

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Милица Међедовић Стефановић

СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И БИОЛОШКА АКТИВНОСТ МОНО- И ДИНУКЛЕАРНИХ РУТЕНИЈУМ(II/III) КОМПЛЕКСА СА АЗОТ-ДОНОРСКИМ ЛИГАНДИМА

Докторска дисертација

Крагујевац, 2024



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

FACULTY OF SCIENCE

Milica Međedović Stefanović

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF MONO- AND DINUCLEAR RUTHENIUM(II/III) COMPLEXES WITH NITROGEN-DONOR LIGANDS

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2024

Аутор
Име и презиме: Милица Међедовић Стефановић
Датум и место рођења: 23.04.1993., Бор
Садашње запослење: Истраживачица-сарадница
Докторска дисертација
Наслов: Синтеза, карактеризација и биолошка активност моно- и
динуклеарних рутенијум(II/III) комплекса са азот-донорским лигандима
Број страница: 152
Број слика: 94
Број библиографских података: 227
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет,
Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Хемија – Неорганска хемија (546)
Коментори: Проф. др Биљана Петровић, редовна професорка, Природно-
математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
др Ана Рилак Симовић, виша научна сарадница, Институт за информационе
технологије, Универзитет у Крагујевцу
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске
дисертације: Одл. бр. 400/XIV-2, 26.08.2021.

Author
Name and surname: Milica Međedović Stefanović
Date and place of birth: 23.04.1993., Bor
Current employment: Research Associate
Doctoral Dissertation
Title: Synthesis, characterization and biological activity of mono- and dinuclear
ruthenium (II/III) complexes with nitrogen-donor ligands
No. of pages: 152
No. of images: 94
No. of bibliographic data: 227
Institution and place of work: Faculty of Science, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Chemistry- Inorganic Chemistry (546)
Mentor: Prof. dr Biljana Petrović, Full Professor, Faculty of Science, University
of Kragujevac
dr Ana Rilak Simović, Senior Research Associate, Insitute of information
technologies, University of Kragujevac
Topic Application Date: 14.07.2021.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic:
400/XIV-2, 26.08.2021

ПОСВЕЋЕНО РОДИТЕЉИМА

ЗАХВАЛНИЦА

Користим прилику да изразим велику захвалност проф. др Биљани Петровић, редовној професорки Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу и коментору, јер ме је у генерацији 2012/2013 међу многим талентованим људима издвојила. Захваљијем јој се на укључивању у рад њене истраживачке групе, на свакој сугестији и посвећености током рада и израде докторске дисертације. Посебну захвалност јој дугујем за укључивање у рад са студентима у оквиру извођења лабораторијских вежби, што бих издвојила као најлепши део рада на Институту за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

Захвалност дугујем и др Ани Рилак Симовић, вишој научној сарадници Института за информационе технологије Универзитета у Крагујевцу и коментору, пре свега на пристанку да заједно са професорком Биљаном Петровић буде мој коментор. Дугујем јој захвалност на несебичном преношењу знања и искуства у раду са комплексима рутенијума, које је стекла иколовањем и усавршавањем. Захваљујем јој се на посвећености, преданости и сугестијама у експерименталном раду, као и великој помоћи у изради саме докторске дисертације.

Захвалност дугујем и члановима комисије др Јовани Богојески, ванредној професорки Природно-математичког факултета у Крагујевцу, др Сањи Гргурић Шипки, редовној професорки Хемијског факултета у Београду, др Марини Костић, вишој научној сарадници Института за информационе технологије у Крагујевцу, др Милану Вранешу, редовном професору Природноматематичког факултета у Новом Саду и др Дејану Баскићу, редовном професору Факултета медицинских наука у Крагујевцу, за време које су издвојили и коментаре које су дали приликом прегледа докторске дисертације.

Захваљујем се свим колегама из истраживачке групе проф. др Биљане Петровић и проф. др Јоване Богојески, а посебно колегама др Снежани Радисављевић и др Душану Ћоћићу.

Захваљујем се својој породици и пријатељима на великој подршци током школовања, а посебно супругу Александру и двема мени важним женама тетки Соњи и баби Љиљани.

Посебно место у захвалници издвојила бих за своје родитеље којима сам неизмерно захвална на љубави, васпитању, разумевању, подршци и свакој жртви који су поднели током мог школовања.

Рад посвећујем родитељима.

Све вам дугујем!

АПСТРАКТ

У оквиру дисертације описана је синтеза нових мононуклеарних Ru(II) (1-7) и Ru(III) комплекса (8–13), као и динуклеарних Ru(II) комплекса (14, 15). Структуре комплекса потврђене су аналитичким методама, као што су UV-Vis спектрофотометрија, ¹H и ¹³C NMR, IR, MS, EPR, мерење проводљивости и елементална микроанализа. Проучавани комплекси показали су добру стабилност у физиолошким условима, чиме су се стекли услови за даља истраживања. У супституционим реакцијама комплекси рутенијума 1-7, 14 и 15 показали су већу реактивност према азот-донорским (5'-GMP) него према сумпор-донорским нуклеофилима (GSH, L-Met и L-Cys). Резултати испитивања интеракција комплекса ca DNA указали су на везивање интеркалацијом и/или везивањем за мали жљеб, што је потврћено и на 1Z3F и 1BNA конформацијама DNA компјутерским докинг методама. Испитивани комплекси показали су умерену јачину везивања ($K_b = 10^4 - 10^6$) за протеин HSA и његов структурни аналог BSA. Молекулски докинг је код динуклеарних комплекса 14 и 15 издвојио активно место I субдомена IIA као вероватно, док је код мононуклеарних комплекса 1-13 потврђена могућност везивања за место I субдомена IIA и за место II субдомена IIIA активне стране протеина. Резултати испитивања биолошке активности указали су на добру активност и селективност комплекса 2, 5 и 6 према MDA-MB 231 и HeLa ћелијским линијама. Комплекс 12 показао се ефикасним у смањењу тумора плућа, а комплекс 9 у смањењу броја метастаза. Комплекс 15 показао се активнијим у поређењу са комплексом 14 према MDA-MB-231 ћелијској линији, док су се према HCT-116 ћелијској линији показали неактивним. На компјутерском докинг моделу панкреаса проучавана дифузија комплекса 8-13 кроз ткива и велике крвне судове дала је јасан увид у њихов фармацеутски потенцијал. In vitro испитивања антимикробне активности издвојила су комплексе 12 и 13 као најефикасније, док се по антиоксидативним својствима издвојио комплекс 8.

Кључне речи:

- Рутенијум(II/III) комплекси
- Механизам супституције
- Интеракције
- DNA
- BSA/HSA
- Цитотоксичност
- Молекулски докинг

ABSTRACT

This doctoral dissertation describes the synthesis of new mononuclear Ru(II) (1–7) and Ru(III) (8–13) complexes as well as dinuclear ruthenium(II) complexes (14 and 15). The structures of complexes were confirmed by various analytical methods, such as UV-Vis, ¹H and ¹³C NMR, IR, EPR, ESI-MS spectroscopy, conductivity measurements and elemental microanalysis. These complexes showed good stability in physiological conditions and thus became suitable candidates for further research. Ruthenium complexes 1-7, 14 and 15 were more reactive towards nitrogen-donor nucleophiles (5'-GMP) than toward sulfur-donor nucleophiles (GSH, L-Cys and L-Met) in the nucleophilic substitution reactions. Results obtained from the examination of the interactions of ruthenium complexes with DNA indicated binding by intercalation and/or minor groove binding, which was also confirmed by computational docking methods on two DNA conformations, 1Z3F and 1BNA. Ruthenium complexes bind to both sites with moderately strong affinity $(K_{\rm b} = 10^4 - 10^6 \,{\rm M}^{-1})$ to HSA and its structural analogue BSA. Molecular docking of dinuclear complexes 14 and 15 singled out active site I of subdomain IIA as probable, while mononuclear complexes 1–13 confirmed the possibility of binding to active site I subdomain IIA and active site II subdomain IIIA of proteins. Complexes 2, 5 and 6 showed good to strong and highly selective cytotoxic activity on the MDA-MB 231 and HeLa cell lines. Furthermore, complex 12 reduced the volume of mouse primary heterotopic Lewis lung cancer, while complex 9 reduced the number of metastases per lung. Finally, dinuclear complex 15 was more active against MDA-MB-231 cells than complex 14. On computational pancreatic model we studied diffusion of complexes 8-13 through both tissue and large blood vessel domains, demonstrating that these complexes are promising candidates for future pharmacological research in the field of pancreatic adenocarcinoma research. In vitro investigation stands out complexes 12 and 13 for the best antibacterial activity, while complex 8 was singled out for its antioxidant properties.

Keywords:

- Ruthenium(II/III) complexes
- Mechanism of substitution
- Interactions
- DNA
- BSA/HSA
- Cytotoxicity
- Molecular docking

САДРЖАЈ

1. ОПШТИ ДЕО	1
1.1. Рутенијум	2
1.2. Примена комплекса рутенијума као антитуморских агенаса	3
1.3. Арена рутенијум(II) комплекси	5
1.4. Рутенијум полипиридил комплекси	
1.4.1. Хидролиза рутенијум(II) полипиридил комплекса	
1.4.2. Интеракције са дериватима гуанина и DNA	
1.4.3. Интеракције са аминокиселинама и протеинима	16
1.5. Комплекси рутенијума(II/III) са Schiff-овим базама	20
1.6. Полинуклеарни комплекси рутенијума	24
1.6.1. Хомополинуклеарни комплекси рутенијума	24
1.6.2. Хетерополинуклеарни комплекси рутенијума	
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	
2.1. Хемикалије и реагенси	
2.2. Синтеза комплекса	
2.2.1. Синтеза Ru(II) полипиридил комплекса (1–7)	
2.2.2. Синтеза рутенијум(III) комплекса са Schiff-овим базама као лигандима (8	3–13)
2.2.3. Синтеза динуклеарних рутенијум(II) комплекса 14 и 15	40
2.3. Инструменти	40
2.4. Кинетичка мерења	41
2.4.1. Испитивање реакција супституције рутенијум(II) терпиридин комплекса	
2.4.2. Испитивање хидролизе и реакција супституције динуклеарних рутенијум	1(II) комплекса41
2.5. Апсорпциона спектроскопска испитивања	
2.6. Флуоресцентна испитивања	
2.7. Мерење вискозности	
2.8. Квантно хемијске методе	
2.9. Молекулски докинг	
2.9.1. Концепт дистрибуираног (енгл. smeared) моделирања	
2.10. Цитотоксичност комплекса	
2.10.1. In vitro испитивања	
2.10.1.1. Ћелијске културе	
2.10.1.2. MTT mecm	
2.10.1.3. Проточна цитометријска анализа	
2.10.1.4. Annexin V-FITC/7-AAD анализа	
2.10.1.5. Анализа протеина повезаних са апоптозом, аутофагијом и ћелијски	м циклусом46
2.10.1.6. Детекција и кванитификација аутофагије	
2.10.1.7. Анализа ћелијског циклуса	
2.10.2. Антимикробна активност	
2.10.3. Антиоксидативна активност	

Садржај

2.10.4. In vivo испитивања	47
3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА	48
3.1. Ru(II) полипиридил комплекси 1–7	49
3.1.1. Синтеза и карактеризација комплекса	49
3.1.2. Стабилност комплекса у воденом раствору	51
3.1.3. Утицај супституената и ароматичности на реактивност комплекса	54
3.1.4. Интеракције комплекса са DNA	59
3.1.4.1. Испитивање интеракција електронском апсорпционом спектроскопијом	59
3.1.4.2. Испитивање интеракција мерењем флуоресценције у присуству ЕВ	59
3.1.4.3. Испитивање интеракција мерењем флуоресценције у присуству Hoechst 33258	61
3.1.4.4. Вискозиметријска мерења	63
3.1.5. Интеракције комплекса са хуманим серум албумином (HSA)	64
3.1.5.1. Испитивање интеракције комплекса са HSA у присуству маркера	64
3.1.6. Молекулски докинг комплекса са DNA и HSA	69
3.1.7. Цитотоксичност и селективност комплекса	74
3.1.8. Утицај комплекса на апоптозу	76
3.1.9. Утицај комплекса на аутофагију	77
3.1.10. Утицај комплекса на ћелијски циклус	78
3.2. Ru(III) комплекси са Schiff-овим базама као лигандима (8–13)	79
3.2.1. Синтеза и карактеризација	79
3.2.2. Интеракције комплекса са DNA	81
3.2.2.1. Испитивање интеракција комплекса са DNA спектроскопским методама	81
3.2.2.2. Испитивање интеракција комплекса са DNA применом флуоресцентне спектроскоп	uje.82
3.2.2.3. Испитивање интеракција комплекса са DNA мерењем вискозности	85
3.2.2.4. Молекулски докинг комплекса са DNA	85
3.2.3. Интеракције комплекса са BSA	89
3.2.3.1. Испитивање интеракција комплекса са BSA емисионом методом	89
3.2.3.2. Молекулски докинг комплекса са BSA	92
3.2.4. Интеракције комплекса са HSA	95
3.2.4.1. Испитивање интеракција комплекса 12 са HSA емисионом методом	95
3.2.4.2. Молекулски докинг комплекса са HSA	96
3.2.5. Испитивање цитотоксичности комплекса	105
3.2.5.1. In vitro cmyduje	105
3.2.5.2. Анализа потенцијала апоптозе	107
3.2.5.3. Антипролиферативна активност Ru(III) комплекса	110
3.2.5.4. In vivo студије	111
3.2.5.5. Антимикробна активност комплекса	113
3.2.5.6. Антиоксидативна активност комплекса	114
3.2.5.7. In silico испитивање дистрибуције комплекса унутар панкреасног ткива и мреже уроњених крвних судова	115

Садржај

3.3. Динуклеарни комплекси рутенијума 14 и 15	117
3.3.1 Синтеза и карактеризација	117
3.3.2. Хемијско понашање динуклеарних комплекса у воденом раствору	118
3.3.3. Кинетичка мерења	119
3.3.4. Интеракције динуклеарних комплекса са DNA	122
3.3.4.1. Апсорпциона спектроскопска мерења	122
3.3.4.2. Емисиона спектроскопска испитивања интеракција у присуству ЕВ	123
3.3.4.3. Емисиона спектроскопска испитивања интеракција у присуству Hoechst 33258	124
3.3.4.4. Вискозиметријка мерења	125
3.3.5. Интеракције комплекса са говеђим серум албумином (BSA)	125
3.3.6. Молекулски докинг са DNA и BSA	127
3.3.7. In vitro цитотоксична активност	130
4. ЗАКЉУЧАК	131
5. ЛИТЕРАТУРА	134
6. ПРИЛОГ	

7. БИОГРАФИЈА

СКРАЋЕНИЦЕ

цисплатина	cis-диаминдихлоридоплатина(II)
DNA	дезоксирибонуклеинска киселина
Cl-tpy	4'-хлоро-2,2',6',2"-терпиридин
tpy	2,2',6',2"-терпиридин
en	етилендиамин
dach	(±)- <i>trans</i> -1,2-диаминоциклохексан
bpy	2,2'-бипиридин
dmso	диметилсулфоксид
PF ₆	хексафлуорофосфат
NMR	нуклеарно магнетна резонантна спектроскопија
5'-GMP	гуанозин-5'-монофосфат
5'-AMP	аденозин-5'-монофосфат
5'-TMP	тимидин-5'-монофосфат
GSH	ГЛУТАТИОН
L-Cys	L-пистеин
L-Met	L-метионин
Pz	пиразол
Tz	1.2.4-триазол
Pv	пирилин
L-His	L-хистилин
UV-Vis	спектрофотометрија у ултраљубичастом и видљивом
	делу спектра
Tf	трансферин
G	гуанин
Ā	аленин
C	ШИТОЗИН
im	имилазол
ind	инлазол
NAMI-A	[Him] <i>trans</i> -[RuCl ₄ (im)(dmso-S)]
KP1019	[Hind] <i>trans</i> -[RuCl4(ind) ₂]
acac	анетиланетонат
MS	масена спектроскопија
pta	1.3.5-триаза-7-фосфатрицикло[3.3.1.1]-лекан
E ₂	енергија активирања
R	гасна константа (8 314 $IK^{-1}M^{-1}$)
Т	температура у Келвиновим степенима (К)
ΛH≠	промена енталпије активирања
AS≠	промена ентропије активирања
AV≠	промена запремине активирања
Δv N	Avogadro-og 6poi $(6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1})$
h	Planck-ова константа (6.626 \cdot 10 ⁻³⁴ Js)
II D	притисак
	константа брзине хемијске реакције
	константа брзине реакције <i>решиције</i>
N obsd	спектроскопија у инфранреном лелу спектра
IIX EtaN	триетиламин
12131N A	апсорбнија раствора
A)	тапасна лужина
Λ	талата думппа

t	време у секундама (s)
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум
	бромид
MeOH	метанол
EtOH	етанол

H

HO



1. ОПШТИ ДЕО

1.1. Рутенијум

Рутенијум се у периодном систему елемената налази у петој периоди и VIII групи, где заједно са Os, Rh, Ir, Pd и Pt чини платинску групу метала. Овај прелазни метал добио је име по латинском називу за Русију (*Ruthenia*). Редни број рутенијума је 44 (Kr 5s¹ 4d⁷), а атомски 101,07. У природи постоји у великом броју изотопа (⁹⁶Ru, ⁹⁸Ru, ⁹⁹Ru, ¹⁰⁰Ru, ¹⁰¹Ru, ¹⁰²Ru и ¹⁰⁴Ru), од којих је ¹⁰²Ru најзаступљенији. Рутенијум је стабилан на ваздуху, док загревањем прелази у оксид RuO₂. У физиолошким условима доминантно оксидационо стање рутенијума је Ru(III), док су оксидациона стања Ru(II) и Ru(IV) присутна у случају дејстава неких редукционих (глутатион или аскорбат) или оксидационих средстава (H₂O₂ или O₂). У свим поменутим оксидационим стањима рутенијум гради комплексе октаедарске геометрије. Поред тога, Ru(II) јон може да гради карактеристичне комплексе псеудо-октаедарске геометрије, тзв. "piano-stool" комплекси.

Ru(II) јон и Ru(III) јон знатно се разликују у неким хемијским карактеристикама, као што су твдо-меке особине, реактивност, инертност, понашање у магнетном пољу и др. Док је Ru(II), који има попуњене све три $(t_{2g})d$ орбитале, дијамагнетичан, Ru(III) са једним неспареним електроном у $(t_{2g})d$ орбитали показује парамагнетична својства. Даље, Ru(II) спада у "меке" киселине и има π -донорске особине, док се Ru(III) понаша као "тврда" киселина и има π -акцепторске особине. У погледу реактивности комплекси Ru(III) инертнији су у поређењу са својим Ru(II) аналозима. Због тога је професор Clark, након дугогодишњег проучавања биолошке активности комплекса рутенијума са својим сарадницима, предложио механизам "активације редукцијом" (Слика 1.1.1.). По овом механизму у физолошким условима најпре се врши супституција хлоридо лиганда молекулима воде, када се добија метаболит који се лакше везује за биолошке мете, а затим и координација глутатиона, који је одговоран за редукцију [Ru^{III} (NH₃)₅GSH] до [Ru^{II} (NH₃)₅GSH]. Овако добијени комплекси остају непромењени све док не доспеју до туморског ткива, које одликује нижи садржај кисеоника и нижа pH вредност, али и повећан садржај глутатиона, што погодује процесу оксидације. Овакав начин активације поспешује селективност, што је довело до значајних резултата приликом примене комплекса рутенијума у лечењу тумора отпорних на радио- и хемиотерапију.



Слика 1.1.1. Clark-ов механизам активације котплекса рутенијума(III) редукцијом.

1.2. Примена комплекса рутенијума као антитуморских агенаса

У циљу проналаска комплекса прелазних метала који би показали бољу активност, већу селективност, али и мању резистентност и токсичност у односу на цисплатину, комплекси рутенијума истакли су се као најперспективнија алтернатива.

Први комплекс рутенијума који је синтетисан по узору на цисплатину био је *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃] (Слика 1.2.1.). Синтетисао га је 1980. године Clark са својим сарадницима. Овај амински комплекс рутенијума показао је бољу активност од цисплатине у случају леукемије Р388. Велике потешкоће у примени овог комплекса изазвала је његова слаба растворљивост у води, а самим тим и у физиолошком раствору, због чега никада није нашао фармаколошку примену.^{1, 2}



Слика 1.2.1. Структуре потенцијално активних комплекса рутенијума.

Пар година касније, 1984. године, Mestroni је са својим тимом сарадника синтетисао два изомера, *cis-* и *trans-*[RuCl₂(dmso)₄] (Слика 1.2.1.). Поменути тим научника детаљно је проучавао антитуморску активност ових комплекса *in vitro* и *in vivo*. У циљу утврђивања способности изомера да замене цисплатину, проучавана је ефикасност у лечењу чврстих метастазирајућих тумора плућа миша, а добијени резултати поређени су са резултатима добијеним за цисплатину. Испитивани комплекси показали су се веома ефикасним у дејству на метастазе рака плућа, при чему је *cis-*изомер показао активност од 46-52%, док је *trans-*изомер показао ефикасност од 57-71%. Проучавани комплекси показали су такође мању токсичност и већу селективност у односу на комплекс цисплатине. Испитан је и учинак ових комплекса у постоперативном току лечења код мишева којима је оперативно уклоњен примарни тумор плућа, уз изненађујуће добре резултате. Наиме, утврђена је способност пролонгације животног века испитиваних мишева применом оба изомера, у поређењу са мишевима који нису третирани. Уједно, цисплатина није показала овакву ефикасност у постоперативном делу лечења оболелих мишева.^{3,4}

Керрler је са својим истраживачким тимом, 90-их година прошлог века, синтетисао комплекс [Na]*trans*-[RuCl₄ (Im)(dmso-S)], назван NAMI,^{5,6,7} који је због слабе растворљивости у води врло брзо замењен имидазоловом сољу [ImH]*trans*-[RuCl₄(Im)(dmso-S)], познатом као NAMI-A (Слика 1.2.2.). За разлику од првог комплекса који је веома брзо хидролизовао, увођењем имидазола добијено је једињење које се одликује већом стабилношћу и низом других погодних карактеристика. Наиме, NAMI-A комплекс показао је ефикасност у лечењу чврстих метастазирајућих тумора *in vivo*. Након дугог преклиничког испитивања, 1999. године комплекс NAMI-A улази у фазу I клиничких испитивања на холандском институту за канцер у Амстердаму, чиме постаје прво једињење рутенијума које је доспело до ове фазе испитивања. NAMI-A показао се ефикасним након тестирања код 24 пацијената, уз одсуство токсичности чак и након прекорачења максималних дневних доза (300 mg/m²/дан).

У току 2003. године у фазу I клиничких испитивања доспео је још један комплекс синтетисан од стране Керpler-ове групе, комплекс КР1019 (Слика 1.2.2.).^{8,9} Овај комплекс показао је добру активност према туморима резистентним на цисплатину, а мању токсичност, што га је учинило веома атрактивним у погледу клиничке примене. Претпоставља се да овако добре особине овог Ru(III) комплекса потичу од његове способности интрацелуларне трансформације у активну Ru(II) форму.

Круцијална ствар у разумевању дејства неког лека јесте познавање начина транспорта до места деловања, због чега је велика пажња научне јавности била усмерена на проучавање механизма транспорта комплекса рутенијума до места терапеутске примене.

За КР1019 утврђена је зависност стабилности комплекса од температуре и pH вредности. Поменути комплекс је јако стабилан у води на собној температури, док у физиолошким условима (pH 7,4 и температура 37 °C) брже хидролизује.¹⁰ Овај комплекс, као и NAMI, замењен је својом натријумовом сољу КР1339, који је показао значајно бољу растворљивост.



Слика 1.2.2. Структурне формуле комплекса Ru(III): [Him]trans-[RuCl₄(im)(dmso-S)] или NAMI-A (лево), [Hind]trans-[RuCl₄(ind)₂] или KP1019 (десно)

Велики број ревијалих радова публикован након открића ових комплекса описује њихово понашање од уношења у организам до места деловања. На путу свог деловања комплекси наилазе на велики број једињења са атомима азота и/или сумпора у свом саставу, као што су протеини крвне плазме или трансферин.^{11,12} Детаљним испитивањем утврђено је присуство јаке везе при формирању Ru(III)-протеин адукта.^{13,14,15} Публиковане су и важне информације о везивању комплекса за транспортни протеин гвожђа, трансферин (Tf), који везује рутенијум и преноси га до површине тумора, где захваљујући великом броју трансфериниских рецептора бива лако унет у ћелију. Овакав олакшан транспорт јако је важан за сваки лек, с обзиром да примена лека тј. његова активност у ћелији тумора у великој мери зависи од ћелијског транспорта. Када Ru-Tf адукти доспеју у ћелију комплекси Ru(III) се ослобађају и наступа претходно поменута активација редукцијом.

1.3. Арена рутенијум(II) комплекси

Велика пажња у овој области истраживања била је усмерена и на органометалне Ru(II) арена комплексе опште формуле [(η^6 -arene)Ru(XY)Z], где је агеп бензен или дериват бензена, XY бидентатни лиганд (*N*,*N*-, *N*,*O*- или *O*,*O*- хелатни лиганд), док је лабилни лиганд Z најчешће халоген (Слика 1.3.1.). Овакви комплекси, познатији као "half-sandwich", интензивно су испитивани у Sadler-овој групи.¹⁶



Слика 1.3.1. Структура Ru(II) арена комплекса

Детаљније проучавање повезаности активности и структуре арена комплекса показало је највећу активност једињења које поседује етилендиамин као хелатни лиганд (ХҮ) и хлорид као лабилан лиганд (L). Наиме, управо је комплекс [(η^6 -aren)Ru(en)Cl][PF₆] показао значајну активност према ћелијским линијама A2780 (карцинома јајника) у *in vivo* условима.^{17,18} Испитивана је антитуморска активност комплекса као што су [(η^6 -*p*-cimen)Ru(en)Cl]⁺, [(η^6 -*p*-cimen)Ru(en)I]⁺, [(η^6 -bifenil)Ru(en)Cl]⁺ и [(η^6 -bifenil)Ru(en-Et)Cl]⁺ (Слика 1.3.2.), и за сваки је потврђена активност према A2780 ћелијској линији тумора са IC₅₀ вредностима између 6–9 µM, у поређењу са клинички примењеном карбоплатином (6 µM) (Табела 1.3.1.). Рутенијум комплекс [(η^6 -tetrahidroantracen)Ru(en)Cl]⁺ показао је највећу активност сличну цисплатини (0,6 µM).¹⁹ Наиме, цитотоксичност испитиваних комплекса расте следећим редоследом: бензен < *p*-цимен < бифенил < дихидроантрацен < тетрахидроантрацен. Може се закључити да са повећањем величине прстена координованог арена лиганда, односно са повећањем хидрофобности арена лиганда, расте и цитотоксичност комплекса.



Слика 1.3.2. Структурне формуле Ru(II) комплекса са различитим арена лигандима.

Табела 1.3.1. IC₅₀ вредности Ru(II) арена комплекса [(η^6 -aren)Ru(X)(Y)Cl]A [A = PF₆⁻ за позитивно наелектрисане комплексе], карбоплатине и цисплатине у A2780 ћелијама тумора јајника након 24 h излагања леку.¹⁹

Арен/Ru комплекс	X	Y	IC50 (µM)
р-цимен	CH ₃ CN	CH ₃ CN	> 100
р-цимен	Cl	Изоникотинамид	> 100
C ₆ H ₅ CO ₂ CH ₃	en		56
бензен	en		17
р-цимен	en		10
Карбоплатина			6
бифенил	en-Et		6
бифенил	en		5
дихидроантрацен	en		2
Цисплатина			0,6
тетрахидроантрацен	en		0,5

Комплекси опште формуле $[(\eta^6\text{-cimen})\text{Ru}(X)(Y)(Z)]$, са три монодентатна лиганда у својој структури (X, Y, Z = халогенид, ацетонитрил, изоникотинамид) не показују активност према A2780 ћелијским линијама.²⁰

Механизам дејства комплекса цисплатине од давнина је познат. Он се заснива првобитно на супституцији хлоридо лиганда молекулом воде, при чему се добија знатно реактивнија аква врста комплекса. Познавање механизма дејства комплекса у великој мери олакшало је синтезу нових комплекса прелазних метала. С тога увиђамо важност разумевања и механизма деловања комплекса рутенијума након њихове апликације. Када се Ru(II) арена комплекси нађу у организму долази до супституције лабилног хлоридо лиганда молекулима воде, при чему се у зависности од pH вредности добијају Ru-H₂O или Ru-OH врсте. Ru-OH врсте су мање пожељне, јер се одликују отежаном супституцијом неким од биомолекула. Испитивања су показала да се комплекси [$(\eta^6$ -bip)Ru(en)H₂O]²⁺, [$(\eta^6$ -dha)Ru(en)H₂O]²⁺ и [$(\eta^6$ -tha)Ru(en)H₂O]²⁺, чије су р K_a вредности 7,71; 7,89 и 8,01, налазе у екстрацелуларној течности где је присутна већа концентрација хлорида (104 mM) у мање активном хлоридо облику, док су при нижим концентрацијама хлорида у интрацелуларној течности (4–25 mM) присутни у активном аква облику. Такође, високе р K_a вредности аква комплекса указују и на постојање евентуалне мале количине Ru-OH врсте у ћелији.

Како је за антитуморску активност цисплатине одговорна интеракција са DNA молекулом, који је уједно и главна мета, од велике важности било је проучавање интеракција и Ru(II) арена комплекса са фрагментима DNA. Из поменутих разлога испитивана је активност [(η^6 -aren)Ru(II)(en)X] комплекса (en = етилендиамин, aren = бифенил (Bip), тетрахидрофуран (THF), дихидроантрацен (DHA), *p*-цимен (cym) или бензен (Ben), X = Cl-, H₂O) са фрагментима DNA.²¹ Испитивања су показала да се Ru(II) координује за азотове атоме пуринских и пиримидинских база, или за 5'-фосфатну групу. Прецизније, I (инозин) и T (тимин) деривати координију се преко *N1* у случају 5'-IMP или инозина, или *N3* у случају 5'-TMP и тимидина, док се деривати G (гуанин), A (аденин) и C (цитозин) координују углавном преко *N1* или *N7* азотовог атома. Потврђена је највећа реактивност у погледу формирања монофункционалних производа преко *N7* атома гуанина, затим *N7* и *N1* инозина, *N3* тимидина, слабије везивање за *N3* цитидина, док је везивање за аденозин мало заступљено. Овакав начин везивања потврђен је и од стране других истраживачких група.¹⁷

Још једну групу органометалних Ru(II) комплекса представљају комплекси опште формуле $[(\eta^{6}\text{-}aren)\text{RuX}_{2}(\text{pta})]$, који у својој структури поседују pta = 1,3,5-триаза-7-фосфатрицикло[3,3,1,1]декан, познатији као RAPTA комплекси (Слика 1.3.3.) синтетисани од стране Dyson-ове групе.²² Коришћењем серије лиганада за aren = *p*-цимен, толуен, бензен, бензо-15-круна-5, 1-етилбензен-2,3-

диметилимидазолију-тетрафлуороборат, етил-бензен, хексаметилбензен, као и за pta = 1,3,5-триаза-7фосфатрицикло[3,3,1,1]декан или његових метил деривата, добијени су комплекси различитих антитуморских особина.²³ Слично као NAMI–A, ови комплекси имају антиметастатско дејство, које је мање ефикасно, али селективно према метастазама.



Слика 1.3.3. Структура RAPTA комплекса

Недавно су синтетисана три нова Ru(II) арена комплекса [Ru(η^6 -*p*-суm)(L¹)Cl₂] (**Ru1**), где је L¹ = N-((4-метосифенил)карбамотиол)бензамид; [Ru(η^6 -*p*-суm)(L²)Cl₂] (**Ru2**), где је L² = 4-(3-бензоилтиоуреидо)бензоева киселина и [Ru(η^6 -*p*-суm)(L³)Cl₂] (**Ru3**), где је L³ = метил-4-(3-безоилтиоуреидо)бензоет (Слика 1.3.4.), и испитана је њихова антибактеријска и антитуморска активност. Ови комплекси показали су изненађујуће добру активност према ћелијским линијама HeLa (карцином грлића материце) са IC₅₀ вредностима у опсегу од 29,68 до 52,36 µM, при чему се најактивнијим показао комплекс [Ru(η^6 -*p*-суm)(L¹)Cl₂] (**Ru1**) са IC₅₀ вредношћу 29,8. Комплекси су показали бољу активност и у односу на лиганде, осим у случају комплекса **Ru2** чија је IC₅₀ вредност јако слична IC₅₀ вредности лиганда. За испитивање антибактеријске активности Ru(II) арена комплекса и лиганада коришћене су грам-позитивне и грам-негативне бактерије, као и гљивица *Candida albicans*. Детектована минимална концентрација неопходна за инхибицију креће се у опсегу од 62,5 µg/ml код третирања гљивице до 1000 µg/ml код примене на бактеријама.²⁴



Слика 1.3.4. Струтктурна формула Ru(II) арена комплекса.

Сазнањем да инхибитори поли(ADP-рибоза)полимеразе-1(PARP-1) показују невероватну активност према BRCA-мутираним туморима, група професорке Grgurić-Šipka дошла је на идеју да

искористи поменута једињења за синтезу нових комплекса. Наиме, сам PARP ензим укључен је у веома важне процесе у организму, као што су репарација DNA ланца, регулација транскрипције и ћелијска смрт. Поменута група научника користила је деривате прве генерације PARP инхибитора, 3-аминобензамид (3-AB), 2-амино-4-метилбензамид (L1) и 3-амино-N-метилбензамид (L2) у циљу добијања једињења која би деловала на DNA и инхибирала PARP ензим. Добијена су четири комплекса рутенијума: **Ru4** [(η^6 -toluen)Ru(L1)Cl]PF₆, **Ru5** [(η^6 -p-cym)Ru(L1)Cl]PF₆, **Ru6** [(η^6 -toluen)Ru(L2)Cl₂] и **Ru7** [(η^6 -p-cym)Ru(L2)Cl₂] (Слика 1.3.5). Утврђена је највећа антипролиферативна активност **Ru4** комплекса према HCC1937, MDA-MB-231 и MCF-7 ћелијским линијама карцинома дојке. Комплекс **Ru4** показао је највећу интрацелуларну акумулацију, могућност препознавања потенцијалних мета, као и велику ефикасност везивања за DNA.²⁵



Слика 1.3.5. Схематски приказ синтезе комплекса Ru4-Ru7.

Раније је синтетисана серија нових Ru(II) арена комплекса опште формуле [(η^6 -*p*-суm)Ru(L)Cl₂], где је L = 3-ацетилпиридин, 4-ацетилпиридин, 2-амино-5-хлоропиридин, изоникотинска или никотинска киселина, и [(η^6 -*p*-суm)Ru(HL)Cl], где је HL = 2,3-пиридин-, 2,4-пиридин-, 2,5-пиридин- и 2,6-пиридин-дикарбоксилат (Слика 1.3.6.).²⁶ Ови комплекси показали су ниску цитотоксичност на неколико испитиваних туморских ћелијских линија. Уочено је да је замена различито супституисаних пиридинских лиганада помоћу анјона пиколинске киселине, при чему настаје комплекс [(η^6 -*p*-суm)Ru(pico)Cl], довела до повећане антипролиферативне активности овог комплекса.^{27,28}



 $\begin{array}{lll} L^1, 1: & R_2, R_4, R_5, R_6 = H; R_3 = {\rm COCH}_3 \\ L^2, 2: & R_2, R_3, R_5, R_6 = H; R_4 = {\rm COCH}_3 \\ L^3, 3: & R_2 = {\rm NH}_2; R_3, R_4, R_6 = H; R_5 = {\rm Cl} \\ {\rm HL}^4, 4: & R_2, R_3, R_5, R_6 = H; R_4 = {\rm COOH} \\ {\rm HL}^5, 5: & R_2, R_4, R_5, R_6 = H; R_3 = {\rm COOH} \\ {\rm H}_2L^6, 6: & R_2, R_3 = {\rm COOH}; R_4, R_5, R_6 = H \\ {\rm H}_2L^7, 7: & R_2, R_4 = {\rm COOH}; R_3, R_5, R_6 = H \\ {\rm H}_2L^8, 8: & R_2, R_5 = {\rm COOH}; R_3, R_4, R_6 = H \\ {\rm H}_2L^9, 9: & R_2, R_6 = {\rm COOH}; R_3, R_4, R_5 = H \end{array}$

Слика 1.3.6. Структурне формуле а) лиганада; б) комплекса са монодентатно везаним лигандом *Ru8-Ru12*; ц) комплекса са бидентатно везаним лигандом *Ru13-Ru16*. ²⁶

У току 2020. године синтетисани су $Ru(II)-\eta^6$ -*p*-сітеп комплекси опште формуле [$Ru(\eta^6$ -*p*-сітеп)(L1)Cl] и [$Ru(\eta^6$ -*p*-сітеп)(L2)Cl], који у својим структурама садрже Schiff-ове базе, тачније деривате 3-аминохинона, L1 = 2-хидрокси-бензалдехид (**Ru17**) и L2 = 2-хидрокси-нафталдехид (**Ru18**) (Слика 1.3.7.).



Слика 1.3.7. Структурне формуле комплекса [$Ru(\eta^6$ -p-cimen)(L1)Cl](Ru17) и [$Ru(\eta^6$ -p-cimen)(L2)Cl](Ru18).

Ови комплекси показали су се веома делотворним према агресивном тумору мозга, који је карактеристичан по високој резистентности на иначе примењиване поступке лечења. Активност комплекса проучавана је *in vitro* на ћелијским линијама тумора мозга (LN229) и нормалним ћелијама фибробласта (L929) помоћу МТТ теста. Добијени резултати упоређени су са резултатима за цисплатину. Комплекс **Ru17** показао се делотворнијим са ~75% успешности у инхибирању ћелијског раста, али и селективнијим у односу на цисплатину. Добијени резултати *in vitro* испитивања, IC₅₀ вредности и индекси селективности приказани су у Табели 1.3.2.²⁹

Табела 1.3.2. IC50 вредност и индекс селективности (S.I.) комплекса Ru17 и Ru18 у случају ћелијских
линија тумора мозга (LN229) и здравих ћелија фибробласта миша (L929). ²⁹

Комплекс	F	ku17		Ru18
Ћелијска линија	$IC_{50}(\mu M)^a$	S.I. ⁶	$IC_{50}(\mu M)^a$	S.I. ⁶
LN229	$22,8 \pm 1,5$	3,0	$21,7 \pm 1,5$	2,0
LN929	$68,5\pm0,7$	-	$44,0\pm0,3$	-

^a Концентрација изражена у μM након излагања дејству комплекса у периоду од 24 h ⁶ Индекс селективности (S.I.) за комплексе **Ru17** и **Ru18** након периода инкубације од 24 h

1.4. Рутенијум полипиридил комплекси

У жижи интересовања, након претходно поменутих комплекса рутенијума, убрзо су се нашли комплекси рутенијума са лигандима који садрже хетероаромате, тачније тзв. полипиридил комплекси.

Прва директна веза између интеракције полипиридилских Ru(II) комплекса са DNA и цитотоксичности комплекса долази од Brabec-а и његовог тима сарадника.³⁰ Међу три полипиридилска комплекса [Ru(tpy)(bpy)Cl]Cl, *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂] и *mer*-[Ru(tpy)Cl₃] својом активношћу према различитим туморским ћелијским линијама нарочито се истакао комплекс *mer*-[Ru(tpy)Cl₃] (Слика 1.4.1.). За цитотоксичну активност *mer*-[Ru(tpy)Cl₃] комплекса сматра се одговорним везивање за N7 атом два деривата гуанина у *trans* положају на супротним ланцима DNA. Унакрсно везивање металокомплекса за DNA ланац раније је потврђено код цисплатине, што је истраживања у области рутенијум полипиридил комплекса учинило нарочито актуелним.^{31,32}

Изненађујуће разлике у активности показала су три изомерна дихлоро-полипилиридилрутенијум(II) комплекса, α -, β - и γ -[Ru(azpy)₂Cl₂] (аzpy= 2-фенилазопиридин) тестирањем на различитим ћелијским линијама, као што су MCF-7 (карцином дојке), EVSA-T (карцином дојке), WIDR (карцином дебелог црева), IGROV (карцином јајника), M19 (карцином јајника), A498 (карцином бубрега), H266 (карцином плућа мушкарца) и A2780 (карцином јајника).^{33,34,35} Највећу активност према серији ћелијских линија тумора показао је α -[Ru(azpy)₂Cl₂] (Слика 1.4.1.), због како се претпоставља два хлоридо лиганда у *cis*-положају која могу бити супституисана атомима азота из молекула DNA, аналогно везивању цисплатине. Да би се ова хипотеза потврдила дизајнирани су *tris*-Ru(II) комплекси са азот-донорским лигандима [RuL₃][PF₆]₂ и [RuL₂L["]][PF₆]₂ (L = 2-фенилазопиридин или *о*-толилазопиридин, L' =2-фенилазопиридин и L'' = bpy), који у својој структури не поседују два хлоридо лиганда у *cis*-положају. Изненађујуће, комплекси *mer*-[Ru(azpy)₃][PF₆]₂ и *mer*-[Ru(tazpy)₃][PF₆]₂ показали су високу цитотоксичну активност на серији испитаних ћелијских линија А498, H226 (карцином плућа), EVSA-T, M19, IGROV, WIDR и MCF-7. Овакво откриће потиснуло је претходне тврдње и указало на потпуно другачији механизам деловања комплекса рутенијума као потенцијалних антитуморских агенаса.



Слика 1.4.1. Структурне формуле Ru(II) полипиридил комплекса који су показали добра цитотоксична својства, azpy = 2-фенилазопиридин, tpy = 2,2',6',2''-терпиридин

Рутенијум полипиридил комплексе одликује слаба растврљивост у воденом раствору, што у великој мери ограничава њихову примену. С тога је прва тежња научника управо била добијање полипиридил комплекса растворних у води. Примећена је већа активност комплекса меридијалне геометрије у односу на комплексе са фацијалном, због чега су међу првима проучавани комплекси са терпиридином, који су искључиво меридијални изомери.^{30,36,37} Тако су синтетисани нови комлекси рутенијума опште формуле [Ru(L₃)(chel)(X)][Y]_n, где је L₃ = tру или 4'- супституисани tру (4'-хлоро-2,2':6',2''-терпиридин (Cl-tpy) или 4'-(4-хлорофенил)-2,2':6',2''-терпиридин (Cl-Ph-tpy)), chel = бидентатни хелатни лиганд (N-N = en, dach, bpy, phen, o-bqdi или N-O = pic), X = монодентатни лиганд (Cl или dmso-S), Y = Cl, PF₆ или CF₃SO₃, a n број јона у спољашњој сфери који зависи од природе хелатног лиганда (chel) или монодентатног лиганда (X). Структуре синтетисаних комплекса приказане су на Слици 1.4.2.^{38,39,40}



Слика 1.4.2. Схематски приказ комплекса Ru19-Ru35.

Тестиран је цитотоксични потенцијал Ru(II)-tpy комплекса, **Ru19-Ru35** према четири ћелијске линије изоловане из хуманих карцинома, MCF-7 (канцер дојке), HeLa, HCT116 (карцином дебелог црева) и А549 (карцином плућа), ћелијској линији карцинома дебелог црева миша CT26, као и према здравој ћелијској линији изолованој из фибробласта плућа MRC-5. Добијене IC₅₀ вредности сумиране су у Табели 1.4.1. Својом активношћу издвојили су се комплекси **Ru27** (bpy), **Ru28** (phen) и **Ru29** (*o*-bqdi).

Комплекс **Ru28** показао се цитотоксичним према MCF-7 и A549 ћелијским линијама током периода инкубације од 72 h. Такође, комплекс **Ru29** довео је до значајног смањења вијабилности MCF-7, A549 и HeLa ћелија. Испитивани комплекси нарочито су се истакли активношћу према MRC-5 ћелијама, чиме је утврђена њихова селективност према различитим туморским ћелијским линијама. Комплекси **Ru28** и **Ru29** показали су смањење односа два протеина Bcl-2/Bax, што доводи до отпуштања цитохрома C од стране митохондрија, који проузрокују активацију каспазе-3 и покрећу апоптозу. Коначно, у поређењу са Cl-tpy ⁴¹ и Cl-Ph-tpy ⁴² аналозима, који поседују алифатичне диамине као хелатне лиганде (еп или dach), комплекси рутенијума **Ru27-Ru29** са ароматичним хелатним лигандима показују значајно већу активност према тестираним ћелијским линијама.⁴²

На основу претходних резултата увидео се значај присуства ароматичних лиганада у структури Ru(II) комплекса на њихову цитотоксичну активност. Штавише, испитиван је утицај природе меридијалног терпидина у структури комплекса. Наиме, увођењем хлоро-фенил-групе (Cl-Ph-tpy) у структуру самог терпиридина добијени су Ru(II) комплекси знатно побољшаних антитуморских особина. Међу поменутим комплексима утврђена је спорија хидролиза комплекса **Ru27-Ru29** (bpy, phen или o-bqdi) у односу на комплексе **Ru25** (en) и **Ru26** (dach), што је супротно претходно добијеним резултатима за комплексе који у својој структури имају Cl-tpy лиганд, **Ru22-Ru24**, чија је активност повезивана са постојањем аква облика. Занимљива је чињеница да су ови комплекси показали своју активност упркос слабо доступном месту за координацију, што је последица присуства волуминозног терпиридина. Резултати су у супротности са претходно добијеним резултатима за "half-sandwich" једињења.^{17,43,44,40}

Даље, доказано је да присуство лиганада код којих изостаје могућност грађења водоничне везе (bpy, phen и bqdi у комплекскима **Ru27**, **Ru28** и **Ru29**) није повезано са смањењем цитотоксичности комплекса. Комплекси **Ru27-Ru29** показали су одличну цитотоксичну активност, која је повезана са њиховом хидрофобношћу, односно са увођењем липофилних лиганада у структуру комплекса (Табела 1.4.1.) Комплекс **Ru28** са највишом липофилношћу (log Po/w = 1,13) показао је највећу активност према тестираним ћелијским линијама (IC₅₀ = 4,6 μ M).³⁹ Ови резултати у складу су са резултатима добијеним од стране Sadler-ове групе, који су такође проучавали везу између цитотоксичности и липофилности арена у структури комплекса.¹⁹

	IC50 [µM]							
	HeLa	A549	MCF-7	HCT116	CT26	MRC-5	$\log P_{o/w}$	Реф
Ru21	> 100	>100	-	-	-	-	-1,1	19
Ru22	71,3	> 100	-	66,3	32,8	86,7	-1,33	45
Ru23	> 100	> 100	-	84,4	72,8	> 100	-1,45	45
Ru24	> 100	> 100	-	> 100	> 100	> 100	-1,1	45
Ru25	84,9	> 100	-	-	-	> 100	0,27	46
Ru26	96,3	> 100	-	-	-	> 100	0,20	46
Ru27	12,7	53,8	-	-	-	97,7	0,39	46
Ru28	75,5	4,6	13,8	-	-	192,6	1,13	40
Ru29	6,4	21,7	4,6	-	-	238,1	-1,14	40

Табела 1.4.1. IC₅₀ вредности комплекса Ru21–Ru29.

1.4.1. Хидролиза рутенијум(II) полипиридил комплекса

Проучавањем реакција Ru(II)-терпиридил комплекса $[Ru(L_3)(N-N)C1]^+$ (L₃ = Cl-tpy или Cl-Ph-tpy; N-N = en, dach или bpy)^{39,46} установљено је да комплекси који у својој стуктури имају еп и dach, Ru36, Ru37, Ru39 и Ru40, хидролизују брже од bpy аналога, Ru38 и Ru41. Лабилност хлоридо лиганда у металокомплексима са алифатичним аминима у структури може се објаснити trans утицајем σ -донора, као што су еп и dach, док је bpy π -акцептор. Претходно поменути Ru-(Cl-Ph-tpy) комплекси ca phen (Ru42) и bqdi (Ru43) релативно су инертни, а њихове аква врсте формирале су се после 3 (Ru42) и 10 h (**Ru43**).⁴⁰ Доказано је да увођење хлоро-фенил супституента у 4'-положај терпиридина није значајно утицало на процес хидролизе. Комплекси **Ru39** и **Ru40** показали су нешто бржу хидролизу у односу на Ru-(Cl-tpy) аналоге **Ru36** и **Ru37** (Табела 1.4.2.1.).^{39,46} Због потенцијалног значаја хидролизе у постизању биолошке активности комплекса, одређене су рКа вредности аква комплекса Ru36aq -**Ru38aq**.³⁹ Поређењем р K_a вредности (10,50 ± 0,03; 10,26 ± 0,02 и 9,56 ± 0,01 за **Ru36aq**, **Ru37aq** и Ru38aq) закључено је да депротонација молекула воде зависи у великој мери од природе хелатног лиганда у структури комплекса. Очигледно је да и близина ароматичног bpy лиганда чини аква лиганд у $[Ru(Cl-tpy)(bpy)OH_2]^{2+}$ (**Ru38aq**) више киселим, док су р K_a вредности добијене за преостале две аква врсте сличне. Битно је напоменути да у физолошким условима (pH=7,4) мала количина Ru-tpy комплекса (< 1% укупне количине) може постојати у облику мање реактивних хидроксо-врста, тј. $[Ru(Cl-tpy)(N-N)OH]^+).$

1.4.2. Интеракције са дериватима гуанина и DNA

DNA је потврђена као једна од примарних мета комплекса јона прелазних метала који су дизајнирани као потенцијални антитуморски агенси. С тога је од велике важности познавање интеракција Ru(II) комплекса са нуклеинским базама, нуклеозидима и нуклеотидима као основним конституентима DNA ланца.^{30,47} Исптивањем интеракција Ru(II)-tpy комплекса са дериватима гуанина, применом UV-Vis и NMR спектроскопије, утврђено је да се комплекси **Ru36-Ru43** искључиво везују за N7 атом 9MeG и 5'-GMP (Схема 1.4.2.1.), уз доказану зависност брзине реакције од природе хелатног лиганда. Тако комплекси **Ru36, Ru37, Ru39** и **Ru40**, у којима је хелатни лиганд алифатични диамин, реагују знатно брже у односу на њихове аналоге **Ru38** и **Ru41** са ароматичним bpy лигандом.^{39,42} Ова разлика у брзини реакције може бити последица стерних сметњи у близини металног центра узрокованих волуминозним Cl-tpy, Cl-Ph-tpy или bpy лигандима током формирања прелазног стања са координационим бројем 7 у току асоцијативног механизма.

Даље, утврђено је да брзина реакције зависи и од величине инертног бидентатног лиганда, јер комплекс **Ru43** са ароматичним диимином (*o*-bqdi) реагује брже од комплекса **Ru42** са фенантролином (phen).⁴⁰ Осим величине, и природа хелатног лиганда има велики утицај на реактивност меридијалних комплекса, што је показано на примеру N-N бидетатног лиганда који је у *trans*-положају.

Константа брзине реакције комплекса **Ru43**, k_2 , са 5'-GMP је неколико пута већа у односу на константе добијене за аналоге **Ru36**, **Ru37**, **Ru39** и **Ru40**.^{39,42} Јасно је да ароматичност има утицај на брзину супституције поменутих комплекса са терпиридином у структури. Тако комплекс **Ru42** са фенантролином реагује 2,5 пута брже од комплекса **Ru41** који поседује бипиридин као бидентатни лиганд, што је последица већег броја π -акцептора тј. ароматичних прстенова у структури фенантролина.⁴⁸ Боље π -акцепторске особине хелата у структури комплекса **Ru42** узрок су смањене електронске густине на централном јону метала и брже измене координоване воде молекулом 5'-GMP. Изменама у структури терпиридина, односно додавањем различитих функционалих група може се утицати на јачину интеракција комлекса са биомолекулима, што је и доказано увођењем хлорофенил групе у положају 4'-терпиридина.



Схема 1.4.2.1. Интеракције Ru(II) комплекса **Ru36-Ru43** са дериватима гуанина 9-MeG и 5'-GMP у воденом раствору.

У реакцијама супституције са 5'-GMP, Ru-(Cl-tpy) комплекси **Ru36-Ru38** показали су мање вредности константе брзине $k_2 (0,15 - 0,71 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})^{39}$ од њихових Ru-(Cl-Ph-tpy) аналога **Ru39-Ru43** ($k_2 = 0,35 - 1,2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).^{40,42} Хлоро-фенил групе у 4'-позицији терпиридина имају способност привлачења електронске густине ка себи, чиме смањују електронску густину и на самом јону метала, што проузрокује повећану реактивност комплекса **Ru39-Ru43** у поређењу са аналогним комплексима без додатног супституента у положају 4'-терпиридина.

1 аоела	1.4.2.1.	константа	орзине	реакције	И	активациони	параметри	3a	реакције	cyncr	итуције
комплек	cca Ru36	-Ru43 ca 9-1	MeG и 5	-GMP на 🤅	310) K.					

	k ₂ [10 ⁻¹ M ⁻¹ s ⁻¹]	$\Delta H_2^{\neq} [kJmol^{-1}]$	$\Delta S_2^{\neq} \left[JK^{-1}mol^{-1} \right]$	Реф.
Ru36				
5'-GMP	$4,7 \pm 0,3$	69 ± 3	-45 ± 10	39
9-MeG	$1,3 \pm 0,1$	_	_	39
Ru37				
5'-GMP	7.1 ± 0.2	51 ± 3	-101 ± 9	39
9-MeG	3.1 ± 0.2	_	_	39
Ru39	,			
5'-GMP	$5,3 \pm 0,3$	_	_	39
Ru40				
5'-GMP	$7,5 \pm 0,4$	46 ± 6	-114 ± 18	42
Ru41				
5'-GMP	$3,\!4 \pm 0,\!2$	—	_	42
Ru42				
5'-GMP	$8,7\pm0,5$	_	_	40
Ru43				
5'-GMP	$12,0 \pm 0,6$	48 ± 4	-108 ± 12	40

За групу [Ru(Cl-tpy)(N-N)Cl]⁺ комплекса испитане су и интеракције са моделима нуклеотида. Применом ¹Н и ³¹P NMR спектроскопије праћено је везивање комплекса **30** са аденозин-5'монофосфатом (5'-AMP), као и конкурентно везивање за 5'-GMP и 5'-AMP.³⁹ Испитивани комплекс показао је већу тенденцију везивања за 5'-GMP, уз формирање производа [Ru(Cl-tpy)(en)(5'-GMP-N7)] везивањем за N7 атом гуанозин-5'-монофосфата. Оваква тенденција везивања за 5'-GMP, радије него за 5'-AMP, била је позната,³⁶ а сматра се последицом формирања пурин-терпиридин и пуринбипиридин/фенантролин хидрофобних интеракција, које су мање заступљене у случају формирања Ru-N7-аденин производа. Ова појава се објашањава одбојним силама C6-NH₂ остатка у аденину, који је ортогонално орјентисан према π облацима tру или bру лигандима, приликом приближавања Ru(II) јону. Слични резултати забележени су и у оквиру Sadler-ове групе у случају антитуморских [Ru(η^6 -arene)(en)Cl]⁺ комплекса.^{49,50}

Иако се фармаколошка мета већине комплекса рутенијума не може са сигурношћу прецизирати, претпоставља се да су цитотоксични ефекти повезани са њиховом способношћу везивања за DNA.^{51,52} Да би се утврдила способност везивања комплекса Ru36, Ru37, Ru39-Ru43 са DNA и да се дефинише начин везивања, поменути комплекси су инкубирани, а затим помешани са DNA. На тај начин формирани производи су проучавани применом UV-Vis и флуоресцентне спектроскопије, као и мерењем вискозности.^{40,45,46} Како тестирани комплекси поседују лиганд са интеркалационим потенцијалом (Cl-tpy or Cl-Ph-tpy) и лако одлазећи лиганд, они показују тенденцију везивања за DNA кроз оба начина везивања. (Слика 1.4.2.1.). Тачније, комплекси Ru36, Ru37, Ru39 и Ru40, који поседују *N*-донорски хелатни лиганд, показују могућност грађења водоничних веза које додатно стабилизују формиран DNA-комплекс адукт. Добијене вредности константи везивања, које представљају квантитативно мерило јачине везивања, за комплексе Ru36, Ru37 и Ru39-Ru43 сумиране су у Табели 1.4.2.2., и указују на умерено до јако везивање за DNA. Константе везивања K_b добијене за полипиридил комплексе Ru36 и Ru37 знатно су мање у поређењу са вредностима добијеним за комплексе **Ru39-Ru41**, што је вероватно последица додатног супституента на терпиридину. Природа супституента у положају 4'-терпиридина (електрон донорске или акцепторске особине) утиче на електронску густину на јону метала и тиме директно утиче на начин везивања испитиваних комплекса, чиме се објашњава и повећана реактивност комплекса Ru39-Ru41. Највећу активност показују комплекси рутенијума који садрже Cl-tpy или Cl-Ph-tpy, а који су способни да отпусте монодентатни лиганд и да преко хелатних лиганада (en или dach) формирају јаку водоничну везу са дериватима Gua. Начин везивања комплекса Ru36-Ru40 повезан је са њиховом способношћу да се ковалентно вежу за DNA. Насупрот томе, комплекс Ru41, у коме је bpy у комбинацији са 4 ароматична прстена из Cl-Ph-tpy лиганда, је најактивнији, уз напомену да је у том случају интеркалација доминантан начин везивања.



Слика 1.4.2.1. Схематски приказ два могућа начина везивања Ru(II)-tpy комплекса за DNA молекул.

Комплекс	K _b [M ⁻¹]	Реф.
Ru36	$(1,0\pm 0,2)\times 10^5$	45
Ru37	$(2,1\pm0,1)\times10^4$	45
Ru39	$(1,0\pm 0,2)\times 10^{6}$	46
Ru40	$(2,8\pm0,1)\times10^{6}$	46
Ru41	$(9,0\pm 0,2)\times 10^{6}$	46
Ru42	$(1,9\pm0,2)\times10^4$	40
Ru43	$(3,0\pm 0,1) \times 10^4$	40

Табела 1.4.2.2. Константа везивања за DNA (*K*_b) одабраних Ru(II) комплекса.

1.4.3. Интеракције са аминокиселинама и протеинима

Осим DNA, многи комплекси рутенијума на путу остваривања своје антитуморске активности могу да реагују и са другим метама, као што је између осталог RNK.⁵³ Поред тога, прва испитивања на протеинима, као потенцијалним метама везивања, рађена су за комплексе KP1019 и KP1339.⁵⁴ Током преклиничких испивања RAPTA-C комплекси показали су значајан афинитет за два ензима, катепсин В и тиоредоксин редуктазу, који се из тог разлога могу сматрати метом комплекса рутенијума.⁵⁵

Последњих година забележена је експанзија литературних података о афинитету везивања Ru(II) једињења за протеине.^{40,54,55,56} Узимајући у обзир високу концентрацију транспортних протеина у крвној плазми, као и тенденцију лекова да се за исте вежу, медицинска хемија спознала је значај проучавања интеракције новосинтетисаних комплекса са протеинима, који учествују у њиховом

транспорту до места фармаколошке примене.⁵⁶ Познато је да након интравенозне примене једињења рутенијума бивају везана за хистидинске остатке на површини албумина и трансферина.^{57,58,59} Такође, од великог је значаја повезати активацију и деактивацију лека, као и транспорт, управо са интеракцијом протеин-комплекс (лек). Узимајући у обзир значај L-хистидина (L-His) као компоненте активних центара многих биолошких система, а између осталог ова аминокиселина улази у састав хема и каталитичког дела неких ензима,⁶⁰ испитиване су супституционе реакције претходно поменутих Ru(II) комплекса Ru36 и Ru37 са L-хистидином (L-His). Проучавање кинетике супституционих реакција указало је на значај природе хелатног лиганда у структури комплекса на брзину супституције лабилног лиганда L-хистидином. Резултати су показали да комплекс **Ru36** (en) pearyje два пута брже у односу на комплекс Ru37 (dach) (Табела 1.4.3.1.) Овакав исход је очекиван због позитивног индуктивног ефекта и стерних ефеката присутног циклохексана. Комбинација поменутих ефеката иницирала је мању реактивност комплекса Ru37 у односу на комплекс Ru36, најпре због смањене реактивности самог металног центра.⁶¹ Проучавањем механизма супституције применом ¹Н NMR спектроскопије утврђено је да се у најранијим фазама комплекси везују најпре за N3 атом L-His, иако је веза са N1 атомом знатно стабилнија.⁴⁵ Миграција са N3 на N1 атом L-His одиграва се у року од 24 h. (Схема 1.4.3.1.) DFT калкулацијама демонстрирана је већа стабилност производа формираног координацијом Ru(II) јона за NI атом L-His у односу на производ добијен координацијом за N3 атом L-His, са разликом енергије од 4 kcal mol⁻¹, потврђујући реорганизацију везивања. Овакав начин везивања применом ¹Н NMR спектроскопије потврђен је и за органометалне рутенијум арена комплексе у оквиру Sadler-ове групе.⁶² Детектовани су и потврђени случајеви координовања за амино и карбоксилну групу L-His уз формирање петочланих и шесточланих прстенова, само уколико су поменута места за координацију била слободна.^{63,64} Код комплекса **Ru36** и **Ru37** могућа је координација само за *N3* или *N1* атом, због постојања једног лабилног лиганда у координационој сфери комплекса.45



Схема 1.4.3.1. Реакциони путеви комплекса **Ru36** и **Ru37** са L-His у воденом раствору.⁴⁵

Мегlino и сарадници су проучавањем протеин-рутенијум производа, у којима је рутенијум координован за одређене фрагменте протеина, дошли до закључка да се рутенијум у протеинима најчешће координује за L-His, као и да је могућа не тако честа координација за неке друге аминокиселине као што су: глутаминска киселина (Glu), аспарагинска киселина (Asp) или цистеин (Cys). Статистички подаци указују да се рутенијум примарно везује за атоме N и O у протеинима, док је атом S секундарна опција.⁶⁵ Да би се добио детаљнији увид у могуће реакције Ru(II)-tpy комплекса са аминокиселинама које у својој структури поседују атоме сумпора, реакције супституције комплекса

Ru36 и **Ru37** са L-Cys и L-Met праћене су применом UV-Vis и NMR спектроскопијом⁶⁶ Након дисоцијације хлоридо лиганда проучавани комплекси су реаговали споро са L-Cys уз формирање монофункционалног тиолато производа, $[Ru(Cl-tpy)(N-N)(RS)]^+$, након чега је дошло до оксидације и формирања сулфонато производа, $[Ru(Cl-tpy)(N-N)(RSO)]^{2+}$ (Схема 1.4.3.2.А). Слични резултати забележени су и код $[(\eta^6\text{-arene})RuCl(en)]^+$ комплекса.⁶⁷ Оксидација тиола има важну улогу на саму фармаколошку примену и активност Ru-tpy и Ru-apeна комплекса, јер повезује координацију рутенијум јона са редокс процесима интер- и интраћелијски. Са друге стране, интеракција Ru(II) јона са тиоетарском групом L-Met показала се слабом.⁶⁶ Експериментални докази добијени применом NMR спектроскопије предлажу координацију Ru(II) јона у комплексима **Ru36** и **Ru37** са L-Met кроз формирање монофункционалног производа [Ru(Cl-tpy)(*N-N*)(MeSR)]²⁺, а затим и накнадну оксидацију координованог L-Met до метионин-сулфоксида (Схема 1.4.3.2.Б).



Схема 1.4.3.2. Реакциони пут комплекса **Ru36** и **Ru37** са А) L-Cys и Б) L-Met у воденом раствору.⁶⁶

Брзина реакције комплекса **Ru36** и **Ru37** са L-Суѕ и L-Меt у великој мери зависи од природе бидентатног хелатног лиганда у структури комплекса. Тако, комплекс **Ru36** (en) реагује двоструко брже од **Ru37** (dach), што је у сагласности са реактивношћу добијеном за реакцију са L-His (Табела 1.4.3.1.). Брзина супституције зависи и од природе улазног лиганда тј. нуклеофила, тако да је реакција са L-Суѕ 5 пута бржа од реакције са L-Met. Овакво понашање објашњава се већом волуминозношћу тиоетарске групе. Такође, не може се занемарити и могућа депротонација L-Суѕ при одређеној рН вредности.⁶⁸ Познато је да је тиолни јон (RS⁻) бољи σ-донор од тиоетарске групе. Могуће је да, услед

координације за одређене аминокиселине (као фрагмената протеина), Ru-tpy комплекси постану неактивни, али се на тај начин омогућава транспорт самог комплекса кроз формирани комплекспротеин производ. Након формирања поменутог производа, комплекс бива транспортован и отпуштен у близини места деловања, као што су ћелијска мембрана, митохондрија, ћелијско језгро или хроматин. Да би допремање до канцерогене ћелије било потпуно и адекватно од велике важности је јачина везе коју комплекс остварује са протеином.

одговарајућим аминокисели	нама на З	310 K.	Ū	•	•	0	Ì		
-								•	

Табела 1.4.3.1. Константа брзине реакције сусптустиције (k2) комплекса Ru36 и Ru37 са

	$k_2 [10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	Реф.
Ru36		
L-His	$7,0\pm0,4$	45
L-Cys	$7,2 \pm 0,3$	66
L-Met	$1,50 \pm 0,05$	66
Ru37		
L-His	$3,6 \pm 0,3$	45
L-Cys	$3,7 \pm 0,2$	66
L-Met	$0,\!80\pm0,\!07$	66

Да би се сваки нови металотерапеутик примењивао интравенозно, важно је испитати способност везивања потенцијалног антитуморског кандидата за транспортне протеине.^{69,70} Најзаступљенији протеини крвне плазме су: хумани серум албумин (HSA, c = 35-50 gL⁻¹), имуноглобулин G (IgG, c = 7–16 g L⁻¹) и серум трансферин (Tf, c = 2,5–3,5 gL⁻¹).⁷¹ 2018. године детаљно је испитана интеракција Ru-tpy комплекса **Ru36-Ru38** са HSA и Tf. Стехиометрија везивања одређена је оптичком емисионом спектрометријом индуктивно спрегнуте плазме (ICP OES од engl. inductively coupled plasma optical emission spectrometry) проучавањем формираних Ru-tpy-протеин производа. Резултати су показали да везивање Ru-tpy комплекса за HSA зависи од природе комплекса, при чему за 1 mol HSA може да се веже 1,5; 7 или 8,5 mol комплекса **Ru36**, **Ru37** и **Ru38**, док је за трансферин примећен другачији тренд, односно за 1 mol Tf може да се веже 0,4; 3 или 3,5 mol истих комплекса. У случају испитиваних комплекса својом активношћу нарочито се истакао комплекс **Ru37.** Применом флуоресцентне спектрофотометрије дефинисана је и јачина везивања за транспортне протеине. Израчунате константе везивања 10^4 – 10^5 M⁻¹ за комплексе **Ru36** и **Ru37** указују на умерено до јако везивање за HSA (Табела 1.4.3.2.), док константа за комплекс **Ru38** ($K_b = 6,72$ M⁻¹) указује на слабо везивање. Комплекси Ru36-Ru38 показали су веома слаб интензитет везивања за Tf, са константама реда величине 10²-10³ М⁻¹ (Табела 1.4.3.2.). Осим проучавања могућности везивања за протеине, научници су испитивали и да ли при везивању долази до промена у секундарној или терцијалној стурктури HSA и Tf применом спектроскопије циркуларног дихроизма. Закључено је да везивање комплекса Ru36-Ru38 за HSA и Tf не доводи до промена у секундарној структури, док су у терцијарној структури примећене модификације.

Комбинација nano-LC/нано-ESI MS (од *енгл.* electrospray ionization mass spectrometry) анализе и молекулског докинга омогућила је детаљно проучавање везивања Ru(II)-tpy комплекса **Ru36-Ru38** за HSA.⁷² За комплексе **Ru36** (en), **Ru37** (dach) и **Ru38** (bpy) пронађено је да преферирају бочне ланце L-His као место везивања у протеину, али је такође могуће и везивање за Asp. Комплекси **Ru36** и **Ru37** везују се за 5 остатака L-His и један остатак Asp, док се комплекс **Ru38** везује за три L-His и један Asp. На основу молекулског докинга потврђено је да се испитивани комплекси везују за протеин у делу између субдомена IA и IIA. (Слика 1.4.3.1.) У том делу налазе се одређене циљане секвенце, као што су: ¹DAHK⁴, ⁵SEVAHR¹⁰ и ⁶⁵SLHTLFGDK⁷³. Следећи везивни регион који обухвата секвенцу ¹⁴⁶HPYFYAPELLFFAK¹⁵⁹ позициониран је на доњем улазу у субдомен IB и састоји се од три α-хеликса који формирају хидрофобни жљеб. Доказано је да се сва три комплекса везују за His146, што је такође потврђено и за сам KP1910.⁷³ Следећи део у протеину за који се везују комплекси **Ru37-Ru39** налази се између субдомена IA и IIA и састоји се од секвенци 324 DVFLGMFLYEYAR 336 и 338 HPDYSVVLLLR 348 . Комплекси **Ru36** и **Ru37** везују се за His338 и Asp324, док се комплекс **Ru38** везује само за Asp324.

Комплекс	<i>K</i> (M ⁻¹)	<i>Kapp</i> (M ⁻¹)	Реф
	HSA		
Ru36	$7,19 \times 10^{4}$		71
Ru37	$8,59 \times 10^{4}$		71
Ru38	6,72		71
	Tf		
Ru36	-	$0,64 \times 10^{2}$	71
Ru37		$10,00 \times 10^{2}$	71
Ru38		$0,025 \times 10^{2}$	71



Слика 1.4.3.1. Потенцијална места везивања Ru(II)-tpy комплекса у HSA.

1.5. Комплекси рутенијума(II/III) са Schiff-овим базама

Hugo Schiff, италијанско-немачки хемичар, 1864. године синтетисао је једињења по имену "Schiff-ове базе", у реакцији карбонилних једињења са примарним аминима механизмом приказаним на Слици 1.5.1.



Слика 1.5.1. Механизам синтезе Schiff-ових база

Schiff-ове базе су једињења која се због каталитичких својстава користе у органским синтезама, затим за стабилизацију полимера, као пигменти у индустрији хране, а поседују и низ других примена. Такође, врло брзо су се издвојили и као погодни лиганди низом својих добрих особина, које је пре свега могуће контролисати кроз синтезу, као што су одабир донорских атома, хелатни ефекат, различите електронске и стерне карактеристике. Због низа поменутих особина, Schiff-ове базе узете су у разматрање и при синтези нових комплекса рутенијума. У случају лиганада који у својој структури поседују *N*- и *O*- као донорске атоме синтетисани су комплекси са Ru(II) јоном, док су у случају лиганада са *O*- и *S*-донорским атомима синтетисана једињења са Ru(III) јоном.

Први комплекси рутенијума који у својој структури поседују Schiff-ове базе као лиганде били су Ru(II) комплекси *cis*-[Ru(acac)₂(CO)₂] (acac = ацетилацетонато) и *cis*-[Ru(Ph-SaEn)₂(CO)₂] (Ph-SaEn = фенилсалицилениминато), синтетисани по узору на аналогне комплексе гвожђа од стране F. Calderazzo и сарадника 1969. године.⁷⁴ Убрзо затим, полазећи од [RuCl₂(PPh₃)₂], синтетисан је *trans*-[Ru(salen)(PPh₃)X] (salen = *N*,*N'*-етилен-*bis*(салицилалдиминато), PPh₃ = трифенилфосфин, X= Cl).⁷⁵ Ови и њима слични комплекси најпре су коришћени као катализатори органских реакција,^{76,77,78} све до појаве првих примера који су показали њихову антифунгалну и антимикробну активност.^{79,80} Активност једне такве серије Ru(III) комплекса опште формуле [RuX₂(EPh₃)(L)] (где је X = Cl, Br; E = P, As; L = Schiff-ова база, тридентатни лиганд) испитана је *in vitro* у циљу утврђивања ефикасности у погледу бактерија *Escherichia Coli, Salmonella Typhi* и *Pseudomonas Aeruginosa*, применом дифузионе технике уз агар као хранљиву подлогу. Детектована је умерена активност како комплекса тако и самих лиганада према свим бактеријама осим *S. Typhi*, уз стављање акцента на већу активност комплекса у односу на референтни бактерицид, стрептомицин.⁸¹

Идеја научника да увођењем поменутих база у коордионациону сферу комплекса побољшају особине комплексних једињења показала се веома успешном. Стога је у претходној деценији синтетисан велики број комплекса са мањом резистентношћу и токсичношћу, а бољом активношћу од цисплатине.

Антитуморска активност комплекса опште формуле [RuCl(CO)(B)L] (B = PPh₃, AsPh₃, py; L = Schiff-ова база добијена кондензацијом салициладехида и 4-аминоанитипирина), као и самих лиганада, испитивана је на HeLa ћелијским линијама МТТ тестом. Утврђена је већа цитотоксичност комплекса у односу на саме лиганде. Такође, добијене IC₅₀ вредности у опсегу 52,3–31,6 μ M, указале су на добру активност, али лошију у односу на цисплатину за коју је поменута вредност 16,7 μ M.⁸¹

Viswanathamurthi и сарадници синтетисали су серију од 8 мононуклеарних Ru(III) комплекса опште формуле [RuCl(EPh₃)L¹⁻⁴] (**Ru44-Ru51**) (E = P или As) добијених у реакцији [RuCl₃(EPh₃)₃] и *bis*(салициладехид)-S-метилизотиосемикарбазона (H₂L¹⁻³) или *bis*(2-хидроксинафталдехид)-Sметилизотиосемикарбазона (H₂L⁴) (Слика 1.5.2.).⁸² Испитивана је цитотоксичност ових комплекса према MCF-7 ћелијским линијама, при чему су комплекси **Ru49** и **Ru50** показали већу, док је комплекс **Ru48** показао једнаку ефикасност у поређењу са цисплатином (IC₅₀ = 12,33 µM) (Табела 1.5.1.).



Слика 1.5.2. Структурне формуле комплекса рутенијума Ru44-Ru51.

Комплекс	<u>IC50</u>	Реф	
ROMINICKU	МСГ-7 ћелијска линија	1 сф.	
Ru50	$0,\!90 \pm 0,\!10$	82	
Ru52	$3,57 \pm 1,09$	83	
Ru57	$3,63 \pm 1,92$	84	
Ru60	$7,95 \pm 0,45$	85	
Ru61	7.76 ± 0.88	85	
Ru65	2.93 ± 0.21	86	
Ru68	2.63 ± 0.30	87	
Ru69	$2,91 \pm 0,35$	87	

Табела 1.5.1. Сумиране IC₅₀ вредности комлекса рутенијума са Schiff-овима базама који су се у својим групама издвојили као најактивнији.

Ејіdіke и Ајіbade синтетисали су серију комплекса (**Ru52-Ru59**) опште формуле [Ru(L)Cl₂(H₂O)], где је L = Schiff-ова база, тридентатни *N*,*N*,*O*- донорски лиганд. Структурна формула комплекса приказана је на Слици 1.5.3., где су са R₁ и R₂ означени супституенти по којима се ови комплекси међусобно разликују. Антитуморска активност ових комплекса испитивана је на ћелијским линијама TK-10 (карцином бубрега), UACC-62 (карцином коже) и MCF-7.⁸⁴ Највећу *in vitro* антипролиферативну активност показали су комплекси **Ru52** и **Ru57** (Табела 1.5.1.).



Слика 1.5.3. Структурне формуле комплекса рутенијума Ru52-Ru59.

Jedhav je ca својом истраживачком групом синтетисао серију од чак 17 рутенијум-арена пиридинилметилен комплекса са Schiff-овим базама, који су тестирани на HeLa и MCF-7 ћелијским линијама. Комплекси су показали већу активност у односу на цисплатину (IC₅₀ = 16,2 μ M за HeLa, и 9,42 μ M за MCF-7) (Табела 1.5.1.).⁸⁵ Комплекси **Ru60** и **Ru61**, чије су структурне формуле приказане на Слици 1.5.4., показали су највећу активност у опсегу од 7,10–7,95 μ M према ћелијским линијама HeLa и MCF-7. Chow је са својим сарадницима синтетисао Ru(II) арена комплексе **Ru62-Ru67**, који су испитивани према ћелијским линијама MCF-7, A2780 и A2780cisR.⁸⁶ Својом активношћу нарочито се извдвојио комплекс **Ru65** (Слика 1.5.4.). У случају А2780 ћелијске линије установљена IC₅₀ вредност (IC₅₀ = 2,76 μ M) је 3 пута мања у односу на IC₅₀ вредност цисплатине (IC₅₀ = 9,54 μ M), док је у случају A2780cisR ћелијске линије забележена IC₅₀ вредност (IC₅₀ = 3,17 μ M) чак 10 пута мања у односу на цисплатину (IC₅₀ = 34,30 μ M).



Слика 1.5.4. Структурне формуле комплекса Ru61, Ru62 и Ru65.

Осим мононуклеарних комплекса рутенијума од стране Surbarkhana и његових сарадника синтетисани су и тестирани полинуклеарни комплекси (**Ru68-Ru75**) опште формуле $[(\eta^6\text{-}arene)_2\text{Ru}_2(\text{L})\text{Cl}_2]$ (где је аrene: бензен или *p*-цимен; L: бензил-*bis*(бензоилхидразон) деривати). У серији синтетисаних комплекса нарочито су се издвојили комплекси **Ru68** и **Ru69** (Слика 1.5.5.), који су показали добру активност према ћелијским линијама A549, A549cisR , MCF-7, LoVo (карцином дебелог црева) и HuH-7 (карцином јетре). Након периода инкубације од 72 h, комплекси **Ru68** и **Ru69** показали су ниже IC₅₀ вредности (3,39 µM за **Ru68** и 5,70 µM за **Ru69**) у поређењу са IC₅₀ 17,24 µM за цисплатину према ћелијској линији A549cisR.⁸⁷



 Ru68
 Ru69

 Слика 1.5.5. Структуре полинуклеарних комплекса рутенијума Ru68 и Ru69.
1.6. Полинуклеарни комплекси рутенијума

У поређењу са мононуклеарним комплексима, полинуклеарни комплекси показују низ бољих синергистичких и биолошких карактеристика за које се сматра да су последица дејства више јона метала. Наиме, ови комплекси показују бољу активност и селективност у везивању за DNA молекул и већу цитотоксичност у случају лечења тумора.

Први синтетисан полинуклеарни комплекс је комплекс платине BBR3464 (Слика 1.6.1.), који је показао побољшану терапеутску активност у односу на цисплатину, нарочито у лечењу тумора резистентних на цисплатину. ⁸⁸



Слика 1.6.1. Структурна формула BBR3464 комплекса.

Фасцинантне резултате показали су и полинуклеарни комплекси рутенијума, чији је развитак у последњој деценији у експанзији.

Полинуклеарни комплекси се могу поделити у две групе:

- 1. хомополинуклеарни (идентични метални центри),
- 2. хетерополинуклеарни (бар један од металних центара у структури комплекса је различит).

На основу природе мостног лиганда унутар поменутих група извршена је класификација на комплексе који у својој структури имају флексибилне мостне лиганде, као што су полиамински ланци, или пак они са ригидним мостним лигандима, као што су аромати. Комплекси са флексибилним мостним лигандима погоднији су за везивање за мали жљеб DNA торзионом ротацијом и селективним везивањем за два избочена места, као и за интеркалацију, због доприноса више јона метала. Ипак, не заостаје ни интересовање за проучавањем полинуклеарних комплекса са ригидним лигандима који са DNA молекулом могу интераговати кроз *bis*-интеркалацију или везивањем за мали жљеб, уз додатну стабилизацију Van der Waals-овим, хидрофобним или водоничним интеракцијама.

1.6.1. Хомополинуклеарни комплекси рутенијума

Испитивања хомополинуклеарних комплекса са јонима метала повезаним лабилним лигандима показала су да природа и дужина мостног лиганда у великој мери утичу на јачину, селективност и начин везивања, као и на саму биолошку активност комплекса. Међу комплексима синтетисаним у оквиру ове класе својим особинама издвојили су се комплекси **Ru76-Ru79**, чије су структурне формуле За динуклеарне Ru(II) комплексе приказане на Слици 1.6.1.1. опште формуле [(bpy)₂Ru(L)Ru(bpy)₂]Cl₄ (где L = 1,2-*bis*(2-(2-(4-(1*H*-имидазо[4,5-*f*][1,10]фенантролин-2ie ил) фенокси) етокси) бензен (**Ru76**)⁸⁹, L = 1, 2-*bis*(4-(1H-имидазо [4,5-f][1,10] фенантролин-2ил) ϕ енокси)етан (**Ru77**), L = 2,2'-(4,4'-(2,2'-окси-*bis*(етан-2,1-диил)*bis*(окси))*bis*(4,1- ϕ енилен))*bis*(1Hимидазо[4,5-f][1,10] ϕ енантролин) (**Ru78**), L = 1,2-bis(2-(4-(1H-имидазо[4,5-f][1,10] ϕ енантролин-2ил)фенокси) етокси)етан (**Ru79**), синтетисане у групама Хи-а и Ји-а, испитивано је везивање за DNA и фрагменте DNA ланца помоћу апсорпционе спектроскопије. Утврђено је јако везивање комплекса за DNA, као и могућност замене ЕВ из самог DNA ланца. Добијене вредности константи везивања Кь реда величине 10^7 указале су на изненађујућу јачину везивања, много већег интензитета него у случају мононуклеарних комплекса. Мерењем вискозности потврђено је везивање комплекса за DNA интеркалацијом. 90, 91



Слика 1.6.1.1. Структуре хомополинуклеарних комплекса рутенијума Ru77-Ru79

У групи професора Liu-а испитиван је афинититет везивања за DNA, као и *in vitro* цитотоксичност три динуклеарна Ru(II) комплекса **Ru80–82** опште формуле $[(bpy)_2Ru(L)Ru(bpy)_2]Cl_4$, где је bpy = 2,2' -бипиридин, док је L = 1,10-*bis*(3-(1Н-имидазо[4,5-f][1,10]фенантролин-2-ил)-9Н-карбазол-9-ил)декан} за **Ru80**, 1,6-*bis*(3-(1Н-имидазо[4,5-f][1,10]фенантролин-2-ил)-9Н-карбазол-9-ил)хексан} за **Ru81** и 1,3-*bis*(3-(1Н-имидазо[4,5-f][1,10]фенантролин-2-ил)-9Н-карбазол-9-ил)хексан} за **Ru81** и 1,3-*bis*(3-(1Н-имидазо[4,5-f][1,10]фенантролин-2-ил)-9Н-карбазол-9-ил)пропан} за **Ru82** (Слика 1.6.1.2.). Резултати су указали на јако везивање комплекса за DNA ланац, што је потврђено хипохромизмом у UV-Vis апсорпционом спектру. Флуоресцентна мерења указала су такође на могућност замене ЕВ из DNA ланца у случају сва три комплекса, док је праћењем вискозности установљено везивање интеркалацијом у случају комплекса **Ru81**, као и делимичном интеркалацијом у случају комплекса **Ru81**, као и делимичном интеркалацијом у случају комплекса **Ru81**, као и делимичном интеркалацијом у случају комплекса **Ru80** и **Ru82**. Наиме, некласични интеркалатори, што су у овом случају **Ru80** и **Ru82**, доминантнији су у свом везивању за DNA ланац у односу на класични интрекалирајући комплекса **Ru81**. Утицај разлике у дужини ланца мостног лиганда на активност комплекса примећена је и при

испитивању њихове цитотоксичности према ћелијским линијама HeLa и MCF-7. Резултати су показали да активност опада следећим редоследом **Ru80** > **Ru82** > **Ru81**.^{92,93}



n = 10 Ru80; n = 6 Ru81; n = 3 Ru82

Слика 1.6.1.2. Структуре динуклеарних комплекса рутенијума Ru80-Ru82

Zhang је са својим тимом сарадника, применом емисионе спектроскопије, проучавао везивање динуклеарних комплекса **Ru83–Ru85** (Слика 1.6.1.3.) за DNA и добио Stern-Volmer-ове константе везивања 3.5×10^5 , 1.46×10^5 и 2.98×10^5 М⁻¹. У оквиру ове групе испитивана је и активност комплекса према ћелијским линијама HeLa, SGC-823 и SGC-7901. Добијене IC₅₀ вредности: 16,14–21,6 µM за комплекс **Ru83**, 13,83–16,04 µM за **Ru84** и 9,21–13,07 µM за **Ru85**, у складу су са претходно одређеним константама везивања за DNA.⁹¹



Слика 1.6.1.3. Структуре динуклеарних комплекса рутенијума Ru83-Ru85.

Keene и Collins са својим тимом сарадника испитивали су антимикробну активност полинуклеарних комплекса **Ru90–Ru92** (Слика 1.6.1.4.) према грам-позитивним бактеријама

Staphylococcus aureus (S. aureus), метицилин-резистентни S. aureus (MRSA), као и грам-негативним Escherichia coli (E. coli) и Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa). Такође, анализирана је и њихова цитотоксичност према ћелијским линијама HEK-293 и HepG2. Комплекси **Ru90–Ru92** показали су добру антибактеријску активност, при чему се нарочито издвојио **Ru91** који је показао активност и према грам-позитивним и према грам-негативним бактеријама, и то 16-18 пута већу него према ћелијским линијама.⁹⁴



Слика 1.6.1.4. Структуре динуклеарних комплекса рутенијума **Ru90–Ru92**.

Занимљиве особине показали су динуклеарни комплекси **Ru93–Ru96** (Слика 1.6.1.5.), синтетисани у групи професора Saeed-a, који се одликују разликама у дужини алкил низа мостног лиганда. Мононуклерне јединице опште формуле $[Ru(dppz)(tpm)]^{2+}$ (tpm = *tris*(1-пиразолил)метан, dppz = дипиридо[3,2-a:2',3'-c]феназин), повазене су мостним лигандима који се завршавају пиридилским делом, заправо 3- и 4-аминопиридином. Истраживања показују да разлике у природи мостних лиганда значајно утичу на начин везивања комплекса за DNA, при чему је комплекс са 3-пиридил лигандом, **Ru96**, показао већу активност у односу на комплексе са 4-пиридил лигандима. Наиме, добијене су вредности за константе *K* 2,5 × 10⁶ M⁻¹ за **Ru96**, 0,2 × 10⁶ M⁻¹ за **Ru94**, 1,7 × 10⁶ M⁻¹ за **Ru95** и 0,9 × 10⁶ M⁻¹ за **Ru93**. Такође, запажена је мања активност полинуклеарних комплекса нису показали довољну флексибилност и тиме смањили активност самих комплекса, односно могућност везивања *bis*-интеркалацијом у комбинацији са везивањем за жљебове DNA.⁹⁵



Слика 1.6.1.5. Структурне формуле динуклеарних комплекса рутенијума **Ru93–Ru96**.

Хомополинуклеарни комплекси рутенијума са металним центрима повезаним ригидним лигандима остварују интеракције са DNA молекулом везивањем за жљебове или интеркалацијом. Један од комплекса овог типа **Ru109**, [{(bpy)₂Ru}₂(4-azo)]⁴⁺ (4-azo = 4,4-azo-*bis*(2,2 -бипиридин)) приказан на Слици 1.6.1.6., синтетисан је и тестиран у групи Thomas и Otsuki. Овај комплекс се врло брзо издвојио најпре због високих вредности константи везивања за DNA ($K_b = 1,61 \pm 0,17$) × 10⁶ M⁻¹. Испитивања заснована на апсорпционим мерењима и мерењу вискозности указивала су на везивање полинуклеарног комплекса за жљеб DNA ланца, захваљујући присуству азо лиганда у својој структури, што је у експериментима примећено и променом боје раствора из љубичасте у зелену по додатку комплекса у раствор DNA.⁹⁶

Испитивањем серије хомополинуклеарних комплекса рутенијума, **Ru109-Ru113** приказаних на Слици 1.6.1.7., са ригидним мостним лигандима који се разликују по дужини, утврђено је да природа ригидних мостних лиганада има велики утицај на начин везивања ових комплекса за DNA молекул. Тачније, сматра се да је код комплекса са краћим мостним лигандима доминантно везивање за мали жљеб, док је везивање интеркалацијом карактеристика за комплексе са дужим ригидним лигандом. ^{97,98} Wang и сарадници испитивали су активност полинуклеарног комплекса **Ru113** у циљу поређења са активношћу мононуклеарног аналога [Ru(bpy)₂(Htip)]²⁺. Утврђена је боља активност полинуклеарног комплекса према ћелијским линијама MCF-7 (IC₅₀ = 44 μ M), насупрот скоро неактивном мононуклеарном аналогу.⁵⁹



Слика 1.6.1.6. Структурна формула хомополинуклераних комплекса рутенијума са ригидним лигандима





Слика 1.6.1.7. Структурна формула хомополинуклераних комплекса рутенијума Ru111-Ru113.

1.6.2. Хетерополинуклеарни комплекси рутенијума

Хетерополинуклеарни комплекси у којима је рутенијум преко флексибилног мостног лиганда повезан са неким другим јоном метала имају могућност да због присуства два различита метална јона покажу удружену, односно бољу активност. Holder је са својим тимом сарадника синтетисао комплекс Ru(II) и V(IV) опште формуле [Ru(pbt)₂(phen₂DTT)VO(sal-L-tryp)](PF₆)₂·5H₂O, где је phen₂DTT = 1,4*bis*(1,10-фенантролин-5-илсулфанил)бутан-2,3-диол и pbt = 2-(2'-пиридил)бензотиазол, чија је структура приказана на Слици 1.6.2.1. Испитивањем активности овог комплекса према хуманим ћелијама карцинома епидерма A431, малигног меланома и хуманим здравим ћелијама фибробласта коже, утврђена је већа активност према туморским ћелијама у односу на здраве ћелије коже. Комплекс је показао већу активност након што су тестиране канцерогене ћелије излагане светлости, док је такво понашање изостало код излагања неканцерогених ћелија. Низ добрих резултата сврстао је динуклеарни комлекс рутенијум(II)-ванадијум(IV) међу потенцијалне лекове тумора коже.⁹⁹



Слика 1.6.2.1. Структурна формула хетерополинуклераног Ru(II)-V(IV) комплекса.

Комплекс рутенијума са иридијумом [Ru(bpy)₃-(CH₂)₁₀-Ir(F₂ppy)₂]³⁺ (ppy = 1-фенил-пиридин) (**RuIR**), приказан на Слици 1.6.2.2., садржи Ru(II) и Ir(III) који су ковалентно повезани 10-метиленским ланцем. Јон иридијума изабран је са циљем побољшања карактеристика јона рутенијума. Да би се потврдила оваква замисао у циљу поређења, синтетисана су и два хомополинуклеарна аналога [Ru(bpy)₃-(CH₂)₁₀-Ru(bpy)₃]⁴⁺ (**RuRu**) и [Ir(F₂ppy)₂-(CH₂)₁₀-Ir(F₂ppy)₂]²⁺ (**IrIr**). Комплекс **RuIr** тестиран је у случају здравих ћелија LO2, као и на ћелијским линијама HeLa и МСF-7, при чему је највећу активност показао према ћелијској линији HeLa са IC₅₀ ~ 50 μ M, у поређењу са цисплатином (IC₅₀ = 22 μ M). Поменути комплекс имао је способност одличног допремања до места деловања, односно продирања у ћелију. Утврђено је да своју активност показује у цитоплазми, а још бољу у нуклеусу, о чему говори 3,2 пута већи интензитет емисије у нуклеусу у односу на саму цитоплазму. Хетерополинуклеарни комплекс **RuIr** показао је боље карактеристике, односно већу активност према тестираним ћелијским линијама у односу на хомополинуклеарне комплексе **RuRu** и **IrIr**.¹⁰⁰



Слика 1.6.2.2. Структурна формула хетерополинуклеарног комплекса $[Ru(bpy)_{3-}(CH_{2})_{10}-Ir(F_{2}ppy)_{2}]^{3+}$

До сада потврђена већа активност полинуклеарних комплекса рутенијума у односу на мононуклеарне комплексе није изостала ни у овој класи. Тако је Messori са својим тимом сарадника синтетисао два хетеробиметална комплекса рутенијума и злата, $[RuCl_2(p-cimen)(\mu-dppm)AuCl]$ (**Ru114**) и $[RuCl_2(p-cimen)(\mu-dppm)AuS(tiazolin)]$ (**Ru115**) (Слика 1.6.2.3.), по узору на већ познате цитостатике $[Ru(p-cimen)Cl_2(PR_3)]$ и $[AuX(PR_3)]$ (X = Cl, SR) повезивањем дифосфинским лигандом dppm = 1,1-*bis*(дифенилфосфин)метан. Новосинтетисани хетеронуклеарни комплекси показали су одличан фармаколошки профил, тачније већу цитотоксичност и бољу селективност у односу на претходно испитивање мононуклеарне аналоге. *In vitro* испитивања према ћелијској линији HCT116 показала су

веће IC₅₀ вредности за комплексе **Ru114** (4,6 μ M) и **Ru115** (6,5 μ M) у поређењу са претходно синтетисаним аналозима, чије су IC₅₀ вредности 73,7 μ M за динуклеарни Ru-Ru комплекс и 21,9 μ M за мононуклеарни Ru комплекс.¹⁰¹



Слика 1.6.2.3. Структурне формуле комплекса [$RuCl_2(p-cimen)(\mu-dppm)AuCl$] (Ru114) и [$RuCl_2(p-cimen)(\mu-dppm)AuS(tiazolin)$ (Ru115).

2018. године Рилак Симовић и сарадници синтетисали су два нова Ru(II)-терпиридил комплекса моносупституисаним фероценом у својој структури [Ru(tpy)Cl₂(mtefc)] (**Ru116**) ca И $[Ru(tpy)Cl_2(mtpfc)]$ (Ru117), где је mtefc = (2-(метилтио)етил)фероцен и mtpfc = (3-(метилтио) пропил)фероцен (Слика 1.6.2.4.).¹⁰² Биолошка активност ових комплекса испитивана је *in vitro* и *in vivo* на ћелијским линијама миша 4T1 (карицном дојке) и хуманој ћелијској линији MDA-MB-231 (карцином дојке). In vitro испитивања показала су активност оба испитивана комплекса, при чему покрећу апоптозу и потенцијално доводе до ћелијске смрти тестираних линија. In vivo испитивања указала су на смањен раст ћелија тумора. Ослабљен раст ћелија тумора резултат је измењених урођених и стечених антитуморских имуних одговора, а промене су јасно изазване комплексима. Резултати до којих се дошло указују на терапетуски потенцијал Ru(II)/фероценил комплекса. Комплекс Ru117 показао се ефикаснијим чак и од саме цисплатине, а примећен је и дужи животни век мишева третираних комплексима **Ru116** и **Ru117** у односу на оне третиране цисплатином.¹⁰²



Слика 1.6.2.4. Структурне формуле хетеронуклеарних Ru(II)-tpy/фероцен комплекса Ru116 и Ru117.

Међу хетерополинуклеарним комплексима у којима је рутенијум повезан са другим јонима метала ригидним мостним лигандом издвојио се комплекс $[(phen)_2Ru(bpibH_2)Co(phen)_2]^{5+}$ (phen = 1,10- фенантролин, bpibH₂ = 1,4-*bis*([1,10]фенантролин-[5,6-d]имидазол-2-ил)-бензен) (**Ru118**) (Слика 1.6.2.5.) који је при испитивању интеракција са DNA и RNA, низом примењених метода, показао боље везивање за RNA. Применом UV-Vis спектрофотометрије, флуоресцентне спектроскопије и мерењем вискозности прецизирано је везивање овог комплекса за DNA и RNA интеркалацијом. Овај Ru(II)-Co(III) комплекс показао је и инхибицију раста HL-60 ћелија, као и апоптозу тестираних ћелијских линија HepG2.¹⁰³ Ru(II)-Pt(II) хетерополинуклеарни комплекс [(Ph₂phen)₂Ru(dpp)PtCl₂]²⁺ (Ph₂phen = 4,7-дифенил-1,10-фенантролин; dpp = 2,3-*bis*(2-пиридил)пиразин) (**Ru119**) (Слика 1.6.2.5.), показао је изузетну цитотоксичност према ћелијама малигног глиома пацова F98. Удружено дејство два јона метала овог комплекса сматра се одговорним за изузетну активност и вишеструко дејство које се огледа у цитотоксичности и утицају на оксидативни стрес.¹⁰⁴ *In vitro* испитивања показала су већу тенденцију ка фотоактивној модификацији DNA, уз умерени ефекат на протеине у испитиваним условима. Оваква селективна активност доприноси смањењу споредних ефеката *in vivo*.





Ru119

Слика 1.6.2.5. Структурне формуле хетерополинуклеарних комплекса рутенијума са металним центрима повезаним ригидним лигандима

У групи Андерсона синтетисани су динуклеарни (**Ru120**) и тринуклеарни комплекси (**Ru121**) Ru(III) и Pt(II) опште формуле [Na₂]{[Ru(III)Cl₄(DMSO-S)(- μ -pyz)]₂Pt(II)Cl₂} (Слика 1.6.2.6.), чија је активност испитивана према А549 и MDA-MB-231 ћелијским линијама. Својом активношћу према А549 ћелијским линијама нарочито се издвојио **Ru121**, који се показао активнијим у поређењу са NAMI-А комплексом, са IC₅₀ = 1,3 μ M.^{105,106} Овако добра активност објашњена је удруженим мултидисциплинарним дејством два различита јона метала, насупрот једном у мононуклеарном комплексу NAMI-A.¹⁰⁵



Слика 1.6.2.6. Структурне формуле хетеронуклеарних комплекса Ru(III) и Pt(II).

Низом својих добрих претходно поменутих карактеристика рутенијум(II/III) комплекси брзо су се издвојили као потенцијални антитуморски агенси који би са великим успехом могли да замене комплексе платине у лечењу великог броја различитих карцинома.



P

РH

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

2.1. Хемикалије и реагенси

Рутенијум(III)-хлорид (RuCl₃·3H₂O), 2,2'-бипиридин (bpy), 1,10-фенантролин (phen), *о*-фенилендиамин (*о*-pda), 2,3-диаминонафтален (dan), 4,4'-диметил-2,2'-бипиридин (dmbpy). 2,2'-бипиридин-4,4'-дикарбоксилна киселина (dcbpy) 2,2':6',2"-терпиридин (tpy), 4'-(4-хлорофенил)-2,2':6',2"-терпиридин (Cl-Ph-tpy) и пиразин (pzn) набављени су од Sigma Aldrich и коришћени су без претходног пречишћавања. Schiff-ове базе bis(ацетилацетон)етилендиимин (acacen), bis(бензоилацетон)етилендиимин (ацетилацетон)(бензоилацетон)етилендиимин (bzacen). i(acacbzacen). bis(ацетилацетон)пропилендиимин (acacpn), bis(бензоилацетон)пропилендиимин (bzacpn) и (ацетилацетон)(бензоилацетон)пропилендиимин (acacbzacpn) припремљене су на основу претходно објављене процедуре.¹⁰⁷

Мононуклеарни Ru(II) комплекси *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂]·2H₂O, *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂]·2H₂O, [Ru(tpy)Cl₃] и [Ru(Cl-Ph-tpy)Cl₃]] синтетисани су на основу претходно публикованих процедура и коришћени су за даљу синтезу без претходног пречишћавања.^{38,42,108,109} Динатријумова со гуанозин-5'-монофосфата (5'-GMP-Na₂), L-метионин (L-Met), L-хистидин (L-His), глутатион (GSH), етидијум-бромид (EB), Hoechst 33258, еозин Y, ибупрофен, натријумова со деоксирибонуклеинске киселине говеђег тимуса (CT DNA), хумани (HSA) и говеђи серум албумин (BSA) набављени су такође од Sigma Aldrich и коришћени су без претходног пречишћавања. Фосфатни пуфер (PBS, 10 mM, C_{NaCl} = 137 mM, C_{KCl} = 2,7 mM, pH = 7,4) и Нереѕ пуфер (N-2-хидроксиетилпиперазин -N'-2-етансулфонска киселина) набављени су од произвођача Sigma Aldrich. Раствор CT DNA припремљен је у 10 mM фосфатном пуферу, pH = 7,4, при чему је однос апсорбанци на 260 и 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀) био између 1,8 и 1,9, што указује да је раствор DNA ослобођен протеина. Концентрација раствора DNA одређена је помоћу апсорбанце на 260 nm ($\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).¹¹⁰ Раствор HSA (2 µM) припремљен је, такође, у 10 mM фосфатном пуферу. Дестилована вода коришћена је за све експерименте, а сви припремљени раствори чувани су на 4 °C и коришћени у року од 5 дана.

2.2. Синтеза комплекса

2.2.1. Синтеза Ru(II) полипиридил комплекса (1-7)

Прекурсори *mer*-[Ru(tpy)Cl₃] и *mer*-[Ru(Cl-Ph-tpy)Cl₃] синтетисани су према претходно објављеним процедурама.^{38,42,108} Одговарајућа количина RuCl₃ × $3H_2O$ (1 mmol) растворена је у етанолу, а затим је раствор рефлуктован до промене боје из браон у зелену (приближно 2 h). Након тога, додата је одговарајућа количина лиганда, tpy или Cl-Ph-tpy (1 mmol), и рефлукс настављен још 3,5 h. За то време раствор је променио боју до браон или браон-црвенкасте уз истовремено стварање црног или браон талога. Хлађењем раствора до собне температуре дошло је до издвајања одговарајућих прекурсора. Добијени прекурсори издвојени су филтрацијом, испрани етанолом и етром, и сушени под вакуумом.

Генерална процедура синтезе [Ru(L₃)(N-N)Cl]Cl (1–7). Одмерена количина mer-[Ru(tpy)Cl₃] или mer-[Ru(Cl-Ph-tpy)Cl₃] додата је смеши етанол/H₂O (3:1) која садржи 10 еq. LiCl и 3 еq. триетиламина (Et₃N). Затим је у раствор додат хелатни лиганд N-N (1,2 еq.; N-N = o-pda, dan, dmbpy, dcbpy) и тако добијена смеша рефлуктована приближно 4 h. Љубичаст (код комплекса 2, 4, 5, 6), наранџасто-црвен (код комплекса 7), црвенкасто-розе (код комплекса 3) и браон (код комплекса 1) раствори филтрирани су ради отклањања евентуално заосталих нерастворних супстанци. Раствори су упаравани на ротационом вакуум упаривачу до ¹/4 почетне запремине и охлађени на 4 °C у циљу формирања талога. Комплекси су издвојени филтрирањем, испрани хладном водом, ацетоном и диетилетром, осушени под вакуумом и пречишћени хроматографијом на колони.¹¹¹

[Ru(tpy)(o-bqdi)CI]CI (1). 100,0 mg (0,195 mmol) [Ru(tpy)Cl₃], 29,4 mg (0,234 mmol) *o*-фенилендиамин (*o*-pda), 96,2 mg (1,950 mmol) LiCl и 94,9 μL (0,585 mmol) Et₃N y 20 mL смеше етанол/H₂O дају браон талог, комплекс **1**. Принос: 71,6 mg (61,8%). Израчунато за C₂₁H₁₇Cl₂N₅Ru (511,37): C, 49,32; H, 3,35; N, 13,70. Нађено: C, 49,41; H, 3,31; N, 13,65. Комплекс **1** растворан је у ацетону, DMSO-у, док је у води, метанолу, етанолу, хлороформу, дихлорметану и ацетонитрилу умерено растворан. ¹H NMR (200MHz, CD₃OD) δ 13,84 (s, 1H, N1*H*), 11,78 (s, 1H, N2*H*), 8,76–8,70 (m, 2H, C3'*H*/C5'*H*), 8,57–8,50 (m, 2H, C3*H*/C3"*H*), 8,37–8,28 (m, 1H, C4'*H*), 8,05–7,94 (m, 2H, C4*H*/C4"*H*), 7,76–7,67 (m, 1H, Cb*H*), 7,53–7,46 (m, 2H, C6*H*/C6"*H*), 7,41–7,31 (m, 2H, C5*H*/C5"*H*), 7,15–7,05 (m, 1H, Cc*H*), 6,97–6,91 (m, 2H, Ce*H*/Cd*H*). ¹³C NMR (50 MHz, CD₃OD) δ 173,52; 168,06; 159,15; 156,23; 155,76; 148,93; 139,63; 138,32; 128,53; 128,12; 124,61; 124,05; 122,42; 120,19. IR (KBr, cm⁻¹): v_{NH} 3466 (s), 3447(s); v_{tpy} 3097 (m), 3066 (m), 1614 (m), 1461 (m), 1442 (s), 1417 (s), 1264 (m), 1017 (m), 766 (s). UV/Vis спектар (H₂O; λ_{max}, nm (ε, M⁻¹ cm⁻¹)): 316 (21165), 509 (22520). ESI-MS: [M]⁺ (m/z = 476,02).

146.7 mg (0.261 mmol) [Ru(tpv)Cl₃]. (0.313 [Ru(tpv)(nadi)CllCl (2). 63.2 mg mmol) 2,3-диаминонафтален (dan), 141,1 mg (2,610 mmol) LiCl и 140,0 µL (0,783 mmol) Et₃N у 30 mL смеше етанол/H₂O, проузрокује формирање љубичастог талога комплекса 2. Комплекс је пречишћен хроматографијом на колони уз смешу дихлорметан/метанол (90:10, v/v) која је употребљена у својству елуента. Принос: 86.8 mg (46.44 %). Израчунато за С25Н19Сl2N5Ru (561.43): С. 53.48: Н. 3.41: N. 12.47. Нађено: С, 53,41; Н, 3,46; N, 12,52. Комплекс 2 растворан је у води, метанолу, етанолу и ацетонитрилу, a нерастворан у ацетону, хлороформу и дихлорметану. ¹H NMR (200MHz, DMSO-d⁶) δ 14,40 (s, 1H, N1H), 13,60 (s, 1H, N2H), 8,86 (d, 2H, C3'H/C5'H), 8,75 (d, 2H, C3H/C3"H), 8,37 (t, 1H, C4'H), 8,32 (s, 1H, CaH), 8,16 (d, 1H, CbH), 8,10-7,92 (m, 2H, C4H/C4"H), 7,70 (d, 2H, C6H/C6"H), 7,61-7,53 (m, 2H, CeH, CfH), 7,52–7,42 (m, 2H, C5H/C5"H), 7,29 (m, 1H, CcH), 7,04 (m, 1H, CdH). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d⁶) δ 169,59; 168,15; 164,58; 156,94; 155,37; 153,58; 146,26; 139,33; 137,56; 135,25; 133,36; 130,75; 127,39; 123,73; 122,99; 110,13. IR (KBr, cm⁻¹): v_{NH} 3417 (s); v_{tpy} 2917 (m), 1623 (m), 1448 (m), 1397 (m), 1268 (w), 770 (s). UV/Vis спектар (H₂O; λ_{max} , nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹)): 313 (21398), 516 (12073). ESI-MS: [M]⁺ (m/z = 526,03).

[Ru(tpy)(dmbpy)Cl]Cl (3). 100,0 mg (0,169 mmol) [Ru(tpy)Cl₃], 46,2 mg (0.204 mmol) 4,4'-диметил-2,2'-бипиридин (dmbpy); 86,8 mg (1,690 mmol) LiCl и 85,5 µL (0,507 mmol) Et₃N у 20 mL смеше етанол/H2O, проузрокује формирање црвенкасто-розе талога, комплекс 3. Принос: 76,4 mg (63,35%). Израчунато за C₂₇H₂₃Cl₂N₅Ru (589,04): C, 55,01; H, 3,93; N, 11,88. Нађено: C, 55,41; H, 3,83; N, 11,95. Комплекс 3 растворан је у метанолу, етанолу, хлороформу, дихлорметану, ацетонитрилу и DMSO-y, док је у води и ацетонитрилу делимично растворан. ¹H NMR (200MHz, DMSO-d⁶) δ 9.89 (d, 1H, J = 5,8 Hz, CaH), 8,86–8,76 (m, 3H, C3'H/C5'H, CdH), 8,69 (d, 2H, J = 5.5 Hz, C3H/C3"H), 8,54 (s, 1H, CeH), 8,17 (t, 1H, J = 8.1 Hz, C4'H), 8,02–7,90 (m, 2H, C4H/C4"H), 7,90 (s, 1H, CbH), 7,62 (d, 2H, J =4,5 Hz, C6H/C6"H), 7,43–7,32 (m, 2H, C5H/C5"H), 7,08 (d, 1H, J = 5,8 Hz, CgH), 6,90 (d, 1H, J = 5,9 Hz, ChH), 2,73 (s, 3H, -CH₃), 2,30 (s, 3H, -CH₃). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d⁶) δ 158,48; 157,75; 157,68; 155,23; 151,64; 151,20; 150,53; 148,11; 147,44; 147,41; 136,81; 133,37; 127,71; 127,40; 127,33; 124,30; 124,23; 123,64; 122,57; 21,00; 20,44. IR (KBr, cm⁻¹): v_{tpv} 1614 (m), 1477 (m), 1446 (m), 1241 (w), 770 (s). UV/Vis спектар (H₂O; λ_{max} , nm (ε, M⁻¹ cm⁻¹)): 290 (15915), 316 (15961), 498 (4800). ESI-MS: [M]⁺ (m/z = 554,06).

[Ru(tpv)(dcbpv)Cl]Cl (4). 80,0 mg (0,123 mmol) $[Ru(tpy)Cl_3],$ 53.2 mg (0.148)mmol) 2,2'-бипиридин-4,4'-дикарбоксилна киселина (dcbpy), 77,2 mg (1,230 mmol) LiCl и 75,9 µL (0,369 mol) Et₃N у 18 mL смеше етанол/H₂O, даје љубичаст талог комплекса 4. Принос: 54,0 mg (45,72%). Израчунато за C₂₇H₁₉Cl₂N₅O₄Ru (648,99): C, 49,93; H, 2,95; N, 10,78. Нађено: C, 49,83; H, 3,03; N, 10,85. Комплекс 4 растворан је у метанолу, етанолу и DMSO-у, док је у води, ацетону, хлороформу, дихлорметану и ацетонитрилу умерено растворан. ¹H NMR (200MHz, CD₃OD) δ 10,38 (d, 1H, J = 5,8 Hz, CaH), 9,24 (d, 1H, J = 1,1 Hz, CdH), 8,95 (d, 1H, J = 1,2 Hz, CeH), 8,69 (d, 2H, J = 8,1 Hz, C3'H/C5'H), 8,55 (d, 2H, J = 8,1 Hz, C3H/C3"H), 8,48 (dd, 1H, J = 5,9; 1,7 Hz, CbH), 8,28–8,18 (m, 1H, C4'*H*), 7,96 (td, 2H, *J* = 7,9; 1,5 Hz, C4*H*/C4"*H*), 7,71–7,63 (m, 3H, *J* = 5,5; 0,7 Hz C6*H*/C6"*H*, Cg*H*), 7,54 (dd, 1H, J = 6,0; 1,8 Hz, ChH), 7,32 (ddd, 2H, J = 7.6, 5.6, 1.3 Hz, C5H/C5"H).¹³C NMR (50 MHz, CD₃OD) δ 166,61; 165,92; 159,86; 158,82; 156,23; 154,43; 153,68; 153,38; 138,72; 136,40; 128,58; 127,17; 126,51; 124,94; 124,27; 123,89. Selected IR (KBr, cm⁻¹): v_{OH} 3429 (m), 3112(m), 2434 (m); v_{C=0} 1714 (s); v_{C0} 1288 (s); v_{tpy} 1603 (m), 1562 (m), 1460 (m), 1114 (s), 765 (s), 681 (s). UV/Vis cпектар (H₂O; λ_{max} , nm (ε, M⁻¹ cm⁻¹)): 313 (19404), 378 (3282), 511 (5522).

[*Ru*(*Cl-Ph-tpy*)(*nqdi*)*Cl*/*Cl* (5). 100,0 mg (0,149 mmol) [Ru(Cl-Ph-tpy)Cl₃], 34,4 mg (0,179 mmol) 2,3-диаминонафтален (dan), 76,9 mg (1,490 mmol) LiCl и 75,7 μL (0,447 mmol) Et₃N y 20 mL смеше етанол/H₂O, проузрокује формирање љубичастог талога комплекса **5**. Добијени комплекс пречишћен је хромотографијом на колони уз смешу дихлорметан/метанол (90:10, v/v) као елуент. Принос: 66,0 mg (61,74%). Израчунато за C₃₁H₂₂Cl₃N₅O4Ru (671,00): C, 55,41; H, 3,30; N, 10,42. Нађено: C, 55,36; H, 3,40; N, 10,38. Комплекс **5** растворан је у метанолу и DMSO-у, док је у води, етанолу, ацетону и ацетонитрилу умерено растворан, а у хлороформу и дихлорметану нерастворан. ¹H NMR (200MHz, CD₃OD) δ 13,94 (s, 1H, N1*H*), 12,03 (s, 1H, N2*H*), 9,09 (s, 2H, C3*H*/C5'*H*), 8,70 (d, *J*=8,0 Hz, 2H, C3*H*/C3"*H*), 8,19 (d, *J*=8,4 Hz, 2H, CA*H*/CA'*H*), 8,00–7,95 (m, 4H, C4*H*/C4"*H*, Ca*H*, Cb*H*), 7,71 (d, *J* = 8,3 Hz, 2H, CB*H*/CB'*H*), 7,56 (d, *J*=5,5 Hz, 3H, C6*H*/C6"*H*, Ce*H*), 7,38–7,26 (m, 4H, C5*H*/C5"*H*, Cc*H*, Cf*H*), 7,01 – 6,93 (m, 1H, Cd*H*). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d⁶) δ 172,59; 169,57; 157,03; 155,39; 154,03; 154,2; 147,51; 139,21; 135,50; 134,67; 129,61; 129,40; 127,82; 127,49; 124,06; 120,64; 120,16. IR (KBr, cm⁻¹): v_{NH} 3412 (s); v_{tpy} 2926 (w), 1658 (s), 1610 (m), 1431 (m), 1263 (m), 1092 (m), 786 (m). UV/Vis спектар (H₂O; λ_{max} , nm (ε, M⁻¹ cm⁻¹)): 286 (12787), 517 (5620). ESI-MS: [M]⁺ (m/z = 636,02).

[Ru(Cl-Ph-tpy)(dmbpy)Cl]Cl (6). 100,0 mg (0,143 mmol) [Ru(Cl-Ph-tpy)Cl₃], 45,2 mg (0,172 mmol) 4,4'-диметил-2,2'-бипиридин (dmbpy), 87,4 mg (1,430 mmol) LiCl и 85,5 µL (0,516 mmol) Et₃N у 20 mL смеше етанол/H₂O, дају љубичасти талог комплекса 6. Добијени комплекс пречишћен је хроматографијом на колони уз смешу дихлорметан/метанол (90:10, v/v) као елуент. Принос: 59,8 mg (40.51%). Израчунато за С₂₇Н₂₃Сl₂N₅Ru (699,03): С, 56,62; Н, 3,74; N, 10,00. Нађено: С, 56,53; Н, 3,80; N, 10,09. Комплекс 6 растворан је у метанолу, етанолу, ацетону, дихлорметану, ацетонитрилу и DMSO-у, док је у води и хлороформу делимично растворан. ¹H NMR (200MHz, DMSO-d⁶) δ 9.91 (d, 1H, J=5.8 Hz, CaH), 9,19 (s, 2H, C3'H/C5'H), 8,92 (d, 2H, J=8,1 Hz, C3H/C3"H), 8,80 (s, 1H, CdH), 8,52 (s, 1H, CeH), 8,38 (d, 2H, J=8,6 Hz, CAH/CA'H), 8,01 (t, 2H, J=7.1 Hz, C4H/C4"H), 7,93 (d, 1H, J=6.5 Hz, CbH), 7,78 (d, 2H, J=8,5 Hz, CBH/CB'H), 7,64 (d, 2H, J=4.8 Hz, C6H/C6"H), 7,46–7,34 (m, 2H, C5H/C5"H), 7,18 (d, 1H, J=5,8 Hz, CgH), 6,90 (d, 1H, J=6,0 Hz, ChH), 2,75 (s, 3H, -CH₃), 2,31 (s, 3H, -CH₃). ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d⁶): 176,38; 158,61; 158,10; 157,57; 155,12; 151,69; 151,24; 150,72; 148,11; 14,.44; 143,12; 142,90; 136,71; 136,30; 134,71; 129,27; 127,70; 127,41; 124,28; 123,98; 119,73; 118,18; 21,02; 20,46. IR (KBr, cm⁻¹): v_{trv} 3058 (m), 3038 (m), 1614 (s), 1476 (s), 1406 (s), 1240 (m), 1090 (s), 835 (s), 787 (s). UV/Vis спектар (H₂O; λ_{max} , nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹)): 286 (26253), 317 (14273), 509 (6000). ESI-MS: $[M]^+$ (m/z = 664,06).

[*Ru*(*Cl-Ph-tpy*)(*dcbpy*)*Cl*[*Cl* (7). 100,0 mg (0,132 mmol) [Ru(Cl-Ph-tpy)Cl₃], 57,3 mg (0,158 mmol) 2,2'-бипиридин-4,4'-дикарбоксилна киселина (dcbpy), 49,8 mg (1,320 mmol) LiCl и 48,9 μL (0,396 mmol) Et₃N y 13 mL смеше етанол/H₂O, дају наранџасто-црвен талог, комплекс 7. Принос: 88,2 mg (42,65%). Израчунато за C₂₇H₁₉Cl₂N₅O₄Ru (758,98): C, 52,15; H, 2,92; N, 9,22. Нађено: C, 52,21; H, 3,03; N, 9,31. Комплекс 7 растворан је DMSO-у, умерено растворан у води, метанолу и етанолу, док је у ацетону, хлороформу, дихлорметану и ацетонитрилу нерастворан. ¹H NMR (200MHz, CD₃OD) δ 10,51 (d, 1H, J = 5,9 Hz, CaH), 9,43 (s, 1H, CdH), 9,38 (s, 2H, C3'H/C5'H), 9,14 (s, 1H, CeH), 9,09 (d, 2H, J = 8,0 Hz, C3H/C3"H), 8,56 (dd, 1H, J = 6,0, 1,6 Hz, CbH), 8,47 (d, 2H, J=8,6 Hz, CAH/CA'H), 8,18–8,06 (m, 3H, C4H/C4"H, CgH), 7,96 (d, 2H, J = 4,6 Hz, C6H/C6"H), 7,82 (d, 2H, J=8,6 Hz, CBH/CB'H), 7,56 (dd, 1H, J = 5,9, 1,7 Hz, ChH), 7,52–7,38 (m, 2H, C5H/C5"H). IR (KBr, cm⁻¹): vo_H 3430 (s); vco 1235 (w); v_{tpy} 1607 (s), 1476 (s), 1405 (m), 1380 (s), 784 (s). UV/Vis спектар (H₂O; λ_{max}, nm (ε, M⁻¹ cm⁻¹)): 312 (12499), 368 (2479), 518 (4752). ESI-MS: [M]⁺ (m/z = 724,00).

2.2.2. Синтеза рутенијум(III) комплекса са Schiff-овим базама као лигандима (8–13)

Генерални поступак за синтезу комплекса [Ru(L)Cl(H₂O)] (8-13). Одређена количина RuCl₃·3H₂O (0,3825 mmol) растворена је у етанолу. Добијени раствор рефлуктован је приближно 2 h, а раствор је притом променио боју из браон у зелену. Затим је додата одговарајућа количина Schiff-ових база (1 mmol) и рефлукс настављен још 5 h. Током поменутог временског периода боја раствора промењена је из браон у браон-црвенкасту. Запремина добијеног раствора умањена је на ¼ почетне запремине употребом ротационог вакуум упаривача. Талог комплекса издвојен је филтрирањем и осушен под вакуумом, након чега је испран етанолом и диетилетром.

[*Ru(acacen)Cl(H₂O)*] (8). 100,0 mg (0,3825 mmol) RuCl₃·3H₂O и 85,79 mg (0,3825 mmol) *bis*(ацетилацетон)етилендиимин у 20 mL етанола даје браон талог комплекса 8. Принос: 75,3 mg (75,3 %). Израчунато за C₁₂H₂₀ClN₂O₃Ru (376,82): C, 38,25; H, 5,35; N, 7,43. Нађено: C, 38,21; H, 5,29; N, 7,47. Комплекс 8 растворан је DMSO-у, делимично растворан у води, метанолу, етанолу, ацетону, хлороформу, дихлорметану и ацетонитрилу. IR (KBr, cm⁻¹): $v_{(O-H)}$ 3445 (m); $v_{(C=C)}$ 1622 (m), 1594 (m); $v_{(CH=N)}$ 1540 (s); $v_{(C-O)}$ 1325 (s). UV/Vis спектар (DMSO; λ_{max} , nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹)): 324 (59139), 408 (21731). ESI-MS: [Ru(acacen)]⁺ (m/z = 324,04).

[*Ru(bzacen)Cl(H₂O)*] (9). 100,0 mg (0,3825 mmol) RuCl₃·3H₂O и 133,1 mg (0,3825 mmol) *bis*(бензоилацетон)етилендиимин у 20 mL етанола даје браон талог комплекса 9. Принос: 82,5 mg (82,5 %). Израчунато за C₂₂H₂₄ClN₂O₃Ru (500,97): C, 52,75; H, 4,83; N, 5,59. Нађено: C, 52,78; H, 4,87; N, 5,58. Комплекс 9 растворан је у DMSO-у, делимично растворан у води, метанолу, етанолу, ацетону, хлороформу, дихлорметану и ацетонитрилу. IR (KBr, cm⁻¹): v_(O-H) 3445 (m); v_(C=C) 1595 (m), 1540 (m); v_(CH=N) 1502 (s), 1486 (s), 1447 (s); v_(C=O) 1362 (s), 1274 (s). UV/Vis спектар (DMSO; λ_{max} , nm (ε, M⁻¹ cm⁻¹)): 262 (49028), 313 (30301), 409 (18570). ESI-MS: [Ru(bzacen)(H₂O)]⁺ (m/z = 466,08); [Ru(bzacen)]⁺ (m/z = 448,07).

[*Ru(acacbzacen)Cl(H₂O)*] (10). 100,0 mg (0,3825 mmol) RuCl₃·3H₂O и 109,5 mg (0,3825 mmol) (ацетилацетон)(бензоилацетон)етилендиимин у 20 mL етанола дају браон талог комплекса 10. Принос: 69,8 mg (69,8 %). Израчунато за C₁₇H₂₂ClN₂O₃Ru (439,89): C, 46,52; H, 5,05; N, 6,38. Нађено: C, 46,54; H, 5,12; N, 6,34. Комплекс 10 растворан је у DMSO-у, делимично растворан у води, метанолу, етанолу, ацетону, хлороформу, дихлорметану и ацетонитрилу. IR (KBr, cm⁻¹): $v_{(O-H)}$ 3444 (m); $v_{(C=C)}$ 1621 (m), 1595 (m); $v_{(CH=N)}$ 1540 (s), 1502 (s); $v_{(C-O)}$ 1326 (s). UV/Vis спектар (DMSO; λ_{max} , nm (ε, M⁻¹ cm⁻¹)): 269 (45233), 325 (49707), 410 (20120). ESI-MS: [Ru(acacbzacen)(H₂O)]⁺ (m/z = 404,06); [Ru(acacbzacen)]⁺ (m/z = 386,05).

[*Ru(acacpn)Cl(H₂O)*] (11). 100,0 mg (0,3825 mmol) RuCl₃·3H₂O и 91,2 mg (0,3825 mmol) *bis*(ацетилацетон)пропиледиимин у 20 mL етанола проузрокује стварање браон талога комплекса 11. Принос: 72,1 mg (72,1 %). Израчунато за C₁₃H₂₂ClN₂O₃Ru (390,85): C, 39,95; H, 5,67; N, 7,17. Нађено: C, 39,92; H, 5,69; N, 7,11. Комплекс 11 растворан је у DMSO-у, делимично је растворан у води, метанолу, етанолу, ацетону, хлороформу, дихлорметану и ацетонитрилу. IR (KBr, cm⁻¹): v_(O-H) 3445 (m); v_(C=C) 1621 (m); v_(CH=N) 1521 (s); v_(C-O) 1332 (s). UV/Vis спектар (DMSO; λ_{max} , nm (ε, M⁻¹ cm⁻¹)): 269 (55642), 324 (59109), 403 (24896). ESI-MS: [Ru(acacpn)(H₂O)]⁺ (m/z = 355,07); [Ru(acacpn)]⁺ (m/z = 338,05).

[*Ru(bzacpn)Cl(H₂O)*] (12). 100,0 mg (0,3825 mmol) RuCl₃·3H₂O и 138,6 mg (0,3825 mmol) *bis*(бензоилацетон)пропилендиимин у 20 mL етанола дају браон талог, комплекс 12. Принос: 87,2 mg (87,2 %). Израчунато за C₂₃H₂₆ClN₂O₃Ru (514,99): C, 53,64; H, 5,09; N, 5,44. Нађено: C, 53,67; H, 5,11; N, 5,41. Комплекс 12 растворан је у DMSO-у, делимично растворан у води, метанолу, етанолу, ацетону, хлороформу, дихлорметану и ацетонитрилу. IR (KBr, cm⁻¹): v_(O-H) 3438 (m); v_(C=C) 1595 (s); v_(CH=N) 1502 (s), 1486 (s); v_(C-O) 1339 (s). UV/Vis спектар (DMSO; λ_{max} , nm (ε, M⁻¹ cm⁻¹)): 260 (53084), 316 (30758), 409 (19905). ESI-MS: [Ru(bzacpn)(H₂O)]⁺ (m/z = 480,09).

 $[Ru(acacbzacpn)Cl(H_2O)]$ (13). 100,0 mg (0,3825 mmol) RuCl₃·3H₂O и 114,9 mg (0,3825 mmol) (ацетилацетон)(бензоилацетон)пропиледиимин у 20 mL етанола дају браон талог комплекса 13.

Принос: 70,5 mg (70,5 %). Израчунато за $C_{18}H_{24}ClN_2O_3Ru$ (452,92): C, 47,73; H, 5,34; N, 6,19. Нађено: C, 47,70; H, 5,40; N, 6,17. Комплекс **13** растворан је у DMSO-у , делимично растворан у води, метанолу, етанолу, ацетону, хлороформу, дихлорметану и ацетонитрилу. IR (KBr, cm⁻¹): $v_{(O-H)}$ 3444 (m); $v_{(C=C)}$ 1596 (s); $v_{(CH=N)}$ 1503 (s), 1486 (s); $v_{(C-O)}$ 1333 (s). UV/Vis спектар (DMSO; λ_{max} , nm (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹)): 274 (18134), 324 (25339), 403 (9867). ESI-MS: [Ru(acacbzacpn)(H₂O)]⁺ (m/z = 418,08); [Ru(acacbzacpn)]⁺ (m/z = 400,07).

2.2.3. Синтеза динуклеарних рутенијум(II) комплекса 14 и 15

Динуклеарни Ru(II) полипиридил комплекс [{RuCl(bpy)₂}₂(µ-pzn)][PF₆]₂·2H₂O (**14**) синтетисан је према претходно објављеном поступку.¹⁰⁹ Комплекс је окарактерисан применом елементалне микроанализе, UV-Vis, IR, ¹H NMR и ESI-MS спектроскопије. Потврђено је добро слагање добијених спектара са публиковасним резултатима.

 $[{RuCl(phen)_2}_2(\mu-pzn)][PF_6]_2 \cdot 2H_2O$ (15) синтетисан је по идентичном поступку као комплекс 14. Комплекс *cis*-[Ru(phen)₂Cl₂]·2H₂O (250 mg, 0,94 mmol) и лиганд пиразин (18,80 mg, 0,47 mmol) у 10 mL смеше етанол/вода (1:1) рефлуктовани су уз загревање у атмосфери аргона 3 h. По завршетку рефлуктовања запремина добијеног раствора редукована је до 5 mL, а затим је додат раствор NH₄PF₆ (306,1 mg, 1,87 mmol). Награђени црвенкасто-браон талог одвојен је филтрирањем, а затим испран хладном дестилованом водом. Добијени производ пречишћен је хроматографијом на колони уз алуминујум-оксид као стационарна фаза и ацетонитрил као елуент. Упаравањем елуента добијен је браон талог комплекса 15. Принос: 301,0 mg (47,0%). Израчунато за C₅₂H₄₀Cl₂F₁₂N₁₀O₂P₂Ru₂ (1399,91): С, 44,61; H, 2,88; N, 10,01. Наћено: С, 44,98; H, 3,15; N, 10,24. Комплекс 15 растворан је у метанолу, етанолу, ацетону, дихлорметану, ацетонитрилу и DMSO-у, а делимично растворан у води и хлороформу. ¹H NMR (200MHz, CD₃CN): 9,98 (t, 2H, *J* = 4,9 Hz), 9,05 (t, 2H, *J* = 4,6 Hz), 8,72 (d, 2H, J = 5,4 Hz), 8,67 (m, 4H), 8,35 – 8,27 (m, 8H), 8,21 (d, 4H, J = 7,2 Hz), 8,18 (d, 2H, J = 5,5 Hz), 8,13 (d, 2H, Hz), 8,13 (d, 2H, J = 5,5 Hz), 8,13 (d, 2H, Hz), 8,14 (d, 2H, Hz), 8,13 (d, 2H, Hz), 8,13 (d, 2H J = 5,3 Hz), 8,09 (m, 2H), 7,92 (m, 2H), 7,55 (m, 2H), 7,35 (m, 4H) ppm. IR (KBr, cm⁻¹): 3067 (w), 2918 (w), 1603(m), 1464 (s), 1422 (m), 840 (s), 762 (m), 557 (m). UV/Vis cπεκταp (CH₃OH; λ_{max} , nm (ε, M⁻¹ cm⁻¹)): 264 (8764), 451 (1226). ESI-MS: $[Ru_2(phen)_4(\mu-pzn)(N_2)]^{z+}$ (m/z = 1029,00), $[Ru_2(phen)_3(\mu-pzn)(N_2)]^{z+}$ (m/z = 850,93) [Ru(phen)₂Cl]⁺ (m/z = 497,02), [Ru(phen)Cl]⁺ (m/z = 321,06).

2.3. Инструменти

UV-Vis спектри снимани су на Perkin-Elmer Lambda 35 спектрофотометру са термостатираном 1,00 ст кварцном Suprasil киветом (3,00 mL). IR спектри снимани су помоћу Perkin-Elmer 983G спектрофотометра. NMR спектри снимани су на 200 MHz Varian Gemini-2000 спектрометру. Померања за NMR сигнале ¹H или ¹³C атома у деутерисаним растварачима (¹H- или ¹³C NMR) изражена су у ppm и дата су у односу на интерни стандард тетраметилсилан (TMS). Елементална анализа комплекса 1-7 рађена је на Elementar Vario MICRO елементалном анализатору. ESI-MS мерења рађена су на UHR-TOF Bruker Daltonik (Bremen, Немачка) масеном спектрофотометру резолуције 60.000 FWHM. Вршена је детекција позитивних јона, са снагом извора од 3,5 kV и протоком 180 µL/h. Као гас за сушење коришћен је азот (N₂), загрејан на 180 °C, док је температура распршеног растварача одржавана на 20 °С. Калибрација уређаја рађена је пре сваког мерења употребом инфузије Agilent ESI-TOF, чиме је одржавана ниска концентрација мешавине, што је омогућило m/z опсег једноструко наелектрисаних пикова до 2700 Da у оба мода јона. Масени спектри комплекса 8-13 добијени су помоћу LTQ Orbitrap XL уређаја, док је за комплексе 14 и 15 коришћен Synapt G2-Si инструмент (Waters), са дефинисаним условима рада: капиларни напон 2,8 kV, конусни напон 32 V, проток десолватационог гаса 650 L/h и температура 350 °C, као и температура извора 120 °C. pH вредност раствора мерена је помоћу Mettler Delta 350 дигиталног pH метра опремљеног комбинованом стакленом електродом, док су за калибрацију електроде коришћени стандардни раствори пуфера (pH 4,0; 7,0 и 9,0) набављени од Sigma Aldrich. Флуоресцентна мерења снимана су помоћу RF-1501спектрофлуориметра (Shimadzu, Japan). За мерење вискозитета коришћен је Ubbelodhe вискозиметар термостатиран на 25 ± 0.1 °C. Моларна проводљивост комплекса **8–13** одређивана је у свеже припремљеном 10^{-3} М раствору комплекса у диметилформамиду на собној температури коришћењем Crison EC-Meter Basic 30+ ћелије. EPR спектри комплекса **8–13** снимљени су на X-band MagnetTech MS300 спектрометру са фреквенцијом од 9.5 GHz. Снага микроталаса била је 3.16 mW (чији интензитет слаби до 15 dB), уз амплитуду од 0.2 mT.¹¹²

2.4. Кинетичка мерења

2.4.1. Испитивање реакција супституције рутенијум(II) терпиридин комплекса

Кинетика и механизам супституционих реакција комплекса опште формуле [Ru(L₃)(*N*-*N*)Cl]Cl (1-7) са азот- (5'-GMP) и сумпор-донорским биомолекулима (L-Cys и L-Met) изучавани су UV-Vis спектрофотометријски праћењем промене апсорбције раствора са временом на радној таласној дужини. Радна таласна дужина одређена је снимањем спектара раствора испитиваних комплекса у одређеним временским интервалима. За радну таласну дужину узима се она таласна дужина на којој је забележена највећа промена апсорбанце са временом. Реакције супституције проучаване су на три температуре (15, 25 и 37 °C) у 25 mM Нерез пуферу (pH=7,4) уз додатак 30 mM NaCl. Кинетика проучаваних реакција испитивана је под условима реакције *pseudo*-првог реда, што подразумева концентрацију лиганда најмање 10 пута већу у односу на концентрацију испитиваног комплекса. Реакције су започете директним мешањем 0,3 mL раствора комплекса (1,00 mM) са 2,7 mL раствора нуклеофила (5,56 mM) у кварцној кивети.

Константа брзине реакције *pseudo*-првог реда, *k*_{obsd}, израчунава се применом следеће једначине (1):¹¹³

$$\ln (\mathbf{A}_{t} - \mathbf{A}_{\infty}) = \ln (\mathbf{A}_{0} - \mathbf{A}_{\infty}) - k_{\text{obsd}} t$$
(1)

у којој A_t представља апсорбанцу у моменту t, а A_{∞} апсорбцију раствора након "бесконачно" дугог времена, односно на крају реакције. Зависност $\ln(A_t - A_{\infty})$ од t је линеарна, тако да се константа k_{obsd} израчунава из нагиба праве. Добијена вредност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , представља средњу вредност 2 до 3 независна кинетичка мерења за сваки од експерименталних услова. За реакције супституције које су праћене на три температуре израчунате су и вредности термодинамичких параметара. За обраду података коришћена су два компјутерска програма, Microsoft Excel 2016 и OriginPro 8.5.

2.4.2. Испитивање хидролизе и реакција супституције динуклеарних рутенијум(II) комплекса

Хидролиза динуклеарних комплекса Ru(II), $[{RuCl(by)_2}_2(\mu-pzn)][PF_6]_2 \cdot 2H_2O$ (14) и $[{RuCl(phen)_2}_2(\mu-pzn)][PF_6]_2 \cdot 2H_2O$ (15), изучавана је помоћу UV-Vis спектрофотометрије, праћењем промене апсорбције на одређеној таласној дужини у функцији времена. Радна таласна дужина дефинисана је на начин описан у одељку 2.4.1. Реакције хидролизе праћене су у води и 10 mM фосфатном пуферу (137 mM NaCl, pH = 7,4). Апсорбанца је снимана на температури од 25 °C сваких 30 s. Концентрација сваког од комплекса у финалном узорку била је 1 × 10⁻⁴ M.

Кинетика и механизам супституционих реакција динуклеарних комплекса Ru(II) са 5'-GMP, L-Met и GSH, проучаване су такође применом UV-Vis спектрофотометрије. Радна таласна дужина за изучавани систем одређена је на начин описан у одељку 2.4.1. Реакције су проучаване на три температуре (15, 25 и 37 °C) у 25 mM Hepes пуферу (pH = 7,4) уз додатак 50 mM NaCl. Кинетика супституционих реакција праћена је под условима реакције *pseudo*-првог реда (концентрација лигандаје најмање 10 пута у вишку у односу на концентрацију комплекса). Реакције су започете мешањем раствора комплекса (0,3 mL, 1,00 mM) са 2,7 mL раствора нуклеофила (5,56 mM). Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd1} и k_{obsd2} , за први и други корак супституције представљају

средњу вредност 2 до 3 независна кинетичка мерења. Константе брзине реакције за први и други корак супституције, k_1 и k_2 , добијене су директно из нагиба праве зависности k_{obsd} од концентрације нуклеофила. За обраду података коришћени су компјутерски програми Microsoft Excel 2016 и OriginPro 8.5.

2.5. Апсорпциона спектроскопска испитивања

Интеракције новосинтетисаних комплекса рутенијума (1-15) са DNA молекулом испитиване су применом UV-Vis спектрофотометрије на 37 °C. Апсорпционе титрације рађене су у 10 mM PBS пуферу (137 mM NaCl, pH 7,4) коришћењем константне концентрације комплекса (10 μ M) у коју су додате растуће концентрације DNA (2,0 mM).

2.6. Флуоресцентна испитивања

Одређивање начина везивања комплекса за DNA у присуству етидијум-бромида (EB) вршено је применом флуоресцентне спектроскопије. Флуоресцентна мерења рађена су на таласној дужини ексцитације од 527 nm и таласној дужини емисије од 612 nm. Ширина ексцитационог и емисионог прореза била је иста (10 nm), а брзина снимања константна. Раствори DNA (2,0 mM) и комплекса (0,1 mM) припремани су у 10 mM раствору пуфера (pH=7,4). Серије раствора комплекс–DNA припремане су додавањем у раствор DNA растуће концентрације комплекса: [DNA] = 28,6 μ M, [Q] = 5,72 – 57,2 μ M за комплексе 1–7; [DNA] = 24,0 μ M, [Q] = 5,50 – 55,0 μ M за комплексе 8–13, и [DNA] = 25,3 μ M, [Q] = 5,06 – 50,60 μ M за комплексе 14 и 15. Пре мерења, сваки од узорака инкубиран је на собној температури 5 min. Емисиони спектри снимани су у опсегу од 550-750 nm.

Идентично претходно описаном поступку, анализиране су интеракције комплекса са DNA молекулом у присуству индикатора везивања за жљеб DNA ланца, Hoechst 33258. Таласна дужина ексцитације била је 346 nm и емисије 490 nm. Емисиони спектри снимани су у опсегу од 370 до 650 nm.

Флуоресцентна спектроскопија коришћена је и за праћење интеракција комплекса са серум албуминима (HSA и BSA). Раствор серум албумина припреман је у 10 mM фосфатном пуферу (pH = 7,4). Промене у структури протеина узроковане везивањем комплекса праћене су променама у емисионом спектру након додавања растуће концентрације комплекса, [Q] $0 - 2.0 \times 10^{-5}$ М. Емисиони спектри праћени су у опсегу таласних дужина од 300 - 500 nm, на таласној дужини ексцитације од 285 nm. Претходним снимањем спектара самих комплекса у фосфатном пуферу није детектована емисија истих. Идентична флуоресцентна мерења у присуству маркера, еозина (маркер за место I субдомена IIA) и ибупрофена (маркер за место II субдомена IIIA), коришћена су за прецизније дефинисање места везивања у протеину. Емисиони спектри праћени су у опсегу од 300-500 nm, а снимани су на таласној дужини ексцитације од 295 nm. У раствор еквимоларних концентрација HSA/BSA и маркера (2,0 × 10⁻⁶ M) додата је растућа концентрација испитиваних комплекса. $[O] = 0 - 2.0 \times 10^{-5}$ М за комплексе 1–15.

2.7. Мерење вискозности

Вискозност раствора DNA мерена је у присуству растуће концентрације комплекса 1–13. Време протока мерено је шест пута дигиталном штоперицом за сваки од узорака, након чега је израчунато просечно време. Резултати су представљени као зависност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ од г, где је η вискозност DNA раствора у присуству комплекса, а η_0 вискозност самог DNA раствора у фосфатном пуферу. За израчунавање је коришћено време протока раствора DNA-комплекс (t) кориговано за време протока самог пуфера $(t_0), \eta = (t - t_0)/t_0$.

2.8. Квантно хемијске методе

Оптимизација структура свих испитиваних комплекса рађена је применом хибридног функционала B3LYP¹¹⁴ у комбинацији са безисним скупом def2-SVP.¹¹⁵ Све структуре комплекса окарактерисане су као локални минимуми или прелазна стања рачунима вибрационих фреквенција на истом нивоу теорије (B3LYP/def2-SVP). Релативне енергије су рачунате на ω B97XD¹¹⁶/def2-TZVP¹¹⁵// B3LYP/def2-SVP нивоу теорије, а добијеним енергијама (ω B97XD/def2tzvp) је додата ZPE корекција (B3LYP/def2-SVP). Ефекат солватације је укључен помоћу CPCM^{117,118} модела на ω B97XD/def2-TZVP//B3LYP/def2-SVP нивоу теорије у циљу изучавања ефекта хидратације испитиваних комплекса. Сва израчунавања рађена су у GAUSSIAN09 програмском пакету.¹¹⁹

2.9. Молекулски докинг

Симулације молекулског докинга рађене су на структурама комплекса оптимизованим на начин описан у одељку 2.8. За испитивања коришћена је кристална структура B-DNA додекамера d(CGCGAATTCGCG) преузета из базе података (PDB код 1BNA).¹²⁰ Структурне координате које представљају фрагменте каноничног B-DNA (PDB: 1BNA), DNA са интеркалационом празнином (PDB: 1Z3F) и BSA (PDB: 4F5S) добијене су од Brookhaven Protein Data Bank (<u>https://www.rcsb.org</u>). Докинг симулације представљене су у крутој структури DNA и протеина додавањем флексибилних једињења, комплекса рутенијума, коришћењем Molegro Virtual Docker софтверског пакета (MVD, верзија 2013.6.0.1)¹²¹ Ради лакшег презентовања сви хетероатоми, молекули воде и лиганди уклоњени су уколико су били присутни. Докинг параметри за комплексе **1**–7: максималан број интеракција 1500, величина популације 50, праг енергије 100,00 и максималан број понављања 300. За процену интеракције испитиваних комплекса са DNA и протеинима коришћена је MVD-функција бодовања: MolDock, Docking, Rerank, Hbond и Molegro.¹²¹ Доковани положаји визуелизовани су коришћењем молекулског графичког програма CHIMERA (<u>https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/</u>).

У циљу потврђивања експериментално добијених резултата о интеракцијама комплекса 8-13 са DNA и BSA коришћени су Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) и Autodock 4.2 софтвери.¹²² Докинг параметри за комплексе 8-13: максималан број интеракција 2500, величина популације 27000, стопа мутације и укрштања од 0,02 до 0,8; коришћени су за LGA метод за праћење ригидно-флексибилне интеракције биомолекула са новосинтетисаним комплексима, односно максималан број интеракција 1500, величина популације 50, праг енергије 100,00, максималан број корака 300; коришћени су за LGA, односно MVD метод¹²¹, за праћење ригидно-флексибилне интеракције биомолекула са новосинтетисаним комплексима, као и симулације молекулског докинга, састоје се од неколико фаза, које укључују припрему лиганда, идентификацију и припрему протеина, као и формирање везе. Најпре су структуре комплекса 8-13 оптимизоване¹¹⁹ B3LYP-D3BJ методом у комбинацији са 6-311 + G(d,p) базисним скупом,^{123,124} док је за Ru примењен def2-TZVPD базисни скуп (уграђени ефективни потенцијал језгра). Структура BSA набављена је од RCSB Protein Data Bank коришћењем PDB ID: 4F5S.¹²⁵ У структури протеина само ланац А је задржан, док су ланац В, преостали атоми, хетероатоми и молекули воде уклоњени применом BIOVA Discovery Studio 4.0. Простор за претрагу BSA био је ограничен на целокупну величину мреже $60 \times 60 \times 60$ Å са густином од 0.375 A праћењем XYZ димензија које су подешене на следеће оквире појединих делова у струкри протеина: место I (субдомен IIA): 4,80 × 30,50 × 101,01; место II (субдомена IIIA): 10,91 × 16,30 × 119,72; место III (субдомена IB): $19.86 \times 33.53 \times 97.92$. Структуре каноничног B-DNA (PDB ID: 1BNA) и DNA са интеркалационом празнином (PDB ID: 1Z3F) набављене су од RCSB Protein Data Bank.^{126,120} Целокупна величина мреже била је $60 \times 74 \times 120$ Å, док је за структура 1BNA подешена на $15,81 \times 21,31 \times 9,88$ Å са густином мреже од 0.375 Å.

Структуре комплекса 14 и 15 претходно су оптимизоване помоћу B3LYP функционала^{127,128} у комбинацији са def2-SVP базисним скупом (на исти начин као до сада помињани комплекси).^{129,115} Структура каноничне B-DNA (PDB: 1BNA), DNA са интеркалационом празнином (PDB: 1Z3F) и BSA (PDB: 4F5S) добијени су из Brookhaven Protein Data Bank (<u>http://www.rcsb.org</u>). Уколико у структури

постоје лиганди, молекули воде или хетероатоми, исти су уклоњени употребом Molegro Virtual Docker (MVD, верзија 2013.6.0.1).¹²¹ Параметри докинг метода подешени су на: максималан број интеракција 1500, величина популације 50, праг енергије 100,00, и максималан број понављања 300. Величина мреже подешена је на 0.3 Å. Докинг параметри за комплексе 14 и 15: величина популације 100 и максималан број интеракција 10000. Процена интеракција проучваних комплекса са DNA/BSA описана је применом MVD- функција: MolDock, Docking и Rerank.¹²¹ Доковани положаји визуелизовани су коришћењем молекулског графичког програма CHIMERA (<u>https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/</u>).

2.9.1. Концепт дистрибуираног (енгл. smeared) моделирања

Метод коначних елемената коришћен је за генерисање рачунског модела панкреаса. Концепт дистрибуираног моделирања и Којић-евог транспортног модела коришћени су у оквиру теоријског разматрања и дефинисања концепта.^{130,131,132} Основна идеја је дефинисање посматраних домена на двакапилара и ткива. Елементарне запремине које заузимају ти домени унутар коначног елемента у интеграционим тачкама су rvdV за капиларни и $(1 - r_V)dV$ за домен ткива.¹³⁰ Присутна су међусобно зависна физичка поља: притисак и концентрација у капиларима, и притисак и концентрација унутар ткива. Посматрани домени састоје се од међућелијског простора, ћелија и органела (међусобно независни домени), са сопственом мрежом коначних елемената. Капилари и лимфни судови су представљени једнодимензионалним елементима уроњеним у међућелијски простор, у оквиру којих ти домени имају своје 1Д коначне елементе са координатним осама дуж елемената.¹³³ Све једначине потребне за моделирање дифузионог транспорта уграђене су у нумерички софтвер РАК¹³⁴ (скраћеница на српском од "Програм за Анализу Конструкција" – "Program for Structural Analysis"), софтвер који је оригинално развијен на Универзитету у Крагујевцу и BioIRC-у (Bioengineering Research and Development Center, Крагујевац, Србија). У циљу визуализације добијених резултата и приказа расподеле различитих физичких поља, користи се CAD Field & Solid, интерни алат Универзитета у Крагујевцу и BioIRC-а за 3D моделирање и визуелизацију у оквиру пре- и постпроцесирања резултата. Главна предност коришћења овог софтвера је поједностављење процеса генерисања модела и могућност визуелизације, приказа анимација и лаког анализирања резултата.

Дифузиони коефицијент (D) испитиваних једињења процењен је Stokes-Einstein-овом једначином^{135,136}:

$$\mathbf{D} = \frac{K_B T}{6\pi\eta\alpha} \tag{2}$$

где а представља полупречник испитиваних једињења, K_B је Boltzman-ова константа (1.380 x 10⁻²³ J/K), и η представља вискозитет растварача, који у случају воде (физиолошки услови) износи 8,905 × 10⁻⁴ Ра x s¹³⁷. Полупречници испитиваних једињења одређени су коришћењем софтверског пакета Gaussian16¹³⁸ и B3LYP-D3BJ у комбинацији са 6-311+G(d,p) базисним скупом за C, N, O, Cl и H и def2-TZVPD базисни скуп за Ru (уграђени ефективни потенцијал језгра)^{123,124}.

2.10. Цитотоксичност комплекса

2.10.1. In vitro испитивања

2.10.1.1. Ћелијске културе

За испитивање цитотоксичности комплекса коришћене су хумане туморске ћелијске линије: A549 (карцином плућа), MDA-MB 231 (карцином дојке), HCT116 (карцином дебелог црева) и HeLa (карцином грлића материце), туморске ћелијске линије миша: LLC1 (карцином плућа) и CT26 (карцином дебелог црева), као и ћелијске линије хуманих фибробласта плућа MRC-5 и ћелијске линије фибробласта плућа миша 3 T3. Ћелијске линије коришћене за испитивање биолошке активности комплекса рутенијума набављене су од American Type Culture Collection (ATTC, Manassas, VA, USA). Ћелије су култивисане у Dulbecco's modified Eagle's медијуму (DMEM) са 4,5% глукозе, уз суплементацију у виду 10% феталног говеђег серум албумина (FBS), L-глутамина, неесенцијалних аминокиселина, пеницилина (100 IU mL⁻¹), и стрептомицина (100 µg mL⁻¹) (Sigma), на 37 °C у атмосфери 5% CO₂ и апсолутној влажности. Ћелије су сакупљене на 70% конфлуентности коришћењем смеше 0,25% трипсин/0.53 mM EDTA, засађене на плочама за ћелијске културе са 96- или 24-отвора (Thermo Scientific, New York, NY).

2.10.1.2. MTT mecm

Способност испитиваних комплекса да редукују ћелијски раст анализира се помоћу 3-(4,5-диметилтиазол -2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромида (МТТ), односно помоћу МТТ теста. ћелијске линије засејане на плочама за ћелијске културе са 96- или 24- отвора са густином од 3×10^3 ћелија по отвору за комплексе 1-7, 5×10^5 ћелија/mL за комплексе 8-13, инкубиране су преко ноћи, а затим третитиране комплексима у широком опсегу концентрација (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, и 100 µМ за комплексе 1-7, у концентрацијама од 7,8 – 1000 µМ у случају комплекса 8-13, и 0,1, 1, 10, 50, 100 и 200 µМ за комплексе 14 и 15), или култивисане у медијуму самостално у циљу добијања контролне ћелије у току 24, 48 или 72 h. Затим је медијум одстрањен, а у сваки од отвора додато је 100 µL 3-(4,5-диметилтиазол -2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромида (МТТ, 0,5 mg mL⁻¹ PBS). Након 2 h МТТ раствор је уклоњен и замењен са 150 µL DMSO-а у циљу растварања кристала формазана. Апсорбанца је мерена у току 24 h на читачу Zenyth 3100 (Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria) на 590 nm. Сви експерименти поновљени су најмање три пута у трипликату. Цитотоксичност је рачуната на основу формуле: $(1 - A_{test}/A_{control}) \times 100. IC_{50}$ вредност, дефинисана као концентрација једињења заслужна за 50% инхибиције ћелијског раста, израчуната је применом ED50plus v1.0 софтвера.

2.10.1.3. Проточна цитометријска анализа

За анализу ћелијске смрти примењена је проточна цитомерија. Ћелијске линије засејане су на плочама са густином од 1×10^5 по отвору, инкубиране током ноћи, а затим третиране комплексима рутенијума у концентрацији која одговара IC₅₀ вредности, док су у случају контролне ћелијске линије инкубиране у медијуму самостално 48 h на 37 °C у атмосфери 5% CO₂. Ћелијске линије су затим испране PBS пуфером, а потом поново суспендоване у 200 µL пуферу (10 mM Hepes/140 mM NaCl, pH = 7,4 и 2,5 mM CaCl₂). 100 µL ћелијске суспензије са густином од 10⁵ ћелија у суду од 5 mL помешано је са 5 µL AnnexinV-FITC или 5 µL пропидијум-јодида (PI), и инкубирано 15 min на собној температури у мраку. Затим је у сваки суд додато 400 µL везујућег пуфера и анализирано помоћу Cytomics FC500 проточног цитометра (Beckman Coulter,USA), уз FlowJo.V10 софтвер.

2.10.1.4. Annexin V-FITC/7-AAD анализа

Тестирање је извршено према упутствима произвођача (Beckman Coulter, USA). Третиране и контролне ћелије испране су хладним PBS-ом, ресуспендоване у 100 μ L хладног везујућег пуфера и обојене са 10 μ L Annexin V-FITC и 20 μ L 7-AAD. Након 15 min инкубације на 4 °C у мраку, 400 μ L везујућег пуфера додато је у сваку епрувету, а анализа узорака вршена је помоћу проточне цитометрије.

2.10.1.5. Анализа протеина повезаних са апоптозом, аутофагијом и ћелијским циклусом

Сакупљене ћелије испране су PBS-ом, а затим фиксиране и пермеабилизоване помоћу Fixation and Permeabilization Kit (eBioscience). За детектовање апоптозе ћелије су инкубиране 20 min са примарним анти-Bcl-2, анти-Bax (Santa Cruz Biotech. Inc.) или са антителом против цепања каспазе-3 (Cell SignalingTechnology) на собној температури. Затим су ћелије испране PBS-ом и обојене секундарним FITC-конјугованим антителом (Abcam) 20 min на собној температури у мраку. Након испирања, ћелије су ресуспендоване у пуферу и анализиране проточном цитометријом. За анализу експресије циклина, пермеабилизоване ћелије обојене су анти-циклинимам D-FITC, A2-FITC, E-PE и B1-APC, док су за детекцију аутофагије третиране са анти-p62-FITC моноклонским антителом (Abcam). Након 20 min инкубације, ћелије су испране и коначно суспендоване у PBS пуферу. Експресије Bcl-2, Bax, циклина и p62, представљене средњим интензитетом флуоресценције (MFI), и проценат ћелија које експримирају цепану каспазу-3 представљени су употребом FlowJo.V10.

2.10.1.6. Детекција и кванитификација аутофагије

Сакупљене ћелије испране су PBS пуфером, обојене помоћу 1 µg mL⁻¹ акридин-наранџастог и инкубиране 15 min у мраку. Ћелије су затим испране, ресуспендоване у 300 µL PBS пуферу и анализиране проточном цитометријом. Резултат је представљен у процентима црвених/зелених ћелија.

2.10.1.7. Анализа ћелијског циклуса

Издвојене ћелије испране су PBS пуфером и дистрибуиране у хладном 70% етанолу преко ноћи. Затим су ћелије испране, ресуспендоване у PBS пуферу који садрже 500 µg mL⁻¹ RNaseA и инкубиране 30 min на 37 °C. Коначно, ћелије су обојене помоћу 5 µL PI (10 mg mL⁻¹), инкубиране у мраку 15 min и анализиране. Садржај DNA дефинисан је помоћу FlowJo.V10, а дистрибуција ћелија представљена је хистограмом.

2.10.2. Антимикробна активност

Антимикробна активност комплекса 8–13 тестирана је на пет врста бактерија: Bacillus subtilis (ATCC 6633), Staphylococcus aureus (ATCC25923), Proteus mirabilis (ATCC 12453), Klebsiella pneumoniae (ATC70063) и Escherichia coli (ATC25922), као и на пет врста гљивица: Fusarium solani (ATC36031), Trichoderma viride (ATCC13233), Penicillium italicum (ATCC 10454), Mucor mucedo (ATCC 20094) и Aspergillus niger (ATCC 16888).

За одређивање минималне концентрације потребне за инхибицију (MIC) коришћен је микротитарски тест са 96-јама и ресазурином као индикатором ћелијског раста.¹³⁹ Почетни раствори испитиваних једињења добијени су растварањем комплекса у 5% DMSO-у. Затим су припремане серије двоструких разблажења у стерилним плочицама са 96 јама, уз Mueller-Hinton подлогу за бактеријске културе или Sabouraud декстрозне подлоге за гљивичне културе. Потом су бактерије и гљивице додате у одговарајуће јаме, и коначно раствор ресазурина. Тако припремљене плочице инкубиране су на 37 °C у периоду од 24 h за бактерије и 72 h на 28 °C за гљивице. МIC је дефинисана визуелном проценом као минимална концентрација испитиваних једињења која доводи до промене боје ресазурина из плаве у ружичасту. За гљивице MIC вредност испитиваних једињења дефинисана је као минимална

концентрација која доводи до видљиве инхибиције раста мицела. Стрептомицин (за бактерије) и кетокеназол (за гљивице) коришћени су за упоређивање, а претходно је проверен и утицај коришћеног растварача, 5% DMSO-а, на раст миркоорганизама.

2.10.3. Антиоксидативна активност

Активност уклањања слободних радикала помоћу комплекса **8–13** испитивана је помоћу 1,1-дифенил-2-пикрил-хидразил (DPPH), претходно публикованом методом.¹⁴⁰ 2 mL раствора DPPH радикала у метанолу (0,05 mg/mL) и 1 mL испитиваног једињења (1000, 500, 250 и 125 mg/mL) додато је у кивете. Смеша је снажно промућкана и остављена да стоји на собној температури 30 min. Раствор DPPH је првобитно љубичаст, али након донирања водоника од стране антиоксиданата бледи. Промена боје праћена је спектрофотометријски на 517 nm. За упоређивање, односно контролу, коришћена је аскорбинска киселина. Концентрација DPPH израчуната је коришћењем једначине: ефекат уклањања DPPH (%) = $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$, где је A_0 апсорбанца негативне контроле (сачињена од свих реакционих агенаса изузев тестираних једињења), а A_1 апсорбанца реакционе смеше.

2.10.4. In vivo испитивања

In-vivo испитивања цитотоксичности комплекса рутенијума рађена су за комплексе 9 и 12.

За експерименте су одабрани C57BL/6 мишеви исте тежине, старости осам до десет недеља, чувани у стандардним условима. Сви експерименти одобрени су и спроведени у складу са упутствима Етичког одбора за животиње, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Србија.

C57BL/6 миш третиран је са 5×10^4 LLC1 субкуталним инјектирањем. Мишеви су затим случајним одабиром одвојени у 4 групе са по 5 мишева унутар сваке. Након 15 дана, LLC1 ћелије су деловале и тумори су били опипљиви. Прва група третирана је комплексом 9, друга комплексом 12, трећа цисплатином, док је четврта третирана физиолошким раствором. Мишеви су третирани са концентрацијом од 5 mg/kg телесне масе у шест доза, по три дозе недељно, док су 26-ог дана од инјектирања жртвовани.

Величина примарног LLC1 тумора мерена је морфометријски у две димензије коришћењем калипера. Формула коришћена за дефинисање величине тумора (mm³) = L (већа оса тумора) × W(мања оса тумора)²/2.

Ткиво канцера плућа уситњено је на ситне делове и уроњено у парафин, фиксирано 4% параформалдехидом, монтирано на стаклене плочице и обојено са хематоксилином и еозином. Применом светлосног микроскопа мале снаге опремљеног дигиталном камером испитано је постојање метастаза на стакленим плочицама.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

Ť

HO

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

3.1. Ru(II) полипиридил комплекси 1-7

3.1.1. Синтеза и карактеризација комплекса

Серија нових мононуклеарних Ru(II) комплекса опште формуле *mer*-[Ru(L₃)(*N*-*N*)Cl]Cl, где је L₃ 2,2':6',2"-терпиридин (tpy) или 4'-(4-хлорофенил)-2,2':6',2"-терпиридин (Cl-Ph-tpy), док је *N*-*N o*-бензохинондиимин (*o*-bqdi), 2,3-нафтохинондиимин (nqdi), 4,4'-диметил-2,2'-бипиридин (dmbpy) или 2,2'-бипиридин-4,4'-дикарбоксилна киселина (dcbpy), је синтетисана. Процедура синтезе комплекса приказана је у оквиру Схеме 3.1.1.1, а структурне формуле комплекса **1-7** приказане су на Слици 3.1.1.1. Комплекси **1–7** добијени су у различитом приносу у облику хлоридних соли стабилних на ваздуху, полазећи од неутралног Ru(III) прекурсора, *mer*-[Ru(tpy)Cl₃] или *mer*-[Ru(Cl-Ph-tpy)Cl₃], уз додатак одговарајућег хелатног лиганда. Ru(II) комплекси са хинондиимином (nqdi, комплекс **5**), добијени су у реакцији одговарајућег Ru(III) прекурсора са лигандима *o*-фенилендиамин (*o*-pda) или 2,3-диаминонафтален (dan) захваљујући чијим редокс својствима долази до оксидације амина у имине. Добијени комплекси окарактерисани су елементалном анализом, као и низом спектроскопских метода, као што су IR, UV-Vis, ¹H NMR, ¹³C NMR и ESI-MS. Ru(II)-tpy комплекс **1** раније је синтетисан, али је у овом раду коришћен у циљу поређења.³⁹



Схема 3.1.1.1. Приказ синтезе комплекса 1–7. Реагенси и услови: (a) tpy или Cl-Ph-tpy, EtOH, рефлукс; (б) N-N (1,2 eq.; N-N = o-bqdi, nqdi, dmbpy, dcbpy), EtOH/H₂O (3:1), Et₃N (3,0 eq.), LiCl (10,0 eq.), рефлукс.

У ¹Н NMR спектрима мононуклеарних Ru(II)-tру комплекса (1–7) уочавају се сигнали типични за резонантне структуре ароматичних фрагмената tру и Cl-Ph-tpy лиганада, као и сигнали који потврђују присуство *N-N* бидентатних ароматичних лиганада. У ¹Н NMR спектрима комплекса **1**, **2** и **5** са бидентатним хелатним лигандима, *o*-bqdi или nqdi, запажамо сигнале који потичу од једне половине протона поменутих лиганада. Наиме, сигнали половине протона аксијално координованих лиганада знатно су померени у односу на одговарајуће симетричне протоне друге половине (δ (N1H) 13,84 у поређењу са δ (N2H) 11,78 ppm за комлекс **1**, затим δ (N1H) 14,40 у поређењу са δ (N2H) 13,60 ppm за комплекс **2** и δ (N1H) 13,94 у поређењу са δ (N2H) 12,03 ppm за комплекс **5**), због заштитног утицаја tру или Cl-Ph-tpy лиганда. NH протони хелатних лиганада у спектрима уочавају се као два синглета прилично удаљена један од другог. Ови сигнали одликују се високим фреквенцама типичним за иминске протоне, чиме је потврђена структура хелатних лиганада, тј. диимина. Идентична појава је у литератури описана код комплекса [Ru(Cl-Ph-tpy)(*o*-bqdi)Cl]Cl, као и других њему сличним.³⁹

Очекивано, ¹³С NMR спектри комплекса 1, 2 и 5, како у CD_3OD тако и у DMSO-d⁶, потврдили су присуство симетричних tpy и Cl-Ph-tpy лиганада, као и нееквивалентних угљеникових атома у *o*-bqdi или nqdi.



Слика 3.1.1.1. Структурне формуле комплекса 1-7

У ¹Н NMR спектрима комплекса **3**, **4**, **6** и **7**, који садрже супституисан bpy, може се уочити дублет значајно померен ка вишим вредностима хемијског померања типичан за Н6 протон пиридина који је

у *cis* положају у односу на координовани хлорид, а одговара H6 протону екваторијално постављеног пиридина у bpy лиганду. Даље, протони аксијално постављеног пиридина знатно су померени ка нижим вредностима хемијског померања у поређењу са другим пиридином (δ (CgH) 7,08 у односу на δ (CbH) 7,90 ppm за комплекс **3**), због заштитног ефекта tpy и Cl-Ph-tpy. У спектрима комплекса **3** и **6** издвајају се два интензивна синглета (на 2,73 и 2,30 ppm за комплекс **3**, као и на 2,75 и 2,31 ppm за комплекс **6**) који одговарају протонима метил група на bpy лиганду. Слично понашање запажено је и у случају [Ru(Cl-tpy)(bpy)Cl]Cl и [Ru(Cl-Ph-tpy)(bpy)Cl]Cl комплекса.^{38,42}

У ¹³С NMR спектрима комплекса **3**, **4**, **6** и **7**, како у CD₃OD тако и у DMSO-d⁶, детектовани су сигнали који указују на присуство симетричних tру или Cl-Ph-tpy лиганада, као и нееквивалентних угљеникових атома у dmbpy или dcbpy.

IR спектри комплекса 1–7 показују присуство трака карактеристичних за терпиридинске лиганде: ароматичне вибрације С–Н везе у области од 3112–2916 сm⁻¹ и типичан јак сигнал у области од 1366–1607 сm⁻¹ који потиче од симетричних вибрација v(C=N) и v(C=C) везе. IR спектри комплекса 1, 2 и 5 показују јак сигнал у области 3466–3412 сm⁻¹ који потиче од N–Н вибрација bqdi и nqdi лиганада.

Апсорпциони спектри комплекса 1–7 типични су за рутенијум полипиридил комплексе. Интензивни пикови у UV области (273–318 nm) одговарају $\pi \rightarrow \pi^*$ прелазима. У видљивом делу спектра (497–517 nm) апсорпциони максимуми одговарају метал-лиганд $d\pi(Ru) \rightarrow \pi^*(полипиридил)$ прелазима.^{141,142} Добијени апсорпциони максимуми за Ru(II)-tpy комплексе у сагласности су са до сада публикованим вредностима.¹⁴³

3.1.2. Стабилност комплекса у воденом раствору

Како је циљ ових испитивања синтеза нових комплекса рутенијума са потенцијалном антитуморском активношћу, било је неопходно испитати понашање комплекса у физиолошким условима. Комплекси 1–7 су након растварања у малој количини метанола разблажени до концентрације од 1 \times 10⁻⁴ M, а затим анализирани у периоду од 24 h применом UV-Vis спектрофотометрије. У спектрима комплекса 1–7 запажено је смањење апсорпционог максимума које се приписује хидролизи хлоридног јона у Ru(II) комплексу. Хидролиза хлоридо комплекса 1–7 до одговарајућих аква врста праћена је метал-лиганд прелазима кроз стабилизацију d π орбитала рутенијума. На основу добијених спектара закључујемо да до хидролизе комплекса рутенијума долази како у води (Слика 3.1.2.1), тако и у физиолошким условима (Слика 3.1.2.2). Такође, добијени резултати су у складу са резултатима за сличне Ru-tpy комплексе, [Ru(Cl-Ph-tpy)(phen)Cl]Cl и [Ru(Cl-Ph-tpy) (*o*-bqdi)Cl]Cl, код којих је потврђено постојање аква врста.³⁹





Слика 3.1.2.1. UV-Vis спектри комплекса 1-7 у води у периоду од 24 h. $[Ru(II)] = 1 \times 10^{-4} M$, T = 298 K.





Слика 3.1.2.2. UV-Vis спектри комплекса 1–7 у 10 mM PBS пуферу у периоду од 24 h. [Ru(II)] = 1×10^{-4} M, T = 298 K.

3.1.3. Утицај супституената и ароматичности на реактивност комплекса

Познато је да рутенијум комплекси могу бити активирани супституцијом монодентатних лиганада молекулима воде. Овај процес дозвољава централном металном јону да се интрацелуларно координује за важне биомолекуле, као што су DNA, протеини и друге биолошке мете. Понашање Ru(II) комплекса у процесима супституције је од велике важности за њихову потенцијалну биолошку активност и примену.

У претходних пар година фокус наших испитивања су рутенијум комплекси меридијалне геометрије са tру или 4'-супституисаним tру лигандом. Проучавана је кинетика супституционих реакција комплекса *mer*-[Ru(L₃)(*N*-*N*)X]⁺, где је L₃ = 2,2':6',2"-терпиридин са супституентом у положају 4', док је *N*-*N* бидентатни лиганд са различитим електронским и стерним особинама (en, dach, bpy, phen или *o*-bqdi).^{39,38,45} Главни циљ испитивања био је дефинисање утицаја супституената и ароматичности тридентатних и бидентатних лиганада на брзину супституције монодентатних лиганада. Након низа изведених експеримената утврђен је утицај природе инертног хелатног лиганда, као и улазног нуклеофила, на брзину супституције. Дакле, структура координационе сфере, избор бидентатног лиганда према броју пиридинских прстенова или врсти супституената на пиридинском прстену у великој мери утичу на реактивност Ru(II)-tpy комплекса.

Проучаване су супституционе реакције Ru(II) комплекса који у својој структури поседују 4,4'-супституисани bpy (dmbpy и dcbpy), као и хинондиимин 2,3-нафтохинондиимин (*o*-bqdi). Кинетика супституционих реакција проучавана је применом електронске апсорпционе спектроскопије у видљивом делу спектра, праћењем промене апсорбанце на претходно дефинисаној таласној дужини, која одговара максималној промени апсорбанце у функцији од времена.

Супституционе реакције Ru(II) комплекса са важним биомолекулима могу се представити једначином (3):

$$[\operatorname{Ru}(\operatorname{L}_3)(N-N)\operatorname{H}_2\operatorname{O}]^{2+} + \operatorname{Nu} \xrightarrow{k} [\operatorname{Ru}(\operatorname{L}_3)(N-N)\operatorname{Nu}]^n + \operatorname{H}_2\operatorname{O}$$
(3)

 $(L_3) = tpy, Cl-Ph-tpy; N-N = o-bqdi, nqdi, dmbpy, dcbpy; Nu = 5'-GMP, L-Cys, L-Met.$

Супституционе реакције праћене су у зависности од концентрације улазног нуклеофила. Графици зависности *k*_{obsd} од концентрације улазног нуклеофила су без одсечка на *y*-оси за све испитане комплексе (Слика 3.1.3.1.). Узимајући у обзир претходно поменуто, константа брзине *k* може се добити из нагиба праве добијене на основу једначине (4):

$$k_{obsd} = k[\mathrm{Nu}] \tag{4}$$





Слика 3.1.3.1. Константа брзине реакције pseudo-првог реда у функцији од концентрације нуклеофила за супституционе реакције комплекса 1–7 са нуклеофилима 5'-GMP, L-Cys и L-Met.

Добијене вредности константи брзине *k* сумиране су у Табели 3.1.3.1. Кинетика супституционих реакција комплекса **1** са одговарајућим нуклеофилима праћена је на три различите температуре у циљу дефинисања вредности термодинамичких активационих параметара. Применом Eyring-ове једначине (5) добијене су вредности за $\Delta H^{\neq} = 56 \pm 2$, 51 ± 4 , 41 ± 2 [kJ mol⁻¹] и $\Delta S^{\neq} = -71 \pm 6$, -98 ± 13 , -133 ± 6 [J K⁻¹ mol⁻¹].^{144,145}

$$ln(\frac{k}{T}) = ln\left(\frac{R}{N \times h}\right) + \frac{\Delta S^{\neq}}{R} - \frac{\Delta H^{\neq}}{RT}$$
(5)

Негативне вредности ентропије активирања указују да се супституција у испитиваном комплексу одиграва по асоцијативном механизму (A) или по механизму измене асоцијативног карактера (Ia).^{146,147} На основу добијених резултата реактивност испитиваних комплекса опада у низу 5 > 7 > 6 > 1 > 2 > 4 > 3. Наиме, хлорофенил супституент у положају 4'-терпиридина има јак електронпривлачни ефекат на сам tpy, а потом и на јон метала смањујући електронску густину, односно повећавајућу његову електрофилност. Управо овај ефекат проузрокује већу реактивност хлорофенил-tpy комплекса 5–7 у поређењу са tpy комплексима 1–4. Увођење неког електрон-донорског супституента у ароматични лиганд (bpy) углавном повећава електронску густину на самом лиганду, која се потом индуктивним ефектом преноси и на јон метала. Повећање електронске густине самог металног јона узрокује редуковану реактивност и смањење одговарајуће константе брзине реакције супституције. На основу претходно наведеног објашњавамо већу реактивност комплекса 4 и 7, са dcbpy, у односу на комплексе 3 и 6, са dmbpy у структури.

Процес супституције Ru(II) комлекса зависи и од природе улазног лиганда, тачније нуклеофила. Из тог разлога се посебан фокус ставља на одабир нуклеофила, тачније на његове електронске и стерне особине. Међу нуклеофилима одабраним за ове експерименте нарочито се издваја *N*-донорски 5'-GMP који је показао значајну реактивности, што је последица тврдо-меких карактеристика јона метала и нуклеофила. У групи *S*-донорских лиганада већа реактивност L-Cys у односу на L-Met објашњава се присуством волуминозне метил групе у молекулу L-Met, која отежава прилаз и координацију преко атома сумпора.

Комплекс	t [°C]	k [M ⁻¹ s ⁻¹]			
		L-Met	L-Cys	5'-GMP	
	15	$0,\!14\pm0,\!01$	$0,\!15\pm0,\!01$	$0,\!70\pm0,\!01$	
1 (<i>o</i> -bqdi)	25	$0,\!35\pm0,\!03$	$0,\!43\pm0,\!03$	$1,5\pm0,0$	
	37	$0{,}51\pm0{,}03$	$0,\!69\pm0,\!06$	$3,9 \pm 0,2$	
2 (nqdi)	37	$0{,}26\pm0{,}02$	$0,\!30\pm0,\!02$	$0,51 \pm 0,03$	
3 (dmbpy)	37	$0{,}09\pm0{,}01$	$0,\!11 \pm 0,\!01$	$0,\!16 \pm 0,\!01$	
4 (dcbpy)	37	$0,\!34 \pm 0,\!01$	$0,\!44\pm0,\!02$	$0,\!66\pm0,\!08$	
5 (nqdi)	37	$1,6 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,4$	$14,0\pm0,9$	
6 (dmbpy)	37	$0{,}64 \pm 0{,}08$	$2,7 \pm 0,2$	$9,5 \pm 0,6$	
7 (dcbpy)	37	$0{,}91\pm0{,}06$	$2,9 \pm 0,2$	$11,2 \pm 0,9$	

Табела 3.1.3.1. Константе брзине реакција супституције комплекса 1–7 и нуклеофила са 5'-GMP, L-Cys и L-Met.

Van Eldik је са својом истраживачком групом испитивао Ru(II)-tpy комплексе опште формуле $[Ru(tpy)(N-N)(H_2O)]^{2+},$ = где je N-Nen, 2-(аминометил)пиридин(ampy), N.N.N'.N''тетраметилетилендиамин (tmen), bpy или phen, за које је, у зависности од врсте бидентатног лиганда, потврђен редослед реактивности phen \leq bipy \approx tmen < ampy < en. Наиме, установљен је велики утицај бидентатних лиганада који низом електронских и стерних ефеката могу значајно повећати електрофилност Ru(II) јона, али и променити његову природу у смеру мање инертног Ru(III). Занимљиво је да иста група истраживача, приликом испитивања супституционих реакција ових комплекса са тиоуреом, није добила линеарну зависност константе брзине од концентрације нуклеофила, што је објашњено механизмом супституције који укључује корак у коме долази до формирања прекурсора, након чега долази до спорог процеса замене лиганада. 148,149,150

У циљу испитивања релативне стабилности и термодинамичких карактеристика комплекса 1–7 применом компјутерских метода формирани су модели и конструисан је модел једначине (6):

[комплекс 1-Y] + [комплекс X-L]
$$\rightarrow$$
 [комплекс 1-L] + [комплекс X-Y] (6)

где су све енергије комплекса (X = 2, 3, 4, 5, 6 и 7) израчунате у односу на комплекс 1 у два различита случаја ($X = H_2O$ и Cl⁻), у њиховим аква и хлоридо врстама. Резултати добијени уметањем формираних модела у једначину представљени су у Табели 3.1.3.2. Проучавањем замене хлоридо лиганда улазним лигандом добијене су вредности енергија E1 и E2, које указују на већу термодинамичку стабилност комплекса 2–7 у односу на комплекс 1. Овакво понашање комплекса може се објаснити супституцијом негативног хлоридо лиганда неутралним нуклеофилом, након чега комплекси остају са вишком позитивног наелектрисања, које поменути волуминознији комплекса 1 са стабилношћу комплекса 4 и 7, у случају Gua као нуклеофила, установљена је већа стабилност продукта 1-Gua, што је последица формирања интрамолекулске водоничне везе између Gua и инертног лиганда у комплексу 1 (Слика 3.1.3.2.).



Слика 3.1.3.2. Добијена (*RB3LYP/def2-SVP*) структура 1-Gua комплекса са представљеном водоничном везом.

Након супституције молекула воде помоћу нуклеофила као што су L-Cys, L-Met или 5'-GMP наелектрисање комплекса остаје непромењено. У случају Gua као нуклеофила примећене су значајне негативне вредности енергије, које указују на важност формираних интрамолекулских водоничних веза у случају комплекса **1**.

		Хлоридни облик			Аква облик		
Комплекс	Нуклеофил	E1	E2	E3	E 1	E2	E3
	HSCH ₃	1,52	0,42	-1,77	-1,00	-1,59	-1,30
2	$S(CH_3)_2$	1,58	0,51	-1,45	-0,94	-1,50	-0,98
	Gua	1,08	0,86	-0,37	-1,44	-1,15	0,10
	HSCH ₃	7,30	8,45	2,21	-0,74	0,10	0,17
3	$S(CH_3)_2$	7,02	8,35	2,40	-1,02	0,00	0,35
	Gua	-0,92	2,59	-0,49	-8,96	-5,76	-2,53
	HSCH ₃	2,68	3,76	0,71	-0,74	0,21	-0,10
4	$S(CH_3)_2$	2,32	3,48	0,69	-1,09	-0,08	-0,13
	Gua	-4,34	-0,77	-1,10	-7,75	-4,33	-1,92
	HSCH ₃	4,25	2,51	-1,88	-1,05	-1,36	-1,01
5	$S(CH_3)_2$	4,72	3,50	-1,16	-0,58	-0,37	-0,28
	Gua	2,97	2,14	-0,58	-2,33	-1,72	0,29
	HSCH ₃	9,85	10,29	1,90	-0,74	0,16	0,23
6	$S(CH_3)_2$	9,35	10,21	2,22	-1,25	0,08	0,54
	Gua	0,85	3,99	-0,52	-9,74	-6,14	-2,19
	HSCH ₃	5,29	5,58	0,25	-0,88	0,00	-0,26
7	$S(CH_3)_2$	4,86	5,34	0,37	-1,31	-0,24	-0,14
	Gua	-2,59	0,47	-1,51	-8,76	-5,11	-2,02

Табела 3.1.3.2. Израчунате вредности релативних стабилности (in kcal mol^{-1}) за дати модел једначине (6)

 $E_1\text{-}RB3LYP/def2\text{-}SVP + ZPE(B3LYP/def2\text{-}SVP)$

 E_2 -R ω B97XD/def2-TZVP + ZPE(B3LYP/def2-SVP)

 E_3 - R ω B97XD(CPCM)/def2-TZVP + ZPE(B3LYP/def2-SVP)

3.1.4. Интеракције комплекса са DNA

Иако механизам деловања комплексног једињења на путу своје терапеутске примене није још увек до детаља разјашњен, претпоставља се да је у питању сложен механизам интеракције са низом биомолекула. Управо због тога, циљ наших испитивања био је детаљан увид у интеракције са биолошки важним молекулима за које се претпоставља да су мете рутенијум комплекса. Испитивања су започета проучавањем интеракција са DNA, која се сматра једним од основних мета рутенијум комплекса, применом низа метода, као што су: UV-Vis спектрофотометрија, флуоресцентна спектроскопија и мерење вискозности.^{151,152,153}

3.1.4.1. Испитивање интеракција електронском апсорпционом спектроскопијом

Комплекси прелазних метала могу се везати за DNA ковалентном везом, везивањем за мали жљеб, везивањем за велики жљеб, електростатичким интеракцијама и/или интеркалацијом.¹⁵⁴ Интеракције комплекса **1–7** са DNA најпре су проучаване применом UV-Vis спектрофотометрије, додавањем растуће концентрације DNA у раствор сталне концентрације комплекса. Додатак растуће концентрације DNA проузрокује хиперхромизам главног апсорпционог пика и указује на присуство интеракције испитиваних комплекса са DNA молекулом.

Константа везивања, K_b , израчуната је на основу једначине (7) и графика зависности [DNA]/($\varepsilon_b - \varepsilon_f$) од [DNA] за сваки комплекс појединачно. Добијене вредности константи представљене су у Табели 3.1.4.3.1.

$$[DNA]/(\varepsilon_{A} - \varepsilon_{f}) = [DNA]/(\varepsilon_{b} - \varepsilon_{f}) + 1/[K_{b}(\varepsilon_{b} - \varepsilon_{f})]$$
(7)

Добијене високе вредности константи везивања за све испитиване комплексе, реда величине 10^{4} – 10^{5} , указују на остварену везу комплекса са DNA хеликсом, уз претпоставку да је реч о везивању за жљеб DNA и/или интеркалацији.¹⁵⁵ Највећа вредност константе везивања добијена је у случају комплекса 4 (dcbpy), што потврђује велики утицај природе супституента на bpy лиганду. За комплексе опште формуле $[Ru(Cl-Ph-tpy)(N-N)Cl]^+$, где је N-N = en, dach или bpy, добијене су вредности константе $K_{\rm b}$ реда величине $10^5 - 10^6 \,{
m M}^{-1}$, сврставајући их у групу једињења која се везују за мали жљеб DNA ланца.¹⁵² Такође, вредности константи изнад 10⁴ М⁻¹ добијене су за интеркалаторе као што су (ptan = 3-(1,10-фенантролин -2-ил)-ас-триазино комплекси опште формуле $[Ru(tpy)(pta)]^{2+}$ $[Ru(tpy)(ptp)]^{2+}$ = 3-(1,10-фенантролин-2-ил)-ас-триазино [5,6-f]аценафтилен) И (ptp [5,6-f]фенантрен).¹⁵⁵ Сличне вредности константе K_b (10⁴ M⁻¹) добијене су и за комплексе [Ru(Cl-tpy)(en/dach)Cl]⁺ и [Ru(Cl-Ph-tpy)(phen/bqdi)Cl]⁺, те су и они сврстани у групу интеркалационих агенаса.³

3.1.4.2. Испитивање интеракција мерењем флуоресценције у присуству ЕВ

Једињења која се за DNA везују интеркалацијом способна су да из DNA-EB адукта у потпуности истисну EB и замене га. Са друге стране, једињења која се везују за жљебове DNA способна су за делимичну замену EB у поменутом адукту, што се може детектовати променама у емисионом спектру.^{153,156}

У циљу дефинисања начина везивања Ru(II) полипиридил комплекса за DNA молекул, интеракције комплекса са DNA праћене су у присуству интеркалационог агенса 3,8-диамино-5-етил-6-фенилфенантридинијум бромид (EB) применом флуоресцентне спектроскопије. Додатком растуће концентрације комплекса 1–7 у раствор у коме је раније формиран DNA-EB адукт, примећено је значајно смањење интензитета емисије на 612 nm (Слика 3.1.4.2.1.). Применом Stern-Volmer-ове једначине (8) и одговарајућег графика зависности (Слика 3.1.4.2.1.) добијене су вредности Stern-Volmer-ове константе, K_{sv} , приказане у Табели 3.1.4.3.1.
$$I_0/I = 1 + k_q \tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q]$$
(8)

Добијене ниске вредности Stern-Volmer-ових константи, реда величине 10^3-10^4 , указују да комплекси 1–7 делимично истискују интеркалациони агенс из DNA ланца. Такође, израчунате вредности су у складу и са вредностима добијеним за друге Ru(II)-4'-Cl-Ph-tpy комплексе за које је утврђено везивање за жљеб DNA ланца.⁴² На основу свега наведеног може се закључити да се комплекси 1–7 везују за мали жљеб DNA и/или делимичном интеркалацијом.





Слика 3.1.4.2.1. Емисиони спектри ЕВ везаног за DNA након додатка растуће концентрације комплекса 1–7. [EB] = 28,6 μ M, [DNA] = 28,6 μ M; [Ru] = 0–57,2 μ M; λ_{ex} = 527 nm. Стрелица показује промену интензитета флуоресценције. Уметнути графици: Stern-Volmer-ов график EB-CT DNA за комплексе 1–7.

3.1.4.3. Испитивање интеракција мерењем флуоресценције у присуству Hoechst 33258

Познато је да се комплекси рутенијума иницијално везују за DNA неким од нековалентних типова везивања, а потом долази до ковалентног везивања за атоме азота у гуанину.¹⁰⁸

Да би се утврдила способност везивања комплекса 1–7 за жљебове DNA изведена су флуоресцентна мерења уз индикатор везивања за жљеб DNA ланца Hoechst 33258 ((2-(4-хидроксифенил)-5-[5-(4-метилпиперазин-1-ил)бензимидазо-2-ил]-бензимидазол).¹⁵³ Праћена је промена интензитета емисије на 490 nm претходно формираног DNA-Hoechst адукта, након додатка растуће концентрације комплекса 1–7 (Слика 3.1.4.3.1.).





Слика 3.1.4.3.1. Флуоресцентни спектри Hoechst-CT DNA адукта по додатку растуће концентрације комплекса 1–7 у 10 mM PBS пуферу. Стрелица показује промену интензитета флуоресценције. Уметнути графици: Stern-Volmer-ов график Hoechst-CT DNA за комплексе 1–7.

У Stern-Volmer-овим графицима, $I_0/I= f([Q])$, уочена је линерна зависност за сваки комплекс појединачно. Добијене вредности Stern-Volmer-ових константи, K_{sv} , израчунате на основу једначине (8) представљене су у Табели 3.1.4.3.1. На основу ових вредности може се потврдити способност испитиваних комплекса да замене Hoechst у DNA ланцу, те да се стога могу везати за DNA молекул интеркалацијом и/или везивањем за мали жљеб ланца. Нешто више вредности константи K_{sv} у случају замене Hoechst указују на већу тенденцију везивања комплекса 1–7 за мали жљеб.

Комплекс	Kb [M ⁻¹]	K _{sv} ^a [M ⁻¹]	K _{sv} ^b [M ⁻¹]
1	$(2,3\pm 0,2) imes 10^4$	$(8,5\pm 0,4) imes 10^3$	$(0,9\pm 0,1) imes 10^4$
2	$(1,0\pm 0,1) imes 10^5$	$(1,50\pm0,06) imes10^4$	$(8,8\pm 0,4) imes 10^4$
3	$(3,4\pm 0,3) imes 10^5$	$(4,2\pm 0,5) imes 10^3$	$(4,2\pm 0,3) imes 10^4$
4	$(3,8\pm 0,5) imes 10^5$	$(6,1\pm 0,7) imes 10^3$	$(2,0\pm 0,2) imes 10^4$
5	$(2,5\pm 0,2) imes 10^5$	$(4,2\pm 0,3) imes 10^4$	$(4,5\pm 0,3) imes 10^4$
6	$(1,0\pm 0,1) imes 10^5$	$(8,70\pm0,08) imes10^4$	$(9,0\pm 0,2) imes 10^4$
7	$(3,3\pm 0,8) imes 10^5$	$(2,4\pm 0,7) imes 10^4$	$(8,5\pm 0,4) imes 10^4$

Табела 3.1.4.3.1. Константе везивања комплекса за DNA (K_b) и Stern–Volmer-ове константе (K_{sv}) за комплексе 1–7 у случају формираних EB–DNA и Hoechst–DNA адукта.

^а Stern–Volmer-ове константе (K_{sv}) за EB–DNA.

^b Stern–Volmer-ове константе (K_{sv}) за Hoechst–DNA.

3.1.4.4. Вискозиметријска мерења

Познато је да оптичке методе нису довољне за прецизно дефинисање начина везивања једињења за DNA. Из тог разлога су претходна испитивања допуњена хидродинамичком методом, односно мерењем вискозности.

Везивање комплекса за DNA интеркалацијом огледа се у повећању вискозности раствора DNA. Са друге стране, делимична интеркалација или нековалентно везивање доводи до смањења вискозности, а електростатичко или везивање за жљебове нема утицаја на вискозност раствора DNA.^{157,158} Додавањем растуће концентрације комплекса 1–7 у раствор DNA уочено је благо повећање вискозности. Како су претходна флуоресцентна мерења са ЕВ и Hoechst указивала на везивање за мали жљеб и/или интеркалацијом, добијена промена вискозности раствора DNA по додатку комплекса 1–7 приписана је везивању за мали жљеб (Слика 3.1.4.4.1.)



Слика 3.1.4.4.1. *Релативна вискозност* $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ *СТ DNA* (0,01 mM) *у* 10 mM PBS *у* присуству растуће концентрације комплекса 1–7 (г).

Добијени резултати су у сагласности са публикованим резултатима добијеним у случају комплекса $[Ru(phen)_3]^{2+}, ^{158} [Ru(phen)_2(Hcdpq)]^+, ^{159} [Ru_2(bpy)_4(btb)]^{4+}$ (btb = 2,2-*bis*(1,2,4-триазин-3-ил)-4,4'-бипиридин), $[Ru_2(bpy)_4(btapb)]^{4+}$ (btapb = 2,2-*bis*(1,2,4-триазино[5,6-f]аценафтилен-3-ил)-4,4'-бипиридин), и $[Ru_2(bpy)_4(bdptb)]^{4+}$ (2,2'-*bis*(5,6-дифенил -1,2,4-триазин-3-ил)-4,4-бипиридин), ^{160,161} који се у литератури наводе као агенси везивања за мали жљеб DNA хеликса.

3.1.5. Интеракције комплекса са хуманим серум албумином (HSA)

Хумани серум албумин један је од најзаступљенијих протеина крвне плазме. Његов значај огледа се у транспорту лекова до места фармаколошког деловања, због чега је од велике важности испитивање способности комплекса рутенијума да управо са овим протеином образују стабилна једињења, помоћу којих би било могуће њихово допремање до места примене.

Флуоресцентна мерења коришћена су и за проучавање афинитета лиганада L1 (*o*-pda), L2 (dan), L3 (dmbpy), L4 (dcbpy) и комплекса 1–7 да се вежу за један од најважнијих протеина крвне плазме, HSA. Везивање за протеин доводи до промена у окружењу Тгр у структури протеина, које се може пратити смањењем интензитета емисионог пика у спектру протеина након додатка растуће концентрације једињења чија се активност испитује, у нашем случају лиганада или комплекса. Применом Stern-Volmer-ове једначине (8) и графика добијене су вредности константе *K*sv које су заједно са константама гашења флуоресценције представљене у Табели 3.1.5.1.1. Добијене вредности константи указују на остварену везу комплекса 1–7 са протеином. Наша истраживачка група раније је потврдила ковалентно везивање L-His у протеину и Ru(II) јона везаног за 4'-Cl-Ph-tpy лиганд. 108,162

Параметри, као што су константа везивања K_b , и број места везивања у протеину n, добијени су из Scatchard-ове једначине (9) и одговарајућег графика.

$$\log(I_0-I/I) = \log K_b + n\log[Q]$$
(9)

Израчунате вредности константе везивања K_b за сваки од комплекса реда су величине 10^4 , уз нешто веће вредности за Cl-Ph-tpy комплекс 7 (dcbpy) и tpy комплекс 4 (dcbpy), које указују на умерено јаку везу комплекса са протеином. Веома ниске вредности константе везивања K_b за Cl-Ph-tpy комплекс 5 (nhdi) и за tpy комплекс 2 (nhdi) указују на слабо везивање комплекса за протеин. Добијене вредности константи везивања K_b за лиганде L1–L4 су око 10 пута мање у односу на константе добијене за везивање одговарајућих комплекса.

Публиковане вредности константи K_b за интеракције HSA и комплекса опште формуле $[\operatorname{Ru}(\operatorname{Cl-tpy})(N-N)\operatorname{Cl}]^+$ (где је N-N = en, dach) у опсегу су од 7,19 – 8,59 × 10⁴ M⁻¹. Такође, ниска вредност $K_b = 6,72 \text{ M}^{-1}$ за $[\operatorname{Ru}(\operatorname{Cl-tpy})(\operatorname{bpy})\operatorname{Cl}]^+$ говори о томе да ригидно, планарно, хидрофобно *nceydo*-хексагонално окружење Ru(II) јона у $[\operatorname{Ru}(\operatorname{Cl-tpy})(\operatorname{bpy})\operatorname{Cl}]^+$ узрокује слабо везивање за HSA.⁷¹ Насупрот овим резултатима, у Stren-Volmer-овом графику везивања комплекса $[\operatorname{Ru}(\operatorname{Cl-Ph-tpy})(N-N)\operatorname{Cl}]^+$ за BSA забележене су промене и израчунате вредности статистичке и динамичке константе, али је добијена вредност константе везивања у опсегу од 2 – 5 × 10⁴ M⁻¹.⁴²

3.1.5.1. Испитивање интеракције комплекса са HSA у присуству маркера

Познато је да се Ru(II) полипиридил комплекси најпре везују за HSA нековалентним типом везе, након чега се рутенијум координује за атом азота из аминокиселине L-His у структури протеина.⁶⁴ Како претходно одрађена флуоресцентна мерења нису могла дати информације о тупу и месту везивања комплелса за протеин, урађена су додатна испитивања у присуству маркера еозина Y (за место I субдомена IIA) и ибупрофена (за место II субдомена IIIA). Емисиони спектри праћени су на таласној дужини ексцитације од 295 nm, у опсегу од 300–500 nm. У раствор еквимоларних концентрација HSA и маркера додата је растућа концентрација сваког од комплекса. HSA-еозин Y и HSA-ибупрофен адукти показују значајан интензитет емисије до чије редукције долази након замене маркера у везивном месту протеина одговарајућим комплексом (Слика 3.1.5.1.1. и Слика 3.1.5.1.2.).¹¹⁰





Слика 3.1.5.1.1. Емисиони спектар HSA-ибупрофен адукта по додатку растуће концентрације комплекса 1–7. [HSA] = 2 μ M, [ибупрофен] = 2 μ M, [Ru] = 0 – 20 μ M; λ_{ex} = 295 nm. Стрелице показују промену интензитета емисије по додатку растуће концентрације комплекса. Уметнути графици: Stern-Volmer-ови графици за HSA-ибупрофен адукте у присуству комплекса 1–7.

Помоћу Stern-Volmer-ове једначине (8) и одговарајићег графика дефинисане су константе везивања K_{sv} , као и константне гашења флуоресценције k_q , док су применом Scatchard-ове једначине (9) и одговарајућег графика дефинисане константе везивања K_b и број места везивања у протеину *n*. Израчунате вредности приказане су у Табели 3.1.5.1.1. Добијене вредности константи везивања K_b ($10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}$) указују на јако везивање Ru(II) полипиридил комплекса за IIA и IIIA субдомен, а због малих разлика у константама, у случају свих седам комплекса, није било могуће издвојити место у протеину са већом тенденцијом везивања. Ови резултати указали су на мали утицај природе инертног хелатног лиганда на везивање комплекса за транспортни протеин.





Слика 3.1.5.1.2. Емисиони спектар HSA-еозин Y адукта по додатку растуће концентрације комплекса 1–7. [HSA] = 2 μ M, [еозин Y] = 2 μ M, [Ru] = 0 – 20 μ M; λ_{ex} = 295 nm. Стрелице показују промену интензитета емисије по додатку растуће концентрације комплекса. Уметнути графици: Stern-Volmer-ови графици за HSA-еозин Y адукте у присуству комплекса 1–7.

Комплекс	Систем	<i>K</i> _{sv} [M ⁻¹]	$k_q [\mathrm{M}^{-1}\mathrm{s}^{-1}]$	<i>K</i> _b [M ⁻¹ s ⁻¹]	n
L1 (<i>o</i> -pda)	Лиганд-HSA	$(6,3\pm0,1)\times10^{3}$	$(6,3\pm0,1)\times10^{11}$	$2,8 \times 10^{3}$	0,93
1	Комплекс-HSA	$(2,3\pm 0,2) imes 10^4$	$(2,3\pm0,2) imes 10^{12}$	$1,28 \times 10^{4}$	0,95
	Комплекс-HSA-Ибупрофен	$(5,1\pm 0,4) imes 10^4$	$(5,1\pm0,4) imes 10^{12}$	$7,98 \times 10^{4}$	1,03
	Комплекс-HSA-Еозин-Ү	$(1,2\pm 0,4) \times 10^4$	$(1,2\pm0,4) imes 10^{12}$	$1,00 \times 10^{4}$	0,95
L2 (dan)	Лиганд-HSA	$(9,4\pm0,3)\times10^{3}$	$(9,4\pm0,3)\times10^{11}$	$3,76 \times 10^{3}$	0,92
2	Комплекс-HSA	$(1,1\pm 0,1) \times 10^4$	$(1,1\pm0,1) imes 10^{12}$	$1,15 \times 10^{4}$	1,00
	Комплекс-HSA-Ибупрофен	$(1,5\pm 0,1) \times 10^4$	$(1,5\pm0,1)\times10^{12}$	$1,13 \times 10^{4}$	0,97
	Комплекс-HSA-Еозин-Ү	$(3,5\pm 0,2) imes 10^4$	$(3,5\pm0,2)\times10^{12}$	$1,70 \times 10^{5}$	1,21
L3(dmbpy)	Лиганд-HSA	$(3,7\pm 0,3) imes 10^3$	$(3,7\pm0,3) imes10^{11}$	$8,02 \times 10^{2}$	0,86
3	Комплекс-HSA	$(1,5\pm 0,1) imes 10^4$	$(1,5\pm0,1) imes10^{12}$	$1,03 \times 10^{4}$	0,97
	Комплекс-HSA-Ибупрофен	$(2,8\pm 0,2) imes 10^4$	$(2,8\pm0,2) imes10^{12}$	$1,58 \times 10^{6}$	1,35
	Комплекс-HSA-Еозин-Ү	$(7,8\pm 0,5) imes 10^4$	$(7,8\pm0,5) imes10^{12}$	$2,77 \times 10^{4}$	0,91
L4(dcbpy)	Лиганд-HSA	$(8,2\pm 0,1) imes 10^3$	$(8,2\pm0,1) imes10^{11}$	$7,52 \times 10^{2}$	0,78
4	Комплекс-HSA	$(1,8\pm 0,1) imes 10^4$	$(1,8\pm0,1) imes10^{12}$	$1,05 \times 10^{4}$	0,93
	Комплекс-HSA-Ибупрофен	$(1,40\pm0,06) imes10^4$	$(1,40\pm0,06) imes10^{12}$	$7,35 \times 10^{5}$	1,36
	Комплекс-HSA-Еозин-Ү	$(5,7\pm 0,4) imes 10^4$	$(5,7\pm0,4) imes10^{12}$	$6,92 \times 10^{4}$	1,02
5	Комплекс-HSA	$(1,28\pm0,09) imes10^4$	$(1,28\pm0,09) imes10^{12}$	$1,04 \times 10^{4}$	0,98
	Комплекс-HSA-Ибупрофен	$(5,90\pm0,02)\times10^{3}$	$(5,90\pm0,02) imes10^{11}$	$1,06 \times 10^{4}$	1,03
	Комплекс-HSA-Еозин-Ү	$(2,2\pm0,2)\times10^4$	$(2,2\pm0,2)\times10^{12}$	$1,10 \times 10^{5}$	1,14
6	Комплекс-HSA	$(2,1\pm 0,2) imes 10^4$	$(2,1\pm0,2) imes10^{12}$	$1,46 \times 10^{4}$	0,96
	Комплекс-HSA-Ибупрофен	$(3,2\pm0,1)\times10^4$	$(3,2\pm0,1)\times10^{12}$	$1,48 \times 10^{4}$	0,93
	Комплекс-HSA-Еозин-Ү	$(2,6\pm0,2)\times10^4$	$(2,6\pm0,2)\times10^{12}$	$3,50 \times 10^4$	1,02
7	Комплекс-HSA	$(4,6\pm 0,2) imes 10^4$	$(4,6\pm0,2) imes10^{12}$	$4,48 \times 10^{4}$	1,00
	Комплекс-HSA-Ибупрофен	$(1,6\pm 0,2) \times 10^4$	$(1,6\pm0,2)\times10^{12}$	$1,00 \times 10^{4}$	0,94
	Комплекс-HSA-Еозин-Ү	$(5,6\pm 0,4) imes 10^4$	$(5,6\pm0,4) imes10^{12}$	$2,66 \times 10^{4}$	0,94

Табела 3.1.5.1.1. Stern-Volmer-ове константе (*K*_{sv}) и константе гашења флуоресценције (*k*_q) за интеракције комплекса 1–7 и лиганада L1–L4 са HSA самостално или у присуству одговарајућих маркера, ибупрофена и еозина Ү.

3.1.6. Молекулски докинг комплекса са DNA и HSA

Да бисмо потврдили експериментално добијене резултате интеракције Ru(II) полипиридил комплекса са важним биомолекулима извршена је симулација молекулског докинга. Најпре су дефинисане најстабилније геометријске структуре комплекса, односно оне са минимумом енергије, за које се претпоставља да су испитивани комплекси поседовали приликом везивања за DNA или цепове HSA.

За испитивања су коришћена два фрагмента DNA, један који представља интеркалациони џеп (PDB 1Z3F) и други који представља канонични B-DNA (PDB 1BNA). Најбоље позиције комплекса 1-7 при везивању за DNA приказане су на Слици 3.1.6.1., док су добијене вредности енергија приказане у Табели 3.1.6.1. За свих седам комплекса потврђена је делимична интеркалација у 1Z3F. Наиме, један хетероциклични прстен у структури терпиридина код комплекса 1 и 2 интеркалиран је у 1Z3F, док bhdi y комплексу 1 и nhdi y комплексу 2 нису успели да се уметну између парова база, јер нису планарни. Са друге стране, ароматични bpy у структури комплекса 3 и 4 је са лакоћом успео да се интеркалира у 1Z3F. Комплекси 5-7 поседују један хетероциклични терпиридин интеркалиран у 1Z3F, док 4'-Cl-Ph-супституент остаје изван хеликса. Такође, комплекси 5-7 поседују могућност везивања за мали жљеб 1BNA фрагмента, што потврђују екстремно ниске вредности енергије. Афинитет везивања испитиваних комплекса опада у низу 6 > 2 > 7 > 5 > 1 > 4 > 3 у случају везивања интеркалацијом за DNA, а редоследом 6 > 5 > 7 > 2 > 1 > 4 > 3 у случају везивања за мали жљеб DNA ланца. Ови резултати усаглашени су са претходно добијеним резултатима спектроскопских мерења. Такође, недавно су публиковани резултати на основу којих су мононуклеарни Ru-tpy комплекси опште формуле $[Ru(Cl-Ph-tpy)(N-N)Cl]^+$, где је N-N = en, dach или bpy, показали везивање за DNA хеликс интеркалацијом и/или везивањем за мали жљеб.¹⁵⁴ С друге стране, [Ru(tpy/Cl-Ph-tpy)Cl₃] је комплетно интеркалиран у 1Z3F, док је [Ru(H₂Lt-bu)Cl₃] парцијално интеркалиран због присуства алкил-групе. Овај комплекс преферира интеракцију са 1BNA везивањем за мали жљеб.¹⁵⁵







Слика 3.1.6.1. Компјутерски добијени докинг модели који илуструју интеракције између комплекса 1–7 и DNA у два случаја везивања А) везивање за мали жљеб и Б) интеркалацијом. Водоничне везе означене су плавим испрекиданим линијама.

Табела 3.1.6.1. Вредности DNA докинга испитиваних комплекса 1–7.

DNA докинг				
PDB ID DNA	Комплекс	MolDock	Rerank	Docking
	1	-172,69	-82,31	-168,55
	2	-193,68	-96,61	-188,26
	3	-160,07	-82,15	-153,38
IBNA – Канонични	4	-166,71	-84,64	-163,01
размак	5	-206,37	-100,65	-200,21
	6	-207,15	-106,21	-202,04
	7	-204,44	-98,62	-198,73
	1	-150,44	-68,92	-148,04
	2	-187,11	-87,48	-183,15
1725 11	3	-147,17	-74,39	-143,36
1Z3F – Интеркалациони	4	-148,67	-73,78	-145,98
размак	5	-182,24	-89,61	-177,83
	6	-188,66	-88,81	-185,19
	7	-184,73	-91,86	-181,21

Симулације докинга комплекса 1–7 са HSA представљене су за субдомен IIA (место I) и субдомен IIIA (место II). Ниске вредности енергије указују на стабилност формираног комплекспротеин адукта и остварену везу. На основу добијених вредности енергија, представљених у Табели 3.1.6.2., може се дефинисати афинитет везивања комплекса за HSA који опада у низу 3 > 4 > 2 > 1 за Ru(II)-tpy комплексе, као и редоследом 7 > 6 > 5 за везивање Ru(II)-Cl-Ph-tpy комплекса за субдомен IIA. С друге стране, афинитет везивања за субдомен IIIA расте у низу 1 > 3 > 2 > 4 за Ru(II)-tpy комплексе и 6 > 7 > 5 за Ru(II)-Cl-Ph-tpy комплекс. Резултати молекулског докинга интеракције комплекса 1–7 са HSA илустровани су на Слици 3.1.6.2.

PDB ID HSA	Комплекс	MolDoc k	Rerank	HBon d	Docking
	1 ^{<i>a</i>}	102,65	-71,93	-4,18	- 106,11
	1^{b}	172,13	-142,87	-3,86	- 168,11
	2^a	- 115,18	-80,79	-4,96	-91,91
	2^{b}	- 120,27	-75,57	-3,93	- 118,52
1АО6 – Хумани серум албумин	3 ^{<i>a</i>}	- 159,11	-132,23	-0,47	- 118,05
	3^b	- 153,11	-128,78	-1,46	- 109,58
	4 ^{<i>a</i>}	- 138.76	-113,07	-3,21	- 124.86
	4 ^b	-96,83	-41,95	-5,66	-92,89
	5 ^{<i>a</i>}	- 109.58	-97,65	-4,92	- 101,11
	5^{b}	-79,21	-40,11	-3,23	-71,51
	6 ^{<i>a</i>}	113,54	-63,84	-0,58	102,47
	6 ^{<i>b</i>}	- 165,49	-134,21	-1,62	132,47
	7^{a}	- 130,51	-124,58	-2,47	- 123,66
	7 ^b	- 125,64	-115,36	-3,34	- 109,74

Табела 3.1.6.2. Добијене вредности енергија формираних комплекс-HSA адуката

^{*а*}Везивање за субдомен IIА (везивно место I)

^{*b*}Везивање за субдомен IIIА (везивно место II)

Рилак Симовић и сарадници показали су да се Ru-tpy, као и Ru-*bis*-пиразолпиридин комплекси, веома добро уклапају у везивном џепу који је лоциран на месту I (субдомен IIA)¹⁵⁵ Са друге стране, пронађена су три места везивања за Ru-полипиридил комплексе опште формуле [Ru(Cl-tpy)(N-N)Cl]⁺, где је N-N = en, dach или bpy. Прво место везивања је у домену I, у близини секвенце ¹⁴⁶HPYFYAPELLFFAK¹⁵⁹. Друго место је лоцирано између IA и IIA субдомена, заузимајући место између ¹DAHK⁴, ⁵SEVAHR¹⁰ и ⁶⁵SLHTLFGDK⁷³ секвенци. Трећи регион је у субдомену IIB, између ³²⁴DVFLGMFLYEYAR³³⁶ и ¹⁴⁶HPDYSVVLLLR3¹⁵⁹ ¹⁶³ секвенци.¹⁶²

Масникоса је са својим сарадницима објавила ново место везивања за HSA (тзв. Sudlowово место везивања, место III) за Ru(II)-tру комплексе опште формуле [Ru(Cl-Ph-tpy)(N-N)Cl]⁺, где је N-N = en, dach или bpy. Везивно место смештено је у дубоком расцепу, који је повезан са секвенцом у субдомену IB са једне стране и субдоменима IIIA и IIIB са друге стране.¹⁵⁴

Резултати и дискусија резултата



Резултати и дискусија резултата



Слика 3.1.6.2. А) Илустрација добијена молекулским докингом приказује везивање комплекса 1–7 за везивни џеп HSA (црвеном бојом приказано је везивање за место I, док је жутом бојом приказано везивање за везивно место II), везивна места и селектоване аминокиселине презентована су у делу Б) за везивно место I и Ц) за везивно место II. Водоничне везе означене су плавим испрекиданим линијама.

3.1.7. Цитотоксичност и селективност комплекса

За испитивање цитотоксичне активности Ru(II) полипиридил комплекса туморске ћелијске линије (MDA-MB 231, HCT116 и HeLa), као и здраве ћелијске линије (MRC-5), третиране су комплексима 1–7 у концентрацијама од 100 µM, у периоду од 48 сати. Селективност комплекса представљена је као однос цитотоксичности коју комплекси показују према туморским ћелијским линијама и здравим ћелијама. Добијени резултати приказани су у Табели 3.1.7.1. Међу испитиваним

комплексима својом цитотоксичношћу и селективношћу нарочито су се издвојили комплекси 5 и 6, као и комплекс 2, због чега су управо они коришћени за даља испитивања.

Испитивана је цитотоксичност одабраних комплекса у седам различитих концентрација (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; и 100 μ M) након 48 и 72 h, употребом МТТ теста. Активност комплекса **5** и **6** испитана је на здравим MRC-5 ћелијама и на туморским ћелијским линијама (MDA-MB 231, HCT116, HeLa), док је активност комплекса **2** испитивана на MDA-MB 231 и HCT116 ћелијским линијама. У случају туморских ћелијских линија утврђена је зависност активности од концентрације и времена деловања испитаних комплекса, док је активност према здравим ћелијским линијама ниска (у случају комплекса **2**) или занемарљива (у случају комплекса **5** и **6**). Добијене IC₅₀ вредности, представљене у Табели 3.1.7.1., указују на умерену до високу активност испитиваних комплекса на тестираним ћелијским линијама. Наиме, комплекси **2**, **5** и **6** показали су значајну цитотоксичну активност и селективност према MDA-MB 231 и HeLa ћелијским линијама. Насупрот томе, активност у погледу HCT116 ћелијских линија показала се умереном за комплексе **2** и **5**, а слабом за комплекс **6**. Испитани комплекси нису показали значајну активност према здравим ћелијским линијама, чиме је потврђена селективност на путу њихове примене као потенцијалних цитостатика.

Табела 3.1.7.1. IC₅₀ (µМ) и SI вредности комплекса **2**, **5**, и **6** за MRC-5, MDA-MB 231, HCT116, и HeLa ћелије након 48 и 72 h третмана.

48h	MRC-5	MDA-MB231	SI	HCT116	SI	HeLa	SI
2	285 ± 2	8 ± 2	34,79	60 ± 7	4,72	/	/
5	1180 ± 10	37 ± 1	31,66	75 ± 3	15,74	22 ± 1	53,09
6	328 ± 8	159 ± 5	2,06	130 ± 5	2,52	32 ± 2	10,23
72h	MRC-5	MDA-MB231	SI	HCT116	SI	HeLa	SI
2	161 ± 2	3 ± 1	45,86	63 ± 1	2,54	/	/
5	120 ± 30	79 ± 1	14,90	50 ± 2	23,67	26 ± 8	45,86
6	420 ± 6	117 ± 3	3,58	77 ± 3	5,47	50 ± 4	8,46

Недавно је потврђена биолошка активност Ru(II)-(Cl-tpy/Cl-Ph-tpy) комплекса који садрже различите бидентатие хелатие лиганде, као што су етилендиамин (en), 1,2-диаминоциклохексан (dach), 2,2'-бипиридин (bpy), 1,10-фенантролин (phen) или *о*-бензохинондиимин (o-bqdi), према HeLa и HCT116 ћелијским линијама.^{39,42} Ru(II)-Cl-Ph-tpy комплекси са phen, o-bqdi или bpy као бидентатним лигандом показују бољу активност у поређењу са њиховим Cl-tpy⁴⁰ и Cl-Ph-tpy⁴² аналозима, указујући на значајан утицај ароматичности на антитуморску активност. У нашем испитивању Ru(II)-tpy комплекс 2, који у својој структури поседује редокс-активан ароматични диамин 2,3-диаминонафтален као лиганд, показује знатно већу активност у поређењу са његовим Cl-Ph-tpy аналогом, комплексом 5. Ови резултати нису усаглашени са резултатима добијеним за Ru(II)-Cl-Ph-tpy комплексе, чија је цитотоксичност значајно побољшана увођењем хлоро-фенил супституената у структуру tру лиганда.^{39,42,40} Потврђено је да присуство лиганада који немају могућност образовања водоничних веза (nqdi, dmbpy и dcbpy у комплексима 2, 5 и 6) нису повезани са губитком цитотоксичне активности. Овакво откриће у корелацији је са претходно добијеним резултатима за сличне Ru(II) полипиридил комплексе који садрже bpy, phen и bqdi као бидентатне хелатне лиганде.^{39,42,40} Поред свега, ови резултати су показали да цитотоксичност tpy и Cl-Ph-tpy комплекса 2, 5 и 6 има тренд који није усаглашен са њиховом кинетичком активношћу, која опада у низу 5 > 6 > 2.

Узимајући у обзир слабу активност испитиваних комплекса према здравим ћелијским линијама, у поређењу са високом активношћу према туморским ћелијским линијама, настављено је испитивање механизма дејства комплекса.

3.1.8. Утицај комплекса на апоптозу

Апоптоза је тип ћелијске смрти који не узрокује оштећење суседних ћелија, због чега представља пожељан механизам дејства сваког цитостатика. Први корак апоптозе заснован је на издвајању фосфатидилсерина на површини ћелијске мембране. Анексин V специфично реагује са фосфатидилсерином, што га чини идеалним индикатором ћелијске апоптозе. Молекул 7-AAD (7-аминоактиномицин D) због своје величине не може бити транспортован кроз ћелијску мембрану, тако да представља одличан агенс који прави разлику између ћелије у којој је започет процес апоптозе и некротичне ћелије у односу на здраве ћелије. Због низа претходно поменутих чињеница, Анексин V/7-AAD представља златни стандард у детектовању апоптозе.

Пошто се транслокација фосфатидилсерина може јавити и у случају других типова ћелијске смрти, као што је на пример онкоза, неопходно је применити више метода да би се са сигурношћу потврдила апоптоза.

Ради потврђивања апоптозе као типа ћелијске смрти узроковане дејством комплекса посматрана је промена у експресији протеина Bcl-2, Вах и активиране каспазе-3. Параметри коришћени за детектовање почетка апоптозе су однос антиапоптопичних Bcl-2 и проапоптопичних Вах протеина (Bcl-2/Bax) (Слика 3.1.8.1.Б), као и проценат ћелија које експримирају активирану каспазу-3 (Слика 3.1.8.1.В). Нађено је да је експресија активиране каспазе-3 знатно већа у случају MDA-MB 231 ћелија третираних комплексима 2 и 5, а однос Bcl-2/Bax нижи у случају ћелија третираних комплексом 5. Комплекс 2 није имао утицаја на овај однос, указујући да не узрокује ћелијску апоптозу митохондријалним путем. Постоје такође алтернативни механизми ћелијске апоптозе као што је стрес ендоплазматског ретикулума, који може бити проузрокован поремећеном хомеостазом калцијума и/или континуираном акумулацијом погрешно савијених протеина.¹⁶⁴ Протеазомни инхибитори имају важну улогу у индукцији апоптозе посредоване ендоплазматским ретикулумом тиме што доводе до грешака при савијању протеина.¹⁶⁵ Како су ендоплазматски ретикулум и Голџијев апарат функционално повезани, сматра се да агенси који узрокују стрес у ендоплазматском ретикулуму могу довести и до стреса у Голцијевом апарату.¹⁶⁶ Стога се може закључити да комплекс 2 проузрокује апоптозу у MDA-MB 231 ћелијама активирајући унутрашњи пут који не укључује митохондрије. Са друге стране, третирање НСТ116 ћелија комплексима 2 и 5, као и HeLa ћелија комплексима 5 и 6, изазива смањење односа Bcl-2/Bax и повећање експресије активне каспазе-3, што потврђује индукцију апоптозе као типа ћелијске смрти. У ћелијама тумора углавном долази до дисрегулације гена који учествују у индукцији или супресији ћелијске смрти. Прекомерна експресија антиапоптотичног протеина Bcl-2 један је од најчешћих дефеката апоптотичног пута у канцерогеним ћелијама, који онемогућава ћелијско преживљавање. Стога, агенси који смањују ниво Bcl-2 и повећавају ниво Bax, утичући на њихов баланс ка индукцији апоптозе, су од велике фармаколошке важности. Генерално, ови резултати показују да испитивани комплекси узрокују ћелијску апоптозу, док је проценат некротичних ћелија занемарљив (Слика 3.1.8.1.А).



Слика 3.1.8.1. Проточна цитометријска анализа бојења Анексином V-FITC/7-AAD и експресија протеина повезаних са апоптозом. Графици (A) приказују проценат ћелија у раним фазама апоптозе, касне апоптозе, као и некротичних ћелија, (**Б**) Bcl-2/Bax однос и (**B**) проценат експресије ћелија изазване активиране каспазом-3 у MDA-MB 231, HCT116 и HeLa ћелијама у нетретираним ћелијама (контрола) и ћелијама третираним комплексима 2, 5, и 6. Резултати су представљени као средња вредност три независна експеримента.

3.1.9. Утицај комплекса на аутофагију

Аутофагија такође може бити укључена у процес апоптозе. Као хомеостатски механизам кроз које ћелије разграђују и рециклирају непотребно оштећене или нефункционалне компоненте, аутофагија игра улогу у преживљавању ћелија. Међутим, инхибиција или активација аутофагије може допринети смрти ћелије. Аутофагију карактерише формирање аутофагозома, везикуле које садрже ћелијске компоненте намењене за разградњу спајајући се са лизозомима, киселим органелама које садрже хидролазе, да би формирале аутофаголизозоме у којима ће аутофагични материјал бити деградиран. Аутофагија може бити детектована pH-сензитивном флуорофором акридин оранж (AO), који емитује зелену флуоресценцију у цитосолу при неутралној рН и наранџасто-црвену у киселим везикулама при ниској рН. Проценат ћелија са црвено/зеленом флуоресценцијом тј. ћелије које садрже аутофаголизозоме могуће је детектовати проточном цитометријом. Овај метод омогућава мерење повећања или редукције у аутофагији у ћелијама које су третиране испитиваним комплексима. Као што се може видети на Слици 3.1.9.1.А комплекс 2 не утиче на аутофагију у MDA-MB ћелијама, док комплекс 5 доводи до инхибиције аутофагије до 50%. У НСТ116 ћелијама комплекси 2 и 5, као и у случају HeLa ћелија комплекси 5 и 6, доводе до повећања аутофагије. Ови резултати су у сагласности са проточном цитометријом рађеном у присуству маркера аутофагије р62. Инхибиција аутофагије проузрокује нагомилавање маркера р62, док индукција аутофагије доводи до смањења нивоа р62. Ниво p62 маркера у MDA-MB 231 ћелијама није се мењао након третирања комплексом 2, док је ниво повећан након третирања комплексом 5. Након третирања HeLa ћелија комплексима 5 и 6, ниво р62 је нижи у односу на нетретиране ћелије, указујући на повећање аутофагије.



Слика 3.1.9.1. Графици представљају проценат односа црвене/зелене ћелије (A) и експресију (MFI) р62 (Б) у нетретираним и третираним MDA-MB 231, HCT116, и HeLa ћелијама. Резултати су представљени као средња вредност три независна експеримента.

3.1.10. Утицај комплекса на ћелијски циклус

У циљу даљег испитивања механизма дејства испитиваних комплекса тестиран је њихов утицај на ћелијски циклус праћењем садржаја ћелијске DNA и експресијом циклина D, E, A2 и B1 у третираним ћелијама. Циклини представљају групу протеина који регулишу прогресију кроз фазе ћелијског циклуса. Праћењем садржаја DNA и нивоа циклина потврђено је да испитивани комплекси индукују поремећаје ћелијског циклуса (Слика 3.1.10.1.). Изузетак је комплекс 2 који не утиче на ћелијски циклус у MDA-MB 231 ћелијама. Након третмана комплексом 5 проценат ћелија у G2/M фази се увећава, као и ниво циклина E. У HCT116 ћелијским линијама комплекси 2 и 5 узрокују акумулацију ћелија у G0/G1 и S фази, уз истовремену промену нивоа циклина D и E. Ови регулаторни молекули се активирају након DNA поремећаја и даље инхибирају прогресију ћелијског циклуса, спречавајући ћелије да активирају репарационе механизме, или уколико поремећај не може бити решен, подлежу апоптози.

У HeLa ћелијским линијама комплекс 5 узрокује заустављање у G0/G1 фази због оштећења DNA пре уласка у S фазу. Комплекс 6 се зауставља у G2/M фази ћелијског циклуса, због вероватно ирегуларне репликације хромозома узроковане оштећењем DNA или оксидативним стресом. Добијени резултати указују да тестирана једињења ограничавају ћелијски раст и репликацију, чиме доводе до апоптозе кроз, како се претпоставља, оштећења DNA или блокаду синтезе DNA.

У оквиру испитивања биолошке активности комплекса 2, 5 и 6, у зависности од њихове структуре и врсте ћелијске линије, потврђено је да ова једињења делују различито у складу са својим утицајем на аутофагију, ћелијски циклус и пут апоптозе. Такође, добијени резултати су показали умерену до јаку цитотоксичност, али и селективност према тестираним ћелијским линијама, што их чини потенцијалним хемотерапеутицима.



Слика 3.1.10.1. Графици представљају дистрибуцију ћелијског (А) и експресију циклина D, E, A2 и B1 (Б) у MDA-MB 231, HCT116, и HeLa ћелијама нетретираним (контрола), као и ћелијама третираним комплексима 2, 5, и 6. Резултати су представљени као средња вредност три независна експеримента.

3.2. Ru(III) комплекси са Schiff-овим базама као лигандима (8-13)

3.2.1. Синтеза и карактеризација

Процедура синтезе нових Ru(III) комплекса 8–13 опште формуле [Ru(L)Cl(H₂O)], где је L тетрадентатни лиганд, Schiff-ова база *bis*(ацетилацетоне)етилендиимин (acacen, 8), *bis*(бензоилацетон)етилендиимин (bzacen, 9), (ацетилацетон)(бензоилацетон)етилендиимин (acacbzacen, 10), *bis*(ацетилацетон)пропилендиимин (acacpn, 11), *bis*(бензоилацетон)пропилендиимин (bzacpn, 12) или (ацетилацетон)(бензоилацетон)пропилендиимин (acacbzacen, 13), приказана је у оквиру Схеме 3.2.1.1, док су структурне формуле комплекса приказане на Слици 3.2.1.1.



Схема 3.2.1.1. Приказ синтезе комплекса 8–13.



Слика 3.2.1.1. Структурне формуле комплекса 8-13.

Комплекси 8–13 добијени су полазећи од RuCl₃·3H₂O уз додатак одговарајуће Schiff-ове базе рефлуктовањем. Тако добијени комплекси окарактерисани су различитим спектроскопским методама, као што су EPR, UV-Vis, IR и ESI-MS, елементална анализа и кондуктометрија.

IR спектри слободних лиганада и одговарајућих Ru(III) комплекса пажљиво су анализирани да би се утврдила остварена координација. Сигнал у опсегу од 3445 – 3438 cm⁻¹ потиче од v(O–H), односно координованог молекула воде у комплексима **8–13**.¹⁶⁷ У спектрима, такође, уочавамо сигнале који потичу од ароматичних и алифатичних C–H веза у опсегу од 3099 – 2925 cm⁻¹, као и сигнале који потичу од v(C=C) везе у области од 1621 – 1485 cm⁻¹.¹⁶⁸ Изражени сигнали у области од 1289 – 1285 cm⁻¹ потичу од слободних Schiff-ових база у енолном облику, тачније у питању су сигнали од v(C–O) валенционих вибрација, док су у комплексима **8–13** ови сигнали померени ка вишим вредностима фреквенције у опсегу од 1325 – 1362 cm⁻¹, указујући на координацију Ru(III) јона са лигандом преко енолног кисеоника.^{169,170} Валенционе вибрације v(CH=N) слободних Schiff-ових база и сигнале вибрације са Ru(III) јоном потврђена је померањем овог сигнала у случају комплекса **8–13** ка вишим вредностима фреквенције у области од 1447 – 1435 cm⁻¹.⁸³

У електронским апсорпционим спектрима комплекса **8–13**, снимљеним у диметил-сулфоксиду, издвојило се неколико апсорпционих сигнала. Због присуства слободног електрона на азоту азометин групе у Schiff-овим базама, апсорпционе траке у области од 259 – 274 nm и 313 – 325 nm приписане су π – π * и n– π *прелазима.^{171,172} Сигнал умереног интензитета у видљивом делу спектра, између 403 – 410 nm, потиче од лиганд-метал трансфера наелектрисања (LMCT).⁸⁰ Апсорпциони спектри комплекса **8–13** уобичајени су за комплексе октаедарске геометрије Ru(III) јона.

Вредности моларне проводљивости (Λ) комплекса **8–13** у 10⁻³ М раствору диметилформамида (DMF) на собној температури у опсегу од 7,0 – 24,3 μ S cm² mol⁻¹ потврђују да су испитивани комплекси неелектролити.¹⁷³

У спектрима добијеним масеном спектрометријом издвајају се сигнали који потичу од $[Ru(L)(H_2O)]^+$ и $[Ru(L)]^+$ молекул јона. Јони добијени губитком хлоридног јона заједнички су за сваки од испитиваних комплекса.^{174,175,176}

Применом електронске парамагнетне резонанце (EPR) добијени су спектри комплекса **8–13** (X-band, 295 K) који потврђују парамагнетна својства нискоспинског Ru(III) јона у октаедарским комплексима издужене геометрије. Фитовањем је потврђена аксијална симетрија спектара, gx = gy = g⊥ > gz = g||, која указује на ортогоналну симетрију издужену дуж Z осе (Табела 3.2.1.1.). Добијени EPR спектри комплекса **8–13** у сагласности су са до сада публикованим спектрима других Ru(III) комплекса.¹⁷⁷

Комплекс	gx	gy	gz
8	2,27	2,27	1,83
9	2,25	2,25	1,84
10	2,25	2,25	1,85
11	2,29	2,29	1,81
12	2,24	2,24	1,87
13	2,27	2,27	1,82

Табела 3.2.1.1. ЕРК вредности за комплексе 8-13.

3.2.2. Интеракције комплекса са DNA

3.2.2.1. Испитивање интеракција комплекса са DNA спектроскопским методама

Способност Ru(III) комплекса да се вежу за DNA праћена је променама у апсорпционом спектру комплекса узрокованих додатком растуће концентрације раствора DNA. Запажен хиперхромизам указује да је остварено везивање комплекса 8–13 за DNA. Добијене вредности константи везивања, K_b , приказане у Табели 3.2.2.1.1., опадају у низу: 9 (bzacen) \approx 12 (bzacpn) > 13 (acacbzacpn) > 10 (acabzacen) > 11 (acacpn) > 8 (acacen).

Табела 3.2.2.1.1. Константе везивања за DNA (K_b , K_{sv}) комплекса 8–13 самостално или у случају ЕВ (K_{sv}^{a}) и Hoechst-DNA (K_{sv}^{6}).

Комплекс	Kb [M ⁻¹]	K _{sv} ^a [M ⁻¹]	K _{sv} ⁶ [M ⁻¹]
8	$(5,8\pm 0,3) imes 10^4$	$(4,9 \pm 0,2) \times 10^3$	$(4,4\pm 0,3) imes 10^4$
9	$(8,8\pm 0,2) imes 10^4$	$(2,1\pm 0,1) imes 10^4$	$(1,8\pm 0,3) imes 10^4$
10	$(6,4\pm 0,2) imes 10^4$	$(5,9 \pm 0,2) imes 10^3$	$(4,0\pm 0,1) imes 10^4$
11	$(6,1\pm 0,1) imes 10^4$	$(5,6\pm 0,1) imes 10^3$	$(4,5\pm 0,2) imes 10^4$
12	$(8,6\pm 0,2) imes 10^4$	$(7,8\pm 0,3) imes 10^3$	$(2,\!4\pm0,\!2) imes 10^4$
13	$(7,1\pm 0,1) imes 10^4$	$(7,4\pm 0,1) imes 10^3$	$(2,6\pm 0,1) imes 10^4$

Својом најбољом активношћу издвојили су се комплекси 9 и 12, што се објашњава утицајем ароматичних супституената у структури тетрадентатног лиганда. Такође, примећено је да комплекси са Schiff-овима базама добијених из пропилендиамина (11, 12 и 13) показују већи афинитет везивања за DNA у односу на оне добијене из етилендиамина (8, 9 и 10), због присуства метил група у структури. Ради поређења, нови тумор-селективни Ru комплекси опште формуле

Na[RuCl₂(L¹⁻³-N,O)₂], где је L⁽¹⁻³⁾ депротонована Schiff-ова база (HL¹-HL³) добијена из алкиламина (пропил- или бутиламин) и 5-супституисаног салицилалдехида, који су показали високу активност према MDA-MB-231 ћелијским линијама резистентним на цисплатину, показују ниже вредности константи K_b , реда величине 10³, у поређењу са вредностима добијеним за комплексе **1–6**, које су реда величине 10⁴.¹⁷⁸

3.2.2.2. Испитивање интеракција комплекса са DNA применом флуоресцентне спектроскопије

Даља испитивања рађена су применом флуоресцентне спектроскопије, праћењем промена у емисионом спектру формираног EB–DNA адукта по додатку растуће концентрације комплекса 8–13, при чему долази до умереног смањења интензитета емисије на 612 nm (Слика 3.2.2.2.1.). Применом Stern-Volmer-oве једначине (8) и графика добијене су Stern-Volmer-oве константе везивања, K_{sv}^{a} , сумиране у Табели 3.2.2.1.1. Интензитет флуоресценције EB–DNA се смањивао након сваког додатка комплекса, што потврђује конкурентност за везивање DNA између једињења и EB. Добијене вредности константи опадају у низу: 9 (bzacen) \approx 12 (bzacpn) > 13 (acacbzacpn) > 10 (acabzacen) > 11 (acacpn) > 8 (acacen). С обзиром да су се комплекси који садрже ароматичне лиганде (9 и 12) показали најефикаснији у везивању за СТ DNA са EB, то указује да смањен број ароматичних прстенова или њихово одсуство узрокује слабије интеркалативне особине комплекса. У случају комплекса 8 и 11, без ароматичних прстенова у својој структури, слабо флуоресцентно везивање и умерене константе везивања. Важно је напоменути да је велики број комплекса рутенијума, који су класификовани као агенси везивања за жљеб DNA, показао знатну антитуморску активност.¹⁷⁹

Флуоресцентна мерења рађена су и у присуству индикатора везивања за мали жљеб DNA Hoechst 33258. Након ексцитације на 346 nm, праћене су промене интензитета емисије на 490 nm претходно формираног Hoechst–DNA адукта изазваних додатком растуће концетрације комплекса 8– 13 (Слика 3.2.2.2.2.). Добијене вредности Stern-Volmer-ових константи у присуству Hoechst, K_{sv}^b , приказане у Табели 3.2.2.1.1. расту у низу: 11 (acacpn) \approx 8 (acacen) > 10 (bzacen) > 13 (bzacpn) > 9 (acacbzacen), што је супротно тренду који је добијен за EB-флуоресцентна мерења. Добијене вредности јасно показују да комплекси код којих су изостали ароматични лиганди у структури (8 и 11) показују највећу способност да замене Hoechst молекуле и вежу се за мали жљеб DNA ланца.¹⁸⁰



Слика 3.2.2.2.1. Емисиони спектри ЕВ-DNA адукта у присуству комплекса 8–13.



Слика 3.2.2.2.2. Емисиони спектар Ное-DNA адукта у присуству комплекса 8-13.

3.2.2.3. Испитивање интеракција комплекса са DNA мерењем вискозности

Мерење вискозности DNA у присуству растуће концентрације комплекса 8–13 показало је исти тренд као што је добијен флуоресцентним мерењем у присуству ЕВ, при чему су комплекси са ароматичним прстеновима у структури лиганда (9, 10, 12 и 13) показали веће повећање вискозности DNA у поређењу са комплексима са метил групама (8 и 11) (Слика 3.2.2.3.1.)



Слика 3.2.2.3.1. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ CT DNA (0,01 mM) у PBS пуферу (137 mM NaCl, pH 7,4) у присуству растуће концентрације комплекса **8–13** (r).

3.2.2.4. Молекулски докинг комплекса са DNA

Извршена је симулација молекулског докинга како би се добио свеобухватан опис интеракција између једињења **8–13** и одабраних DNA конформација: 1BNA и 1Z3F. Додекамерна структура 1BNA садржи секвенцу d(CGCGAATTCGCG)₂. Симулације молекулског докинга са 1BNA конформацијом опонаша канонски начин интеракције комплекса са молекулом DNA и паралелна је експериментално потврђеним Stern–Volmer-овим константама (K_{sv}^{b}) добијеним помођу експеримента Hoechst–DNA флуоресценције. Друга конформација представља хексануклеотид d(CGATCG)₂ са веома моћним антиканцерогеним агенсом – елиптицином, са RSCB PDB кодом у 1Z3F конформацији. Симулација користи конформациони потенцијал интеркалације и паралелна је експериментално потврђеним Stern–Volmer-овим константама (K_{sv}^{a}) добијеним помођу експеримента EB–DNA флуоресценције.

Добијени резултати интеракција испитиваних комплекса са 1BNA и 1Z3F конформацијама приказани су у Табели 3.2.2.4.1. Негативне вредности ΔG_{bind} , као и ниске вредности K_i указују на јако везивање комплекса за DNA молекул, тачније за испитиване конформације 1BNA и 1Z3F. На основу добијених енергетских разлика било је могуће одредити преференцијални (нековалентни) начин везивања за DNA спиралу. Заправо, добијене ΔG_{bind} и K_i вредности указују да комплекси 9, 10, 12, и 13, са ароматичним прстеновима у структури, показују већи афинитет везивања интеркалацијом, тачније за 1Z3F конформацију. Добијени резултати су у сагласности са Stern-Volmer-овим константама везивања комплекса за DNA у прусуству EB (K_{sv}^a), односно резултатима добијеним помоћу флуоресцентних мерења.

Табела 3.2.2.4.1. Термодинамички параметри најстабилнијих конформација комплекса **8–13** у различитим DNA конформацијама добијени молекулским докинг симулацијама. (ΔG_{bind} слободна енергија везивања, ΔG_{total} укупна енергија, K_i константа инхибиције, ΔG_{tor} торзиона енергија, ΔG_{elec} електростатичка енергија и $\Delta G_{vdw+hbond+desolv}$ сумарна енергија дисперзије и одбијања (ΔG_{vdw}), ΔG_{unb} невезивна енергија система, енергија десолватације (ΔG_{desolv}) и водоничне везе (ΔG_{hbond}), kcal mol⁻¹).

Конформације	ΔG bind	Ki (µM)	ΔG_{inter}	ΔG vdw+hbond +desolv	ΔG_{elec}	ΔG_{total}	ΔG_{tor}	ΔG_{unb}
DNA (1Z3F) - 8	-5,29	133,26	-5,56	-5,37	-0,19	-0,45	0,27	-0,45
DNA (1BNA) - 8	-6,94	8,12	-7,22	-6,97	-0,24	-0,22	0,27	-0,22
DNA(1Z3F) - 9	-9,81	0,65	-10,63	-10,45	-0,18	-1,21	0,82	-1,21
DNA (1BNA) – 9	-7,80	1,90	-8,63	-8,57	-0,06	-1,08	0,82	-1,08
$\text{DNA}\left(1Z3F\right)-10$	-8,50	0,59	-9,05	-8,87	-0,18	-0,84	0,55	-0,84
DNA (1BNA) - 10	-8,05	1,26	-8,60	-8,28	-0,32	-0,53	0,55	-0,53
$\text{DNA}\left(1Z3F\right)-11$	-5,30	130,39	-5,57	-5,54	-0,04	-0,43	0,27	-0,43
DNA (1BNA) - 11	-7,60	6,67	-7,34	-7,09	-0,25	-0,22	0,27	-0,22
$\text{DNA}\left(1Z3F\right)-12$	-9,79	66,73	-10,61	-10,43	-0,19	-1,18	0,82	-1,18
DNA (1BNA) – 12	-7,52	3,09	-8,34	-8,13	-0,03	-1,04	0,82	-1,04
$\text{DNA}\left(1Z3F\right)-13$	-8,51	0,57	-9,06	-8,88	-0,18	-0,87	0,55	-0,87
DNA (1BNA) - 13	-8,04	1,28	-8,59	-8,27	-0,32	-0,54	0,55	-0,54

Молекулски докинг показује да комплекси са лигандима који поседују супституенте у виду метил група, **8** и **11**, имају већи афинитет везивања за 1BNA конформацију, односно да ова врста комплекса има већи афинитет везивања за мали жљеб DNA ланца. Овакво понашање комплекса је у сагласности са експерименталним вредностима Hoechst-константи (K_{sv}^{b}), које сугеришу мали жљеб као пожељан начин везивања. Смањење броја ароматичних прстенова у структури комплекса у сагласности је са смањеним афинитетом везивања испитиваних комплекса путем интеркалације, односно мањем афинитету према 1Z3F структури: **9** > **12** > **13** > **10** > **11** > **8**. Овакво понашање објашњава се повећањем површине комплекса, односно хидрофобношћу, па самим тим и афинитетом везивања за 1Z3F путем интеркалације (Слика 3.2.2.4.1). Заправо, ароматични прстенови у комлексима **9**, **10**, **12**, и **13** реагују са нуклеобазама, тако што један од прстенова интеркалира на место ароматичног прстена елиптицина. Са друге стране, недостатак ароматичних прстенова ограничава могућност комплекса **8** и **11** да се вежу путем интеркалације за 1Z3F, тако да оба комплекса преферирају везивање за 1BNA путем малог жљеба, при чему не изазивају значајне промене у самом ланцу.



Слика 3.2.2.4.1. Приказ најпожељнијих места везивања комплекса 8–13 за елиптицин у хексануклеотиду d(CGATCG)₂ (PDB код: 13ZF). Комплекси 8–13 представљени су плавим штапићима (атоми угљеника), док је елиптицин представљен жутим (угљеникови атоми). Шећерно-фосфорни остаци два комплементарна ланца представљени су спирално увијеним жутим тракама, док су нуклеинске базе представљене плавом бојом. Различите боје на штапићима представљају различите атоме: азот-плава, кисеоник-црвена, хлор-зелена, Ru(III) јон-тамно зелена.

Слика 3.2.2.4.2. представља 2D приказ интеракције Ru(III) комплекса са нуклеобазама 1Z3F и 1BNA конформација, на основу чега се може закључити да конвенционалне водоничне везе значајно

стабилизују испитиване комплексе приликом интеркалације за DNA хексануклеотид. Генерално, DG2 успоставља конвенционалну водоничну везу између поларизованих кисеоникових атома комплекса са $-NH_2$ групама пуринског прстена (>1,70 Å). Поред тога, координовани молекул H₂O формира водоничне везе са N и O хетероатомима две узастопне нуклеобазе: DG2 (>1,85 Å) и DA3 (>1,19 Å) пуринских прстенова (Слика 3.2.2.4.2). Наиме, хидрофобне интеракције значајно доприносе стабилизацији испитиваних комплекса приликом везивања за 1Z3F интеркалацијом. Рутенијум комплекси су такође стабилизовани путем π - π интеракција успостављених између ароматичних прстенова комплекса 9, 10, 12 и 13, и нуклеобаза DG2, DC1 и DG6. Елиптицин смештен у делу за интеркалацију 1Z3F конформације такође је стабилизован π - π интеракцијама са поменутим нуклеобазама.

Водоничне везе имају доминантан утицај на стабилизацију комплекса 8–13 у 1ВNA конформацији. Комплекси 8 и 11 смештени су у близини цитозинских парова DC21 (>1,89 Å) и DC22 (>1,89 Å) са којима формирају водоничну везу. Нуклеобазе DG4 и DG5 формирају водоничне везе преко –NH група са поларизованим кисеониковим атомима комплекса 8 и 11. Везе угљеник–водоник формиране су између атома хлора комплекса 8 (3,29 Å) и 11 (3,29 Å) и угљениковог атома нуклеобазе DA6. Смањен број хидрофобних интеракција се може приметити у комплексима који садрже ароматичне прстенове. Хидрофобни π – π контакт јавља се између ароматичног пиримидинског прстена DC21 и ароматичних прстенова комплекса 9 (5,35 Å) и 11 (5,38 Å).



Слика 3.2.2.4.2. 2D приказ интеракција комплекса 8–13 у нуклеинским базама хексануклеотида $d(CGATCG)_2$ (PDB код: 1Z3F) са међуатомском динстанцом добијеном након молекулских докинг симулација (DC = деоксицитидин, DT = деокситимидин, DG = деоксигуанозин). Сваки прусутан тип интеракција приказан је одговарајућом бојом.

3.2.3. Интеракције комплекса са BSA

3.2.3.1. Испитивање интеракција комплекса са BSA емисионом методом

Због своје структурне сличности са хуманим серум албумином, говеђи серум албумин (BSA) представља адекватну замену за испитивање интеракција комплекса рутенијума са протеином.

Афинитет везивања комплекса праћен је променом флуоресцентне емисије протеина на 352 nm након додатка растуће концентрације комплекса **8–13**. Применом Stern-Volmer-ове (8) и Scatchard-ове једначине (9), као и одговарајућих графика, добијене су вредности константи K_{sv} и k_q , приказане у Табели 3.2.3.1.1. Констатне реда величине $10^3 - 10^4$ M⁻¹ указују на умерено до јако везивање комплекса **8–13** за BSA, док добијене вредности параметра *n* говоре о једном месту везивања у протеину. Добијен тренд везивања комплекса за BSA **9** > **12** > **10** > **13** > **11** > **8** подудара се са јачином везивања комплекса за DNA. Својом активношћу нарочито су се издвојили комплекси **9** и **12**, чиме је потврђен утицај ароматичних прстенова у структури комплекса на везивање за BSA.

	Без присуства ма	ибупро	фен	еозин Ү		
	$K_{ m sv}$	$k_{\rm q}$	$K_{ m sv}$	k_{q}	$K_{ m sv}$	$k_{ m q}$
8	$(7,7\pm 0,4) imes 10^{3}$	$7,7 \times 10^{11}$	$(1,5\pm 0,4) \times 10^4$	$1,5 \times 10^{12}$	$(2,0\pm 0,2) imes 10^4$	$2,0 \times 10^{12}$
9	$(6,8\pm 0,2) imes 10^4$	$6,8 \times 10^{12}$	$(3,1\pm 0,2) \times 10^4$	$3,1 \times 10^{12}$	$(8,9\pm0,1) \times 10^3$	$8,9 \times 10^{11}$
10	$(3,5\pm 0,1) imes 10^4$	$3,5 \times 10^{12}$	$(2,8\pm 0,3) imes 10^4$	$2,8 \times 10^{12}$	$(2,2\pm 0,3) \times 10^4$	$2,2 \times 10^{12}$
11	$(1,6\pm 0,3) imes 10^4$	$1,6 \times 10^{12}$	$(1,7\pm 0,1) imes 10^4$	$1,7 \times 10^{12}$	$(1,4\pm 0,1) \times 10^4$	$1,4 \times 10^{12}$
12	$(7,6\pm 0,2) \times 10^4$	$3,5 \times 10^{12}$	$(5,0\pm 0,2) \times 10^4$	$5,0 \times 10^{12}$	$(1,2\pm 0,2) \times 10^4$	$1,2 \times 10^{12}$
13	$(3,3\pm 0,1) \times 10^4$	$3,3 \times 10^{12}$	$(2,6\pm 0,3) \times 10^4$	$2,6 \times 10^{12}$	$(3,0\pm 0,3) \times 10^4$	$3,0 \times 10^{12}$

Флуоресцентна мерења допуњена су проучавањем везивања комплекса **8–13** за BSA у присуству одговарајућих маркера, еозина Y за место I субдомена IIA и ибупрофена за место II субдомена IIIA. Еквимоларним концентрацијама протеина и маркера (2 μ M) додате су растуће концентрације комплекса **8–13** (до односа 20 μ M). Таласна дужина ексцитације била је 295 nm, а емисиони спектри праћени су у опсегу од 300-500 nm. Формирани адукти протеина и маркера, BSA-ибупрофен (Слика 3.2.3.1.1.) и BSA-еозин (Слика 3.2.3.1.2.) показују значајан интензитет емисије, до чијег смањења долази када испитивани комплекс замени маркер из везивног џепа протеина. Помоћу Stern-Volmer-ове (8) и Scatchard-ове једначине (9), као и истоимених графика, добијене су одговарајуће константе. У Табели 3.2.3.1.1. сумиране су добијене вредности за Stern-Volmer-ове константе (K_{sv}) и константе гашења флуоресценције (k_q) Упоредо су дати подаци за везивање комплекса **8–13** за протеин (BSA) самостално и у присуству маркера. Мале разлике у вредностима представљених константи, $K_b = 10^4$ M⁻¹, не издвајају ниједан од субдомена протеина као место са већом тенденцијом за везивање Ru(III) комплекса.¹⁸¹



Слика 3.2.3.1.1. Емисиони спектар BSA-ибупрофен адукта по додатку растуће концентрације комплекса 8–13. [BSA] = 2 μ M, [ибупрофен] = 2 μ M, [Ru] = 0 – 20 μ M; λ_{ex} = 295 nm. Стрелице показују промену интензитета емисије по додатку растуће концентрације комплекса. Уметнути графици: Stern-Volmer-ови графици за BSA-ибупрофен адукте у присуству комплекса 8–13.



Слика 3.2.3.1.2. Емисиони спектар HSA-еозин Y адукта по додатку растуће концентрације комплекса 8–13. [BSA] = 2 μ M, [еозин Y] = 2 μ M, [Ru] = 0 – 20 μ M; λ_{ex} = 295 nm. Стрелица показују промену интензитета емисије по додатку растуће концентрације комплекса. Уметнути графици: Stern-Volmer-ови графици за BSA-еозин Y адукте у присуству комплекса 8–13.

3.2.3.2. Молекулски докинг комплекса са BSA

Говеђи серум албумин, BSA, састоји се од полипептидног ланца који садржи 583 аминокиселина са три јасно дефинисана домена: I (аминокиселински остаци 1–195), II (аминокиселински остаци 196–383) и III (аминокиселински остаци 384–583), од којих сваки поседује субдомен А и Б.^{108,162} Хидрофобни џепови у субдоменима IIA и IIIA, путем којих је већина лекова транспортована, дефинисани су као активно место I и активно место II. Последњих деценија пронађен је и трећи D-хидрофобни џеп за везивање лекова у субдомену IБ (активно место III).¹⁸² Да бисмо што боље разумели начин везивања најстабилнијих конформација испитиваних комплекса за BSA, молекулски докинг је спроведен за сва три активна места протеина (Слика 3.2.3.2.1.).



Слика 3.2.3.2.1. 3D приказ најбољих докинг позиција комплекса 9 у случају три различита везивна места (активна страна I, II и III) говеђег серум албумина (ланац А) (PDB код: 4F5S).

Мале разлике у добијеним параметрима, приказане у Табели 3.2.3.2.1., указују да испитивани комплекси показују афинитет везивања за сва три активна места протеина. И у овом случају суптилне енергетске разлике дефинишу доминантно активно место везивања. На основу негативних вредности ΔG_{bind} , као и ниских вредности K_i , може се закључити да испитивани комплекси показују највећи афинитет везивања за активно место III BSA протеина, што је у складу са до сада публикованим резултатима за рутенијум комплексе са великим порфиринским прстеновима.¹⁸³

Афинитет везивања Ru комплекса опада у низу 9 > 12 > 13 > 10 > 11 > 8 и одговара експериментално добијеним Stern-Volmer-овим константама (K_{sv}). Као што је очекивано, комплекси са ароматичним прстеновима, 9 и 12, показују већи афинитет везивања за BSA у односу на комплексе без ароматичних прстенова, 8 и 11. На Слици 3.2.3.2.2. дат је 3D приказ најстабилнијих конформација комплекса 8–13 у активним местима I, II и III, односно хидрофобним џеповима BSA. Да би разумели механизам везивања испитиваних комплекса за протеин, неопходно је дискутовати интеракције комплекса са аминокиселинским остацима. Проучавањем интеракција комплекса 8–13 у активном месту I долазимо до закључка да су електростатичке интеракције од пресудног значаја за стабилизацију. Занимљиво је да различито позиционирани остаци аргинина: Arg 194, Arg 198 и Arg217 остварују везе са комплексима кроз електростатичке интеракције и конвенционалне водоничне везе. У активном месту II комплекс рутенијума стабилизован је хидрофобним

интеракцијама (π–алкил) оствареним са узастопним аминокиселинским остацима Val 408–Arg 409, Ag 412–Lys 413.

Табела 3.2.3.2.1. Термодинамички параметри најстабилнијих конформација Ru(III) комплекса **8–13** у различитим активним странама BSA добијени молекулским докинг симулацијама. (К_i константа инхибиције, ΔG_{bind} слободна енергија везивања, ΔG_{total} укупна енергија, ΔG_{tor} торзиона енергија, ΔG_{elec} електростатичка енергија и $\Delta G_{vdw+hbond+desolv}$ сумарна енергија дисперзије и одбијања (ΔG_{vdw}), ΔG_{unb} невезивна енергија система, енергија десолватације (ΔG_{desolv}) и водоничне везе (ΔG_{hbond}), kcal mol⁻¹).

Конформације	$\Delta \mathbf{G}$ bind	K _i (μM)	$\Delta \mathbf{G}_{inter}$	$\Delta \mathbf{G}_{vdw+hbond}$ +desolv	ΔG_{elec}	$\Delta \mathbf{G}_{total}$	$\Delta \mathbf{G}_{tor}$	$\Delta \mathbf{G}_{unb}$
BSA-8-I	-5,49	94,70	-5,76	-5,65	-0,11	-0,46	0,27	-0,46
BSA-8-II	-5,61	77,04	-5,89	-5,90	0,01	-0,45	0,27	-0,45
BSA-8-III	-6,47	18,24	-6,74	-6,61	-0,13	-0,45	0,27	-0,45
BSA-9-I	-6,02	38,39	-6,85	-6,76	-0,09	-1,01	0,82	-1,01
BSA-9-II	-7,87	1,71	-8,69	-8,53	-0,16	-0,93	0,82	-0,93
BSA-9-III	-8,26	0,87	-9,08	-9,15	0,08	-1,19	0,82	-1,19
BSA-10-I	-6,33	22,96	-6,88	-6,65	-0,23	-0,71	0,55	-0,71
BSA-10-II	-6,75	11,32	-7,30	-7,19	-0,11	-0,64	0,55	-0,64
BSA-10-III	-7,78	1,97	-8,33	-8,42	0,08	-0,84	0,55	-0,84
BSA-11-I	-5,97	42,09	-6,24	-6,13	-0,11	-0,44	0,27	-0,44
BSA-11-II	-5,79	56,56	-6,07	-6,05	-0,02	-0,28	0,27	-0,28
BSA-11-III	-6,76	11,09	-7,03	-6,92	-0,12	-0,44	0,27	-0,44
BSA-12-I	-5,47	97,08	-6,30	-6,16	-0,14	-1,19	0,82	-1,19
BSA-12-II	-7,09	6,36	-7,91	-7,84	-0,08	-1,19	0,82	-1,19
BSA-12-III	-8,25	0,90	-9,07	-9,14	0,07	-1,17	0,82	-1,17
BSA-13-I	-6,61	14,17	-7,16	-6,94	-0,23	-0,74	0,55	-0,74
BSA-13-II	-6,79	10,57	-7,34	-7,24	-0,11	-0,65	0,55	-0,65
BSA-13-III	-7,83	1,82	-8,38	-8,44	0,06	-0,85	0,55	-0,85

На крају, посебна пажња посвећена је интеракцијама комплекса са активним местом III, где парцијално негативни атом кисеоника у Glu 125 формира водоничну везу са атомима водоника –СН–групе комплекса 8 (1.86 Å) и 11 (1.84 Å) (Слика 3.2.3.2.3.). Ови комплекси су додатно стабилизовани присуством хидрофобних π -алкил интеракција са аминокиселинама Leu 122 и Lys 136. Аминокиселине Lys 136 и Glu 140 остварују везе преко парцијално негативног атома кисеоника и атома водоника из координованог молекула воде у комплексима 9, 11, 12, и 13. Аминокиселине Leu 115, Leu 122, и Tyr 160 укључене су у формирање π -алкил интеракција између ароматичних прстенова и метил група у комплексима 9, 11, 12, и 13. Такође, остварене су и интеракције између ароматичног прстена Рhe 133 и σ орбитале –CH– групе (π – σ контакт) у означеним комплексима.



Слика 3.2.3.2.2. Приказ најповољнијих докинг позиција комлекса 8–13 у субдомену IB (активно место везивања III) говеђег серум албумина (BSA) (PDB код: 4F5S). Комплекси 8–13 представљени су плавим штапићима (атоми угљеника). Различите боје на самим штапићима представљају различите атоме: азот-плава, кисеоник-црвена, хлорид-зелена, Ru(III) јон-тамно зелена. У циљу јаснијег представљања добијених резултата структура протеина је изостављена.



Слика 3.2.3.2.3. 2D приказ интеракција комплекса 8–13 у аминокиселинским остатцима у субдомену IB (активна страна III) говеђег серум албумина (BSA) (PDB код: 1Z3F) са међуатомском динстанцом добијеном након молекулских докинг симулација. За представљање сваког прусутног типа интеракција коришћена је друга боја.

3.2.4. Интеракције комплекса са HSA

3.2.4.1. Испитивање интеракција комплекса 12 са HSA емисионом методом

Интеракције комплекса 12 са HSA праћене су применом флуоресцентне спектроскопије, која представља квантитативно мерило јачине везивања. Додавање растуће коцентрације комплекса 12 у раствор HSA узрокује смањење интензитета емисије (Слика 3.2.4.1.1.А). Запажене промене у спектру протеина приписују се променама у терцијарној структури протеина, односно окружењу Trp, што са сигурношћу потврђује везивање испитиваног комплекса за албумин.^{197,198,199} Мерило јачине везивања је Stern-Volmer-ова константа (K_{sv}) добијена из истоимене једначине (6). Добијена вредност Stern-Volmer-ове константе за комплекс 12 ($K_{sv} = 3,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) указује на умерену јачину везивања за HSA. Испитивани комплекс је показао константу везивања истог реда величине (10⁴) и у случају везивања за BSA.²⁰⁰



Слика 3.2.4.1.1. Емисиони спектар HSA у присуству комплекса 12. А) Стрелица показује смањење интензитета емисије са додатком растуће концентрације комплекса. Уметнут график: Stern-Volmer-ов график за комплекс 12. Б) График зависности $log[I_0-I)/I]$ од log[Q].

Константа гашења флуоресценције (k_q) зависи од вероватноће судара једињења и флуорофоре, и мера је изложености аминокиселине Trp леку. Вредност $k_q = 3,20 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ иницира добру могућност гашења флуоресценције, односно високу доступност Trp. Очекивана горња граница за k_q је $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, због чега се претпоставља да везивање комплекса **12** за протеин није искључиво контролисано дифузијом, већ је праћено специфичним лек-протеин интеракцијама које вредност поменуте константе чине већом.^{198,199}

Константа везивања (K_b) и број везивних места у протеину (n) добијени су из Scatchard-ове једначине (7) и графика (Слика 3.2.4.1.1.Б). Одређивање константе везивања (K_b) може послужити за предвиђање дистрибуције комплекса кроз крвну плазму. За комплекс 12 добијена вредност $K_b = 1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ сматра се оптималном, односно ова вредност указује на везивање комплекса за протеин које ће бити, са једне стране, довољно јако да омогући транспорт, а са друге стране довољно слабо да омогући отпуштање комплекса од стране протеина након извршене дистрибуције до жељеног места.²⁰¹⁻²⁰³ Број везивних места n је 1, чиме је потврђено једно везивно место у протеину погодно за везивање комплекса $12.^{204}$
3.2.4.2. Молекулски докинг комплекса са HSA

У оквиру испитивања са HSA и Bcl-2 макромолекулима коришћене су MVD функције, од којих се најрелевантнијим сматрају MolDock и Hbond. Најбоље позиције испитиваних комплекса са најнижим докинг вредностима аплициране су како би предпоставили везивање унутар шупљине HSA протеина у субдоменима IIA (везивно место I) и IIIA (везивно место II), као и везивно место у Bcl-2 протеину у случају свих шест комплекса (8–13). Постоји велика хидрофобна шупљина у субдомену IIA за смештај лекова, што је од великог значаја за метаболизам и транспорт биомолекула. У складу са коришћеним функцијама, резултати интеракција испитиваних комплекса са везивним местом IIA HSA протеина изражени су параметрима представљеним у Табели 3.2.4.2.1. Најбоље позиције према Hbond вредностима за комплексе 8-13 који су смештени у субдомен IIA приказане су на Слици 3.2.4.2.1.

Табела 3.2.4.2.1. Вредности параметара добијених након молекулског докинга за комплексе **8–13** који су смештени у активном месту IIA HSA протеина.

Комплекс	MolDock	Rerank	Hbond	Docking	Остаци аминокиселина ^{b,c}
8 ^{<i>a</i>,<i>b</i>}	-102,16	-75,95	-2,89	-103,08	Pro-447(H), Cys-448(H), Asp-451, Tyr452(H)
9 ^{<i>a</i>}	-122,71	-60,39	-2,06	-125,09	Arg-257, Ala-291, Lys-199(H), His- 242(H), Ser-192, Trp-214,
9^b	-121,91	-40,37	-3,58	-123,71	Arg-222(H), Leu-219
10 ^{<i>a</i>}	-114,38	-86,67	-1,73	-114,71	Arg-222, Lys-195(H), Ser-192, Glu-292(H), Ala-291, Tyr-150,
10 ^b	-111,31	-63,87	-4,76	-112,31	Gln-196, Lys-199(H)
11 ^{<i>a</i>}	-108,74	-79,99	-2,99	-109,72	Ile-264, Leu-238, Tyr-150(H),
11 ^b	-94,68	-79,96	-5,27	-99,46	Arg-257(H), Ala-291, Ser-287(H),
12 ^{<i>a</i>}	-127,59	-77,91	-2,37	-129,59	Pro-447(H), Cys-448(H),
12^b	-120,96	-72,78	-3,14	-121,48	Tyr-452(H), Arg-218, Asp-451
13 ^{<i>a</i>}	-121,21	-89,64	-3,16	-121,75	$\Delta sn_{2}95(H)$ Glu_294
13 ^b	-103,56	-75,01	-4,33	-108,97	Asii-275(11), Olu-294

^а Најбољи положај комплекса према MolDock вредностима

^{*b*} Најбољи положај комплекса према Hbond вредностима

^с(H) ознака за аминокиселину која остварује водоничну везу са комплексом

Ru(III) комплекси 8–13 добро су смештени у везивни џеп активног места IIA HSA молекула, што се може закључити на основу вредности сумираних у Табели 3.2.4.2.1. Афинитет везивања комплекса за активно место IIA опада у низу $12 > 13 \ge 9 > 10 > 11 > 8$. Сви комплекси поседују могућност формирања водоничних веза које стабилизују формиран систем HSA-комплекс и сматра се значајним фактором за успешан транспорт лека кроз организам. Формирање водоничне везе се углавном остварује преко координованих молекула воде испитиваних комплекса.









Слика 3.2.4.2.1. Најбољи положаји комплекса 8-13 смештеног у субдомен IIA HSA протеина према Hbond вредностима: A) резултати молекулског докинга илустровани на примеру протеинске основе; Б) везивно место протеина са издвојеним аминокиселинама презентовано штапним моделом (водоничне везе представљене су плавим испрекиданим линијама).

Студије молекулског докинга примењене су и за субдомен IIIA протеина HSA за комплексе 8–13, при чему су добијене вредности параметара представљене у Табели 3.2.4.2.2. Најбоље позиције комплекса 8-13 према Hbond вредностима за активно место IIIA представљене су на Слици 3.2.4.2.2. Афинитет везивања комплекса за активно место IIIA опада у низу $8 > 11 \ge 10 > 13 > 11 > 9$. Узимајући у обзир чињеницу да је шупљина у субдомену IIIA мања од оне у субдомену IIA, као и волуминозност испитиваних комплекса, не изненађује податак да комплекси боље пристају субдомену IIA. Тако, мање волуминозни комплекси 8 и 11 (без фенил групе) остварују боље интеракције са HSA унутар субдомена IIIA. У оквиру субдомена IIIA, испитивани комплекси могу да формирају водоничне везе углавном преко остатака аминокиселина, као што су Туг-411, Asn-391 и Leu-387.

Комплекс	MolDock	Rerank	Hbond	Docking	Остаци аминокиселина ^{b,c}
8 ^{<i>a</i>}	-70,54	-68,91	-0,01	-69,81	Ile-388, Val-433, Leu-453, Leu-387(H), Asn-391(H), Ala-
8 ^b	-58,33	-50,13	-0,73	-53,74	449, Cys-438, Cys-392, Gly-434
9 ^a	-33,04	-30,13	0	-31,51	Phe-403, Cys-438, Cys-392, Leu-453, Arg-445, Ala-449,
9 ^b	-19,36	-15,26	-1,23	-20,73	Cys-437, Val-433, Asn-391(H), Leu-387, Pro-384, Glu-450, Ile- 388
10 ^{<i>a</i>}	-65,67	-60,53	0	-65,57	Leu-430, Leu-453, Asn-391, Tyr-411(H), Lys-414, Ser-489,
10 ^b	-38,03	-35,01	-2,45	-39,89	Arg-410
11 ^{<i>a</i>}	-66,72	-60,27	-0,47	-66,29	Leu-407, Leu-453, Tyr-411(H),
11^{b}	-41,24	-40,42	-1,19	-47,22	Arg-410, Asn-391, Arg-485, Leu-387
12 ^{<i>a</i>}	-35,41	-30,13	0	-35,57	Val-433, Leu-387, Asn-391(H),
12 ^b	-19,95	-14,17	-1,68	-24,54	Gln-390, Arg-410, Ser-489, Tyr-411(H), Leu-453, Leu-430
13 ^{<i>a</i>}	-61,86	-57,66	0	-61,81	Ile-388, Cys-392, Val-433, Leu-
13 ^b	-41,42	-37,42	-2,05	-39,51	453, Leu-407, Leu-430, Tyr- 411(H), Arg-485

Табела 3.2.4.2.2. Вредности параметара добијених након молекулског докинга за комплексе **8–13** који су смештени у активном месту IIIA HSA протеина.

^а Најбољи положај комплекса према MolDock вредностима

^{*b*} Најбољи положај комплекса према Hbond вредностима

^{*c*}(H) ознака за аминокиселину која остварује водоничну везу са комплексом







100



Слика 3.2.4.2.2. Најбољи положаји комплекса 8–13 смештеног у IIIA субдомен HSA протеина према Hbond вредностима: A) резултати молекулског докинга илустровани на примеру протеинске основе; Б) везивно место протеина са издвојеним аминокиселинама презентовано штапним моделом (водоничне везе представљене су плавим испрекиданим линијама).

Способност малих молекула да инхибирају антиапоптозни Bcl-2 протеин повезана је са осетљивошћу канцерогених ћелија на апоптозу.⁴⁶ Механизам деловања ових инхибитора зависи од могућности остваривања везе са везивним жљебом Bcl-2 протеина које узрокује инхибицију. У циљу одређивања способности комплекса **8–13** да инхибирају Bcl-2 протеин урађена су докинг испитивања. Најбољи положаји према функцији бодовања сумирани су у Табели 3.2.4.2.3. и приказани су на Слици 3.2.4.2.3.

Табела	3.2.4.2.3.	Вредности	параметара	добијених	након	молекулског	докинга за	комплексе	8–13
прилик	ом везива	ња за Bcl-2 г	протеин.						

Комплекс	MolDock	Rerank	Hbond	Docking	Остаци аминокиселина ^{b,c}
8 ^{<i>a</i>}	-97,56	-54,74	-3,91	-89,82	Ala-72, Val-118, Glu-119, Val-115,
8^{b}	-95,47	-58,96	-5,66	-97,19	Lys-22, Ser-75(H), Phe-71(H), Arg-68
9 ^{<i>a</i>}	-100,63	-71,39	-1,62	-101,99	Leu 78 Asp 70(H) Met 74
9 ^b	-98,19	-65,51	-1,82	-99,51	Leu-78, Asp-76(11), Met-74
10 ^{<i>a</i>,<i>b</i>}	-109,71	-72,15	-3,63	-90,27	Lys-22(H), Val-118, Ser-64(H), Arg-65, Arg-26(H), Arg-68, Phe-71
11 ^{<i>a,b</i>}	-101,59	-59,13	-5,34	-101,72	Ala-72, Val-118, Phe-71(H), Ser-75(H), Val-115, Lys-22, Arg-68
12 ^{<i>a</i>}	-103,39	-69,04	-0,92	-105,83	L 78 A 70(11) M-4 74
12^{b}	-101,26	-67,27	-2,16	-101,61	Leu-/8, Asp-/0(H), Met-/4
13 ^{<i>a</i>}	-98,64	-61,23	0	-97,16	$C_{12} = 05(11) I_{122} = 0((11) V_{12} = 0)$
13 ^b	-94,26	-67,45	-0,89	-96,23	Giu-95(H), Leu-96(H), Val-92

^а Најбољи положај комплекса према MolDock вредностима

^{*b*} Најбољи положај комплекса према Hbond вредностима

^с(H) ознака за аминокиселину која остварује водоничну везу са комплексом

На основу MolDock вредности приказаних у Табели 3.3.4.2.3., рутенијум комплекси поседују сличан афинитет везивања за антиапоптотични протеин Bcl-2, у опсегу од –94,26 за комплекс 12 до –109,71 за комплекс 10. Комплекси, поред своје структурне компатибилности са местом везивања на Bcl-2 протеину, могу да формирају и водоничне везе у завиности од изложености координованих молекула воде аминокиселинским остацима Bcl-2 протеина.









Слика 3.3.4.2.3. Најбољи положаји комплекса 8–13 приликом везивања за Bcl-2 протеин према Hbond вредностима: А) резултати молекулског докинга илустровани на примеру протеинске основе;

Б) везивно место протеина са издвојеним аминокиселинама презентовано штапним моделом (водоничне везе представљене су плавим испрекиданим линијама).

3.2.5. Испитивање цитотоксичности комплекса

3.2.5.1. In vitro cmyduje

МТТ тест је такође коришћен за испитивање цитотоксичности комплекса 8–13 на ћелијским линијама карцинома плућа (А549 и LLC1) и дебелог црева (НСТ116 и СТ26). На основу добијених резултата, који су приказани на Слици 3.2.5.1.1., може се видети да испитивани комплекси показују цитотоксичност према А549 и LLC1 ћелијским линијама, која зависи од примењене дозе. Такође, добијена цитотоксичност је нижа у поређењу са цисплатином. Наиме, највишу цитотоксичност према А549 и LLC1 ћелијским линијама, која зависи од примењене дозе. Такође, добијена цитотоксичност је нижа у поређењу са цисплатином. Наиме, највишу цитотоксичност према А549 и LLC1 ћелијским линијама показали су комплекси 9 и 12, нарочито у средњим дозама од 31,25 и 62,5 μ M, када је цитотоксична активност била упоредива са активношћу цисплатине. Најнижу активност, према МТТ тесту, показују комплекси 8 и 11. Комплекси 9, 10, 12 и 13 су такође показали умерену активност према ћелијским линијама карцинома дебелог црева само када су коришћени у највишим концентрацијама (500 μ M). Својом цитотоксичношћу према ћелијским линијама карцинома дебелог црева НСТ116 ћелијама карцинома дебелог црева када су коришћени у највишим концентрацијама (500 μ M). Својом цитотоксичношћу према ћелијским линијама карцинома дебелог црева само када су коришћени у највишим концентрацијама (500 μ M). Својом цитотоксичношћу према ћелијским линијама карцинома дебелог црева само када су коришћени у највишим концентрацијама (500 μ M).



Слика 3.2.5.1.1. Цитотоксичност комплекса 8–13 према А549, LLC1, HCT116 и CT26 ћелијским линијама након излагања у периоду од 72 h добијена МТТ тестом.

На основу резултата приказаних у Табели 3.2.5.1.1. може се закључити да сви тестирани комплекси показују бољу активност према ћелијским линијама карцинома плућа у односу на ћелијске линије карцинома дебелог црева. Анализом добијених IC₅₀ вредности Ru(III) комплекса и цисплатине може се закључити да комплекс **12** показује највишу цитотоксичност у случају свих ћелијских линија коришћених у експериментима. Нижу, али свакако значајну активност, показује и комплекс **9**, док комплекси **11** и **8** показују најмању активност.

Ћелијска		$IC_{50} \pm SD (\mu g/mL)$					
линија	A549	HCT116	LLC1	CT26			
8	284 ± 5	374 ± 8	69 ± 1	490 ± 10			
9	34 ± 7	49 ± 9	14 ± 4	108 ± 2			
10	113 ± 9	86 ± 4	24 ± 4	83 ± 7			
11	370 ± 7	460 ± 10	149 ± 4	710 ± 10			
12	21 ± 5	17 ± 4	9 ± 3	18 ± 5			
13	70 ± 10	114 ± 9	60 ± 10	107 ± 2			
CDDP	6 ± 1	15 ± 4	2 ± 1	4 ± 1			

Табела 3.2.5.1.1. IC₅₀ вредности цитотоксичне активност комплекса **8–13** и цисплатине одређене МТТ тестом.

У циљу испитивања селективности комплекса **8–13** према ћелијским линијама, цитотоксичност је испитивана према здравим ћелијама фибробласта, при чему су добијене IC_{50} вредности и индекс селективности приказани у Табели 3.2.5.1.2. Добијене вредности индекса селективности указују на мању селективност свих тестираних комплекса у односу на цисплатину. Комплекс **12**, који се претходно издвојио највишом активношћу у случају коришћених ћелијских линија карцинома, показао је најмањи цитотоксични индекс, што указује на највишу цитотоксичност према здравим ћелијама. Међутим, комплекс **9**, који показује IC_{50} вредност нешто вишу у поређењу са комплексом **12**, показао је најбољу селективност у случају обе ћелијске линије. Узимајући у обзир бољу цитотоксичност свих комплекса према ћелијским линијама карцинома плућа, најнижу IC_{50} вредност комплекса **12**, као и најбољи индекс селективности комплекса **9**, комплекси **9** и **12** даље су тестирани на ћелијским линијама карцинома плућа.

Табела 3.2.5.1.2.	Индекс селективности	комплекса 8-13 и	цисплатине з	за А549 и Н	ІСТ116 ћелиј	ске
линије. Индекс се	лективности одређен је 1	као део ІС50 вредно	ости за MRC-5	5 и А549 или	и HCT116 ћели	ије.

Индекс селективности	$IC_{50} \pm SD$	(μg/mL)
	A549	HCT116
8	1,13	0,86
9	1,75	1,20
10	0,90	1,18
11	1,16	0,94
12	0,60	0,75
13	1,11	0,72
CDDP	3,82	1,38

Добијени резултати *in vitro* испитивања указали су на велики утицај ароматичних супституената у структури Ru(III) комплекса на антиканцерогену активност. Наиме, увођењем ароматичног супституента у структуру тетрадентатног лиганда, односно Schiff-ове базе, добијен је комплекс 12 са побољшаним антиканцерогеним особинама. Ови резултати су у сагласности са недавно публикованим резултатима за Ru-терпиридин комплексе са бидентатним и тридентатним лигандима меридијалне геометрије.¹⁸⁴

3.2.5.2. Анализа потенцијала апоптозе

ћелијска смрт апоптозом у случају ћелијских линија колоректалног карцинома изазвана дејством комплекса рутенијума је раније потврђена.^{151,185} У циљу одређивања способности комплекса да изазову апоптозу коришћено је Annexin *V* FITC/PI двоструко бојење. За мерење потенцијала апоптозе у ћелијској линији карцинома плућа коришћени су комплекси 9 и 12 у концентрацији од 62,5 μ M. Проточна цитометријска анализа показала је да комплекси 9 и 12 изазивају апоптотичку смрт А549 ћелија у већем проценту него сама цисплатина (Слика 3.2.5.2.1). Такође, ови комплекси узрокују рану и касну апоптозу А549 ћелија у знатно већем проценту у поређењу са нетретираним ћелијама (Слика 3.2.5.2.1.А).

У случају А549 ћелија највиши степен апоптозе примећен је након третирања комплексима 9 и 12 у фази ране апоптозе (Anenxin V+ PI-), док је код третираних LLC1 ћелија до ћелијске смрти дошло у касној апоптози (Annexin V+ PI+). Проценат LLC1 ћелија у касној апоптози изазване након третирања комплексима 9 и 12, слично ћелијама третираним цисплатином, био је знатно већи у поређењу са нетретираним ћелијама (Слика 3.2.5.2.1.Б).



Слика 3.2.5.2.1. Апоптоза нетретираних и A549 (A) и LLC1 (Б) ћелија третираних 24 h цисплатином и комплексима 9 и 12, при дози од 62,5 μ M двоструко обојене Annexin-ом V/PI, анализиране су проточном цитометријом. Добијени резултати представљени су као средња вредност три независна експеримента, *p < 0,05 указује на значајну разлику. Репрезентативне тачке показују популације одрживих (AnnV-PI-) ћелија у фази ране апоптозе (AnnV+PI-), касне апоптозе (AnnV+PI+) и некротичних (AnnV+PI+) А549 (А десни панел) и LLC1 (Б десни панел) ћелија.

Протеини из Bcl-2 породице учествују у формирању хетеродимеричног комплекса у митохондријама, чиме се објашњава њихова улога у контроли унутрашњег пута апоптозе. Bcl-2 протеин повезан са Вах протеином учествују у отпуштању цитохрома *с* из митохондрија и активацији каскаде каспаза, што резултира ћелијском смрћу. Антиапоптотични протеин Bcl-2 спречава отпуштање цитохрома *с* посредовано Вах протеином, што доводи до рестрикције апоптотичног пута и опстанка ћелије.¹⁸⁶ BH3-проапоптотични молекул, Noxa, везује само Mcl-1 антиапоптотични молекул, а однос Noxa/Mcl-1 може регулисати ћелијску смрт и преживљавање.¹⁸⁷ Због утицаја великог броја цитотоксичних агенаса на баланс про- и анти-апоптотичних молекула, а самим тим и на повећање ћелијске смрти изазване апоптозом, даљи ток истраживања био је усмерен на анализу процента Mcl-1 и Noxa молекула у A549 и LLC1 ћелијама након третирања комплексима 9 и 12. Добијен је знатно већи проценат Noxa позитивних A549 ћелија третираних комплексима 9 и 12 у

поређењу са нетретираним ћелијама и ћелијама третираним цисплатином (Слика 3.2.5.2.2.А). Проценат Mcl-1 који утиче на A549 ћелије третиране комплексима 9, 12 и цисплатином знатно је нижи у поређењу са нетретираним ћелијама. Даље, однос Mcl-1 и Noxa је значајно нижи у ћелијама третираним комплексима рутенијума у поређењу са нетретираним и цисплатина третираним ћелијама (Слика 3.2.5.2.2.Б). Ови резултати могу указати на утицај комплекса 9 и 12 на баланс између про- и анти-апоптотичних молекулула, а самим тим и на апоптотичну смрт A549 ћелија (Слика 3.2.5.2.2.В).



Слика 3.2.5.2.2. Утицај Ru(III) комплекса 9 и 12 на однос Mcl1 и Noxa у A549 ћелијама. Графици показују средњу вредност три независна мерења (A) проценат Noxa и Mcl1 позитивних A549 ћелија и (Б) Mcl1 и Noxa односа. Статистички значај, дефинисан помоћу Студентског теста; *p < 0,05 указује на разлику у проценту A549 ћелија третираних комплексима 9 и 12, и нетретираних ћелија, *p < 0,05 указује на разлику у проценту A549 ћелија третираних комплексима 9 и 12, као и ћелија третираних цисплатином. (B) Репрезентативни хистограм експресије Noxa и Mcl1 (средњи интензитет флуоресценције) у A549 ћелијама.

У случају LLC1 третирање комплексима 9 и 12 знатно смањује проценат ћелија које изражавају Mcl-1 и Bcl-2 молекуле (Слика 3.2.5.2.3.А), као и проценат ћелија који изражавају проаптотичне молекуле Вах и Noxa (Слика 3.2.5.2.3.Б). Ови комплекси такође смањују експресију Mcl-1 у LLC1 ћелијама и повећавају експресију Noxa, нарочито комплекс 12 (Слика 3.2.5.2.3.В). Забележено је да камптотецин појачава експресију Noxa и Mcl-1 у HeLa ћелијама, али истовремено изазива и њихову

апоптозу.¹⁸⁷ Ова чињеница објашњава се способношћу лекова да промене релативни однос Mcl-1 и Noxa, и тиме узрокују апоптозу. Могуће је да комплекси 9 и 12 мењају поменути однос и индукују апоптозу LLC1 ћелија.



Слика 3.2.5.2.3. Дејство комплекса 9 и 12 на проценат LLC1 које утичу на анти- и про-апоптозне молекуле. Графици показују средњу вредност три независна експеримента: проценат (A) Noxa и Mcl1, и (Б) Bcl-2 и Bax при утицају на LLC1 ћелије. Статистички значај дефинисан је помоћу Студенског теста; * p < 0,05, **p < 0,01, и *** p < 0,005 указује на разлику у проценту LLC1 ћелија третираних комплексима 9, 12 и нетретираних ћелија, #p < 0,05 и ##p < 0,01 указује на разлике у проценту LLC1 ћелија третираних Ru(III) комплексима и цисплатином. (B) Penpeзентативни хистограм експересије Noxa и Mcl1 (средњи интензитет флуоресценције) у LLC1 ћелијама.

Фосфатидилинозитид 3-киназа (PI3K)/АКТ-сигнални пут један је од најважнијих за преживљавање ћелија карцинома. Фосфорилисани активирани АКТ инактивира проапоптотичне протеине, али индукује експресију антиапоптотичних протеина изазивајући притом инхибицију апоптозе.¹⁸⁸ У складу са повећаним садржајем Noxa, смањеним садржајем Mcl-1 и повећаном апоптозом А549 ћелија, примећено је и значајно смањење процента А549 ћелија израженог фосфорилисаним АКТ, рАКТ, након третирања комплексима 9 и 12 (Слика 3.2.5.2.4.А). Знатно нижи

садржај рАКТ у LLC1 нађен је након третирања комплексом **12** у поређењу са нетретираним ћелијама (Слика 3.2.5.2.4.А). Комплекс **12** такође узрокује значајно смањење рАКТ експресије у LLC1 ћелијама (Слика 3.2.5.2.4.Б). Ови резултати могу указати да комплекси **9** и **12** доводе до смрти ћелија карцинома плућа (А549) инхибицијом АКТ активације, што резултује смањењем експресије Mcl-1, протеина значајног за опстанак и ћелија карцинома плућа,¹⁸⁹ као и измењеним односом Mcl-1 и Noxa водећи до апоптозе.



Слика 3.2.5.2.4. Утицај Ru(III) комплекса 9 и 12 на проценат ћелија карцинома плућа који је изражен кроз pAKT. (А) Графици показују средњу вредност три независна експеримента за проценат pAKT A549 и LLC1 ћелија. Статистички значај одређен је Студентским тестом; * p < 0,05 указује на разлику у проценту третираних и нетретираних ћелија. (Б) Репрезентативни хистограм за pAKT експресију (средњи интензитет флуоресценције) у A549 и LLC1 ћелијама.

3.2.5.3. Антипролиферативна активност Ru(III) комплекса

Кі-67 је протеин смештен у једру пролиферативних ћелија и један је од најважнијих маркера за детектовање агресивне пролиферације ћелија карцинома.¹⁹⁰ Претпоставља се да Ru(III) комплекси испољавају своју антитуморску активност делимично смањењем пролиферације LLC1 ћелија. Ru(III) комплекси 9 и 12 значајно смањују проценат Кі-67 протеина у LLC1 ћелијама у поређењу са нетретираним и ћелијама које су третиране цисплатином (Слика 3.2.5.3.1.). Комплекс 12 такође редукује проценат D1 циклина у LLC1 ћелијама.



Слика 3.2.5.3.1. Утицај Ru(III) комплекса 9 и 12 на пролиферацију LLC1 ћелија. Графици показују средњу вредност три независна мерења за Ki-67 и циклин D1 који утичу на LLC1 ћелије. Статистички значај дефинисан је помоћу Студентског теста; * p < 0,05 указује на разлику у проценту третираних и нетретираних ћелија; # p < 0,05 указује на разлику у проценту LLC1 ћелија третираних Ru(III) комплексима и цисплатином.

3.2.5.4. In vivo cmyduje

Након потврђене активности комплекса 9 и 12 *in vitro*, следећи циљ истраживања био је испитивање потенцијала комплекса да смање раст Lewis карцинома плућа миша и метастаза *in vivo*. Мишеви су најпре заражени субкуталним инјектирањем LLC1 ћелија. Након 15 дана од инјектирања појавио се опипљиви тумор, који је третиран комплексима 9 и 12, као и цисплатином као контролном. Комплекс 12 смањио је запремину тумора, али не у мери забележеној код тумора третираним цисплатином (Слика 3.2.5.4.1.). Код тумора третираним комплексом 9 запремина је била знатно већа, чак и у поређењу са контролном групом мишева.



Слика 3.2.5.4.1. Утицај комплекса 9 и 12 на раст примарног Lewis карцинома плућа. Мишеви (5 у свакој групи) су субкутално заражени LLC1 ћелијама, а затим наком 15 дана третирани Ru(III) комплексима, цисплатином или физиолошким раствором. А) Графици показују средњу вредност запремине тумора у групама. Статистички значај дефинисан је Студентским тестом; * p < 0,05 указује на разлику у проценту третираних и нетретираних мишева; Б) Репрезентативни тумори издвојени за сваку од група.

Плућна ткива анализирана су интраперитонеално 26-ог дана од инокулације туморских ћелија у групи нетретираних мишева и мишева који су третирани комплексима 9, 12 и цисплатином. Хистолошке анализе показале су да комплекс 9 смањује појаву метастаза у плућима, док се код мишева третираних комплексом 12 у свим случајевима развила метастаза (Табела 3.2.5.4.1.).

Табела 3.2.5.4.1. Учесталост метастаза у плућима. Проценат мишева код којих су метастазе у плућима детектоване 26 дана након инокулације ћелија тумора у контролној групи и групи мишева који су примили шест доза цисплатине или Ru(III) комплекса.

	нетретирано	цисплатина	9	12
Проценат мишева са метастазама у плућима	100	66,66	33,33	100

Штавише, комплекс 9 је значајно смањио средњи број метастаза у плућима у поређењу са нетретираним и мишевима третираним цисплатином (Слика 3.2.5.4.2.).



Слика 3.2.5.4.2. Утицај комплекса 9 и 12 на број метастаза у примарном Lewis карциному плућа. Графици представљају средњу вредност броја метастаза карцинома плућа.

Комплекс 9, иако није показао смањење раста примарног тумора, показао је бољу антиметастатску активност од саме цисплатине. Код мишева третираних комплексом 12 није било добро формираних метастатских жаришта у плућима, као што је забележено код мишева третираних цисплатином (Слика 3.2.5.4.3.), али је примећена хиперемија и крварење. Мала жаришта крварења откривена су у плућима мишева третираних комплексом 9, али метастазе нису откривене ни у једном делу плућа.



Слика 3.2.5.4.3. Репрезентативне секције плућног ткива бојене хематоксилином и еозином 26 дана након субкуталног инјектирања LLC1 ћелија (увећање 100× и 400×).

3.2.5.5. Антимикробна активност комплекса

Могући механизми антимикробне активности обухватају деструкцију ћелијског зида, деактивацију мембране протеина, интеракције са мембранским фосфолипидима, нарушавање и распад фосфолипидног двослоја и цурење цитоплазме, инхибицију синтезе протеина или нуклеинских киселина. Са друге стране, комплекси могу показати антифунгалну активност кроз утицај на неки од ћелијских процеса, као што су смањење запремине и интраћелијско стварање реактивне врсте кисеоника (ROS).

Антибактеријска и антифунгална активност комплекса **8–13** испитивана је употребом грампозитивних бактерија: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*; грам-негативних бактерија: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis*; као и гљивица: *Fusarium solani*, *Trichoderma viride*, *Penicillium italicum*, *Mucor mucedo* и *Aspergillus niger*. Добијене вредности минималне концентрације потребне за инхибицију (MIC) сумиране су у Табели 3.2.5.5.1. Ради могућег поређења наведене су и MIC вредности за стрептомицин, док су у Табели 3.2.5.5.2. у идентичне сврхе наведене MIC вредности кетокеназола.

Испитивана	Bacillus subtilis	Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Proteus mirabilis	Klebsiella pneumoniae
једињења			(MIC) mg/mL		
8	0,234	0,468	0,937	0,937	1,875
9	0,029	0,029	0,937	0,937	1,875
10	0,029	0,029	0,468	0,937	1,875
11	0,937	0,468	0,937	0,937	1,875
12	0,029	0,014	0,937	0,937	3,750
13	0,029	0,014	0,937	0,468	1,875
Стрептомицин	0,016	0,031	0,062	0,062	0,031

Табела 3.2.5.5.1. Антибактеријска активност комплекса 8-13.

Испитивана једињења	Fusarium solani	Trichoderma viride	Penicillium italicum	Mucor mucedo	Aspergillus niger
-			(MIC) mg/ml		
8	1,875	3,750	1,875	3,750	3,750
9	1,875	0,937	0,468	0,937	0,468
10	0,937	1,875	0,468	0,937	0,468
11	0,937	1,875	0,937	3,750	0,937
12	1,875	0,468	0,234	1,875	0,234
13	0,937	0,937	0,468	0,937	0,468
Кетокеназол	0,078	0,078	0,156	0,156	0,078

Табела 3.2.5.5.2. Антифунгална активност комплекса 8–13.

На основу МІС вредности антибактеријске и антифунгалне активности сумираних у Табелама 3.2.5.5.1. и 3.2.5.5.2. може се закључити да испитивани комплекси **8–13** показују снажну антимикробну активност према свим микроорганизмима, са МІС вредностима у опсегу од 0,014 до 3,750 mg/mL у зависности од коришћене бактерије. Својом антибактеријском активношћу према *S. Aureus* нарочито су се издвојили комплекси **12** и **13**, који су са МІС вредности у лечењу. Добијене показали бољу активност чак и у поређењу са антибиотицима до сада коришћеним у лечењу. Добијене МІС вредности за антифунгалну активност испитиваних комплекса крећу се од 0,234 до 3,750 mg/mL, где се у групи коришћених микроорганизама као најосетљивија издвојила гљивица *P. italicum*.

Испитивани Ru(III) комплекси су показали слабију антифунгалну активност у поређењу са антибактеријском. Ова разлика у осетљивости бактерија и гливица третираних комплексима **8–13** није неочекивана и може се објаснити разликама у структури ћелијског зида бактерија и гљивица. Наиме, зид грам-позитивних бактерија сачињен је од муреина и теихоинске киселине, грам-негативне бактерије поседују зид сачињен од липопилисахарида и липопротеина, док је ћелијски зид гљивица сачињен од хитина, глукана, манана (линеарног полисахарида) и диаминопимелинске киселине.^{140,191} Управо ове разлике у структури ћелијског зида гљивица и бактерија узрок су веће резистентности самих гљивица.

3.2.5.6. Антиоксидативна активност комплекса

Испитивани комплекси 8–13 показују висок проценат инхибиције DPPH радикала, о чему говоре резултати сумирани у Табели 3.2.5.6.1. Међу проучаваним комплексима највишим процентом инхибиције издвојио се комплекс 8. Антиоксидативна својства сличних једињења раније су публикована.^{192,193}

Занимљиво је да испитивани комплекси са смањењем концентрације показују повећање процента инхибиције DPPH радикала. На основу до сада публикованих резултата очекивали смо супротан ефекат, односно да се вишим концентрацијама испитиваних једињења постиже већи проценат инхибиције слободних радикала. Овакво неочекивано понашање може бити узроковано јаком бојом испитиваних Ru(III) комплекса, због чега је испитивање поновљено са разблаженијим растворима комплекса (125-15,621 mg/mL), када су добијени резултати остали непромењени. Друга могућност појашњења поменуте појаве јесте својство неких једињења, укључујући и нашироко примењиване антиоксидансе као што су аскорбинска киселина, α-токоферол и друга, да могу бити изузетно делотворна у ниским концентрацијама.

Испитивана	1000 μg/ml	500 μg/ml	250 μg/ml	125 μg/ml						
једињења		Проценат инхибиције (%)								
8	$50,06\pm0,02$	$69,56 \pm 0,03$	$82,\!94 \pm 0,\!01$	$89,\!98 \pm 0,\!02$						
9	$40,\!23 \pm 0,\!03$	$67,\!53 \pm 0,\!06$	$80{,}28\pm0{,}02$	$88,\!82 \pm 0,\!02$						
10	$29{,}99\pm0{,}08$	$56{,}70\pm0{,}08$	$75,\!05\pm0,\!06$	$85{,}67 \pm 0{,}08$						
11	$31,\!29 \pm 0,\!06$	$55,\!12 \pm 0,\!07$	$72{,}52\pm0{,}03$	$84,\!60 \pm 0,\!06$						
12	$30,12 \pm 0,01$	$52,\!32\pm0,\!02$	$73,\!61 \pm 0,\!05$	$85,\!25 \pm 0,\!02$						
13	$23,\!04 \pm 0,\!01$	$54,\!46\pm0,\!03$	$74,\!87\pm0,\!07$	$85,\!25 \pm 0,\!03$						
Аскорбинска киселина (IC50)	$22,0 \pm 0,9$									

Табела 3.2.5.6.1. Активност комплекса **8–13** у инхибицији DPPH радикала. Резултати су представљени као средња вредност три понављања

3.2.5.7. In silico испитивање дистрибуције комплекса унутар панкреасног ткива и мреже уроњених крвних судова

Разумевање траснпорта лекова кроз панкреас од великог је значаја за планирање лечења, односно примене новосинтетисаних лекова и хемиотерапеутика. Комплетна геометрија модела панкреаса генерисана је на Институту за информационе технологије, Универзитета у Крагујевцу, коришћењем СТ снимака добијених од стране MD Anderson Инситута за канцер у Хјустону, према одобреном протоколу (РА14-0646). Иницијални геометријски модел, представљен на Слици 3.2.5.7.1А, приказује рачунски модел који се састоји од 1Д цевних коначних елемената за моделирање великих крвних судова (1592 елемената), ЗД композитних дистрибуираних коначних елемената (102,254 елемената) и везивних 1Д елемената (262 елемената) који повезују велике крвне судове са чворовима околног ткива. Укупан број чворова у моделу је 127,783.

Параметри за овај модел су:

- улазна концентрација болусног типа C(t) (профил концентрације дефинисан је у претходно публикованом раду¹⁹⁶) (Слика 3.2.5.7.1.Б, означено са Сул),
- излазна концентрација 0 М (Слика 3.3.3.1.Б, означено са Сизл).

Параметри дистрибуираног модела су:

- средњи пречник капилара 0,005 mm,
- дебљина зида капилара 0,0005 mm,
- запремински удео капилара 2%,
- број временских корака нумеричке симулације: 40 x 10 s.

Дифузиони коефицијент за комплексе 9 и 12 одређен је Stokes-Einstein-овом једначином (10)

$$D = \frac{k_{\rm B}T}{6\pi\eta\alpha} \tag{10}$$

Добијене вредности су: $D_{Cкомплекс9} = 4,11 \text{ x } 10^{-10} \text{ mm}^2 \text{s}^{-1}$ и $D_{Cкомплекс12} = 4,07 \text{ x } 10^{-10} \text{ mm}^2 \text{s}^{-1}$ (мерено у води). Остали услови идентични су раније публикованим.¹⁹⁶

Слика 3.2.5.7.2. приказује поља концентрације на крају трећег временског корака (t = 120 s) унутар великих крвних судова, капиларног и домена ткива. Улазна концентрација дефинисана је на улазним гранама великих крвних судова, где почиње сам процес дифузије у живим организмима и наставља се кроз зидове капилара све до окружујућег ткива.



Слика 3.2.5.7.1. А) Геометрија панкреаса са великим крвним судовима и елементима на површини; Б) Гранични услови са дефинисаном улазном и излазном концентрацијом.

Дакле, Слика 3.2.5.7.2. приказује да концентрација оба једињења имају максималне вредности веће у капиларном него у околном ткиву, што је последица самог процеса дифузије који је описан у претходном тексту (Слика 3.2.5.7.2.Б). Поред тога, због мањег коефицијента дифузије комплекса 12, максималне концентрације у капиларима и ткиву комплекса 9 (Слике 3.2.5.7.2.А и 3.2.5.7.2.Б) су веће за исти временски период, у поређењу са комплексом 12 (Слика 3.2.5.7.2. В и 3.2.5.7.2. Д). Добијени резултати могу дати увид у то како дифузиони коефицијент различитих комплекса може утицати на процес дифузије унутар модела панкреаса и тиме знатно олакшати адекватан одабир терапијске дозе, а уједно спречити и нежељене ефекте у случају превелике дозе лека.



Слика 3.2.5.7.2. Компјутерски модел панкреаса. Поља концентрација упоређена су у капиларама и ткиву за t = 120 s (трећи корак симулације) за два различита комплекса. А) Дистрибуција комплекса 9 представљена на 1Д и 3Д моделу капиларно домена; Б) Дистрибуција комплекса 9 у случају целокупног 1Д и 3Д модела ткива; В) Дистрибуција комплекса 12 на 1Д и 3Д моделу капиларног домена; Д) Дистрибуција комплекса 12 у случају целокупног 1Д и 3Д модела ткива.

3.3. Динуклеарни комплекси рутенијума 14 и 15

3.3.1 Синтеза и карактеризација

Динуклеарни Ru(II) полипиридил комплекс [{RuCl(bpy)₂}₂(μ -pzn)][PF₆]₂·2H₂O (**14**) синтетисан је према претходно објављеном поступку (Схема 3.3.1.1.),¹⁰⁹ а динуклеарни Ru(II) полипиридил комплекс [{RuCl(phen)₂}₂(μ -pzn)][PF₆]₂·2H₂O (**15**) синтетисан је према сличној процедури. Комплекси су окарактерисани применом елементалне микроанализе, UV-Vis, IR, ¹H NMR и ESI-MS спектроскопије. За синтетисане комплексе примећено је добро слагање добијених спектара са већ објављеним резултатима.



Схема 3.3.1.1. Приказ синтезе комплекса 14 и 15. Реагенси и услови: I (а) bpy (14) и (с) phen (15), EtOH, peфлукс; II [Ru(N-N)₂Cl₂](2 eq.), (b) pzn, EtOH/H₂O (1:1), peфлукс

3.3.2. Хемијско понашање динуклеарних комплекса у воденом раствору

Хемијско понашање динуклеарних Ru(II) комплекса 14 и 15 испитивано је у воденом раствору. Комплекси су растворени у минималној количини метанола, а затим разблажени водом до концентрације од 1 × 10⁻⁴ М. Добијени раствори анализирани су применом UV-Vis спектрофотометрије, праћењем промена апсорпционог максимума у периоду од 24 h. Интензитет апсорпционог максимума Ru(II) комплекса опадао је са временом, што се приписује хидролизи лабилног хлоридо лиганда (Слика 3.3.2.1.). Да би се добио детаљан увид о стабилности комплекса 14 и 15 у физиолошким условима, испитивање је урађено и растварањем комплекса у 10 mM PBS-u (137 mM NaCl, pH = 7,4). Електронски апсорпциони спектри комплекса 14 и 15 остали су непромењени након 24 h од растварања (Слика 3.3.2.2.).



Слика 3.3.2.1. UV-Vis спектри комплекса 14 и 15 у води у периоду од 24 h. $[Ru] = 1 \times 10^{-4} M$, $t = 25 \degree C$.



Слика 3.3.2.2. UV-Vis спектри комплекса 14 и 15 у PBS (pH = 7,4) у периоду од 24 h. [Ru] = 1×10^{-4} M, t = 25 °C.

3.3.3. Кинетичка мерења

Супституционе реакције динуклеарних Ru(II) полипиридил комплекса 14 и 15 у физиолошким условима изучаване су у присуству нуклеофила 5'-GMP, L-Met и GSH. Реакције су проучаване помоћу UV-Vis спектрофотометрије праћењем промене апсорбанце у функцији од времена. Реакције супституције лабилног хлоридо лиганда неким од поменутих нуклеофила одигравају се у два ступња, која су приказана у оквиру Схеме 3.3.3.1. Први корак представља реверзибилну супституцију једног хлоридо лиганда нуклеофилом, док други корак представља реверзибилну супституцију другог хлоридо лиганда из координационе сфере Ru(II) комплекса.



Схема 3.3.3.1. Схематски приказ супституционих реакција комплекса 14 и 15 са нуклеофилима 5'-GMP, L-Met и GSH.

Кинетичке криве ових супституционих реакција анализиране су као експоненцијалне функције другог реда из којих су добијене константе брзине реакције *pseudo*-првог реда за сваки корак супституције, односно k_{obsd1} и k_{obsd2} . Линеарна зависност константи k_{obsd1} и k_{obsd2} од концентрације нуклеофила може се представити једначинама (11) и (12).

$$k_{\rm obsd1} = k_1 [\rm Nu] + k_{-1} [\rm C1^{-}]$$
(11)

$$k_{\text{obsd2}} = k_2[\text{Nu}] + k_{-2}[\text{Cl}^-]$$
 (12)

Константе брзине реакције k_1 и k_2 добијене су из нагиба правих k_{obsd1} или k_{obsd2} у функцији од концентрације нуклеофила, док су константе повратних реакција k_{-1} и k_{-2} добијене из одсечка. Ове вредности сумиране су у Табели 3.3.3.1. На Слици 3.3.3.2. приказана је зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , од концентрације нуклеофила за супституциону реакцију комплекса **15** са L-Met у 25 mM Hepes пуферу (pH = 7,2). На Сликама 3.3.3.3. и 3.3.3.4. представљени су графици зависности k_{obsd1} или k_{obsd2} од концентрације 5'-GMP и GSH за супституционе реакције комплекса **15**, док је на Слици 3.3.3.4. приказана зависност константе брзине реакције комплекса **16**, док је на Слици 3.3.3.4. приказана зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , од концентрације 5'-GMP и GSH за супституционе реакције комплекса **16**, док је на Слици 3.3.3.4. приказана зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , од концентрације 5'-GMP и GSH за супституционе реакције комплекса **15**, док је на Слици 3.3.3.4. приказана зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd} , од концентрације нуклеофила за први и други ступањ супституционе реакције комплекса **14** са 5'-GMP, L-Met и GSH у 25 mM Hepes пуферу (pH = 7,2) на 25 °C.



Слика 3.3.3.2. Константа брзине реакције pseudo-првог реда у функцији од концентрације нуклеофила за први и други ступањ супституције комплекса **15** са L-Met на pH = 7,2 (25 mM Hepes nydep, 50 mM NaCl).



Слика 3.3.3.3. Константа брзине реакције рѕеидо-првог реда у функцији од концентрације нуклеофила и температуре за први и други ступањ супституције комплекса 15 са 5'-GMP на pH = 7,2 (25 mM Hepes пуфер, 50 mM NaCl).



Слика 3.3.3.4. Константа брзине реакције рѕеидо-првог реда у функцији од концентрације нуклеофила и температуре за први и други ступањ супституције комплекса 15 са GSH на pH = 7,2 (25 mM Hepes nyфep, 50 mM NaCl).

Активациони параметри (ΔH^{\neq} и ΔS^{\neq}), добијени применом Eyring-ове једначине (5), за супституционе реакције комплекса **15** са 5'-GMP и GSH сумирани су у Табели 3.3.3.1. Ниске вредности за ΔH^{\neq} и негативне вредности за ΔS^{\neq} јасно указују на асоцијативни тип механизма супституције. Сличан механизам предложен је и за супституционе реакције Ru(II) полипиридил комплекса са нуклеофилима као што су 9-метил-гуанин (9-MeG), гуанин (Guo), 5'-GMP, L-хистидин (L-His), L-метионин (L-Met), L-цистеин (L-Cys), пиразол (Pz), 1,2,4-триазол (Tz) и пиридин (Py).^{39,38,42,45,40,65}



Слика 3.3.3.5. Константа брзине реакције pseudo-првог реда, k_{obs} , у функцији од концентрације нуклеофила супституционе реакције комплекса **14** са 5'-GMP, L-Met и GSH у 25 mM Hepes пуферу (pH=7,2) на 25 °C.

Како оба комплекса имају пиразин као мостни лиганд, разлика у њиховој реактивности приписује се утицају природе инертног бидентатног лиганада. Упоређивањем реактивности комплекса 14 и 15 можемо закључити да комплекс 14, са bpy у структури, реагује брже у односу на комплекс 15 са phen. Мања реаактивност комплекса 15 може се приписати волуминозном и ригидном фенантролину, који отежава формирање везе са улазним лигандом приликом образовања прелазног стања са координационим бројем седам, који је део супституције по асоцијативном механизму.

На реактивност Ru(II) комплекса у процесу супституције у великој мери утиче и природа улазног нуклеофила. Добијена реактивност нуклеофила опада у низу 5'-GMP > GSH > L-Met. Мања реактивност L-Met у односу на GSH може се објаснити присуством волуминозне метил групе на атому сумпора, која отежава прилаз овог нуклеофила Ru(II) комплексу. На крају, може се закључити да *N*-

донорски нуклеофил 5'-GMP показује већи афинитет према динуклеарним Ru(II) комплексима у односу на *S*-донорске нуклеофиле.

Табела 3.3.	3.1. Константе	е брзине првоі	г и другог коран	ка реакције	супституције	комплекса	14 и	15 ca
5'-GMP, L-N	Лet и GSH, pH	=7,2 (25 mM H	Нерез пуфер, 50	mM NaCl).				

	t	10 ¹ kı	10 ² k ₂	ΔH 1 [≠]	ΔS1 [≠]	ΔH2 [≠]	ΔS_2^{\neq}
	[°C]	$[M^{-1}s^{-1}]$	$[M^{-1}s^{-1}]$	[kJmol ⁻¹]	[JK ⁻¹ mol ⁻¹]	[kJmol ⁻¹]	[JK ⁻¹ mol ⁻¹]
$[{RuCl(bpy)_2}_2(\mu-pzn)]^{2+}$ (14)							
5'-GMP	25	53 ± 4	27 ± 3				
L-Met	25	$9,8\pm0,4$	$0{,}70\pm0{,}02$				
GSH	25	42 ± 2	$8,2 \pm 0,4$				
[{RuCl(phen) ₂ } ₂ (µ-pzn)] ²⁺ (15)							
5'-GMP	15	$0,\!66\pm0,\!03$	$0{,}69 \pm 0{,}04$				
	25	$1,2 \pm 0,1$	$1{,}00\pm0{,}04$	37 ± 3	-150 ± 10	16 ± 2	$\textbf{-250}\pm7$
	37	$2,1 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$				
L-Met	25	$0,\!83\pm0,\!07$	$0{,}24\pm0{,}02$				
GSH	15	$0{,}62\pm0{,}04$	$0{,}57 \pm 0{,}03$				
	25	$0,\!96\pm0,\!01$	$0{,}74\pm0{,}02$	27 ± 2	-191 ± 7	15 ± 1	-253 ± 4
	37	$1,5 \pm 0,1$	$0,\!94\pm0,\!08$				

3.3.4. Интеракције динуклеарних комплекса са DNA

3.3.4.1. Апсорпциона спектроскопска мерења

Могућност везивања динуклеарних Ru(II) комплекса за DNA најпре је праћена применом UV-Vis спектрофотометрије. Реакције титрације праћене су на собној температури додавањем растуће концентрације DNA (2 – 20 μ M) у раствор константне концентрације комплекса (10 μ M). Примећено хиперхромно померање апсорпционог максимума на 291 nm у спектру комплекса 14 указује на остварено везивање комплекса за DNA молекул.²⁰⁶ Исто понашање забележено је и у апсорпционом спектру комплекса 15 на таласној дужини од 265 nm. Како ова испитивања не могу послужити за јасно дефинисање начина везивања, наша истраживања су била усмерена ка додатним експериментима.²⁰⁷

Константе везивања (*K*_b) комплекса 14 и 15, добијене из одговарајуће једначине (7) и графика сумиране у Табели 3.3.4.1.1., указују на јако везивање комплекса за DNA.

Табела 3.3.4.1.1. Константе везивања (K_b) и Stern–Volmer-ове константе (K_{sv}) за EB–DNA и Hoechst– DNA флуоресцентна мерења за комплексе 14 и 15.

Комплекс	K _b [M ⁻¹]	K _{sv} ^a [M ⁻¹]	K _{sv} ^b [M ⁻¹]
14	$(1,9 \pm 0,1) \times 10^5$	$(3,6\pm 0,1) imes 10^4$	$(5,8\pm 0,3) imes 10^4$
15	$(1,5\pm 0,1) \times 10^{5}$	$(2,8\pm 0,2) imes 10^4$	$(1,7\pm 0,2) \times 10^{5}$

Добијене вредности константи мање су у поређењу са константама добијеним за сличне динуклеарне Ru(II) полипиридил комплексе који у својој структури поседују флексибилан мостни лиганд.^{92,59} Када је мостни лиганд у структури динуклеарних комплекса флексибилан могуће је

координовање оба јона метала за DNA молекул. Са пиразином као ригидним лигандом знатно је отежано везивање комплекса за DNA молекул, тако да се претпоставља да се испитивани динуклеарни комплекси координују само преко једног металног центра, док други остаје ван DNA ланца.^{208,209,210}

Добијене K_b вредности за комплексе 14 и 15 су на граници вредности које дефинишу интеркалацију и везивање за мали жљеб DNA. Познато је да константе везивања за мали жљеб могу достићи вредност реда величине $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$, као што је случај код раније публикованих резултата за $[\{\text{Ru}(\text{bpy})_2\}_2(4\text{-azo})]^{4+}$ (где је 4-аzo = 4,4"-азо-*bis*(2,2-бипиридин))⁹⁶ и Ru-bpy комплекс који садржи катехол лиганд (E)-4-[2-(4'-метил-2,2'-бипиридин-4-ил)винил]бензен -1,2-диол.²¹¹ С друге стране, K_b вредности изнад 10^4 M^{-1} приписују се DNA интеркалаторима, као што су $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dpz})]^{2+,212}$ [Ru(phen)₂(dppz)]^{2+ 213} и етидијум-бромид (EB).²¹⁴ Стога, долазимо до закључка да се комплекси 14 и 15 могу везати за DNA ланац интеркалацијом и/или везивањем за мали жљеб.

3.3.4.2. Емисиона спектроскопска испитивања интеракција у присуству ЕВ

Начин везивања комплекса 14 и 15 за DNA молекул може се одредити праћењем промена у емисионом спектру након додатка растуће концентрације комплекса претходно формираном EB–DNA адукту. Једињење које се везује интеркалацијом потпуно истискује EB из претходног адукта, уз значајно смањење интензитета флуоресценције, док једињења која се везују за жљеб DNA ланца само делимично истискују EB из формираног EB–DNA адукта.^{154,157,215,216}

Додатак растуће концентрације комплекса 14 и 15 раствору ЕВ–DNA адукта довео је до умереног смањења интензитета емисије за 40% у случају комплекса 14 и 43% у случају комплекса 15, у односу на почетни интензитет емисије (I₀) (Слика 3.3.4.2.1.). На основу добијених резултата може се закључити да је везивање оба комплекса за DNA резултирало умереним истискивањем ЕВ из ЕВ–DNA адукта (Слика 3.3.4.2.2.). На основу Stern–Volmer-oве једначине (8) и одговарајућих графика израчунате су Stern–Volmer-ове константе (K_{sv}) чије су вредности сумиране у Табели 3.3.4.2.1. Добијене вредности указују да се динуклеарни Ru(II) комплекси радије везују за DNA путем малог жљеба, у односу на интеркалационо везивање.



Слика 3.4.3.2.1. Релативни интензитет флуоресцентне емисије ЕВ на $\lambda_{em} = 612$ nm ($\lambda_{ex} = 527$ nm) у зависности од r (r = [комплекс]/[CT DNA]) за комплексе 14 и 15 у PBS (137 mM NaCl, pH 7,4).



Слика 3.4.3.2.2. Емисиони спектри ЕВ-DNA адукта у присуству комплекса 14 и 15.

3.3.4.3. Емисиона спектроскопска испитивања интеракција у присуству Hoechst 33258

Аналогно претходно рађеним флуоресцентним мерењима, праћена је промена емисионог спектра Hoechst–DNA адукта након додатка растуће концентрације комплекса.¹⁵³ Забележено је значајно смањење интензитета емисије на 490 nm, након ексцитације на 346 nm, које указују да је остварено истискивање Hoechst молекула из жљеба DNA и везивање комплекса (Слика 3.3.4.3.1.).



Слика 3.3.4.3.1. Емисиони спектри Hoechst-DNA адукта у присуству комплекса 14 и 15.

Промена релативног интензитета флуоресцентне емисије Hoechst на λ_{em} = 490 nm у зависности од r (r = [комплекс]/[CT DNA]) за комплексе 14 и 15 дата је на Слици 3.4.3.3.2.

Stern–Volmer-ови дијаграми зависноти I_0/I од [Q] линеарни су у случају оба комплекса. Израчунате Stern–Volmer-ове константе (K_{SV}) приказане су у Табели 3.3.4.1.1. На основу ЕВ и Hoeschst флуоресцентних мерења може се закључити да се комплекси 14 и 15 могу везати за DNA интеркалацијом и везивањем за мали жљеб.



Слика 3.3.4.3.2. Релативни интензитет флуоресцентне емисије Hoechst на $\lambda_{em} = 490$ nm ($\lambda_{ex} = 346$ nm) у функцији од r (r = [комплекс]/[CT DNA]) за комплексе 14 и 15 у PBS (137 mM NaCl, pH 7,4).

3.3.4.4. Вискозиметријка мерења

Мерење вискозности засновано на променама у дужини DNA ланца коришћено је да би се потврдили претходно донешени закључци. Додавање растуће концентрације (до r = 1,0) комплекса 14 и 15 у раствор DNA довело је до умереног повећања вискозности које није типично за интеркалаторе,²¹⁷ већ указује на везивање комплекса за мали жљеб DNA ланца (Слика 3.3.4.4.1.).^{218,219}



Слика 3.3.4.4.1. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ CT DNA (0.01 mM) у PBS пуферу (137 mM NaCl, pH 7,4) у присуству растуће концентрације комплекса 14 и 15 (r).

3.3.5. Интеракције комплекса са говеђим серум албумином (BSA)

У оквиру овог рада испитиване су и интеракције динуклеарних комплекса 14 и 15 са BSA помоћу флуоресцентне спектроскопије. Додавање растуће концентрације комплекса 14 и 15 у раствор BSA резултира смањењем интензитета флуоресценције на 365 nm (Слика 3.3.5.1.).



Слика 3.3.5.1. Емисиони спектар BSA по додатку растуће концентрације комплекса 14 и 15. $[BSA] = 2 \mu M$, $[Ru] = 0 - 80 \mu M$; $\lambda_{ex} = 295$ nm. Стрелица показују промену интензитета емисије по додатку растуће концентрације комплекса.

Добијено смањење интензитета флуоресценције је 7% и 15,5% за комплексе 14 и 15 у односу на почетну вредност, што указује на конформациону промену хидрофобне шупљине субдомена IIA, где се налази остатак Trp-214, указујући на везивање једињења 14 и 15 за серум албумин (Слика 3.3.5.2.).²²⁰



Слика 3.3.5.2. График зависности релативног интензитета флуоресценције на $\lambda_{em} = 364$ nm (%) од r (r = [комплекс]/[BSA]) за комплексе 14 и 15 (7,0 % почетног интензитета флуоресценције за комплекс 14 и 15,5 % за комплекс 15) у раствору пуфера (10 mM PBS, pH = 7,4).

График зависности I₀/I од [Q] показује линеарну зависност за оба комплекса. (Слика 3.3.5.3.). Статичка константа гашења, *V*, добијена је помоћу модификоване Stern–Volmer-ове једначине (13):

$$I_0/I = (1 + K_{sv}[Q])e^{V[Q]}$$
 (13)



Слика 3.3.5.3. Модификовани Stern-Volmer-ови графици везивања комплекса 14 и 15 за BSA.

Да би добили што прецизнију вредност за V коришћена је највиша вредност коефицијента корелације као критеријум за линеарност праве. Динамичка константа гашења, K_{sv} , добијена је из нагиба линеарне праве. Израчунате вредности поменутих констатни дате су у Табели 3.4.4.1. Важно је напоменути да су статичке и динамичке константе гашења за оба комплекса истог реда величине (10^4 M^{-1}) . За комплексе 14 и 15 израчунате су и бимолекуларне константе гашења флуоресценције, k_q , такође приказане у Табели 3.3.5.1. Комплекс 14 показао је нешто вишу вредност константе k_q $(2,3 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ у односу на комплекс 15 $(2,0 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$. Применом Scatchard-ове једначине (9), као и одговарајућих графика, израчунате су константе везивања, K, и број везивних места у протеину n. Добијене вредности сумиране су у Табели 3.3.5.1. Интересантно, број везујућих места у протеину за оба испитивана комплекса је близу 2. Добијене вредности константи везивања K биле су у опсегу од 3,6 $\times 10^4$ до 1,9 $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Ове вредности су довољно високе да потврде везивање динуклеарних Ru(II) комплекса за BSA, као и њихов транспорт до жељених мета унутар ћелије.

Табела 3.3.5.1. Константе и параметри (K_{sv} , V, k_q , K, и n) за интеракције комплекса 14 и 15 са BSA.

Комплекс	K _{sv} (M ⁻¹)	$k_{ m q} ({ m M}^{-1}{ m s}^{-1})$	K (M ⁻¹)	n	V (M ⁻¹)
14	$2,3 (\pm 0,5) \times 10^4$	$2,3 (\pm 0,5) \times 10^{12}$	$3,6 \times 10^{4}$	1,70	$5,1 (\pm 0,4) \times 10^4$
15	$2,0~(\pm 0,4) imes 10^4$	2,0 (± 0,4) × 10^{12}	$1,9 \times 10^{4}$	2,10	$3,3 (\pm 0,3) \times 10^4$

3.3.6. Молекулски докинг са DNA и BSA

Интеракције динуклеарних комплекса 14 и 15 са DNA и BSA испитиване су и симулацијама молекулског докинга. MolDock, Docking и Rerank функције коришћене су за дефинисање комплекс-DNA/BSA афинитета везивања.¹²¹ Литературни подаци потврђују сличност интеракција металокомплекса са 1BNA и CT DNA. Комплекси 14 и 15 уметнути су у фрагменте DNA: канонични B-DNA (PDB 1BNA) и DNA са интеркалационом шупљином (PDB 1Z3F). Најбољи положаји комплекса 14 и 15 приказани су на Сликама 3.3.6.1. и 3.3.6.2.

Докинг анализа показала је да се комплекси 14 и 15 везују за 1Z3F и 1BNA интеркалацијом и/или везивањем за мали жљеб, што је у сагласности је са претходно добијеним резултатима помоћу апсорпционих и флуоресцентних мерења. Израчунате вредности слободних енергија проучаваних структура приказане су у Табели 3.3.6.1. Мале разлике у енергији везивања комплекса 14 и 15 могу се објаснити присуством phen лиганда у структури комплекса 15 који више одговара шупљини DNA ланца.



Слика 3.3.6.1. Резултати молекулског докинга приликом интеракције комплекса 14 и 15 са каноничном B-DNA.



Слика 3.3.6.2. *Резултати молекулског докинга приликом интеракције испитиваних комплекса 14 и 15 са интеркалационом шупљином DNA*.

Потенцијална места везивања комплекса 14 и 15 за BSA такође су изучавана помоћу докинг методе. Резултати MVD докинг програма показују да се оба комплекса везују за субдомен IIA у BSA протеину. Најбољи положаји комплекса одређени су на основу параметара сумираних у Табели 3.3.6.1. и приказани на Слици 3.3.6.3. Комплекси 14 и 15 веома добро одговарају везивном џепу на активном месту I BSA молекула. Такође, оба комплекса поседују сличан афинитет везивања.

DNA докинг				
PDB ID DNA	Комплекс:	MolDock	Rerank	Docking
1Z3F – Интеркалациони	14	-179,064	-65,909	-173,860
размак	15	-201,364	-71,803	-194,314
1BNA – канонични	14	-188,742	-71,107	-185,379
размак	15	-210,341	-77,217	-206,809
BSA докинг				
	14	-183,107	-67,969	-180,887
rud ID: 4rj5	15	-184,020	-82,344	-181,667

Табела 3.3.6.1. Резултати добијени на основу молекулског докинга комплекса 14 и 15 са DNA и BSA.



Слика 3.3.6.3. Најбољи положаји комплекса 14 и 15 приликом интеракције са BSA дефинисани на основу MolDock, Docking и Rerank функција; а) илустрација добијена молекулским докингом представља инеракције комплекса 14 и 15 са BSA; б) комплекс уметнут у активно место BSA; в) везивно место комплекса 14 и 15 у протеину и остаци аминокиселина представљени моделима итапића.

3.3.7. In vitro цитотоксична активност

Цитотоксичност динуклеарних Ru(II) комплекса 14 и 15 испитивана је на две канцерогене ћелијске линије, MDA-MB-231 и HCT-116, применом МТТ теста. Комплекси су показали умерену активност према MDA-MB-231 ћелијама, док у случају HCT-116 ћелија није детектована активност, што потврђују добијени резултати сумирани у Табели 3.3.7.1.

Табела 3.3.7.1. Цитотоксични ефекат комплекса 14 и 15 према две канцерогене ћелијске линије изражен IC₅₀ вредношћу.

IC50 [µM]					
	MDA-MB-231		HCT-116		
	24h	72h	24h	72h	
14	> 200	71,7	> 200	> 200	
15	155,4	55,2	> 200	> 200	

Комплекс 15, са phen у структури, показао се активнијим од комплекса 14, имплицирајући на тај начин утицај ароматичности лиганда на повећану активност Ru(II) динуклеарних комплекса. Такође, комплекси 14 и 15 показали су већу активност у поређењу са сличним Ru(II) динуклеарним комплексима са bpy и phen.²¹⁸ У поређењу са цисплатином, комплекс 15 је показао бољу активност 24 h од примене, а сличну након 72 h, тестирањем на MDA-MB-231 ћелијској линији.²¹⁹ У претходним испитивањима већина испитиваних комплекса показала је већу активност према HCT-116 ћелијским линијама,²²³⁻²²⁵ у поређењу са метастазирајућим и високо инвазивним MDA-MB-231 ћелијским линијама.²²⁵ Ови резултати указују да проучавани комплекси имају потенцијалну антиметастатску активност. Иако слаба *in vitro* активност не би навела научнике да проучаване комплексе тестирају и *in vivo*, литературни подаци су показали да неки од комплекса прелазних метала са слабом *in vitro* активношћу показују изузетну *in vivo* активност. Један од таквих примера управо је комплекс NAMI-A.²²⁷

Корелација између цитотоксичности комплекса и њиховог DNA/BSA афинитета везивања сугерише да је више мета и механизама укључено у антитуморску активност. Добијене разлике могу имати веома важну улогу у предвиђању њихове антитуморске активности и могу допринети бољем разумевању механизма цитотоксичности у односу на цисплатину.

ЗАКЉУЧАК

H

HO


4. ЗАКЉУЧАК

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

Ru(II) полипиридил комплекси 1–7

- Синтетисани су нови мононуклеарни Ru(II) комплекси са полипиридилским лигандима (1–7) опште формуле *mer*-[RuL₃(*N*-*N*)Cl]Cl, где је L₃ = 2,2':6',2"-терпиридин (tpy) или 4'-(4-хлорофенил)-2,2':6',2"-терпидин, док је *N*-*N* бидентатни лиганд *o*-бензохинондиимин (*o*-bqdi), 2,3-нафтохинондиимин (nqdi), 4,4'-диметил-2,2'-бипиридин (dmbpy) или 2,2'-бипиридин-4,4'-дикарбоксилна киселина (dcbpy).
- Структуре комплекса потврђене су аналитичким методама, као што су UV-Vis, ¹H NMR, ¹³C NMR, IR, MS и елементална микроанализа.
- > Ru(II) комплекси су показали добру стабилност у физиолошким условима.
- У супституционим реакцијама комплекси су показали већу реактивност према *N*-донорским (5'-GMP) у односу на *S*-донорске (L-Cys и L-Met) нуклеофиле.
- Добијене вредности константи везивања за DNA указују на могућност везивања комплекса интеркалацијом и/или везивањем за мали жљеб.
- Докинг анализа показала је парцијалну интеркалацију комплекса 1–7 у 1Z3F, као и везивање за мали жљеб у 1BNA конформацији DNA.
- Резултати испитивања везивања комплекса за HSA у присуству одговарајућих маркера, еозина Y и ибупрофена, показали су да се комплекси везују за оба активна места у протеину (активно место I субдомена IIA и активно место II субдомена IIIA) умереном јачином $(K_b = 10^4 10^6)$.
- Резултати испитивања биолошке активности указали су на добру активност и селективност комплекса 2, 5 и 6 према MDA-MB 231, HCT-116 и HeLa ћелијским линијама.

Ru(III) комплекси са Schiff-овим базама као лигандима 8–13

- ≻ Синтетисани су нови Ru(III) комплекси опште формуле [Ru(L)Cl(H₂O)] (8-13), где је L Schiff-ова bis(ацетилацетон)етилендиимин тридентатна база (acacen, 8). bis(бензоилацетон)етилендиимин (bzacen. 9). (ацетилацетон)(бензоилацетон bis(ацетилацетон)пропилендиимин (етилендиимин) (acacbzacen, 10), (acacpn, 11), *bis*(бензоилацетон)пропилендиимин (bzacpn, 12) или (ацетилацетон)(бензоилацетон) пропилендиимин (acacbzacpn, 13).
- Структуре комплекса потврђене су UV-Vis, ¹H NMR, ¹³C NMR, IR, MS, EPR методама, мерењем проводљивости и елементалном микроанализом.
- Резултати испитивања интеракција комплекса 8–13 са DNA указали су на већу ефикасност комплекса да замене EB у DNA ланцу када у својој структури поседују ароматични прстен (9 и 12). Насупрот томе, већу ефикасност у везивању за мали жљеб DNA ланца показали су комплекси без ароматичних прстенова (8 и 11).
- Добијени афинитет везивања комплекса за DNA (8 > 11 > 10 > 13 > 12 > 9) потврђен је и молекулским докингом.
- ≻ Комплекси 8–13 се везују за BSA умереном јачином (K_b = 10⁴ M⁻¹) за везивно место I субдомена IIA и везивно место II субдомена IIIA, док је молекулски докинг издвојио активно место III.
- Антитуморска активност комплекса 8–13 тестирана је на А549, LLC1, HCT116 и СТ26 ћелијским линијама, при чему су се нарочито издвојили комплекси 9 и 12, који су потом подвргнути *in vivo* тестирању на моделу Lewis карцинома плућа миша. Утврђено је да

комплекс 12 доводи до редукције запремине Lewis карцинома плућа миша, док комплекс 9 смањује број метастаза.

- У *in vitro* испитивањима антимикробне активности издвојили су се комплекси 12 и 13 (MIC = 0,014 mg/mL), због највеће активности према *Staphylococus aureus*, боље и од стрептомицина. Најбољу антиоксидативну активност, са највећим процентом инхибиције DPPH радикала, показао је комплекс 9.
- Инкорпорација комплекса 8–13 у компјутерски модел панкреаса омогућила је увид у дифузију комплекса кроз ткива и велике крвне судове, чиме је добијен јасан увид у њихов фармацеутски потенцијал. Комплекси 9 и 12 су показали мали коефицијент дифузије са максималном концентрацијом у ткиву и крвним судовима, што их је, поред добрих резултата *in vivo* и *in vitro* активности, издвојило као обећавајуће кандидате у лечењу карцинома.

Динуклерани Ru(II) комплекси 14 и 15

- ≻ У оквиру ове тезе синтетисана су и два динуклеарна комплекса [{RuCl(bpy)₂}₂ (μ -pzn)][PF₆]₂·2H₂O (**14**) и [{RuCl(phen)₂}₂(μ -pzn)][PF₆]₂·2H₂O (**15**), где је bpy = 2,2'-бипиридин (bpy), phen = 1,10-фенантролин и μ -pzn = пиразин.
- ≻ Структуре комплекса потврђене су UV-Vis, ¹H NMR, ¹³C NMR, IR, MS методама и елементалном микроанализом.
- Испитивани комплекси су у супституционим реакцијама показали већу реактивност према *N*-донорском (5'-GMP) у односу на *S*-донорске (GSH и L-Met) нуклеофиле.
- Резултати испитивања су указали на зависност реактивности комплекса од структуре. Наиме, комплекс 14 (bpy) у свим испитивањима показао се реактивнијим, због присуства мање волуминозног и флексибилног инертног лиганда.
- Резултати молекулског докинга издвојили су хидрофобни џеп субдомена IIA (везивно место I) BSA као погодно за везивање комплекса 14 и 15.
- Комплекс 15 показао се активнијим према MDA-MB-231, док су комплекси 14 и 15 неактивни према HCT-116 ћелијској линији.

У групи проучаваних Ru(II/III) комплекса са *N*-донорским лигандима својом антитуморском активношћу издвојили су се комплекси 2, 9 и 12, и тиме стекли услов за даље истраживање и потенцијалну антитуморску примену. Такође, комплекси 12 и 13 су се истакли својом изузетном антимикробном активношћу, а комплекс 9 својом антиоксидативном активношћу.

Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације дају велики допринос развоју неорганске, коордионационе, медицинске и бионеорганске хемије. Омогућавају разумевање везе између структуре и биолошке активности комплекса, а све у циљу проналаска металотерапеутика чија је селективност и ефикасност већа, а цитотоксичност мања у односу на једињења која се тренутно користе у медицини.

ЛИТЕРАТУРА

Р

HO



5. ЛИТЕРАТУРА

1. C. Monti Bragadin, L. Ramani, L. Samer, *Antimicrob. Agents Ch.* 7 (1975) 825–827 (https://doi.org/10.1128/AAC.7.6.825)

2. M. J. Clarke, F. Zhu, D. R. Frasca, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2511–2533 (https://doi.org/10.1021/cr9804238)

3. G. Mestroni, E. Alessio, M. Calligaris, W. M. Attia, F. Quadrifoglio, S. Cauci, G. Sava, S. Zorzet, S. Pacor, C. Monti-Bragadin, M. Tamaro, L. Dolzani, *Clin. Biochem. Med.*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1989, 71–87 (https://doi.org/10.1007/978-3-642-74760-1_4)

4. G. Sava, S. Pacor, G. Mestroni, E. Alessio, *Clin. Exp. Metastasis* 10 (1992) 273–280 (https://doi.org/10.1007/BF00133563)

5. I. Bratsos, S. Jedner, T. Gianferrara, E. Alessio, *Chimia (Aarau)*. 61 (2007) 692–697 (https://doi.org/10.2533/chimia.2007.692)

6. E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo, G. Sava, *Curr. Top. Med. Chem.* 4 (2004) 1525–1535 (https://doi.org/10.2174/1568026043387421)

7. A. Bergamo, G. Sava, *Dalton Trans*. (2007) 1267–1272 (https://doi.org/10.1039/b617769g)

8. E. Reisner, V. B. Arion, B. K. Keppler, A. J. L. Pombeiro, *Inorg. Chim. Acta* 361 (2008) 1569–1583 (https://doi.org/10.1016/j.ica.2006.12.005)

9. C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 891–904 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.02.013)

10. A. Küng, T. Pieper, R. Wissiack, E. Rosenberg, B. K. Keppler, *J. Biol. Inorg. Chem.* 6 (2001) 292–299 (https://doi.org/10.1007/s007750000203)

11. M. Sulyok, S. Hann, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, G. Stingeder, G. Koellensperger, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 20 (2005) 856–863 (https://doi.org/10.1039/b508060f)

12. F. Kratz, M. Hartmann, B. Keppler, L. Messori, J. Biol. Chem. 269 (1994) 2581–2588 (https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)41984-3)

13. A. R. Timerbaev, A. V. Rudnev, O. Semenova, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, *Anal. Biochem.* 341 (2005) 326–333 (https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.03.020)

14. K. Polec-Pawlak, J. K. Abramski, O. Semenova, C. G. Hartinger, A. R. Timerbaev, B. K. Keppler, M. Jarosz, *Electrophoresis* 27 (2006) 1128–1135 (https://doi.org/10.1002/elps.200500694)

15. F. Kratz, B. K. Keppler, M. Hartmann, L. Messori, M. R. Berger, *Metal Based Drugs* 3 (1996) 15–23 (https://doi.org/10.1155/MBD.1996.15)

16. S. J. Dougan, P. J. Sadler, *Chimia (Aarau)*. 61 (2007) 704–715 (https://doi.org/10.2533/chimia.2007.704)

17. Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Chem. Commun.* (2005) 4764–4776 (https://doi.org/10.1039/b508531b)

18. A. F. A. Peacock, P. J. Sadler, *Chem.-Asian J.* 3 (2008) 1890–1899 (https://doi.org/10.1002/asia.200800149)

19. R. E. Aird, J. Cummings, A. A. Ritchie, M. Muir, D. I. Jodrell, R. E. Morris, H. Chen, P. J. Sadler, *Brit. J. Cancer* 86 (2002) 1652–1657 (https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600290)

20. R. E. Morris, R. E. Aird, P. del Socorro Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N. D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D. I. Jodrell, P.J. Sandler, *J. Med. Chem* 44 (2001) 3616–3621 (https://doi.org/10.1021/jm010051m)

21. H. Chen, J. A. Parkinson, R. E. Morris, P. J. Sadler, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 173–186 (https://doi.org/10.1021/ja027719m)

22. C. S. Allardyce, P. J. Dyson, D. J. Ellis, S. L. Heath, Chem. Commun. 2 (2001) 1396–1397 (https://doi.org/10.1039/b104021a)

23. C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurenczy, T. J. Geldbach, G. Sava, P. J. Dyson, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 4161–4171 (https://doi.org/10.1021/jm050015d)

24. D. Obradović, S. Nikolić, I. Milenković, M. Milenković, P. Jovanović, V. Savić, A. Roller, M. Đorđić Crnogorac, T. Stanojković, S. Grgurić-Šipka, *J. Inorg. Biochem.* 210 (2020) 111164 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111164)

M. Pavlović, A. Tadić, N. Gligorijević, J. Poljarević, T. Petrović, B. Dojčinović, A. Savić, S. Radulović,
S. Grgurić-Šipka, S. Aranđelović, J. Inorg. Biochem. 210 (2020) 111155 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111155)

26. S. Grgurić-Šipka, I. Ivanović, G. Rakić, N. Todorović, N. Gligorijević, S. Radulović, V. B. Arion, B. K. Keppler, Ž. L. Tešić, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1051–1058 (https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.11.055)

27. N. Gligorijević, S. Aranđelović, L. Filipović, K. Jakovljević, R. Janković, S. Grgurić-Šipka, I. Ivanović, S. Radulović, Ž. L. Tešić, *J. Inorg. Biochem.* 108 (2012) 53–61 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.12.002)

28. I. Ivanović, S. Grgurić-Šipka, N. Gligorijević, S. Radulović, A. Roller, Ž. L. J. Tešić, B. K. Keppler, *J. Serb. Chem. Soc.* 76 (2011) 53–61 (https://doi.org/10.2298/JSC100517017I)

29. P. Kumar, I. Mondal, R. Kulshreshtha, A. K. Patra, *Dalton Trans.* 49 (2020) 13294–13310 (https://doi.org/10.1039/d0dt02167a)

30. O. Nováková, J. Kašpárková, O. Vrána, P. M. van Vliet, J. Reedijk, V. Brabec, *Biochemistry* 34 (1995) 12369–12378 (https://doi.org/10.1021/bi00038a034)

31. V. Brabec, M. Leng, *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 (1993) 5345–5349 (https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5345)

32. J. Malinge, C. Perez, M. Leng, C. D. B. Moleculaire, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 3834–3839 (https://doi.org/10.1093/nar/22.19.3834)

33. A. H. Velders, H. Kooijman, A. L. Spek, J. G. Haasnoot, D. De Vos, J. Reedijk, *Inorg. Chem.* 39 (2000) 2966–2967 (https://doi.org/10.1021/ic000167t)

34. A. C. G. Hotze, S. E. Caspers, D. De Vos, H. Kooijman, A. L. Spek, A. Flamigni, M. Bacac, G. Sava, J. G. Haasnoot, J. Reedijk, *J. Biol. Inorg. Chem.* 9 (2004) 354–364 (https://doi.org/10.1007/s00775-004-0531-6)

35. A. C. G. Hotze, M. Bacac, A. H. Velders, B. A. J. Jansen, H. Kooijman, A. L. Spek, J. G. Haasnoot, J. Reedijk, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 1743–1750 (https://doi.org/10.1021/jm021110e)

36. Y. Mulyana, G. Collins, R. Keene, *J. Incl. Phenom. Macro.* 71 (2011) 371–379 (https://doi.org/10.1007/s10847-011-0036-1)

37. E. Corral, A. C. G. Hotze, A. Magistrato, J. Reedijk, *Inorg. Chem.* 46 (2007) 6715–6722 (https://doi.org/10.1021/ic070092u)

38. A. Rilak, I. Bratsos, E. Zangrando, J. Kljun, I. Turel, Ž. D. Bugarčić, E. Alessio, *Inorg. Chem.* 53 (2014) 6113–6126 (https://doi.org/10.1021/ic5005215)

39. P. Čanović, A. R. Simović, S. Radisavljević, I. Bratsos, N. Demitri, M. Mitrović, I. Zelen, Ž. D. Bugarčić, *J. Biol. Inorg. Chem.* 22 (2017) 1007–1028 (https://doi.org/10.1007/s00775-017-1479-7)

40. D. Lazić, A. Arsenijević, R. Puchta, Ž. D. Bugarčić, A. Rilak, *Dalton Trans.* 45 (2016) 4633–4646 (https://doi.org/10.1039/c5dt04132e)

41. M. R. Gill, J. A. Thomas, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 3179–3192 (https://doi.org/10.1039/c2cs15299a)

42. M. M. Milutinović, A. Rilak, I. Bratsos, O. Klisurić, M. Vraneš, N. Gligorijević, S. Radulović, Ž. D. Bugarčić, *J. Inorg. Biochem.* 169 (2017) 1–12 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.10.001)

43. I. Bratsos, S. Jedner, A. Bergamo, G. Sava, T. Gianferrara, E. Zangrando, E. Alessio, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1120–1133 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.01.005)

44. I. Bratsos, E. Mitri, F. Ravalico, E. Zangrando, T. Gianferrara, A. Bergamo, E. Alessio, *Dalton Trans*. 41 (2012) 7358–7371 (https://doi.org/10.1039/c2dt30654a)

45. M. M. Milutinović, S. K. C. Elmroth, G. Davidović, A. Rilak, O. R. Klisurić, I. Bratsos, Ž. D. Bugarčić, *Dalton Trans.* 46 (2017) 2360–2369 (https://doi.org/10.1039/c6dt04254f)

46. A. W. Roberts, D. C. S. Huang, *Clin. Pharmacol. Ther.* 89 (2017) 101 (https://doi.org/10.1002/cpt.553(https://doi.org/10.1002/cpt.553)

47. T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* 116 (2016) 3436–3486 (https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00597)

48. J. E. Quin, J. R. Devlin, D. Cameron, K. M. Hannan, R. B. Pearson, & R. D. Hannan, *B.B.A. - Mol. Basis. Dis.* 1842 (2014) 802–816 (https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.12.009)

49. P. J. Dyson, G. Sava, *Dalton Trans.* (2006) 1929–1933 (https://doi.org/10.1039/b601840h)

50. H. Chen, J. A. Parkinson, O. Nováková, J. Bella, F. Wang, A. Dawson, R. Gould, S. Parsons, V. Brabec, P. J. Sadler, *P. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 14623–14628 (https://doi.org/10.1073/pnas.2434016100)

51. H. Huang, P. Zhang, B. Yu, Y. Chen, J. Wang, L. Ji, H. Chao, *J. Med. Chem* (2014) 8971–8983 (https://doi.org/10.1021/jm501095r)

52. S. Richter, S. Singh, D. Draca, A. Kate, A. Kumbhar, A. S. Kumbhar, D. Maksimovic-Ivanic, S. Mijatovic, P. Lönnecke, E. Hey-Hawkins, *Dalton Trans.* 45 (2016) 13114–13125 (https://doi.org/10.1039/C6DT01782G)

53. H. A. Wee, P. J. Dyson, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2006) 4003–4018 (https://doi.org/10.1002/ejic.200600723)

54. A. Casini, C. Gabbiani, F. Sorrentino, M. P. Rigobello, A. Bindoli, T. J. Geldbach, A. Marrone, N. Re, C. G. Hartinger, P. J. Dyson, L. Messori, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 6773–6781 (https://doi.org/10.1021/jm8006678)

55. S. H. Lai, W. Li, J. H. Yao, B. J. Han, G. Bin Jiang, C. Zhang, C. C. Zeng, Y. J. Liu, *J. Photoch. Photob. B* 158 (2016) 39–48 (https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.02.015)

56. F. Piccioli, S. Sabatini, L. Messori, P. Orioli, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1135–1142 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.04.002)

57. W. Hu, Q. Luo, M. Xiaoyan, K. Wu, J. Liu, Y. Chen, S. Xiong, J. Wang, P. J. Sadler, F. Wang, *Chem. - Eur. J.* 15 (2009) 6586–6594 (https://doi.org/10.1002/chem.200900699)

58. A. Levina, J. B. Aitken, Y. Y. Gwee, Z. J. Lim, M. Liu, A. M. Singharay, P. F. Wong, P. A. Lay, *Chem. - Eur. J.* 19 (2013) 3609–3619 (https://doi.org/10.1002/chem.201203127)

59. X. L. Zhao, Z. S. Li, Z. B. Zheng, A. G. Zhang, K. Z. Wang, *Dalton Trans.* 42 (2013) 5764–5777 (https://doi.org/10.1039/c3dt33116d)

60. F. Wang, J. Bella, J. A. Parkinson, P. J. Sadler, J. Biol. Inorg. Chem. 10 (2005) 147–155 (https://doi.org/10.1007/s00775-004-0621-5)

61. P. Heffeter, K. Böck, B. Atil, M. A. Reza Hoda, W. Körner, C. Bartel, U. Jungwirth, B. K. Keppler, M. Micksche, W. Berger, G. Koellensperger, *J. Biol. Inorg. Chem.* 15 (2010) 737–748 (https://doi.org/10.1007/s00775-010-0642-1)

62. W. S. Sheldrick, R. Exner, *Inorg. Chim. Acta* 195 (1992) 1–9 (https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)83844-X)

63. W. S. Sheldrick, S. Heeb, *J. Organomet. Chem.* 377 (1989) 357–366 (https://doi.org/10.1016/0022-328X(89)80097-X)

64. A. Merlino, *Coord. Chem. Rev.* 326 (2016) 111–134 (https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.08.001)

65. A. Rilak, R. Puchta, Ž. D. Bugarčić, *Polyhedron* 91 (2015) 73–83 (https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.02.030)

66. F. Wang, H. Chen, J. A. Parkinson, P. Socorro, P. J. Sadler, S. Table, *Inorg. Chem.* 41 (2002) 4509–4523 (https://doi.org/10.1021/ic025538f)

67. A. E. Martell, R. M. S. Editors, *Biochem. Educ.* 11 (1989) 20 (https://doi.org/10.1016/0307-4412(83)90054-7)

68. D. M. Townsend, K. D. Tew, *Oncogene* 22 (2003) 7369–7375 (https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940)

69. M. Groessl, M. Terenghi, A. Casini, L. Elviri, R. Lobinski, P. J. Dyson, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 25 (2010) 305–313 (https://doi.org/10.1039/b922701f)

70. A. Bergamo, L. Messori, F. Piccioli, M. Cocchietto, G. Sava, *Invest. New Drug* 21 (2003) 401–411 (https://doi.org/10.1023/A:1026243000320)

71. M. Nišavić, M. Stoiljković, I. Crnolatac, M. Milošević, A. Rilak, R. Masnikosa, *Arab. J. Chem.* 11 (2018) 291–304 (https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.07.021)

72. A. Bijelic, S. Theiner, B. K. Keppler, A. Rompel, J. Med. Chem. 59 (2016) 5894–5903 (https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00600)

73. M. Wenzel, A. Casini, *Coord. Chem. Rev.* 352 (2017) 432–460 (https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.02.012)

74. F. Calderazzo, C. Floriani, R. Henzi, F. L'Eplattenier, J. Chem. Soc. A. (1969) 1378–1386 (https://doi.org/10.1039/J19690001378)

75. K. S. Murray, M. A. A. van den Bergen, B. O. West, Aust. J. Chem. 31 (1978) 203–207 (https://doi.org/10.1071/CH9780203)

76. M. G. Bhowon, H. Li Kam Wah, R. Narain, *Polyhedron* 18 (1998) 341–345 (https://doi.org/10.1016/S0277-5387(98)00301-5)

77. S. Chang, L. R. Jones, C. Wang, L. M. Henling, R. H. Grubbs, *Organometallics* 17 (1998) 3460–3465 (https://doi.org/10.1021/om970910y)

78. M. M. T. Khan, S. B. Halligudi, S. Shukla, Z. A. Shaikh, *J. Mol. Catal.* 57 (1990) 301–305 (https://doi.org/10.1016/0304-5102(90)85004-2)

79. N. Dharmaraj, P. Viswanathamurthi, & K. Natarajan, *Trans. Met. Chem.* 26 (2001) 105–109 (https://doi.org/10.1023/A:1007132408648)

80. T. D. Thangadurai, K. Natarajan, *Trans. Metal. Chem.* 25 (2000) 347–351 (https://doi.org/10.1023/A:1007028431330)

81. N. Sathya, P. Muthusamy, N. Padmapriya, G. Raja, K. Deivasigamani, C. Jayabalakrishnan, *J. Coord. Chem.* 62 (2009) 3532–3543 (https://doi.org/10.1080/00958970903089676)

82. G. Prakash, R. Manikandan, P. Viswanathamurthi, K. Velmurugan, R. Nandhakumar, *J. Photoch. Photobiol. B*.138 (2014) 63–74 (https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.04.019)

83. I. P. Ejidike, P. A. Ajibade, *Rev. Inorg. Chem.* 35 (2015) 191–224 (https://doi.org/10.1515/revic-2015-0007)

84. I. P. Ejidike, & P. A. Ajibade, Int. J. Mol. Sci. 17 (2016) 1–11 (https://doi.org/10.3390/ijms17010060)

85. G. R. Jadhav, S. Sinha, M. Chhabra, P. Paira, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26 (2016) 4154–4155 (https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.06.069)

86. M. J. Chow, C. Licona, D. Yuan Qiang Wong, G. Pastorin, C. Gaiddon, W. H. Ang, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 6043–6059 (https://doi.org/10.1021/jm500455p)

87. M. K. M. Subarkhan, L. Ren, B. Xie, C. Chen, Y. Wang, H. Wang, *Eur. J. Med. Chem.* 179 (2019) 246-256 (https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.061)

88. N. J. Wheate, J. G. Collins, *Coord. Chem. Rev.* 241 (2003) 133–145 (https://doi.org/10.1016/S0010-8545(03)00050-X)

89. L. Xu, D. Zhang, J. Huang, M. Deng, M. Zhang, X. Zhou, *Chem. Commun.* 46 (2010) 743–745 (https://doi.org/10.1039/b918045a)

90. C. C. Ju, A. G. Zhang, C. L. Yuan, X. L. Zhao, K. Z. Wang, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 435–443 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.12.004)

91. Y. Zhang, L. Lai, P. Cai, G.-Z. Cheng, Y. Liu, New J. Chem. 39 (2015) 5805–5812 (https://doi.org/10.1039/C5NJ00582E)

92. P. Liu, J. Liu, Y. Q. Zhang, B. Y. Wu, K. Z. Wang, J. Photoch. Photobiol. B 143 (2015) 89–99 (https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.01.004)

93. P. Liu, B. Y. Wu, J. Liu, Y. C. Dai, Y. J. Wang, K. Z. Wang, *Inorg. Chem.* 55 (2016) 1412–1422 (https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01934)

94. X. Li, K. Heimann, F. Li, J. M. Warner, F. Richard Keene, J. Grant Collins, *Dalton Trans.* 45 (2016) 4017–4029 (https://doi.org/10.1039/c5dt04885k)

95. H. K. Saeed, I. Q. Saeed, N. J. Buurma, J. A. Thomas, *Chem. - Eur. J.* 23 (2017) 5467–5477 (https://doi.org/10.1002/chem.201605750)

96. V. Gonzalez, T. Wilson, I. Kurihara, A. Imai, J. A. Thomas, J. Otsuki, *Chem. Commun.* (2008) 1868–1870 (https://doi.org/10.1039/b802073f)

97. J. Andersson, P. Lincoln, J. Phys. Chem. B 115 (2011) 14768–14775 (https://doi.org/10.1021/jp2062767)

98. A. A. Almaqwashi, T. Paramanathan, P. Lincoln, I. Rouzina, F. Westerlund, M. C. Williams, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 11634–11641 (https://doi.org/10.1093/nar/gku859)

99. A. A. Holder, P. Taylor, A. R. Magnusen, E. T. Moffett, K. Meyer, Y. Hong, S. E. Ramsdale, M. Gordon, J. Stubbs, L. A. Seymour, D. Acharya, R. T. Weber, P. F. Smith, G. C. Dismukes, P. Ji, L. Menocal, F. Bai, J. Williams, D. M. Cropek, W. L. Jarrett, Dalton Trans. 42 (2013)11881-11899 L. (https://doi.org/10.1039/c3dt50547b)

100. S. Sun, J. Wang, D. Mu, J. Wang, Y. Bao, B. Qiao, X. Peng, *Chem. Commun.* 50 (2014) 9149–9152 (https://doi.org/10.1039/c4cc04501g)

101. L. Massai, J. Fernández-Gallardo, A. Guerri, A. Arcangeli, S. Pillozzi, M. Contel, L. Messori, *Dalton Trans.* 44 (2015) 11067–11076 (https://doi.org/10.1039/c5dt01614b)

M. M. Milutinović, P. P. Čanović, D. Stevanović, R. Masnikosa, M. Vraneš, A. Tot, M. M. Zarić, B. Simović Marković, M. Misirkić Marjanović, L. Vučićević, M. Savić, V. Jakovljević, V. Trajković, V. Volarević, T. Kanjevac, A. Rilak Simović, *Organometallics* 37 (2018) 4250–4266 (https://doi.org/10.1021/acs.organomet.8b00604)

103. X. Liang, X. Zou, L. Tan, W. Zhu, J. Inorg. Biochem. 104 (2010) 1259–1266 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.08.006)

104. J. Zhu, J. A. Rodríguez-Corrales, R. Prussin, Z. Zhao, A. Dominijanni, S. L. Hopkins, B. S. J. Winkel, J. L. Robertson, K. J. Brewer, *Chem. Commun.* 53 (2017) 145–148 (https://doi.org/10.1039/c6cc07978d)

105. C. M. Anderson, I. R. Taylor, M. F. Tibbetts, J. Philpott, Y. Hu, J. M. Tanski, *Inorg. Chem.* 51 (2012) 12917–12924 (https://doi.org/10.1021/ic301981s)

106. A. Herman, J. M. Tanski, M. F. Tibbetts, C. M. Anderson, *Inorg. Chem.* 47 (2008) 274–280 (https://doi.org/10.1021/ic062419h)

107. J. O' Connell. A. Martell, R. J. Hovey, J. Am. Chem. Soc. 81 (1958) 3189-3192 (https://doi.org/10.1021/ja01522a006)

108. M. Nišavić, R. Masnikosa, A. Butorac, K. Perica, A. Rilak, L. Korićanac, A. Hozić, M. Petković, M. Cindrić, *J. Inorg. Biochem.* 159 (2016) 89–95 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.02.034)

109. T. Yamada, Y. Noguchi, M. Nakai, O. Yamauchi, Y. Nakabayashi, T. Sato, Y. Tamai, M. Chikuma, Y. Mino, *Inorg. Chim. Acta* 394 (2013) 190–195 (https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.08.001)

110. R. Esteghamat-Panah, H. Hadadzadeh, H. Farrokhpour, J. Simpson, A. Abdolmaleki, F. Abyar, *Eur. J. Med. Chem.* 127 (2017) 958-971 (https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.11.005)

111. M. Međedović, A. Rilak Simović, D. Ćoćić, L. Senft, S. Matić, D. Todorović, S. Popović, D. Baskić, B. Petrović, *Dalton Trans.* 52 (2023) 1323-1344 (https://doi.org/10.1039/D2DT02993F)

112. S. Stoll, A. Schweiger, J. Magn. Reson. 178 (2006) 42–55 (https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013)

113. R. W. Hay, in *Reaction Mechanisms of metal complexes*, Elsevier, England, 2000

114. A. D. Becke, J. Phys. Chem. 97 (1993) 5648–5652 (https://doi.org/10.1063/1.464304)

115. F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 7 (2005) 3297–3305 (https://doi.org/10.1039/b508541a)

116. J. D. Chai, M. H. Gordon, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10 (2008) 6615–6620 (https://doi.org/10.1039/b810189b)

117. V. Barone, M. Cossi, J. Phys. Chem. A 102 (1998) 1995–2001 (https://doi.org/10.1021/jp9716997)

118. M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, V. Barone, J. Comput. Chem. 24 (2003) 669–681 (https://doi.org/10.1002/jcc.10189)

M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V Ortiz, J. Cioslowski, & D. J. Fox, (2010) Gaussian 09, Revision B.01. Gaussian Inc., Wallingford.

120. H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 2179–2183 (https://doi.org/10.1073/pnas.78.4.2179)

121. R. Thomsen, M. H. Christensen, J. Med. Chem. 49 (2006) 3315–3321 (https://doi.org/10.1021/jm051197e)

122. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, A. J. Olson. R. K. Belew, D. Goodsel, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791 (https://doi.org/10.1002/jcc)

123. Y. Zhao, N. E. Schultz, D. G. Truhlar, J. Chem. Theory Comput. 2 (2006) 364–382 (https://doi.org/10.1021/ct0502763)

124. A. D. Becke, E. R. Johnson, J. Chem. Phys. 123 (2005) 154101 (https://doi.org/10.1063/1.2065267)

125. A. Bujacz, Acta Crystallogr. D 68 (2012) 1278–1289 (https://doi.org/10.1107/S0907444912027047)

126. A. Canals, M. Purciolas, J. Aymami, M. Coll, *Biol. Crystallogr.* 61 (2005) 1009–1012 (https://doi.org/10.1107/S0907444905015404)

127. L. Chengteh, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B*, 37 (1988) 785-789 (https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785)

128. P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski, & M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 11623–11627 (https://doi.org/10.1021/j100096a001)

129. D. Andrae, U. Häußermann, M. Dolg, H. Stoll, & H. Preuß, *Theor. Chim. Acta* 77 (1990) 123–141 (https://doi.org/10.1007/BF01114537)

130. M. Kojic, M. Milosevic, V. Simic, E. J. Koay, J. B. Fleming, S. Nizzero, N. Kojic, A. Ziemys, M. Ferrari, *Comput. Methods Appl. Mech. Eng.* 324 (2017) 413–437 (https://doi.org/10.1016/j.cma.2017.06.019)

131. A. Ziemys, M. Kojic, M. Milosevic, Computational Models in Biomedical Engineering, Elsevier, 2022

 132.
 M.
 Kojic,
 J.
 Serbian
 Soc.
 Comput.
 Mech.
 12
 (2018)
 1–16

 (https://doi.org/10.24874/jsscm.2018.12.02.01)

 1–16

133. M. Međedović, D. Ćoćić, A. Mijatović, V. Simić, Ž. Milanović, M. Kosanić, S. Sretenović, A. R. Simović, J. Coord. Chem (2024) 1-20 (https://doi.org/10.1080/00958972.2024.2303736)

134. M. Kojić, R. Slavković, M. Živković, N. Grujović, N. Filipović, M. Milošević, V. Isailović, PAK-FE program for structural analysis, fluid mechanics, coupled problems and biomechanics. F.o.T.S. *Bioengineering R&D Cnter for Bioengineering,* Kragujevac, Serbia (2016)

135. G. G. Stokes, *Mathematical and physical papers*, Volume 3, Independently Published, 2021.

136. A. Einstein, Ann. Phys. 14 (1905) 182–193 (https://doi.org/10.1002/andp.200590005)

137. http://www.trimen.pl/witek/ciecze/liquids.html, (2023)

138. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, Jr Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian 09, Revision B.01. Gaussian Inc., Wallingford (2010).

139. S. D. Sarker, L. Nahar, Y. Kumarasamy, *Methods* 42 (2007) 321–324 (https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.006)

140. N. Joksimović, N. Janković, J. Petronijević, E. Milović, M. Kosanić, M. Petrović, *Med. Chem.*18 (2022) 784-790 (https://doi.org/10.2174/1573406418666220304230342)

141. M. N. Patel, D. S. Gandhi, P. A. Parmar, H. N. Joshi, J. Coord. Chem. 65 (2012) 1926–1936 (https://doi.org/10.1080/00958972.2012.685728)

142. A. Dovletoglou, S. A. Adeyemi, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.* 35 (1996) 4120–4127 (https://doi.org/10.1021/ic9512587)

143. M. J. Root, E. Deutsch, Inorg. Chem 24 (1985) 1464–1471 (https://doi.org/10.1021/ic00204a013)

144. J. D. Atwood, Inorganic and Organometallic Reaction Mechanisms, Wiley-VCH, New Tork, 1997

145. R. G. Wilkinson, *Kinetics and Mechanism of Reactions at Transition Metal Complexes*, VCH Weinheim, New York, 1991, 232–242.

146. P. A. Adcock, F. R. Keene, R. S. Smythe, M. Snow, *Inorg. Chem.* 15 (1984) 1923–1960 (http://dx.doi.org/10.1002/chin.198443318)

147. L. Helm, A. E. Merbach, Chem. Rev. 105 (2005) 1923–1959 (https://doi.org/10.1021/cr0307260)

148. M. Chrzanowska, A. Katafias, A. Kozakiewicz, R. van Eldik, *Inorg. Chim. Acta* 504 (2020) 119449 (https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119449)

149. M. Chrzanowska, A. Katafias, O. Impert, A. Kozakiewicz, A. Surdykowski, P. Brzozowska, A. Franke, A. Zahl, R. Puchta, R. Van Eldik, *Dalton Trans.* 46 (2017) 10264–10280 (https://doi.org/10.1039/c7dt01669g)

150. M. Chrzanowska, A. Katafias, A. Kozakiewicz, R. Puchta, R. van Eldik, J. Coord. Chem. 71 (2018) 1761–1777 (https://doi.org/10.1080/00958972.2018.1498972)

151. M. Savic, A. Arsenijevic, J. Milovanovic, B. Stojanovic, V. Stankovic, A. Rilak Simovic, D. Lazic, N. Arsenijevic, N. Milovanovic, *Molecules* 4699 (2020) 2–20 (https://doi.org/10.3390/molecules25204699)

152. H. Chao, W. J. Mei, Q. W. Huang, L. N. Ji, J. Inorg. Biochem. 92 (2002) 165–170 (https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00543-3)

153. B. F. Cain, B. C. Baguley, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* 21 (1978) 658–668 (https://doi.org/10.1021/jm00205a013)

154. R. Masnikosa, M. M. Milutinović, I. Crnolatac, A. Tot, S. Veličković, Ž. Bojić-Trbojević, A. Rilak-Simović, *J. Inorg. Biochem.* 208 (2020) 111090 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111090)

155. D. Lazić, A. Scheurer, D. Ćoćić, J. Milovanović, A. Arsenijević, B. Stojanović, N. Arsenijević, M. Milovanović, A. Rilak Simović, *Dalton Trans.* 50 (2021) 7686–7704 (https://doi.org/10.1039/d1dt00185j)

156. P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, H. G. Davtyan, A. T. Karapetyan, *Exp. Mol. Med.* 35 (2003) 527–533 (https://doi.org/10.1038/emm.2003.68)

157. D. D. Li, J. L. Tian, W. Gu, X. Liu, S. P. Yan, J. Inorg. Biochem. 104 (2010) 171–179 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.10.020)

158. S. Satyanarayana, J. C. Dabrowiak, J. B. Chaires, *Biochemistry* 31 (1992) 9319–9324 (https://doi.org/10.1021/bi00154a001)

159. A. G. Zhang, Y. Z. Zhang, Z. M. Duan, K. Z. Wang, H. B. Wei, Z. Q. Bian, C. H. Huang, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 6425–6436 (https://doi.org/10.1021/ic102126m)

160. C. W. Jiang, J. Inorg. Biochem. 98 (2004) 497–501 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2003.12.020)

161. C. W. Jiang, Eur. J. Inorg. Chem. 2004 (2004) 2277–2282 (https://doi.org/10.1002/ejic.200300710)

162. M. Nišavić, G. V. Janjić, A. Hozić, M. Petković, M. K. Milčić, Z. Vujčić, M. Cindrić, *Metallomics* 10 (2018) 587–594 (https://doi.org/10.1039/c7mt00330g)

163. R. O. Omondi, S. O. Ojwach, D. Jaganyi, A. A. Fatokun, *Inorg. Chem. Commun.* 94 (2018) 98–103 (https://doi.org/10.1016/j.inoche.2018.06.006)

164. I. Tabas, D. Ron, *Nat. Cell Biol.* 13 (2011) 184–190 (https://doi.org/10.1038/ncb0311-184)

165. G. Paniagua Soriano, G. De Bruin, H. S. Overkleeft, B. I. Florea, *Antioxid. Redox Sign.* 21 (2014) 2419–2443 (https://doi.org/10.1089/ars.2013.5794)

166. S. W. Hicks, C. E. Machamer, B. B. A. - Mol. Cell Res. 1744 (2005) 406–414 (https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.03.002)

167. I. P. Ejidike, P. A. Ajibade, *Molecules* 20 (2015) 9788–9802 (https://doi.org/10.3390/molecules20069788)

168. R. Karvembu, K. Natarajan, *Polyhedron* 21 (2002) 1721–1727 (https://doi.org/10.1016/S0277-5387(02)01038-0)

169. K. N. Kumar, R. Ramesh, Y. Liu, J. Mol. Catal. A - Chem. 265 (2007) 218–226 (https://doi.org/10.1016/j.molcata.2006.10.015)

170. K. P. Balasubramanian, R. Karvembu, R. Prabhakaran, V. Chinnusamy, K. Natarajan, *Spectrochim. Acta A* 68 (2007) 50–54 (https://doi.org/10.1016/j.saa.2006.10.049)

171. I. P. Ejidike, P. A. Ajibade, J. Coord. Chem. 68 (2015) 2552–2564 (https://doi.org/10.1080/00958972.2015.1043127)

172. G. Venkatachalam, R. Ramesh, *Spectrochim. Acta A* 61 (2005) 2081–2087 (https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.08.008)

173. C. A. Bolos, A. T. Chaviara, D. Mourelatos, Z. Iakovidou, E. Mioglou, E. Chrysogelou, A. Papageorgiou, *Bioorgan. Med. Chem.* 17 (2009) 3142–3151 (https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.02.059)

174. T. T. Thai, B. Therrien, G. Süss-Fink, *Inorg. Chem. Commun.* 12 (2009) 806–807 (https://doi.org/10.1016/j.inoche.2009.06.023)

175. R. Payne, P. Govender, B. Therrien, C. M. Clavel, P. J. Dyson, G. S. Smith, *J. Organomet. Chem.* 729 (2013) 20–27 (https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2013.01.009)

176. P. Govindaswamy, B. Therrien, G. Süss-Fink, P. Štěpnička, J. Ludvík, *J. Organomet. Chem.* 692 (2007) 1661–1671 (https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2006.12.040)

177. M. Fandzloch, A. Wojtczak, J. Sitkowski, I. Łakomska, *Polyhedron* 67 (2014) 410-415 (https://doi.org/10.1016/j.poly.2013.09.022)

178. M. Pavlović, E. Kahrović, S. Aranđelović, S. Radulović, P. P. Ilich, S. Grgurić-Šipka, N. Ljubijankić, D. Žilić, J. Jurec, *J. Biol. Inorg. Chem.* (2023) (https://doi.org/10.1007/s00775-023-01989-0)

179. V. Brabec, J. Kasparkova, *Coord. Chem. Rev.* 376 (2018) 75–94 (https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.07.012)

180. H. J. Yin, A. G. Zhang, L. H. Gao, H. Zhao, K. Z. Wang, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* 39 (2020) 592–614 (https://doi.org/10.1080/15257770.2019.1669804)

181. S. Maikoo, B. Xulu, A. Mambanda, N. Mkhwanazi, C. Davison, J. A. de la Mare, I. N. Booysen, *Chem. Med. Chem.* 20 (2022) 17-32 (https://doi.org/10.1002/cmdc.202200444)

182. H. A. Alhazmi, *Sci. Pharm.* 87 (2019) 5-18 (https://doi.org/10.3390/scipharm87010005)

183. O. A. Chaves, L. B. Menezes, B. A. Iglesias, J. Mol. Liq. 294 (2019) 111581 - 111616 (https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111581)

184. A. Rilak Simović, R. Masnikosa, I. Bratsos, E. Alessio, *Coord. Chem. Rev.* 398 (2019) 113011 - 113037 (https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.07.008)

185. N. Ribeiro, P. F. Farinha, J. O. Pinho, H. Luiz, J. P. Mészáros, A. M. Galvão, J. Costa Pessoa, É. A. Envedy, C. P. Reis. I. Correia, M. M. Gaspar, **Pharmaceutics** 14 (2022)1 - 29(https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122583)

186. R. J. Youle, A. Strasser, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 9 (2008) 47–59 (https://doi.org/10.1038/nrm2308)

187. Y. Mei, C. Xie, W. Xie, X. Tian, M. Li, M. Wu, *Neoplasia* 9 (2007) 871–881 (https://doi.org/10.1593/neo.07589)

188. C. S. Mitsiades, N. Mitsiades, V. Poulaki, R. Schlossman, M. Akiyama, D. Chauhan, T. Hideshima, S. P. Treon, N. C. Munshi, P. G. Richardson, K. C. Anderson, *Oncogene* 21 (2002) 5673–5683 (https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205664)

189. Y. Sakuma, S. Hirai, T. Sumi, M. Tada, T. Kojima, T. Niki, M. Yamaguchi, *Exp. Cell Res.* 406 (2021) 112763 - 112770 (https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112763)

190. R. Rahmanzadeh, P. Rai, J. P. Celli, I. Rizvi, B. Baron-Lühr, J. Gerdes, T. Hasan, *Cancer Res.* 70 (2010) 9234–9242 (https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1190)

191. V. Farkaš, *Folia Microbiol*. 48 (2003) 469–478 (https://doi.org/10.1007/BF02931327)

192. M. A. E.-Atway. A. H. Bashal , K. D. Khalil , A. M. Abu-Dief, *Int. J. Biol. Macromol.* 253 (2023) 126856 (https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126856)

193. A. M. Abu-Dief, N. H. Alotaibi, E. S.Al-Farraj, H. A. Qasem, S. Alzahrani, M. K. Mahfouz, *J. Mol. Liq.* 365 (2022) 119961 (https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119961)

194. R. Sotler, B. Poljšak, R. Dahmane, T. Jukić, D. Pavan Jukić, C. Rotim, P. Trebše, A. Starc, *Acta Clin. Croat.* 58 (2019) 726–736 (https://doi.org/10.20471/acc.2019.58.04.20)

195. G. G. Duca, C. Vicol, Fundamental and Biomedical Aspects of Redox Processes, 2023, 224–249

196. Z. Markovic, Ž. Milanović, M. Antonijević, E. Avdović, V. Simić, M. Milošević, Z. Dolićanin, M. Kojić, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2023) 1-16 (https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2245071)

197. O. Dömötör, C. G. Hartinger, A. K. Bytzek, T. Kiss, B. K. Keppler, E. A. Enyedy, *J. Biol. Inorg. Chem.* 18 (2013) 9–17 (https://doi.org/10.1007/s00775-012-0944-6)

198. Y. Q. Wang, H. M. Zhang, G. C. Zhang, W. H. Tao, S. H. Tang, *J. Lumin.* 126 (2007) 211–218 (https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2006.06.013)

199. S. Deepa, A. K. Mishra, J. Pharm. Biomed. Anal. 38 (2005) 556–563 (https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.01.023)

200. A. Rilak- Simovic, M. Međedović, A. Mijatović, R. Baošić, D. Lazić, Ž. Milanović, Z. Marković, J. Milovanović, D. Arsenijević, B. Stojanović, M. Arsenijević, M. Milovanović, B. Petrović, *J. Inorg. Biochem.* 248 (2023) 112363-112382 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112363)

201. G. Psomas, D. P. Kessissoglou, *Dalton Trans.* 42 (2013) 6252-6276 (https://doi.org/10.1039/C3DT50268F)

202. S. S. Wu, W. B. Yuan, H. Y. Wang, Q. Zhang, M. Liu, K. B. Yu, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 2026–2034 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.08.005)

203. V. Rajendiran, R. Karthik, M. Palaniandavar, H. Stoeckli-Evans, V. S. Periasamy, M. A. Akbarsha, B. S. Srinag, H. Krishnamurthy, *Inorg. Chem.* 46 (2007) 8208–8221 (https://doi.org/10.1021/ic700755p)

204. B. Mishra, A. Barik, K. I. Priyadarsini, H. Mohan, J. Chem. Sci. 117 (2005) 641-647 (https://doi.org/10.1007/BF02708293)

205. M. Medjedović, A. R. Simović, D. Ćoćić, M. Milutinović, L. Senft, S. Blagojević, N. Milivojević, B. Petrović, *Polyhedron* 178 (2020) 114334 (https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.114334)

206. A. M. Pyle, J. P. Rehmann, R. Meshoyrer, C. V. Kumar, N. J. Turro, J. K. Barrton, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 3051–3058 (10.1021/ja00190a046)

207. J. R. Lakowicz, G. Weber, *Biochemistry* 12 (1973) 4161–4170 (https://doi.org/10.1021/bi00745a020)

208. C. Rajput, R. Rutkaite, L. Swanson, I. Haq, J. A. Thomas, *Chem.- Eur. J.* 12 (2006) 4611–4619 (https://doi.org/10.1002/chem.200501349)

209. H. Chao, R. H. Li, C. W. Jiang, H. Li, L. N. Ji, X. Y. Li, J. Chem. Soc. Dalton. Trans. 325 (2001) 1920–1926 (https://doi.org/10.1039/b101483h)

210. U. McDonnell, M. R. Hicks, M. J. Hannon, A. Rodger, J. Inorg. Biochem. 102 (2008) 2052–2059 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.06.006)

211. A. Ghosh, P. Das, M. R. Gill, P. Kar, M. G. Walker, J. A. Thomas, A. Das, *Chem. Eur. J.* 17 (2011) 2089–2098 (https://doi.org/10.1002/chem.201002149)

212. L. M. Wilhelmsson, F. Westerlund, P. Lincoln, B. Norde, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 12092–12093 (https://doi.org/10.1021/ja027252f)

213. R. B. Nair, C. J. Murphy, J. Inorg. Biochem. 69 (1998) 1-5 (https://doi.org/10.1016/S0162-0134(97)10033-2)

214. H. P. Hopkins Jr, J. Fumero, W. D. Wilson, *Biopolymers* 29 (1990) 449–459 (https://doi.org/10.1002/bip.360290215)

215. R. Sarkar, S K. Pal, *Biopolymers* 83 (2006) 675–686 (https://doi.org/10.1002/bip.20606)

216. M. R. Bugs, M. Cornelio, *Eur. Biophys. J.* 31 (2002) 232–240 (https://doi.org/10.1007/s00249-002-0205-7)

217. V. G. Vaidyanathan, B. U. Nair, J. Inorg. Biochem. 94 (2003) 121–126 (https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00620-7)

218. J. M.Kelly, A. B. Tossi, MC Connell DJ, OhUigin C., Nucelic. Acids. Res. 13 (1985) 6017–6034 (https://doi.org/10.1093/nar/13.17.6017)

219. C. Metcalfe, C. Rajput, J. A. Thomas, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1314–1319 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.03.005)

220. M. Jiang, Y.-T. Li, Z.-Y. Wub, Z.-Q. Liu, C.-W. Yan, J. Inorg. Biochem. 103 (2009) 833-844 (https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.02.007)

221. U. McDonnell, J.M. C. A. Kerchoffs, R. P. M. Castineiras, M. R. Hicks, A. C. G. Hotze, M. J. Hannon, A. Rodger, *Dalton Trans*. (2008) 667–675 (https://doi.org/10.1039/b711080d)

222. V. P. Petrovic, M. N. Zivanovic, D. Simijonovic, J. Djorovic, Z. D. Petrovic, S. D. Markovic, *Chem. Pap.* 71 (2017) 2075–2083 (https://doi.org/10.1007/s11696-017-0200-1)

D. Lj. Stojkovic, V. V. Jevtic, G. P. Radic, D. S. Đacic, M. G. Curcic, S. D. Markovic, V. M. Đinovic,
V. P. Petrovic, S. Trifunovic, J. Mol. Struct. 1062 (2014) 21–28 (https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.01.020)

224. V. P. Petrovic, D. Simijonovic, M. N. Zivanovic, J. V. Kosaric, Z. D. Petrovic, S. Markovic, S. D. Markovic, *RSC Adv.* 4 (2014) 24635–24644 (https://doi.org/10.1039/c4ra03909b)

225. V. P. Petrović, M. N. Živanović, D. Simijonović, J. Đorović, Z. D. Petrović, S. D. Marković, *RSC Adv.* 5 (2015) 86274–86281 (https://doi.org/10.1039/C5RA10204A)

226. Y. Liu, C. Chou, M. Kim, R. Vasisht, Y. Kuo, P. Ang, C. Liu, E. P. Perillo, Y. Chen, K. Blocher, H. Horng, Y. Chen, D. T. Nguyen, T. E. Yankeelov, M. Hung, A. K. Dunn, *Sci. Rep.* 9 (2019) 3395-3407 (https://doi.org/10.1038/s41598-018-37625-0)

227. E. Alessio, L. Messori, *Molecules* 24 (2019) 1995-2014 (https://doi.org/10.3390/molecules24101995)

ПРИЛОГ

 $\dot{\frown}$

9 H

HO



Dalton Transactions



PAPER



Cite this: Dalton Trans., 2023, 52, 1323

New ruthenium(II) complexes with quinone diimine and substituted bipyridine as inert ligands: synthesis, characterization, mechanism of action, DNA/HSA binding affinity and cytotoxic activity†

Milica Međedović,^a Ana Rilak Simović, ⁽¹⁾ *^b Dušan Ćoćić, ⁽¹⁾ a Laura Senft,^c Sanja Matić,^d Danijela Todorović,^e Suzana Popović,^f Dejan Baskić^f and Biljana Petrović ⁽¹⁾ *^a

This paper presents the synthesis and structural characterization of a series of new ruthenium(II) complexes 1-7, with the general formula mer-[RuL₃(N-N)Cl]Cl, where L is 2,2':6',2''-terpyridine (tpy) or 4'-(4chlorophenyl)-2,2':6',2"-terpyridine (Cl-Ph-tpy) and N-N is o-benzoquinonediimine (o-bqdi), 2,3naphthoquinonediimine (nqdi), 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine (dmbpy) or 2,2'-bipyridine-4,4'-dicarboxylic acid (dcbpy). The kinetic results showed that the ligand substitution reactions of new Ru(11)-polypyridyl complexes with biomolecules were affected by different substituents and the aromaticity of meridional tridentate and bidentate spectator ligands as well as by the nature of the entering nucleophile. The reactivity of the complexes increases in the order: dmbpy < dcbipy < nqdi < o-bqdi. In addition, quantum chemical calculations were performed to support the interpretation and discussion of the experimental data. Furthermore, combining ethidium bromide (EB) and Hoechst 33258 (2-(4-hydroxyphenyl)-5-[5-(4methylpiperazine-1-yl)benzimidazo-2-yl]-benzimidazole) fluorescence assay results implied that 1-7 might interact with calf thymus DNA through partial intercalation and/or minor groove binding. The human serum albumin (HAS)-fluorescence binding studies involving the site markers, eosin Y, as a marker for site I of subdomain IIA, and ibuprofen, as a marker for site II of subdomain IIIA, showed that Ru(II) compounds bind to both sites with moderately strong affinity ($K_b = 10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}$). Moreover, these DNA/HSA experimental results were confirmed by molecular docking. Complexes 2, 5 and 6 exerted good to strong and highly selective cytotoxic activity against breast adenocarcinoma (MDA-MB 231), colorectal carcinoma (HCT116) and cervix adenocarcinoma (HeLa). Depending on their structure and cell line, the complexes acted differently in terms of their influence on autophagy, the cell cycle and the engaged apoptotic pathway.

Received 14th September 2022, Accepted 22nd December 2022 DOI: 10.1039/d2dt02993f

rsc.li/dalton

^aUniversity of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: biljana.petrovic@pmf.kg.ac.rs;

Fax: +381(0)34335040; Tel: +381(0)34336223
 ^bUniversity of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Natural Sciences, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia.
 E-mail: anarilak@kg.ac.rs; Fax: +381(0)34335040; Tel: +381(0)34336223
 ^cDepartment Chemie, Ludwig-Maximilians Universität (LMU) München, 81377
 München, Germany

^eUniversity of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Genetics, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

Introduction

The major goal in the discovery of new metallodrugs is to develop and implement innovative therapies with increased effectiveness and tolerability. Scientists are still working on the development of new transition metal ion complexes for cancer therapy associated with lower side effects, drug resistance and higher biocompatibility than the compounds used so far.¹ Ruthenium-based drugs have achieved promising results as potential anticancer agents due to their unique properties such as biological, photophysical, optical, electronic and catalytic, giving favorable therapeutic application possibilities.² Among the numerous reported Ru complexes showing potential as anticancer therapeutics, the Ru(II) polypyridyl complex (TLD1433) and Ru(III) complexes (NAMI-A and KP1019) have progressed to clinical trials.^{3–5} Although polypyridyl-based

^dUniversity of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Svetozara Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^fUniversity of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

[†]Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: https://doi.org/ 10.1039/d2dt02993f

Journal of Inorganic Biochemistry 248 (2023) 112363



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry



Synthesis, characterization, biomolecular interactions, molecular docking, and in vitro and in vivo anticancer activities of novel ruthenium(III) Schiff base complexes



Milica Međedović^a, Aleksandar Mijatović^b, Rada Baošić^c, Dejan Lazić^d, Žiko Milanović^e, Zoran Marković^e, Jelena Milovanović^f, Dragana Arsenijević^g, Bojana Stojanović^h, Miloš Arsenijević^d, Marija Milovanovićⁱ, Biljana Petrović^a, Ana Rilak Simović^{e,*}

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

^d Department of Surgery, Faculty of Medical Sciences, University of Kraujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

* University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Natural Sciences, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

¹ Departement of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

^g Departement of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia
^h Departement of Patophysiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

¹ Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords: Ruthenium(III) Schiff bases Biomolecular interactions Docking simulations Lewis lung cancer Metastases

ABSTRACT

In order to discover new anticancer drugs, novel ruthenium(III) complexes [Ru(L)Cl(H2O)], where L is tetradentate Schiff base bis(acetylacetone)ethylendiimine (acacen, 1), bis(benzoylacetone)ethylendiimine (bzacen, 2), (acetylacetone)(benzoylaceton)ethylendiimine (acacbzacen, 3), bis(acetylacetone)propylendiimine (acacpn, 4), bis(benzoylacetone)propylendiimine (bzacpn, 5) or (acetylacetone)(benzoylaceton)propylendiimine (acacbzacpn, 6), were synthesized. The complexes 1 - 6 were characterized by elemental analysis, molar conductometry, and by various spectroscopic techniques, such as UV-Vis, IR, EPR, and ESI-MS. Based on in vitro DNA/BSA experiments, complexes 2 (bzacen) and 5 (bzacpn) with two aromatic rings showed the highest DNA/ BSA-activity, suggesting that the presence of the aromatic ring on the tetradentate Schiff base ligand contributes to increased activity. Moreover, these two compounds showed the highest cytotoxic effects toward human, A549 and murine LLC1 lung cancer cells. These complexes altered the ratio of anti- and pro-apoptotic molecules and induced apoptosis of A549 cells. Further, complexes 2 and 5 reduced the percentage of Mcl1 and Bcl2 expressing LLC1 cells, induced their apoptotic death and exerted an antiproliferative effect against LLC1. Finally, complex 5 reduced the volume of mouse primary heterotopic Lewis lung cancer, while complex 2 reduced the incidence and mean number of metastases per lung. Additionally, molecular docking with DNA revealed that the reduced number of aromatic rings or their absence causes lower intercalative properties of the complexes in order: 2 > 5> 6 > 3 > 4 > 1. It was observed that conventional hydrogen bonds and hydrophobic interactions contribute to the stabilization of the structures of complex-DNA. A molecular docking study with BSA revealed a predominance of 1 - 6 in binding affinity to the active site III, a third *D*-shaped hydrophobic pocket within subdomain IB.

* Corresponding author.

E-mail address: anarilak@kg.ac.rs (A.R. Simović).

https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112363

Received 14 July 2023; Received in revised form 25 August 2023; Accepted 28 August 2023 Available online 29 August 2023 0162-0134/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

^b University of Belgrade, Faculty of Mining and Geology, Đušina 7, 11000 Belgrade, Serbia

^c University of Belgrade, Faculty of Chemistry, Studentski trg 12-16, 11000 Belgrade, Serbia

Abbreviations: acacbzacen, (acetylacetone)(benzoylaceton)ethylendiimine;; acacbzacpn, (acetylacetone)(benzoylaceton)propylendiimine;; acacen, bis(acetylacetone)ethylendiimine;; acacpn, bis(acetylacetone)propylendiimine;; bzacen, bis(benzoylacetone)ethylendiimine;; A549, human lung cancer cell line;; A549cisR, cisplatin resistant human lung cancer cell line;; Bcl2, B-cell lymphoma 2;; bzacpn, (benzoylaceton)propylendiimine;; HCT116 and CT26, colorectal cancer cell line;; HuH-7, hepatocyte-derived carcinoma cell line;; LLC1, murin Lewis lung cancer cell line;; MCF-7, breast cancer cell line;; Mcl, mantle cells lymphoma;; TK10, renal cancer cell line;

JOURNAL OF COORDINATION CHEMISTRY https://doi.org/10.1080/00958972.2024.2303736



Check for updates

In silico and *in vitro* biological evaluation: distribution of Ru(III) Schiff base complexes through the pancreatic 3D model and immersed blood vessel network

Milica Međedović^a, Dušan Ćoćić^a, Aleksandar Mijatović^b, Vladimir Simić^c, Žiko Milanović^c, Marijana Kosanić^d, Nevena Petrović^d, Snežana Sretenović^e and Ana Rilak Simović^c

^aFaculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, P. O. Box 60, 34000, Serbia; ^bFaculty of Mining and Geology, University of Belgrade, Dušina 7, Belgrade, 11000, Serbia; ^cUniversity of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Jovana Cvijića bb 34 000, Kragujevac, Serbia; ^dFaculty of Science, Department of Biology, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, 34000, Serbia; ^eFaculty of Medicinal Science, Department of Internal Medicine, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, Kragujevac, 34000, Serbia

ABSTRACT

In this study, we describe the in vitro antimicrobial activity of newly synthesized Ru(III)-Schiff base complexes, [Ru(L)Cl(H2O)], where L = bis(acetylacetone)ethylendiimine (acacen, 1), bis(benzoylacetone)ethylendiimine (bzacen, 2), (acetylacetone)(benzoylaceton)ethylendiimine (acacbzacen, 3), bis(acetylacetone) propylendiimine (acacpn, 4), bis(benzoylacetone)propylendiimine (bzacpn, 5) or (acetylacetone) (benzoylaceton)propylendiimine (acacbzacpn, 6), against Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Fusarium solani, Trichoderma viride, Penicillium italicum, Mucor mucedo, and Aspergillus niger. The best antibacterial activity was displayed against Staphylococcus aureus for 5 and 6 with MIC of 0.014 mg/mL, while the highest antifungal activity was obtained for 5 against Penicillium italicum and Aspergillus niger (MIC of 0.234 mg/mL). In continuation of our previous study, the diffusion process of Ru(III) complexes within the pancreatic 3D model and immersed blood vessel network was monitored by comparative analysis. Furthermore, a molecular docking investigation of 1-6 with human serum albumin (HSA) was conducted and the affinity of HSA to accommodate 1-6 in a subdomain IIA follows the order $5 > 6 \ge 2 > 3 > 4 > 1$. Finally, all selected complexes exhibit marginally similar binding affinities to the protein Bcl-2.

ARTICLE HISTORY

Received 8 September 2023 Accepted 6 November 2023

KEYWORDS

Ru complexes; HAS; Bcl-2; pancreatic model; antimicrobial

CONTACT Ana Rilak Simović 🖂 anarilak@kg.ac.rs 💽 University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Natural Sciences, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia.

Supplemental data for this article can be accessed online at https://doi.org/10.1080/00958972.2024.2303736.
 2024 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Polyhedron 178 (2020) 114334



Contents lists available at ScienceDirect

Polyhedron

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





POLYHEDRON

Milica Medjedović^a, Ana Rilak Simović^b, Dušan Ćoćić^a, Milan Milutinović^c, Laura Senft^d, Stefan Blagojević^e, Nevena Milivojević^e, Biljana Petrović^{a,*}

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, P. O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia

^b University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Natural Sciences, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

^c Institute for Inorganic and Analytical Chemistry, Technical University of Braunschweig, Hagenring 30, 38106 Braunschweig, Germany

^d Department of Chemistry and Pharmacy, Friedrich-Alexander University Erlangen-Nuremberg, 91058 Erlangen, Germany

^e University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology, Radoja Domanovića 12, P. O. Box 60, Kragujevac 34000, Serbia

ARTICLE INFO

Article history: Received 15 November 2019 Accepted 27 December 2019 Available online 30 December 2019

Keywords: Dinuclear Ru(II) complexes Polypyridyl DNA BSA Cytotoxicity

ABSTRACT

The substitution reactions of dinuclear Ru(II) polypyridyl complexes, *i.e.* [{RuCl(bpy)₂}₂(μ -pzn)][PF₆]₂(**1**) and $[{RuCl(phen)_2}_2(\mu-pzn)][PF_6]_2$ (2) (bpy = 2,2'-bipyridine, phen = 1,10-phenanthroline, µ-pzn = pyrazine), with mononucleotide guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) and sulfur-containing nucleophiles, such as L-methionine (L-Met) and glutathione (GSH) were studied by UV-Vis spectroscopy. The structures of dinuclear Ru(II) complexes 1 and 2 were preserved during the substitution processes and the calculated enthalpies and entropies of activation ($\Delta H^{\neq} > 0$, $\Delta S^{\neq} < 0$) supported an associative mechanism of substitution. The DNA binding affinity of complexes 1 and 2 was evaluated by UV-Vis, fluorescence emission spectroscopy and by viscosity measurements in aqueous phosphate buffer solution (PBS) at pH 7.40. Additionally, competitive binding reactions with an intercalative agent ethidium bromide (EB) and the known minor groove binder Hoechst 33258 were studied as well. The obtained results indicate that complexes 1 and 2 can interact with DNA through the intercalation and/or minor groove binding, where the latest was preferred. This observation is in a good agreement with the results obtained by molecular docking. Furthermore, both complexes strongly quenched the fluorescence of tryptophan residues in serum albumin (BSA) through both static and dynamic quenching ($K_{sv} = 10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$). In addition, complexes 1 and 2 showed moderate cytotoxic activity against human breast cancer cells (MDA-MB-231), while both were inactive against human colorectal cancer cells (HCT-116).

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: Bpy, 2,2'-bipyridine; phen, 1,10-phenantroline; pzn, pyrazine; 5'-GMP, guanosine-5'-monophosphate; L-Met, L-methionine; GSH, glutathione; DNA, deoxyribonucleic acid; PBS, phosphate-buffered saline; EB, ethidium bromide; Hoechst 33258, 2-(4-hydroxyphenyl)-5-[5-(4-methylpipera-zine-1-yl)benzimidazo-2-yl]-benzimidazole; MDA-MB-231, human breast cancer cell; HCT-116, human colorectal cancer cell; tpy, 2,2':6',2"-terpyridine; Cl-tpy, 4'-chloro-2,2':6',2"-terpyridine; Cl-Ph-tpy, 4'-(4-chlorophenyl)-2,2':6',2"-terpyridine; en, 1,2-diaminoethane; dach, 1,2-diaminocyclohexane; o-bqdi, o-benzoquinonediimine; CT-DNA, calf thymus DNA; HT DNA, herring testes DNA; HSA, human serum albumin; mtefc, (2-(methylthio)ethyl)ferrocene; mtpfc, (3-(methylthio)propyl)ferrocene); Hepes buffer, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; DMSO, dimethylsulfoxide; MVD, Molegro Virtual Docker; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 9-MeG, 9-methylguanine; 1-His, 1-histidine; Pz, pyrazole; Tz, 1,2,4-triazole; Py, pyridine; NAMI-A, imidazolium trans-[tetrachlorido(1H-imidazole)(dimethylsulfoxide)ruthenate(III)]; 4-azo, 4,4"-azobis(2,2'-bipyridine). Corresponding author.

https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.114334 0277-5387/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved. 1. Introduction

Ruthenium compounds with polypyridyl ligands are leading candidates for use as anticancer drugs, due to their relatively low toxicity, photophysical and redox properties, and proved antitumor effectiveness [1,2]. In order to establish the structure-activity relationship for Ru(II)-polypyridyl complexes, the chemistry and reactivity of Ru(II)-terpyridine complexes with meridional geometry that contained a tridenate chelating ligand, such as 2,2':6', 2"-terpyridine (tpy), 4'-chloro-2,2':6',2"-terpyridine (Cl-tpy) or 4'-(4-chlorophenyl)-2,2':6',2"-terpyridine (Cl-Ph-tpy), and a bidentate chelating ligand, such as 1,2-diaminoethane (en), 1,2-diaminocyclohexane (dach), 2,2'-bipyridine (bpy), *o*-benzo-quinonediimine (*o*-bqdi) and 1,10-phenanthroline (phen) were described [3–6]. The interactions of these complexes with oligonucleotides and with DNA (calf thymus, CT DNA, and herring testes,

E-mail address: biljana.petrovic@pmf.kg.ac.rs (B. Petrović).

БИОГРАФИЈА

H

HO



БИОГРАФИЈА



Милица Међедовић Стефановић рођена је 23.04.1993. године у Бору, где је завршила Основну школу "Бранко Радичевић" као носилац Вукове дипломе. Средњу Медицинску школу, смер фармацеутски техничар, завршила је у Зајечару. Основне академске студије хемије, смер истраживање и развој, завршила је 2017. године на Природноматематичком факултету у Крагујевцу са просечном оценом 8,92. Мастер академске студије, смер истраживање и развој, завршила је 2018. године, на истом факултету, са просечном оценом 10,00. За мастер рад "Синтеза, карактеризација, испитивање супституционих реакција са биолошки релевантним лигандима и испитивање интеракција са ДНК и серум албумином монофункционалних комплекса паладијума(II)"под менторством проф. др Биљане Петровић добила је награду Костић фонда 2019. године.

Школске 2018/2019. је уписала докторске академске студије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу под менторством проф. др Биљане Петровић, редовне професорке Природноматематичког факултета у Крагујевцу и др Ане Рилак-Симовић, више научне сараднице Института за информационе технологије, Универзитета у Крагујевцу. Положила је све испите на докторским академским студијама са просечном оценом 10,00. За време докторских студија била је ангажована као сарадница у извођењу вежби из предмета Неорганска хемија 2, Виша неорганска хемија, Хемија атмосфере и Механизми неорганских реакција. За време докторских студија учествовала је у изради 6 мастер радова студената чији је ментор била проф. др Биљана Петровић. У школској 2021/2022. години добила је диплому Студентског парламента Природно-математичког факултета за најбоље оцењену сарадницу у студентској анкети. На Институту за хемију Природно-математичког факултета у Крагујевцу запослена је у звању истраживачица-припавница од 2019. године, а од 2021. као истраживачица-сарадница.

Милица Међедовић Стефановић је чланица Српског хемијског друштва. Била је учесница бројних националних и међународних конференција, као и чланица организационог одбора 59. конференције Српског хемијског друштва.

Истраживачки рад Милице Међедовић Стефановић заснован је на синтези, карактеризацији и испитивању биолошке активности нових рутенијум(II/III) комплекса у циљу проналаска потенцијалних цитостатика.

Милица Међедовић Стефановић је до сада публиковала 6 научних радова у престижним међународним часописима. Њена истраживања дају допринос неорганској, координационој, бионеорганској и медицинској хемији.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

<u>CNHTEBA, Lapaksepu Baynja n Enonowia auturbroct Motro- n</u> <u>Antykheapitux pytetujým (11/111) konnnekca ca abot-40topekny</u> MNRAHANNA

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 Крагујевчу , 24.06.2024. године,

epduli Giropatisbut Jump

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

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

<u>Chittesa, kapartepnsailinja n Buorowia artubitet uotio - n</u> <u>Anitzireapitux pytettinjju (11/11) Kounnerica ca asot - 2040pounn</u> narattavina

истоветне.

У Крагунерену , 24.00. 2024. године,

<u>Lurrya diezegolout Cideopartobut</u> потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ja, Murrya NetresoBut CredentoBut



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

CUHTEBO, Kapaltepusalinja n Enorovia autrestort notto- n Antykleoptux pytetinjym (11/11) von mekra ca abot Autropenny Mrananna

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 <u>Крагујевчу</u>, <u>24.06.2024.</u> године,

<u>Гиплина Ливеровин Сичерановин</u> потпис аутора

τ.

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/