

UNIVERZITET U KRAGUJEVCU PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Anđela A. Franich

STRUKTURNA, TEORIJSKA I ANTITUMORSKA ISPITIVANJA DINUKLEARNIH KOMPLEKSA PLATINE(II) I PALADIJUMA(II) SA AROMATIČNIM *N*-HETEROCIKLIČNIM MOSTNIM LIGANDIMA

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2025



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF SCIENCE

Anđela A. Franich

STRUCTURAL, THEORETICAL AND ANTITUMOR INVESTIGATION OF DINUCLEAR PLATINUM(II) AND PALLADIUM(II) COMPLEXES WITH AROMATIC N-HETEROCYCLIC BRIDGING LIGANDS

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2025

Identifikaciona strana doktorske disertacije

Autor	
Ime i prezime: Anđela A. Franich	
Datum i mesto rođenja: 10. maj 1991. godine, Kragujevac	
Sadašnje zaposlenje: Asistent	
Doktorska disertacija	
Naslov: Strukturna, teorijska i antitumorska ispitivanja dinuklearnih kompleksa	
platine(II) i paladijuma(II) sa aromatičnim <i>N</i> -heterocikličnim mostnim ligandima	
Broj stranica: 133	
Broj slika: 61	
Broj bibliografskih podataka: 262	
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet	
u Kragujevcu	
Naučna oblast (UDK): Hemija – Neorganska hemija (546)	
Mentor: dr Snežana Rajković, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet,	
Univerzitet u Kragujevcu	
dr Goran Janjić, naučni savetnik, Institut za hemiju, tehnologiju i	
metalurgiju, Univerzitet u Beogradu	
Broi i datum, odluke Veća univerziteta o prihvatanju teme doktorske disertacije:	

Broj i datum odluke Veća univerziteta o prihvatanju teme doktorske disertacije: IV-01-56/7 ; 04.02.2022. godine

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je rađena u Institutu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Kragujevcu pod mentorstvom dr Snežane Rajković, redovnog profesora i dr Gorana Janjića, naučnog savetnika. Temu doktorske disertacije, interesantne i inovativne eksperimentalne metode predložila je profesor Snežana Rajković kojoj se ovim putem zahvaljujem što me je primila u svoju istraživačku grupu, na ukazanom poverenju, predanosti i pomoćima bez kojih se ova disertacija ne bi uspešno realizovala. Neizmernu zahvalnost dugujem dr Goranu Janjiću koji mi je nesebično pomogao u realizaciji naučnih radova, a samim tim i ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se članovima komisije koji su svojim sugestijama i savetima doprineli boljem kvalitetu doktorske disertacije.

Takođe se zahvaljujem svojim kolegama i prijateljima sa Instituta za hemiju za podršku i pomoć koju su mi pružili u toku izrade disertacije.

Ljubav prema hemiji, kao i veliko znanje u moj život je unela nastavnica Ljiljana Milošević kojoj bi se ovim putem zahvalila što je uticala na moj životni put.

Imala sam čast i privilegiju da upoznam veoma drage ljude, sada moje prijatelje, koji su uticali na to da sledim svoj put. Hvala vam na razumevanju, podršci i za sve one dragocene trenutke koje pamtimo.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, ocu, majci i sestri. Njihova ljubav, podrška, kao i pomoć u svakom smislu, glavni su izvor moje snage i motivacije za dosadašnje uspehe.

Posebno želim da istaknem zahvalnost svom mužu Nenadu na pruženoj ljubavi i strpljenju svih ovih godina. Hvala i njegovoj porodici koja je doprinela da on bude odličan muž i otac.

Najveći uticaj na mene svakako ima moj sin Aleksa koji mi je pružio priliku da upoznam najčistiju ljubav.

Anđela

Apstrakt

U okviru ove doktorske disertacije prikazana je sinteza dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa, $[{M(en)Cl}_2(\mu-L)]^{2+}$, M je Pt(II) ili Pd(II), en je bidentatno koordinovan etilendiamin, a L je mostni ligand 4,4'-bipiridin (Pt1 i Pd1), 1,2-bis(4-piridil)etan (Pt2 i Pd2), 1,2-bis(4-piridil)etilen (Pt3 i Pd3), hinoksalin (Pd4), hinazolin (Pd5) i ftalazin (Pd6). Na osnovu rezultata elementalne mikroanalize, NMR (¹H i ¹³C) i IR spektroskopije kao i UV-Vis spektrofotometrije potvrđena je struktura sintetisanih dinuklearnih kompleksa. Struktura Pt1-Pt3 kompleksa je potvrđena i na osnovu rezultata masene spektroskopije. kompleksa CT-DNK ispitivane Interakcije Pt1-Pt3 sa su primenom **UV-Vis** spektrofotometrije, fluorescentne i IR spektroskopije, merenjem viskoziteta, gel elektroforezom i molekulskim dokingom. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da planarni 1,2-bis(4-piridil)etilen mostni ligand uslovljava interkalaciju Pt3 kompleksa u CT-DNK, dok se Pt1 i Pt2 kompleksi vezuju za fosfatne grupe DNK heliksa. Hidrolizom Pt1-Pt3 kompleksa nastaju Pt1W-Pt3W akva kompleksi koji se vezuju za DNK premošćavanjem malog žljeba. Rezultati UV-Vis spektrofotometrije, fluorescentne spektroskopije i merenje viskoziteta pokazuju da paladijum(II) kompleksi interkaliraju u CT-DNK gde mostni ligandi imaju važan uticaj na jačinu ostvarene veze. Pt1-Pt3 kompleksi prevazilaze rezistentnost ispitivanih ćelija kao i anti-angeogeni terapeutski potencijal sunitiniba, dok Pt3 kompleks pokazuje najveći citotoksični potencijal u odnosu na ispitivane ćelijske linije. In vitro ispitivanja citotoksičnog potencijala Pd1-Pd6 kompleksa pokazuju da ovi kompleksi izazivaju apoptozu ispitivanih ćelija sa smanjenom ekspresijom Ki-67, a na nekim ćelijama pokazuju bolju aktivnost od cisplatine.

KLJUČNE REČI

- Dinuklearni kompleksi platine(II) i paladijuma(II)
- Dezoksiribonukleinska kiselinom
- Bovin serum albumin
- Molekulski doking
- Citotoksična aktivnost
- Anti-angiogena aktivnost

Abstract

In this doctoral dissertation is presented the synthesis of dinuclear platinum(II) and palladium(II) complexes, $[{M(en)Cl}_2(\mu-L)]^{2+}$, where M is Pt(II) or Pd(II), en is bidentate coordinated ethylenediamine, while L is bridging ligand 4,4'-bipyridine (Pt1 and Pd1), 1,2-bis(4-pyridyl)ethane (Pt2 and Pd2), 1,2-bis(4-pyridyl)ethylene (Pt3 and Pd3), quinoxaline (Pd4), quinazoline (Pd5) and phthalazine (Pd6). The structure of synthesized dinuclear complexes was confirmed by elemental microanalysis, NMR (¹H and ¹³C) and IR spectroscopy, as well as UV-Vis spectrophotometry. The structure of the Pt1-Pt3 complexes was also confirmed based on the results of mass spectroscopy. The interactions of the Pt1-Pt3 complexes with CT-DNA were investigated by UV-Vis spectrophotometry, fluorescence and IR spectroscopy, viscosity measurement, gel electrophoresis and molecular docking. Based on the obtained results of the mentioned methods, it can be concluded that the planar 1,2-bis(4-pyridyl)ethylene bridging ligand conditions the intercalation of the Pt3 complex in CT-DNA, while the Pt1 and Pt2 complexes bind to the phosphate groups of the DNA helix. Hydrolysis of the Pt1-Pt3 complex produced Pt1W-Pt3W aqua complexes that bind to DNA by the minor groove covering. The results of UV-Vis spectrophotometry, fluorescence spectroscopy and viscosity measurement showed that palladium(II) complexes intercalate in CT-DNA while bridging ligands have an important influence on the strength of the bond. Pt1-Pt3 complexes overcome the resistance of the tested cells as well as the anti-angiogenic therapeutic potential of sunitinib, while the Pt3 complex showed the highest cytotoxic potential against tested cell lines. In vitro investigation of cytotoxicity of the Pd1-Pd6 complexes showed that these complexes induce apoptosis of the examined cells with reduced expression of Ki-67. and on some tested cells complexes showed better activity than cisplatin.

KEY WORDS

- Dinuclear platinum(II) and palladium(II) complexes
- Deoxyribonucleic acid
- Bovine serum albumin
- Molecular docking
- Cytotoxic activity
- Anti-angiogenic activity

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Kompleksi platine(II)	2
1.1.1. Mononuklearni kompleksi platine(II)	2
1.1.2. Polinuklearni kompleksi platine(II)	5
1.1.3. Mehanizam delovanja cisplatine	7
1.2. Kompleksi paladijuma(II)	9
1.2.1. Mononuklearni kompleksi paladijuma(II)	9
1.2.2. Polinuklearni paladijum(II) kompleksi	11
1.3. Interakcije kompleksa sa DNK	13
1.3.1. Kovalentne interakcije	15
1.3.2. Nekovalentne interakcije	16
1.4. Interakcije kompleksa sa albuminima	24
2. PREDMET ISTRAŽIVANJA	
3. EKSPERIMENTALNI DEO	
3.1. Hemikalije i reagensi	
3.2. Eksperimentalne metode	
3.3. Sinteza dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa	
3.3.1. Sinteza dinuklearnih platina(II) kompleksa	
3.3.2. Sinteza dinuklearnih paladijum(II) kompleksa	30
3.3.3. Stabilnost dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa	
3.4. Interakcije dinuklearnih kompleksa platine(II) i paladijuma(II) sa DNK	
3.4.1. UV–Vis spektrofotometrijska merenja	
3.4.2. Fluorescentna merenja	
3.4.3. Merenje viskoziteta	
3.4.4. FT–IR i far-IR merenja	
3.4.5. Gel elektroforeza	
3.4.6. Molekulski doking	
3.5. Interakcije dinuklearnih kompleksa paladijuma(II) sa BSA	
3.6. In vitro i in vivo ispitivanja citotoksičnog potencijala Pt1-Pt3 kompleksa	
3.6.1. In vitro ispitivanja	35
3.6.2. In vivo ispitivanja	
3.7. In vitro ispitivanja citotoksičnog potencijala Pd1-Pd6 kompleksa	
4. DISKUSIJA REZULTATA	39

4.1. Sinteza dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa
4.2. Karakterizacija dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa
4.2.1. Spektroskopska karakterizacija platina(II) kompleksa
4.2.2. Spektroskopska karakterizacija paladijum(II) kompleksa
4.2.3. Stabilnost dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa
4.3. Interakcije dinuklearnih kompleksa platine(II) sa DNK , <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> ispitivanja citotoksičnog potencijala kompleksa
4.3.1. Interakcije dinuklearnih kompleksa platine(II) sa DNK
4.3.2. In vitro i in vivo ispitivanja citotoksičnog potencijala Pt1-Pt3 kompleksa
4.4. Interakcije dinuklearnih kompleksa paladijuma(II) sa biomolekulima i ispitivanje njihovog <i>in vitro</i> citotoksičnog potencijala71
4.4.1. Interakcije Pd1–Pd6 kompleksa sa CT–DNK72
4.4.2. Interakcije dinuklearnih kompleksa paladijuma(II) sa BSA
4.4.3. In vitro ispitivanja citotoksičnog potencijala Pd1–Pd6 kompleksa 80
ZAKLJUČAK
LITERATURA
PRILOG
LISTA SKRAĆENICA
BIOGRAFIJA

1. UVOD

Neorganska hemija predstavlja suštinski deo života na Zemlji. U ranim oblicima života pretpostavlja se da je izvor energije bilo neorgansko jedinjenje, gvožđe(II)-sulfid [1]. Elementi koji su neophodni za biohemiju sisara su H, C, N, O, F, Na, Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Mo, Sn i I. Međutim, pored metoda i tehnika koje se koriste u savremenoj nauci, biohemija nekih elemenata kao što su F, Si, V, Ni, i Sn nije u potpunosti razjašnjena. Hrom i bor su se pokazali kao bitni elementi za funkcionisanje organizma sisara, ali trenutni dokazi nisu kompletni. Važno je napomenuti da esencijalnost elemenata se ne odnosi samo na sam element, već i na jedinjenja tog elementa. Na primer, kobalt pripada grupi esencijalnih elemenata, ali samo kada je u obliku vitamina B₁₂. Takođe, toksičnost jona metala zavisi od liganada koji su za njega vezani kao i sredine u kojoj se nalazi.

Nedostatak nekih jona metala može dovesti do pojave bolesti kao što su anemija, koja nastaje usled nedostatka gvožđa, usporavanje rasta usled nedovoljnog unosa cinka ili srčana oboljenja novorođenčadi zbog nedostatka bakra. Sa druge strane, veća koncentracija jona metala u organizmu može biti toksična. Mogućnost prepoznavanja, razumevanja i lečenja bolesti uzrokovanih neadekvatnom funkcijom jona metala u organizmu predstavlja važan aspekt medicinske bioneorganske hemije. Joni metala imaju važnu ulogu kao farmaceutski proizvodi. Platina i zlato kao teški metali nemaju poznatu biološku funkciju, ali njihova jedinjenja, kao što su cisplatina i auranofin, imaju veoma važnu ulogu u farmaciji za lečenje tumora, odnosno reumatoidnog artritisa. Pored toga, radioaktivni jon metala ⁹⁹Tc i kompleksi Gd(III) koriste se kao sredstva za radiodijagnostiku [2]. Jedinjenja volframa se koriste za lečenje pacijenata obolelih od HIV-a [3], dok se jedinjenja cinka upotrebljavaju za lečenje herpesa [4]. Dijetetski suplementi na bazi kalcijuma, mangana i selena se koriste za održavanje biološke ravnoteže organizma, a za lečenje dijabetesa se koriste jedinjenja vanadijuma [1]. Za lečenje gastrointestinalnih poremećaja koriste se jedinjenja na bazi bizmuta.

Humanoj populaciji bolest pod nazivom tumor poznata je već vekovima, ali još uvek nije tačno definisan uzrok koji dovodi do promene u biološkim procesima pri nastanku ovog oboljenja. Sve ćelije u organizmu imaju tačno definisanu funkciju i njihova deoba (proliferacija) je kontrolisana, dok ćelije tumora karakteriše abnormalan rast, odnosno njihov ćelijski ciklus je poremećen. Tumorske ćelije se mogu nekontrolisano razvijati, ignorišući signale za usporavanje rasta. U stanju su da koriste strane krvotoke za sopstveno širenje i opstanak, i tako poseduju najopasniju osobinu, s obzirom da se šire u drugim tkivima i stvaraju metastaze. Hemioterapija, hirurgija i radioterapija su glavni načini lečenja tumora. Termin hemioterapija se odnosi na upotrebu hemijskih jedinjenja za zaustavljanje proliferacije ćelija tumora. Jedan od glavnih hemioterapeutika koji sadrži platina(II) jon je cisplatina. Cisplatina (*cis*-diammindihloridoplatina(II)), odobren za kliničku upotrebu 1978. godine, jedan je od najčešće korišćenih kompleksa u antikancerogenoj terapiji [5].

Bez obzira na trenutna dostignuća platinske grupe lekova, postoje glavni nedostaci u terapiji koji još uvek nisu otklonjeni. Ovi lekovi su efikasni samo za ograničen spektar tumora.

Neki tumori su postali rezistentni na lekove i često uzrokuju ozbiljne neželjene efekte kao što je mučnina, supresija koštane srži i nepravilan rad bubrega. Toksičnost kompleksa metala je delimično posledica kovalentnog vezivanja jona metala za DNK. Interakcije kompleksa metala sa nukleinskom kiselinom su dale osnovu i uspešnu primenu cisplatine i njenih derivata kao hemioterapeutskih agenasa. Dizajn novih kompleksa platine(II) zahteva detaljno razumevanje načina interakcije ovih kompleksa sa nukleinskom kiselinom. Poznavanje transporta kompleksa metala u organizmu je važno za razumevanje metabolizma neorganskih i organskih agenasa kao i za razumevanje prirode bolesti izazvanih pogrešnim transportom metala.

Najvažniji cilj većine istraživanja sa ovom tematikom je pronalazak pogodnog antitumorskog agensa koji se može efikasno koristiti za lečenje, a to bi bio onaj lek koji se dobro rastvara u vodi, ima dobru sposobnost transporta kroz membrane, stabilnost u ćeliji, vezivanje za dezoksiribonukleinsku kiselinu i na kraju izbacivanje iz organizma sa minimalnim neželjenim efektima. Koordinaciona hemija se bavi dizajniranjem novih terapeutskih i dijagnostičkih agenasa. Rastvorljivost, reaktivnost, sterni efekti i geometrija kompleksa mogu se kontrolisati menjanjem i modifikovanjem liganada oko centralnog jona metala. Kako ligand tako i jon metala određuju biološku aktivnost kompleksa pa i promena jona metala može dovesti do velikih razlika u biološkoj aktivnosti.

1.1. Kompleksi platine(II)

1.1.1. Mononuklearni kompleksi platine(II)

Rutenijum, rodijum, paladijum, osmijum, iridijum i platina su elementi koji imaju slične fizičke i hemijske osobine i spadaju u takozvanu platinsku grupu metala. Veliki broj kompleksnih jedinjenja elemenata iz ove grupe metala je pokazao antibakterijsko i antitumorsko dejstvo. Kompleksno jedinjenje *cis*-diammindihloridoplatina(II) (cisplatina) poznato je još od 1844. godine kao "Pejronov hlorid" (Peyrone) (Slika 1) [6]. Strukturne razlike između cis- i trans- izomera diammindihloridoplatina(II) kompleksa rešio je Alfred Verner (Alfred Werner) 1890. godine [7]. Antitumorska aktivnost cisplatine otkrivena je 1969. godine, kada je Barnet Rosenberg (Barnett Rosenberg) sa saradnicima pokušao da ispita uticaj električnog polja na rast bakterije Escherichia coli [8]. Rosenberg sa saradnicima je zaključio da je deoba ćelija bila zaustavljena i to proizvodom elektrolize, odnosno cisplatinom koja je nastala u toku eksperimenta, a ne direktnim delovanjem električnog polja. Klinička ispitivanja cisplatine počela su 1971. godine, a 1978. godine jedinjenje je zvanično ušlo u kliničku upotrebu i to za lečenje tumora testisa i jajnika [9]. Danas se cisplatina koristi za lečenje različitih vrsta tumorskih oboljenja. Ovaj hemioterapeutik danas se uglavnom upotrebljava za lečenje tumora testisa [10], jajnika [11], bešike [12], glave i vrata [13], pluća [14] i grlića materice [15]. Cisplatina, uprkos svojim prednostima, ima i negativne efekte, koji se ogledaju kardiotoksičnosti, nefrotoksičnosti, ototoksičnosti, hematološkoj toksičnosti. u hepatotoksičnosti, gastrointestinalnoj toksičnosti i neurotoksičnosti. Pored toga, ćelije tumora vremenom razvijaju rezistentnost, pa se uočava pad efikasnosti leka kao i manje preživljavanje pacijenata, iako postoji dobar početni odgovor na lečenje [16]. Klinički cisplatina se koristi samostalno kao lek ili u kombinaciji sa drugim jedinjenjima kao što je bleomicin, vinblastin, 5-fluorouracil ili ciklofosfamid [17]. Cisplatina se primenjuje intravenozno injekcijom rastvora leka u krvotok jer oralno unošenje nije moguće zbog hidrolize kompleksa u kiseloj sredini želuca [5]. Transplatina ne pokazuje antitumorsku aktivnost, što se pripisuje brzoj hidrolizi i interakciji sa sumporom iz proteina [18].

U cilju pronalaska kompleksa koji će imati manje toksičnih efekata u procesu hemioterapije ispitivani su derivati cisplatine. Pretpostavljeno je da bi promene u labilnosti odlazeće grupe mogle da promene toksičnost što je dovelo do sinteze karboplatine (*cis*-diammin(1,1-ciklobutandikarboksilato)platina(II)) [19,20]. U poređenju sa cisplatinom koja sadrži hlorido ligande, karboplatina kao negativni jon sadrži ciklobutandikarboksilato ligand (CBDCA), što utiče na stabilnost kompleksa (Slika 1). Supstitucijom hlorido liganada sa CBDCA dobijeni kompleks je pokazao manju toksičnost u odnosu na cisplatinu. Ispitivanja su pokazala da karboplatina izaziva znatno manju mučninu i neurotoksičnost u odnosu na cisplatinu. Ovo je posledica manje konstante hidrolize (10^{-8} s⁻¹) karboplatine u odnosu na cisplatinu (10^{-5} s⁻¹) [21]. Zbog niže reaktivnosti karboplatina se može primeniti u većim dozama. Način delovanja karboplatine analogan je načinu delovanja cisplatine (kovalentno vezivanje za DNK), zbog čega su i proizvodi koje formira cisplatina i karboplatina sa DNK identični [22]. Nažalost, primećena je rezistencija istih tumorskih ćelija na karboplatinu kao i na cisplatinu.



Slika 1. Strukturne formule kompleksa platine(II) koji se koriste u medicini za lečenje tumora.

Promenom stabilnog liganda (amminski ligand) u cisplatini dovodi i do promena u formiranju veza sa DNK. Oksaliplatina (*trans*-R,R-cikloheksan-(1,2-diamin) oksalatoplatina(II)), ie platina(II) kompleks koji sadrži bidentatno koordinovani 1,2-diammincikloheksan kao stabilan ligand i anjon oksalne kiseline kao odlazeću grupu (Slika 1). Oksaliplatina kao lek prvi put je primenjena u Francuskoj 1996. godine [23]. Istraživanja su pokazala da je oksaliplatina u kombinaciji sa 5-fluorouracilom i leukovorinom efikasna kao lek za lečenje tumora kolorektalnog trakta, bolesti u kojoj cisplatina i karboplatina nisu pokazali značajne rezultate [24–26]. Bio je to prvi lek kojim je prevaziđena rezistencija ćelija tumora. Oksaliplatina je ipak pokazala negativnu stranu koja se ogleda u neurotoksičnosti što ograničava dozu leka [27]. Proizvodi vezivanja oksaliplatine za DNK su slični, ali ne i jednaki proizvodima koje formiraju cisplatina i karboplatina. Oksaliplatina se uglavnom vezuje GpG unutarlančano za GpG fragment DNK, ali glavna prednost oksaliplatine je da hidrofobni

dach (diaminocikloheksan) ligand pokriva veliki žljeb (*major groove covering*) DNK heliksa i sprečava vezivanje proteina za regeneraciju DNK lanca [31–33].

Nedaplatina je strukturno slična karboplatini, pa se podrazumeva da formira iste proizvode vezivanjem za DNK kao cisplatina i karboplatina. Za razliku od cisplatine, nedaplatina sadrži glikolato ligand koji je bidentatno koordinovan za platina(II) jon (Slika 1). Japanska kompanija *Shionogi Pharmaceutical Company* je 1983. godine, dizajnirala nedaplatinu sa ciljem smanjenja toksičnosti cisplatine [31,32]. Primena nedaplatine u medicini počela je 1995. godine u Japanu. Nedaplatina se koristi za lečenje tumora glave i vrata, jednjaka i pluća [33]. Glikolato helatni ligand povećava rastvorljivost nedaplatine u vodi, pa se nedaplatina primenjuje intravenozno u većoj dozi u odnosu na cisplatinu. Ispitivanja su pokazala da se nedaplatina vezuje za guanin, ali je reakcija oko 20 puta sporija u odnosu na reakciju guanina i cisplatine [27]. Nedaplatina ima kratko poluvreme eliminacije i farmakokinetički profil sličan karboplatini [34].

Lekovi druge generacije, heptaplatina i lobaplatina su dobile regionalno odobrenje za korišćene u terapijama (Slika 1). Heptaplatina se pojavila na tržištu 1999. godine i koristi se za lečenje tumora kolorektalnog trakta u Republici Koreji. Ispitivanja u III fazi su pokazala da kombinacija heptaplatine sa 5-fluorouracilom ima isti efekat kao kombinacija cisplatine i 5-fluorouracila sa manjim hematološkim neželjenim efektima [33,35]. Ipak heptaplatina kao lek pokazuje neželjene efekte kao što su mijelosupresija, trombocitnopenija, mukozitis i alopecija [36]. Lobaplatina je odobrena kao lek u Kini za terapiju metastaze tumora dojke, hronične mijelogenske leukemije i karcinoma pluća [34]. Lečenje lobaplatinom nije povezano sa oboljevanjem pacijanata od tipičnih neželjenih efekata koji se primećuju kod cisplatine. Toksičnost lobaplatine koja ograničava dozu leka ogleda se u trombocitopeniji [33]. Lobaplatina se pokazala kao efikasan lek na ćelijama koje pokazuju rezistenciju na cisplatinu [38].

Povećana rezistencija ćelija tumora na lekove koji sadrže platinu(II) povezana je sa citosolnom deaktivacijom lekova usled vezivanja jona platine(II) za atome sumpora iz peptida i proteina. Smanjenje reaktivnosti leka, a samim tim i smanjenje rezistencije i toksičnosti, dovelo je do sinteze nove generacije lekova koji sadrže platinu(II) uvođenjem volumioznog liganda u koordinacionu sferu jona metala. Najbolje rezultate, odnosno citotoksičnost, pokazala je pikoplatina, kompleks platine(II) koji sadrži volumiozni ligand (Slika 2). Pikoplatina je manje podložna deaktivaciji intracelularnim tiolima u odnosu na cisplatinu [39]. Pretpostavka je bila da bi se pikoplatina kao lek mogla davati oralno. Pikoplatina je pokazala bolji citotoksični efekat u II i III fazi ispitivanja u odnosu na cisplatinu [40,41], ali III izborom ćelija u trećoj fazi ispitivanja zaključeno je da pikoplatina kao lek nema kliničku perspektivu [35,42].



Slika 2. Strukturna formula pikoplatine.

Svi klinički korišćeni lekovi su neutralni kvadratno-planarni kompleksi platine(II), koji sadrže dva odlazeća liganda u *cis*-položaju, jer je dokazano da ovaj raspored liganada

omogućava citotoksični efekat (klasični kompleksi platine) [43-45]. Međutim, u cilju pronalaženja kompleksa platine(II) koji bi imao bolju antitumorsku aktivnost sintetisani su i ispitani neklasični kompleksi platine(II) koji se strukturno ne mogu povezati sa cisplatinom [46].

1.1.2. Polinuklearni kompleksi platine(II)

Antitumorsko dejstvo cisplatine uslovljeno je vezivanjem kompleksa za DNK, pri čemu se DNK savija ka glavnom žljebu što organizam prepoznaje kao oštećenje strukture biomolekula. Zbog toga su istraživanja usmerena ka sintezi polinukleranih platina(II) kompleksa, koji sa DNK uspostavljaju više interakcija i tako utiču na znatno manje savijanje biomolekula [35]. Shodno tome, sintetisani su dinuklearni kompleksi platine(II) koji su pokazali bolju antitumorsku aktivnost u odnosu na mononuklearne platina(II) komplekse kao i u odnosu na cisplatinu. Dinuklearni platina(II) kompleks sa azolom kao mostnim ligandom (AMPZ, Slika 3) formira unutarlančane veze sa azotom guanina i tako ispoljava antitumorsko dejstvo [47].



Slika 3. Strukturne formule dinuklearnih AMPZ, AMTA i 5-H-Y kompleksa.

Platina(II) kompleks sa triazolom kao mostnim ligandom (AMTA, Slika 3) za DNK se vezuje elektrostatičkim interakcijama pri čemu dolazi do delimičnog odmotavanja heliksa i malih konformacionih promena [48]. Ova dva dinuklearna platina(II) kompleksa pokazuju veću citotoksičnu aktivnost u poređenju sa cisplatinom na ispitivanim tumorskim ćelijskim linijama. Platina(II) kompleks koji sadrži tetrazol kao mostni ligand (5-H-Y, Slika 3) se pokazao kao dobar antitumorski agens prema tumoru pankreasa [49].

Drugu klasu polinuklearnih platina(II) kompleksa čine *trans*-platina(II) kompleksi koji sadrže alifatične amine kao mostne ligande. Pozitivno naelektrisanje polinuklearnih kompleksa utiče na jače interakcije sa DNK. Sa ciljem da se prevaziđe rezistentnost tumorskih ćelija na korišćene antitumorske agense sintetisani su BBR3464, BBR3610 i BBR3611 kompleksi (Slika 4). Kompleks platine(II) označen kao BBR3464 je ušao u klinička ispitivanja na osnovu *in vitro* i *in vivo* rezultata ispitivanja citotoksičnosti. Kompleks je pokazao bolju antitumorsku aktivnost i manju rezistentnost tumorskih ćelija u odnosu na cisplatinu [50]. Jaka interakcija pozitivno naelektrisanog BBR3464 kompleksa (+4) i ćelijske membrane je ukazala na alternativni put ulaska kompleksa u ćeliju [51]. Rezultati su pokazali da je procenat BBR3464 kompleksa koji se veže za DNK veći u odnosu na cisplatinu [50]. Trinuklearni platina(II) kompleks formira delokalizovane unutarlančane i međulančane veze sa guaninom preko šest parova baza, dok cisplatina može maksimalno da reaguje sa tri bazna para [52].

Vezivanjem BBR3464 kompleksa za DNK povećava se fleksibilnost DNK. Unutar- i međulančane unakrsne veze nisu prepoznatljive za HMG (*high mobility group*) protein, dok proteini zaduženi za popravku DNK, efikasno uklanjaju unutarlančane veze, za razliku od

međulančanih unakrsnih veza [53,54]. Trinuklearni BBR3464 kompleks je pokazao zavidan citotoksični efekat na različitim ćelijskim linijama (100 puta veći u odnosu na cisplatinu) i nije pokazao rezistenciju prema tumorskim ćelijama neuroblastoma i jajnika [55]. Ispitivanja citotoksičnosti BBR3464 na mišijim tumorskim ćelijama želuca, koje nisu reagovale na cisplatinu, pokazala su da kompleks inhibira rast tumora i nakon završetka tretmana. Međutim, problem primene BBR3464 kompleksa je maksimalna doza koja je 15 puta niža u odnosu na cisplatinu [55]. Pacijenti koji su primali BBR3464 kompleks su imali gastrointestinalne i hematološke neželjene efekte koji ograničavaju korišćenu dozu kompleksa, što je posledica većeg procenta vezivanja kompleksa za protein plazme kod čoveka u odnosu na miševe [56]. Kompleksi BBR3610 i BBR3611 su ispoljili veću toksičnost u odnosu na BBR3464 kompleks



Slika 4. Strukturne formule polinuklearnih BBR3464, BBR3610 i BBR3611 kompleksa.

Trinuklearni platina(II) kompleks, Triplatin-NC (Slika 5) u ćeliju ulazi putem mikropinocitoze koja je olakšana interakcijom pozitivnog naelektrisanja kompleksa i glikozaminoglikanima na površini ćelijskog omotača, što naravno nije slučaj sa cisplatinom i oksaliplatinom [58]. Za DNK se vezuje nekovalentno formirajući elektrostatički ojačane vodonične veze sa fosfatnim grupama [59].



Slika 5. Strukturna formula kompleksa Triplatina-NC.

Triplatin-NC kompleks indukuje kondenzaciju DNK i agregaciju RNK što dovodi do inhibicije transkripcije DNK [60]. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti Triplatin-NC kompleksa su pokazali da se upotrebom ovog kompleksa mogu prevazići ograničenja koja ima BBR3464 kompleksa [35].

Novi antitumorski platina(II) kompleksi sa ligandima koji će uticati na antitumorsko delovanje kompleksa, fleksibilnost kompleksa, unutarlančano i međulančano vezivanje za DNK i na vezivanje kompleksa za mali žljeb su budućnost koordinacione hemije.

1.1.3. Mehanizam delovanja cisplatine

Nakon otkrića antitumorske aktivnosti cisplatine, bilo je neophodno ispitati mehanizam delovanja ovog kompleksnog jedinjenja u organizmu. Istraživanja su pokazala da mehanizam delovanja cisplatine podrazumeva supstituciju hlorido liganada molekulima vode nakon ulaska u ćelije, što je praćeno vezivanjem za nukleobaze DNK i apoptozom ćelije odnosno programirane ćelijske smrti [61].

Usled visoke koncentracije hloridnih jona u ekstracelularnim tečnostima hidroliza cisplatine je suzbijena. Opisana su tri mehanizma po kojima cisplatima može da uđe u ćeliju. Kao neutralni molekul cisplatina može ući u ćeliju pasivnom difuzijom, aktivnim transportom posredstvom plazma-membranskog bakar Ctr1p transportera ili pomoću organskih katjona koji imaju ulogu transportera [62]. Unutar ćelije koncentracija hlodnih jona je oko 4 mM zbog čega cisplatina hidrolizuje (Slika 13). Dihlorido kompleks, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], je dominantan u citoplazmi, dok su kompleksi **1**, **2** i **4** kao i oligomeri kompleksa **4** su prisutni unutar ćelije (Slika 6) [63].

$$\begin{array}{c} cis-[PtCl_{2}(NH_{3})_{2}] \\ +Cl \\ +Cl \\ -Cl \\ +Cl \\ -Cl \\ -Cl \\ -Cl \\ -H^{+} \\ cis-[PtCl(NH_{3})_{2}(H_{2}O)]^{+} \\ 2 \\ 1 \\ +Cl \\ -H^{+} \\ -H^{+} \\ -Cl \\ +Cl \\ +Cl \\ -Cl \\ +Cl \\ +Cl \\ -Cl \\ -Cl \\ +Cl \\ -Cl \\ +Cl \\ -Cl \\ +Cl \\ -Cl \\ +Cl \\ -Cl \\$$

Slika 6. Šematski prikaz reakcija hidrolize cisplatine unutar ćelije.

Reaktivni elektrofilni katjonski proizvodi hidrolize se vezuju za nukleofilne grupe koje sadrže kiseonik, azot ili sumpor kao donorske atome bočnih lanaca aminokiselina, proteina i nukleinskih baza (RNK ili DNK) [86]. Koordinovanjem platina(II) kompleksa za DNK sprečena je transkripcija i replikacija DNK, što ćelija prepoznaje kao odgovor koji rezultira apoptozom ćelije (Slika 7) [65–67].

Istraživanja su pokazala da se 5–10% cisplatine kovalentno veže za DNK [68]. Istraživanja pokazuju da kovalentno vezivanje platina(II) kompleksa za DNK nije jedini mehanizam odgovoran za citotoksičnost kompleksa [38,69]. S obzirom da je dokazano da se cisplatina 4-20 puta više akumilira u ćelijskoj RNK u poređenju sa DNK kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, pretpostavlja se da je jedan od potencijalnih mehanizama koji je odgovoran za citotoksičnu aktivnost vezivanje kompleksa za RNK [70]. Cisplatina se za RNK vezuje atipičnim unakrsnim kovalentnim vezama, sprečavajući reverzibilnu transkripciju RNK čime se ometa prenošenje informacija o sekvenci [71,72]. Istraživanja su pokazala da se kompleksi platine vezuju za proteine citoskeleta kao što su ubikvitin, Hsp90 i G-aktin [73]. Vezivanje kompleksa platine(II) za pomenute proteine dovodi do konformacionih promena kompleksa, a samim tim i do njihove izmenjene biološke funkcije [74,75]. Da vezivanje kompleksa platine(II) za DNK nije jedini uslov za dobru citotoksičnost kompleksa pokazala su ispitivanja *trans*-(1,2-cikloheksandiamin-dihidrogenpirofosfat) platina(II) kompleksa [76]. Sintetisani kompleks platine(II) je u *in vitro* istraživanjima pokazao citotoksičnu aktivnost kao cisplatina, a nije se vezao za DNK. Mehanizam njegove citotoksične aktivnosti nije još uvek razjašnjen [73].



Slika 7. Mehanizam antitumorskog delovanja *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] kompleksa.

Oko 50% unetog leka platine(II) vezuje se za proteine krvi i izlučuje se putem urina. Preostali deo unete cisplatine u organizmu se transportuje krvotokom do tkiva. Platina(II) jon kao meka Pirsonova (*Pearson*) kiselina pokazuje veliki afinitet prema biomolekulima koji sadrže sumpor, što predstavlja jedan od glavnih uzroka neželjenih efekata cisplatine [77]. Reaktivne kompleksne vrste, *cis*-[PtCl(NH₃)₂(H₂O)]⁺ i *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺, nastali hidrolizom cisplatine se vezuju za nukleofile citoplazme kao što su glutation, metionin, metalotionein, što dovodi do oksidativnog stresa u ćelijama. Pomenute nukleofilne vrste vezuju komplekse platine(II) u organizmu čime ograničavaju njihovu raspoloživost. Kod pacijenata koji su nakon terapije postali rezistentni na cisplatinu nađen je povišeni nivo glutationa i glutation-S-transferaze (enzim koji učestvuje u prenošenju cisplatine) [35,78].

Cisplatina utiče ne samo na tumorske već i na zdrave ćelije u organizmu koje se brzo dele i uništava ih. Kao posledica toga javljaju se pomenuti neželjeni efekti kao što je nefrotoksičnost (smanjena funkcija i oštećenje bubrega), neurotoksičnost (oštećenje nervnog sistema), ototoksičnost (gubitak sluha) i mijelosupresija (smanjenje aktivnosti koštane srži) [33,79].

1.2. Kompleksi paladijuma(II)

1.2.1. Mononuklearni kompleksi paladijuma(II)

U cilju sinteze kompleksa koji će pokazati bolju antitumorsku aktivnost od cisplatine, naučnici su poboljšavali metode, modifikovali strategije i usavršavali nove ideje kako bi antitumorski agensi uspešnije delovali na tumorske ćelije. Uzimajući u obzir sličnost između platine(II) i paladijuma(II) jona, sintetisani su paladijum(II) kompleksi koji su strukturno slični kompleksima platine(II) [80,81].

Kompleksi paladijuma(II), koji su analozi cisplatini, *cis*-[PdCl₂(NH₃)₂] i *cis*-[Pd(dach)Cl₂] ne pokazuju antitumorska svojstva [82]. Kompleks *cis*-[PdCl₂(NH₃)₂] u fiziološkim uslovima prelazi u *trans* oblik koji ne pokazuje antitumorsku aktivnost. Paladijum(II) kompleksi na putu do jedra, gde se nalazi DNK, reaguju sa biomolekulima u organizmu čime je sprečeno vezivanje kompleksa za DNK. Kompleksi paladijuma(II) u *in vitro* i *in vivo* uslovima podležu hidrolitičkim reakcijama koje su do 10⁵ puta brže u poređenju sa hidrolizom analognih platina(II) kompleksa, što uslovljava veliku reaktivnost paladijum(II) kompleksa [83,84]. Istraživanja su pokazala da hidroliza paladijum(II) kompleksa zavisi od vrste liganada. Brzina hidrolize paladijum(II) kompleksa se može kontrolisati koordinovanjem volumioznih liganda koji sadrži azot donorske atome i pogodnih odlazećih liganada, kako bi kompleks u *in vivo* uslovima bio dovoljno dugo stabilan da dođe do ćelije. Prednost paladijum(II) kompleksa je njihova bolja rastvorljivost u odnosu na platina(II) komplekse. Sintetisan je veliki broj paladijum(II) kompleksa, a neki od njih su pokazali antitumorsku aktivnost na ćelijskim linijama tumora pluća, vrata, glave, prostate i jajnika [85-94].

Mononuklearni kompleks trans-[PdCl₂(2-dqmp)₂] (Slika 8), gde je 2-dqmp = dietil-2-hinolmetilfosfonat, je pored dobre rastvorljivosti pokazao i dobru antitumorsku aktivnost [82].



Slika 8. Strukturna formula *trans*-[PdCl₂(2-dqmp)₂] kompleksa.

Značajna citotoksična aktivnost $[Pd(L)(PPh_3)]$ i $[Pd(L)(AsPh_3)]$ kompleksa (L = 4-hidroksibenzoeva kiselina (5-bromo-2-hidroksi-benziliden)-hidrazin, Slika 9) na ćelijama humanog tumora grlića materice (HeLa) i ćelijama humanog tumora dojke (MCF-7) je objašnjena interkalacijom ovih kompleksa u CT-DNK [95]. Citotoksična aktivnost ovih kompleksa je ukazala da lipofilnost kompleksa može da pojača njegovu biološku aktivnost.



Slika 9. Strukturne formule [Pd(L)(PPh₃)] i [Pd(L)(AsPh₃)] kompleksa (L = 4-hidroksibenzoeva kiselina (5-bromo-2-hidroksi-benziliden)-hidrazin).

Glikokonjugovani paladijum(II) kompleks [Pd(L)Cl₂], L je 2-deoksi-2-[(2-piridinilmetilen)ammin]- α -D-glukopiranoza (Slika 10), je pokazao sposobnost da u *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima indukuje apoptozu ćelija tumora želuca koje su pokazale rezistentnost prema cisplatini [96]. Analogni platina(II) kompleks u istim eksperimentalnim uslovima nije pokazao antitumorsko dejstvo. Takođe [Pd(L)Cl₂] kompleks je pokazao manju nefrotoksičnost u odnosu na cisplatinu.



Slika 10. Strukturna formula $[Pd(L)Cl_2]$ kompleksa (L = 2-deoksi-2-[(2-piridinilmetilen)amino]- α -D-glukopiranoza).

Paladijum(II) kompleksi $([Pd(mda)]^{2-} i [Pd(obp)]^{2-}$, Slika 11) koji sadrže tetradentatne ligande (mda je malamido-N,N'-diacetato, obp je oksamido-N,N'-di-3-propionato) u kojima su donorski atomi dva atoma azota sekundarnog amida i dva atoma kiseonika anjona karboksilne kiseline, su pokazali značajnu antitumorsku aktivnost i izazvali manju rezistentnost ispitivanih ćelija u odnosu na cisplatinu. Rezultati ispitivanja interakcija ovih kompleksa sa DNK su pokazali da kompleksi prvo uspostavljaju vodonične veze sa DNK, a zatim se S_n2 asocijativnim mehanizmom vezuju za DNK supstitucijom prve, a zatim i druge karboksilne grupe stvarajući unutarlančane kovalentne veze [97].



Slika 11. Strukturne formule $[Pd(mda)]^{2-}$ i $[Pd(obp)]^{2-}$ kompleksa.

Sinteza paladijum(II) kompleksa koji će zadovoljiti farmaceutske potrebe je pravi izazov za naučnike jer pored dobre citotoksične aktivnosti paladijum(II) kompleksi nisu ispunili sve kriterijume da uđu u klinička ispitivanja.

1.2.2. Polinuklearni paladijum(II) kompleksi

Polazeći od mononuklearnih paladijuma(II) kompleksa i liganada koji imaju dva donorska atoma azota tako da mogu imati ulogu mostnog liganda, sintetisani su polinuklearni paladijum(II) kompleksi.

Dinuklearni paladijum(II) kompleks ([Pd₂Cl₄Spm], Slika 12) sa sperminom kao bidentatno koordinovanim ligandom je pokazao dobar citotoksični potencijal na ćelijama koje su rezistentne u odnosu na cisplatinu [98]. Farmakokinetički profil i distribucija pasivnom difuzijom [Pd₂Cl₄Spm] kompleksa su povoljni za lečenje tumorskih oboljenja. Metabolički odgovor prilikom primene [Pd₂Cl₄Spm] kompleksa je mnogo brži u odnosu na cisplatinu, pa se očekuje da oporavak pacijenata bude brži [98].



Slika 12. Strukturna formula [Pd₂spm] kompleksa (spm = spermin).

Dinuklearni paladijum(II) kompleks sa nitroimidazolom (Slika 13) indukuje trostruko povećanje 8, 9 i 10 kaspaze humanih tumorskih ćelija dojke (MDA-MB-231) u poređenju sa cisplatinom [99].



Slika 13. Strukturna formula paladijum(II) kompleksa sa nitroimidazolom [99].

Rezultati su pokazali da primenom ovog kompleksa se aktivira fiziološka ćelijska smrt, jer kaspaze 8, 9 i 10 pripadaju inicijatorima apoptoze. Pretpostavlja se da se mehanizam delovanja kompleksa zasniva na oslobađanju paladijum(II) jona usled raskidanja paladijum(II)-berenila veze [98]. Oslobođeni paladijum(II) jon difunduje u ćeliju putem humanog protein transportera bakra 1 (Ctr1) i transportera organskih katjona 2 (OCT2) izazivajući apoptozu ćelije i prevazilazeći ćelijsku rezistentnost [97-102].

Trinuklearni paladijum(II) kompleks $[{trans-PtCl(NH_3)}_{2-\mu}-{trans-Pd(NH_3)}(2-hidroksipiridin)-(H_2N(CH_2)_6NH_2)_2]^{4+}$ (Slika 14) je pokazao značajnu antitumorsku aktivnost na A2780^{cisR} i A2780 ćelijskim linijama tumora jajnika [106]. Rezultati ispitivanja interakcije trinuklearnog paladijum(II) kompleksa sa DNK su pokazali da kompleks formira GG- međulančane veze koje indukuju konformacione promene DNK.



Slika 14. Strukturna formula [$\{trans-PtCl(NH_3)\}_2-\mu-\{trans-Pd(NH_3)(2-hidroksipiridin)-(H_2N(CH_2)_6NH_2)_2$]⁴⁺ kompleksa.

Polinuklearni paladijum(II) kompleksi još uvek nisu ušli u predklinička ispitivanja bez obzira što su pokazali obećavajuću *in vitro* i *in vivo* antitumorsku aktivnost. Potrebno je uraditi detaljnija istraživanja u ovoj oblasti kako bi se razjasnio mehanizam interakcija polinuklearnih paladijum(II) kompleksa sa DNK. Razumevanje mehanizama vezivanja polinuklearnih paladijum(II) kompleksa za DNK bi otvorio nove vidike u sintezi kompleksa koji bi ušli u kliničku primenu.

1.3. Interakcije kompleksa sa DNK

Kompleksi platine(II) koji se trenutno koriste u hemioterapiji, vezuju se za DNK i menjaju i/ili inhibiraju funkcionisanje DNK izazivajući apoptozu ćelije [104]. Proučavanje interakcije lekova sa DNK je značajno, ne samo za razumevanje mehanizma interakcija već i za dizajn novih antitumorskih agenasa.

Dezoksiribonukleinska kiselina u organizmu ima veoma važnu ulogu jer prenosi genetički materijal sa jedne na drugu generaciju i sadrži uputstva za građenje proteina i ćelijskih organela. Zbog toga je DNK farmakološka meta mnogih lekova koji su u kliničkoj upotrebi ili u predkliničkim ispitivanjima. DNK je u organizmu prisutna u obliku dvostruke spirale, a dug polinukleotidni lanac se sastoji od kombinacije četiri nukleotida (adenina, guanina, timina i citozina). Nukleotid je nukleozid sa jednom ili više fosfatnih gupa koje su kovalentno vezane za 3' i/ili 5' hidroksidnu grupu dezoksiriboze. Unutar lanca ovi nukleotidi su povezani fosfodiestarskim vezama preko šećera i fosfatne grupe tako da čine "kičmu" (*backbone*) DNK (Slika 15). Heliks je stabilizovan vodoničnim vezama gde adenin formira dve vodonične veze sa timinom (A=T), a guanin formira tri vodonične veze sa citozinom (G=C) [105-107].

Deo heliksa gde su dva lanca blizu jedan drugom naziva se mali žljeb (*eng. minor groove*), dok se deo heliksa gde su dva lanca udaljeniji naziva veliki žljeb (*eng. major groove*,Slika 15).



Slika 15. Struktura DNK: Bazni parovi A=T i G=C sa naznačenim vodoničnim vezama (A) i sa naznačenim velikim i malim žljebovima (B) [107,109].

DNK je polimorfna dvostruka spirala, uključujući dubinu i širinu malih i velikih žljebova, koja može imati različite konformacije (A–, B– i Z–oblik, Slika 16). Geometrija dvostrukog heliksa DNK zavisi od toga koju konformaciju DNK zauzima. Veliki i mali žljebovi se u različitim konformacijama značajno razlikuju po veličini, obliku, hidrataciji, elektrostatičkom potencijalu kao i položaju uspostavljanja vodoničnih veza, što utiče na vezivanje agenasa za DNK [108,109].

B–DNK konformer je najčešći oblik u kojoj se dvostruki heliks DNK nalazi u prirodi. U ovoj konformaciji dva lanca su antiparalelno orijentisana i ima cik-cak oblik. Rezultat paralelnog slaganja baza je prisustvo velikog i malog žljeba koji su dostupni za vezivanje različitih agenasa za B–DNK [108]. A–DNK konformer je dehidrirani i rigidniji oblik B–DNK konformera, koji se strukturno razlikuje po veličini velikih i malih žljebova i konformaciji prstena 2-deoksiriboze kao i prečniku spirale [110]. U odnosu na B–DNK konformer, A–DNK je uži sa više parova baza i sa širim malim žljebom [111]. Glavna razlika A- i B- konformera je u konformaciji šećernog prstena dezoksiriboze. Druga razlika je orijentacija baznih parova unutar DNK heliksa. U B–DNK konformeru, bazni parovi su oko centralne ose, dok su u A-DNK konformeru pomereni bliže velikom žljebu [111]. Zato A–DNK konformer ima oblik

spirale sa otvorenim cilindričnim jezgrom. Z–DNK je izduženi oblik B–DNK, sastavljen od jednog uskog žljeba (Slika 16). U Z–DNK konformeru spirale su okrenute suprotno u odnosu na A– i B–DNK konformere. Istraživanja su pokazala da se proteini vezuju za Z–DNK konformer [112]. Konformacione razlike koje pokazuju A–, B– i Z–DNK oblici uglavnom su posledica pakovanja ostataka šećera što uslovljava da A– i B–DNK konformeri budu desno orijentisani, dok je Z–DNK konformacija levo orijentisana [113,114].



Slika 16. Strukture A–DNK, B–DNK i Z–DNK konformera u kristalnim strukturama [113].

Atomi azota i ugljenika purina i dva atoma ugljenika pirimidina u B–DNK su okrenuti prema velikom žljebu, tako da se mogu ostvariti specifične veze sa aminokiselinama iz proteina. Aminokiseline iz proteina služe kao donori i akceptori vodoničnih veza koje proteini uspostavljaju sa nukleotidima iz DNK. Vodonične veze između proteina i azotnih baza malog žljeba su retke [115]. Međutim, vezivanje agenasa za mali žljeb rezultira ispoljavanjem njihove antitumorske i antimikrobne aktivnosti.

Pored malog i velikog žljeba (interkalacija), delovi DNK koji takođe mogu da stupe u interakciju sa agensima su negativno naelektrisane fosfatne grupe (elektrostatičke interakcije) i atomi kiseonika iz fosfatnih grupa (van der Valsove interakcije, *van der Waals interactions*) [116]. Kovalentne i nekovalentne interakcije su dva moguća načina vezivanja kompleksa za DNK.

1.3.1. Kovalentne interakcije

Kovalentni način vezivanja molekula za DNK je nepovratan proces koji izaziva potpunu inhibiciju biološke funkcije DNK što uslovljava apoptozu ćelije. Kovalentno vezivanje kompleksa za DNK, dovodi do distorzije heliksa, što za posledicu ima promene u transkripciji i replikaciji DNK [103]. Antitumorski agensi koji se koriste u hemioterapiji se kovalentno vezuju za DNK [117,118]. Proizvod vezivanja cisplatine za DNK je okarakterisan gel elektroforezom i utvrđeno je da dolazi do savijanja DNK ($\approx 40^{\circ}$, Slika 17A) [119]. Rezultati rengenske kristalografije, 1995. godine, su potvrdili da vezivanje cisplatine za *N7* atom guanina iz DNK (Slika 17B) dovodi do savijanja velikog žljeba, ali bez raskidanja vodoničnih veza [120]. Na osnovu brojnih biohemijskih ispitivanja dokazano je da cisplatina sa DNK uspostavlja unutar/međulančanu unakrsnu vezu sa atomima azota baznih parova (Slika 17C) [121,122]. U stvari, DNK heliks menja konformaciju iz B–DNK u A–DNK. Ove strukturne promene DNK su prepoznatljive od strane ćelijskih proteina koji popravljaju strukturu ili iniciraju ćelijsku smrt [5].



Slika 17. Kovalentno vezivanje cisplatine za DNK u kristalnoj strukturi (A) [104]; Strukturni prikaz načina vezivanja cisplatine za guanin (G) i adenin (A) (B); 1,2-unutarlančano GpG, 1,2-unutarlančano ApG, 1,3-međulančano GpNpG i 1,2-međulančano GpG vezivanje cisplatine za DNK (C) [120,121,122].

1.3.2. Nekovalentne interakcije

Nekovalentne interakcije kompleksa sa DNKsu reverzibilni procesi koji su poželjniji u odnosu na kovalentno vezivanje, uzimajući u obzir metabolizam leka i toksične sporedne efekte. Vezivanje kompleksa za DNK nekovalentnim interakcijama može dovesti do konformacionih promena, promena torzionih uglova, raskidanja protein–DNK veza i potencijalno do raskidanja DNK heliksa [104].

Nekovalentni način vezivanja kompleksa za DNK se može klasifikovati kao interkalacija, vezivanje za žljebove i vezivanje za fosfatnu kičmu DNK (vezivanje za fosfatnu kičmu uključuje i interakcije sa dezoksiribozom, koja je deo kičme, a koja svakako doprinosi vezivanju, najčešće vodoničnim vezama).

Interkalacija

Afinitet vezivanja heterocikličnih aromatičnih boja, koje spadaju u planarna organska jedinjenja, za DNK objasnio je Lerman (Lerman) [123]. Planarna heterociklična jedinjenja se ponašaju kao interkalatori, vezujući se između susednih parova baza DNK, što dovodi do preklapanja njihovih π -orbitala (Slika 18). Interkalatori ne formiraju kovalentne veze i ne utiču na raskidanje vodoničnih veza između baza DNK. Na stabilnost veze interkalator-DNK utiču van der Valsove sile, vodonične veze i π - π interakcije [124,125]. Veze koje se ostvaruju nakon interkalacije agensa u DNK zavise od sekvence baza na mestu interkalacije, kao i od hemijskih modifikacija agensa. Da bi se prilagodila ligandu, DNK mora da prođe konformacione promene koje uključuju povećanje rastojanja između baza da bi se stvorila šupljina za dolazni interkalator (Slika 18). Dvostruki DNK heliks se u tom slučaju produžuje, ali se delimično i odmotava, što dovodi do izobličenja šećerno-fosfatnog skeleta i promene ugla uvijanja uzastopnih baznih parova [126]. Stepen odmotavanja heliksa zavisi od veličine interkalatora. Distorzija DNK lanca može dovesti do funkcionalnih promena, često do inhibicije, transkripcije, replikacije kao i popravke DNK, što interkalatore čini moćnim mutagenima [127,128]. Interkalacija je favorizovana prisustvom kondenzovanog aromatičnog liganda i uglavnom je nezavisna od sekvence DNK (uočena je mala G=C specifičnost) [37].



Slika 18. Grafički prikaz interkalacije etidijum jona (Et) iz etidijum-bromida (EtBr) [126].

Merenje viskoziteta DNK u prisustvu agenasa je eksperimentalna metoda koja je osetljiva na promenu dužine DNK lanca [129]. Shodno tome, ova metoda se može koristiti za određivanje načina interakcije agenasa sa DNK. Klasična interkalacija rezultira značajnim povećanjem viskoziteta DNK, jer su bazni parovi razdvojeni, tj. DNK lanac se produžava [130].

Postoje dva glavna načina interkalacije, a to su klasična interkalacija i udenuta interkalacija [104,131].

Predstavnik klasičnog interkalatora je etidijum-bromid (EtBr) čija je interkalacija prikazana na Slici 18. Jakom interkalacijom EtBr emituje intenzivnu fluorescenciju što se koristi kao eksperimentalna metoda za ispitivanje interakcija kompleksa metala sa DNK. Naime, formiranje EtBr/DNK proizvoda se može detektovati u emisionom spektru EtBr nakon

dodavanja DNK, na 612 nm [132]. U emisionim spektrima EtBr/DNK nakon dodavanja kompleksa metala može doći do smanjenja ili povećanja maksimuma fluorescentne emisije što ukazuje da kompleks istiskuje EtBr, odnosno nastaje novi kompleks/DNK proizvod [133].

Nakon otkrića prednosti interkalacije sintetisan je veliki broj platina(II) i paladijum(II) kompleksa kojima je ovo bio primaran način vezivanja za DNK. Kvadratno-planarni platina(II) kompleksi koji sadrže heterociklične aromatične ligande su se pokazali kao dobri interkalatori pri čemu je nađeno da imaju širok spektar citotoksične aktivnosti [134,135]. Katjonski kompleksi mogu da ostvaruju dodatne veze sa negativno naelektrisanim fosfatnim grupama DNK, zato su se kao najbolji interkalatori pokazali pozitivno naelektrisani kompleksi.

Interkalator platina(II) kompleks $[Pt(6phbpy)(tert-butilizocijanid)]^+$ (6phbpy = 6-fenil-2,20-bipiridin, Slika 19A) je pokazao IC₅₀ vrednosti od 9 nM prema ćelijama humanog epidermoidnog karcinoma KB i 10 nM prema SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma [136]. Naknadna *in vivo* ispitivanja na miševima sa NCI-H460 tumorom pluća, su pokazala da je ovaj kompleks inhibirao 60% tumora bez neželjenih efekata [135].



Slika 19. Strukturne formule platina(II) kompleksa koji interkaliraju u DNK [136,137,138].

Platina(II) kompleks [Pt(dip)Cl₂] (dip = 4,7-difenil-1,10-fenantrolin, Slika 19B) se za DNK vezuje klasičnom interkalacijom, usled čega dolazi do konformacionih promena DNK [137]. Kompleks [Pt(N4,N7-ribavirin)Cl(DMSO)]·H₂O koji sadrži antivirusni lek ribavirin (Slika 19C) se za DNK vezuje parcijalnom interkalacijom [138]. Oba pomenuta platina(II) kompleksa su pokazala dobru citotoksičnu aktivnost prema ispitivanim ćelijskim linijama.

Udenuta interkalacija u DNK je specifična za agense koji imaju dva bočna lanca na suprotnim stranama planarnog aromatičnog prstena. Planarni aromatični prsten se interkalira

između baznih parova DNK, dok se dva bočna lanca vezuju za mali i veliki žljeb. Udenuta interkalacija omogućava istovremenu interakciju kompleksa sa malim i velikim žljebom i tako dodatno stabilizuje DNK strukturu [139]. Ovaj vid interkalacije zahteva velike strukturne promene DNK, što je veoma spor proces [140]. Uprkos konformacionim promenama DNK prilikom vezivanja udenutom interkalacijom, nastaje kompleks koji je stabilizovan interakcijama u interkalacijskom mestu i u žljebovima [141]. Sporija disocijacija udenutog interkalatora u poređenju sa klasičnim interkalatorima može imati ključnu ulogu u inhibiciji transkripcije i replikacije DNK. Ovo objašnjava visoku citotoksičnost nogalamicina koji se za DNK vezuje udenutom interkalacijom (Slika 20)[142].



Slika 20. Strukturna formula nogalamicina (A); Šematski prikaz udenute interkalacije (B) [142].

Za razliku od etidijum-bromida koji se interkalira u DNK paralelno, nogalamicin se vezuje udenutom interkalacijom. Prilikom vezivanja za DNK aminoglukoza je vezana za veliki žljeb, dok je šećerna komponenta interkalirana u mali žljeb. Vezivanje nogalamicina za DNK je stabilizovano van der Valsovim interakcijama i vodoničnim vezama šećera u žljebovima. Činjenica da je interkalacija velikih molekula stabilna sugeriše na dinamičnu strukturu DNK, gde se vodonične veze azotnih baza mogu raskinuti i prilagoditi obezbeđujući dovoljno velike interkalaciju glomaznih molekula. Istraživanja šupljine za su pokazala da se akridin-4-karboksamidi (daca) vezuju za DNK udenutom interkalacijom (Slika 21) [104]. Derivati akridina inhibiraju enzime topoizomeraze I i II (topoizomeraze su esencijalni enzimi koji inicijalno indukuju razdvajanje heliksa DNK) čime uzrokuju oštećenje DNK, ometaju popravku i replikaciju DNK i tako izazivaju ćelijsku smrt.



Slika 21. Strukturna formula 9-amino-6-bromo-daca (A); Kristalna struktura udenute interkalacije 9-amino-6-bromo-daca u DNK. Preuzeto iz rada [104].

Dvostruki način vezivanja - kovalentno vezivanje i interkalacija

Istraživanjem prirode interakcije kompleksa metala sa DNK nađeno je da se kompleksi metala mogu vezati na dvostruki način, što uključuje kovalentno vezivanje i interkalaciju. Najjednostavniji primer kompleksa platine(II) koji se za DNK vezuje na dvostruki način je hlorido(2,2':6',2''-terpiridin)platina(II)-hlorid ([Pt(terpy)Cl]⁺, Slika 22). Istraživanja interakcije ovog kompleksa sa DNK su pokazala da se kompleks prvenstveno vezuje za DNK tako što interkalira u heliks, a zatim formira kovalentne veze sa parovima baza [143]. Koordinovanjem drugog elementa umesto hlora suzbija se hidroliza kompleksa, tako da kompleks u kome je hlorido ligand supstituisan tioetarskim ligandima samo interkalira u DNK (Slika 22) [144]. Sintetisan je veliki broj različitih platina(II) kompleksa sa terpiridinom (terpy), a neki od njih su pokazali veću citotoksičnost od karboplatine prema humanoj ćelijskoj liniji tumora jajnika [143].



Slika 22. Strukturne formule platina(II) kompleksa sa terpiridinom kao ligandom [143,144].

Uslov vezivanja kompleksa metala dvostrukim načinom jeste prisustvo labilnog odlazećeg liganda kao i aromatičnog liganda koji može da interkalira [145,146]. Sintetisana je serija platina(II) kompleksa [Pt{AO(CH₂)_n(en)}Cl₂]Cl (Slika 23A) gde je AO akridin narandžasti koji je vezan za etilendiamin (en) polimetilenskim lancem (n = 3 ili 6) [147]. Kompleksi se za DNK vezuju na dvostruki način i pokazuju citotoksičnost prema različitim

ćelijskim linijama pri makromolarnim koncentracijama (Slika 23) [146]. Platina(II) kompleksi sa akridiniltioureom (ACRAMTU–S, Slika 22B) kao ligandom su pokazali nanomolarnu citotoksičnost prema ispitivanoj ćelijskoj liniji. Ovakva citotoksičnost je posledica produžavanja i agregacije DNK heliksa usled interkalacije i kovalentnog vezivanja platina(II) kompleksa (Slika 23C) [148,149].



Slika 23. Strukturna formula platina(II) kompleksa sa akridinom (A) i akridiniltioureom (B) koji se za DNK vezuju na dvostruki način. Interkalacija i kovalentno vezivanje [Pt(ACRAMTU–S)(en)Cl](NO₃)₂ kompleksa za DNK [148,149].

Bisinterkalacija

Nakon otkrića biološke aktivnosti ehinomicina definisan je još jedan način interakcije jedinjenja u DNK, a to je bisinterkalacija [104]. Bisinterkalacijom se formiraju reverzibilne međulančane veze između agensa i DNK i unutarlančane veze aromatičnog liganda i baznih parova DNK (Slika 24B). Veza bisinterkalatora i DNK se najčešće formira u malom žljebu i jača je od veze koju formira klasični interkalator [143].

Bisinterkalatorski kompleksi platine(II) su mononuklearni kompleksi sa jednim alifatičnim nizom koji vezuje aromatične delove ($[Pt(en)(ACRAMTU-S)_2]^{4+}$, Slika 24A) ili dinuklearni sa aromatičnim ligandima na krajevima ($[{Pt(terpy)}_2(SOS)]^{2+}$, SOS = [2-(2-merkapto-etoksi)-etandiol], Slika 24C). Alifatični niz može sa DNK uspostaviti vodonične veze, van der Valsove interakcije ili ući u žljebove. Afinitet vezivanja dinuklearnih kompleksa je veći u odnosu na afinitet vezivanja mononuklearnih kompleksa zbog povećanog naelektrisanja i aromatičnosti, što za posledicu ima veću citotoksičnost dinuklearnih kompleksa [150-153]. Osobine bisinterkalatora se mogu podesiti modifikacijom aromatičnog dela kompleksa ili modulacijom veličine i rigidnosti alifatičnih lanaca [154,155]. Dinuklearni kompleksi platine(II) koji se ponašaju kao bisinterkalatori su pokazali visok afinitet vezivanja za DNK, visoku citotoksičnost prema ispitivanim tumorskim ćelijskim linijama kao i sposobnost da inhibiraju enzime koji su važni za funkciju tumorske ćelije [145,151,152,156].



Slika 24. Strukturna formula platina(II) bisinterkalatora (A,C); Bisinterkalacija [{Pt(terpy)}₂(SOS)]²⁺ kompleksa u DNK sekvence d(GCTATAGC)2 [143].

Vezivanje za mali žljeb

Molekuli koji poseduju torzionu slobodu se za DNK vezuju za mali žljeb van der Valsovim interakcijama i formiranjem vodoničnih veza sa atomom azota u položaju 3 iz adenina i atomom kiseonika u položaju 2 iz timina. Za vezivanje molekula za mali žljeb potrebna je specifična sekvenca bogata A=T parovima. Sklonost vezivanja molekula za A=T sekvencu je posledica elektronegativnih džepova DNK i uspostavljanja boljih van der Valsovih interkacija između molekula i zidova žljeba. Region A=T parova je uži u odnosu na G=C region [157]. Molekul se smešta u šupljinu žljeba i zamenjuje solvatacioni sloj koji je tu bio prisutan. Za razliku od interkalatora, molekuli koji se vezuju za mali žljeb dovode do minimalnih konformacionih promena DNK heliksa [158]. Minimalno uvrtanje DNK heliksa u suprotnu stranu usled rotiranja baze je neophodno zbog uspostavljanja vodoničnih veza sa molekulom. Molekul vode iz solvatacionog sloja može takođe nagraditi vodoničnu vezu sa agensom. Ovaj slučaj vezivanja molekula za vodu iz malog žljeba je čest i predstavlja glavni faktor u stabilnosti kompleksa. Takođe, nastali kompleks je stabilizovan i van der Valsovim silama, koje mogu dovesti do perturbacija DNK heliksa u odnosu na Vatson-Krik (Watson-Crick) geometriju [159]. Pored konformacionih promena DNK, može doći i do konformacionih promena molekula vezanog za mali žljeb, sve u cilju postizanja što veće stabilnosti kompleksa. Najpoznatiji lekovi koji se vezuju za mali žljeb DNK su berenil i netropsin (Slika 25A i 25B) [160,161]. Hoescht 33258 je obojeno organsko jedinjenje koje se koristi za izučavanje lokalnog okruženja i strukturnih promena DNK jer se vezuje za mali žljeb (Slika 25C) [162]. Vezivanjem Hoescht-a 33258 za DNK dolazi do promene entropije hidratacije usled oslobođanja vode, što dovodi do stabilizacije DNK strukture sa malim konformacionim distorzijama [160,163]. Zbog toga se Hoescht 33258 koristi za određivanje mesta vezivanja kompleksa metala za DNK [164].



Slika 25. Vezivanje berenila (A) [159], netropsina (B) i Hoechst 33258 (C) [165] za mali žljeb DNK.

Vezivanje za veliki žljeb

U velikom žljebu (Slika 15), za razliku od malog žljeba, atomi azota i kiseonika iz nukleinskih baza su usmereni ka unutrašnjosti, odnosno ka osi heliksa. Zbog toga veliki žljeb zavisi od sekvence nukleinskih baza i mesto je vezivanja proteina specifičnih DNK sekvenci ili regiona [166]. Negativni potencijal je jači u velikom žljebu u poređenju sa malim žljebom zbog prisutne G=C sekvence. Shodno tome, fleksibilni katjonski molekuli se vezuju za veliki žljeb [167]. Kompleksi sa volumioznim ligandima prvenstveno se vezuju za veliki žljeb.

Naelektrisanje kompleksa (+4) kao i oblik cilindra omogućava [Fe₂(C₂₅H₂₀N₄)₃]Cl₄ kompleksu vezivanje za veliki žljeb [168,169]. To je bio prvi kompleks za koji je utvrđeno da se vezuje za veliki žljeb. Rutenijum(II) kompleksi koji sadrže volumiozne ligande A- $[Ru(tmp)_{3}]^{2+}$ 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolin) (tmp = i $[Ru(phen)_2(11-(9-))]$ akridinil)dipirido[3,2-a:20,30-c]fenazin)]²⁺ se vezuju za G=C region velikog žljeba DNK [170]. Istraživanja interakcija kompleksa koji se vezuju za ovaj žljeb DNK su pokazala da jačina vezivanja kao i selektivnost žljebova se može modifikovati uvođenjem metil grupa koje utiču na širinu i dužinu molekula [171]. Primeri helatnih kompleksa koji pokazuju selektivnost vezivanja za žljebove su enantiomeri dinuklearnih $[Ru_2(1,10-phen)_4L1]^{4+}$ i $[Ru_2(bpy)_4L1]^{4+}$ 1,10-fenantrolin, bpy je 2,2'-bipiridin, kompleksa (1,10-phen je a L1 je $(C_{5}H_{4}N)C=N(C_{6}H_{4})_{2}CH_{2}$ [172]. Enantiomeri Δ -[Ru₂(phen)₄L1]⁴⁺ i Δ -[Ru₂(bpy)₄L1]⁴⁺ se vezuju za G=C region velikog žljeba dok se Λ -[Ru₂(phen)₄L1]⁴⁺ i Λ -[Ru₂(bpy)₄L1]⁴⁺ mogu vezati i za mali i za veliki žljeb [171].

Vezivanje za fosfatne grupe

Pozitivno naelektrisani joni za DNK se mogu vezati za negativno naelektrisane fosfatne grupe DNK kičme. Vezivanje jona za DNK elektrostatičkim interakcijama nije praćeno strukturnim promenama DNK, ali može dovesti do konformacionih promena [104]. Elektrostatičke interakcije zavise od koncentracije soli u rastvoru i u fiziološkim uslovima su slabe. Smanjenje koncentracije soli doprinosi jačem vezivanju jona za DNK. Međutim, vezivanje jona za fosfatne grupe DNK značajno doprinosi slobodnoj energiji vezivanja jona. Zato pozitivno naelektrisani kompleksi metala se za DNK vezuju na ovaj način [104].

Vezivanje katjona za fosfatne grupe može biti unutarlančano ili vezivanje za fosfatnu kičmu (*backbone tracking*), ukoliko su fosfatne grupe istog DNK lanca (Slika 26) [173], i međulančano ukoliko su fosfatne grupe različitog DNK lanca [173]. Najčešće se vezivanje kompleksa za fosfatnu kičmu javlja u kombinaciji sa vezivanjem kompleksa za žljeb [143]. Dokazano je da se BBR3464 kompleks (Slika 4) vezuje za mali žljeb, ali se vezuje i duž fosfatne kičme DNK formirajući vodonične veze sa atomima kiseonika fosfatnih grupa. Ovakav tip vezivanja za DNK se naziva premošćavanje malog žljeba (*minor groove spanning*).



Slika 26. Vezivanje BBR3464 za jedan lanac fosfatne kičme DNK [143].

Međutim, istraživanja su pokazala da postoje kompleksi metala koji se za DNK vezuju samo interakcijama sa fosfatnim grupama. Povećanje luminescencije rutenijum(II) ([Ru(bpy)₃]²⁺) kompleksa nakon vezivanja za DNK zavisi od jonske jačine, što je bio dokaz da se ovaj kompleks za DNK vezuje samo za fosfatne grupe [104].

1.4. Interakcije kompleksa sa albuminima

U živim organizmima sva tkiva i ćelije se sastoje od proteina. Oni su ključni elementi enzima, hormona, antitela itd. Proteini imaju i važnu ulogu u održavanju kiselinsko-bazne

ravnoteže krvi i utiče na brzinu zgrušavanja krvi. Mogu se podeliti u tri grupe: albumini, globulini i fibrinogeni. Serum sadrži albumine i globuline. Fibrinogen nije prisutan u serumu jer prilikom zgrušavanja krvi prelazi u fibrin [174].

Najzastupljeniji i najpoznatiji protein krvne plazme je albumin. Za razliku od drugih serumskih proteina, albumin ima različite fiziološke uloge. Albumini učestvuju u distribuciji mnogih metabolita, hormona, jona esencijalnih elemenata i lekova u živim organizmima. Serumski albumin se stvara u jetri. Smanjena koncentracija serum albumina u organizmu može dovesti do srčane insuficijencije, a visoka koncentracija utiče na nedostatak vitamina u organizmu. Važna uloga albumina u organizmima je posledica prisustva nekoliko specifičnih mesta vezivanja (transportna mesta). Najviše proučavani albumini su humani serum albumin (HSA) i serum albumin izolovan iz krvi goveda (BSA).



Slika 27. Strukture HSA i BSA sa označenim triptofanskim ostacima (crno) [175].

Rendgenskom strukturnom analizom je utvrđeno da je u sekundarnoj strukturi HSA α -helikoidna struktura zastupljena sa 67%, izduženi lanac sa 23% i 10% je β -heliks (Slika 27)[176]. BSA je strukturno veoma sličan humanom serum albuminu (76%) i zbog toga se koristi za ispitivanje transportnog puta potencijalnih lekova (Slika 27). Po strukturi BSA pripada monokliničnom kristalnom sistemu i C2 prostornom grupom. Bovin serum albumin se sastoji od 583 aminokiselinskih ostataka vezanih peptidnim vezama i ima oblik srca [177,178]. Njegova trodimenzionalna struktura sadrži tri homologna strukturna domena (I, II i III) i svaki sadrži po dva poddomena (A i B, Slika 28) [178–180]. Domeni su stabilizovani sa 35 cisteinskih ostataka koji formiraju 17 disulfidnih veza, a samo Cys34 ima slobodnu tiolnu grupu [181]. Cys34 se nalazi u poddomenu IA i ima važnu ulogu u vezivanju lekova za albumin [182]. Kovalentno vezivanje lekova koji sadrže tiolne grupe za Cys34 dokazano je u in vivo uslovima [183]. Domeni II i III poseduju hidrofobne i pozitivno naelektrisane delove za koje se mogu vezati različita jedinjenja [184]. U poddomenu IIA se nalaze ostaci aminokiseline Trp-214 u HSA i Trp-212 u BSA, a u pododmenu IB u BSA ostaci Trp-134 [185]. Aminokiselinski ostaci triptofana poseduju fluorescenciju što se i koristi za ispitivanje načina vezivanja kompleksa metala za albumin [186].

Postoje dva specifična mesta vezivanja agenasa u strukturi BSA, a to su mesto vezivanja I koje se nalazi u poddomenu IIA i mesto vezivanja II koji se nalazi unutar poddomena IIIA (Slika 28)[187]. Poddomeni IIA i IIIA imaju sličnu trodimenzionalnu strukturu pa se neka jedinjenja mogu vezati i za jedno i za drugo vezivno mesto. Dostupnost albumina za vezivanje farmakoloških agenasa zavisi od različitih fizioloških i patoloških stanja kao što su starost, genetska predispozicija i oboljenja. Zato je poznavanje interakcija kompleksa metala sa albuminom važno za primenu potencijalnih antiumorskih agenasa [188].



Slika 28. Struktura HSA sa označenim mestima vezivanja (I i II), domenima (I-III) i poddomenima (A i B) [185].

Mesto vezivanja I sadrži dva klastera koji imaju polarne karakteristike. Bočni lanci aminokiselina Tyr150, His242 i Arg257 se nalaze na dnu klastera, dok se aminokiseline Lys199, Arg218 i Arg222 nalaze na spoljašnosti klastera [188]. Za ovo mesto se vezuju heterociklična aromatična jedinjenja koja usled negativnog naelektrisanja mogu da nagrade jaku vezu, a zbog svoje strukture mogu da se pozicioniraju između bočnih lanaca Leu238 i Ala291 [176]. Kristalografskim analizama je utvrđeno da je mesto vezivanja I veće u odnosu na mesto vezivanja II. Mesto vezivanja I je fleksibilno, zbog čega nije strogo stereoselektivno [189].

Na osnovu rezultata rendgenske strukturne analize albumina, zaključeno je da mesto vezivanja II predstavlja veliku šupljinu sa polarnim delom u kojoj se nalaze Tyr411 i Arg410 [190]. S obzirom da je mesto vezivanja II manje u odnosu na mesto vezivanja I, onemogućeno je vezivanje volumioznih molekula za ovaj položaj. Mala fleksibilnost mesta vezivanja II uslovljava veću stereoselektivnost [191,192]. Lekovi za koje je potvrđeno da se vezuju za ovo mesto vezivanja su diazepam, diflunisal i ibuprofen, jer reaguju sa hidroksilnom grupom Tyr411 [176].

Detaljna istraživanja mesta vezivanja albumina su pokazala da se lekovi, kao što su probenecid i amitricilin, vezuju za albumin, ali se ne vezuju za mesta vezivanja I i II. Iz navedenog se može zaključiti da je albumin kompleksan biomolekul sa više vezivnih mesta čija dostupnost zavisi od prirode lekova koji se za njega vezuju. Pored navedenih u albuminu postoje i druga mesta vezivanja, ali ona nisu još uvek u potpunosti okarakterisana [188]. Za hemin i bilirubin poddomen IB je primarno mesto vezivanja [193]. Sa druge strane, za azopromazon, varfarin, indometacin i azidotimidin poddomen IB predstavlja sekundarno mesto vezivanja za albumin [194].

2. PREDMET ISTRAŽIVANJA

Naučna istraživanja u okviru ove doktorske disertacije obuhvataju sintezu i karakterizaciju dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa koji kao mostne ligande sadrže 4,4'-bipiridin, 1,2-bis(4-piridil)etan, 1,2-bis(4-piridil)etilen, hinoksalin, hinazolin i ftalazin, a kao bidentatno koordinovan ligand etilendiamin. Istraživanja obuhvataju i ispitivanje interakcija dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa sa biološkim važnim molekulima kao što su dezoksiribonukleinska kiselina i bovin serum albumin, kao i biološka ispitivanja. Zadaci u okviru istraživanja ove doktorske disertacije su:

- 1. dinuklearnih Sinteza platina(II) i paladijum(II) kompleksa (Pt2), $[{Pt(en)Cl}_2(\mu-4,4'-bipy)]Cl_2 \cdot 2H_2O$ (**Pt1**), $[{Pt(en)Cl}_2(\mu-bpa)]Cl_2\cdot 4H_2O$ $[{Pt(en)Cl}_2(\mu-bpe)]Cl_2 \cdot 4H_2O$ (Pt3), $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-4,4'-bipy)](NO_3)_2$ (Pd1), $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-bpa)](NO_3)_2$ (Pd2), $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-bpe)](NO_3)_2$ (Pd3), $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-qx)](NO_3)_2$ (Pd4), $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-qz)](NO_3)_2$ (Pd5) i $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-phtz)](NO_3)_2$ (**Pd6**), gde 4,4'-bipy (4,4'-bipiridin), su bpa (1,2-bis(4-piridil)etan), bpe (1,2-bis(4-piridil)etilen), qx (hinoksalin), qz (hinazolin) i phtz (ftalazin) mostni ligandi, a en je bidentatno koordinovan etilendiamin. Karakterizacija sintetisanih kompleksa izvršiće se primenom ¹H i ¹³C NMR i IR spektroskopije, UV-Vis spektrofotometrije, elementalne mikroanalize i masene spektrometrije (Pt1–Pt3).
- 2. Primenom UV-Vis spektrofotometrije, fluorescentne spektroskopije, merenjem viskoziteta, FT–IR i far-IR spektroskopije kao i gel elektroforezom ispitivaće se interakcije sintetisanih dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa sa dezoksiribonukleinskom kiselinom koja je izolovana iz grudne žlezde teladi.
- 3. Metodom molekulskog dokinga ispitaće se načini interakcija dinuklearnih **Pt1-Pt3** kompleksa sa DNK.
- 4. Korišćenjem fluorescentne spektroskopije ispitaće se interakcije **Pd1-Pd6** kompleksa sa bovin serum albuminom.
- 5. In vitro citotoksični potencijal Pt1-Pt3 kompleksa ispitaće se na kancerogenim humanim ćelijskim linijama adenokarcinoma pluća (A549), melanoma (A375) i kolorektalnog karcinoma (HCT116), kancerogenoj ćelijskoj liniji melanoma miša (B16–F10), kao i na zdravoj ćelijskoj liniji fibroblasta pluća (MRC-5). Citotoksični potencijal Pd1-Pd6 kompleksa u *in vitro* uslovima ispitivaće se na humanim ćelijskim linijama kolorektalnog karcinoma (HCT116), kolorektalnog adenokarcinoma (SW480), adenokarcinoma pluća (A549) i mišijim ćelijskim linijama karcinoma kolona (CT26) i karcinoma pluća (LLC1).
- 6. Embriotoksičnost i anti-angiogeni potencijal dinuklearnih **Pt1-Pt3** kompleksa biće ispitivani u *in vivo* uslovima na modelu embriona zebrica (*Danio rerio*).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Hemikalije i reagensi

Hemikalije i reagensi 4,4'-bipiridin (4,4'-bipy), 1,2-bis(4-piridil)etan (bpa), 1,2-bis(4-piridil)etilen (bpe), etilendiamin (en), hinoksalin (1,4-benzodiazin, qx), hinazolin (1,3-benzodiazin, qz), ftalazin (2,3-benzodiazin, phtz), kalijum-tetrahloridoplatinat(II) $(K_2[PtCl_4]),$ kalijum-tetrahloridopaladat(II) K₂[PdCl₄]), etidijum-bromid (3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinijumbromid, EtBr). bisbenzimid H33258 (Hoechst 33258), dezoksiribonukleinska kiselina izolovana iz grudne žlezde teladi ("calf thymus-DNA", CT-DNK), serum albumin izolovan iz krvi goveda ("bovine serum albumin", BSA), fosfatni pufer (PBS), TRIS pufer (tris(hidroksimetil)aminometan), srebro-nitrat $(AgNO_3)$, kao i deuterisani rastvarači (deuterisana voda (D_2O) , dimetilsulfoksid $(DMSO-d_6)$) kupljeni su od Sigma-Aldrich Chemical Co. Mononukelarni kompleksi [Pt(en)Cl₂] i [Pd(en)Cl₂], koji su korišćeni za sintezu dinuklearnih kompleksa platine(II) i paladijuma(II), kao i *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] (*cis*-diammindihloridoplatina(II), cisplatina, *cis*-Pt), sintetisani su po modifikovanim postupcima koji su ranije opisani u literaturi [195-198]. Rastvarači upotrebljeni u ovom radu: dihlorometan, dietiletar, metanol, aceton i hloroform su komercijalni proizvodi analitičkog stepena čistoće. Za pripremanje rastvora upotrebljena je destilovana voda.

3.2. Eksperimentalne metode

Elementalna mikroanaliza: Elementalne mikroanalize za C, H i N parametre su rađene u Mikroanalitičkom odeljenju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

¹*H* i ¹³*C NMR merenja:* ¹*H* i ¹³*C NMR* spektri snimljeni su u D₂O kao rastvaraču, a TSP (natrijum-3-(trimetilsilil)propionat-2,2,3,3-d₆) je korišćen kao referentni standard. Svi spektri su snimani na spektrometru firme Varian Gemini 2000 (¹*H* spektri na 200, ¹³*C* spektri na 50 MHz) u standardnim NMR kivetama prečnika 5 mm, na 25 °C. Hemijska pomeranja su prikazana u ppm, a skalarna kuplovanja u hercima (Hz).

UV-Vis merenja: Elektronski-apsorpcioni (UV-Vis) spektri snimljeni su na Shimadzu doublebeam spektrofotometru, koji je opremljen kvarcnom Suprasil ćelijom za termostatiranje, u oblasti od 200 do 600 nm. Koncentracija rastvora dinuklearnih kompleksa bila je 5 · 10⁻⁵ M. Eksperimentalni rezultati obrađivani su primenom kompjuterskog programa Microsoft Office Excel 2010.

IR merenja: Infra-crveni (IR) spektri su snimljeni korišćenjem KBr tehnike na Perkin Elmer Spectrum One spektrometru u oblasti od 4000–450 cm⁻¹. Far-IR spektri su snimljeni korišćenjem CsI tehnike na Perkin Elmer 983 spektrometru koristeći Nujol ulje u oblasti od 600–240 cm⁻¹.

MS merenja: Maseni spektri visoke rezolucije (HRMS) su snimljeni na Agilent 6224 Accurate Mass TOF LC/MS instrumentu u acetonitrilu na Univerzitetu u Ljubljani.

pH merenja: Sva pH merenja su rađena na 25 °C koristeći Mettler Toledo Seven Compact S220-U pH-metar kalibrisan u odnosu na Mettler Toledo rastvore pufera pH vrednosti 4,00 i 7,00.
Fluorescentna merenja: Emisioni fluorescentni spektri su snimljeni na RF-1501 PC spektrofluorometru (Shimadzu, Japan).

Merenje viskoziteta: Viskozitet je meren korišćenjem rotacionog ALPHA L Fungilab viskozimetra opremljen 18 mL LCP osovinom. Vreme svakog uzorka je mereno šest puta digitalnom štopericom i dato je kao prosečno vreme u sekundama.

3.3. Sinteza dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa

3.3.1. Sinteza dinuklearnih platina(II) kompleksa

Po modifikovanom postupku, koji je opisan u literaturi [199-201], polazeći od mononuklearnog $[Pt(en)Cl_2]$ kompleksa, sintetisani dinuklearni su $[{Pt(en)Cl}_2(\mu-4,4'-bipy)]Cl_2\cdot 2H_2O$ (Pt1), $[{Pt(en)Cl}_2(\mu-bpa)]Cl_2\cdot 4H_2O$ (Pt2) i $[{Pt(en)Cl}_2(\mu-bpe)]Cl_2\cdot 4H_2O$ (**Pt3**) kompleksi (4,4)-bipy (4,4'-bipiridin), bpa (1,2-bis(4-piridil)etan) i bpe (1,2-bis(4-piridil)etilen) su mostni ligandi, a en je bidentatno koordinovan etilendiamin) [202].

U rastvor koji sadrži 218,8 mg (0,671 mmol) [Pt(en)Cl₂] u 5 mL dimetilformamida dodato je 111,7 mg (0,656 mmol) AgNO₃ ([Pt(en)Cl₂] : AgNO₃ = 1 : 0,98). Reakciona smeša je na sobnoj temperaturi ostavljena na mešalici u mraku za vreme od 24 h. Talog AgCl odvojen je ceđenjem, a u rastvor, koji sadrži [Pt(en)(DMF)Cl]⁺, dodato je 0,335 mmol liganda L (L je 4,4'-bipy, bpa ili bpe) u molskom odnosu 2:1. Reakciona smeša ostavljena je na mešalici za vreme od 24 h u mraku na sobnoj temeraturi. Nakon toga rastvarač (DMF) iz reakcione smeše odvojen je uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču, a suvi ostatak ispran je nekoliko puta dietil-etrom, a zatim je osušen na sobnoj temperaturi. Suvi ostatak je rastvoren u 0,5 M rastvoru LiCl. Talog svetlo žute boje dinuklearnih platina(II) kompleksa odvojen je ceđenjem, ispran metanolom i etrom, a zatim sušen na vazduhu. Čistoća i sastav dobijenih kompleksa provereni su primenom elementalne mikroanalize, NMR (¹H i ¹³C), IR spektroskopije, UV–Vis spektrofotometrije i masene spektrometrije.

[{Pt(en)Cl}₂(μ-4,4'-bipy)]Cl₂·2H₂O (**Pt1**). Prinos: 35% (0,0991 g). Izračunato za **Pt1** = C₁₄H₂₈N₆Cl₄O₂Pt₂ (Mr = 844,38): C, 19,91; H, 3,34; N, 9,95. Nađeno: C, 19,60; H, 3,29; N, 9,78%. ¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ = 2,77 (*m*, 8H, en); 7,93 (*d*, 4H, C2H, C6H, C2'H, C6'H, 4,4'-bipy); 8,90 (*d*, 4H, C3H, C5H, C3'H, C5'H, 4,4'-bipy) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, D₂O): δ = 50,78 i 51,05 (en); 127,28 (C2, C6, C2', C6'); 149,08 (C1, C1'); 156,18 (C3, C5, C3', C5') ppm. IR (KBr, v, cm⁻¹): ~ 3426 (O–H); 3119, 3061(N–H); 1615, 1384 (C = N/C = C, 4,4'-bipy). Far – IR (CsI, v, cm⁻¹): 252 (Pt–N(bipy)); 322, 349 (Pt-Cl); 476 (Pt–N(en)). UV–Vis (H₂O, λ_{max} , nm): 281 (ε = 1,9 · 10⁴ M⁻¹cm⁻¹). ESI-HRMS (CH₃CN): [[{Pt(en)Cl}₂(μ-4,4'-bipy)]²⁺ (*m*/*z* = 368,04); [Pt(en)Cl]⁺ (*m*/*z* = 290,00).

[{Pt(en)Cl}₂(μ -bpa)]Cl₂·4H₂O (**Pt2**). Prinos: 38% (0,1158 g). Izračunato za **Pt2** = C₁₆H₃₆N₆Cl₄O₄Pt₂ (Mr = 908,46): C, 21,15; H, 3,99; N, 9,25. Nađeno: C, 20,63; H, 3,87; N, 9,06 %. ¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ = 2,76 (*m*, 8H, en); 3,19 (*s*, 4H, bpa); 7,37 (*d*, 4H, C2H, C6H, C2'H, C6'H, bpa); 8,56 (*d*, 4H, C3H, C5H, C3'H, C5'H, bpa) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, D₂O): δ = 39,78 (bpa); 50,55 i 55,98 (en); 133,09 (C2, C6, C2', C6'); 157,27 (C3, C5, C3', C5'); 157,61 (C1, C1') ppm. IR (KBr, v, cm⁻¹): ~ 3428 (O–H); 3131, 3061 (N–H); 1619, 1561 (C=N/C=C, bpa). Far – IR (CsI, v, cm⁻¹): 250, 258 (Pt–N(bpa)); 316, 349 (Pt–Cl); 470 (Pt–

N(en)). UV–Vis (H₂O, λ_{max} , nm): 256 ($\epsilon = 1, 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). ESI–HRMS (CH₃CN): [[{Pt(en)Cl}₂(μ -bpa)]Cl]⁺ (m/z = 801,00); [Pt(en)Cl(μ -bpa)]⁺ (m/z = 475,10); [{Pt(en)Cl}₂(μ -bpa)]²⁺ (m/z = 382,05); [Pt(en)Cl]⁺ (m/z = 290,00).

[{Pt(en)Cl}₂(μ-bpe)]Cl₂·4H₂O (**Pt3**). Prinos: 40% (0,1216 g). Izračunato za **Pt3** = C₁₆H₃₄N₆Cl₄O₄Pt₂ (Mr = 906,45): C, 21,20; H, 3,78; N, 9,27. Nađeno: C, 21,04; H, 3,64; N, 9,17 %. ¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ = 2,71(*m*, 8H, en); 7,50 (*s*, 2H, bpe); 7,65 (*d*, 4H, C2H, C6H, C2'H, C6'H, bpe); 8,66 (*d*, 4H, C3H, C5H, C3'H, C5'H, bpe) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, D₂O): δ = 50,81 i 51,10 (en); 129,17 (C2, C6, C2', C6'); 134,53 (- CH=CH-, bpe); 149,91 (C1, C1'); 155,28 (C3, C5, C3', C5') ppm. IR (KBr, v, cm⁻¹): ~ 3401 (O–H); 3051 (N–H); 1614, 1505 (C=N/C=C, bpe); 1053 (CH=CH). Far – IR (CsI, v, cm⁻¹): 252, 260 (Pt–N(bpe)); 320, 351 (Pt-Cl); 472 (Pt–N(en)). UV–Vis (H₂O, λ_{max} , nm): 326 (ε = 2.0·10⁴ M⁻¹cm⁻¹). ESI–HRMS (CH₃CN): [[{Pt(en)Cl}₂(μ-bpe)]Cl]⁺ (*m*/*z* = 799,00); [Pt(en)Cl(μ-bpe)]⁺ (*m*/*z* = 473.00); [{Pt(en)Cl}₂(μ-bpe)]²⁺ (*m*/*z* = 381,04); [Pt(en)Cl]⁺ (*m*/*z* = 290,00).

3.3.2. Sinteza dinuklearnih paladijum(II) kompleksa

Po modifikovanom postupku, koji je opisan u literaturi [199,200,203], polazeći od mononuklearnog $[Pd(en)Cl_2]$ [196–198] kompleksa, sintetisani dinuklearni su $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-4,4'-bipy)](NO_3)_2$ (Pd1), $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-bpa)](NO_3)_2$ (Pd2), $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-bpe)](NO_3)_2$ (Pd4), (**Pd3**), $[{Pd(en)Cl}_{2}(\mu-qx)](NO_{3})_{2}$ $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-qz)](NO_3)_2$ (**Pd5**) $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-phtz)](NO_3)_2$ kompleksi i (**Pd6**) (4,4'-bipy (4,4'-bipiridin), bpa (1,2-bis(4-piridil)etan), bpe (1,2-bis(4-piridil)etilen), qx (hinoksalin), qz (hinazolin), phtz (ftalazin) su mostni ligandi, a en je bidentatno koordinovan etilendiamin) [204,205].

U rastvor koji sadrži [Pd(en)Cl₂] kompleks u dimetilformamidu dodat je AgNO₃ u molskom odnosu 1 : 0,98. Reakciona smeša je ostavljena na mešalici na sobnoj temperaturi u mraku u periodu od 24 h. Talog AgCl odvojen je ceđenjem, a u rastvor, koji sadrži [Pd(en)Cl(DMF)]⁺, dodata je mostni ligand L (L je 4,4'-bipy, bpa, bpe, qx, qz, phtz) u molskom odnosu [Pd(en)Cl(DMF)]⁺ : L = 2 : 1. Reakciona smeša je ostavljena u mraku na mešalici za vreme od 4 h na sobnoj temperaturi. Uparavanjem rastvarača na vakuum uparivaču smanjena je zapremina rastvora na 5 mL, a nakon toga u rastvor je dodato 20 mL dihlormetana. Dobijeni talog žute boje, odvojen je ceđenjem na vakuumu, ispran etrom i sušen na vazduhu. Čistoća i sastav dobijenih kompleksa provereni su primenom elementalne mikroanalize, NMR (¹H i ¹³C) i IR spektroskopije, kao i UV–Vis spektrofotometrije.

[{Pd(en)Cl}₂(μ-4,4'-bipy)](NO₃)₂ (Pd1). Prinos 55% (0,0564 g). Izračunato za Pd1 = C₁₄H₂₄N₈Cl₂O₆Pd₂ (Mr = 684,14): C, 24,58; H, 3,54; N, 16,38; Nađeno: C, 24,22; H, 3,62; N, 16,32 %. ¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ = 2,85 (s, 8H, en); 7,95 (d, 4H, C2H, C6H, C2'H, C6'H, 4,4'-bipy); 8,94 (d, 4H, C3H, C5H, C3'H, C5'H, 4,4'-bipy) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, D₂O): δ = 45 i 46 (en); 124 (C2, C6, C2', C6'); 146 (C1, C1'); 156 (C3, C5, C3', C5') ppm. IR (KBr, ν, cm⁻¹): ~3450 (NH₂); 3209, 3090 (NH₂); 1612, 1536, 1492 (C=N/C=C, 4,4'-bipy); 1351 (NO₃). UV–Vis (H₂O, λ_{max}, nm): 259 (ε = 1,3 · 10⁴ M⁻¹cm⁻¹).

 $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-bpa)](NO_3)_2$ (Pd2). Prinos 57% (0,0609 g). Izračunato za Pd2 = $C_{16}H_{28}N_8Cl_2O_6Pd_2$ (Mr = 712,19): C, 26,98; H, 3,96; N, 15,73; Nađeno: C, 27,10; H, 4,04; N,

15,85 %. ¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ = 2,84 (s, 8H, en); 3,20 (s, 4H, bpa); 7,37 (d, 4H, C2H, C6H, C2'H, C6'H, bpa); 8,44 (d, 4H, C3H, C5H, C3'H, C5'H, bpa) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, D₂O): δ = 39 (bpa); 52 (en); 133 (C2, C6, C2', C6'); 154 (C3, C5, C3', C5'); 156 (C1, C1') ppm. IR (KBr, ν, cm⁻¹): ~3417 (NH₂); 3190, 3065 (NH₂); 1618, 1435 (C=N/C=C, bpa); 1383, 1353 (NO₃). UV–Vis (H₂O, λ_{max} , nm): 257 (ϵ = 1,1 · 10⁴ M⁻¹cm⁻¹).

[{Pd(en)Cl}₂(μ-bpe)](NO₃)₂ (**Pd3**). Prinos 60% (0,0639 g). Izračunato za **Pd3** = C₁₆H₂₆N₈Cl₂O₆Pd₂ (Mr = 710,17): C, 27,06; H, 3,69; N, 15,78; Nađeno: C, 27,11; H, 3,72; N, 15,68 %. ¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ = 2,75 (s, 8H, en); 7,54 (s, 2H, bpe); 7,69 (d, 4H, C2H, C6H, C2'H, C6'H, bpe); 8,68 (d, 4H, C3H, C5H, C3'H, C5'H, bpe) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, D₂O): δ = 45 i 46 (en); 124 (C2, C6, C2', C6'); 131 (–CH=CH–, bpe); 147 (C1, C1'); 151 (C3, C5, C3', C5') ppm. IR (KBr, v, cm⁻¹): ~3429 (NH₂); 3199, 3055 (NH₂); 1658, 1611 (C=N/C=C, bpe); 1059 (CH=CH); 1384, 1353 (NO₃). UV–Vis (H₂O, λ_{max}, nm): 299 (ε = 1,4 · 10⁴ M⁻¹cm⁻¹).

[{Pd(en)Cl}₂(μ-qx)](NO₃)₂ (Pd4). Prinos 54% (0,0590 g). Izračunato za Pd4 = $C_{12}H_{22}N_8Cl_2O_6Pd_2$ (Mr = 658,10): C, 21,90; H, 3,37; N, 17,03; Nađeno: C, 22,11; H, 3,26; N, 17,29 %. ¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ = 2,71–2,88 (m, 8H, en); 8,41 (m, 2H, C6H, C7H, qx); 9,59 (s, 2H, C5H, C8H, qx); 9,73 (m, 2H, C2H, C3H, qx) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, D₂O): δ = 49 i 50 (en); 130 (C6, C7), 136 (C5, C8); 145 (C4a, C8a); 152 (C2, C3) ppm. IR (KBr, v, cm⁻¹): ~ 3198, 3104 (N–H); 1614, 1575, 1507 (C = C i C= N, qx); 1324 (NO₃); 865 (C – H, qx); 764 (NO₃). UV–Vis (H₂O, λ_{max}, nm): 234 (ε = 40,0 · 10³ M⁻¹cm⁻¹) i 316 (ε = 10,4 · 10³ M⁻¹cm⁻¹).

[{Pd(en)Cl}₂(μ-qz)](NO₃)₂ (Pd5). Prinos 60% (0,0655 g). Izračunato za Pd5 = C₁₂H₂₂N₈Cl₂O₆Pd₂ (Mr = 658,10): C, 21,90; H, 3,37; N, 17,03; Nađeno: C, 21,79; H, 3,26; N, 17,11 %. ¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ = 2,65 – 2,81 (m, 8H, en); 8,30 (m, 2H, C6H, C7H, qz); 8,54 (m, 2H, C5H, C8H, qz); 9,52 (d, H, C4H, qz); 10,12 (d, H, C2H, qz) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, D₂O): δ = 51 (en); 128 (C4a); 130 i 135 (C5 i C8); 132 i 144 (C6 i C7); 154 (C8a); 162 (C4); 174 (C2) ppm. IR (KBr, v, cm⁻¹): ~ 3207, 3103 (N–H)); 1617, 1567, 1495 (C = C i C = N, qz); 1321 (NO₃); 823, 783 (C – H, qz); 753 (NO₃). UV–Vis (H₂O, λ_{max}, nm): 226 (ε = 44,7 · 10³ M⁻¹cm⁻¹) i 309 (ε = 4,5 · 10³ M⁻¹cm⁻¹).

[{Pd(en)Cl}₂(μ-phtz)](NO₃)₂ (**Pd6**). Prinos 56% (0,0612 g). Izračunato za **Pd6** = C₁₂H₂₂N₈Cl₂O₆Pd₂ (Mr = 658,10): C, 21,90; H, 3,37; N, 17,03; Nađeno: C, 22,36; H, 3,48; N, 17,09 %. ¹H NMR (200 MHz, D₂O): δ = 2,58–2,88 (m, 8H, en); 8,36 (m, 4H, C5H, C6H, C7H, C8H, phtz); 10.01 (s, 2H, C1H, C4H, phtz) ppm. ¹³C NMR (50 MHz, D₂O): δ = 50 (en); 130 (C4a, C8a); 130 (C5, C8); 139 (C6, C7); 163 (C1, C4) ppm. IR (KBr, v, cm⁻¹): ~ 3204, 3107 (N–H); 1660, 1586, 1566 (C= C i C = N, phtz); 1374 (NO₃); 826, 802 (C – H, phtz); 774 (NO₃). UV–Vis (H₂O, λ_{max}, nm): 231 (ε = 48,5 · 10³ M⁻¹cm⁻¹) i 312 (ε = 4,0 · 10³ M⁻¹cm⁻¹).

3.3.3. Stabilnost dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa

Stabilnost sintetisanih dinuklearnih **Pt1–Pt3** i **Pd1–Pd3** kompleksa praćena je primenom UV–Vis spektrofotometrije u vremenskom periodu od 24 h. Za rastvaranje sintetisanih dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa korišćena je smeša rastvarača voda-dimetilsulfoksid (H₂O/DMSO) u zapreminskom odnosu 9 : 1. Uzorci su čuvani na sobnoj

temperaturi u mraku između merenja. Stabilnost je prikazana grafički kao zavisnost talasne dužine od apsorpcije.

¹H NMR spektroskopija je korišćena za ispitivanje stabilnosti dinuklearnih **Pd1–Pd3** kompleksa. ¹H NMR spektri su snimani u D₂O i u smeši rastvarača D₂O/DMSO- d_6 , koji su pomešani u zapreminskom odnosu 9 : 1. Stabilnost kompleksa je praćena u različitim vremenskim intervalima (t = 0, 8 i 24 h). Uzorci su čuvani na sobnoj temperaturi u mraku između merenja.

3.4. Interakcije dinuklearnih kompleksa platine(II) i paladijuma(II) sa DNK

3.4.1. UV–Vis spektrofotometrijska merenja

Interakcije sintetisanih platine(II) i paladijuma(II) kompleksa sa biomolekulom CT-DNK izučavane su primenom UV-Vis spektrofotometrije. Rastvor CT-DNK dobijen je rastvaranjem 5 mg CT–DNK u 5 mL 0,01 M fosfatnog pufera kao rastvarača (PBS). Merenjem odnosa UV apsorpcije ovako dobijenog rastvora na 260 nm i 280 nm proverava se da li se CT–DNK molekul oslobodio proteina. Ako je odnos UV apsorpcije približno 1,8 – 1,9 znači da se CT-DNK oslobodila proteinskog dela i takav rastvor se čuva na 4 °C [206,207]. Koncentracija rastvora CT-DNK određena je primenom Lamber-Berovog (Lambert-Beer) vrednost apsorpcije na 260 nm i ekstincionog koeficijenta zakona, uzimajući $\varepsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Rastvori ispitivanih kompleksa, cisplatine, EtBr i Hoechst 33258 su dobijeni rastvaranjem odgovarajućih supstanci u 0,01 M PBS puferu i korišćeni su za ispitivanje interakcija sa CT–DNK. Serija rastvora je pripremljena mešanjem rastvora ispitivanih jedinjenja konstantne koncentracije (8 µM) sa inkrementima CT-DNK polaznog rastvora. ispitivanih kompleksa sa CT-DNK su praćene primenom UV-Vis Interakcije spektrofotometrije na temperaturi od 37 °C, a UV-Vis spektri su snimani u oblasti od 200 do 500 nm.

U cilju određivanja načina interakcije ispitivanih kompleksa sa CT–DNK izračunate su unutrašnje konstante vezivanja (K_b) primenom sledeće jednačine [208]:

$$\frac{[DNK]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[DNK]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_a - \varepsilon_f)}$$
(1)

gde je [DNK] koncentracija CT–DNK, ε_a i ε_b su ekstincioni koeficijenti rastvora kompleksa i rastvora koji su dobijeni mešanjem kompleksa sa CT–DNK. Ekstincioni koeficijent ε_f određen je iz kalibracione krive koja je dobijena merenjem apsorpcije slobodnog kompleksa pri različitim koncentracijama. Ekstincioni koeficijent ε_a izračunat je na osnovu Lamber-Berovog zakona, kao odnos apsorpcije ispitivanog rastvora A_{obs} i koncentracije kompleksa u tom rastvoru, (A_{obs} – A_{DNK})/[kompleks]. Dobijeni rezultati prikazani su grafički kao zavisnost [DNK]/(ε_a - ε_f) od [DNK]. Nagib dobijene prave ima vrednost 1/(ε_b - ε_f), dok je odsečak na y osi 1/K_b·(ε_b - ε_f). Unutrašnja konstanta vezivanja (K_b) određena je iz odnosa nagiba prave i odsečka na y osi. Dobijene vrednosti K_b korišćene su za izračunavanje slobodne Gibsove (*Gibbs*) energije po jednačini:

$$\Delta G = -RT lnK_b \tag{2}$$

gde je R univerzalna gasna konstanta ($R = 8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$), a T je temperatura izražena u kelvinima (K).

UV–Vis spektrofotometrijska merenja su korišćena za ispitivanje interakcija **Pt1–Pt3** kompleksa, *cis*-Pt, EtBr i Hoechst 33258 sa CT–DNK. Ispitivani rastvori dobijeni su mešanjem

platina(II) kompleksa, EtBr i Hoechst 33258 koncentracije od 0 - 26 μ M sa CT–DNK konstantne koncentracije u PBS puferu. Nakon 24 h, rastvori su centrifugirani 10 min. Apsorpcija je određena primenom Lamber-Berovog zakona na 260 nm. Stehiometrijski izračunata apsorpcija (A_{cal}) je izračunata po jednačini [209]:

$$A_{cal} = \varepsilon_{260}(Q) + \varepsilon_{260}(CT - DNK) \cdot b \cdot [CT - DNK]$$
(3)

gde je $\varepsilon_{260}(Q)$ ekstinkcioni koeficijent **Pt1–Pt3** kompleksa, *cis*-Pt, EtBr i Hoechst 33258 na 260 nm, [Q] je koncentracija ispitivanog jedinjenja, $\varepsilon_{260}(CT-DNK)$ je ekstinkcioni koeficijent CT–DNK na 260 nm B-DNK oblika i [CT–DNK] je koncentracija CT–DNK.

3.4.2. Fluorescentna merenja

Emisiona fluorescentna spektroskopija je upotrebljena za ispitivanje reakcija sintetisanih dinuklearnih kompleksa i etidijum-bromida sa CT–DNK. EtBr je standardni ispitivani interkalator. Fluorescentni spektri EtBr/CT–DNK su snimani u odsustvu i u prisustvu dinuklearnih kompleksa. Svi rastvori su pripremljeni u 0,01 M PBS puferu kao rastvaraču. U rastvor koji sadrži EtBr i CT–DNK u molskom odnosu 1 : 1, dodata je odgovarajuća količina dinuklearnih platine(II) ili paladijuma(II) kompleksa u molskim odnosima r = 0 – 1 (Pt(II) : EtBr/CT–DNK) [202] i r = 0 – 0,9 (Pd(II) : EtBr/CT–DNK) [204,205]. Emisioni spektri serije rastvora snimani su u opsegu 550 - 750 nm, sa ekscitacijom na 527 nm i emisijom na 612 nm, na sobnoj temperaturi.

Jačina interakcije dinuklearnih kompleksa sa CT–DNK određuje se izračunavanjem Stern-Volmerove (*Stern-Volmer*) konstante (K_{sv}) koja je određena na osnovu sledeće jednačine [210,211]:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv}[Q]$$
 (4)

gde su I_0 i I intenziteti fluorescencije pre i nakon dodavanja kompleksa u rastvor EtBr/CT–DNK dok je [Q] koncentracija kompleksa. Dobijeni rezultati prikazani su grafički kao zavisnost I_0/I od [Q]. Iz nagiba dobijene prave određena je Stern-Volmerova konstanta.

Konstanta stabilnosti (K_a) kao i broj vezujućih mesta (n) dobijeni su primenon Skečerdove (*Scatchard*) jednačine [212]:

$$\log \frac{I_0 - I}{I} = \log K_a + n \cdot \log[Q] \tag{5}$$

gde su I₀ i I intenziteti fluorescencije pre i nakon dodavanja kompleksa u rastvor EtBr/CT–DNK dok je [Q] koncentracija kompleksa. Dobijeni rezultati prikazani su grafički kao zavisnost $\log(I_0-I)/I$ od [Q]. Vrednost K_a dobijena je iz preseka prave sa y osom, a broj vezujućih mesta (n) iz nagiba prave.

3.4.3. Merenje viskoziteta

Merenjem viskoziteta rastvora koji sadrži CT–DNK i ispitivani kompleks može se predvideti način interakcije ispitivanog kompleksa sa DNK. Napravljena je serija rastvora u kojima je koncentracija CT–DNK bila konstantna, a koncentracija kompleksa varijabilna (molski odnos r([kompleks]/[CT–DNK]) = 0 – 0,9) [202,204,205]. Rastvori su pripremljeni u 0,01 M PBS puferu kao rastvaraču na sobnoj temperaturi.

Vrednost viskoziteta je izračunata prema jednačini:

$$\eta = \frac{t - t_0}{t_0} \tag{6}$$

gde t predstavlja srednje vreme protoka ispitivanog rastvora, a t₀ je srednje vreme protoka fosfatnog pufera. Rezultati su prezentovani kao $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ u odnosu na r gde je η viskozitet CT–DNK u prisustvu ispitivanih kompleksa, a η_0 je viskozitet CT–DNK u fosfatnom puferu.

3.4.4. FT–IR i far-IR merenja

U cilju bližeg određivanja načina interakcije sintetisanih platina(II) kompleksa sa CT–DNK snimani su FT–IR i far-IR spektri CT–DNK u prisustvu i odsustvu dinuklearnih platina(II) kompleksa. Rastvori **Pt1–Pt3** kompleksa i CT–DNK dobijeni su rastvaranjem odgovarajućih supstanci u 10 mM TRIS puferu kao rastvaraču (150 mM NaCl, pH = 7,4). Rastvori dinuklearnih platina(II) kompleksa koncentracije 8 μ M pomešani su sa rastvorom CT–DNK (r = 0,5; 1,0 i 2,0) i ostavljeni 24 h na sobnoj temperaturi. Zatim je rastvarač uparen na vodenom kupatilu (t = 30 °C). Suvi ostatak je korišćen za snimanje IR spektara. Suvi ostatak CT–DNK i platina(II) kompleksa dobijen je na isti način.

3.4.5. Gel elektroforeza

Genomska DNK (gDNK) iz *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 je izolovana korišćenjem DNeasy seta (Qiagen, Hilden, Nemačka) i upotrebljena je kao model dvolančane DNK. Kvalitet i koncentracija DNK su procenjeni snimanjem UV–Vis spektra na spektrofotometru NanoVue Plus (GE Healthcare, Frajburg, Nemačka). Sposobnost vezivanja **Pt1–Pt3** kompleksa za gDNK iz *P. aeruginosa* ispitivana je elektroforezom u agaroznom gelu [213]. Za eksperimente gel elektroforeze, gDNK (200 ng) je tretirana kompleksima **Pt1–Pt3** varijabilne koncentracije (5, 25, 50 μ M) u TE (10 mM TRIS pufer/1 mM EDTA, pH = 8) puferu, a sadržaj je inkubiran 2 h na 37 °C. Zatim je tako tretirana gDNK podvrgnuta gel elektroforezi na 0,8% (w/v) agaroznom gelu koji sadrži 0,1 μ g/mL etidijum-bromida u TAE (40 mM TRIS acetat/1 mM EDTA, pH = 7,4) puferu na 60 V u vremenskom period od 2 h. Gelovi su vizualizovani i analizirani primenom Gel Doc system (Biometra, Germany) opremljen sa Image LabTM softverom.

3.4.6. Molekulski doking

Molekulski doking je korišćen za predviđanje načina vezivanja sintetisanih kompleksa Pt1-Pt3 kao i njihovih akva derivata Pt1W-Pt3W za DNK [202]. Strukture sintetisanih dinuklearnih platina(II) kompleksa kao i njihovih akva derivata su optimizovane metodom wb97xd, sa 6-31g** bazisom za atome nemetala i lanl2dz bazisom za platinu. Merc-Kolman (The Merz-Kollman) atomska naelektrisanja su izračunata za sve atome na istom nivou teorije, prema RESP proceduri, koja je data u literaturi [214]. Struktura DNK (pdb kod: 1BNA), ekstrahovana iz Proteinske baze podataka (pdb, od eng. Protein Data Bank), upotrebljena je za ispitivanje interakcija sa dinuklearnim platina(II) kompleksima i njihovim akva derivatima. Ispitivana dvolančana struktura DNK je d(CpGpCpGpApApTpTpCpGpCpG) dodekamer, koja sadrži dva regiona bogata G=C parovima i jednim regionom bogatim A=T parovima, smeštenim između pomenuta dva regiona [215]. Ispitivane su i interakcije kompleksa platine(II) sa strukturom DNK, ekstrahovane iz pdb strukture, sa kodom 1XRW [148]. Kod ove DNK strukture postoji i interkalaciona šupljina, nastala čišćenjem strukture DNK. Za potrebe doking studija, struktura DNK je očišćena od kristalne vode, i ostalih jedinjenja vezanih za DNK heliks. Interkalaciona šupljina je nastala uklanjanjem interkaliranog kompleksa platine(II), koji sadrži koordinovani akridinski ligand.

AutoDock 4.2 softver je korišćen za pripremu strukture DNK, dok je AutoDockTools program korišćen za proračune [216]. Interakciona kutija, koja definiše prostor za ispitivanje interakcija, sadrži celovitu DNK strukturu, dok Lamarkianov (*Lamarckian*) genetski algoritam je upotrebljen kao metoda virtualnog pretraživanja, sa 50 konformacionih koraka po svakom doking skrinu (*docking screen*). The Discovery Studio (BIOVIA Software product) je korišćen za vizuelizaciju i analizu dobijenih rezultata [217]. Strukture A- i B-DNK konformacije (pdb kod: 1BN i 5MVK) dobijene su iz pdb.

3.5. Interakcije dinuklearnih kompleksa paladijuma(II) sa BSA

Primenom emisione fluorescentne spektroskopije ispitivane su reakcije sintetisanih dinuklearnih **Pd1–Pd6** kompleksa sa serum albuminom izolovanog iz krvi goveda (BSA) u 0,01 M fosfatnom puferu kao rastvaraču [204,205]. Serija rastvora je napravljena tako da koncentracija BSA bude konstantna (8 μ M) dok je koncentracija dinuklearnih kompleksa bila u intervalu 0 – 50 μ M, odnosno u molskom odnosu r = 0 – 25. Emisioni spektri ovako pripremljenih rastvora snimani su nakon inkubacije od 4 h na sobnoj temperaturi, u opsegu 300-500 nm sa ekstincijom na 295 nm. Ispitivani dinuklearni kompleksi paladijuma(II) ne pokazuju emisioni intenzitet što je dokazano snimanjem emisionih spektara paladijum(II) kompleksa u fosfatnom puferu pod istim eksperimentalnim uslovima.

U cilju proučavanja mehanizma interakcija dinuklearnih **Pd1–Pd6** kompleksa, za izračunavanje Stern-Volmerove konstante (K_{sv}), korišćena je Stern-Volmerova jednačina (jednačina 4) [111,112]. Konstanta vezivanja (K_a) kao i broj vezivnih mesta (n) dobijeni su iz Skečardove jednačine (jednačina 5)

3.6. In vitro i in vivo ispitivanja citotoksičnog potencijala Pt1-Pt3 kompleksa

3.6.1. In vitro ispitivanja

Humane ćelijske linije adenokarcinoma pluća (A549), melanoma (A375) i kolorektalnog karcinoma (HCT116), kao i zdrave ćelijske linije fibroblasta pluća (MRC-5) (*American Type Culture Collection*) upotrebljene su za ispitivanje citotoksičnog potencijala **Pt1–Pt3**. Ćelije su uzgajane u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂ na 37 °C, u RPMI-1640 podlozi suplementiranoj sa 100 µg/mL streptomicina, 100 U/mL penicilina i 10% goveđeg seruma (FBS) na pločicama sa 96 otvora, pri čemu je koncentracija bila $1 \cdot 10^4$ ćelija po otvoru.

Nakon 24 h inkubacije u ispitivane ćelijske linije (A549, A375, HCT116 i MRC-5) dodati su rastvori ispitivanih dinuklearnih kompleksa platine(II) u koncentracijama od 4 do 200 μ M. U kontrolni uzorak dodat je dimetilsulfoksid, a kontrolna proba bili su otvori sa 200 μ L hranljivog medijuma. Nakon 48 h inkubacije, proliferacija ćelija određena je primenom MTT testa (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid). U svaki otvor dodat je sveže sterilisani MTT rastvor (0,5 mg/mL), a zatim su ploče inkubirane još 1 h. Proliferacija ćelija je određena na osnovu promene apsorpcije na 540 nm, a merenja su vršena na Tecan Infinite 200 Pro čitaču sa više pločica (*Tecan Group, Männedorf, Švajcarska*). Svi testovi su rađeni dva puta sa po četiri merenja, a rezultati su prikazani u procentima u odnosu na kontrolnu probu (netretirane ćelijske linije, 100%). Procenat preživljavanja ćelija (%) izračunat je primenom formule:

$$Procenat \text{ preživljavanja} = \frac{OD(\text{ispitivane ćelije})}{OD(\text{kontrolna proba})} \cdot 100$$
(7)

gde je OD vrednost optičke gustine ćelija. Rezultati su prikazani u funkciji koncentracije, a iz dobijenih grafika određene su IC_{50} vrednosti. IC_{50} vrednost se definiše kao koncentracija jedinjenja koja inhibira 50 % rast ćelija u odnosu na netretirane ćelijske linije (kontrolna proba).

3.6.2. In vivo ispitivanja

Embriotoksičnost i anti-angiogeni potencijal

Evaluacija toksičnosti dinuklearnih platina(II) kompleksa ispitivana je na modelu embriona zebrica (Danio rerio) po standardima OECD Vodič za testiranje hemikalija (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals) [218]. Svi eksperimenti su izvođeni u skladu sa Evropskom direktivom 2010/63/EU i etničkim smernicama "Vodiča za negu i korišćenje laboratorijskih životinja" Instituta za Molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Embrioni divljih ribica (zebrica) su gajeni u uzgajalištu za zebrice na konstantnoj temperaturi (28 °C), u svetlosnom režimu 14 h svetlo i 10 h bez svetla. Embrioni su redovno hranjeni, dva puta dnevno, komercijalnim suvim pahuljicama (TetraMinTM flakes; Tetra Melle, Germany) i jednom dnevno svežom Artemia nauplii hranom. Embrioni zebrica se dobijaju parenjem adultnih ženki i mužjaka nakon čega se skupljuju i raspoređuju u ploče sa 24 otvora tako da svaki otvor sadrži 10 embriona. Nakon toga, u otvore se dodaje 1 ml vode (0,2 g/L Instant Ocean® Salt u destilovanoj vodi) i embrioni se gaje na 28 °C. Za procenu smrtnosti zebrica i toksičnosti ispitivanih Pt1-Pt3 kompleksa, dobijeni embrioni su 6 h nakon oplodnje tretirani različitim koncentracijama kompleksa. Kao negativna kontrolna proba korišćen je 0,25% DMSO, a pozitivna kontrolna proba bila je cisplatina. Eksperimenti su rađeni tri puta sa po 30 embriona po ispitivanoj koncentraciji. Radi određivanja toksičnosti ispitivanih dinuklearnih platina(II) kompleksa, apikalne tačke su snimane svaki dan, na 120 hpf¹ pomoću invertnog mikroskopa (CKX41, Olympus, Tokyo, Japan). Mrtvi embrioni se broje i odbacuju na svakih 24 h. Na 120 hpf, ebrionima se prati brzina otkucaja srca, daje im se anestezija (0,1 % rastvor trikaina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)), fotografišu se zamrzavaju na - 20 °C duže od 24h.

Anti-angiogeni potencijal dinuklearnih platina(II) kompleksa i cisplatine je ispitan na transgenim embrionima zebrica Tg(*fli1*:GFP) sa označenim EGFP endotelnim ćelijama, metodom koja je opisana u literaturi [219]. Embrioni zebrica su na 6 hpf tretirani **Pt1–Pt3** kompleksima u opsegu netoksičnih koncentracija i inkubirani na 28 °C. Nakon tretmana, embrioni su anestezirani sa 0,02 % trikaina i fotografisani. Razvijeni intersegmentalni krvni sudovi (ISVs), dorzalni uzdužni anastomotski sudovi (DLAVs) na 48 hpf i subintestinalni krvni sudovi (SIVs) na 72 hpf embriona su pregledani i snimljeni fluorescentnim mikroskopom (*Olimpus BX51, Applied, Imaging Corp., San Jose, CA, USA*). Lek sunitibin malat (*Sutent, Pfizer, New York*), koji pokazuje anti-angiogenu aktivnost i nalazi se u kliničkoj upotrebi, korišćen je kao pozitivna kontrolna proba.

Citotoksični potencijal Pt1–Pt3 kompleksa prema B16–F10 i HCT-116 ćelijskim linijama

Ćelijske linije humanog karcinoma injektirane su u embrione zebrica, po postupku koji je ranije opisan u literaturi [220]. Ćelijske linije humanog kolorektalnog karcinoma (HCT-116) i kancerogene ćelijske linije melanoma miša (B16-F10), uzgajane su kao što je prethodno opisao (3.7.1.), a nakon uzgajanja isprane su rastvorom fosfatnog pufera koji sadrži tripsin (0,25% tripsin/0,53 mM EDTA). Ćelije su peletirane centrifugiranjem na 1200 rpm u

¹ Skraćenica hpf potiče od engleske reči *high-pressure freezing* što znači zamrzavanje pod visokim pritiskom.

vremenskom intervalu od 5 min i rastvorene su u RPMI podlozi koja ne sadrži serum. Nakon toga, ćelije su označene pomoću CellTracker-a (*Thermofisher Scientific*) prema uputstvu proizvođača, pri čemu je koncentracija ćelija bila 2 μ M. Nakon 48 h od injektiranja, embrioni su anestezirani sa 0,02% trikaina, i u njih je mikroinjektirano, pomoću pneumatske pikopumpe (PV820, *World Precision Instruments, SAD*), 10 nL suspenzije koja sadrži 300 ispitivanih kancerogenih ćelija. Tačan broj ćelija je određen vizuelnim brojanjem nakon ubrizgavanja iste zapremine suspenzije na mikroskopsko staklo. Nakon injektiranja, embrioni su inkubirani 1 h na 28 °C, mrtvi embrioni su uklonjeni, a živi su raspoređeni na pločice koje sadrže 24 otvora, a svaki otvor sadrži 10 embriona u 1 mL embrionalne vode. Embrioni su tretirani različitim koncentracijama **Pt1–Pt3** kompleksa (5,0 12,5 i 25,0 μ M) i gajeni su na 33 °C. Kao pozitivna kontrola korišćena je cisplatina, dok je negativna kontrola bio 0,05% rastvor DMSO. Svakog dana beležen je broj preživelih embriona. Radi procene uticaja ispitivanih kompleksa na razvoj tumorske mase, metastaze kancerogenih ćelija, formiranje sekundarnog tumora kao i formiranje tumora izazvanim angiogenezom u SIV regionu, embrioni su svakodnevno pregledani pod fluorescentnim mikroskopom.

3.7. In vitro ispitivanja citotoksičnog potencijala Pd1-Pd6 kompleksa

Za ispitivanje citotoksičnog potencijala sintetisanih dinuklearnih paladijum(II) kompleksa korišćene su humane ćelijske linije kolorektalnog karcinoma (HCT116), kolorektalnog adenokarcinoma (SW480), adenokarcinoma pluća (A549), mišije ćelijske linije karcinoma kolona (CT26) i karcinoma pluća (LLC1) (*American Type Culture Collection*). Tumorske ćelije su kultivisane u kompletnom DMEM medijumu (*Dulbecco`s Modified Eagles Medium*) (Sigma-Aldrich) u atmosferi sa 5% CO₂ u inkubatoru na pločicama sa 96 otvora, pri čemu je koncentracija bila $5 \cdot 10^3$ ćelija/100 µL po otvoru na temperaturi od 37 °C. Samo suspenzije sa više od 95% preživelih ćelija su korišćene u svim ekperimentima. Tripan plavi rastvor je korišćen za određivanje broja preživelih tumorskih ćelija. Ispitivani **Pd1–Pd6** kompleksi su rastvoreni u vodi koncentracije 10 mM i filtrirani kroz filtere sa porama prečnika 0,22 mm. Ovako pripremljeni rastvori su razblaženi neposredno pre korišćenja kako bi se izbegla promena hemijske strukture ispitivanih kompleksa.

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid) je rastvoren u fosfatnom puferu (5 g/L, pH = 7,20) i filtriran je kroz filtere sa porama prečnika 0,22 mm. Svi korišćeni reagensi su nabavljeni od Sigma-Aldrich Chemical Co.

Nakon 24 h inkubacije ispitivanih ćelija dodata je različita koncentracija paladijum(II) kompleksa kao i cisplatine koja je bila u opsegu od 7,8 do 1000 μ M. Zatim su ploče inkubirane još 72 h. Nakon inkubacije uklonjen je medijum i MTT rastvor, a u svaki otvor je dodato po 20 μ L rastvora PBS pufera (5 mg/mL), a nakon toga ploče su inkubirane još 4 h. Intenzitet ljubičaste boje je meren multifunkcionalnim čitačem mikrotitar ploča Zenyth 3100 (*AnthosLabtec Instruments*) na talasnoj dužini od 595 nm. Procenat živih ćelija izračunat je pomoću formule:

% citotoksičnosti =
$$\frac{(E-B)}{(S-B)} \cdot 100$$
 (8)

gde je B apsorpcija kontrolne probe, E je apsorpcija ćelija koje su tretirane ispitivanim dinuklearnim kompleksom paladijuma(II), a S je apsorpcija netretiranih ćelija.

Aneksin V- test dvostrukog bojenja

Nakon 24 h tretiranja ispitivanim paladijum(II) kompleksima koncentracije 65,5 μ M, CT26 i LLC1 ćelije su sakupljene, isprane PBS puferom i ponovo suspendovane u ledeno hladnom puferu za vezivanje (10·pufera za vezivanje: 0,1 M Hepes/NaOH (pH = 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂). Aneksin V-FITC (Aneksin V) (*BD Pharmingen, San Diego, California, USA*) i propidijum-jodid (PI, Sigma-Aldrich) su dodati u svaki uzorak i inkubirani u mraku 15 min. Procenat mrtvih ćelija je određen FACS Calibur protočnim citometrom (*BD Biosciences, San Jose, USA*) a podaci su analizirani-pomoću FlowJo (Tree Star) softvera. Analiza ćelijskog ciklusa je rađena tako što su ćelije CT26 i LLC1 nakon 24 h tretmana paladiujum(II) kompleksima koncentracije 62,5 μ M, obojene Vybrant DyeCycleTM Ruby bojom (*Thermo Fisher Scientific, Inc. USA*). Posle 30 minuta inkubacije na 37 °C, ćelije su analizirane FACS Calibur protočnim citometrom. Distribucija ćelijskog ciklusa je analizirana korišćenjem FlowJo softvera.

Protočna citometrijska analiza ekspresije Ki67

Ćelije CT26 i LLC1, tretirane dinuklearnim paladijum(II) kompleksima i cisplatinom, koncentracije 62,5 μ M tokom 24 h, su fiksirane, permeabilizovane puferom za permeabilizaciju (*BD Bioscience*) i inkubirane 30 min sa Ki67 specifičnim antitelom konjugovanim fluorescentnim izotiocijanatom (11-5698-82, *eBioscience, San Diego, USA*). Protočna citometrija je rađena na FACS Calibur protočnom citometru, a podaci su analizirani korišćenjem FlowJo softvera.

Statistički podaci su obrađeni u programu za statističku obradu rezultata SPSS 20.0 for Windows software (*SPSS Inc., Chicago, IL*), dok su rezultati analizirani korišćenjem Student T-test. Statistički značajna razlika je uzeta u obzir kada je p < 0.05.

4. DISKUSIJA REZULTATA

4.1. Sinteza dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa

Dinuklearni kompleksi, $[{Pt(en)Cl}_2(\mu-4,4'-bipy)]Cl_2 \cdot 2H_2O$ (Pt1), $[{Pt(en)Cl}_2(\mu-bpa)]Cl_2\cdot 4H_2O$ (Pt2), $[{Pt(en)Cl}_2(\mu-bpe)]Cl_2\cdot 4H_2O$ (Pt3), $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-4,4'-bipy)](NO_3)_2$ (Pd1). $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-bpa)](NO_3)_2$ (Pd2), $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-bpe)](NO_3)_2$ (Pd3), $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-qx)](NO_3)_2$ (Pd4), $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-qz)](NO_3)_2$ (Pd5) i $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-phtz)](NO_3)_2$ (Pd6), (4,4'-bipy ie 4,4'-bipiridin, bpa je 1,2-bis(4-piridil)etan, bpe je 1,2-bis(4-piridil)etilen, qx je hinoksalin, qz je hinazolin i phtz je ftalazin su mostni ligandi, a en je bidentatno koordinovan etilendiamin, Slika 29), su sintetisani i okarakterisani na osnovu rezultata elementalne mikroanalize, NMR (¹H i ¹³C) i IR spektroskopije kao i UV–Vis spektrofotometrije [202,204,205]. Struktura Pt1-Pt3 kompleksa dodatno je potvrđena na osnovu rezultata masene spektroskopije [202]. Na Slici 30 prikazana je sinteza dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa. Rezultati elementalne mikroanalize za sintetisane komplekse su u saglasnosti sa izračunatim vrednostima (Eksperimentalni deo 3.3).

4.2. Karakterizacija dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa

4.2.1. Spektroskopska karakterizacija platina(II) kompleksa

U cilju karakterizacije sintetisanih dinuklearnih **Pt1–Pt3** kompleksa korišćena je NMR (¹H i ¹³C) i IR spektroskopija, UV–Vis spektrofotometrija i masena spektrometrija. Kao što se može videti sa Slike 29, sintetisani platina(II) kompleksi imaju isti bidentatno koordinovan etilendiaminski ligand, a različite mostne ligande 4,4'-bipy ([{Pt(en)Cl}₂(μ -4,4'-bipy)]Cl₂·2H₂O (**Pt1**)), bpa ([{Pt(en)Cl}₂(μ -bpa)]Cl₂·4H₂O (**Pt2**)) i bpe ([{Pt(en)Cl}₂(μ -bpe)]Cl₂·4H₂O (**Pt3**)).

NMR karakterizacija

Odgovarajući spektroskopski podaci ¹H NMR spektara **Pt1–Pt3** kompleksa su dati u Tabeli 1, a ¹H i ¹³C NMR spektri **Pt1–Pt3** kompleksa prikazani su u Prilogu (Slika P1). U aromatičnoj oblasti, u ¹H NMR spektrima sintetisanih kompleksa javljaju se dva karakteristična multipleta koji odgovaraju protonima piridinskih prstenova. Poređenjem ovih signala sa signalima koji potiču od slobodnih liganada, može se zaključiti da nakon koordinovanja bipiridinskih liganada za dve [Pt(en)Cl]⁺ jedinice signali se pomeraju ka višem hemijskom pomeranju odnosno ka nižem polju, što ukazuje na koordinovanje *N*-heterocikličnih liganada za platina(II) jone. Pomeranje signala protona piridinskih prstenova nakon koordinovanja za platinu(II) jon pripisuje se delokalizaciji pozitivnog naelektrisanja jona metala kroz oba aromatična prstena u mostnom ligandu [221]. U alifatičnoj oblast u ¹H NMR spektrima **Pt1–Pt3** kompleksa nalazi se signal na približno 2,7 ppm, koji potiče od protona bidentatno koordinovanog etilendiaminskog liganda. Takođe, u ovoj oblasti u ¹H NMR spektrima **Pt2** i **Pt3** kompleksa javljaju se signali koji potiču od alifatičnih protona 1,2-bis(4-piridil)etana (-CH₂-CH₂-) i 1,2-bis(4-piridil)etilena (-CH=CH-) i za razliku od nekoordinovanih liganada (bpa i bpe) ovi signali su na višem hemijskom pomeranju (Tabela 1).



 $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-phtz)](NO_3)_2 (Pd6)$

Slika 29. Strukturne formule dinuklearnih kompleksa platine(II) i paladijum(II). Numeracija atoma ugljenika je u skladu sa IUPAC–ovim pravilima.

U ¹³C NMR spektrima **Pt1–Pt3** kompleksa uočavaju se tri, odnosno četiri signala koji potiču od aromatičnih atoma ugljenika mostnih liganada. Na osnovu podataka prikazanih u

Tabeli 1 može se zaključiti da su ovi signali na višem hemijskom pomeranju u odnosu na signale aromatičnih atoma ugljenika nekoordinovanih mostnih liganada. Kao posledica koordinovanja mostnog liganda za dve ekvivalentne mononuklearne platina(II) jedinice ([Pt(en)Cl]⁺), signali aromatičnih atoma ugljenika u prstenu se pomeraju ka nižem polju odnosno ka višem hemijskom pomeranju. Takođe, u ¹³C NMR spektrima **Pt2** i **Pt3** kompleksa se mogu uočiti signali koji potiču od alifatičnih atoma ugljenika bpa (-CH₂-CH₂-) i bpe (-CH=CH-) mostnih liganada (Tabela 1).



Slika 30. Šematski prikaz sinteze dinuklearnih platine(II) i paladijum(II) kompleksa.

Položaj	¹ H		¹³ C		
atoma	4,4'-bipy	Pt1	4,4'-bipy	Pt1	
1, 1'	/	/	145	149	
2, 2'; 6, 6'	7,50 (dd)	7,93 (d)	121	127	
3, 3'; 5, 5'	8,70 (dd)	8,90 (d)	151	156	
	bpa	Pt2	bpa	Pt2	
1, 1'	/	/	154	158	
2, 2'; 6, 6'	7,18 (d)	7,37 (d)	127	133	
3, 3'; 5, 5'	8,32 (d)	8,56 (d)	151	157	
-CH ₂ -CH ₂ -	2,97 (s)	3,19 (s)	38	40	
	bpe	Pt3	bpe	Pt3	
1, 1'	/	/	145	150	
2, 2'; 6, 6'	7,51 (dd)	7,65 (d)	122	129	
3, 3'; 5, 5'	8,50 (d)	8,66 (d)	149	155	
-CH=CH-	7,46 (s)	7,50 (s)	131	134	

Tabela 1. NMR (¹H i ¹³C) hemijska pomeranja (δ , ppm) za slobodne 4,4'-bipy, bpa i bpe ligande i odgovarajuće dinuklearne **Pt1–Pt3** komplekse u D₂O kao rastvaraču i TSP kao standardu.

IR karakterizacija

IR spektri dinuklearnih **Pt1–Pt3** kompleksa snimljeni su u opsegu od 4000-450 cm⁻¹ (Slika P2). Široka traka u opsegu od 3401-3428 cm⁻¹ koja odgovara valencionim vibracijama O-H grupe, ukazuje na prisustvo molekula koordinovane ili kristalne vode [222]. Dve veoma jake i oštre trake na ~3200 i 3100 cm⁻¹ potiču od asimetričnih i simetričnih valencionih vibracija koordinovane amino grupe bidentatno koordinovanog etilendiaminskog liganda [223]. Pored toga, u oblasti od 1614-1619 cm⁻¹ i od 1384-1561 cm⁻¹ javljaju se trake koje potiču od C=N i C=C vibracija aromatičnih mostnih liganada.

U far-IR spektrima **Pt1–Pt3** kompleksa (Slika P3) jasno se mogu uočiti trake u oblasti od 260–250 cm⁻¹ koje potiču od Pt(II)–N(mostni ligand) vibracija, a trake u oblasti od 322–316 i 351–349 cm⁻¹ potvrđuju prisustvo koordinovanog hlorido liganda za platina(II) jon (Pt(II)-Cl). U oblasti od 476–470 cm⁻¹ javljaju se trake koje ukazuju na prisustvo Pt–N(en) veze.

UV–Vis karakterizacija

UV–Vis spektri **Pt1–Pt3** kompleksa snimljeni su u vodi kao rastvaraču (c = $5 \cdot 10^{-5}$ M) (Slika P4). Talasne dužine maksimalne apsorpcije (λ_{max} , nm) i koeficijenti molarne ekstincije (ϵ , M⁻¹cm⁻¹) određeni su odmah nakon rastvaranja kompleksa i navedeni su u Eksperimentalnom delu 3.3.1. Apsorpcioni maksimumi **Pt1–Pt3** kompleksa u odnosu na apsorpcione maksimume nekoordinovanih mostnih liganada su na višim talasnim dužinama (λ_{max} = 281 nm za **Pt1**, 256 nm za **Pt2** i 326 nm za **Pt3**). Batohromno pomeranje signala slobodnih liganada nakon koordinovanja za Pt(II) jone se može pripisati pobuđivanju i prelazu elektrona iz orbitala liganada u prazne orbitale platina(II) jona (LMCT prelazi).

Optimizacija struktura Pt1–Pt3 kompleksa

Za optimizaciju struktura **Pt1–Pt3** kompleksa kvantno-mehanički proračuni su izvršeni pomoću B3LYP metode, koristeći 6-311G(d,p) bazis za nemetale i lanl2dz bazis za platinu. Teorija funkcionala gustine (DFT) je potvrđena kao pogodna metoda za optimizaciju geometrije i izračunavanje harmonijskih vibracionih frekvencija za platina(II)-amin komplekse [224,225]. Optimizovane strukture sintetisanih **Pt1–Pt3** kompleksa prikazani su na Slici 31, a vrednosti izračunatih dužina veza i uglova navedene su u Tabeli P1.

Kompleksi **Pt1–Pt3** imaju distorgovanu kvadratno-planarnu geometriju. Za platina(II) jone koordinovana su tri atoma azota (dva iz bidentatno koordinovanog etilendiamina i jedan iz mostnog liganda) i jedan hlorido ligand. Izračunata dužina Pt-N(en) veze je 2,08 Å što je veće u odnosu na dužinu Pt-N(piridin) veze (Tabela P1). Ista razlika od 0,02 Å postoji i između Pt–N(en) i Pt–N(pirazin, pz) veze u [{Pt(en)Cl}₂(μ -pz)]²⁺ kompleksu, što je potvrđeno na osnovu rezultata rendgenske strukturne analize [200]. Petočlani etilendiaminski prsten zauzima *gauche* konformaciju, sa uglom veze od ≈ 83°, dok je torzioni ugao N–C–C–N ≈ ±53°, što je u skladu sa rezultatima X-ray analize za [{Pt(en)Cl}₂(μ -pz)]²⁺ kompleks [200]. Dva aromatična prstena mostnih liganada u **Pt1–Pt3** kompleksima su pod uglom od 31° (**Pt1**), 7° (**Pt2**) i 14° (**Pt3**). Rastojanje između platina(II) jona (Pt…Pt) je 11 Å u **Pt1** kompleksu, dok se platina(II) joni u **Pt2** i **Pt3** kompleksu nalaze na udaljenosti od 13 Å.



Slika 31. Optimizovane strukture dinuklearnih Pt1–Pt3 kompleksa i strukturne formule odgovarajućih mostnih liganda.

S obzirom da se ekperimentalna ispitivanja vrše u vodenim rastvorima, postoji mogućnost supstitucije hlorido liganada sa molekulom vode. Zbog toga je rađena i optimizacija akva analoga **Pt1–Pt3** kompleksa (**Pt1W–Pt3W**) koristeći isti nivo proračuna. Proračuni su pokazali da akva kompleksi imaju slične geometrijske parametre kao i odgovarajući hlorido platina(II) kompleksi (Tabela P2). Kraća Pt-N(en) veza u *trans*-položaju u odnosu na koordinovani akva ligand je rezultat supstitucije hlorido liganda molekulom vode. Hlorido i piridinski ligandi pokazuju sličan *trans*-uticaj za razliku od akva liganda koji ima manji *trans*-uticaj [226]. Izračunate dužine Pt–N(en) veza u *trans*-položaju u odnosu na akva ligand su $\approx 2,05$ Å za **Pt1W–Pt3W** komplekse.

Na osnovu strukturne analize može se zaključiti da se **Pt1–Pt3** kompleksi razlikuju samo po strukturi mostnih liganada, koji uslovljavaju različite načine interakcije sa biomolekulima, a samim tim i potencijalno drugačija biološka svojstva.

4.2.2. Spektroskopska karakterizacija paladijum(II) kompleksa

U cilju karakterizacije sintetisanih dinuklearnih Pd1–Pd6 kompleksa korišćena je NMR (¹H i ¹³C) i IR spektroskopija i UV–Vis spektrofotometrija. Kao što se sa Slike 29 može uočiti, sintetisani paladijum(II) kompleksi imaju isti bidentatno koordinovan etilendiaminski ligand, a različite mostne ligande 4,4'-bipy $([{Pd(en)Cl}_2(\mu-4,4'-bipy)](NO_3)_2$ (**Pd1**)), bpa $([{Pd(en)Cl}_2(\mu-bpa)](NO_3)_2$ (Pd2)), bpe $([{Pd(en)Cl}_2(\mu-bpe)](NO_3)_2 (Pd3)),$ qx $([{Pd(en)Cl}_2(\mu-qx)](NO_3)_2$ (**Pd4**)), qz ([{Pd(en)Cl}₂(μ -qz)](NO₃)₂ (**Pd5**)) i phtz $([{Pd(en)Cl}_2(\mu-phtz)](NO_3)_2 (Pd6)).$

NMR karakterizacija

Spektroskopski podaci ¹H i ¹³C NMR spektara slobodnih mostnih liganada i sintetisanih paladijum(II) kompleksa prikazani su u Tabeli 2, a odgovarajući NMR spektri **Pd1–Pd6** kompleksa na Slici P5.

U¹H NMR spektrima Pd1-Pd3 kompleksa u aromatičnoj oblasti nalaze se dva multipleta koja potiču od protona piridinskih prstenova i oni su na višem hemijskom pomeranju u odnosu na signale slobodnih mostnih liganada. Pomeranje signala u spektrima kompleksa ukazuje na koordinovanje mostnih 4,4'-bipy, bpa i bpe liganada za dva paladijum(II) jona preko atoma azota. Ova hemijska pomeranja su u skladu sa ekperimentalnim rezultatima koji su dobijeni za analogne platina(II) komplekse [202]. U spektrima Pd2 i Pd3 kompleksa mogu se uočiti signali koji potiču od alifatičnih protona mostnih bpa i bpe liganada koji su takođe na višem hemijskom pomeranju u odnosu na signale slobodnih mostnih liganada. U aromatičnoj oblasti ¹H NMR spektara **Pd4** i **Pd6** kompleksa uočavaju se tri grupe signala koje se pripisuju protonima koordinovanih benzodiazina (qx, phtz). Poredeći ove signale sa signalima koji potiču od slobodnih qx i phtz liganada, može se zaključiti da nakon koordinovanja liganada signali odgovarajućih protona javljaju se na višem hemijskom pomeranju, što ukazuje na koordinovanje liganada za paladijum(II) jone. U ¹H NMR spektru **Pd5** kompleksa uočavaju se četiri grupe signala koje potiču od protona koordinovanog qz liganda. Mostni ligandi qx, qz i phtz sadrže dva atoma azota unutar jednog aromatičnog prstena, ali na različitim položajima (1,4- za qx; 1,3- za qz; 2,3- za phtz (Slika 29)), što dovodi do različitih sternih i elektronskih efekata koordinovanih mostnih liganada. Pomeranje signala koji potiču od protona qx, qz i phtz liganada ka nižem polju nakon koordinovanja za dve [Pd(en)Cl]⁺ jedinice može se pripisati delokalizaciji pozitivnog naelektrisanja paladijum(II) jona kroz sve prstenove u molekulu [227]. Hemijska pomeranja u ¹H NMR spektrima Pd4-Pd6 kompleksa su u saglasnostima sa ekperimentalnim podacima koji su ranije objavljeni [228]. Svi ispitivani paladijum(II) kompleksi u alifatičnoj oblasti ¹H NMR spektra sadrže karakterističan singlet koji potiče od protona bidentatno koordinovanog etilendiaminskog liganda.

U ¹³C NMR spektrima **Pd1–Pd3** kompleksa javljaju se tri odnosno četiri različita signala koji potiču od atoma ugljenika mostnih (4,4'-bipy, bpa, bpe) liganada (Tabela 2, Slika P5). Poredeći ¹³C NMR spektre kompleksa sa spektrima slobodnih mostnih 4,4'-bipy, bpa i bpe liganada, može se zaključiti da signali koji potiču od ugljenikovih atoma mostnih liganada u spektrima **Pd1–Pd3** kompleksa se nalaze na višem hemijskom pomeranju što je posledica koordinovanja liganada za paladijum(II) jon. U ¹³C NMR spektrima **Pd2** i **Pd3** kompleksa, uočavaju se i signali koji se pripisuju alifatičnim ugljenikovim atomima bpa, odnosno bpe liganada. Ovi signali se takođe nalaze na višem hemijskom pomeranju u odnosu na signale slobodnih liganada. U ¹³C NMR spektrima **Pd4** i **Pd6** kompleksa javljaju se četiri različita signala dok ¹³C NMR spektar **Pd5** kompleksa sadrži osam signala (Tabela 2). Može se zaključiti da signali ugljenikovih atoma benzodiazina u kompleksima **Pd4–Pd6** su na višem hemijskom pomeranju što je rezultat koordinovanja mostnih liganada za paladijum(II) jone. U ¹³C NMR spektrima **Pd1–Pd6** kompleksi u oblasti od 45–52 ppm nalazi se signal koji potiče od atoma ugljenika bidentatno koordinovanog etilendiamina.

Položaj	¹ H		¹³ C		
atoma	4,4'-bipy	Pd1	4,4'-bipy	Pd1	
1, 1'	/	/	145	146	
2, 2'; 6, 6'	7,50 (dd)	7,95 (d)	121	124	
3, 3'; 5, 5'	8,70 (dd)	8,90 (d)	151	156	
	bpa	Pd2	bpa	Pd2	
1, 1'	/	/	154	156	
2, 2'; 6, 6'	7,18 (d)	7,37 (d)	127	133	
3, 3'; 5, 5'	8,32 (d)	8,44 (d)	151	154	
-CH ₂ CH ₂ -	2,97 (s)	3,29 (s)	38	39	
	bpe	Pd3	bpe	Pd3	
1, 1'	/	/	145	147	
2, 2'; 6, 6'	7,51 (dd)	7,76 (d)	122	124	
3, 3'; 5, 5'	8,50 (d)	8,76 (d)	149	151	
-CH=CH-	7,46 (s)	7,52 (s)	131	131	
	qx	Pd4	qx	Pd4	
2, 3	8,44 (s)	9,73 (m)	146	152	
5, 8	7,51 (m)	9,59 (s)	132	136	
6, 7	7,51 (m)	8,41 (m)	129	130	
4a, 8a	/	/	142	145	
	qz	Pd5	qz	Pd5	
2	9,09 (s)	10,12 (d)	163	174	
4	8,84 (s)	9,52 (d)	156	162	
5.8	7.80 (m)	8.54 (m)	129	130	
0,0	,,			135	
6,7	7,79 (m)	8.30 (m)	131	132	
0, 7				144	
4a, 8a	/	/	127	128	
,			151	154	
	phtz	Pd6	phtz	Pd6	
1,4	9,18 (s)	10,01 (s)	154	163	
6 ,7	7,88 (m)	8,36 (m)	137	139	
5,8	7,88 (m)	8,36 (m)	129	130	
4a, 8a	/	/	129	130	

Tabela 2. ¹H i ¹³C NMR hemijska pomeranja (δ , ppm) za slobodne 4,4'-bipy, bpa, bpe, qx, qz i phtz mostne ligande i dinuklearne **Pd1–Pd6** komplekse u D₂O kao rastvaraču i u TSP kao standardu.

IR karakterizacija

IR spektri dinuklearnih **Pd1–Pd6** kompleksa snimljeni su u opsegu od 4000-450 cm⁻¹ (Slika P6). Široke trake na 3000 cm⁻¹ pripisuju se asimetričnim i simetričnim vibracijama koordinovane amino grupe bidentatno koordinovanog etilendiaminskog liganda [229]. U opsegu od 1660–1500 cm⁻¹ mogu se uočiti trake koje potiču od C=N i C=C vibracija koordinovanih 4,4'–bipy, bpa i bpe mostnih liganada za paladijum(II) jon u **Pd1–Pd3** kompleksima. IR spektri **Pd4–Pd6** kompleksa pokazuju jake trake u oblasti 1659–1566 cm⁻¹ koje potiču od C=N i C=C vibracija aromatičnih koordinovanih qx, qz i phtz mostnih liganada

za paladijum(II) jon. Jake trake u IR spektrima paladijum(II) kompleksa u opsegu 1385–1350 cm⁻¹ potiču od nitratnih anjona koji se nalaze u spoljašnjoj sferi **Pd1–Pd6** kompleksa [203].

UV–Vis karakterizacija

Na Slici P7 prikazani su UV–Vis spektri **Pd1–Pd6** kompleksa koncentracije $5 \cdot 10^{-5}$ M, a odgovarajuće talasne dužine maksimalne apsorpcije (λ_{max} , nm) i koeficijenti molarne ekstincije (ε , M⁻¹cm⁻¹) su dati u Eksperimentalnom delu 3.3.2. Apsorpcioni maksimumi **Pd1** i **Pd2** kompleksa pokazuju batohromno pomeranje u odnosu na apsorpcione maksimume 4,4'-bipy i bpa, dok apsorpcioni maksimum **Pd3** kompleksa je na nižim vrednostima od apsorpcionog maksimuma bpe mostnog liganda (Slika P7A). Elektronski apsorpcioni spektri **Pd4–Pd6** kompleksa su veoma slični, sa apsorpcionim maksimumima na 234 i 316 nm za **Pd4**, 226 i 309 nm za **Pd5**, odnosno 231 i 312 nm za **Pd6** kompleks (Slika P7B). Apsorpcioni maksimumi **Pd4–Pd6** kompleksa potiču od $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza u aromatičnim benzodiazinima i u odnosu na apsorpcione maksimume slobodnih qx, qz i phtz mostnih liganada nalaze se na nižoj talasnoj dužini [230]. Apsorpcioni maksimumi na višim talasnim dužimana ($\lambda > 300$ nm) su posledica pobuđivanja i prelaza elektrona iz orbitala liganada u prazne orbitale jona metala (LMCT prelazi).

4.2.3. Stabilnost dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa

Stabilnost dinuklearnih **Pt1–Pt3** i **Pd1–Pd3** kompleksa praćena je primenom UV–Vis spektrofotometrije u vremenskom periodu od 24 h u smeši rastvarača voda-dimetilsulfoksid (H₂O/DMSO) u zapreminskom odnosu 9:1. Nisu uočene promene u UV–Vis spektrima kompleksa pa se može zaključiti da su ispitivani **Pt1–Pt3** i **Pd1–Pd3** kompleksi stabilni u H₂O/DMSO rastvaraču tokom ekperimentalnog vremena (Slika P8 za **Pt3** i **Pd3** komplekse).

Dodatno, stabilnost **Pd1–Pd3** kompleksa potvrđena je i na osnovu rezultata ¹H NMR spektroskopije. U D₂O kao rastvaraču ovi kompleksi su bili stabilni za vreme od 24 h (Slika P9A za **Pd3** kompleks). Pored toga, stabilnost **Pd1–Pd3** kompleksi ispitivana je u smeši D₂O/DMSO-*d*₆ kao rastvaraču za vreme od 24 h. U ¹H NMR spektrima u aromatičnoj oblasti uočeno je pomeranje signala piridinskih protona mostnih 4,4'-bipy, bpa i bpe liganada nakon 24 h što je posledica veoma sporog raskidanja Pd-*N*(mostni ligand) veze. Na osnovu odnosa integrala signala piridinskih protona koordinovanih i slobodnih mostnih liganada može se zaključiti da je samo 5–8 % veze Pd-*N*(mostni ligand) raskinuto nakon 24 h (Slika P9B za kompleks **Pd1**).

4.3. Interakcije dinuklearnih kompleksa platine(II) sa DNK i ispitivanje njihovog citotoksičnog potencijala

Rezultati ispitivanja interakcija kompleksa metala sa DNK su veoma važni u farmakologiji i imaju značajnu ulogu u dizajniranju lekova koji bi imali bolju antitumorsku aktivnost, a manju toksičnost u odnosu na lekove koji se već primenjuju u medicini [231]. UV–Vis spektrofotometrija je jednostavna i često korišćena instrumentalna metoda za proučavanje stabilnosti DNK molekula i njegove interakcije sa lekovima [104]. Usled vezivanja lekova/potencijalnih lekova za DNK dolazi do promene apsorpcionog maksimuma na 260 nm, na osnovu čega se može zaključiti koji tip interakcije leka/potencijalnog leka sa DNK nastaje. Elektrostatičko vezivanje katjona za fosfatne grupe, koje dovodi do promena u sekundarnoj

strukturi DNK, kao i denaturacija DNK lanca dovode do hiperhromnog efekata [232]. Hipohromni efekat se javlja kao posledica interkalacije leka/potencijalnih lekova u molekul DNK, odnosno usled interakcije aromatičnih hromofora interkalatora i parova nukleinskih baza DNK, a jačina interakcije je određena stepenom hipohromizma [233].

Pored UV–Vis spektrofotometrije, fluorescentna spektroskopija je, takođe, često primenjivana metoda za izučavanje interakcija lekova/potencijalnih lekova sa DNK biomolekulom. Ovom metodom se mogu dobiti dodatne informacije o mestima i načinima vezivanja ispitivanih molekula za DNK [107]. Prednosti fluorescentne spektroskopije u odnosu na druge metode je visoka osetljivost, veliki opseg koncentracija i selektivnost. U slučaju interkalacije ispitivanih molekula dolazi do povećanja intenziteta emisije usled njihove interakcija sa baznim parovima DNK lanca. Usled uspostavljanja elektrostatičkih, vodoničnih i hidrofobnih interakcija ispitivanih molekula sa DNK dolazi do smanjenja intenziteta emisije kao posledica promene sredine ostataka šećera DNK biomolekula [79]. Etidijum-bromid je organsko jedinjenje koje pokazuje intenzivnu emisiju fluorescencije kada interkalira u DNK, zbog čega se koristi za ispitivanje interakcija leka/potencijalnog leka sa DNK [132,234]. Smanjenje intenziteta fluorescencije EtBr/DNK na 612 nm je posledica istiskivanja etidijum-bromida iz EtBr/DNK proizvoda i interkalacije ispitivanog jedinjenja [235].

Merenjem viskoziteta DNK, mogu se dobiti pouzdane informacije o načinu vezivanja ispitivanih jedinjenja za DNK, jer je ova metoda osetljiva na promene dužine DNK lanca [236]. Vezivanje klasičnih interkalatora dovodi do izduživanja DNK lanca, jer se razdvajaju parovi baza da bi ispitivani molekul interkalirao u DNK, što za posledicu ima povećanje viskoziteta [237]. Delimični i/ili neklasični interkalatori svojim vezivanjem za DNK dovode do savijanja molekula, što za posledicu ima smanjenje dužine lanca, pri čemu viskozitet DNK ostaje nepromenjen ili blago opada [238]. U slučaju elektrostatičkih interakcija, može doći do kompaktnosti i agregacije DNK, što smanjuje nezavisno kretanje molekula a samim tim i viskozitet DNK. Molekuli koji se vezuju za žljebove takođe smanjuju viskozitet DNK kao posledica skraćivanja dužine lanca izazvane savijanjem heliksa [157]. Vezivanje za fosfatne grupe nema uticaja na viskozitet DNK molekula [239].

Infracrvena Furijeva transformacija (FT–IR) je metoda koja se veoma uspešno koristi za kvalitativne i kvantitativne analize. Pored toga FT–IR spektroskopija može poslužiti za sistematsko praćenje konformacionih promena jednolančane i dvolančane DNK, kao i za prepoznavanje promena u konformaciji DNK u odnosu na hidrataciju i razumevanje njene potencijalne uloge u kliničkoj dijagnostici [111]. U FT–IR spektrima se javljuju karakteristične trake, na osnovu kojih se mogu pratiti konformacione promene DNK (B, A ili Z-oblik) [240].

4.3.1. Interakcije dinuklearnih kompleksa platine(II) sa DNK

Hidroliza Pt1–Pt3 kompleksa

Poznato je da kompleksi platine(II) koji se koriste u hemioterapiji, pre dolaska do ciljanog mesta, odnosno do DNK, podležu procesu hidrolize (Slika 7). Na brzinu i stepen hidrolize utiče priroda liganada koji se supstituišu, koncentracija prisutnih jona u ćeliji i van nje, pH vrednost i mnogi drugi faktori. U cilju ispitivanja interakcija dinuklearnih **Pt1–Pt3** kompleksa sa CT–DNK, kao i mogućnosti interakcija hidrolizovanih derivata, ispitivane su reakcije hidrolize pomenutih kompleksa. Ispitivanja su vršena primenom UV–Vis spektrofotometrije, kao i teorijskim proračunima. Na slici 32A prikazani su UV–Vis spektri **Pt1** kompleksa na različitim pH vrednostima. Pri pH = 1,9 uočava se Gausov oblik spektra sa apsorpcionim maksimumom na ≈ 290 nm i jednim oštrim maksimumom apsorpcije na < 250 nm, koji potiče od prenosa naelektrisanja. Sa povećanjem pH vrednosti spektra sa

maksimumom apsorpcije na približno 290 nm gubi oblik Gausove krive i pojavljuje se prevoj na nižoj talasnoj dužini. Na višim pH vrednostima ova promena je izraženija, a u UV–Vis spektru već pri pH = 7,4 se jasno vidi. U cilju određivanja stepena hidrolize hlorido kompleksa, izvršena je dekonvolucija² UV–Vis spektra **Pt1** kompleksa na tri različite pH vrednosti (pH 1,9; 4,8 i 7,4, Slika 32B). Rezultat dekonvolucije je pojava spektra sa apsorpcionim maksimumima na ≈ 290 i 260 nm.



Slika 32. UV–Vis spektri Pt1 kompleksa na različitim pH vrednostima (A); dekonvolucija UV–Vis spektara Pt1 kompleksa (pH = 1,9, 4,8 i 7,4) (B).

Na slici P10-P12 prikazani su UV–Vis spektri Pt1–Pt3 kompleksa, kao i njihovih akva derivata (Pt1W-PtW3), koji su dobijeni teorijskim proračunima. Maksimum apsorpcije Pt1W kompleksa (Slika P10B) je na nižoj talasnoj dužini u odnosu na apsorpcioni maksimum hlorido kompleksa (Pt1, Slika P10A). Rezultati teorijskih proračuna su pokazali da spektar sa maksimalnom apsorpcijom na 290 nm odgovara hlorido kompleksu (Pt1), dok spektar u kojem je $\lambda_{max} = 260$ nm odgovara akva derivatu **Pt1** kompleksa (**Pt1W**). Sa povećanjem pH vrednosti intenzitet apsorpcionog maksimuma na 290 nm opada, dok intentitet maksimuma na 260 nm raste (Slika 32B). Na osnovu spektara prikazanih na Slici 32B može se zaključiti da je pri fiziološkim uslovima u rastvoru količina Pt1 i Pt1W kompleksa približno ista. U reakcijama, usled vezivanja platina(II) kompleksa za CT-DNK, ovaj odnos se menja, jer sa povećanjem koncentracije platina(II) kompleksa, u rastvoru se nalazi veća koncentracija Pt1-Pt3 kompleksa (Slika 33). Ako je molski odnos **Pt1**/CT–DNK < 1 količina hlorido i akva kompleksa u rastvoru je približno jednaka, dok sa povećanjem koncentracije Pt1 kompleksa (Pt1/CT-DNK > 1) apsorpcija na 290 nm postaje intenzivnija. Na osnovu ovih ispitivanja se može pretpostaviti da pri molskom odnosu Pt1/CT-DNK > 1, CT-DNK pokazuje veći afinitet za vezivanje hlorido oblika platina(II) kompleksa (Slika 33).

² Dekonvolucija je matematički postupak kojim se raščlanjuje široka traka nastala uticajem mernog instrumenta na signal.



Slika 33. UV–Vis spektri Pt1–Pt3/CT–DNK ([CT–DNK]_o = 13 μ M) mereni u 0,01 M PBS puferu na pH = 7,40 i temperaturi od 37 °C (r = 0,4-6,0).

Teorijskim proračunima zaključeno je da UV–Vis spektar sa maksimalnom apsorpcijom na 260 nm odgovara **Pt2** kompleksu (Slika P11A), dok spektar koji pokazuje maksimalnu apsorpciju na 225 nm odgovara njegovom akva derivatu (**Pt2W**, Slika P11B). Rezultati dekonvolucije UV–Vis spektara za reakcije **Pt2** kompleksa sa CT–DNK su pokazali da do molskog odnosa **Pt2**/CT–DNK < 2 maksimumi apsorpcije na 260 i 225 nm su priblizno jednaki, a kada je **Pt2**/CT–DNK > 2 apsorpcioni maksimum na 225 nm je intenzivniji u odnosu na maksimum na 260 nm. (Slika P12A i Slika 33B).

Teorijski proračuni za UV–Vis spektre **Pt3** i **Pt3W** komplekse su pokazali da su apsorpcioni maksimumi ova dva kompleksa veoma bliski (Slika P12B), pri čemu je i kod ovog kompleksa apsorpcioni maksimum akva oblika (**Pt3W**) na nižoj talasnoj dužini u odnosu na hlorido oblik (**Pt3**) (Slika P13). U snimljenim UV–Vis spektrima (eksperimentalni rezultati) ova dva signala se preklapaju (Slika 33). Međutim, ovi spektri imaju oblik "sedla" (*saddle-like shape*) i vizuelno se mogu uočiti maksimumi koji odgovaraju hlorido i akva obliku ispitivanog platina(II) kompleksa (Slika P12). Bez obzira na molski odnos **Pt3** kompleksa i CT–DNK, odnos apsorpcionih maksimuma koji odgovaraju akva i hlorido kompleksu je približno isti.

Na osnovu kvantno-mehaničkih proračuna moguće je predvideti mehanizam supstitucije hlorido liganda molekulom vode, a samim tim ispitati i sposobnost hidrolize **Pt1–Pt3** kompleksa. Na Slici 34 prikazan je energetski profil reakcije hidrolize dinukelarnih platina(II) kompleksa. Dobijeni rezultati su pokazali da ispitivani **Pt1–Pt3** kompleksi imaju slične vrednosti aktivacije (18,8-19,1 kcal/mol, Slika 34). U svim ispitivanim reakcijama sistem sa molekulom vode i **Pt1–Pt3** kompleksima (Pt–Cl···W) je približno 5 kcal/mol (4,8 kcal/mol za **Pt1**; 5,0 kcal/mol za **Pt2** i **Pt3**) stabilniji od sistema u kome je jedan hlorido ligand supstituisan molekulom vode (Pt–W···Cl).



Slika 34. Energetski profil hidrolize Pt1–Pt3 kompleksa.

Na osnovu prethodno opisanih ispitivanja, može se zaključiti da **Pt1–Pt3** kompleksi hidrolizuju na veoma sličan način, a da različit odnos hlorido i akva kompleksa u rastvoru je posledica različitih afiniteta vezivanja ovih kompleksa za CT–DNK.

UV–Vis spektrofotometrijska merenja

Elektronski apsorpcioni spektri ispitivanih platina(II) kompleksa u odsustvu i prisustvu CT–DNK prikazani su na Slici 35. Povećanjem koncentracije CT–DNK javlja se hiperhromni efekat koji sugeriše da ispitivani dinuklearni **Pt1–Pt3** kompleksi reaguju sa CT–DNK vezujući se za spoljašnjost DNK lanca [241]. Izračunate vrednosti konstanti vezivanja (K_b) kao i slobodne Gibsove energije date su u Tabeli 3. Konstante vezivanja ukazuju na stabilnost CT–DNK/Pt(II) proizvoda, dok slobodna Gibsova energija ukazuje na spontanost vezivanja kompleksa za CT–DNK. Kompleks **Pt3** ima vrednost konstante K_b koja je u opsegu vrednosti K_b klasičnog interkalatora EtBr (K_b = 12,3·10⁴ M⁻¹) [242], dok su **Pt1** i **Pt2** kompleksi pokazali niže vrednosti konstante vezivanja. Kompleks **Pt3** pokazuje najveći hipohromizam koji potvrđuje da ima najjači afinitet vezivanja za CT–DNK u odnosu na ispitivane platina(II) komplekse.



Slika 35. Apsorpcioni spektri Pt1–Pt3 kompleksa u odsustvu i prisustvu CT–DNK. Strelice pokazuju promenu apsorpcije usled povećanja koncentracije CT–DNK. Umetnuti grafik predstavlja zavisnost [DNK]/(ε_a-ε_f) od [DNK].

K _b	ΔG	Hiperhromizam*
(1/ M)	(kJ/mol)	(%)
$4,0 \cdot 10^4$	-26,3	40
$2,0 \cdot 10^{4}$	-24,5	52
$11,0 \cdot 10^{4}$	-28,8	60
	$\begin{array}{c} K_b \\ (1/M) \\ 4,0 \cdot 10^4 \\ 2,0 \cdot 10^4 \\ 11,0 \cdot 10^4 \end{array}$	$\begin{array}{ccc} K_b & \Delta G \\ (1/M) & (kJ/mol) \\ 4,0\cdot 10^4 & -26,3 \\ 2,0\cdot 10^4 & -24,5 \\ 11,0\cdot 10^4 & -28,8 \end{array}$

Tabela 3. Konstante vezivanja (K_b), Gibsova energija (ΔG) i hiperhromizam (%) za **Pt1–Pt3** komplekse.

*Hiperhromizam je povećanje intenziteta apsorpcije izračunato primenom jednačine: 100- $(A_{min}*100/A_{max})$ gde je A_{min} apsorpcioni maksimum rastvora platina(II) kompleksa, a A_{max} apsorpcioni maksimum rastvora sa najvećom koncentracijom CT–DNK, izražen u procentima.

Merenje apsorpcije CT–DNK/Pt(II) na 260 nm u funkciji koncentracija **Pt1–Pt3** kompleksa, ukazuje na to da povećanje koncentracije platina(II) kompleksa dovodi do povećanja apsorpcije (Slika 36). Isti eksperiment je izveden i sa *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] kompleksom (*cis*-Pt) za koji je poznato da se kovalentno vezuje za DNK. Povećanje koncentracije *cis*-Pt kompleksa uzrokuje smanjenje intenziteta apsorpcije na 260 nm. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da ispitivani **Pt1–Pt3** kompleksi sa DNK ostvaruju nekovalentne interakcije.



Slika 36. Zavisnost apsorpcije CT–DNK/Pt(II) od koncentracija Pt1–Pt3 i *cis*-Pt kompleksa na $\lambda = 260$ nm.

U cilju definisanja načina vezivanja ispitivanih platina(II) kompleksa za DNK snimljeni su UV–Vis spektri *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], EtBr i Hoechst 33258. Primenom Lamber-Berovog zakona na $\lambda = 260$ nm izračunati su molarni ekstincioni koeficijenti (Tabela P3). Brojna vrednost apsorpcije na $\lambda = 260$ nm upotrebljena je za izračunavanje stehiometrijske vrednosti apsorpcije (A_{cal}) ispitivanih jedinjenja u prisustvu DNK. Način vezivanja *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], EtBr i Hoechst-a 33258 za DNK je poznat, što je i upotrebljeno da bi se ustanovio obrazac pomoću koga je moguće definisati kovalentno vezivanje, interkalaciju i vezivanje za mali žljeb. Na Slici 37 prikazane su zavisnosti apsorpcije na 260 nm od koncentracija i jasno se mogu uočiti razlike između eksperimentalno dobijenih (A_{exp}) i izračunatih (A_{cal}) vrednosti apsorpcije. Eksperimentalno dobijene vrednosti apsorpcije za *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] u prisustvu DNK opadaju skoro linearno (Slika 37A), jer se *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] vezuje kovalentno za *N7* nukleinske baze guanina u DNK, dok eksperimentalno dobijene vrednosti apsorpcije za EtBr (interkalacija) rastu (Slika 37B). Smanjenje eksperimentalno dobijenih vrednosti apsorpcije za cis-[PtCl₂(NH₃)₂] u prisustvu DNK se može smatrati posledicom promene okruženja azotnih baza DNK usled vezivanja cis-Pt za guanin što dovodi do deformacije strukture DNK kao i destabilizacije DNK heliksa [243]. Razlika eksperimentalno dobijenih i izračunatih vrednosti apsorpcije cis-Pt/DNK se uočava pri koncentracijama većim od 5 μ M (Slika 37A). Interkalacija EtBr stabilizuje DNK što je uzrok povećanja eksperimentalno dobijenih vrednosti apsorpcije za EtBr/DNK pri koncentracijama većim od 5 μ M.



Slika 37. Izračunate i eksperimentalno dobijene vrednosti apsorpcije na talasnoj dužini od 260 nm za cis-Pt (A), EtBr (B) i Hoechst 33258 (C) u prisustvu CT-DNK ([DNK]₀ = 13 μ M). Umetnuti grafici prikazuju izračunate i eksperimentalne vrednosti apsorpcije koncentracija do 12 μ M.

Eksperimentalno dobijene vrednosti apsorpcije Hoechst-a 33258 (jedinjenje koje se vezuje za mali žljeb), potpuno se poklapa sa stehiometrijskom apsorpcijom do koncentracije od 15 μ M, što odgovara molskom odnosu r = 1,2. Pri većoj koncentraciji Hoechst-a 33258 eksperimentalno dobijene vrednosti apsorpcije su veće u poređenju sa izračunatim (Slika 37C). Vezivanje fluorescentnog agensa Hoechst-a 33258 za mali žljeb DNK ne dovodi do značajnih promena u strukturi DNK [244] pa se brojne vrednosti ekserimentalno dobijenih i izračunatih vrednosti apsorpcije za Hoechst 33258/DNK poklapaju na niskim koncentracijama.



Zavisnost ekserimentalno dobijenih i izračunatih vrednosti apsorpcije na 260 nm od koncentracije dinuklearnih **Pt1–Pt3** kompleksa u prisustvu CT–DNK prikazane su na Slici 38.

Slika 38. Izračunate i eksperimentalno dobijene vrednosti apsorpcije na 260 nm za Pt1 (A), Pt2 (B) i Pt3 (C) u prisustvu CT-DNK ([DNK]₀ = 13 μM). Umetnuti grafici predstavljaju izračunate i eksperimentalne vrednosti apsorpcije koncentracija do 12 μM.

Razlike između brojnih vrednosti A_{exp} i A_{cal} za **Pt1–Pt3** komplekse se primećuju pri koncentracijama većim od 5 μ M. Ovo upućuje na zaključak da se pri nižoj koncentraciji **Pt1–Pt3** kompleksi vezuju za DNK na jedan način, a da se povećanjem koncentracije način vezivanja kompleksa za DNK menja. U slučaju **Pt1** i **Pt2** kompleksa eksperimentalno dobijene vrednosti apsorpcije na 260 nm su niže u odnosu na izračunate, kao što je u slučaju *cis*-Pt (Slika 38A, 38B). Povećanjem koncentracije **Pt1** i **Pt2** kompleksa apsorpcija raste, za razliku od *cis*-Pt, za koju je pokazano da se apsorpcija smanjuje usled kovalentnog vezivanja za DNK.

Vezivanje platina(II) kompleksa za fosfatne grupe DNK molekula dovodi do savijanja DNK lanca, slabljenja interakcija između azotnih baza i kondenzacije DNK [245], što za posledicu ima smanjenje vrednosti A_{exp} u odnosu na vrednosti A_{cal}. *In vitro* eksperimentalna istraživanja na DNK biomolekulu su pokazala da kondenzacija DNK zahteva vezivanje katjona naelektrisanja +3 ili više [246]. Vrednost apsorpcije na 260 nm jedinjenja u prisustvu CT–DNK se smanjuje usled kondenzacije nastale vezivanjem ovih katjona [246]. U slučaju **Pt1**

kompleksa, razlika eksperimentalno dobijenih i izračunatih vrednosti apsorpcija se javlja pri koncentraciji od 2,6 µM.

Razlike eksperimentalno dobijenih i izračunatih vrednosti apsorpcija za **Pt2** kompleks se uočavaju pri koncentracijama većim od 5 μ M. Dobijeni rezultati navode na zaključak da se dinuklearni **Pt1** i **Pt2** kompleksi pri nižim koncentracijama vezuju za mali žljeb, a sa povećanjem koncentracije kompleksa način vezivanja se menja. U slučaju dinuklearnog **Pt3** kompleksa eksperimentalno dobijene vrednosti apsorpcije rastu sa povećanjem koncentracije kompleksa kao što je to u slučaju sa EtBr (Slika 37), pa se može zaključiti da ispitivani kompleks **Pt3** interkalira u DNK (Slika 38C). Poznato je da kovalentno vezivanje kompleksa platine(II) (kao što je *cis*-Pt) sprečava vezivanje EtBr za DNK interkalacijom kao i da istovremeno vezivanje EtBr i Hoechst-a 33258 za DNK stabilizuje dvolančanu DNK [247,248]. Zbog toga se može zaključiti da se kompleksi **Pt1** i **Pt2** vezuju za fosfatne grupe DNK dok se **Pt3** kompleks vezuje interkalacijom u DNK.

Fluorescentna merenja

Emisioni spektri EtBr/CT–DNK u odsustvu i prisustvu **Pt1–Pt3** kompleksa prikazani su na Slici 39. Ispitivani **Pt1–Pt3** kompleksi ne pokazuju fluorescenciju pri istim ekperimentalnim uslovima. Sa povećanjem koncentracije platina(II) kompleksa dolazi do smanjenja intenziteta emisije EtBr/CT–DNK što je direktna posledica vezivanja kompleksa za DNK. Interakcije dinuklearnih platina(II) kompleksa sa DNK dovode do istiskivanja EtBr i smanjenja intenziteta emisije EtBr/CT–DNK [243].

Stern-Volmerove konstante (K_{sv}), konstante vezivanja (K_a) kao i broj vezujućih mesta (n) za ispitivane dinuklearne platina(II) komplekse su izračunate korišćenjem jednačina datih u eksperimentalnom delu (Eksperimentalni deo 3.4.2) i prikazane su u Tabeli 4. Dobijene vrednosti K_{sv} opadaju u nizu Pt3 > Pt1 > Pt2, što je u skladu sa rezultatima koji su dobijeni primenom apsorpcione spektroskopije (K_b, Tabela 3). Stern-Volmerova konstanta za Pt3 kompleks je \approx 11,5 puta veća u odnosu na K_{sv} za Pt2 i \approx 4,5 puta veća u odnosu na K_{sv} za Pt1 kompleks, što ukazuje na veću sposobnost ovog kompleksa da istisne EtBr iz EtBr/CT–DNK adukta. Vrednost K_{sv} za Pt3 kompleksa ukazuje na interkalaciju kompleksa u DNK, dok brojne vrednosti K_{sv} za Pt1 i Pt2 komplekse sugerišu da se kompleksi vezuju za fosfatne grupe DNK. Takođe, vrednost konstante vezivanja (K_a) za Pt3 ukazuje da ovaj kompleks ostvaruje jače interakcije sa DNK u poređenju sa Pt1 i Pt2 kompleksima. Ispitivani platina(II) kompleksi se za CT–DNK vezuju zauzimajući jedno vezivno mesto što potvrđuje izračunat broj vezujućih mesta (Tabela 4).



Slika 39. Emisioni spektri EtBr/CT–DNK u odsustvu i prisustvu Pt1–Pt3 kompleksa. Strelice pokazuju promenu emisije usled povećanja koncentracije Pt1–Pt3 kompleksa. Umetnuti grafik predstavlja zavisnost I₀/I od [Q].

Komplaks	K _{sv}	Ka	n	
Kompleks	(1/M)	(1/M)	11	
Pt1	$4,9 \cdot 10^{4}$	$12,9 \cdot 10^{4}$	1,0	
Pt2	$1,9\cdot 10^4$	$9,4 \cdot 10^{4}$	1,1	
Pt3	$22,0 \cdot 10^{4}$	$49,7 \cdot 10^{4}$	1,1	

Tabela 4. Stern-Volmerove konstante (K_{sv}), konstante vezivanja (K_a) i broj vezujućih mesta (n) kompleksa **Pt1–Pt3**.

Merenje viskoziteta

Za ispitivanje načina vezivanja dinuklearnih **Pt1–Pt3** kompleksa za CT–DNK korišćena je metoda merenja viskoziteta. Viskozitet CT–DNK je meren u odsustvu i u prisustvu platina(II) kompleksa u molskom odnosu od 0 do 0,9 (Slika 40). Povećanje koncentracije **Pt1** i **Pt2** kompleksa dovodi do smanjenja viskoziteta CT–DNK što ukazuje da ovi kompleksi ne interkaliraju u CT–DNK. Međutim, u prisustvu **Pt3** kompleksa viskozitet CT–DNK smanjuje se do koncentracije kompleksa od 4 µM, a nakon te koncentracije viskozitet se povećava, što ukazuje na interkalativni način vezivanja **Pt3** kompleksa. Ovi rezultati potvrđuju zaključak dosadašnjih ispitivanja da **Pt3** kompleks interkalira u CT–DNK za razliku od **Pt1** i **Pt2** kompleksa koji se vezuju za fosfatne grupe DNK heliksa.



Slika 40. Relativni viskozitet CT–DNK u zavisnosti od koncentracije **Pt1–Pt3** kompleksa u 0,01 M PBS puferu na pH = 7,40 i na 25 °C.

FT–IR i far-IR merenja

Interakcije **Pt1–Pt3** kompleksa sa CT–DNK proučavane su primenom FT–IR i far-IR spektroskopije (Slika 41 i P14-P26). Traka na 1058 cm⁻¹ (Slika P14) koja potiče od simetričnih P-O vibracija, u IR spektru **Pt1**/CT–DNK i **Pt2**/CT–DNK je pomerena na 1054 cm⁻¹ za **Pt1** i

1053 cm⁻¹ za **Pt2** kompleks (Slika P18-P26). U IR spektru **Pt3**/CT–DNK ne dolazi do pomeranja trake na 1058 cm⁻¹ (Slika P24-26). Intenzitet trake na 1223 cm⁻¹ u IR spektru CT–DNK koja potiče od asimetričnih vibracija fosfatnih grupa, u spektrima **Pt1–Pt3**/CT–DNK opada. U spektru CT–DNK, traka na 1710 cm⁻¹ pripisana je vibracijama AT para baza, dok oštra i intenzivna traka na 1690 cm⁻¹ odgovara vibracijama CG baznog para. IR spektri **Pt1–Pt3**/CT–DNK ne sadrže ove trake. Ovi rezultati nesumnjivo potvrđuju da ispitivani kompleksi interaguju sa DNK vezivanjem za fosfatne grupe.

Ranije objavljeni rezultati su pokazali da se kompleks Triplatina (BBR3464) vezuje za DNK na pH = 5,4, nakon hidrolize kompleksa što je dokazano odsustvom trake na 320 cm⁻¹ pripisane vibracijama Cl–Pt–Cl veze [249,250]. Shodno tome, teorijski dobijeni IR spektri **Pt1–Pt3** kompleksa su poređeni sa teorijski dobijenim IR spektrima njihovih akva analoga (Slika 42). Na hidrolizu **Pt1–Pt3** kompleksa i vezivanje ispitivanih kompleksa za fosfatne grupe DNK ukazuje gubitak trake na 320 cm⁻¹ (Pt–Cl vibracije) i pojava nove trake na 380 cm⁻¹ (Pt–OH₂ vibracije) (Slika 42B).



Intenziteti traka prisutnih u IR spektrima CT–DNK i **Pt1–Pt3**/CT–DNK prikazani su u Tabeli 5. CT–DNK je u B-obliku, i na osnovu vrednosti intenziteta traka (Tabela 5) može se zaključiti da ne dolazi do promene konfiguracije CT–DNK sa povećanjem koncentracije dinuklearnih kompleksa. Međutim, primetne su razlike IR spektra CT–DNK i ispitivanih platina(II) kompleksa pri niskim koncentracijama kompleksa (r = 0,5) (Slika 13).



Slika 42. Teorijski dobijeni far-IR spektri za Pt1W kompleks, Pt1W-H₂O i Pt1W-(CH₃)₂PO₄ (A). Strelice pokazuju na trake koje potiču od Pt–OH₂ vibracije. Teorijski dobijeni far-IR spektri Pt1–Pt3 kompleksa i odgovarajućih akva derivata Pt1W–Pt3W korišćnjem B3LYP metode, sa 6-311g(d,p) bazisom za atome nemetala i lanl2dz (ECP) bazisom za platinu (B).

Pojava trake na 667 cm⁻¹, odgovara vibracijama C–C veze guanina i timina, što potvrđuje da ispitivani **Pt1–Pt3** kompleksi interaguju sa azotnim bazama (vezivanjem za žljeb ili interkalacijom), pa dolazi do promena u vibracijama azotnih baza [110]. Traka na 969 cm⁻¹ (Slika P14), koja potiče od vibracija C–C veza DNK, nakon interakcije sa platina(II) kompleksima, se gubi što se može pripisati interferenciji vibracija DNK lanca [240]. Trake na 1053 cm⁻¹ (simetrične vibracije fosfatnih grupa) i 1038 cm⁻¹ (vibracije C–O veze dezoksiriboze) u spektru CT–DNK predstavljaju dokaz postojanja B-DNK oblika. Promena položaja i intenziteta ovih traka nakon dodavanja ispitivanih kompleksa platine(II) nije primećena čime se dokazuje da interakcija **Pt1–Pt3** kompleksa ne menja konformaciju CT–DNK.

CT– DNK	Pt1/CT–DNK		Pt2/CT–DNK		Pt3/CT–DNK				
	r = 0,5	r = 1,0	r = 2,0	r = 0,5	r = 1,0	r = 2,0	r = 0,5	r = 1,0	r = 2,0
501	598	598	598	598	598	598	599	599	599
595	666	667	666	668	665	665	666	664	666
969	910	910	910	910	910	/	/	909	909
1038	1038	1038	1038	1037	1038	1037	1038	1038	1038
1058	1053	1052	1053	1052	1053	1057	1058	1059	1058
1223	1137	1137	1137	1136	1137	1137	1136	1136	1136
1294	1297	1297	1297	1296	1297	1297	1296	1295	1296
1552	1404	1404	1404	1403	1404	1404	1403	1403	1403
1630	1463	1463	1463	1463	1463	1463	1463	1463	1463
1710	1554	1554	1554	1553	1554	1554	1554	1553	1554
2921	1630	1631	1631	1630	1631	1630	1631	1630	1631
3227	2097	2097	2097	2097	2097	2108	2100	2101	2101
3409	2599	2600	2600	2600	2600	2600	2576	2576	2576
/	2691	2691	2691	2684	2685	2685	2693	2692	2693
/	2990	2989	2990	2990	2990	2990	2984	2983	2976
/	3189	3189	3190	3194	3188	3192	3201	/	3192
/	3401	3401	3348	3229	/	3216	3228	3228	3227
/	/	/	/	3417	3416	3425	3425	3427	3426

Tabela 5. Intenziteti traka prisutnih u IR spektrima CT–DNK i **Pt1–Pt3**/CT–DNK u različitom molskom odnosu (r).

Prikazani rezultati FT–IR i far-IR su u saglasnosti sa zaključkom prethodno korišćenih metoda i potvrđuju da ispitivani kompleksi pri nižim koncentracijama imaju isti način vezivanja za CT–DNK. Pri molskom odnosu kompleksa platine(II) i DNK od 0,5; 1,0 i 2,0, rezultati FT–IR spektroskopije su pokazali da nema izraženih promena u položaju traka, što bi ukazivalo na promenu konformacije DNK (Slika 43). To znači da elongacija i savijanje DNK usled vezivanja ispitivanih dinuklearnih kompleksa platine(II) ne dovodi do konformacionih promena DNK.



Slika 43. IR spektri Pt1–Pt3/CT–DNK u molskom odnosu r = 0,5.

Gel elektroforeza

Ispitivana je mogućnost vezivanja **Pt1–Pt3** kompleksa za bakterijsku genomsku dvolančanu DNK praćenjem promene intenziteta i pokretljivosti u agaroznom gelu. Rezultati gel elektroforeze ukazuju na razliku u načinu vezivanja ispitivanih **Pt1–Pt3** kompleksa. Kada su ispitivani kompleksi platine(II) koncentracije 5, 25 i 50 μ M reagovali sa 200 ng genomske dsDNK 2 h na 37 °C, DNK trake su se promenile. Vezivanje ispitivanih platina(II) kompleksa za DNK izaziva promene u osetljivosti i pokretljivosti dsDNK traka (Slika 44). Traka dsDNK na pH=7,4 je postala svetlija, dok se trake kontrolne DNK i DMSO rastvarača nisu promenile (Slika 44, traka C). Promene na trakama dsDNK u prisustvu **Pt1–Pt3** kompleksa koncentracije 5 μ M ukazuju da se ispitivani kompleksi vezuju za DNK na pH = 7,4 (**Pt1 > Pt2 > Pt3**).



Slika 44. Trake genomske dsDNK (200 ng) u prisustvu **Pt1–Pt3** kompleksa koncentracije 5, 25 i 50 μM u TE puferu (10 mM Tris, 1 mM EDTA) 2 h na pH = 7,4 i 37°C. M je DNK marker, a C je kontrolna DNK.

U prisustvu **Pt3** kompleksa koncentracije 25 i 50 μ M za vreme od 2 h traka je potpuno nestala što potvrđuje interkalaciju **Pt3** kompleksa u dsDNK. Pri istoj koncentraciji **Pt1** i **Pt2** kompleksa prisutne su trake koje ukazuju na neinterkalativni način vezivanja ovih kompleksa za dsDNK. **Pt1** i **Pt2** imaju sličan način vezivanja jer imaju slične elektroforetograme. Rezultati gel elektroforeze potvrđuju nemogućnost interkalacije EtBr usled vezivanja ispitivanih platina(II) kompleksa. Uticaj kompleksa na deformaciju strukture DNK raste sa povećanjem koncentracije kompleksa. Elongacija DNK usled interkalacije **Pt3** kompleksa uspešnije sprečava vezivanje EtBr nego deformacione strukturne promene DNK izazvane vezivanjem **Pt1** i **Pt2** kompleksa za fosfatne grupe DNK molekula.

Molekulski doking

Primenom molekulskog dokinga na ispitivane sisteme (DNK/Pt(II)) može se predvideti način vezivanja kompleksa platine(II) za DNK, a samim tim i terapeutski potencijal ispitivanih kompleksa. Na osnovu eksperimentalnih rezultata zaključeno je da mostni ligandi u Pt1–Pt3 kompleksima imaju uticaj na prirodu interakcija ispitivanih kompleksa i njihovih akva derivata (Pt1W–Pt3W) sa DNK, zbog čega su ove interakcije ispitivane i primenom molekulskog dokinga.

Energetski najpovoljniji način vezivanja hlorido kompleksa (**Pt1–Pt3**) za DNK je vezivanje za mali žljeb (*minor groove binding*) koji se nalazi u regionu koji je bogat A=T baznim parovima (Slika 45). Međutim, za akva derivate, **Pt1W–Pt3W** nađeno je da se za DNK vezuju načinom koji do sada nije opisan u literaturi (Slika 46). Nov način vezivanja kompleksa za DNK smo nazvali prekrivanje malog žljeba (*minor groove covering*). Energije vezivanja hlorido platina(II) kompleksa su u rasponu od -7,5 do -8,0 kcal/mol, dok je opseg energija vezivanja za akva derivate od -10,0 do -10,5 kcal/mol (Slika 45). Razlike u energijama vezivanja **Pt1–Pt3** i **Pt1W–Pt3W** kompleksa su rezultat razlike u naelektrisanju kompleksa (+2 za hlorido komplekse, +4 za akva komplekse). Veće pozitivno naelektrisanje **Pt1W–Pt3W** kompleksa dovodi do jačih elektrostatičkih interakcija sa negativno naelektrisanim fosfatnim grupama DNK u poređenju sa hlorido platina(II) kompleksima.



Slika 45. Strukture i energije najstabilnijih načina vezivanja Pt1–Pt3 kompleksa i njihovih akva derivata (Pt1W–Pt3W) za DNK dobijene primenom molekulskog dokinga.



Slika 46. Strukture najstabilnijih načina vezivanja Pt1–Pt3 (vezivanje za mali žljeb) i Pt1W– Pt3W kompleksa (prekrivanje malog žljeba).

Rezultati molekulskog dokinga su pokazali da samo **Pt3** kompleks interkalira u DNK, dok se drugi kompleksi vezuju za fosfatnu kičmu DNK prekrivanjem malog žljeba (Slika 47A). Interkalacija preko spirale (*threading intercalation*) **Pt3** kompleksa je rezultat manjeg pozitivnog naelektrisanja (+2) ovog kompleksa, u poređenju sa njegovim **Pt3W** analogom (+4), kao i planarnosti mostnog bpe liganda (Slika 47B). Za **Pt1** i **Pt2** komplekse interkalacija se pokazala kao nepovoljan način vezivanja zbog neplanarnosti 4,4'-bipy i bpa mostnih liganada, koji uslovljavaju sličan način vezivanja ova dva platina(II) kompleksa (Slika 47A).



Slika 47. Strukture najstabilnijih načina vezivanja Pt1–Pt3 i Pt1W–Pt3W kompleksa za DNK dobijene molekulskim dokingom (A); dve vrste interkalacije preuzete iz Proteinske baze podataka (pdb) (B).

S obzirom da su rezultati prethodno korišćenih eksperimentalnih metoda pokazali da povećanje koncentracije dinuklearnih **Pt1–Pt3** kompleksa utiče na način vezivanja kompleksa za DNK, primenom molekulskog dokinga analizirana su dva moguća mesta vezivanja (BS1 i BS2) za ovaj biomolekul (Slika 48). Mesta vezivanja **Pt1–Pt3** kompleksa za B-DNK konformer se nalaze u malom žljebu, a energije vezivanja su od –7,3 do –8,6 kcal/mol. Najstabilniji proizvod sa B-DNK konformerom gradi **Pt3** kompleksa (–8,56 kcal/mol) vezujući se za BS1 vezivno mesto, dok je energiju vezivanja **Pt2** kompleksa za isto vezivno mesto –7,75 kcal/mol. Odgovarajući akva **Pt1W–Pt3W** kompleksi grade stabilnije adukte sa B-DNK u odnosu na hlorido komplekse (energija vezivanja od –8,5 do –9,7 kcal/mol). Razlika u energijama vezivanja akva i hlorido kompleksa je posledica različitog pozitivnog naelektrisanja +4 za **Pt1W–Pt3W**, odnosno +2 za **Pt1–Pt3** komplekse, koje utiče na jačinu elektrostatičkih interakcija između platina(II) kompleksa i DNK. Prema tome, supstitucijom hlorido liganda u **Pt1–Pt3** kompleksima molekulom vode (**Pt1W–Pt3W**) dolazi do promene načina vezivanja kompleksa za DNK. Akva derivati vezuju se duž fosfatne kičme (unutarlančano fosfatno
vezivanje, *phosphate backbone*, Slika 48). Ispitivani **Pt1W-Pt3W** kompleksi se vezuju i načinom koji je nazvan premošćavanje malog žljeba (*minor groove spanning*), pri čemu se **Pt2W** kompleks jedino vezuje na ovaj način za vezivno mesto BS1. Najstabilniji način vezivanja **Pt1W** i **Pt3W** kompleksa je prekrivanje malog žljeba (*minor groove covering*). Za drugo vezivno mesto (BS2) u DNK **Pt2W** kompleks vezuje se premošćavanjem velikog žljeba (*major groove spanning*). Prema tome, **Pt2W** kompleks se za BS1 i BS2 vezuje premošćavanjem žljebova (*groove spanning*).



Slika 48. Strukturni načini vezivanja Pt1–Pt3 i Pt1W–Pt3W kompleksa za BS1 i BS2 vezivna mesta u B-DNK konformeru (pdb kod: 1BNA).

Rezultati molekulskog dokinga su pokazali da se ispitivani hlorido i akva platina(II) kompleksi vezuju za fosfatne grupe A-DNK konformera (pdb kod: 5MVK, Slika 49). Akva **Pt1W–Pt3W** kompleksi imaju veći afinitet vezivanja za A-DNK konformer u odnosu na hlorido komplekse. Dobijeni rezultati, koji opisuju način vezivanja ispitivanih platina(II) kompleksa za A-DNK konformer, nisu u saglasnosti sa rezultatima koji su dobijeni na osnovu eksperimentalnih merenja, koji su pokazali da **Pt3** kompleks interkalira u DNK.

Na osnovu rezultata molekulskog dokinga zaključeno je da se hlorido kompleksi vezuju za mali žljeb, a akva derivati za fosfatne grupe A- i B-DNK konformera, pri čemu ne dolazi do promene konformacije biomolekula (iz B- u A-formu). Uprkos činjenici da se pretpostavljao jedan način vezivanja ispitivanih platina(II) kompleksa, prisutna su dva načina vezivanja, jer u rastvoru postoji smeša hlorido i akva kompleksa.



Slika 49. Strukture i energije vezivanja najstabilnijih načina vezivanja Pt1–Pt3 i odgovarajućih akva derivata (Pt1W–Pt3W) za A-DNK konformer (pdb kod: 5MVK).

4.3.2. In vitro i in vivo ispitivanja citotoksičnog potencijala Pt1-Pt3 kompleksa

In vitro ispitivanja

In vitro citotoksična aktivnost dinuklearnih **Pt1–Pt3** kompleksa ispitivana je na četiri ćelijske linije: humane zdrave ćelije fibroblasta pluća (MRC-5), humane ćelije karcinoma melanoma (A375), adenokarcinoma pluća (A549) i kolorektalnog karcinoma (HCT116). Sposobnost preživljavanja ćelija nakon povećanja koncentracije dinuklearnih platina(II) kompleksa i cisplatine (referentni kompleks), izračunata je korišćenjem MTT testa, a IC₅₀ vrednosti (koncentracija jedinjenja koja dovodi do smanjenja preživljavanja ispitivanih ćelija za 50%) date su u Tabeli 6. Na osnovu IC₅₀ vrednosti jasno je da ispitivani kompleksi imaju slab citotoksični potencijal i ne pokazuju selektivnosti u odnosu na kancerogene i zdrave ćelijske linije. Najveći citotoksični potencijal u odnosu na ispitivane ćelijske linije pokazao je **Pt3** kompleks.

Kompleks	Ćelijske linije					
	MRC-5	A375	A549	HCT116		
Pt1	94,7	94,7	106,6	100		
Pt2	82,6	88,1	88,1	125		
Pt3	55	60,6	55	125		
Cis-Pt	3,3	4,1	2,5	1		

Tabela 6. IC₅₀ vrednosti dobijene MTT testom na humanim ćelijskim linijama izražene u μ M (standardna devijacija je između 1-5%).

In vivo ispitivanja

Toksičnost predstavlja glavnu prepreku u korišćenju relevantnih lekova za lečenje kancerogenih oboljenja. Zbog toga je važno ispitati toksičnost novosintetisanih jedinjenja, pri čemu se mogu koristiti različiti *in vivo* modeli. Embrioni zebrica (*Danio rerio*) se često koriste kao *in vivo* alternativni modeli sisara za ispitivanje toksičnosti lekova i farmakološki aktivnih jedinjenja [251]. Ispitivanje toksičnosti platina(II) kompleksa na modelu embriona zebrica je veoma važano zbog njihove genetske sličnosti sa humanim organizmima, a transparentnost njihovog tela omogućava vizuelno ispitivanje organa nakon tretiranja ispitivanim kompleksima. Ispitivanja su pokazala da toksičnost **Pt1–Pt3** kompleksa zavisi od njihove koncentracije. Pri koncentraciji kompleksa od 100 μ M procenat uginulih embriona zebrica bio je 75% u prisustvu **Pt1** i 20% u prisustvu **Pt3**, dok su nakon koncentracije od 100 μ M **Pt2** kompleksa i cisplatine svi embrioni preživeli i razvili se bez teratogenih malformacija³ (Slika 50). Važno je naglasiti da nijedan embrion u prisustvu ispitivanih platina(II) kompleksa nije pokazao znakove kardiovaskularnih oštećenja (pojava perikardijalnog edema i nepravilni otkucaji srca), niti znakove oštećenja jetre (nekroza, promena veličine, smanjena apsorpcija žumanceta).



Slika 50. Rezultati ispitivane toksičnosti Pt1–Pt3 kompleksa i cisplatine prema embrionima zebrica, izraženi kao LC₅₀ vrednost. Embrioni zebrice su bili izloženi različitim koncentracijama kompleksa u periodu od 6 do 120 hpf.

³ Stečeni deformitet građe tela ili organa embriona

Na osnovu ovih rezultata, kao i uočenog smanjena cirkulacije krvi u kaudalnom regionu embriona, koji su bili izloženi **Pt1–Pt3** kompleksima, ispitivana je i njihova mogućnost da inhibiraju angiogenezu. Transgeni embrioni zebrica Tg(fli1:EGFP) sa fluorescentno obeleženim endotelnim ćelijama su korišćeni za praćenje angiogeneze. Angiogeneza je složen fiziološki proces neovaskularizacije tj. formiranje mreže novih krvnih sudova iz postojećih venula i kapilara. Za vizuelizaciju vaskularizacije tkiva korišćen je fluorescentni mikroskop. Angiogeneza je praćena posmatranjem dve vrste krvnih sudova i to intersegmentalnih (ISV) (razvijaju se 48 h nakon oplodnje) i subintestinalnih (SIV) (razvijaju se 72 h nakon oplodnje), kao i dorzalnih uzdužnih anastomotičkih sudova (DLAV). Inhibicija angiogeneze se prati posmatranjem smanjenja broja ili dužine krvnih sudova duž tela. Anti-angiogena aktivnost dinuklearnih **Pt1–Pt3** kompleksa upoređivana je sa aktivnošću klinički korišćenih agenasa (cisplatina, sunitinib) dok je dimetilsulfoksid korišćen kao kontrola (Slika 51A).



Slika 51. *In vivo* anti-angiogena aktivnost dinuklearnih Pt1–Pt3 kompleksa i sunitiniba (A); IC₅₀ vrednosti Pt1–Pt3 kompleksa dobijene tretiranjem embriona sa anti-angiogenim fenotipom (B); Rezultati inhibicije ISV angiogeneze (C) i SIV angiogeneze (D). Statistički značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe su označene (*P < 0,05, **P < 0,01; ***P < 0,001).

Potvrđeno je da svaki od ispitivanih dinuklearnih platina(II) kompleksa efikasno inhibira ISV i SIV angiogenezu i da inhibicija zavisi od koncentracije kompleksa (P < 0.05) (Slika 51C,D). Kompleks **Pt1** se pokazao efikasnijim od **Pt2** i **Pt3** kompleksa (P < 0.001).

Pri koncentraciji od 1 μ M **Pt1** kompleks inhibira angiogenezu i ima IC₅₀ vrednost od 3,2 μ M. Kompleksi **Pt2** (tri puta) i **Pt3** (sedam puta) su pokazali manju aktivnost u odnosu na **Pt1** kompleksa, sa IC₅₀ vrednostima od 9,8 μ M za **Pt2** i 22,4 μ M za **Pt3** (Slika 51B). Za razliku od ovih kompleksa, cisplatina nije pokazala inhibitornu aktivnost na neovaskularnim tkivima, čak i pri koncentraciji od 50 μ M (rezultati nisu prikazani).

Ispitivana je anti-angiogena aktivnost dinukelarnih platina(II) kompleksa i poređena je sa aktivnošću sunitiniba, koji se u kliničkim uslovima koristi kao inhibitor angiogeneze [252]. Rezultati su pokazali da Pt1 i Pt2 kompleksi pri koncentraciji od 12,5 µM i Pt3 pri koncentraciji od 25 µM inhibiraju formiranje krvnih sudova na isti način kao i sunitinib pri koncentraciji od 1,25 µM (vrednosti EC₅₀, Tabela 7). Međutim, anti-angiogena aktivnost Pt1 i Pt2 pri koncentraciji od 25 µM je veća u poređenju sa aktivnošću sunitiniba koncentracije 1,25 μ M (P < 0,001 za oba kompleksa). Iako rezultati ukazuju na slabiju anti-angiogenu aktivnost Pt1-Pt3 kompleksa u poređenju sa sunitinibom (Tabela 7), nijedan od ispitivanih dinuklearnih platina(II) kompleksa nije pokazao toksičnost pri ispitivanim koncentracijama, dok je sunitinib kardiotoksičan i smanjuje preživljavanje embriona na 120 hpf (Slika 51) [219]. Embrioni su se na svakoj od primenjenih anti-angiogenih doza Pt1-Pt3 kompleksa razvili bez toksičnih neželjenih efekata, za razliku od embriona tretiranih sunitinibom koncentracije 1,25 µM, kod kojih se javlja perikardijalni edem (Slika 51). Terapeutski opseg (Tw, odnos između vrednosti LC₅₀ i IC_{50ang}; Tabela 7) Pt1-Pt3 kompleksa bio je do sedam puta veći od opsega za sunitinib (Tw od 2,16), posebno za Pt1 kompleks (Tw od 14,93) što ukazuje da ispitivani kompleksi poseduju manju toksičnost (Tabela 7). Kardiotoksičnost sunitiniba, praćena nefrotoksičnošću i mijelosupresijom pri njegovom korišćenju, predstavlja veliku prepreku koja ograničava dugotrajnu primenu ovog leka [253]. Na osnovu dobijenih rezultata jasno je da se pomenuta toksičnost može prevazići primenom dinuklearnih platina(II) kompleksa.

Kompleks	LC50	IC _{50ang}	Tw	EC50(µM)	
	(µM)		_	ISVs	SIVs
Pt1	47,62	3,19	14,93	9,34	4,87
Pt2	>100	9,75	> 10,26	> 25	18,23
Pt3	>100	21,11	> 4,74	> 25	27,39
cisplatina	>100	>50	/	>50	>50
sunitinib*	1,08	0,50	2,16	1,76	1,06

Tabela	7.	Toksikološki	parametri	dobijeni	iz	grafika	zavisnosti	procene	toksičnosti	i
anti-ang	ioge	enog potencijal	a od konce	ntracije ko	omp	oleksa Pt	1-Pt3, cisp	latine i su	nitiniba.	

 LC_{50} - koncentracija koja uzrokuje letalne efekte na 50% ispitivanih embriona

 $IC_{50ang}-koncentracija \ na \ kojoj \ 50\% \ embriona \ ispoljava \ anti-angeogeni \ fenotip$

Tw – terapeutski opseg dobijen iz odnosa LC_{50}/IC_{50ang} vrednosti

 EC_{50} – koncentracija koja uzrokuje letalne i teratogene efekte na 50% ispitivanih embriona

* – rezultati iz literature [241]

Antikancerogena i antimetastatska aktivnost dinuklearnih **Pt1–Pt3** kompleksa, ispitivana je na modelu ksenotransplantnog tumora zebrice B16–F10 i HCT116. Dobijeni rezultati su upoređeni sa aktivnošću cisplatine. Rezultati ukazuju da nijedan od ispitivanih platina(II) kompleksa nije bio aktivan prema ćelijama humanog kolorektalnog karcinoma, kao

što je cisplatina, ali su svi kompleksi pokazali aktivnost prema ksenotransplatnim B16–F10 ćelijama (kancerogene ćelije mišijeg melanoma) (Slika 52).



Slika 52. Antikancerogena i anti-angiogena aktivnost Pt1–Pt3 kompleksa i cisplatine na ksenotransplantnim B16–F10ćelijama zebrica.

Ćelije melanoma B16–F10 (crvena masa) su mikroinjektirane u žumance transgenih $T_g(fli1:EGFP)$ embriona sa fluorescentno (zelenim) obeleženim sudovima (Slika 53). Brojne metastaze (obeležene strelicama) su otkrivene u celom telu tri dana nakon injektiranja (120 hpf), posebno u kaudalnom predelu (Slika 53A). Veoma visok metastatski, kao i jak angiogenski potencijal, usled prekomerne ekspresije vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) je karakteristika B16–F10 ćelija [254]. Ispitivani Pt1–Pt3 kompleksi pokazuju mnogo bolju antikancerogenu i antimetastatsku aktivnost u poređenju sa cisplatinom, posebno Pt1 kompleks (P <0,0001). U prisustvu cisplatine volumen tumora, samo pri koncentraciji od 25 µM, bio je smanjen sa slabim efekatom na angiogenezu i metastazu ćelija raka (Slika 53). Pri koncentraciji od 5 μ M Pt1 kompleksa volumen tumora znatno se smanjio (57,2 ± 8,7 % u poređenju sa netretiranom kontrolnom grupom, P < 0,001). Pored toga ovaj kompleks je inhibirao tumorsku angiogenezu i sprečio metastazu ćelija melanoma B16-F10 (manje od 5% ksenotransplantata imalo je diseminovane ćelije melanoma u kaudalnom predelu) (Slika 53). Važno je napomenuti da je nakon tretiranja ćelija **Pt1** kompleksom koncentracije od 25 μ M, tumor potpuno nestao (bez jasne crvene fluorescencije), dok su krvni sudovi bili jedva vidljivi (Slika 53), odnosno tretirani embrioni su preživeli (120 hpf) bez neželjenih efekata i uticaja na njihov razvoj.

Kompleksi **Pt2** i **Pt3** su na sličan način efikasno inhibirali razvoj tumora i neovaskularizaciju tumora, ali su pokazali slabiji efekat u odnosu na **Pt1** kompleks. Ipak, dobijeni rezultati ukazuju da ispitivani dinuklearni platina(II) kompleksi mogu biti novi efikasni antitumorski agensi, posebno **Pt1** kompleks. Interesantno je da rezultati *in vitro* ispitivanja ukazuju na umerenu citotoksičnost platina(II) kompleksa prema ispitivanim ćelijama, dok rezultati *in vivo* ispitivanja pokazuju efikasnu antikancerogenu aktivnost **Pt1–Pt3** kompleksa. Ovi rezultati nisu iznenađujući i ukazuju na razlike između korišćenih *in vitro* i *in vivo* modela. Razlike korišćenih modela su posledica složenosti organizama, metaboličkih transformacija apsorbovanih bioaktivnih molekula, koji se metabolišu u jetri, kao i njihovom uticaju na tumorsko mikrookruženje i na imune ćelija, posebno neutrofile [255].



Slika 53. Antikancerogena aktivnost Pt1–Pt3 kompleksa i cisplatine koncentracije 5µM i 25 µM (A); Volumen B16–F10 tumorskih ćelija u zavisnosti od koncentracije Pt1–Pt3 kompleksa i cisplatine (B); Procenat embriona zebrice koji pokazuju diseminaciju ćelija melanoma u kaudalnom predelu nakon tretmana dinuklearnim Pt1–Pt3 kompleksima i cisplatinom (C). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija za tri nezavisna eksperimenta, *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 prema ANOVA i Bonferonijevom (*Bonferonni*) testu.

4.4. Interakcije dinuklearnih kompleksa paladijuma(II) sa biomolekulima i ispitivanje njihovog *in vitro* citotoksičnog potencijala

Dinuklearni **Pd1–Pd6** kompleksi sadrže različite mostne ligande koji mogu da utiču na način interakcije sa biomolekulima kao i na njihovu citotoksičnost (Slika 29). Shodno tome ispitivane su interakcije **Pd1–Pd6** kompleksa sa CT–DNK i BSA. Interakcije paladijum(II) kompleksa sa CT–DNK ispitivane su primenom UV–Vis spektrofotometrije, fluorescentne spektroskopije i merenjem viskoziteta.

S obzirom da serum albumini imaju ulogu transportnih proteina u organizmu, važno je za primenu leka utvditi način vezivanja leka kao i mogućnost otpuštanja leka kada dođe u kontakt sa obolelom ćelijom. Za ispitivanje načina transporta kompleksa u organizmu najčešće korišćen albumin je serum albumin izolovan iz krvi goveda (BSA) zbog njegove strukturne homologije sa humanim serum albuminom (HSA). Fluorescencija koju emituje sam BSA molekul potiče uglavnom od triptofana, pa se interakcije kompleksa metala i BSA mogu eksperimentalno pratiti promenama emisionih spektara BSA [241]. Smanjenje intenziteta fluorescencije zbog promene sredine oko fluorofora ukazuje na prirodu reakcije vezivanja leka

za albumin [242]. Interakcije **Pd1–Pd6** kompleksa sa BSA ispitivane su primenom fluorescentne spektroskopije.

4.4.1. Interakcije Pd1–Pd6 kompleksa sa CT–DNK

UV–Vis spektrofotometrijska merenja

Apsorpcioni spektri **Pd1–Pd6** kompleksa snimani su u odsustvu i prisustvu rastuće koncentracije CT–DNK (Slika 54). U UV–Vis spektrima samih kompleksa uočavaju se apsorpcioni maksimumi na 259 nm za **Pd1**, 257 nm za **Pd2**, 299 nm za **Pd3**, 234 i 316 nm za **Pd4**, 226 i 309 nm za **Pd5** i 231 i 312 nm za **Pd6** kompleks. Ovi maksimumi se pripisuju $\pi \rightarrow \pi^*$ prelazima koordinovanih mostnih 4,4'-bipy, bpa, bpe, qx, qz i phtz liganada [204,205]. Apsorpcioni maksimumi svih ispitivanih paladijum(II) kompleksa, prilikom povećanja koncentracije CT–DNK, pokazuju hiperhromni efekat što ukazuje na to da se ispitivani kompleksi vezuju za CT–DNK. Apsorpcioni maksimumi **Pd1–Pd3** kompleksa pored hiperhromnog efekta pokazuju i batohromni efekat.

Afinitet vezivanja dinuklearnih paladijum(II) kompleksa za CT–DNK može se odrediti na osnovu vrednosti konstanti vezivanja (K_b) izračunatih korišćenjem jednačine date u eksperimentalnom delu (Ekperimentalni deo 3.4.2). Vrednosti K_b (Tabela 8) za komplekse **Pd1** i **Pd3** su veće u odnosu na K_b vrednost **Pd2** kompleksa i istog reda veličine su kao i K_b klasičnog interkalatora EtBr ($1,23 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) [235]. Razlike u načinu vezivanja **Pd1–Pd3** kompleksa za CT–DNK su posledica prisustva različitih mostnih (4,4'-bipy, bpa, bpe) liganda u ovim kompleksima. Kompleksi **Pd1** i **Pd3** u svojoj strukturi sadrže 4,4'-bipy, odnosno bpe mostne ligande koji usled svoje rigidnosti uslovljavaju sličnost u interakcijama ova dva kompleksa sa CT–DNK, a dobijene K_b vrednosti su u skladu sa rezultatima koji su dobijeni za strukturno slične platina(II) komplekse [202]. Zbog mogučnosti slobodne rotacije –CH₂–CH₂– veze u bpa mostnom ligandu **Pd2** kompleks ostvaruje slabije interakcije sa CT–DNK. Batahromno pomeranje apsorpcionog maksimuma **Pd1–Pd3** kompleksa ukazuje na interkalaciji ovih kompleksa, odnosno njihovih aromatičnih hromofora između baznih parova CT–DNK.



Slika 54. Apsorpcioni spektri kompleksa Pd1–Pd6 u odsustvu i prisustvu CT–DNK. Strelice pokazuju promenu apsorpcije usled povećanja koncentracije CT–DNK. Umetnuti grafik predstavlja zavisnost [DNK]/(ε_a-ε_f) od [DNK].

Vrednosti K_b izračunate za komplekse **Pd4–Pd6** sugerišu da kompleksi **Pd5** i **Pd6** imaju značajno veći afinitet vezivanja za CT–DNK u poređenju sa **Pd4** kompleksom. Razlike u vrednostima K_b se mogu pripisati različitom položaju heteroatoma azota u mostnim benzodiazinskim ligandima (qx, qz i phtz), koji imaju važnu ulogu u načinu vezivanja paladijum(II) kompleksa za CT–DNK.

Kompleks	K _b	ΔG	Hiperhromizam
	(1/M)	(kJ/mol)	(%)
Pd1	$1,2 \cdot 10^{5}$	-30,1	31
Pd2	$7,4\cdot 10^4$	-28,9	56
Pd3	$1,5 \cdot 10^{5}$	-30,7	11
Pd4	$1,5 \cdot 10^{4}$	-23,8	58
Pd5	$6,0 \cdot 10^{4}$	-27,3	63
Pd6	$6,4 \cdot 10^{4}$	-27,5	65

Tabela 8. Konstante vezivanja (K_b), Gibsova energija (ΔG) i hiperhromizam (%) dinukelarnih **Pd1–Pd6** kompleksa.

Poređenjem K_b vrednosti za ispitivane dinuklearne paladijum(II) komplekse može se zaključiti da **Pd1–Pd3** kompleksi pokazuju jači afinitet vezivanja u odnosu na **Pd4–Pd6** komplekse. Ovakav rezultat je bio očekivan s obzirom da se ispitivani paladijum(II) kompleksi razlikuju u mostnim ligandima. Naime, piridinski prstenovi u 4,4'-bipy, bpa i bpe ligandima su fleksibilniji u odnosu na qx, qz i phtz ligande. Kod benzodiazinskih liganada fleksibilnost je onemogućena jer su prstenovi kondenzovani, a samim tim i kruti, što uslovljava delimičnu interkalaciju **Pd4–Pd6** kompleksa u DNK. Dobijene negativne vrednosti Gibsove energije za sve ispitivane dinuklearne paladijum(II) komplekse ukazuju na spontanost ovih interakcija (Tabela 8).

Fluorescentna merenja

U cilju detaljnijeg ispitivanja načina interakcije dinuklearnih paladijum(II) kompleksa sa CT–DNK korišćena je fluorescentna emisiona spektroskopija kojom se meri promena fluorescencije EtBr/CT–DNK adukta. Emisioni spektri EtBr/CT–DNK u odsustvu i prisustvu ispitivanih kompleksa mereni su u 0,01 M PBS puferu na pH = 7,4 i sobnoj temperaturi. U toku eksperimenta koncentracije CT–DNK i EtBr bile su konstantne, a koncentracije dinuklearnih paladijum(II) kompleksa su bile stehiometrijski promenljive. Povećanje koncentracije paladijum(II) kompleksa (r = 0 - 0,9) dovodi do smanjenja intenziteta fluorescencije EtBr/CT–DNK na 612 nm (Slika 55). Smanjenje fluorescencije ukazuje da svi ispitivani dinuklearni paladijum(II) kompleksi istiskuju EtBr i vezuju se za CT–DNK.

Doktorska disertacija

Anđela A. Franich



Slika 55. Emisioni spektri EtBr/CT–DNK u odsustvu i prisustvu Pd1–Pd6 kompleksa. Strelice pokazuju promenu emisije usled povećanja koncentracije Pd1–Pd6 kompleksa. Umetnuti grafik predstavlja zavisnost I₀/I od [Q].

Stern-Volmerove konstante (K_{sv}), konstante vezivanja (K_a) kao i broj vezujućih mesta (n) za ispitivane dinuklearne paladijum(II) komplekse su izračunate korišćenjem jednačina koje su date u eksperimentalnom delu (Eksperimentalni deo 3.4.2, Tabeli 9). Vrednosti K_{sv} za **Pd1–Pd3** komplekse opadaju u nizu **Pd3** > **Pd1** > **Pd2**, što je u skladu sa prethodno opisanim rezultatima za analogne komplekse platine(II) koji sadrže iste 4,4'-bipy, bpa i bpe mostne ligande [236]. Dobijeni rezultati pokazuju da mostni ligandi u dinuklearnim platina(II) i

paladijum(II) kompleksima imaju važnu ulogu u načinu vezivanja kompleksa za CT–DNK. Vrednosti konstanti vezivanja (K_a) za **Pd1–Pd3** komplekse se smanjuju istim redosledom kao vrednosti K_{sv} što ukazuje da **Pd3** kompleks ostvaruje najjaču vezu sa CT–DNK. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da ispitivani **Pd1–Pd3** kompleksi interkaliraju u CT–DNK, a bpe mostni ligand omogućava **Pd3** kompleksu uspostavljanje najjačih interakcija sa CT–DNK.

Kompleks	Kompleks $\frac{K_{sv}}{(1/M)}$		n
Pd1	$7,8 \cdot 10^{4}$	$4,5 \cdot 10^{4}$	0,6
Pd2	$1,7 \cdot 10^{4}$	$1,2 \cdot 10^{4}$	0,6
Pd3	$9,9 \cdot 10^{4}$	$6,6 \cdot 10^{4}$	0,6
Pd4	$1,4 \cdot 10^{4}$	$2,3 \cdot 10^{2}$	0,5
Pd5	$1,4 \cdot 10^{4}$	$5,8 \cdot 10^{3}$	0,8
Pd6	$1,\!4 \cdot 10^{4}$	$5,1 \cdot 10^{4}$	1,2

Tabela 9. Stern-Volmerove konstante (K_{sv}), konstante vezivanja (K_a) i broj vezujućih mesta (n) kompleksa **Pd1–Pd6.**

Sa povećanjem koncentracija **Pd4–Pd6** kompleksa opada intenzitet fluorescentne emisije EtBr/CT–DNK (Slika 55). Izračunate vrednosti K_{sv} za **Pd4–Pd6** komplekse su iste za sva tri kompleksa ($1,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, Tabela 9), a njihove brojne vrednosti ukazuju na interkalaciju ispitivanih kompleksa. Pored toga, brojne vrednosti konstanti vezivanja (K_a) ovih kompleksa potvrđuju da je način vezivanja **Pd4–Pd6** kompleksa za CT–DNK interkalacija. Izračunate vrednosti K_a se smanjuju u nizu **Pd6** > **Pd5** > **Pd4** što je u saglasnosti sa rezultatima koji su dobijeni primenom UV–Vis spektrofotometrije.

Najveću vrednost K_{sv} ispitivanih dinuklearnih paladijum(II) kompleksa ima Pd3 kompleks potvrđujući činjenicu da planarnost bpe mostnog liganda omogućava bolju interkalaciju ovog kompleksa u CT–DNK. Niže vrednosti konstanti za Pd4–Pd6 kompleksa u odnosu na Pd1–Pd3 komplekse ukazuju da kondenzovani prstenovi u benzodiazinskim ligandima dovode do slabijih interakcija sa CT–DNK. Analogno načinu vezivanja Pt1 i Pt2 kompleksi za CT–DNK, može se pretpostaviti da pored interkalacije Pd1 i Pd2 kompleksi mogu se vezati i za fosfatne grupe CT–DNK molekula. Rigidnost benzodiazinskih liganada (Pd4–Pd6) uslovljava interkalaciju ovih kompleksa, što za posledicu ima veće smanjenje intenziteta emisije u odnosu na Pd1–Pd3 komplekse. Broj vezujućih mesta ispitivani paladijum(II) kompleksa za CT–DNK je n= 0,5-1,2 (Tabela 9).

Merenje viskoziteta

Rezultati merenja viskoziteta CT–DNK u prisustvu **Pd1–Pd6** kompleksa prikazani su na Slici 56 kao grafička zavisnost $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ u odnosu na r (r = 0 - 0,9), gde je η viskozitet CT–DNK u prisustvu ispitivanih kompleksa, a η_0 je viskozitet CT–DNK u fosfatnom puferu.



Slika 56. Uticaj povećanja koncentracije **Pd1–Pd3** (A) i **Pd4–Pd6** (B) kompleksa na relativni viskozitet CT–DNK molekula u 0,01 M PBS puferu na pH = 7,40 i sobnoj temperaturi.

Sa povećanjem koncentracije **Pd1–Pd3** kompleksa viskozitet CT–DNK se povećava što potvrđuje da ovi kompleksi interkaliraju između dva lanca CT–DNK. Kompleks **Pd2** pokazuje najmanju promenu viskoziteta što potvrđuje da zbog prisustva bpa mostnog liganda ovaj kompleks ima manju sposobnost interkaliranja u odnosu na **Pd1** i **Pd3** komplekse. Takođe, relativni viskozitet CT–DNK se kontinuirano povećavao sa povećanjem koncentracija **Pd4–Pd6**, što ukazuje na interkalaciju ovih kompleksa. Afinitet vezivanja kompleksa za CT–DNK određen stepenom povećanja viskoziteta opada u nizu **Pd4 > Pd5 > Pd6**. Rezultati merenja relativnog viskoziteta CT–DNK u odsustvu i prisustvu dinukelarnih paladijum(II) kompleksa su pokazali da se ispitivani paladijum(II) kompleksi vezuju za CT–DNK tako što interkaliraju unutar CT–DNK heliksa.

4.4.2. Interakcije dinuklearnih kompleksa paladijuma(II) sa BSA

Fluorescentna merenja

Emisioni spektri BSA snimani su u odsustvu i prisustvu **Pd1–Pd6** kompleksa u fosfatnom puferu i na sobnoj temperaturi (Slika 57). Intenziteti emisije fluorescencije BSA se smanjuju sa povećanjem koncentracije paladijum(II) kompleksa. Promene u sekundarnoj strukturi proteina dovode do promena u okruženju triptofana i ukazuju na vezivanje kompleksa za albumin [256]. Da bi se utvrdio način interakcija dinuklearnih paladijum(II) kompleksa sa BSA, izračunate su vrednosti Stern-Volmerove konstante gašenja fluorescencije (K_{sv}), konstante brzine gašenja fluorescencije biomolekula (k_q), konstante vezivanja (K_a) kao i broj vezujućih mesta (n) (Eksperimentalni deo 3.5) i prikazane su u Tabeli 10. Svi ispitivani paladijum(II) kompleksi pokazuju dobru sposobnost gašenja fluorescencije BSA. Najmanja vrednost K_{sv} nađena je za **Pd2** kompleks. Takođe, svi paladijum(II) kompleksi imaju veće dinamičke konstante gašenja fluorescencije u proteinima ($2 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$) [257], što ukazuje da je navedeno smanjenje intenziteta emisije inicirano formiranjem Pd(II)/BSA proizvoda.

Tabela 10. Stern-Volmerove konstante (K_{sv}), konstanta gašenja fluorescencije albumina (k_q), konstante vezivanja (K_a) i broj vezujućih mesta (n) **Pd1–Pd6** kompleksa.

Komplaka	K _{sv}	kq	Ka	n
Kompleks	(1/M)	$(1/M \cdot s)$	(1/M)	
Pd1	$2,0 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^{13}$	$5,9 \cdot 10^4$	1,0
Pd2	$6,2 \cdot 10^{4}$	$6,2 \cdot 10^{12}$	$3,7 \cdot 10^{3}$	0,8
Pd3	$2,8 \cdot 10^{5}$	$2,8 \cdot 10^{13}$	$9,1 \cdot 10^{4}$	1,0
Pd4	$1,\!4 \cdot 10^{5}$	$1,4 \cdot 10^{13}$	$4,8\cdot 10^4$	0,8
Pd5	$1,5 \cdot 10^{5}$	$1,5 \cdot 10^{13}$	$6,\! 4 \cdot 10^4$	0,8
Pd6	$4, 4 \cdot 10^{5}$	$4, 4 \cdot 10^{13}$	$6,\!4 \cdot 10^4$	0,8

Vrednosti K_a za **Pd1–Pd6** komplekse ukazuju da se paladijum(II) kompleksa vezuju za BSA, međutim raskidanje Pd(II)-BSA veze nakon transporta do ciljane ćelije je sprečeno [258,259]. Izračunate vrednosti broja vezujućih mesta (n) ukazuju da postoji jedno mesto na BSA dostupno za interakciju sa ispitivanim paladijum(II) kompleksima.



Slika 57. Emisioni spektri BSA molekula u odsustvu i prisustvu kompleksa **Pd1–Pd6**. Strelica pokazuje promenu emisije povećanjem koncentracije kompleksa. Umetnuti grafik predstavlja zavisnost I₀/I od [Q].

4.4.3. In vitro ispitivanja citotoksičnog potencijala Pd1-Pd6 kompleksa

In vitro antitumorska aktivnost dinuklearnih [{Pd(en)Cl}₂(μ -4,4'-bipy)](NO₃)₂ (**Pd1**), $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-bpa)](NO_3)_2$ (Pd2), $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-bpe)](NO_3)_2$ (Pd3). $[{Pd(en)Cl}_{2}(\mu-qx)](NO_{3})_{2}$ (Pd4), $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-qz)](NO_3)_2$ (**Pd5**) i $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-phtz)](NO_3)_2$ (Pd6) kompleksa ispitivana je na pet ćelijskih linija: humanog kolorektalnog karcinoma (HCT116), kolorektalnog adenokarcinoma (SW480). adenokarcinoma pluća (A549), mišije ćelijske linije karcinoma kolona (CT26) i karcinoma pluća (LLC1). Sposobnost preživljavanja malignih ćelija nakon tretiranja i sa povećanjem koncentracije dinuklearnih paladijum(II) kompleksa, određene MTT testom prikazana je na Slici 58. Rezultati ovih eksperimenata prikazani su kao IC₅₀ vrednosti (Tabela 11). Citotoksični potencijal ispitivanih kompleksa poređen je sa citotoksičnim potencijalom cisplatine.



Slika 58. Citotoksični potencijal Pd1–Pd6 kompleksa ispitivan na A549 (A), SW480 (B), LLC1 (C), HCT116 (D) i CT26 (E) kancerogenim ćelijama nakon 72 h rasta u prisustvu različitih koncentracije paladijum(II) kompleksa. Svi podaci su predstavljeni kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta izvedena tri puta.

Kompleksi **Pd1–Pd6** su pokazali citotoksičnu aktivnost prema ispitivanim ćelijskim linijama, koja zavisi od koncentracije dinuklearnih paladijum(II) kompleksa (Slika 58). Citotoksičnost **Pd1–Pd3** kompleksa prema ćelijama humanog adenokarcinoma pluća (A549)

je bila niža u poređenju sa cisplatinom. Međutim, citotoksičnost ovih kompleksa prema mišijim ćelijama karcinoma pluća (LLC1) približna je citotoksičnosti koju ispoljava cisplatina i pri koncentraciji od 15,625 µM broj preživelih ćelija se smanjio. Kompleks Pd3 je pokazao najvišu citotoksičnost na ove dve ćelijske linije, dok je kompleks Pd1 imao najmanji efekat. Kompleksi Pd4 i Pd5 su imali sličan citotoksični efekat kao i cisplatina prema ispitivanim A549 dok je citotoksični efekat Pd6 kompleksa bolji u odnosu na cisplatinu. Citotoksični efekat Pd4 kompleksa prema LLC1 ćelijama je bio manji u poređenju sa citotoksičnim efektom cisplatine, dok su Pd5 i Pd6 kompleksi pokazali bolji citotoksični efekat prema LLC1 ćelijama od cisplatine (Slika 58A i 58C). Međutim, ovi kompleksi pokazuju najjači efekat prema A549 ćelijama (Slika 58A). Viabilnost ćelija A549, koje su tretirane sa najnižom koncentracijom Pd4–Pd6 kompleksa (7.8 µM) je bila oko 50 %. Najjače citotoksično dejstvo prema A549 ćelijama ispoljava Pd6 kompleks (Slika 58A). Kompleksi Pd1-Pd3 su pokazali manji antitumorski efekat u odnosu na cisplatinu prema ćelijskoj liniji kolorektalnog karcinoma (Slika 58, Tabela 11), a najnižu aktivnost je pokazao Pd1 kompleks. Kompleksi Pd2 i Pd3 su smanjili sposobnost preživljavanja HCT116 i CT26 ćelija samo pri visokim koncentracijama (>125 µM). U odnosu na Pd1 i Pd2 komplekse Pd3 kompleks je pokazao bolju aktivnost prema ćelijama humanog kolorektalnog adenokarcinoma (SW480) pri koncentraciji od 62,5 μM (Slika 58B). Na nižim koncentracijama, Pd4-Pd6 kompleksi su pokazali manju citotoksičnost prema ćelijama humanog kolorektalnog karcinoma (HCT116) i humanog kolorektalnog adenokarcinoma (SW480) u poređenju sa cisplatinom (Slika 58B i 58D). Međutim, pri koncentraciji od 7,8 µM, koja je pogodna za in vivo primenu, ispitivani Pd4-Pd6 kompleksi su pokazali sličan efekat kao i cisplatina prema CT26 ćelijama (Slika 58E).

Kompleks	IC ₅₀ (µM)					
	A549	LLC1	SW480	HCT116	CT26	
Pd1	90,6	113,9	173,2	155,2	156,7	
Pd2	75,0	83,6	231,2	265,8	224,6	
Pd3	63,9	69,9	117,7	158,3	159,9	
Pd4	10,4	71,1	68,8	60,0	215,0	
Pd5	8,1	39,0	93,8	105,5	99,3	
Pd6	5,5	28,4	192,9	193,8	162,3	
cisplatina	8,6	59,0	5,8	57,0	48,8	

Tabela 11. IC₅₀ vrednosti **Pd1–Pd6** kompleksa dobijene MTT testom na humanim i mišijim tumorskim ćelijama linijama. Podaci su izraženi kao srednja vrednost (standardna devijacija je između 1-5%).

Smrt ćelije ne nastaje kao slučajan proces, već je posledica molekulskih promena koje dovode do toga da ćelija sistematski uništava samu sebe, nakon čega je druge ćelije fagocituju ne ostavljajući nikakav trag. U većini slučajeva programirana ćelijska smrt nastaje apoptozom, pri čemu se ćelija morfološki menja, citoskelet se razgrađuje, a jedro se fragmentiše [260]. Tokom rasta i razvoja organizma, veliki broj ćelija umire apoptozom. Uzimajući u obzir mehanizme ćelijske smrti, najželjenije antitumorsko delovanje nekog agensa se ogleda u mogućnosti da indukuje apoptozu. Potencijalna sposobnost sintetisanih **Pd1–Pd6** kompleksa da indukuju apoptotičku smrt ćelija određena je primenom protočne citometrijske analize

tretiranih ćelija obojenih Aneksin V FITC i propidijum jodidom. Rezultati pokazuju da **Pd1–Pd3** kompleksi indukuju apoptozu u LLC1 ćelijama (Slika 59A). Ovi kompleksi su izazvali veći apoptotički efekat prema LLC1 ćelijama u odnosu na cisplatinu. Veći procenat LLC1 ćelija za vreme od 24 h, koje su tretirane **Pd1–Pd3** kompleksima, bio je u ranoj apoptozi (P < 0,05) i u kasnoj apoptozi (P < 0,005) u poređenju sa ćelijama tretiranim cisplatinom (Slika 59A). Nakon 24 h većina LLC1 ćelija, koje su tretirane **Pd1–Pd3** kompleksima, je bila u kasnoj apoptozi (Slika 59A i 59B). Treba istaći da je procenat LLC1 ćelija u ranoj apoptozi tretiranih **Pd1–Pd3** kompleksima veći u poređenju sa procentom ćelija tretiranih cisplatinom.



Slika 59. Apoptoza LLC1 ćelija netretiranih i tretiranih cisplatinom, Pd1–Pd3 (A) i Pd4–Pd6 (C) kompleksima i apoptoza netretiranih i tretiranih CT26 ćelija cisplatinom i Pd4–Pd6 kompleksima (E) nakon 24 h ispitana primenom protočne citometrije korišćenjem Aneksina V (FITC) i PI dvostrukog obojenja. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna ekperimenta, * P<0,05, *** P<0,001. Dot plot-ovi pokazuju populaciju preživelih (AnnV– PI–), ranih apoptotičkih (AnnV+ PI–), kasnih apoptotičkih (AnnV+ PI+) i nekrotičnih (AnnV– PI+) LLC1 (B i D) i CT26 ćelija (F).</p>

Kompleksi **Pd4–Pd6** dovode do apoptoze CT26 i LLC1 ćelija (Slika 59). Većina tretiranih LLC1 ćelija **Pd4–Pd6** kompleksima je nakon 24 h bila u kasnoj apoptozi (Slika 59C i 59D). Znatno veći procenat (*P*< 0,001) LLC1 ćelija tretiranih **Pd4–Pd6** kompleksima tokom 24 h je bio u kasnoj apoptozi u poređenju sa netretiranim ćelijama (Slika 59D). Nađeno je da je procenat apoptoze LLC1 ćelija, koje su tretirane sa **Pd4–Pd6** kompleksima, veći u poređenju sa apoptozom LLC1 ćelija tretiranih cisplatinom (Slika 59C i 59D). Tokom 24 h značajno veći procenat CT26 ćelija, koje su tretirane **Pd4 i Pd5** kompleksima, su bile u ranoj apoptozi u poređenju sa netretiranim ćelijama (Slika 59E). U istom vremenskom periodu veći procenat CT26 ćelija tretiranih **Pd5** kompleksom je bio u kasnoj apoptozi u poređenju sa netretiranim ćelijama (Slika 59E). U istom vremenskom periodu veći procenat CT26 ćelija tretiranih CT26 ćelija ispitivanim paladijum(II) kompleksima u ranoj apoptozi je sličan procentu ćelija nakon tretmana cisplatinom (Slika 59F).

Ki67 je protein koji se vezuje za DNK i eksprimiran je tokom ćelijskog ciklusa u proliferirajućim ćelijama. Antiproliferativni efekti testiranih agenasa se mogu proceniti na osnovu nivoa ekspresije Ki67 u tretiranim ćelijama [261]. Procenat Ki67-pozitivnih LLC1 ćelija tretiranih kompleksima **Pd1–Pd3** je smanjen u poređenju sa netretiranim i ćelijama tretiranim cisplatinom (Slika 60A).

Kompleks **Pd2** koncentracije 62,5 μ M je značajno oslabio ekpresiju Ki67 u LLC1 ćelijama u poređenju sa netretiranim ćelijama (Slika 60B). Takođe, procenat Ki67-pozitivnih LLC1 ćelija tretiranih kompleksima **Pd4–Pd6** i cisplatinom je bio smanjen u poređenju sa netretiranim ćelijama (Slika 60C i 60D). Procenat Ki67-pozitivnih LLC1 ćelija tretiranih **Pd5** i **Pd6** kompleksima je značajno (P < 0,05) niži u odnosu sa netretirane ćelije (Slika 60C). U odnosu na netretirane ćelije procenat Ki67-pozitivnih CT26 ćelija, koje su tretirane **Pd5** kompleksom koncentracije 62,5 μ M bio je znatno smanjen (Slika 60E i 60F).



Slika 60. Procenat Ki67-pozitivnih LLC1 ćelija netretiranih i tretiranih cisplatinom i kompleksima Pd1–Pd6 (A, C) i procenat Ki67-pozitivnih CT26 ćelija netretiranih i tretiranih cisplatinom i kompleksima Pd4–Pd6 (E) tokom 24 h, određen protočnom citometrijom, predstavljen kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. Reprezentativni *dot plot*-ovi i histogrami prikazuju ekspresiju Ki67 (srednji intenzitet fluorescencije) u ćelijama LLC1 (B, D) i CT26 (F).

Ćelijski ciklus CT26 ćelija tretiranih **Pd4–Pd6** kompleksima ili cisplatinom u vremenskom periodu od 24 h prikazan je na Slici 61. Cisplatina je povećala procenat CT26 ćelije u G2 fazi ćelijskog ciklusa u poređenju sa netretiranim ćelijama. Međutim, tretiranje ovih ćelija ispitivanim paladijum(II) kompleksima (62,5 μ M) nije promenilo procenat CT26 ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa (G1, S i G2) u poređenju sa netretiranim ćelijama (Slika 61). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koji su dobijeni za komplekse paladijum(II) sa saharinatom, za koje je nađeno da izazivaju apoptičku smrt HCT116 ćelija nezavisno od faze ćelijskog ciklusa [262].



Slika 61. CT26 ćelije u fazama ćelijskog ciklusa (G1, S i G2) netretirane i tretirane cisplatinom i Pd4–Pd6 kompleksima (62,5 μM) tokom 24 h obojene Vybrant® DyeCycle™ Rubi bojom i analizirane protočnom citometrijom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta.

ZAKLJUČAK

Cilj doktorske disertacije bio je sinteza dinuklearnih platina(II) i paladijum(II) kompleksa sa aromatičnim *N*-heterocikličnim mostnim ligandima kao potencijalnih antitumorskih agenasa. U okviru ove doktorske disertacije sintetisani su dinuklearni platina(II) i paladijum(II) kompleksi koji kao mostni ligand sadrže 4,4'-bipiridin, 1,2-bis(4-piridil)etan, 1,2-bis(4-piridil)etilen (**Pt1–Pt3**, **Pd1–Pd3**), hinoksalin, hinazolin i ftalazin (**Pd4–Pd6**), a etilendiamin kao bidentatno koordinovan ligand. Sintetisani kompleksi su okarakterisani primenom elementalne mikroanalize, spektroskopskih metoda (¹H i ¹³C NMR, UV-Vis, IR), a za karakterizaciju **Pt1–Pt3** kompleksa primenjena je i masena spektrometrija.

Primenom UV–Vis spektrofotometrije potvrđena je stabilnost dinuklearnih **Pt1–Pt3** i **Pd1–Pd3** kompleksa, dok je stabilnost **Pd1–Pd3** kompleksa dodatno potvrđena primenom ¹H NMR spektroskopije. Dokazano je da su u smeši rastvarača (H₂O/DMSO odnosno D₂O/DMSO- d_6) sintetisani dinuklearni kompleksi stabilni u vremenskom periodu od 24 h.

Interakcije dinuklearnih platina(II) kompleksa sa biomolekulom CT-DNK ispitivane su primenom UV–Vis i emisione spektroskopije, merenjem viskoziteta, FT–IR i far-IR spektroskopije, gel elektroforeze, kao i molekulskim dokingom. Nađeno je da se za CT-DNK vezuju dinuklearni Pt1–Pt3 kompleksi kao i njihovi akva derivati Pt1W–Pt3W koji nastaju hidrolizom hlorido kompleksa. Odnos hlorido (Pt1 i Pt2) i akva (Pt1W i Pt2W) kompleksa u smeši zavisi od molskog odnosa platina(II) kompleksa i CT–DNK, dok je kod Pt3 kompleksa nađeno da molski odnos Pt3 i DNK ne utiče na odnos hlorido i akva oblika ovog kompleksa. Ovi rezultati su posledica različitih afiniteta i načina vezivanja Pt1–Pt3 kompleksa za CT–DNK.

U UV–Vis spektrima **Pt1–Pt3** kompleksa u prisustvu rastuće koncentracije CT–DNK se uočava hiperhromno pomeranje apsor pcionog maksimuma, što sugeriše na interakciju ispitivanih kompleksa sa CT–DNK. Kompleks **Pt3** ima vrednost konstante vezivanja $K_b = 11,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ koja ukazuje da ovaj kompleks interkalira u CT-DNK. Kompleksi **Pt1** i **Pt2** pokazuju niže vrednosti konstanti vezivanja što ukazuje na drugačiji način vezivanja u odnosu na **Pt3** kompleks. Poređenjem interakcija platina(II) kompleksa sa CT-DNK i interakcija *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], EtBr i Hoechst 33258, takođe sa CT–DNK, utvrđeno je da se **Pt1** i **Pt2** kompleksi vezuju za fosfatne grupe CT-DNK heliksa, a **Pt3** kompleks interkalira u CT-DNK heliks.

Rezultati merenja fluorescencije su pokazali da **Pt1–Pt3** kompleksi istiskuju EtBr iz EtBr/CT–DNK adukta. Vrednost izračunate Stern-Volmerove konstante za **Pt3** kompleks ($22,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) ukazuje na interkalaciju kompleksa u CT-DNK, dok niže vrednosti K_{sv} konstante za **Pt1** i **Pt2** komplekse potvrđuju vezivanje ovih kompleksa za fosfatne grupe CT-DNK. Takođe, rezultati su pokazali da svi ispitivani platina(II) kompleksi zauzimaju jedno vezivno mesto prilikom interakcije sa CT–DNK.

Na osnovu merenja viskoziteta CT–DNK u prisustvu dinuklearnih platina(II) kompleksa može se zaključiti da **Pt3** kompleks interkalira u CT–DNK za razliku od **Pt1** i **Pt2** kompleksa koji se vezuju za fosfatne grupe DNK heliksa, što je u saglasnosti sa rezultatima UV-Vis spektrofotometrije i fluorescentne spektroskopije.

Rezultati FT–IR i far-IR spektroskopije ukazuju da prilikom vezivanja **Pt1–Pt3** kompleksa za CT-DNK ne dolazi do promene njene konformacije. Takođe, rezultati ovih ispitivanja potvrđuju da usled hidrolize **Pt1–Pt3** kompleksa pri nižim koncentracijama ispitivani kompleksi ostvaruju isti način vezivanja za CT–DNK, dok povećanjem njihove koncentracije ne dolazi do značajnog pomeranja traka u FT–IR spektrima što potvrđuje da usled vezivanja ispitivanih kompleksa ne dolazi do konformacionih promena CT-DNK heliksa.

Metoda gel elektroforeze je korišćena za ispitivanje interakcija **Pt1–Pt3** kompleksa sa bakterijskom genomskom dvolančanom DNK. Dobijeni rezultati su potvrdili interkalaciju **Pt3** kompleksa i vezivanje **Pt1** i **Pt2** kompleksa za fosfatne grupe CT-DNK.

Rezultati molekulskog dokinga su potvrdili eksperimentalne rezultate vezivanja **Pt1–Pt3** kompleksa za DNK. Kompleks **Pt3** interkalira u DNK, dok se **Pt1** i **Pt2** kompleksi vezuju za fosfatnu kičmu DNK prekrivanjem malog žljeba, što ukazuje da priroda interakcija ispitivanih kompleksa zavisi od mostnog liganda u kompleksima. Rezultati molekulskog dokinga interakcija **Pt1W–Pt3W** kompleksa sa DNK su potvrdili činjenicu da veće pozitivno naelektrisanje (+4) **Pt1W–Pt3W** kompleksa omogućava jače elektrostatičke interakcije sa negativno naelektrisanim fosfatnim grupama DNK u poređenju sa hlorido kompleksima (**Pt1–Pt3**) u kojima kompleksni katjon ima naelektrisanje +2. Ova ispitivanja su, takođe pokazala da supstitucija hlorido liganada sa molekulima vode dovodi do promena u načinu vezivanja kompleksa za DNK, ali ne i do konformacionih promena DNK heliksa.

In vitro citotoksična aktivnost **Pt1–Pt3** kompleksa ispitivana je na humanim zdravim ćelijama fibroblasta pluća, humanim ćelijama karcinoma melanoma, adenokarcinoma pluća i ćelijama kolorektalnog karcinoma. Rezultati MTT testa ukazuju jasno da ispitivani kompleksi imaju slab citotoksični potencijal i ne pokazuju selektivnost u odnosu na kancerogene i zdrave ćelijske linije. Kompleks **Pt3** je pokazao najveći citotoksični potencijal u odnosu na ispitivane ćelijske linije.

Toksičnost dinuklearnih **Pt1–Pt3** kompleksa ispitana je na embrionima zebrica (*Danio rerio*) kao *in vivo* modelima. Nađeno je da toksičnost **Pt1–Pt3** kompleksa zavisi od njihove koncentracije, s tim da nijedan embrion nije pokazao znakove oštećenja kardiovaskularnog sistema, kao ni znakove oštećenja jetre u prisustvu ispitivanih platina(II) kompleksa. Ispitivani kompleksi efikasno inhibiraju ISV i SIV angiogenezu u zavisnosti od koncentracije kompleksa, dok cisplatina nije pokazala inhibitornu aktivnost. Rezultati ispitivanja angiogeneze su pokazali da je kompleks **Pt1** efikasniji od **Pt2** i **Pt3** kompleksa. Na osnovu rezultata anti-angiogene aktivnost ispitivanih kompleksa zaključeno je da dinuklearni platina(II) kompleksi pokazuju slabiju anti-angiogenu aktivnost u poređenju sa sunitinibom. Pored toga, ispitivani kompleksi nisu pokazali toksičnost pri ispitivanim koncentracijama, za razliku od sunitiniba koji je kardiotoksičan i smanjuje preživljavanje embriona. Ispitivanja antikancerogene i antimetastatske aktivnosti dinuklearnih **Pt1–Pt3** kompleksa na modelu ksenotransplantnog tumora zebrice B16–F10 i HCT116 su pokazala da ispitivani kompleksi nisu aktivni prema ćelijama mišijeg melanoma.

Primenom apsorpcione i emisione spektroskopije, kao i merenjem viskoziteta ispitivane su interakcije paladijum(II) kompleksa sa DNK. Rezultati ispitivanja interakcije **Pd1–Pd6** kompleksa sa CT–DNK primenom UV–Vis spektroskopije su pokazali da se paladijum(II) kompleksi vezuju za CT-DNK, a izračunate vrednosti K_b konstante su potvrdile očekivani redosled jačine vezivanja (**Pd3**>**Pd1**>**Pd2**>**Pd6**>**Pd5**>**Pd4**). Jači afinitet vezivanja usled interkalacije **Pd1**–**Pd3** kompleksa u CT–DNK je posledica prisustva 4,4'-bipiridina, 1,2-bis(4-piridil)etana, 1,2-bis(4-piridil)etilena kao mostnih liganada. Kondenzovani prstenovi u hinoksalinu, hinazolinu i ftalazinu onemogućavaju fleksibilnost mostnih liganada, što uslovljava slabiji afinitet vezivanja **Pd4–Pd6** kompleksa u odnosu na ostale ispitivane paladijum(II) komplekse. Izračunate slobodne Gibsove energije imaju negativne vrednosti što je potvrda spontanosti ispitivanih interakcija. Uticaj mostnih liganada na način i jačinu interakcija dinuklearnih paladijum(II) kompleksa sa CT-DNK je potvrđen i na osnovu rezultata emisione spektroskopije. Usled planarnosti mostnog bpa liganda **Pd3** kompleks ostvaruje najjače interakcije sa CT-DNK. Mostni 4,4'-bipiridin i 1,2-bis(4-piridil)etan ligandi u **Pd1** i **Pd2** kompleksima, pored interkalacije, omogućavaju da se ovi kompleksi vezuju i za fosfatne grupe CT-DNK heliksa. Rigidnost benzodiazinskih liganada u **Pd4–Pd6** kompleksima uslovljava interkalaciju kompleksa, na šta ukazuju vrednosti konstanti vezivanja (K_a).

Rezultati emisione spektroskopije reakcija **Pd1–Pd6** kompleksa sa bovin serum albuminom su pokazali da ispitivani kompleksi imaju sposobnost gašenja fluorescencije BSA i da se vezuju za jedno vezivno mesto u biomolekulu. Vrednosti konstanti vezivanja (K_a) **Pd1–Pd6** kompleksa za BSA ukazuju da BSA nije dobar transportni protein za ove komplekse, jer raskidanje Pd(II)-BSA veze nakon transporta je onemogućeno.

Citotoksični potencijal Pd1–Pd6 kompleksa poređen je sa citotoksičnim potencijalom cisplatine. Ispitivani kompleksi su pokazali citotoksičnu aktivnost prema ćelijskim linijama humanog kolorektalnog karcinoma, kolorektalnog adenokarcinoma, adenokarcinoma pluća, mišije ćelijske linije karcinoma kolona i karcinoma pluća, koja zavisi od koncentracije dinuklearnih paladijum(II) kompleksa. Citotoksičnost Pd1-Pd3 kompleksa prema ćelijama humanog adenokarcinoma pluća je niža u poređenju sa cisplatinom, ali je prema mišijim ćelijama karcinoma pluća približna citotoksičnosti koju ispoljava cisplatina. Najvišu citotoksičnost prema ove dve ćelijske linije je pokazao Pd3 kompleks. Rezultati ispitivanja Pd1-Pd3 kompleksa su pokazali da kompleksi indukuju apoptozu u LLC1 ćelijama sa većim apoptotičkim efektom u odnosu na cisplatinu, dok je procenat tretiranih CT26 ćelija paladijum(II) kompleksima u ranoj apoptozi sličan procentu ćelija nakon tretmana cisplatinom. Rezultati ispitivanja antiproliferativnog efekta Pd1-Pd6 kompleksa su pokazali da je procenat Ki67-pozitivnih LLC1 ćelija tretiranih paladijum(II) kompleksima i cisplatinom smanjen u poređenju sa netretiranim ćelijama. Ispitivanja ćelijskog ciklusa CT26 ćelija u prisustvu Pd4-Pd6 kompleksa su potvrdila činjenicu da ispitivani kompleksi dovode do apoptičke smrti ćelija nezavisno od faze ćelijskog ciklusa.

Sličnost u interakcijama **Pt1** i **Pt2**, **Pd1** i **Pd2** kompleksa sa CT–DNK može se pripisati prisustvu mostnih liganada (4,4'-bipiridina (**Pt1**, **Pd1**), odnosno 1,2-bis(4-piridil)etana (**Pt2**, **Pd2**)) u kompleksima. Međutim, mostni ligand 1,2-bis(4-piridil)etilen u **Pt3** i **Pd3** kompleksima, zbog onemogućene rotacije oko -CH=CH- veze uslovljava interkalaciju oba kompleksa u CT–DNK. Na osnovu rezultata ispitivanja citotoksičnog potencijala **Pt1–Pt3** i **Pd1–Pd3** kompleksa jasno je da platina(II) kompleksi pokazuju bolji citotoksični potencijal prema ćelijskoj liniji humanog kolorektalnog karcinoma (HCT116) u odnosu na paladijum(II) komplekse. Najbolji citotoksični potencijal prema ćelijskoj liniji humanog adenokarcinoma pluća (A549) pokazao je **Pt3** kompleks. Kompleksi platine(II) u poređenju sa kompleksima paladijuma(II) sporije hidrolizuju što uzrokuje bolju citotoksičnu aktivnost ispitivanih platina(II) kompleksa u odnosu na njihove paladijum(II) analoge.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije su od značaja za sinteze novih dinuklearnih kompleksa ne samo platine(II) i paladijuma(II), već i drugih jona metala koji bi

imali primenu u kliničkoj praksi za lečenje malignih tumorskih oboljenja. Razumevanje interakcija dinuklearnih platine(II) i paladijum(II) kompleksa sa biološki važnim molekulima, kao što su DNK i BSA, može otvoriti put sinteze efikasnijih antitumorskih agenasa sa potencijalnom primenom u kliničkoj praksi.

LITERATURA

[1] E. Alessio, Bioinorganic Medicinal Chemistry, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Germany, 2011.

[2] I. Bertini, H.B. Gray, S.J. Lippard, J.S. Valentine, University Science Books, USA, 1994.

[3] G.-S. Kim, D. A. Judd, C. L. Hill, R. F. Schinazi, J. Med. Chem, 1994, 37, 816-820.

[4] D. W. Hutchinson, Antiviral Research, 1985, 5, 193-205.

[5] D. Wang, S.J. Lippard, Nat. Rev. Drug Discov, 2005, 4, 307–320.

[6] G.B. Kauffman, R. Pentimalli, S. Doldi, M.D. Hall, Platinum Met. Rev, 2010, 54, 250–256.

[7] H. Berke, Chimia, 2009, 63, 541-544.

[8] B. Rosenberg, L. van Camp, T. Krigas, Nature, 1965, 205, 698-699.

[9] J.D. Hainsworth, D.H. Johnson, F.A. Greco, J. Clin. Oncol, 1992, 10, 912–922.

[10] T. Gilligan, D.W. Lin, R. Aggarwal, D. Chism, N. Cost, I.H. Derweesh, H. Emamekhoo, D.R. Feldman, D.M. Geynisman, S.L. Hancock, C. LaGrange, E.G. Levine, T. Longo, W. Lowrance, B. McGregor, P. Monk, J. Picus, P. Pierorazio, S. Rais-Bahrami, P. Saylor, K. Sircar, D.C. Smith, K. Tzou, D. Vaena, D. Vaughn, K. Yamoah, J. Yamzon, A. Johnson-Chilla, J. Keller and L.A. Pluchino, *J. Natl. Compr. Cancer Netw*, 2019, **17**, 1529–1554.

[11] I. Ray-Coquard, P. Morice, D. Lorusso, J. Prat, A. Oaknin, P. Pautier, N. Colombo, Ann. Oncol, 2018, **29**, iv1–iv18.

[12] J. A. Witjes, H.M. Bruins, R. Cathomas, E.M. Compérat, N.C. Cowan, G. Gakis, V. Hernández, E.L. Espinós, A. Lorch, Y. Neuzillet, M. Rouanne, G.N. Thalmann, E. Veskimäe, M.J. Ribal, A.G. van der Heijden, *Eur. Urol*, 2021, **79**, 82–104.

[13] L.C. Iglesias Docampo, V. Arrazubi Arrula, N. Baste Rotllan, A. Carral Maseda, B. Cirauqui Cirauqui, Y. Escobar, J.J. Lambea Sorrosal, M. Pastor Borgoñón, A. Rueda, J.J. Cruz Hernández, *Clin. Transl. Oncol*, 2018, **20**, 75–83.

[14] P.E. Postmus, K.M. Kerr, M. Oudkerk, S. Senan, D.A. Waller, J. Vansteenkiste, C. Escriu, S. Peters, *Ann. Oncol*, 2017, **28**, iv1–iv21.

[15] C. Marth, F. Landoni, S. Mahner, M. McCormack, A. Gonzalez-Martin, N. Colombo, *Ann. Oncol*, 2017, **28**, iv72–iv83.

[16] R. Oun, Y.E. Moussa, N.J. Wheate, *Dalton Trans*, 2018, **47**, 6645–6653.

[17] S.A. Aldossary, Biomed. Pharmacol. J, 2019, 12(1), 07-15.

[18] S.M. Aris, N.P. Farrell, Eur. J. Inorg. Chem, 2009, 10, 1293–1302.

[19] K.R. Harrap, Cancer Treat. Rev, 1985, 12, 21–33.

[20] K.R. Harrap, *Cancer Res*, 1995, **55**, 2761–2768.

[21] U. Frey, J.D. Ranford, P.J. Sadler, *Inorg. Chem*, 1993, **32**, 1333–1340.

[22] R.R. Barefoot, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl, 2001, 751, 205-211.

[23] J.M. Extra, M. Espic, F. Calvo, C. Ferme, L. Mignot, M. Marty, *Cancer Chemother*. *Pharmacol*, 1990, **25**, 299–303.

[24] F. Lev, G. Metzger, C. Massari, G. Milano, Clin. Pharmacokin, 2000, 38, 1-21.

[25] J.T. Hartmann, H.P. Lipp, Exp. Opin. Pharmacother, 2003, 4, 889–901.

[26] T. Andre, C. Boni, L. Mounedji-Boudiaf, M. Navarro, J. Tabernero, T. Hickish, C. Topham, M. Zaninelli, P. Clingan, J. Bridgewater, I. Tabah-Fisch, A. de Gramont, *N. Engl. J. Med*, 2004, **350**, 2343–2351.

[27] T. Lazarević, A. Rilak, Ž.D. Bugarčić, Euro. J. Med. Chem, 2017, 142, 8-31.

[28] T. Boulikas, M. Vougiouka, Onkol. Rep, 2003, 10, 1663–1682.

[29] L.M. Pasetto, M.R. D'Andrea, A.A. Brandes, E. Rossi, S. Monfardini, *Crit. Rev. Oncol. Hematol*, 2006, **60**, 59–75.

[30] J. Kašpárková, M. Vojtísková, G. Natile, V. Brabec, Chem. Eur. J, 2008, 14, 1330–1341.

[31] Y. Kameyama, N. Okazaki, M. Nakagawa, H. Koshida, M. Nakamura, M. Gemba, *Toxicol. Lett*, 1990, **52(1)**, 15–24.

[32] T. Niioka, T. Uno, N. Yasui-Furukori, T. Takahata, M. Shimizu, K. Sugawara, T. Tateishi, *Cancer Chemother. Pharmacol*, 2007, **59**(**5**), 575–580.

[33] N.J. Wheate, S. Walker, G.E. Craig, R. Oun, *Dalton Trans*, 2010, **39**, 8113–8127.

[34] M. Shimada, H. Itamochi, J. Kigawa, Cancer Manag Res, 2013, 5, 67–76.

[35] S. Dilruba, G.V. Kalayda, Cancer Chemother. Pharmacol, 2016, 77, 1103–1124.

[36] K.M. Al-Anazi, F.M. Abou-Tarboush, M.F. Abdel-Samad, M.A. Farah, M.Y. Al-Faifi, B.A. Al-Ahmadi, *Pak. J. Biol. Sci*, 2010, **13**, 896–900.

[37] Lobaplatin, Drugs R D, 2003, 4(6), 369-372.

[38] C.P. Saris, P.J. van de Vaart, R.C. Rietbroek, F.A. Blommaert, *Carcinogen*, 1996, **17**, 2763–2769.

[39] J. Holford, F. Raynaud, B.A. Murrer, K. Grimaldi, J.A. Hartley, M. Abrams, L.R. Kelland, *Anticance. Drug. Des*, 1998, **13**, 1–18.

[40] J. Treat, J. Schiller, E. Quoix, A. Mauer, M. Edelman, M. Modiano, P. Bonomi, R. Ramlau, E. Lemarie, *Eur. J. Cancer*, 2002, **38**(8), S13–S18.

[41] L. Kelland, Nat. Rev. Cancer, 2007, 7, 573–584.

[42] B.A. Chan, I.G. Coward Jermaine, J. Thorac. Dis, 2013, 5(5), S565–S578.

[43] E. Wexselblatt, D. Gibson, J. Inorg. Biochem, 2012, 117, 220–229.

[44] D. Gibson, Dalton Trans, 2016, 45, 12983-12991.

[45] R.G. Kenny, S.W. Chuah, A. Crawford, C.J. Marmion, *Eur. J. Inorg. Chem*, 2017, **2017**(12), 1596–1612.

[46] C.X. Zhang, S.J. Lippard, Curr. Opin. Chem. Biol, 2003, 7(4), 481–489.

[47] J. Mlcouskova, J. Kasparkova, T. Suchankova, S. Komeda, V. Brabec, *J. Inorg. Biochem*, 2012, **114**, 15–23.

[48] N. Kida, Y. Katsuda, Y. Yoshikawa, S. Komeda, T. Sato, Y. Saito, M. Chikuma, M. Suzuki, T. Imanaka, K. Yoshikawa, *J. Biol. Inorg. Chem*, 2010, **15**, 701–707.

[49] S. Komeda, Y. Lin, M. Chikuma, Chem. Med. Chem, 2011, 6, 987–990.

[50] P. Perego, L. Gatti, C. Caserini, R. Supino, D. Colangelo, R. Leone, S. Spinelli, N. Farrell, F. Zunino, *J. Inorg. Biochem*, 1999, **77**, 59–64.

[51] P. Kabolizadeh, J. Ryan, N. Farrell, Biochem. Pharmacol, 2007, 73, 1270–1279.

[52] N. Summa, J. Maigut, R. Puchta, R. van Eldik, Inorg. Chem, 2007, 46, 2094–2104.

[53] J. Zehnulova, J. Kasparkova, N. Farrell, V. Brabec, J. Biol. Chem, 2001, 276, 22191–22199.

[54] J. Kasparkova, J. Zehnulova, N. Farrell, V. Brabec, J. Biol. Chem, 2002, 277, 48076–48086.

[55] C. Manzotti, G. Pratesi, E. Menta, R. Di Domenico, E. Cavalletti, H.H. Fiebig, L.R. Kelland, N. Farrell, D. Polizzi, R. Supino, G. Pezzoni, F. Zunino, *Clin. Cancer Res*, 2000, **6**, 2626–2634.

[56] D.I. Jodrell, T.R. Evans, W. Steward, D. Cameron, J. Prendiville, C. Aschele, C. Noberasco, M. Lind, J. Carmichael, N. Dobbs, G. Camboni, B. Gatti, F. de Braud, *Eur. J. Cancer*, 2004, **40**, 1872–1877.

[57] N. Farrell, in: L.R. Kelland, N.P. Farrell (Eds.), Platinum-based Drugs in Cancer Therapy, Humana Press, Totowa, 2000, 321–338.

[58] E.J. Peterson, V.R. Menon, L. Gatti, R. Kipping, D. Dewasinghe, P. Perego, L.F. Povirk, N.P. Farrell, *Mol. Pharm*, 2015, **12**, 287–297.

[59] A. Prisecaru, Z. Molphy, R.G. Kipping, E.J. Peterson, Y. Qu, A. Kellett, N.P. Farrell, *Nucleic Acids Res*, 2014, **42**, 13474–13487.

[60] J. Malina, N.P. Farrell, V. Brabec V, Angew. Chem. Int. Ed. Engl, 2014, 53, 12812–12816.

[61] T.C. Johnstone, K. Suntharalingam, S.J. Lippard, Chem. Rev, 2016, 116, 3436–3486.

[62] C.A. Puckett, R.J. Ernst, J.K. Barton, *Dalton Trans*, 2010, **39**, 1159–1170.

[63] S.J. Berners-Price, T.G. Appleton, Humana Press Inc, Totowa, N.J. 2000.

[64] P. Jordan, M. Carmo-Fonseca, Cell Mol. Life Sci, 2000, 57, 1229–1235.

[65] C.M. Sorenson, A. Eastman, *Cancer Res*, 1988, 48, 6703–6707.

[66] E.R. Jamieson, S.J. Lippard, Chem. Rev, 1999, 99, 2467–2498.

[67] R.C. Todd, S.J. Lippard, *Metallomics*, 2009, 1, 280–291.

[68] M.A. Fuertes, C. Alonso, J.M. Perez, Chem. Rev, 2003, 103, 645–662.

[69] R.N. Bose, *Mini Rev. Med. Chem*, 2002, 2, 103–111.

[70] A.A. Hostetter, M.F. Osborn, V.J. DeRose, ACS Chem. Biol, 2012, 7, 218–225.

[71] A.A. Hostetter, E.G. Chapman, V.J. DeRose, J. Am Chem. Soc, 2009, 131, 9250–9257.

[72] E.G. Chapman, V.J. DeRose, J. Am Chem. Soc, 2010, 132, 1946–1952.

[73] S.V. Hato, A. Khong, I.J. de Vries, W.J. Lesterhuis, *Clin. Cancer Res*, 2014, **20**(**11**), 2831–2837.

[74] R. Ishida, Y. Takaoka, S. Yamamoto, T. Miyazaki, M. Otaka, S. Watanabe, A. Komatsuda, H. Wakui, K.I. Sawada, H. Kubota, H. Itoh, *FEBS Lett*, 2008, **582**, 3879–3883.

[75] J.P. Williams, H.I. Phillips, I. Campuzano, P.J. Sadler, *J. Am Soc. Mass Spectrom*, 2010, **21**, 1097–1106.

[76] R.N. Bose, L. Maurmann, R.J. Mishur, L. Yasui, S. Gupta, W.S. Grayburn, H. Hofstetter, T. Salley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2008, **105**, 18314–18319.

[77] P.C. Dedon, R.F. Borch, Biochem. Pharmacol, 1987, 36, 1955–1964.

[78] R.J. Schilder, L. Hall, A. Monks, L.M. Handel, A.J. Fornace, R.F. Ozols, A.T. Fojo, T.C. Hamilton, *Int. J. Cancer*, 1990, **45**(**3**), 416–422.

[79] P.J. Loehrer, L.H. Einhorn, Ann. Intern. Med, 1984, 100, 704-713.

[80] M.D. Coskun, F. Ari, A.Y. Oral, M. Sarimahmut, H.M. Kutlu, V.T. Yilmaz, E. Ulukaya, *Bioorg, Med. Chem*, 2013, **21**, 4698–4705.

[81] A.R. Kapdi, I.J.S. Fairlamb, Chem. Soc. Rev, 2014, 43, 4751-4777.

[82] Lj. Tušek-Božić, I. Matijašić, G. Bocelli, G. Calestani, A. Furlani, V. Scarcia, A. Papaioannou, J. Chem. Soc. Dalton Trans, 1991, **185**, 195–201.

[83] S. Medici, M. Peana, V.M. Nurchi, J.I. Lachowicz, G. Crisponi, M.A. Zoroddu, *Coord. Chem. Rev*, 2015, **284**, 329–350.

[84] Ž.D. Bugarčić, J. Bogojeski, R. van Eldik, Coord. Chem. Rev, 2015, 292, 91-106.

[85] L. Szucova, Z. Travnicek, M. Zatloukal, I. Popa, Bioorg. Med. Chem, 2006, 14, 479-491.

[86] F. Keter, S. Kanyanda, S.L. Lyantagaye, J. Darkwa, D.J. Rees, M. Meyer, *Cancer Chemother. Pharmacol*, 2008, **63**, 127–138.

[87] H. Mansouri-Torshizi, I.M.M.A. Divsalar, A.A. Saboury, *Bioorg. Med. Chem*, 2008, 16, 9616–9625.

[88] K.S.O. Ferraz, L. Ferandes, D. Carrilho, M.C.X. Pinto, M.d.F. Leite, E.M. Souza Fagundes, N.L. Speziali, I.C. Mendes, H. Beraldo, *Bioorg. Med. Chem*, 2009, **17**, 7138–7144.

[89] S. Nadeem, M. Bolte, S. Ahmad, T. Fazeelat, S.A. Tirmizi, M.K. Rauf, S.A. Sattar, S. Siddiq, A. Hameed, S.Z. Haider, *Inorg. Chim. Acta*, 2010, **363**, 3261–3269.

[90] A.S. Abu-Surrah, K.A. Abu Safieh, I.M. Ahmad, M.Y. Abdalla, M.T. Ayoub, A.K. Qaroush, A.M. Abu-Mahtheieh, *Eur. J. Med. Chem*, 2010, **45**, 471–475.

[91] P.I.D.S. Maia, A. Graminha, F.R. Pavan, C.Q. Leite, A.A. Batista, D.F. Back, E.S. Lang, J. Ellena, S.D.S. Lemos, H.S. Salistre-de-Araujo, *J. Braz. Chem. Soc*, 2010, **21**, 1177–1186.

[92] E. Ulukaya, F. Ari, K. Dimas, E.I. Ikitimur, E. Guney, V.T. Yilmaz, *Eur. J. Med. Chem*, 2011, **46**, 4957–4963.

[93] E. Guney, V.T.Yilmaz, F.Ari, O. Buyukgungor, E. Ulukaya, *Polyhedron*, 2011, **30**, 114–122.

[94] R. Kontek, K. Matlawska-Wasowska, U. Kalinowska-Lis, B. Kontek, J. Ochocki, *Acta Pol. Pharm*, 2011, **68**, 127–136.

[95] G. Ayyannan, M. Mohanraj, G. Raja, N. Bhuvanesh, R. Nandhakumar, C. Jayabalakrishnan, *Inorg. Chim. Acta*, 2016, **453**, 562–573.

[96] M. Tanaka, H. Kataoka, S. Yano, H. Ohi, K. Kawamoto, T. Shibahara, T. Mizoshita, Y. Mori, S. Tanida, T. Kamiya, T. Joh, *BMC Cancer*, 2013, **13**, 237–246.

[97] Z.D. Matović, E. Mrkalić, G. Bogdanović, V. Kojić, A. Meetsma, R. Jelić, J. Inorg. Biochem, 2013, **121**, 134–144.

[98] M. Vojtek, S. Gonçalves-Monteiro, E. Pinto, S. Kalivodová, A. Almeida, M.P.M. Marques, A.L.M. Batista de Carvalho, C.B. Martins, H. Mota-Filipe, I. Ferreira, C. Diniz, *Pharmaceuticals*, 2021, **14**(2), 1–16.

[99] R. Czarnomysy, D. Radomska, O.K. Szewczyk, P. Roszczenko, K. Bielawski, *Int. J. Mol. Sci*, 2021, **22**, 8271–8300.

[100] S. Ishida, J. Lee, D.J. Thiele, I. Herskowitz, Proc. Natl. Acad. Sci, 2002, 99, 14298–14302.

[101] M. Campbell, R.J. Prankerd, A.S. Davie, W.N. Charman, J. Pharm. Pharmacol, 2004, 56, 1327–1332.

[102] Y. Saito, K. Okamoto, M. Kobayashi, K. Narumi, T. Yamada, K. Iseki, *Eur. J. Pharmacol*, 2017, **811**, 191–198.

[103] H. Cheng, F. Huq, P. Beale, K. Fisher, Eur. J. Med. Chem, 2006, 41, 896-903.

[104] M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, J. Photochem. Photobiol. B, 2013, 124, 1-19.

[105] M.M. Harding, C.J. Harden, L.D. Field, FEBS Lett, 1993, 322(3), 291–294.

[106] E.D. Gadsby, *PhD Dissertation*, School of Chemistry and Biochemistry, Georgia Institute of Technology, 2004, 23–25.

[107] V. Gonzalez-Ruiz, A.I. Olives, M.A. Martin, P. Ribelles, M.T. Ramos, J.C. Menendez, *In Tech*, 2011, 65–90.

[108] S. Arnott, *Nature*, 1986, **320**, 313–313.

[109] C. Oguey, N. Foloppe, B. Hartmann, PLOS One, 2010, 5(12), 15931–15940.

[110] A. Kellett, Z. Molphy, C. Slator, V. McKee, N.P. Farrell, *Chem. Soc. Rev*, 2019, **48**, 971–988.

[111] B.R. Wood, Chem. Soc. Rev, 2016, 45, 1980–1998.

[112] A. Rich, S. Zhang, Nat. Rev. Genet, 2003, 4, 566–572.

[113] N.C. Seeman, H. Wang, X. Yang, F. Liu, C. Mao, W. Sun, L. Wenzler, Z. Shen, R. Sha, H. Yan, M.H. Wong, P. Sa-Ardyen, B. Liu, H. Qiu, X. Li, J. Qi, S.M. Du, Y. Zhang, J.E. Mueller, T.J. Fu, Y. Wang, J. Chen, *Nanotechnology*, 1998, **9**, 257–273.

[114] D. Svozil, J. Kalina, M. Omelka, B. Schneider, *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(**11**), 3690–3706.

[115] M. Lin, J.T. Guo, Nucleic. Acids Res, 2019, 47(21), 11103–11113.

[116] S. Rauf, J.J. Gooding, K. Akhtar, M.A. Ghauri, M. Rahman, M.A. Anwar, A.M. Khalid, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal*, 2005, **37**, 205–217.

[117] H.C. Harder, B. Rosenberg, Int. J. Cancer, 1970, 6, 207–216.

[118] S. Reslova, Chem.-Biol. Interact, 1971, 4, 66–70.

[119] A.L. Pinto, S.J. Lippard, *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **780**, 167–180.

[120] P.M. Takahara, A.C. Rosenzweig, C.A. Frederick, S.J. Lippard, *Nature*, 1995, **377**, 649–652.

[121] P.J. Stone, A.D. Kelman, F.M. Sinex, J. Mol. Biol, 1976, 104, 793–801.

[122] H.M. Ushy, T.D. Tullius, S.J. Lippard, Biochem, 1982, 21, 3744–3748.

[123] L.S. Lerman, J. Mol. Biol, 1961, 3, 18–30.

[124] X. Shui, M.E. Peek, L.A. Lipscomb, Q. Gao, C. Ogata, B.P. Roques, C. Garbay, Jaureguiberry, A.P. Wilkinson, L.D. Williams, *Curr. Med. Chem*, 2000, **7**, 59–71.

[125] R. Martínez, L.C. García, Curr. Med. Chem, 2005, 12, 127-151.

[126] W. Bauer, J. Vinograd, J. Mol. Biol, 1970, 54, 281-298.

[127] S. Neidle, Z. Abraham, CRC Crit. Rev. Biochem, 1984, 171, 73–121.

[128] M.V. Keck, S.J. Lippard, J. Am. Chem. Soc, 1992, 114, 3386–3390.

[129] D.D. Li, J.L. Tian, W. Gu, X. Liu, S.P. Yan, J. Inorg. Biochem, 2010, 104, 171–179.

[130] N. Vamsikrishna, S. Daravath, N. Ganji, N. Pasha, Shivaraj, *Inorg. Chem. Commun*, 2020, **113**, 107767.

[131] L.G. Bulnes, J. Gallego, J. Am. Chem. Soc, 2009, 131, 7781–7791.

[132] S. Radisavljević, I. Bratsos, A. Scheurer, J. Korzekwa, R. Masnikosa, A. Tot, N. Gligorijević, S. Radulović, A. Rilak Simović, *Dalton Trans*, 2018, **47**, 13696–13712.

[133] S. Dhar, M. Nethaji, A.R. Chakravarty, J. Inorg. Biochem, 2005, 99, 805–812.

[134] C.R. Brodie, J.G. Collins, J.R. Aldrich-Wright, *Dalton Trans*, 2004, 8, 1145–1152.

[135] A.M. Krause-Heuer, R. Grunert, S. Kuhne, M. Buczkowska, N.J. Wheate, D.D. Le Pevelen, L.R. Boag, D.M. Fisher, J. Kasparkova, J. Malina, P.J. Bednarski, V. Brabec, J.R. Aldrich-Wright, *J. Med. Chem*, 2009, **52**, 5474–5484.

[136] K.M. Deo, D.L. Ang, B. McGhie, A. Rajamanickam, A. Dhiman, A. Khoury, J. Holland, A. Bjelošević, B. Pages, C. Gordon, J.R. Aldrich-Wright, *Coord. Chem. Rev*, 2018, **375**, 148–163.

[137] N. Shahabadi, S. Kashanian, A. Fatahi, Bioinorg. Chem. Appl, 2011, Article ID 687571

[138] N. Shahabadi, Z. Mirzaei Kalar, N. Hosseinpour Moghadam, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2012, **96**, 723–728.

[139] A. Paul, S. Bhattacharya, *Curr. Sci*, 2012, **102**(2), 212–231.

[140] J.R. Johansson, Y. Wang, M.P. Eng, N. Kann, P. Lincoln, J. Andersson, *Chem. Eur. J*, 2013, **19(20)**, 6246–6256.

[141] G.M. Blackburn, M.J. Gait, D. Loakes, D.M. Williams, Nucleic Acids in Chemistry and Biology, third ed., RSC Publishing, Cambridge, 2006.

[142] S. Takenaka, Threading Intercalators as Redox Indicators, *Perspectives in Bioanalysis*, 2005, **1**, 345–367.

[143] B.J. Pages, D.L. Ang, E.P. Wright, J.R. Aldrich-Wright, *Dalton Trans*, 2015, 44, 3505–3526.

[144] K. Becker, C. Herold-Mende, J.J. Park, G. Lowe, R.H. Schirmer, *J. Med. Chem*, 2001, **44**, 2784–2792.

[145] R.J. Holmes, M.J. McKeage, V. Murray, W.A. Denny, W.D. McFadyen, J. Inorg. Biochem, 2001, 85, 209–217.

[146] Z. Ma, J.R. Choudhury, M.W. Wright, C.S. Day, G. Saluta, G.L. Kucera, U. Bierbach, *J. Med. Chem*, 2008, **51**, 7574–7580.

[147] B.E. Bowler, K.J. Ahmed, W.I. Sundquist, L.S. Hollis, E.E. Whang, S.J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc*, 1989, **111**, 1299–1306.

[148] H. Baruah, M.W. Wright, U. Bierbach, Biochem, 2005, 44, 6059-6070.

[149] S. Dutta, M. Snyder, D. Rosile, K. Binz, E. Roll, J. Suryadi, U. Bierbach, M. Guthold, *Cell Biochem. Biophys*, 2013, **67**, 1103–1113.

[150] S. Dawson, J.P. Malkinson, D. Paumier, M. Searcey, Nat. Prod. Rep, 2007, 24, 109–126.

[151] H.-L. Chan, D.-L. Ma, M. Yang, C.-M. Che, Chem. Bio. Chem, 2003, 4, 62–66.

[152] H.L. Chan, D.L. Ma, M. Yang, C.M. Che, J. Biol. Inorg. Chem, 2003, 8, 761–769.

[153] K. Duskova, S. Sierra, M.-J. Fernández, L. Gude, A. Lorente, *Bioorg. Med. Chem*, 2012, **20**, 7112–7118.

[154] W.D. McFadyen, L.P. Wakelin, I.A. Roos, B.L. Hillcoat, *Biochem. J*, 1987, **242**, 177–183.

[155] J.R. Choudhury, R. Guddneppanavar, G. Saluta, G.L. Kucera, U. Bierbach, J. Med. Chem, 2008, **51**, 3069–3072.

[156] G. Lowe, A.S. Droz, T. Vilaivan, G.W. Weaver, J.J. Park, J.M. Pratt, L. Tweedale, L.R. Kelland, *J. Med. Chem*, 1999, **42**, 3167–3174.

[157] M.M. Aleksić, V. Kapetanović, Acta Chim Slov, 2014, 61(3), 555–573.

[158] Z. Morávek, S. Neidle, B. Schneider, Nucleic Acids Res, 2002, 30(5), 1182–1191.

[159] M.J. Hannon, Chem. Soc. Rev, 2007, 36, 280–295.

[160] S. Neidle, Nat. Prod. Rep, 2001, 18(3), 291–309.

[161] A. Lauria, A. Montalbano, P. Barraja, G. Dattolo, A.M. Almerico, *Curr. Med. Chem*, 2007, **14(20)**, 2136–2160.

[162] N.H. List, J. Knoops J, Rubio-Magnieto, J. Idé, D. Beljonne, P. Norman, M. Surin, M. Linares, *J. Am. Chem. Soc*, 2017, **139**, 14947–14953.

[163] S.Y. Breusegem, F.G. Loontiens, P. Regenfuss, R.M. Clegg, *Methods Enzymol*, 2001, **340**, 212–233.

[164] A.P. Antonyan, M.A. Parsadanyan, N.H. Petrosyan, P.O. Vardevanyan, J. Appl. Spectrosc, 2022, **89**, 684–688.

[165] M. Sriram, G.A. van der Marel, H.L. Roelen, J.H. van Boom, A.H. Wang, *EMBO J*, 1992, **11(1)**, 225–232.

[166] R. Rohs, X. Jin, S.M. West, R Joshi, B. Honig, R.S. Mann, Annu. Rev. Biochem, 2010, **79**, 233–269.

[167] L. Strekowski, B. Wilson, Mutat. Res, 2007, 623(1-2), 3-13.

[168] M.J. Hannon, V. Moreno, M.J. Prieto, E. Moldrheim, E. Sletten, I. Meistermann, C.J. Isaac, K.J. Sanders, A. Rodger, *Angew. Chem. Int. Ed*, 2001, **40**, 879–884.

[169] I. Meistermann, V. Moreno, M.J. Prieto, E. Moldrheim, E. Sletten, S. Khalid, P.M. Rodger, J.C. Peberdy, C.J. Isaac, A. Rodger, M.J. Hannon, *Proc. Nat. Ac. Sci. USA*, 2002, **99**, 5069–5074.

[170] M. Mariappan, M. Suenaga, A. Mukhopadhyay, P. Raghavaiah, B.G. Maiya, *Inorg. Chim. Acta*, 2011, **376**, 340–349.

[171] J.C. García-Ramos, R. Galindo-Murillo, F. Cortés-Guzmán, L. Ruiz-Azuara, J. Mex. Chem. Soc, 2013, 57(3), 245–259.

[172] U. McDonnell, M.R. Hicks, M.J. Hannon, A. Rodger, J. Inorg. Biochem, 2008, 102, 2052–2059.

[173] S. Komeda, T. Moulaei, K.K. Woods, M. Chikuma, N.P. Farrell, L.D.A. Williams, *J. Am. Chem. Soc*, 2006, **128**, 16092–16103.

[174] F.W. Putnam, The Plasma Proteins, Structure, Function, and Genetic Control, 2012.

[175] A. Belatik, S. Hotchandani, R. Carpentier, H.A. Tajmir-Riahi, *PLoS ONE*, 2012, 7(5), e36723.

[176] J. Ghuman, P.A. Zunszain, I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry, J. Mol. Biol, 2005, **353**, 38–52.

[177] A. Bujacz, J.A. Talaj, K. Zielinski, A.J. Pietrzyk-Brzezinska, P. Neumann, Acta Crystallogr. D Struct. Biol, 2017, **73(11)**, 896–909.

[178] E.A. Litus, S.E. Permyakov, V.N. Uversky, E.A. Permyakov, *Cell Biochem. Biophys*, 2018, **76(1–2)**, 39–57.

[179] K.A. Majorek, P.J. Porebski, A. Dayal, M.D. Zimmerman, K. Jablonska, A. J. Stewart, M. Chruszcz, W. Minor, *Mol. Immunol*, 2012, **52**(3–4), 174–182.

[180] A. Bujacz, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr, 2012, 68(10), 1278–1289.

[181] J. Wang, B. Zhang, Curr. Med. Chem, 2018, 25(25), 2938–2953.

[182] K. Oettl, R.E. Stauber, Br. J. Pharmacol, 2007, 151, 580–590.

[183] K. Yamasaki, V.T. Chuang, T. Maruyama, M. Otagir, *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1830**(12), 5435–5443.

[184] C. Bertucci, E. Domenici, Curr. Med. Chem, 2002, 15, 1463–1481.

[188] A. Jahanban-Esfahlan, A. Ostadrahimi, R. Jahanban-Esfahlan, L. Roufegarinejad, M. Tabibiazar, R. Amarowicz, *Int. J. Biol. Macromol*, 2019, **138**, 602–617.

[186] P. Bourassa, I. Hasni, H.A. Tajmir-Riahi, Food Chem, 2011, 129(3), 1148–1155.

[187] S. Bi, Y. Sun, C. Qiao, H. Zhang, C. Liu, J. Lumin, 2009, 129(5), 541-547.

[188] W. Bal, M. Sokołowska, E. Kurowska, P. Faller, *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, **1830**(12), 5444–5455.

[189] L. Zhu, F. Yang, L. Chen, E.J. Meehan, M. Huang, J. Struct. Biol, 2008, 162, 40-49.

[190] S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, N. Franks, Nat. Struct. Biol, 1998, 5, 827-835.

[191] U. Kragh-Hansen, V.T.G. Chuang, M. Otagiri, Biol. Pharm. Bull, 2002, 25, 695–704.

[192] M. Otagiri, Drug Metab. Pharmacokinet, 2005, 20, 309–323.

[193] K.L. Hein, U. Kragh-Hansen, J.P. Morth, M.D. Jeppesen, D. Otzen, J.V. Møller, P. Nissen, J. Struct. Biol, 2010, **171**, 353–360.

[194] I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, S. Twine, M. East, S. Curry, J. Biol. Chem, 2001, 276, 22804–22809.

[195] S.C. Dhara, Indian J Chem, 1970, 8, 193–194

[196] H. Hohmann, R van Eldik, *Inorg. Chim. Acta*, 1990, **174**, 87–92.

[197] S.U. Milinković, T.N. Parac, M.I. Djuran, N.M. Kostić, J. Chem. Soc. Dalton Trans, 1997, 16, 2771–2776.

[198] M.D. Živković, D.P. Ašanin, S. Rajković, M.I. Djuran, Polyhedron, 2011, 30, 947-952.

[199] S. Komeda, G.V. Kalayda, M. Lutz, A.L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma, J.J. Reedijk, *J. Med. Chem*, 2003, **46**, 1210–1219.

[200] D.P. Ašanin, M.D. Živković, S. Rajković, B. Warźajtis, U. Rychlewska, M.I. Djuran, *Polyhedron*, 2013, **51**, 255–262.

[201] S. Rajković, U. Rychlewska, B. Warźajtis, D.P. Ašanin, M.D. Živković, M.I. Djuran, *Polyhedron*, 2014, **67**, 279–285.

[202] A.A. Franich, M.D. Živković, T. Ilić-Tomić, I.S. Đorđević, J. Nikodinović-Runić, A. Pavić, G.V. Janjić, S. Rajković, *J. Biol. Inorg. Chem*, 2020, **25**, 395–409.

[203] G. Zhao, H. Lin, S. Zhu, H.Y. Sun, Y. Chen, J. Inorg. Biochem, 1998, 70, 219–226.

[204] A.A. Franich, M.D. Živković, D. Ćoćić, B. Petrović, M. Milovanović, A.N. Arsenijević, J. Milovanović, D. Arsenijević, B. Stojanović, M.I. Djuran, S. Rajković, *J. Biol. Inorg. Chem*, 2019, **24**(7), 1009–1022.

[205] A.A. Franich, M.D. Živković, J. Milovanović, D. Arsenijević, A. Arsenijević, M. Milovanović, M.I. Djuran, S. Rajković, *J. Inorg. Biochem*, 2020, **210**, 111158.

[206] A. Wolf, G.H. Shimer, T. Meehan, Biochem, 1987, 26, 6392-6396.

[207] F. Dimiza, F. Perdih, V. Tangoulis, I. Turel, D.P. Kessissoglou, G. Psomas, J. Inorg. Biochem, 2011, 105, 476–489.

[208] R.P. Hertzberg, P.B. Dervan, J. Am. Chem. Soc, 1982, 104, 313-315.

[209] A.A. Franich, I.S. Đorđević, M.D. Živković, S. Rajković, G.V. Janjić, M.I. Djuran, J. Biol. Inorg. Chem, 2022, 27, 65–79.

[210] J.R. Lakowicz, G. Weber, *Biochem*, 1973, **12**, 4161–4170.

[211] J. Chen, X. Wang, Y. Shao, J. Zhu, Y. Zhu, Y. Li, Q. Xu. Z. Guo, *Inorg. Chem*, 2007, **46(8)**, 3306–3312.

[212] J. Jing, M. Jiang, Y.T. Li, Z.Y. Wu, C.W. Yan, J. Biochem. Mol. Toxic, 2014, 28, 47-59.

[213] V.T. Yilmaz, E. Gocmen, C. Icsel, M. Cengiz, S.Y. Susluer, O. Buyukgungor, *J. Photoch. Photobio. B*, 2014, **131**, 31–42.

[214] H.R. Drew, R.M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R.E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, **78**, 2179–2183.

[215] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, *J. Comput. Chem*, 2009, **30**, 2785–2791.

[216] S. Satyanarayana, J.C. Dabrowiak, J.B. Chaires, *Biochem*, 1992, **31**, 9319–9324.

[217] Dassault Systèmes BIOVIA (2016) Discovery studio modeling environment, release 2017. Dassault Systèmes, San Diego.

[218] OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 236, 2013.

[219] A. Pavić, B. Glišić, S. Vojnović, B. Warzajtis, N. Savić, M. Antić, S. Radenković, G. Janjić, J. Nikodinović Runić, U. Rychlewska, M.I. Djuran, *J. Inorg. Biochem*, 2017, **174**, 156–168.

[220] G. Fornabaio, R.L. Barnhill, C. Lugassy, L.A. Bentolila, N. Cassoux, S. Roman-Roman, S. Alsafadi, F. Del Bene, *Sci. Rep*, 2018, **8**(1), 10448.

[221] B.D. Glišić, B. Warżajtis, N.S. Radulović, U. Rychlewska, M.I. Djuran, *Polyhedron*, 2015, **87**, 208–214.

[222] L. Zhu, N.M. Kostić, Inorg. Chem, 1992, 31, 3994–4001.

[223] B.Đ. Glišić, I. Aleksić, P. Comba, H. Wadepohl, T. Ilić-Tomić, J. Nikodinović Runić, M.I. Djuran, *RSC Adv*, 2016, **6**, 86695–86709.

[224] S.M. Fiuza, A.M. Amado, M.P.M. Marques, L.A.E. Batista de Carvalho, *J. Phys. Chem. A*, 2008, **112(14)**, 3253–3259.

[225] A.L.M. Batista de Carvalho, S.F. Parker, L.A.E. Batista de Carvalho, M.P.M. Marques, *Acta Crystallogr*, 2018, **C74**, 628–634.

[226] D. Banerjea, F. Basolo, R.G. Pearson, J. Am Chem. Soc, 1957, 15, 4055-4062.

[227] M.D. Živković, S. Rajković, B.Đ. Glišić, N.S. Drašković, M.I. Djuran, *Bioorg. Chem*, 2017, **72**, 190–198.

[228] S. Rajković, B. Warźajtis, M.D. Živković, B.Đ. Glišić, U. Rychlewska, M.I. Djuran, *Bioinorg. Chem. Appl*, 2018, **2018**, 3294948.

[229] S. Chattopadhyay, P. Chakraborty, M.G.B. Drew, A. Ghosh, *Inorg. Chim. Acta*, 2009, **362**, 502–508.

[230] J.-A. Zhang, M. Pan, J.-Y. Zhang, H.-K. Zhang, Z.-J. Fan, B.-S. Kang, C.-Y. Su, *Polyhedron*, 2009, **28(1)**, 145–149.

[231] N. Kumar, R. Kaushal, P. Awasthi, J. Mol. Struct, 2023, 1288, 135751.

[232] F. Arjmand, A. Jamsheera, *Spectrochim. Acta A*, 2011, **78**, 45–51.

[233] J. Liu, T. Zhang, T. Lu, L. Qu, H. Zhou, Q. Zhang, L. Ji, J. Inorg. Biochem, 2002, 91, 269–276.

[234] K. Karami, Z.M. Lighvan, S.A. Barzani, A.Y. Faal, M. Poshteh-Shirani, T. Khayamian, V. Eignerc, M. Dušek, *New J. Chem*, 2015, **39**, 8708–8719.

[235] C.V. Kimar, J.K. Barton, N.J. Turro, J. Am. Chem. Soc, 1985, 107(19), 5518–5523.

[236] D.D. Li, J.L. Tian, W. Gu, X. Liu, S.P. Yan, J. Inorg. Biochem, 2010, 104, 171–179.

[237] M. Jiang, Y. Li, Z. Wub, Z. Liu, C. Yan, J. Inorg. Biochem, 2009, 103, 833-844.

[238] N. Shahabadi, S. Fatahi, M. Maghsudi, J. Coord. Chem, 2018, 271, 258–270.

[239] T.M. Kelly, A.B. Tossi, D.J. McConnell, T.C. Strekas, *Nucleic. Acids Res*, 1985, 13, 6017–6034.

[240] D.R. Whelan, K.R. Bambery, P. Heraud, M.J. Tobin, M. Diem, D. McNaughton, B.R. Wood, *Nucleic. Acids Res*, 2011, **39**(**3**), 5439–5448.

[241] M. Milutinović, J. Bogojeski, O. Klisurić, A. Scheurer, S. Elmrothd, Ž.D. Bugarčić, *Dalton Trans*, 2016, **45**, 15481–15491.

[242] A.A. Recio Despaigne, J.G. Da Silva, P.R. Da Costa, R.G. Dos Santos, H. Beraldo, *Molecules*, 2014, **19**, 17202–17220.

[243] J. Grau, C. Renau, A.B. Caballero, A. Caubet, M. Pockaj, J. Lorenzo, P. Gamez, *Dalton Trans*, 2018, **47**, 4902–4908.

[244] X.-X. Zhang, S.L. Brantley, S.A. Corcelli, A. Tokmakoff, *Commun. Biol*, 2020, **3**, 525-534.

[245] I.S. Tolokh, S.A. Pabit, A.M. Katz, Y. Chen, A. Drozdetski, N. Baker, L. Pollack, A.V. Onufriev, *Nucleic. Acids Res*, 2014, **42(16)**, 10823–10831.

[246] H.-L. Gong, Y.-H. Liu, Y.-L. Tang, L. Hu, Spectrosc. Spect. Anal, 2017, 66, 639-644.

[247] H. Loskotová, V. Brabec, Eur. J. Biochem, 1999, 266(2), 392–402.

[248] P.O. Vardevanyan, A.P. Antonyan, M.A. Parsadanyan, M.A. Shahinyan, G.A. Melkonyan, *Int. J. Spectrosc*, 2015, **2015**, 586231.

[249] R. Ruhayel, S. Berners-Price, N.P. Farrell, *Dalton Trans*, 2013, 42, 3181–3187.

[250] A. Batista de Carvalho, A. Mamede, A. Dopplapudi, V. Sakai, J. Doherty, M. Frogley, G. Cinque, P. Gardner, D. Gianolio, L. Batista de Carvalho, M. Marques, *Phys. Chem. Chem. Phys*, 2019, **21**, 4162–4175.

[251] C.A. MacRae, R.T. Peterson, Nat. Rev. Drug. Discov, 2015, 14, 721-731.

[252] Y. Hao, I. Sadek, Onco. Targets Ther, 2016, 9, 5495–5505.

[253] J.J. Zhang, R.W.Y. Sun, C.M. Che, Chem. Commun, 2012, 48, 3388–3390.

[254] C. Tobia, G. Gariano, G. De Sena, M. Prest, *Biochim. Bio-phys. Acta 1*, 2013, **1832(9)**, 1371–1377.

[255] M.E. Shaul, Z.G. Fridlender, Nat. Rev. Clin. Oncol, 2019, 16(10), 601-620.

[256] D. Ćoćić, S. Jovanović, M. Nišavić, D. Baskić, D. Todorović, S. Popović, Ž.D. Bugarčić, B. Petrović, *J. Inorg. Biochem*, 2017, **175**, 67–79.

[257] D.P. Ross, S. Subramanian, Biochem.-USA, 1981, 20, 3096-3102,

[258] V. Rajendiran, R. Karthik, M. Palaniandavar, H. Stoeckli-Evans, V.S. Periasamy, M.A. Akbarsha, B.S. Srinag, H. Krishnamurthy, *Inorg. Chem*, 2007, **46**, 8208–8221.

[259] S. Jovanović, K. Obrenčević, Ž.D. Bugarčić, I. Popović, J. Žakula, B. Petrović, *Dalton Trans*, 2016, **45**, 12444–12457.

[260] C.D. Bortner, N.B.E. Oldenburg, J.A. Cidlowski, Trends Cell Biol, 1995, 5(1), 21-26.

[261] K.S.M. Smalley, R. Contractor, N.K. Haass, J.T. Lee, K.L. Nathanson, C.A. Medina,

K.T. Flaherty, M. Herlyn, Br. J. Cancer, 2007, 96, 445-449.

[262] O. Kacar, B. Cevatemre, I. Hatipoglu, N. Arda, E. Ulukaya, V.T. Yilmaz, C. Acilan, *Bioorg. Med. Chem*, 2017, **25**(6), 1770–1777.
PRILOG







¹³C NMR (50 MHz, D₂O) za **Pt3**

Slika P1. ¹H i ¹³C NMR spektri Pt1-Pt3 kompleksa.





Slika P2. IR spektri Pt1–Pt3 kompleksa (KBr tehnika, 298 K).



Slika P3. Far-IR spektri Pt1–Pt3 kompleksa (CsI tehnika, 298 K).



Slika P4. UV–Vis spektri **Pt1–Pt3** kompleksa u vodi kao rastvaraču koncentracije $5 \cdot 10^{-5}$ M.

Pt(II) kompleks	Pt1	Pt2	Pt3
Veza			
Pt1–N1	2,0801	2,0835	2,0815
Pt2–N4	2,0803	2,0817	2,0810
Pt1-N2	2,0783	2,0794	2,0783
Pt2–N5	2,0788	2,0790	2,0785
Pt1–N3	2,0643	2,0670	2,0624
Pt2–N6	2,0642	2,0659	2,0622
Pt1-Cl1	2,4023	2,4020	2,4026
Pt2Cl2	2,4011	2,4028	2,4010
$M1 \cdots M2$	11,2079	13,3768	13,5211
Ugao			
N1-M1-N2	82,58	82,51	82,62
N4-M2-N5	82,57	82,49	82,60
N1-M1-N3	176,56	176,69	176,28
N4-M2-N6	176,11	176,54	176,00
N2-M1-N3	94,08	94,29	93,84
N5-M2-N6	93,55	94,06	93,46
N1-M1-Cl1	92,24	92,23	92,36
N4-M2-Cl2	92,47	92,32	92,64
N2-M1-Cl1	174,75	174,70	174,90
N5-M2-Cl2	175,01	174,77	175,19
N3-M1-Cl1	91,12	90,98	91,20
N6-M2-Cl2	91,42	91,13	91,30
Torzioni ugao			
Pt1-N1-C1-C2	38,62	38,96	38,91
Pt1-N2-C2-C1	40,96	41,20	40,71

Tabela P1. Izračunate vrednosti dužina veza (Å) i uglova (°) u $[{Pt(en)Cl}_2(\mu-4,4'-bipy)]^{2+}$ (Pt1), $[{Pt(en)Cl}_2(\mu-bpa)]^{2+}$ (Pt2) i $[{Pt(en)Cl}_2(\mu-bpe)]^{2+}$ (Pt3) kompleksima

Pt2-N4-C13-	-40,16	-39,83	-40,82
C14			
Pt2-N5-C14-	-39,73	-40,30	-38,85
C13			
N1-C1-C2-N2	-52,47	-52,87	-52,54
N4-C13-C14-	52,68	52,80	52,56
N2			
N1-Pt1-N2-C2	-15,63	-15,64	-15,31
N2-Pt1-N1-C1	-12,85	-13,03	-13,18
N4-Pt2-N5-C14	14,01	14,60	13,00
N5-Pt2-N4-C13	14,58	14,09	15,51
N2-Pt1-N3-C7	120,52	122,57	117,99
N5-Pt2-N6-C10	125,18	60,03	122,66
C4-C5-C8-C12	149,51	/	/
C5-C15-C16-	/	179,78	179,72
C8			

Tabela P2. Izračunate vrednosti dužina veza (Å) i uglova (°) u [{Pt(en)(H₂O)}₂(μ -4,4'-bipy)]⁴⁺ (**Pt1W**), [{Pt(en)(H₂O)}₂(μ -bpa)]⁴⁺ (**Pt2W**) i [{Pt(en)(H₂O)}₂(μ -bpe)]⁴⁺ (**Pt3W**) kompleksima

Pt(II)-akva	Pt1W	Pt2W	Pt3W	
kompleks				
Veza				
Pt1-N1	2,0830	2,0855	2,0868	
Pt2–N4	2,0809	2,0822	2,0843	
Pt1–N2	2,0460	2,0458	2,0473	
Pt2–N5	2,0458	2,0467	2,0445	
Pt1–N3	2,0633	2,0649	2,0628	
Pt2–N6	2,0653	2,0703	2,0643	
Pt1–O1	2,1336	2,1339	2,1358	
Pt2–O2	2,1357	2,1357	2,1373	
M1…M2	11,1937	13,3892	13,5010	
Ugao	_			
N1-M1-N2	82,75	82,81	82,66	
N4-M2-N5	82,91	82,95	82,95	
N1-M1-N3	177,63	177,11	176,84	
N4-M2-N6	176,88	176,82	176,13	
N2-M1-N3	94,92	94,57	94,39	
N5-M2-N6	93,97	93,87	93,54	
N1-M1-O1	95,43	95,15	95,74	
N4-M2-O2	91,89	90,99	91,73	
N2-M1-O1	178,16	177,49	177,86	
N5-M2-O2	174,73	173,85	174,67	
N3-M1-O1	86,90	87,50	87,24	
N6-M2-O2	91,22	92,20	91,79	
Torzioni ugao	_			
Pt1-N1-C1-C2	38,23	38,75	39,54	

Pt1-N2-C2-C1	41,49	40,48	40,37
Pt2-N4-C13-C14	-39,36	-39,81	-38,16
Pt2-N5-C14-C13	-40,21	-39,81	-41,81
N1-C1-C2-N2	-52,23	-51,95	-52,37
N4-C13-C14-N2	52,22	52,31	52,53
N1-Pt1-N2-C2	-16,11	-15,08	-14,65
N2-Pt1-N1-C1	-12,44	-13,30	-14,01
N4-Pt2-N5-C14	13,58	14,41	16,38
N5-Pt2-N4-C13	14,94	14,11	12,26
N2-Pt1-N3-C7	122,97	120,84	120,01
N5-Pt2-N6-C10	124,22	59,35	124,36
C4C5C8C12	145,32	/	/
C5-C15-C16-C8	/	-179,90	-177,96







¹³C NMR (50 MHz, D₂O) za **Pd6**



10.0

4000.0



cm-1

450.0





Slika P6. IR spektri Pd1–Pd6 kompleksa (KBr tehnika, 298 K).



Slika P7. UV-Vis spektri **Pd1-Pd3** kompleksa (A), UV-Vis spektri **Pd4-Pd6** kompleksa (B) u vodi kao rastvaraču koncentracije 5·10⁻⁵ M.



Slika P8. UV-Vis spektri Pt3 (A) i Pd3 (B) kompleksa u H₂O/DMSO kao rastvaraču tokom ekperimentalnog vremena.



Slika P9. ¹H NMR spektri **Pd3** kompleksa u D₂O u vremenskom periodu od 0, 5, 8 i 24h (A); ¹H NMR spektri **Pd1** kompleksa u D₂O/DMSO- d_6 u vremenskom periodu od 0, 5, 8 i 24h (B).



Slika P10. UV-Vis spektri Pt1 kompleksa (A) i Pt1W kompleksa (B) dobijeni teorijskim proračunima.



Slika P11. UV-Vis spektri Pt2 kompleksa (A) i Pt2W kompleksa (B) dobijeni teorijskim proračunima.



Slika P12. Dekonvolucija UV-Vis spektra Pt2/CT-DNK (A) i Pt3/CT-DNK (B) molarnog odnosa 2 i 6.



Slika P13. UV-Vis spektri Pt3 kompleksa (A) i Pt3W kompleksa (B) dobijeni teorijskim proračunima.

Tabela P3. Eksperimentalno određeni ekstencioni koeficijenti **Pt1–Pt3**, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], EtBr, Hoechst 33258 i CT-DNK na $\lambda = 260$ nm i koncentracije korišćene za njihovo izračunavanje.

Jedinjenje	Koncentracija (µM)	E 260
Pt1	50	1572000
Pt2	50	1154000
Pt3	50	282000
cis-Pt	2,6	115385
EtBr	0,95	5263158
Hoechst 33258	50	25972
CT-DNK	13	569231



Slika P14. IR spektar CT-DNK rastvorenog u 10 mM TRIS puferu na pH = 7,4 i temperaturi $37 \degree$ C, nakon 24 h.



Slika P15. IR spektar Pt1 kompleksa rastvorenog u 10 mM TRIS puferu na pH = 7,4 i temperaturi 37 °C, nakon 24 h.



Slika P16. IR spektar Pt2 kompleksa rastvorenog u 10 mM TRIS puferu na pH = 7,4 i temperaturi 37 °C, nakon 24 h.



Slika P17. IR spektar Pt3 kompleksa rastvorenog u 10 mM TRIS puferu na pH = 7,4 i temperaturi 37 °C, nakon 24 h.



Slika P18. IR spektar Pt1/CT-DNK (r = 0,5)











Slika P23. IR spektar **Pt2**/CT-DNK (r = 2,0)









LISTA SKRAĆENICA

¹³ C NMR	ugljenik-13 nuklearna magnetna rezonanca
¹ H NMR	protonska nuklearna magnetna rezonanca
4,4'-bipy	4,4'-bipiridin
5-H-Y	$[{cis-Pt(NH_3)_2}_2(\mu-OH)(\mu-tetrazolato-N2,N3)](ClO_4)_2$
А	adenin
A375	humane ćelije karcinoma melanoma
ACRAMTU–S	1-[2-(akridin-9-ilamino)etil]-1,3-dimetiltiourea
AgCl	srebro(I)-hlorid
AgNO ₃	srebro-nitrat
Ala	alanin
AMPZ	$[{cis-Pt(NH_3)_2}_2(\mu-OH)(\mu-pirazolat)]^{2+}$
AMTA	$[{cis-Pt(NH_3)_2}_2(\mu-OH) (\mu-1,2,3-ta-N1,N2)](NO_3)_2$
Arg	arginin
bpa	1,2-bis(4-piridil)etan
B16-F10	mišije ćelije karcinoma melanoma
bpe	1,2-bis(4-piridil)etilen
BSA	bovin serum albumin
С	citozin
cis-Pt	cis-diammindihloridoplatina(II)
CT26	ćelije mišijeg karcinoma kolona
CT–DNK	dezoksiribonukleinska kiselina izolovana iz grudne žlezde
	teladi
Ctr1p	transporter bakra
Cys	cistein
D ₂ O	deuterisana voda
DLAV	dorzalni uzdužni anastomotički krvni sudovi
DMF	dimetil-formamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DMSO-d ₆	deutero dimetilsulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
dsDNK	dvolančana uracil-dezoksiribonukleinska glikozilaza
EC ₅₀	polovina maksimalne efektivne koncentracije
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
EGFP	zeleni fluorescentni protein
en	etilendiamin
ESI-HRMS	elektrosprej jonizaciona masena spektroskopija
EtBr	3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinijumbromid
FT–IR	infracrvena spektroskopija Furijeove transformacije
	(Fourier-transform infrared spectroscopy)

G	guanin
G-aktin	monomerni globularni aktin
gDNK	genomska dezoksiribonukleinska kiselina
HCT116	ćelije humanog kolorektalnog karcinoma
His	histidin
	monom
HIV	humani imunodeficijencijski virus
	(Human Immunodeficiency Virus)
Hoechst 33258	2'-(4-hidroksifenil)-5-[5-(4-metilpiperazin-1-
	il)benzimidazo-2-ill-benzimidazol
HSA	humani serum albumin
Hsp90	protein toplotnog šoka
IC ₅₀	koncentracija polovine maksimalnog inhibitorskog deistva
1030	(half maximal inhibitory concentration)
IR	infracryena spektroskopija
ISV	intersegmentalni kryni sudovi
KB	ćelije humanog enidermoidnog karcinoma
	polovina latentne doze (<i>lethal concentration</i>)
	litium-hlorid
	celije mišijeg karcinoma nluća
LLCI	lizin
MRC-5	humane zdrave ćelije fibroblasta pluća
MS	masana snektrometrija
	2 (4.5 dimotilized 2 il) 2.5 diferiltetrazolium bromid
	5-(4,5-uinetinazoi-2-ii)-2,5-uinetintetiazoituin bioiniu
NCI-H400	Organizacija za ekonomelju sorodnju i rozvoj (The
UECD	Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj (<i>The</i>
DDC	fosfotni nufon
r D.S.	2.2 honzodiozin
phtz	2,5-benzodiazin
qx	1,4-Denzoulazin
qz	1,5-Denzoulazin
	ribonukleinska kiselina
RPMI	Memorialni institut Rozvel Park (Roswell Park Memorial
	Institute)
SH-SY5Y	celije humanog neuroblastoma
SUS	2-(2-merkapto-etoksi)-etandiol
SIV	subintestinalni krvni sudovi
SW480	celije humanog kolorektalnog adenokarcinoma
T	timin
Transplatina	trans-diammindihloridoplatina(II)
TRIS	tris(hidroksimetil)aminometan
Trp	triptofan
Tyr	tirozin
UV–Vis	ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija
IUPAC	Međunarodni savez čiste i primenjene hemije (International
	Union of Pure and Applied Chemistry)
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta
A549	ćelije humanog adenokarcinoma pluća

SPISAK SLIKA

Redni broj slike	Naziv slike	Strana
Slika 1.	Strukturne formule kompleksa platine koji se koriste u medicini za lečenje tumora	3
Slika 2.	Strukturna formula pikoplatine.	4
Slika 3.	Strukturne formule dinuklearnih AMPZ, AMTA i 5-H-Y kompleksa.	5
Slika 4.	Strukturne formule polinuklearnih BBR3464, BBR3610 i BBR3611 kompleksa.	6
Slika 5.	Strukturna formula kompleksa Triplatina-NC.	6
Slika 6.	Šematski prikaz reakcija hidrolize cisplatine unutar ćelije.	7
Slika 7.	Mehanizam antitumorskog delovanja <i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂] kompleksa.	8
Slika 8.	Strukturna formula <i>trans</i> -[PdCl ₂ (2-dqmp) ₂] kompleksa.	9
Slika 9.	Strukturne formule $[Pd(L)(PPh_3)]$ i $[Pd(L)(AsPh_3)]$ kompleksa $(L = 4-hidroksi-benzoeva kiselina (5-bromo-2-hidroksi-benziliden)-hidrazin).$	10
Slika 10.	Strukturna formula [PdCl ₂ (L)] kompleksa (L = 2-deoksi-2-[(2-piridinilmetilen)amino]- α -D-glukopiranoza).	10
Slika 11.	Strukturne formule [Pd(mda)] ²⁻ i [Pd(obp)] ²⁻ kompleksa.	11
Slika 12.	Strukturna formula [Pd2spm] kompleksa (spm = spermin).	11
Slika 13.	Strukturna formula paladijum(II) kompleksa sa nitroimidazolom.	12
Slika 14.	Strukturna formula $[{trans-PtCl(NH_3)}_2-\mu-{trans-Pd(NH_3)(2-hidroksipiridin)-(H_2N(CH_2)_6NH_2)_2]^{4+}$ kompleksa.	12
Slika 15.	Struktura DNK: Bazni parovi A=T i G=C sa naznačenim vodoničnim vezama (A) i sa naznačenim velikim i malim žljebovima (B).	14
Slika 16.	Strukture A–DNK, B–DNK i Z–DNK konformera u kristalnim strukturama.	15
Slika 17.	Kovalentno vezivanje cisplatine za DNK u kristalnoj strukturi (A); Strukturni prikaz načina vezivanja cisplatine za guanin (G) i adenin (A) (B); 1,2-unutarlančano GpG, 1,2-unutarlančano ApG, 1,3- međulančano GpNpG i 1,2- međulančano GpG vezivanje cisplatine za DNK (C).	16

Slika 18.	Grafički prikaz interkalacije etidijum jona (Et) iz etidijum-bromida (EtBr).	17
Slika 19.	Strukturne formule platina(II) kompleksa koji interkaliraju u DNK.	18
Slika 20.	Strukturna formula nogalamicina (A); Šematski prikaz udenute interkalacije (B).	19
Slika 21.	Strukturna formula 9-amino-6-bromo-daca (A); Kristalna struktura udenute interkalacije 9-amino-6-bromo-daca u DNK.	20
Slika 22.	Strukturne formule platina(II) kompleksa sa terpiridinom kao ligandom.	20
Slika 23.	Strukturna formula platina(II) kompleksa sa akridinom (A) i akridiniltioureom (B) koji se za DNK vezuju na dvostruki način. Interkalacija i kovalentno vezivanje [Pt(ACRAMTU– S)(en)Cl](NO ₃) ₂ kompleksa za DNK.	21
Slika 24.	Strukturna formula platina(II) bisinterkalatora (A,C); Bisinterkalacija $[{Pt(terpy)}_2(SOS)]^{2+}$ kompleksa u DNK sekvence d(GCTATAGC)2.	22
Slika 25.	Vezivanje berenila (A), netropsina (B) i Hoechst 33258 (C) za mali žljeb DNK.	23
Slika 26.	Vezivanje BBR3464 za jedan lanac fosfatne kičme DNK.	24
Slika 27.	Strukture HSA i BSA sa označenim triptofanskim ostacima (crno).	25
Slika 28.	Struktura HSA sa označenim mestima vezivanja (I i II), domenima (I-III) i poddomenima (A i B).	26
Slika 29.	Strukturne formule dinuklearnih kompleksa platine(II) i paladijum(II). Numeracija atoma ugljenika je u skladu sa IUPAC– ovim pravilima.	40
Slika 30.	Šematski prikaz sinteze dinuklearnih platine(II) i paladijum(II) kompleksa.	41
Slika 31.	Optimizovane strukture dinuklearnih Pt1–Pt3 kompleksa i strukturne formule odgovarajućih mostnih liganda.	43
Slika 32.	UV–Vis spektri Pt1 kompleksa na različitim pH vrednostima (A); dekonvolucija UV–Vis spektara Pt1 kompleksa (pH = 1,9, 4,8 i 7,4) (B).	48
Slika 33.	UV–Vis spektri Pt1–Pt3 /CT–DNK ([CT–DNK] _o = 13 μ M) mereni u 0,01 M PBS puferu na pH = 7,40 i temperaturi od 37 °C (r = 0,4-6,0).	49
Slika 34.	Energetski profil hidrolize Pt1–Pt3 kompleksa.	50
Slika 35.	Apsorpcioni spektri Pt1–Pt3 kompleksa u odsustvu i prisustvu CT– DNK. Strelice pokazuju promenu apsorpcije usled povećanja koncentracije CT–DNK. Umetnuti grafik predstavlja zavisnost $[DNK]/(\epsilon_a-\epsilon_f)$ od $[DNK]$.	51
Slika 36.	Zavisnost apsorpcije CT–DNK/Pt(II) od koncentracija Pt1–Pt3 i <i>cis</i> -Pt kompleksa na $\lambda = 260$ nm.	52

Slika 37.	Izračunate i eksperimentalno dobijene vrednosti apsorpcije na talasnoj dužini od 260 nm za cis-Pt (A), EtBr (B) i Hoechst 33258 (C) u prisustvu CT-DNK ([DNK] ₀ = 13 μ M). Umetnuti grafici prikazuju izračunate i eksperimentalne vrednosti apsorpcije koncentracija do 12 μ M.	53
Slika 38.	Izračunate i eksperimentalno dobijene vrednosti apsorpcije na 260 nm za Pt1 (A), Pt2 (B) i Pt3 (C) u prisustvu CT–DNK ([DNK] ₀ =13 μ M). Umetnuti grafici predstavljaju izračunate i eksperimentalne vrednosti apsorpcije koncentracija do 12 μ M.	54
Slika 39.	Emisioni spektri EtBr/CT–DNK u odsustvu i prisustvu $Pt1-Pt3$ kompleksa. Strelice pokazuju promenu emisije usled povećanja koncentracije $Pt1-Pt3$ kompleksa. Umetnuti grafik predstavlja zavisnost I ₀ /I od [Q].	55
Slika 40.	Relativni viskozitet CT–DNK u zavisnosti od koncentracije Pt1–Pt3 kompleksa u 0,01 M PBS puferu na pH = 7,40 i na 25 °C.	57
Slika 41.	Far-IR spektri za Pt1-Pt3/CT-DNK.	58
Slika 42.	Teorijski dobijeni far-IR spektri za Pt1W kompleks, Pt1W-H2O i Pt1W-(CH3)2PO4 (A). Strelice pokazuju na trake koje potiču od Pt– OH ₂ vibracije. Teorijski dobijeni far-IR spektri Pt1–Pt3 kompleksa i odgovarajućih akva derivata Pt1W–Pt3W korišćnjem B3LYP metode, sa 6-311g(d,p) bazisom za atome nemetala i lanl2dz (ECP) bazisom za platinu (B).	59
Slika 43.	IR spektri Pt1–Pt3 /CT–DNK u molskom odnosu $r = 0,5$.	61
Slika 44.	Trake genomske dsDNK (200 ng) u prisustvu Pt1–Pt3 kompleksa koncentracije 5, 25 i 50 μ M u TE puferu (10 mM Tris, 1 mM EDTA) 2 h na pH = 7,4 i 37°C. M je DNK marker, a C je kontrolna DNK.	62
Slika 45.	Strukture i energije najstabilnijih načina vezivanja Pt1–Pt3 kompleksa i njihovih akva derivata (Pt1W–Pt3W) za DNK dobijene primenom molekulskog dokinga.	63
Slika 46.	Strukture najstabilnijih načina vezivanja Pt1–Pt3 (vezivanje za mali žljeb) i Pt1W–Pt3W kompleksa (prekrivanje malog žljeba).	63
Slika 47.	Strukture najstabilnijih načina vezivanja Pt1–Pt3 i Pt1W–Pt3W kompleksa za DNK dobijeni molekulskim dokingom (A); dve vrste interkalacije preuzete iz Proitenske baze podataka (pdb) (B).	64
Slika 48.	Strukture načini vezivanja Pt1–Pt3 i Pt1W–Pt3W kompleksa za BS1 i BS2 vezivna mesta u B-DNK konformeru (pdb kod: 1BNA).	65
Slika 49.	Strukture i energije vezivanja najstabilnijih načina vezivanja Pt1–Pt3 i odgovarajućih akva derivata (Pt1W–Pt3W) za A-DNK konformer (pdb kod: 5MVK).	66
Slika 50.	Rezultati ispitivane toksičnosti Pt1–Pt3 kompleksa i cisplatine prema embrionima zebrica, izraženi kao LC ₅₀ vrednost. Embrioni zebrice su	67

bili izloženi različitim koncentracijama kompleksa u periodu od 6 do 120 hpf.

- Slika 51. In vivo anti-angiogena aktivnost dinuklearnih Pt1–Pt3 kompleksa i sunitiniba (A); IC₅₀ vrednosti Pt1–Pt3 kompleksa dobijene tretiranjem embriona sa anti-angiogenim fenotipom (B); Rezultati inhibicije ISV angiogeneze (C) i SIV angiogeneze (D). Statistički značajne razlike između kontrolne i tretirane grupe su označene (*P < 0,05, **P < 0,01; ***P < 0,001).
- Slika 52. Antikancerogena i anti-angiogena aktivnost Pt1–Pt3 kompleksa i 69 cisplatine na ksenotransplantnim B16–F10ćelijama zebrica.
- Slika 53. Antikancerogena aktivnost Pt1–Pt3 kompleksa i cisplatine 70 koncentracije 5µM i 25 µM (A); Volumen B16–F10 tumorskih ćelija u zavisnosti od koncentracije Pt1–Pt3 kompleksa i cisplatine (B); Procenat embriona zebrice koji pokazuju diseminaciju ćelija melanoma u kaudalnom predelu nakon tretmana dinuklearnim Pt1– Pt3 kompleksima i cisplatinom (C). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija za tri nezavisna eksperimenta, **P* < 0,05; ***P* < 0,01; ****P* < 0,001 prema ANOVA i Bonferonijevom (*Bonferonni*) testu.
- Slika 54. Apsorpcioni spektri kompleksa Pd1–Pd6 u odsustvu i prisustvu CT– 71 DNK. Strelice pokazuju promenu apsorpcije usled povećanja koncentracije CT–DNK. Umetnuti grafik predstavlja zavisnost $[DNK]/(\varepsilon_a-\varepsilon_f)$ od [DNK].
- Slika 55. Emisioni spektri EtBr/CT–DNK u odsustvu i prisustvu Pd1–Pd6 75 kompleksa. Strelice pokazuju promenu emisije usled povećanja koncentracije Pd1–Pd6 kompleksa. Umetnuti grafik predstavlja zavisnost I₀/I od [Q].
- **Slika 56.** Uticaj povećanja koncentracije **Pd1–Pd3** (A) i **Pd4–Pd6** (B) 77 kompleksa na relativni viskozitet CT–DNK molekula u 0,01 M PBS puferu na pH = 7,40 i sobnoj temperaturi.
- Slika 57. Emisioni spektri BSA molekula u odsustvu i prisustvu kompleksa 79
 Pd1–Pd6. Strelica pokazuje promenu emisije povećanjem koncentracije kompleksa. Umetnuti grafik predstavlja zavisnost I₀/I od [Q].
- Slika 58. Citotoksični potencijal Pd1–Pd6 kompleksa ispitivan na A549 (A), 80
 SW480 (B), LLC1 (C), HCT116 (D) i CT26 (E) kancerogenim ćelijama nakon 72 h rasta u prisustvu različitih koncentracije paladijum(II) kompleksa. Svi podaci su predstavljeni kao srednja vrednost tri nezavisna eksperimenta izvedena tri puta.
- Slika 59. Apoptoza LLC1 ćelija netretiranih i tretiranih cisplatinom, Pd1–Pd3 82 (A) i Pd4–Pd6 (C) kompleksima i apoptoza netretiranih i tretiranih CT26 ćelija cisplatinom i Pd4–Pd6 kompleksima (E) nakon 24 h ispitana primenom protočne citometrije korišćenjem Aneksina V (FITC) i PI dvostrukog obojenja. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija tri nezavisna ekperimenta, * *P*<0,05,

*** *P*<0,001. *Dot plot*-ovi pokazuju populaciju preživelih (AnnV– PI–), ranih apoptotičkih (AnnV+ PI–), kasnih apoptotičkih (AnnV+ PI+) i nekrotičnih (AnnV– PI+) LLC1 (B i D) i CT26 ćelija (F).

- Slika 60. Procenat Ki67-pozitivnih LLC1 ćelija netretiranih i tretiranih 84 cisplatinom i kompleksima Pd1–Pd6 (A, C) i procenat Ki67-pozitivnih CT26 ćelija netretiranih i tretiranih cisplatinom i kompleksima Pd4–Pd6 (E) tokom 24 h, određen protočnom citometrijom, predstavljen kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. Reprezentativni *dot plot*-ovi i histogrami prikazuju ekspresiju Ki67 (srednji intenzitet fluorescencije) u ćelijama LLC1 (B, D) i CT26 (F).
- Slika 61. CT26 ćelije u fazama ćelijskog ciklusa (G1, S i G2) netretirane i 85 tretirane cisplatinom i Pd4–Pd6 kompleksima (62,5 μM) tokom 24 h obojene Vybrant® DyeCycleTM Rubi bojom i analizirane protočnom citometrijom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta.

SPISAK TABELA

Redni broj tabele	Naziv tabele	Strana
Tabela 1.	NMR (¹ H i ¹³ C) hemijska pomeranja (δ , ppm) za slobodne 4,4'-bipy, bpa i bpe ligande i odgovarajuće dinuklearne Pt1–Pt3 komplekse u D ₂ O kao rastvaraču i TSP kao standardu.	41
Tabela 2.	¹ H i ¹³ C NMR hemijska pomeranja (δ , ppm) za slobodne 4,4'-bipy, bpa, bpe, qx, qz i phtz mostne ligande i dinuklearne Pd1–Pd6 komplekse u D ₂ O kao rastvaraču i u TSP kao standardu.	45
Tabela 3.	Konstante vezivanja (K _b), Gibsova energija (Δ G) i hiperhromizam (%) za Pt1–Pt3 komplekse.	52
Tabela 4.	Stern-Volmerove konstante (K_{sv}), konstante vezivanja (K_a) i broj vezujućih mesta (n) kompleksa Pt1–Pt3 .	57
Tabela 5.	Intenziteti traka prisutnih u IR spektrima CT–DNK i Pt1–Pt3/CT– DNK u različitom molskom odnosu (r).	60
Tabela 6.	IC_{50} vrednosti dobijene MTT testom na humanim ćelijskim linijama izražene u μ M (standardna devijacija je između 1-5%).	67
Tabela 7.	Toksikološki parametri dobijeni iz grafika zavisnosti procene toksičnosti i anti-angiogenog potencijala od koncentracije kompleksa Pt1–Pt3 , cisplatine i sunitiniba.	69
Tabela 8.	Konstante vezivanja (K _b), Gibsova energija (ΔG) i hiperhromizam (%) dinukelarnih Pd1–Pd6 kompleksa.	74
Tabela 9.	Stern-Volmerove konstante (K_{sv}), konstante vezivanja (K_a) i broj vezujućih mesta (n) kompleksa Pd1–Pd6 .	76
Tabela 10.	Stern-Volmerove konstante (K_{sv}), konstanta gašenja fluorescencije albumina (k_q), konstante vezivanja (K_a) i broj vezujućih mesta (n) Pd1–Pd6 kompleksa.	78
Tabela 11.	IC ₅₀ vrednosti Pd1–Pd6 kompleksa dobijene MTT testom na humanim i mišijim tumorskim ćelijama linijama. Podaci su izraženi kao srednja vrednost (standardna devijacija je između 1-5%).	81

BIOGRAFIJA



Anđela A. Franich je rođena u Kragujevcu 1991. godine. Osnovnu školu i Prvu kragujevačku gimnaziju završila je u Kragujevcu. Diplomirala je 2016. godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Kragujevcu. Master studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Kragujevcu upisala je iste godine i završila 2017. godine. Doktorske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Kragujevcu smer Neorganska hemija upisala je 2017. godine. U zvanje istraživač-pripravnik za naučnu oblast Hemija izabrana je 2017. godine. Do sada je položila sve planom i programom predviđene ispite sa prosečnom ocenom 10.

U zvanje asistent za užu naučnu oblast Neorganska hemija na Institutu za hemiju na Prirodno-matematičkom fakultetu u Kragujevcu izabrana je 2018. godine, a reizabrana 2021. godine. Sa uspehom izvodi vežbe studentima Osnovnih akademskih studija hemije, na predmetima Neorganska hemija 1, Odabrana poglavlja neorganske hemije, Hemija

rastvora i Strukturna neorganska hemija. Kao istraživač bila je angažovana na projektu br. 172036 ("Sinteza novih kompleksa metala i ispitivanje njihovih reakcija sa peptidima") Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razuvoja Republike Srbije. Trenutno je angažovana na projektu br. 451-03-65/2024-03/200122 Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije.

Kao dobitnik stipendije "*EU Erasmus+ Programme KA107 with Partner Countries*" projekta, tokom 2019/2020. godine boravila je 6 meseci na Fridrih-Aleksandar Univerzitetu u Erlangen-Nirnbergu (Nemačka) na trećoj godini doktorskih studija.

Pod mentorstvom profesora dr Snežane Rajković bavi se istraživačkim radom u oblasti bioneorganske i medicinske neorganske hemije. Predmet naučnih istraživanja Anđele A. Franich je sinteza, strukturna karakterizacija i biološka ispitivanja dinuklearnih kompleksa platine(II) i paladijum(II). Do sada je objavila četrnaest naučnih radova u međunarodnim i nacionalnim časopisima sa SCI liste i učestvovala je na šesnaest međunarodnim i nacionalnim konferencijama. Publikovani rezultati doktorske disertacije

ORIGINAL PAPER



New dinuclear palladium(II) complexes with benzodiazines as bridging ligands: interactions with CT-DNA and BSA, and cytotoxic activity

Andjela A. Franich¹ · Marija D. Živković² · Dušan Ćoćić¹ · Biljana Petrović¹ · Marija Milovanović³ · Aleksandar Arsenijević³ · Jelena Milovanović^{3,4} · Dragana Arsenijević^{2,3} · Bojana Stojanović^{3,5} · Miloš I. Djuran⁶ · Snežana Rajković¹

Received: 29 May 2019 / Accepted: 19 July 2019 / Published online: 5 August 2019 © Society for Biological Inorganic Chemistry (SBIC) 2019

Abstract

Three new dinuclear Pd(II) complexes with general formula [$\{Pd(en)Cl\}_2(\mu-L)$](NO₃)₂ [L is bridging ligand quinoxaline (Pd1), quinazoline (Pd2) and phthalazine (Pd3)] were synthesized and characterized by elemental microanalyses, UV–Vis, IR and NMR (¹H and ¹³C) spectroscopy. The interaction of dinuclear Pd1–Pd3 complexes with calf thymus DNA (CT-DNA) has been monitored by viscosity measurements, UV–Vis and fluorescence emission spectroscopy in aqueous phosphate buffer solution (PBS) at pH 7.40 and 37 °C. In addition, these experimental conditions have been applied to investigate the binding affinities of Pd1–Pd3 complexes to the bovine serum albumin (BSA) by fluorescence emission spectroscopy. In vitro antiproliferative and apoptotic activities of the dinuclear Pd(II) complexes have been tested on colorectal and lung cancer cell lines. All tested Pd(II) complexes had lower cytotoxic effect than cisplatin against colorectal cancer cells, but also had similar or even higher cytotoxicity than cisplatin against lung cancer cells. All complexes induced apoptosis of colorectal and lung cancer and lung cancer cells, while the highest antiproliferative effect exerted Pd2 complex.

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s00775-019-01695-w) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Snežana Rajković snezana@kg.ac.rs

- ¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, Kragujevac 34000, Serbia
- ² Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, Kragujevac 34000, Serbia
- ³ Department of Pharmacy, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences,

University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, Kragujevac 34000, Serbia

- ⁴ Department of Pharmacy, Department for Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, Kragujevac 34000, Serbia
- ⁵ Department of Pharmacy, Department for Pathophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, Kragujevac 34000, Serbia
- ⁶ Serbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, Belgrade 11000, Serbia

Contents lists available at ScienceDirect



Journal of Inorganic Biochemistry

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



In vitro cytotoxic activities, DNA- and BSA-binding studies of dinuclear palladium(II) complexes with different pyridine-based bridging ligands

Andjela A. Franich^a, Marija D. Živković^b, Jelena Milovanović^{c,d}, Dragana Arsenijević^{b,c}, Aleksandar Arsenijević^c, Marija Milovanović^c, Miloš I. Djuran^{e,*}, Snežana Rajković^{a,*}

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, S. Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^c University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, S. Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^d University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Institute of Histology, S. Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^e Serbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords: Palladium(II) complexes Pyridine-based bridging ligands Cytotoxic activity DNA/BSA binding

ABSTRACT

Three new dinuclear palladium(II) complexes with general formula $[{Pd(en)Cl}_2(\mu-L)]^{2+}$ (L is pyridine-based bridging ligand 4,4'-bipyridine (4,4'-bipy, 1), 1,2-bis(4-pyridyl)ethane (bpa, 2), 1,2-bis(4-pyridyl)ethylene (bpe, 3) and en is bidentate coordinated ethylenediamine) were synthesized and characterized by elemental microanalyses, NMR (¹H and ¹³C), IR and UV–Vis spectroscopy. *In vitro* cytotoxic activity of these complexes against human A549 and murine LLC1 lung cancer cells, as well as two human HCT116 and SW480 and one murine CT26 colon cancer cells was investigated using MTT assay (MTT is 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). The potential of complexes 1–3 to induce apoptosis was tested by flow cytometric analyses of Annexin V and propidium iodide stained treated cells, while their antiproliferative activity was analyzed by detection of Ki67 expression in treated cancer cells. The DNA binding affinity of complexes 1–3 was evaluated by UV–Vis, fluorescence emission spectroscopy and by viscosity measurements in aqueous phosphate buffer solution at pH 7.40. Furthermore, interaction of these complexes with bovine serum albumin was investigated by fluorescence spectrometry. The present study showed that the nature of pyridine-based bridging ligand (L) in dinuclear [{Pd(*en*)Cl}₂(μ -L)]²⁺ complex has an influence on the complex preference for the cytotoxic activity and CT-DNA/BSA (CT-DNA is calf thymus DNA and BSA is bovine serum albumin) binding affinity.

1. Introduction

After discovery of the antitumor activity of cisplatin, the fight against the most serious and widespread malignant tumor disease has been opened. The well-known clinically used antitumor drug cisplatin and its analogue platinum(II) derivatives have long played an important role in the clinical treatment of human malignant tumor. However, these metal-based antitumor drugs have been shown negative effects reflected in toxicity (nephrotoxicity, neurotoxicity, cardiotoxicity and resistance) [1]. These factors strongly motivate scientists to synthesize complexes of other metals, such palladium(II). Palladium(II) complexes are good alternative for antitumor drugs due to their structural similarities to platinum(II) [2], as well as their high solubility in water and low renal toxicity [3]. Unfortunately, the potential therapeutic application of palladium(II) complexes is complicated by lower *in vivo* stability and lower antitumor activity which are the consequences of their higher reactivity and rapid hydrolysis in solution leading to conversion into other species that can be inactive [4]. This impediment can be overcome by different choice of ligands in metallodrug design or by dinuclear complexes, which have many advantages in comparison with mononuclear complexes. Rodrigues et al. reported that dinuclear cyclopalladate organometallic complexes containing biphosphine ligands were more active *in vivo*, delaying the tumor growth and prolonging animal survival, compared to the corresponding mononuclear complexes [5].

Interaction of metal complexes with DNA and bovine serum albumin (BSA) can show their antitumor nature [6]. DNA interaction between metal complexes is of great significance in the elucidation of the mechanisms of antitumor drugs. Types of metal ions, the ligand donor atoms, the planarity of ligands and the coordination geometry

* Corresponding authors.

E-mail addresses: djuran@kg.ac.rs (M.I. Djuran), snezana.rajkovic@pmf.kg.ac.rs (S. Rajković).

https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111158

Received 14 April 2020; Received in revised form 18 June 2020; Accepted 21 June 2020 Available online 23 June 2020

0162-0134/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.
ORIGINAL PAPER



New minor groove covering DNA binding mode of dinuclear Pt(II) complexes with various pyridine-linked bridging ligands and dual anticancer-antiangiogenic activities

Andjela A. Franich¹ · Marija D. Živković² · Tatjana Ilić-Tomić³ · Ivana S. Đorđević⁴ · Jasmina Nikodinović-Runić³ · Aleksandar Pavić³ · Goran V. Janjić⁴ · Snežana Rajković¹

Received: 25 December 2019 / Accepted: 25 February 2020 / Published online: 11 March 2020 © Society for Biological Inorganic Chemistry (SBIC) 2020

Abstract

New anticancer platinum(II) compounds simultaneously targeting tumor cells and tumor-derived neoangiogenesis, with new DNA interacting mode and large therapeutic window are appealing alternative to improve efficacy of clinical platinum chemotherapeutics. Herein, we describe three novel dinuclear [{Pt(en)Cl}₂(μ -L)]²⁺ complexes with different pyridine-like bridging ligands (L), 4,4'-bipyridine (**Pt1**), 1,2-bis(4-pyridyl)ethane (**Pt2**) and 1,2-bis(4-pyridyl)ethene (**Pt3**), which highly, positively charged aqua derivatives, [{Pt(en)(H₂O)}₂(μ -L)]⁴⁺, interact with the phosphate backbone forming DNA-Pt adducts with an unique and previously undescribed binding mode, called a minor groove covering. The results of this study suggested that the new binding mode of the aqua-Pt(II) complexes with DNA could be attributed to the higher anticancer activities of their chloride analogues. All three compounds, particularly complex [{Pt(en)Cl}₂(μ -4,4'-bipy)]Cl₂·2H₂O (4,4'-bipy is 4,4'-bipyridine) (**Pt1**), overcame cisplatin resistance in vivo in the zebrafish–mouse melanoma xenograft model, showed much higher therapeutic potential than antiangiogenic drug sunitinib malate, while effectively blocking tumor neovascularization and melanoma cell metastasis. Overall therapeutic profile showed new dinuclear Pt(II) complexes can serve as a useful tool for developing new and more effective anticancer drugs.

Keywords Dinuclear platinum(II) complexes · Minor groove covering · Dual anticancer and anti-angiogenic activity

Introduction

Platinum(II) complexes are still the most widely used metallodrugs in treatments of various cancer types—about 50% of chemotherapies are based on them [1, 2]. The binding of

Andjela A. Franich and Marija D. Živković contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s00775-020-01770-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Aleksandar Pavić goran.janjic@ihtm.bg.ac.rs

Goran V. Janjić goran.janjic@ihtm.bg.ac.rs

Snežana Rajković snezana@kg.ac.rs; snezana.rajkovic@pmf.kg.ac.rs

Extended author information available on the last page of the article

inorganic Pt(II) complexes to DNA is the principal activity mode of their cytostatic activities. The clinically approved Pt(II) anticancer complexes, such as cisplatin, predominantly form intrastrand covalent adducts with DNA by the coordination of N7 atoms from two adjacent guanine bases [3]. However, clinical Pt(II) complexes also bind to DNA in the healthy cells resulting in various negative side-effects (myelosupression, hepatotoxicity, ototoxicity, cardiotoxicity, nausea and vomiting, diarrhea, mucositis, stomatitis, pain, etc.) and the treatment discontinuation [4, 5]. Therefore, drug improvement in this area is focused on the synthesis of multinuclear Pt(II) complexes, such as the clinically used trinuclear complex Triplatin (or BBR3464). Polynuclear complexes, unlike mononuclear clinical agents, form different DNA adducts [6], and the different binding mode to DNA may result in the unique biochemical activity [7].

Highly charged polynuclear Pt(II) complexes are today a new class of antitumor compounds. They have a new type of DNA binding, called the phosphate clamp [6],

ORIGINAL PAPER



Dinuclear platinum(II) complexes as the pattern for phosphate backbone binding: a new perspective for recognition of binding modes to DNA

Andjela A. Franich¹ · Ivana S. Đorđević² · Marija D. Živković³ · Snežana Rajković¹ · Goran V. Janjić² · Miloš I. Djuran⁴

Received: 21 June 2021 / Accepted: 7 October 2021 © The Author(s), under exclusive licence to Society for Biological Inorganic Chemistry (SBIC) 2021

Abstract

The mechanism of action of most approved drugs in use today is based on their binding to specific proteins or DNA. One of the achievements of this research is a new perspective for recognition of binding modes to DNA by monitoring of changes in measured and stoichiometric values of absorbance at 260 nm. UV–Vis and IR spectroscopy, gel electrophoresis and docking study were used for investigation of binding properties of three dinuclear platinum(II) complexes containing different pyridine-based bridging ligands, [{Pt(en)Cl}₂(μ -4,4'-bipy)]Cl₂·2H₂O (**Pt1**), [{Pt(en)Cl}₂(μ -bpa)]Cl₂·4H₂O (**Pt2**) and [{Pt(en)Cl}₂(μ -bpe)]Cl₂·4H₂O (**Pt3**) to DNA (4,4'-bipy, bpa and bpe are 4,4'-bipyridine, 1,2-*bis*(4-pyridyl)ethane and 1,2-*bis*(4-pyridyl)ethene, respectively). In contrast to the system with well-known intercalated ligand (EtBr), covalently bound ligand (*cis*-Pt) and with minor groove binder (Hoechst 33258), which do not have significant differences in measured and stoichiometric values, the most pronounced deviations are recorded for two dinuclear platinum(II) complexes (**Pt1** and **Pt2**), as a consequence of complex binding to the phosphate backbone and bending of DNA helix. The hydrolysis of complexes and changes in DNA conformation were also analysed as phenomena that may have an impact on the changes in absorbance.

Graphic abstract



Keywords Dinuclear Pt(II) complex \cdot Pyridine-based bridging ligands \cdot UV-vis spectroscopy \cdot Quantum-mechanical calculations \cdot DNA binding modes

Goran V. Janjić goran.janjic@ihtm.bg.ac.rs

Miloš I. Djuran milos.djuran@pmf.kg.ac.rs

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 29 October 2021

Introduction

One of the goals of modern research in the medicinal chemistry is the relationship of the measurable biophysical parameters and structure of medical important compounds with

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

<u>Структурна, теоријска и антитуморска испитивања динуклеарних комплекса платине(II)</u> и паладијума(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима

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, 24.09.2024. године,

потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ Докторске дисертације

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом: <u>Структурна, теоријска и антитуморска испитивања динуклеарних комплекса платине(II)</u> <u>и паладијума(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима</u>

истоветне.

У Крагујевцу, 24.09.2024. године,

Atpauid

потпис аутора

Образац З

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Анђела А. Франицх,



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

<u>Структурна, теоријска и антитуморска испитивања динуклеарних комплекса платине(II)</u> и паладијума(II) са ароматичним *N*-хетероцикличним мостним лигандима

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



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

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

1) Ауторство

2) Ауторство - делити под истим условима

3) Ауторство - без прерада

4) Ауторство - некомерцијално

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 24.09.2024. године,

потпис аутора

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