med. Chem.* **2008**, 3, 1269.
189. K. V. Kong, W. K. Leong, L. H. K. Lim, Osmium carbonyl clusters containing labile ligands hyperstabilize microtubules, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, 22, 1116.

190. N. P. E. Barry, F. Edafe, P. J. Dyson, B. Therrien, Osmium carbonyl clusters containing labile ligands hyperstabilize microtubules, *Dalton Trans.* **2010**, 39, 2816.
191. C. G. Hartinger, A. D. Phillips, A. A. Nazarov, Polynuclear ruthenium, osmium and gold complexes. The quest for innovative anticancer chemotherapeutics, *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, 11, 2688.
192. B. Cebrián-Losantos, A. A. Krokhin, I. N. Stepanenko, R. Eichinger, M. A. Jakupec, V. B. Arion, B. K. Keppler, Osmium NAMI-A analogues: synthesis, structural and spectroscopic characterization, and antiproliferative properties, *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 5023.
193. A. Egger, B. Cebrián-Losantos, I. N. Stepanenko, A. A. Krokhin, R. Eichinger, M. A. Jakupec, V. B. Arion, B. K. Keppler, Hydrolysis and cytotoxic properties of osmium(II)/(III)-DMSO-azole complexes, *Chem. Biodiversity* **2008**, 5, 1588.
194. G. E. Büchel, S. Kossatz, A. Sadique, P. Rapt, M. Zalibera, L. Bucinsky, S. Komorovsky, J. Telser, J. Eppinger, T. Reiner, V. B. Arion, cis-Tetrachlorido-bis(indazole)osmium(IV) and its osmium(III) analogues: paving the way towards the cis-isomer of the ruthenium anticancer drugs KP1019 and/or NKP1339, *Dalton Trans.* **2017**, 46, 11925.
195. G. E. Büchel, I. N. Stepanenko, M. Hejl, M. A. Jakupec, B. K. Keppler, P. Heffeter, W. Berger, V. B. Arion,) Osmium(IV) complexes with 1H- and 2H-indazoles: tautomer identity versus spectroscopic properties an antiproliferative activity, *J. Inorg. Biochem.* **2012**, 113, 47.
196. C. G. Hartinger, M. A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessl, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P. J. Dyson, B. K. Keppler, KP1019, a new redox-active anticancer agent: preclinical development and results of a clinical phase i study in tumor patients, *Chem. Biodiversity* **2008**, 5, 2140.
197. P. S. Kuhn, G. E. Büchel, K. K. Jovanović, L. Filipović, S. Radulović, P. Rapt, V. B. Arion, Osmium(III) analogues of KP1019: electrochemical and chemical synthesis, spectroscopic characterization, X-ray crystallography, hydrolytic stability, and antiproliferative activity, *Inorg. Chem.* **2014**, 53, 11130.
198. U. Jungwirth, C. R. Kowol, B. K. Keppler, C. G. Hartinger, W. Berger, P. Heffeter, Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes, *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, 15, 1085.
199. Y. Fu, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, S. H. van Rij, D. J. Healey, P. A. Cooper, S. D. Shnyder, G. J. Clarkson, P. J. Sadler, Organometallic osmium arene complexes with potent cancer cell cytotoxicity, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 8192.
200. A. Bergamo, A. Masi, A. F. A. Peacock, A. Habtemariam, P. J. Sadler, G. Sava, In vivo tumour and metastasis reduction and in vitro effects on invasion assays of the ruthenium RM175 and osmium AFAP51 organometallics in the mammary cancer model, *J. Inorg. Biochem.* **2010**, 104, 79.
201. S. D. Shnyder, Y. Fu, A. Habtemariam, S. H. van Rij, P. A. Cooper, P. M. Loadmana, P. J. Sadler, Anti-colorectal cancer activity of an organometallic osmium arene azopyridine complex, *Med. Chem. Comm.* **2011**, 2, 666.
202. Y. Fu, A. Habtemariam, A. M. B. H. Basri, D. Braddick, G. J. Clarkson, P. J. Sadler, Structure-activity relationships for organometallic osmium arene phenylazopyridine complexes with potent anticancer activity, *Dalton Trans.* **2011**, 40, 10553.
203. Y. Fu, M. J. Romero, A. Habtemariam, M. E. Snowden, L. Song, G. J. Clarkson, B. Qamar, A. M. Pizarro, P. R. Unwina, P. J. Sadler, The contrasting chemical reactivity of potent isoelectronic iminopyridine and azopyridine osmium(II) arene anticancer complexes, *Chem. Sci.* **2012**, 3, 2485.

204. I. Romero-Canelón, L. Salassa, P. J. Sadler, The contrasting activity of iodido versus chlorido ruthenium and osmium arene azo- and imino-pyridine anticancer complexes: control of cell selectivity, cross-resistance, p53 dependence, and apoptosis pathway, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 1291.
205. S. H. van Rijt, A. F. Peacock, R. D. Johnstone, S. Parsons, P. J. Sadler, Organometallic osmium(II) arene anticancer complexes containing picolinate derivatives, *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 1753.
206. A. F. A. Peacock, S. Parsons, P. J. Sadler, Tuning the hydrolytic aqueous chemistry of osmium arene complexes with N,O-chelating ligands to achieve cancer cell cytotoxicity, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 3348.
207. S. H. van Rijt, A. Mukherjee, A. M. Pizarro, P. J. Sadler, Cytotoxicity, hydrophobicity, uptake, and distribution of osmium(II) anticancer complexes in ovarian cancer cells, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 840.
208. S. H. van Rijt, H. Kostrhunova, V. Brabec, P. J. Sadler, Functionalization of osmium arene anticancer complexes with (poly)arginine: effect on cellular uptake, internalization, and cytotoxicity, *Bioconjug. Chem.* **2011**, 22, 218.
209. F. Barragán, D. Carrion-Salip, I. Gómez-Pinto, A. González-Cantó, P. J. Sadler, R. de Llorens, V. Moreno, C. González, A. Massaguer, V. Marchán, Somatostatin subtype-2 receptor-targeted metal-based anticancer complexes, *Bioconjug. Chem.* **2012**, 23, 1838.
210. G. Gasser, I. Ott, N. Metzler-Nolte, Organometallic Anticancer Compounds, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 3.
211. H. Kostrhunova, J. Florian, O. Novakova, A. F. A. Peacock, P. J. Sadler, V. Brabec, DNA interactions of monofunctional organometallic osmium(II) antitumor complexes in cell-free media, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 3635.
212. A. F. A. Peacock, A. Habtemariam, R. Fernández, V. Walland, F. P. A. Fabbiani, S. Parsons, R. E. Aird, D. I. Jodrell, P. J. Sadler, Tuning the reactivity of osmium(II) and ruthenium(II) arene complexes under physiological conditions, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1739.
213. M. Hanif, H. Henke, S. M. Meier, S. Martić, M. Labib, W. Kandoller, M. A. Jakupec, V. B. Arion, H.-B. Kraatz, B. K. Keppler, C. G. Hartinger, Is the reactivity of M(II)-arene complexes of 3-hydroxy-2(1H)-pyridones to biomolecules the anticancer activity determining parameter?, *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 7953.
214. M. G. Mendoza-Ferri, C. G. Hartinger, A. A. Nazarov, R. E. Eichinger, M. A. Jakupec, K. Severin, B. K. Keppler, Influence of the arene ligand, the number and type of metal centers, and the leaving group on the in vitro antitumor activity of polynuclear organometallic compounds, *Organometallics* **2009**, 28, 6260.
215. M. G. Mendoza-Ferri, C. G. Hartinger, M. A. Mendoza, M. Groessl, A. E. Egger, R. E. Eichinger, J. B. Mangrum, N. P. Farrell, M. Maruszak, P. J. Bednarski, F. Klein, M. A. Jakupec, A. A. Nazarov, K. Severin, B. K. Keppler, Transferring the concept of multinuclearity to ruthenium complexes for improvement of anticancer activity, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 916.
216. W.-X. Ni, W.-L. Man, S.-M. Yiu, M. Ho, M. T.-W. Cheung, C.-C. Ko, C.-M. Che, Y.-W. Lam, T.-C. Lau, Osmium(VI) nitrido complexes bearingazole heterocycles: a new class of antitumor agents, *Chem. Sci.* **2012**, 3, 1582.
217. Q. Tang, W.-X. Ni, C.-F. Leung, W.-L. Man, K. K.-K. Lau, Y. Liang, Y.-W. Lam, W.-Y. Wong, S.-M. Peng, G.-J. Liu, T.-C. Lau, Synthesis and antitumor activity of a series of osmium(VI) nitrido complexes bearing quinolinolato ligands, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 9980.

218. K. Suntharalingam, T. C. Johnstone, P. M. Bruno, W. Lin, M. T. Hemann, S. J. Lippard, Bidentate ligands on osmium(VI) nitrido complexes control intracellular targeting and cell death pathways, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14060.
219. W.-X. Ni, W.-L. Man, M. T.-W. Cheung, R. W.-Y. Sun, Y.-L. Shu, Y.-W. Lam, C.-M. Che, T.-C. Lau, Osmium(VI) complexes as a new class of potential anti-cancer agents, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2140.
220. H. Z. S. Lee, W. K. Leong, S. Top, A. Vessi res, Cytotoxic triosmium carbonyl clusters: a structure–activity relationship study, *Chem. Med. Chem.* **2014**, *9*, 1453.
221. A. Dorcier, P. J. Dyson, C. Gossens, U. Rothlisberger, R. Scopelliti, I. Tavernelli, Binding of organometallic ruthenium(II) and osmium(II) complexes to an oligonucleotide: A combined mass spectrometric and theoretical study, *Organometallics* **2005**, *24*, 2114.
222. A. Dorcier, W. H. Ang, S. Bola o, L. Gonsalvi, L. Juillerat-Jeannerat, G. Laurenczy, M. Peruzzini, A. D. Phillips, F. Zanobini, P. Dyson, In vitro evaluation of rhodium and osmium RAPTA analogues: the case for organometallic anticancer drugs not based on ruthenium, *J. Organometallics* **2006**, *25*, 4090.
223. A. Dorcier, C. G. Hartinger, R. Scopelliti, R. H. Fish, B. K. Keppler, P. J. Dyson, Studies on the reactivity of organometallic Ru-, Rh- and Os-pta complexes with DNA model compounds, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1066.
224. T. Nabiyeva, C. Marschner, B. Blom, Synthesis, structure and anti-cancer activity of osmium complexes bearing π -bound arene substituents and phosphane Co-Ligands: A review, *Eur. J. Med. Chem* **2020**, *201*, 112483.
225. K. J. Kilpin, S. Crot, T. Riedel, J. A. Kitchen, P. J. Dyson, Ruthenium(II) and osmium(II) 1,2,3-triazolylidene organometallics: a preliminary investigation into the biological activity of 'click' carbene complexes, *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 1443.
226. N. R. Jadhav, S. P. Bhosale, S. S. Bhosale, S. D. Mali, P. B. Toraskar, T. S. Kadam, Ionic liquids: Formulation avenues, drug delivery and therapeutic updates, *J. Drug Del. Sci.* **2021**, *65*, 102694.
227. M. Goto, M. Moniruzzaman, *Application of Ionic Liquids in Drug Delivery*, Springer, **2021**.
228. B. Altava, S. V. Luis, E. Garc a-Verdugo, R. Porcar, Chapter 12 - Application of ionic liquids in pharmaceuticals and medicine, In Foundations and Frontiers in Enzymology, Biocatalysis in Green Solvents, Academic Press, **2022**, 317.
229. Y. Hu, Y. Xing, H. Yue, T. Chen, Y. Diao, W. Wei, S. Zhang, Ionic liquids revolutionizing biomedicine: recent advances and emerging opportunities, *Chem. Soc. Rev.* **2023**, *52*, 7262.
230. A. M. Curreri, S. Mitragotri, E. E. L. Tanner, Recent Advances in Ionic Liquids in Biomedicine, *Adv. Sci.* **2021**, *8*, 2004819.
231. K. S. Egorova, E. G. Gordeev, V. P. Ananikov, Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceuticals and Medicine, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7132.
232. Y. Zhuo, H.-L. Cheng, Y.-G. Zhao, H.-R. Cui, Ionic Liquids in Pharmaceutical and Biomedical Applications: A Review, *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 151.
233. S. N. Pedro, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre, M. G. Freire, The Role of Ionic Liquids in the Pharmaceutical Field: An Overview of Relevant Applications, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8298.
234. M. K. Shukla, H. Tiwari, R. Verma, W. L. Dong, S. Azizov, B. Kumar, S. Pandey, D. Kumar, Role and Recent Advancements of Ionic Liquids in Drug Delivery Systems. Pharmaceuticals, *Pharmaceutics*. **2023**, *15*, 702.
235. L. Jiang, Y. Sun, A. Lu, X. Wang, Y. Shi, Ionic Liquids: Promising Approach for Oral Drug Delivery, *Pharm. Res.* **2022**, *39*, 2353.

236. X. Li, N. Ma, L. Zhang, G. Ling, P. Zhang, Applications of choline-based ionic liquids in drug delivery, *Int. J. Pharm.* **2022**, 612, 121366.
237. P. Uniyal, S. Das, S. Panwar, N. Kukreti, P. Nainwal, R. Bhatia, . A Comprehensive Review on Imperative Role of Ionic Liquids in Pharmaceutical Sciences, *Curr. Drug Deliv.* **2024**, 21, 1197.
238. I. Ali, M. Hozafa, S. Ali, A. Malik, M. Locatelli, Advances in ionic liquids as future anti-cancer drugs, *J. Mol. Liq.* **2023**, 388, 122823.
239. Y. Shi, Z. Zhao, K. Peng, Y. Gao, D. Wu, J. Kim, S. Mitragotri, Enhancement of Anticancer Efficacy and Tumor Penetration of Sorafenib by Ionic Liquids, *Adv. Healthc Mater.* **2021**, 10, e2001455.
240. Z. Lei, B. Chen, Y.-M. Koo, D. R. MacFarlane, Introduction: Ionic Liquids, *Chem. Rev.* **2017**, 117, 6633.
241. A. Tzani, M.-A. Karadendrou, S. Kalafateli, V. Kakokefalou, A. Detsi, , A. Current Trends in Green Solvents: Biocompatible Ionic Liquids, *Crystals* **2022**, 12, 1776.
242. X. Wu, H. Zhang, S. He, Q. Yu, Y. Lu, W. Wu, N. Ding, Q. Zhu, Z. Chen, Y. Ma, J. Qi, Improving dermal delivery of hyaluronic acid by ionic liquids for attenuating skin dehydration, *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 150, 528.
243. A. R. F. Carreira, T. Veloso, N. Schaeffer, J. L. Pereira, S. P. M. Ventura, C. Rizzi, J. Sirieix, H. Passos, A. P. Coutinho, Synthesis of Purine-Based Ionic Liquids and Their Applications, *Molecules* **2021**, 26, 6958.
244. K. Czerniak, J. Pernak, L-Carnitine-Based Bio-Ionic Liquids as Antioxidants, *Chemistryselect* **2021**, 6, 1994.
245. J. M. Gomes, S. S. Silva, R. L. Reis, Biocompatible ionic liquids: fundamental behaviours and applications, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, 48, 4317.
246. T. Welton, Ionic liquids: a brief history, *Biophys. Rev.* **2018**, 10, 691.
247. R. Md Moshikur, R. Chowdhury, M. Moniruzzaman, M. Goto, Biocompatible ionic liquids and their applications in pharmaceuticals, *Green Chem.* **2020**, 22, 8116.
248. J. M. Gomes, S. S. Silva, R. L. Reis, Biocompatible ionic liquids: fundamental behaviours and applications, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, 48, 4317.
249. B. L. Gadilohar, G. S. Shankarling, Choline based ionic liquids and their applications in organic transformation, *J. Mol. Liq.* **2017**, 227, 234.
250. S. Miao, R. Atkin, G. Warr, Design and applications of biocompatible choline amino acid ionic liquids, *Green Chem.* **2022**, 24, 7281.
251. X. Li, N. Ma, L. Zhang, G. Ling, P. Zhang, Applications of choline-based ionic liquids in drug delivery, *Int. J. Pharmaceut.* **2022**, 612, 121366.
252. J. Pernak, A. Syguda, I. Mirska, A. Pernak, J. Nawrot, A. Pradzynska, S. T. Griffin, R. D. Rogers, Choline-Derivative-Based Ionic Liquids, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 6817.
253. Y. Gao, F. Zhang, K. Huang, J.-W. Ma, Y.-T. Wu, Z.-B. Zhang, Absorption of CO₂ in amino acid ionic liquid (AAIL) activated MDEA solutions, *International Journal of Greenhouse Gas Control*, *Int. J. Greenh. Gas Con.* **2013**, 19, 379-386, 1750.
254. M. Ye, Y. Gu, *Amino Acids Ionic Liquids*. In: Encyclopedia of Ionic Liquids. Springer, Singapore, **2021**.
255. Choline, Fact Sheet for Health Professionals, <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Choline-HealthProfessional/>
256. M. Vranes, A. Tot, S. Papovic, D. Cetojevic-Simin, S. Markov, A. Velicanski, M. Popsavin, S. Gadzuric, Physico-chemical Features and Toxicity of Some Vitamin Based Ionic Liquids, *J. Mol. Liq.* **2017**, 247, 411.
257. A. Marić, P. Jovanov, S. Gadžurić, T. Trtić-Petrović, M. Sakač, A. Tot, M. Bertić, Milan Vraneš, Application of biodegradable cholinium ionic liquids for the extraction of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) from honey, *RSC Adv.* **2023**, 13, 32714.

258. P. Illner, S. Kern, S. Begela, R. van Eldik, Rapid ligand substitution reactions in ionic liquids studied by stopped-flow technique, *Chem. Commun.* **2007**, 45, 4803.
259. S. Kern, P. Illner, S. Begel, R. van Eldik, Mechanistic Studies on Fast Ligand-Substitution Reactions of a Very Labile PdII Complex in Several Ionic Liquids, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 29, 4658.
260. C. D. Hubbard, P. Illner, R. van Eldik, Understanding chemical reaction mechanisms in ionic liquids: successes and challenges, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 272.
261. M. Schmeissera, R. van Eldik, Elucidation of inorganic reaction mechanisms in ionic liquids: the important role of solvent donor and acceptor properties, *Dalton Trans.* **2014**, 43, 15675.
262. F. P. Pruchnik, P. Jakimowicz, Z. Ciunik, J. Zakrewska-Czerwinska, A. Oplolski, J. Wietrzyk, E. Wojdat, Rhodium(III) complexes with polypyridyls and pyrazole and their antitumor activity, *Inorg. Chim. Acta* **2002**, 334, 59.
263. J. Korzekwa, A. Scheurer, F. W. Heinemann, K. Meyer, Synthesis and characterization of uranium(IV) tetrachloro complexes in bis-pyrazolylpyridine ligand environments, *Dalton Trans.* **2017**, 46, 13811.
264. A. Wolfe, G. H. Shimer Jr, T. Meehan, Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA, *Biochemistry*, **1987**, 26, 6392.
265. S. Pavlović, B. Petrović, D. Čoćić, A. Schreurer, S. Sretenović, M. D. Nešić, M. Nišavić, Z. Maric, I. Stanisavljević, I. Čorović, B. Simović Marković, V. Maric, I. Jovanović, G. Radić, S. Radisavljević, S. Jovanović Stević, New Pd(ii)-pincer type complexes as potential antitumor drugs: synthesis, nucleophilic substitution reactions, DNA/HSA interaction, molecular docking study and cytotoxic activity, *Dalton Trans.* **2024**, 53, 18560.
266. A. Tarushi, E. Polatoglou, J. Kljun, I. Turel, G. Psomas, D. P. Kessissoglou, Interaction of Zn(II) with quinolone drugs: Structure and biological evaluation, *Dalton Trans.* **2011**, 40, 9461.
267. M. Vraneš, A. Tot, S. Papović, D. Četojević-Simin, S. Markov, A. Velićanski, M. Popsavin, S. Gadžurić, Physicochemical features and toxicity of some vitamin based ionic liquids, *J. Mol. Liq.* **2017**, 247, 411.
268. A. Z. Petrović, D. C. Čoćić, D. Bockfeld, M. Živanović, N. Milivojević, K. Virijejić, N. Janković, A. Scheurer, M. Vraneš, J. V. Bogojeski, Biological Activity of Bis(Pyrazolylpyridine) and Terpyridine Os(II) Complexes in the Presence of Biocompatible Ionic Liquids, *Inorg. Chem. Front.* **2021**, 8, 2749.
269. M. B. Vraneš, J. J. Panić, A. S. Tot, S. M. Ostojić, D. D. Četojević-Simin, N. Janković, S. B. Gadžurić, Synthesis and Thermophysical Characterization of New Biologically Friendly Agmatine-Based Ionic Liquids and Salts by Experimental and Computational Approach, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, 7, 10773.
270. A. Petrović, M. M. Milutinović, E. T. Petri, M. Živanović, N. Milivojević, R. Puchta, A. Scheurer, J. Korzekwa, O. R. Klisurić, J. Bogojeski, Synthesis of Camphor-Derived Bis(pyrazolylpyridine) Rhodium(III) Complexes: Structure–Reactivity Relationships and Biological Activity, *Inorg. Chem.* **2019**, 58, 307.
271. F. P. Pruchnik, P. Jakimowicz, Z. Ciunik, J. Zakrzewska-Czerwińska, A. Opolski, J. Wietrzyk, E. Wojdat, Rhodium(III) complexes with polypyridyls and pyrazole and their antitumor activity, *Inorg. Chim. Acta* **2002**, 334, 59.
272. H.-H. Schmidtke, Darstellung und Spektren einiger Rhodium (III)-Komplexverbindungen. IV. Triacido-Triammin-Rhodium(III)-Verbindungen, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1965**, 339, 103.

273. M. M. Milutinović, J. V. Bogojeski, O. Klisurić, A. Scheurer, S. K. C. Elmroth, Ž. D. Bugarčić, Synthesis and structures of a pincer-type rhodium(III) complex: reactivity toward biomolecules, *Dalton Trans.* **2016**, 45, 15481.
274. A. Z. Caković, D. S. Čoćić, M. Živanović, J. Pavić, K. Virijejić, N. Janković, M. Vraneš, J. V. Bogojeski, Effect of using biocompatible ionic liquids as cosolvents on the reactions of Rh(III) complexes with 5'-GMP, and CT-DNA, as well as on their cytotoxic effect, *Conference on advances in science and technology, Proceedings COAST 2022*, Maj 26-29, Herceg Novi, Montenegro **2022**, 346.
275. A. Caković, D. Čoćić, M. Živanović, N. Janković, N. Milivojević, M. Delibašić, M. Kostić, I. Radojević, M. Grujović, K. G. Marković, O. R. Klisurić, M. Vraneš, Jovana Bogojeski, Enhancing Bioactivity of *N,N,N*-Chelating Rhodium(III) Complexes with Ionic Liquids: Toward Targeted Cancer Therapy, *J. Med. Chem.* **2024**, 67, 13349.
276. A. Z. Caković, S. Radisavljević, D. C. Čoćić, M. Zaric, D. Petrović, A. Schreurer, S. Jovanovic-Stević, B. Petrović, N. Janković, M. Vraneš, J. V. Bogojeski, Ionic Liquids as Modulators of Biomolecular Interactions and Biological Activity of Rhodium(III) and Osmium(II) Complexes with Thiazole- and Pyridine-Based Ligands, непубликовани резултати
277. A. Petrović, M. Živanović, R. Puchta, D. Čoćić, A. Scheurer, N. Milivojević, J. Bogojeski, Experimental and Quantum Chemical Study on the DNA/Protein Binding and the Biological Activity of a Rhodium(III) Complex with 1,2,4-Triazole as an Inert Ligand, *Dalton Trans.* **2020**, 49, 9070.
278. J. V. Bogojeski, A. Z. Caković, B. Petrović, S. Jovanović Stević, A. Đeković, S. Radisavljević, D. Čoćić, S. Sretenović, I. R. Raković, I. D. Radojević, K. G. Marković, M. Ž. Grujović, Antimicrobial activity of Os(II) complexes containing *N,N,N*-inert ligands derivatives of pyrazyl-pyridine, *Conference on advances in science and technology, Proceedings COAST 2023*, Maj 31-June 03, Herceg Novi, Montenegro **2023**, 448.
279. Ž. Bugarčić, *Kinetika i mehanizam supstitucionih reakcija*, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, **1996**.
280. R. W. Hay, *Reaction Mechanisms of metal complexes*, Elsevier, England, **2000**.
281. F. Dimiza, S. Fountoulaki, A.N. Papadopoulos, C.A. Kontogiorgis, V. Tangoulis, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, A. Terzis, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, Non-steroidal antiinflammatory drug–copper(ii) complexes: Structure and biological perspectives, *Dalton Trans.* **2011**, 40, 8555.
282. E. A. Dolgoplova, A. A. Berseneva, M. S. Faillace, O. A. Ejegbavwo, G. A. Leith, S. W. Choi, H. N. Gregory, A. M. Rice, M. D. Smith, M. Chruszcz, S. Garashchuk, K. Mythreye, N. B. Shustova, Confinement-Driven Photophysics in Cages, Covalent–Organic Frameworks, Metal–Organic Frameworks, and DNA, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 4769.
283. J. R. Lakowicz, G. Weber, Quenching of Fluorescence by Oxygen. A Probe for Structural Fluctuations in Macromolecules, *Biochemistry* **1973**, 12, 4161.
284. D. D. Li, J. L. Tian, W. Gu, X. Liu, S. P. Yan, A novel 1,2,4-triazole-based copper(II) complex: Synthesis, characterization, magnetic property and nuclease activity, *J. Inorg. Biochem.* **2010**, 104, 171.
285. M. Jiang, Y. Li, Z. Wu, Z. Liu, C. Yan, Synthesis, crystal structure, cytotoxic activities and DNA-binding properties of new binuclear copper(II) complexes bridged by *N,N'*-bis(*N*-hydroxyethylaminoethyl)oxamide, *J. Inorg. Biochem.* **2009**, 103, 833.
286. M. Chauhan, K. Banerjee, F. Arjmand, Quenching of DNA-ethidium fluorescence by amsacrine and other antitumor agents: a possible electron-transfer effect, *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 3072.

287. S. Huang, H. Luo, W. Su, Q. Xiao, J. Xie, Comparative study of binding interactions between three organometallic rhodium(III) complexes with curcuminoid ligands and human serum albumin, *J. Mol. Recognit.* **2021**, 34, e2876.
288. J. Min, X. Meng-Xia, Z. Dong, L. Yuan, L. Xiao-Yu, C. Xing, Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin, *J. Mol. Struct.* **2004**, 692, 71.
289. R. Esteghamat-Panah, H. Hadadzadeh, H. Farrokhpour, J. Simpson, A. Abdolmaleki, F. Abyar, Synthesis, Structure, DNA/ Protein Binding, and Cytotoxic Activity of a Rhodium(III) Complex with 2,6-Bis(2-Benzimidazolyl)Pyridine, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 127, 958.
290. K. Wojtuszewski, I. Mukerji, HU Binding to Bent DNA: A Fluorescence Resonance Energy Transfer and Anisotropy Study, *Biochemistry* **2003**, 42, 3096.
291. Z. Cheng, Interaction of tetramethylpyrazine with two serum albumins by a hybrid spectroscopic method, *Spectrochim. Acta Part A*, **2012**, 93, 321.
292. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, third edition, Springer Science Business Media, New York, USA, **2006**.
293. C. A. Puckett, J. K. Barton, Methods to Explore Cellular Uptake of Ruthenium Complexes, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 46.
294. (a) A. D. Becke, Densityfunctional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Phys. Chem.* **1993**, 98, 5648. (b) C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B* **1988**, 37, 785. (c) P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski, M. J. Frisch, Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 11623. (d) T. H. Dunning Jr, P. J. Hay, *Modern Theoretical Chemistry*, third edition, Plenum, Press, New York, **1976**. (e) P. J. Hay, W. R. Wadt, Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg, *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 270. (f) P. J. Hay, W. R. Wadt, Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi, *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 284. (g) P. J. Hay, W. R. Wadt, Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals, *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 299. (h) S. Huzinaga, *Gaussian Basis Sets for Molecular Calculations*, Elsevier, Amsterdam, **1984**.
295. (a) O. Shyshov, R.-Ch. Brachvogel, T. Bachmann, R. Srikantharajah, D. Segets, F. Hampel, R. Puchta, M. von Delius, Adaptive Behavior of Dynamic Orthoester Cryptands, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 776. (b) S. Begel, A. Scheurer, R. Puchta, R. van Eldik, Host-Guest Complexes of [TriPip222], the Piperazine Analogue of [2.2.2]: Prediction of Ion Selectivity by Quantum Chemical Calculations VIII, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2016**, 642, 395. (c) S. Begel, A. Scheurer, R. Puchta, Saalfrank-type {Fe2L3} host-guest complexes – prediction of ion selectivity by quantum chemical calculations VII, *J. Coord. Chem.* **2015**, 68, 3374. (d) S. Begel, R. Puchta, R. van Eldik, Host-guest complexes of calix[4]tubes--prediction of ion selectivity by quantum chemical calculations VI, *J. Mol. Model.* **2014**, 20, 2200. (e) S. Begel, R. Puchta, R. van Eldik, Host-guest complexes of mixed glycol-bipyridine cryptands: prediction of ion selectivity by quantum chemical calculations, part V, *J. Org. Chem.* **2013**, 9, 1252. (f) M. Schmeisser, P. Illner, R. Puchta, A. Zahl, R. van Eldik, Gutmann Donor and Acceptor Numbers for Ionic Liquids, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 10969. (g) R. Puchta, R. Meier, N. J. R. van Eikema Hommes, R. van Eldik, Quantum Chemical Analysis of the Enantiomerisation Mechanism of Complexes of the Type [MII(XU)4]F⁺ (M = Pt, Pd, Ni; X = S, Se, Te; U = urea), *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 2006, 4063. (h) A. Scheurer, H. Maid, F. Hampel, R. W. Saalfrank, L. Toupet, P. Mosset, R. Puchta, N. J. R. van Eikema

- Hommes, Influence of the Conformation of Salen Complexes on the Stereochemistry of the Asymmetric Epoxidation of Olefins, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 205, 2566. (i) P. Illner, A. Zahl, R. Puchta, N. J. R. van Eikema Hommes, P. Wasserscheid, R. van Eldik, Mechanistic studies on the formation of Pt(II) hydroformylation catalysts in imidazolium-based ionic liquids, *J. Organomet. Chem.* **2005**, 690, 3567. (j) C. F. Weber, R. Puchta, N. J. R. van Eikema Hommes, P. Wasserscheid, R. van Eldik, Transition-State Effects of Ionic Liquids in Substitution Reactions of Pt(II) Complexes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 6033.
296. a) V. Barone, M. Cossi, Quantum calculation of molecular energies and energy gradients in solution by a conductor solvent model, *J. Phys. Chem. A.* **1998**, 102, 1995. b) M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, V. Barone, Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model, *J. Comp. Chem.* **2003**, 24, 669.
297. 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, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian 09, Revision C.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2010**.
298. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* **2009**, 30, 2785.
299. H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, 78, 2179.
300. A. Canals, M. Purciolas, J. Aymami, M. Colla, The anticancer agent ellipticine unwinds DNA by intercalative binding in an orientation parallel to base pairs, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2005**, 61, 1009.
301. A. Bujacz, Structures of bovine, equine and leporine serum albumin, *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2012**, 68, 1278.
302. R. Thomsen, M. H. Christensen, MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 3315.
303. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.
304. C. Auclair, E. Voisin, *Nitroblue tetrazolium reduction*. Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, CRC Press. **1985**.
305. P. Griess, Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt, Ueber einige Azoverbindungen, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1879**, 12, 426.
306. I. Rahman, A. Kode, S. K. Biswas, Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method, *Nat. Protoc.* **2007**, 1, 3159.

307. Z. Wang, M. Wu, S. Gou, Toward a better understanding of the oxaliplatin mode of action upon the steric hindrance of 1,2-diaminocyclohexane and its analogue, *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *157*, 1.
308. E. Petruzzella, A. Curci, N. Margiotta, G. Natile, J. D. Hoeschele, Kiteplatin: Differential binding between GSH and GMP, *Inorg. Chim. Acta* **2016**, *452*, 130.
309. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular biology of the cell*. forth edition, Garland Science, New York, **2002**.
310. B. J. Pages, D. L. Ang, E. P. Wright, J. R. Aldrich-Wright, Metal complex interactions with DNA, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 3505.
311. N. Kumar, R. Kaushal, P. Awasthi, Non-covalent binding studies of transition metal complexes with DNA: A review, *J. Mol. Struc.* **2023**, *1288*, 135751.
312. T. Topală, A. Bodoki, L. Oprean, R. Oprean, Experimental techniques employed in the study of metal complexes-dna-interactions, *Farmacia* **2014**, *62*, 6.
313. M. A. Rizvi, M. Zaki, M. Afzal, M. Mane, M. Kumar, B. A. Shah, S. Srivastav, S. Srikrishna, G. M. Peerzada, S. Tabassum, Nuclear blebbing of biologically active organoselenium compound towards human cervical cancer cell (HeLa): in vitro DNA/HSA binding, cleavage and cell imaging studies, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *90*, 876.
314. R. Galindo-Murillo, T. E. Cheatham III, Ethidium bromide interactions with DNA: an exploration of a classic DNA–ligand complex with unbiased molecular dynamics simulations, *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 3735.
315. A. A. Recio Despaigne, J. G. Da Silva, P. R. da Costa, R. G. dos Santos, H. Beraldo, ROS-Mediated Cytotoxic Effect of Copper(II) Hydrazone Complexes against Human Glioma Cells, *Molecules* **2014**, *19*, 17202.
316. S. Dhar, M. Nethaji, A. R. Chakravarty, Effect of charge transfer bands on the photo-induced DNA cleavage activity of [1-(2-thiazolylazo)-2-naphtholato]copper(II) complexes, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 805.
317. S. Verma, V. Ravichandiran, N. Ranjan, S. Flora, Recent Advances in Therapeutic Applications of Bisbenzimidazoles, *Med. Chem.* **2020**, *16*, 454.
318. J. Chen, J. Stubbe, Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 175.
319. W. Fudickar, T. Linker, Structural motives controlling the binding affinity of 9,10-bis(methylpyridinium)- anthracenes towards DNA, *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115432.
320. S. M. Robinson, Z. Shen, J. R. Askim, C. B. Montgomery, H. O. Sintim, S. Semancik, Ligand-based stability changes in duplex DNA measured with a microscale electrochemical platform, *Biosensors* **2019**, *9*, 54.
321. M. Chauhan, K. Banerjee, F. Arjmand, DNA Binding Studies of Novel Copper(II) Complexes Containing 1-Tryptophan as Chiral Auxiliary: In Vitro Antitumor Activity of Cu–Sn₂ Complex in Human Neuroblastoma Cells, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 3072.
322. A. Sharma, S. Delile, M. Jabri, C. Adamo, C. Fave, D. Marchal, A. Perrier, Interaction of osmium(ii) redox probes with DNA: insights from theory, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 30029.
323. F. Dimiza, F. Perdih, V. Tangoulis, I. Turel, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, Interaction of Copper(II) with the Non-Steroidal AntiInflammatory Drugs Naproxen and Diclofenac: Synthesis, Structure, DNA- and Albumin-Binding, *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 476.
324. X. M. He, D. C. Carter, Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin, *Nature* **1992**, *358*, 209.

325. J. Steinhardt, J. Krijn, J. G. Leidy, Differences between Bovine and Human Serum Albumins: Binding Isotherms, Optical Rotatory Dispersion, Viscosity, Hydrogen Ion Titration, and Fluorescence Effects, *Biochemistry* **1971**, *10*, 4005.
326. O. Dömötör, É. A. Enyedy, Binding Mechanisms of HalfSandwich Rh(III) and Ru(II) Arene Complexes on Human Serum Albumin: A Comparative Study, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2019**, *24*, 703.
327. B. P. Espósito, R. Najjar, Interactions of Antitumoral PlatinumGroup Metallodrugs with Albumin, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 137.
328. S. Al-Harathi, J. I. Lachowicz, M. E. Nowakowski, M. Jaremko, Ł. Jaremko, Towards the Functional High-Resolution Coordination Chemistry of Blood Plasma Human Serum Albumin, *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *198*, 110716.
329. R. P. Paitandi, R. K. Gupta, R. S. Singh, G. Sharma, B. Koch, D. S. Pandey, Interaction of Ferrocene Appended Ru(II), Rh(III) and Ir(III) Dipyrinato Complexes with DNA/Protein, Molecular Docking and Antitumor Activity, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *84*, 17.
330. Y. Song, Y. Liu, W. Liu, F. A. Villamena, J. L. Zweier, . Characterization of the Binding of the Finland Trityl Radical with Bovine Serum Albumin, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 47649.
331. I. M. Vlasova, A. M. Saletsky, Spectroscopic investigation of binding of three fluorescent nanomarkers to bionanomolecules of human serum albumin in dependence on pH, *Curr. Appl. Phys.* **2009**, *9*, 1027.
332. D. Senthil Raja, N. S. P. Bhuvanesh, K. Natarajan, Effect of N(4)-Phenyl Substitution in 2-Oxo-1,2-Dihydroquinoline-3- Carbaldehyde Semicarbazones on the Structure, DNA/Protein Interaction, and Antioxidative and Cytotoxic Activity of Cu(II) Complexes, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 12852.
333. T. P. Andrejevic, I. Aleksic, M. Pockaj, J. Kljun, D. Milivojevic, N. L. Stevanovic, J. Nikodinovic-Runic, I. Turel, M. I. Djuran, B. Glisic, Tailoring Copper(II) Complexes with Pyridine-4,5-Dicarboxylate Esters for Anti Candida Activity, *Dalton Trans.* **2021**, *50*, 2627.



7. ПРИЛОГ



Листа скраћеница и ознака

- 5'-GMP: гуанозин-5'-монофосфат
- ATCC: *American Type Culture Collection*
- Bio-IL: Биокompatibilне јонске течности
- BSA: Серумски албумин говечета
- CCDC: Cambridge Crystallographic Data Centre
- DMSO: Диметил сулфоксид
- DMF: Диметилформамид
- DFT: теорија функционала густине
- ДНК: дезоксирибонуклеинска киселина
- ЕБ: Етидијум-бромид
- ϵ_b : коефицијент апсорпције везаног комплекса
- ϵ_f : коефицијент апсорпције слободног комплекса
- ESI-MS: Електроспреј масена спектрометрија
- FBS: Фетални серум бика
- FRET: Флуоресцентни резонантни пренос енергије
- FTIR: Фуријеова трансформациона инфрацрвена спектроскопија
- GSH: глутатион
- HEPES: 4-(2-хидроксиетил)-1-пиперазинетансулфонска киселина
- HCT-116: хумана колоректална туморска ћелијска линија
- HeLa: хумана ћелијска линија аденокарцинома грлића материце
- HSA: Хумани серумски албумин
- IC₅₀: концентрација једињења која инхибира раст ћелија за 50%
- IL: Јонске течности
- IL1: 1-Етил-3-метилимидазолијум-етилсулфат
- IL2: Холин-никотинат
- IL3: Холин-биотинат
- IL4: Холин-гама-аминобутират
- IL5: Холин-аскорбат
- IL6: Холин-сирингат
- IL7: Холин-бензоат
- IL8: Холин-салицилат
- IL9: Агматин-никотинат
- IL10: Агматин-аскорбат
- IL11: Агматин-салицилат
- IL12: Агматин-ибупрофенат
- K_b : константа везивања
- K_{obsd} : константе брзине *pseudo*-првог реда
- K_{sv} : Стерн-Волмер-ова константа
- L1: dien (диетилентриамин)

- L2: *bis*(пиридин-2-илметил)амин
- L3: 2,2':6',2''-терпиридин
- L4: 2,6-*bis*(5-*tert*-бутил-1Н-пиразол-3-ил)пиридин
- L5: 2,6-*bis*(5-*tert*-бутил-1-метил-1Н-пиразол-3-ил)пиридин
- L6: 2,6-*bis*((4S,7R)-1,7,8,8-тетраметил-4,5,6,7-тетрахидро-1Н-4,7-метаноиндазол-3-ил)пиридин
- L7: 2,6-*bis*((4S,7R)-7,8,8-триметил-4,5,6,7-тетрахидро-1Н-4,7-метаноиндазол-3-ил)пиридин
- L8: N2,N6-*bis*(5-метилтиазол-2-ил)пиридин-2,6-дикарбоксиамид
- L9: N2,N6-ди(бензо[d]тиазол-2-ил)пиридин-2,6-дикарбоксиамид
- МТТ: 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид
- MRC-5: ћелијска линија нормалних хуманих фибробласта плућа
- NMR: Нуклеарна магнетна резонанца
- Hoeschst33258: 4-[6-[6-(4-метилпиперазин-1-ил)-1Н-бензимидазол-2-ил]-1Н-бензимидазол-2-ил]фенол трихидрохлорид
- PBS: Фосфатни пуфер
- ROS: реактивне кисеоничне врсте
- SW-480: ћелијска линија колоректалног тумора
- TAE: *tris*-сирћетна киселина-ЕДТА пуфер
- UV-Vis: Ултразубичасто-видљива спектроскопија
- WHO: Светска здравствена организација
- $\Delta H^\ddagger$: промена енталпије активирања
- $\Delta S^\ddagger$: промена ентропије активирања

Списак објављених радова који су коришћени за израду ове докторске дисертације

1. **A. Caković**, D. Ćoćić, M. Živanović, N. Janković, N. Milivojević, M. Delibašić, M. Kostić, I. Radojević, M. Grujović, K. G. Marković, O. R. Klisurić, M. Vraneš, Jovana Bogojeski, Enhancing Bioactivity of *N,N,N*-Chelating Rhodium(III) Complexes with Ionic Liquids: Toward Targeted Cancer Therapy, *J. Med. Chem.* **2024**, 67, 13349.
2. **A. Z. Petrović**, D. C. Ćoćić, D. Bockfeld, M. Živanović, N. Milivojević, K. Virijeвић, N. Janković, A. Scheurer, M. Vraneš, J. V. Bogojeski, Biological Activity of Bis(Pyrazolylpyridine) and Terpyridine Os(II) Complexes in the Presence of Biocompatible Ionic Liquids, *Inorg. Chem. Front.* **2021**, 8, 2749.
3. **A. Petrović**, M. M. Milutinović, E. T. Petri, M. Živanović, N. Milivojević, R. Puchta, A. Scheurer, J. Korzekwa, O. R. Klisurić, J. Bogojeski, Synthesis of Camphor-Derived Bis(pyrazolylpyridine) Rhodium(III) Complexes: Structure–Reactivity Relationships and Biological Activity, *Inorg. Chem.* **2019**, 58, 307.
4. **A. Petrović**, M. Živanović, R. Puchta, D. Ćoćić, A. Scheurer, N. Milivojević, J. Bogojeski, Experimental and Quantum Chemical Study on the DNA/Protein Binding and the Biological Activity of a Rhodium(III) Complex with 1,2,4-Triazole as an Inert Ligand, *Dalton Trans.* **2020**, 49, 9070.

Enhancing Bioactivity of *N,N,N*-Chelating Rhodium(III) Complexes with Ionic Liquids: Toward Targeted Cancer Therapy

Angelina Caković, Dušan Čoćić, Marko Živanović, Nenad Janković, Nevena Milivojević, Marija Delibašić, Marina Kostić, Ivana Radojević, Mirjana Grujović, Katarina G. Marković, Olivera R. Klisurić, Milan Vraneš, and Jovana Bogojeski*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c01220>

Read Online

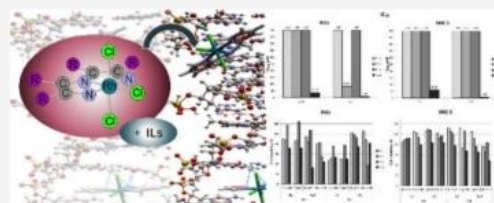
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: This study investigates the potential of using ionic liquids as cosolvents to enhance the solubility and activity of poorly soluble rhodium(III) complexes, particularly those with diene, pyridine derivatives, and camphor-derived bis-pyrazolylpyridine ligands, in relation to 5'-GMP, CT-DNA, and HSA as well as their biological activity. Findings indicate that ionic liquids significantly increase the substitution activity of these complexes toward 5'-GMP while only marginally affecting DNA/HSA binding affinities with molecular docking, further confirming the experimental results. Lipophilicity assessments indicated good lipophilicity. Notably, cytotoxicity studies show that Rh2 is selectively effective against HeLa cancer cells, with IL1 and IL10 modulating the cytotoxic effects. Redox evaluations indicate that rhodium complexes induce oxidative stress in cancerous cells while maintaining redox balance in noncancerous cells. By elucidating the role of ionic liquids in modulating these effects, the study proposes a promising avenue for augmenting the efficacy and selectivity of cancer treatments, thus opening new horizons in cancer therapeutics.



INTRODUCTION

Transitional metal complexes have played a crucial role in the treatment and diagnosis of cancer, owing to the success of cisplatin in cancer therapy worldwide.^{1–3} However, not many transition complexes besides cisplatin are used in cancer therapy because of their toxic effects, poor solubility, and the development of resistance.⁴ The toxic effects of cisplatin and the resistance to its application are the main reasons for the worldwide investigation of different metal complexes as anticancer agents.⁴ Metals like rhodium, ruthenium, osmium, and iridium are especially interesting in this area of research.^{5–10} At the early stages of anticancer research, rhodium was not considered interesting to the public due to its inert nature. However, since the 70s, there has been a growing interest in the potential of rhodium complexes as anticancer agents. This interest has evolved from binuclear rhodium(II) complexes to mononuclear species that contain Rh(I) and finally Rh(III) ions.^{11–17} Rhodium complexes are unequivocally one of the most promising potential anticancer agents available today.^{17–19} Their inertness provides the opportunity for a complex design that can specifically target molecules, such as DNA, proteins, or enzymes, making them highly versatile and effective in fighting cancer.

The interaction between transition metal complexes and DNA molecules is an essential and exciting research area in bioinorganic chemistry, medicine, and pharmacy. Its potential to unlock new treatment methods for various diseases,

including cancer treatment, is undeniable.^{20,21} The DNA molecule is one of the primary intracellular targets for the activity of anticancer transition metal complexes, with the possibility of interacting by intercalation, groove binding, or electrostatic interactions.^{17,22–25} The potential use of transition metal complexes in therapy is significantly limited by a key drawback: the tendency of these metals to form sparingly soluble complexes. This drawback severely restricts their efficacy and is a major challenge that must be overcome to realize their full potential in medical treatment. One way to enhance complexes' solubility is through using cosolvents. Among these, ionic liquids (ILs) have emerged as a particularly viable option, earning them the nickname "green solvents of the future".^{26,27} Composed entirely of ions and possessing low melting points, ILs are less harmful than conventional organic solvents and are considered ecologically sound. Thanks to their ion-based composition, these solvents can be modified to be nontoxic and biocompatible with the human body. The most famous ILs consist of cations like choline and different biocompatible anions.^{27–29} Given their unique properties,

Received: May 28, 2024

Revised: July 12, 2024

Accepted: July 19, 2024

RESEARCH ARTICLE

View Article Online
View Journal

Cite this: DOI: 10.1039/d0qi01540g

Biological activity of bis(pyrazolylpyridine) and terpyridine Os(II) complexes in the presence of biocompatible ionic liquids†

Angelina Z. Petrović,^a Dušan C. Čočić,^a Dirk Bockfeld,^b Marko Živanović,^c Nevena Milivojević,^c Katarina Virijević,^c Nenad Janković,^c Andreas Scheurer,^d Milan Vraneš^e and Jovana V. Bogojeski^{*,a}

Within this paper is presented the synthesis and structural characterization of three newly synthesized osmium(II) complexes **Os1–3**, with the chemical formula $[\text{Os}^{\text{II}}\text{LCl}_2\text{H}_2\text{O}]$, $[\text{L} = 2,6\text{-bis}(5\text{-tert-butyl-1H-pyrazol-3-yl})\text{pyridine}$ (for **Os1**), $2,6\text{-bis}(5\text{-tert-butyl-1-methyl-1H-pyrazol-3-yl})\text{pyridine}$ (for **Os2**) or $2,2':6',2''\text{-terpyridine}$ (for **Os3**)]. Single crystal X-ray analysis of a DMSO adduct of complex **Os1** was performed. Kinetics of substitution reactions of examined **Os1–3** complexes with biomolecules 5-GMP, L-Met, and GSH were followed in the presence and absence of different biocompatible ionic liquids. Binding properties of the examined complexes to biologically important molecules, CT-DNA and HSA, were investigated using UV-Vis spectrophotometry, fluorescence spectroscopy, and gel electrophoresis. Interactions with CT-DNA were performed both in the absence and presence of biocompatible ionic liquids. To locate the binding site and possible binding mode of the examined complexes to CT-DNA and HSA, fluorescence competition experiments with site-markers were performed. To better understand these interactions and obtain detailed binding information of the examined complexes with CT-DNA, and HSA, molecular docking studies and fluorescence resonance energy transfer (FRET) were performed. *In vitro* cytotoxicity and redox status experiments on three cancer cell lines and on one healthy cell line were performed to elucidate the possible molecular mechanisms of investigated **Os1–3** complexes.

Received 31st December 2020,
Accepted 7th April 2021DOI: 10.1039/d0qi01540g
rsc.li/frontiers-inorganic

Introduction

Cancer represents a malignant disease characterized by irregular, fast, and pathological cell proliferation, that can appear on any part of the human body, organ, or tissue. However, it frequently appears on the lungs, bones, breasts, prostate, digestion tract, etc.¹ Cancer causes can be diverse, including hereditary inclination, viral diseases, and changes in the cells' DNA. The reason for cancer existence is the presence of malfunction-

ing cells, leading to cells developing atypical sizes, having rapid division, and intruding into the neighbouring organs, causing demise in the end.² The worldwide impact of cancer as a leading disease on the planet in the number of fatalities, is massively negative to the world's resources, health care administrations, and economics.^{3,4} Therefore, finding effective therapy treatment without a doubt is one of the main interests in science.

Metal-based therapeutics are at the cutting edge of anti-cancer treatment, with cisplatin being utilized widely in chemotherapy treatments.⁵ Cisplatin's unforeseen revelation in cancer therapy and its US FDA endorsement in 1978 achieved an insurgency in cancer therapy.⁶ Combination of treatments and dosing have prompted the broad utilization of platinum compounds, with the estimates that over half of all patients with malignant diseases receive them worldwide, frequently in advance of any surgical procedure.⁷ Despite its accomplishment in clinical use, cisplatin's fundamental toxicity when utilized for chemotherapy, prompts extreme side effects such as peripheral neuropathy, ototoxicity, kidney toxicity, low blood counts, hair loss, severe nausea and vomiting. These adverse side effects imply that numerous patients are treated with doses that are not ideal, causing some cancers,

^aUniversity of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: jovana.bogojeski@pmf.kg.ac.rs; Fax: +381 (0)34 335040; Tel: +381(0)34336223

^bInstitut für Anorganische und Analytische Chemie, Technische Universität Braunschweig, Hagenring 30, 38106 Braunschweig, Germany

^cUniversity of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Science, Jovana Cvijica bb, 34000 Kragujevac, Serbia

^dInorganic Chemistry, Department of Chemistry and Pharmacy, University of Erlangen-Nürnberg, 91058 Erlangen, Germany

^eDepartment of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection University of Novi Sad, Faculty of Science, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia

†Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 2045190. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/d0qi01540g

Synthesis of Camphor-Derived Bis(pyrazolylpyridine) Rhodium(III) Complexes: Structure–Reactivity Relationships and Biological Activity

Angelina Petrović,[†] Milan M. Milutinović,^{†,‡,¶} Edward T. Petri,[#] Marko Živanović,[†] Nevena Milivojević,[†] Ralph Puchta,^{‡,§,||} Andreas Scheurer,^{‡,¶} Jana Korzekwa,[‡] Olivera R. Klisurić,[⊥] and Jovana Bogojeski^{*,†,¶}

[†]Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

[‡]Inorganic Chemistry, Department of Chemistry and Pharmacy, [§]Computer Chemistry Center, Department of Chemistry and Pharmacy, and ^{||}Zentralinstitut für Scientific Computing, University of Erlangen-Nürnberg, 91058 Erlangen, Germany

[⊥]Faculty of Science, Department of Physics and [#]Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 4, 21000 Novi Sad, Serbia

[¶]Department of Organic Chemistry, University of Paderborn, Warburgerstraße 100, 33098 Paderborn, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: Two novel rhodium(III) complexes, namely, $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{X})\text{Cl}_3]$ ($\text{X} = 2,6\text{-bis}((4\text{S},7\text{R})\text{-}7,8,8\text{-trimethyl-}4,5,6,7\text{-tetrahydro-}1\text{H-}4,7\text{-methanoindazol-}3\text{-yl})\text{pyridine}$ or $2,6\text{-bis}((4\text{S},7\text{R})\text{-}1,7,8,8\text{-tetramethyl-}4,5,6,7\text{-tetrahydro-}1\text{H-}4,7\text{-methanoindazol-}3\text{-yl})\text{pyridine}$), were synthesized from camphor derivatives of a bis(pyrazolylpyridine), tridentate nitrogen-donor chelate system, giving $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{L}^*)\text{Cl}_3]$ (**1a**) and $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Me}_2\text{L}^*)\text{Cl}_3]$ (**1b**). A rhodium(III) terpyridine (terpy) ligand complex, $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{terpy})\text{Cl}_3]$ (**1c**), was also synthesized. By single-crystal X-ray analysis, **1b** crystallizes in an orthorhombic $P2_12_12_1$ system, with two molecules in the asymmetric unit. Tridentate coordination by the N,N,N-donor localizes the central nitrogen atom close to the rhodium(III) center. Compounds **1a** and **1b** were reactive toward L-methionine (L-Met), guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP), and glutathione (GSH), with an order of reactivity of $5'\text{-GMP} > \text{GSH} > \text{L-Met}$. The order of reactivity of the Rh^{III} complexes was: **1b** > **1a** > **1c**. The Rh^{III} complexes showed affinity for calf thymus DNA and bovine serum albumin by UV–vis and emission spectral studies. Furthermore, **1b** showed significant in vitro cytotoxicity against human epithelial colorectal carcinoma cells. Since the Rh^{III} complexes have similar coordination modes, stability differences were evaluated by density functional theory (DFT) calculations (B3LYP(CPCM)/LANL2DZp). With (H_2L^*) and (terpy) as model ligands, DFT calculations suggest that both tridentate ligand systems have similar stability. In addition, molecular docking suggests that all test compounds have affinity for the minor groove of DNA, while **1b** and **1c** have potential for DNA intercalation.



INTRODUCTION

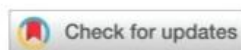
Transition-metal complexes have a range of applications in supramolecular chemistry,¹ catalytic chemistry,² and as medicinal agents.³ In chemical biology, transition-metal complexes were investigated as inhibitors,^{4–9} imaging agents,^{10–12} biological probes,^{13,14} or catalysts with unique properties. Over the last century, platinum-based complexes have been used as anticancer drugs.^{15,16} However, side effects, such as cell-acquired resistance and high toxicity,¹⁷ have prompted investigation of other metal complexes.^{18,19} Despite their variable oxidation states, the anticancer properties of rhodium complexes have not been extensively explored.^{20,21} However, kinetically inert transition-metal complexes could serve as scaffolds for pharmacological agents due to their inertness, stability, unique geometries, and structural diversity.²² Recently, such metal complexes were shown to have affinity both for DNA, their primary target, as well as various proteins,^{23–27} suggesting potential use in the design of anticancer agents.

Transition-metal complexes have been synthesized with pyridine-containing tridentate triamine ligands, for use in catalytic reactions or as potential antitumor agents, etc. Tridentate triamine ligands have advantages, including ready availability, relatively low cost, and low toxicity.²⁸ Various metal complexes with camphor-based pyridine ligands have also been used for asymmetric catalysis²⁹ and tested for biomolecular interactions or antitumor activity.^{30–33}

Previously, we synthesized a Rh^{III} complex with a tridentate nitrogen-donor pincer-type ligand that displayed promising properties and biomolecular reactivity.²⁰ Thus, we sought to expand our investigation of Rh^{III} complexes to pincer-type ligands with diverse substituent patterns on the pyrazolyl moiety, creating differences in space configuration and electron density distribution that could influence biomolecular interaction potential or cytotoxicity.

Received: August 24, 2018

Published: December 19, 2018



Cite this: DOI: 10.1039/d0dt01343a

Experimental and quantum chemical study on the DNA/protein binding and the biological activity of a rhodium(III) complex with 1,2,4-triazole as an inert ligand†

Angelina Petrović,^a Marko Živanović,^b Ralph Puchta,^{c,d,e} Dušan Čoćić,^a Andreas Scheurer,^c Nevena Milivojević^b and Jovana Bogojeski^{b,*}

The synthesis and structural characterization of a newly synthesized mononuclear rhodium(III) complex, **Rhtrz**, with a ligand (2,2,6-bis((4*S*,7*R*)-7,8,8-trimethyl-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-4,7-methanoindazol-3-yl)pyridine) and a ligand of 1,2,4-triazole, are presented in this paper. The kinetic interactions of the **Rhtrz** complex with essential biomolecules such as 5-GMP, L-Met, and GSH were examined. The study of the biological interactions was focused on the binding properties of the **Rhtrz** complex with CT-DNA and serum albumin. These interactions were investigated using UV-vis spectrophotometry, fluorescence spectroscopy, viscosity measurements, thermal denaturation studies, and electrophoresis. Fluorescence competition experiments with site-markers for BSA were used to locate the binding site of the **Rhtrz**-complex to the BSA. Molecular docking studies were carried out to obtain detailed binding information of the complex with CT-DNA, BSA, and HSA. Furthermore, the apparent distance between the donor (HSA) and acceptor (**Rhtrz**) was determined using fluorescence resonance energy transfer (FRET). The thermodynamic properties and relative stabilities of the **Rhtrz** complex were examined, constructing the two model equation by DFT calculations (B3LYP(CPCM)/LANL2DZp). *In vitro* cytotoxicity and redox status on the human epithelial colorectal cancer cell line (HCT-116) and healthy human fibroblast cell line (MRC-5) were also investigated.

Received 12th April 2020,
Accepted 4th June 2020
DOI: 10.1039/d0dt01343a
rsc.li/dalton

Introduction

On the basis of a WHO report, the disease that ranks second in the world in terms of the number of deceased is cancer. In the light of this, there is a constant need to find a cure that will successfully treat the disease without causing a large number of unwanted side effects. Transition metals have taken a significant place in cancer therapy after the successful use of cisplatin for treating a substantial number of carcinomas.¹

However, even though cisplatin was introduced in cancer therapy several decades ago, only a few analogs have been used in treatment so far. In addition to Pt(II) complexes, various ruthenium complexes have been intensively studied.^{2–5} Although they have proved to be significantly more efficient than platinum complexes, no Ru complex has passed clinical testing and been put into use as a cytostatic.

A large number of different metal complexes have been investigated worldwide, aiming to find a drug that will effectively affect the carcinoma cells. In the last few years, researchers' interest has been on metals like rhodium, osmium, and iridium.^{6–10} It was in the 1970s that interest in rhodium complexes as potential anticancer drugs first manifested, with the attention focused on binuclear rhodium(II) complexes.¹¹ Rhodium complexes as potential anticancer agents were not an attractive topic of research because of their kinetic inertness. However, some unreactive compounds were known as active anticancer agents.¹² Research has progressed over time to mononuclear species containing Rh(I) and Rh(III) ions.¹¹ Recent studies with rhodium complexes showed surprising anticancer activity, and they are seen as promising candidates for the development of anticancer drugs. Many studies have

^aUniversity of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: jovana.bogojeski@pmf.kg.ac.rs; Fax: +381 (0)34 335040; Tel: +381 (0)34 336223

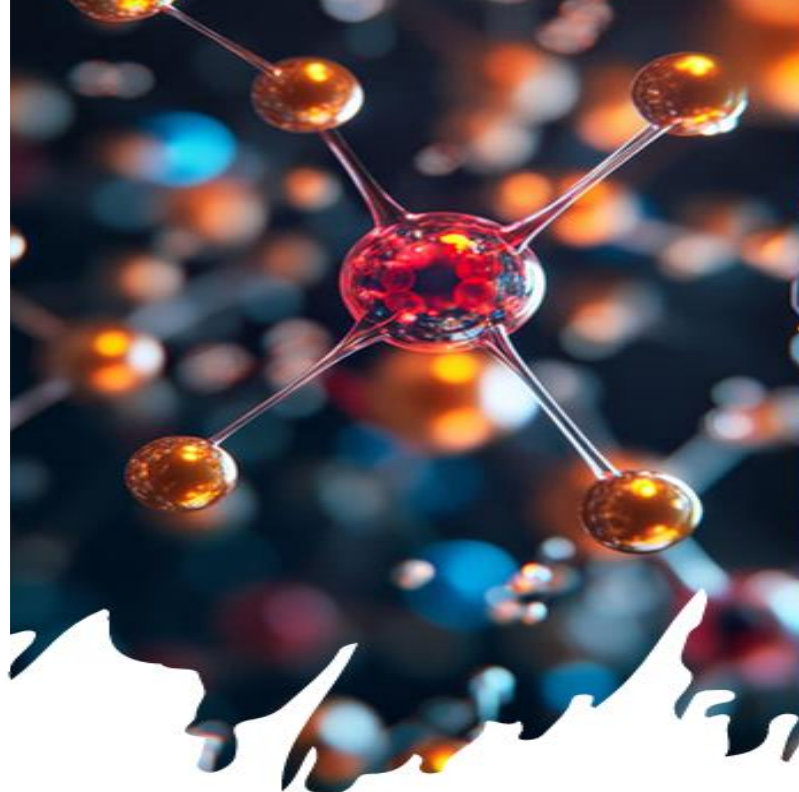
^bUniversity of Kragujevac, Institute of Information Technologies Kragujevac, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

^cInorganic Chemistry, Department of Chemistry and Pharmacy, University of Erlangen-Nürnberg, 91058 Erlangen, Germany

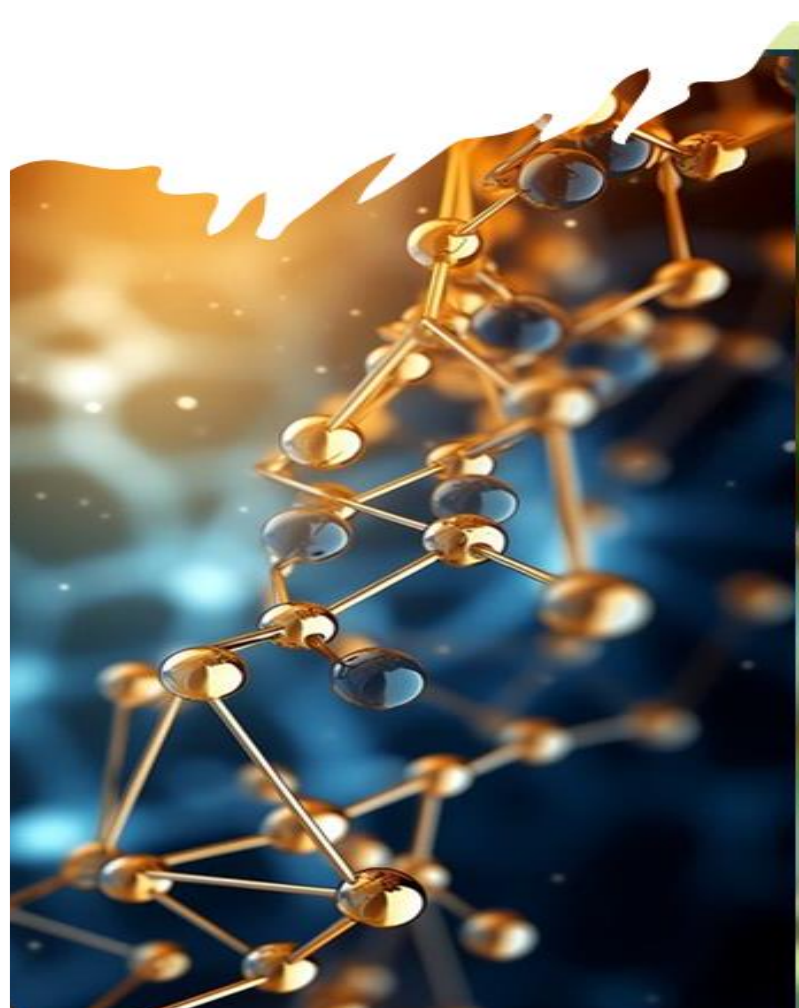
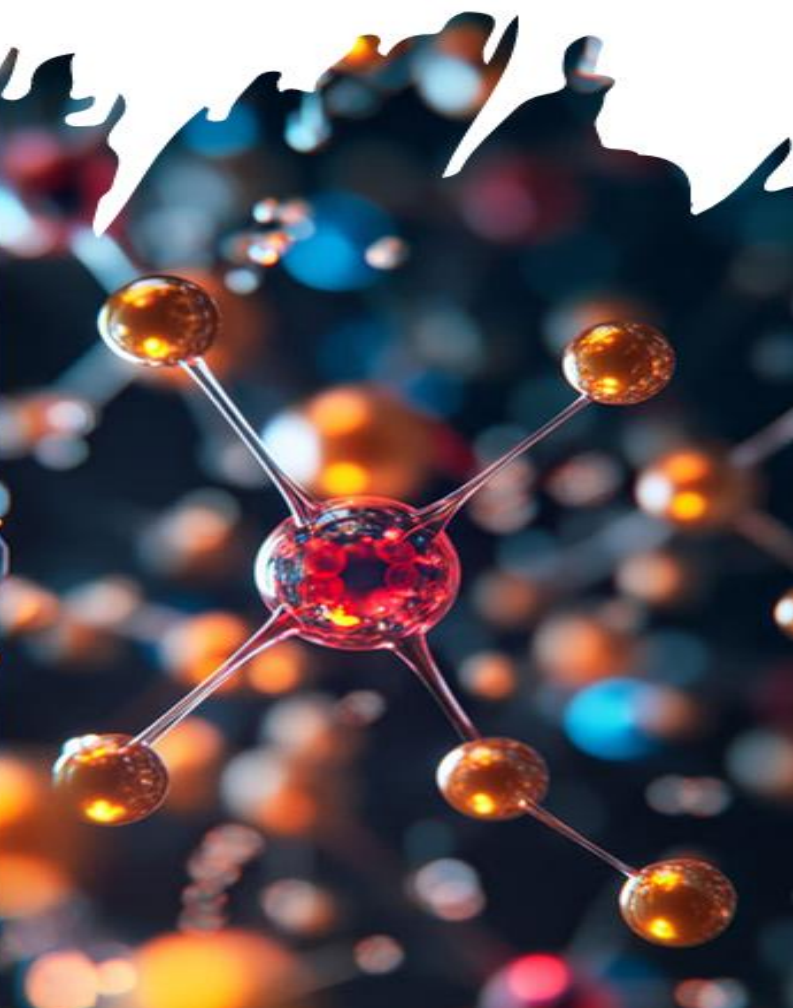
^dComputer Chemistry Center, Department of Chemistry and Pharmacy, University of Erlangen-Nürnberg, 91058 Erlangen, Germany

^eZISC (Zentralinstitut für Scientific Computing), Universität Erlangen-Nürnberg, Martensstrasse 5a, 91058 Erlangen, Germany

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/D0DT01343A



8. БИОГРАФИЈА



8. БИОГРАФИЈА



Ангелина Цаковић (девојачко Петровић) рођена је 03. 10. 1993. године у Смедеревској Паланци. Завршила је средњу медицинску школу са домом ученика „Сестре Нинковић“ у Крагујевцу, смер фармацеутски техничар, са одличним успехом. Основне академске студије, студијски програм Хемија, смер истраживање и развој, уписала је на Природно-математичком факултету у Крагујевцу 2012. године и завршила са просечном оценом 9,37. Мастер академске студије, студијски програм Хемија, смер истраживање и развој, уписала је на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, 2017. године и завршила са просечном оценом 10,00. Докторске академске студије хемије уписала је на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, школске 2018/2019. године под менторством ванредног професора др Јоване Богојески. До сада је положила све испите предвиђене планом и програмом, са просечном оценом 10,00.

Од јануара 2019. године запослена је на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, најпре као истраживач-приправник, а од децембра 2022. године као истраживач-сарадник. Добитница је престижне DAAD стипендије у 2020. години, као и Erasmus+ стипендије за краткорочну мобилност у 2024. години. Имала је кратке боравке у групи професора др Т. Warner-а на Универзитету у Падерборну (Немачка) и у групи професора др S. G. Williams-а на Универзитету у Сиднеју (Аустралија).

Предмет научног истраживања Ангелине Цаковић је синтеза и карактеризација комплекса родијума(III) и осмијума(II), као и испитивање интеракција и биолошке активности датих комплекса. Истраживања се испитују у присуству и одсуству биокомпатибилних нетоксичних косолвената. До сада је објавила дванаест научних радова у часописима од међународног значаја, при чему је први аутор на три рада из категорије M21a, и једног из категорије M21. Такође, први аутор је и једаног рада у часопису од националног значаја из категорије M53, као и два рада штампана у целости на међународним конференцијама из категорије M33. Осим тога, представила је своја истраживања кроз више саопштења на иностраним и националним конференцијама.

Као истраживач, била је активно ангажована у настави, учествујући у извођењу вежби из предмета Индустријска хемија 1, Хемија раствора, Виша неорганска хемија и Технологија и постројења за прераду и пречишћавање вода. За свој рад са студентима, добила је признање Студентског парламента који ју је наградио дипломом за најбољег асистента на Институту за хемију. Више пута је као ментор учествовала у програмима за даровите ученике основних школа у оквиру Центра за таленте. Члан је више стручних удружења, укључујући Српско хемијско друштво, Младе хемичаре Србије, European Young Chemists' Network (EYCN) и European Federation for Medicinal Chemistry – Young Scientists Network (EFMC-YSC). Учествовала је у организационом одбору 57. Саветовања Српског хемијског друштва, које се одржавало на Природно-математичком факултету у Крагујевцу.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Утицај структуре инертних N,N,N -лиганата на реактивност и биолошку активност комплекса родијума(III) и осмијума(II) у присуству и одсуству нетоксичних косолената

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,

У Крагујевцу, 16.06.2025. године,


потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

Утицај структуре инертних N,N,N -лиганата на реактивност и биолошку
активност комплекса родијума(III) и осмијума(II) у присуству и одсуству нетоксичних
косолената

истоветне.

У Крагујевцу, 16.06.2025. године,

Мирјана Савић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ангелина Цаковић,



дозвољавам



не дозвољавам

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

Утицај структуре инертних N,N,N -лиганата на реактивност и биолошку активност комплекса родијума(III) и осмијума(II) у присуству и одсуству нетоксичних косолената

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

Овом Изјавом такође



дозвољавам



не дозвољавам¹

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

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

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

У Крагујевцу, 16.06.2025. године,


потпис аутора

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