УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Игњат П. Филиповић

СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА КОБАЛТА(II), БАКРА(II) И ЦИНКА(II) СА 2,4-ДИКЕТОЕСТРИМА

Докторска дисертација

Крагујевац, 2026



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Ignjat P. Filipović

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF COBALT(II), COPPER(II) AND ZINC(II) COMPLEXES WITH 2,4-DIKETOESTERS

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2026

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Игњат Филиповић
Датум и место рођења: 31. 10. 1989. године, Београд, Србија
Садашње запослење: Истраживач сарадник
Докторска дисертација
Наслов: Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса кобалта(II), бакра(II) и цинка(II) са 2,4-дикетоестрима
Број страница: 98
Број слика: 38
Број библиографских података: 217
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): Хемијске науке - Неорганска хемија (546)
Ментор: др Марина Ћендић-Серафиновић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: IV-01-7/6 од 21. 1. 2026.

Велико ХВАЛА!

Ненаду, Јеци, Биљи, Маји, Марини и Пери,
на помоћи у току израде ове дисертације,

Предрагу и Нади,
на крилима и часовима летења,

Мирјани
што бираш да летимо заједно.

Посвећено Борославу и Мирјани

Сажетак

Синтетисано је 12 нових комплексних једињења, приликом чега су као централни јони коришћени кобалт(II), бакар(II) и цинк(II), а као лиганди су коришћени раније синтетисани 2,4-дикетоестри, приликом чега је коришћено 9 различитих лиганада. Комплекси су синтетисани у моларном односу метал:лиганд 1:2. Комплекси су окарактерисани комбинацијом спектроскопских метода, UV-Vis, IR, NMR, EPR као и методама масене спектрометрије. Елементалном анализом је потврђен састав комплекса. Утврђено је да су лиганди бидентатно координовани за јон метала и да се налазе у енолној форми приликом координације.

Испитане су активности свих 12 комплекса према 5 бактеријских и 5 гљивичних култура. Уочене су уопштено веће вредности активноси према гљивичним културама. Испитане су антитуморска активност и индекс селективности свих 12 комплекса одређивањем активности према ћелијама рака и здравим ћелијама. На основу значајне антитуморске активности изабрано је 4 комплекса **CoL3**, **CuL6**, **ZnL2** и **ZnL4** за даља испитивања. Морфолошком анализом је утврђено да је механизам ћелијске смрти под утицајем изабраних комплекса претежно апоптоза.

Испитане су интеракције изабраних комплекса са биолошким макромолекулима. Интеракције са DNA су праћене применом спектроскопске титрације, флуориметрије и вискозиметрије. Утврђено је постојање спонтаних интеракција са DNA, а фаворизовано је везивање у малом жлебу. Интеракције са албумином су испитане флуориметријски. Утврђен је већи афинитет везивања ка субдомену IIIA. Структуре комплекса су оптимизоване и као такве доковане на кристалне структуре DNA и BSA. Резултати добијени на основу молекулског доковања су у складу са резултатима добијеним проучавањем интеракција са DNA и BSA.

Кључне речи

-Комплекси метала
-Кобалт(II)
-Бакар(II)
-Цинк(II)
-2,4-дикетоестри
-Спектроскопија
-Антимикробна активност
-Антитуморска активност
-Макромолекулске интеракције
-Молекулско доковање

Abstract

Twelve new complex compounds have been synthesized using three different metal ions, cobalt(II), copper(II) and zinc(II), and nine different 2,4-diketoesters that were synthesized earlier. Compounds were synthesized using molar ratio metal:ligand 1:2. Compounds were characterized using UV-Vis, IR, NMR and EPR spectroscopy and mass spectrometry. Elemental analysis was used to confirm compound stoichiometry. Bidentate coordination of ligands in enol form was confirmed in each case.

Biological activity was tested for all 12 compounds against 5 bacterial and 5 fungal cultures. Generally higher values of activity were noticed against fungal cultures. Anticancer activity and selectivity index were examined by determining activities against cancer cell line and healthy cell line. Based on significant anticancer activity, 4 complexes **CoL3**, **CuL6**, **ZnL2** and **ZnL4**, were selected for further studies. Morphological analysis suggests apoptosis as cell death mechanism when cells are exposed to any of the selected complexes.

Interactions of selected complexes with biological macromolecules were also investigated. Interactions with DNA were determined using spectroscopic titrations, fluorimetry and viscometry methods. It was determined that interactions were spontaneous, while minor groove binding was preferred binding mode. Interactions with albumin were measured using fluorimetry. It was determined that selected complexes have higher affinity towards binding pocket inside IIIA subdomain. Optimization of structures of selected compounds was followed by docking toward crystal structures of DNA and BSA molecules. Molecular docking results corroborate with results from investigations of DNA and BSA interactions.

Keywords:

-Metal complexes
-Cobalt(II)
-Copper(II)
-Zinc(II)
-2,4-diketoesters
-Spectroscopy
-Antimicrobe activity
-Antitumor activity
-Macromolecular interactions
-Molecular docking

САДРЖАЈ

1. УВОДНИ ДЕО....1
1.1. Кобалт, бакар и цинк – открића и прве примене....2
1.2. Физичкохемијске особине кобалта....3
1.3. Биолошки значај и фармаколошки потенцијал кобалта и његових једињења....4
1.4. Физичкохемијске особине бакра....6
1.5. Биолошки значај и фармаколошки потенцијал бакра и његових једињења....8
1.6. Физичкохемијске особине цинка....11
1.7. Биолошки значај и фармаколошки потенцијал цинка и његових једињења....13
1.8. Значај 2,4-дикетоестара и њихових комплекса....15
2. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ....19
2.1. Опште напомене....20
2.1.1. Коришћене супстанце....20
2.1.2. Припрема раствора за испитивање интеракција....20
2.1.3. Инструментална мерења и технике....20
2.2. Синтеза комплекса....20
2.2.1. Комплекси кобалта(II)....20
2.2.2. Комплекси бакра(II)....21
2.2.2.1. Мерење стабилности комплекса бакра(II)....22
2.2.3. Комплекси цинка(II)....22
2.3. Испитивање антимикробне активности....23
2.4. Одређивање цитотоксичне активности....24
2.5. Испитивање интеракција са биомолекулима....25
2.5.1. Кинетичка мерења....25
2.5.2. Интеракције са DNA....25
2.5.2.1. Апрсорпциона спектроскопија....25
2.5.2.2. Флуоросцентна спектроскопија....26
2.5.2.3. Мерење вискозитета....26
2.5.3. Интеракције са албумином....26
2.6. Молекулско доковање....27
3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА....29
3.1. Синтезе комплекса и њихова карактеризација....30
3.1.1. Синтезе лиганада....30
3.1.2. Синтеза и карактеризација комплекса кобалта(II)....31
3.1.3. Синтеза и карактеризација комплекса бакра(II)....33

3.1.4. Синтеза и карактеризација комплекса цинка(II)....36
3.2. Биолошка испитивања....40
3.2.1. Антимикробна активност синтетисаних комплекса....40
3.2.2. Антитуморска активност синтетисаних комплекса....42
3.3. Испитивање интеракција одабраних комплекса са биомолекулима....44
3.3.1. Кинетичка мерења....44
3.3.2. Интеракције са DNA....45
3.3.3. Интеракције са албумином....51
3.4. Структурна оптимизација и симулације молекулског доковања....56
4. ЗАКЉУЧАК....65
5. ЛИТЕРАТУРА....69
6. ПРИЛОЗИ....87
ПРИЛОГ 1 - Списак скраћеница и симбола....88
ПРИЛОГ 2 - Списак слика....90
ПРИЛОГ 3 - Списак табела....93
ПРИЛОГ 4 – Насловне странице радова у оквиру докторске дисертације....94
7. БИОГРАФИЈА....97

1. УВОДНИ ДЕО

1.1. Кобалт, бакар и цинк – открића и прве примене

Камен, одувек доступан човеку, служио је и као оруђе и као накит без неке нарочите обраде. Са обрадом, дошле су и нове намене. Међутим метали, који су већином закључани у самом камену у облику руда су могли доћи до изражаја тек са могућношћу човека да произведе врло високе температуре у својим пећима које је пре свега побољшавао због производње грнчарије. Што се тиче метала у елементалном облику, у праисторијском периоду је човек могао наићи на сјајни грумен неког од метала племенитијих особина. Постоје докази о употреби бакарних предмета као накита већ између осмог и деветог миленијума пре нове ере (п.н.е.) у пределима данашњег Ирака [1] док је пример о употреби бакарног алата дошао од залеђеног човека званог Еци (*Ötzi*), пронађеног у Алпима са бакарном секиром још увек при руци после више од 5000 година [2]. Прапостојбина металургије је Балканско полуострво, где су између шестог и трећег миленијума п.н.е. припадници Винчанске културе на територији данашње Србије вадили и термички обрађивали руде из којих су изоловали бакар [3]. Проналажени су предмети од злата и сребра датирани далеко пре зачећа металургије, међутим докази који указују на топљење ових метала и употребе при ковању композитних предмета датирају тек од другог миленијума п.н.е. [4]. Бакар је као материјал донео велике предности културама које су га производиле и користиле због значајно лакше обрадивости у односу на друге доступне материјале тог времена. Због тога се коришћење бакра врло брзо раширило међу људима у периоду који називамо халколит – бакарно доба, прелазном периоду између каменог и бронзаног доба. Бронза, легура бакра и калаја која је тврђа од чистог бакра, је по открићу врло брзо потиснула готово све примене које је камен задржао као алат захваљујући својој тврдоћи.

Цинк је пронађен у саставу неких раних бакарних предмета у јако малом проценту, што је и очекивано са обзиром да се међу сулфидним рудама бакра често налази и цинк. Намерна производња месинга (легуре бакра и цинка) се јавља значајно касније, у Римском царству око првог века п.н.е. [5]. Као један од разлога за касни почетак производње ове легуре наводи се температура кључања цинка која је нижа од температуре топљења бакра за скоро 180 °C. Ова чињеница доводи до губитка готово свог цинка из смеше путем испаравања пре него што дође до топљења бакра. Да би производили месинг, Римљани су морали да осмисле затворене фуруне где би третирали бакар цинковом паром у процесу који се назива цементација [6]. Са друге стране, у Индијској области Рацастан постоје докази о циљаном откопавању руда цинка уз руде олова пре првог миленијума п.н.е. а први докази о изоловању и употреби цинка као метала су на том простору датирани неких хиљаду година касније [7]. Такође на простору Индије, између 12. и 14. века н.е. је развијена технологија дестилације цинка помоћу које је први пут добијен готово чист метални цинк, а слична технологија је коришћема на просторима Кине два века касније [8].

Кобалт је изолован из руде за коју се претпостављало да је руда бизмута при чему је шведски хемичар Георг Брант око 1735. године описао аналитичке методе за јасну идентификацију новог метала [9]. Нови метал је добио назив по коболду (*kobold*) злоћудном патуљку или духу из локалног фолклора (често поистовећеном са гоблином) због отровних испарења у рудницима која су највероватније потицала од арсена у саставу руда [10]. Кобалт је тиме постао први метал у Периодном систему елемената чијем се проналазачу зна име. По открићу кобалт је брзо нашао примену у легурама због изузетних особина које даје челицима када се у њима налази и у врло малим процентима.

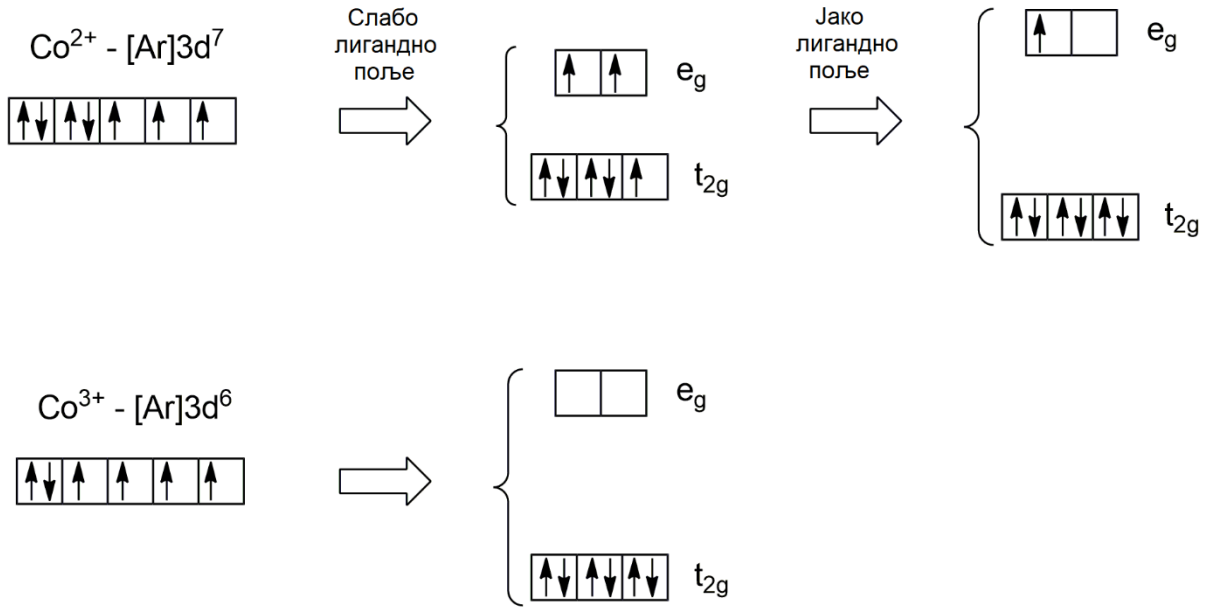
Иако је као метал откривен врло касно, људи су рано почели са експлоатацијом особина једињења кобалта. Већ у другом миленијуму п.н.е. Египћани су развили нове

технологије за производњу и бојење стакла при чему користе кобалтне стипсе (алуминијум-сулфатне соли са катјоном другог метала нпр. $CoAl_2(SO_4)_4{\cdot}22H_2O$) помоћу којих добијају стакло карактеристичне „дубоко“ плаве боје [11]. Постоји могућност да су за бојење стакла користили стипсе директно, али за бојење керамике су морали ова једињења прво да обраде. Докази указују да су највероватније стипсе третирали алкалним раствором натријум-карбоната при чему су као талог добијали смешу хидроксида различитих метала присутних у стипси [12]. На сличан начин су налазила примену и једињења бакра и цинка. На пример руде бакра као што су азурит и малахит, природно поседују изразито плаву и изразито зелену боју, па су коришћене као полудраго камење а уз то су и обрађиване зарад добијања пигмената коришћених при изради стакла и керамике [13], док су плави камен (бакар(II)-сулфат) и црвени прах (бакар(I)-оксид) коришћени као лекови и дезинфекциона средства [14]. Грчки лекар, ботаничар и фармацеут Диоскорид је описао процес за добијање цинк-оксида који је, поред употребе за производњу месинга, коришћен и као мелем за кожу [15].

1.2. Физичкохемијске особине кобалта

Кобалт се у Периодном систему елемената налази у блоку *d*-елемената, односно међу прелазним металима. Атомски број му је 27, што га смешта испред никла, иако поседује већу атомску масу. Изотоп Co-59 је једини стабилан изотоп кобалта и тежи је од далеко најзаступљенијег изотопа никла на земљи, Ni-58 што узрокује ову аномалију у Периодном систему. По количини у Земљиној кори кобалт је 30. елемент, мало испред скандијума који је најређи елемент прве периоде *d*-блока [16]. Највећи део кобалта се данас добија захваљујући експлоатацији арсенидних и сулфидних руда овог метала. Иако се налази и у другим облицима, експлоатација таквих руда није за сада комерцијално прихватљива [10]. Велики део овако добијеног кобалта се користи за производњу пигмената и боја. Кобалт се користи у изради челика високе тврдоће и отпорности који се користе за производњу најоптерећенијих делова алата и критичних делова машинерије за копање и бушење, а користи се и за материјале попут алнико легуре (*alnico* на основу састава Al-Ni-Co) од које се производе перманентни магнети за сензоре и микро-моторе.

Кобалт је нешто слабије реактиван од гвожђа што га чини постојаним на ваздуху при нормалним условима, а приликом загревања на високе температуре оксидује се до маслинастозеленог кобалт(II)-оксида који је стабилан на преко 900 °C, док се на нижим температурама формира црни Co_3O_4 где је један атом кобалта у +2 а два су у +3 оксидационом стању. При екстремним условима се могу добити једињења кобалта у другим оксидационим стањима, али у природи се овај метал налази само у +2 и +3 облицима. Кобалт(II) са халогеним елементима даје рози флуорид, плави хлорид, зелени бромид и плаво-црни јодид у анхидрованом облику а сви ови халогениди имају другачије боје приликом формирања кристалохидрата [17]. Флуорид кобалта(III) се примењује у батеријама и флуоровању органских једињења [18], а од халогенида кобалта(III) је познат још и врло нестабилан хлорид [19]. Да би се добио кобалт(II) јон електронска конфигурација металног кобалта $[Ar]3d^74s^2$ се мења отпуштањем лабилних s електрона. Кобалт(II) је са својом d^7 конфиурацијом прилично стабилан јон који у воденом раствору гради комплексни октаедарски хексааква катјон, приликом чега се у слабом лигандном пољу налази у $t_{2g}^5e_g^2$ високоспинској конфигурацији (Слика 1). У овом облику кобалт са скоро свим стандардним једновалентним анјонима може градити соли које се даље могу изоловати у облику кристалохидрата.



Слика 1. Електронске конфигурације јона кобалта у различитим лигандним пољима.

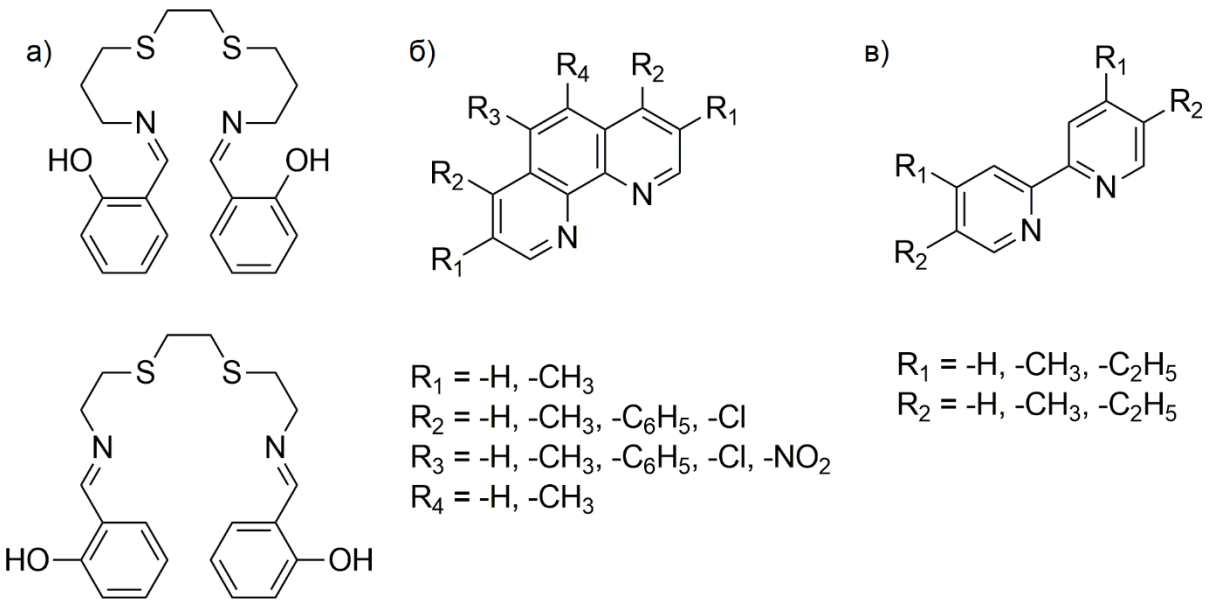
Приликом синтезе неких комплексних једињења, *O*- и *N*-донорски лиганди измењују координовану воду и уопштено не мењају ни октаедарску геометрију ни спинско стање централног јона. Ипак, амино група и монодентатни *N*-донорски лиганди могу узроковати оксидацију до кобалта(III), док бидентатни *N*-донорски лиганди могу довести до стабилизације +2 оксидационог стања [20]. Кобалт(II) јон се из воденог раствора може изоловати додавањем базе при чему се издваја $Co(OH)_2$ као талог, који се у вишку базе може опет растворити формирањем $[Co(OH)_4]^{2-}$ јона. Халогени елементи углавном граде комплексе тетраедарске геометрије и опште формуле $[CoX_4]^{2-}$. Познати су и ниско-спински комплекси кобалта(II) као што је пентацијанидокобалтат(II) где јако лигандно поље утиче на формирање дублетне $t_{2g}^6e_g^1$ конфигурације (Слика 1) и квадратно пирамидалне геометрије [21]. Да би се наградио кобалт(III) јон, мора се уложити знатно више енергије ради уклањања једног електрона из *d* љуске при чему се формира d^6 конфигурација. Оваква конфигурација је значајно стабилнија у нискоспинском синглетном облику $t_{2g}^6e_g^0$ (Слика 1) што утиче на формирање претежно октаедарских комплекса чак и у врло слабом лигандном пољу. На пример чак и $[Co(H_2O)_6]^{3+}$ јон је нискоспинске конфигурације, иако је врло нестабилан због израженог оксидационог карактера. Значајно постојанији су амински комплекси кобалта(III) у облицима $[CoX_2(NH_3)_4]^+$, $[CoX(NH_3)_5]^{2+}$, и $[Co(NH_3)_6]^{3+}$, где X може бити било који халоген. У овим општим формулама халоген може бити замењен водом или другим *O*-донорским лигандом док један или више аминских лиганада може бити замењено моно- или полидентатним *N*-донорским лигандом. Изузетна стабилност d^6 конфигурације доводи до кинетичке инертности оваквих комплекса, због чега синтезе нових једињења засноване на супституцији лиганада трају прилично дуго. Због тога се повремено приступа прво синтези комплекса са кобалтом(II) као централним јоном у облику који је приближан жељеном, а потом се овако добијени комплекс оксидује [22].

1.3. Биолошки значај и фармаколошки потенцијал кобалта и његових једињења

Кобалт је код животиња заступљен у саставу витамина $Б_{12}$, где су за њега координовани атоми азота коринског прстена. Овај молекул који се још назива и

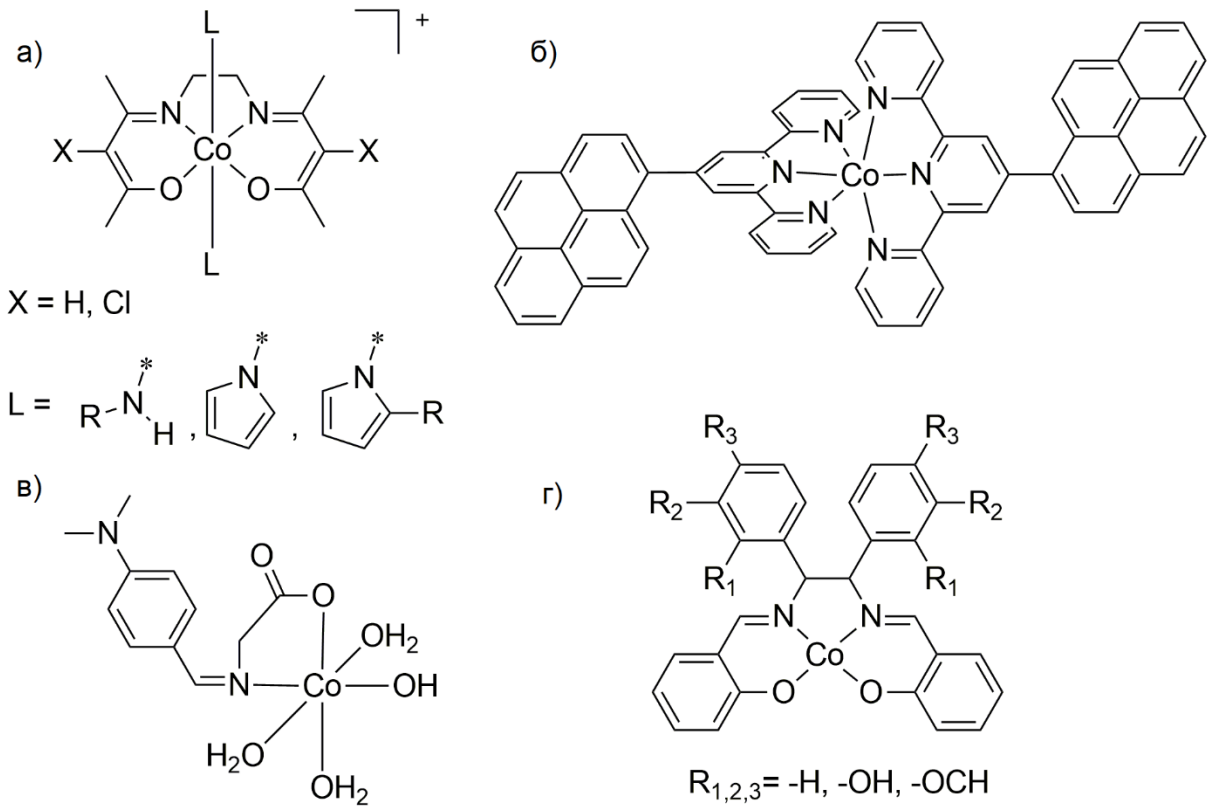
кобаламин је важан кофактор код синтезе деоксирибонуклеинске киселине (DNA), у метаболизмима масних киселина и амино киселина, а врши функције и код производње и сазревања црвених крвних зрнаца [23]. Недостатак кобаламина у човековој исхрани изазива многобројне болести као што су различите врсте анемије и неуролошких дефеката. Овај витамин се не може надокнадити уношењем вишка кобалта у другим облицима пошто синтезу овог витамина врше искључиво специјализовани организми попут неких бактерија [24]. Вишак кобалта код човека је токсичан услед различитих фактора као што је производња реактивних оксидативних врста или измена јона гвожђа у ензимима приликом чега настају инхибирани облици [25]. Међутим као и за сваки други ендогени метал, постоје ефикасни биолошки путеви за уклањање вишка из организма [26]. Биолошки значај кобалта није везан само за витамин $Б_{12}$. Откривени су ензими који садрже кобалт који није унутар коринског прстена [27]. Неки од примера су нитрил хидратаза која је код појединих бактерија одговорна за трансформацију нитрилне групе у амидну групу [28], или бромид пероксидаза која катализује стварање хипобромита [29].

Биолошка активност синтетичких комплекса метала, међу којима су били и комплекси кобалта, испитивана је још педесетих година прошлог века од стране аустралијског научника Френсиса П. Двајера. Проучавао је токсичност комплекса кобалта(III) са лигандима попут деривата салицилалдимина (Слика 2а) у 1:1 односу [30]. Радио је и са комплексима кобалта(II) где је као лиганде користио деривате фенантролина и бипиридина (Слика 2б, 2в) у молском односу метал:лиганд 1:3, при чему су неки од синтетисаних комплекса показали значајну антимикробну активност [31]. Велики подстицај за дизајн нових терапеутика на бази једињења кобалта су упоредни тестови којима је утврђена значајно мања токсичност ових једињења у односу на цисплатину [32]. Комплекси кобалта(II) и кобалта(III) који се примењују терапеутски, или имају потенцијал за такву примену, могу се поделити на стабилне и лабилне у зависности од тога да ли им се структура мења приликом терапеутског дејства [33]. Значајна група антивиралних комплекса кобалта(III) се означава скраћеницом CTC.



Слика 2. Неки од лиганада за грађење комплекса кобалта а) 1,10-бис(*N*-салицилалдиминил)-4,7-дитиадекан и 1,8-бис(*N*-салицилалдиминил)-4,6-дитиаоктан; б) 1,10-фенантролин и деривати; в) 2,2'-бипиридин и деривати.

У СТС комплексима су за кобалт(III) хелатно координоване Шифове базе у екваторијалном положају (Слика 3а). Лабилне аксијалне групе ових комплекса се могу заменити хистидином при чему се комплекс значајно стабилизује [34], због чега се претпоставља иреверзибилно везивање за хистидин у виралној протеази. Са друге стране, комплекс хексаамминкобалт(III)-хлорид се без структурне промене може везати за DNA само путем водоничних веза [35] и инхибирати репликацију неких вируса [36]. Постоје и комплекси који су у организму стабилни и не показују никакав терапеутски ефекат, али се одређеном методом могу активирати. Пример су комплекси кобалта(II) са терпиридином који се могу активирати на жељеном месту излагањем тачној фреквенцији електромагнетног зрачења захваљујући координованом фотоактиватору попут пирена (Слика 3б) [37]. Комплекси кобалта(II) уопштено поседују лабилније лиганде у односу на комплексе кобалта(III), па се самим тим чешће класификују као лабилни терапеутици. Један комплекс овог типа, у коме је за кобалт(II) јон координована Шифова база добијена реакцијом 4-диметиламинобензалдехида и аспарагина (Слика 3в), показује антиоксидативне особине и способност зацељивања површинских рана [38]. Синтетисани су и комплекси овог типа који показују антитуморску активност [39]. Пример је комплекс у коме је 3,4-диарилсален хелатно координован за кобалт(II) јон (Слика 3г) [40].



Слика 3. Структурне формуле комплекса кобалта: а) Представници СТС комплекса кобалта(III); б) Фотоактивабилни комплекс кобалта(III); в) Комплекс кобалта(II) са алдимином аспарагинске киселине; г) Комплекси кобалта(II) са диарил саленима.

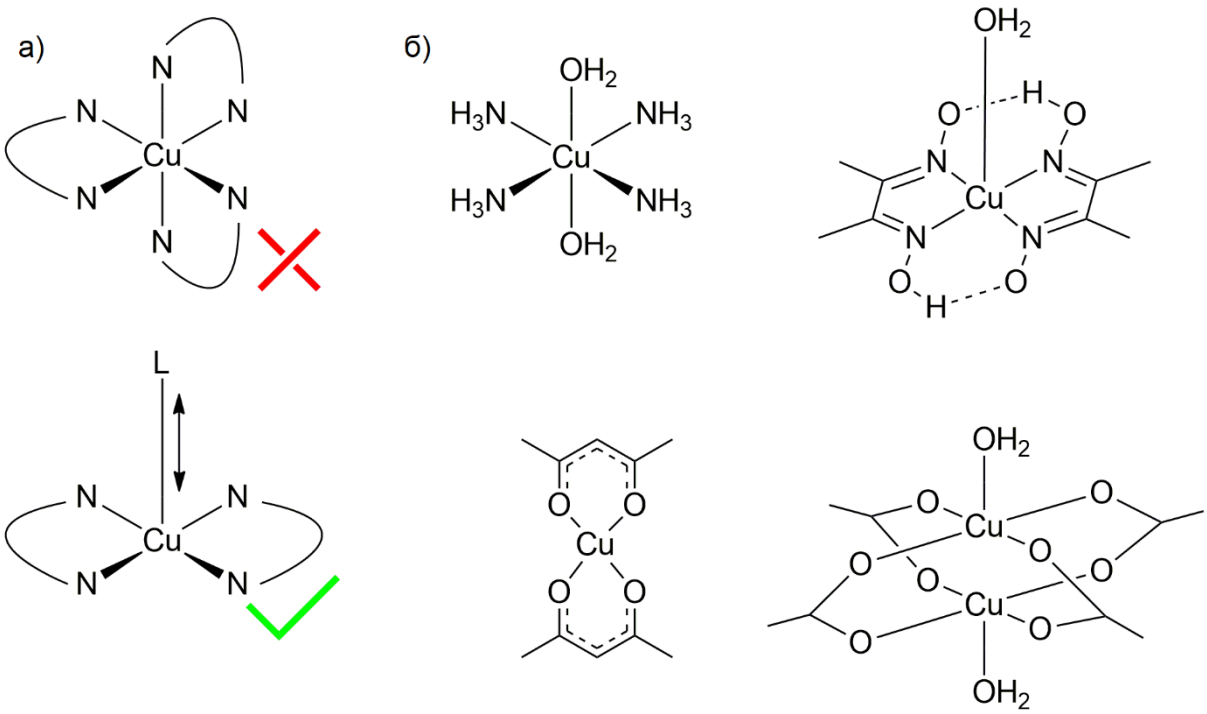
1.4. Физичкохемијске особине бакра

Бакар је прелазни метал, 29. елемент у Периодном систему елемената, позициониран директно изнад сребра и злата са којима дели особине које га чине незнатно племенитијим од других прелазних метала у истој периоди. У Земљиној кори је

прилично заступљен. По процени од 65 g/t је 25. елемент по масеном уделу, што га чини око 800, односно 15 хиљада пута заступљенијим од сребра и злата [16]. Налази се у сулфидним и карбонатним рудама из којих се изолује једноставним процесом загревања уз редукционо средство. Међутим највећа количина се налази у комбинацији са гвожђем у руди халкопирит, што одвајање бакра чини значајно компликованијим. Развијени модерни електролитички процеси у великој мери олакшавају пречишћавање добијеног метала а уз то и издвајање сребра и злата који су често присутни уз бакар [41]. Без обзира на бенефите модернизације, екстракција бакра представља значајан еколошки проблем. Бакар се у рудама налази у врло малом проценту (< 1%) што ствара потребу за концентровањем сировине, приликом чега се ствара огромна количина уситњеног отпада. Поред тога што је штетан и као прашина, овај материјал је често добро растворан у води и високе киселости па га кише лако распоређују у околном земљишту узрокујући ацидификацију тла и водотокова уз повећање покретљивост јона других тешких метала [42]. Одлична проводљивост бакра, који по овом параметру заостаје само за сребром, чини га идеалним за производњу каблова и електричних компоненти где се и употребљава највећа количина овог метала. Значајно већа заступљеност, па самим тим и нижа цена, довољно оправдава употребу бакра за ове намене у односу на сребро, међутим и друге карактеристике, као што је већа отпорност према спољним условима, дају предност бакру. Када је потребна додатна отпорност на корозију, понекад се примењује злато, али често само као заштитни слој. Постоји и опција у облику специјалних антикорозивних легура бакра попут купроникла који налази примену у структурама изложеним морској води. Бакар је мекан метал, па су развијене чврше и термално стабилније легуре да би се искористила изузетна термална проводљивост овог метала и тамо где је пожељна механичка постојаност, као код млазница ракетних погона [43]. Једињења бакра се у највећој мери употребљавају у пољопривреди. Плави камен је заштитно средство које се користи за лозу, површе и у воћњацима. Ово једињење задржава фунгицидно и бактерицидно дејство према широком спектру организама, због свог неспецифичног деловања на више активних центара, што умањује могућност појаве резистенције [44].

Бакар изложен спољним условима на површини ствара патину која је по саставу смеша карбоната, сулфата и оксида, у зависности од примеса присутних у ваздуху. Загревањем метала у присуству кисеоника може се контролисано добити црни бакар(II)-оксид на нижим температурама, а црвени бакар(I)-оксид при јачем загревању. Једноставнији начин за добијање бакар(II)-оксида је жарење бакар(II)-карбоната или нитрата, док се бакар(I)-оксид може добити једноставном редукцијом бакар(II)-облика помоћу хидразина или шећера. Бакар гради сулфиде у оба оксидациона стања, при чему је нешто стабилнији бакар(I)-сулфид. Бакар гради халогениде у оба оксидациона стања при чему су изузеци флуорид, који се гради само са бакром(II), и јодид, који се гради само са бакром(I). Још један јон са којим бакар гради просту со у једновалентном облику је цијанидни јон. Растворени Cu(II) се може исталожити додатком базе, при чему се добија амфотерни хидроксид $Cu(OH)_2$. У воденом раствору је +2 оксидационо стање значајно стабилније, док се бакар(I) често диспропорционише на бакар(II) и бакар у елементарном стању. Ово је насупрот очекиваном понашању уколико узмемо у обзир само електронску структуру. Бакар има $[Ar]3d^{10}4s^1$ конфигурацију и одузимањем једног електрона формира се врло стабилна d^{10} конфигурација, међутим позитивни ефекти солватације Cu(II) јона су довољно јаки да превазиђу ефекат нешто мање повољне d^9 електронске конфигурације. Потпуно солватисан Cu(II) јон је у раствору карактеристично плаве боје, координован је са 6 молекула воде и заузима октаедарску геометрију. Додавањем воденог раствора

амонијака или неке амонијум соли, лако се могу супституисати до 4 координоване воде, пошто је комплекс бакра(II) са 5 амонијака већ нестабилан, док се $[Cu(NH_3)_6]^{2+}$ комплекс може добити и одржати само у течном амонијаку. Приликом везивања N-донорских лиганада у екваторијалне положаје октаедра, јавља се издуживање аксијалних веза услед Јан-Телеровог ефекта. Ово доводи до немогућности формирања комплекса бакра(II) који имају 3 бидентатно координована *N*-донорска лиганда, као што су 2,2'-бипиридин или етилендиамин и често формирање квадратно-пирамидалне геометрије код оваквих комплекса (Слика 4а). Са *O*-донорским лигандима, бакар(II) јон може да гради комплексна једињења сличне геометрије. Октаедарска геометрија као код хексакава комплекса се може задржати са монодентатним лигандима, док се квадратно-пирамидална, двострука квадратно-пирамидална (воденични точак) или чак квадратно-планарна структура јавља са полидентатним лигандима (Слика 4б) [45]. Бакар(II) у кристалима са халогеним елементима може имати квадратно-планарну геометрију која се одговарјућим контра-јоном може деформисати до тетраедарске, док бакар(I) комплекси са халогенидо лигандима могу имати и тетраедарску геометрију [46].



Слика 4. Неке од геометрија комплекса бакра(II): а) Три бидентатна лиганда се не могу везати за бакар(II) јон због појаве Јан-Телеровог ефекта (издуживање аксијалне везе); б) У правцу казаљке на сату од структуре горе-лево: Октаедарски тетрааминдиаква бакар(II), квадратно-пирамидални бис(диметилглиоксимато)бакар(II), воденични точак бакар(II)-ацетата, и квадратно-планарни бис(ацетилацетонато)бакар(II).

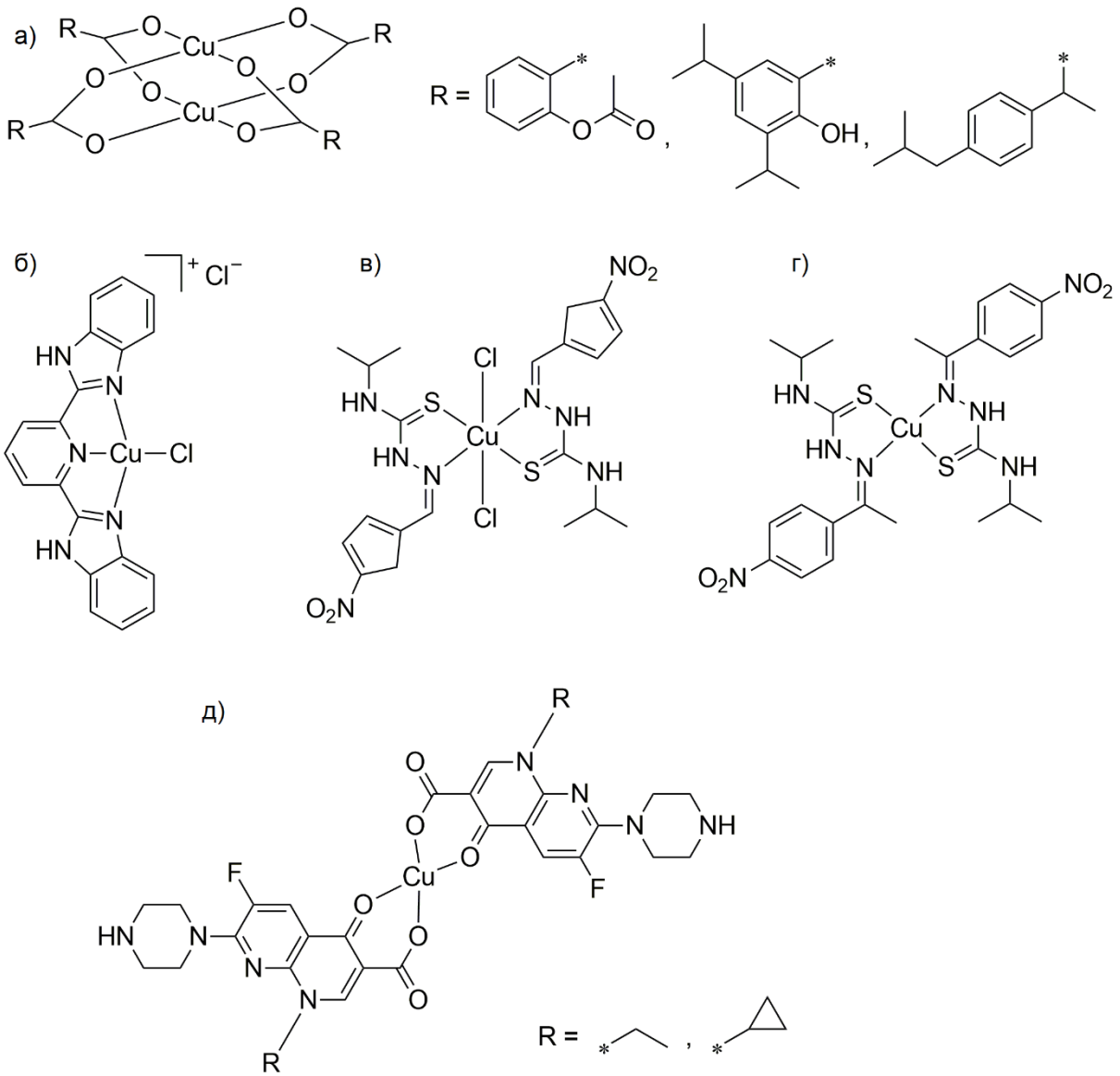
1.5. Биолошки значај и фармаколошки потенцијал бакра и његових једињења

Мали редокс потенцијал између јона бакра(I) и бакра(II) утиче на то да се у организму стварају слободни радикали што доводи до оксидативног стреса [47]. Са друге стране, иста особина је одговорна за место бакра унутар активних места многих ензимима који катализују оксидо-редукционе процесе. Пошто присуство слободних јона бакра доводи до проблема, бакар се углавном налази унутар ензимске структуре као статичан кофактор, односно стално везани супстрат који не долази у контакт са околином ензима али је неопходан за његову каталитичку функцију [48]. Пут бакра од ванћелијске течности

до места на коме ће вршити функцију је сложен. Прво се металоредуктазом бакар(II) јон редукује до бакра(I), а затим се транспортује унутар ћелије протеином за унос бакра високог афинитета (*eng. High affinity copper uptake protein*) [49]. Унутар ћелије јоне преузимају такозвани шаперони, протеини који су одговорни да заштите и транспортују јон бакра до ензима који је његово крајње одредиште [50]. Зглавкари и мекушци немају крв као кичмењаци, па за транспорт кисеоника до ћелија уместо црвених крвних зрнаца користе протеин хемоцијанин [51]. Два бакар(I) катјона се услед везивања кисеоника оксидују до бакра(II), приликом чега безбојни деоксихемоцијанин добија апсорпциони пик плавог оксихемоцијанина на 340 nm [52]. Утврђено је да су јони бакра(II) у оксихемоцијанину снажно антиферомагнетно купловани што утиче на стабилност везе са кисеоником као мостним лигандом [53]. Бакар је у различитим активним местима ензима везан на врло сличан начин. Често је координован за 3 хистидинска остатка као код амино оксидаза (*AOC1*, *AOC2*, *AOC3*) [54] или код супероксид дисмутаза (*SOD1*, *SOD3*) у близини слично везаног цинка [55], приликом чега формира тетраедарску структуру где се за једно координационо место координује вода, супстрат или протеински остатак који учествује у трансферу електрона. Код неких ензима, као код билирубин оксидазе, за бакар(II) јон су координована два хистидина, цистеин и метионин, при чему је тетраедарска структура изобличена скоро до тригонално пирамидалне услед интеракција са блиским треонином и аспарагином [56]. Бакар се налази и у митохондријалној цитохром С оксидази, у непосредној близини хема са координованим јоном гвожђа [57].

Поремећаји у метаболизму бакра доводе до бројних болести. Мутације протеина који помажу приликом излучивања бакра жучним путевима доводе до нагомилавања бакра у јетри и мозгу, што узрокује Вилсонову болест [58]. Менкеова болест се јавља услед мутација сличних протеина, али се манифестује симптомима недостатка бакра, као што су ломљива коса, издужени крвни судови и неуродегенерација [59]. Код пацијената који болују од Алцхајмерове болести пронађене су необично високе концентрације бакра у наслагама амилоид β протеина, и утврђено је да бакар подстиче димеризацију прекурсора овог протеина [60]. С обзиром да вишак бакра подстиче стварање слободних радикала који могу утицати на ћелијске сигнале за пролиферацију, интензивно се истражује утицај бакра на туморске ћелије [61]. Утврђено је да туморске ћелије захтевају већу количину бакра за раст од нормалних ћелија [62]. Стварање нових крвних судова (ангиогенеза) је такође процес који у великој мери зависи од бакра [63]. С обзиром да је ангиогенеза кључна за развој тумора, а бакар је важан фактор у оба процеса, смањивањем доступности бакра се могу постићи значајни антиангиогени и антитуморски ефекат [64]. Једињења која се хелатно координују за бакар, као што су пеницилamин или тетратиомолибдат, смањују његову доступност побољшавајући ефикасност излучивања што утиче на успоравање раста тумора [65].

Једињења попут бис(глицинато)бакар(II) комплекса су позната још од 1841. године [66], при чему се биолошка активност комплекса бакра(II) са аминокиселинама и пептидима испитује од средине прошлог века [67]. Убрзо су испитани и комплекси многих познатих лекова са бакар(II) јоном, као што су комплекс бакра(II) са 3,5-диизопропилсалицилатом и динуклеарни комплекс са мостно везаним аспирином који су показали антиинфламаторне и антитуморске активности (Слика 5а) [68]. Поред тога динуклеарни комплекс бакра(II) са ибупрофеном као мостним лигандом (Слика 5а), показује одличну активност према интестиналним чиревима [69].

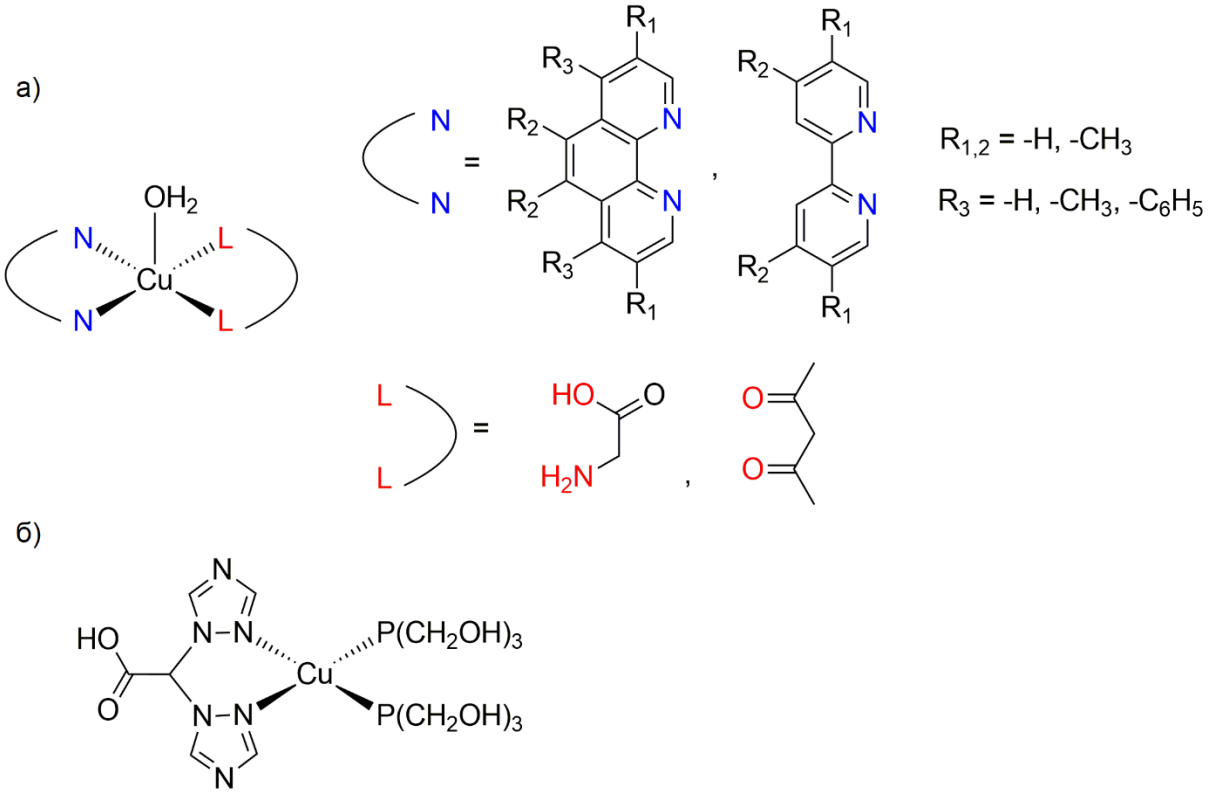


Слика 5. Биолошки активни комплекси бакра(II): а) динуклеарни комплекси са аспирином, диизопропилсалицилатом и ибупрофеном; б) вештачка протеаза, комплекс са 2,6-бис(бензимидазо-2-ил)пиридином; в) амебоцидни комплекс са 5-нитрофуран-2-карбоксалдехид тиосемикарбазоном; г) трипаноцидни комплекс са 4-нитроацетофенон тиосемикарбазоном; д) антибактеријски комплекси са антибиотицима еноксацином и ципрофлоксацином као лигандима.

Многи комплекси бакра(II) мале моларне масе, укључујући и неке већ споменуте, имитирају активност супероксид дисмутазе [70], што их чини кандидатима за борбу против прионских болести, односно болести код којих у мозгу долази до стварања лоше сложених варијанти протеина - приона, који утичу на умножавање лоших варијанти што доводи до ћелијске смрти [71]. Поред тога, ензимска мимикрија је утврђена и за комплекс са 2,6-бис(бензимидазо-2-ил)пиридином (Слика 5б), који делује као протеаза која катализује раскидање пептидних веза у албумину [72]. Комплекси бакра(II) показују и активност према паразитима [73]. На пример, комплекси са дериватима тиосемикарбазона показују одличну активност према амеби *Entamoeba histolytica* (Слика 5в) [74] и бичару *Trypanosoma cruzi* (Слика 5г) [75]. Поред тога, комплекси бакра(II) са

флуорохинолонским антибиотицима, еноксацином или ципрофлоксацином, показују значајну активност према различитим сојевима *Staphylococcus aureus* [76].

Многи комплекси бакра(II) показују и антитуморску активност [77]. Различите групе лиганада се користе са синтезу комплекса бакра(II) који показују антитуморску активност, укључујући деривате тиосемикарбазона [78], Шифових база [79], и куркуминоида [80]. У групи комплекса бакра(II) названих касиопеини (*Casiopeinas*) се налазе бројна једињења која показују одличну антитуморску активност [81]. Касиопеини су комплекси у којима је јон бакра координован са два бидентатна лиганда од којих је један *N,N*-донорским бидентатни лиганд 2,2'-бипиридин, 1,10-фенантролин или неки њихов дериват, док је други лиганд бидентатни *O*- или *N*-донор (Слика 6а) [82]. Комплекс бакра(I) са триазолил лигандом (Слика 6б) је показао антитуморску активност упоредиву са активношћу цисплатине, уз способност превазилажења резистенције на овај цитостатик, што указује на другачији механизам деловања [83]. Развијају се и радиофармацеутски лекови на бази комплекса бакра(I) и бакра(II) [84].



Слика 6. Комплекси бакра(II) и бакра(I) са антитуморским дејством: а) Општа структурна формула комплекса бакра(II) из групе касиопеина; б) (бис(1,2,4-триазол-1-ил)ацетато)ди(трихидроксиметилфосфинато)бакар(I).

1.6. Физичкохемијске особине цинка

Цинк има редни број 30, што га позицијом сврстава међу елементе *d*-блока, међутим, заједно са кадмијумом и живом се често не убраја међу прелазне метале. Најчешће цитиран разлог, поткован строгом дефиницијом IUPAC-а је попуњена 3*d*-орбитала и у основном и у јонизованом стању [85]. По заступљености у Земљиној кори је одмах испред бакра, на 24. месту, са око 15% већим масеним уделом [16]. Преко 90% овог метала се добија прерадом сулфидних руда, које се после концентровања седиментацијом, оксидују печењем руде. Овако се добија цинк(II)-оксид уз издвајање

сумпор-диоксида који се даље користи за добијање сумпорне киселине. Редукција цинка из оксида захтева преко 1000 °C, температуру на којој је цинк у стању паре и где је подложан реоксидацији. Због тога се разблажена сумпорна киселина користи за извлачење цинк-оксида из сировине, а потом се из овог раствора таложи кадмијум (уколико је присутан), док се цинк издваја електролизом [86]. Употреба цинка се често своди на заштиту других материјала од спољних услова. На челичне производе се антикорозивни слој цинка наноси електролитичким процесом или потапањем у истопљени цинк. Неке фарбе са заштитом од рђе садрже цинк у праху. Редукциони потенцијал и релативно ниска цена цинка доводе до тога да се често користи као анода у батеријама и разним електролитичким процесима. Такође је један од најчешће употребљаваних материјала за израду жртвених анода које служе да штите металне предмете који су изложени сталној влази или су потопљени, као што су бродске конструкције. Цинк у смеши са другим металима, поред месинга, гради легуре са алуминијумом од великог значаја за индустрију ливења под притиском. Изузетне карактериситике ових легура омогућавају брзу израду веома компликованих предмета уз врло мала мерна одступања. Поред тога што се цинк-оксид користи у пигментима и кремама као и у античко доба, има и модерне примене. На пример, приликом вулканизације гуме се користи као активатор процеса, а додаје се и пластици зарад појачане стабилности материјала приликом излагања ултраљубичастом зрачењу. Фосфати цинка се користе као адитиви лубрикантима за машине приликом чега се стварају фосфатне наслаге које штите челичне делове од гребања и оксидације [87].

Цинк се на влажном ваздуху оксидује до +2 стања приликом чега се формира патина чији састав зависи од примеса у ваздуху. На повишеној температури реагује директно са кисеоником, сумпором, фосфором и халогеним елементима, а не показује значајну реактивност према водонику, угљенику и азоту. Растворљив је у неоксидујућим киселинама уз формирање простих соли, док са оксидујућим киселинама реагује различито у зависности од температуре и концентрације. На пример, са азотном киселином увек гради цинк(II)- нитрат, али у реакцији са концентрованом киселином ће се поред тога издвојити азот(IV)-оксид док ће реакција са разблаженом азотном киселином дати азот(II)- или азот(I)-оксид [88]. Електронска конфигурација цинка, $[Ar]3d^{10}4s^2$ лако се мења услед ниских јонизујућих потенцијала за отпуштање 2 електрона из валентне s орбитале, при чему се добија стабилна d^{10} конфигурација цинковог +2 јона. Цинк(II) јон се лако хидратише, што утиче на његову добру растворљивост. Из раствора се може сталожити пажљивим додавањем базе услед грађења нерастворног хидроксида, међутим овај талог се раствара у вишку базе услед амфотерности. Стабилна унутрашња електронска љуска чини катјон цинка врло сличним катјону магнезијума пошто поред истог наелектрисања имају и сличне величине. Ови јони граде изоморфне соли, и често се међусобно измењују у кристалним структурама минерала, а поред тога имају тенденцију да лако граде комплексе са *O*-донорским лигандима. Као и магнезијум, цинк већином гради безбојна једињења. Међутим услед попуњене *d*-орбитале цинк показује сличности и са прелазним металима. У односу на магнезијум, значајно лакше формира комплексе са *N*- и *S*-донорским лигандима, као и са халогеним и цијанидним јонима. У 12. групи услед попуњене *d*-орбитале стабилизација кристалног поља не утиче на геометрију тако да цинк, као и кадмијум и жива, гради комплексе чија је геометрија условљена величином катјона, поларизационом моћи катјона и просторним захтевима волуминознијих лиганада. Цинк(II) јон углавном има координациони број 4 и тетраедарске је геометрије, док кадмијум(II), јон већег полупречника из исте групе, чешће гради комплексе са координационим бројем 6. Без обзира на то, у воденим растворима

цинкових соли доминантан облик цинковог катјона је октаедарски $[Zn(H_2O)_6]^{2+}$. Са већином *O*- и *N*-донорских лиганада цинк гради тетраедарске комплексе, међутим у великој концентрацији лиганда или са додатком волуминозног контра-јона координациони број се може повећати на 5 или 6 [89].

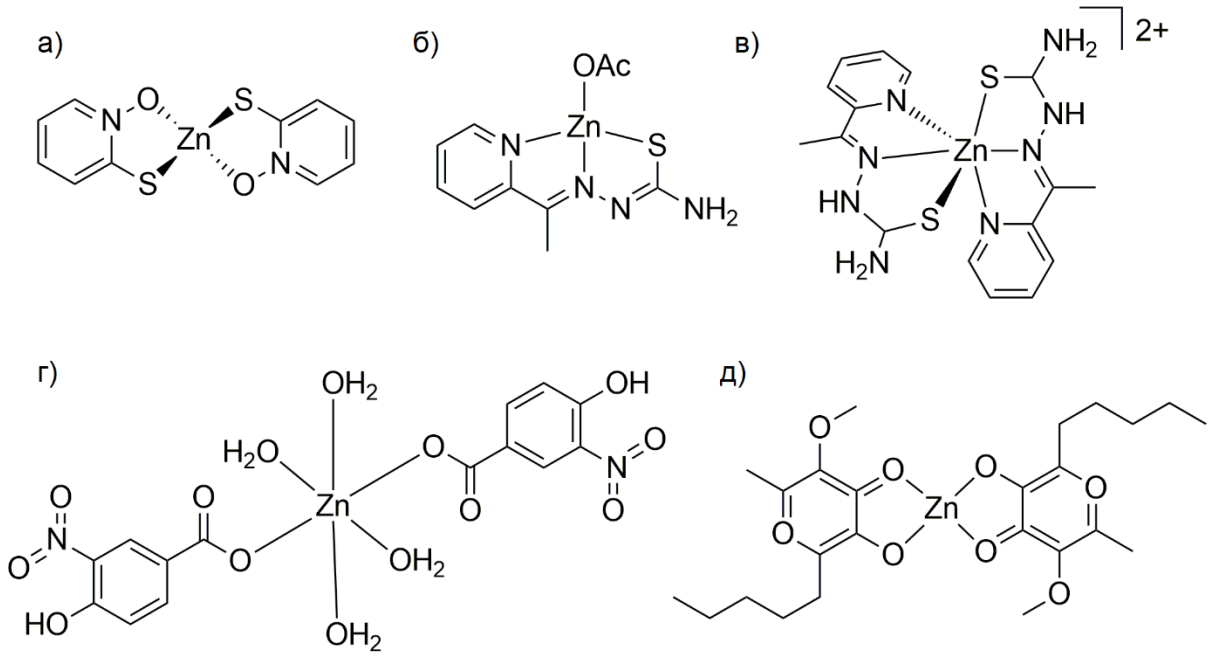
1.7. Биолошки значај и фармаколошки потенцијал цинка и његових једињења

После гвожђа, цинк је најзаступљенији есенцијални микроелемент у људском организму [90]. Као натријум, калијум, магнезијум и калијум, може се наћи у слободном облику у плазми пошто је за разлику од других елемената *d* блока редокс неактиван, па не повећава ризик од настајања слободних радикала. Као такви, јони цинка могу да служе за сигнализацију регулацијом концентрације унутар ћелије као унутарћелијске информације, или за међућелијску комуникацију [91]. У већим концентрацијама се може пронаћи у специјалним везикулама у мозгу, костима и мишићима [92]. Са друге стране, значај цинка за живи свет као везаног елемента се огледа у његовој заступљености у стотинама структура ензима међу којима су припадници свих основних ензимских класа [93]. Неки од примера ензима са каталитички активним цинком су алкохол дехидрогеназа у класи оксидоредуктаза [94] и карбонат дехидратаза у класи хидрогеназа [95]. Код трансфераза, као што је метал трансфераза ZNG1 [96], и лигаза, као што је DNA лигаза 3α [97], цинк се углавном налази везан унутар такозваног цинковог прста, структурног мотива који је веома често заступљен код ензима који интерагују са DNA или RNA.

Директан унос цинка у малим количинама за човека није токсичан, али у случајевима уношења прекомерних количина може доћи до симптома као што су мучнина, умор и болови у стомаку [98]. За човека је недостатак цинка далеко опаснији. Овај метал је врло битан фактор код превенције многих инфекција и болести због директног утицаја на имунитет [99]. Због свог антимикробног и антиинфламаторног дејства, недостатак може утицати на појаве промена на кожи попут дерматитиса или акни [100]. Постоје докази и о повезаноси метаболизма цинка са хипергликемијом, па се истражује у правцу утицаја овог метала на пацијенте оболеле од дијабетиса [101]. Мањак између осталог повећава ризик и од кардиоваскуларних обољења [102], поремећаја можданих функција [103], развијања депресије [104] и дегенерације очних мишића [105]. Повећање уноса цинка кроз суплементацију или додатке исхрани се често препоручује уз приликом лечења рака [106] или пацијентима који су под утицајем неке вирусне инфекције [107] са нагласком на коронавирус, сиду и хепатитис [108].

Примена комплекса цинка у модерној медицини највероватније почиње открићем својства комплекса цинка са пиритионом (Слика 7а) који је патентиран средином прошлог века, а сматра се да је коришћен и раније [109]. Овај комплекс је показао антибактеријско и антифунгално дејство, и нашао је намену као додатак у шампонима против перути, а употребљава се и код дерматитиса, псоријаза, екцема и других кожних обољења [110]. Многи комплекси цинка показују антимикробну активност. На пример од два комплекса цинка(II) са 2-ацетилпиридин тиосемикарбазоном (Hatsc – протонован облик), комплекс са ацетато лигандом [Zn(atsc)OAc] (Слика 7б) се понаша селективно показујући врло високу активност само према *Staphylococcus aureus,* док комплекс са нитратним контра-јонима $[Zn(Hatsc)_2](NO_3)_2$ (Слика 7в) показује умерену активност према свим тестираним сојевима [111]. Још једна група лиганада која која је коришћена за синтезу антимикробних комплекса цинка(II) су и флуорохинолонски антибиотици [112]. Комплекси цинка(II) са метанитробензоатима (Слика 7г) показују обећавајућу активност као антиепилептици

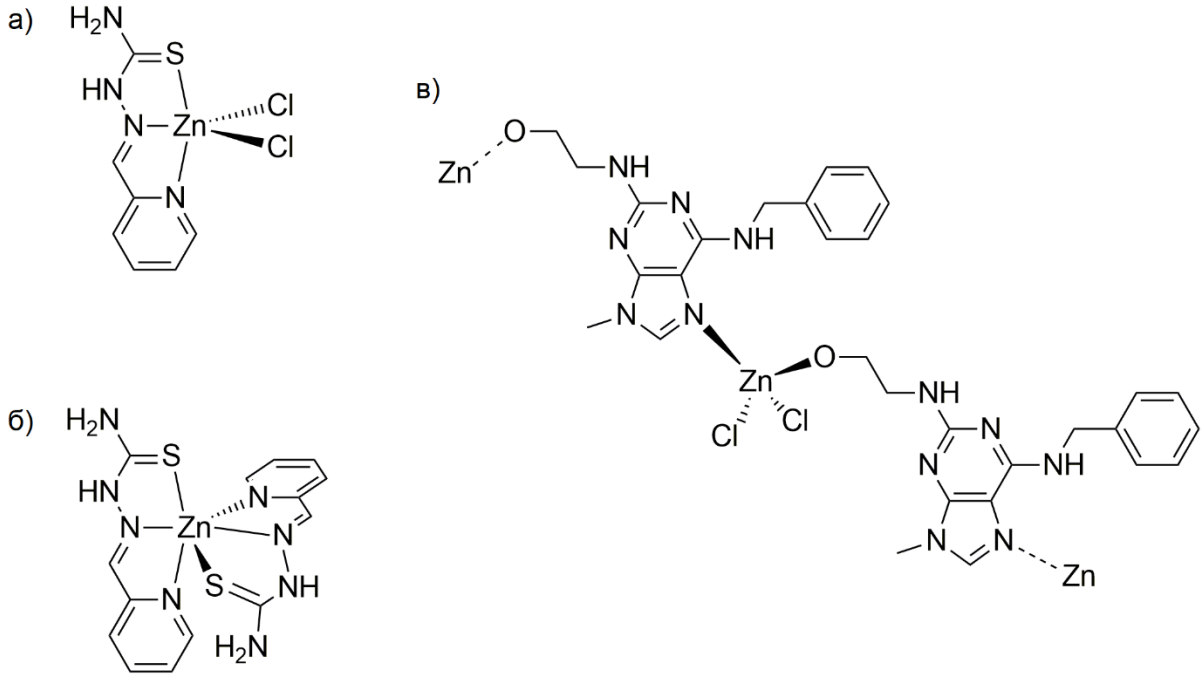
[113]. Аликсин из белог лука са цинк(II) јоном гради бис(аликсинато)цинк(II) (Слика 7д), који се показао као функционални имитатор инсулина [114] што је довело до развоја многих комплекса са дериватима овог лиганда у сврху истраживања утицаја на дијабетес [115].



Слика 7. Биолошки активни комплекси цинка(II): а) цинк пиритион; б) [Zn(atsc)OAc] комплекс који показује селективну антимикробну активност; в) $[Zn(Hatsc)_2]^{2+}$ комплекс који не показује селективну антимикробну активност; г) антиепилептик, тетрааквабис(3-нитро-4-хидроксибензоато)цинк(II); д) бис(аликсинато)цинк(II), комплекс који делује као инсулин.

У развоју антитуморских комплекса метала, комплекси цинка(II) могу бити значајни услед нетоксичности самог централног јона, што води до изостајања неких од најтежих нуспојава хемиотерапије [116]. Међутим, није само токсичан централни јон проблематичан код класичних цитостатика, већ и сам механизам деловања. Комплекси цинка и овде могу бити извор иновативних решења, с обзиром да активност потенцијално испољавају другачијим путевима [117]. Једна од посебних особина комплекса цинка која може да помогне приликом деловања на туморске ћелије јесте добра мимикрија ензимске активности нуклеаза које раскидају везе у DNA спирали [118]. Врло су разнолики примери комплекса цинка(II) који показују антитуморску активност и по избору лиганада и по геометрији централног јона [119]. Пиридином супституисани тиосемикарбазони се координују тридентатно, уз два хлоридо лиганда у тригоналној бипирамиди (Слика 8а), или се у октаедру тридентатно координују два лиганда (Слика 8б) у зависности од односа метала и лиганда у раствору у току синтезе [120]. Комплекси са дериватима пурина (Слика 8в), где је цинк тетраедарски координован, су се показали као добри инхибитори циклин-зависних киназа које учествују у транскрипцији и поправци DNA а имају појачану активност у ћелијама рака [121]. Међу осталима су и комплекси са дериватима хинолина [122], терпиридина [123] и имидазола [124]. Вредни су помена и хетеродинуклеарни комплекси цинка(II) и бакра(II) са терпиридинима међу којима неки показују обећавајуће активности [125]. Развија се и фотодинамична терапија

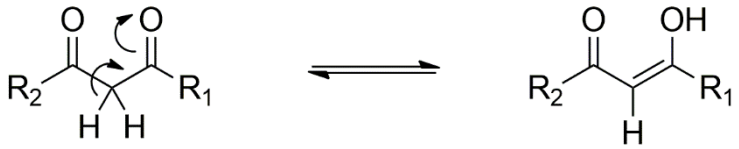
на бази комплекса цинка са фталоцијанинима који су популарни међу истраживачима због њихове нетоксичности и добре хемијске стабилности [126].



Слика 8. Комплекси цинка(II) који показују антитуморску активност: а) са једним пиридин-супституисаним тиосемикарбазонским лигандом; б) са два пиридин-супституисана тиосемикарбазонска лиганда; в) Шематски приказ веза из кристалне структуре комплекса са оломуцином.

1.8. Значај 2,4-дикетоестара и њихових комплекса

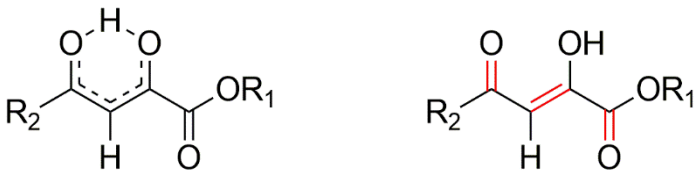
Једињења 2,4-дикетоестри садрже естарску групу на алифатичном ланцу од минимум 5 угљеникових атома и две карбонилне групе које се у односу на естарску налазе на положајима 2 и 4. Једно од најједноставнијих једињења из ове групе је, етил-2,4-диоксопентаноат, односно етил-ацетопируват који је синтетисан 1924. године [127]. Ова једињења се још називају и *β*-дикетоестри [128], због сегмента са две карбонилне групе размакнуте једним угљеником, основног сегмента ацетилацетона, чији се деривати као група често називају *β*-дикетони. У процесу који је врло добро проучен [129] вице-вицинални дикарбонилни сегмент услед електронегативности блиских кисеоника доводи до електронског дефицита међукарбонилног угљеника и тиме до појачане лабилности водоника који су за њега везани. Лабилан водоник својим одласком даје могућност везивања новог водоника за један од карбонилних кисеоника, приликом чега двострука веза прелази из карбонилне групе између два суседна угљеника. Овај повратни процес се при нормалним условима одвија врло брзо и назива се кето-енолна таутомерија (Слика 9). Због брзине самог процеса, и електронске спреге произведене новонасталом конјугацијом двоструких веза, геометрија *β*-дикето сегмента је планарна и атоми кисеоника су усмерени у истом правцу. Таква геометрија је врло погодна за бидентатну координацију за јоне метала који имају афинитет према атому кисеоника [130]. Међутим, овакви лиганди се могу координовати и преко угљеника са металима који такав тип координације подржавају [131].



Слика 9. Кето-енолна таутомерија.

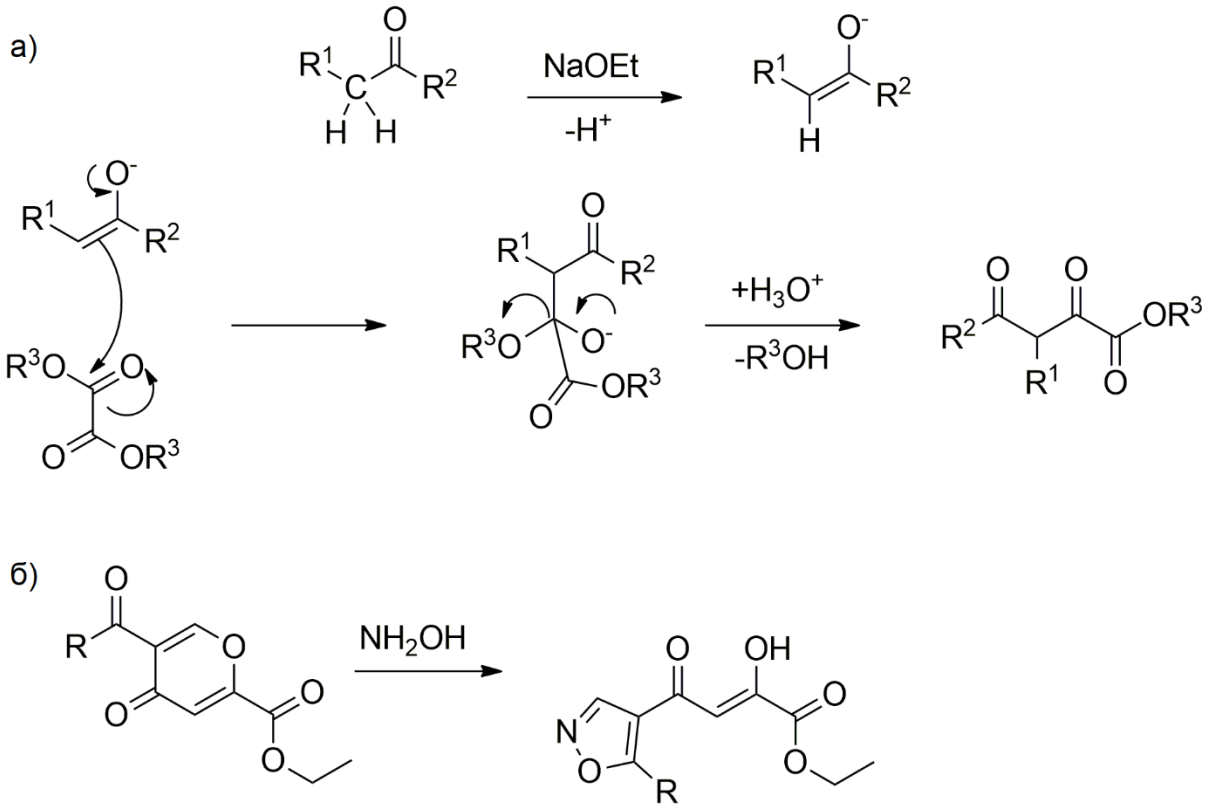
Природни β-дикетони су између осталих дибензоилметан из сладића [132], и куркумин из куркуме [133], од којих оба имају медицински потенцијал. Ацетоацетат садржи сличан сегмент где је једна карбонилна група замењена карбоксилном, због чега се назива *β*-кетобутират, односно 3-оксобутаноат. У телу је у редокс спрези са 3-хидроксибутаноатом чинећи метоболичко-сигнални пар [134], а учествује у липогенези у комплексу са коензимом А [135]. Малонат је дикарбоксилно једињење са сличним сегментом. Естри и соли ацетоацетата и малоната се често заједно испитују, због многобројних синтетичких путева за добијање разноликих деривата [136], као и због сличног начина координације са јонима метала [137].

Као и претходно споменута једињења са сличним молекулским сегментима, и 2,4-дикето естри су једињења која су се показала као битни фактори у многим органским синтезама [138]. Претпоставља се померање таутомерне равнотеже ка енолној форми због стабилизације конјугованим двоструким везама и формирања шесточланог прстена путем водоничне везе између енолне хидроксилне и карбонилне групе (Слика 10) [139].



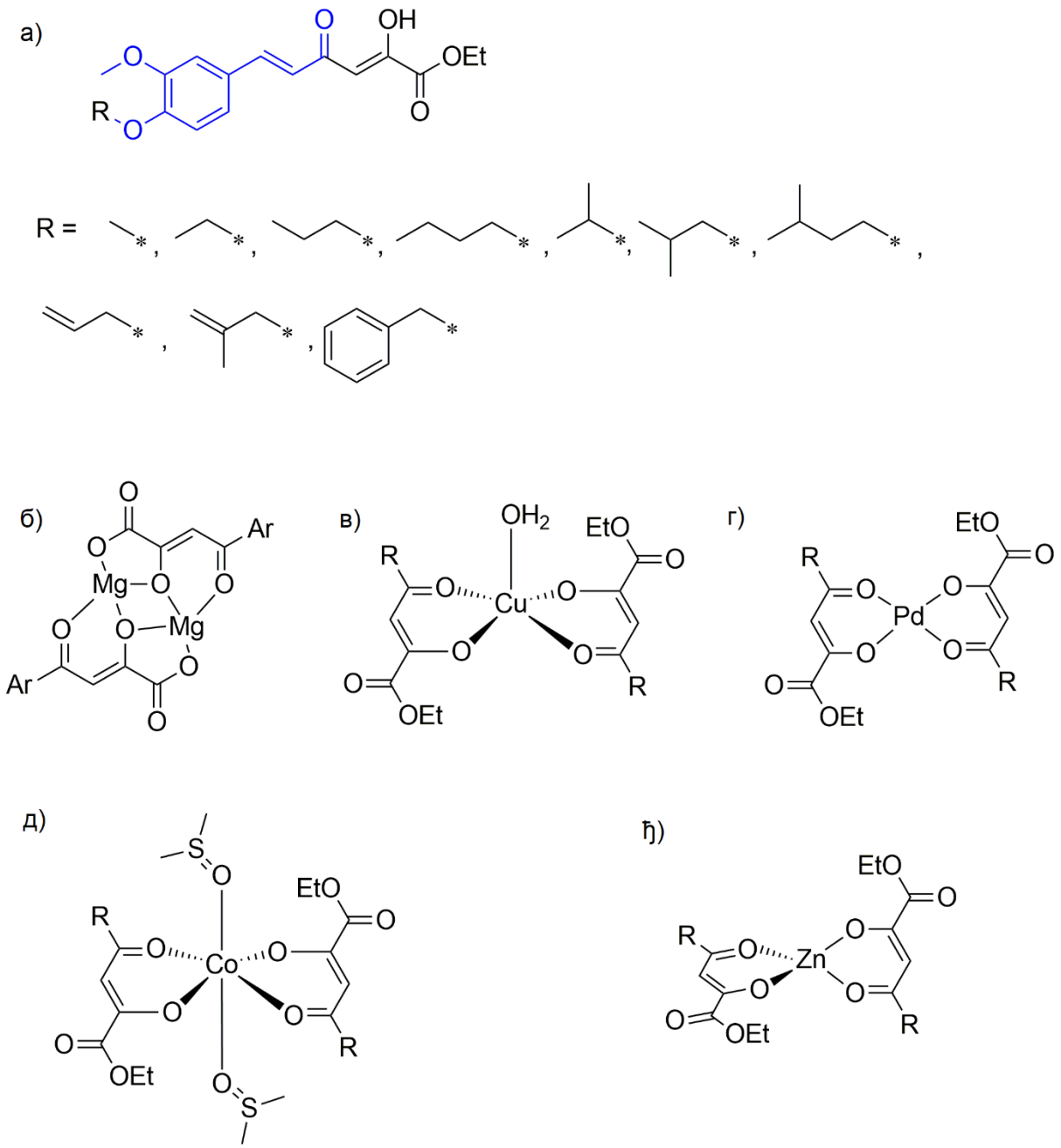
Слика 10. Приказ енолне форме 2,4-дикето естра стабилизованог помоћу водоничне везе (лево) и конјугованим двоструким везама (десно).

Један од најчешћих начина за синтезу 2,4-дикетоестара је Клајзенова кондензација, приликом које у присуству јаке базе реагују метил-кетон са жељеним алкил супституентом и диалкилоксалат (Слика 11а) [140]. Једна од занимљивих синтеза је из 2-карбокси-5-карбоил деривата пиранона у етанолу уз хидроксиламин (Слика 11б) [141], при којој се отвара пирански да би се формирао изоксазолски прстен. Неке од синтеза у којима ова једињења учествују су добијање антимикробних пиразола [142] и пиролидинона [143] али и потенцијално антитуморски активних хиноксалинона [144]. Из 2,4-дикето естара је хидролизом врло једноставно добити 2,4-дикетокиселине, од којих су многе показале антивирусну активност, захваљујући афинитету ка координацији јона метала у ензимским каталитичким центрима [145]. Преко 2,4-дикетоестара је синтетисан и 2,4-дикетоамид пиперазина који показује одличну активност према бактерији која узрокује туберкулозу и која показује резистенцију према антибиотицима [146].



Слика 11. Синтезе 2,4-дикето естара: а) Клајзенова кондензација кетона са естром оксалне киселине; б) Реакција етил естра 5-ароил-4-пирон-2-карбоксилне киселине са хидроксиламином.

Поред очигледног потенцијала који имају као прекурсори приликом добијања активних супстанци, 2,4-дикетоестри и сами имају биолошки потенцијал. Дехидрозингерон фрагмент у 2,4-дикетоестрима (Слика 12а) се показао као значајан зато што се налази у једињењима која су показала и антимикробну [147] и антитуморску активност [148]. Синтетисани су и други, структурно врло слични дикетоестри, за које је утврђена већа селективност од цисплатине, с обзиром да показују бољу активност према ћелијама тумора дојке, док нису токсични према фибробластима [149]. Уопште није зачуђујуће што и комплекси ових једињења са јонима метала показују добру биолошку активност. За магнезијум јон се 2,4-дикето естри могу бидентатно координовати или преко две карбонилне, или преко карбонилне и карбоксилне групе. Међутим међу комплексима који показују активност према HIV вирусу (*eng. Human immunodeficiency virus*), издваја се динуклеарни комплекс у коме се могу уочити обе врсте координације, при чему средњи карбонилни кисеоник служи као мостни лиганд (Слика 12б) [150]. Кристалне структуре комплекса бакра(II) са 2,4-дикетонатима су уопштено предвидљиве (слика 12в) због врло сличних дужина веза и величина углова [151]. Многи комплекси бакра(II) са 2,4-дикетонатима показују значајне биолошке активности [152-154], а поред тога са истим или сличним лигандима се испитују и активности комплекса јона других метала (Слика 12г-ђ) [155,156].



Слика 12. Биолошки активни 2,4-дикетоестри и одговарајући комплекси метала: а) Дикетоестар заснован на дехидрозингеронском фрагменту (плаво) са модификацијама; б) Динуклеарни комплекс магнезијума(II); в) Квадратно-пирамидални комплекси бакра(II); г) Квадратно-планарни комплекса паладијума(II); д) Октаедарски комплекси кобалта(II); ђ) Тетраедарски комплекси цинка(II).

2. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

2.1. Опште напомене

Сви наведене процедуре синтезе, карактеризације, одређивања биолошке активности, испитивања интеракција и молекулског доковања комплекса кобалта(II), бакра(II) и цинка(II) са 2,4-дикетоестрима су преузете и преведене из радова објављених у међународним научним часописима [157-159].

2.1.1. Коришћене супстанце

Све хемикалије, укључујући супстрате и растваваче, набављене су од компаније Sigma-Aldrich и коришћене без додатног пречишћавања. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) набављен је од GIBCO (Invitrogen, USA). Етидијум-бромид (EB) набављен је од SERVA (Немачка), акридин-оранж (AO) од Acros Organics (САД), док су Hoechst 33258 (HOE), DNA телећег тимуса (calf-thymus, CT-DNA), говеђи серум албумин (bovine serum albumin, BSA), еозин Y(EY) и ибупрофен набављени од Sigma Chemical Co. L-Метионин (L-Met) и натријумова со гуанозин-5′-монофосфата (5′-GMP) набављени су од Acros Organics и коришћени без додатног пречишћавања.

У синтезама комплекса метала су као лиганди коришћени 2,4-дикетоестри синтетисани реакцијама Клајзенове кондензације између оксалата и различито супституисаних кетона описаних у ранијим публикацијама [147-149, 152-155]. Кетони потребни за синтезу 2,4-дикетоестара који нису комерцијално доступни су синтетисани по раније описаном поступку модификацијом продуката добијених реакцијом Клајзен-Шмитове кондензације између ванилина и ацетона [148].

2.1.2. Припрема раствора за испитивање интеракција

Основни раствори CT-DNA, EB, HOE, BSA, EY и ибупрофена припремљени су у фосфатном пуферу (PBS, 0,01 M, pH 7,4). Чистоћа раствора CT-DNA проверавана је мерењем апсорбанци на 260 и 280 nm, при чему однос A_{260}/A_{280} у опсегу 1,8–1,9 указује на одсуство протеинских нечистоћа [160]. Концентрација DNA одређена је коришћењем моларног екстинкционог коефицијента од 6600 M^{-1} cm^{-1} на 260 nm. Раствори су чувани на 4 °C и коришћени у року од пет дана.

2.1.3. Инструментална мерења и технике

Апсорпциони спектри у ултраљубичастом и видљивом опсегу (UV–Vis) снимани су на PerkinElmer Lambda 35 двозрачном спектрофотометру користећи кварцне кивете запремине 3 ml са оптичком дужином пута од 1 cm. Флуоресцентни спектри снимљени су на Shimadzu RF-1501 PC спектрофлуориметру са пропусним опсегом за ексцитацију и емисију од 10 nm. Инфрацрвени (IR) спектри снимани су на PerkinElmer Spectrum One FT-IR спектрометру коришћењем KBr таблета. Спектри нуклеарне магнетне резонанције (NMR) су снимани у DMSO-d_6 уз тетраметилсилан (TMS) као интерни стандард. За кинетичка мерења коришћен је Applied Photophysics SX20 апарат за технику заустављеног тока (stopped-flow), повезан са системом за прикупљање података. Обрада и анализа података вршене су коришћењем софтвера Origin 2018 и Microsoft Excel 2017.

2.2. Синтеза комплекса

2.2.1. Комплекси кобалта(II)

Сви комплекси су синтетисани претходно објављеној процедури [156]. Лиганд (2,0 mmol) је растворен у 5 ml етанола на собној температури. Затим је раствор $CoSO_4$ (1,0 mmol) у 5 ml воде додаван кап по кап у раствор лиганда. Талог се формирао готово одмах

додатка соли кобалта(II). Након што је реакција остављена да тече 5 ч, добијени талог је процеђен, испран метанолом и остављен да се суши на собној температури. Осушени талог је затим прекристалисан у 3 ml смеше DMSO и метанола (*v/v* 1:2). Кристали су остављени 24 ч да се формирају, након чега су процеђени и осушени под вакуумом. Реакције су праћене танкослојном хроматографијом, користећи мобилну фазу CH_2Cl_2 : EtOH (9:1). Сви комплекси су окарактерисани применом UV-Vis и IR спектроскопије, масене спектрометрије, као и елементалном анализом [157].

*[Co(**L1**)$_2$(DMSO)$_2$]* (**CoL1**): Црвени прах; принос: 80%; mp = 120 °C; UV-Vis (λ_{max}/nm, (log(ε/M^{-1} cm^{-1})): 344(3,54). IR (KBr): ν 3411, 2955, 1732, 1571, 1520, 1457, 1422, 1271 cm^{-1}. ESI-MS (m/z) = 654,4 $[M + H]^+$. За $C_{28}H_{34}O_{10}S_2Co$ (%):

израчунато	C, 43,30;	H, 4,54.
нађено	C, 43,34;	H, 4,55.

*[Co(**L2**)$_2$(DMSO)$_2$]* (**CoL2**): Црвени прах; принос: 79%; mp = 101 °C; UV-Vis (λ_{max}/nm, (log(ε/M^{-1} cm^{-1})): 350(3,62). IR (KBr): ν 3399, 2070, 1728, 1582, 1514, 1490, 1446, 1277, 1213, 1039, 1024 cm^{-1}. ESI-MS (m/z) = 714,5 $[M + H]^+$. За $C_{30}H_{38}O_{12}S_2Co$ (%):

израчунато	C, 50,49;	H, 5,37.
нађено	C, 50,53;	H, 5,35.

*[Co(**L3**)$_2$(DMSO)$_2$]* (**CoL3**): Црвени прах; принос: 83%; mp = 136 °C; UV-Vis (λ_{max}/nm, (log(ε/M^{-1} cm^{-1})): 369(3,85). IR (KBr): ν 3400, 2975, 1729, 1569, 1507, 1443, 1432, 1257, 1157, 1017, 968 cm^{-1}. ESI-MS (m/z) = 706,5 $[M + H]^+$. За $C_{32}H_{38}O_{10}S_2Co$ (%):

израчунато	C, 54,46;	H, 5,43.
нађено	C, 54,49;	H, 5,41.

*[Co(**L4**)$_2$(DMSO)$_2$]* (**CoL4**): Црвени прах; принос: 86%; mp = 129 °C; UV-Vis (λ_{max}/nm, (log(ε/M^{-1} cm^{-1})): 276(3,38), 358(3,76). IR (KBr): ν 3398, 1726, 1524, 1497, 1443, 1411, 1285, 1249, 1015 cm^{-1}. ESI-MS (m/z) = 666,4 $[M + H]^+$. За $C_{24}H_{38}O_{10}S_4Co$ (%):

израчунато	C, 43,30;	H, 4,54.
нађено	C, 43,35;	H, 4,53.

2.2.2. Комплекси бакра(II)

Комплекси бакра(II) **CuL5-CuL8** су синтетисани коришћењем модификованог претходно објављеног поступка [161]. Еквимоларне количине лиганада **L5-L8** (1,0 mmol) растворене су у 3 ml апсолутног етанола на собној температури. У сваки раствор додаван је $(PhNH_3)_2CuCl_4$ (0,5 mmol) уз константно мешање. Реакционе смеше су затим мешане још 60 минута, приликом чега су се комплекси исталожили из раствора. Ток реакције праћен је методом танкослојне хроматографије (TLC) користећи смешу хлороформ/метанол (*v/v* 9:1) као мобилну фазу. Исталожени производи су изоловани вакуум-филтрацијом, темељно испрани безводним диетил-етром, ради уклањања преосталих нечистоћа, а затим рекристалисани из кључалог етанола. Након хлађења до собне температуре, пречишћени комплекси су поново издвојени филтрацијом, испрани диетил-етром и осушени на ваздуху. Сви комплекси су окарактерисани применом UV-Vis, IR и EPR спектроскопије, масене спектрометрије, као и елементалном анализом [158].

*[Cu(**L5**)$_2$H$_2$O]* (**CuL5**): Зелени прах; принос: 88%; mp = 127 °C; UV-Vis (λ_{max}/nm, (log(ε/M^{-1} cm^{-1})): 284(4,69), 388(4,34). IR (KBr): ν 3450, 2933, 1734, 1720, 1632, 1570, 1549, 1508, 1461, 1272, 1141, 1020 cm^{-1}. EPR (DMSO, 77K): g_x = 2.073; g_y = 2.078; g_z = 2.335; $A_{\parallel}$ = 492 MHz. ESI-MS (m/z) = 692,3 [M + H]$^+$. За $C_{32}H_{36}O_{13}Cu$ (%): C 55,53, H 5,24; нађено (%): C 55,37, H 5,25.

израчунато C, 55,53; H, 5,24.
нађено C, 55,37; H, 5,25.

*[Cu(**L6**)$_2$H$_2$O]* (**CuL6**): Зелени прах; принос: 86%; mp = 132 °C; UV-Vis (λ_{max}/nm, (log(ε/M^{-1} cm^{-1})): 391(4,46). IR (KBr): ν 3463, 2939, 1732, 1639, 1560, 1507, 1449, 1038, 1259, 1228, 1162, 1137, 1028 cm^{-1}. EPR (DMSO, 77K): g_x = 2.075; g_y = 2.079; g_z = 2.336; $A_{\parallel}$ = 489 MHz. ESI-MS (m/z) = 776,4 [M + H]$^+$. За $C_{38}H_{48}O_{13}Cu$ (%):

израчунато C, 58,79; H, 6,32.
нађено C, 58,83; H, 6,33.

*[Cu(**L7**)$_2$H$_2$O]* (**CuL7**): Браон прах; принос: 79%; mp = 187 °C; UV-Vis (λ_{max}/nm, (log(ε/M^{-1} cm^{-1})): 303(5,41), 389(4,61). IR (KBr): ν 3450, 2934, 1722, 1634, 1546, 1514, 1336, 1273, 1137, 1018 cm^{-1}. EPR (DMSO, 77K): g_x = 2.077; g_y = 2.077; g_z = 2.336; $A_{\parallel}$ = 486 MHz. ESI-MS (m/z) = 744,4 [M + H]$^+$. За $C_{36}H_{40}O_{13}Cu$ (%):

израчунато C, 58,10; H, 5,42.
нађено C, 58,15; H, 5,40.

*[Cu(**L8**)$_2$H$_2$O]* (**CuL8**): Браон прах; принос: 76%; mp = 156 °C; UV-Vis (λ_{max}/nm, (log(ε/M^{-1} cm^{-1})): 398(4,33). IR (KBr): ν 3451, 2943, 1718, 1637, 1547, 1516, 1338, 1269, 1137, 1015 cm^{-1}. EPR (DMSO, 77K): g_x = 2.075; g_y = 2.080; g_z = 2.336; $A_{\parallel}$ = 490 MHz. ESI-MS (m/z) = 773,5 [M + H]$^+$. За $C_{32}H_{36}O_{13}Cu$ (%):

израчунато C, 59,10; H, 5,74.
нађено C, 59,15; H, 5,75.

2.2.2.1. Мерење стабилности комплекса бакра(II)

Стабилност комплекса у симулираним физиолошким условима је одређена применом UV-Vis спектроскопије. Припремљени су раствори комплекса бакра(II) у DMSO концентрације $1 \cdot 10^{-3}$ M који су разблажени раствором PBS (pH = 7,4) да би се добили раствори комплекса бакра(II) концентрације $1 \cdot 10^{-5}$ M. Као контролни узорак припремљен је раствор PBS са малом количином DMSO.

2.2.3. Комплекси цинка(II)

Синтеза цинк(II) комплекса изведена је на основу претходно објављене процедуре, уз мање модификације [156]. Смеша 2,0 mmol одговарајућих β-дикетоестара, 1,0 mmol $ZnCl_2$ и 10 mL сувог етанола мешана је на собној температури током 5 h. Добијени светложути талог је затим процеђен, испран етанолом и диетил-етром. Комплекси су потом кристалисани из кључалог етанола. Приноси комплекса су у опсегу 77–85 %. Сви комплекси су окарактерисани применом UV-Vis, IR и NMR спектроскопије, масене спектрометрије, као и елементалном анализом [159].

*[Zn(**L2**)$_2$]* **(ZnL2):**. Светложути прах; принос: 81 %; mp =103 °C; UV–Vis (λ_{max}/nm, (log(ε/M^{-1} cm^{-1})): 359(4,72); IR (KBr, cm^{-1}): *ν* 3393, 2976, 1724, 1597, 1512, 1490, 1445, 1272, 1224, 1203, 870; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 200 MHz) *δ* 7,50–7,26 (m, 6H, 2 × CHAr), 7,19–7,00 (m,

2H, 2 × CHAr), 6,53 (s, 2H, 2 × CH––CO), 4,21 (q, *J* =7,1 Hz, 4H, 2 × OCH_2), 3,75 (s, 6H, 2 × OCH_3), 1,27 (t, *J* =7,1 Hz, 6H, 2 × CH_3) ppm; ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 50 MHz) δ 187,95, 173,27, 165,42, 141,08, 129,64, 119,31, 117,29, 112,05, 93,81, 61,09, 55,22, 14,21 ppm; ESI-MS (*m*/*z*): $[M]^+$=563; За $C_{26}H_{26}O_{10}Zn$ (%):

израчунато C, 55,38; H, 4,65.
нађено C, 55,41; H, 4,66.

*[Zn(**L3**)$_2$]* **(ZnL3)**: Светложути прах; принос: 77 %; mp =122 °C; UV–Vis (λ_{max}/nm, (log(ε/M^{-1} cm^{-1}))): 383(4,79); IR (KBr, cm^{-1}): *ν* 3400, 2975, 1726, 1581, 1572, 1509, 1446, 1259, 1159, 1018, 969, 861; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 200 MHz) δ 7,77–7,61 (m, 4H, 2 × CHAr), 7,55–7,34 (m, 8H, 2 × CHAr + 2 × CH––), 6,95 (d, *J* =15,8 Hz, 2H, 2 × CH––), 6,14 (s, 2H, 2 × CH––CO), 4,21 (q, *J* =7,1 Hz, 4H, 2 × OCH_2), 1,28 (t, *J* =7,1 Hz, 6H, 2 × CH_3) ppm; ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 50 MHz) 186,42, 173,14, 165,22, 138,95, 129,75, 128,95, 128,16, 99,18, 61,12, 14,34 ppm; ESI-MS (*m*/*z*): $[M]^+$=555; За $C_{28}H_{26}O_8Zn$ (%):

израчунато C, 60,50; H, 4,71.
нађено C, 60,55; H, 4,70.

*[Zn(**L4**)$_2$]* **(ZnL4)**: Светложути прах; принос: 85 %; mp =114 °C; UV–Vis (λ_{max}/nm, (log(ε/M^{-1} cm^{-1}))): 369(4,61); IR (KBr, cm^{-1}): *ν* 3392, 2974, 1725, 1601, 1523, 1448, 1410, 1284, 1249, 1015, 863; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 200 MHz) δ 7,78 (dd, *J* =14,3, 4,0 Hz, 4H, 2 × CHAr), 7,21–7,08 (m, 2H, 2 × CHAr), 6,47 (s, 2H, 2 × CH––CO), 4,20 (q, *J* =7,1 Hz, 4H, 2 × OCH_2), 1,27 (t, *J* =7,1 Hz, 6H, 2 × CH_3) ppm; ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 50 MHz) δ 181,23, 172,70, 165,30, 146,03, 132,31, 129,26, 128,48, 93,43, 61,11, 14,22 ppm; ESI-MS (*m*/*z*): $[M]^+$=514; За $C_{20}H_{18}O_8S_2Zn$ (%):

израчунато C, 46,56; H, 3,52.
нађено C, 46,60; H, 3,53.

*[Zn(**L9**)$_2$]* **(ZnL9)**: Светложути прах; принос: 79 %; mp =119 °C; UV–Vis (λ_{max}/nm, (log(ε/M^{-1} cm^{-1}))): 362(4,49); IR (KBr, cm^{-1}): *ν* 3385, 2988, 1719, 1605, 1513, 1452, 1351, 1251, 1011, 863; ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 200 MHz) δ 8,55 (s, 2H, 2 × CHAr), 8,40–8,18 (m, 4H, 2 × CHAr), 7,80–7,65 (m, 2H, 2 × CHAr), 6,61 (s, 2H, 2 × CH––CO), 4,23 (q, *J* =7,1 Hz, 4H, 2 × OCH_2), 1,28 (t, *J* =7,1 Hz, 6H, 2 × CH_3) ppm; ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 50 MHz) δ 184,57, 174,58, 148,08, 140,88, 133,10, 130,37, 125,82, 121,52, 93,71, 61,29, 14,18 ppm; ESI-MS (*m*/*z*): $[M]^+$=593; За $C_{24}H_{20}N_2O_{12}Zn$ (%):

израчунато C, 48,54; H, 3,39; N, 4,72.
нађено C, 48,57; H, 3,37; N, 4,74.

2.3. Испитивање антимикробне активности

Испитивана је антибактеријска и антигљивична активност синтетисаних комплекса на панелу стандардних микробних сојева добијених из Америчке колекције типских култура (ATCC). Бактеријски сојеви су обухватали *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus mirabilis* (ATCC 29906) и *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70063). Фунгални панел је обухватао *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *Mucor mucedo* (ATCC 20094), *Candida albicans* (ATCC 10259), *Microsporum canis* (ATCC 36299) и *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188).

Бактеријски сојеви су узгајани на Müller–Hinton (MH) агару, док су гљивичне културе узгајане на Sabouraud dextrose (SD) агару (Torlak, Београд, Србија). Све културе су чуване на 4 °C до употребе. Бактеријски инокулуми су припремани од 24 ч култура на

МН агару инкубираних на 37 °C и подешени на приближно 10^8 cfu/ml према 0,5 McFarland стандарду. Фунгалне суспензије су припремане од 3–7 дана старих култура коришћењем стерилне дестиловане воде са приближно 10^6 cfu/ml, следећи NCCLS смернице [162].

Вредности минималне инхибиторне концентрације (MIC) су одређиване методом микродилуције у бујону у складу са претходно описаним поступком [163]. Раствори комплекса су припремани у 5% DMSO, праћени серијама двоструког разблажења у опсегу од 7,5 до 0,005 mg/ml у стерилним микротитарским плочама са 96 бунарића, које садрже МН бујон за бактерије и SD бујон за гљивице. Након тога, стандардизовани бактеријски или фунгални инокулуми и раствор ресазурина (као индикатор одрживости ћелија) су додати у одговарајуће бунариће. Плоче су инкубиране на 37 °C током 24 ч (бактерије) и на 28 °C током 72 ч (гљивице).

За бактеријске анализе, MIC је дефинисан као најнижа концентрација једињења која спречава промену боје ресазурина из плаве у розу, што указује на инхибицију раста ћелија. За гљивице, MIC је одговарао најнижој концентрацији која видљиво сузбија развој мицелије. Стрептомицин и кетоконазол су коришћени као позитивне контроле за антибактеријске и антифунгалне тестове, док је DMSO коришћен као негативна контрола, да би се потврдила компатибилност растварача.

Сви подаци су представљени као средња вредност резултата три паралелна мерења, са стандардном девијацијом. Статистичке евалуације су спроведене коришћењем Microsoft Office Excel и SPSS софтвера (верзија 26, IBM SPSS Statistics, Armonk, NY, USA). *t*-Тест је коришћен за одређивање статистичке грешке при чему се вредност $p < 0,05$ сматрала статистички значајном.

2.4. Одређивање цитотоксичне активности

Утицај синтетисаних комплекса на вијабилност ћелија рака дебелог црева SW480 и здравих кератиноцита HaCaT процењиван је применом MTT теста (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид). Ћелијске линије SW480 су набављене из ATCC (Manassas, VA, USA), а HaCaT из CLS (Cell Lines Service, Eppelheim, Germany). Ћелије су одржаване у DMEM медијуму према стандардним протоколима култивације ћелија [164].

За MTT тест, ћелије су посејане у плоче са 96 бунарића (10^4 ћелија по бунарићу) и остављене да се инкубирају 24 ч. Затим су третиране комплексима у концентрацијама од 1 до 200 μM (припремљеним у медијуму, са максималном концентрацијом DMSO од 0,1 %), док су нетретиране ћелије служиле као контрола. Одрживост ћелија је одређивана након 24 и 72 ч инкубације. Након инкубације, формирани кристали формазана су растворени у DMSO, а апсорпција је мерена спектрофотометријски [165]. Проценат одрживости ћелија израчунат је као однос апсорпције третираних и контролних ћелија, помножен са 100. Вредности IC_{50} одређиване су из дозно-зависних кривих помоћу CalcuSyn софтвера. Индекс селективности (SI) израчунат је као однос IC_{50} вредности према здравим HaCaT ћелијама и IC_{50} вредности према SW480 ћелијама карцинома.

Сви подаци су изражени као средња вредност уз стандардну девијацију три независна експеримента. Статистичка грешка је утврђена применом ANOVA или *t*-теста, при чему је вредност $p < 0,05$ сматрана статистичким значајном. Обрада података вршена је помоћу SPSS софтвера.

За анализу типа индуковане ћелијске смрти, коришћене су ћелије SW480, третиране са IC_{50} концентрацијом најактивнијег комплекса током 24 ч. Након третирања, ћелије су обојене смешом акридин-оранжа (AO) и етидијум-бромида (EB) (100 μg/ml, 1:1, 10 μl по бунарићу) [166]. Морфолошке промене и флуоресцентни сигнали анализирани

су под флуоресцентним микроскопом Nikon Ti-Eclipse при увећању од 400 пута. Ћелије су класификоване као: виталне (VC), рано апоптотичне (EA), касно апоптотичне (LA) и некротичне (NC), на основу типичних морфолошких карактеристика и бојења (зелена витална, зелено-жута рано апоптотична, наранџасто-црвена касно апоптотична-некротична). Проценат сваког типа ћелијске смрти израчунат је на основу више од 300 анализираних ћелија по узорку.

2.5. Испитивање интеракција са биомолекулима

2.5.1. Кинетичка мерења

Ради одређивања одговарајуће таласне дужине за кинетичка испитивања, спектралне промене су праћене у опсегу 220–450 nm након мешања једнаких запремина раствора комплекса и нуклеофила. Реакције супституције испитиваних комплекса метала са нуклеофилима, L-метионином (L-Мет) и 5'-гуанозинмонофосфатом (5'-GMP), проучаване су применом технике заустављеног тока. Концентрација нуклеофила је у свим експериментима била најмање десет пута већа од концентрације комплекса, како би се обезбедили услови за реакцију псеудо-првог реда. Све реакције су испитиване на температури од 310 K и при pH = 7,2 у 25 mM HEPES пуферу, уз додатак 50 mM NaCl ради спречавања спонтане хидролизе комплекса. Реакције су инициране мешањем једнаких запремина раствора у апарату за технику заустављеног тока. Вредности константи брзина псеудо-првог реда (k_{obsd}) израчунате су као средње вредности четири до шест пролаза применом софтвера Pro-Data SX.

2.5.2. Интеракције са DNA

2.5.2.1. Апсорпциона спектроскопија

Интеракције синтетисаних комплекса са CT-DNA испитиване су применом UV–Vis апсорпционе спектроскопије, на три различите температуре, како би се утврдио начин везивања за DNA и одредиле константе везивања (K_b). Вредност K_b је израчуната помоћу једначине (1), док су ван 't Хофове једначине (2) и (3) употребљене за одређивање термодинамичких параметара [167]. Константе везивања су израчунате из односа нагиба и одсечка на y-оси на графику односа [DNA]/(ε_A - ε_f) према [DNA].

$$[DNA]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f) = [DNA]/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f) \quad (1)$$

$$\ln K_b = -(\Delta H^0/RT) + (\Delta S^0/R) \quad (2)$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT\ln K_b \quad (3)$$

У наведеним једначинама [DNA] је концентрација DNA, ε_A је привидан екстинциони коефицијент који се рачуна за одређену концентрацију DNA на основу односа очитане апсорбанце (A_{obsd}) и концентрације комплекса, ε_f је екстинциони коефицијент слободног комплекса, ε_b је екстинкциони коефицијент везаног комплекса, ΔH је промена енталпије, R је универзална гасна константа, T је температура у степенима Келвинове скале (K), ΔSје промена ентропије, ΔG је промена Гибсове слободне енергије.

Апсорпционе титрације су извођене при константној концентрацији комплекса у фосфатном пуферу ($1{,}35 \cdot 10^{-5}$ M), при чему су растуће концентрације раствора CT-DNA ($1{,}34–12{,}6 \cdot 10^{-5}$ M) додаване директно у кивету. Спектри су снимани непосредно након мешања раствора, уз корекцију на разблажење. Мерења су извођена на три различите

температуре како би се одредиле термодинамичке карактеристике интеракције коплекса и CT-DNA.

2.5.2.2. Флуоросцентна спектроскопија

Флуоресцентна спектроскопија је примењена у циљу испитивања способности испитиваних комплекса да замене EB или HOE у EB-CT-DNA и HOE-CT-DNA системима и да интерагују са CT-DNA. У оквиру експеримената, припремљене су серије раствора комплекс-EB-CT-DNA и комплекс-HOE-CT-DNA. EB-CT-DNA систем је припремљен мешањем 12,5 μM EB и 4,5 μM CT-DNA у 0,01 M раствору PBS пуфера, а HOE-CT-DNA систем је припремљен мешањем 12,5 μM HOE и 6 μM CT-DNA. Потенцијално везивање комплекса је испитивано додавањем растућих количина испитиваних комплекса метала (0,50 - 5,00 · 10^{-5} M) у раствор EB-CT-DNA или HOE-CT-DNA. Распон емисије је варирао у зависности од експеримента, 550–750 nm за EB и 360–600 nm за HOE, док су таласне дужине ексцитације износиле 527 nm и 346 nm.

Добијени спектрални подаци су анализирани употребом Штерн-Волмерове једначине:

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q] \tag{4}$$

где су I_0 и I интензитети емисије у одсуству и присуству испитиваног комплекса (гасиоца флуоресценције), K_{SV} је Штерн-Волмерова константа, а [Q] је коначна концентрација испитиваног комплекса.

2.5.2.3. Мерење вискозитета

Мерења вискозитета су извршена на Anton Paar Lovis 2000 M/ME rolling-ball вискозиметру (Anton Paar GmbH, Грац, Аустрија). Како би се добили раствори са различитим односима комплекс:CT-DNA од 1 : 1, до 10:1, вискозитет је мерен при различитим концентрацијама комлекса (1,095 – 10,95 · 10^{-5} M) и константној концентрацији CT-DNA (1,095 · 10^{-5} M). Вискозитет раствора CT-DNA се обележава са η_0. док η представља вискозитет тестираних узорака на 298 K. График је конструисан на основу релативног вискозитета $(\eta/\eta_0)^{1/3}$, и односа концентрација комплекса и CT-DNA.

2.5.3. Интеракције са албумином

Способност комплекса да се везују за BSA је испитивана применом флуоресцентне титрације. Како би се испитала везивна места, коришћени су маркери, EY и ибупрофен. Експерименти су изведени са константним концентрацијама BSA и маркера (2 · 10^{-6} M), док су концентрације комплекса биле променљиве (4,98–47,6 · 10^{-6} M). Спектри су снимани непосредно након мешања раствора. Емисиони опсег спектара је 300 –500 nm, док је таласна дужина ексцитације износила 295 nm. Флуоресценција невезаних комлекса није детектована.

Како би се одредили везивни параметри и број везивних места, употребљене су Штерн-Волмерове једначине (5), (6) и Хилова једначина (7):

$$I_0/I = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \tag{5}$$

$$K_{SV} = k_q\tau_0 \tag{6}$$

$$\log[(I_0/I)/I] = \log K_b + n\log[Q] \tag{7}$$

где су I_0 and I интензитети емисије BSA у одсуству и присуству комплекса, k_q је константа гашења флуоресценције, τ_0 је трајање флуоресценције BSA без гасиоца флуоресценције, K_{SV} је Штерн-Волмерова константа, [Q] је коначна концентрација гасиоца флуоресценције, K_b је константа везивања и n је број везивних места у BSA.

2.6. Молекулско доковање

Молекулско доковање је изведено коришћењем програма Molegro Virtual Docker (MVD) [168] и AutoDock4 (AD4) [169]. Припрема система за симулације у оквиру AutoDock платформе извршена је помоћу програма AutoDockTools (ADT) и обухвата додавање водоника, одређивање AD4 типова, рачунање Гастејгерових (*Gasteiger*) наелектрисања, спајања неполарних водоника и рачунање интеракционих мапа. MVD користи параметризацију погодну за комплексе са прелазним металима, што га чини погодним за испитивање комплекса метала [170,171].

Тродимензионалне структуре циљних биомолекула преузете су из Протеинске базе података (Protein Data Bank, rcsb.org) [172]. За испитивање интеракција са DNA коришћене су структуре са PDB кодовима 1BNA (додекамер DNA за анализу везивања у жлебу) [173] и 1Z3F (структура DNA за испитивање интеркалације) [174]. За испитивање интеракција са протеинима коришћене су структуре албумина: 4JK4 [175] и 4F5S [176] (BSA), као и структуре 2BXD, 2BXF, 2BXG, 2BXI и 2BXO којима се моделују различита везивна места у хуманом серум албумину (HSA) [177]. Код BSA, анализирана су везивна места у близини триптофанских остатака (TRP134 и TRP213), док свака од HSA структура представља једно типично место за везивање одговарајућих лекова.

Све структуре циљних биомолекула припремљене су уклањањем ко-кристалисаних лиганада и молекула воде, корекцијом непотпуних остатака и подешавањем протонованог стања аминокиселина у складу са условима pH. У случају DNA молекула, извршене су додатне модификације неопходне за примену у симулацијама молекулског доковања, према раније описаним протоколима [171].

Структуре испитиваних комплекса најпре су моделоване и првобитно оптимизоване семи-емпиријском PM6 методом у програму MOPAC2016 [178], након чега је извршена потпуна геометријска оптимизација методом B3LYP/LANL2DZ [179, 180] у програму Gaussian 09 [181]. Оптимизоване структуре лиганада су затим припремљене за симулације молекулског доковања додељивањем одговарајућих типова атома, уносом израчунатих парцијалних наелектрисања и уоквиравањем неполарних водоника.

Свака грид кутија је дефинисана јединицом од 0,375 Å. Простори за претраге дефинисани су тако да обухвате релевантна места везивања. За анализу везивања у жлебу DNA дефинисана је грид кутија која обухвата целокупну структуру DNA, како би се омогућило испитивање свих потенцијалних места везивања. За анализу интеркалације, грид кутија је била коцка од 50 јединица центрирана око интеркалационог размака. Код протеинских структура простор претраге центриран је у позиције ко-кристалисаних лиганада или релевантних аминокиселинских остатака. Код BSA су грид кутије биле коцке од 80 јединица центриране око триптофанских остатака, док су код HSA грид кутије биле коцке од 60 јединица центриране око везивних места уклоњених ко-кристалисаних супстрата.

У програму MVD доковање је изведено помоћу алгоритма MolDock SE и MolDock Score функције [182]. Већина параметара задржана је на подразумеваним вредностима [183], с тим да су у евалуацију лиганда урачунате и интрамолекулске електростатичке

интеракције, интрамолекулске водоничне везе и sp^2–sp^2 торзиони параметри. Број алгоритамских пролаза је повећан на 20, како би се адекватно испитао конформациони простор.

У AutoDock4 симулацијама коришћен је Ламаркијански хибрид генетског алгоритма и локалне претраге (Lamarckian hybrid genetic algorithm-local search), са 20 претрага и максимално $2{,}5 \times 10^7$ енергетских евалуација по претрази, како би се извршило адекватно испитивање конформационог простора.

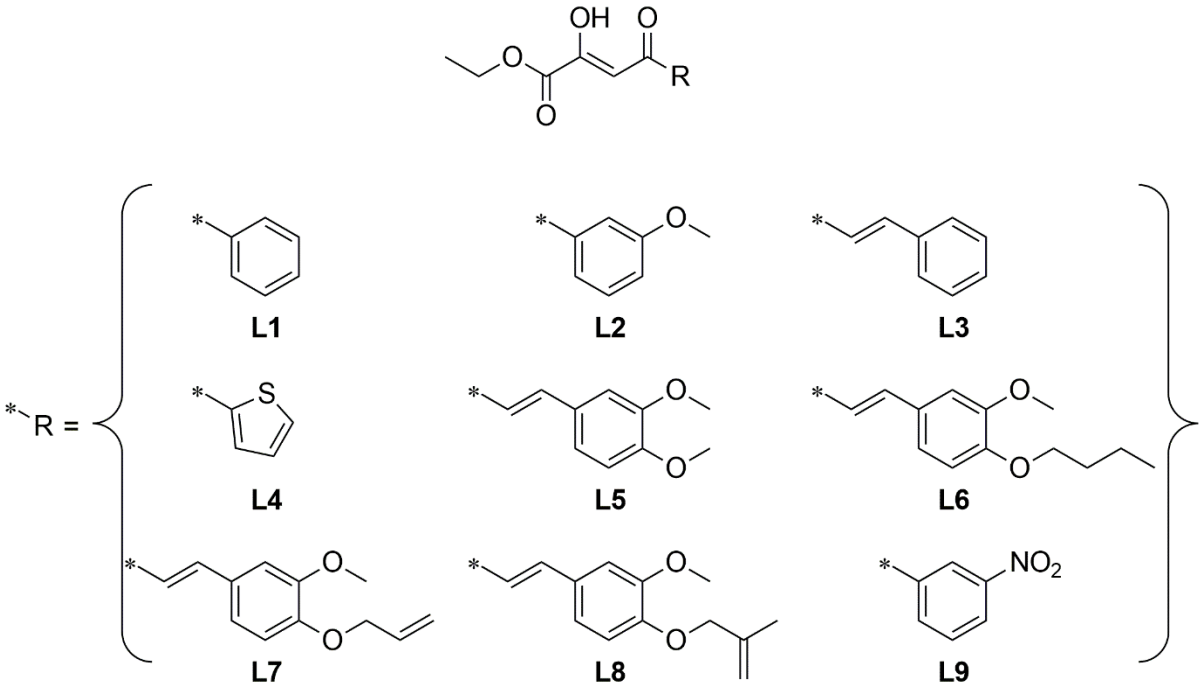
Валидација методе извршена користећи кокристалисане супстрате из структура мета, тако што су структуре супстрата изоловане, измењене додељивањем насумичних диедарских углова, и потом доковане циљајући везивна места из којих су изоловане. Овим поступком потврђена је поузданост коришћених параметара и способност метода да репродукују експериментално одређене начине везивања.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

3.1. Синтезе комплекса и њихова карактеризација

3.1.1. Синтезе лиганада

Лиганди **L1-L9** су 2,4-дикетоестри и синтетисани су применом Клајзенове кондензације у базним условима у реакцији између диетил-оксалата и одговарајуће супституисаног метил-кетона користећи познате протоколе [152-155]. Добијени лиганди су шематски приказани на Слици 13.



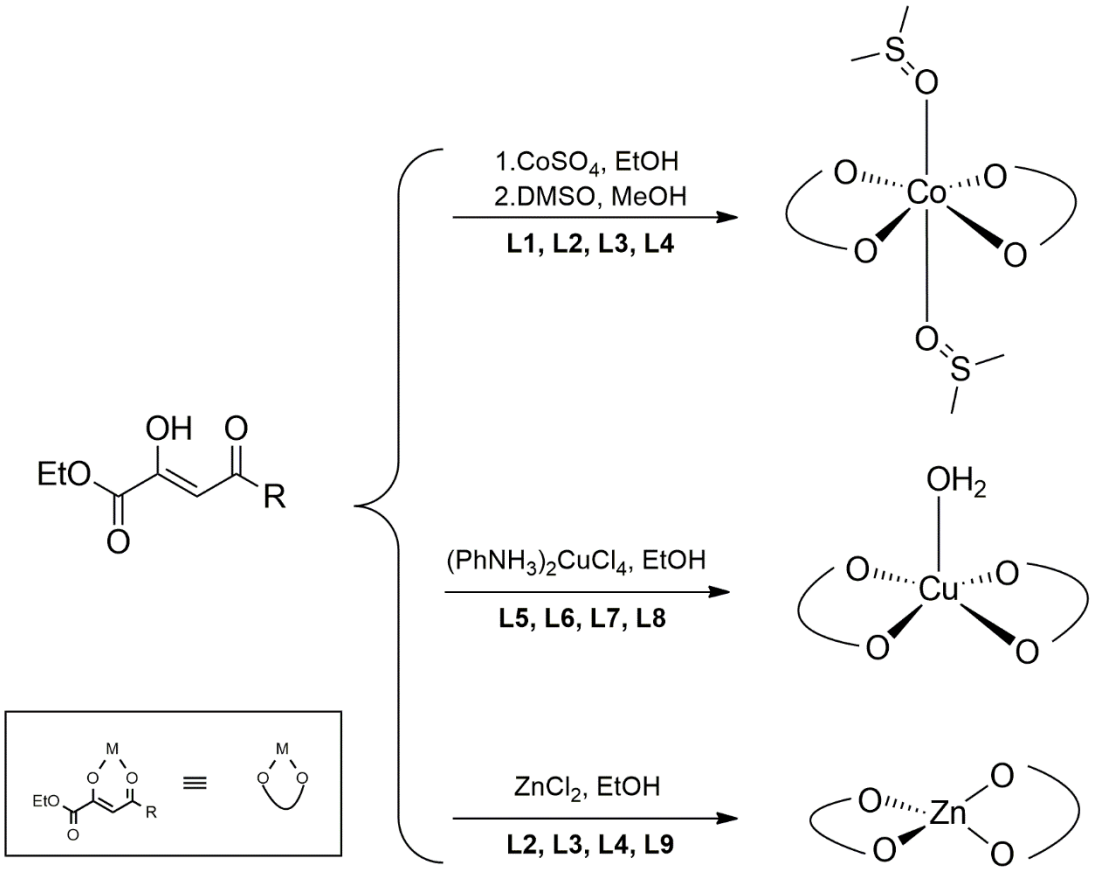
Слика 13. Структурне формуле 2,4-дикетоестара који су коришћени као лиганди за синтезу комплекса кобалта(II), бакра(II) и цинка(II).

Општа шема синтезе 2,4-дикетоестара коришћена за синтезу лиганада је приказана на Слици 11а. Реакција Клајзенове кондензације се врши у анхидрованом диетил-етру, охлађеном на -10 °C. У диетил-етру се растварају одговарајући кетон и диетил-оксалат у малом вишку (молски однос 1:1,2). Потом се у капима додаје 5,0 M раствор натријум-етоксида до молског односа кетон:етокисд 1:1,5. Већ у току додавања раствора натријум-етоксида, појављује се талог. Смеша се после потпуног додатка натријум-етоксида меша на собној температури још 30 минута. Добијени талог је процеђен, опран анхидрованим етром и остављен да се суши на собној температури. Осушени талог је потом растворен у води и закишељен до pH = 2,0 помоћу 6,0 M HCl. По додатку киселине, јавља се талог дикетоестра који је потом процеђен, испран водом и остављен да се суши на собној температури [152]. Полазни кетони за синтезу лиганада **L1**-**L4** и **L9** су комерцијално доступни. За потребе синтезе лиганада који садрже дехидрозингеронски фрагмент (Слика 12а), односно **L5**-**L8**, полазни кетони су синтетисани користећи познате протоколе [147-149]. Прво је дехидрозингерон синтетисан користећи Клајзен-Шмитову кондензацију између ванилина и ацетона. Ванилин се раствара у ацетону у молском односу ванилин:ацетон (1:10), после чега се одређеној запремини овог раствора додаје једнака запремина 10% раствора NaOH и оставља преко ноћи уз мешање. После инкубационог периода, раствор је неутралисан помоћу 10% раствора HCl приликом чега се издваја дехидрозингерон као талог који је процеђен и испран водом. Хидроксилна група овако добијеног дехидрозингерона се

подвргава алкиловању помоћу вишка одговарајућег алкил-јодида у присуству анхидрованог калијум-карбоната у ацетону уз рефлуктовање. Добијен талог је процеђен, испран ацетоном, и сушен на ваздуху а потом коришћен као полазни кетон у синтези одговарајућих лиганада [148].

3.1.2. Синтеза и карактеризација комплекса кобалта(II)

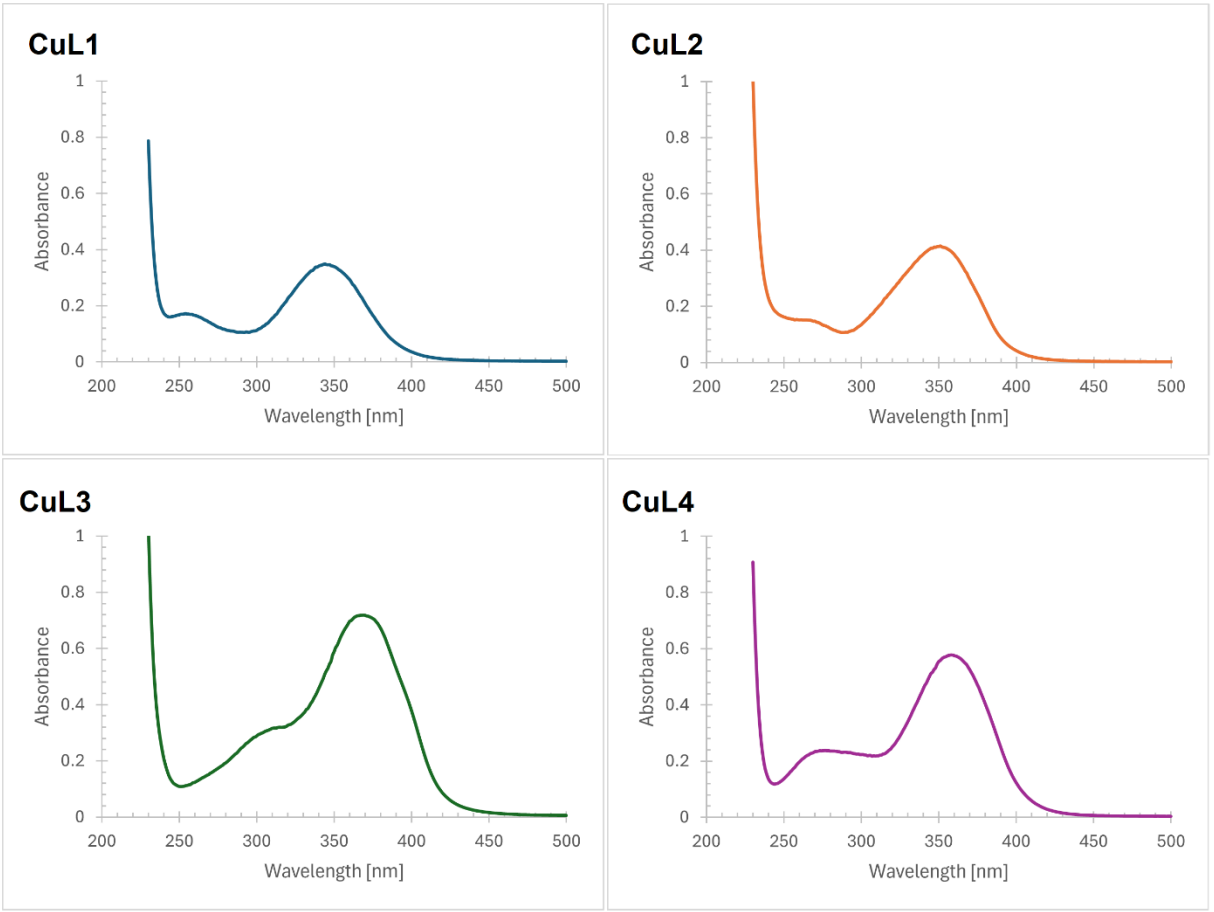
Претходно синтетисани лиганди, **L1-L4**, су коришћени за синтезу одговарајућих комплекса кобалта(II), **CoL1-CoL4** [157]. Први корак у реакцији синтезе комплекса је координација жељеног лиганда за кобалт(II) јон која је остварена директном реакцијом лиганда и $CoSO_4$ соли у молском односу 2:1 у етанолу као растварачу. У овом кораку се добија талог који се испира метанолом и суши на собној температури. Други корак је координација DMSO за кобалт(II), која се дешава по додатку добијеног талога у смешу DMSO и метанола, приликом чега се формирају кристали комплекса (Слика 14.).



Слика 14. Шематски приказ синтеза комплекса кобалта(II), бакра(II) и цинка(II) са различитим 2,4-дикето естрима као лигандима. Шематски приказ структура лиганада L1-L9 је на Слици 13.

Овако добијени комплекси су октаедарске геометрије са централним јоном кобалта(II) за који су бидентатно координована два молекула одговарајућег 2,4-дикетоестра у екваторијалним положајима и два молекула DMSO у аксијалним положајима. Оваква координација лиганада истог типа за јон кобалта(II) је потврђена кристалографским резултатима добијеним у претходним истраживањима [156]. Новосинтетисани комплекси су окарактерисани UV-Vis и IR спектроскопијом, масеном спектрометријом и елементалном анализом.

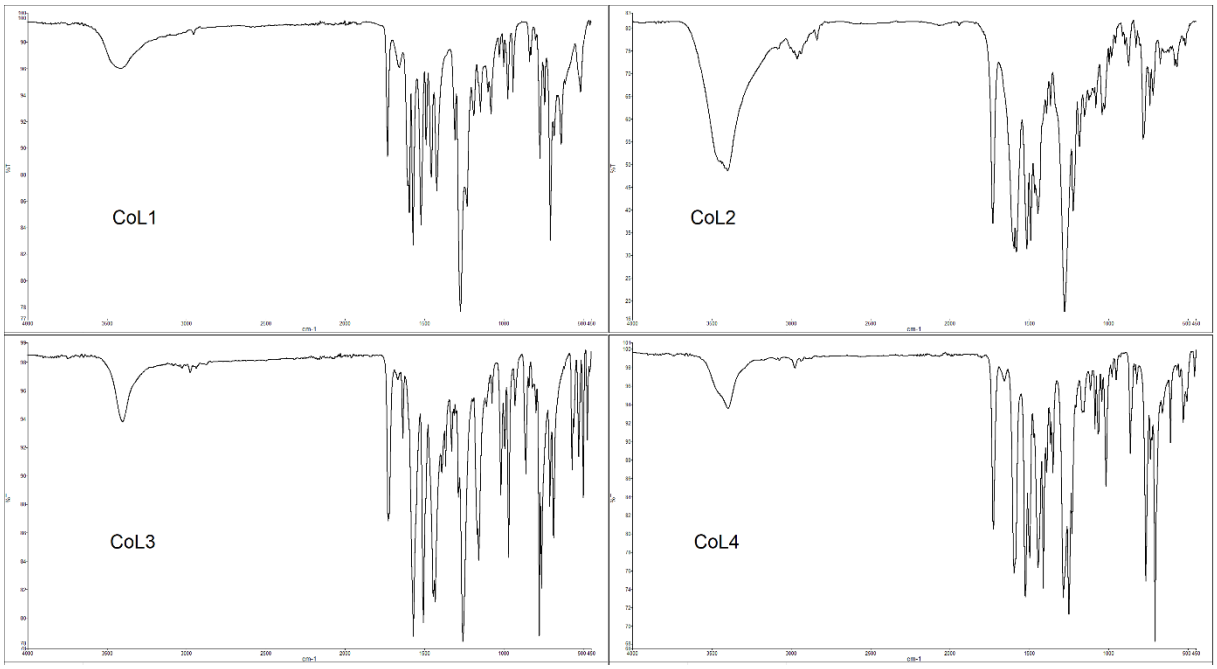
Релативно широке апсорпционе траке које у добијеним UV-Vis спектрима имају апсорпционе максимуме на таласним дужинама између 340 и 370 nm [157] потичу од интралигандних $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза конјугованих двоструких веза или $n \rightarrow \pi^*$ прелаза карбонилних група. Апсорпциони UV-Vis спектри добијених комплекса су приказани на Слици 15.



Слика 15. UV-Vis спектри комплекса кобалта(II) са 2,4-дикетоестрима као лигандима. Приказана је вредност апсорбанце (*eng. Absorbance*) у односу на таласну дужину у нанометрима (*eng. Wavelength [nm]*).

Разлика у инфрацрвеним спектрима између одговарајућих лиганада и комплекса значајно доприноси разумевању понашања 2,4-дикето енолног система приликом координације. Делокализација π-електрона преко конјугованих двоструких веза енолног облика је одговорна за смањење двоструког карактера обе везе, а самим тим и ниже фреквенције сигнала који потичу од ових веза [152]. Неконјугована карбонилна група је углавном одговорна за валенциону вибрацију на око 1700 cm^{-1}, међутим код лиганада, траке које потичу од валенционих вибрација конјугованих двоструких веза, ν(C=O)/ν(C=C), јављају се на око 1600 cm^{-1} [157]. Приликом координације, таласни број дотичних трака се додатно смањује (око 1580 cm^{-1}) што указује на издуживање, односно смањење реда карбонилне везе услед координације за јон метала. С друге стране, таласни број траке која која потиче од валенционе вибрације енолног атома кисеоника ν(C-O) се помера са око 1230 cm^{-1} у некоординованом лиганду на око 1250 cm^{-1} у комплексу [157]. Ова промена подржава теорију о координацији преко енолног атома кисеоника која се

највероватније дешава уз његову депротонацију. Апсорпциони IR спектри добијених комплекса су приказани на Слици 16.



Слика 16. IR спектри комплекса кобалта(II) са 2,4-дикетоестрима као лигандима. Приказан је проценат трансмитанце (%T) у односу на таласни број (cm^{-1}).

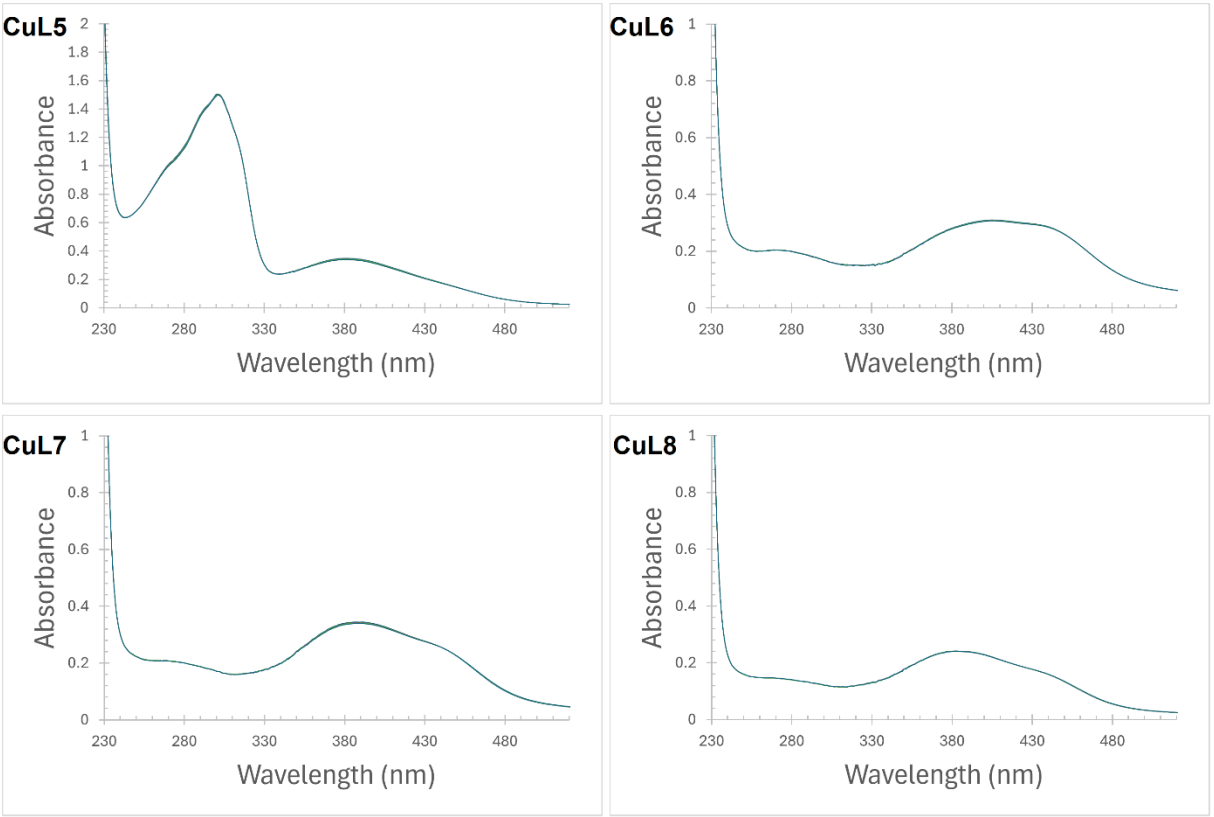
Ове спектралне промене удружено потврђују да се 2,4-дикетоестар координује за кобалт(II) преко атома кисеоника енолне групе и атома кисоника карбонилне групе при чему се формира стабилан шесточлани хелатни прстен [184,185]. Ови резултати потврђују претпостављену структуру, која је у складу са резултатима масене спектрометрије и елементалне анализе.

3.1.3. Синтеза и карактеризација комплекса бакра(II)

Лиганди **L5-L8** су коришћени за синтезу комплекса бакра(II) **CuL5-CuL8** [158]. Синтеза је вршена у етанолу као растварачу, приликом чега је со бис(фениламонијум)тетрахлоридокупрат(II) $(PhNH_3)_2CuCl_4$ помешана са одговарајућим лигандом у молском односу 1:2 (Слика 14). Со $(PhNH_3)_2CuCl_4$ је изабрана за синтезе на основу раније изведене оптимизације приликом које је утврђено да синтезе у којима се користе бакар(II)-хлорид, бакар(II)-ацетат или бакар(II)-сулфат као извор бакар(II) јона дају значајно ниже приносе од изабране соли и у кључалом етанолу као растварачу, док се синтеза са $(PhNH_3)_2CuCl_4$ може извести и на собној температури [152]. Координација ових лиганада за бакар(II) јон се одвија спонтано на собној температури. Добијени су комплекси где су два 2,4-дикетоестарска лиганда бидентатно координована за бакар(II) јон у основи квадратно-пирамидалне геометрије и где је један аква лиганд координован у аксијалном положају [158]. Оваква координација је претпостављена на основу раније синтетисаних комплекса бакра(II) са 2,4-дикетоестрима као лигандима чија је структура окарактерисана кристалографским методама [152]. Новосинтетисани комплекси су окарактерисани UV-Vis, IR и EPR спектроскопским методама, масеном спектрометријом и елементалном анализом.

На основу UV-Vis спектара могу се идентификовати одређене врсте координованих система и може се испратити стабилност комплекса у раствору.

Идентификовани су релативно слаби и широки сигнали са максимумима између 380-400 nm [158] који потичу од интралигандних $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза конјугованих двоструких веза или $n \rightarrow \pi^*$ прелаза карбонилних група. Праћењем промена интензитета ових сигнала у неком одређеном временском периоду може се утврдити постојаност комплекса метала у симулираним физиолошким условима. На основу изостанка уочљиве промене у интензитету спектара комплекса бакра(II) сниманих у раствору PBS закључено је да су сви новосинтетисани комплекси бакра(II) довољно стабилни у периоду потребном за испољавање биолошке активности (Слика 17).



Слика 17. UV-Vis спектри комплекса бакра(II) са 2,4-дикетоестрима. У сваком квадранту је приказано по 10 преклопљених спектара од којих је сваки снимљен у размаку од 3 минута. Приказана је вредност апсорбанце у односу на таласну дужину [nm].

Као и код карактеризације комплекса кобалта(II) IR спектри комплекса бакра(II) дају важну информацију о начину координације 2,4-дикето енолног система. Јаке апсорпционе траке на приближно 1580 cm^{-1} које потичу од конјугованих ν(C=O)/ ν(C=C) валенционих вибрација се померају ка мањим таласним бројевима од приближно 1550 cm^{-1} приликом координације. Таласни број валенционе вибрације C-O везе некоординованог енолног атома кисеоника ν(C-O) се са приближно 1255 cm^{-1} помера на приближно 1270 cm^{-1} приликом координације што указује на депротоновање [158]. Као и код комплекса кобалта(II), ове спектралне промене удружено указују на координацију енолног облика 2,4-дикетоестра за бакар(II) преко карбонилног атома кисеоника и енолног атома кисеоника, при чему се и у овом случају формира стабилан шесточлани хелатни прстен [184,185]. Претпостављена структура комплекса је у складу са стехиометријским подацима добијеним на основу масене спектрометрије и елементалне анализе [158].

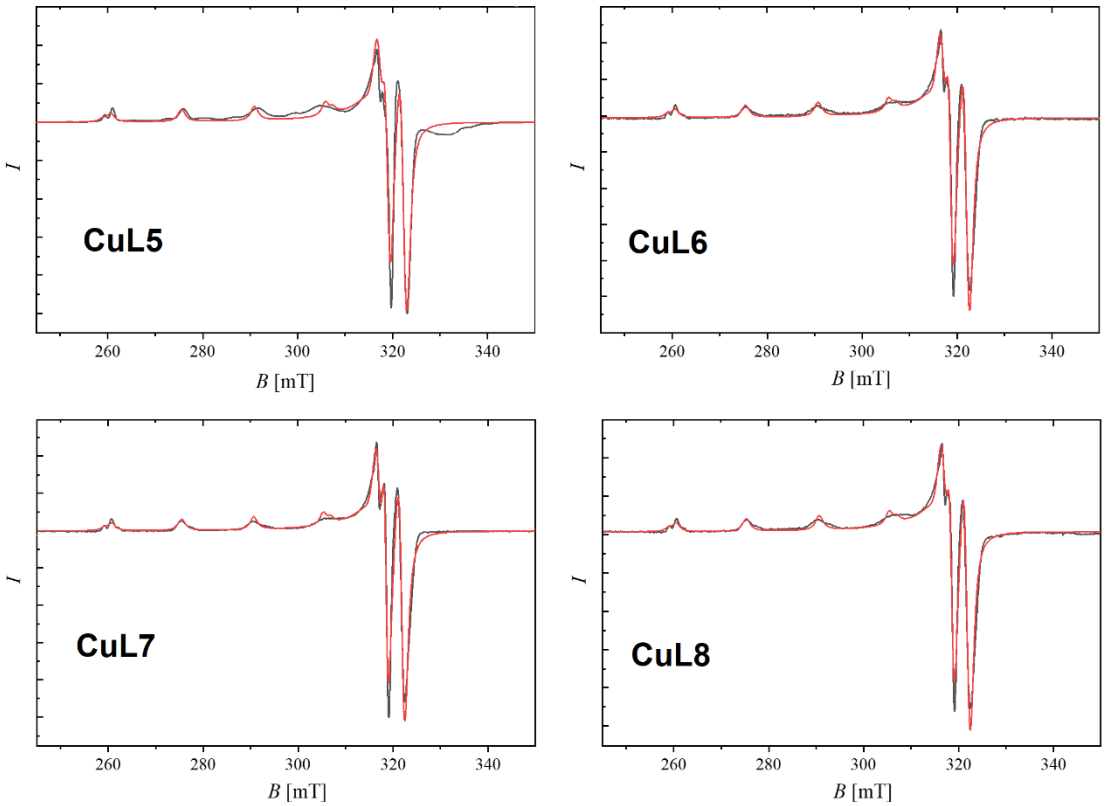
EPR спектроскопија је моћна метода помоћу које се може доћи до значајних закључака о структурама једињења и особинама материјала на основу вредности *g*-фактора и хиперфиних интеракција [186]. Вредност *g*-фактора је бездимензионална величина еквивалентна односу измереног магнетног момента за неку честицу и магнетног момента честице истог наелектрисања и угаоног момента, израчунатог класичном механиком. За слободан електрон је израчуната вредност *g*-фактора g_e = 2,0023 [187]. Код дегенерисаних *d* орбитала вредност *g*-фактора је идентична као код слободног електрона. Лиганди разбијају симетрију приликом чега се губи дегенерисаност орбитала што доводи до враћања утицаја који орбитале имају на магнетни моменат електрона кроз спин-орбитално купловање основног (E_0) и различитих ексцитованих (E_n) стања. Услед тога се јавља анизотропија *g*-фактора који одступа од вредности коју показује слободан електрон, на начин који је приказан у једначини (8) [186,187].

$$g_i = 2{,}0023 \pm k\lambda / (E_0 - E_n) \quad (8)$$

У једначини (8) се i односи на координату x, y или z, *k* је степен мешања орбитала, а λ представља константу спин-орбиталног купловања. Дефинисани су аксијално паралелни *g*-фактор ($g_\parallel = g_z$) и аксијално нормални *g*-фактор ($g_\perp = g_x = g_y$). Код компресоване октаедарске или тригонално-бипирамидалне геометрије очекује се да $g_\perp$ фактор покаже већу вредност од $g_\parallel$ фактора који је близак g_e вредности. Код ромбичне геометрије g_x и g_y су различитих вредности и очекује се да покажу вишу вредност у односу на $g_\parallel$ фактор. Код издужене октаедарске и квадратно-пирамидалне геометрије, очекивана вредност $g_\perp$ фактора је нижа од вредности $g_\parallel$ фактора [186,187]. Сви EPR спектри испитиваних комплекса бакра(II) су снимљени у залеђеном раствору DMSO на температури од 77 K при чему се сузбија кретање молекула [158]. С обзиром на нуклеарни спин 3/2 језгра бакра, уочено је добро дефинисано паралелено хиперфино цепање при чему је за све комплексе вредност константе паралелног хиперфиног купловања ($A_\parallel$) приближно 490 MHz (Табела 1), док је константу нормалног хиперфиног купловања врло ниске вредности ($A_\perp$ < 5 MHz) немогуће прецизно одредити [158]. Вредност $A_\parallel$ указује на аксијално издужену структуру [188]. Сви снимљени EPR спектри за испитиване комплексе бакра(II) су приказани на Слици 18.

Табела 1. Подаци добијени на основу EPR спектара синтетисаних комплекса бакра(II). Дате су вредности *g*-фактора и константе паралелелног хиперфиног купловања за сваки комплекс.

Испитивана једињења	g_x	g_y	g_z	$A_\parallel$ [MHz]
CuL5	2,073	2,078	2,335	492
CuL6	2,075	2,079	2,336	489
CuL7	2,077	2,077	2,336	486
CuL8	2,075	2,080	2,336	490



Слика 18. EPR спектри комплекса бакра(II) са 2,4-дикетоестрима као лигандима. Приказан је однос интензитета апсорпционог сигнала (*I*) у произвољним јединицама са јачином магнетног поља (*B* [mT]).

На основу високе вредности g_z и нижих али изједначених вредности g_x и g_y утврђених за све испитане комплексе може се установити да је аксијално паралелни *g*-фактор значајно већи од аксијално нормалног *g*-фактора ($g_{\parallel} > g_{\perp}$) што указује на геометрије попут издужене октаедарске геометрије или квадратно-пирамидалне геометрије код свих комплекса [188]. Запажања изведена на основу *g*-фактора и константи хиперфиног купловања се слажу са претпоставкама о квадратно-пирамидалној геометрији синтетисаних комплекса [158].

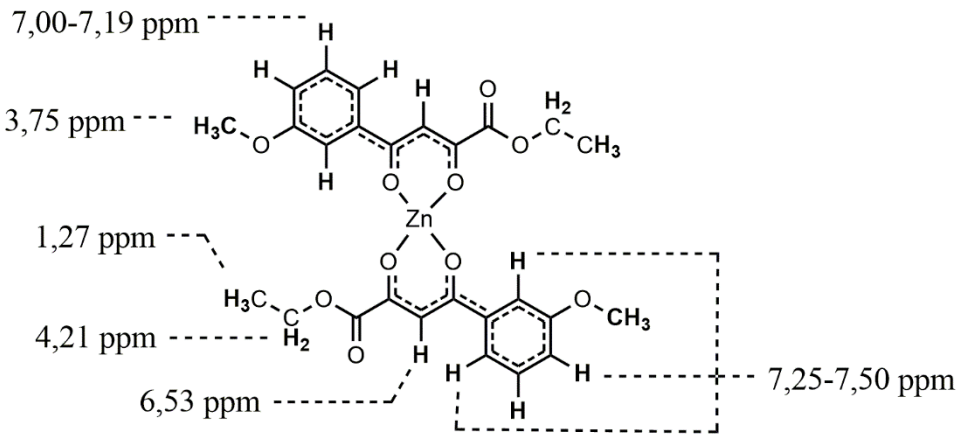
3.1.4. Синтеза и карактеризација комплекса цинка(II)

Лиганди **L2-L4**, и **L9** су коришћени за синтезу комплекса цинка(II) **ZnL2-ZnL4** и **ZnL9** [159]. Комплекси су добијени у реакцији соли $ZnCl_2$ и одговарајућег лиганда у молском односу 1:2 (Слика 14). Реакције синтезе су вршене у апсолутном етанолу као растварачу на собној температури. Добијени су тетраедарски комплекси цинка при чему су за централни јон цинка(II) бидентано координована два молекула 2,4-дикетоестра. Новосинтетисани комплекси су окарактерисани UV-Vis, IR и NMR (^{1}H и ^{13}C) спектроскопијом, масеном спектрометријом и елементалном анализом [159].

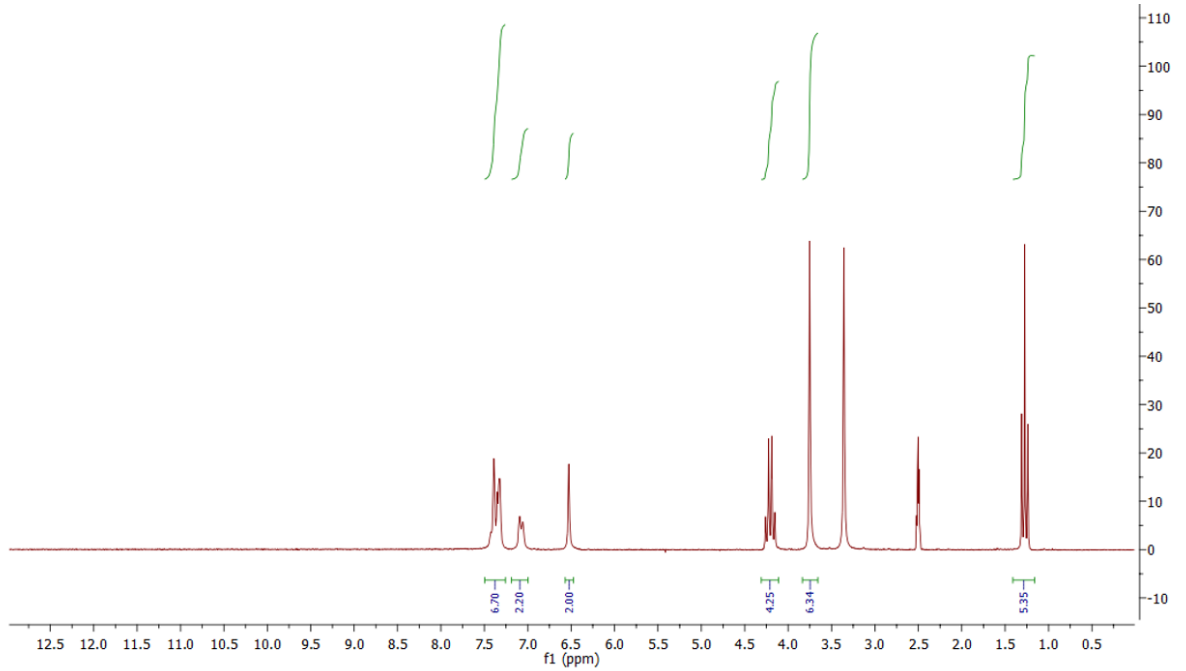
Широке апсорпционе траке у опсегу 350-390 nm [159] које се јављају у UV-Vis спектрима испитиваних комплекса цинка(II) са 2,4-дикетоестрима потичу од интралигандних $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза конјугованих двоструких веза или $n \rightarrow \pi^*$ прелаза карбонилних група. На основу разлика у IR спектрима слободног лиганда и комплекса могу се донети закључци о начину координације 2,4-дикетоестара за јон цинка(II), као што је то случај и код комплекса кобалта(II) и бакра(II). У некоординованом лиганду, валенционе вибрације конјугованог система карбонилне групе и двоструке енолне везе

ν(C=O)/ ν(C=C) дају јаке траке у области од 1529-1628 cm^{-1} док се траке које потичу од координованог лиганда померају на 1513-1601 cm^{-1}, што указује на њихову координацију за јон цинка(II) преко карбонилног атома кисеоника. Валенциона вибрација C-O везе која садржи енолни атом кисеоника ν(C-O) се јавља у опсегу од 1217-1249 cm^{-1} у некоординованом лиганду, док се у комплексу помера на 1249-1272 cm^{-1}, што указује на координацију лиганда преко енолног атома кисеоника уз депротонацију. Ове спектралне промене удружено указују на координацију енолне форме 2,4-дикетоестра за јон цинка(II) преко карбонилног атома кисеоника и енолног атома кисеоника, при чему се формира стабилан шесточлани хелатни прстен [184,185], као и код комплекса кобалта(II) и бакра(II) [157,158].

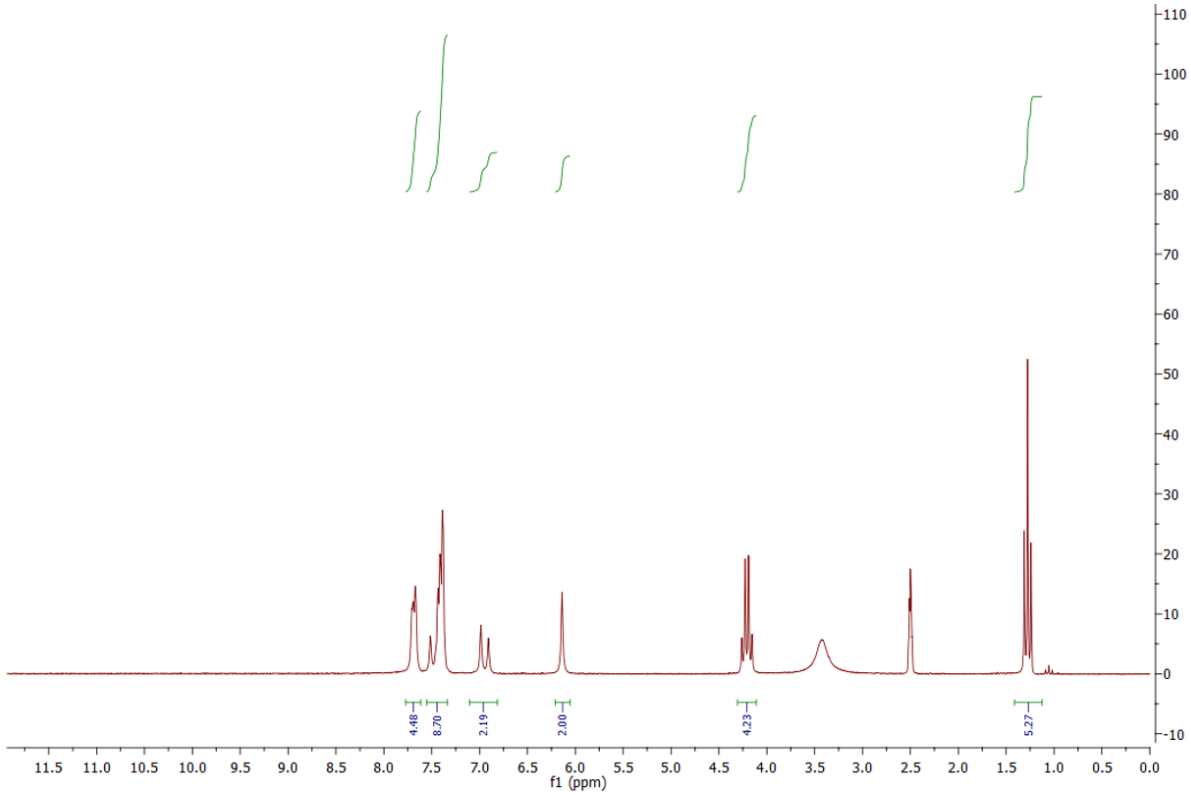
^{1}H NMR спектроскопија даје додатан доказ за координацију лиганда путем енолног атома кисеоника. Наиме, карактеристичан сигнал који потиче од енолског протона хидроксиле групе у слободном лиганду на δ ≈ 15 ppm [152,155], у потпуности нестаје након његове координације за јон цинка(II) што представља доказ грађења координационе везе између јона метала и лиганда који садржи хидроксилну групу [189,190]. Структура **ZnL2** са обележеним померањима је као пример приказана на Слици 19. ^{1}H NMR спектри испитиваних комплекса цинка(II) са 2,4-дикетоестрима су приказани на Сликама 20-23. На свим добијеним спектрима се јављају сигнали који потичу од протона из естарске етил групе, односно квадруплет -CH_2-O- на δ ≈ 4,21 ppm и триплет CH_3- на δ ≈ 1,27. Још један сигнал је заступљен у свим добијеним спектрима, синглет између 6,14 и 6,61 ppm који потиче од протона на *β*-угљенику. У спектру **ZnL2** се налази синглет на δ = 3,75 ppm који потиче од протона метокиси групе -OCH_3. Остали сигнали на δ > 7,00 ppm потичу од протона везаних за атоме који се налазе унутар ароматичног прстена или су са прстеном конјуговани.



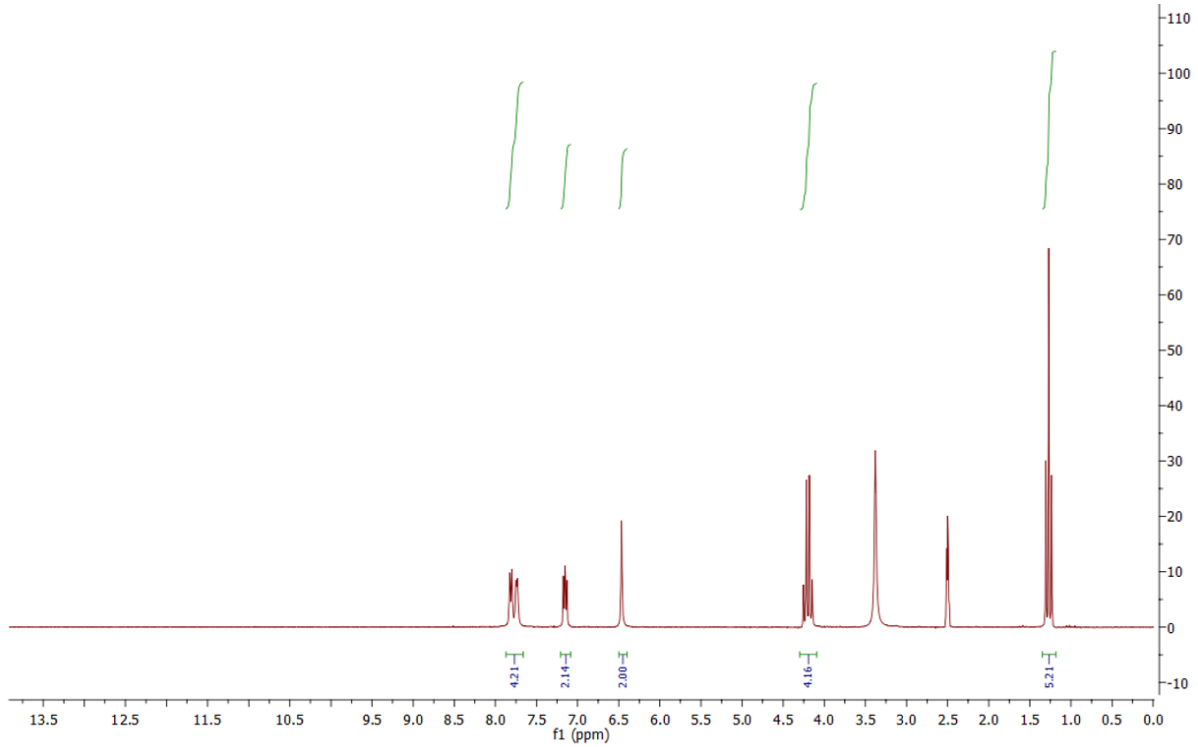
Слика 19. Структура комплекса **ZnL2** и протонска померања у ^{1}H NMR спектру.



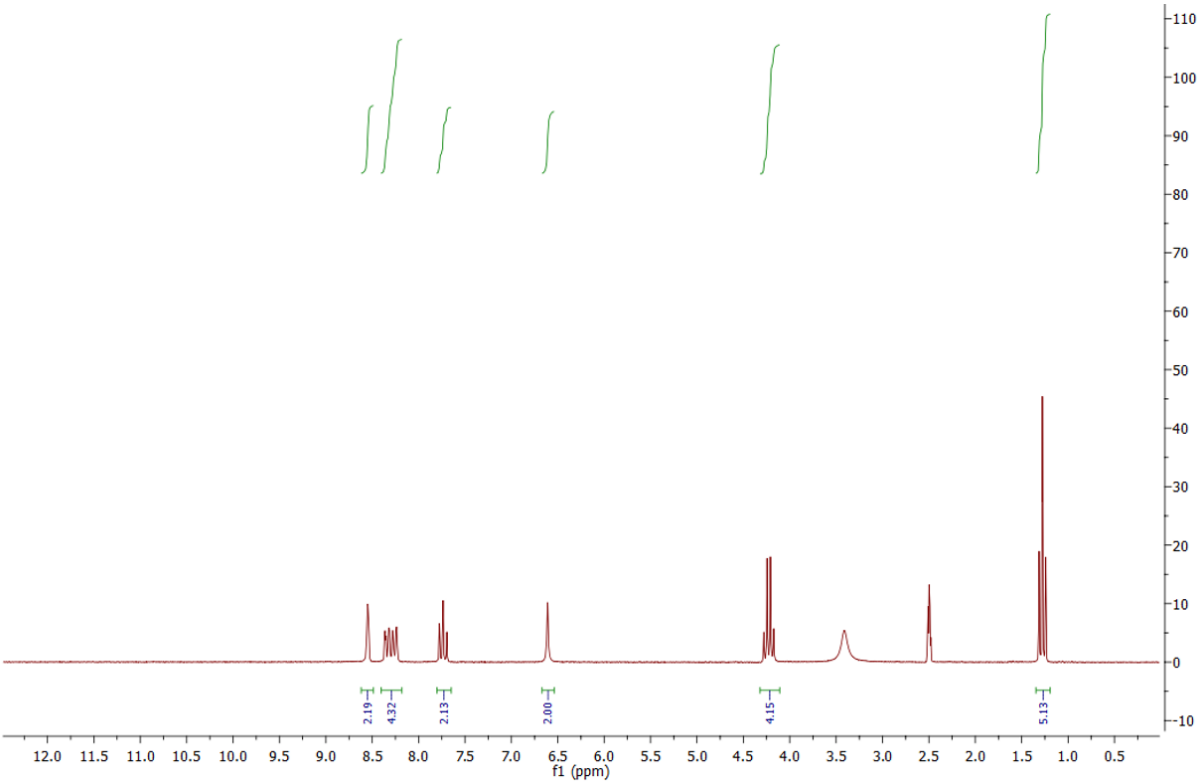
Слика 20. ^{1}H NMR спектар комплекса **ZnL2** на 200MHz у раствору DMSO-*d6* на 20°C.



Слика 21. ^{1}H NMR спектар комплекса **ZnL3** на 200MHz у раствору DMSO-*d6* на 20°C.



Слика 22. ^{1}H NMR спектар комплекса **ZnL4** на 200MHz у раствору DMSO-*d6* на 20°C.



Слика 23. ^{1}H NMR спектар комплекса **ZnL9** на 200MHz у раствору DMSO-*d6* на 20°C.

3.2. Биолошка испитивања

3.2.1. Антимикробна активност синтетисаних комплекса

Антимикробна активност новосинтетисаних комплекса је одређена на основу вредности минималне инхибиторне концентрације (MIC) према микроорганизмима који укључују људске, животињске и биљне патогене, микроорганизме који производе микотоксине и узрочнике кварења хране. Активност комплекса је упоређена са активношћу стандардних лекова. Антибактеријска активност је поређена са стрептомицином (Табела 2), док је антифунгална активност поређена за кетоконазолом (Табела 3). Као контрола је коришћен 5% DMSO за који је експериментално утврђено да не утиче на раст микроорганизама, међутим, додатно је разблажен у медијуму. У табелама су представљене средње вредности три независна мерења. У свим случајевима је стандардна девијација у вредности од ± 0,001. Постоји статистички значајна разлика између контроле и тестираних једињења ($p < 0,05$).

Већина тестираних комплексних једињења кобалта(II) су показала инхибиционо дејство према расту микроорганизама, приликом чега су MIC вредности између 0,01 и 7,5 mg/ml. Комплекс **CoL1** је показао најбољи антимикробни потенцијал међу комплексима кобалта(II), а чак и већу антифунгалну активност од кетоконазола према одређеним сојевима гљивичних култура. Сва испитивана комплексна једињења бакра(II) су показала инхибиторну активност према тестираним микроорганизмима са MIC вредностима између 0,01 и 7,5 mg/ml. Комплекс **CuL7** је показао уопштено највећу антибактеријску активност, док је **CuL6** најактивнији према *K. pneumoniae,* сој који се показао као најотпорнији према испитиваним комплексима бакра(II). Највећу антифунгалну активност према већини тестираних сојева је показао комплекс **CuL5**, осим у случају *M. mucedo,* сој према коме је највећу ефикасност показао **CuL6**. Тестирана једињења цинка(II) су уопштено показала нешто мању антибактеријску активност у односу на тестирана једињења кобалта(II) и бакра(II), међутим и међу њима постоје једињења са врло ниским MIC вредностима према одређеним сојевима гљивица. Утврђене MIC вредности су између 0,01 и 7,5 mg/ml, при чему је 7,5 mg/ml највећа тестирана концентрација. Комплекс **ZnL4** је најефикаснији инхибитор раста *M. canis* међу свим испитиваним комплексима а уопштено је најактивнији комплекс цинка(II).

На основу добијених резултата (Табеле 2,3) може се закључити да су гљивице подложније дејству комплекса кобалта(II), бакра(II) и цинка(II) од бактерија. Од изабраних сојева, најподложније деловању испитиваних једињења су се показале *P. mirabilis* и *T. rubrum*, патогене гљивице које код људи настањују кожу, нокте и косу, изазивајући дерматофитију. Претпоставља се да се антигљивична активност ових једињења јавља услед ометања биосинтезе ергостерола, који је кључна компонента гљивичних ћелијских мембрана, што доводи до компромитованог мембранског интегритета. Додатни механизми потенцијално доприносе смањењу ћелијске запремине, митохондријалне дисфункције и инхибицији раста мицелијума [159]. Један од раније синтетисаних комплекса кобалта(II) са 2,4-дикетоестрима и DMSO који је у својој групи показао најизраженије активности према групи тестираних микроба [156], показује сличне антибактеријске активности као **CoL1**, приликом чега **CoL1** показује незнатно већу ефикасност према *S. aureus* и *P. mirabilis* али показује значајно већу активност према гљивичним културама. Раније одређена биолошка активност једињења која су коришћена као лиганди **L5** и **L6** [147] показује да комплекси бакра(II) са тим једињењима **CuL5** и **CuL6** показују незнатно нижу активност према сојевима бактерија *S. aureus и B. subtilis*, али значајно вишу активност према сојевима бактерија *E. coli* и *P. mirabilis*, и гљивици *M. mucedo.*

Табела 2. MIC вредности испитиваних једињења према различитим бактеријским културама.

Испитивана једињења	MIC [mg/ml]				
	Bacillus subtilis	*Staphylococcus aureus*	*Escherichia coli*	*Proteus mirabilis*	*Klebsiella pneumoniae*
CoL1	0,46	0,23	0,93	0,23	3,75
CoL2	3,75	0,46	3,75	1,87	7,5
CoL3	7,5	7,5	7,5	7,5	>7,5
CoL4	3,75	1,87	7,5	0,93	7,5
CuL5	0,46	0,46	0,46	0,23	7,5
CuL6	0,23	0,23	0,23	0,46	3,75
CuL7	0,11	0,23	0,23	0,23	7,5
CuL8	0,23	0,46	1,87	0,46	7,5
ZnL2	7,5	3,75	7,5	7,5	>7,5
ZnL3	3,75	>7,5	>7,5	7,5	>7,5
ZnL4	3,75	0,93	3,75	3,75	7,5
ZnL9	7,5	3,75	7,5	7,5	>7,5
Стрептомицин	0,01	0,03	0,03	0,07	0,03

Табела 3. MIC вредности испитиваних једињења према различитим гљивичним културама.

Испитивана једињења	MIC [mg/ml]				
	Aspergillus fumigatus	*Mucor mucedo*	*Candida albicans*	*Microsporum canis*	*Trichophyton rubrum*
CoL1	0,05	0,01	0,46	0,02	0,02
CoL2	0,93	0,02	0,93	0,02	0,02
CoL3	7,5	3,75	7,5	0,46	0,11
CoL4	3,75	0,05	7,5	0,05	0,02
CuL5	0,11	1,87	0,23	0,01	0,02
CuL6	0,11	0,46	0,23	0,05	0,11
CuL7	0,11	0,93	0,23	0,02	0,02
CuL8	3,75	3,75	3,75	0,02	0,05
ZnL2	3,75	3,75	3,75	0,02	0,05
ZnL3	7,5	3,75	0,46	0,23	0,05
ZnL4	0,46	3,75	3,75	0,01	0,05
ZnL9	7,5	3,75	3,75	0,23	1,87
Кетоконазол	0,15	0,15	0,03	0,001	0,001

3.2.2. Антитуморска активност синтетисаних комплекса

Услед интензивног трагања за све бољим хемотерапеутским агенсима, све више се обраћа пажња на комплексе прелазних метала који се природно налазе у људском организму (есенцијални јони метала). Међу њима као кандидати обећавају комплекси кобалта(II) [191,192], бакра(II) [193-196] и цинка(II) [119, 197-199]. Биолошка активност великог броја комплекса ових метала је испитивана према различитим ћелијским линијама тумора [200]. У оквиру ове дисертације урађени су MTT тестови ради утврђивања одрживости ћелија у периодима од 24 и 72 ч од тренутка третмана изабраним комплексом. За MTT тестове су коришћени сви новосинтетисани комплекси **CoL1**-**CoL4**, **CuL5**-**CuL8**, **ZnL2**-**ZnL4** и **ZnL9** којима су третиране ћелијска линија тумора дебелог црева SW-480 и ћелијска линија анеуплоидних кератиноцита људске коже HeCaT. Индекс селективности (*eng. selectivity index* - SI) је рачунат за свако тестирано једињење ради предвиђања терапеутског потенцијала, на основу количника IC_{50} вредности за здраве ћелије (HeCaT) и IC_{50} вредности за туморске ћелије (SW-480). Вредност SI која је већа од 3,0 се уопштено сматра пожељном код антитуморских лекова, указујући на селективну токсичност према ћелијама тумора у односу на здраве ћелије [201]. Резултати MTT тестова и израчунате SI вредности су приказани у Табели 4. Поређења ради, у табелу су укључене IC_{50} вредности према SW-480 ћелијској линији за 5-флуороурацил, цитостатик који се налази у комерцијалној употреби [202].

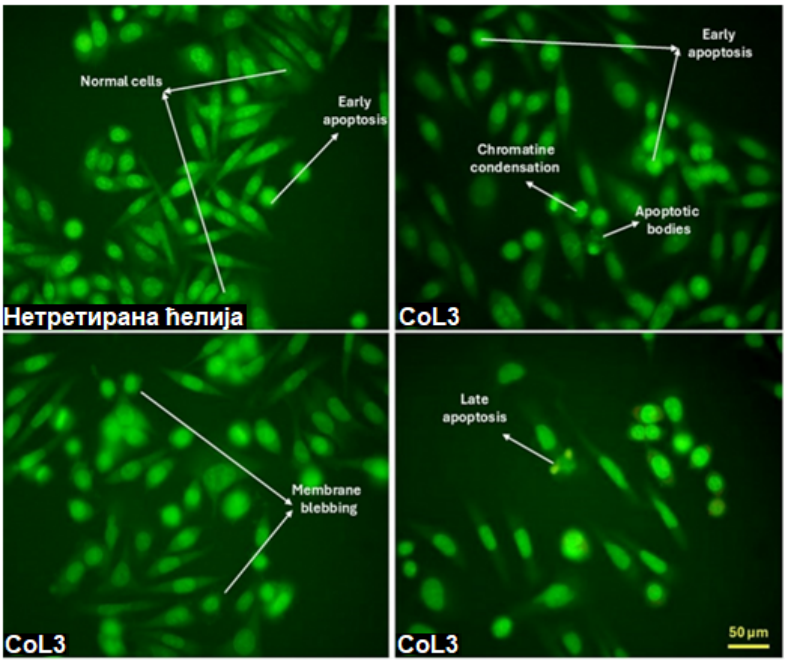
Табела 4. Инхибиторне активности испитиваних комплекса изражене као IC_{50} вредности према SW-480 и HeCaT ћелијским линијама, и израчунат индекс селективности.

Испитивана једињења	IC_{50} вредности [μM]				SI	
	SW-480		HaCaT			
	24 ч	72 ч	24 ч	72 ч	24 ч	72 ч
CoL1	41,31	54,4	992,15	206,32	24,02	3,79
CoL2	59,14	33,19	346,6	136,03	5,86	4,09
CoL3	28,55	11,49	112,16	19,5	3,92	1,69
CoL4	59,42	76,25	914,15	204,38	15,38	2,68
CuL5	35,19	11,82	204,92	66,97	5,82	5,67
CuL6	18,47	4,85	100,05	22,67	5,42	4,67
CuL7	25,32	14,72	112,37	26,94	4,43	1,83
CuL8	20,29	16,29	98,36	30,27	4,84	4,81
ZnL2	27,39	11,5	154,64	101,51	5,64	8,82
ZnL3	36,68	5,29	139,3	45,36	3,79	8,57
ZnL4	21,98	15,81	187,32	127,94	8,52	8,09
ZnL9	34,38	16,38	675,33	210,53	19,64	12,85
5-флуороурацил	235,16	16,90	/	/	/	/

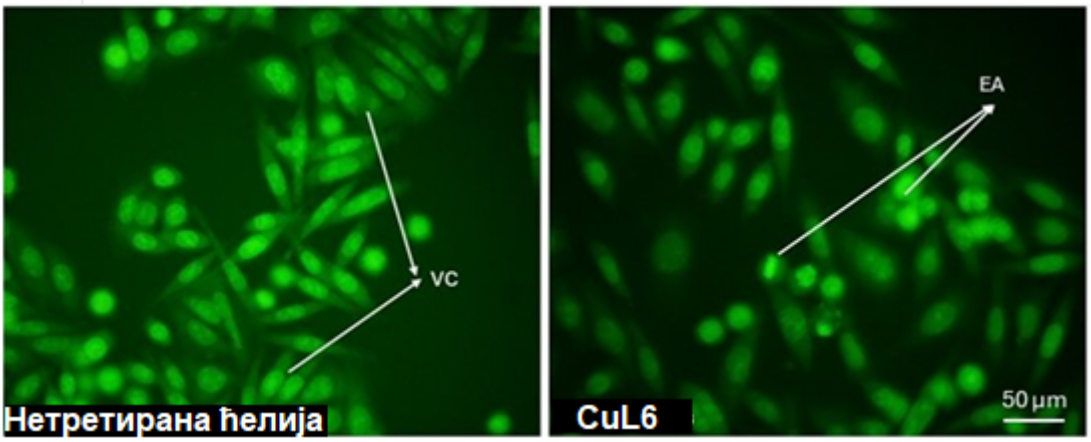
Цитотоксични ефекат већине синтетисаних комплекса према нормалним и туморским ћелијама зависи од дозе и времена осим у случају два једињења кобалта(II), **CoL1** и **CoL4,** код којих се јавља делимично опорављање ћелија рака после дуге изложености. Једно од могућих објашњења је да ћелије рака могу да се адаптирају на

третман тако што активирају неки од разних резистенционих механизама који омогућавају преживљавање, као што су појачавање путева DNA-поправке, убрзавање избацивања лека, преуређивање места везивања лека и метаболичко репрограмирање [203]. Нестабилност једињења се може искључити као могућност пошто ова једињења показују јак ефекат према здравим ћелијама. Међу једињењима кобалта, најизраженији цитотоксични ефекат је показало једињење **CoL3** после 24 ч и 72 ч, због чега је изабрано за даља испитивања. Испитивана једињења кобалта(II) су уопштено показала значајан пад индекса селективности после 24 ч. Од свих тестираних једињења највећу активност према туморским ћелијама је показао комплекс бакра(II) **CuL6** који уз то има и повољну вредност индекса селективности, услед чега је изабран за даље испитивање. Испитани комплекси цинка(II) су поред малих IC_{50} вредности показали и повољне SI вредности. После 24 ч, највећу активност су показали комплекси **ZnL2** и **ZnL4**, који су изабрани за даље испитивање.

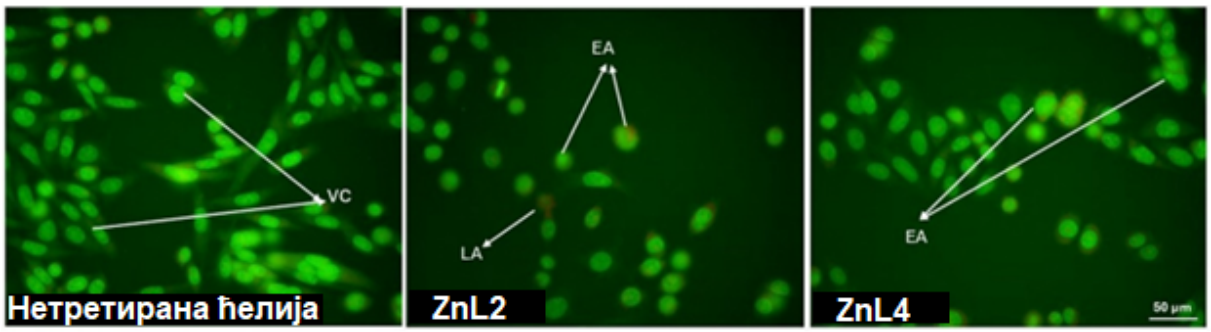
MTT тестови не дају информацију о механизму ћелијске смрти, при чему постоји вероватноћа да супстанца која показује значајну активност према ћелијама рака делује на непожељан начин, узрокујући некрозу ћелијског ткива. Морфолошка анализа је значајан тест којим се може утврдити да ли потенцијални лек делује проапоптотично или некротично. Морфолошка анализа је изведена праћењем промена у флоуресцентним микрографима ћелијске линије SW-480 након третмана комплексима **CoL3** (Слика 24), **CuL6** (Слика 25), **ZnL2** и **ZnL4** (Слика 26). На основу промена учесталости преурањене апоптозе приликом третирања испитиваним комплексима утврђено је да је апоптоза доминантан механизам њиховог деловања, при чему су промене у учесталости појаве некротичних ћелија минималне.



Слика 24. Микрографи флуоресцентног микроскопа. Морфологија SW-480 ћелија третираних са **CoL3**. Здраве ћелије (*eng. Normal cells*), ћелије у раној апоптози (*eng. Early apoptosis*), ћелије у касној апоптози (*eng. Late apoptosis*), апоптотична тела (*eng. Apoptotic bodies*), кондензација хроматина (*eng. Chromatine condensation*) и стварање везикула (*eng. Membrane blebbing*).



Слика 25. Микрографи флуоресцентног микроскопа. Морфологија нетретираних SW-480 ћелија и ћелија третираних комплексом **CuL6**. На слици су означене здраве ћелије (*eng. Viable cells* - VC), и ћелије у раној апоптози (*eng. Early apoptosis* - EA).



Слика 26. Микрографи флуоресцентног микроскопа. Морфологија нетретираних SW-480 ћелија и ћелија третираних комплексима ZnL2 и ZnL4. На слици су означене здраве ћелије (VC), ћелије у раној апоптози (EA) и ћелије у касној апоптози (*eng. Late apoptosis* - LA).

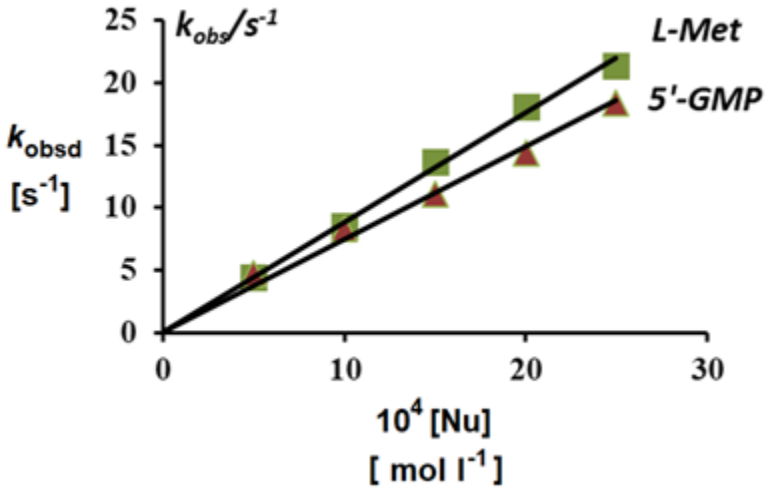
3.3. Испитивање интеракција одабраних комплекса са биомолекулима

3.3.1. Кинетичка мерења

Биолошка активност комплекса метала се може испољити на различите начине, што најчешће укључује интеракцију са неким од биолошки важних макромолекула приликом чега се ремети или модификује њихова биолошка функција [33]. Лабилно координовани лиганди у комплексима метала који се лако супституишу атомима макромолекула су кључни приликом дизајна активних супстанци заснованих на принципу координације биолошки важних молекула за јон метала [34]. Кинетичка мерења у овом контексту служе да се одреди колико је најлабилније координован лиганд у испитиваном комплексу подложан супституцији у присуству донора различитих атома. Испитана је подложност координоване воде у комплексу **CuL6** према утицају различитих лиганада помоћу изабраних нуклеофила L-Met као *S*-донора и 5'-GMP као и *N*-донора, применом апарата за технику заустављеног тока. Испитиване реакције су реакције супституције које се одигравају у једном кораку, који подразумева измену координованог молекула воде у координационој сфери комплекса одговарајућим нуклеофилом, односно по хемијској једначини (9).

$$[Cu\ (\mathbf{L6})_2(H_2O)] + Nu \rightarrow [Cu\ (\mathbf{L6})_2Nu] + H_2O \qquad (9)$$

У једначини (9) Nu представља или L-Met који се координује преко атома сумпора или 5'-GMP који се координује преко атома азота. Константа брзине реакције другог реда (k) је одређена из линеарног графика односа константе брзине псудо-првог реда (k_{obsd}) и концентрације нуклеофила ([Nu]) на основу једначине (10). Линеарна зависност је приказана на графику (Слика 27), а израчунате константе другог реда су приказане у Табели 5.



Слика 27. Константе брзине псеудо-првог реда на температури од 310 K за супституционе реакције комплекса CuL6 са нуклеофилима L-Met и 5'-GMP, у односу на различите концентрације нуклеофила.

Табела 5. Константе брзине другог реда на температури од 310 K за супституционе реакције комплекса **CuL6** са нуклеофилима L-Met и 5'-GMP.

Нуклеофил	$k \cdot 10^3$ [M^{-1} s^{-1}]
L-Met	8,67
5'-GMP	6,67

На основу добијених резултата је закључено да је комплекс **CuL6** благо подложнији супституцији у присуству *S*-донорских лиганада. На основу Луисове теорије о тврдим и меким киселинама и базама (HSAB), у лигандима се атом сумпора класификује као мека база, док се атом азота углавном сматра тврдом базом. По HSAB теорији, јон бакра(II) је по особинама између тврде и меке киселине, услед чега се за овај јон координују и тврде и меке базе.

3.3.2. Интеракције са DNA

Молекул DNA се сматра кључном метом приликом развоја нових антитуморских супстанци, пошто су лекови који директно интерагују са DNA ћелије рака или инхибирају синтезу или репликацију овог молекула најчешћа стратегија за узроковање ћелијске смрти [204]. За DNA се лекови могу везати ковалентно преко N7 азота гуанина [205], док се нековалентно могу везати електростатички унутар жлеба или интеркалацијом [206]. Везивање унутар жлеба молекула DNA се може одиграти у малом или великом жлебу (*eng. minor groove* или *major groove*) природне хеликоидне структуре молекула DNA. С друге стране, интеркалација се заснива на углављивању супстрата између парова нуклеинских

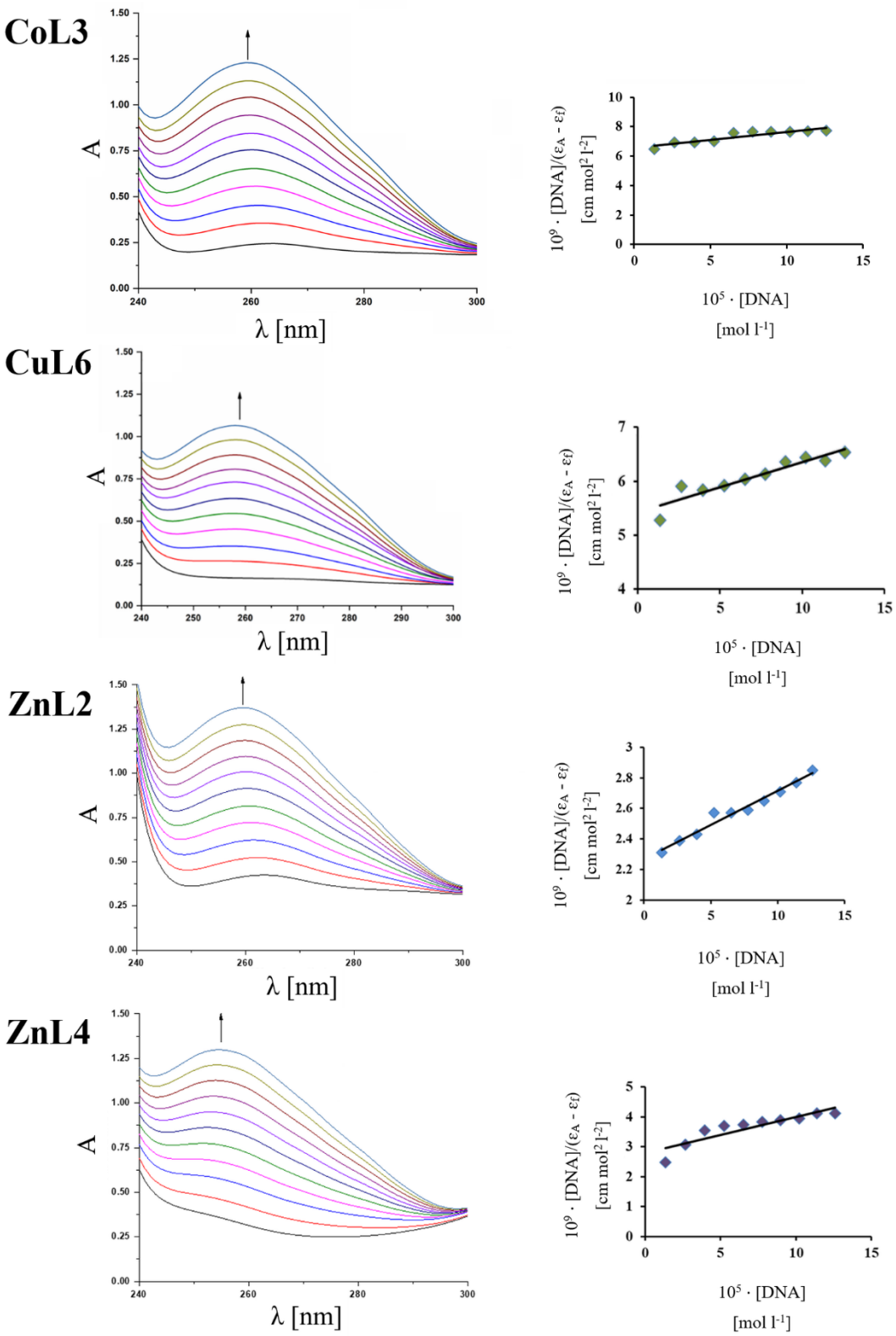
база. Применом UV-Vis спектроскопије може се потврдити постојање интеракција, док се мерењем флуоресценције и вискозитета може утврдити механизам везивања.

На основу снимљених UV-Vis спектара испитиваног комплекса у току титрације са CT-DNA могу се израчунати константе везивања између ових молекула на одређеној температури. Мерењем на више различитих температура може се оценити термодинамичка спонтаност ових интеракција помоћу Гибсове енергије (ΔG^0). Промена интензитета апсорпције указује на механизам везивања. Хипохромизам (смањивање интензитета) указује на интеркалацију, док се хиперхромизам најчешће везује за електростатичке интеракције или одмотавање хеликса [207]. Активациони параметри, промена ентропије (ΔS^0) и промена енталпије (ΔH^0), указују на врсту доминантних међумолекулских интеракција [208]. Позитивне вредности оба параметра указују на хидрофобне интеракције, негативне вредности указују на водоничне везе и ван дер Валсове силе, док позитивна промена ентропије уз промену енталпије која је приближна нули указује на електростатичке интеракције.

У сврху израчунавања константе везивања са CT-DNA и наведених термодинамичких параметара за сваки од одабраних комплекса, **CoL3**, **CuL6**, **ZnL2** и **ZnL4** (Табела 6), за сваки комплекс је на по три различите температуре (288, 298 и 310 K) снимљена серија од десет UV-Vis спектара са различитим концентрацијама CT-DNA. Односи [DNA]/(ε_A - ε_f) према [DNA] очитани из добијених спектара су унесени у график из кога се линеарном екстраполацијом и користећи једначину (1) долази до вредности K_b. Приказане су серије спектара снимљених за комплексе **CoL3**, **CuL6**, **ZnL2** и **ZnL4**, на температури од 310 K, на основу којих су произведени графици односа [DNA]/(ε_A - ε_f) према [DNA] (Слика 28). Снимање спектара на различитим температурама је омогућило рачунање термодинамичких параметара на основу ван 't Хофових једначина (2) и (3).

Табела 6. Израчунати параметри на основу резултата UV-Vis титрација са CT-DNA.

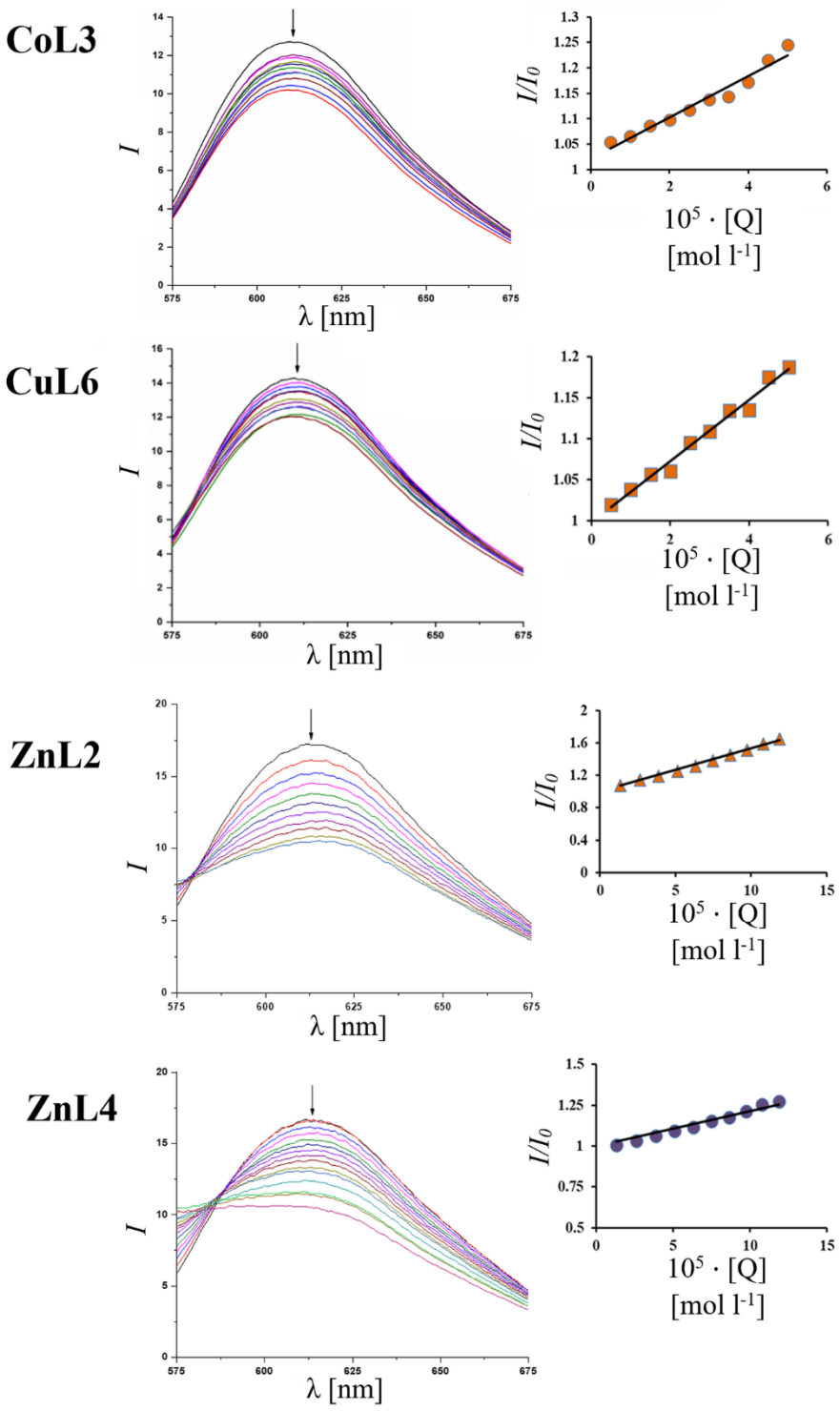
Испитивана једињења	T [K]	$K_b \times 10^3$ [M^{-1}]	Хиперхромизам [%]	ΔG^0 [kJ/mol]	ΔH^0 [kJ/mol]	ΔS^0 [J $K^{-1}mol^{-1}$]
CoL3	288	2,33	44,9	–12,93	65,97	273,95
	298	5,09	80,3	–15,67		
	310	16,30	80,5	–18,96		
CuL6	288	2,00	52,2	-12,42	72,93	296,36
	298	3,30	84,5	-15,39		
	310	17,10	85,0	-18,94		
ZnL2	288	0,16	57,7	-12,17	82,8	333,44
	298	1,86	73,7	-18,65		
	310	1,96	68,6	-19,54		
ZnL4	288	0,37	50,6	-14,15	83,43	337,79
	298	0,83	71,5	-16,64		
	310	4,31	72,3	-21,57		



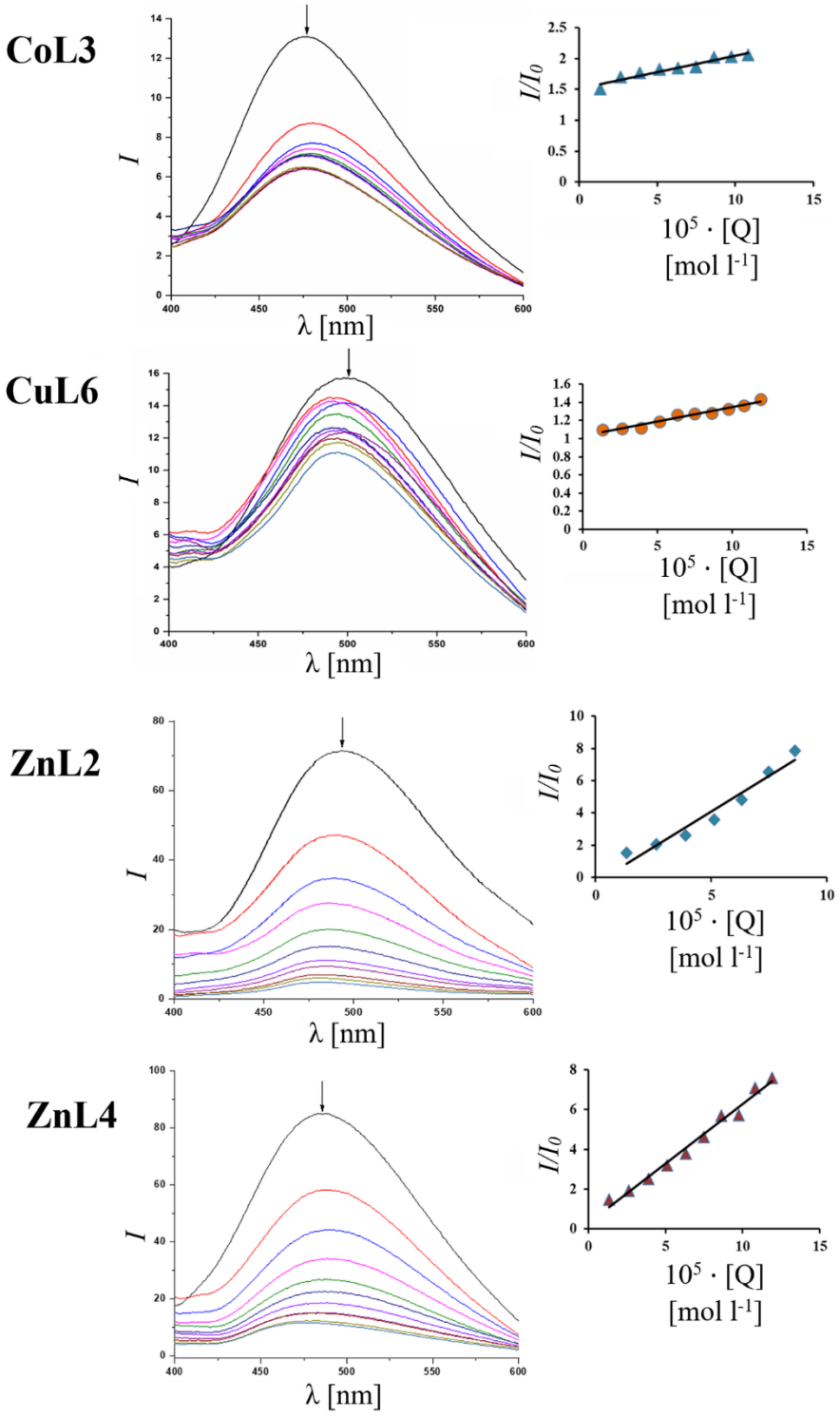
Слика 28. Лево: Серија апсорпционих UV-Vis спектара комплекса **CoL3**, **CuL6**, **ZnL2** и **ZnL4** у PBS пуферу на 310 K, по додавању растућих концентрација CT-DNA (у опсегу од 1,35 - 12,6 · 10^{-5} M). Стрелице показују промену апсорбанце по додатку CT-DNA; Десно: График односа [DNA]/(ε_A - ε_f) према [DNA] за одговарајућу серију спектара и линеарна екстраполација на основу које се рачуна K_b.

Вредности константи везивања за све испитиване комплексе су највеће на 310 K, односно температури најближој физиолошкој, и код свих осим код **ZnL2** је примећен је значајан пораст у односу на константе везивања које су израчунате за ниже температуре. Код свих комплекса забележен је пораст интензитета апсорпције у току титрације, односно ефекат хиперхромизма. Негативне вредности промене Гибсове енергије указују на спонтаност процеса везивања са CT-DNA молекулом. Промена ентропије и промена енталпије имају позитивне вредности, што указује на остваривање претежно хидрофобних интеракција.

У циљу даљег разумевања механизма везивања одабраних комплекса за DNA молекул, урађена је серија експеримената компетитивног везивања. Молекулу који се на познат начин везује за DNA би било, најпре, омогућено несметано везивање за овај биомолекул, а потом би по додавању познатих концентрација испитиваног комплекса пратили да ли је првобитно везани молекул истиснут. Као молекули са познатим механизмом везивања користе се познате DNA флуорохроме, с обзиром да се удео везаних молекула за DNA може пратити помоћу флуоресцентне спектроскопије. За проучавање интеркалације користи се етидијум бромид (EB), планарно једињење које је познат интеркалатор DNA, код кога после ексцитације доминира нерадиогено пражњење путем ротација фенил групе или других унутрашњих кретања, али му се приликом интеркалације смањује степен слободе па се деексцитација дешава радиогеним пражњењем у облику уочљиве флуоресценције [209]. Пад интензитета флуоресценције приликом додавања испитиваног комплекса указује на то да испитивани комплекс измешта молекул EB из интеркалационог размака [210]. С друге стране, реагенс познат као бисбензимидазол (*Hoechst* 33258, HOE) је флуорохром који се везује унутар малог жлеба молекула DNA, и сличним механизмом као код молекула EB, приликом везивања губи степене слободе унутрашњег кретања, приликом чега се појачава радиогена деексцитација уочљива као флуоресценција. Степен компетитивног истискивања овог молекула из малог жлеба DNA помоћу тестираног комплекса може се утврдити на основу смањења уочљиве флуоресценције [211]. Компетитивно везивање за DNA молекул са EB и HOE је испитивано за комплексе **CoL3**, **CuL6**, **ZnL2** и **ZnL4**. Смањење интензитета емисије у флуоресцентним спектрима у зависности од концентрације додатог комплекса је уочено код свих испитиваних комплекса у експериментима изведеним и са EB-CT-DNA (Слика 29) и са HOE-CT-DNA (Слика 30). Линеарна зависност односа интензитета (I_0/I) и концентрације тестираног комплекса ([Q]) на основу једначине (4) је искоришћена за рачунање Штерн-Волмерових константи (K_{SV}) (Табела 7).



Слика 29. Лево: Серије емисионих спектара раствора EB-CT-DNA, сниманих по додатку различитих концентрација испитиваних комплекса. Спектри по додатку **CoL3** и **CuL6** су снимани у раствору [DNA] = [EB] = $5 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1}, при чему [**CoL3**] = [**CuL6**] = 5-50 $\cdot 10^{-6}$ mol l^{-1}. Спектри по додатку **ZnL2** и **ZnL4** су снимани у раствору [DNA] = [EB] = $1{,}35 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1}, при чему [**ZnL2**] = [**ZnL4**] = 1,33-11,9 $\cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}. Стрелице показују промену интензитета емисије са порастом концентрације комплекса; Десно: График зависности односа интензитета (I_0/I) и концентрације комплекса за одговарајућу серију спектара.



Слика 30. Лево: Серије емисионих спектара раствора HOE-CT-DNA, сниманих по додатку различитих концентрација испитиваних комплекса. Спектри по додатку **CoL3**, **CuL6** су снимани у раствору [DNA] = [HOE] = $5 \cdot 10^{-6}$ mol l^{-1}, при чему [**CoL3**] = [**CuL6**] = 5-50 $\cdot 10^{-6}$ mol l^{-1}. Спектри по додатку **ZnL2**, **ZnL4** су снимани у раствору [DNA] = [HOE] = 1,35 $\cdot 10^{-5}$ mol l^{-1}, при чему [**ZnL2**] = [**ZnL4**] = 1,33-11,9 $\cdot 10^{-4}$ mol l^{-1}. Стрелице показују промену интензитета емисије са порастом концентрације комплекса; Десно: График зависности односа интензитета (I_0/I) и концентрације комплекса за одговарајућу серију спектара.

Табела 7. Израчунате Штерн-Волмерове константе на основу мерења компететивног везивања тестираних једињења за DNA у односу на ЕВ и HOE.

Испитивана једињења	K_{SV} [M^{-1}]	
	ЕВ	HOE
CoL3	$4{,}69 \cdot 10^3$	$5{,}29 \cdot 10^3$
CuL6	$3{,}69 \cdot 10^3$	$3{,}16 \cdot 10^3$
ZnL2	$5{,}29 \cdot 10^3$	$8{,}81 \cdot 10^4$
ZnL4	$2{,}14 \cdot 10^3$	$5{,}98 \cdot 10^4$

Вредности K_{SV} свих испитиваних комплекса показују слабу до умерену могућност истискивања ЕВ из ЕВ-CT-DNA комплекса што се може закључити на основу константе везивања ЕВ у вредности од $1.23 \cdot 10^5\ M^{-1}$ [212]. Приликом истискивања HOE из комплекса HOE-CT-DNA примећено је да су K_{SV} вредности за комплексе кобалта(II) и бакра(II), **CoL3** и **CuL6** сличне као и за ЕВ. Нажалост, ова чињеница онемогућава јасно утврђивање преферентног начина везивања, али смањење флуоресценције у оба случаја свакако доказује могућност да се комплекси вежу и интеркалационо и унутар мањег жлеба. Код комплекса цинка(II), **ZnL2** и **ZnL4**, вредности K_{SV} се разликују за читав ред величине у корист истискивања HOE, што недвосмислено указује на то да је везивање у мањем жлебу значајно повољнији начин везивања од интеркалације.

Технике које се заснивају на мерењу хидродинамичких параметара попут вискозитета су веома осетљиве на промене дужине DNA ланца, па се због тога сматрају најпоузданијим методама за одређивање начина везивања после кристалографских студија. Ова метода се заснива на чињеници да се ланац DNA издужује приликом повећања раздаљине између нуклеинских база које је узроковано укључењем страног тела у интеркалациони размак. Издуживање ланца утиче на повећање вискозитета, тако да се мерењем овог параметра може лако утврдити да ли, и у којој мери, испитивано једињење интеркалира са DNA [213]. Испитивање одабраних комплекса, **CoL3**, **CuL6**, **ZnL2** и **ZnL4**, је извршено тако што су у раствор CT-DNA додавани у растућим количинама почев од еквимоларне са DNA, до десетоструке. Мерен је однос између релативне вискозности у односу на почетну вискозност и релативне концентрације комплекса у односу на DNA. За све испитиване комплексе утврђен је врло мали пораст релативне вискозности у односу на релативну концентрацију. Ова чињеница указује на слабу елонгацију ланца DNA, на основу чега се претпоставља да је везивање унутар малог жлеба највероватније главни механизам интеракције.

3.3.3. Интеракције са албумином

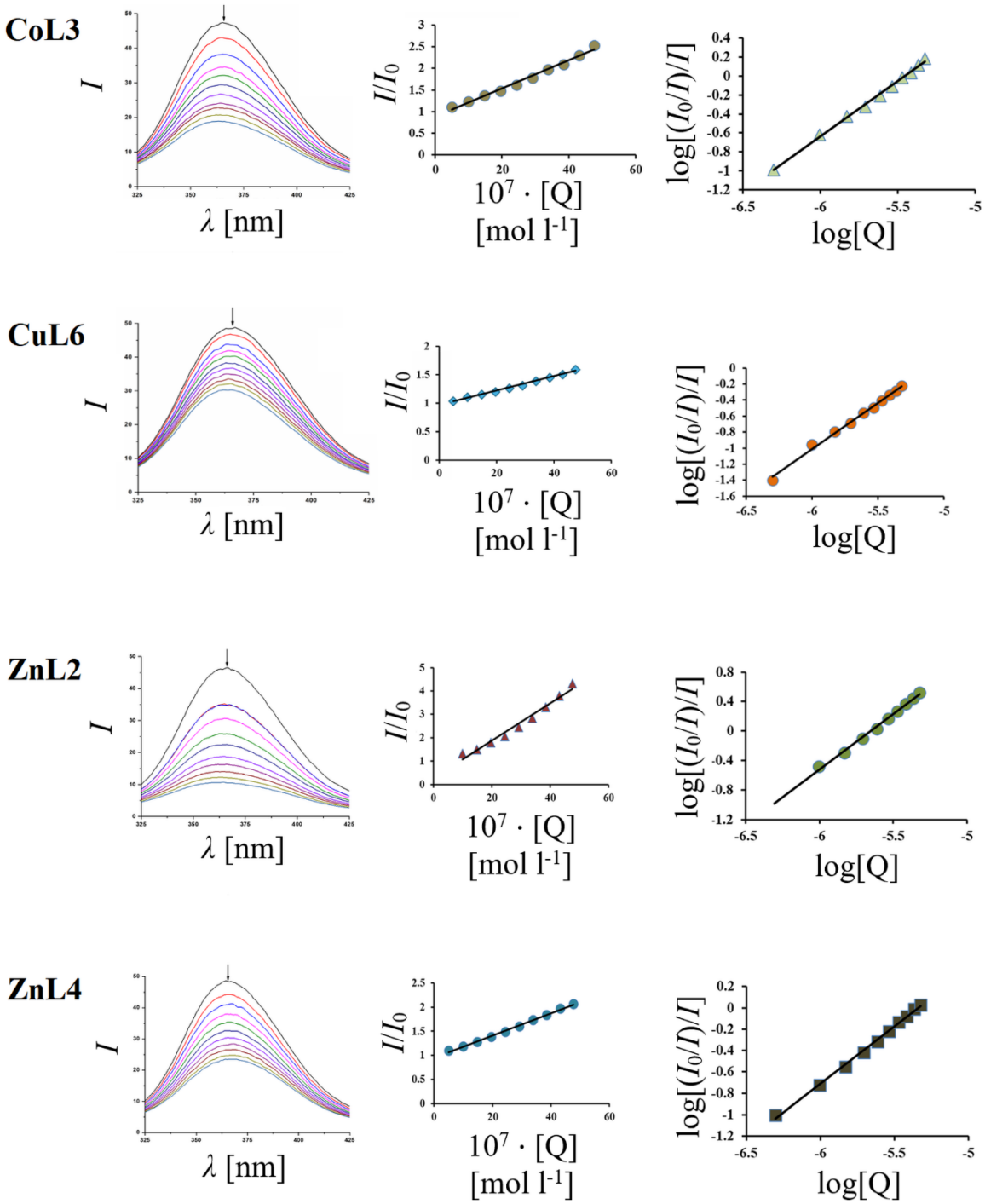
Интеракције између комплекса метала и протеина су врло битан фактор који утиче на понашање потенцијалног лека у организму. Проучавање ових интеракција омогућава дубље разумевање фармакокинетичких и фармаколошких особина. Албумин се често проучава због заступљености у организму и потенцијалне улоге као носиоца лекова. Албумин из говеђег серума (BSA) поседује три врсте флуорофора, триптофан (Trp), тирозин (Tyr) и фенилаланин (Phe). Код флуоресценције све три наведене флуорофоре ексцитација се врши путем $\pi \rightarrow \pi^*$ прелаза који потичу од ароматичних система у структурама ових аминокиселинских остатака. Интензитет флуоресцентне емисије услед деексцитације је најмањи у случају Phe остатка, док је највећи у случају Trp. Промена интензитета емисије услед структурних промена протеина је најзначајнија код Trp остатка. Емисија Tyr остатка је често загашена у присуству Trp. Због јаког

интензитета флуоресцентне емисије, могућности селективне ексцитације и осетљивости на структурне промене, сматра се да је Trp кључна аминокиселина приликом проучавања флуоресценције BSA [214]. Промене интензитета флуоресцентне емисије BSA се због тога користе за праћење везивања комплекса метала за овај макромолекул [215].

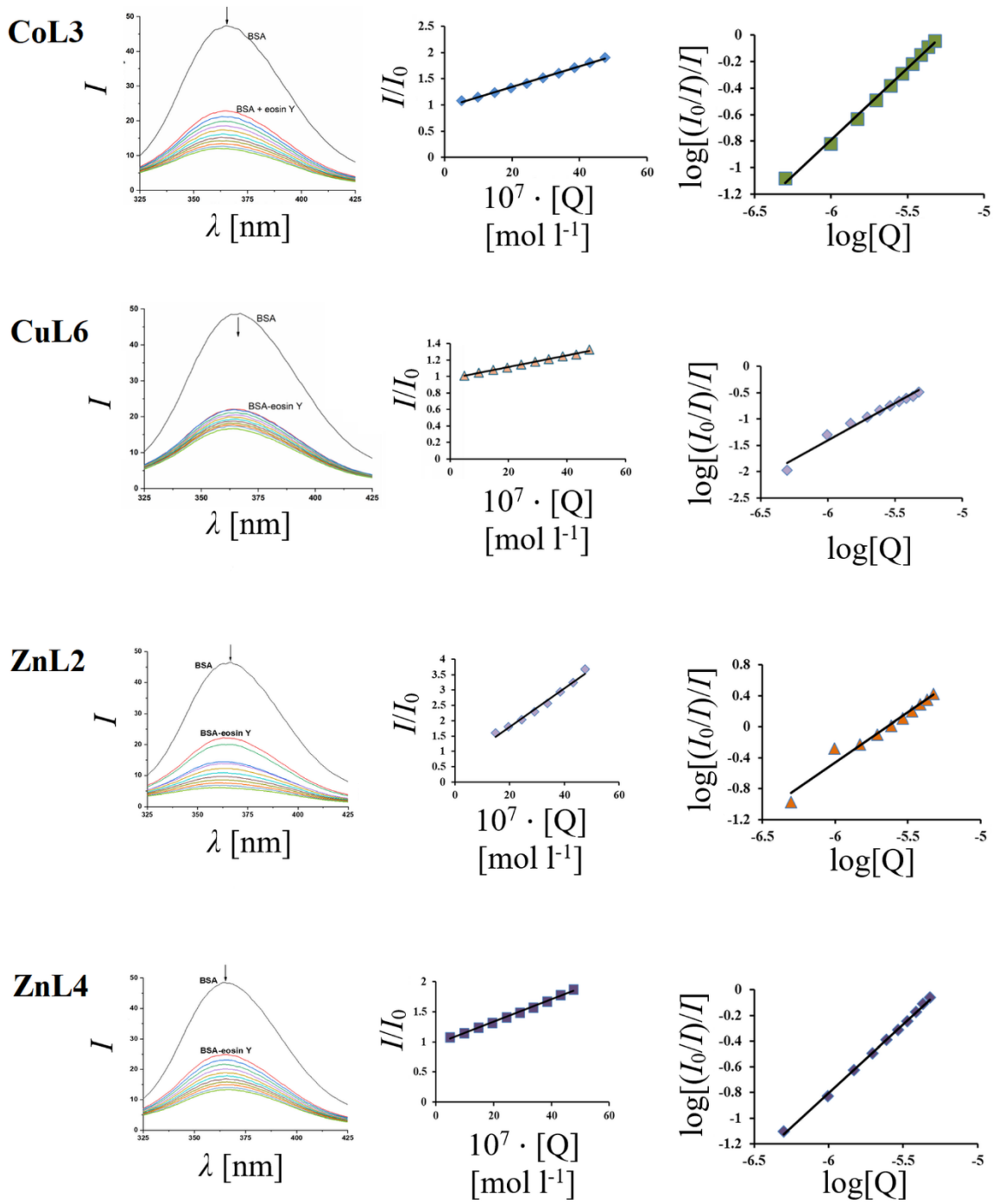
За сваки од одабраних комплекса **CoL3**, **CuL6**, **ZnL2** и **ZnL4**, снимљено је 3 серије спектара раствора албумина са различитим додатим концентрацијама одговарајућег комплекса. У првој серији су снимљени спектри чистог албумина, док су у другој и трећој серији спектри албумина у комплексу са маркерима везивних места, и у све три серије са одговарајућим испитиваним комплексом у растућим концентрацијама. Као маркери места везивања су коришћени еозин Y (EY), и ибупрофен. Молекул EY се везује у субдомену IIA (место 1), док се ибупрофен везује у субдомену IIIA (место 2). На основу сваке серије спектара (Слике 31-33 лево) конструисани су график зависности односа интензитета емисије I/I_0, и концентрације комплекса [Q] (Слике 31-33 средина), на основу кога су помоћу једначина (5) и (6) израчунате Штерн-Волмерова константа K_{SV}, и константа гашења флуоресценције k_q, и график зависности $\log[(I_0/I)/I]$ од $\log[Q]$ (Слике 31-33 десно) на основу кога су помоћу једначине (7) израчунате константа везивања K_b и број везивних места испитиваног комплекса у BSA (Табела 8).

Табела 8. Параметри везивања испитиваних комплекса метала за BSA у одсуству маркера, у присуству еозина Y, и у присуству ибупрофена.

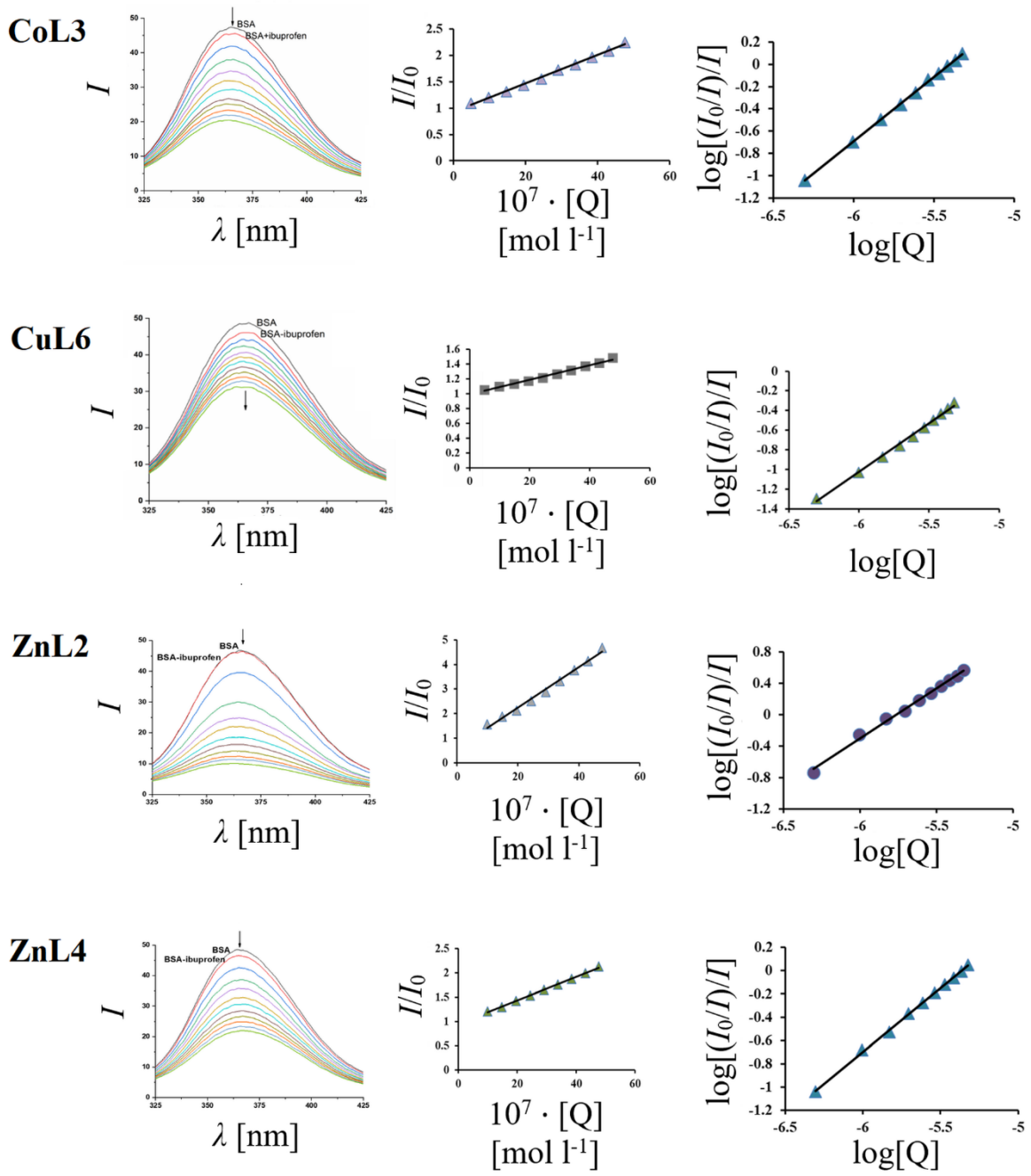
Једињење	Параметри	BSA	BSA-EY	BSA-ибупрофен
CoL3	K_{sv} [M^{-1}]	$3{,}25 \cdot 10^5$	$1{,}97 \cdot 10^5$	$2{,}72 \cdot 10^5$
	k_q [$M^{-1}\,s^{-1}$]	$3{,}25 \cdot 10^{13}$	$1{,}97 \cdot 10^{13}$	$2{,}72 \cdot 10^{13}$
	K_b [M^{-1}]	$2{,}33 \cdot 10^6$	$5{,}02 \cdot 10^5$	$1{,}88 \cdot 10^6$
	n	1,17	1,08	1,16
CuL6	K_{sv} [M^{-1}]	$1{,}27 \cdot 10^5$	$7{,}10 \cdot 10^4$	$9{,}95 \cdot 10^4$
	k_q [$M^{-1}\,s^{-1}$]	$1{,}27 \cdot 10^{13}$	$7{,}10 \cdot 10^{12}$	$9{,}95 \cdot 10^{12}$
	K_b [M^{-1}]	$7{,}68 \cdot 10^5$	$1{,}13 \cdot 10^7$	$8{,}56 \cdot 10^4$
	n	1,15	1,41	0,99
ZnL2	K_{sv} [M^{-1}]	$8{,}01 \cdot 10^5$	$6{,}28 \cdot 10^5$	$8{,}24 \cdot 10^5$
	k_q [$M^{-1}\,s^{-1}$]	$8{,}01 \cdot 10^{13}$	$6{,}28 \cdot 10^{13}$	$8{,}24 \cdot 10^{13}$
	K_b [M^{-1}]	$3{,}24 \cdot 10^8$	$2{,}08 \cdot 10^7$	$2{,}33 \cdot 10^7$
	n	1,51	1,3	1,28
ZnL4	K_{sv} [M^{-1}]	$2{,}32 \cdot 10^5$	$1{,}86 \cdot 10^5$	$2{,}43 \cdot 10^5$
	k_q [$M^{-1}\,s^{-1}$]	$2{,}32 \cdot 10^{13}$	$1{,}86 \cdot 10^{13}$	$2{,}43 \cdot 10^{13}$
	K_b [M^{-1}]	$5{,}20 \cdot 10^5$	$4{,}31 \cdot 10^5$	$7{,}86 \cdot 10^5$
	n	1,07	1,07	1,10



Слика 31. Лево: Серије емисионих спектара раствора BSA, сниманих по додатку различитих концентрација испитиваних комплекса. Спектри су снимани при [BSA] = 2 · 10^{-6} mol/l, при чему [Q] = 4,98 – 47,6 · 10^{-6} mol/l. Стрелице показују промену интензитета емисије са порастом концентрације комплекса; Средина: График зависности односа интензитета емисије од концентрације одговарајућег комплекса; Десно: График зависности log[(I_0/I)/I] од log[Q].



Слика 32. Лево: Серије емисионих спектара раствора BSA-EY, сниманих по додатку различитих концентрација испитиваних комплекса. Спектри су снимани при [BSA] = [EY] = $2 \cdot 10^{-6}$ mol/l, при чему је [Q] = 4,98 – $47{,}6 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Стрелице показују промену интензитета емисије са порастом концентрације комплекса; Средина: График зависности односа интензитета емисије од концентрације одговарајућег комплекса; Десно: График зависности $\log[(I_0/I)/I]$ од log[Q].



Слика 33. Лево: Серије емисионих спектара раствора BSA-ибупрофен, сниманих по додатку различитих концентрација испитиваних комплекса. Спектри су снимани при [BSA] = [ибупрофен] = $2 \cdot 10^{-6}$ mol/l, при чему је [Q] = 4,98 – 47,6 · 10^{-6} mol/l. Стрелице показују промену интензитета емисије са порастом концентрације комплекса; Средина: График зависности односа интензитета емисије од концентрације одговарајућег комплекса; Десно: График зависности $\log[(I_0/I)/I]$ од log[Q].

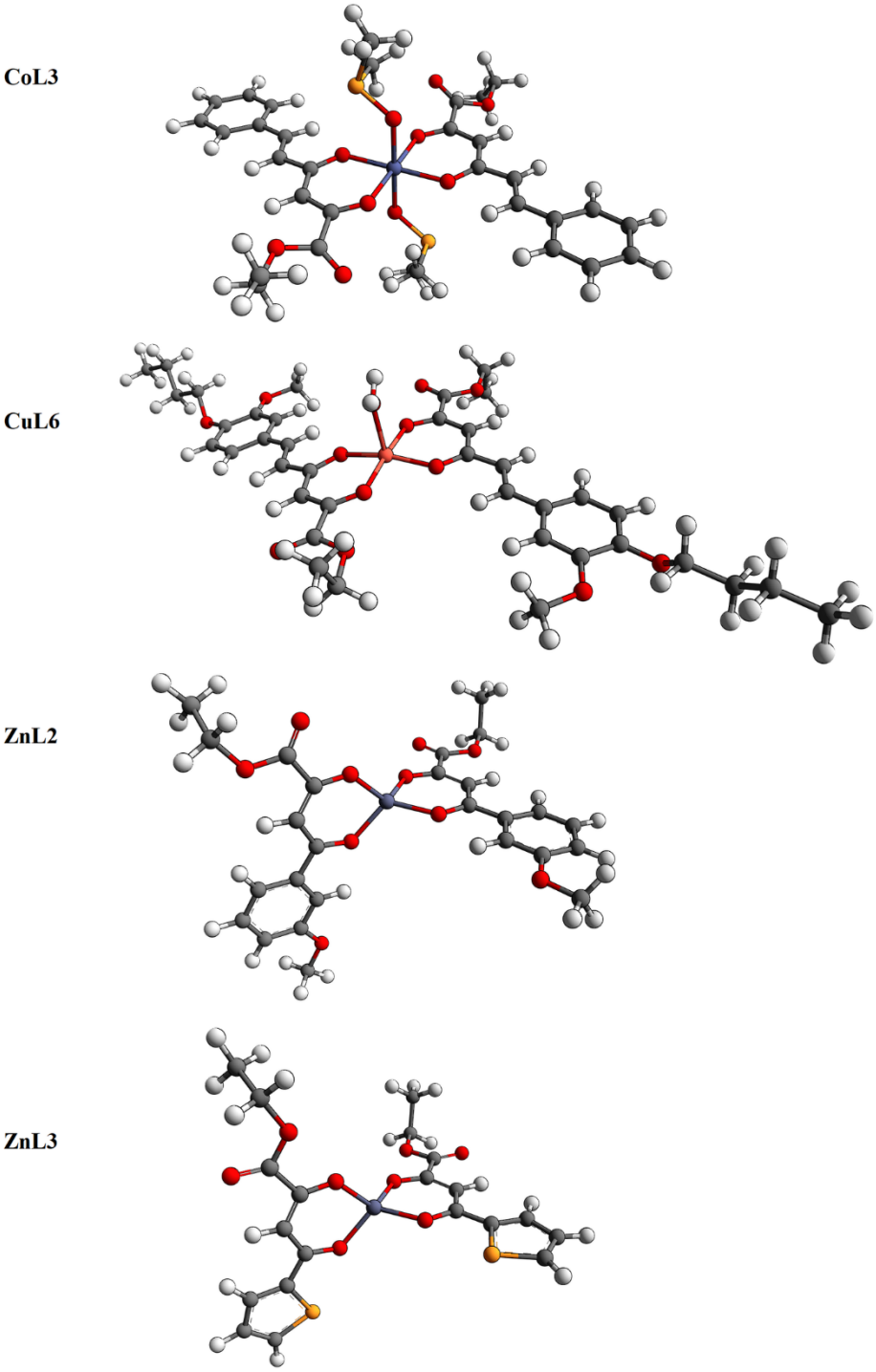
За све испитиване комплексе, **CoL3**, **CuL6**, **ZnL2** и **ZnL4**, утврђено је да је приликом интеракција са BSA дошло до значајног смањења флуоресценције, што указује на промене у околини Trp остатака. Израчунате вредности K_b указују на добар афинитет комплекса при везивању за албумин, при чему се на основу параметра n комплекси метала везују у односу 1:1 за BSA. Штерн-Волмерови параметри су код свих изабраних комплекса виши приликом истискивања лека из комплекса BSA-ибупрофен у односу на истискивање из комплекса BSA-EY што указује на већи афинитет према месту везивања у субдомену IIIA.

3.4. Структурна оптимизација и симулације молекулског доковања

Молекулско доковање је рачунарска техника која омогућава брзо проналажење и оцењивање конформација које неки молекул може заузети приликом интеракције са биолошким макромолекулом. Претраживање конформационог простора се врши методама попут генетског алгоритма или локалне претраге, а најпрецизније су комбинације више метода. Оцењивање се врши употребом функција за оцењивање (*eng. Scoring function*) које се могу заснивати на једноставној употреби поља силе као у типичном молекулско-механичком прорачуну, а могу бити и функције произведене техникама машинског учења приликом чега се прилагођавају тренирањем на великом скупу кристалографских података. Различити софтверски пакети имају различите могућности. На пример, AutoDock4 (AD4) је један од најчешће коришћених пакета за молекулско доковање првенствено због поузданости резултата које даје али и због отворености и доступности научној јавности. Нажалост, овај програмски пакет је ограничен релативно малим бројем елемената за које је параметризован, тако да молекули који садрже нпр. бакар(II) или кобалт(II) не могу бити доковани овим програмом без значајних модификација параметризације. Због ових разлога је AD4 коришћен за доковање комплекса цинка(II) на молекуле DNA и BSA. Molegro је програмски пакет затвореног кода, али боље оптимизован у правцу брзине прорачуна и параметризован помоћу једињења са далеко већом елементалном разноврсношћу. Због тога је овај пакет коришћен за доковање комплекса кобалта(II) и бакра(II) на молекуле DNA и BSA. Услед коришћења различитих програмских пакета за молекулско доковање, резултати у оквиру ове дисертације добијени за комплексе кобалта(II) и бакра(II) нису упоредиви са резултатима добијеним за комплексе цинка(II).

Молекулско доковање у оквиру ове дисертације је коришћено пре свега као потпора резултатима добијеним проучавањем интеракција са биолошким макромолекулима. Као такво, употребљено је за разлучивање начина везивања испитиваних једињења за DNA са нагласком на упоређивање афинитета према везивању у малом жлебу у односу на интеркалативно везивање. Поред тога, молекулско доковање је употребљено и за одређивање преферентне мете приликом везивања за молекул BSA. Посебан нагласак приликом доковања на албумин је дат непосредној околини аминокиселинских остатака Trp134 и Trp213, са обзиром да су кључне флуорофоре чија се емисија прати приликом флуоресцентне спектроскопије. Ове аминокиселине се налазе у субдоменима IIA и IIIA, а места везивања су често означена као место 1 и место 2 [216].

Прва оптимизација претпостављених структура испитиваних комплекса **CoL3**, **CuL6**, **ZnL2** и **ZnL4** је изведена семи-емпиријском методом PM6 [178], потом чега је за даљу оптимизацију употребљена значајно прецизнија метода B3LYP/LANL2DZ [179,180], на основу које су добијене оптимизоване структуре (без имагинарних вибрација), коришћене у симулацијама молекулског доковања (Слика 34).



Слика 34. Структуре испитиваних комплекса коришћене за симулације молекулског доковања, оптимизоване B3LYP/LANL2DZ методом.

На основу података добијених оптимизацијом структура одабраних комплекса **CoL3**, **CuL6**, **ZnL2** и **ZnL4**, можемо закључити да су код свих оптимизованих комплекса формирана два хелатна шесточлана прстена у којима учествују јон метала (M), атом кисеоника везан за атом угљеника на положају 2 (*α*O), атом угљеника на положају 2 (*α*C), атом угљеника на положају 3 (*β*C), атом угљеника на положају 4 (*γ*C) и атом кисеоника везан за *γ*C (*γ*O), односно M-*α*O-*α*C-*β*C-*γ*C-*γ*O и M-*α*O'-*α*C'-*β*C'-*γ*C'-*γ*O'. На основу дужина веза (Табела 9) можемо закључити да су карбонилне везе (*α*O-*α*C и *γ*O-*γ*C) после

координације атома кисеоника са јоном метала готово идентичне што указује на идентичан ред везе. Лиганди се координују за јон метала преко атома кисеоника, при чему су најдуже M-O везе у комплексима кобалта(II). Насупрот томе, C-O везе координованих атома кисоника су најкраће у комплексима кобалта(II). Аксијални лиганди (DMSO у **CoL3**, вода у **CuL6**) се за јон метала координују преко атома кисеоника (*ax*O) при чему је услед квадратно-пирамидалне геометрије очекивано дужа веза у комплексу **CuL6** него у комплексу октаедарске геометрије **CoL3**. Везе између атома угљеника су прилично уједначене у свим оптимизованим комплексима, као и веза коју гради водоник на положају 3 (*β*H).

Табела 9. Одабране дужине веза у структурама испитиваних комплекса после оптимизације B3LYP/LANL2DZ методом.

Дужине веза [Å]	**CoL3**	**CuL6**	**ZnL2**	**ZnL4**
M – *α*O	2,085	1,973	1,976	1,979
*α*C – *α*O	1,290	1,308	1,302	1,303
M – *γ*O	2,080	1,980	1,981	1,985
*γ*C – *γ*O	1,302	1,310	1,308	1,311
M – *ax*O	2,135	2,244	/	/
*α*C – *β*C	1,409	1,397	1,405	1,403
*β*C – *γ*C	1,426	1,430	1,426	1,426
*β*C – *β*H	1,082	1,081	1,078	1,081

У испитиваним комплексима, сви углови на јонима метала унутар шесточланих хелатних прстенова су приближно 90° (Табела 10). Ово је у складу са октаедарском и квадратно-пирамидалном геометријом **CoL3** и **CuL6**, међутим одступа од идеалног угла тетраедарске геометрије комплекса **ZnL2** и **ZnL4**, услед чега координационе везе два различита дикетоестарска лиганда O-Zn-O' заузимају углове од 119°, који су већи од идеалних.

Табела 10. Одабране вредности углова веза у структурама испитиваних комплекса после оптимизације B3LYP/LANL2DZ методом.

Углови везе [°]	**CoL3**	**CuL6**	**ZnL2**	**ZnL4**
*α*O-M-*γ*O	87,22	90,53	90,74	91,26
*α*O-M-*γ*O'	92,79	88,40	119,33	119,36
*α*O-M-*α*O'	179,99	173,85	120,63	120,25
*α*O-M-*ax*O	87,53	92,92	/	/
M-*α*O-*α*C	126,93	126,77	126,25	125,98
M-*γ*O-*γ*C	128,85	128,72	129,12	128,04
*α*O-*α*C-*β*C	127,50	126,79	126,89	127,04
*γ*O-*γ*C-*β*C	124,56	123,55	122,77	123,67
*α*C-*β*C-*γ*C	124,41	123,54	124,19	124,01
*α*C-*β*C-*β*H	117,53	118,15	116,27	116,45

Код комплекса **CoL3** и **CuL6** аксијални лиганди су координовани под углом од приближно 90°, а под сличним углом су и суседне O-M-O' везе у екваторијалном положају. Конјуговане везе заузимају углове који не одступају много од 120°, очекиваних за sp^2 систем, при чему су вредности углова уопштено мало веће због малог угла на јону метала. На основу диедарских углова (Табела 11) можемо закључити да шесточлани хелатни прстенови показују висок степен планарности чак и код комплекса **CoL3** код кога углови највише одступају од равни међу изабраним комплексима.

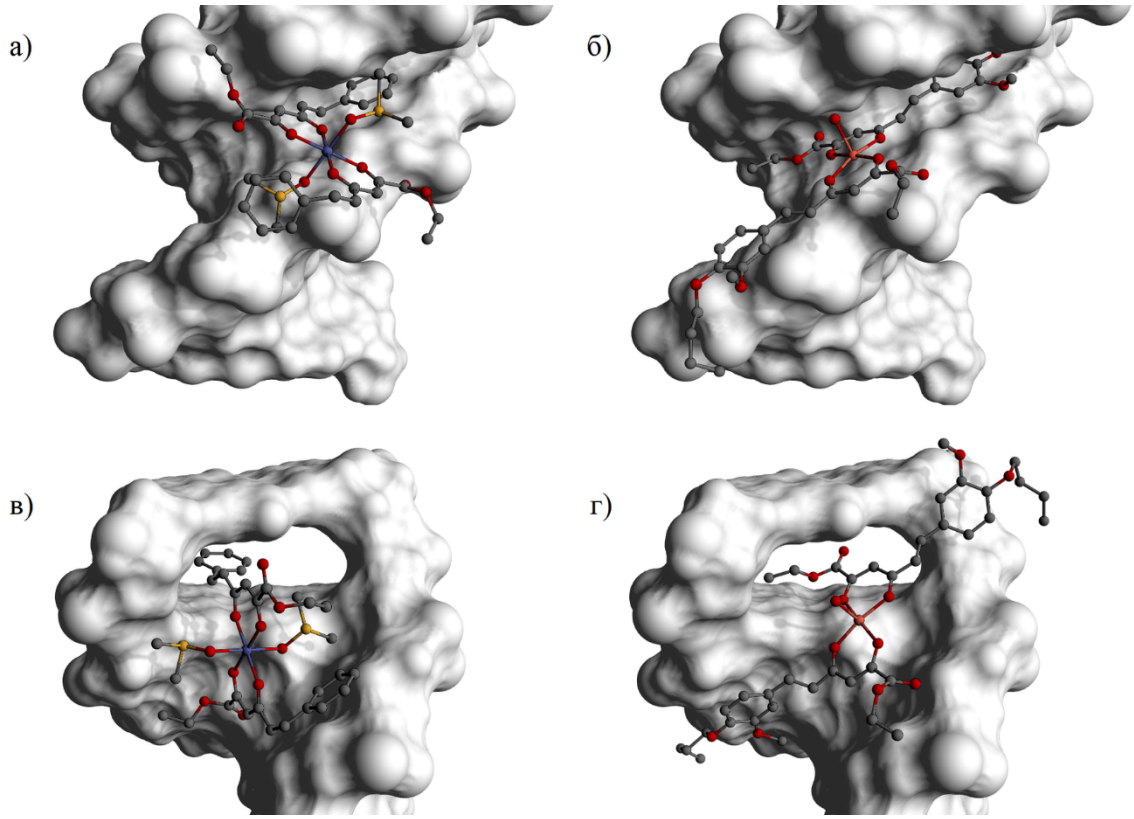
Табела 11. Одабране вредности диедарских углова у структурама испитиваних комплекса после оптимизације B3LYP/LANL2DZ методом.

Диедарски углови [°]	**CoL3**	**CuL6**	**ZnL2**	**ZnL4**
M-*α*O-*α*C-*β*C	7,45	2,03	1,06	0,04
*α*O-*α*C-*β*C-*β*H	1,21	0,17	0,37	0,26
*α*O-*α*C-*β*C-*γ*C	2,70	1,30	0,13	0,20
*α*C-*β*C-*γ*C-*γ*O	2,31	1,41	0,25	0,12
*β*C-*γ*C-*γ*O-M	6,98	1,84	0,87	0,10
*γ*C-*γ*O-M-*ax*O	79,29	89,71	/	/

Комплекси кобалта(II) и бакра(II), **CoL3** и **CuL4**, доковани су на две различите DNA структуре, од којих једна поседује интеркалациони размак, а друга не [157, 158]. Због значајне разлике у структурама мета и параметризације која је заснована на бази података са молекулским интеракцијама претежно протеин-супстрат типа, резултати нису квантитативно упоредиви али дају на увид могућности за структурне адаптације при везивању [217]. С друге стране, резултати доковања на BSA се могу квантитативно упоређивати. Комплекси кобалта(II) су доковани на више везивних места у оквиру BSA молекула [157]. Испитивани молекули нису показали значајан афинитет ка другим везивним местима у оквиру BSA. Из ових разлога су дати само најрелевантнији резултати, односно резултати доковања на албумин унутар везивних места I и II у доменима IIA и IIIA, и резултати доковања на структуре DNA молекула са, и без, интеркалационог размака (Табела 12). Комплекси бакра(II) су доковани на различите структуре HSA, циљајући везивна места кокристалисаних лекова (место 1 уместо варфарина, односно место 2 уместо диазепама), да би се испитао афинитет везивања у различитим доменима [158]. Добијени резултати су оцене MolDock функције која узима у обзир енергије везивања, тако да у складу са тиме, негативне оцене веће апсолутне вредности представљају већи афинитет према мети. На Сликама 35 и 36 су приказане најбоље оцењене структуре без структурних аномалија.

Табела 12. Резултати молекулског доковања који су добијени на основу рачунских експеримената изведених у програму Molegro. Резултати су бездимензионалне величине израчунате функцијама за оцену.

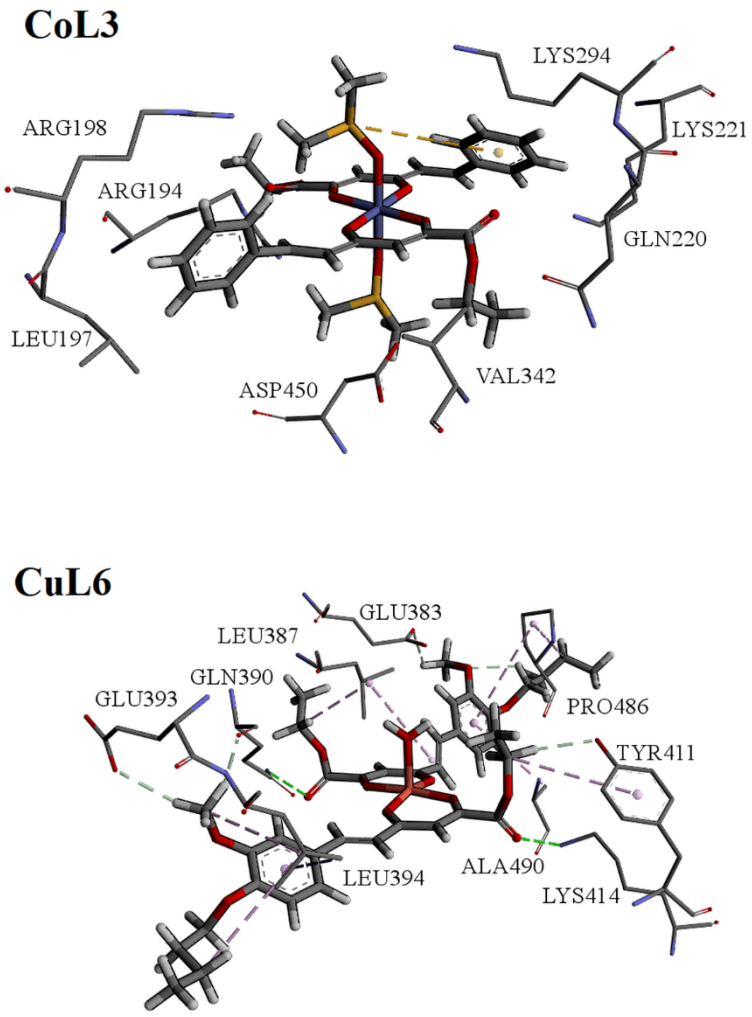
Испитивана једињења	Функција за оцену	Албумин IIA	Албумин IIIA	DNA мали жлеб	DNA интеркалација
CoL3	MolDock	−172,21	−177,52	−140,31	−184,16
	Rerank	−111,27	−129,92	−57,34	−86,50
CuL6	MolDock	-89,18	-141,66	-190,05	-159,23
	Rerank	575,28	-100,16	-95,23	-80,04



Слика 35. Најбоље оцењене структуре добијене доковањем испитиваних комплекса на DNA коришћењем програма MVD: а) **CoL3** у малом жлебу; б) **CuL6** у малом жлебу; в) интеркалација **CoL3**; г) интеркалација **CuL6**.

Комплекси **CoL3** и **CuL6** су добили високе оцене при везивању за обе DNA структуре што указује на могућност везивања на оба начина у случају оба комплекса [157, 158]. Квантитативна неупоредивост резултата нам не дозвољава постављање тврдњи о преферентном начину везивања, иако би из резултата могло да се претпостави да **CoL3** тежи ка интеркалацији (Слика 35в), док **CuL6** тежи ка везивању у малом жлебу (Слика 35б) [157, 158]. Важно је напоменути да је приликом доковања **CuL6** у интеркалациони размак дисквалификована најбоље оцењена структура услед структурне нелогичности, па је приказана структура која је друга по MolDock и Rerank оценама (Слика 35г). Уопштено најлошије оцењен резултат на основу доковања испитиваних комплекса на DNA коришћењем MVD програма је добијен доковањем **CoL3** у мали жлеб (Слика 35а), највероватније због немогућности углављивања дикетоестарског фрагмента у жлеб услед

стерних сметњи узрокованим интеракцијом аксијалних лиганада са фосфатним ланцем. Осврташем на албумин, добијени резултати приликом доковања **CoL3** за места везивања у доменима IIA и IIIA су сличних вредности, што би онемогућило доказивање афинитета према једном или другом месту везивања, међутим Rerank (функција за поновно оцењивање) даје значајну предност везивању у оквиру домена IIIA што је у складу са експериментално добијеним подацима [157]. Ситуација је јаснија код комплекса **CuL6**, зато што алгоритам није пронашао добро место везивања у домену IIA, па је очигледно већи афинитет према месту у домену IIIA, што потврђује Rerank функција, а у складу је и са експериментално добијеним подацима [158]. Аминокиселински остаци у близини најбољих поза добијених доковањем комплекса **CoL3** и **CuL6** на албумин користећи програм MVD, приказане су на Слици 36.



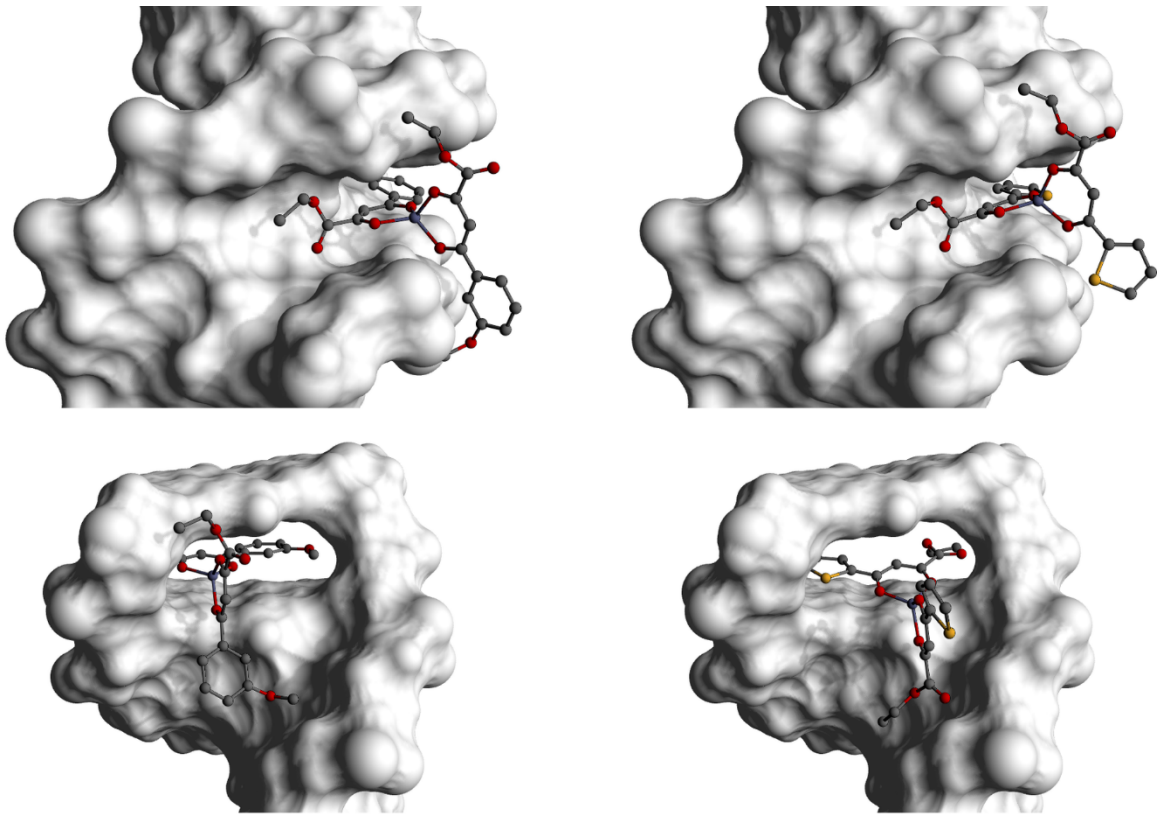
Слика 36. Интеракције са аминокиселинским остацима најбоље оцењених структура испитиваних комплекса, добијених доковањем на албумин, коришћењем програма MVD. Горе: **CoL3** у месту 2 на BSA; Доле: **CuL6** у месту 2 на HSA.

Комплекси цинка(II), **ZnL2** и **ZnL4,** доковани су на сличан начин као и комплекси кобалта(II) и бакра(II), али користећи програм AD4. Припремљене су структуре DNA од којих је једна са интеркалационим размаком. Припремљена је и структура BSA, приликом чега су циљана два везивна места, позната као место 1 у субдомену IIA и место 2 у

субдомену IIIA [159]. Програм AD4 и функција за оцењивање у склопу програма се ослања на физичке интеракције типова атома са генерисаним интеракционим површинама, што се разликује од методе структурне параметризације према одређеном типу биомолекула. Ово доводи до поузданије квантификације оцена које се тумаче као предвиђене енергије везивања (ΔE_b) и у случају непротеинских макромолекула [169]. Дате су вредности ΔE_b добијене рачунским експериментима у програму AD4 (Таβела 13) и приказане су добијене структуре са најнижим вредностима ΔE_b (Слике 37,38).

Табела 13. Резултати молекулског доковања у облику предвиђених енергија везивања који су добијени на основу рачунских експеримената изведених у програму AutoDock4.

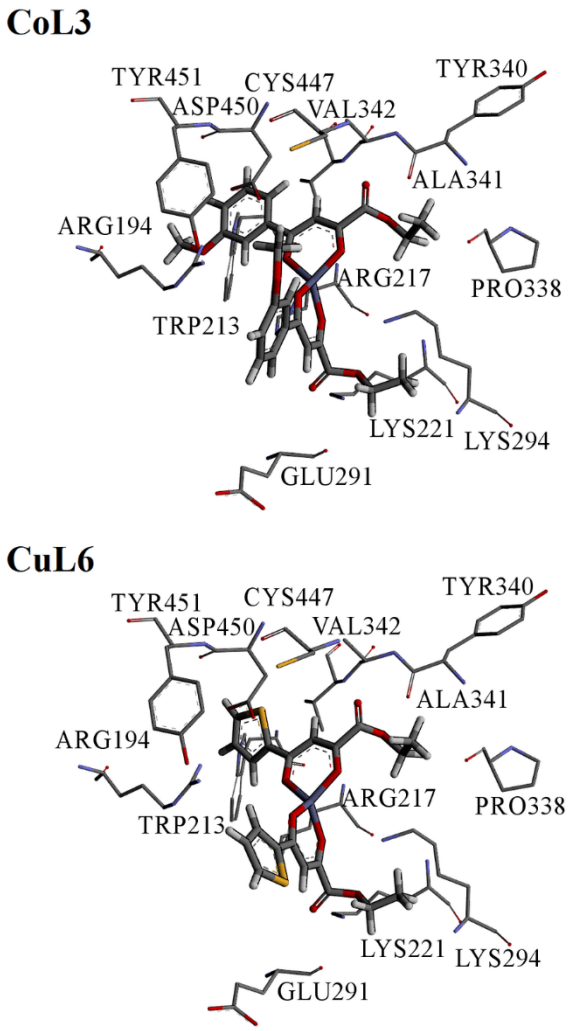
Испитивана једињења	ΔE_b [kcal/mol]			
	BSA IIA	BSA IIIA	DNA мали жлеб	DNA интеркалација
ZnL2	-4,87	-6,24	-5,68	-5,64
ZnL4	-4,50	-5,34	-4,70	-5,09



Слика 37. Најбоље оцењене структуре добијене доковањем испитиваних комплекса на DNA коришћењем програма AD4: а) **ZnL2** у малом жлебу; б) **ZnL4** у малом жлебу; в) интеркалација **ZnL2**; г) интеркалација **ZnL4**.

Оба комплекса цинка показују средње јак афинитет према молекулу DNA, приликом чега се **ZnL2** везује нешто јаче него **ZnL4** [159]. Разлика у енергији између ΔE_b за интеркалацију и везивање у малом жлебу је у оба случаја мања од 0,5 kcal/mol. Овако мала разлика указује на могућност успостављања обе врсте интеракција, али онемогућава постављање прецизнијих тврдњи о начину везивања. Приликом доковања у малом жлебу, добијене структуре **ZnL2** и **ZnL4** најниже енергије се одлично поклапају (Слике

37а, 37б) пошто се дикетоестарски фрагмент на идентичан начин поставља унутар жлеба. У експериментима са албумином, разлика у ΔE_b између домена IIA и IIIA је значајна, и очигледно оба комплекса фаворизују место везивања у домену IIIA, што се поклапа са експериментално добијеним подацима [159]. Доковање помоћу програма AD4 није произвело резултате у чијим структурама су пронађене структурне аномалије.



Слика 38. Интеракције са аминокиселинским остацима најбоље оцењених структура испитиваних комплекса, добијених доковањем на албумин, коришћењем програма AD4. Горе: **ZnL2** у месту 2 на BSA; Доле: **ZnL4** у месту 2 на BSA.

4. ЗАКЉУЧАК

Синтетисано је укупно 12 нових комплекса, а од тога су 4 комплекса кобалта(II), 4 комплекса бакра(II) и 4 комплекса цинка(II). Коришћено је 9 раније синтетисаних 2,4-дикетоестара за координацију са јонима изабраних метала. Сви новосинтетисани комплекси су добијени у реакцијама јона метала и одговарајућег лиганда у молском односу метал:лиганд 1:2. Карактеризацијом спектроскопским методама UV-Vis, IR, NMR и EPR је утврђено да се приликом координације лиганди налазе у енолној форми, и да се бидентатно координују за јон метала у случају свих синтетисаних комплекса. Добијени спектрални подаци се поклапају са подацима раније синтетисаних комплекса чије су структуре одређене помоћу кристалографских метода. Коришћењем масене спектрометрије и елементалне анализе, претпостављене структурне формуле су стехиометријски потврђене.

Антимикробне активности према 5 различитих сојева бактеријских култура, и 5 различитих гљивичних култура, одређене су за сваки новосинтетисани комплекс, при чему су MIC вредности између 0,01 и 7,5 mg/ml установљене за већину случајева. Уопштено су тестирани комплекси показали бољу активност према гљивичним културама, од чега највећу према сојевима одговорним за кожна обољења. Највећу антибактеријску активност међу комплексима кобалта(II) и једну од уопштено највећих антифунгалних активности међу тестираним комплексима је показао **CoL1**. Међу комплексима бакра(II) највећу антимикробну активност је показао **CuL7,** а највећу антигљивичну активност је показао **CuL5**. Комплекс цинка(II) који је показао уопштено највећу антимикробну активност је **ZnL4**. Антитуморска активност је одређена помоћу MTT тестова на ћелијским линијама рака дебелог црева, SW-480 и анеуплоидних кератиноцита HeCaT. Најизраженији цитотоксични ефекат међу комплексима кобалта(II) је показао **CoL3**, међу комплексима цинка(II) су показали **ZnL2** и **ZnL4**, а међу свим тестираним комплексима највећи ефекат је показао **CuL6**, комплекс бакра(II). Ова четири комплекса, **CoL3**, **CuL6**, **ZnL2** и **ZnL4** су изабрана за даља истраживања. Морфолошка анализа је показала да сви изабрани комплекси узрокују претежно апоптозу као механизам ћелијске смрти.

Интеракције изабраних комплекса са DNA су испитане помоћу UV-Vis титрација, флуориметријом и мерењем вискозитета. Утврђено је да сви изабрани комплекси спонтано интерагују са DNA и да су вредности константи везивања највише на физиолошкој температури од три испитане. Појава хиперхромизма, као и позитивне вредности енталпије и ентропије указују на неинтеркалаторне хидрофобне интеракције. Флоуриметријом је испитано компетитивно везивање изабраних комплекса за DNA у односу на интеркалатор EB или HOE у малом жлебу. Упоређивањем Штерн-Волмерових константи закључено је да се изабрани комплекси цинка(II) везују у малом жлебу док је разлика превише мала за закључке о начину везивања изабраних комплекса кобалта(II) и бакра(II). У складу са претходно наведеним закључцима, мерењем вискозитета је утврђено да је највероватнији начин интеракције свих изабраних комплекса са молекулом DNA везивање унутар малог жлеба. Интеракције изабраних комплекса са албумином су испитане флуориметријом, приликом чега је утврђено да изабрани комплекси показују афинитет према албумину. Испитано је компетитивно везивање у односу на EY који се преферентно везује у домену IIA и ибупрофен који се преферентно везује у домену IIIA, приликом чега је на основу израчунатих Штерн-Волмерових константи установљено да се сви изабрани комплекси преферентно везују у домену IIIA.

Рачунарском техником молекулског доковања је утврђено да је везивање за DNA у случају свих изабраних комплекса могуће и путем интеркалације и у малом жлебу. Недовољна разлика у предвиђеним енергијама везивања је онемогућила разлучивање

начина везивања изабраних комплекса цинка(II) за DNA, док је параметризација усмерена ка протеинским интеракцијама онемогућила разлучивање начина везивања комплекса кобалта(II) и бакра(II) за DNA у контексту молекулског доковања. Техником молекулског доковања су потврђене претпоставке о начину везивања свих изабраних комплекса за албумин, постављене на основу флуориметријских мерења. Сви изабрани комплекси су показали већи афинитет према месту везивања у субдомену IIIA, при чему **CuL6** није успешно докован у субдомену IIA.

Изабрани комплекси **CoL3**, **CuL6**, **ZnL2** и **ZnL4** су показали значајану активност према ћелијама рака, поред чега су показали селективно дејство према нездравим ћелијама у односу на здраве. Утврђен је проапоптотичан механизам деловања на ћелије рака. Испитивањем молекулских интеракција и прорачунима молекулског доковања је утврђено да се изабрани комплекси везују за албумин, из чега се може закључити да албумин може да послужи као носилац лека у организму. Испитивањем молекулских интеракција и прорачунима молекулског доковања је утврђено да се изабрани комплекси везују за DNA, приликом чега је испитивањем молекулских интеракција утврђено да је највероватнији начин везивања унутар малог жлеба. На основу тога се може закључити да изабрани комплекси могу приликом интеракција са DNA довести до неправилног читања и репликације DNA, што може бити механизам узроковања апоптозе нездравих ћелија.

5. ЛИТЕРАТУРА

[1] Roberts, B. W.; Thornton, C. P.; Pigott, V. C. Development of Metallurgy in Eurasia. *Antiquity* **2009**, 83 (322), 1012–1022. https://doi.org/10.1017/s0003598x00099312
[2] Müller, W.; Fricke, H.; Halliday, A. N.; McCulloch, M. T.; Wartho, J.-A. Origin and Migration of the Alpine Iceman. *Science* **2003**, 302 (5646), 862–866. https://doi.org/10.1126/science.1089837
[3] Radivojević, M.; Roberts, B. W. Early Balkan Metallurgy: Origins, Evolution and Society, 6200–3700 BC. *Journal of World Prehistory* **2021**, 34 (2), 195–278. https://doi.org/10.1007/s10963-021-09155-7
[4] Müller, J.; Delgado-Raack, S.; Escanilla, N.; Kienle, L.; Kneisel, J.; Czebreszuk, J.; Jaeger, M.; Szmyt, M.; Schürmann, U. First Evidence for the Forging of Gold in an Early Bronze Age Site of Central Europe (2200–1800 BCE). *Journal of Archaeological Science: Reports* **2023**, 47, 103748. https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2022.103748
[5] Craddock, P. T. The Composition of the Copper Alloys Used by the Greek, Etruscan and Roman Civilizations. *Journal of Archaeological Science* **1978**, 5 (1), 1–16. https://doi.org/10.1016/0305-4403(78)90015-8
[6] Rehren, T. Small Size, Large Scale Roman Brass Production in Germania Inferior. *Journal of Archaeological Science* **1999**, 26 (8), 1083–1087. https://doi.org/10.1006/jasc.1999.0402
[7] Willies, L.; Craddock, P. T.; Gurjar, L. J.; Hegde, K. T. M. Ancient Lead and Zinc Mining in Rajasthan, India. *World Archaeology* **1984**, 16 (2), 222–233. https://doi.org/10.1080/00438243.1984.9979929
[8] Zhou, W.; Martinón-Torres, M.; Chen, J.; Liu, H.; Li, Y. Distilling Zinc for the Ming Dynasty: The Technology of Large Scale Zinc Production in Fengdu, Southwest China. *Journal of Archaeological Science* **2012**, 39 (4), 908–921. https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.10.021
[9] Gusenius, E. M. Beginnings of Greatness in Swedish Chemistry: Georg Brandt, (1694-1768). *Transactions of the Kansas Academy of Science* **1967**, 70 (4), 413. https://doi.org/10.2307/3627593
[10] Greenwood N. N; Earnshaw A. Cobalt, Rhodium and Iridium. *Chemistry of the Elements* **1997**, 1113–1143, Butterworth-Heinemann. https://doi.org/10.1016/b978-0-7506-3365-9.50032-8
[11] Rehren, Th. Aspects of the Production of Cobalt-blue Glass in Egypt. *Archaeometry* **2001**, 43 (4), 483–489. https://doi.org/10.1111/1475-4754.00031
[12] Shortland, A. J.; Tite, M. S.; Ewart, I. Ancient Exploitation and Use of Cobalt Alums From the Western Oases of Egypt. *Archaeometry* **2006**, 48 (1), 153–168. https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2006.00248.x
[13] Völz, H. G.; Kischkewitz, J.; Woditsch, P.; Westerhaus, A.; Griebler, W.-D.; De Liedekerke, M.; Buxbaum, G.; Printzen, H.; Mansmann, M.; Räde, D.; Trenczek, G.; Wilhelm, V.; Schwarz, S.; Wienand, H.; Adel, J.; Adrian, G.; Brandt, K.; Cork, W. B.; Winkeler, H.; Mayer, W.; Schneider, K.; Leitner, L.; Kathrein, H.; Schwab, E.; Jakusch, H.; Ohlinger, M.; Veitch, R.; Etzrodt, G.; Pfaff, G.; Franz, K.-D.; Emmert, R.; Nitta, K.; Besold, R.; Gaedcke, H. Pigments, Inorganic. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* **2006**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA. https://doi.org/10.1002/14356007.a20_243.pub2
[14] Zdravković, M.; Milutinović, J. S. Antimicrobial Properties of Copper and Its Alloys through the Prism of the Current SARS CoV-2 Pandemic. *Zaštita Materijala* **2021**, 62 (4), 297–303. https://doi.org/10.5937/zasmat2104297m
[15] Craddock, P. T. The Origins and Inspirations of Zinc Smelting. *Journal of Material Science* **2009**, 44 (9), 2181–2191. https://doi.org/10.1007/s10853-008-2942-1

[16] Greenwood N. N; Earnshaw A. Abundance of Elements in Crustal Rocks. *Chemistry of the Elements* **1997**, 1294, Butterworth-Heinemann.
https://doi.org/10.1016/b978-0-7506-3365-9.50041-9
[17] Macwalter, R. J.; Barratt, S. 115. The Absorption Spectra of Cobalt Halide Solutions. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1934**, 517. https://doi.org/10.1039/jr9340000517
[18] Coe, P. L. Cobalt(III) Fluoride. *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis* **2001**. https://doi.org/10.1002/047084289x.rc185
[19] Chester, A. W.; Heiba, E.-A.; Dessau, R. M.; Koehl, W. J., Jr. The Interaction of Cobalt(III) with Chloride Ion in Acetic Acid. *Inorganic and Nuclear Chemistry Letters* **1969**, 5 (4), 277–283. https://doi.org/10.1016/0020-1650(69)80198-4
[20] Melchior, A.; Peressini, S.; Portanova, R.; Sangregorio, C.; Tavagnacco, C.; Tolazzi, M. Cobalt(II) and Cadmium(II) Chelates with Nitrogen Donors and O2 Bonding to Co(II) Derivatives. *Inorganica Chimica Acta* **2004**, 357 (12), 3473–3482.
https://doi.org/10.1016/j.ica.2004.04.020
[21] Birch, A. J.; Williamson, D. H. Homogeneous Hydrogenation Catalysts in Organic Synthesis. *Organic Reactions*, **2011**, 1–186. https://doi.org/10.1002/0471264180.or024.01
[22] Siedzielnik, M.; Pawłowska, M.; Daśko, M.; Kleinschmidt, H.; Dołęga, A. Reactions of Cobalt(II) Chloride and Cobalt(II) Acetate with Hemisalen-Type Ligands: Ligand Transformation, Oxidation of Cobalt and Complex Formation. Preliminary Study on the Cytotoxicity of Co(II) and Co(III) Hemisalen Complexes. *RSC Advances* **2023**, 13 (13), 8830–8843. https://doi.org/10.1039/d2ra07089h
[23] Yamada, K. Cobalt: Its Role in Health and Disease. *Metal Ions in Life Sciences* **2013**, 295–320. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7500-8_9
[24] Raux, E.; Schubert, H. L.; Warren, M. J. Biosynthesis of Cobalamin (Vitamin B12): A Bacterial Conundrum. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2000**, 57 (13), 1880–1893. https://doi.org/10.1007/pl00000670
[25] Leyssens, L.; Vinck, B.; Van Der Straeten, C.; Wuyts, F.; Maes, L. Cobalt Toxicity in Humans—A Review of the Potential Sources and Systemic Health Effects. *Toxicology* **2017**, 387, 43–56. https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.05.015
[26] Savigni, D. L.; Morgan, E. H. Transport Mechanisms for Iron and Other Transition Metals in Rat and Rabbit Erythroid Cells. *The Journal of Physiology* **1998**, 508 (3), 837–850.
https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.837bp.x
[27] Kobayashi, M.; Shimizu, S. Cobalt Proteins. *European Journal of Biochemistry* **1999**, 261 (1), 1–9. https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00186.x
[28] Brennan, B. A.; Alms, G.; Nelson, M. J.; Durney, L. T.; Scarrow, R. C. Nitrile Hydratase from Rhodococcus Rhodochrous J1 Contains a Non-Corrin Cobalt Ion with Two Sulfur Ligands. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118 (38), 9194–9195.
https://doi.org/10.1021/ja961920d
[29] Itoh, N.; Morinaga, N.; Kouzai, T. Purification and Characterization of a Novel Metal-Containing Nonheme Bromoperoxidase from Pseudomonas Putida. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1994**, 1207 (2), 208–216.
https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)00053-0
[30] Dwyer, F. P.; Gyarfas, E. C.; Rogers, W. P.; Koch, J. H. Biological Activity of Complex Ions. *Nature* **1952**, 170 (4318), 190–191. https://doi.org/10.1038/170190a0
[31] Dwyer, F.; Reid, I.; Shulman, A.; Laycock, G. M.; Dixson, S. The Biological Actions of 1,10-Phenanthroline and 2,2′-Bipyridine Hydrochlorides, Quaternary Salts and Metal Chelates and Related Compounds. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* **1969**, 47 (2), 203–218. https://doi.org/10.1038/icb.1969.21

[32] Chang, E. L.; Simmers, C.; Knight, D. A. Cobalt Complexes as Antiviral and Antibacterial Agents. *Pharmaceuticals* **2010**, 3 (6), 1711–1728. https://doi.org/10.3390/ph3061711
[33] Renfrew, A. K.; O'Neill, E. S.; Hambley, T. W.; New, E. J. Harnessing the Properties of Cobalt Coordination Complexes for Biological Application. *Coordination Chemistry Reviews* **2018**, 375, 221–233. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.11.027
[34] Takeuchi, T.; Böttcher, A.; Quezada, C. M.; Meade, T. J.; Gray, H. B. Inhibition of Thermolysin and Human α-Thrombin by Cobalt(III) Schiff Base Complexes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, 7 (5), 815–819. https://doi.org/10.1016/s0968-0896(98)00272-7
[35] Gessner, R. V.; Quigley, G. J.; Wang, A. H. J.; Van der Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; Rich, A. Structural Basis for Stabilization of Z-DNA by Cobalt Hexaammine and Magnesium Cations. *Biochemistry* **1985**, 24 (2), 237–240. https://doi.org/10.1021/bi00323a001
[36] Delehanty, J. B.; Bongard, J. E.; Thach, D. C.; Knight, D. A.; Hickey, T. E.; Chang, E. L. Antiviral Properties of Cobalt(III)-Complexes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, 16 (2), 830–837. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.10.022
[37] Roy, S.; Roy, S.; Saha, S.; Majumdar, R.; Dighe, R. R.; Jemmis, E. D.; Chakravarty, A. R. Cobalt(II) Complexes of Terpyridine Bases as Photochemotherapeutic Agents Showing Cellular Uptake and Photocytotoxicity in Visible Light. *Dalton Transactions*. 2011, 40 (6), 1233–1242. https://doi.org/10.1039/c0dt00223b
[38] El-Ferjani, Rashd. M.; Ahmad, M.; Dhiyaaldeen, S. M.; Harun, F. W.; Ibrahim, M. Y.; Adam, H.; Mohd. Yamin, B.; Al-Obaidi, M. M. J.; Batran, R. A. In Vivo Assessment of Antioxidant and Wound Healing Improvement of a New Schiff Base Derived Co (II) Complex in Rats. *Scientific Reports* **2016**, 6 (1). https://doi.org/10.1038/srep38748
[39] Kar, K.; Ghosh, D.; Kabi, B.; Chandra, A. A Concise Review on Cobalt Schiff Base Complexes as Anticancer Agents. *Polyhedron* **2022**, 222, 115890. https://doi.org/10.1016/j.poly.2022.115890
[40] Gust, R.; Ott, I.; Posselt, D.; Sommer, K. Development of Cobalt(3,4-Diarylsalen) Complexes as Tumor Therapeutics. Journal of Medicinal Chemistry 2004, 47 (24), 5837–5846. https://doi.org/10.1021/jm040763n
[41] Greenwood N. N; Earnshaw A. Copper, Silver and Gold. *Chemistry of the Elements* **1997**, 1173–1200, Butterworth-Heinemann. https://doi.org/10.1016/b978-0-7506-3365-9.50034-1
[42] Punia, A. Role of Temperature, Wind, and Precipitation in Heavy Metal Contamination at Copper Mines: A Review. *Environmental Science and Pollution Research* **2020**, 28 (4), 4056–4072. https://doi.org/10.1007/s11356-020-11580-8
[43] Broyles, S. E.; Anderson, K. R.; Groza, J. R.; Gibeling, J. C. Creep Deformation of Dispersion-Strengthened Copper. *Metallurgical and Materials Transactions A* **1996**, 27 (5), 1217–1227. https://doi.org/10.1007/bf02649859
[44] Vlajić, S.; Iličić, R.; Vlajić, A.; Popović, V.; Blagojević, M. Research on the Use of Copper in Vegetable Production. *7th International Scientific Conference Modern Trends in Agricultural Production, Rural Development and Environmental Protection* **2025**, 257–262. https://doi.org/10.46793/7thmtagricult.24v
[45] Worthy, A.; Grosjean, A.; Pfrunder, M. C.; Xu, Y.; Yan, C.; Edwards, G.; Clegg, J. K.; McMurtrie, J. C. Atomic Resolution of Structural Changes in Elastic Crystals of Copper(II) Acetylacetonate. *Nature Chemistry* **2017**, 10 (1), 65–69. https://doi.org/10.1038/nchem.2848
[46] Vlasova, V.; Toikka, Yu. N.; Suslonov, V. V.; Smirnov, A. S.; Bokach, N. A. Synthesis and Structure of Copper(I) Halide Complexes with Halogen-Functionalized Isocyanide Ligands. *Russian Journal of General Chemistry* **2024**, 94 (7), 1682–1688. https://doi.org/10.1134/s1070363224070107

[47] Vo, T. T. T.; Peng, T.-Y.; Nguyen, T. H.; Bui, T. N. H.; Wang, C.-S.; Lee, W.-J.; Chen, Y.-L.; Wu, Y.-C.; Lee, I.-T. The Crosstalk between Copper-Induced Oxidative Stress and Cuproptosis: A Novel Potential Anticancer Paradigm. *Cell Communication and Signaling* **2024**, 22 (1). https://doi.org/10.1186/s12964-024-01726-3
[48] Tsang, T.; Davis, C. I.; Brady, D. C. Copper Biology. Current Biology 2021, 31 (9), R421–R427. https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.03.054
[49] Zhou, B.; Gitschier, J. HCTR1: A Human Gene for Copper Uptake Identified by Complementation in Yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, 94 (14), 7481–7486. https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7481
[50] Harrison, M. D.; Jones, C. E.; Dameron, C. T. Copper Chaperones: Function, Structure and Copper-Binding Properties. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **1999**, 4 (2), 145–153. https://doi.org/10.1007/s007750050297
[51] Evolution of Arthropod Hemocyanins and Insect Storage Proteins (Hexamerins). *Molecular Biology and Evolution* **1994**. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040129
[52] Coates, C. J.; Nairn, J. Diverse Immune Functions of Hemocyanins. *Developmental & Comparative Immunology* **2014**, 45 (1), 43–55. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.01.021
[53] Erasmus, C.; Haase, W. Hemocyanin Model Compounds; a Quantum Mechanical Calculation of Geometry-Dependent Exchange Interaction. *Inorganica Chimica Acta* **1994**, 221 (1–2), 141–146. https://doi.org/10.1016/0020-1693(94)03968-2
[54] Parsons, M.; Convery, M.; Wilmot, C.; Yadav, K.; Blakeley, V.; Corner, A.; Phillips, S.; McPherson, M.; Knowles, P. Crystal Structure of a Quinoenzyme: Copper Amine Oxidase of Escherichia Coli at 2 å Resolution. *Structure* **1995**, 3 (11), 1171–1184. https://doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00253-2
[55] Cao, X.; Antonyuk, S. V.; Seetharaman, S. V.; Whitson, L. J.; Taylor, A. B.; Holloway, S. P.; Strange, R. W.; Doucette, P. A.; Valentine, J. S.; Tiwari, A.; Hayward, L. J.; Padua, S.; Cohlberg, J. A.; Hasnain, S. S.; Hart, P. J. Structures of the G85R Variant of SOD1 in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283 (23), 16169–16177. https://doi.org/10.1074/jbc.m801522200
[56] Cracknell, J. A.; McNamara, T. P.; Lowe, E. D.; Blanford, C. F. Bilirubin Oxidase from Myrothecium Verrucaria: X-Ray Determination of the Complete Crystal Structure and a Rational Surface Modification for Enhanced Electrocatalytic O2 Reduction. *Dalton Transactions* **2011**, 40 (25), 6668. https://doi.org/10.1039/c0dt01403f
[57] Tsukihara, T.; Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Nakashima, R.; Yaono, R.; Yoshikawa, S. Structures of Metal Sites of Oxidized Bovine Heart Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å. *Science* **1995**, 269 (5227), 1069–1074. https://doi.org/10.1126/science.7652554
[58] Schaefer, M.; Hopkins, R. G.; Failla, M. L.; Gitlin, J. D. Hepatocyte-Specific Localization and Copper-Dependent Trafficking of the Wilson's Disease Protein in the Liver. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **1999**, 276 (3), G639–G646. https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.3.g639
[59] Mercer, J. F. B.; Ambrosini, L.; Horton, S.; Gazeas, S.; Grimes, A. Animal Models of Menkes Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1999**, 97–108. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4859-1_8
[60] Noda, Y.; Asada, M.; Kubota, M.; Maesako, M.; Watanabe, K.; Uemura, M.; Kihara, T.; Shimohama, S.; Takahashi, R.; Kinoshita, A.; Uemura, K. Copper Enhances APP Dimerization and Promotes Aβ Production. *Neuroscience Letters* **2013**, 547, 10–15. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.04.057

[61] Hordyjewska, A.; Popiołek, Ł.; Kocot, J. The Many "Faces" of Copper in Medicine and Treatment. *Biometals* **2014**, 27 (4), 611–621. https://doi.org/10.1007/s10534-014-9736-5
[62] Easmon, J. Copper and Iron Complexes with Antitumour Activity. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2002**, 12 (6), 789–818. https://doi.org/10.1517/13543776.12.6.789
[63] Nasulewicz, A.; Mazur, A.; Opolski, A. Role of Copper in Tumour Angiogenesis—Clinical Implications. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2004**, 18 (1), 1–8. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2004.02.004
[64] Cox, C.; Teknos, T. N.; Barrios, M.; Brewer, G. J.; Dick, R. D.; Merajver, S. D. The Role of Copper Suppression as an Antiangiogenic Strategy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *The Laryngoscope* **2001**, 111 (4), 696–701. https://doi.org/10.1097/00005537-200104000-00024
[65] Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. D. Trace Elements in Human Physiology and Pathology. Copper. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2003**, 57 (9), 386–398. https://doi.org/10.1016/s0753-3322(03)00012-x
[66] Delf, B. W.; Gillard, R. D.; O'Brien, P. The Isomers of α-Amino-Acids with Copper(II). Part 5. The Cis and Trans Isomers of Bis(Glycinato)Copper(II), and Their Novel Thermal Isomerization. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1979**, No. 8, 1301–1305. https://doi.org/10.1039/dt9790001301
[67] Li, N. C.; Doody, E. Metal—Amino Acid Complexes. II. Polarographic and Potentiometric Studies on Complex Formation between Copper(II) and Amino Acid Ion1,2. *Journal of the American Chemical Society* **1952**, 74 (16), 4184–4188. https://doi.org/10.1021/ja01136a067
[68] Sorenson, J. R. J.; Oberley, L. W.; Crouch, R. K.; Kensler, T. W.; Kishore, V.; Leuthauser, S. W. C.; Oberley, T. D.; Pezeshk, A. Pharmacologic Activities of Copper Compounds in Chronic Diseases. *Biological Trace Element Research* **1983**, 5 (4–5), 257–273. https://doi.org/10.1007/bf02987212
[69] Andrade, A.; Namora, S. F.; Woisky, R. G.; Wiezel, G.; Najjar, R.; Sertié, J. A. A.; de Oliveira Silva, D. Synthesis and Characterization of a Diruthenium–Ibuprofenato Complex. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2000**, 81 (1–2), 23–27. https://doi.org/10.1016/s0162-0134(00)00106-9
[70] Riley, D. P. Functional Mimics of Superoxide Dismutase Enzymes as Therapeutic Agents. *Chemical Reviews* **1999**, 99 (9), 2573–2588. https://doi.org/10.1021/cr980432g
[71] Fukuuchi, T.; Doh-ura, K.; Yoshihara, S.; Ohta, S. Metal Complexes with Superoxide Dismutase-like Activity as Candidates for Anti-Prion Drug. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2006, 16 (23), 5982–5987. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.08.115
[72] Shrivastava, H. Y.; Kanthimathi, M.; Nair, B. U. Copper(II) Complex of a Tridentate Ligand: An Artificial Metalloprotease for Bovine Serum Albumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2002**, 1573 (2), 149–155. https://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00417-8
[73] Iakovidis, I.; Delimaris, I.; Piperakis, S. M. Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach. *Molecular Biology International* **2011**, 2011, 1–13. https://doi.org/10.4061/2011/594529
[74] Sharma, S.; Athar, F.; Maurya, M. R.; Azam, A. Copper(II) Complexes with Substituted Thiosemicarbazones of Thiophene-2-Carboxaldehyde: Synthesis, Characterization and Antiamoebic Activity against E. Histolytica. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 40 (12), 1414–1419. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.05.013

[75] Pérez-Rebolledo, A.; Teixeira, L. R.; Batista, A. A.; Mangrich, A. S.; Aguirre, G.; Cerecetto, H.; González, M.; Hernández, P.; Ferreira, A. M.; Speziali, N. L. 4-Nitroacetophenone-Derived Thiosemicarbazones and Their Copper(II) Complexes with Significant in Vitro Anti-Trypanosomal Activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 43 (5), 939–948. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.06.020

[76] Jiménez-Garrido, N.; Perelló, L.; Ortiz, R.; Alzuet, G.; González-Álvarez, M.; Cantón, E.; Liu-González, M.; García-Granda, S.; Pérez-Priede, M. Antibacterial Studies, DNA Oxidative Cleavage, and Crystal Structures of Cu(II) and Co(II) Complexes with Two Quinolone Family Members, Ciprofloxacin and Enoxacin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2005, 99 (3), 677–689. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.11.016

[77] Tripathi, L.; Kumar, P.; Singhai, A. Role of Chelates in Treatment of Cancer. *Indian Journal of Cancer* **2007**, 44 (2), 62. https://doi.org/10.4103/0019-509x.35813

[78] Coats, E. A.; Milstein, S. R.; Holbein, G.; McDonald, J.; Reed, R.; Petering, H. G. Comparative Analysis of the Cytotoxicity of Substituted [Phenylglyoxal Bis(4-Methyl-3-Thiosemicarbazone]Copper(II) Chelates. *Journal of Medicinal Chemistry* **1976**, 19 (1), 131–135. https://doi.org/10.1021/jm00223a023

[79] Miesel, R.; Weser, U. Anticarcinogenic Reactivity of Copper-Dischiffbases with Superoxide Dismutase-Like Activity. *Free Radical Research Communications* **1990**, 11 (1–3), 39–51. https://doi.org/10.3109/10715769009109666

[80] Zhang, W.; Chen, C.; Shi, H.; Yang, M.; Liu, Y.; Ji, P.; Chen, H.; Tan, R. X.; Li, E. Curcumin Is a Biologically Active Copper Chelator with Antitumor Activity. *Phytomedicine* **2016**, 23 (1), 1–8. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.11.005

[81] Rivero-Müller, A.; De Vizcaya-Ruiz, A.; Plant, N.; Ruiz, L.; Dobrota, M. Mixed Chelate Copper Complex, Casiopeina IIgly®, Binds and Degrades Nucleic Acids: A Mechanism of Cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions* **2007**, 165 (3), 189–199. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.002

[82] Figueroa-DePaz, Y.; Pérez-Villanueva, J.; Soria-Arteche, O.; Martínez-Otero, D.; Gómez-Vidales, V.; Ortiz-Frade, L.; Ruiz-Azuara, L. Casiopeinas of Third Generations: Synthesis, Characterization, Cytotoxic Activity and Structure–Activity Relationships of Mixed Chelate Compounds with Bioactive Secondary Ligands. *Molecules* **2022**, 27 (11), 3504. https://doi.org/10.3390/molecules27113504

[83] Marzano, C.; Pellei, M.; Colavito, D.; Alidori, S.; Lobbia, G. G.; Gandin, V.; Tisato, F.; Santini, C. Synthesis, Characterization, and in Vitro Antitumor Properties of Tris(Hydroxymethyl)Phosphine Copper(I) Complexes Containing the New Bis(1,2,4-Triazol-1-Yl)Acetate Ligand. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49 (25), 7317–7324. https://doi.org/10.1021/jm0601248

[84] Holland, J. P.; Aigbirhio, F. I.; Betts, H. M.; Bonnitcha, P. D.; Burke, P.; Christlieb, M.; Churchill, G. C.; Cowley, A. R.; Dilworth, J. R.; Donnelly, P. S.; Green, J. C.; Peach, J. M.; Vasudevan, S. R.; Warren, J. E. Functionalized Bis(Thiosemicarbazonato) Complexes of Zinc and Copper: Synthetic Platforms Toward Site-Specific Radiopharmaceuticals. Inorg. Chem. 2006, 46 (2), 465–485. https://doi.org/10.1021/ic0615628

[85] Housecroft, C. E.; Thomas, C. M.; Lim, M. H. The Central Role of the D-Block Metals in the Periodic Table. *Dalton Transactions* **2019**, 48 (26), 9405–9407. https://doi.org/10.1039/c9dt90117e

[86] Greenwood N. N; Earnshaw A. Zinc, Cadmium and Mercury. *Chemistry of the Elements* **1997**, 1201–1226, Butterworth-Heinemann. https://doi.org/10.1016/b978-0-7506-3365-9.50035-3

[87] Farias, M. C. M.; Santos, C. A. L.; Panossian, Z.; Sinatora, A. Friction Behavior of Lubricated Zinc Phosphate Coatings. *Wear* **2009**, 266 (7–8), 873–877. https://doi.org/10.1016/j.wear.2008.10.002
[88] Khalil, S. A.; El-Manguch, M. A. The Kinetics of Zinc Dissolution in Nitric Acid. *Monatshefte für Chemie* **1987**, 118 (4), 453–462. https://doi.org/10.1007/bf00809928
[89] Dudev, T.; Lim, C. Tetrahedral vs Octahedral Zinc Complexes with Ligands of Biological Interest: A DFT/CDM Study. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122 (45), 11146–11153. https://doi.org/10.1021/ja0010296
[90] Kiouri, D. P.; Tsoupra, E.; Peana, M.; Perlepes, S. P.; Stefanidou, M. E.; Chasapis, C. T. Multifunctional Role of Zinc in Human Health: An Update. *EXCLI Journal* **2023**, 22, 809–827. https://doi.org/10.17179/EXCLI2023-6335
[91] Zoroddu, M. A.; Aaseth, J.; Crisponi, G.; Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M. The Essential Metals for Humans: A Brief Overview. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2019**, 195, 120–129. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013
[92] Vašák, M. Metallothioneins: New Functional and Structural Insights. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, 4 (2), 177–183. https://doi.org/10.1016/s1367-5931(00)00082-x
[93] Broadley, M. R.; White, P. J.; Hammond, J. P.; Zelko, I.; Lux, A. Zinc in Plants. *New Phytologist* **2007**, 173 (4), 677–702. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x
[94] Auld, D. S.; Bergman, T. Medium- and Short-Chain Dehydrogenase/Reductase Gene and Protein Families. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2008**, 65 (24), 3961–3970. https://doi.org/10.1007/s00018-008-8593-1
[95] Coleman, J. E. Carbonic Anhydrase: Zinc and the Mechanism of Catalysisa. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1984**, 429 (1), 26–48. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1984.tb12313.x
[96] Pasquini, M.; Grosjean, N.; Hixson, K. K.; Nicora, C. D.; Yee, E. F.; Lipton, M.; Blaby, I. K.; Haley, J. D.; Blaby-Haas, C. E. Zng1 Is a GTP-Dependent Zinc Transferase Needed for Activation of Methionine Aminopeptidase. *Cell Reports* **2022**, 39 (7), 110834. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110834
[97] Nagpal, A.; Schaich, M. A.; Weaver, T. M.; Roginskaya, V.; Sallmyr, A.; Leary, L. P.; Freudenthal, B. D.; Tomkinson, A. E.; Van Houten, B. The Zinc Finger of DNA Ligase 3α Binds to Nucleosomes via an Arginine Anchor. *Nature Communications* **2025**, 16 (1). https://doi.org/10.1038/s41467-025-66320-8
[98] Fosmire, G. Zinc Toxicity. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1990**, 51 (2), 225–227. https://doi.org/10.1093/ajcn/51.2.225
[99] Chasapis, C. T.; Ntoupa, P.-S. A.; Spiliopoulou, C. A.; Stefanidou, M. E. Recent Aspects of the Effects of Zinc on Human Health. *Archives of Toxicology* **2020**, 94 (5), 1443–1460. https://doi.org/10.1007/s00204-020-02702-9
[100] Zou, P.; Du, Y.; Yang, C.; Cao, Y. Trace Element Zinc and Skin Disorders. *Frontiers in Medicine* **2023**, 9. https://doi.org/10.3389/fmed.2022.1093868
[101] Wang, X.; Wu, W.; Zheng, W.; Fang, X.; Chen, L.; Rink, L.; Min, J.; Wang, F. Zinc Supplementation Improves Glycemic Control for Diabetes Prevention and Management: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2019**, 110 (1), 76–90. https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz041
[102] Knez, M.; Glibetic, M. Zinc as a Biomarker of Cardiovascular Health. *Frontiers in Nutrition* **2021**, 8. https://doi.org/10.3389/fnut.2021.686078
[103] Sandusky-Beltran, L. A.; Manchester, B. L.; McNay, E. C. Supplementation with Zinc in Rats Enhances Memory and Reverses an Age-Dependent Increase in Plasma Copper. *Behavioural Brain Research* **2017**, 333, 179–183. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.007

[104] Anbari-Nogyni, Z.; Bidaki, R.; Madadizadeh, F.; Sangsefidi, Z. S.; Fallahzadeh, H.; Karimi-Nazari, E.; Nadjarzadeh, A. Relationship of Zinc Status with Depression and Anxiety among Elderly Population. *Clinical Nutrition ESPEN* **2020**, 37, 233–239. https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2020.02.008

[105] Organisciak, D.; Wong, P.; Rapp, C.; Darrow, R.; Ziesel, A.; Rangarajan, R.; Lang, J. Light -Induced Retinal Degeneration Is Prevented by Zinc, a Component in the Age-related Eye Disease Study Formulation. *Photochemistry & Photobiology* **2012**, 88 (6), 1396–1407. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01134.x

[106] Hoppe, C.; Kutschan, S.; Dörfler, J.; Büntzel, J.; Büntzel, J.; Huebner, J. Zinc as a Complementary Treatment for Cancer Patients: A Systematic Review. *Clinical and Experimental Medicine* **2021**, 21 (2), 297–313. https://doi.org/10.1007/s10238-020-00677-6

[107] Read, S. A.; Obeid, S.; Ahlenstiel, C.; Ahlenstiel, G. The Role of Zinc in Antiviral Immunity. *Advances in Nutrition* **2019**, 10 (4), 696–710. https://doi.org/10.1093/advances/nmz013

[108] Jothimani, D.; Kailasam, E.; Danielraj, S.; Nallathambi, B.; Ramachandran, H.; Sekar, P.; Manoharan, S.; Ramani, V.; Narasimhan, G.; Kaliamoorthy, I.; Rela, M. COVID-19: Poor Outcomes in Patients with Zinc Deficiency. *International Journal of Infectious Diseases* **2020**, 100, 343–349. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.014

[109] Marks, R.; Pearse, A. D.; Walker, A. P. The Effects of a Shampoo Containing Zinc Pyrithione on the Control of Dandruff. *British Journal of Dermatology* **1985**, 112 (4), 415–422. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1985.tb02314.x

[110] Faergemann, J. Management of Seborrheic Dermatitis and Pityriasis Versicolor. *American Journal of Clinical Dermatology* **2000**, 1 (2), 75–80. https://doi.org/10.2165/00128071-200001020-00001

[111] Kasuga, N. C.; Sekino, K.; Ishikawa, M.; Honda, A.; Yokoyama, M.; Nakano, S.; Shimada, N.; Koumo, C.; Nomiya, K. Synthesis, Structural Characterization and Antimicrobial Activities of 12 Zinc(II) Complexes with Four Thiosemicarbazone and Two Semicarbazone Ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2003**, 96 (2–3), 298–310. https://doi.org/10.1016/s0162-0134(03)00156-9

[112] López-Gresa, M. P.; Ortiz, R.; Perelló, L.; Latorre, J.; Liu-González, M.; García-Granda, S.; Pérez-Priede, M.; Cantón, E. Interactions of Metal Ions with Two Quinolone Antimicrobial Agents (Cinoxacin and Ciprofloxacin). *Journal of Inorganic Biochemistry* **2002**, 92 (1), 65–74. https://doi.org/10.1016/s0162-0134(02)00487-7

[113] d'Angelo, J.; Morgant, G.; Ghermani, N. E.; Desmaële, D.; Fraisse, B.; Bonhomme, F.; Dichi, E.; Sghaier, M.; Li, Y.; Journaux, Y.; Sorenson, J. R. J. Crystal Structures and Physico-Chemical Properties of Zn(II) and Co(II) Tetraaqua(3-Nitro-4-Hydroxybenzoato) Complexes: Their Anticonvulsant Activities as Well as Related (5-Nitrosalicylato)–Metal Complexes. *Polyhedron* **2008**, 27 (2), 537–546. https://doi.org/10.1016/j.poly.2007.10.006

[114] Adachi, Y.; Yoshida, J.; Kodera, Y.; Kato, A.; Yoshikawa, Y.; Kojima, Y.; Sakurai, H. A New Insulin-Mimetic Bis(Allixinato)Zinc(II) Complex: Structure-Activity Relationship of Zinc(II) Complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2004**, 9 (7), 885–893. https://doi.org/10.1007/s00775-004-0590-8

[115] Nakayama, A.; Hiromura, M.; Adachi, Y.; Sakurai, H. Molecular Mechanism of Antidiabetic Zinc–Allixin Complexes: Regulations of Glucose Utilization and Lipid Metabolism. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2008**, 13 (5), 675–684. https://doi.org/10.1007/s00775-008-0352-0

[116] Prasad, A. S.; Beck, F. W. J.; Snell, D. C.; Kucuk, O. Zinc in Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer* **2009**, 61 (6), 879–887. https://doi.org/10.1080/01635580903285122

[117] Mendiguchia, B. S.; Pucci, D.; Mastropietro, T. F.; Ghedini, M.; Crispini, A. Non-Classical Anticancer Agents: On the Way to Water Soluble Zinc(II) Heteroleptic Complexes. *Dalton Transactions* **2013**, 42 (19), 6768. https://doi.org/10.1039/c3dt50367d
[118] Qian, J.; Wang, L.; Gu, W.; Liu, X.; Tian, J.; Yan, S. Efficient Double-Strand Cleavage of DNA Mediated by Zn(II)-Based Artificial Nucleases. *Dalton Transactions* **2011**, 40 (20), 5617. https://doi.org/10.1039/c0dt01659d
[119] Porchia, M.; Pellei, M.; Del Bello, F.; Santini, C. Zinc Complexes with Nitrogen Donor Ligands as Anticancer Agents. *Molecules* **2020**, 25 (24), 5814. https://doi.org/10.3390/molecules25245814
[120] Kovala-Demertzi, D.; Yadav, P. N.; Wiecek, J.; Skoulika, S.; Varadinova, T.; Demertzis, M. A. Zinc(II) Complexes Derived from Pyridine-2-Carbaldehyde Thiosemicarbazone and (1E)-1-Pyridin-2-Ylethan-1-One Thiosemicarbazone. Synthesis, Crystal Structures and Antiproliferative Activity of Zinc(II) Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006**, 100 (9), 1558–1567. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.05.006
[121] Trávníček, Z.; Kryštof, V.; Šipl, M. Zinc(II) Complexes with Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Derived from 6-Benzylaminopurine: Synthesis, Characterization, X-Ray Structures and Biological Activity. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006**, 100 (2), 214–225. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.07.006
[122] Huang, K.-B.; Mo, H.-Y.; Chen, Z.-F.; Wei, J.-H.; Liu, Y.-C.; Liang, H. Isoquinoline Derivatives Zn(II)/Ni(II) Complexes: Crystal Structures, Cytotoxicity, and Their Action Mechanism. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 100, 68–76. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.05.038
[123] Winter, A.; Gottschaldt, M.; R. Newkome, G.; S. Schubert, U. Terpyridines and Their Complexes with First Row Transition Metal Ions:Cytotoxicity, Nuclease Activity and Self-Assembly of Biomacromolecules. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2012**, 12 (3), 158–175. https://doi.org/10.2174/156802612799078919
[124] Apohan, E.; Yilmaz, U.; Yilmaz, O.; Serindag, A.; Küçükbay, H.; Yesilada, O.; Baran, Y. Synthesis, Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Novel Cobalt and Zinc Complexes of Benzimidazole Derivatives. *Journal of Organometallic Chemistry* 2017, 828, 52–58. https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2016.11.020
[125] Soldatović, T. V. Design of Hetero-Dinuclear Metallic Complexes as Potential Metal-Based Drugs With a Zinc Metal Center in a Square-Pyramidal Structure. *Drugs and Drug Candidates* **2025**, 4 (1), 12. https://doi.org/10.3390/ddc4010012
[126] Roguin, L. P.; Chiarante, N.; García Vior, M. C.; Marino, J. Zinc(II) Phthalocyanines as Photosensitizers for Antitumor Photodynamic Therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2019**, 114, 105575. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.105575
[127] Marvel, C. S.; Dreger, E. E. Ethyl Aceropyruvate. *Organic Syntheses* **1926**, 6, 40. https://doi.org/10.15227/orgsyn.006.0040
[128] Uchil, V.; Seo, B.; Nair, V. A Novel Strategy to Assemble the β-Diketo Acid Pharmacophore of HIV Integrase Inhibitors on Purine Nucleobase Scaffolds. *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, 72 (22), 8577–8579. https://doi.org/10.1021/jo701336r
[129] Yoshida, Z.; Ogoshi, H.; Tokumitsu, T. Intramolecular Hydrogen Bond in Enol Form of 3-Substituted-2,4-Pentanedione. *Tetrahedron* **1970**, 26 (24), 5691–5697. https://doi.org/10.1016/0040-4020(70)80005-9
[130] Gibson, D.; Johnson, B. F. G.; Lewis, J. Metal β-Diketone Complexes. Part VI. Some β-Diketone Complexes of Copper(I), Silver(I), and Gold(I). *Journal of the Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical* **1970**, 0 (0), 367–369. https://doi.org/10.1039/j19700000367

[131] Gibson, D. Carbon-Bonded Beta-Diketone Complexes. *Coordination Chemistry Reviews* **1969**, 4 (2), 225–240. https://doi.org/10.1016/s0010-8545(00)80087-9
[132] Jackson, K. M.; DeLeon, M.; Verret, C. R.; Harris, W. B. Dibenzoylmethane Induces Cell Cycle Deregulation in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Letters* **2002**, 178 (2), 161–165. https://doi.org/10.1016/s0304-3835(01)00844-8
[133] Nelson, K. M.; Dahlin, J. L.; Bisson, J.; Graham, J.; Pauli, G. F.; Walters, M. A. The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60 (5), 1620–1637. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00975
[134] Puchalska, P.; Crawford, P. A. Metabolic and Signaling Roles of Ketone Bodies in Health and Disease. *Annual Review of Nutrition* **2021**, 41 (1), 49–77. https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-111120-111518
[135] Hasegawa, S.; Noda, K.; Maeda, A.; Matsuoka, M.; Yamasaki, M.; Fukui, T. Acetoacetyl-CoA Synthetase, a Ketone Body-Utilizing Enzyme, Is Controlled by SREBP-2 and Affects Serum Cholesterol Levels. Molecular Genetics and Metabolism 2012, 107 (3), 553–560. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.08.017
[136] Tundo, P.; Venturello, P.; Angeletti, E. Alkylation Reactions of Ethyl Malonate, Ethyl Acetoacetate, and Acetylacetone by Gas–Liquid Phase-Transfer Catalysis (G.L.–P.T.C.). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1987**, No. 0, 2159–2162. https://doi.org/10.1039/p19870002159
[137] Morita, H.; Nakamura, Y.; Kawaguchi, S. Some Metal Complexes Containing Ethyl Acetoacetate or Ethyl Malonate as a Neutral Ligand. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1972**, 45 (8), 2468–2472. https://doi.org/10.1246/bcsj.45.2468
[138] Joksimović, N.; Janković, N.; Davidović, G.; Bugarčić, Z. 2,4-Diketo Esters: Crucial Intermediates for Drug Discovery. *Bioorganic Chemistry* **2020**, 105, 104343. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104343
[139] Zalesov, V. V.; Kataev, S. S.; Pulina, N. A.; Kovylyaeva, N. V. 4-Aryl-2,4-Dioxobutanoic Acids and Their Derivatives in Reactions with Diazoalkanes. *Russian Journal of Organic Chemistry* **2002**, 38 (6), 840–844. https://doi.org/10.1023/a:1020343221719
[140] Oh, Y.; Jang, M.; Cho, H.; Yang, S.; Im, D.; Moon, H.; Hah, J.-M. Discovery of 3-Alkyl-5-Aryl-1-Pyrimidyl-1H-Pyrazole Derivatives as a Novel Selective Inhibitor Scaffold of JNK3. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2019**, 35 (1), 372–376. https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1705294
[141] Obydennov, D. L.; Khammatova, L. R.; Sosnovskikh, V. Ya. Synthesis of Ethyl 4-(Isoxazol-4-Yl)-2,4-Dioxobutanoates from Ethyl 5-Aroyl-4-Pyrone-2-Carboxylates and Hydroxylamine. *Mendeleev Communications* **2017**, 27 (2), 172–174. https://doi.org/10.1016/j.mencom.2017.03.022
[142] Radwan, A. A.; Ghorab, M. M.; Alsaid, M. S.; Alanazi, F. K. Novel Ethyl 1,5-Disubstituted-1H-Pyrazole-3-Carboxylates as a New Class of Antimicrobial Agents. *Acta Pharmaceutica* **2014**, 64 (3), 335–344. https://doi.org/10.2478/acph-2014-0028
[143] Prakash, O.; Aneja, K.; Hussain, K.; Sharma, C. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New 2-(3-(4-Aryl)-1-Phenyl-1H-Pyrazol-4-Yl) Chroman-4-Ones. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2011**, 73 (5), 586. https://doi.org/10.4103/0250-474x.99023
[144] Petronijević, J.; Bugarčić, Z.; Bogdanović, G. A.; Stefanović, S.; Janković, N. An Enolate Ion as a Synthon in Biocatalytic Synthesis of 3,4-Dihydro-2(1H)-Quinoxalinones and 3,4-Dihydro-1,4-Benzoxazin-2-Ones: Lemon Juice as an Alternative to Hazardous Solvents and Catalysts. *Green Chemistry* **2017**, 19 (3), 707–715. https://doi.org/10.1039/c6gc02893d

[145] Zhao, X. Z.; Semenova, E. A.; Liao, C.; Nicklaus, M.; Pommier, Y.; Burke, T. R., Jr. Biotinylated Biphenyl Ketone-Containing 2,4-Dioxobutanoic Acids Designed as HIV-1 Integrase Photoaffinity Ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14 (23), 7816–7825. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.07.064

[146] Nair, V.; Okello, M. O.; Mangu, N. K.; Seo, B. I.; Gund, M. G. A Novel Molecule with Notable Activity against Multi-Drug Resistant Tuberculosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, 25 (6), 1269–1273. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.01.050

[147] Mihajlović, K.; Joksimović, N.; Janković, N.; Milović, E.; Petronijević, J.; Filipović, I.; Muškinja, J.; Petrović, N.; Kosanić, M. Synthesis, Characterization, and Biological Activity of Some 2,4-Diketo Esters Containing Dehydrozingerone Fragment: DNA and Protein Binding Study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2023**, 93, 129413. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2023.129413

[148] Piskulić, K.; Stojanović, S.; Petronijević, J.; Filipović, I.; Janković, N.; Muškinja, J.; Bogdanović, G. A.; Matić, I. Z.; Stanojković, T.; Branković, S.; Joksimović, N. Synthesis, Characterization, and Anticancer Potential of Some 2,4-Diketo Esters Containing Dehydrozingerone Fragment: DNA and Protein Binding Study and Molecular Docking. *Journal of Molecular Structure* **2025**, 1343, 142819. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2025.142819

[149] Mihajlović, K.; Joksimović, N.; Radisavljević, S.; Petronijević, J.; Filipović, I.; Janković, N.; Milović, E.; Popović, S.; Matić, S.; Baskić, D. Examination of Antitumor Potential of Some Acylpyruvates, Interaction with DNA and Binding Properties with Transport Protein. *Journal of Molecular Structure* **2022**, 1270, 133943. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133943

[150] Sechi, M.; Bacchi, A.; Carcelli, M.; Compari, C.; Duce, E.; Fisicaro, E.; Rogolino, D.; Gates, P.; Derudas, M.; Al-Mawsawi, L. Q.; Neamati, N. From Ligand to Complexes: Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase by β-Diketo Acid Metal Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49 (14), 4248–4260. https://doi.org/10.1021/jm060193m

[151] Gromilov, S. A.; Baidina, I. A. Regularities of Crystal Structures of Cu(II) β-Diketonates. *Journal of Structural Chemistry* **2004**, 45 (6), 1031–1081. https://doi.org/10.1007/s10947-005-0096-4

[152] Joksimović, N.; Baskić, D.; Popović, S.; Zarić, M.; Kosanić, M.; Ranković, B.; Stanojković, T.; Novaković, S. B.; Davidović, G.; Bugarčić, Z.; Janković, N. Synthesis, Characterization, Biological Activity, DNA and BSA Binding Study: Novel Copper(II) Complexes with 2-Hydroxy-4-Aryl-4-Oxo-2-Butenoate. *Dalton Transactions* **2016**, 45 (38), 15067–15077. https://doi.org/10.1039/c6dt02257j

[153] Joksimović, N.; Petronijević, J.; Janković, N.; Kosanić, M.; Milivojević, D.; Vraneš, M.; Tot, A.; Bugarčić, Z. Synthesis, Characterization, Antioxidant Activity of β-Diketonates, and Effects of Coordination to Copper(II) Ion on Their Activity: DNA, BSA Interactions and Molecular Docking Study. *Medicinal Chemistry* **2021**, 17 (5), 519–532. https://doi.org/10.2174/1573406415666191024102520

[154] Joksimović, N.; Petronijević, J.; Radisavljević, S.; Petrović, B.; Mihajlović, K.; Janković, N.; Milović, E.; Milivojević, D.; Ilić, B.; Djurić, A. Synthesis, Characterization, Antitumor Potential, and Investigation of Mechanism of Action of Copper(II) Complexes with Acylpyruvates as Ligands: Interactions with Biomolecules and Kinetic Study. *RSC Advances* **2022**, 12 (47), 30501–30513. https://doi.org/10.1039/d2ra05797b

[155] Joksimović, N.; Janković, N.; Petronijević, J.; Baskić, D.; Popovic, S.; Todorović, D.; Zarić, M.; Klisurić, O.; Vraneš, M.; Tot, A.; Bugarčić, Z. Synthesis, Anticancer Evaluation and Synergistic Effects with CisPlatin of Novel Palladium Complexes: DNA, BSA Interactions and Molecular Docking Study. *Medicinal Chemistry* **2020**, 16 (1), 78–92. https://doi.org/10.2174/1573406415666190128095732

[156] Joksimović, N.; Petronijević, J.; Ćoćić, D.; Ristić, M.; Mihajlović, K.; Janković, N.; Milović, E.; Klisurić, O.; Petrović, N.; Kosanić, M. Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of Novel Cobalt(II) Complexes with β-Diketonates: Crystal Structure Determination, BSA Binding Properties and Molecular Docking Study. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2024**, 29 (5), 541–553. https://doi.org/10.1007/s00775-024-02069-7

[157] Filipović, I.; Stojanović, S.; Petronijević, J.; Milutinović, M.; Nikodijević, D.; Petrović, N.; Kosanić, M.; Joksimović, N. Spectroscopic and Physicochemical Analysis of Bioactive Cobalt(II) β-Diketo Ester Complexes: Insights into DNA and BSA Binding Mechanisms. *Analytica* **2025**, 7 (1), 3. https://doi.org/10.3390/analytica7010003

[158] Filipović, I.; Stojanović, S.; Petronijević, J.; Serafinović, M. Ć.; Milutinović, M.; Nikodijević, D.; Petrović, N.; Kosanić, M.; Milivojević, D.; Muškinja, J.; Joksimović, N. Synthesis, Characterization, and Biological Activity of New Copper(II) Complexes with DHZ –β-Diketo Ester Ligands: Biomolecular Interactions and Molecular Docking Analysis. *Polyhedron* **2026**, 118282. https://doi.org/10.1016/j.poly.2026.118282

[159] Filipović, I.; Joksimović, N.; Stojanović, S.; Petronijević, J.; Nikodijević, D.; Milutinović, M.; Petrović, N.; Kosanić, M. Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of Novel Zinc(II) Complexes with Biologically Relevant β-Diketo Ester Ligands: DNA and Protein Binding Studies and Molecular Docking Analysis. *Polyhedron* **2025**, 282, 117813. https://doi.org/10.1016/j.poly.2025.117813

[160] Dimiza, F.; Fountoulaki, S.; Papadopoulos, A. N.; Kontogiorgis, C. A.; Tangoulis, V.; Raptopoulou, C. P.; Psycharis, V.; Terzis, A.; Kessissoglou, D. P.; Psomas, G. Non-Steroidal Antiinflammatory Drug–Copper(II) Complexes: Structure and Biological Perspectives. *Dalton Transactions* **2011**, 40 (34), 8555. https://doi.org/10.1039/c1dt10714c

[161] Joksimović, N.; Petronijević, J.; Serafinović, M.; Janković, N.; Baskic, D. Anticancer potential of novel palladium(II) complexes with acyl pyruvates as ligands: DNA and BSA interactions and molecular docking study. *STED Journal* **2024**, 6 (1), 1–14. https://doi.org/10.7251/sted2401001j

[162] Proposed Standard M38-P; Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Wayne, PA, USA, 1998.

[163] Sarker, S. D.; Nahar, L.; Kumarasamy, Y. Microtitre Plate-Based Antibacterial Assay Incorporating Resazurin as an Indicator of Cell Growth, and Its Application in the in Vitro Antibacterial Screening of Phytochemicals. *Methods* **2007**, 42 (4), 321–324. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.006

[164] Milutinović, M.; Stanković, M.; Cvetković, D.; Maksimović, V.; Šmit, B.; Pavlović, R.; Marković, S. The Molecular Mechanisms of Apoptosis Induced by Allium Flavum L. and Synergistic Effects with New-Synthesized Pd(II) Complex on Colon Cancer Cells. *Journal of Food Biochemistry* **2015**, 39 (3), 238–250. https://doi.org/10.1111/jfbc.12123

[165] Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, 65 (1–2), 55–63. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4

[166] Baskic, D.; Popovic, S.; Ristic, P.; Arsenijevic, N. Analysis of Cycloheximide-Induced Apoptosis in Human Leukocytes: Fluorescence Microscopy Using Annexin V/Propidium Iodide versus Acridin Orange/Ethidium Bromide. *Cell Biology International* **2006**, 30 (11), 924–932. https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2006.06.016
[167] Radisavljević, S.; Ćoćić, D.; Petrović, B.; Kellner, I.; Ivanović-Burmazović, I.; Radenković, N.; Nikodijević, D.; Milutinović, M. New Dinuclear Gold(III) Complex with 1,5-Naphthyridine as Bridging Ligand: Synthesis, Characterization, DNA/BSA Binding Studies, and Anticancer Activity. *Gold Bulletin* **2024**, 57 (1–2), 9–25. https://doi.org/10.1007/s13404-024-00344-8
[168] Bitencourt-Ferreira, G.; de Azevedo, W. F., Jr. Molegro Virtual Docker for Docking. *Methods in Molecular Biology* **2019**, 149–167. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_10
[169] Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, 30 (16), 2785–2791.
https://doi.org/10.1002/jcc.21256
[170] Adeniyi, A.; Ajibade, P. An Insight into the Anticancer Activities of Ru(II)-Based Metallocompounds Using Docking Methods. *Molecules* **2013**, 18 (9), 10829–10856.
https://doi.org/10.3390/molecules180910829
[171] Ozalp, L.; Sağ Erdem, S.; Yüce-Dursun, B.; Mutlu, Ö.; Özbil, M. Computational Insight into the Phthalocyanine-DNA Binding via Docking and Molecular Dynamics Simulations. *Computational Biology and Chemistry* **2018**, 77, 87–96.
https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.09.009
[172] Berman, H. M. The Protein Data Bank. Nucleic Acids Research 2000, 28 (1), 235–242. https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235
[173] Drew, H. R.; Wing, R. M.; Takano, T.; Broka, C.; Tanaka, S.; Itakura, K.; Dickerson, R. E. Structure of a B-DNA Dodecamer: Conformation and Dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1981**, 78 (4), 2179–2183.
https://doi.org/10.1073/pnas.78.4.2179
[174] Canals, A.; Purciolas, M.; Aymamí, J.; Coll, M. The Anticancer Agent Ellipticine Unwinds DNA by Intercalative Binding in an Orientation Parallel to Base Pairs. *Acta Crystallographica Section D, Structural Biology* **2005**, 61 (7), 1009–1012.
https://doi.org/10.1107/s0907444905015404
[175] Sekula, B.; Zielinski, K.; Bujacz, A. Crystallographic Studies of the Complexes of Bovine and Equine Serum Albumin with 3,5-Diiodosalicylic Acid. *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, 60, 316–324. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.004
[176] Bujacz, A. Structures of Bovine, Equine and Leporine Serum Albumin. *Acta Crystallographica Section D, Structural Biology* **2012**, 68 (10), 1278–1289.
https://doi.org/10.1107/s0907444912027047
[177] Ghuman, J.; Zunszain, P. A.; Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Otagiri, M.; Curry, S. Structural Basis of the Drug-Binding Specificity of Human Serum Albumin. *Journal of Molecular Biology* **2005**, 353 (1), 38–52. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.075
[178] Stewart, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods VI: More Modifications to the NDDO Approximations and Re-Optimization of Parameters. *Journal of Molecular Modeling* 2012, 19 (1), 1–32. https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x
[179] Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, 98 (7), 5648–5652. https://doi.org/10.1063/1.464913
[180] Hay, P. J.; Wadt, W. R. Ab Initio Effective Core Potentials for Molecular Calculations. Potentials for K to Au Including the Outermost Core Orbitals. *The Journal of Chemical Physics* **1985**, 82 (1), 299–310. https://doi.org/10.1063/1.448975

[181] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Li, X.; Caricato, M.; Marenich, A. V.; Bloino, J.; Janesko, B. G.; Gomperts, R.; Mennucci, B.; Hratchian, H. P.; Ortiz, J. V.; Izmaylov, A. F.; Sonnenberg, J. L.; Williams-Young, D.; Ding, F.; Lipparini, F.; Egidi, F.; Goings, J.; Peng, B.; Petrone, A.; Henderson, T.; Ranasinghe, D.; Zakrzewski, V. G.; Gao, J.; Rega, N.; Zheng, G.; Liang, W.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Throssell, K.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M. J.; Heyd, J. J.; Brothers, E. N.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Keith, T. A.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A. P.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Millam, J. M.; Klene, M.; Adamo, C.; Cammi, R.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Fox, D. J. *Gaussian 09, Revision D.01* **2016**, Gaussian, Inc., Wallingford CT.

[182] Thomsen, R.; Christensen, M. H. MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49 (11), 3315–3321. https://doi.org/10.1021/jm051197e

[183] Medjedović, M.; Simović, A. R.; Ćoćić, D.; Milutinović, M.; Senft, L.; Blagojević, S.; Milivojević, N.; Petrović, B. Dinuclear Ruthenium(II) Polypyridyl Complexes: Mechanistic Study with Biomolecules, DNA/BSA Interactions and Cytotoxic Activity. *Polyhedron* **2020**, 178, 114334. https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.114334

[184] Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, **2008**, John Wiley & Sons, Inc. https://doi.org/10.1002/9780470405888

[185] Pellei, M.; Del Gobbo, J.; Caviglia, M.; Gandin, V.; Marzano, C.; Karade, D. V.; Noonikara Poyil, A.; Dias, H. V. R.; Santini, C. Synthesis and Investigations of the Antitumor Effects of First-Row Transition Metal(II) Complexes Supported by Two Fluorinated and Non-Fluorinated β-Diketonates. *IJMS* **2024**, 25 (4), 2038. https://doi.org/10.3390/ijms25042038

[186] Garribba, E.; Micera, G. The Determination of the Geometry of Cu(II) Complexes: An EPR Spectroscopy Experiment. *Journal of Chemical Education* **2006**, 83 (8), 1229. https://doi.org/10.1021/ed083p1229

[187] Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a Comprehensive Software Package for Spectral Simulation and Analysis in EPR. *Journal of Magnetic Resonance* **2006**, 178 (1), 42–55. https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013

[188] Peisach, J.; Blumberg, W. E. Structural Implications Derived from the Analysis of Electron Paramagnetic Resonance Spectra of Natural and Artificial Copper Proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1974**, 165 (2), 691–708. https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90298-7

[189] Manisha; Ahmedi, S.; Tiwari, B.; Manzoor, N.; Kumar, A.; Jain, P. 3d-Transition Metal Complexes of a Tridentate Ligand: Synthesis, Characterization, Physico-Chemical Studies, Antimicrobial Activity, In Silico Molecular Docking and ADME Studies. *Chemistry Africa* **2025**, 8 (5), 1851–1867. https://doi.org/10.1007/s42250-025-01310-3

[190] Alka; Gautam, S.; Kumari, P.; Khurana, S.; Jain, P.; Gupta, M. K. 2-((2-Mercaptobenzylidene)Amino)Pyridin-3-Ol Schiff Base Derived Mn(II), Co(II), Ni(II), and Cu(II) Metal Chelates: Synthesis, Antimicrobial, Antioxidant, Thermo-Kinetics, Molecular Docking, and In Silico ADMET Studies. *Chemistry Africa* **2025**, 8 (8), 3417–3435. https://doi.org/10.1007/s42250-025-01309-w

[191] Munteanu, C. R.; Suntharalingam, K. Advances in Cobalt Complexes as Anticancer Agents. *Dalton Transactions* **2015**, 44 (31), 13796–13808. https://doi.org/10.1039/c5dt02101d

[192] Thamilarasan, V.; Sengottuvelan, N.; Sudha, A.; Srinivasan, P.; Chakkaravarthi, G. Cobalt(III) Complexes as Potential Anticancer Agents: Physicochemical, Structural, Cytotoxic Activity and DNA/Protein Interactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2016**, 162, 558–569. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.06.024
[193] Marzano, C.; Pellei, M.; Tisato, F.; Santini, C. Copper Complexes as Anticancer Agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2009**, 9 (2), 185–211. https://doi.org/10.2174/18715209787313837
[194] Santini, C.; Pellei, M.; Gandin, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano, C. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. *Chemical Reviews* **2013**, 114 (1), 815–862. https://doi.org/10.1021/cr400135x
[195] Climova, A.; Pivovarova, E.; Szczesio, M.; Gobis, K.; Ziembicka, D.; Korga-Plewko, A.; Kubik, J.; Iwan, M.; Antos-Bielska, M.; Krzyżowska, M.; Czylkowska, A. Anticancer and Antimicrobial Activity of New Copper (II) Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2023**, 240, 112108. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.112108
[196] Mariani, D.; Ghasemishahrestani, Z.; Freitas, W.; Pezzuto, P.; Costa-da-Silva, A. C.; Tanuri, A.; Kanashiro, M. M.; Fernandes, C.; Horn, A., Jr.; Pereira, M. D. Antitumoral Synergism between a Copper(II) Complex and Cisplatin Improves in Vitro and in Vivo Anticancer Activity against Melanoma, Lung and Breast Cancer Cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2021**, 1865 (10), 129963. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129963
[197] Pellei, M.; Del Bello, F.; Porchia, M.; Santini, C. Zinc Coordination Complexes as Anticancer Agents. *Coordination Chemistry Reviews* **2021**, 445, 214088. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214088
[198] Villaman, D.; Vega, A.; Santa Maria de la Parra, L.; León, I. E.; Levín, P.; Toro, P. M. Anticancer Activity of Ni(II) and Zn(II) Complexes Based on New Unsymmetrical Salophen-Type Ligands: Synthesis, Characterization and Single-Crystal X-Ray Diffraction. *Dalton Transactions* **2023**, 52 (31), 10855–10868. https://doi.org/10.1039/d3dt00800b
[199] Hasić, R.; Serezlić, M. K.; Caković, A.; Bogojeski, J.; Nikodijević, D.; Milutinović, M.; Stanojević, A.; Čavić, M.; Egorov, A. V.; Komolkin, A. V.; Kornyakov, I. V.; Scheurer, A.; Puchta, R.; Soldatović, T. V. New Bis-Pyrazolate Zinc(II) Complexes as Potential Anticancer Drugs: From Structure to Anticancer Activity. *New Journal of Chemistry* **2025**, 49 (9), 3617–3632. https://doi.org/10.1039/d5nj00043b
[200] M. Abd El-Lateef, H.; M. Ali, A.; M. Khalaf, M.; Abdou, A. New Iron(III), Cobalt(II), Nickel(II), Copper(II), Zinc(II) Mixed-Ligand Complexes: Synthesis, Structural, DFT, Molecular Docking and Antimicrobial Analysis. *Bulletin of Chemical Society of Ethiopia* **2023**, 38 (1), 147–166. https://doi.org/10.4314/bcse.v38i1.12
[201] Weerapreeyakul, N.; Nonpunya, A.; Barusrux, S.; Thitimetharoch, T.; Sripanidkulchai, B. Evaluation of the Anticancer Potential of Six Herbs against a Hepatoma Cell Line. *Chinese Medicine* **2012**, 7 (1), 15. https://doi.org/10.1186/1749-8546-7-15
[202] Radenković, N.; Nikodijević, D.; Jovankić, J.; Blagojević, S.; Milutinović, M. Resistance to 5-Fluorouracil: The Molecular Mechanisms of Development in Colon Cancer Cells. *European Journal of Pharmacology* **2024**, 983, 176979. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176979
[203] Roszkowska, M. Multilevel Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *IJMS* **2024**, 25 (22), 12402. https://doi.org/10.3390/ijms252212402
[204] Quin, J. E.; Devlin, J. R.; Cameron, D.; Hannan, K. M.; Pearson, R. B.; Hannan, R. D. Targeting the Nucleolus for Cancer Intervention. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2014**, 1842 (6), 802–816. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.12.009

[205] Onoa, G. B.; Moreno, V. Palladium and Platinum Famotidine Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1998**, 72, 141–153. https://doi.org/10.1016/s0162-0134(98)10074-0
[206] Abd Karim, N. H.; Mendoza, O.; Shivalingam, A.; Thompson, A. J.; Ghosh, S.; Kuimova, M. K.; Vilar, R. Salphen Metal Complexes as Tunable G-Quadruplex Binders and Optical Probes. *RSC Advances* **2014**, 4 (7), 3355–3363. https://doi.org/10.1039/c3ra44793f
[207] Radisavljević, S.; Ćoćić, D.; Jovanović, S.; Šmit, B.; Petković, M.; Milivojević, N.; Planojević, N.; Marković, S.; Petrović, B. Synthesis, Characterization, DFT Study, DNA/BSA-Binding Affinity, and Cytotoxicity of Some Dinuclear and Trinuclear Gold(III) Complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2019**, 24 (7), 1057–1076. https://doi.org/10.1007/s00775-019-01716-8
[208] Ross, P. D.; Subramanian, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. *Biochemistry* **1981**, 20 (11), 3096–3102. https://doi.org/10.1021/bi00514a017
[209] Ambika, S.; Manojkumar, Y.; Senthilkumar, R.; Sathiyaraj, M.; Arunachalam, S. Nucleic Acid Binding and Invitro Cytotoxicity Studies of Polymer Grafted Intercalating Copper(II) Complex. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials* **2016**, 26 (3), 579–588. https://doi.org/10.1007/s10904-016-0356-0
[210] Thederahn, T.; Spassky, A.; Kuwabara, M. D.; Sigman, D. S. Chemical Nuclease Activity of 5-Phenyl-1,10-Phenanthroline-Copper Ion Detects Intermediates in Transcription Initiation by E. Coli RNA Polymerase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1990**, 168 (2), 756–762. https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)92386-e
[211] Radisavljević, S.; Scheurer, A.; Bockfeld, D.; Ćoćić, D.; Puchta, R.; Senft, L.; Pešić, M.; Damljanović, I.; Petrović, B. New Mononuclear Gold(III) Complexes: Synthesis, Characterization, Kinetic, Mechanistic, DNA/BSA/HSA Binding, DFT and Molecular Docking Studies. *Polyhedron* **2021**, 209, 115446. https://doi.org/10.1016/j.poly.2021.115446
[212] Tarushi, A.; Lafazanis, K.; Kljun, J.; Turel, I.; Pantazaki, A. A.; Psomas, G.; Kessissoglou, D. P. First- and Second-Generation Quinolone Antibacterial Drugs Interacting with Zinc(II): Structure and Biological Perspectives. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2013**, 121, 53–65. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.12.009
[213] Shahabadi, N.; Mahdavi, M. DNA Interaction Studies of a Cobalt(II) Mixed-Ligand Complex Containing Two Intercalating Ligands: 4,7-Dimethyl-1,10-Phenanthroline and Dipyrido[3,2-a:2′,3′-c]phenazine. *International Scholarly Research Notices Inorganic Chemistry* **2013**, 2013, 1–7. https://doi.org/10.1155/2013/604218
[214] Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence* **2012**. https://doi.org/10.1002/9783527650002
[215] Manojkumar, Y.; Ambika, S.; Arulkumar, R.; Gowdhami, B.; Balaji, P.; Vignesh, G.; Arunachalam, S.; Venuvanalingam, P.; Thirumurugan, R.; Akbarsha, M. A. Synthesis, DNA and BSA Binding, in Vitro Anti-Proliferative and in Vivo Anti-Angiogenic Properties of Some Cobalt(III) Schiff Base Complexes. *New Journal of Chemistry* **2019**, 43 (28), 11391–11407. https://doi.org/10.1039/c9nj01269a
[216] Esteghamat-Panah, R.; Hadadzadeh, H.; Farrokhpour, H.; Simpson, J.; Abdolmaleki, A.; Abyar, F. Synthesis, Structure, DNA/Protein Binding, and Cytotoxic Activity of a Rhodium(III) Complex with 2,6-Bis(2-Benzimidazolyl)Pyridine. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 127, 958–971. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.11.005

[217] Ćoćić, D.; Jovanović-Stević, S.; Jelić, R.; Matić, S.; Popović, S.; Djurdjević, P.; Baskić, D.; Petrović, B. 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 Transactions* **2020**, 49 (41), 14411–14431. https://doi.org/10.1039/d0dt02906h

6. ПРИЛОЗИ

ПРИЛОГ 1 - Списак скраћеница и симбола

Уобичајене скраћенице

eng.	Енглеским језиком
п.н.е.	Пре нове ере
н.е.	Нове ере
ч	Час
v/v	Запремински однос

Једињења и лиганди

DNA	Деоксирибонуклеинска киселина (*eng. Deoxyribonucleic acid*)
RNA	Рибонуклеинска киселина (*eng. Ribonucleic acid*)
ZNG1	Гуанозинтрифосфатаза регулисана цинком, металопротеински активатор 1 (*eng. Zinc-regulated GTPase metalloprotein activator 1*)
atsc/Hatsc	2-ацетилпиридин тиосемикарбазон – депротонован облик/протонован облик
EB	Етидијум-бромид
AO	Акридин-оранж
HOE	4-[6-[6-(4-methylpiperazin-1-yl)-benzimidazol-2-yl]-benzimidazol-2-yl]phenol, Бисбензимидазол, Hoechst 33258
EY	Еозин Y
CT-DNA	DNA телећег тимуса (*eng. Calf-thymus DNA*)
BSA	Говеђи серум албумин (*eng. Bovine serum albumin*)
PBS	Фосфатни пуфер (*eng. Phosphate buffer solution*)
5′-GMP	Гуанозин-5’-монофосфат
TMS	Тетраметилсилан
DMSO	Диметилсулфоксид
DMSO-d_6	Деутерисани диметилсулфоксид
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид
HSA	Хумани серум албумин (*eng. Human serum albumin*)

Ознаке и симболи

k_{obsd}	Константа брзине реакције псеудо-првог реда
K_b	Константа везивања
ε_A	Привидан екстинциони коефицијент комплекса у одређеној концентрацији DNA
ε_b / ε_f	Екстинциони коефицијент везаног комплекса / слободног комплекса
ΔH	Промена енталпије
R	Универзална гасна константа
T	Температура у степенима Келвинове скале (K)
ΔS	Промена ентропије
ΔG	Промена Гибсове слободне енергије
[Q]	Концентрација гасиоца флуоресценције (*eng. Quencher concentration*)
I_0	Интензитет емисије у одсуству гасиоца флуоресценције
I	Интензитет емисије у присуству одређене коцентрације комплекса
η_0	Вискозитет раствора CT-DNA
η	Вискозитет раствора CT-DNA са одређеном концентрацијом комплекса
k_q	Константа гашења флуоресценције
τ_0	Трајање флуоресценције у одсуству гасиоца флуоресценције
K_{SV}	Штерн-Волмерова константа
n	Број везивних места

g_e g-фактор слободног електрона
g_i Анизотропне вредности g-фактора (i = x, y, z)
E_0 Енергија основног стања
E_n Енергија n-тог ексцитованог стања
k (у контексту EPR спектроскопије) Степен мешања орбитала
λ (у контексту EPR спектроскопије) Константа спин-орбиталног купловања
$g_{\parallel}$ Аксијално паралелни g-фактор
$g_{\perp}$ Аксијално нормални g-фактор
$A_{\parallel}$ Константа паралелног хиперфиног купловања
$A_{\perp}$ Константа нормалног хиперфиног купловања
δ NMR померања
k (у контексту кинетичких мерења) константа брзине реакције
[Nu] Концентрација нуколеофила

Остало

IUPAC Међународна унија за чисту и примењену хемију (e*ng. International Union of Pure and Applied Chemistry*)
HIV Хумани вирус имунодефицијенције (*eng. Human immunodeficiency virus*)
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium
UV–Vis Ултраљубичасти и видљиви опсег електромагнетног зрачења
IR Инфрацрвени опсег електромагнетног зрачења
NMR Нуклеарна магнетна резонанца
EPR Електронска парамагнетна резонанца
TLC Танкослојна хроматографија
ATCC Америчка колекција типских култура (*eng. American Type Culture Collection*)
MIC Минимална инхибиторна концентрација (*eng. Minimum inhibitory concentration*)
MH Müller–Hinton
SD Sabouraud dextrose
SW480 Ћелијска линија, ћелије тумора дебелог црева
HaCaT Ћелијска линија, анеуплоидни кератиноцити
SI Индекс селективности (*eng. Selectivity index*)
IC_{50} Концентрација супстанце потребна за 50%-тну инхибицију
VC Здраве ћелије (*eng. Vital cells*)
EA Рано апоптотичне (*eng. Early apoptotic*)
LA Касно апоптотичне (*eng. Late apoptotic*)
NC Некротичне ћелије (*eng. Necrotic cells*)
MVD Програм Molegro Virtual Docker
AD4/ADT Програми AutoDock4 / AutoDockTools
HSAB Луисова теорија о тврдим и меким киселинама и базама (*eng. Hard and soft acids and bases*)

ПРИЛОГ 2 - Списак слика

Слика 1. Електронске конфигурације јона кобалта у различитим лигандним пољима.....4
Слика 2. Неки од лиганада за грађење комплекса кобалта а) 1,10-бис(*N*-салицилалдиминил)-4,7-дитиадекан и 1,8-бис(*N*-салицилалдиминил)-4,6-дитиаоктан; б) 1,10-фенантролин и деривати; в) 2,2'-бипиридин и деривати.....5
Слика 3. Структурне формуле комплекса кобалта: а) Представници СТС комплекса кобалта(III); б) Фотоактивабилни комплекс кобалта(III); в) Комплекс кобалта(II) са алдимином аспарагинске киселине; г) Комплекси кобалта(II) са диарил саленима.....6
Слика 4. Неке од геометрија комплекса бакра(II): а) Три бидентатна лиганда се не могу везати за бакар(II) јон због појаве Јан-Телеровог ефекта (издуживање аксијалне везе); б) У правцу казаљке на сату од структуре горе-лево: Октаедарски тетраамминдиаква бакар(II), квадратно-пирамидални бис(диметилглиоксимато)бакар(II), воденични точак бакар(II)-ацетата, и квадратно-планарни бис(ацетилацетонато)бакар(II).....8
Слика 5. Биолошки активни комплекси бакра(II): а) динуклеарни комплекси са аспирином, диизопропилсалицилатом и ибупрофеном; б) вештачка протеаза, комплекс са 2,6-бис(бензимидазо-2-ил)пиридином; в) амебоцидни комплекс са 5-нитрофуран-2-карбоксалдехид тиосемикарбазоном; г) трипаноцидни комплекс са 4-нитроацетофенон тиосемикарбазоном; д) антибактеријски комплекси са антибиотицима еноксацином и ципрофлоксацином као лигандима.....10
Слика 6. Комплекси бакра(II) и бакра(I) са антитуморским дејством: а) Општа структурна формула комплекса бакра(II) из групе касиопеина; б) (бис(1,2,4-триазол-1-ил)ацетато)ди(трихидроксиметилфосфинато)бакар(I).....11
Слика 7. Биолошки активни комплекси цинка(II): а) цинк пиритион; б) [Zn(atsc)OAc] комплекс који показује селективну антимикробну активност; в) $[Zn(Hatsc)_2]^{2+}$ комплекс који не показује селективну антимикробну активност; г) антиепилептик, тетрааквабис(3-нитро-4-хидроксибензоато)цинк(II); д) бис(аликсинато)цинк(II), комплекс који делује као инсулин.....14
Слика 8. Комплекси цинка(II) који показују антитуморску активност: а) са једним пиридин-супституисаним тиосемикарбазонским лигандом; б) са два пиридин-супституисана тиосемикарбазонска лиганда; в) Шематски приказ веза из кристалне структуре комплекса са оломуцином.....15
Слика 9. Кето-енолна таутомерија.....16
Слика 10. Приказ енолне форме 2,4-дикето естра стабилизованог помоћу водоничне везе (лево) и конјугованим двоструким везама (десно).....16
Слика 11. Синтезе 2,4-дикето естара: а) Клајзенова кондензација кетона са естром оксалне киселине; б) Реакција етил естра 5-ароил-4-пирон-2-карбоксилне киселине са хидроксиламином.....17
Слика 12. Биолошки активни 2,4-дикетоестри и одговарајући комплекси метала: а) Дикетоестар заснован на дехидрозингеронском фрагменту (плаво) са модификацијама; б) Динуклеарни комплекс магнезијума(II); в) Квадратно-пирамидални комплекси бакра(II); г) Квадратно-планарни комплекса паладијума(II); д) Октаедарски комплекси кобалта(II); ђ) Тетраедарски комплекси цинка(II).....18
Слика 13. Структурне формуле 2,4-дикетоестара који су коришћени као лиганди за синтезу комплекса кобалта(II), бакра(II) и цинка(II).....30
Слика 14. Шематски приказ синтеза комплекса кобалта(II), бакра(II) и цинка(II) са различитим 2,4-дикето естрима као лигандима. Шематски приказ структура лиганада **L1-L9** је на Слици 13.....31

Слика 15. UV-Vis спектри комплекса кобалта(II) са 2,4-дикетоестрима као лигандима. Приказана је вредност апсорбанце (*eng. Absorbance*) у односу на таласну дужину у нанометрима (*eng. Wavelength [nm]*).....32
Слика 16. IR спектри комплекса кобалта(II) са 2,4-дикетоестрима као лигандима. Приказан је проценат трансмитанце (%T) у односу на таласни број (cm^{-1}).....33
Слика 17. UV-Vis спектри комплекса бакра(II) са 2,4-дикетоестрима. У сваком квадранту је приказано по 10 преклопљених спектара од којих је сваки снимљен у размаку од 3 минута. Приказана је вредност апсорбанце у односу на таласну дужину [nm].....34
Слика 18. EPR спектри комплекса бакра(II) са 2,4-дикетоестрима као лигандима. Приказан је однос интензитета апсорпционог сигнала (*I*) у произвољним јединицама са јачином магнетног поља (*B* [mT]).....36
Слика 19. Структура комплекса **ZnL2** и протонска померања у ^{1}H NMR спектру.....37
Слика 20. ^{1}H NMR спектар комплекса **ZnL2** на 200MHz у раствору DMSO-*d6* на 20°C.. 38
Слика 21. ^{1}H NMR спектар комплекса **ZnL3** на 200MHz у раствору DMSO-*d6* на 20°C.. 38
Слика 22. ^{1}H NMR спектар комплекса **ZnL4** на 200MHz у раствору DMSO-*d6* на 20°C.. 39
Слика 23. ^{1}H NMR спектар комплекса **ZnL9** на 200MHz у раствору DMSO-*d6* на 20°C.. 39
Слика 24. Микрографи флуоресцентног микроскопа. Морфологија SW-480 ћелија третираних са **CoL3**. Здраве ћелије (*eng. Normal cells*), ћелије у раној апоптози (*eng. Early apoptosis*), ћелије у касној апоптози (*eng. Late apoptosis*), апоптотична тела (*eng. Apoptotic bodies*), кондензација хроматина (*eng. Chromatine condensation*) и стварање везикула (*eng. Membrane blebbing*).....43
Слика 25. Микрографи флуоресцентног микроскопа. Морфологија нетретираних SW-480 ћелија и ћелија третираних комплексом **CuL6**. На слици су означене здраве ћелије (*eng. Viable cells* - VC), и ћелије у раној апоптози (*eng. Early apoptosis* - EA).....44
Слика 26. Микрографи флуоресцентног микроскопа. Морфологија нетретираних SW-480 ћелија и ћелија третираних комплексима **ZnL2** и **ZnL4**. На слици су означене здраве ћелије (VC), ћелије у раној апоптози (EA) и ћелије у касној апоптози (*eng. Late apoptosis* - LA).....44
Слика 27. Константе брзине псеудо-првог реда на температури од 310 K за супституционе реакције комплекса **CuL6** са нуклеофилима L-Met и 5'-GMP, у односу на различите концентрације нуклеофила.....45
Слика 28. Лево: Серија апсорпционих UV-Vis спектара комплекса **CoL3**, **CuL6**, **ZnL2** и **ZnL4** у PBS пуферу на 310 K, по додавању растућих концентрација CT-DNA (у опсегу од 1,35 - 12,6 · 10^{-5} M). Стрелице показују промену апсорбанце по додатку CT-DNA; Десно: График односа [DNA]/(ε_A - ε_f) према [DNA] за одговарајућу серију спектара и линеарна екстраполација на основу које се рачуна K_b.....47
Слика 29. Лево: Серије емисионих спектара раствора EB-CT-DNA, сниманих по додатку различитих концентрација испитиваних комплекса. Спектри по додатку **CoL3** и **CuL6** су снимани у раствору [DNA] = [EB] = 5 · 10^{-6} mol l^{-1}, при чему [**CoL3**] = [**CuL6**] = 5-50 · 10^{-6} mol l^{-1}. Спектри по додатку **ZnL2** и **ZnL4** су снимани у раствору [DNA] = [EB] = 1,35 · 10^{-5} mol l^{-1}, при чему [**ZnL2**] = [**ZnL4**] = 1,33-11,9 · 10^{-4} mol l^{-1}. Стрелице показују промену интензитета емисије са порастом концентрације комплекса; Десно: График зависности односа интензитета (I_0/I) и концентрације комплекса за одговарајућу серију спектара.. 49
Слика 30. Лево: Серије емисионих спектара раствора HOE-CT-DNA, сниманих по додатку различитих концентрација испитиваних комплекса. Спектри по додатку **CoL3**, **CuL6** су снимани у раствору [DNA] = [HOE] = 5 · 10^{-6} mol l^{-1}, при чему [**CoL3**] = [**CuL6**] = 5-50 · 10^{-6} mol l^{-1}. Спектри по додатку **ZnL2**, **ZnL4** су снимани у раствору [DNA] = [HOE] = 1,35 · 10^{-5} mol l^{-1}, при чему [**ZnL2**] = [**ZnL4**] = 1,33-11,9 · 10^{-4} mol l^{-1}. Стрелице показују

промену интензитета емисије са порастом концентрације комплекса; Десно: График зависности односа интензитета (I_0/I) и концентрације комплекса за одговарајућу серију спектара.....50
Слика 31. Лево: Серије емисионих спектара раствора BSA, сниманих по додатку различитих концентрација испитиваних комплекса. Спектри су снимани при [BSA] = $2 \cdot 10^{-6}$ mol/l, при чему [Q] = 4,98 – $47{,}6 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Стрелице показују промену интензитета емисије са порастом концентрације комплекса; Средина: График зависности односа интензитета емисије од концентрације одговарајућег комплекса; Десно: График зависности $\log[(I_0/I)/I]$ од log[Q].....53
Слика 32. Лево: Серије емисионих спектара раствора BSA-EY, сниманих по додатку различитих концентрација испитиваних комплекса. Спектри су снимани при [BSA] = [EY] = $2 \cdot 10^{-6}$ mol/l, при чему је [Q] = 4,98 – $47{,}6 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Стрелице показују промену интензитета емисије са порастом концентрације комплекса; Средина: График зависности односа интензитета емисије од концентрације одговарајућег комплекса; Десно: График зависности $\log[(I_0/I)/I]$ од log[Q].....54
Слика 33. Лево: Серије емисионих спектара раствора BSA-ибупрофен, сниманих по додатку различитих концентрација испитиваних комплекса. Спектри су снимани при [BSA] = [ибупрофен] = $2 \cdot 10^{-6}$ mol/l, при чему је [Q] = 4,98 – $47{,}6 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Стрелице показују промену интензитета емисије са порастом концентрације комплекса; Средина: График зависности односа интензитета емисије од концентрације одговарајућег комплекса; Десно: График зависности $\log[(I_0/I)/I]$ од log[Q].....55
Слика 34. Структуре испитиваних комплекса коришћене за симулације молекулског доковања, оптимизоване B3LYP/LANL2DZ методом.....57
Слика 35. Најбоље оцењене структуре добијене доковањем испитиваних комплекса на DNA коришћењем програма MVD: а) **CoL3** у малом жлебу; б) **CuL6** у малом жлебу; в) интеркалација **CoL3**; г) интеркалација **CuL6.**.....60
Слика 36. Интеракције са аминокиселинским остацима најбоље оцењених структура испитиваних комплекса, добијених доковањем на албумин, коришћењем програма MVD. Горе: **CoL3** у месту 2 на BSA; Доле: **CuL6** у месту 2 на HSA.....61
Слика 37. Најбоље оцењене структуре добијене доковањем испитиваних комплекса на DNA коришћењем програма AD4: а) **ZnL2** у малом жлебу; б) **ZnL4** у малом жлебу; в) интеркалација **ZnL2**; г) интеркалација **ZnL4**.....62
Слика 38. Интеракције са аминокиселинским остацима најбоље оцењених структура испитиваних комплекса, добијених доковањем на албумин, коришћењем програма AD4. Горе: **ZnL2** у месту 2 на BSA; Доле: **ZnL4** у месту 2 на BSA.....63

ПРИЛОГ 3 - Списак табела

Табела 1. Подаци добијени на основу EPR спектара синтетисаних комплекса бакра(II). Дате су вредности *g*-фактора и константе паралелелног хиперфиног купловања за сваки комплекс.....35
Табела 2. MIC вредности испитиваних једињења према различитим бактеријским културама.....41
Табела 3. MIC вредности испитиваних једињења према различитим гљивичним културама.....41
Табела 4. Инхибиторне активности испитиваних комплекса изражене као IC_{50} вредности према SW-480 и HeCaT ћелијским линијама, и израчунат индекс селективности.....42
Табела 5. Константе брзине другог реда на температури од 310 K за супституционе реакције комплекса CuL6 са нуклеофилима L-Met и 5'-GMP.....45
Табела 6. Израчунати параметри на основу резултата UV-Vis титрација са CT-DNA.....46
Табела 7. Израчунате Штерн-Волмерове константе на основу мерења компететивног везивања тестираних једињења за DNA у односу на EB и HOE.....51
Табела 8. Параметри везивања испитиваних комплекса метала за BSA у одсуству маркера, у присуству еозина Y, и у присуству ибупрофена.....52
Табела 9. Одабране дужине веза у структурама испитиваних комплекса после оптимизације B3LYP/LANL2DZ методом.....58
Табела 10. Одабране вредности углова веза у структурама испитиваних комплекса после оптимизације B3LYP/LANL2DZ методом.....58
Табела 11. Одабране вредности диедарских углова у структурама испитиваних комплекса после оптимизације B3LYP/LANL2DZ методом.....59
Табела 12. Резултати молекулског доковања који су добијени на основу рачунских експеримената изведених у програму Molegro. Резултати су бездимензионалне величине израчунате функцијама за оцену.....60
Табела 13. Резултати молекулског доковања у облику предвиђених енергија везивања који су добијени на основу рачунских експеримената изведених у програму AutoDock4. 62

ПРИЛОГ 4 – Насловне странице радова у оквиру докторске дисертације

analytica

MDPI

Article

Spectroscopic and Physicochemical Analysis of Bioactive Cobalt(II) β-Diketo Ester Complexes: Insights into DNA and BSA Binding Mechanisms

Ignjat Filipović [1], Snežana Stojanović [1], Jelena Petronijević [1], Milena Milutinović [2], Danijela Nikodijević [2], Nevena Petrović [2], Marijana Kosanić [2] and Nenad Joksimović [1,*]

[1] Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia; ignjat.filipovic@pmf.kg.ac.rs (I.F.); snezana.radisavljevic@pmf.kg.ac.rs (S.S.); jelena.petronijevic@pmf.kg.ac.rs (J.P.)

[2] Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia; milena.milutinovic@pmf.kg.ac.rs (M.M.); danijela.nikodijevic@pmf.kg.ac.rs (D.N.); nevena.n.petrovic@pmf.kg.ac.rs (N.P.); marijana.kosanic@pmf.kg.ac.rs (M.K.)

* Correspondence: nenad.joksimovic@pmf.kg.ac.rs

Abstract

The urgent need for effective therapies against cancer and antimicrobial-resistant pathogens motivates the development of novel metal-based complexes. Herein, we report the synthesis and characterization of four novel cobalt(II) complexes with biologically relevant β-diketo ester ligands. The complexes were characterized via UV-Vis, FTIR, mass spectrometry, and elemental analysis. Their biological activities were evaluated through antimicrobial and cytotoxic assays. Complex **B1** exhibited the strongest antimicrobial activity, with minimum inhibitory concentrations (MICs) of 0.23 mg/mL against *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis*, and 0.01 mg/mL against *Mucor mucedo*, exceeding the performance of ketoconazole. Cytotoxicity studies on SW480 colorectal cancer cells and HaCaT normal keratinocytes identified **B3** as the most potent anticancer agent (IC_{50} = 11.49 μM), selectively targeting tumor cells. Morphological analysis indicated apoptosis as the primary mode of cell death. Mechanistic studies were performed to elucidate interactions with biomolecules. UV-Vis and fluorescence spectroscopy, viscosity measurements, and molecular docking revealed that **B3** binds strongly to calf thymus DNA via hydrophobic interactions and groove binding, and exhibits selective binding to bovine serum albumin (site II, subdomain IIIA). These results highlight the potential of cobalt(II) complexes as multifunctional agents with significant antimicrobial and antitumor activities and provide detailed insight into their molecular interactions with DNA and serum proteins.

Keywords: cobalt(II) complexes; β-diketo ester; antimicrobial activity; anticancer activity; DNA and protein binding study; molecular docking

Check for updates

Academic Editors: Marcello Locatelli and Halil Ibrahim Ulusoy

Received: 7 November 2025
Revised: 12 December 2025
Accepted: 24 December 2025
Published: 29 December 2025

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license.

1. Introduction

A variety of analytical and spectroscopic methods have been applied to investigate the interactions of transition metal complexes with biological macromolecules [1]. A combination of analytical and spectroscopic techniques, including UV–Vis absorption and fluorescence quenching studies, provides valuable insight into electronic transitions, complex formation, and the binding mechanisms of metal complexes with biomacromolecules such as DNA and proteins [2]. Viscosity and thermal denaturation studies clarify DNA

Polyhedron 282 (2025) 117813

Contents lists available at ScienceDirect

Polyhedron

journal homepage: www.elsevier.com/locate/poly

Synthesis, characterization, and biological evaluation of novel zinc(II) complexes with biologically relevant β-diketo ester ligands: DNA and protein binding studies and molecular docking analysis

Ignjat Filipović [a], Nenad Joksimović [a,*], Snežana Stojanović [a], Jelena Petronijević [a], Danijela Nikodijević [b], Milena Milutinović [b], Nevena Petrović [b], Marijana Kosanić [b]

[a] University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
[b] University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:
Zinc(II) complexes
B-Diketo ester
Antimicrobial activity
Anticancer activity
DNA interactions
Protein binding study
Molecular docking

ABSTRACT

Zinc(II) complexes have recently attracted attention for their potential roles in cancer therapy and antimicrobial applications due to their biocompatibility and versatile coordination chemistry. In this study, we synthesized and characterized a series of novel zinc(II) complexes with biologically relevant β-diketo ester ligands. Their biological efficacy was evaluated through antimicrobial and antitumor assays. Antimicrobial activity was tested against five bacterial and five fungal strains, with complex **B2** showing the strongest effect. Antitumor activity was assessed using the SW480 cancer cell line and the HaCaT normal cell line, where complexes **B1** and **B2** displayed potent cytotoxicity with IC_{50} values of 11.5 μM and 15.81 μM, respectively. Both compounds exhibited a selectivity index (SI) above 8, suggesting preferential toxicity towards cancer cells. Mechanistic studies confirmed that **B1** and **B2** primarily induce apoptosis in SW480 cells. DNA binding experiments revealed groove binding as the predominant interaction mode, with binding constants (K_b) of $1.96 \times 10^3\ M^{-1}$ and $4.31 \times 10^3\ M^{-1}$ for compounds **B1** and **B2**, respectively. Bovine serum albumin (BSA) binding analyses indicated the formation of highly stable complexes, with binding constants (K) of $3.24 \times 10^8\ M^{-1}$ and $5.20 \times 10^5\ M^{-1}$ for compounds **B1** and **B2**, respectively. Molecular docking further supported the binding interactions of **B1** and **B2**. These findings highlight the promise of zinc(II) β-diketo ester complexes as potential candidates for anticancer and antimicrobial applications.

1. Introduction

Cancer remains one of the leading causes of premature death worldwide and a major burden on global macroeconomics [1]. Researchers continue to focus on developing treatments that are more effective against various cancer types compared to existing therapies while also minimizing side effects to improve patients' well-being. Transition metal complexes have been extensively studied for their antitumor and antimicrobial properties, and many are currently in use or undergoing clinical trials [2–4]. Platinum-based compounds remain among the most extensively researched medicinal metal complexes. However, these compounds are associated with several serious, often unavoidable, issues, such as nephrotoxicity and neurotoxicity [5–9]. In contrast, complexes involving endogenous elements, which may be less toxic, also show promising therapeutic potential.

Zinc, an essential element in the human body and the second most abundant trace element after iron, is endogenous [10] which makes it biocompatible and its compounds less toxic when compared with similar compounds of platinum group elements. Unlike platinum and some other transition metals, zinc(II) is redox-inactive, which minimizes the generation of harmful reactive oxygen species. Its recognized biocompatibility, relatively low toxicity, and versatile coordination chemistry make zinc(II) complexes attractive candidates for drug development [11,12]. Zinc complexes, including the zinc-pyrithione complex described in 1930, have been used to inhibit bacterial and fungal cell division and are effective in treating dandruff [13]. Zinc is co-secreted with insulin when blood glucose levels are elevated, as it is a component of stored, crystallized insulin [14]. This observation has led researchers to investigate various zinc complexes as potential anti-diabetic agents [15]. Additionally, many zinc complexes exhibit antimicrobial

* Corresponding author.
E-mail address: nenad.joksimovic@pmf.kg.ac.rs (N. Joksimović).

https://doi.org/10.1016/j.poly.2025.117813
Received 20 May 2025; Accepted 30 September 2025
Available online 4 October 2025
0277-5387/© 2025 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Polyhedron xxx (xxxx) 118282

Contents lists available at ScienceDirect

Polyhedron

journal homepage: www.elsevier.com/locate/poly

Synthesis, characterization, and biological activity of new copper(II) complexes with DHZ–β-diketo ester ligands: biomolecular interactions and molecular docking analysis

Ignjat Filipović[a], Snežana Stojanović[a], Jelena Petronijević[a], Marina Ćendić Serafinović[a,*], Milena Milutinović[b], Danijela Nikodijević[b], Nevena Petrović[b], Marijana Kosanić[b], Dušan Milivojević[c], Jovana Muškinja[d], Nenad Joksimović[a,*]

[a] University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
[b] University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
[c] University of Belgrade, Vinča Institute of Nuclear Science, P.O. Box 522, 11001 Belgrade, Serbia
[d] University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Sciences, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:
Copper(II) complexes
DHZ-β-diketo ester
Antimicrobial activity
Anticancer activity
DNA and protein binding study
Molecular docking

ABSTRACT

A series of new copper(II) complexes (**5A–D**) with DHZ-β-diketo ester ligands were synthesized *via* a multi-step procedure. The structures of the copper(II) complexes were confirmed by elemental analysis, UV–Vis, IR, EPR, and mass spectrometry. Spectroscopic and EPR data ($g_{\parallel} > g_{\perp} > g_e$) revealed a square-pyramidal geometry with a $dx^2–y^2$ ground state around the Cu(II) center. The antimicrobial screening indicated that compounds **5A–C** possess significant activity, with **5A** showing strong antifungal potency against *Microsporum canis* (MIC = 0.01 mg/mL) and **5C** exhibiting the most effective antibacterial activity against *Bacillus subtilis* (MIC = 0.11 mg/mL). Cytotoxicity studies on SW-480 colon adenocarcinoma cells demonstrated that complex **5B** had the highest cytotoxic and selective activity (IC_{50} = 4.85 μM), inducing apoptosis as the primary mode of cell death. Kinetic studies using stopped-flow techniques showed that substitution reactions follow the order L-Met >5'-GMP, consistent with HSAB theory and the soft character of Cu(II). UV–Vis, fluorescence, and viscosity studies revealed that complex **5B** binds to CT-DNA predominantly through a spontaneous and moderately intercalative mode, governed by hydrophobic interactions. Binding to bovine serum albumin (BSA) was confirmed by fluorescence quenching studies, indicating a strong interaction ($K = 7.68 \times 10^5\ M^{-1}$) at a single binding site located in subdomain IIIA (site II). The combined spectroscopic, kinetic, and biological data demonstrate that these copper(II) β-diketo ester complexes represent promising candidates for further investigation as potential metallodrugs with dual antimicrobial and anticancer activity.

1. Introduction

Coordination complexes of transition metals with biologically significant ligands represent a dynamic and rapidly evolving area of research in modern chemistry and bioengineering, offering considerable potential for the development of novel therapeutic agents [1]. Among these, copper is of particular importance due to its natural presence in trace amounts in the human body, where it plays key roles in enzymatic function, electron transport, collagen synthesis, and protection against oxidative stress [2]. Copper(II) ions can form stable complexes with a wide variety of donor atoms, allowing for structural diversity and tunability in the design of compounds with specific physicochemical and biological properties [3,4].

β-Diketoesters are a chemically flexible group of compounds that have gained attention in both medicinal and bioinorganic chemistry due to their capacity to bind metal ions and participate in biologically relevant processes [5]. The β-dicarbonyl motif serves as an effective metal-chelating site, which makes these molecules useful building blocks for the synthesis of metal-based drugs, diagnostic probes, and enzyme-modulating agents [6]. Incorporation of a dehydrozingerone (DHZ) fragment, a naturally occurring phenolic derivative known for its biological activity, can further enhance the functional diversity of these compounds [7,8].

* Corresponding authors.
E-mail addresses: marina.cendic@pmf.kg.ac.rs (M.Ć. Serafinović), nenad.joksimovic@pmf.kg.ac.rs (N. Joksimović).

https://doi.org/10.1016/j.poly.2026.118282
Received 12 February 2026; Accepted 29 June 2026
0277-5387/© 20XX

7. БИОГРАФИЈА

Филиповић Игњат је рођен у Београду 31. октобра 1989. године. Основно образовање је стекао у школи „ОШ Светозар Марковић“ у Крагујевцу. Наставио је школовање у Првој техничкој школи – Крагујевац, где је наставу похађао на смеру „Хемијски лаборант“. Природно-математички факултет је уписао 2008. године, где је стекао звање „Дипломирани хемичар за истраживање и развој“. Мастер студије је започео 2013. године на истом факултету, а титулу мастер хемичара је стекао 2014. године. Дипломски и мастер рад израдио је под менторством академика проф. др Милоша И. Ђурана.

Докторске студије на Природно-математичком факултету је започео 2018. године на смеру за неорганску хемију под менторством проф. др Зорана Матовића. Предмет студијског истраживачког рада су компјутерске симулације комплекса метала у биолошким условима. Од 2019. године запослен је на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја под називом „Преклиничка испитивања биоактивних супстанци“, а од 2020. године до данас запослен је по уговору истог министарства. Од 2025. године ментор му је доц. др Марина Ћендић Серафиновић.

Будуће екологе је уводио у свет хемије изводећи вежбе из предмета „Одабрана поглавља хемије за екологе“. Будуће хемичаре је обучавао за рад у лабораторији на вежбама из предмета „Општа хемија“, док је искуснијим студентима показивао примену рачунарских техника у хемији на предмету „Симулације конформационом динамиком“.

Бави се научно-истраживачким радом из области координационе, бионеорганске и медицинске хемије. Предмет истраживања на којима је ангажован је синтеза комплекса метала, карактеризација синтетисаних комплекса, као и проучавање интеракција ових једињења са важним биомолекулима – у пракси и кроз рачунарске симулације. До сада има 14 објављених научних радова.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса кобалта(II), бакра(II) и цинка(II) са 2,4-дикетоестрима

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*, *3. jul 2026.* године,

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

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

Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса кобалта(II), бакра(II) и цинка(II) са 2,4-дикетоестрима

истоветне.

У *Крагујевцу*, *3. jul 2026.* године,

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Филиповић Иња, _____,

☑ дозвољавам

☐ не дозвољавам

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

Синтеза, карактеризација и биолошка активност комплекса кобалта(II), бакра(II) и цинка(II) са 2,4-дикетоестрима

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 дозвољавам[1]

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 прерада[2]

У Крагујевцу, 3. jul 2026. године,

потпис аутора

[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.

[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/