



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

*Андриана М. Букоњић*

**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ИСПИТИВАЊЕ**  
**БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА**  
 **$\beta$ -АМИНОКИСЕЛИНАМА**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

*Ментор: др Јована Богојески, доцент*

Крагујевац, 2019. година

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Андриана М. Букоњић
Датум и место рођења: 16.03.1988. год. Краљево, Република Србија
Садашње запослење: асистент на Факултету медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Република Србија
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса бакра(II) са $\beta$ -аминокиселинама
Број страница: 93
Број слика: 28
Број библиографских података: 164
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): медицина
Ментор: др Јована В. Богојески, доцент
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 09.02.2017.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-689/20 од 05.07.2017.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"><li><b>Проф. др Небојша Н. Арсенијевић</b>, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Микробиологија и имунологија; Онкологија</i>, председник;</li><li><b>Проф. др Тибор Ј. Сабо</b>, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област <i>Општа и неорганска хемија</i>, члан;</li><li><b>Проф. др Гордана П. Радић</b>, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармацеутска хемија</i>, члан;</li><li><b>Доц. др Верица В. Јевтић</b>, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Неорганска хемија</i>, члан;</li><li><b>НС др Ивана Д. Радојевић</b>, научни сарадник Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за научну област <i>Биологија</i>, члан.</li></ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
<ol style="list-style-type: none"><li><b>Проф. др Небојша Н. Арсенијевић</b>, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Микробиологија и имунологија; Онкологија</i>, председник;</li><li><b>Проф. др Тибор Ј. Сабо</b>, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област <i>Општа и неорганска хемија</i>, члан;</li><li><b>Проф. др Гордана П. Радић</b>, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Фармацеутска хемија</i>, члан;</li><li><b>Доц. др Верица В. Јевтић</b>, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Неорганска хемија</i>, члан;</li><li><b>НС др Ивана Д. Радојевић</b>, научни сарадник Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за научну област <i>Биологија</i>, члан.</li></ol>
Датум одбране дисертације:

## АПСТРАКТ

**Увод:** Бакар(II)-јон је због прелазно тврдо-меких карактеристика идеалан за координовање са различитим донорским атомима, а због есенцијалне улоге коју има у организму његови комплекси су потенцијално мање токсични. Аминокиселине преко атома азота и кисеоника лако формирају координативно-ковалентне везе са прелазним металима. Због биолошке активности и фармаколошког значаја,  $\beta$ -аминокиселине су погодни лиганди у синтези потенцијалног лека.

**Материјал и методе:** У оквиру ове докторске дисертације описани су поступци синтеза  $\beta$ -аминокиселина и одговарајућих комплекса бакра(II) са  $\beta$ -аминокиселинама. Структуре синтетисаних лиганата потврђене су на основу инфрацрвене (IR) и нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR), док су састав и структуре синтетисаних комплексних једињења претпостављене на основу резултата елементарне микроанализе, инфрацрвене и електронско-парамагнетно-резонанционе спектроскопије (EPR). Стварна структура комплекса бакра(II)-јона и 2-(1-аминоциклохексил)сирћетне киселине потврђена је и на основу резултата рендгенске структурне анализе. Интеракције синтетисаних комплекса са молекулом ДНК утврђене су на основу кинетичких мерења, апсорпционо спектроскопских мерења, флуоресцентних мерења и мерења вискозитета ДНК раствора. Број и вијабилност туморских ћелија (4T1, СТ26, LLC1) након примене раствора комплексних једињења одређена је колориметријским МТТ тестом. Антимикробна активност синтетисаних једињења испитана је микродилуционом методом.

**Резултати:** Потврђена је квадратно-планарна структура синтетисаних комплекса. Вредности константи везивања, смањења интензитета флуоресценције и повећање релативног вискозитета раствора ДНК указују на интеракцију комплекса и молекула ДНК. Од испитиваних ћелијских линија највећу осетљивост према синтетисаним комплексима показале су ћелије карцинома плућа, LLC1. Оба комплекса индукују апоптозу ћелија карцинома колоне (СТ26) и при нижим концентрацијама имају бољу активност од *цисплатине*. Испитиване супстанце испољавају ниску и селективну антимикробну активност која је вероватно последица њихових слабих липофилних карактеристика.

**Закључак:** Синтеза комплекса бакра(II) са различитим лигандима даје могућност развоја потенцијалних лекова. Испитивање биолошке активности сваког потенцијалног фармакотерапеутика омогућава да се приближније повеже структура комплекса са механизмом дејства и антитуморским и антимикробним потенцијалом.

**Кључне речи:**  $\beta$ -аминокиселине, комплекси бакра(II), биолошка активност.

## ABSTRACT

**Introduction:** Copper(II)-ion is ideal for coordinating with different donor atoms due to its soft-hard characteristics while transferring, and because of its essential role in organism, its complexes are potentially less toxic. Amino acids, through the atoms of nitrogen and oxygen, easily form coordinate-covalent bonds with transition metals.  $\beta$ -amino acids are suitable ligands in the synthesis of a potential medicine because of their biological activity and pharmacological significance.

**Materials and methods:** This PhD thesis describes the syntheses procedures of  $\beta$ -amino acids and corresponding copper(II)-complexes with  $\beta$ -amino acids. The structures of synthesized ligands were confirmed based on infrared (IR) and nuclear-magnetic-resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR), while the composition and the structures of synthesized complex compounds were assumed by the results of elemental microanalysis, infrared and electron paramagnetic resonance (EPR). The real structure of copper(II)-ion complex and 2-(1-aminocyclohexyl) acetic acid was confirmed from the results of Roentgen structural analysis. The interactions of synthesized complexes with the DNA molecule were determined by kinetic measurements, absorption spectroscopic measurements, fluorescent measurements and the measurements of the DNA solution viscosity. The number and the viability of tumor cells (4T1, CT26, LLC1), after applying complex compounds solutions, was determined by MTT colorimetric technique. Antimicrobial activity of synthesized compounds was examined using microdilution method.

**Results:** Square planar structure of synthesized compounds was confirmed. The values of binding constants, fluorescence intensity reduction and the increase of relative DNA solution viscosity indicated the interaction between complexes and the DNA molecule. From the tested cell lines, lung cancer cells (LLC1) showed the largest sensitivity towards synthesized complexes. Both complexes induced cell apoptosis of colon cancer (CT26) and had higher activity in lower concentrations than *cisplatin*. The tested substances expressed low and selective antimicrobial activity which was probably the result of their weak lipophilic characteristics.

**Conclusion:** The synthesis of copper(II)-complexes with different ligands offers the possibility for the development of potential medicines. Biological activity examination of each potential drug enables more approximate connection of the structure of complexes with the mechanism of action and anticancer and antimicrobial potentials.

**Key words:**  $\beta$ -amino acids, copper(II)-complexes, biological activity.

*Својој менторки, доц. др Јовани Богојески хвала на великој подршци и помоћи у истраживачком раду и изради ове Докторске дисертације.*

*Члановима Комисије, проф. др Небојши Арсенијевићу, проф. др Тибору Сабоу, проф. др Гордани Радић, доц. др Верици Јевтић и научној сарадници др Ивани Радојевић захваљујем на саветима и сугестијама којима су допринели побољшању квалитета ове дисертације.*

*Колегама и пријатељима, доц. др Марини Мијајловић, доц. др Милошу Николићу и др Душану Томовићу захваљујем на подршци, дивној сарадњи и заједничком раду.*

*Породици хвала на љубави и разумевању.*

*Ову Докторску дисертацију посвећујем мајци.*

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Хемијске особине <math>\beta</math>-аминокиселина</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2. Биолошки значај <math>\beta</math>-аминокиселина</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Хемијске особине бакра</b> .....	<b>6</b>
1.1.1. Комплексна једињења бакра(II) са аминокиселинама.....	8
<b>1.4. Биолошки значај бакра</b> .....	<b>10</b>
1.4.1. Дисбаланс концентрације бакра у организму.....	11
1.4.2. Повезаност бакра и карцинома.....	12
1.4.3. Улога бакра у лечењу карцинома.....	14
<b>1.5. Механизам дејства антитуморске активности бакар(II)-комплекса</b> .....	<b>16</b>
<b>1.6. Антимикробна активност</b> .....	<b>21</b>
1.6.1. Антимикробно дејство бакар(II)-јона и бакар(II)-комплекса.....	24
<b>2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ</b> .....	<b>26</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1. Синтеза лиганата</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2. Синтеза комплексних једињења</b> .....	<b>30</b>
3.2.1. Поступак синтезе комплекса бакра(II) са Л1 лигандом, 2-(1-аминоциклохексил)сирћетном киселином.....	30
3.2.2. Поступак синтезе комплекса бакра(II) са Л2 лигандом, 2-(1-амино-4-( <i>tert</i> -бутил)циклохексил)сирћетном киселином.....	30
<b>3.3. Инструментална мерења</b> .....	<b>31</b>
3.3.1. Елементална микроанализа.....	31
3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија.....	31
3.3.3. Нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија.....	31
3.3.4. Електронска-парамагнетна-резонанција.....	31
3.3.5. Рендгенска структурна анализа.....	32

<b>3.4. Испитивање стабилности комплексних једињења.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5. Интеракције синтетисаних комплекса са ДНК.....</b>	<b>33</b>
3.5.1. Припрема реагенаса .....	33
3.5.2. Кинетичка мерења.....	33
3.5.3. Апсорпциона спектроскопска мерења .....	35
3.5.4. Флуоресцентна мерења.....	35
3.5.5. Мерење вискозитета .....	37
<b>3.6. Антитуморска активност.....</b>	<b>37</b>
3.6.1. Припремање раствора испитиваних једињења и реагенаса.....	37
3.6.2. Ћелијска култура.....	38
3.6.3. Цитотоксични тестови .....	38
3.6.3.1. <i>MTT – тест</i> .....	38
3.6.3.2. <i>Тест апоптоичности</i> .....	40
<b>3.7. Антимикробна активност.....</b>	<b>41</b>
3.7.1. Припремање раствора испитиваних једињења и реагенаса.....	41
3.7.2. Третирани микроорганизми и припрема суспензија .....	42
3.7.3. Микродилуциона метода .....	43
<b>4. РЕЗУЛТАТИ .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. Синтеза и карактеризација .....</b>	<b>46</b>
4.1.1. Синтеза $\beta$ -аминокиселина .....	46
4.1.2. Синтеза комплекса бакра(II) са $\beta$ -аминокиселина .....	46
4.1.3. Елементална микроанализа синтетисаних комплекса.....	47
4.1.4. Нуклеарно-магнетно-резонантни спектри (лиганада).....	47
4.1.5. Инфрацрвени спектри синтетисаних лиганада и комплекса .....	48
4.1.6. Спектри електронско-парамагнетне-резонанције.....	48
4.1.7. Кристална структура комплекса K1 .....	49
<b>4.2. Стабилност раствора комплексних једињења .....</b>	<b>52</b>

<b>4.3. Интеракција синтетисаних комплекса са молекулом ДНК .....</b>	<b>53</b>
4.3.1. Супституционе реакције.....	53
4.3.2. UV-Vis апсорпциони спектри .....	54
4.3.3. Флуоресцентни емисиони спектри.....	55
4.3.4. Вискозност .....	56
<b>4.4. Антитуморска активност.....</b>	<b>57</b>
4.4.1. Ћелијска варијабилност и IC <sub>50</sub> вредности.....	57
4.4.2. Индукција апоптозе .....	58
<b>4.5. Антимикробна активност.....</b>	<b>59</b>
<b>5. ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>63</b>
<b>5.1. Синтеза и карактеризација <math>\beta^2</math>-аминокиселина .....</b>	<b>64</b>
<b>5.2. Синтеза, карактеризација и стабилност раствора комплекса бакра(II) са <math>\beta^2</math>-аминокиселинама .....</b>	<b>65</b>
<b>5.3. Интеракција комплекса са ДНК молекулом .....</b>	<b>68</b>
<b>5.4. Антитуморска активност.....</b>	<b>72</b>
<b>5.5. Антимикробна активност.....</b>	<b>74</b>
<b>6. ЗАКЉУЧАК .....</b>	<b>77</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>80</b>
<b>8. БИОГРАФИЈА АУТОРА .....</b>	<b>94</b>
<b>9. БИБЛИОГРАФИЈА АУТОРА.....</b>	<b>96</b>
<b>10. ПРИЛОЗИ.....</b>	<b>99</b>



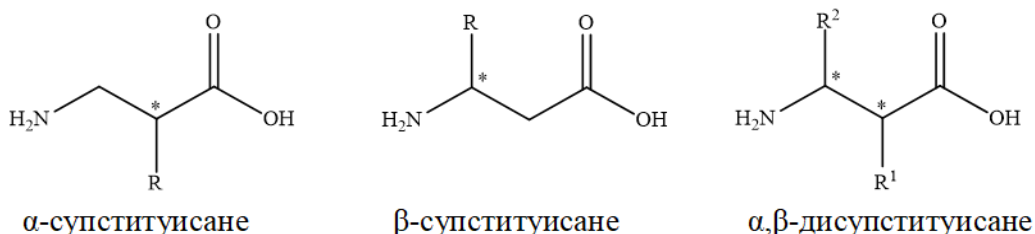


# 1. УВОД

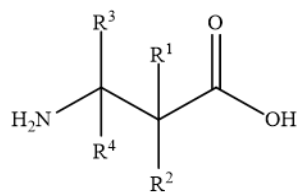
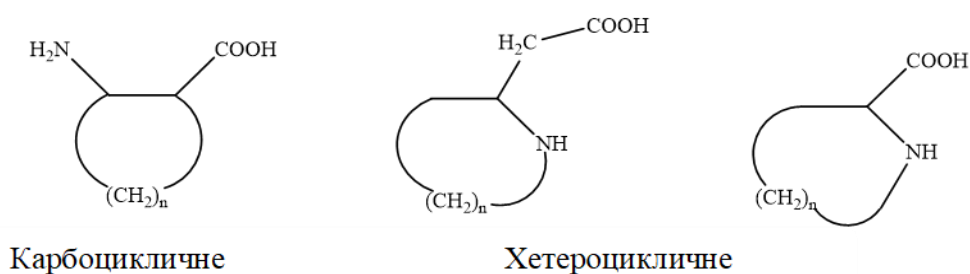
### 1.1. Хемијске особине $\beta$ -аминокиселина

Аминокиселине су веома важни органски молекули са амино ( $-\text{NH}_2$ ) и карбоксилном ( $-\text{COOH}$ ) функционалном групом и бочним ланцем који је специфичан за сваку аминокиселину [1]. До сада је познато преко 700 природних аминокиселина које се у зависности од положаја функционалних група могу класификовати на  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$ -аминокиселине [2]. На основу структуре  $\beta$ -аминокиселина извршена је подела на линеарне ( $\alpha$ -супституисане,  $\beta$ -супституисане и  $\alpha,\beta$ -дисупституисане) и цикличне (карбоцикличне и хетероцикличне) (Слика 1). Цикличне могу имати амино и карбоксилну функционалну групу као супституенте на карбоцикличном прстену или амино групу која улази у састав прстена. Најједноставнија  $\beta$ -аминокиселина је 3-аминопропанска киселина ( $\beta$ -аланин) и за разлику од већине она није оптички активна [3].

#### ЛИНЕАРНЕ $\beta$ -АМИНОКИСЕЛИНЕ



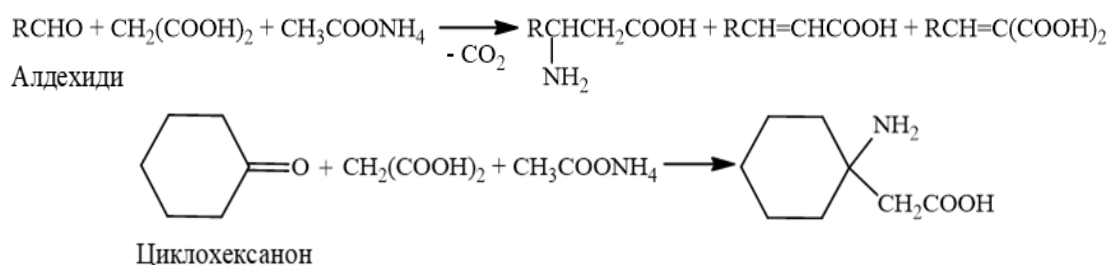
#### ЦИКЛИЧНЕ $\beta$ -АМИНОКИСЕЛИНЕ



$R^1, R^2, R^3, R^4 = \text{H}$  ( $\beta$ -аланин);  
 $R^2, R^3, R^4 = \text{H}$  ( $\beta^2$ -аминокиселине);  
 $R^1, R^2, R^3 = \text{H}$  ( $\beta^3$ -аминокиселине);  
 $R^3, R^4 = \text{H}$  ( $\beta^{2,2}$ -аминокиселине);  
 $R^2, R^3 = \text{H}$  ( $\beta^{2,3}$ -аминокиселине);  
 $R^1, R^2 = \text{H}$  ( $\beta^{3,3}$ -аминокиселине);  
 $R^4 = \text{H}$  ( $\beta^{2,3,3}$ -аминокиселине);  
 $R^1, R^2, R^3, R^4 \neq \text{H}$  ( $\beta^{2,2,3,3}$ -аминокиселине).

Слика 1. Структура  $\beta$ -аминокиселина

Добијање  $\beta$ -аминокиселина се последњих година углавном заснива на каталитичкој асиметричној синтези уз примену прелазних метала, органских катализатора или биокатализатора (ензима) [4,5]. Реакције које су катализоване металима најчешће обухватају реакције хидрогенизације, нуклеофилне адиције на  $\alpha,\beta$ -незасићена једињења и Манихове (Mannich) реакције [3-5]. Због велике енантиомерне селективности производа и мале количине катализатора, хидрогенизација у присуству родијума и рутенијума има широку примену, док су ограничења Манихових реакција и нуклеофилне адиције већа количина катализатора и приступачност нуклеофила [4]. Родионовом (Rodionov) реакцијом се од алифатичних и ароматичних алдехида могу добити значајне  $\beta$ -аминокиселине (Схема 1). Међутим, од испитиваних кетона је једино циклохексанон Родионовом реакцијом дао  $\beta$ -аминокиселину, док се ацетофенон, бензофенон, ацетон и етил-метил-кетон нису показали као погодни реагенси (Схема 1) [6].



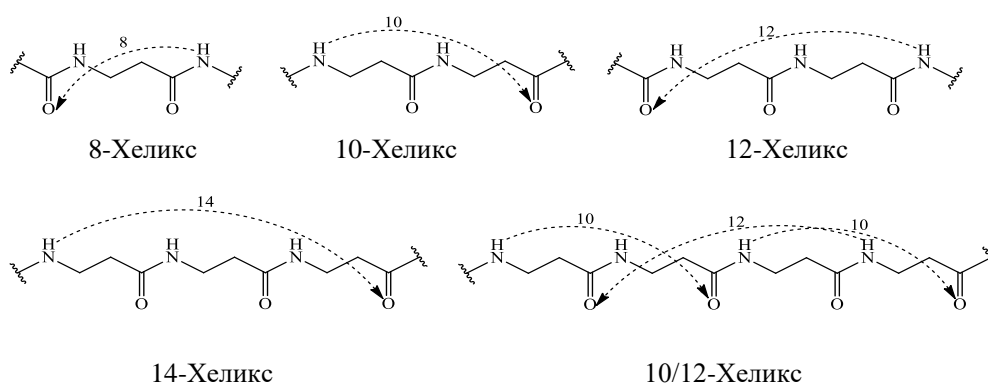
**Схема 1.** Синтеза  $\beta$ -аминокиселина Родионовом реакцијом

Реакције катализоване органским супстанцама су веома корисне методе, али и оне захтевају већу количину катализатора, дуже трају и често је потребан додатни корак у трансформацији до одговарајуће  $\beta$ -аминокиселине. Један од пожељних органских катализатора је (*S*)-пролин, природна и лако доступна аминокиселина [4]. Због све веће потребе да се избегне рацемска смеша  $\beta$ -аминокиселина и добију што чистији енантиомери, усавршавају се биокаталитичке методе, посебно оне које се заснивају на кинетичкој резолуцији и примени хидролитичких ензима [7,8].

Како би се детектовале синтетисане аминокиселине користе се различите аналитичке методе. Елементална микроанализа, инфрацрвена спектроскопија и нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија дају потврду структуре [9]. Раздвајање и квантификација слободних аминокиселина може се вршити применом гасна и течна хроматографија и капиларне електрофорезе [10]. Комплексирајућа способност

аминокиселина омогућила је развој електрохемијских сензора. Електроде које садрже бакар омогућавају осетљиву ампериметријску детекцију аминокиселина [11,12].

Са хемијског аспекта  $\beta$ -аминокиселине се не разликују значајно од  $\alpha$ -аминокиселина. Између амино групе једне  $\beta$ -аминокиселине и карбоксилне групе друге  $\beta$ -аминокиселине долази до формирања амидне везе и синтезе  $\beta$ -пептида у високом приносу. Спектроскопским методама и рендгенском структурном анализом су окарактерисани добијени пептиди. Уочена је значајна разлика у секундарној структури између  $\alpha$ - и  $\beta$ -пептида. Поређење аналогних секундарних структура ових пептида показује значајне разлике које се првенствено огледају у већој стабилности различитих  $\beta$ -хеликса (Слика 2). Супституенти на положајима  $\alpha$  и  $\beta$  у  $\beta$ -аминокиселинама фаворизују *gauche* конформације између  $\alpha$  и  $\beta$  угљеникових атома, што утиче на термодинамичку стабилност  $\beta$ -пептида [13,14]. Већа стабилност је запажена и према пептидазама, где  $\beta$ -пептиди изграђени од  $\beta$ -аминокиселине са остацима које садрже и  $\alpha$ -аминокиселине остају дуже неразграђени [15].

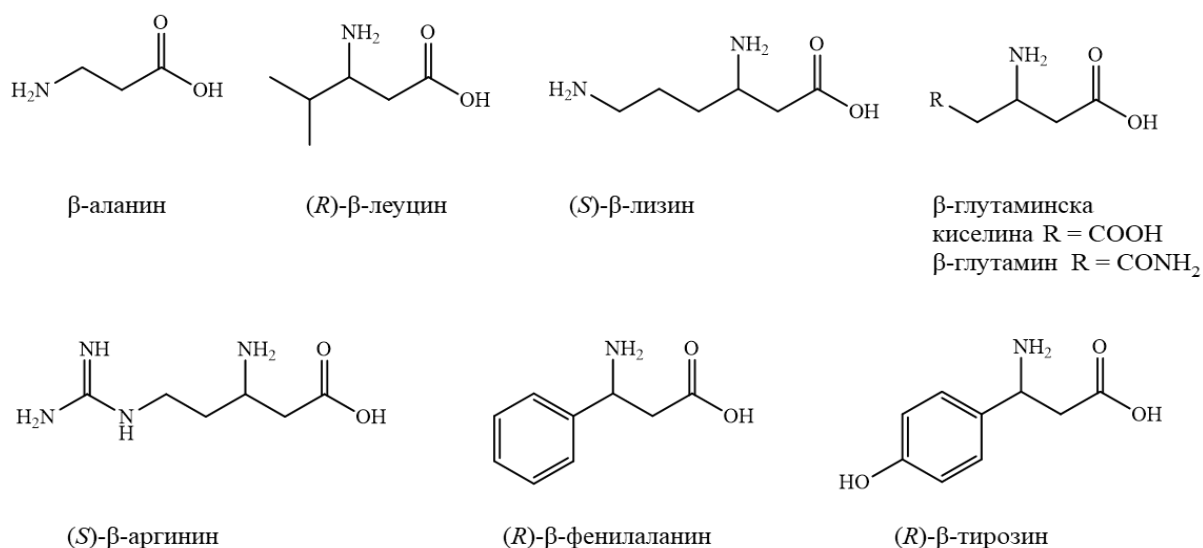


Слика 2. Хеликси које формирају  $\beta$ -пептиди

## 1.2. Биолошки значај $\beta$ -аминокиселина

За разлику од протеиногених  $\alpha$ -аминокиселина њихови  $\beta$ -аналози су мање заступљени у природи, али се могу наћи у великом броју живих организама, животиња, биљака и микроорганизама [3,16]. Заступљеност им није равномерна, тако да је до сада установљено да се само  $\beta$ -аланин и  $\beta$ -аминоизобутират налазе у свим организмима, јер су укључени у њихов примарни метаболизам [3]. Углавном чине градивне јединице сложенијих биолошки значајних молекула (пептида, алкалоида, лактона), док је слободна форма  $\beta$ -аминокиселина мање заступљена [3,17]. До сада је у слободној форми

или као део молекула у природи пронађено осам  $\beta$ -аминокиселина са остацима који одговарају протеиногеним аминокиселинама (Слика 3). Прва откривена  $\beta$ -аминокиселина,  $\beta$ -аланин је и најраспрострањенија аминокиселина и градивна јединица коензима А. Код сисара се може наћи и у слободној форми, јер се производи као интермедијер при катаболизму урацила [3]. Заступљеност и активност цикличних  $\beta$ -аминокиселина и њихових деривата повезана је са величином цикличног система [3,18]. Мањи молекули, три до четири члана, су веома ретки у природи и обично испољавају токсично дејство [3]. Антигљивично дејство је већим делом карактеристика петочланих и шесточланих цикличних  $\beta$ -аминокиселина [18]. Циклопентацин, циклична  $\beta$ -аминокиселина, се добро раствара у води и у *in vitro* условима показује значајну антигљивичну активност против врсте *Candida albicans* [17,18]. Хетероциклична  $\beta$ -аминокиселина (3-пролин карбоксилна киселина) постоји у два енантиомерна облика. Енантиомер *R* делује као селективни инхибитор  $\gamma$ -аминобутанске киселине (ГАБА), главног инхибиторног неуротрансмitera у централном нервном систему сисара [17].



Слика 3. Природне  $\beta$ -аминокиселине аналогне протеиногеним аминокиселинама

Интересовање за проучавање ових киселина је све веће првенствено због потенцијалног фармаколошког значаја, али и због њихове природне улоге. У фармацеутској употреби испитује се њихова антимикробна, антитуморска, хипогликемијска и инсектицидна својства [19]. Од посебног интереса у медицинској хемији је терапија пептидима или пептидомиметизима који садрже  $\beta$ -аминокиселине и могу бити идеална терапијска стратегија с обзиром на то да су  $\beta$ -аминокиселине довољно

сличне њиховим  $\alpha$  аналозима, али имају знатно боље фармакокинетичке карактеристике. Предност се огледа у повећаној биорасположивости и отпорности на деградацију која се може повезати са секундарном структуром  $\beta$ -пептида [20-22]. Пептидомиметици могу функционисати као антимикуробна једињења, али је показано да могу деловати и као инхибитори протеазома и инхибитори природне аминокиселине глицина [22].

### 1.3. Хемијске особине бакра

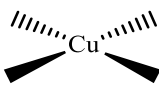
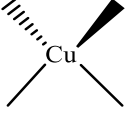
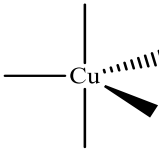
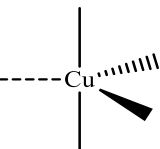
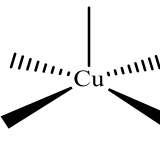
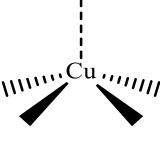
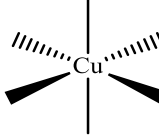
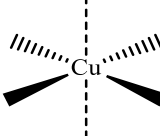
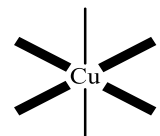
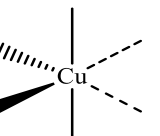
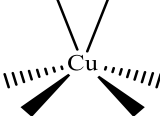
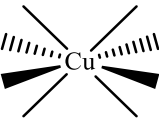
Бакар је 29. елемент у периодном систему елемената и припада групи прелазних метала [23]. Због једног неспареног електрона у  $s$ -орбитали сврстава се у IV групу (CAS, енгл. *Chemical Abstracts Service*) [24], односно 11. групу према новој класификацији (IUPAC, енгл. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) [25]. У једињењима се бакар најчешће налази у оксидационим стањима +1, +2 и +3, али су само бакар(II) једињења стабилна у воденим растворима [26]. Назив и симбол овог елемента изведени су од речи *aes cuprium* (касније Cuprum), а повезани су са снабдевањем Римљана бакром са Кипра. Одређене карактеристике бакра дате су у Табели 1 [23].

Табела 1. Опште карактеристике бакра

Карактеристике		Бакар
Општа својства	Симбол	Cu
	Атомски број	29
	Број природних изотопа	2
	Релативна атомска маса (u)	63,546
	Електронска конфигурација	[Ar] 3d <sup>10</sup> 4s <sup>1</sup>
Атомска својства	Електронегативност	1,9
	Метални радијус (pm)	128
	Ефективни јонски радијус (pm)	54 (3+), 73 (2+), 77 (1+)
	Енергија јонизације (kJ/mol)	745,3 (I), 1957,3 (II)
Физичка својства	Тачка топљења (°C)	1083
	Тачка кључања (°C)	2570
	Густина на 20°C (g/cm <sup>3</sup> )	8,95
	Електрична отпорност 20°C ( $\mu\text{ohm}\cdot\text{cm}$ )	1,673

Према Пирсоновој класификацији  $\text{Cu(I)}$ -јон ( $[\text{Ar}]3d^{10}$ ) је „меког” карактера и формира дијамагнетична, безбојна комплексна једињења са органским и неогранским лигандима који као донорске атоме садрже сумпор (цистеин, метионин),  $sp^2$  хибридизован азот (пиридински и хистидински системи), фосфор (терцијарни фосфини) [27,28]. Ови комплекси обично имају линеарну структуру (координациони број, КБ = 2), тригонално-планарну (КБ = 3) или тетраедарску (КБ = 4) [28]. Као прелазна тврдо-мека киселина,  $\text{Cu(II)}$ -јон има способност да се координује са лигандима различите дентатности и преко донорских атома са различитим тврдо/меким карактеристикама по Пирсоновој класификацији [29-31]. Комплекси које гради  $\text{Cu(II)}$ -јон ( $[\text{Ar}]3d^9$ ) су парамагнетични, плаве боје и разноврсне геометријске структуре (Табела 2) [28].

Табела 2. Геометријске структуре бакар(II) комплекса

Cu(II)	
КБ = 4	 <p>Правилна квадратно-планарна структура</p>  <p>Спљоштена тетраедарска структура</p>
КБ = 5	 <p>Правилна тригонално-бипирамидална структура</p>  <p>Дисторгована тригонално-бипирамидална структура</p>  <p>Правилна квадратно-пирамидална структура</p>  <p>Дисторгована квадратно-пирамидална структура</p>
КБ = 6	 <p>Правилна октаедарска структура</p>  <p>Издужена октаедарска структура</p>  <p>Спљоштена октаедарска структура</p>  <p>cis-дисторгована октаедарска структура</p>
КБ = 7	 <p>Хептакоординована структура</p>
КБ = 8	 <p>Октакоординована структура</p>

### 1.1.1. Комплексна једињења бакра(II) са аминокиселинама

Бакар(II)-јон може да награди комплексна једињења са различитим  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - или  $\delta$ -аминокиселинама које се најчешће понашају као бидентатни лиганди, али могу бити и монодентатни или тридентатни у зависности од R остатка. Због великог значаја које имају, највећи број синтетисаних и проучених комплекса бакра чине  $\alpha$ -аминокиселине. Бакар(II)-јон формира стабилне комплексе са аминокиселинама кроз хелатизацију, тако што најпре долази до стварања квадратно-планарних комплекса, а затим може доћи и до координовања са атомима из бочног ланца аминокиселине [32]. Обично један бакар(II)-јон везује два молекула аминокиселине тако што се координовање врши преко кисеоника из карбоксилних група и преко азота из амино група формирајући два геометријска изомера (*cis/trans*) (Слика 4) [32,33].

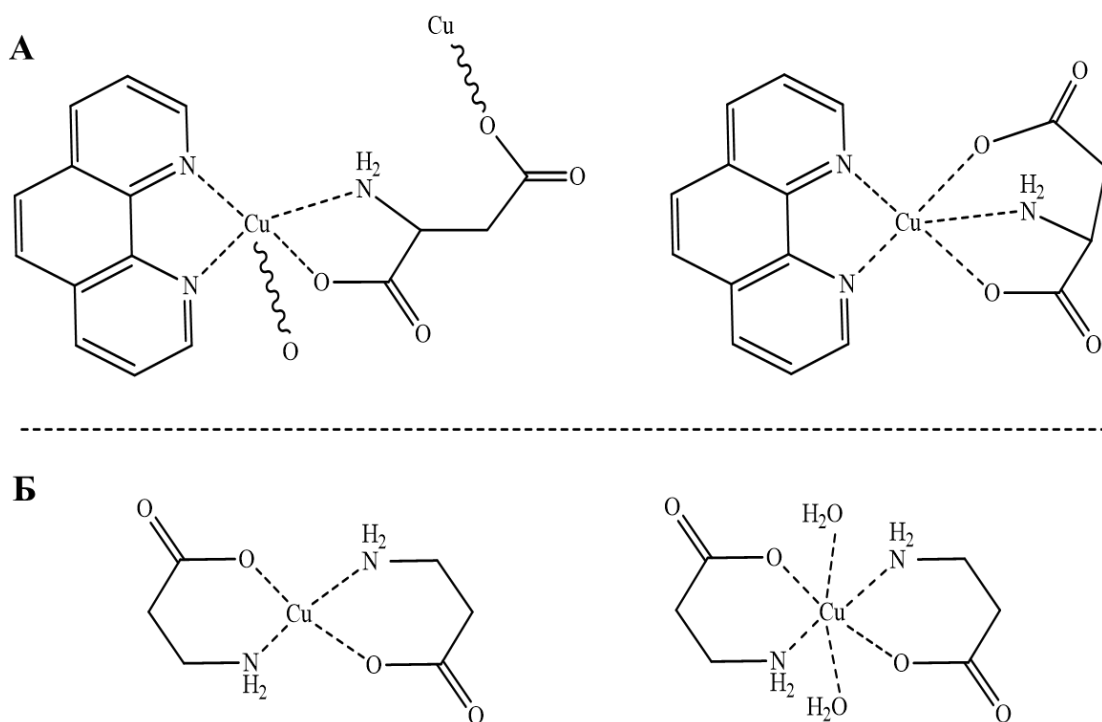


Слика 4. Геометријски изомери бакар(II)-комплекса са аминокиселинама

Синтеза великог броја комплексних једињења захтева потребу за развојем метода њихове карактеризације, од којих су неке елементална микроанализа, инфрацрвена спектроскопија (IR), електронска-парамагнетна-резонанција (EPR), рендгенска структурна анализа. Упоредивањем IR спектра некоординованих аминокиселина и њихових очекиваних комплекса може се са великом сигурношћу установити да ли је дошло до координовања. Апсорпционе траке које потичу од протонване амино групе лиганда јављају се на око  $2900\text{ cm}^{-1}$ , док се асиметричне валенционе вибрације примарне амино групе јављају на око  $3300\text{ cm}^{-1}$  у спектру комплекса. Траке некоординованих карбоксилних група присутне су на  $1750\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ . При координовању депротонваних карбоксилних група појављују се траке на  $1650\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  [33,34]. EPR је спектроскопска метода која на основу детекције неспарених електрона пружа информацију о структури и начину успостављања хемијских веза у једињењу са парамагнетним особинама. Изглед EPR спектра и вредност g параметра могу да укажу на геометријску структуру комплекса [35,36]. Рендгенска дифракциона анализа је једна од најпоузданијих метода за одређивање структуре и начина координовања. Овом методом је окарактерисана структура великог броја комплекса са аминокиселинама с почетком још од средине XX



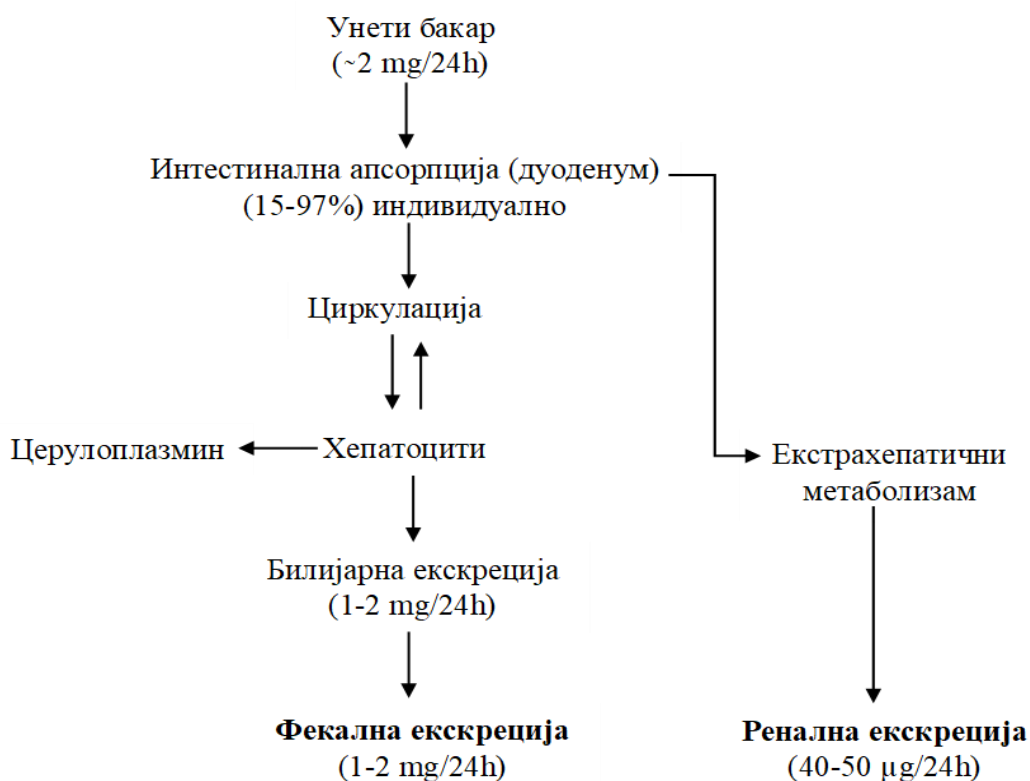
века до данас [32]. Установљено је да се аланин понаша као бидентатни лиганд и координовање остварује преко атома кисеоника и атома азота из функционалних група, са могућношћу формирања *cis* и *trans* геометријских изомера [37]. Аспарагинска киселина се може класификовати и као  $\alpha$  и као  $\beta$ -аминокиселина. Због присуства још једне карбоксилне групе понаша се и као тридентатни лиганд. Пронађене су две различите пентакоординоване кристалне структуре бакар(II)-јона и аспарагинске киселине. У мономеру је аспарагинска киселина тридентатни лиганд, док се у полимеру преко кисеоника из карбоксилне групе бочног ланца координује за други бакар(II)-јон (Слика 5А) [38]. Најједноставнија  $\beta$ -аминокиселина,  $\beta$ -аланин координује се бидентатно за бакар(II)-јон формирајући *trans* изомер квадратно-планарне геометријске структуре [39] или *trans* изомер октаедарске структуре у којој два молекула аминокиселине чине основу, док су аксијално координовани молекули воде [40] (Слика 5Б). Различит начин координовања једне аминокиселине забележен је и на примеру  $\gamma$ -аминобутанске киселине. У једној структури две аминокиселине повезују два бакар(II)-јона *trans* двоструким премошћавањем формирајући бесконачан једнодимензиони ланац, док се друга структура састоји из бесконачних дводимензионих мрежа [41].



Слика 5. Координовање аспарагинске киселине (А) и  $\beta$ -аланина (Б) са бакар(II)-јоном

#### 1.4. Биолошки значај бакра

Просечан унос бакра код одраслих особа варира од 0,6 до 1,6 mg дневно, а извори су углавном орашаста плодови, махунарке, шкољке, јетра [42]. Из гастроинтестиналног тракта, највећим делом из дуоденума, апсорбује се око 60% унетог бакра, који се у циркулацији везује за албумине и транспортује до јетре, а затим везан за церулоплазмин до периферних ткива [43]. Само 10 до 15% бакра у жучи се ресорбује, а вишак се највећим делом излучује билијарном екскрецијом (Схема 2) [42,44]. Хомеостатски механизми регулишу све процесе од уноса метала до његове елиминације како би се спречила свака неуравнотеженост у концентрацији [44-46]. Количина бакра у организму износи 80 до 120 mg [47,48] и у највећем проценту је везан за протеине, док слободног има у просеку мање од једног атома по ћелији [49].



*Схема 2. Апсорпција, дистрибуција и елиминација унетог бакра*

И поред микрозаступљености у организму, утврђено је да бакар има веома важну улогу у биохемијским процесима како код бактеријских, тако и код ћелија еукариота. При физиолошким условима лако прелази из редукованог Cu(I) у оксидовани Cu(II)

облик који је и више заступљен у биолошким системима. Редокс активан бакар у ћелијама еукариота делује као кофактор за бројне ензиме који су потребни за одржавање хомеостазе организма. Ензими зависни од овог метала учествују у енергетском метаболизму, синтези везивног ткива, синтези катехоламина, заштити организма од слободних радикала (Табела 3) [42,50].

**Табела 3.** Ензими за чије функционисање је потребан редокс активан бакар

Бакар	Ензими	Функција
$\text{Cu}^+ \rightarrow \text{Cu}^{2+}$	Лизин оксидаза	Унакрсно повезивање колагена и еластина
	Cu/Zn супероксид дизмутаза	Детоксификација слободних радикала
	Васкуларни аденозни протеин 1	Оксидативна конверзија амина у алдехиде
	Церулоплазмин	$\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$
	Допамин- $\beta$ -хидроксилаза	Синтеза неуротрансмитера, конверзија допамина у норадреналин
	Цитохром оксидаза	Пренос електрона
	Семикарбазид-сензитивна аминоксидаза	Адхезија леукоцита на ендотелне ћелије
	Тирозиназа	Синтеза меланома
	Метионин синтетаза	Конверзија хомоцистеина у метионин

#### 1.4.1. Дисбаланс концентрације бакра у организму

Повишена или снижена концентрација бакра у организму примећена је код различитих болести и метаболичких поремећаја. Ниже вредности од референтних су пронађене код Менкесове и Паркинсонове болести, обољења која су праћена губитком протеина, као и код поремећаја у интестиналној апсорпцији и при примени парентералне исхране. Вилсонову болест, различите запаљенске процесе, карциноме, цирозу јетре и холестазе прати повишена концентрација бакра. Забележене су повишене серумске концентрације и код трудница и код особа које користе хормонске контрацептиве [51].

Посебна пажња је усмерена на проучавање генетски условљеног поремећаја у хомеостазе овог метала [52]. Менкесова болест је најтежи облик дефицита бакра која

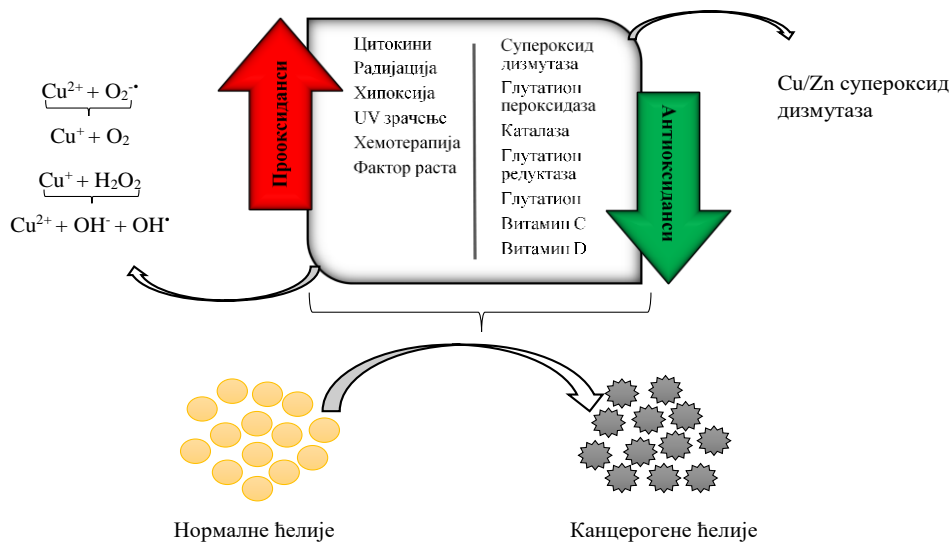
настаје услед генетских поремећаја на X хромозому, односно мутације на АТР7А гену који је одговоран за активност АТП-азе, интрацелуларне пумпе која транспортује бакар до Голџијевог апарата. Код болесника је забележено значајно смањење апсорпције бакра из гастроинтестиналног тракта [52,53]. Клиничке манифестације су изузетно тешке, праћене неуролошким оштећењима, поремећајима у расту и развоју, хипотонијом, хипотермијом, као и поремећајима у функционисању бакар-зависних ензима [51,52]. Најчешће долази до смрти у раном неонаталном периоду, док су симптоми који се јаве касније у детињству мање озбиљни [52]. Терапијски приступ подразумева субкутану и интравенску примену суплемената који садрже бакар [54,55]. Вилсонова болест је генетски условљено обољење које се преноси аутозомно-рецесивно. Настаје услед дефекта на АТР7Б гену на хромозому број 13 који као последицу има поремећај у везивању јона бакра за транспортне протеине, церулоплазмин и немогућности да се бакар излучи путем жучи у дигестивне органе [56,57]. Акумулирају се велике количине бакра у јетри и мозгу, али и у другим органима. Клиничке манифестације укључују менталне промене, различите моторне абнормалности, фулминативну инсуфицијенцију јетре, бубрежну дисфункцију, хомолитичку анемију [56-58]. Лек избора у терапији Вилсонове болести је пенициламин који везујући бакар омогућава његово излучивање [57-60]. Међутим, озбиљна нежељена дејства овог лека довела су до развоја алтернативних хелатора [56] и нових терапијских стратегија [61].

#### 1.4.2. Повезаност бакра и карцинома

Због редокс активности, бакар се може повезати са повећаном производњом слободних радикала и реактивних врста кисеоника ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$ ) који услед неравнотеже са антиоксидансима могу довести до оксидативног стреса [62,63]. Присуство реактивних једињења у дужем временском периоду доводи до оштећења ћелија. Иницијација и напредовање карцинома повезани су са мутацијом или оштећењем ДНК која настају услед оксидативног стреса и хроничног запаљења [64,65].

Међутим, резултати истраживања која повезују бакар и настанак карцинома су опречна. Код мишева који су у периоду од две године били изложени води за пиће која је садржала бакар(II)-сулфат у концентрацији од 20  $\mu M$ , није забележена повећана инциденца карцинома [66]. Ако се узму у обзир хомеостатски механизми регулације нивоа бакра у организму, потребно је при оваквим истраживањима пратити и серумску концентрацију бакра [44-46]. Недостатак бакра се манифестује супресијом коштане

сржи и анемијом [67,68], али је забележен и настанак вешеструких интестиналних неоплазми код мишева чија исхрана није садржала овај метал у задовољавајућој количини [69]. Свакако при тумачењу ових резултата треба сагледати и значај бакра при активности одређених ензима (Cu/Zn супероксид дизмутаза) [70] и имунолошког система [71] (Слика 6).



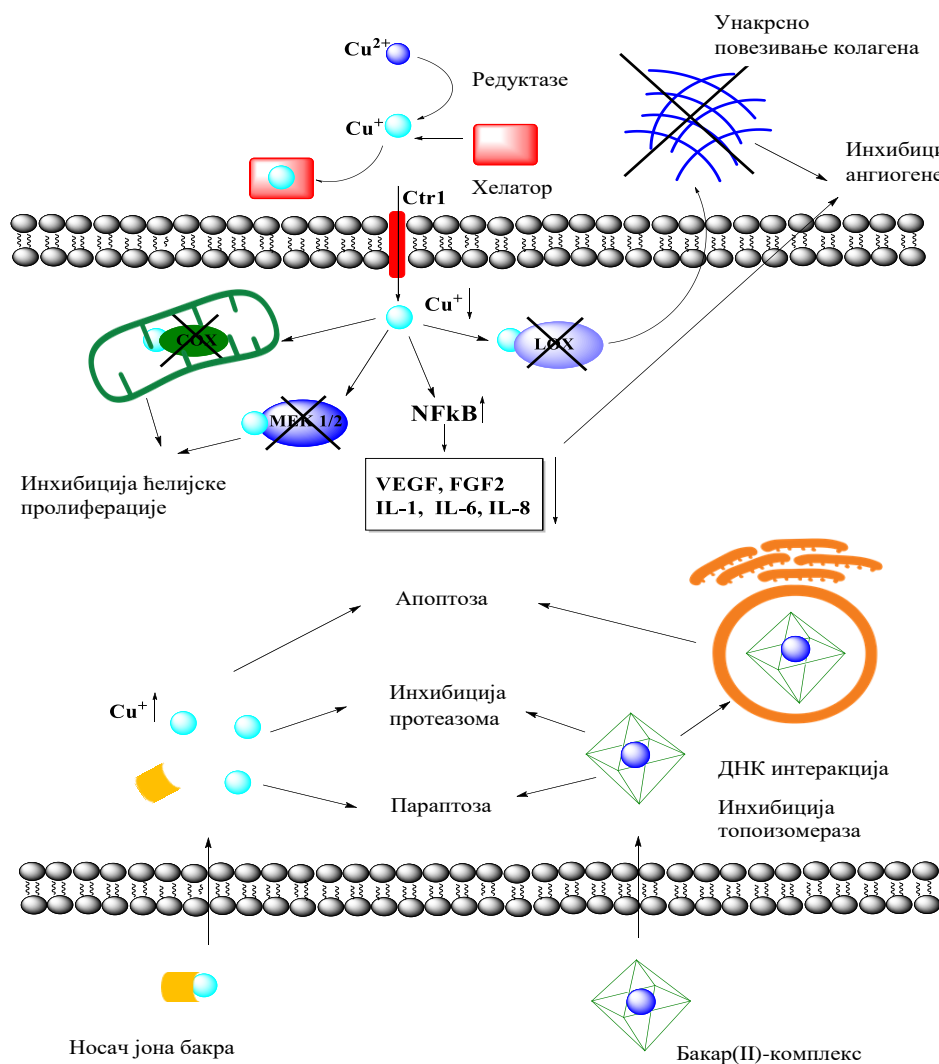
Слика 6. Могућа улога бакра у развоју карцинома

Мерење нивоа бакра у серуму особа оболелих од различитих врста карцинома може послужити као потенцијални биомаркер, с обзиром на то су забележене повећане серумске концентрације у лимфомима, сквамозном карциному, карциному плућа, леукемији, карциному дојке. Механизми који доводе до повећања ове концентрације нису познати [72]. До прогресије и раста карцинома више од 1-2 mm у пречнику долази услед активације стимулационих фактора ангиогенезе (васкуларни ендотелни фактор раста (VEGF), фактор основног раста фибробласта, трансформишући фактор раста, цитокини) и њихове доминације у односу на инхибиторе (ангиостатин, ендостатин) [73,74]. И поред потврђених редокс активности и улоге у каскадној активацији слободних радикала, није потврђено да бакар може бити иницијатор развоја карцинома, али се показало да бакар има веома важну улогу у процесима ангиогенезе и бржем расту карцинома [75,76]. Метастаза карцинома се такође може повезати са повишеним концентрацијама бакра због његове значајне улоге у ангиогенези, која је основни предуслов метастатског потенцијала карцинома [77]. Међутим, бакар је неопходан и за активацију лизин оксидазе која је важна у синтези колагена и еластина и доприноси

расту и ширењу карцинома [78,79]. Показало се да је инактивација овог ензима потенцијални приступ у сузбијању метастаза карцинома [80].

### 1.4.3. Улога бакра у лечењу карцинома

Улога бакра у ангиогенези, повишена концентрација јона бакра у серуму и туморском ткиву оболелих особа, значај у активацији антиоксидативних ензима и имуног система и откриће комплексних једињења као потенцијалних хемиотерапеутика довели су до развоја троструког терапијског приступа (Слика 7) [81].



**Ctr1**-бакарни транспортер 1, **COX**-цитохром c оксидаза, **MEK ½**-митоген-активирана протеин киназа, **LOX**-лизин оксидаза, **NFkB**-нуклеарни фактор, **VEGF**-васкуларни ендотелни фактор раста, **FGF2**-фибробласни фактор раста, **IL**-интерлеукин

Слика 7. Терапијски приступ у лечењу карцинома [81]

Примена хелатора у смањењу концентрације бакра развијена је у циљу лечења Вилсонове болести, али се испитује и њихов утицај на контролу ангиогенезе и у спречавању раста и метастаза карцинома. Смањење интрацелуларне концентрације бакра утиче на функционисање ензима и концентрацију компоненти имуног система што заједно доводи до инхибиције ћелијске пролиферације, спречавање унакрсног повезивања колагена и инхибиције ангиогенезе [81,82] (Слика 7). Изазвани тумори мозга код зечева били су мањи, ограничени и слабо васкуларизовани у групи чија исхрана није имала довољне количине бакра и групи зечева на третману хелатором, пенициламином [83]. У мезотелиалним туморима мишева старости од шест до осам недеља мерен је ниво бакра атомском апсорпционом спектрофотометријом. Највеће концентрације су забележене у раном стадијуму развоја болести. Примена хелатора, пенициламина (2000  $\mu\text{g}$ ), триентина (700  $\mu\text{g}$ ) и тетратиомолибдата (500  $\mu\text{g}$ ) започета је при величини тумора од 20 до 25  $\text{mm}^2$  и бележи смањење концентрације бакра уз успоравање раста мезотелиома [84]. Значајни резултати претклиничких истраживања подстакли су клиничку примену хелатора код пацијената са метастатским карциномима различитог типа. Пацијенти са раним метастазама су имали позитиван исход примене тетратиомолибдата, али код пацијената са узнатредовалим метастазама резултат није био охрабрујућ [85].

Јонофоре имају улогу транспорта одређеног јона метала у ћелију услед чега долази до повећања његове биорасположивости. Механизми којима ова терапијска стратегија доводи до смрти канцерогене ћелије нису потпуно разјашњени, али се сматра да може доћи до инактивације протеазома или повећане концентрације слободних радикала и реактивних врста кисеоника (Слика 7) [81,86]. Дисулфирамин је јонофора која може да повећа концентрацију јона бакра у ћелијама карцинома. Његова првобитна клиничка примена је била у лечењу алкохолизма, али је управо при овој индикацији установљен и антиканцерогени потенцијал и започето детаљније клиничко проучавање [81].

Међу различитим синтетисаним комплексним једињењима бакра [87] велики број је антитуморску активност остварио интеракцијом са молекулима ДНК, инхибицијом протеазома и инхибицијом топоизомераза (Слика 7). Комплекси овог јона метала могу довести до повећане производње реактивних врста кисеоника, слободних радикала, параптозе и апоптозе туморске ћелије [81,87].

### 1.5. Механизам дејства антитуморске активности бакар(II)-комплекса

Комплекси бабра имају шири спектар дејства и нижу токсичност од комплекса платине, што може да сугерише да је њихов механизам дејства другачији од комплекса платине који се ковалентно везују за ДНК. Сматра се да су циљни путеви бакар(II)-комплекса који доводе до оштећења туморских ћелија првенствено ДНК молекула, али и топоизомеразе и протеазом (Схема 3) [87].

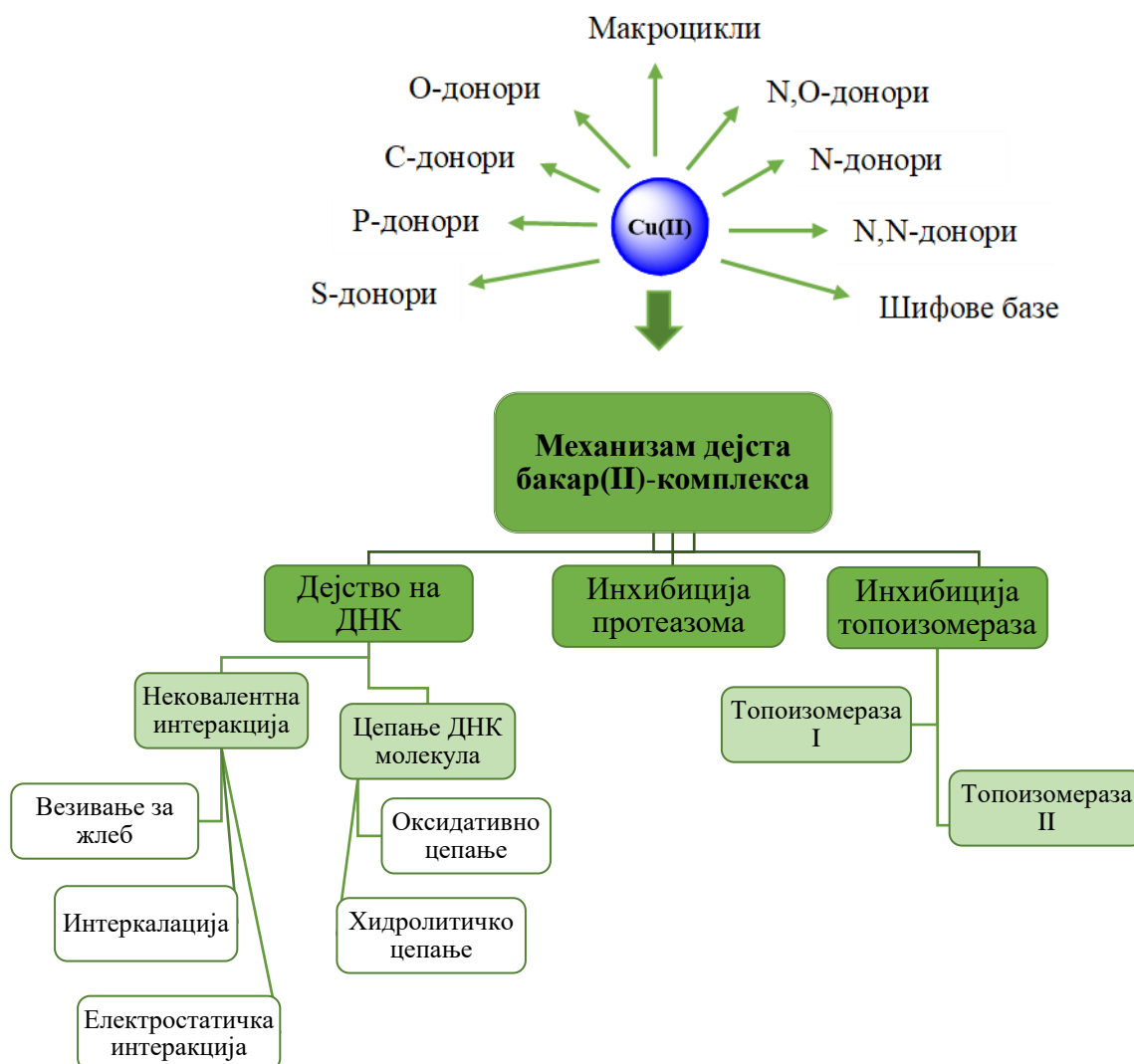


Схема 3. Механизам дејства бакар(II)-комплекса

Могућност интеракције једињења бабра и ДНК показана је кристалном структуром у којој се види да је бакар(II)-хлорид интераговао са молекулом ДНК, јер је дошло до везивања бабра за остатке гуанина на положају N7 [88]. За неке класе комплекса бабра установљени су и документовани начини интеракције са ДНК и сви су нековалентног

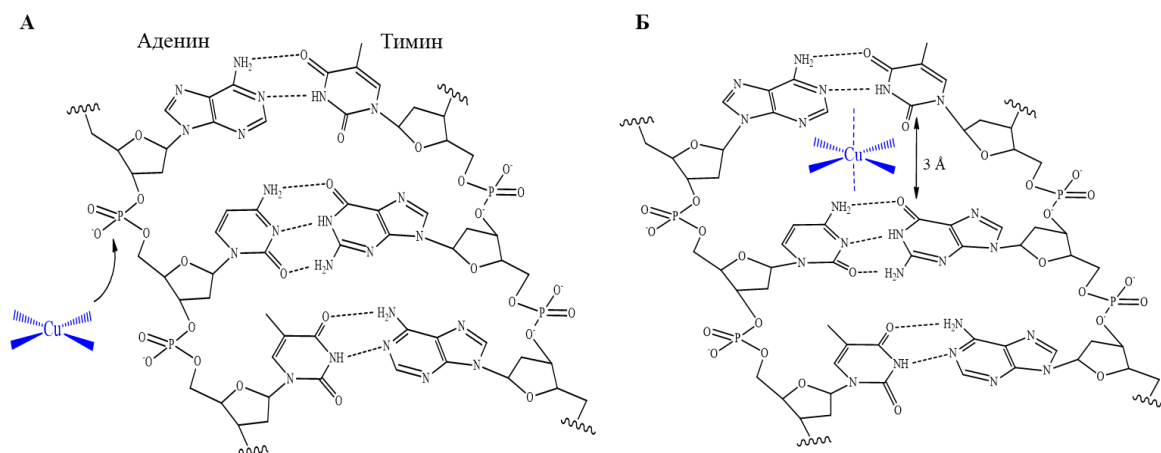


типа. У одређивању начина везивања физичко-хемијске карактеристике (планарност, хидрофобност, величина комплекса, геометријска структура) играју веома важну улогу [89-93].

Између два комплементарна ланца ДНК молекула поред парова база налазе се удубљења (жлебови) која су погодна места за везивање протеина и малих молекула [92]. Разликује се велики (главни) жлеб ширине 22 Å и мали жлеб ширине 12 Å [94]. Интеракција молекула и ДНК обавља се преко базних парова (G-C) у главном и (A-T) малом жлебу. Углавном мали молекули, лекови при везивању за ДНК, преферирају интеракцију са малим жлебом, док се протеини и олигоелементи везују преко великог жлеба [89,92]. Селективност при избору места интеракције јавља се услед разлике у хемијским својствима, варијацијама у електростатичком потенцијалу, степенима хидратације, стерним ефектима [92]. Лекови који на овај начин интерагују са ДНК обично имају карактеристичан облик полумесеца и изграђени су од неколико ароматичних хетероциклуса. Торзионе слободе унутар прстенастих система омогућавају молекулу да се прилагоди конформацији малог жлеба [89,92]. Непосредно пре везивања лека идентификују се погодне, специфичне секвенце ДНК молекула које заузимају распон од 16 до 18 базних парова [89]. Због већег електростатичког потенцијала и мањих стерних сметњи избор за интеракцију су А-Т секвенце. Интеракција се одвија формирањем водоничних веза између лека и А-Т базних парова [89,92], која се додатно стабилизује Ван дер Валсовим (Van der Waals) интеракцијама [92].

Интеркалацији, уметању комплексног молекула између суседних база ДНК, боље подлежу комплекси планарне геометријске структуре. Класични интеркалатори су планарни, ароматични катјони који имају могућност уметања под правим углом у двоструки хеликс [89-92]. Површина ових молекула је око 28 Å [91]. При овој интеракцији може доћи до продужетка ДНК молекула за око 3 Å. Иако степен оштећења зависи од места интеракције, промене настале интеркалацијом су теже за ћелије у пролиферацији. Ово доприноси селективнијем деловању према канцерогеним ћелијама [89]. Потврђено је да је фосфат као део деоксирибозе специфична локација за приближавање комплекса (Слика 8А), а недавна истраживања показују да бакар(II)-комплекси бирају тимин-аденин-тимин секвенцу за почетак интеркалације. Процес се састоји од размицања суседних база и уметања комплексног једињења по аксијалним положајима (Слика 8Б) [95]. Главну улогу у одржању стабилности интеракције интеркалатора и ДНК молекула имају хидрофобне интеракције између ароматичних

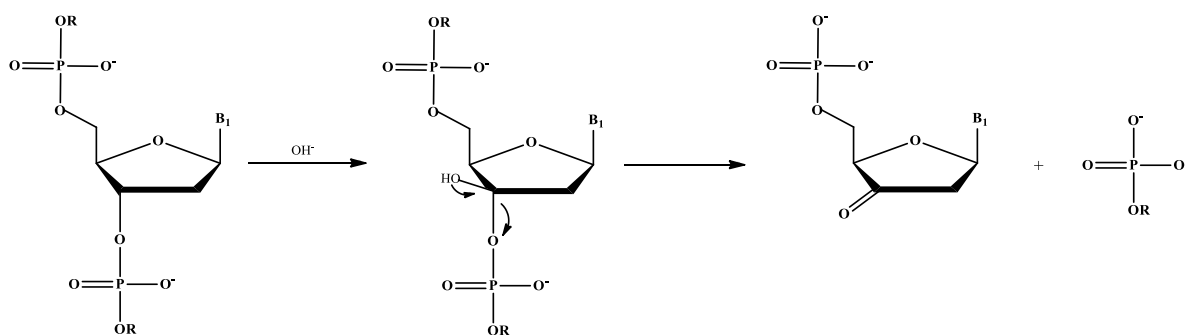
система лека и базних парова, али и електростатичке и водоничне везе доприносе стабилности [92].



Слика 8. (А и Б) Интеркалација бакар(II)-комплекса са молекулом ДНК

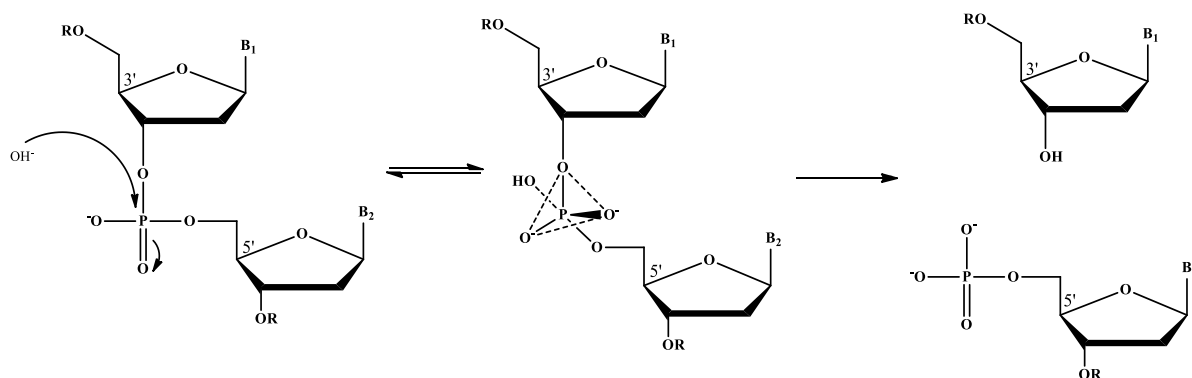
Електростатичке интеракције лека и ДНК молекула су углавном неспецифичне и дешавају се дуж спољашње стране ДНК хеликса. Овај вид интеракције може се јавити код металних катјона који помажу стабилизацији конформације ДНК. Органски катјони који се везују за жлеб или интеркалирају могу иницијално бити укључени у електростатичку интеракцију са негативно наелектрисаном фосфорном групом [90,92].

У неким ситуацијама бакар(II)-комплекси преузимају улогу хемијске нуклеазе и кроз оксидацију и хидролизу доводе до оштећења ДНК молекула. Оксидативно цепање укључује оксидацију деоксирибозе и оксидацију нуклеобаза и најчешће је фотоиндуковано или под дејством слободних радикала, односно реактивних кисеоничних врста [87,89]. Није селективан процес, већ може обухватити и угљенохидратне сегменте и нуклеинску основу. Обично се оксидација врши на С3' деоксирибозе (Слика 9) или је на нивоу нуклеобаза мета гуанин, због нижег оксидационог потенцијала [89].



Слика 9. Оксидативно оштећење молекула ДНК

При хидролитичком оштећењу молекула ДНК долази до цепања фосфодиестарских веза и раздвајања сегмената у присуству воде. Овај механизам је убрзан катализатором, односно јоном метала који може активирати напад нуклеофила ( $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^-$ ) [87,89]. Сматра се да при хидролизи нуклеофил напада фосфатни део при чему се формира координативни систем ( $\text{КБ} = 5$ ) у коме затим долази до одвајања  $5'\text{PO}$  или чешће  $3'\text{PO}$  дела (Слика 10) [89].



Слика 10. Хидролитичко оштећење молекула ДНК

Протеазоми су протеински комплекси који се налазе у једру и цитоплазми еукариотских ћелија и врше разградњу сувишних и оштећених протеина разлагањем њихових пептидних веза. Пре него што се изврши деградација, циљани протеин се обележава малим протеином, убиквитином, како би тако обележен био препознат од стране протеазома и разграђен у његовом активном месту [96]. Протеазом се састоји од активног центра у коме се налазе пептидазе и два регулаторна молекула, капе које се налазе на крајевима и регулишу улазак протеина [97]. Протеазом представља део значајног механизма који регулише концентрацију протеина у ћелији. Активност овог система је укључена у многе ћелијске функције и од примарног је значаја за раст и метастазу карцинома. Канцерогене ћелије су осетљивије на инхибицију протеазома од нормалних ћелија што омогућава повољну стратегију у антиканцерогеној терапији и потенцијал у развоју нових лекова [98,99].

Антитуморско дејство бакар(II)-комплекси остварују и инхибицијом топоизомераза I и II [87], ензима који су неопходни за процес репликације ДНК. Топоизомераза I прекида један ланац двоструког хеликса, долази до релаксације и на крају до повезивања одвојеног дела ланца ДНК, док топоизомераза II прекида оба ланца, које након релаксације повезује [99,100]. Због значаја који имају у процесу репликације

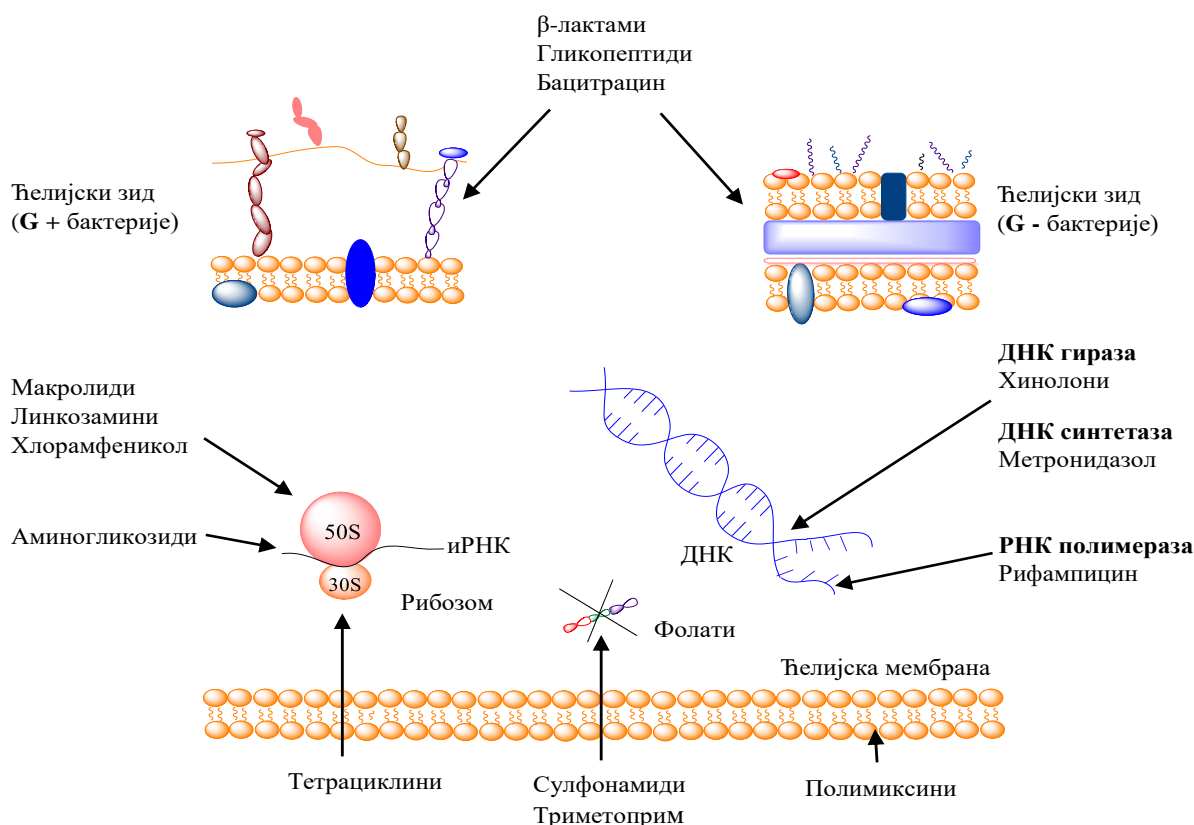
и транскрипције, нуклеарне топоизомеразе су важни циљеви у хемиотерапији рака и представљају значајан терапијски приступ [99].

У зависности од врсте оштећења и немогућности сепарације истог у туморској ћелији се могу активирати сигнални путеви апоптозе, односно може доћи до ћелијске смрти. Сам процес апоптозе је контролисан, ограничен на појединачне ћелије и није праћен запаљењем за разлику од некрозе [101]. Иницијалну фазу у апоптози могу имати спољашњи или унутрашњи фактори који доводе до оштећења ћелије, супстанце које се везују и активирају рецепторе на ћелијској мембрани или на једру или одсуство фактора раста, цитокина и хормона који су потребни за преживљавање. Најзначајнији мембрански рецептори у активацији апоптозе су рецептори за цитокин, фактор некрозе тумора [101-103]. У фази контроле и интеграције долази до покретања процеса ћелијске смрти или до блокирања и одлагања ћелијске смрти. Уколико се не одложи ћелијска смрт, активирају се ензими који регулишу функцију митохондрија које постају пропустљивије услед чега долази до ослобађања цитохрома *c* и покретања апоптозе. Различити механизми настанка апоптозе завршавају се активацијом протолитичких ензима, каспаза, који разлажу ћелијске компоненте и формирају се апоптотска тела која се уклањају процесом фагоцитозе [101].

Многе класе комплекса бакра су синтетисане и *in vitro* проучене, са циљем да се развије потенцијални лек, али је само мали број доспео у претклиничка испитивања [87]. Истраживања за сада показују да антитуморска својства комплекса бакра углавном зависе од природе лиганата и дозорских атома, али се испитују и разлике у активности комплекса бакра(I) и бакра(II). Установљено је да се координовање бакра са лигандима најчешће остварује преко дозорских атома O, N, S и P. Значајну цитотоксичну активност показали су комплекси бакар(II)-јона који као лиганде садрже полидентатне Шифове базе, петочлане ароматичне хетероцикле (имидазол, пиразол, триазол) или шесточлане ароматичне хетероцикле (бипиридин-*bipy*) и терцијарне фосфине [28,87]. Већи потенцијал од *цисплатине* постигли су бинуклеарни комплекси бакра који се везују за два суседна фосфата на ДНК молекулу и доводе до инхибиције синтезе ДНК и смрти туморских ћелија различитог типа [87].

### 1.6. Антимикробна активност

Живе организме, изазиваче инфекција, можемо поделити према ћелијским карактеристикама на прокариоте и еукариоте. Ћелије прокариотских организама не садрже једро за разлику од ћелија еукариота. У поређењу са осталим изазивачима болести бактерије проузрокују највећи број инфекција [104]. Класификација бактерија на Грам-позитивне и Грам-негативне заснована је на њиховом различитом реаговању у присуству специфичних комбинација боја које је последица другачије грађе ћелијског зида [104,105]. Грам-позитивне бактерије имају ћелијски зид једноставније структуре, од 15 до 50 nm дебљине, који се највећим делом састоји од пептидогликана (око 50%) и киселих полимера (40-45%), док протеина и полисахарида има од 5 до 10%. Ћелијски зид Грам-негативних бактерија је знатно сложеније структуре. Спољашњи део плазматске мембране окружује периплазматски простор, тањи пептидогликански слој и спољашња мембрана на чијој се површини налазе сложени полисахариди [104] (Слика 11).

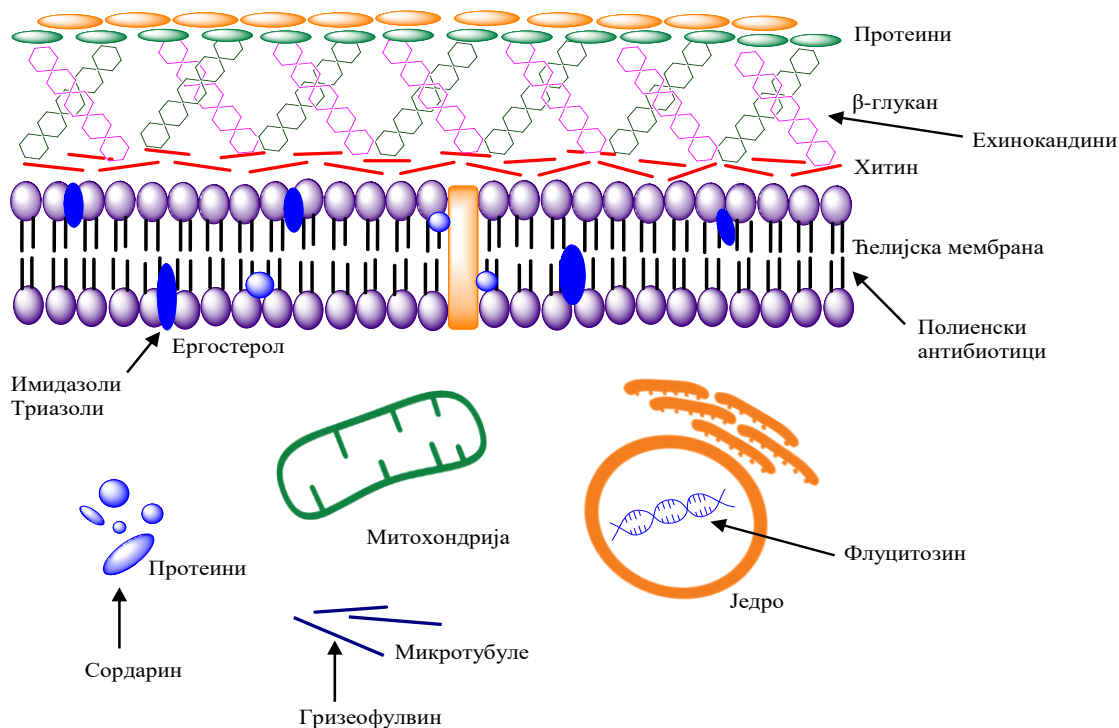


Слика 11. Механизам дејства антибиотика

Након открића антибиотика у ужем смислу, хемијских једињења која стварају живи организми и који и при малим концентрацијама заустављају животне процесе у микроорганизмима, постигнути су значајни успеси у лечењу великог броја инфекција. Ови лекови могу да утичу на раст бактерије (бактериостатици) или могу да убијају бактерије (бактерициди). Антибиотици у ужем смислу и синтетисани антимикиробни лекови своје дејство могу остварити утицајем на различите компоненте бактеријске ћелије (Слика 11) [99].

Антибиотици из групе  $\beta$ -лактама (пеницилини, цефалоспорини, монобактами и карбапенеми) своје дејство испољавају спречавајући синтезу пептидогликана у ћелијском зиду бактерије. Они инхибирају транспептидни ензим који унакрсно повезује пептидне ланце на основну структуру пептидогликана, а финални догађај је инактивација инхибитора аутолитичких ензима у ћелијском зиду, односно бактерицидно дејство [99,104]. Бацитрацин и гликопептидни антибиотици такође инхибирају синтезу ћелијског зида, али се механизам дејства разликује од  $\beta$ -лактама [99]. Инхибиција синтезе протеина у бактеријској ћелији се остварује преко инактивације једне од подјединица рибозома. Тетрациклини своје бактериостатско дејство остварују везивањем за 30S субјединице рибозома, док се макролидни антибиотици, линкозамински антибиотици и хлорамфеникол везују за 50S субјединице [99,105]. Аминогликозиди такође инхибирају синтезу бактеријских протеина, али тако што ометају везивање информационе РНК за рибозоме. Иако нису антибиотици у ужем смислу те речи, јер се добијају синтетским путем, сулфонамиди су веома значајни бактериостатици. Своје дејство остварују тако што инхибирају дихидроптероат синтетазу, спречавајући тако синтезу фолне киселине у бактеријској ћелији, која није у могућности да користи егзогену фолну киселину као хумане ћелије. Триметоприм такође спречава синтезу фолне киселине, али инхибицијом дихидрофолат редуктазе. Хинолони, синтетски антимикиробни лекови, инхибирајући ДНК гиразу делују бактерицидно. Циљно место дејства за полимиксине је ћелијска мембрана, док рифампицин блокира синтезу РНК у бактеријској ћелији [99].

Гљивичне инфекције, микозе, се могу поделити на површинске и системске гљивичне инфекције. Антигљивични лекови своје фунгистатско или фунгицидно дејство најчешће испољавају утицајем на синтезу нуклеинских киселина, синтезу ергостерола, синтезу ћелијског зида или дејством на ћелијску мембрану (Слика 12) [99,104,105].



Слика 12. Потенцијална места дејства антигљивичних лекова

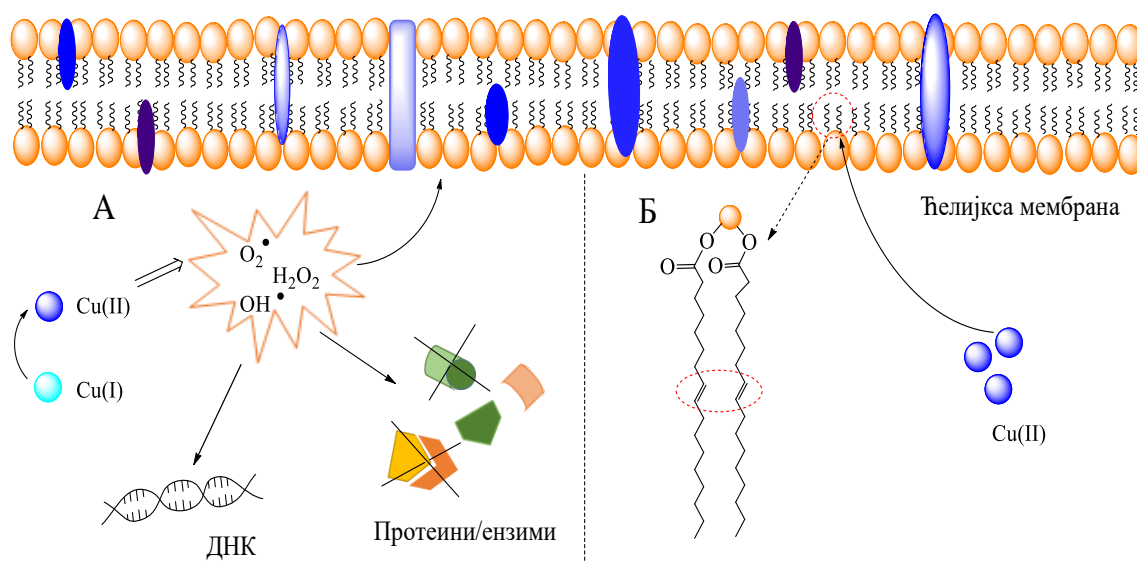
Амфотерицин Б и нистатин су полиенски антибиотици који се везују за стеролне остатке у ћелијској мембрани гљива што доводи до промена пермеабилности и транспортних функција мембране. Ехинокандини инхибирају синтезу 1,3- $\beta$ -глюкана услед чега ћелија гљиве губи интегритет. Флуцитозин је синтетски антигљивични лек који се интрацелуларно преводи у активну форму, 5-флуороурацил, инхибитор ензима тимидилат синтазе. Синтезу ергостерола који је потребан за интегритет мембране ометају лекови из групе имидазола и триазола [104], док сордарин инхибира елонгациони фактор 2, неопходног за синтезу протеина [104,106]. Гризеофулвин је антибиотик који се везује за аднексе коже и кератин којим се гљиве хране и на тај начин уносе. Када доспе у ћелију везује се за микротубуле и ремети његову функцију [99,104].

Повећање броја гљивичних и бактеријских инфекција и све чешћа појава резистенције бактерија на антибиотике, као последица њихове повећане и нерационалне примене, довели су до потребе за развојем нових антимикробних агенаса [104].

### 1.6.1. Антимикробно дејство бакар(II)-јона и бакар(II)-комплекса

Јони различитих метала могу испољити токсичан ефекат на микроорганизме. Механизам којим доводе до антимикробног дејства углавном зависи од врсте метала и обухвата дисфункцију протеина, производњу реактивних врста кисеоника, оштећење ћелијске мембране, интеракцију са хранљивим материјама микроорганизма и генотоксичност [107]. До повећања концентрације бакар(II)-јона може доћи услед поремећаја механизма регулације који одржавају хомеостазу [108]. Токсична концентрација бакар(II)-јона доводи до стварања реактивних врста кисеоника, односно изазива оксидативни стрес који ремети функционисање протеина, оштећује ћелијску мембрану и ДНК молекула (Слика 13А). Сматра се да јони бакра катализују Фентонску реакцију или катализују настанак хидроксилних радикала [109]. Бактерије и квасци који су изложени повишеним концентрацијама јона бакра повећавају регулацију гена који су укључени у процес елиминације слободних радикала и реактивних једињења [103,104]. Протеини микроорганизма су значајна мета за дејство бакра, вероватно везивањем за цистеин, што може довести до стварања протеин дисулфида и смањења антиоксидативних резерви, посебно глутатиона. Истраживања показују да се интегритет ћелијске мембране озбиљно може нарушити токсичним дејством јона метала, али се не може са сигурношћу рећи да овакво оштећење може да доведе до смрти ћелије. Бакар(II)-јон испољава токсично дејство пероксидацијом липида ћелијске мембране бактерија и квасаца и тако доприноси антимикробном дејству (Слика 13Б). Биохемијски механизми липидне пероксидације дефинисани су за мембране еукариота које садрже висок проценат полинезасићених масних киселина, док су мембране бактерија изграђене од мононезасићених масних киселина. Због тога се не може сматрати да је овај начин дејства јона довољан да делује микробицидно [107].





Слика 13. Механизам антимикуробног дејство бакар(II)-јона

Липофилна комплексна једињења лакше пролазе кроз ћелијски зид бактерија. Хелатизацијом се повећава липофилност што доприноси повећању антимикуробног дејства [110]. Комплексна једињења која садрже лиганде са N и O као доносним атомима остварују антибактеријски ефекат инхибицијом ензимске активности [111], а антимикуробном ефекту доприноси и постојање хидроксилних група [112]. Биолошка активност се остварује формирањем водоничних веза између доносних атома комплексних једињења са активним центрима различитих ћелијских компоненти при чему се ремете нормални процеси у бактеријској ћелији [110,113]. Употреба антибиотика као лиганата при комплексирању са јонима метала може довести до повећања антимикуробне активности уз смањење резистенције [114]. Комплекси са хетероцикличним Шифовим базама могу бити значајни антимикуробни агенси. Одликују се стабилношћу и липофилношћу која се повећава услед делокализације  $\pi$ -електрона у хелатном прстену [113,115].



## **2. ХИПОТЕЗЕ И ЦИЉЕВИ**

На основу досадашњих сазнања постављене су следеће радне хипотезе истраживања:

- Реакцијом синтетисаних  $\beta$ -аминокиселина и бакар(II)-нитрата наглађена су комплексна једињења чији састав и структуру потврђују резултати елементалне микроанализе, инфрацрвене спектроскопије, електронско-парамагнетне-резонанције и рендгенске структурне анализе.
- При физиолошким условима долази до интеракције синтетисаних комплекса са молекулима СТ-ДНК (енгл. *calf thymus*) и НТ-ДНК (енгл. *herring tests*).
- Комплекси бакара(II) са  $\beta$ -аминокиселинама показују одређену антимикуробну и антитуморску активност.

Како би се испитала тачност наведених хипотеза дефинисани су следећи циљеви истраживања:

- Синтеза  $\beta$ -аминокиселина (2-(1-аминоциклохексил)сирћетне киселине – **Л1** и 2-(1-амино-4-(*tert*-бутил)циклохексил)сирћетне киселине – **Л2**) и одговарајућих комплекса бакара(II) са лигандима **Л1** и **Л2**.
- Структуре синтетисаних лиганата потврдити на основу инфрацрвене и нуклеарно-магнетно-резонантне спектроскопије.
- Структуре синтетисаних комплексних једињења претпоставити на основу резултата елементалне микроанализе, инфрацрвене спектроскопије и електронско-парамагнетне-резонанције.
- Структуре комплексних једињења потврдити на основу резултата рендгенске структурне анализе, ако за то постоји могућност.
- Могућност интеракције новосинтетисаних комплекса са молекулима СТ-ДНК и НТ-ДНК утврдити на основу кинетичких мерења, апсорпционо спектроскопских мерења, флуоресцентних мерења и мерења вискозитета ДНК раствора.
- Испитати потенцијалну биолошку активност (антимикуробну и антитуморску) комплекса бакара(II) са  $\beta$ -аминокиселинама.



# **3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД**

### 3.1. Синтеза лиганада

Бидентатни лиганди,  $\beta$ -аминокиселине (2-(1-аминоциклохексил)сирћетна киселина – **Л1** и 2-(1-амино-4-(*tert*-бутил)циклохексил)сирћетна киселина – **Л2**), добијени су реакцијом циклохексанона (за **Л1**) или 4-*tert*-бутилциклохексанона (за **Л2**), малонске киселине и амонијум-ацетата у молском односу 1:1:1. Како би се уклонио угљен-диоксид, смеша циклохексанона (1 mol) или деривата циклохексанона (1 mol), малонске киселине (114,4 g) и амонијум-ацетата (177,1 g) у бутанолау (600 mL) рефлуктована је у периоду од 1,5h до 3h. Дестилацијом су уклоњена испарљива једињења чија је температура кључања до 135°C. Реакциона смеша је разблажена бутанолом (300 mL), а затим је поновљена дестилација у вакууму под притиском од 10 до 20 mmHg и температуром до тачке кључања дестилата (128-130°C). Добијено вискозно уље је охлађено до 20°C, третирано ацетоном (700 mL) уз мешање и остављено да одстоји најмање 10h. Синтетисане аминокиселине су одвојене филтрирањем, испиране ацетоном и сушене на 100°C. Поступак синтезе лиганада вршен је према публикованој процедури [6].

#### 2-(1-аминоциклохексил)сирћетна киселина – **Л1**

**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3424, 2945, 2166, 1619, 1570, 1492, 1467, 1383, 1266, 1200, 1133, 1060, 946, 899, 764, 717, 603.  **$^1\text{H NMR}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 1,25-1,47 (m, 6H, 3 $\text{CH}_2$ ), 1,47-1,58 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ), 2,09 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 42,5 (C-), 48,0 ( $\text{CH}_2$ - од сирћетне киселине); 41,2; 21,9; 22,6 ( $\text{CH}_2$ - од циклохексил групе); 177,3 (COOH).

#### 2-(1-амино-4-(*tert*-бутил)циклохексил)сирћетна киселина – **Л2**

**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3433, 2954, 2153, 1639, 1583, 1506, 1466, 1395, 1364, 1336, 1262, 1173, 1055, 950, 901, 764, 714, 623.  **$^1\text{H NMR}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 2,41 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,52-1,75 (m, 8H, 4 $\text{CH}_2$ ), 1,41 (s, H, CH), 0,49 (m, 9H, 3 $\text{CH}_3$ ).  **$^{13}\text{C NMR}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 42,8 (C- од циклохексил групе), 48,0 ( $\text{CH}_2$ - од сирћетне киселине); 20,7; 39,6 ( $\text{CH}_2$ - од циклохексил групе); 32,5 (CH- од циклохексил групе); 27,6 ( $\text{CH}_3$ - од *tert*-бутил групе); 177,3 (COOH).

### 3.2. Синтеза комплексних једињења

Комплекс бакра(II) са 2-(1-аминоциклохексил)сирћетном киселином – **K1** и комплекс бакра(II) са 2-(1-амино-4-(*tert*-бутил)циклохексил)сирћетном киселином – **K2** синтетисани су директном реакцијом бакар(II)-нитрата трихидрата, β-аминокиселине (**L1** или **L2**) и литијум-хидроксида у стехиометријском молском односу 1:2:2.

#### 3.2.1. Поступак синтезе комплекса бакра(II) са **L1** лигандом, 2-(1-аминоциклохексил)сирћетном киселином

Бакар(II)-нитрат трихидрат (0,1000 g, 0,4139 mmol) растворен је у дестилованој води (10 mL). Овом раствору је постепено додата β-аминокиселина (**L1** (0,1301 g, 0,8278 mmol)). Реакциона смеша је загревана на воденом купатилу уз мешање током 3h. Током овог периода је у малим количинама додавано 10 mL раствора литијум-хидроксида (0,0199 g, 0,8278 mmol). Раствор је затим филтриран и упарен до мале запремине, при чему је дошло до издвајања плавих кристала.

Принос: 0,1256 g (80,75%); **K1** =  $\text{CuC}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$  ( $M_r = 375,95$ ).

Изрaчунато: C, 51,12%; H, 7,51%; N, 7,45%. Нађено: C, 51,27%; H, 7,42%; N, 7,42%.

**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3375, 3293, 3243, 2933, 2865, 1576, 1408, 1375, 1198, 1139, 1065, 957, 804, 730, 678.

#### 3.2.2. Поступак синтезе комплекса бакра(II) са **L2** лигандом, 2-(1-амино-4-(*tert*-бутил)циклохексил)сирћетном киселином

Бакар(II)-нитрат трихидрат (0,1000 g, 0,4139 mmol) растворен је у дестилованој води (10 mL). Овом раствору је постепено додата β-аминокиселина (**L2** (0,1766 g, 0,8278 mmol)). Реакциона смеша је загревана на воденом купатилу уз мешање током 3h. Током овог периода је у малим количинама додавано 10 mL раствора литијум-хидроксида (0,0199 g, 0,8278 mmol). Раствор је затим филтриран и упарен до мале запремине. Добијени талог комплекса одвојен је цеђењем, испиран дестилованом водом и сушен на ваздуху.

Принос: 0,1581 g (78,24%); **K2** =  $\text{CuC}_{24}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_4$  ( $M_r = 488,16$ ).

Изрaчунато: C, 59,05%; H, 9,08%; N, 5,74%. Нађено: C, 58,98%; H, 9,01%; N, 5,69%.

**IR** (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3369, 3297, 3239, 2949, 2866, 1577, 1448, 1429, 1408, 1326, 1209, 1176, 1121, 1109, 993, 973, 959, 900, 733, 680.

### 3.3. Инструментална мерења

#### 3.3.1. Елементална микроанализа

Елементална микроанализа урађена је на Хемијском факултету Универзитета у Београду на апарату *Vario III C, H, N, S Elemental Analyzer* у *CHS* моду.

#### 3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија

Снимање инфрацрвених спектра лиганата и комплекса урађено је на спектрофотометру *Perkin-Elmer FTIR 31725X* применом технике KBr пилуле на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу.

#### 3.3.3. Нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија

Снимање нуклеарно-магнетно-резонантних спектра ( $^1\text{H}$  NMR и  $^{13}\text{C}$  NMR) лиганата је спроведено помоћу спектрофотометра *Varian Gemini-200 NMR* на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу. За растварање лиганата се користи  $\text{CDCl}_3$ , а хемијска померања су утврђена у односу на стандард тетраметилсилан (TMS).

#### 3.3.4. Електронска-парамагнетна-резонанција

Спектри електронско-парамагнетне-резонанције (9,8 GHz) снимљени су на Физичком факултету Универзитета у Београду употребом *Bruker Elexsys II 540 EPR* спектрофотометра. Снимање је спроведено на собној температури, микроталасној снази од 6,325 mW, амплитуди модулације од 5 G, фреквенци модулације од 100 kHz и времену конверзије од 240 ms. Узорци (30  $\mu\text{l}$ , 0,5 mM) су припремљени растварањем комплекса у дејонизованој води (18 M $\Omega$ ). Спектри су снимљени и анализирани помоћу *Bruker Xepc* софтвера.

### 3.3.5. Рендгенска структурна анализа

Кристал (**K1**) погодан за рендгенску структурну анализу добијен је спором кристаллизацијом из воденог раствора испаравањем при собној температури у лабораторији за Фармацију, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Рендгенска структурна анализа кристала је извршена анализом X-зрака на Институту за хемију, Универзитета Р. Ј. Šafárik у Кошицама, Словачка.

Кристална структура **K1** утврђена је на *Oxford Diffraction Xcalibur2* дифрактометру који је опремљен детектором *Sapphire2 CCD* и користи графитну монохроматску МоКа радијацију ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ). *Crysalis CCD* [116] је коришћен за прикупљање података, док је *Crysalis RED* [116] коришћен за прецизирање ћелија, редукцију података и корекцију апсорпције. Структура је решена помоћу *SUPERFLIP* [117], док је *Fourier* синтеза урађена коришћењем *SHELXL2013* [118] и имплементирана у програму *WinGX* [119]. Анизотропски дислокацијски параметри су прочишћени за све атоме, осим водоникових. Анализа растојања и углова везе извршена је помоћу *SHELXL2013*. *DIAMOND* [120] је коришћен за молекуларну графику.

Комплекс **K1** кристалише у просторној групи  $P2_1/c$  моноклиничног кристалног система. Како би се одредили параметри јединичне ћелије употребљено је 4854 измерених рефлексија у области  $3,218^\circ < \Theta < 26,498^\circ$ . Преглед резимеа рендгенске дифракције и пречишћавање структуре за **K1** дат је у Табели 4.

Табела 4. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре *K1*

Емпиријска формула	$C_{16}H_{40}CuN_2O_{10}$	Кристална величина ( $\text{mm}^3$ )	0,1791·0,1594·0,1009
Молекулска маса (g/mol)	484,04	Запремина ( $\text{\AA}^3$ )	1081,95(12)
Температура (К)	173(2)	Густина ( $\text{mg/m}^3$ ) (израчунато)	1,486
Таласна дужина ( $\text{\AA}$ )	0,71073	Независне рефлексије	2243 [ $R(\text{int}) = 0,0197$ ]
Јединична ћелија <i>a</i> ( $\text{\AA}$ )	12,5128(8)	Фактори слагања $F^2$	$R_1 = 0,0319$ , $wR_2 = 0,0844$
Јединична ћелија <i>b</i> ( $\text{\AA}$ )/ $\beta$ ( $^\circ$ )	7,5423(3) / 115,544(7)	Финални <b>R</b> индекси	$R_1 = 0,0399$ , $wR_2 = 0,0885$
Јединична ћелија <i>c</i> ( $\text{\AA}$ )	12,7063(7)	Метода побољшања	Пуна матрица најмањих квадрата на $F^2$
<b>F</b>	518	Подаци/ограничења/ параметри	2243 / 0 / 133



### 3.4. Испитивање стабилности комплексних једињења

Стабилност комплексних једињења је испитивана на Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу. Оба комплекса (**K1** и **K2**) су растворена у води, 10% раствору DMSO и у раствору PBS пуфера, тако да је концентрација сваког раствора била  $1 \cdot 10^{-4}$  М. Стабилност комплекса **K1** и **K2** мерена је у временским интервалима од 0, 24 и 48h на UV-Vis спектрофотометру.

### 3.5. Интеракције синтетисаних комплекса са ДНК

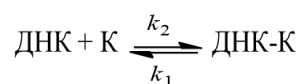
Интеракција комплексних једињења (**K1** и **K2**) са молекулом ДНК испитана је на Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

#### 3.5.1. Припрема реагенаса

СТ-ДНК, НТ-ДНК и етидијум бромид (EtBr) су набављени од *Sigma Chemicals Co.* (САД). Њихови раствори су припремљени коришћењем редестиловане воде. За подешавање рН вредности раствора ДНК на 7,2 употребљен је 0,01 М фосфатни пуфер (*Sigma Aldrich*). Истим пуфером су растворени комплекси (**K1** и **K2**) и направљени су  $1 \cdot 10^{-4}$  М раствори. Раствор ДНК није садржао протеине што потврђује однос апсорбанце између 1,8 и 1,9 ( $A_{260}/A_{280}$ ) на 260 nm и 280 nm. Концентрација раствора ДНК је одређена помоћу UV-Vis апсорбције на 260 nm ( $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Припремљени раствори су чувани на 277 К и коришћени у року од 5 дана.

#### 3.5.2. Кинетичка мерења

Механизам и кинетика супституционих реакција комплексних једињења (**K1** и **K2**) са молекулима СТ-ДНК и НТ-ДНК испитана је на *Stopped-flow* спектрофотометру (*Applied Photophysics*) у PBS (Фосфатни пуфер = 0,0100 М,  $c(\text{NaCl}) = 0,1370$  М,  $c(\text{KCl}) = 0,0027$  М). Реакције супституције комплекса са СТ-ДНК и НТ-ДНК могу бити представљене реверзибилном хемијском реакцијом 1.



### Хемијска реакција 1.

Са К су означени **K1** или **K2**, ДНК је СТ-ДНК или НТ-ДНК,  $k_2$  је константа брзине другог реда за директну реакцију, која карактерише формирање производа, а  $k_1$  је константа брзине повратне реакције.

Све реакције су рачунате као реакције *pseudo*-првог реда на температури од 310 К и радној таласној дужини од  $\lambda = 260$  nm. Супституционе реакције започеле су када су се исте запремине раствора комплекса и ДНК из одвојених шприцева брзо помешале у комори *Stopped-flow* спектрофотометра. Температура оба погонска шприца, ћелија и комора за мешање одржавана је на 310 К. Како би се обезбедили услови реакције *pseudo*-првог реда концентрација ДНК је била најмање 10 пута већа у односу на концентрацију комплекса. Константа брзине *pseudo*-првог реда,  $k_{\text{obsd}}$ , одређена је праћењем промене апсорбције раствора  $A_t$  са временом  $t$  на одређеној таласној дужини, на основу Једначине 1 [121].

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

### Једначина 1.

Зависност  $\ln(A_t - A_\infty)$  од времена  $t$  је линеарна, тако да се из нагиба праве добија вредност за  $k_{\text{obsd}}$ . Величина  $A_\infty$  представља апсорбцију након „бесконечно” дугог временског интервала (обично после 8-10 полувремена реакције). Добијене константе представљају просечну вредност од четири до шест независних кинетичких мерења. Сва израчунавања извршена су помоћу компјутерског програма *Microsoft Excell 2010* и *OriginPro 8*.

### 3.5.3. Апсорпциона спектроскопска мерења

Интеракција комплекса (**K1** и **K2**) са ДНК одређена је на основу вредности константе везивања ( $K_b$ ) добијене помоћу UV-Vis спектrophотометрије. UV-Vis спекри су снимани на Perkin Elmer Lamda 35 или 25 double-beam спектrophотометру опремљеним са термостатираном кварцном Suprasil киветом (1,00 cm, 3 mL). Апсорпциона мерења су вршена у фосфатном пуферу (0,01 M, pH = 7,2). Серија раствора комплекс-ДНК је припремљена мешањем раствора комплекса константне концентрације (8  $\mu$ M) са инкрементима ДНК полазног раствора (1,25 mM). Како би се квантитативно упоредила јачина везивања комплекса, вредности константе везивања ( $K_b$ ) су одређене праћењем промена у апсорпцији на MLCT опсегу при повећању концентрације СТ-ДНК и НТ-ДНК помоћу једначине 2 [122].

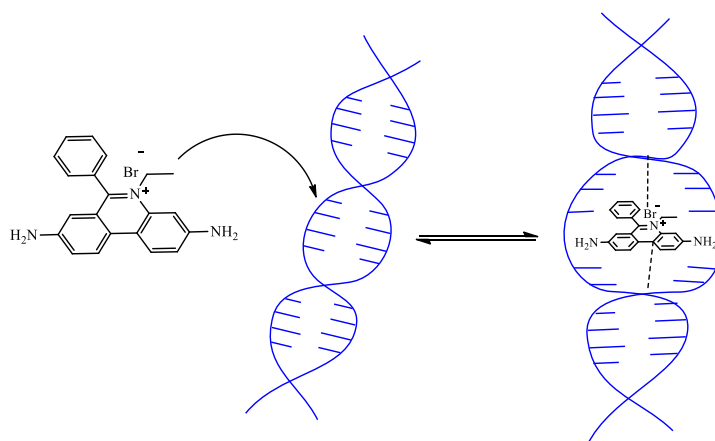
$$[\text{ДНК}]/(\epsilon_A - \epsilon_f) = [\text{ДНК}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)]$$

*Једначина 2.*

Вредност константе  $K_b$  одређује се из односа нагиба и одсечка праве зависности  $[\text{ДНК}]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$  од  $[\text{ДНК}]$ , где је  $\epsilon_A = A_{\text{obsd}}/[\text{комплекс}]$ ,  $\epsilon_f$  је коефицијент екстинкције за слободан комплекс и  $\epsilon_b$  је коефицијент екстинкције за комплекс у потпуно везаном облику.

### 3.5.4. Флуоресцентна мерења

Интеракција комплекса са СТ-ДНК и НТ-ДНК испитана је и на основу флуоресцентне спектроскопије. Флуоресцентна мерења су урађена на RF-1501 PC спектrophлуориметру (Shimadzu, Japan) у опсегу од 550 до 750 nm (527 nm). Ширина ексцитационог и емисионог прореза (10 nm) и брзина снимања су константне за све експерименте. Интензитет флуоресценције је мерен на таласној дужини ексцитације (527 nm), а флуоресцентне емисије на 612 nm. У циљу додатног утврђивања способности везивања комплекса за ДНК испитиване су интеракције комплекса са ДНК у присуству EtBr. Овај планарни, катјонски молекул врши јаку интеркалацију између суседних база ДНК молекула [123] (Слика 14) што доводи до емисије интензивне флуоресценције на око 600 nm.



Слика 14. Комплекс етидијум бромида и молекула ДНК

Јачина флуоресценције се може смањити након додавања другог молекула који би могао заменити EtBr у комплексу са ДНК или разградити секундарну структуру ДНК. Раствор ДНК-EtBr комплекса се припрема мешањем 50  $\mu\text{M}$  EtBr и 50  $\mu\text{M}$  ДНК, а затим се конкурентност испитује додатком раствора синтетисаних комплексних једињења ( $\text{pH} = 7,2$ ). Снимањем промене флуоресцентног емисионог спектра испитани су ефекти везивања комплекса за ДНК након додавања раствора комплекса (0-80  $\mu\text{M}$ ) у раствор ДНК-EtBr и периода инкубације од 5 минута.

Релативно везивање комплекса са СТ-ДНК и НТ-ДНК одређено је израчунавањем Стерн-Волмерове (Stern-Volmer) константне ( $K_{sv}$ ) из нагиба правих линија добијених из Стерн-Волмерове једначине (Једначина 3) [124].

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[Q]$$

Једначина 3.

$I_0/I$  представља интензитет емисије у одсуству и присуству комплекса (**K1** и **K2**),  $[Q]$  је укупна концентрација комплекса, а  $K_{sv}$  је Стерн-Волмерова константа која се добија из нагиба праве зависности  $I_0/I$  према  $[Q]$ .

Вредности константе везивања  $K_{bin}$  и број везујућих места ( $n$ ) су израчунате из Scatchard графика применом Scatchard једначине (Једначина 4) [124].

$$\log(I_0-I)/I = \log K_{bin} + n \log [Q]$$

Једначина 4.

Број везујућих места ( $n$ ) и константе везивања ( $K_{bin}$ ) израчунати су из зависности  $\log(I_0-I)/I$  од  $\log[Q]$ .

### 3.5.5. Мерење вискозитета

Одређивањем вискозитета ДНК раствора у присуству различитих концентрација комплексних једињења може се установити да ли је дошло до промене дужине молекула ДНК. На основу вредности вискозитета одређује се тип интеракције комплекс-ДНК молекул. Вискозност ДНК раствора је мерена у присуству растуће концентрације комплекса (**K1** и **K2**). За сваки узорак је три пута мерено време протока дигиталном штоперицом, а затим је израчуната просечна вредност. Подаци су представљени као зависност  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  од  $c$ , где је  $\eta$  вискозност ДНК у присуству комплекса, а  $\eta_0$  је вискозитет само ДНК у пуферском раствору. Вредности вискозности израчунате су из разлике добијеног времена протока раствора ДНК и комплекса ( $t$ ) и времена протока само пуфера ( $t_0$ ) (Једначина 5) [125].

$$\eta = (t - t_0)/t_0.$$

*Једначина 5.*

## 3.6. Антитуморска активност

Антитуморска активност синтетисаних комплекса испитана је у Центру за молекулску медицину и испитивање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

### 3.6.1. Припремање раствора испитиваних једињења и реагенаса

Растварањем синтетисаних комплекса (**K1** и **K2**) у 10% диметилсулфоксиду (DMSO) направљени су раствори концентрације 10 mM. Раствори су филтрирани кроз *Millipore* филтер чији је промер отвора 0,22 mm, а непосредно пре употребе су разблажени хранљивим медијумом. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-бромид) је растворен (5 mg/mL) у раствору фосфатног пуфера (pH = 7,2) и филтриран кроз *Millipore* филтер (0,22 mm) пре употребе. Сви реагенси су набављени од *Sigma Aldrich*, Минхен, Немачка.

### 3.6.2. Ћелијска култура

Потенцијална антитуморска активност комплекса (**K1** и **K2**) испитана је на мишјим ћелијским линијама *in vitro* методом. У истраживању су коришћене ћелије карцинома колона (СТ26), карцинома дојке (4Т1) и карцинома плућа (LLC1) које су култивисане у DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*, Sigma Aldrich, Минхен, Немачка) са додатком 10% феталног говеђег серума (FBS, Sigma Aldrich, Минхен, Немачка), пеницилина (100 IU/mL) и стрептомицина (100 µg/mL) у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> и на температури од 37°C. Субконфлуентни монослојеви, у фази раста, су прикупљени кратким третирањем са 0,25% трипсином и 0,02% EDTA (етилендиаминтетрасирћетна киселина) у раствору PBS пуфера (енгл. *Phosphate Buffered Saline*, PAA Laboratories GmbH), а након тога испирани три пута у серуму без фосфатног пуферског система. Број виталних ћелија је одређиван методом искључивања након примене трипан плавог. Боја трипан плаво не пролази неоштећену ћелијску мембрану, тако да се живе ћелије не боје, док се мртве ћелије боје плаво (Слика 15).

### 3.6.3. Цитотоксични тестови

#### 3.6.3.1. MTT – тест

Број и варијабилност туморских ћелија након примене раствора комплексних једињења одређен је колориметријским MTT тестом [126]. Смањење варијабилности може бити последица апоптозе или некрозе ћелија.

Поступак теста: Митохондријални ензими дехидрогеназе у метаболички активним ћелијама редукују жуто обојену со тетразолијум бромида до љубичастог формазана (Слика 15). Интрацелуларно локализовани кристали формазана се растварају и квантификују спектрофотометријски. Интензитет боје се мери на *ELISA* читачу (*Zenyth 3100*, *Anthos Labtec Instruments*) читавањем на таласној дужини од 595 nm.

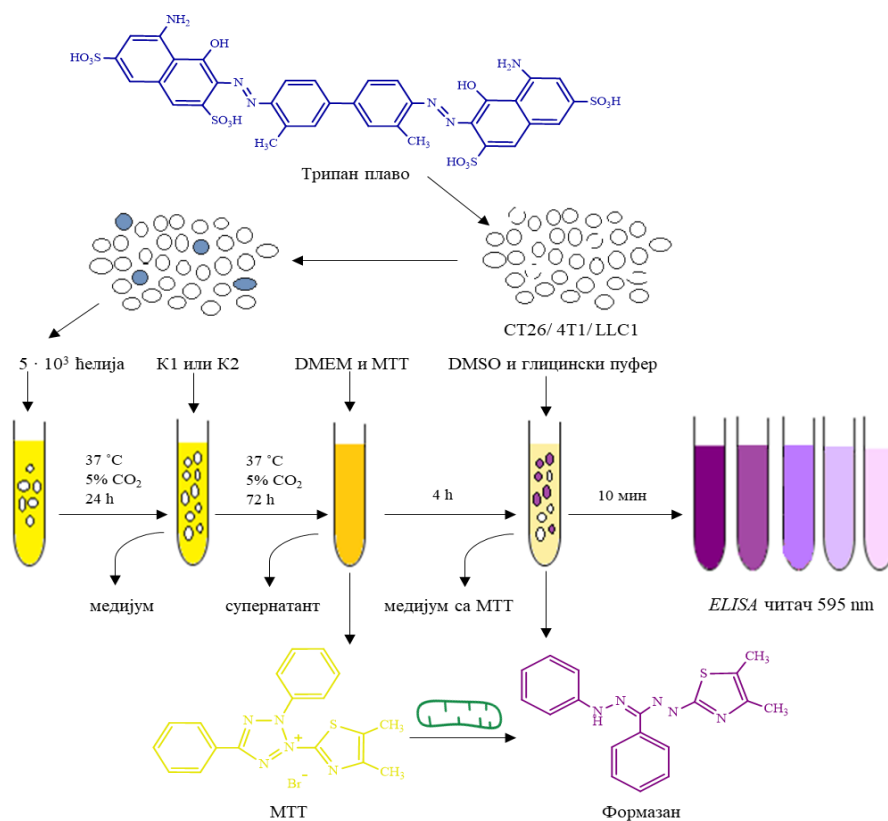
Ћелијске културе су разблажене медијумом до концентрације од  $5 \cdot 10^4$  ћелија/mL. У микротитар плоче са 96 бунарића сипано је по 100 µL, тако да је у бунару било по  $5 \cdot 10^3$  ћелија. Како би се одредила оптичка густина медијума (бленк) у посебне отворе је сипан медијум без ћелија. Након периода инкубације на 37°C у 5% CO<sub>2</sub>, медијум је одливен и замењен са 100 µL раствора испитиваних комплекса (**K1** или **K2**). Серијом двоструких разблажења добијени су раствори комплексних једињења (**K1** или **K2**) чија

је концентрација била од 1000  $\mu\text{M}$  до 7,8  $\mu\text{M}$  у трипликату. Ћелије се инкубирају током 72h (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Супернатант се затим уклања и у сваки бунар додаје 100  $\mu\text{L}$  DMEM са 15% раствором МТТ (5 mg/mL у PBS, 10  $\mu\text{L}$ ). После 4h уклања се и медијум са МТТ и додаје DMSO (150  $\mu\text{L}$ ) са глицинским пуфером (20  $\mu\text{L}$ ) и мућка око 10 минута како би се растворили кристали формазана (Слика 15). Апсорбанца се читава у периоду од 30 минута. Вредности апсорбанце третираних ћелија се упоређују са вредностима апсорбанце нетретираних ћелија на основу чега је израчунато смањење или повећање вијабилности ћелија као последица дејства комплекса (**K1** или **K2**). Процент цитотоксичности је израчунат према Једначини 6.

$$\text{цитотоксичност}\% = 100 - (\text{Е}-\text{Б})/(\text{С}-\text{Б}) \cdot 100$$

*Једначина 6.*

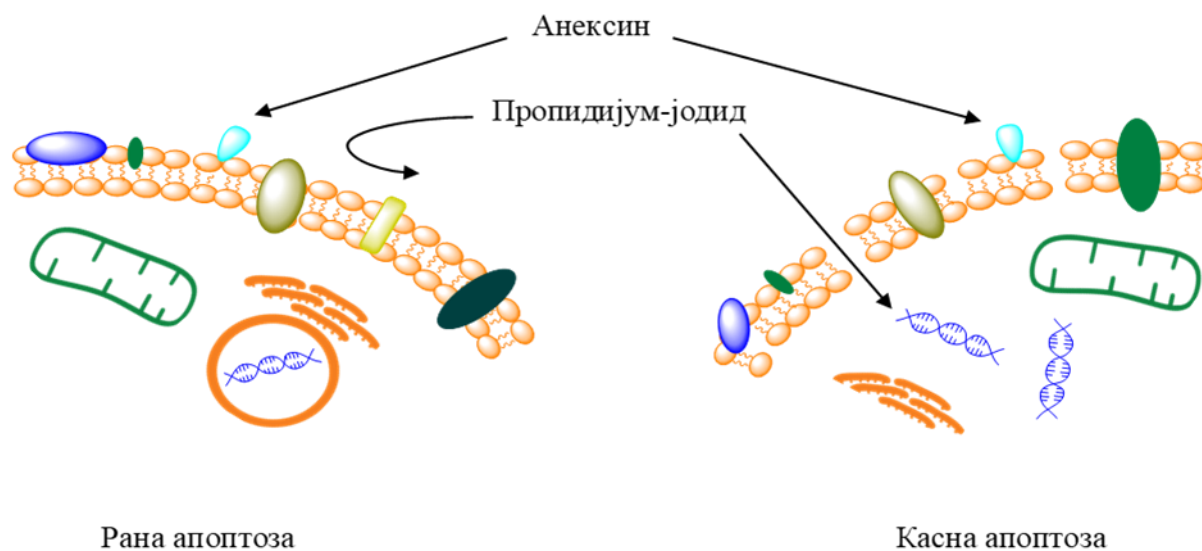
Са **Б** се означавају бунарићи у којима се налази само медијум, са **С** укупна вијабилност/спонтана смрт нетретираних циљних ћелија, а **Е** се односи на вијабилност ћелија у експерименталним бунарићима.



*Слика 15. Метода искључивања применом трипан плавог и схематски приказ тока колориметријског МТТ теста*

## 3.6.3.2. Тест апоптоичности

Апоптоични ефекат комплексних једињења (**K1** или **K2**) на туморске ћелије испитан је применом анексин V-FITC и пропидијум-јодида (PI) [127,128]. Протеин анексин V детектује рану фазу апоптозе, јер има способност да се везује за трансмембранске фосфолипиде. Интегритет ћелијске мембране остаје очуван у раној фази, али долази до губитка асиметрије мембранских фосфолипида, тако да фосфатидилсерин бива изложен на спољашњој страни ћелијске мембране и доступан за везивање (Слика 16) [129,130]. Пропидијум-јодид је флуоресцентан интеркалирајући агенс који се користи да препозна касну фазу апоптозе у којој долази до губитка интегритета ћелијске мембране и могућности његовог везивања за молекулу ДНК (Слика 16) [131].



**Слика 16.** Утврђивање ране и касне апоптозе применом анексина и пропидијум-јодида

Ћелије СТ26 су култивисане у току ноћи у Т25 ћелијским флашковима. Након наведеног периода медијум је замењен раствором испитиваних једињења (**K1** или **K2**) концентрације 15  $\mu\text{M}$  и остављен у инкубатору 24 h на 37°C у 5%  $\text{CO}_2$ . Култивисане ћелије су два пута испране раствором фосфатног пуфера (PBS) и ресуспендоване у 1x везујућем пуферу (10x везујући пуфер: 0,1 M Непес/NaOH (pH 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM  $\text{CaCl}_2$ ) до концентрације од  $1 \cdot 10^6/\text{mL}$ . Након тога, у 100  $\mu\text{L}$  суспензије ћелија додато је 10  $\mu\text{L}$  анексин V-FITC и 20  $\mu\text{L}$  пропидијум-јодида. Ћелије су инкубиране 15 минута у



мраку на собној температури (25°C), а затим је садржај ресуспендован у 400 µL везујућег пуфера и анализиран током 1 часа коришћењем FACS Calibur (BD, San Jose, USA) и Flow Jo софтвера (Tri Star). Проенти ћелија у раној апоптози, касној апоптози и проценат некротичних ћелија одређивани су коришћењем софтвера *CXP Cytometer, FlowJo и Flowing software v2.5*. Анексин V(+)/PI(-) указује на рану апоптозу, анексин V(+)/PI(+) на касну апоптозу, а код некрозе ћелија се јавља анексин V(-)/PI(+). Уколико није дошло до бојења ћелија, анексин V(-)/PI(-), значи да су ћелије вијабилне.

Да би се утврдио потенцијал за индукцију апоптотске смрти тестираних бакарних комплекса, извршена је проточна цитометријска анализа СТ26 ћелија обојених анексином и пропидијум-јодидом након 24h од изложености тестираним комплексима (концентрација 15 µM).

### 3.7. Антимикробна активност

Антимикробна активност је испитана на бактеријама и гљивама *in vitro* методом. Сва испитивања из ове области спроведена су у Лабораторији за микробиологију на Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу.

#### 3.7.1. Припремање раствора испитиваних једињења и реагенаса

Синтетисани комплекси (**К1** и **К2**) су растворени у DMSO (*Acros Organics*, Њу Џерзи, САД), а затим разблажени хранљивим медијумом до концентрације од 10%. Ресазурин је набављен од *Alfa Aesar GmbH & Co* (Карлсруе, Немачка). Доксициклин (*Галеника АД*, Београд) је растворен у течном хранљивом медијуму, Mueller-Hinton бујону (*Торлак*, Београд), док је флуконазол (*Pfizer Inc*, САД) растворен у Sabouraud декстрозном агару (*Торлак*, Београд). Mueller-Hinton бујон је намењен за одређивање минималних инхибиторних концентрација (МИК) антимикробних супстанци дилуционом методом. Ова стандардизована подлога садржи 17,5 g киселог казеин хидролизата, 2 g месног екстракта и 1,5 g скроба. Месни екстракт и хидролизат казеина су извори хранљивих протеина за микроорганизме, док скроб апсорбује токсине који настају као продукт метаболизма микроорганизма у току раста. При припреми подлоге наведена смеша (21 g) се помеша са 1000 mL хладне дестиловане воде, а затим уз мешање загрева до кључања и потпуног растварања. Раствор се разлије у ерленмајере и

стерилише у аутоклаву 15 минута на 121°C. Sabouraud декстрозни агар се користи за изоловање и култивисање гљивица и квасаца. Састоји се од 40 g декстрозе, 15 g агра и 10 g пептона (Пептон Торлак). Декстроза и пептон обезбеђују хранљиве састојке микроорганизмима, а агар доводи до очвршћавања подлоге. У наведену смешу се дода 1000 mL хладне дестиловане воде и остави 15 минута да одстоји. Хранљиви медијум се пажљиво уз мешање загрева до кључања и растварања, а затим стерилише у аутоклаву (15 мин. на 121°C). Када се подлога охлади на 50°C, промеша се и разлије у Петри шоље. При хлађењу и очвршћавању ствара се бистар до благо опалесцентан гел жуте боје.

### 3.7.2. Третирани микроорганизми и припрема суспензија

Антимикробна активност лиганада (Л1 и Л2) и синтетисаних комплексних једињења (К1 и К2) испитивана је на 20 микроорганизма (Табела 5). Клинички изолати бактерија су поклон Института за јавно здравље у Крагујевцу, док су остали микроорганизми обезбеђени из култура из Лабораторије за микробиологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Табела 5. Тестирани микроорганизми

МИКРООРГАНИЗМИ		
	Бактерије	Гљиве
Грам-позитивне	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Penicillium expansum</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Грам-негативне	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	<i>Penicillium italicum</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170
	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305
	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404

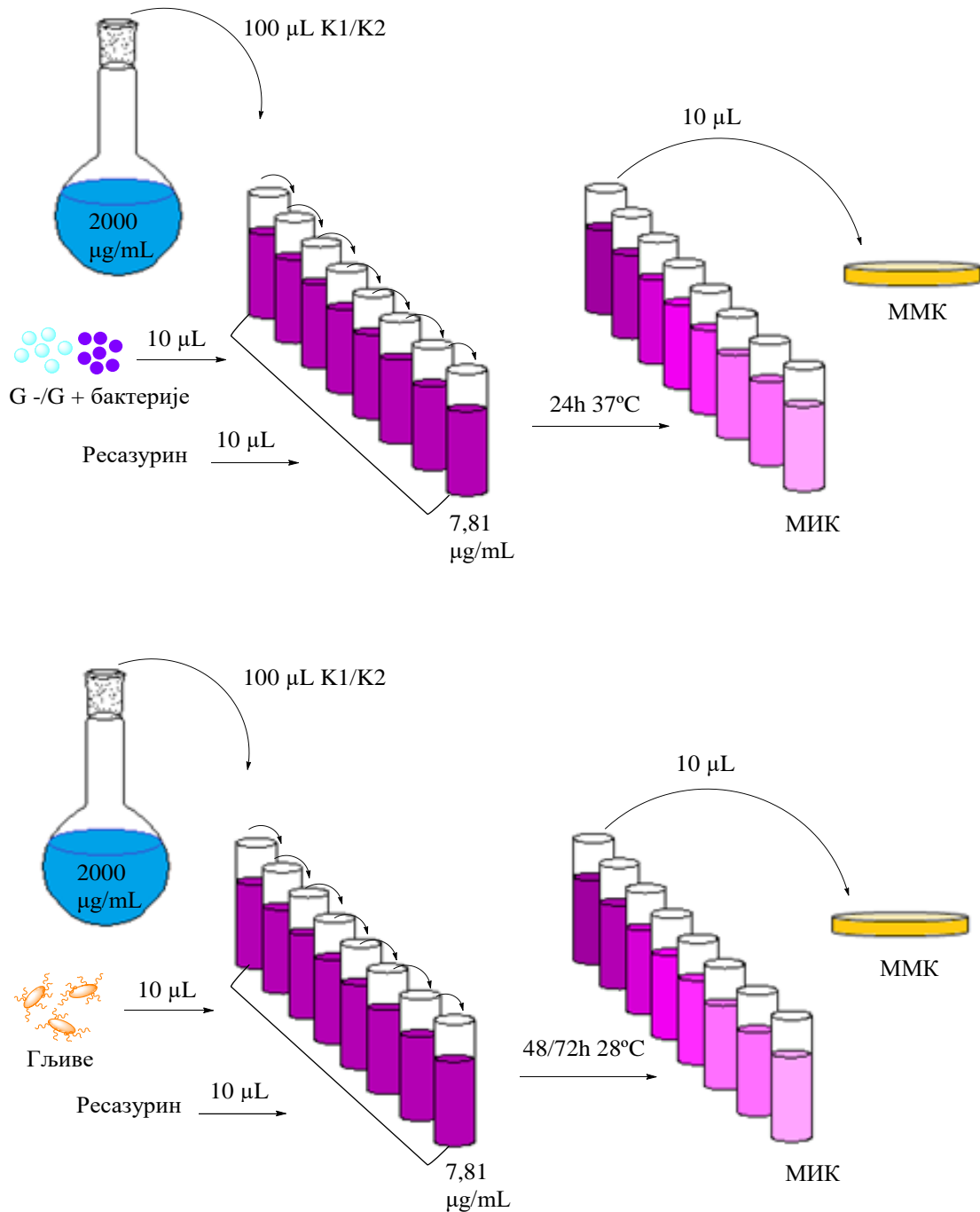
Бактеријске суспензије и суспензије гљива припремљене су методом директне колоније, тако што су микроорганизми узети са подлоге и суспендовани у 5 mL стерилног физиолошког раствора. Коришћењем дензитометра (*DEN-1, BioSan, Летонија*) подешена је густина почетне суспензије и упоређена са 0,5 McFarland стандардом [117]. Вредност стандарда одговара суспензији бактерија која садржи  $10^8$  јединица за формирање колонија (CFU)/mL (енгл. *Colony-Forming Unit*) и суспензији квасаца која садржи  $10^6$  (CFU)/mL. Суспензија гљивичних спора припремљена је пажљивим одвајањем спора са мицелијума гљива. Почетне суспензије су додатно разблажене стерилним физиолошким раствором (0,85%) у односу 1:100 за бактерије и односу 1:1000 за гљиве.

### 3.7.3. Микродилуциона метода

Минимална инхибиторна концентрација (МИК) и минимална микробицидна концентрација (ММК) комплексних једињења (**K1** и **K2**) одређене су микродилуционом методом (Слика 17) [132]. Као позитивне контроле коришћени су доксициклин и флуконазол. Како би се искључио ефекат растварача (DMSO) на раст микроорганизама праћен је и његов утицај у концентрацији од 10%, као и утицај самих лиганата. У сваки од 96 бунарића микротитар плоче сипано је по 100  $\mu$ L хранљиве подлоге. Затим је у први ред микротитрационе плоче додато по 100  $\mu$ L раствора испитиваних једињења чије су почетне концентрације биле 2000  $\mu$ g/mL. Двоструким разблаживањем добијени су раствори концентрација у области од 1000 до 7,81  $\mu$ g/mL. По 10  $\mu$ L припремљене суспензије бактерија и гљива додаје се у сваки бунарић, а након тога и по 10  $\mu$ L ресазурина, индикатора ћелијског раста. Антимикробна активност испитиваних једињења проучена је при концентрацији бактерија од  $10^5$  CFU/mL и концентрацији спора гљива од  $10^3$  CFU/mL. Припремљене микротитар плоче са бактеријама инкубиране су у току 24h на температури од 37°C, док су оне са гљивама инкубиране 48h или 72h на 28°C. У наведеним временским интервалима под дејством оксидоредуктаза живих микроорганизама ресазурин прелази у резорурфин, што се опажа променом боје из љубичасте у розе.

Минимална инхибиторна концентрација је дефинисана као најнижа концентрација испитиваних супстанци на којој није дошло до промене боје ресазурина. Минимална микробицидна концентрација је одређена пресејавањем 10  $\mu$ L узорка из удубљења у

којима није уочен раст на плочаст агар. Концентрација синтетисаних лиганата и комплекса при којој после периода инкубације није уочен раст на плочастом агару биће дефинисана као минимална микробицидна концентрација.



Слика 17. Поступак микродилуционе методе



## **4. РЕЗУЛТАТИ**

## 4.1. Синтеза и карактеризација

### 4.1.1. Синтеза $\beta$ -аминокиселина

Бидентатни лиганди,  $\beta$ -аминокиселине (**Л1** и **Л2**) су синтетисане према поступку описаном у делу 3.1. (Схема 4) у приносу од око 60%.



R = водоник (**Л1**), *tert*-бутил група (**Л2**)

Схема 4. Синтеза  $\beta$ -аминокиселина

### 4.1.2. Синтеза комплекса бакра(II) са $\beta$ -аминокиселина

Поступак синтезе комплекса бакра(II) описан је у делу 3.2. (Схема 5). Комплекс **К1** се из матичног воденог раствора издвојио у виду кристала плаве боје у приносу од 58,10% (0,1256 g), док је принос плавог праха (**К2**) био 78,24% (0,1581 g).

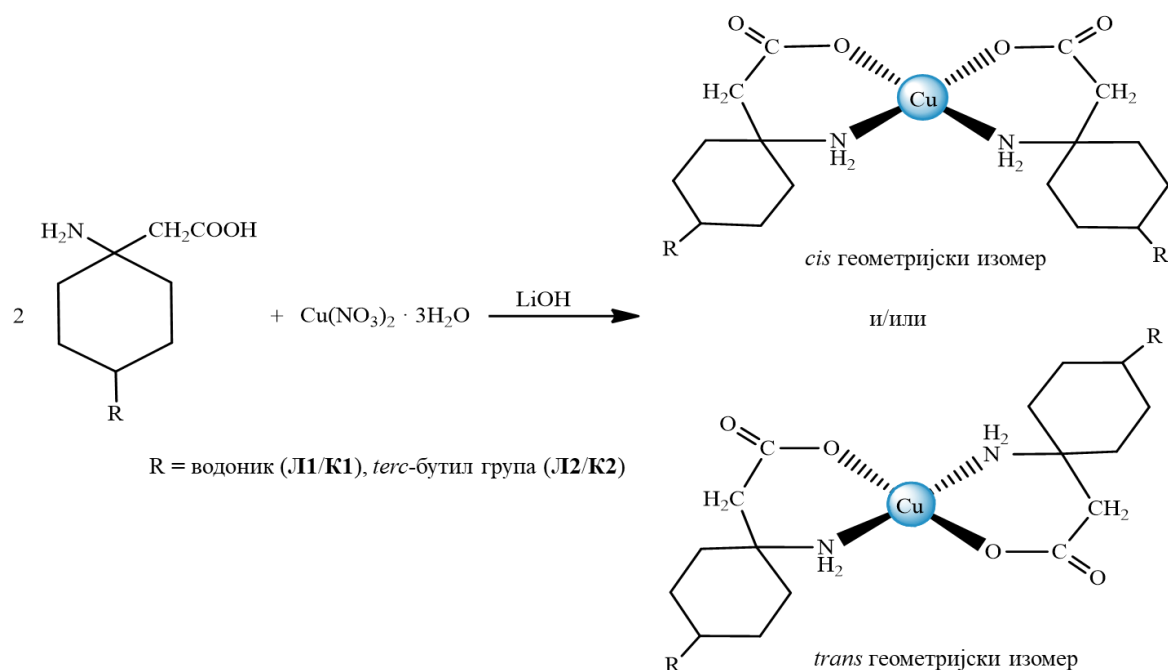


Схема 5. Синтеза комплекса бакра(II) са  $\beta$ -аминокиселинама

### 4.1.3. Елементална микроанализа синтетисаних комплекса

Елементалном микроанализом одређена је процентуална заступљеност угљеника, водоника и азота у узорцима за које се претпоставља да су комплексна једињења. Вредности елементалне микроанализе и израчунате вредности на основу очекиване молекулске формуле синтетисаних комплекса (**К1** и **К2**) су приказане у Табели 6.

Табела 6. Резултати елементалне микроанализе

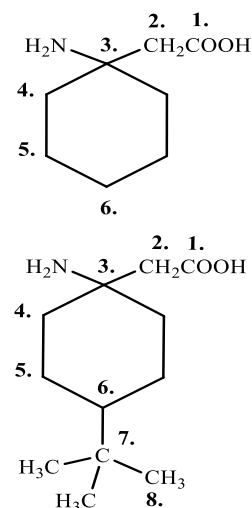
Хемијски елементи		C(%)	H(%)	N(%)
<b>К1</b> CuC <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (M <sub>r</sub> = 375,95)	Израчунато	51,12	7,51	7,45
	Нађено	51,27	7,42	7,42
<b>К2</b> CuC <sub>24</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (M <sub>r</sub> = 488,16)	Израчунато	59,05	9,08	5,74
	Нађено	58,98	9,01	5,69

### 4.1.4. Нуклеарно-магнетно-резонантни спектри (лиганда)

Сигнали <sup>1</sup>H NMR и <sup>13</sup>C NMR спектроскопије синтетисаних лиганда садрже пикове на одређеним вредностима хемијских померања која одговарају водониковим и угљениковим атомима лиганда (Табела 7).

Табела 7. Вредности хемијских померања (ppm) у <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C NMR спектрима **Л1** и **Л2**

Положај	Л1		Л2	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1.	/	177,3	/	177,3
2.	2,41	48,0	2,41	48,0
3.	/	42,5	/	42,8
4.	1,75; 1,50	41,2	1,75; 1,50	39,6
5.	1,53; 1,43	21,9	1,52; 1,27	20,7
6.	1,49; 1,47	22,6	1,41	48,5
7.	/	/	/	32,5
8.	/	/	0,94	27,6



Напомена-приказани су само положаји једног од еквивалентних С и Н атома

#### 4.1.5. Инфрацрвени спектри синтетисаних лиганата и комплекса

У ИР спектрима лиганата уочавају се сигнали протонованих амино група ( $\approx 2950 \text{ cm}^{-1}$ ), док су код комплексних једињења уочене асиметричне валенционе вибрације примарне амино групе ( $\approx 3370 \text{ cm}^{-1}$ ). Оба комплекса показују јаке и оштре апсорпционе траке које потичу од асиметричних фреквенци истезања координованих карбоксилних група на око  $1650\text{-}1570 \text{ cm}^{-1}$ . Карактеристичне апсорпционе траке лиганата и комплекса приказане су у Табели 8.

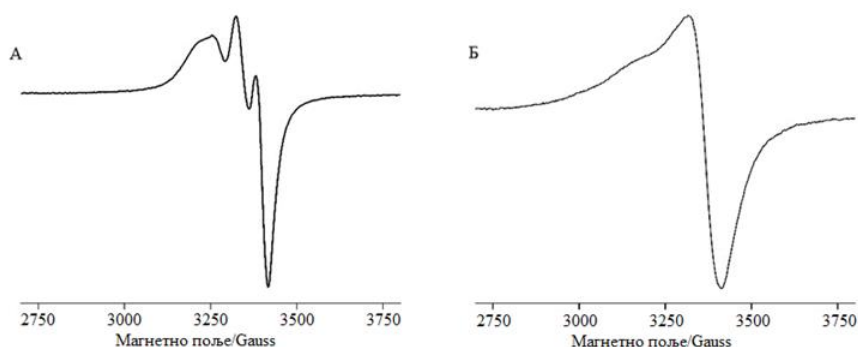
Табела 8. Најважније траке у ИР спектрима ( $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ ) лиганата и комплекса

Једињења	$\nu(\text{NH}_3^+)_{\text{asym}}$	$\nu(\text{NH}_2)_{\text{asym}}$	$\nu(\text{COO})_{\text{asym}}$	$\nu(\text{COO})_{\text{sym}}$
Л1	2945(s)	/	1619(s)	1570(s)
Л2	2954(s)	/	1639(s)	1336(s)
К1	/	3375(s)	1576(s)	1408 (s)
К2	/	3369(s)	1577(s)	1448 (s)

\*s (strong) - траке јаког интензитета

#### 4.1.6. Спектри електронско-парамагнетне-резонанције

На Слици 18 су приказани EPR спектри водених раствора синтетисаних комплекса концентрације  $0,5 \text{ mM}$  при собној температури. Оба комплекса у EPR дају анизотропне спектре са аксијалном симетријом. Бакар(II)-јон у комплексним једињењима показује различиту координацију у воденом раствору, највероватније због различитих лиганата. Спектар који потиче од бакар(II)-јона из комплекса **К1** карактерише  $g_{\parallel} = 2,16$  и  $g_{\perp} = 2,07$ , док спектар комплекса **К2** показује слабо решен  $\text{Cu}$  ( $S=1/2$ ,  $I=3/2$ ) хиперфински слој са  $g_{\parallel} = 2,23$  и  $g_{\perp} = 2,09$ .

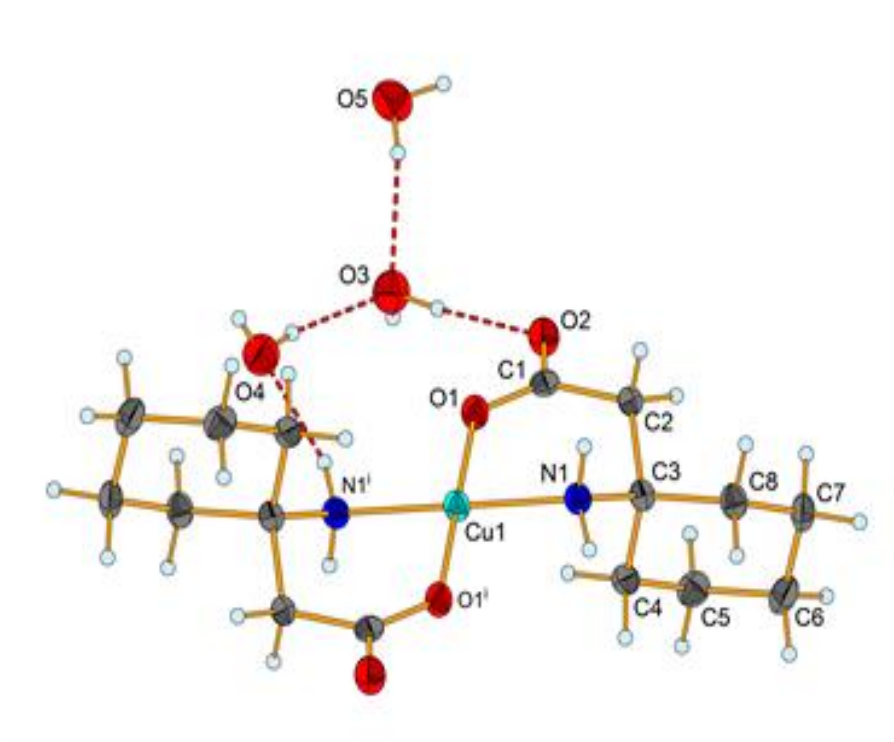


Слика 18. EPR спектри водених раствора комплекса **К1** (А) и **К2** (Б)



#### 4.1.7. Кристална структура комплекса **K1**

Структура комплекса **K1** је приказана на Слици 19. Неутрални молекул комплекса се састоји од бакар(II)-јона и два бидентатно координована лиганда. Координовање лиганда са централним јоном метала је остварено преко кисеоника из депротонованих карбоксилних група и преко азота из амино групе формирајући *transOtransN* геометријски изомер. Мононуклеарни комплекс је квадратно-планарне геометријске структуре са бакар(II)-јоном локализованим у центру симетрије.



Слика 19. Структура комплекса **K1**

\*Испрекидане линије представљају водничне везе ( $i: -x + 1, -y, -z + 1$ )

Одабране дужине и углови веза за комплекс **K1** су приказани у Табелама 9 и 10. Неправилна (деформисана) квадратно-планарна структура комплекса потврђена је на основу вредности дужина веза (Cu-N, Cu-O) и углова веза ( $i = 1 - x, -y, 1 - z$ ) који одступају од  $90^\circ$ .

Табела 9. Углови веза у комплексном једињењу К1

Углови веза [°]			
O1-Cu1-N1 <sup>i</sup>	87,45(7)	C4-C3-C2	112,82(17)
O1 <sup>i</sup> -Cu1-N1	87,45(7)	N1-C3-C8	109,70(17)
O1-Cu1-N1	92,55(7)	C4-C3-C8	109,48(17)
C1-O1-Cu1	130,35(14)	C2-C3-C8	109,75(17)
C3-N1-Cu1	113,79(13)	C1-C2-C3	117,62(17)
O2-C1-O1	121,47(19)	C5-C4-C3	112,32(17)
O2-C1-C2	118,47(19)	C7-C8-C3	113,06(17)
O1-C1-C2	120,01(19)	C7-C6-C5	111,95(18)
N1-C3-C4	107,70(16)	C6-C7-C8	111,31(18)
N1-C3-C2	107,31(17)	C6-C5-C4	111,11(19)

Симетријске операције:  $i: -x + 1, -y, -z + 1$

Веза Cu-O је нешто краћа од Cu-N због краћег ковалентног радијуса атома кисеоника. Везе у карбоксилној групи лигананда су делокализоване (Табела 10), док су остале дужине веза типичне за C-C и C-H. Циклохексил група се налази у конформацији столице.

Табела 10. Дужине веза у комплексном једињењу К1

Дужине веза [Å]			
Cu1-O1	1,9238(15)	Циклохексан	
Cu1-N1	1,9852(17)	C3-C4	1,532(3)
O1-C1	1,280(3)	C3-C8	1,538(3)
O2-C1	1,245(3)	C4-C5	1,530(3)
N1-C3	1,500(3)	C8-C7	1,533(3)
C1-C2	1,520(3)	C6-C7	1,522(3)
C3-C2	1,536(3)	C6-C5	1,524(3)

Симетријске операције:  $i: -x + 1, -y, -z + 1$

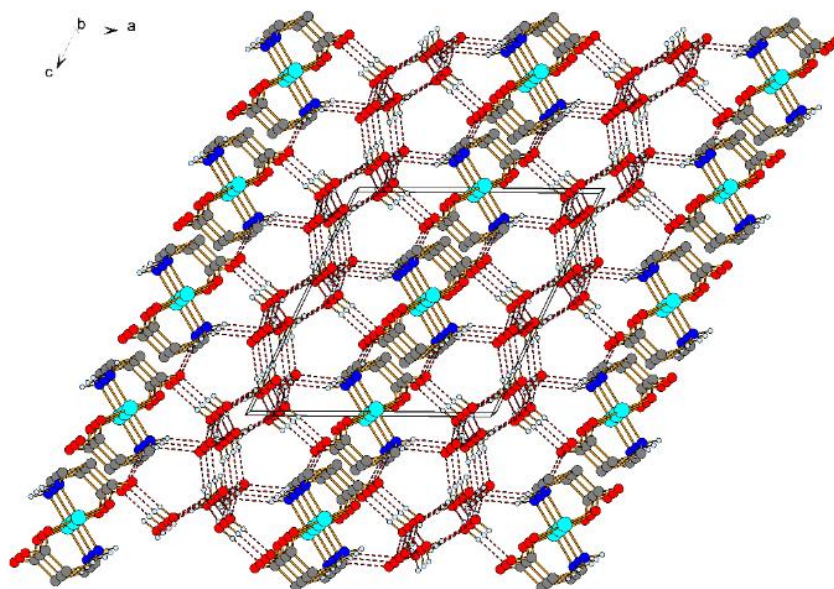
Три молекула кристалне воде су преко водоничних веза укључена у систем (Табела 11) и тако стабилизују саму структуру.

Табела 11. Водоничне везе молекула воде и комплексног једињења **K1** (Å и °).

D-H...A	$d(D-H)$	$d(H...A)$	$d(D...A)$	$\angle(DHA)$
N1-H2N1...O2 <sup>ii</sup>	0,91	2,07	2,958(2)	165,7
N1-H1N1...O4 <sup>i</sup>	0,91	2,24	3,131(2)	164,6
O3-H1O3...O2	0,87	1,91	2,773(2)	175,7
O3-H2O3...O5 <sup>iii</sup>	0,77	2,15	2,896(2)	166,0
O4-H1O4...O3	0,81	2,05	2,844(2)	167,5
O4-H2O4...O5 <sup>iv</sup>	0,77	2,28	3,052(2)	173,9
O5-H1O5...O3	0,84	2,05	2,867(2)	165,2
O5-H2O5...O4 <sup>v</sup>	0,83	2,06	2,892(2)	175,7

Симетријске операције: *i*:  $-x + 1, -y, -z + 1$ ; *ii*:  $-x + 1, y - \frac{1}{2}, -z + \frac{1}{2}$ ; *iii*:  $-x + 2, -y + 1, -z + 1$ ; *iv*:  $-x + 2, -y, -z + 1$ ; *v*:  $x, -y + \frac{1}{2}, z - \frac{1}{2}$ .

Сваки молекул воде је у очекиваном тетраедарском окружењу које чине други молекули воде, амино група или карбоксилна група. Комплексне јединице у структури формирају слојеве у *bc* равни, које су повезане кристалним молекулима воде преко водоничних веза како би се формирао бесконачан 3D систем (Слика 20).

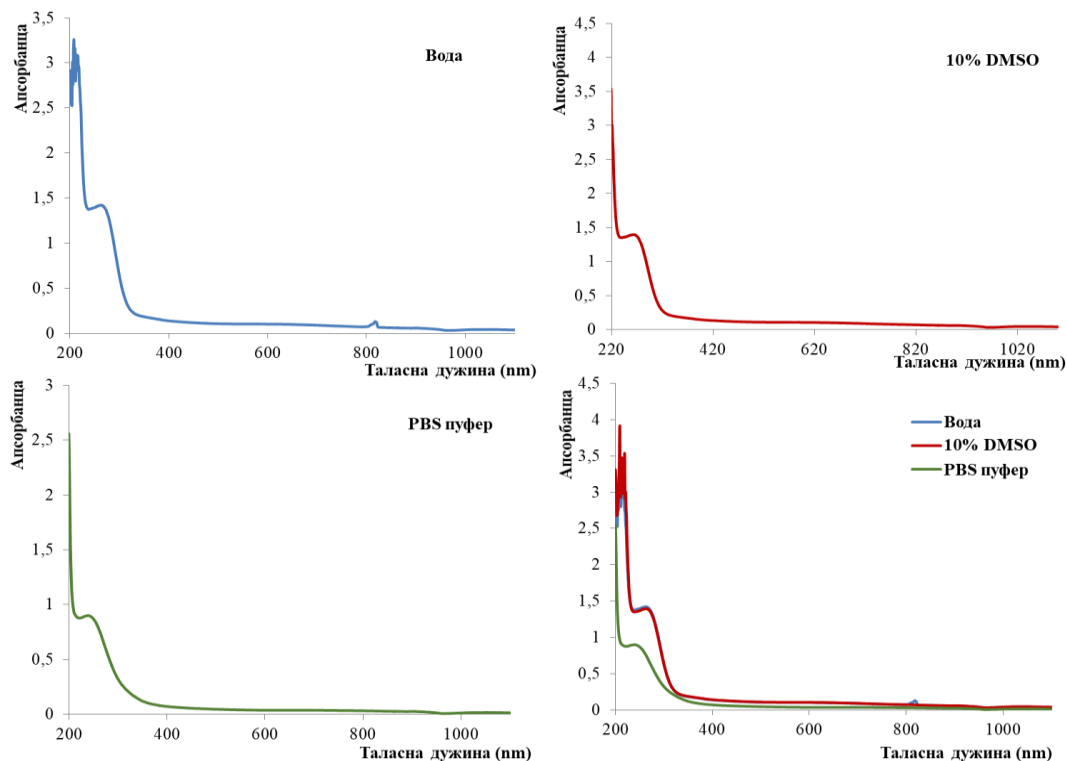


Слика 20. Водоничне везе (испрекидане линије) формирају 3D супрамолекуларну структуру у **K1**.

\* Атоми водоника који нису укључени у водоничне везе су изостављени ради јаснијег приказа.

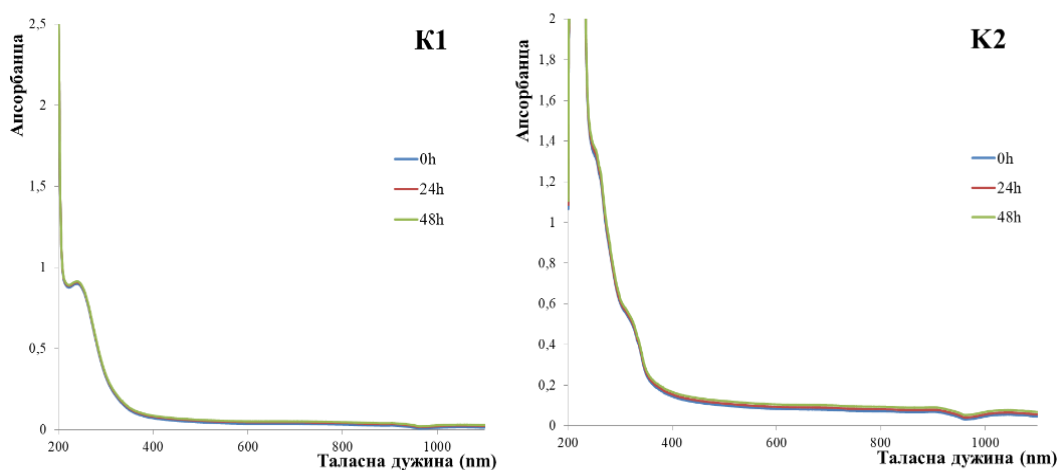
## 4.2. Стабилност раствора комплексних једињења

Раствори синтетисаних комплекса у води, 10% DMSO и раствору PBS остали су стабилни након 48h стајања на собној температури (Слика 21).



Слика 21. UV-Vis спектри комплекса K1 у води, 10% DMSO и раствору пуфера

У пуферском раствору комплекси (K1 и K2) показују стабилност у периоду од 48h (Слика 22).



Слика 22. UV-Vis спектри синтетисаних комплекса у раствору пуфера

### 4.3. Интеракција синтетисаних комплекса са молекулом ДНК

#### 4.3.1. Супституционе реакције

Константа брзине другог реда,  $k_2$ , која карактерише формирање производа при реверзибилној реакцији супституције комплекса **K1** и **K2** са СТ-ДНК и НТ-ДНК је реда величине изнад  $10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (Табела 12). Комплекс **K1** лакше подлеже реакцијама супституције у поређењу са комплексом **K2**, док су вредности константе брзине другог реда,  $k_2$ , веће при супституционим реакцијама оба комплекса са НТ-ДНК (Табела 12).

Табела 12. Константе брзине другог реда,  $k_2$ , при реакцији комплекса **K1/K2** и НТ-ДНК/СТ-ДНК

Комплексна једињења	СТ-DNA $k_2[\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}]$	НТ-DNA $k_2[\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}]$
<b>K1</b>	$(3,8 \pm 0,1)\cdot 10^3$	$(6,3 \pm 0,2)\cdot 10^3$
<b>K2</b>	$(2,9 \pm 0,1)\cdot 10^3$	$(3,4 \pm 0,1)\cdot 10^3$

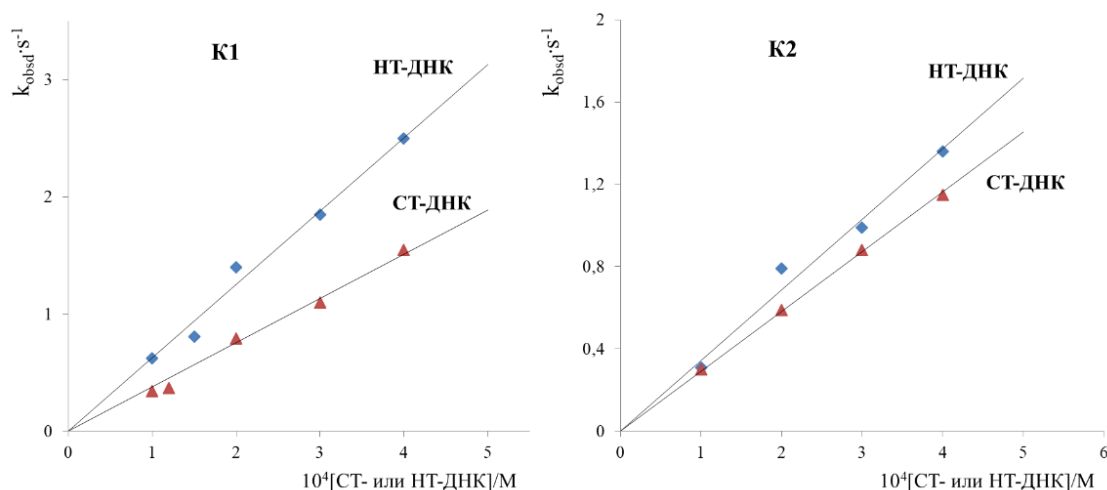
Свака константа брзине *pseudo*-првог реда,  $k_{obsd}$ , израчуната је на основу Једначине 1 као просечна вредност пет до шест независних мерења и у функцији је концентрације ДНК (Табела 13).

Табела 13. Константе брзине *pseudo*-првог реда,  $k_{obsd}$ , при реакцији комплекса **K1/K2** и НТ-ДНК/СТ-ДНК

Комплексна једињења	$10^{-4} C_{\text{СТ-ДНК}}/\text{M}$	$k_{obsd}/\text{s}^{-1}$	$10^{-4} C_{\text{НТ-ДНК}}/\text{M}$	$k_{obsd}/\text{s}^{-1}$
<b>K1</b>	4,00	1,55(6) <sup>a</sup>	4,00	2,50(6)
	3,00	1,10(6)	3,00	1,85(6)
	2,00	0,79(6)	2,00	1,40(6)
	1,20	0,37(6)	1,50	0,81(6)
	1,00	0,34(5)	1,00	0,62(6)
<b>K2</b>	4,00	1,15(6)	4,00	1,36(6)
	3,00	0,88(6)	3,00	0,99(6)
	2,00	0,59(6)	2,00	0,79(6)
	1,00	0,30(6)	1,00	0,31(6)

<sup>a</sup> Број понављања

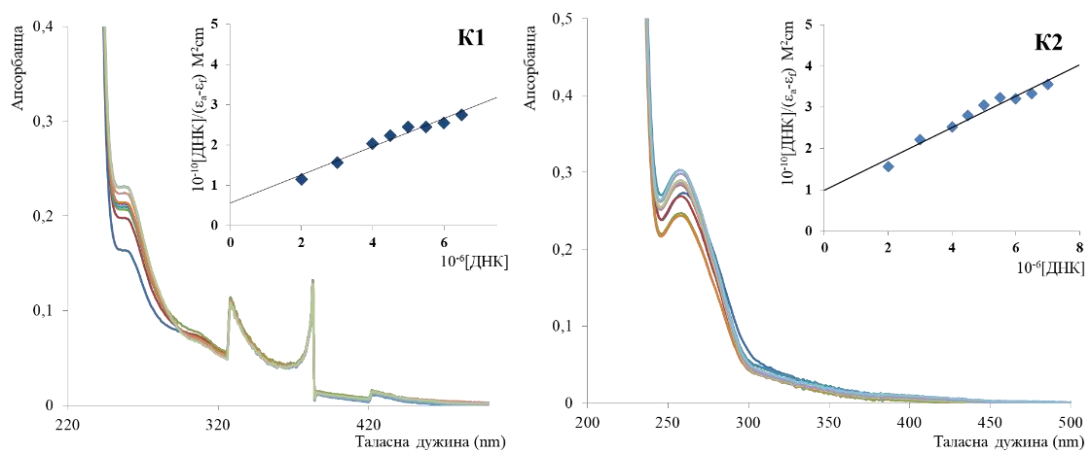
Вредности константе брзине *pseudo*-првог реда,  $k_{obsd}$ , су у корелацији са концентрацијом ДНК и при истим концентрацијама СТ-ДНК и НТ-ДНК су веће при супституцији са комплексом **K1**. Оба комплекса показују већи афинитет према НТ-ДНК (Слика 23).



Слика 23. Константе брзине *pseudo*-првог реда,  $k_{obsd}$ , приказане као функција концентрације СТ-ДНК и НТ-ДНК при реакцији са **K1** и **K2**.

### 4.3.2. UV-Vis апсорпциони спектри

Криве титрације за **K1** и **K2** у присуству СТ-ДНК или НТ-ДНК у различитим концентрацијама су дате на Слици 24. Са повећањем концентрације СТ-ДНК и НТ-ДНК јавља се значајан хиперхромни ефекат са појавом новог опсега на 258, 262 и 266 nm, док у области од 300-500 nm нису уочене значајне промене у спектру (Слика 24).



Слика 24. UV-Vis титрациони спектри комплекса **K1** и **K2** при интеракцији са СТ-ДНК

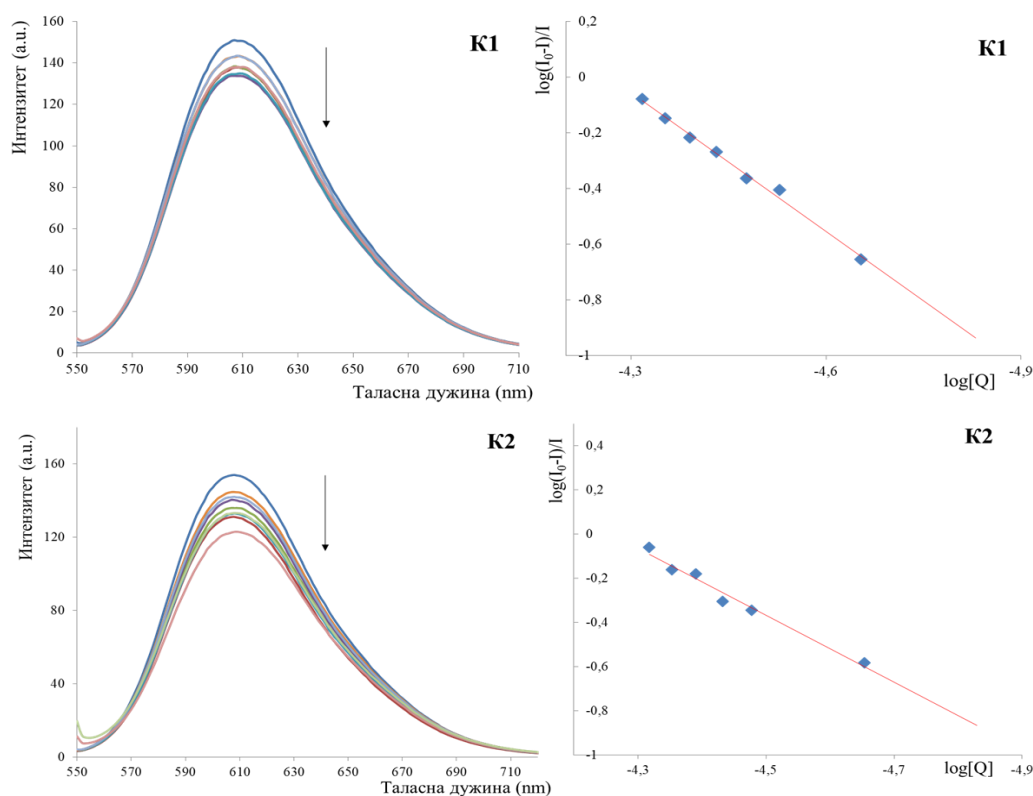
Вредности константе везивања,  $K_b$ , указују да је дошло до интеракције комплекса **K1** и **K2** са СТ-ДНК и НТ-ДНК. (Табела 14).

Табела 14. Вредности константе везивања  $K_b$ .

Комплекси	<b>K1</b>	<b>K2</b>
Константе	$K_b [M^{-1}]$	$K_b [M^{-1}]$
СТ-DNA	$(5,9 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(3,8 \pm 0,1) \cdot 10^5$
НТ-DNA	$(6,2 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(4,0 \pm 0,1) \cdot 10^5$

### 4.3.3. Флуоресцентни емисиони спектри

Интеракција **K1** и **K2** са СТ-ДНК и НТ-ДНК довела је до значајног смањења у интензитету флуоресценције услед супституције EtBr из комплекса EtBr-ДНК. Повећањем концентрације **K1** или **K2** (0-10  $\mu\text{M}$ ) узрокује се значајно смањење интензитета флуоресценције са приметним црвеним померањем (Слика 25).



Слика 25. Флуоресцентни спектри титрације EtBr-СТ-ДНК и EtBr (10  $\mu\text{M}$ ) везаног за НТ-ДНК (10  $\mu\text{M}$ ) у присуству различитих количина комплекса **K1/K2**.

Интензитет флуоресценције на 606, 609, 611 или 612 nm (у зависности од комплекса) коришћен је за израчунавање Стерн-Волмерове константе,  $K_{sv}$ , на основу Једначине 3 (Табела 15).

Табела 15. Вредности Стерн-Волмерове константе  $K_{sv}$

Комплекси	K1	K2
Константе	$K_{sv}[M^{-1}]$	$K_{sv}[M^{-1}]$
СТ-DNA	$(9,8 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(9,6 \pm 0,1) \cdot 10^3$
НТ-DNA	$(2,4 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(2,3 \pm 0,1) \cdot 10^4$

Подаци о интензитету флуоресценције се могу користити како би се одредио број везивних места ( $n$ ) и константа везивања комплексних једињења  $K_{bin}$  за СТ-ДНК или НТ-ДНК. Вредност константа везивања је реда величине изнад  $10^4$ , а броја везујућих места ( $n$ ) је у распону од 0,8 до 1,5, тако да можемо узети у обзир да је вредност ( $n$ ) приближно једнака 1 што указује на постојање једног места везивања комплекса за инкременте ДНК (Табела 16).

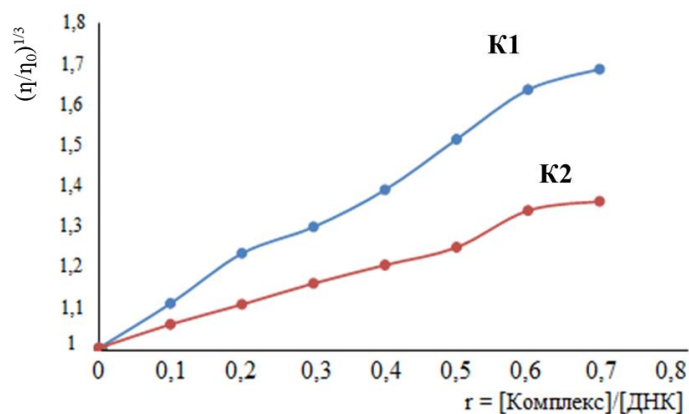
Табела 16. Вредности константи везивања ( $K_{bin}$ ) и број везујућих места ( $n$ )

Комплекси	K1		K2	
ДНК	$K_{bin} [M^{-1}]$	$n$	$K_{bin} [M^{-1}]$	$n$
СТ-ДНК	$(2,7 \pm 0,1) \cdot 10^5$	1,4	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^4$	0,8
НТ-ДНК	$(4,3 \pm 0,1) \cdot 10^6$	1,4	$(2,7 \pm 0,1) \cdot 10^6$	1,5

#### 4.3.4. Вискозност

Додавање растућих концентрација комплексних једињења **K1/K2** у 0,01 mM раствору СТ-ДНК довело је до повећања релативног вискозитета ДНК раствора. У оба случаја вискозност се повећавала са повећањем концентрације комплексног једињења, али је при свакој концентрацији она била израженија при додатку **K1** (Слика 26).



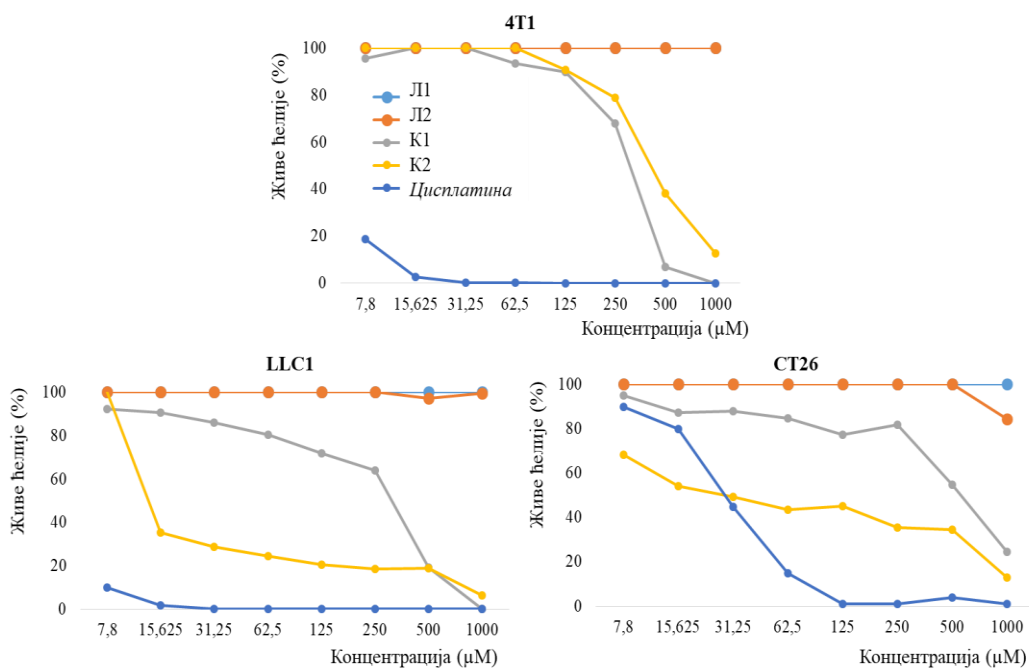


Слика 26. Релативно повећање вискозитета раствора СТ-ДНК при додатку различитих концентрација комплекса К1/К2

#### 4.4. Антитуморска активност

##### 4.4.1. Ћелијска варијабилност и IC<sub>50</sub> вредности

Резултати МТТ теста показују да оба синтетисана лиганда (Л1 и Л2) не испољавају цитотоксични ефекат на све три тестиране ћелијске линије карцинома, чак ни при концентрацији од 1000 μМ (Слика 27).



Слика 27. Ћелијска вијабилност (%) после 72h од третирања туморских ћелија лигандима и комплексима

Вредности  $IC_{50}$  указују на то да синтетисани комплекс **K1** има врло ниско цитотоксично дејство на тестираним ћелијским линијама карцинома, најниже према ћелијама СТ26 (Табела 17). Комплекс **K2** показује бољу цитотоксичну активност у поређењу са комплексом **K1**, посебно према мишјим ћелијама карцинома плућа, LLC1 (Табела 17).

**Табела 17.** Средње вредности  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) са стандардним девијацијама ( $\pm SD$ ) након 72h од примене испитиваних једињења на ћелијским линијама

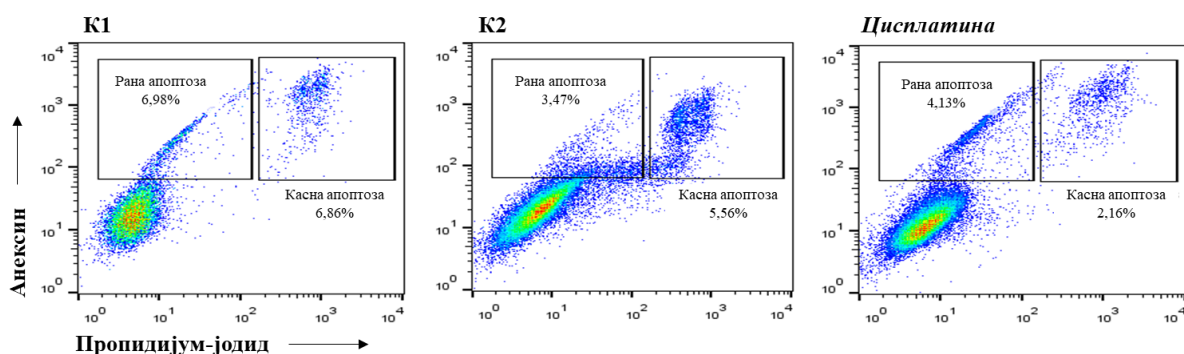
Испитивана једињења	Ћелијске линије		
	4T1	СТ26	LLC1
<b>K1</b>	221,87 $\pm$ 16,25	655,42 $\pm$ 118,67	195,90 $\pm$ 33,05
<b>K2</b>	390,58 $\pm$ 56,48	39,86 $\pm$ 7,09	15,61 $\pm$ 6,86
<b>L1</b>	>1000	>1000	>1000
<b>L2</b>	>1000	>1000	>1000
<b>Цисплатина</b>	<7,8	29,11 $\pm$ 5,87	<7,8

Иако су вредности  $IC_{50}$  за **K2** веће од вредности  $IC_{50}$  за *цисплатину* за одговарајуће ћелијске линије, цитотоксична активност **K2** према LLC1 ћелијским линијама је релативно висока (15,61  $\pm$  6,86). Цитотоксични ефекат оба комплекса једињења зависи од дозе. Смањење концентрације испитиваних једињења пратило је значајно повећање преживљавања туморских ћелија. Комплекси (**K1** и **K2**) готово да не показују цитотоксично дејство на 4T1 ћелијама до концентрације од 125  $\mu M$  (Слика 27), док је цитотоксични ефекат на ћелијама карцинома плућа LLC1 био мањи у односу на активност *цисплатине*. Комплекс **K2** показује бољу цитотоксичну активност на LLC1 и СТ26 у поређењу са **K1**. Међутим, ниже концентрације (7,8 и 15,625  $\mu M$ ) **K2** показале су бољи цитотоксични ефекат на СТ26 у поређењу са истим концентрацијама *цисплатине* (Слика 27).

#### 4.4.2. Индукција апоптозе

Наши резултати указују да након 24 сата тестирани комплекси индукују апоптотичку смрт СТ26 ћелија (Слика 28). Оба комплекса бакра (**K1** и **K2**) су имала већи цитотоксични ефекат на СТ26 у поређењу са *цисплатином* (концентрација 15  $\mu M$ ). Овај

налаз је у корелацији са резултатима МТТ теста који указује на бољи цитотоксични ефекат бакар(II)-комплекса у нижим концентрацијама на СТ26 ћелијама него *цисплатина* (15  $\mu\text{M}$ ).



**Слика 28.** Показатељ процента раних апоптотских, касних апоптотских и преживелих СТ26 ћелија након 24h третмана са комплексима **К1/К2** (15  $\mu\text{M}$ )

#### 4.5. Антимикробна активност

Резултати *in vitro* тестирања антимикробне активности за лиганде (**Л1** и **Л2**) и комплексе (**К1** и **К2**) са позитивним контролама приказани су у табелама 18, 19, 20 и 21. Све испитиване супстанце показале су селективну антимикробну активност. Вредности МИК и ММК за лиганде (**Л1** и **Л2**) били су у распону од 500 до > 1000  $\mu\text{g/mL}$ , а за комплексе у распону од 125 до > 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Уопштено гледано активност комплекса била је већа него активност одговарајућих лиганада. Између Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија није било разлике у осетљивости на испитиване супстанце. Најбољу антимикробну активност показује комплекс **К1** на *Pseudomonas aeruginosa*, али су и код овог комплекса вредности МИК и ММК биле знатно веће од оних које показује доксициклин (Табела 18).

Табела 18. Антибактеријска активност лиганда Л1 и комплекса К1

Врста / тестиране супстанце		Л1		К1		Доксициклин	
Бактерије		МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
Грам-позитивне	<i>Bacillus cereus</i>	> 1000	> 1000	1000	1000	0,98	7,81
	<i>Bacillus subtilis</i>	> 1000	> 1000	> 1000	>1000	0,11	1,95
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	> 1000	> 1000	1000	1000	1,95	31,25
	<i>Staphylococcus aureus</i>	> 1000	> 1000	1000	1000	0,45	7,81
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	> 1000	> 1000	1000	> 1000	0,22	3,75
Грам-негативне	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	> 1000	> 1000	1000	1000	15,63	62,5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 1000	> 1000	125	250	62,5	125
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	> 1000	> 1000	1000	1000	15,63	31,25
	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	> 1000	> 1000	1000	1000	3,91	31,25
	<i>Salmonella enterica</i>	> 1000	> 1000	1000	> 1000	15,63	31,25

Вредности МИК за К2 комплекс су биле у распону од 500 до > 1000 µg/mL, док вредност ММК истог комплекса није била испод 1000 µg/mL ни код једне испитиване бактерије (Табела 19).

Табела 19. Антибактеријска активност лиганда Л2 и комплекса К2.

Врста / тестиране супстанце		Л2		К2		Доксициклин	
Бактерије		МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
Грам-позитивне	<i>Bacillus cereus</i>	> 1000	> 1000	500	1000	0,98	7,81
	<i>Bacillus subtilis</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	0,11	1,95
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	> 1000	> 1000	1000	1000	1,95	31,25
	<i>Staphylococcus aureus</i>	> 1000	> 1000	500	1000	0,45	7,81
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	> 1000	> 1000	500	> 1000	0,22	3,75
Грам-негативне	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	> 1000	> 1000	1000	> 1000	15,63	62,5
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 1000	> 1000	1000	1000	62,5	125
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	15,63	31,25
	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544	> 1000	> 1000	1000	1000	3,91	31,25
	<i>Salmonella enterica</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	15,63	31,25

Бакар(II)-комплекси су показали умерену антифунгалну активност. Вредност МИК и за лиганд **Л1** и за комплекс **К1** је била у распону од 500 до > 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , док вредност ММК код обе супстанце и на свим испитиваним гљивама није била испод 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Табела 20).

**Табела 20.** Антигљивична активност лиганда **Л1** и комплекса **К1**

Врста / тестиране супстанце	Л1		К1		Флуконазол	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	500	1000	500	1000	31,25	500
<i>Saccharomyces boulardii</i>	1000	> 1000	500	1000	7,81	31,25
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1000	1000	1000	> 1000	31,25	62,5
<i>Penicillium expansum</i>	> 1000	> 1000	1000	> 1000	250	500
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1000	> 1000	1000	> 1000	1000	1000
<i>Penicillium italicum</i>	500	> 1000	500	> 1000	250	500
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233	1000	1000	500	1000	500	1000
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170	> 1000	> 1000	500	1000	500	500
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	1000	1000	500	1000	1000	1000
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	1000	> 1000	500	> 1000	1000	1000

Комплекс **K2** показује бољу антигљивичну активност од комплекса **K1**. Вредност ММК за комплекс **K2** била је у распону од 250 до 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Табела 21).

**Табела 21.** Антигљивична активност лиганда **L2** и комплекса **K2**

Врста / тестиране супстанце	L2		K2		Флуконазол	
	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1000	1000	500	1000	31,25	500
<i>Saccharomyces boulardii</i>	1000	> 1000	1000	> 1000	7,81	31,25
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	> 1000	> 1000	1000	> 1000	31,25	62,5
<i>Penicillium expansum</i>	> 1000	> 1000	1000	> 1000	250	500
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1000	> 1000	500	> 1000	1000	1000
<i>Penicillium italicum</i>	500	> 1000	250	> 1000	250	500
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233	1000	1000	500	1000	500	1000
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170	> 1000	> 1000	1000	> 1000	500	500
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATTC 204305	1000	> 1000	1000	1000	1000	1000
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	1000	> 1000	1000	> 1000	1000	1000



## **5. ДИСКУСИЈА**

Након веома добрих резултата које су показали комплекси платине у хемиотерапији, истраживање је усмерено и ка синтези комплекса других јона метала и испитивању њихове биолошке активности. Бакар је привукао посебну пажњу истраживача и са хемијског и са физиолошког аспекта. Прелазно тврдо-меке карактеристике, бакар(II)-јон чине погодним за координовање са различитим донорским атомима [29], а есенцијална улога коју има у организму [50], његове комплексе потенцијално мање токсичним. До сада је установљена генерално боља активност бакар(II)-комплекса у односу на бакар(I)-комплексе, али се сматра да биолошка активност комплекса у највећој мери зависи од комплексирајуће супстанце [87]. Због тога је избор лиганда верованто најзначајнији корак у синтези потенцијалног лека. Аминокиселине преко својих донорских атома лако формирају координативно-ковалентне везе са прелазним металима [32]. Иако се  $\beta$ -аминокиселине структурно незнатно разликују од  $\alpha$ -аминокиселина, њихова заступљеност у природи је мања и слабије су проучене. Након потврђене биолошке активности, установљене стабилније секундарне структуре  $\beta$ -пептида и улоге у фармакотерапији, расте и интересовање за испитивање ових аминокиселина [133]. Досадашња сазнања и развој метода за њихову синтезу чини их погодним лигандом за координовање са бакар(II)-јоном уз потенцијал за значајну биолошку активност и нижу токсичност комплекса.

### 5.1. Синтеза и карактеризација $\beta^2$ -аминокиселина

Лиганди који су коришћени при синтези комплексних једињења су деривати  $\beta$ -аминокиселина [2]. Могу се класификовати у  $\beta^2$ -аминокиселине, јер садрже супституисану циклохексил групу на другом угљениковом атому. Да би се уврстиле у категорију цикличних  $\beta$ -аминокиселина потребно је да имају amino и карбоксилну функционалну групу као супституенте на карбоцикличном прстену или amino групу која улази у састав прстена [3], што овде није случај. Једињења овог типа су често оптички активна, што представља један од проблема приликом селективне енантиомерне синтезе, међутим ови лиганди нису садржали хирални угљеников атом. Синтетисани су Родионовом реакцијом у којој је полазна компонента био циклохексанон, односно *terc*-бутилциклохексанон са приносом који је приближан очекиваном [6].

Нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија и инфрацрвена спектроскопија коришћене су да потврде претпостављену структуру синтетисаних аминокиселина.



Сигнали  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  у NMR спектрима оба лиганда се јављају на очекиваним вредностима ppm за циклоалканске, алканске (Л2) и карбоксилне групе [134]. NMR спектри лиганда (Л1) су у сагласности са спектром синтетисане  $\beta$ -аминокиселине Родионовом реакцијом [6], док се код Л2 јављају незнатна одступања у вредности ppm за  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  сигнале на истим позицијама (Табела 7) и додатни сигнали, један у  $^1\text{H}$  и два у  $^{13}\text{C}$  NMR спектру, који потичу од *tert*-бутил групе.  $^1\text{H}$  NMR спектри оба лиганда показују да се сигнали свих протона везаних за  $sp^3$  хибридизоване C атоме налазе на вредностима очекиваног хемијског померања од 0-2 ppm, осим протона на положају 2. где се због негативног индуктивног утицаја карбоксилне групе јавља сигнал на вишој вредности ppm. У протонским спектрима лиганда не уочавају се сигнали на око 12 ppm, на основу чега се може претпоставити да је карбоксилна група лиганда депротонувана. До највећег хемијског померања у  $^{13}\text{C}$  NMR спектру доводе C атом из карбоксилне групе (177,3 ppm), што је очекивано с обзиром на електронегативност C атома. Хемијски еквивалентни C и H атоми (по два пара на циклохексану оба лиганда и три еквивалентна C атома на *tert*-бутил групи Л2 као што се и очекивало показују исто хемијско померање.

## 5.2. Синтеза, карактеризација и стабилност раствора комплекса бакар(II) са $\beta^2$ -аминокиселинама

Након дисосовања соли, бакар(II)-нитрата трихидрата у воденом раствору очекује се да при додатку раствора лиганда бакар(II)-јон веже две аминокиселине, односно да се реакција одвија у молском односу 1:2. При додатку лиганда у реакциону смешу је у малим количинама додат и раствор литијум-хидроксида како би се услед повећања рН вредности омогућило боље депротоновање карбоксилних група у аминокиселинама. У светлу Пирсонове класификације може се очекивати координовање јона метала са донорским атомима азота и кисеоника из лиганда. Досадашње синтезе указују да бакар(II)-јон гради четири координативно-ковалентне везе са два лиганда, односно координује се преко атома азота из амино групе и преко атома кисеоника из карбоксилне функционалне групе одговарајуће аминокиселине. У зависности од природе лиганда, односно од његове поларизабилности која диктира јачину лигандног поља зависи и да ли ће неки тетракоординовани бакар(II)-јон да гради квадратно-планарне или тетраедарске комплексе [29]. Поред очекиване квадратно-планарне структуре, могу се јавити и геометријске структуре са координационим бројем 5 и координационим бројем

6, ако је дошло до координовања молекула растварача, воде у аксијалним положајима [33].

Како би се потврдила претпостављена структура синтетисаних комплекса урађена је карактеризација елементалном микроанализом и IR спектроскопијом. Резултати елементалне микроанализе за синтетисане комплексе (**K1** и **K2**) показују незнатна одступања од очекиваних вредности (Табела 6). Међутим, на основу само ових анализа не може се са сигурношћу утврдити структура комплексног једињења и начин координовања. У циљу детаљнијег утврђивања начина координовања деривата β-аминокиселина (**L1** и **L2**) за централни јон метала снимани су инфрацрвени спектри. На основу асиметричних валенционих вибрација карбоксилних група може се утврдити постојање координативно-ковалентних веза. Уколико је координовање остварено преко карбоксилних група очекују се апсорпционе траке у области 1600-1650  $\text{cm}^{-1}$ , а ако није дошло до координовања са бакар(II)-јоном апсорпционе траке су у области 1700-1750  $\text{cm}^{-1}$  [135]. Све апсорпционе траке комплекса **K1** и **K2** налазе се у средњој (основној) инфрацрвеној области утврђеној према врсти енергетских прелаза. Утврђено је постојање двоструких, оштрих и јаких трака (1650-1570  $\text{cm}^{-1}$ ) код оба комплексна једињења које потичу од асиметричних фреквенција истезања карбоксилних група преко којих су β-аминокиселине координоване за јон метала. Инфрацрвени спектри комплексних једињења потврђују координовање бидентатних лиганата и преко атома азота. Асиметричне фреквенције истезања примарне амино групе забележене су на 3375  $\text{cm}^{-1}$  код **K1** и на 3369  $\text{cm}^{-1}$  код **K2**. Иако се код некоординованих β-аминокиселина појављују сигнали протоноване амино групе на 2944  $\text{cm}^{-1}$  код **L1** и на 2954  $\text{cm}^{-1}$  код **L2**, бакар(II)-комплекси не показују такве трака. Начин координовања лиганата (**L1** и **L2**) са бакар(II)-јоном није могуће са сигурношћу утврдити само на основу IR спектроскопије. IR спектри комплекса (**K1** и **K2**) не обухватају област далеког инфрацрвеног зрачења (400-100  $\text{cm}^{-1}$ ) која пружа информацију о вибрацијама молекула који садрже тешке атоме. У овој области би се могле очекивати вибрације које потичу од Cu-O и Cu-N координативних веза. Фреквенце истезања M-N и M-O првенствено зависе од метала, док ће промена аминокиселине имати незнатан утицај. Установљено је да се при координовању са истом аминокиселином фреквенца повећава од Ni(II) до Pt(II) (Ni(II) < Cu(II) < Pd(II) < Pt(II)). При координовању глицина за бакар(II)-јон у средњем инфрацрвеном спектру може се уочити сигнал на око 480  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$  Cu-N), а фреквенца од Cu-O се појављује у региону далеког инфрацрвеног зрачења, на око 330  $\text{cm}^{-1}$  [34]. С обзиром да вибрације које потичу од координативних веза зависе од

врсте метала, може се претпоставити да сигнали на  $482\text{ cm}^{-1}$  (**K1**) и  $485\text{ cm}^{-1}$  (**K2**) потичу од Cu-N, док се фреквенце Cu-O не могу уочити у средњем инфрацрвеном спектру.

EPR спектроскопија је погодна метода за карактеризацију бакар(II)-комплекса. Ова метода је аналогна NMR спектроскопији, која се због парамагнетних карактеристика комплекса **K1** и **K2** није могла применити. Језгро  $\text{Cu}^{29}$  има атомски моменат и нуклеарни спин од  $3/2$ . Особине јона бакра омогућавају лако разрешавање структуре његових комплекса у 4 линије спектра. Вредност g фактора добијена методом служи за процену структуре комплекса. У тетраедарској и квадратно-планарној структури неспарени електрони се налазе у  $d_{x^2-y^2}$  орбиталама дајући 2B1g као основно стање са групама  $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,0023$  [136]. EPR спектри комплекса **K1** и **K2** забележени у воденом раствору и при собној температури указују на квадратно-планарну геометријску структуру.

У случају квадратно-планарног распореда лиганата око централног јона метала два лиганда или два донорска атома у случају хелатног система налазе се на оси x, а два на оси y. Укупна енергија цепања d-орбитала код квадратно-планарне геометрије већа је него код октаедарске координације:  $\Delta_{\text{kvadr}} = 1,3 \Delta_{\text{okt}}$  [27]. Квадратно-планарна структура бакар(II)-комплекса укључује минорне интеракције дуж z-осе на растојању реда величине  $> 3,0 \text{ \AA}$  и јавља се код комплекса бакра(II) са монодентатним и бидентатним хелатним лигандима [137].

Најпоузданијом методом за карактеризацију структуре, рендгенском структурном анализом, утврђено је да је комплекс **K1** неутрални комплексни молекул који се састоји из централно постављеног бакар(II)-јона и два бидентатна лиганда. Углови веза измерених између атома који учествују у формирању координативно-ковалентних веза одступају од угла од  $90^\circ$  (Табела 9), тако да је комплекс неправилне квадратно-планарне структуре. Очекивана разлика у дужини веза између Cu-O и Cu-N (Табела 10) може се образложити краћим ковалентним радијусом атома кисеоника у односу на атом азота. Дужина координативно-ковалентних веза у комплексу **K1** је приближна дужини веза код дванаест бакар(II)-комплекса са различитим  $\beta$ -аминокиселинама пронађеним у бази кристалних структура, Cambridge Structural Database (CSD) [138]. Међутим, само један комплекс бакар(II)-јона и  $\beta$ -аминокиселине је квадратно-планаран као и **K1**, док се број координованих лиганата у осталим комплексима повећава углавном због координовања молекула растварача. Комплекс са  $\beta$ -аланином, осим што има исту геометријску структуру и координује се преко кисеоника из депротоноване карбоксилне групе и азота из амино групе формирајући *transOtransN* геометријски изомер што је карактеристично

и за **K1** комплекс. Установљено је чешће формирање *trans*-изомера, осим код комплекса са  $\beta$ -аминобутанском киселином који је *cis*-изомер октаедарске структуре са молекулима воде координованим у аксијалним положајима и бинуклеарног комплекса бакар(II)-јона и  $\beta$ -аланина. У бинуклеарном комплексу  $\beta$ -аланин се координује преко атома азота и оба атома кисеоника из депротонване карбоксилне групе. Преко другог кисеоника успоставља се координовање за други бакар(II)-јон. Други бидентатни комплекс поред аспарагинске киселине садржи 1,10-фенантролин и нитрито лиганд. Аспарагинска киселина преко кисеоника из карбоксилне групе бочног низа повезује два бакар(II)-јона. У бази кристалних структура комплекса бакар(II)-јона и  $\beta$ -аминокиселина забележена су и два тринуклеарна комплекса. Један тринуклеарни комплекс се екваторијалним везама повезује за  $\beta$ -аланин, док је код другог комплекса преко азота и кисеоника из непротонване карбоксилне групе за бакар(II)-јон координован  $\beta$ -аспартат. И поред могућности формирања полинуклеарних комплекса и аксијалног координовања растварача или донорског атома из бочног низа аминокиселине [138], комплекс **K1** је мононуклеарне структуре стабилизоване са три молекула воде преко водоничних веза. Обзиром да је лиганд **L2** структурни аналог лиганда **L1** може се очекивати и да комплекс **K2** има сличну структуру комплексу **K1**.

У UV-Vis спектрима раствора комплексних једињења нису забележене промене у апсорпцији током времена (0-48h). Комплекси остају стабилни у сва три коришћена растварача (Слике 21 и 22).

### 5.3. Интеракција комплекса са ДНК молекулом

Након карактеризације синтетисаних комплекса и испитивања њихове стабилности у различитим медијумима, проучаване су могућности интеракција са молекулима ДНК и потенцијална биолошка активност. С обзиром да је ДНК најчешће место дејства већег броја комплексних једињења као антиканцерогених агенаса [43], вршена су испитивања интеракције ДНК фрагмената са синтетисаним комплексима (**K1** и **K2**).

На основу досадашњих истраживања могло се претпоставити да ће синтетисани комплекси успоставити нековалентни тип интеракције са молекулом ДНК. Кинетичким мерењима је процењено постојање интеракција комплекса и ДНК. Како би се утврдило да ли је нековалентна интеракција електростатичког типа, интеркалативно везивање или жлеб везивање примењене су UV-Vis спектрофотометријске и флуоресцентне

спектроскопске методе, као и мерење вискозитета раствора ДНК молекула и присуству различитих концентрација комплекса [124,139]. Резултати истраживања показују да исти молекул, потенцијални лек, може остварити интеракцију и на више начина [43]. Због добијања што примењивијих резултата који би могли да укажу на евентуално понашање синтетисаних комплекса у *in vivo* условима, мерења су извођена при подешеној рН вредности и температури, а улогу биолошких нуклеофила имали су СТ-ДНК и НТ-ДНК.

Вредности константи брзине (Табела 12) показују постојање интеракције између синтетисаних комплекса и нуклеофила при прилагођеним физиолошким условима. Нешто ниже вредности константе за **K2** вероватно су последица стерних сметњи при интеракцији.

UV-Vis апсорпциона спектрофотометрија је најједноставнија и најчешће коришћена техника за процену интеракције лек-ДНК [124,139]. У UV-Vis апсорпционом спектру ДНК јавља се широк опсег 200-350 nm у UV регији са максимумом апсорпције на 260 nm. Карактеристичан максимум је последица електронских транзиција хромофорских група пуринских и пиримидинских база. С обзиром на високу вероватноћу ових прелаза моларна апсорпција је реда величине око  $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Моларна концентрација ДНК се овом техником одређује при мерењу апсорбанце на 260 nm таласне дужине, а односи апсорпције  $A_{260}/A_{280}$  и  $A_{260}/A_{230}$  могу да опишу чистоћу ДНК. Да је ДНК ослобођена од протеина и погодна за процену интеракције са потенцијалним леком говори однос који је у опсегу од 1,8-1,9. СТ-ДНК и НТ-ДНК нису садржале протеине и њихова измерена концентрација на 260 nm износи  $6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [139]. Промене у спектрима слободне ДНК и раствора ДНК и неке друге супстанце могу да укажу на постојање и тип интеракције. Било која промена у секундарној структури дволанчаног хеликса ДНК настала под утицајем неког другог молекула се у спектру може манифестовати у виду хиперхромног ефекта (повећање интензитета апсорпције или хипохромног ефекта (смањење интензитета апсорпције). Хипохромизам се јавља у случају када се секундарна структура молекула ДНК стабилизује електростатичким везивањем или интеркалацијом са другим молекулом, док се хиперхромизам јавља услед дестабилизације секундарне структуре [124,139]. Значајно хиперхромно померање са појавом нових сигнала се уочава у UV-Vis спектрима (Слика 24) што јасно указује на јаку интеракцију између комплекса (**K1** и **K2**) и ДНК молекула. Молекули који са ДНК остварују интеракцију интеркалацијом обично у спектру показују хипохромизам и црвено померање [124,139]. Интеркалаторни режим укључује интеракцију ароматичних

хромофора базних парова и интеркалатора при чему се смањује електронска транзиција [139]. Интензитет интеркалације је обично у сагласности са обимом хипохромизма. У типичном случају интеркалације у спектру се јавља хипохромизам већи од 35% и батохромни помак (помак максимума апсорпције према већим таласним дужинама) од 15 nm, док је у случају везивања за жлеб око 6-8 nm или без батохромизма [124]. Максимум апсорпције при интеракцији ДНК молекула са **K1** и **K2** налазио се у распону од 258 до 266 nm таласне дужине. Дестабилизација и нарушавање секундарне структуре ДНК хеликса углавном воде ка појави хиперхромизма, који је посебно изражен након денатурације ДНК молекула. Водоничне везе између базних парова ограничавају резонанцију ароматичног прстена, па је апсорпција ДНК ограничена. Раскидањем водоничних веза и раздвајањем пуринских и пиримидинских база повећавају се електронске транзиције и апсорпција ДНК. Хиперхромизам може бити последица интеракције која доводи до делимичног отварања структуре хеликса. Могућа је појава овог ефекта услед електростатичког привлачења катјонског дела комплекса и фосфорне групе ДНК молекула која узрокује нарушавање секундарне структуре. Хиперхромизам се најчешће јавља при везивању за жлеб и при ковалентним интеракцијама [139].

Вредности константе везивања су реда величине изнад  $10^5$  за оба комплекса (Табела 16) и сугерише да се интеракција комплекса **K1** и **K2** са фрагментима ДНК може остварити и интеркалацијом. Нешто нижа вредност ове константе за **K2** у односу на **K1** се може објаснити стерним сметњама које проузрокују *terc*-бутил групе и тако смањују интеракцију.

Флуоресцентна спектроскопија је због високе осетљивости и селективности посебно погодна метода за одређивање интеракције одређеног једињења са молекулом ДНК [124,139]. Највећи интензитет флуоресценције показују једињења која садрже ароматични прстен у свом саставу, али и једињења која садрже алицикличне и алифатичне карбонилне структуре или конјуговане диенске системе [139]. Постоји већи број различитих метода које се заснивају на флуоресцентној спектроскопији и користе се да одреде тип интеракције комплекса и ДНК молекула. Једна од примењивих метода се заснива на примени EtBr [124,139]. Резултати показују значајно смањење интензитета флуоресценције са приметним црвеним померањем (Слика 25), што указује да је EtBr ослобођен из EtBr-ДНК комплекса и замењен синтетисаним комплексом (**K1/K2**). С обзиром да се EtBr понаша као интеркалатор, може се рећи да је то један од начина интеракције и комплексних једињења (**K1** и **K2**) са ДНК молекулом. Промена у интензитету флуоресценције се може користити за процену степена интеракције.

Уколико би се комплекс везао на површини ДНК молекула, без интеркалације, промене у флуоресцентном спектру би биле незнатне [124,139]. Резултати показују да су оба комплекса (**K1** и **K2**) довела до смањења интензитета флуоресценције која је у сагласности са вредностима Стерн-Волмерове константе и додатан је показатељ везивања комплекса за ДНК.

Мерење вискозитета је веома значајна техника за одређивање начина везивања потенцијалног лека за ДНК молекула. Због изузетне осетљивости ова хидродинамичка метода се сматра једном од најуспешнијих. Интеракција егзогеног молекула (комплексног једињења) са ДНК може да доведе до промене у дужини ДНК хеликса. Интеракције које проузрокују савијања молекула ДНК и његовог скраћивања, као што је случај при ковалентном везивању *цисплатине*, доводе до смањења релативног вискозитета. При везивању интеркалатора за хеликс, базе се удаљавају и продужава се ДНК молекула, односно долази до повећања вискозитета. Незнатно повећање вискозитета јавља се и при жлеб везивању, док површинско везивање комплекса за молекула ДНК нема утицај на промену релативног вискозитета [124]. Мерење вискозитета синтетисаних комплекса (**K1** и **K2**) спроведено је са циљем да се потврди вероватна интеркалација ових комплекса у ДНК хеликс. Повећање релативног вискозитета при додавању комплекса у раствор ДНК (Слика 26) сугерише да су оба комплекса интеркалатори који се у оквиру хеликса везују у аксијалним положајима размичући притом суседне базе и продужавајући молекула ДНК. Промена вискозитета је у складу са јачином интеракције, која је израженија при додатку комплекса **K1**. Ови резултати су у складу са вредностима константи добијених спектроскопским методама и вероватно је мања промена релативног вискозитета код **K2** последица слабије интеракције услед стерних сметњи алкил група.

Резултати истраживања углавном показују да се интеракција бакар(II)-комплекса са молекулом ДНК врши на више различитих начина. Комплекси бакар(II) са мешовитим лигандима ( $[\text{Cu}(\text{SalCl-Gly})(\text{bipy})] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Cu}(\text{SalCl-Gly})(\text{H}_2\text{O})_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{SalCl-Ala})(\text{H}_2\text{O})]$ ), су показали потенцијал за оксидативно цепање ДНК молекула у присуству водоник-пероксида. Њихове константе везивања су мање од константе везивања класичног интеркалатора. Једино је  $[\text{Cu}(\text{SalCl-Gly})(\text{bipy})] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$  комплекс са највећом вредношћу константе везивања и највећим повећањем вискозитета окарактерисан и као интеркалатор. Бољу интеркалацију овог комплекса у односу на остале дало је увођење 2,2'-бипиридинског лиганда [140]. Константа везивања

комплекса који садржи фенилаланин,  $[\text{Cu}(\text{HPBM})(\text{l-Phe})(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{ClO}_4$ , износи  $7,38 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  и интеракцију са ДНК остварује преко малог жлеба [141]. Тернарни комплекси у којима је један од лиганда нека аминокиселина најчешће показују интеркалацију са ДНК молекулом што је у складу и са резултатима овог истраживања [122]. Иако је константа везивања мања од  $10^6$ , што је случај и при интеракцији комплекса **K1** и **K2**, променом у интензитету флуоресценције и повећање вискозитета раствора ДНК указују на овај тип интеракције. Кординациона сфера је важна за интеракцију са ДНК, тако да су тернарни комплекси са аминокиселинама показали бољу супституцију са ДНК, од оних чија структура није квадратно-планарна [142].

Вредности израчунатих константи за **K1** и **K2** указују да ови комплекси имају добар афинитет за интеракцију са СТ-ДНК и НТ-ДНК. Боља интеракција комплекса **K1** у односу на комплекс **K2** је вероватно последица стерног ефекта *terc*-бутил групе у **K2**. У одређеној мери је забележена боља интеракција оба комплекса са НТ-ДНК, што може бити последица веће процентуалне заступљености гуанина у НТ-ДНК.

#### 5.4. Антитуморска активност

До сада је синтетисан, окарактерисан и биолошки испитан велики број комплекса јона бакра који су показали различиту антитуморску активност у поређењу са *цисплатином*, што указује да су различити механизми укључени у остваривању антиканцерогеног потенцијала [43].

Резултати који указују на интеракције **K1** и **K2** са СТ-ДНК и НТ-ДНК дали су подстицај да се испита њихова токсичност на три мишије ћелијске линије карцинома (4Т1, СТ26, LLC1) МТТ методом. Комплекси су растворени у DMSO, а бланко узорци који су узети као контрола садржали су исту процентну концентрацију DMSO као и раствори комплекса. Због стабилности коју су комплекси показали у раствору DMSO и пуферском систему није додатно проучаван самостални утицај повећане концентрације бакар(II)-јона који би настао услед потпуне дисоцијације комплексног једињења.

Ћелије карцинома дојке (4Т1) су веома агресивне туморске ћелије. Због честе клиничке заступљености и метастатског потенцијала који је посебно отпоран на терапију, представљају погодан избор за испитивање нових фармакотерапеутика [143]. Комплекси **K1** и **K2** готово да не показују цитотоксично дејство на 4Т1. Комплекси бакра(II) који су садржали изомерне дипептиде изграђене од  $\alpha$ -аминокиселина (аланина



и фенилаланин) показали су бољи цитотоксични ефекат у поређењу са цитотоксичношћу комплекса **K1** и **K2**. Оба пептидна комплекса показују сличну ефикасност према 4Т1 ћелијама, са минималном токсичношћу према нетуморским ћелијама (фибробластима) у односу на *цисплатину* [144]. Комплексни молекул бакар(II)-јона који као фармакофорну групу садржи 1,4-диоксо-2-бутенил делује цитотоксично и генотоксично на 4Т1 ћелије и при *in vivo* примени. Оштећење ДНК молекула и повећање АТМ и p21 експресије, које изазива овај комплекс, доводи до заустављања ћелијског циклуса у G1 фази. До смрти 4Т1 ћелија долази апоптозом која настаје услед повећане експресије ВАХ и каспазе 7 и смањене експресије ВСL-2 гена. Цитотоксичност овог молекула ( $IC_{50} = 63,3 \mu\text{g/mL}$ , 72h) [145] је мања од *цисплатине*, али значајно већа од оне коју су показали комплекси **K1** и **K2** (Табела 17). Arindam Pramanik и сарадници су проучавали *in vivo* ефикасност бакар(II)-комплекса са дикето лигандом при циљаној испоруци до 4Т1 ћелија. Установљено је да комплекс доводи до стварања реактивних врста кисеоника које изазивају оштећење ДНК молекула, као и деполаризацију митохондријалне мембране. Канцерогене ћелије умиру апоптозом која настаје услед оштећења митохондрија. Мишеви који су примали циљану испоруку бис(2,4-пентандион)бакар(II)-комплекса имали су већу стопу преживљавања и смањен волумен тумора у поређењу са неспецифичном испоруком лека [146].

На туморским ћелијама карцинома колона, СТ26, комплекс **K2** при нижим концентрацијама показује бољу активност у поређењу са *цисплатином*. Оба комплекса доводе до апоптозе туморских ћелија са израженим повећањем броја изумрлих ћелија у касној апоптози (Слика 28). Значајан цитотоксични ефекат на СТ26 ћелије забележен је и при примени комплекса бакар(II)-јона и метотрексата као лиганда. Комплексно једињење показује бољу ефикасност од  $\text{CuCl}_2$ , лиганда и *цисплатине* у прва 4 сата од периода инкубације. После 24 сата цитотоксични ефекат се значајно смањује, али су  $IC_{50}$  вредности комплекса и даље мање од  $IC_{50}$  вредности *цисплатине* [147]. Бинуклеарни комплекси бакар(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине нису показали значајну антитуморску активност према СТ26 ћелијским линијама, док је њихов ефекат био значајно бољи према хуманим ћелијама карцинома колона, НСТ-116 [148].

Од испитиваних ћелијских линија највећу осетљивост према синтетисаним комплексима показале су ћелије карцинома плућа, LLC1. Значајно висок цитотоксични потенцијал према овим ћелијама остварује комплекс **K2**.

И поред сталне потраге за развојем нових комплекса бакра(II) који ће показати значајну ефикасност према туморским ћелијама уз мању токсичност, још увек нема

довољно података о *in vivo* истраживањима [43]. Volos и сарадници проучавали су *in vivo* активност комплекса бакара(II) са цијано и супституисаним цијано-дителиолато лигандима. Запажено је да повећање антитуморске активности није повезано са повећањем липофилности комплекса, већ са поларношћу тетраедарских и квадратно-планарних геометријских структура и електростатичким интеракцијама. Као најбољи антилеукемични агенс из ове серије комплекса показао се комплекс са тиазол/дителиолатним лигандима [149]. „Casiopéinas” је серија комплекса бакар(II)-јона и мешовитих хелатних лиганата са N,N и N,O донорским атомима од којих су неки показали обећавајућу *in vivo* активност на ћелијама колоректалног тумора [150].

Углавном су комплекси који остварују бољу интеракцију са молекулом ДНК показали и значајнији антиканцерогени потенцијал. Из серије комплекса са аминокиселинама, једино је  $[Cu(SalCl-Gly)(bipy)] \cdot 0,5H_2O$  имао улогу интеркалатора. Овај комплекс је показао и највећу инхибицију преживљавања ћелија хуманог хепатоцелуларног карцинома јетре и хуманих ћелија карцинома плућа [140]. За комплексни молекул,  $[Cu(HPBM)(l-Phe)(H_2O)] \cdot ClO_4$  установљено је да антитуморску активност, поред интеракције са ДНК преко малог жлеба, остварује и повећаним стварањем реактивних врста кисеоника. Вредности  $IC_{50}$  варирају у зависности од ћелијске линије и крећу се од  $5,7 \pm 0,1$  до  $8,3 \pm 0,6 \mu M$ , а апоптоза је забележена код Еса-109 ћелија [141].

Резултати антитуморске активности синтетисаних комплекса (**K1** и **K2**) нису били у сагласности са резултатима добијеним при испитивању интеракције комплекса и ДНК молекула. И поред јаче интеракције са СТ-ДНК и НТ-ДНК, комплекс **K1** је показао слабији цитотоксични потенцијал од **K2** на свим испитиваним ћелијским линијама. Ови резултати могу да укажу да комплекс **K2** антитуморски ефекат остварује и додатним механизмом, а не само дејством на ДНК.

### 5.5. Антимикробна активност

Антимикробна активност синтетисаних бакар(II)-комплекса испитана је на 20 различитих врста бактерија и гљива. Иако је познато да само повећање концентрације бакар(II)-јона у ћелији микроорганизама може да доведе до њене смрти, овај утицај није посебно праћен. Пре растварања комплекса у DMSO и припреми за микродилуциону методу, испитана је њихова стабилност у овом растварачу и утврђено је да не долази до

нарушавања структуре комплекса. На овај начин је покушано да се искључи антимикуробни утицај самог бакар(II)-јона и добијени резултати интерпретирају као антимикуробна активност **K1** и **K2** комплекса. С обзиром да се зна да неке природне, цикличне β-аминокиселине показују антигљивично дејство, одређиване су вредности МИК и ММК лиганата.

Мононуклеарни и бинуклеарни комплекси бакра(II) координовани преко кисеоника из карбоксилне функционалне групе показују различите антимикуробне активности. Неки бинарни и тернарни комплекси бакра(II) делују на бактерије боље од контроле, тетрациклина [151]. Бинуклеарни комплекси овог јона метала са лигандом који садржи карбоксилну групу показују значајну антибактеријску активност према *S. aureus* [152], док је код мононуклеарних комплекса антимикуробна активност била селективна и умерена [153-157]. Као и у овом истраживању, мононуклеарни комплекси показују бољу антимикуробну активност од лиганата, али је ова активност и даље мања од позитивних контрола или комплекса других метала са сличним лигандима [158-160]. Изузетак је истраживање које је показује да је антибактеријска активност бакар(II)-комплекса значајно боља од комплекса других метала са истим лигандима. Такође је забележено да неки мононуклеарни комплекси нису показали антимикуробну активност за разлику од њихових лиганата [161].

Комплекси бакра(II) са аминокиселинама (глицином и фенилаланином) при концентрацији од 20 mg/ml нису показали значајну антимикуробну активност за разлику од комплекса кадмијума и кобалта са истим лигандима и при истој концентрацији. Једињење код кога је забележена највећа зона инхибиције је Na[Cd(Phe)<sub>3</sub>], а затим Na[Co(Phe)<sub>3</sub>] и Na[Co(Gly)<sub>3</sub>]. Комплекс кадмијума са фенилаланином је показао већу активност према Грам-позитивним бактеријама (*S. aureus* и *B. subtilis*) и према гљивама (*C. albicans*) од контроле, акрифлавина, док су комплекси кобалта били ефикаснији према Грам-негативној бактерији (*P. aeruginosa*) [162]. Комплекси бакра(II) и кобалта(II) са аминокиселинама ([Cu(L)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O] и [Co(L)<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O], L-аминокиселина) су показали знатно бољу активност према Грам-позитивним бактеријама (*Bacillus cereus* и *Micrococcus luteus*) у односу на *E. coli*. Вредности пречника инхибиције су варирали од 0 до 30 mm у зависности од бактеријског соја и аминокиселине која је коришћена за комплексирање са јоном метала. Генерално су бољу активност показали комплекси са леуцином и хистидином, умерену са метионином и фенилаланином, а мању са лизином и валином [163]. Антимикуробна активност тернарних комплекса бакра(II) ([Cu(ATS)(A)], ATS-2-аминометилтиофенил-4-бромсалицилалдехид, А-глицин, аланин,

валин)) испитана је на Грам-позитивним (*S. epidermidis* и *B. cereus*) и Грам-негативним (*E. coli* и *P. aeruginosa*) бактеријама и гљивама (*A. niger* и *A. fumigatus*). Најбољу антимикробну активност показује комплекс са валином, док је најслабија активност забележена код комплекса са глицином, што се може повезати са њиховом липофилношћу [110]. Утицај прелазног металног јона је испитан координовањем трицина и хистидина са различитим прелазним металима (бакар(II), цинк(II) и кобалт(II)). Грам-позитивне бактерије показују већу осетљивост у односу на Грам-негативне бактерије што се може повезати са грађом ћелијског зида. Генерално, највећу активност показује комплекс са багром, док је комплекс са кобалтом показао најмању активност [164].

Иако су  $\beta$ -аминокиселине производи метаболизма неких микроорганизама, запажено је да деривати цикличних  $\beta$ -аминокиселина могу деловати антимикробно. Међутим, самостална примена лиганата (**Л1** и **Л2**) у овом истраживању није показала значајан антимикробни потенцијал. Ниска и селективна антимикробна активност коју су показали комплекси **К1** и **К2** вероватно је последица њихове смањене липофилности, због слабије хелатизације (квадратно-планарне геометријске структуре). С обзиром на N и O донорске атоме може се претпоставити да се антимикробна активност остварује инхибицијом ензимске активности у микроорганизму. Међутим, због ниског антимикробног потенцијала синтетисаних комплекса механизам њиховог дејства у бактеријској и ћелији гљиве није додатно испитиван.



## **6. ЗАКЉУЧАК**

На основу добијених резултата у овој Докторској дисертацији могу се извести следећи закључци:

Карактеризација комплекса бакра(II) са 2-(1-аминоциклохексил)сирћетном киселином (**K1**) и комплекса бакра(II) са 2-(1-амино-4-(*terc*-бутил)циклохексил)сирћетном киселином (**K2**):

- Састав синтетисаних комплекса је потврђен на основу резултата елементалне микроанализе који су у сагласности са израчунатим вредностима процентуалне заступљености угљеника, водоника и азота.
- У IR спектрима уочавају се карактеристичне траке које одговарају структури комплекса **K1** и **K2**.
- Резултати EPR спектроскопије указују да оба комплекса у воденом раствору имају квадратно-планарну геометријску структуру.
- Рендгенском структурном анализом установљено је да се координативно-ковалентна веза бакар(II)-јона и 2-(1-аминоциклохексил)сирћетне киселине остварује преко атома кисеоника из депротонованих карбоксилних група и преко атома азота из амино група у *transOtransN* положају, формирајући неутрални комплексни молекул (**K1**) квадратно-планарне структуре.

Интеракција синтетисаних комплекса са молекулом ДНК:

- Вредности константи брзине другог реда,  $k_2$  показује да долази до формирања производа при реверзибилној реакцији супституције комплекса **K1** и **K2** са СТ-ДНК и НТ-ДНК. Комплекс **K1** лакше подлеже реакцијама супституције у поређењу са комплексом **K2**, што је вероватно последица стерних утицаја *terc*-бутил групе.
- UV-Vis титрациони спектри и вредности константи везивања,  $K_b$  указују на интеракцију комплекса **K1** и **K2** и молекула ДНК.
- Значајно смањење интензитета флуоресценције са приметним црвеним померањем указује да је EtBr ослобођен из EtBr-ДНК комплекса и замењен синтетисаним комплексом (**K1/K2**). С обзиром да се EtBr понаша као интеркалатор, може се рећи да је то један од начина интеракције и комплексних једињења (**K1** и **K2**) са ДНК молекулом.

- Повећање релативног вискозитета при додавању **K1/K2** у раствор ДНК сугерише да су оба комплекса интеркалатори који размичу суседне базе и продужавају молекулу ДНК.

Антитуморска активност синтетисаних комплекса:

- **K1** и **K2** показују релативно низак цитотоксични ефекат на мишјим ћелијама карцинома дојке, умерен ефекат на ћелије карцинома колоне и релативно високу цитотоксичност према ћелијама карцинома плућа.
- Комплексна једињења индукују апоптозу ћелија карцинома колоне и при нижим концентрацијама имају бољу активност од *цисплатине*.
- Комплекс **K1** је показао јачу интеракцију са СТ-ДНК и НТ-ДНК од **K2**, али слабији цитотоксични потенцијал на свим испитиваним ћелијским линијама. Ови резултати могу да укажу да интеракција са ДНК није једини механизам за испољавање антитуморског ефекта комплекса **K2**.

Антимикробна активност синтетисаних комплекса:

- **K1** и **K2** испољавају ниску и селективну антимикробну активност која је вероватно последица њихових слабих липофилних карактеристика.
- Између Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија није било разлике у осетљивости на испитиване супстанце, а најбољу антимикробну активност показује комплекс **K2** на *P. aeruginosa*.



## **7. ЛИТЕРАТУРА**



1. Petrović SD, Mijin DŽ, Stojanović ND. Hemija prirodnih organskih jedinjenja, Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd; 2009.
2. Barrett GC, Elmore DT. Amino Acids and Peptides. Cambridge: Cambridge University Press; 1998.
3. Juaristi E, Soloshonok VA. Enantioselective Synthesis of Beta-Amino Acids. Vol. 2<sup>nd</sup> ed. Hoboken, N.J.: Wiley-VCH; 2005.
4. Weiner B, Szymanski W, Janssen DB, Minnaard AJ, Feringa BL. Recent advances in the catalytic asymmetric synthesis of beta-amino acids. Chem Soc Rev. 2010; 39(5): 1656-91.
5. Weiner, B. New Methods towards the synthesis of beta-amino acids [Groningen]: University of Groningen, 2009.
6. Lebedev A, Lebedeva A, Sheludyakov V, Kovaleva E, Ustinova O, Kozhevnikov I. Competitive Formation of  $\beta$ -Amino Acids, Propenoic, and Ylidenemalonic Acids by the Rodionov Reaction from Malonic Acid, Aldehydes, and Ammonium Acetate in Alcoholic Medium. Russ J Gen Chem. 2005; 75(7): 1113-24.
7. Liljeblad A, Kanerva L. Biocatalysis as a profound tool in the preparation of highly enantiopure  $\beta$ -amino acids. Tetrahedron. 2006; 62(25): 5831-54.
8. Tasnádi G, Forró E, Fülöp F. An efficient new enzymatic method for the preparation of  $\beta$ -aryl- $\beta$ -amino acid enantiomers. Tetrahedron Asymmetry. 2008; 19(17): 2072-7.
9. Liu YT, Feng L, Yin DW. Synthesis and characterization of novel  $\beta$ -amino acid derivatives. Res Chem Intermed. 2013; 39(3): 875-80.
10. Özcan S, Senyuva HZ. Improved and simplified liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry method for the analysis of underivatized free amino acids in various foods. J Chromatogr A. 2006; 1135(2): 179-85.
11. Luque GL, Ferreyra NF, Rivas GA. Electrochemical sensor for amino acids and albumin based on composites containing carbon nanotubes and copper microparticles. Talanta. 2007; 71(3): 1282-87.
12. Zen JM, Hsu CT, Senthil Kumar A, Lyuu HJ, Lin KY. Amino acid analysis using disposable copper nanoparticle plated electrodes. Analyst. 2004; 129(9): 841-5.
13. Cheng RP, Gellman SH, DeGrado WF.  $\beta$ -Peptides: From Structure to Function. Chem Rev. 2001; 101(10): 3219-32.
14. Beke T, Somlai C, Perczel A. Toward a Rational Design of beta-Peptide Structures. J Comput Chem. 2006; 27(1): 20-38.

15. Seebach D, Overhand M, Kuehnle F, Martinoni B, Oberer L, Widmer H, et al.  $\beta$ -Peptides: Synthesis by Arndt-Eistert Homologation with Concomitant Peptide Coupling. Structure Determination by NMR and CD Spectroscopy and by X-Ray Crystallography. Helical Secondary Structure of a  $\beta$ -Hexapeptide in Solution and Its Stability towards Pepsin. *Helv Chim Acta*. 1996; 79(4): 913-41.
16. Von Nussbaum F, Spiteller P.  $\beta$ -Amino Acids in Nature. *ChemInform*. 2005; 36(1): 63-81.
17. Patočka J.  $\beta$ -amino acids and their natural biologically active derivatives. Derivatives of unusual alicyclic and heterocyclic  $\beta$ -amino acids. *Mil Med Sci Lett*. 2011; 80: 2-11.
18. Kuhl A, Hahn MG, Dumić M, Mittendorf J. Alicyclic  $\beta$ -amino acids in Medicinal Chemistry. *Amino Acids*. 2005; 29(2): 89-100.
19. Riaz NN, Rehman F, Ahmad MM.  $\beta$ -Amino Acids: Role in Human Biology and Medicinal Chemistry - A Review. *Med Chem*. 2017; 7(10): 302-7.
20. Del Borgo M, Kulkarni K, Aguilar M. Using beta-Amino Acids and beta-Peptide Templates to Create Bioactive Ligands and Biomaterials. *Curr Pharm Des*. 2017; 23(26): 3772-85.
21. Kiss L, Mándity IM, Fülöp F. Highly functionalized cyclic beta-amino acid moieties as promising scaffolds in peptide research and drug design. *Amino Acids*. 2017; 49(9): 1441-55.
22. Steer DL, Lew RA, Perlmutter P, Smith AI, Aguilar MI.  $\beta$ -Amino acids: Versatile peptidomimetics. *Curr Med Chem*. 2002; 9: 811-22.
23. Greenwood NN, Earnshaw A. *Chemistry of the Elements*, 2<sup>nd</sup>, School of Chemistry University of Leeds, U.K. 1997.
24. Hackh, Ingo WD. *The Classification of the Chemical Elements 1919. The Fundament of Chemistry*. 2012; 146-9
25. Fluck E. New notations in the periodic table. *Pure and Applied Chemistry*. 1988; 60(3): 431-6.
26. Filipović I, Lipanović S. *Opća i anorganska hemija*. Školska knjiga, Zagreb; 1982.
27. Hathaway BJ. Copper. *Coord Chem Rev*. 1983; 52: 87-169.
28. Tisato F, Marzano C, Porchia M, Pellei M, Santini C. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med Res Rev*. 2010; 30(4): 708-49.
29. Milić N. *Neorganska kompleksna i klasterna jedinjenja*. Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac; 1998.

30. Murphy B, Hathaway B. The stereochemistry of the copper(II) ion in the solid statesome recent perspectives linking the Jahn-Teller effect, vibronic coupling, structure correlation analysis, structural pathways and comparative X-ray crystallography. *Coord Chem Rev.* 2003; 243: 237-62.
31. Popova TV, Aksenova NV. Complexes of Copper in Unstable Oxidation States. *Russ J Coord Chem.* 2003; 29(11): 743-65.
32. Hakimi M, Aliabadi TS. Coordination Chemistry of Copper  $\alpha$ - Amino Acid Complexes. *World appl. program.* 2012; 2(10): 431-43.
33. Berestova T, Kuzina L, Amineva N, Faizrakhmanov I, Massalimov I, Mustafin A. ATR-FTIR spectroscopic investigation of the *cis*- and *trans*-bis-( $\alpha$ -amino acids) copper(II) complexes. *J Mol Struct.* 2017; 1137: 260-66.
34. Nakamoto K. Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, applications in coordination, organometallic, and bioinorganic chemistry. Inc, New York; 2009.
35. Roessler MM, Salvadori E. Principles and applications of EPR spectroscopy in the chemical sciences. *Chem Soc Rev.* 2018; 47(8): 2534-53.
36. Szabó-Plánka T, Rockenbauer A, Györ M, Gaizer F. ESR study of copper(II) complexes of  $\alpha$ -amino acids. Coordination modes and metal-ligand bonds in frozen aqueous solutions. *J Coord Chem.* 1988; 17(1): 69-83.
37. Gillard RD, Mason R, Payne NC, Robertson GB. *cis-trans*-Isomerism of bis-( $\alpha$ -alaninato)copper(II). *Chem Commun.* 1966; (6): 155-6.
38. Baggio R, Calvo R, Brondino C, Garland M, Atria A, Spodine E. A Novel Structure of (l-Aspartato)(1,10-phenanthroline)copper(II) Hydrate. *Acta Crystallogr C.* 1995; 51(3): 382-5.
39. Kamwaya ME, Teoh SG, *J.Fiz.Malays.* 1984; 5: 1
40. Bryan RF, Poltak RJ, Tomita KI. The crystal and molecular structure of bis-( $\beta$ -aminobutyrate)copper(II) dihydrate,  $\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_8\text{NO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . *Acta Cryst.* 1961; 14(11): 1125-30.
41. Takenaka A, Oshima E, Yamada S, Watanabé T. Crystal structure of copper(II) complexes with  $\omega$ -amino acids. I. Copper(II) di- $\gamma$ -aminobutyrate,  $[\text{Cu}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO})_2]_n$ , and its dihydrate  $[\text{Cu}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]_n$ . *Acta Cryst.* 1973; 29(3): 503-14.
42. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. *Copper. Biomed Pharmacother.* 2003; 57(9): 386-98.

43. Kidane TZ, Farhad R, Lee KJ, Santos A, Russo E, Linder MC. Uptake of copper from plasma proteins in cells where expression of CTR1 has been modulated. *Biometals*. 2012; 25(4): 697-709.
44. Turnland JR. Human whole-body copper metabolism. *Am J Clin Nutr*. 1998; 67(suppl): 960S-4S.
45. Camakarisa J, Voskoboinika I, Mercerb JF. Molecular Mechanisms of Copper Homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 261(2): 225-32.
46. Lalioti V, Muruais G, Tsuchiya Y, Pulido D, Sandoval I. Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Frontiers In Bioscience*. 2009; (13): 4878-903.
47. Gielen M, Tiekink ER. *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine*. John Wiley & Sons; 2005.
48. Strohfeldt KA. *Essentials of Inorganic Chemistry: For Students of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences and Medicinal Chemistry*. John Wiley & Sons; 2014.
49. Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*. 1999; 284(5415): 805-8.
50. Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr*. 1998; 67(suppl): 952S-9S.
51. Angelova M, Asenova S, Nedkova V, Koleva-Kolarova R. Copper in the human organism. *Trakia Journal Of Sciences*. 2011; 9(1): 88-98.
52. De Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LW. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. 2007. *J Med Genet*; 44(11): 673-88.
53. Tang J, Donsante A, Desai V, Patronas N, Kaler SG. Clinical outcomes in Menkes disease patients with a copper-responsive ATP7A mutation, G727R. *Mol Genet Metab*. 2008; 95(3): 174-81.
54. Kaler SG, Holmes CS, Goldstein DS, Tang J, Godwin SC, Donsante A, Liew CJ, Sato S, Patronas N. Neonatal diagnosis and treatment of Menkes disease. *N Engl J Med*. 2008; 358(6): 605-14.
55. Kim YH, Lee R, Yoo HW, Yum MS, Bae SH, Chung SC, et al. Identification of a novel mutation in the ATP7A gene in a Korean patient with Menkes disease. *J Korean Med Sci*. 2011; 26(7): 951-3.
56. Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *Lancet*. 2007; 369(9559): 397-408.

57. Rodriguez-Castro KI, Hevia-Urrutia FJ, Sturniolo GC. Wilson's disease: A review of what we have learned. *World J Hepatol.* 2015; 7(29): 2859-70.
58. Brewer GJ, Askari FK. Wilson's disease: clinical management and therapy. *J Hepatol.* 2005; 42 Suppl(1): S13-21.
59. Członkowska A, Litwin T, Karliński M, Dziezyc K, Chabik G, Czernska M. D-penicillamine versus zinc sulfate as first-line therapy for Wilson's disease. *Eur J Neurol.* 2014; 21(4): 599-606.
60. Shimizu N, Yamaguchi Y, Aoki T. Treatment and management of Wilson's disease. *Pediatr Int.* 1999; 41(4): 419-22.
61. Ranucci G, Polishchuck R, Iorio R. Wilson's disease: Prospective developments towards new therapies. *World J Gastroenterol.* 2017; 23(30): 5451-6.
62. Gaetke L, Chow C. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2003; 189(1-2): 147-63.
63. Uriu-Adams J, Keen C. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med.* 2005; 26(4-5): 268-98.
64. Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J.* 2007; 401(1): 1-11.
65. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010; 49(11): 1603-16.
66. Ishida S, Andreux P, Poitry-Yamate C, Auwerx J, Hanahan D. Bioavailable copper modulates oxidative phosphorylation and growth of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(48): 19507-12.
67. Hayton BA, Broome HE, Lilenbaum RC. Copper deficiency-induced anemia and neutropenia secondary to intestinal malabsorption. *Am J Hematol.* 1995; 48(1): 45-7.
68. Myint ZW, Oo TH, Thein KZ, Tun AM, Saeed H. Copper deficiency anemia: review article. *Ann Hematol.* 2018; 97(9): 1527-34.
69. Davis CD, Newman S. Inadequate dietary copper increases tumorigenesis in the Min mouse. *Cancer Lett.* 2000; 159(1): 57-62.
70. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79(24): 7634-8.
71. Bonham M, O'Connor JM, Hannigan BM, Strain JJ. The immune system as a physiological indicator of marginal copper status? *Br J Nutr.* 2002; 87(5): 393-403.
72. Schwartz MK. Role of Trace Elements in Cancer. *Cancer Research.* 1975; 35: 3481-7.

73. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011; 473(7347): 298-307.
74. Ahluwalia A, Jones MK, Matysiak-Budnik T, Tarnawski AS. VEGF and colon cancer growth beyond angiogenesis: does VEGF directly mediate colon cancer growth via a non-angiogenic mechanism? *Curr Pharm Des*. 2014; 20(7): 1041-4.
75. Finney L, Vogt S, Fukai T, Glesne D. Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009; 36(1): 88-94.
76. Harris ED. A requirement for copper in angiogenesis. *Nutr Rev*. 2004; 62(2): 60-4.
77. MacDonald G, Nalvarte I, Smirnova T, Vecchi M, Aceto N, Dolemeyer A, et al. Memo is a copper-dependent redox protein with an essential role in migration and metastasis. *Sci Signal*. 2014; 7(329): ra56.
78. Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63(19-20): 2304-16.
79. Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, Seftor EA, Wiley EL, Fong SF, et al. Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res*. 2005; 65(24): 11429-36.
80. Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, McCauley S, Rodriguez HM, Oyasu M, et al. Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med*. 2010; 16(9): 1009-17.
81. Denoyer D, Masaldan S, La Fontaine S, Cater MA. Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. *Metallomics*. 2015; 7(11) :1459-76.
82. Denoyer D, Clatworthy SA and Cater MA. Copper Complexes in Cancer Therapy. *Met Ions Life Sci*. 2018; 18: 469-506
83. Brem SS, Zagzag D, Tsanaclis AM, Gately S, Elkouby MP, Brien SE. Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor. *Am J Pathol*. 1990; 137(5): 1121-42.
84. Crowe A, Jackaman C, Beddoes KM, Ricciardo B, Nelson DJ. Rapid copper acquisition by developing murine mesothelioma: decreasing bioavailable copper slows tumor growth, normalizes vessels and promotes T cell infiltration. *PloS One*. 2013; 8(8): e73684.

85. Brewer GJ, Dick RD, Grover DK, LeClaire V, Tseng M, Wicha M, et al. Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(1): 1-10.
86. Allensworth JL, Evans MK, Bertucci F, Aldrich AJ, Festa RA, Finetti P, et al. Disulfiram (DSF) acts as a copper ionophore to induce copper-dependent oxidative stress and mediate anti-tumor efficacy in inflammatory breast cancer. *Mol Oncol.* 2015; 9(6): 1155-68.
87. Santini S, Pellei M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev.* 2013; 114(1): 815-62.
88. Kagawa TF, Geierstanger BH, Wang AH, Ho PS. Covalent modification of guanine bases in double-stranded DNA. The 1.2-Å Z-DNA structure of d(CGCGCG) in the presence of CuCl<sub>2</sub>. *J Biol Chem.* 1991; 266(30): 20175-84.
89. Sangeetha Gowda KR, Mathew BB, Sudhamani CN, Bhojya Naik HS. Mechanism of DNA Binding and Cleavage. *Biomedicine and Biotechnology.* 2014; 2(1): 1-9.
90. Strekowski L, Wilson B. Noncovalent interactions with DNA: An overview. *Mutation Research-Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis.* 2007; 623: 3-13.
91. García-Ramos J, Galindo-Murillo R, Cortés-Guzmán F, Ruiz-Azuara L. Metal-Based Drug-DNA Interactions. *Journal Of The Mexican Chemical Society.* 2013; (3): 245-59.
92. Blackburn GM, Gait MJ. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*; Oxford University Press: Oxford; 1990.
93. Bischoff G, Hoffmann S. DNA-binding of drugs used in medicinal therapies. *Curr Med Chem.* 2002; 9(3): 312-48.
94. Wing R, Drew H, Takano T, Broka C, Tanaka S, Itakura K, et al. Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature.* 1980; 287(5784): 755-8.
95. Cortes-Guzman F, García-Ramos J, Galindo-Murillo R, Moreno-Esparza R, Ruiz-Azuara L, Gómez R. Intercalation process of anticancer copper(II) complexes in DNA. *Acta Crystallogr A Found Adv.* 70(a1): C963-C963
96. Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem.* 1994; 269(10): 7709-18.
97. Nassif ND, Cambray SE, Kraut DA. Slipping up: partial substrate degradation by ATP-dependent proteases. *IUBMB Life.* 2014; 66(5): 309-17.
98. Drexler HC. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(3): 855-60.

99. Janković SM, Prostran M, Todorović Z. Farmakologija i toksikologija. Medicinski fakultet, Kragujevac; 2007.
100. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* 2001; 70: 369-413.
101. Živančević-Simović S, Đukić A. Opšta patološka fiziologija. Medicinski fakultet, Kragujevac; 2006.
102. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 150845.
103. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16(6): 2129-44.
104. Rang H, Dale M. Rang and Dale's pharmacology. Amsterdam: Elsevier, Churchill Livingstone; 2016.
105. Švabić-Vlahović M, Savić B, Ranin L, Đukić S, Berger-Jekić O, Nedeljković M. Medicinska mikrobiologija, Savremena administracija Beograd, 2008.
106. Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9(9): 719-27.
107. Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11(6): 371-84.
108. Festa RA, Thiele DJ. Copper at the front line of the host-pathogen battle. *PLoS Pathog.* 2012; 8(9): e1002887.
109. Macomber L, Imlay JA. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(20): 8344-9.
110. Aljahdali MS, Abdelkarim AT, El-Sherif AA, Ahmed MM. Synthesis, characterization, equilibrium studies, and biological activity of complexes involving copper(II), 2-aminomethylthiophenyl-4-bromosalicylaldehyde schiff base, and selected amino acids. *J Coord Chem.* 2014; 67(5): 870-90.
111. Chohan ZH, Khan KM, Supuran CT. Synthesis of antibacterial and antifungal cobalt(II), copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes with bis-(1,1'-disubstituted-ferrocenyl)thiocarbohydrazone and bis-(1,1'-disubstituted ferrocenyl)carbohydrazone. *Appl Organomet Chem.* 2004; 18(7): 305-10.



- 112.Çakir S, Biçer E, Odabasoglu M, & Albayrak Ç. Electrochemical and spectroscopic study of 4-(Phenyldiazenyl)-2-[[tris-(hydroxymethyl)methyl]aminomethylene]-cyclohexa-3,5-dien-1(2H)-one : mechanism of the azo and imine electroreduction. *J Braz Chem Soc.* 2005; 16(4): 711-7.
- 113.Kumar S, Dhar DN, Saxena PN. Applications of metal complexes of Schiff bases-A review. *J Sci Ind Res.* 2009; 68: 181-7.
- 114.Poole K. At the Nexus of Antibiotics and Metals: The Impact of Cu and Zn on Antibiotic Activity and Resistance. *Trends Microbiol.* 2017; 25(10): 820-32.
- 115.Prashanthi Y, Kiranmai K, Subhashini NJ, Shivaraj. Synthesis, potentiometric and antimicrobial studies on metal complexes of isoxazole Schiff bases. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2008; 70(1): 30-5.
- 116.Oxford Diffraction, CrysAlis CCD, CCD Data Collection GUI. Oxford Diffraction Ltd. Oxford, UK; 2007.
- 117.Palatinus L, Chapuis GJ. SUPERFLIP – a computer program for the solution of crystal structures by charge flipping in arbitrary dimensions. *J Appl Cryst.* 2007; 40: 786-90.
- 118.Sheldrick GM. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr Sect C: Cryst Struct Commun.* 2015; 71: 3-8.
- 119.Farrugia LJ. WinGX Program Features. *J. Appl. Cryst.* 1999; 32: 837-8.
- 120.Brandenburg K. DIAMOND (Version 3.2i) Crystal Impact GbR, Bonn, Germany, 2009.
- 121.Ho YS. Review of second-order models for adsorption systems. *J Hazard Mater.* 2006; (3): 681-9.
- 122.Jia L, Xu XM, Xu J, Chen LH, Jiang P, Cheng FX, et al. Synthesis, characterization, cytotoxic activities, and DNA-binding studies of ternary copper(II) complexes with new coumarin derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2010; 58(8): 1003-8.
- 123.Meyer-Almes FJ, Porschke D. Mechanism of intercalation into the DNA double helix by ethidium. *Biochemistry.* 1993; 32(16): 4246-53.
- 124.Rehman SU, Sarwar T, Husain MA, Ishqi HM, Tabish M. Studying non-covalent drug-DNA interactions. *Arch Biochem Biophys.* 2015; 576: 49-60.
- 125.Cohen G, Eisenberg H. Viscosity and sedimentation study of sonicated DNA-proflavine complexes. *Biopolym.* 1969; 8(1): 45-55.
- 126.Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.

127. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*. 2000; 243(1-2): 167-90.
128. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184(1): 39-51.
129. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 1995; 182(5): 1545-56.
130. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994; 84(5): 1415-20.
131. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*. 2006; 1(3): 1458-61.
132. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007; 42(4): 321-4.
133. Zheng C, Qiu Q, Hao L, Li H. Studies on the halogen substituted  $\beta$ -amino acids and their Cu(II) coordination complexes in crystallography. *Chem Res Chin Univ*. 2016; 32(1): 1-7.
134. Hans Wienk, *NMR Spectroscopy*, Utrecht; 2008.
135. Stuart B. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Chichester, West Sussex, England: J. Wiley; 2004.
136. Garribba E, Micera G. The Determination of the Geometry of Cu(II) Complexes. An EPR Spectroscopy Experiment. *J Chem Educ*. 2006; 83(8): 1229-32.
137. Hathaway B, Hodgson P. Copper-ligand bond-lengths in axial complexes of the copper(II) ion. *Journal Of Inorganic And Nuclear Chemistry*. 1973; 35(12): 4071-81.
138. Groom CR, Bruno IJ, Lightfoot MP, Ward SC. The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallogr B Struct Sci Cryst Eng Mater*. 2016; 72(Pt 2): 171-9.
139. Sirajuddin M, Ali S, Badshah A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *J Photochem Photobiol B*. 2013; 124: 1-19.

140. Li A, Liu YH, Yuan LZ, Ma ZY, Zhao CL, Xie CZ, et al. Association of structural modifications with bioactivity in three new copper(II) complexes of Schiff base ligands derived from 5-chlorosalicylaldehyde and amino acids. *J Inorg Biochem.* 2015; 146: 52-60.
141. Liu Y, Mo H, Lv Z, Shen F, Zhang C, Le X, et al. DNA binding, crystal structure, molecular docking studies and anticancer activity evaluation of a copper(II) complex. *Transit Met Chem.* 2018; (3): 259.
142. Chikira M, Tomizawa Y, Fukita D, Sugizaki T, Sugawara N, Yamazaki T, et al. DNA-fiber EPR study of the orientation of Cu(II) complexes of 1,10-phenanthroline and its derivatives bound to DNA: mono(phenanthroline)-copper(II) and its ternary complexes with amino acids. *J Inorg Biochem.* 2002; 89(3-4): 163-73.
143. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer.* 2008; 8: 228.
144. Facchin G, Veiga N, Kramer MG, Batista AA, Várnagy K, Farkas E, et al. Experimental and theoretical studies of copper complexes with isomeric dipeptides as novel candidates against breast cancer. *J Inorg Biochem.* 2016; 162: 52-61.
145. De Oliveira EJT, Pessatto LR, de Freitas RON, Pelizaro BI, Rabacow APM, Vani JM, et al. New Bis copper complex ((Z)-4-((4-chlorophenyl)amino)-4-oxobut-2-enoyl)oxy): Cytotoxicity in 4T1 cells and their toxicogenic potential in Swiss mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018; 356: 127-38.
146. Pramanik A, Laha D, Dash SK, Chattopadhyay S, Roy S, Das DK, et al. An in-vivo study for targeted delivery of copper-organic complex to breast cancer using chitosan polymer nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 68: 327-37.
147. Nagaj J, Kołkowska P, Bykowska A, Komarnicka UK, Kyzioł A, Jeżowska-Bojczuk M. Interaction of methotrexate, an anticancer agent, with copper(II) ions: coordination pattern, DNA-cleaving properties and cytotoxic studies. *Med Chem Res.* 2015; 24: 115-23.
148. Nikolić M, Mijajlović M, Jevtić V, Ratković Z, Novaković S, Radić G, et al. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *J Mol Struct.* 2016; 1116: 264-71.
149. Bolos CA, Chaviara AT, Mourelatos D, Iakovidou Z, Mioglou E, Chrysogelou E, et al. Synthesis, characterization, toxicity, cytogenetic and in vivo antitumor studies of

- 1,1-dithiolate Cu(II) complexes with di-, tri-, tetra- amines and 1,3-thiazoles. Structure-activity correlation. *Bioorg Med Chem.* 2009; 17(8): 3142-51.
150. Carvallo-Chaigneau F, Trejo-Solis C, Gomez-Ruiz C, Rodriguez-Aguilera E, Macias-Rosales L, Constantino-Casas F, et al. Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals.* 2008; 21(1): 17-28.
151. El-Gamel NE, Zayed MA. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activity evaluation of metal complexes of sparfloxacin. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2011; 82(1): 414-23.
152. Siddiqi ZA, Khalid M, Kumar S, Shahid M, Noor S. Antimicrobial and SOD activities of novel transition metal complexes of pyridine-2,6-dicarboxylic acid containing 4-picoline as auxiliary ligand. *Eur J Med Chem.* 2010; 45(1): 264-9.
153. Siddiqi ZA, Sharma PK, Shahid M, Khalid M, Anjuli, Siddique A, et al. Superoxide scavenging and antimicrobial activities of novel transition metal complexes of oxydiacetate dianion as primary ligand: spectral characterization, cyclic voltammetric investigations and crystal structure. *Eur J Med Chem.* 2012; 57: 102-11.
154. Chalkidou E, Perdih F, Turel I, Kessissoglou DP, Psomas G. Copper(II)-complexes with antimicrobial drug flumequine: structure and biological evaluation. *J Inorg Biochem.* 2012; 113: 55-65.
155. Creaven BS, Egan DA, Karcz D, Kavanagh K, McCann M, Mahon M, et al. Synthesis, characterisation and antimicrobial activity of copper(II) and manganese(II) complexes of coumarin-6,7-dioxyacetic acid (cdoaH<sub>2</sub>) and 4-methylcoumarin-6,7-dioxyacetic acid (4-MecdoaH<sub>2</sub>): X-ray crystal structures of [Cu(cdoa)(phen)<sub>2</sub>].8.8H<sub>2</sub>O and [Cu(4-Mecdoa)(phen)<sub>2</sub>].13H<sub>2</sub>O (phen=1,10-phenanthroline). *J Inorg Biochem.* 2007; 101(8): 1108-19.
156. Efthimiadou EK, Katsarou ME, Karaliota A, Psomas G. Copper(II) complexes with sparfloxacin and nitrogen-donor heterocyclic ligands: Structure-activity relationship. *J Inorg Biochem.* 2008; 102(4): 910-20.
157. Geeta B, Shrivankumar K, Reddy PM, Ravikrishna E, Sarangapani M, Reddy KK, et al. Binuclear cobalt(II), nickel(II), copper(II) and palladium(II) complexes of a new Schiff-base as ligand: synthesis, structural characterization, and antibacterial activity. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2010; 77(4): 911-5.

158. Rajasekara M, Sreedaranb S, Prabub R, Narayananb V, Jegadeeshc R, Raamanc N, et al. Synthesis, characterization, and antimicrobial activities of nickel(II) and copper(II) Schiff-base complexes. *J Coord Chem*. 2010; 63(1): 136-46.
159. Patel KS, Patel JC, Dholariya HR, Patel VK, Patel KD. Synthesis of Cu(II), Ni(II), Co(II), and Mn(II) Complexes with Ciprofloxacin and Their Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant and Anti-Tubercular Activity. *O J Metal*. 2012; 2: 49-59.
160. Al-Shaalan N. Synthesis, characterization and biological activities of Cu(II), Co(II), Mn(II), Fe(II), and UO<sub>2</sub>(VI) complexes with a new Schiff base hydrazone: O-hydroxyacetophenone-7-chloro-4-quinoline hydrazone. *Molecules*. 2011; 16(10): 8629-45.
161. Shebl M, Khalil S, Ahmed S, Medien H. Synthesis, spectroscopic characterization and antimicrobial activity of mono-, bi- and tri-nuclear metal complexes of a new Schiff base ligand. *J Mol Model*. 2010; (1-3): 39-50.
162. Aiyelabola TO, Ojo IA, Adebajo AC, Ogunlusi GO, Oyetunji O, Akinkunmi EO, et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activities of some metal(II) amino acids' complexes. *Adv Biol Chem*. 2012; 2(03): 268-73.
163. Stănilă A, Braicu C, Stănilă S. Antibacterial activity of copper and cobalt amino acids complexes. *Not Bot Horti Agrobi*. 2011; 39(2): 124-9.
164. Zayed ME, Ammar RA. Some transition metal ions complexes of tricine (Tn) and amino acids: pH-titration, synthesis and antimicrobial activity. *J Saudi Chem Soc*. 2014; 18(6): 774-82.



## **8. БИОГРАФИЈА АУТОРА**

Андриана М. Букоњић је рођена 16.03.1988. године у Краљеву где је завршила основну и средњу Медицинску школу. Уписала је Интегрисане академске студије фармације на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу школске 2007/2008. године где је дипломирала 28.09.2012. године са просечном оценом 9,59 (девет, педесет и девет). У току основних студија награђивана је више пута од стране факултета за изузетне успехе и постигнуте резултате. Учествовала је на више конгреса са националним или међународним учешћем. На завршној години основних студија била је стипендиста Фонда за младе таленте Министарства омладине и спорта Републике Србије.

Докторске академске студија на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Молекулска медицина – подподручје Клиничка и експериментална фармакологија, уписала је школске 2012/2013. године. Била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије и распоређена на пројекту „Преклиничка испитивања биоактивних супстанци”, е.бр. ИИИ 41010. Учествовала је у програму „Србија на вези 2014”. Од 26.05.2014. године запослена је као сарадник у настави за ужу научну област Фармацеутска хемија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, а од јуна 2016. године ангажована је у извођењу наставе у звању асистента.

Године 2018. уписала је специјализацију из токсиколошке хемије на Медицинском факултету Универзитета у Новом Саду.

Од маја 2018. године укључена је на пројекат Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Синтеза, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине органских једињења и одговарајућих комплекса метала” е.бр. ОИ 172016. Говори, чита и пише енглески језик.



## **9. БИБЛИОГРАФИЈА АУТОРА**



1. Aleksić DZ, Milosavljević MN, **Bukonjić AM**, Milovanović JR, Protrka ZM, Radonjić VB, Janković SM, Stefanović SM. Transition to Serbia, cultural adaptation, reliability testing and validation of the questionnaire estimating the fear of injections. *Vojnosanit Pregl.* 2019; 76(02): pp ID 13680 **M23**
2. **Bukonjić AM**, Tomović DLj, Stanković AS, Jevtić VV, Ratković ZR, Bogojeski JV, Milovanović JZ, Đorđević DB, Arsenijević AN, Milovanović MZ, Potočňák I, Trifunović SR, Radić GP. Synthesis, characterization and biological activity of copper(II) complexes with ligands derived from  $\beta$ -amino acids. *Transit Met Chem.* 2018. <https://doi.org/10.1007/s11243-018-0270-0> **M23**
3. Tomović DLj, **Bukonjić AM**, Jevtić VV, Ratković ZR, Bogojeski JV, Đeković A, Radojević ID, Čomić LjR, Novaković SB, Bogdanović GA, Trifunović SR, Radić GP, Cupara S. DNA binding, antibacterial and antifungal activities of copper(II) complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. *Transit Met Chem.* 2018; 43(2): 137-48. **M23**
4. **Bukonjić AM**, Tomović DLj, Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Novaković SB, Bogdanović GA, Radojević ID, Maksimović JZ, Vasić SM, Čomić LjR, Trifunović SR, Radić GP. Antibacterial, antibiofilm and antioxidant screening of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-propyl derivative of thiosalicylic acid. *J Mol Struct.* 2017; 1128: 330-7. **M23**
5. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Tomović DLj, **Bukonjić AM**, Jevtić VV, Ratković ZR, Trifunović SR, Radić GP. Synthesis and characterization of zinc(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; 19(2): 113-7. **M51**
6. Tomović DLj, **Bukonjić AM**, Kočović A, Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Arsenijević AN, Milovanović JZ, Stojanović B, Trifunović SR, Radić GP. Synthesis, characterization and cytotoxicity of binuclear copper(II)-complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. *Ser J Exp Clin Res.* 2017; 18(1): 13-8. **M51**
7. Mijajlović MŽ, Nikolić MV, Tomović DLj, **Bukonjić AM**, Kočović A, Jevtić VV, Ratković ZR, Arsenijević AN, Klisurić O, Trifunović SR, Radić GP. Synthesis, characterization of platinum(IV)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the S-butyl derivative of thiosalicylic acid. *Ser J Exp Clin Res.* 2017; 18(3): 195-201. **M51**
8. Milovanović B, Tomović D, Janković SM, Grubor I, Nikolić Lj, Nikolić M, Mijajlović M, Mrvić S, Divjak A, Milojević A, Djoković J, Prokić A, Bukonjić A, Sekulić M, Matić V,

Vukmirović Dj, Rakonjac B, Dimitrijević T, Nikolić N, Jovanović D, Milovanović J, Ratković M, Barudžić N, Mladenović N, Milutinović M, Antanasković A and Nikolić M. Factor Influencing the Fear of Needles among Students of Medicine and Pharmacy. *Acta Fac Med Naiss.* 2017; 34(2): 147-58. **M51**

9. Raković I, Popovska Jovičić B, **Bukonjić A**, Petrović S, Canović P, Hamzagic N. The analysis of risk factors and clinical demographic Characteristics of patients with clostridium dificile Infection as well as the outcome of their treatment. *Ser J Exp Clin Res.* 2016; 17(2): 139-44. **M51**
10. Janković SM, Aleksić DZ, **Bukonjić AM**, Tomović DLj. Factors influencing knowledge transfer from faculty to PhD students. *Racionalna terapija* 2016; 8(1): 1-9. **M52**
11. Aleksic D, **Bukonjic A**, Stefanovic S. Non-opioid analgesics consumption at the surgery departments of a secondary care hospital in general hospital in Kraljevo, Serbia. *Ser J Exp Clin Res.* 2015; 16(3): 229-33. **M51**
12. **Bukonjić A**, Stefanović S. The analysis of antibiotic consumption and bacterial resistance as an indicator of their proper use at the urology department in the health centre “Studentica” Kraljevo. *Ser J Exp Clin Res.* 2015; 16(2): 135-41. **M51**



## **10. ПРИЛОЗИ**

## КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

### УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

**Редни број - РБ:**

**Идентификациони број - ИБР:**

**Тип документације - ТД:** монографска публикација

**Тип записа - ТЗ:** текстуални штампани материјал

**Врста рада - ВР:** докторска дисертација

**Аутор - АУ:** Андриана М. Букоњић

**Ментор/коментор - МН:** др Јована В. Богојески, доцент

**Наслов рада - НР:** Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса бакра(II) са  $\beta$ -аминокиселинама

**Језик публикације - ЈП:** српски/ћирилица

**Језик извода - ЈИ:** српски/енглески

**Земља публикавања - ЗП:** Република Србија

**Уже географско подручје - УГП:** Централна Србија, Шумадија

**Година - ГО:** 2019. година

**Издавач - ИЗ:** ауторски репринт

**Место и адреса - МС:** 34 000 Крагујевац, Светозара Марковић 69, Република Србија

**Физичи опис рада - ФО:** 7 поглавља, 93 стране, 5 схема, 21 табела, 28 слика и 164 референце

**Научна област - УДК:** медицина

**Научна дисциплина - ДИ:** фармација

**Предметна одредница/ кључне речи - ПО:**

**Чува се - ЧУ:** у библиотеци Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу

**Важна напомена- ВН:**

## Извод - ИД:

**Увод:** Бакар(II)-јон је због прелазно тврдо-меких карактеристика идеалан за координовање са различитим донорским атомима, а због есенцијалне улоге коју има у организму његови комплекси су потенцијално мање токсични. Аминокиселине преко атома азота и кисеоника лако формирају координативно-ковалентне везе са прелазним металима. Због биолошке активности и фармаколошког значаја,  $\beta$ -аминокиселине су погодни лиганди у синтези потенцијалног лека.

**Материјал и методе:** У оквиру ове докторске дисертације описани су поступци синтеза  $\beta$ -аминокиселина и одговарајућих комплекса бакра(II) са  $\beta$ -аминокиселинама. Структуре синтетисаних лиганата потврђене су на основу инфрацрвене (IR) и нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије ( $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR), док су састав и структуре синтетисаних комплексних једињења претпостављене на основу резултата елементалне микроанализе, инфрацрвене и електронско-парамагнетно-резонанционе спектроскопије (EPR). Стварна структура комплекса бакра(II)-јона и 2-(1-аминоциклохексил)сирћетне киселине потврђена је и на основу резултата рендгенске структурне анализе. Интеракције синтетисаних комплекса са молекулом ДНК утврђене су на основу кинетичких мерења, апсорпционо спектроскопских мерења, флуоресцентних мерења и мерења вискозитета ДНК раствора. Број и вијабилност туморских ћелија (4Т1, СТ26, LLC1) након примене раствора комплексних једињења одређена је колориметријским МТТ тестом. Антимикробна активност синтетисаних једињења испитана је микродилуционом методом.

**Резултати:** Потврђена је квадратно-планарна структура синтетисаних комплекса. Вредности константи везивања, смањења интензитета флуоресценције и повећање релативног вискозитета раствора ДНК указују на интеракцију комплекса и молекула ДНК. Од испитиваних ћелијских линија највећу осетљивост према синтетисаним комплексима показале су ћелије карцинома плућа, LLC1. Оба комплекса индукују апоптозу ћелија карцинома колоне (СТ26) и при нижим концентрацијама имају бољу активност од *цисплатине*. Испитиване супстанце испољавају ниску и селективну антимикробну активност која је вероватно последица њихових слабих липофилних карактеристика.

**Закључак:** Синтеза комплекса бакра(II) са различитим лигандима даје могућност развоја потенцијалних лекова. Испитивање биолошке активности сваког потенцијалног фармакотерапеутика омогућава да се приближније повеже структура комплекса са механизмом дејства и антитуморским и антимикробним потенцијалом.

**Кључне речи:**  $\beta$ -аминокиселине, комплекси бакра(II), биолошка активност.

Датум прихватања теме од стране ННВ - ДП: 27.06.2017.

Датум одбране - ДО:

Чланови комисије - КО:

1. **Проф. др Небојша Н. Арсенијевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област *Микробиологија и имунологија; Онкологија*, председник;
2. **Проф. др Тибор Ј. Сабо**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област *Општа и неорганска хемија*, члан;
3. **Проф. др Гордана П. Радић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Фармацеутска хемија*, члан;
4. **Доц. др Верица В. Јевтић**, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област *Неорганска хемија*, члан;
5. **НС др Ивана Д. Радојевић**, научни сарадник Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за научну област *Биологија*, члан.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

**Accession number - ANO:**

**Identification number - INO:**

**Documentation type - DT:** Monographic publication

**Type of record - TR:** Textual printed material

**Contents code - CC:** Ph.D. Thesis

**Author - AU:** Andriana M. Bukonjić

**Menthor/co-mentor - MN:** Assistant Professor, Jovana V. Bogojeski, M.Sc, PhD

**Title - TI:** Synthesis, characterization and biological activity examination of copper(II) complexes with  $\beta$ -amino acid

**Language of text - LT:** Serbian/Cyrillic

**Language of abstract:** Serbian/English

**Country of publication - CP:** Republic of Serbia

**Locality of publication - LP:** Central Serbia, Šumadija

**Publication year - PY:** 2019.

**Publisher - PU:** Author reprint

**Publication place - PP:** 34 000 Kragujevac, Svetozara Markovića 69, Republic of Serbia

**Physical description - PD:** 7 chapters, 93 pages, 5 schemes, 21 tables, 28 images and 164 references

**Scientific field - SF:**

**Scientific discipline - SD:**

**Subject/key words - SKW:**

**UDC**

**Holding data:** Library of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

**Note - N:**

## **ABSTRACT - AB:**

**Introduction:** Copper(II)-ion is ideal for coordinating with different donor atoms due to its soft-hard characteristics while transferring, and because of its essential role in organism, its complexes are potentially less toxic. Amino acids, through the atoms of nitrogen and oxygen, easily form coordinate-covalent bonds with transition metals.  $\beta$ -amino acids are suitable ligands in the synthesis of a potential medicine because of their biological activity and pharmacological significance.

**Materials and methods:** This PhD thesis describes the syntheses procedures of  $\beta$ -amino acids and corresponding copper(II)-complexes with  $\beta$ -amino acids. The structures of synthesized ligands were confirmed based on infrared (IR) and nuclear-magnetic-resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR), while the composition and the structures of synthesized complex compounds were assumed by the results of elemental microanalysis, infrared and electron paramagnetic resonance (EPR). The real structure of copper(II)-ion complex and 2-(1-aminocyclohexyl) acetic acid was confirmed from the results of Roentgen structural analysis. The interactions of synthesized complexes with the DNA molecule were determined by kinetic measurements, absorption spectroscopic measurements, fluorescent measurements and the measurements of the DNA solution viscosity. The number and the viability of tumor cells (4T1, CT26, LLC1), after applying complex compounds solutions, was determined by MTT colorimetric technique. Antimicrobial activity of synthesized compounds was examined using microdilution method.

**Results:** Square planar structure of synthesized compounds was confirmed. The values of binding constants, fluorescence intensity reduction and the increase of relative DNA solution viscosity indicated the interaction between complexes and the DNA molecule. From the tested cell lines, lung cancer cells (LLC1) showed the largest sensitivity towards synthesized complexes. Both complexes induced cell apoptosis of colon cancer (CT26) and had higher activity in lower concentrations than *cisplatin*. The tested substances expressed low and selective antimicrobial activity which was probably the result of their weak lipophilic characteristics.

**Conclusion:** The synthesis of copper(II)-complexes with different ligands offers the possibility for the development of potential medicines. Biological activity examination of each potential drug enables more approximate connection of the structure of complexes with the mechanism of action and anticancer and antimicrobial potentials.

**Key words:**  $\beta$ -amino acids, copper(II)-complexes, biological activity.



**Accepted by the Scientific Board on - ASB: 27.06.2017.**

**Defended on - DE:**

**Thesis defended board (Degree/name/surname/title/faculty) - DB:**

1. **Full Professor, Nebojša N. Arsenijević**, M.D, PhD, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field *Microbiology and immunology; Oncology*, Chairman;
2. **Full Professor, Tibor J. Sabo**, M.Sc, PhD, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, scientific field *General and inorganic chemistry*, member;
3. **Associate Professor Gordana P. Radić**, M.Sc, PhD. Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field *Pharmaceutical chemistry*, member;
4. **Assistant Professor, Verica V. Jevtić**, M.Sc, PhD, Faculty of Science, University of Kragujevac, scientific field *Inorganic chemistry*, member;
5. **Assistant Research Professor, Ivana D. Radojević**, M.Sc, PhD, Faculty of Science, University of Kragujevac, scientific field *Biology*, member.

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Андриана М. Букоњић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса бакра(II) са  $\beta$ -аминокиселинама

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

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

У Крагујевцу, 11.12.2018. године,

\_\_\_\_\_  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Андриана М. Букоњић \_\_\_\_\_,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности комплекса бакра(II) са  $\beta$ -аминокиселинама

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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 прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, 11.12.2018. године,

---

потпис аутора

---

<sup>2</sup> 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/>

*Synthesis, characterization and biological activity of copper(II) complexes with ligands derived from  $\beta$ -amino acids*

**Andriana M. Bukonjić, Dušan Lj. Tomović, Ana S. Stanković, Verica V. Jevtić, Zoran R. Ratković, Jovana V. Bogojeski, et al.**

**Transition Metal Chemistry**

ISSN 0340-4285

Transit Met Chem

DOI 10.1007/s11243-018-0270-0



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Nature Switzerland AG. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](https://link.springer.com)".**



# Synthesis, characterization and biological activity of copper(II) complexes with ligands derived from $\beta$ -amino acids

Andriana M. Bukonjić<sup>1</sup> · Dušan Lj. Tomović<sup>1</sup> · Ana S. Stanković<sup>1</sup> · Verica V. Jevtić<sup>2</sup> · Zoran R. Ratković<sup>2</sup> · Jovana V. Bogojeski<sup>2</sup> · Jelena Z. Milovanović<sup>3</sup> · Dragana B. Đorđević<sup>3</sup> · Aleksandar N. Arsenijević<sup>3</sup> · Marija Z. Milovanović<sup>3</sup> · Ivan Potočňák<sup>4</sup> · Srećko R. Trifunović<sup>2</sup> · Gordana P. Radić<sup>1</sup>

Received: 12 June 2018 / Accepted: 2 August 2018  
© Springer Nature Switzerland AG 2018

## Abstract

Two copper(II) complexes with ligands derived from  $\beta$ -amino acids, 2-(1-aminocyclohexyl)acetic acid **L1** and 2-(1-amino-4-(*tert*-butyl)cyclohexyl)acetic acid **L2**, were synthesized and characterized by microanalysis, infrared, UV–Vis and EPR spectra. The spectroscopically predicted structure of the square-planar copper(II) complex with 2-(1-aminocyclohexyl)-acetic acid **C1** was confirmed by single-crystal X-ray analysis. The biological activities (antitumor activities and interaction with DNA) of the compounds were also investigated. The interactions of both complexes with calf thymus (CT) and herring testes (HT) DNA were examined by stopped-flow spectroscopy, by absorption (UV–Vis) and by emission spectral studies (ethidium bromide displacement studies). Both complexes were found to react a bit faster with HT-DNA than with CT-DNA. The obtained binding constants suggested a moderate intercalative binding mode between the complexes and DNA. In addition, fluorescence spectrometry of bovine serum albumin with the complexes showed a good fluorescence quenching of the complexes. The obtained copper(II) complexes have a relatively low cytotoxic effect on murine mammary carcinoma cell line, 4T1, a moderate effect on murine colon carcinoma cell line, CT26, and a relatively high cytotoxicity toward murine lung cancer cells, LLC1.

## Introduction

Copper is a trace element, but it plays a very important role in all living organisms. Thus, it participates in redox reactions, in growth and development of organisms, and is a component of numerous enzymes [1]. A deviation from homeostatic copper concentrations can lead to the development of various diseases, including Wilson's disease and Menkes disease, and is also thought to be responsible for malignant angiogenesis, i.e., invasiveness of tumor cells and the onset of metastases [1–4].

The biological activity of transition metal complexes is increasingly attracting researchers' attention with the aim of finding potential pharmacotherapeutics [5, 6]. In this context, copper(II) complexes have also been investigated, but with an insufficiently clear mechanism of action [5, 7]. Previous investigations have shown that the properties of copper complexes mainly depend on the nature of the ligands and their donor atoms, but also on the differences in activities of the copper(I) and copper(II) complexes [7]. In general, coordination of copper(II) is realized through oxygen, nitrogen, sulfur and phosphorus donor ligands. Copper(II) complexes

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11243-018-0270-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jovana V. Bogojeski  
jrosic@kg.ac.rs

✉ Gordana P. Radić  
vasic\_gordana@yahoo.com

- <sup>1</sup> Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, Kragujevac 34000, Republic of Serbia
- <sup>2</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34000, Republic of Serbia
- <sup>3</sup> Department of Microbiology and Immunology, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, Kragujevac 34000, Republic of Serbia
- <sup>4</sup> Institute of Chemistry, P.J. Šafárik University, Moyzesova 11, 041 54 Kosice, Slovakia

can show a significant cytotoxic activity for ligands that contain polydentate Schiff bases, five-membered aromatic heterocycles (imidazole, pyrazole, triazole) or six-membered aromatic heterocycles such as bipyridine (bipy) or tertiary phosphines [1, 4]. These complexes lead to the inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [8], while the introduction of several different heterocyclic bases increases the microbial spectrum of the effect [9, 10].

Recent studies are increasingly being focused on the synthesis of complexes of  $\alpha$ -amino acid ligands and their derivatives. These include the study of the stability of such complexes, their binding to DNA, and their biological activities [11–16]. A copper(II) complex of bacitracin showed a significant oxidative activity [16]. The comparative analysis of three complexes of copper(II) with glycine (gly), alanine (ala) and a combination of ligands (gly and bipy) showed that the complex with both amino acid and heterocyclic ligands showed the strongest interaction with DNA and the highest cytotoxic activity [12].

Based on previously published results, we can conclude that, in general,  $\beta$ -amino acids show better biological activities in comparison with  $\alpha$ -amino acids [17–19]. We reasoned that if such  $\beta$ -amino acids were in the coordination sphere of copper(II), the biological activities of the resulting complexes might be better still. Because this area has not yet been fully explored, in this paper our investigations are focused on the synthesis of copper(II) complexes of derivatives of  $\beta$ -amino acids, namely 2-(1-aminocyclohexyl)acetic acid **L1** and 2-(1-amino-4-(*tert*-butyl)cyclohexyl)-acetic acid **L2** as well as the biological activities (antitumor activities and interactions with DNA) of the obtained compounds. The structures of the complexes were deduced on the basis of elemental microanalysis and infrared spectra; moreover, the square-planar structure was confirmed by an X-ray structural study of the copper(II) complex of **L1**. The interactions of the copper(II) complexes with CT-DNA and HT-DNA were investigated. Since it is considered that some transition metal complexes manifest their antitumor activity by interactions with certain proteins [20, 21], we considered it important to examine the affinity of these new complexes with a protein, namely bovine serum albumin (BSA). In this study, we report on the cytotoxicities of the two proligands and their corresponding copper(II) complexes against murine colon carcinoma cell line, CT26, murine mammary carcinoma cells line, 4T1, and murine lung cancer cell line, LLC1.

## Experimental

### Materials and measurements

All reagents were obtained commercially and used without further purification. Elemental analyses were obtained on a

Vario III CHNOS Elemental Analyzer, Elemental Analysensysteme GmbH. For infrared spectra, a PerkinElmer FTIR 31725-X spectrophotometer and KBr pellet technique were employed.

The 9.8 GHz EPR spectra were recorded at room temperature on a Bruker Eleksys II 540 EPR spectrometer under the following conditions: microwave power 6.325 mW, modulation amplitude 5 G, modulation frequency 100 kHz, conversion time 240 ms. The samples (30  $\mu$ L of 0.5 mM aqueous solution, in deionized 18 M $\Omega$  water) were drawn into gas-permeable Teflon tubes (Zeus industries, Raritan, NJ). The spectra were recorded and analyzed using the Bruker Xepr software.

Kinetics of the substitution reactions of the copper(II) complexes with CT and HT-DNA were studied in a stopped-flow spectrophotometer (PerkinElmer Lambda 35) in 25 mM Hepes buffer, pH  $\approx$  7.2 (Acros Organics, Belgium).

## Syntheses

### Synthesis of proligands

The proligands, 2-(1-aminocyclohexyl)acetic acid **L1** and 2-(1-amino-4-(*tert*-butyl)cyclohexyl)acetic acid **L2**, were obtained by using the previously described process [22]. A mixture of cyclohexanone or 4-*tert*-butyl-cyclohexanone (1 mol), malonic acid (1 mol) and ammonium acetate (1 mol) in 1-butanol (600 mL) was refluxed for 1.5–3.0 h until CO<sub>2</sub> was no longer evolved. The postreaction mixtures were transparent solutions. All volatile compounds boiling to 135 °C were distilled off; a colorless film of ammonium malonate was deposited in the Liebig condenser. The reaction mixture was diluted with 1-butanol (300 mL), and the distillation was repeated. The residue was distilled in a vacuum of 10–20 mmHg, until the boiling point of the distillate reached 128–130 °C. The resulting viscous oil was cooled to 20 °C and stirred with acetone (700 mL). Afterward it was allowed to stand for no less than 10 h, and the resulting amino acid precipitates were filtered off, washed with acetone and dried at 100 °C.

**2-(1-aminocyclohexyl)acetic acid (L1)** IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3424 (w), 2945 (s), 2166 (w), 1619 (s), 1570 (s), 1492 (m), 1467 (m), 1383 (m), 1266 (w), 1200 (w), 1133 (w), 1060 (w), 946 (w), 899 (w), 764 (w), 717 (w), 603 (w). <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 1.25–1.47 (m, 6H, 3CH<sub>2</sub>), 1.47–1.58 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 2.09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 42.5 (C–), 48.0 (CH<sub>2</sub>– from acetic acid); 41.2; 21.9; 22.6 (CH<sub>2</sub>– from cyclohexyl group); 177.3 (COOH).

**2-(1-amino-4-(*tert*-butyl)cyclohexyl)acetic acid (L2)** IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3433 (w), 2954 (s), 2153 (w), 1639 (s), 1583



(s), 1506 (m), 1466 (m), 1395 (m), 1364 (m), 1336 (m), 1262 (w), 1173 (w), 1055 (w), 950 (w), 901 (w), 764 (w), 714 (w), 623 (w).  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 2.41 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.52–1.75 (m, 8H, 4 $\text{CH}_2$ ), 1.41 (s, H, CH), 0.49 (m, 9H, 3 $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 42.8 (C-from cyclohexyl group), 48.0 ( $\text{CH}_2$ - from acetic acid); 20.7; 39.6 ( $\text{CH}_2$ - from cyclohexyl group); 32.5 (CH-from cyclohexyl group); 27.6 ( $\text{CH}_3$ - from *t*-butyl group); 177.3 (COOH).

### Synthesis of the complexes

Copper(II) nitrate trihydrate (0.1000 g, 0.4139 mmol) was dissolved in water (10.0 mL) on a steam bath, and 2-(1-aminocyclohexyl)acetic acid **L1** (0.1301 g, 0.8278 mmol) or 2-(1-amino-4-(*tert*-butyl)cyclohexyl)acetic acid **L2** (0.1766 g, 0.8278 mmol) was added. The reaction mixture was heated for 3 h, and during this period 10.0 mL of an aqueous lithium hydroxide solution (0.0199 g, 0.8278 mmol) was added in small portions. The solutions were filtered and evaporated to small volume.

Single crystals of the copper(II) complex with 2-(1-aminocyclohexyl)acetic acid (**C1**) suitable for single-crystal X-ray diffraction analysis were obtained by slow evaporation of a water solution. Yield: 0.1256 g (80.75%). *Anal.* Calc. for **C1** =  $\text{CuC}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$  ( $M_r = 375.95$ ): C, 51.12; H, 7.51; N, 7.45%. Found: C, 51.27; H, 7.42; N, 7.42%. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3375 (s), 3293 (s), 3243 (s), 2933 (m), 2865 (m), 1576 (s), 1408 (s), 1375 (s), 1198 (m), 1139 (w), 1065 (w), 957 (w), 804 (w), 730 (w), 678 (w).

Complex (**C2**) was obtained as a blue powder from a water solution by slow evaporation. Yield: 0.1581 g (78.24%). *Anal.* Calc. for **C2** =  $\text{CuC}_{24}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_4$  ( $M_r = 488.16$ ): C, 59.05; H, 9.08; N, 5.74%. Found: C, 58.98; H, 9.01; N, 5.69%. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3369 (s), 3297 (s), 3239 (s), 2949 (m), 2866 (m), 1577 (s), 1448 (s), 1429 (s), 1408 (s), 1326 (s), 1209 (m), 1176 (m), 1121 (w), 1109 (w), 993 (w), 973 (w), 959 (w), 900 (w), 733 (w), 680 (w).

### Single-crystal X-ray crystallography

A summary of the X-ray diffraction experiment and structure refinement for **C1** is given in Table S1. The crystal structure of **C1** was determined using an Oxford Diffraction Xcalibur2 diffractometer equipped with a Sapphire2 CCD detector using graphite monochromated Mo  $\text{K}\alpha$  radiation ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ). CrysAlis CCD [23] was used for data collection, while CrysAlis RED [23] was used for cell refinement, data reduction and absorption correction. The structure was solved by SUPERFLIP [24] and subsequent Fourier syntheses using SHELXL2013 [25], as implemented in the WinGX program suite [26]. Anisotropic displacement parameters were refined for all non-H atoms. Hydrogen atoms from the

water molecules were found in the difference Fourier map and refined using a riding model; all other hydrogen atoms were placed in calculated positions and refined riding on their parent C or N atoms. An analysis of bond distances and angles was performed using SHELXL2013. DIAMOND [27] was used for molecular graphics.

### Kinetic measurements

The interactions of complexes **C1** and **C2** with CT- and HT-DNA were studied by stopped-flow spectroscopy. In a typical experiment, one syringe contained various concentrations of CT- or HT-DNA in PBS buffer (pH = 7.2), and the other contained 1.0 mM of complex **C1** or **C2**. For each run, equal volumes of both solutions from separate syringes were rapidly mixed in the mixing chamber and the changes in absorbance were monitored for a chosen period of time. The temperature of both drive syringes, the cell and the mixing chamber was maintained at  $37.0 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$  using a circulating water bath. The absorbance change was measured at  $\lambda = 260 \text{ nm}$  after the addition of either complex. The observed *pseudo*-first-order rate constants,  $k_{obsd}$ , were calculated as the average values from four to six independent kinetic runs using the program OriginPro 8. Experimental data are presented in Tables S2–S5.

### DNA interactions

Stock solutions of CT-DNA and HT-DNA were prepared in PBS buffer. The ratio of UV absorbances at 260 and 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) of ca. 1.8–1.9 indicated that the DNA was sufficiently free from protein. The concentration was determined by the UV absorbance at 260 nm ( $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [28]. The UV–Vis spectra were obtained on a PerkinElmer Lambda 35 or 25 double beam spectrophotometer, using 1.0 cm path length quartz cuvettes (3.0 mL). Fluorescence measurements were taken on an RF-1501 PC spectrofluorometer (Shimadzu, Japan). The fluorescence spectra were recorded in the range of 550–750 nm upon excitation at 527 nm in all cases. The excitation and emission bandwidths were both 10 nm.

### UV–Vis absorption studies

In order to compare the binding strengths of the complexes with DNA, the intrinsic binding constants  $K_b$  were determined by monitoring the changes in absorption at the MLCT band with increasing concentrations of CT-DNA, using the following Eq. 1;

$$[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_f) = [\text{DNA}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)] \quad (1)$$

where  $K_b$  is given by the ratio of slope to the y intercept in plots of  $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$  versus  $[\text{DNA}]$ , where  $[\text{DNA}]$

is the concentration of DNA in the base pairs,  $\varepsilon_A = A_{\text{obsd}}/[\text{complex}]$ ,  $\varepsilon_f$  is the extinction coefficient for the unbound complex, and  $\varepsilon_b$  is the extinction coefficient for the complex in the fully bound form.

### Ethidium bromide (EB) displacement studies

The binding strengths of complexes to CT-DNA and HT-DNA were determined by calculating the quenching constant ( $K_{sv}$ ) from the slopes of straight lines obtained from the Stern–Volmer equation (Eq. 2).

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2)$$

where  $I_0$  and  $I$  represent the emission intensities in the absence and the presence of the quencher (complex **C1** or **C2**), respectively;  $[Q]$  is a total concentration of quencher;  $K_{sv}$  is the Stern–Volmer quenching constant which can be obtained from the slope of the plot of  $I_0/I$  versus  $[Q]$ .

### Viscosity measurements

The viscosity of DNA solutions was measured in the presence of increasing amounts of complexes **C1** and **C2**. The flow time was measured with a digital stopwatch. Each sample was measured three times, and the average flow time was calculated. The data are presented as  $(\eta/\eta_0)^{1/3}$  against  $r$ , where  $\eta$  is the viscosity of DNA in the presence of the complex and  $\eta_0$  is the viscosity of DNA alone in the buffer solution. The viscosity values were calculated from the observed flow time of the DNA-containing solutions ( $t$ ), corrected for the flow time of the buffer alone ( $t_0$ ),  $\eta = (t - t_0)/t_0$ .

### In vitro cytotoxicity studies

The complexes were dissolved in 10% DMSO in distilled water at a concentration of 10 mM and filtered through a 0.22-mm Millipore filter. These stock solutions were diluted in culture medium immediately before use. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) was dissolved (5 mg/mL) in a phosphate buffer saline having a pH of 7.2 and filtered through a 0.22-mm Millipore filter before use. All reagents were purchased from Sigma Chemicals.

CT26, 4T1 and LLC1 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). The cells were maintained in DMEM (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, Munich, Germany), penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in a humidified atmosphere of 95% air/5%  $\text{CO}_2$  at 37 °C. Subconfluent monolayers, in log growth phase, were harvested by brief treatment with 0.25% trypsin and 0.02% EDTA in phosphate buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and washed three times in

serum-free PBS. The number of viable cells was determined by trypan blue exclusion.

The effects of the test compounds on cell viability were determined using the MTT colorimetric technique [29]. Cells were diluted in growth medium to ( $5 \times 10^4$  cells/mL), and aliquots ( $5 \times 10^3$  cells/100 mL) were placed in individual wells in 96 multiplates. The next day, the medium was exchanged with 100  $\mu\text{L}$  solution of the test compounds, which had been serially diluted twofold in the medium such that concentrations ranged from 1000 to 7.8  $\mu\text{M}$  in growth medium. Each compound was tested in triplicate. The cells were incubated at 37 °C in 5%  $\text{CO}_2$  for 72 h. After the incubation, the supernatant was removed and 15% MTT solution (5 mg/mL in PBS, 10  $\mu\text{L}$ ) in DMEM medium without FBS was added to each well. After an additional 4 h of incubation at 37 °C in a 5%  $\text{CO}_2$ , the medium with MTT was removed and DMSO (150  $\mu\text{L}$ ) with glycine buffer (20  $\mu\text{L}$ ) was added to dissolve the crystals. The plates were shaken for 10 min. The optical density of each well was determined at 595 nm using a microplate Zenyth 3100 Multimode detector. The percentage of cytotoxicity was calculated as a percentage using the formula:

$$\% \text{ cytotoxicity} = 100 - ((E - B)/(S - B) \times 100)$$

where  $B$  is for the background medium alone,  $S$  is for total viability/spontaneous death of untreated target cells, and  $E$  is for the experimental well. All experiments were carried out in triplicate.

For the apoptosis assays, the cells were plated in T25 culture flasks and allowed to grow overnight. After the cells reached subconfluency, the medium was replaced with the complex (15  $\mu\text{M}$ ). The exposed cells were kept at 37 °C in a 5%  $\text{CO}_2$  incubator for 24 h. The cultured cells were washed twice with PBS and resuspended in 1 $\times$  binding buffer (10 $\times$  binding buffer: 0.1 M HEPES/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM  $\text{CaCl}_2$ ) at a concentration  $1 \times 10^6/\text{mL}$ . Annexin FITC and propidium iodide (PI) were added to 100 mL of cell suspension and incubated for 15 min at room temperature (25 °C) in the dark. After the incubation, 400 mL of 1 $\times$  binding buffer was added to each tube and the stained cells were analyzed within 1 h by using FACS Calibur (BD, San Jose, USA) and Flow Jo software (Tri Star). Since Annexin V FITC staining precedes the loss of membrane integrity that accompanies the later stage identified by PI, Annexin FITC positive, PI negative indicates early apoptosis, while the viable cells are Annexin V FITC negative, PI negative. Cells that are in late apoptosis or already dead are both Annexin V FITC and PI positive.

## Results and discussion

### Synthesis and chemical characterization

Two  $\beta$ -amino acids derivatives 2-(1-aminocyclohexyl)acetic acid **L1** and 2-(1-amino-4-(*tert*-butyl)cyclohexyl)acetic acid **L2** were prepared [22] by direct reaction of cyclohexanone, malonic acid and ammonium acetate. The corresponding copper(II) complexes **C1** and **C2** were obtained by direct reaction of copper(II) nitrate with **L1** and **L2**, respectively, in a molar ratio of 1:2, followed addition of an equimolar amount of aqueous lithium hydroxide, with satisfactory yields of about 80% (Scheme 1).

Infrared spectra of the isolated complexes were recorded in order to identify the coordination mode of  $\beta$ -amino acids ligands. In particular, the asymmetric stretching frequencies of the carboxylic groups were used to determine whether these groups were uncoordinated (absorption bands expected in the range from 1700 to 1750  $\text{cm}^{-1}$ ) or coordinated (absorption bands are located in the range from 1600 to 1650  $\text{cm}^{-1}$ ) to the metal center [30–32]. Thus, the isolated copper(II) complexes both show double sharp and strong asymmetric stretching frequencies of the carboxylic groups at about 1650–1570  $\text{cm}^{-1}$ . The observed clear double bands for the complexes suggest small differences in coordination of the ligand carboxylic groups to the metal.

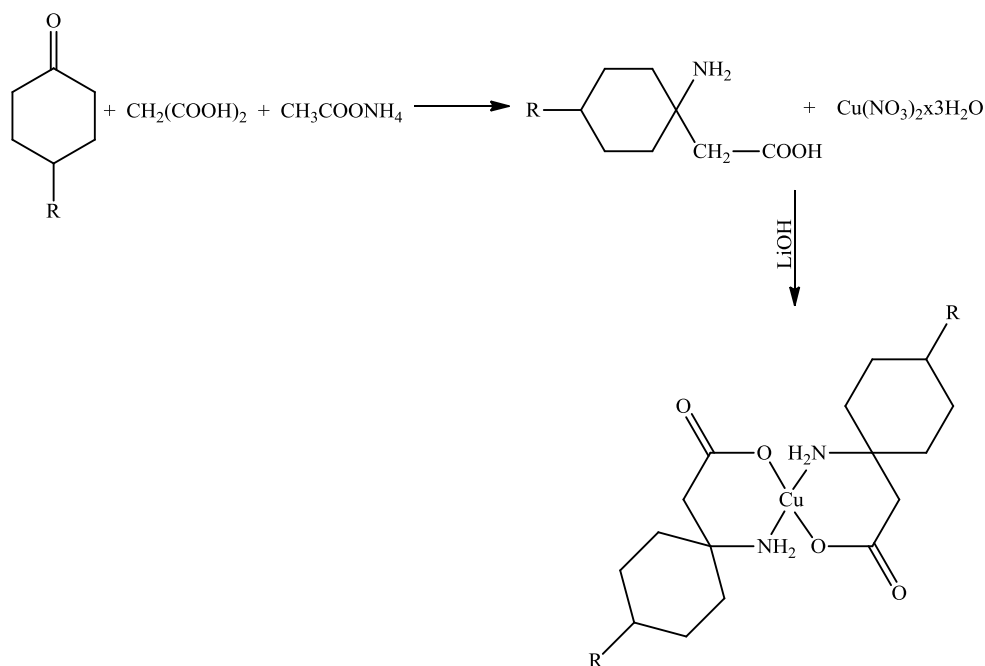
The infrared spectra of both complexes confirm a bidentate mode by means of the amino nitrogen atoms. The isolated copper(II) complexes show asymmetric stretching frequencies of the primary amino group at 3375  $\text{cm}^{-1}$  for **C1** and 3369  $\text{cm}^{-1}$  for **C2**. Also, the complexes have no absorption bands from protonic amino groups, whereas in the spectra-free amino acids the signals of the protonic amino group appear at about 3300–2300  $\text{cm}^{-1}$  (specifically 2944  $\text{cm}^{-1}$  **L1** and 2954  $\text{cm}^{-1}$  **L2**).

Based on the composition of the complexes and their IR spectra alone, it cannot be concluded with certainty how the  $\beta$ -amino acid derivatives are coordinated to copper(II). However, a single-crystal X-ray diffraction study of complex **C1** revealed that the metal is coordinated to **L1** in a square-planar copper(II) complex with *trans*(*O*)-*trans*(*N*)-geometry. Since ligand **L2** is a structural analog of **L1**, a similar geometry can be expected for the structure of corresponding copper(II) complex **C2**.

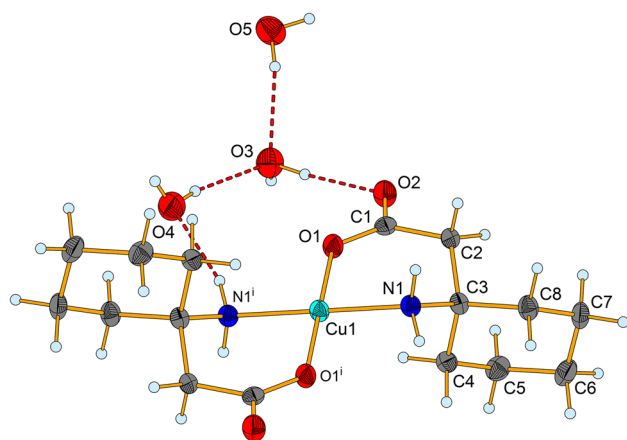
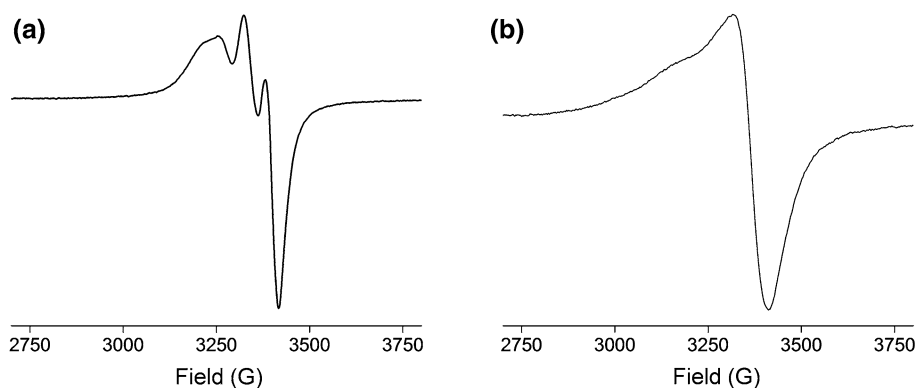
The electronic spectra of both complexes were recorded in water, with a concentration of  $1 \times 10^{-4}$  mol/dm<sup>3</sup> at room temperature. The spectra show an absorption band at 264 nm for **C1** and at 256 nm for **C2**.

Figure 1 shows room temperature EPR spectra of the two copper(II) complexes in 0.5 mM aqueous solution. Both spectra are anisotropic with axial symmetry and clearly show different Cu signals, most likely due to the different ligands. The spectrum of complex **C1** is characterized by  $g_{\parallel} = 2.16$ , and  $g_{\perp} = 2.07$ . The spectrum of complex **C2** shows a poorly resolved Cu signal ( $S = 1/2$ ,  $I = 3/2$ ) hyperfine coupling, with  $g_{\parallel} = 2.23$ , and  $g_{\perp} = 2.09$ .

**Scheme 1** Synthesis of **L1** (R = H) and **L2** (R = *tert*-butyl) and the corresponding complexes **C1** and **C2**



**Fig. 1** Room temperature X-band EPR spectra of complexes **a** **C1** and **b** **C2** in water (0.5 mM)



**Fig. 2** Molecular structure of **C1** with thermal ellipsoids shown at 40% probability. Dashed lines represent hydrogen bonds ( $i: -x+1, -y, -z+1$ )

### Crystal structure of complex **C1**

The X-ray crystal structure of **C1**, shown in Fig. 2, reveals a neutral complex molecule consisting of a Cu(II) atom and two bidentate **L1** ligands. These are coordinated to Cu1 by their O1 atoms after deprotonation of the carboxylic groups, and by their amino N1 atoms in *trans*-positions forming a square-planar coordination sphere around Cu1. As the Cu1 atom is localized at the center of symmetry, the complex unit contains only one independent **L1** ligand.

The selected bond lengths and angles for **C1** are summarized in Table 1. A deformed square-planar geometry around the central atom is confirmed by the N1–Cu1–O1 and N1–Cu1–O1<sup>*i*</sup> bite angles ( $i = 1 - x, -y, 1 - z$ ) which differ a little from 90° as expected for atoms coordinated in *cis*-positions, and also by the Cu1–O1 bond which is slightly shorter than the Cu1–N1 bond due to the smaller covalent radius of oxygen. Nevertheless, the bond distances around the Cu1 atom are similar to those observed in twelve similar Cu(II) complexes with different  $\beta$ -amino acids as reported in the Cambridge Structure Database

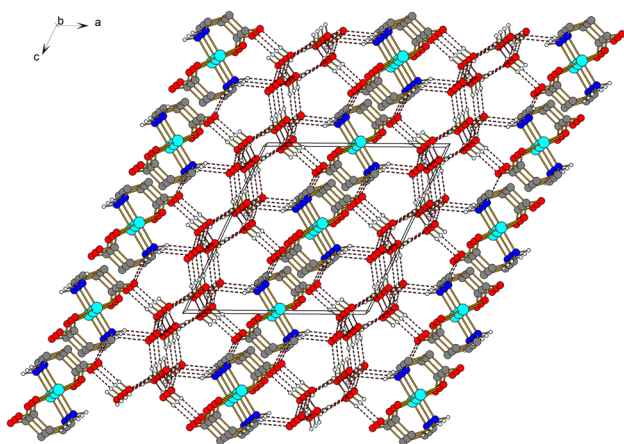
**Table 1** Selected bond lengths (Å) and angles [°] for **C1**

Cu1–O1	1.9238(15)	O1–Cu1–N1 <sup><i>i</i></sup>	87.45(7)
Cu1–N1	1.9852(17)	O1 <sup><i>i</i></sup> –Cu1–N1	87.45(7)
O1–C1	1.280(3)	O1–Cu1–N1	92.55(7)
O2–C1	1.245(3)	C1–O1–Cu1	130.35(14)
N1–C3	1.500(3)	C3–N1–Cu1	113.79(13)
C1–C2	1.520(3)	O2–C1–O1	121.47(19)
C3–C4	1.532(3)	O2–C1–C2	118.47(19)
C3–C2	1.536(3)	O1–C1–C2	120.01(19)
C3–C8	1.538(3)	N1–C3–C4	107.70(16)
C4–C5	1.530(3)	N1–C3–C2	107.31(17)
C8–C7	1.533(3)	C4–C3–C2	112.82(17)
C6–C7	1.522(3)	N1–C3–C8	109.70(17)
C6–C5	1.524(3)	C4–C3–C8	109.48(17)
		C2–C3–C8	109.75(17)
		C1–C2–C3	117.62(17)
		C5–C4–C3	112.32(17)
		C7–C8–C3	113.06(17)
		C7–C6–C5	111.95(18)
		C6–C7–C8	111.31(18)
		C6–C5–C4	111.11(19)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:  $i: -x+1, -y, -z+1$

[33]. However, only one of these Cu(II) complexes is square planar [34] as the coordination number of the Cu(II) atom in all the others is increased, mostly due to coordinated solvent molecule(s).

The bonds in the carboxylic group of ligand **L1** are clearly delocalized (see Table S2), while all other bond lengths are typical for single C–C and C–N bonds. The cyclohexyl ring is in a chair conformation. All three molecules of crystal water are involved in hydrogen bonds (Table S6), stabilizing the crystal structure. Each water molecule is in a typical tetrahedral environment provided by other water molecules, amine or carbonyl groups. Complex units in the structure form layers in the *bc* plane which are linked by hydrogen bonds from layers of crystal water in order to form an infinite 3D system (Fig. 3).



**Fig. 3** Hydrogen bonds (dashed lines) forming a 3D supramolecular structure in **C1**. Hydrogen atoms not involved in hydrogen bonds are omitted for clarity

### Interactions of the complexes with DNA

The kinetics of the interactions both complexes with calf thymus (CT) and herring testes (HT) DNA was investigated spectrophotometrically by following the change in absorbance at 260 nm as a function of time using stopped-flow spectroscopy. All measurements were taken at 7.2 and a temperature of 310 K. To keep a constant pH of 7.2, a PBS buffer was used for all measurements (PBS = phosphate buffer solution = 0.01 M,  $c(\text{NaCl}) = 0.137$ ,  $c(\text{KCl}) = 0.0027$  M, pH 7.4).

The substitution reactions of **C1** and **C2** with CT- and HT-DNA can be represented by Eq. (3):



where  $\text{C} = \text{C1}$  or  $\text{C2}$ ;  $\text{DNA} = \text{CT-}$  or  $\text{HT-DNA}$ .

Here,  $k_2$  is the second-order rate constant for the forward reaction, characterizing formation of the product, and  $k_1$  is the rate constant for the reverse reaction. The rate of the reaction is then described by Eq. (4). All kinetic runs could be fitted by a single exponential function. Plots of  $k_{\text{obsd}}$  versus DNA concentration revealed a linear dependence with negligible intercept for both complexes. The values of the constants  $k_2$  are listed in Table 2.

$$k_{\text{obsd}} = k_2[\text{P}] + k_1[\text{C}] \approx k_2[\text{P}] \quad (4)$$

Each *pseudo*-first-order rate constant,  $k_{\text{obsd}}$ , was calculated as the average of six or seven independent runs, and the values are given in Tables S2–S5. The experimental results for the substitution reactions of **C1** and **C2** with CT- and HT-DNA are shown in Fig. 4 (see also Figure S1 of the Supporting Information).

**Table 2** Rate constants for the reactions of **C1** and **C2** with CT- and HT-DNA at pH = 7.2 (PBS buffer) and 310 K

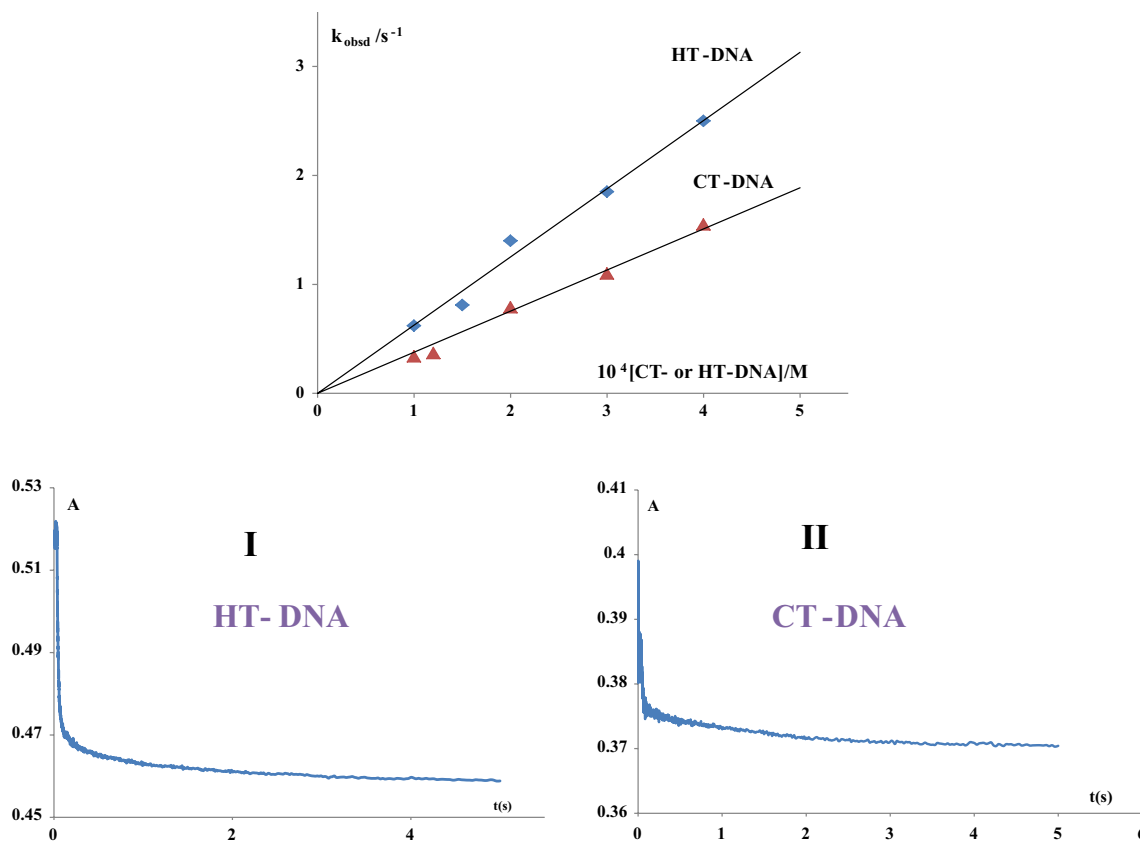
	CT-DNA $k_2$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	HT-DNA $k_2$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
<b>C1</b>	$(3.8 \pm 0.1) \times 10^3$	$(6.3 \pm 0.2) \times 10^3$
<b>C2</b>	$(2.9 \pm 0.1) \times 10^3$	$(3.4 \pm 0.1) \times 10^3$

The results presented in Table 1 clearly show that the rate constants depend on the nature of the ligand in the complexes such that  $k_2$  value for the reaction of **C1** has a greater value than that for **C2**. This can be attributed to the presence of the *tert*-butyl group on the ligand, which causes an increased steric effect for complex **C2**. Also, it can be seen that the reaction goes faster with HT-DNA than with CT-DNA.

### DNA interaction studies

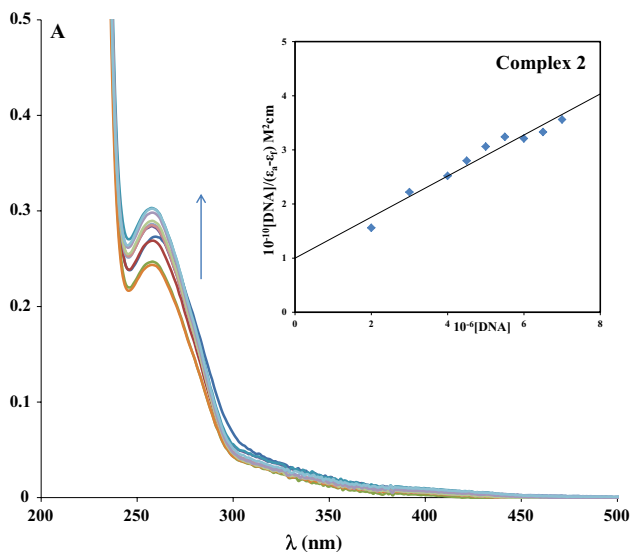
Electronic absorption spectroscopy is widely used to determine the DNA binding affinity of metal complexes. Hence, the potential binding abilities of **C1** and **C2** for CT- and HT-DNA were studied by UV spectroscopy. Typical titration curves for **C1** and **C2** in the presence of either DNA at different concentrations are given in Figs. 5 and S2; the other curves are similar and hence not given. Upon increasing the concentration of either DNA, a significant hyperchromic effect with the appearance of a new band at 258, 262 or 266 nm, but with only insignificant absorption changes in the region of 300–500 nm was observed, as shown in Fig. 5 (see also Figures S2, S3 and S4 in the Supporting Information). A significant hyperchromic shift with the appearance of a new signal in the UV–Vis spectra clearly suggests a strong interaction between the complexes and DNA [35, 36]. Moreover, the intrinsic binding constants  $K_b$  (Table 3) obtained for the two complexes with CT- and HT-DNA follow the order **C1** > **C2**. Once again, for complex **C2** the steric hindrance of the two *tert*-butyl groups results in a reduced interaction with DNA.

In order to further characterize of the binding of these complexes with DNA, competitive binding experiments were carried out on both EB-CT-DNA and EB-HT-DNA by varying the concentration of the complexes. EB is a planar cationic molecule emitting intense fluorescence at about 600 nm in the presence of DNA, due to its strong intercalation between adjacent DNA base pairs [37]. The enhanced fluorescence can be quenched upon the addition of a second molecule which can displace the EB and/or bound or break the secondary structure of the DNA [38]. The interactions of **C1** and **C2** with CT-DNA and HT-DNA were studied by monitoring the fluorescence intensity of EB in PBS buffer



**Fig. 4** Pseudo-first-order rate constants plotted as a function of CT- or HT-DNA concentration for the reactions between the complexes and DNA at pH=7.2 and 310 K in PBS buffer,  $\lambda=260$  nm. Graph I—absorbance-time traces for the reaction between **C1** and HT-DNA

( $2 \times 10^{-4}$  M), pH=7.2, 310 K, PBS buffer; Graph II—absorbance-time traces for the reaction between **C1** and CT-DNA ( $2 \times 10^{-4}$  M), pH=7.2, 310 K, PBS buffer



**Fig. 5** UV-Vis titration spectra for complex **C2** (10  $\mu\text{M}$ ) in PBS buffer (phosphate buffer solution=0.01 M,  $c(\text{NaCl})=0.137$ ,  $c(\text{KCl})=0.0027$  M, pH 7.4) with increasing concentration of HT-DNA (0–10  $\mu\text{M}$ ). The arrow shows hyperchromism in the spectral band,  $\lambda_{\text{max}}=258$  nm. Inset graph: plots of  $[\text{DNA}] / (\epsilon_A - \epsilon_f)$  versus  $[\text{DNA}]$

(pH=7.2). In all cases, there was significant quenching of fluorescence intensity due to the displacement of EB from the EB-DNA complex. The quenching parameters for the **C1** and **C2** were calculated using the Stern–Volmer equation. Increasing the concentration of **C1** or **C2** (0–10  $\mu\text{M}$ ) resulted in a significant decrease in EB fluorescence intensity, with a noticeable redshift (see Figs. 6 and S3, the other dependences are similar and are not given). These results indicate loss of EB from the EB-DNA complex due to displacement by complexes **C1** and **C2** [37, 39, 40].

The fluorescence intensity at 606, 609, 611 or 612 nm (depending on the complex-DNA combination) was used to estimate  $K_{\text{sv}}$  (Table 3). The fluorescence quenching data were also used to determine the number of binding sites ( $n$ ) and the equilibrium binding constant  $K_{\text{bin}}$  by using the Scatchard equation [41–43];

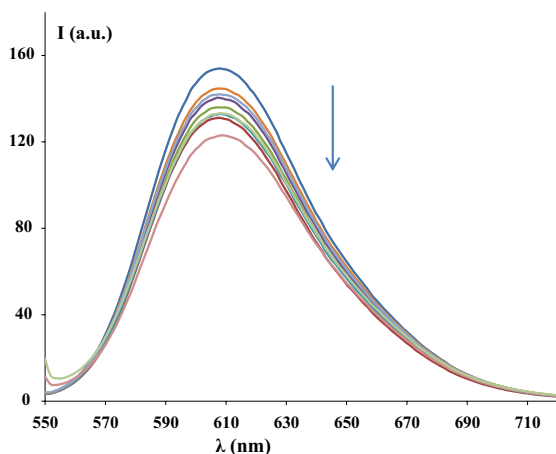
$$\log(I_0 - I) / I = \log K_{\text{bin}} + n \log [Q]$$

The obtained values for  $K_{\text{bin}}$  and the number of binding sites ( $n$ ) are given in Table S7. These values were calculated from plots of  $\log(I_0 - I) / I$  versus  $\log [Q]$  (see also Figure S4 in the Supporting Information; the other dependences are

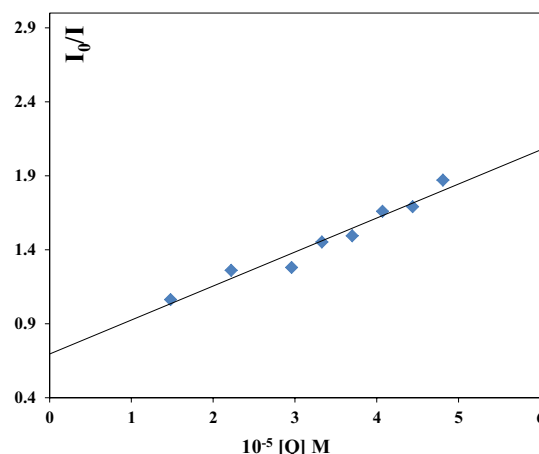
**Table 3** Binding constants for interactions of **C1** and **C2** with CT- and HT-DNA and BSA in PBS buffer

	Complex <b>C1</b>		Complex <b>C2</b>	
	$K_b$ ( $M^{-1}$ )	$K_{sv}$ ( $M^{-1}$ )	$K_b$ [ $M^{-1}$ ]	$K_{sv}$ ( $M^{-1}$ )
CT-DNA	$(5.9 \pm 0.1) \times 10^5$	$(9.8 \pm 0.1) \times 10^3$	$(3.8 \pm 0.1) \times 10^5$	$(9.6 \pm 0.1) \times 10^3$
HT-DNA	$(6.2 \pm 0.1) \times 10^5$	$(2.4 \pm 0.1) \times 10^4$	$(4.0 \pm 0.1) \times 10^5$	$(2.3 \pm 0.1) \times 10^4$
BSA	/	$(1.75 \pm 0.2) \times 10^5$	/	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^5$

$K_b$  = intrinsic binding constant;  $K_{sv}$  = Stern–Volmer constant; BSA = bovine serum albumin



**Fig. 6** Fluorescence titration spectra of EB-CT-DNA and of EtBr (10  $\mu$ M) bound to CT-DNA (10  $\mu$ M) in the presence of varying amounts of complex **C2**,  $\lambda_{max}$  = 609 nm. [The arrow shows changes



in fluorescence intensity upon increasing the concentration of **C2** (0–10  $\mu$ M).] Inset graph: Stern–Volmer plots for EB-DNA fluorescence titration with **C2**

similar and they are not given). The calculated number of binding sites is in a range from 0.8 to 1.5, hence approximately equal to 1, suggesting a single DNA binding site for both complexes.

According to the values of the constants presented in Table 3, a strong interaction of both complexes with CT- or HT-DNA is evident. Complex **C1** has a greater affinity for CT-DNA than complex **C2**, again due to greater steric effects for **C2**. To some extent, both complexes interact more strongly with HT-DNA than with CT-DNA, which can be attributed to the higher proportion of guanine bases in the former.

### Viscosity measurements

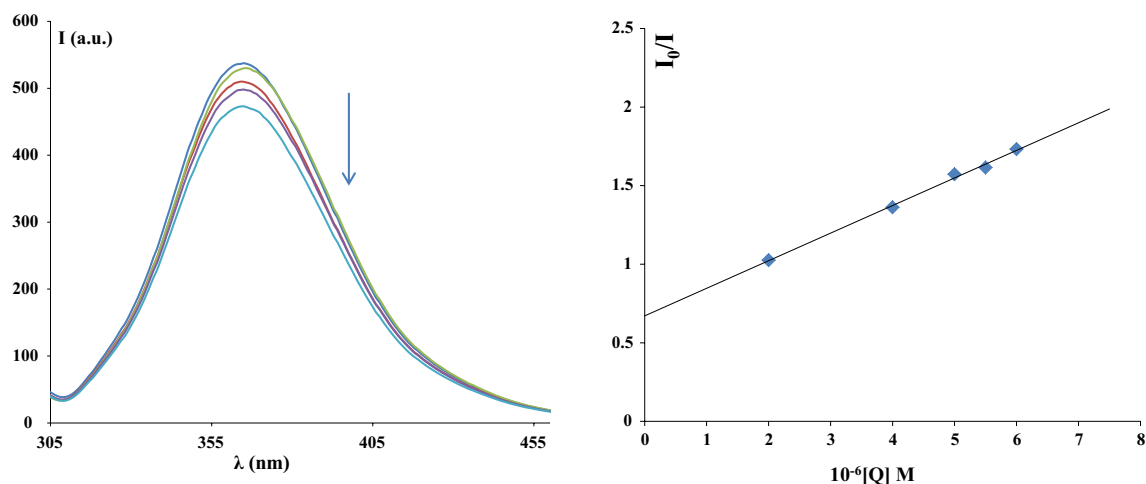
Viscosity measurements were taken to further characterize the interactions of complexes **C1** and **C2** with CT-DNA. Classical intercalation results in lengthening and stiffening of the double helix of DNA, leading to an increase in viscosity [44, 45]. The addition of increasing amounts (up to  $r=1.0$ ) of **C1** and **C2** to a CT-DNA solution (0.01 mM) resulted in an increase in the relative viscosity of CT-DNA (Figure S6), which was more pronounced upon the addition of **C1**. Therefore, the observed results suggest that the complexes bind to CT-DNA by intercalation.

### Protein binding studies

Qualitative analysis of the binding of metal complexes to BSA can be performed by means of fluorescence spectroscopy, which can also provide useful information about the structure, dynamics and folding of proteins [46–48]. The changes in the fluorescence spectrum of BSA upon addition of different concentrations of complex **C1** or **C2** (0–10  $\mu$ M) in the range of 300–500 nm ( $\lambda_{ex}$  = 295 nm) are presented in Figs. 7 and S5 (The other dependences are similar and so not given.) The observed decrease in fluorescence intensity at 365 nm is indicative of an interaction between the complexes and BSA protein. Fluorescence quenching data were analyzed using the Stern–Volmer equation, and the quenching constant ( $K_{sv}$ ) was calculated by using from a plot of  $I_0/I$  versus  $[Q]$ , as shown in Fig. 7.

The equilibrium binding constant  $K_{bin}$  and  $n$  (see also Table S7) as the number of binding sites can be analyzed by the Scatchard equation (see also Figure S7 of the Supporting Information, the other dependences are similar and so are not given). The values of  $n$  for the studied complex are 0.9 or 1.1 which strongly suggested the existence of a single binding site in BSA for these complexes.

According to the obtained constants, both complexes interact strongly with the BSA protein (Table 3). By



**Fig. 7** Emission spectrum of BSA (10  $\mu\text{M}$ ;  $\lambda_{\text{ex}}$ , 295 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  365 nm) in the presence of increasing amounts of **C1** (0–10  $\mu\text{M}$ ),  $\lambda_{\text{max}}$  = 365 nm. The arrow shows the direction of emission intensity changes

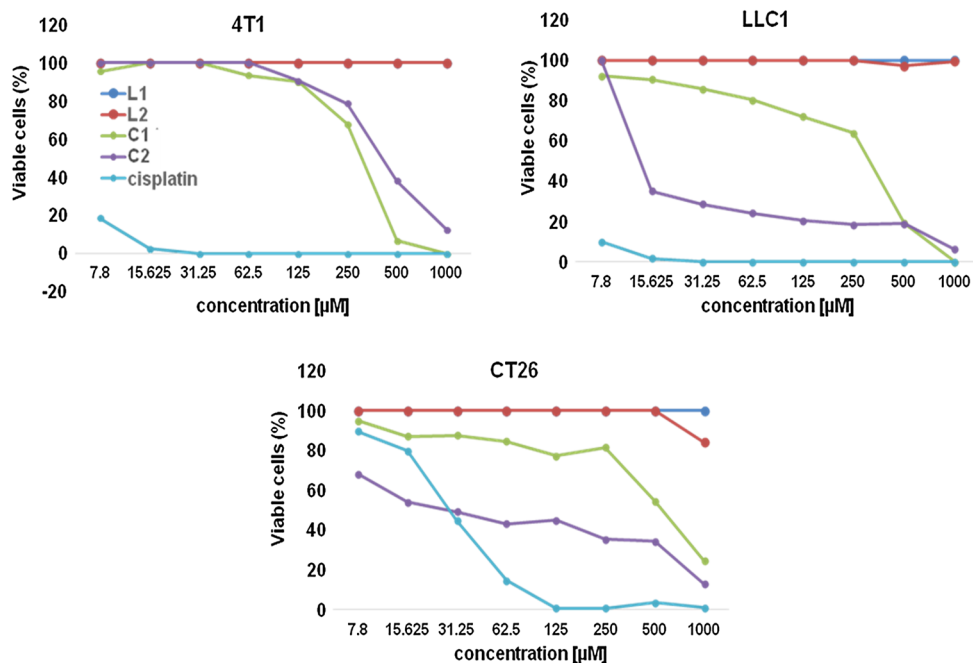
upon increasing the concentration of the complex. Inset graph: plots of  $I_0/I$  versus  $[Q]$

comparing the obtained quenching constants ( $K_{sv}$ ) for the interactions of complexes **C1** and **C2** with DNAs and BSA, it can be seen that studied Cu(II) complexes interact better with BSA than with DNA (Table 3). Furthermore, complex **C1** interacts more strongly with BSA than complex **C2**. The *tert*-butyl groups of **C2** most likely lead to steric hindrance, resulting in a weakened interaction with BSA. Similar results have been reported for other amino acid complexes [49, 50].

### Anticancer activity of the complexes

The results of the MTT assays indicate that the free proligands **L1** and **L2** have no cytotoxic effect against the three tested carcinoma cell lines (CT26, 4T1, LLC1), even at a concentration of 1000  $\mu\text{M}$  (Fig. 8). The cytotoxic effect of both copper complexes on all three cell lines proved to be dose dependent. The complexes showed almost no cytotoxicity on murine mammary carcinoma cells, 4T1, up to concentration of 125  $\mu\text{M}$  (Fig. 8). Complex **C2** had better cytotoxic activity against murine lung cancer cell

**Fig. 8** Representative graphs of 4T1, CT26 and LLC1 cell survival after 72 h cell growth in the presence of the copper complexes and free proligands





line, LLC1 and murine colon carcinoma cell line, CT26 cells than **C1** (Fig. 8). The cytotoxic effect of **C2** on LLC1 was lower compared to cisplatin (Fig. 8). However, lower percentages of viable CT26 cells were detected after exposure to **C2** at lower concentrations (7.8 and 15.625  $\mu\text{M}$ ) compared to the same concentrations of cisplatin (Fig. 8).

The analysis of  $\text{IC}_{50}$  values also indicates that complex **C1** has a lower cytotoxic effect against CT26 and LLC1 cell lines compared with the effect of **C2** (Table 4). Although the cytotoxic activity of **C2** toward murine lung carcinoma cells LLC1 is lower compared with cisplatin, the  $\text{IC}_{50}$  values for **C2** ( $15.61 \pm 6.86 \mu\text{M}$ ) on LLC1 are relatively low.

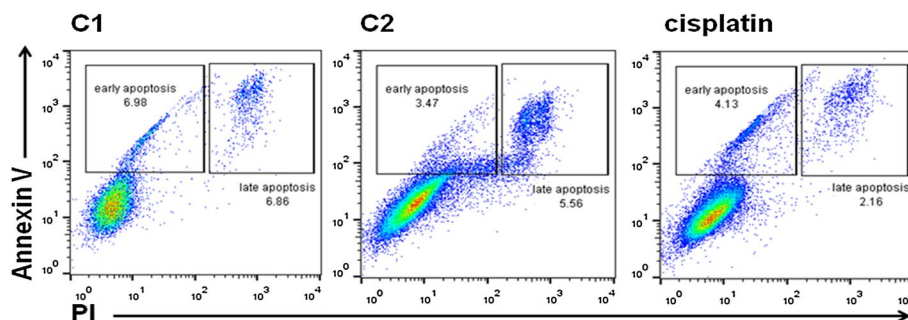
In order to determine the potential for induction of apoptotic death by the complexes, flow cytometry analysis of CT26 cells stained with Annexin V and PI after 24 h exposure to the complexes (concentration 15  $\mu\text{M}$ ) was carried out. The results indicate that after 24 h, both complexes induce apoptotic death of CT26 cells (Fig. 9). Moreover, both complexes had higher cytotoxic effects on CT26 compared to cisplatin (concentration 15  $\mu\text{M}$ ). These observations correlate with the MTT assays, which indicate better cytotoxic effects for the copper(II) complexes at lower concentrations on CT26 cells than cisplatin (15  $\mu\text{M}$ ).

**Table 4**  $\text{IC}_{50}$  values ( $\mu\text{M}$ ) for 72 h of action of the copper(II) complexes, free proligands and cisplatin on 4T1, CT26, and LLC1 cells, as determined by MTT assays

Compound	4T1	CT26	LLC1
<b>C1</b>	$221.87 \pm 16.25$	$655.42 \pm 118.67$	$195.90 \pm 33.05$
<b>C2</b>	$390.58 \pm 56.48$	$39.86 \pm 7.09$	$15.61 \pm 6.86$
<b>L1</b>	> 1000	> 1000	> 1000
<b>L2</b>	> 1000	> 1000	> 1000
Cisplatin	< 7.8	$29.11 \pm 5.87$	< 7.8

Data are presented as mean values  $\pm$  SD (standard deviation) from three experiments

**Fig. 9** Representative flow plots showing the percentages of early apoptotic, late apoptotic and viable CT26 cells after 24 h treatment the copper complexes (concentration: 15  $\mu\text{M}$ )



## Conclusion

Two new copper(II) complexes with  $\beta$ -amino acid ligands were synthesized and characterized. The ligand precursors are coordinated via nitrogen and oxygen atoms to the copper(II) center, giving square-planar structures as confirmed by X-ray analysis for complex **C1**. The interactions with calf thymus and herring testes DNA were studied by stopped-flow spectroscopy. Based on the obtained rate constants, it can be concluded that the reaction goes faster with HT-DNA than with CT-DNA, probably due to the higher percentage of guanine in the former. The interactions between the complexes and CT-DNA, HT-DNA and bovine serum albumin were also examined. Overall, both complexes have good affinities for the both CT- and HT-DNA. Complex **C1** has a greater affinity for DNA than **C2**, which can be explained by the steric effect of *tert*-butyl groups in **C2**. Viscosity measurements suggest that the complexes bind to CT-DNA by intercalation. According to the obtained quenching constants, it can be concluded that both copper(II) complexes interact more strongly with BSA than the DNA. We have also studied the antitumor activities of these complexes. In conclusion, it can be stated that copper(II) complex **C2** has a relatively low cytotoxic effect on murine mammary carcinoma cells, a moderate effect on murine carcinoma cells and a relatively high cytotoxicity toward murine lung cancer cells.

## Supplementary data

CCDC 1810786 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223 336 033; or e-mail: [deposit@ccdc.cam.ac.uk](mailto:deposit@ccdc.cam.ac.uk).

**Acknowledgements** The authors are grateful to the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia for financial support (Grants Nos. 172016, 172034, 175069, 175103, 172011) and Faculty of Medical Sciences for grant MP 2014/02. This work was

also supported by the project VEGA 1/0598/14. We thank prof. Ana Popović-Bijelić and prof. Miloš Mojović (EPR Lab, Faculty of Physical Chemistry, University of Belgrade) for acquiring and analyzing the EPR spectra.

## References

1. Tisato F, Marzano C, Porchia M, Pellei M, Santini C (2010) *Med Res Rev* 30:708–749
2. Goodman VL, Brewer GJ, Merajver SD (2004) *Endocr Relat Cancer* 11:255–263
3. Molina-Holgado F, Hider RC, Gaeta A, Williams R, Francis P (2007) *Biometals* 20:639–654
4. Iakovidis I, Delimaris I, Piperakis SM (2011) *Mol Biol Int* 2011:594529
5. Prudhomme M (2013) *Advances in anticancer agents in medicinal chemistry*. Bentham Science Publishers, Sharjah, p 256
6. Gielen M, Tiekink ER (2005) *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine*. Wiley, New York, p 219
7. Marzano C, Pellei M, Tisato F, Santini C, *Anticancer Agents* (2009) *Med Chem* 9:185–211
8. Chohan ZH, Sumrera SH, Youssoufi MH, Hadda TB (2010) *Eur J Med Chem* 45:2739–2747
9. Patil SA, Naik VH, Kulkarni AD, Badami PS (2010) *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 75:347–354
10. Shebl M, Khalil SM, Ahmed SA, Medien HA (2010) *J Mol Struct* 980:39–50
11. Dhayabaran VV, Prakash TD, Renganathan R, Friehs E, Bahne-mann DW (2017) *J Fluoresc* 27:135–150
12. Li A, Liu YH, Yuan LZ, Ma ZY, Zhao CL, Xie CY, Bao WG, Xu JY (2015) *J Inorg Biochem* 146:52–60
13. Eslami Moghadam M, Saidifar M, Divsalar A, Mansouri-Torshizi H, Saboury AA, Farhangian H, Ghadamgahi M (2016) *J Biomol Struct Dyn* 34:206–222
14. Jalilehvand F, Sisombath NS, Schell AC, Facey GA (2015) *Inorg Chem* 54:2160–2170
15. Dharmaraja J, Subbaraj P, Esakkidurai T, Shobana S, Raji S (2014) *Acta Chim Slov* 61:803–812
16. Tay WM, Epperson JD, da Silva GF, Ming LJ (2010) *J Am Chem Soc* 132:5652–5661
17. Porter EA, Wang X, Lee H, Weisblum B, Gellman SH (2000) *Nature* 404:565
18. Specker E, Bottcher J, Lilie H, Heine A, Schoop A, Muller G, Griebenow N, Klebe G (2005) *Angew Chem Int Ed* 44:3140–3144
19. Myers AG, Barbay JK, Zhong B (2001) *J Am Chem Soc* 123:7207–7219
20. Barry NP, Sadler PJ (2013) *Chem Commun* 49:5106–5131
21. Ronconi L, Sadler JP (2007) *Coord Chem Rev* 251:1633–1648
22. Lebedev AV, Lebedeva AB, Sheludyakov VD, Kovaleva EA, Ustinova OL, Kozhevnikov IB (2005) *Russ J Gen Chem* 75:1113–1124
23. (2007) Oxford diffraction, CrysAlis CCD, CCD data collection GUI. Oxford Diffraction Ltd., Oxford
24. Palatinus L, Chapuis GJ (2007) *Appl Crystallogr* 40:786–790
25. Sheldrick GM (2015) *Acta Crystallogr Sect C Cryst Struct Commun* 71:3–8
26. Farrugia LJ (1999) *J Appl Crystallogr* 32:837–838
27. Brandenburg K (2009) DIAMOND (version 3.2i) Crystal Impact GbR. Bonn
28. Meadows KA, Liu F, Sou J, Hudson BP, McMillin DR (1993) *Inorg Chem* 32:2919–2923
29. Mosmann T (1983) *J Immunol Methods* 65:55–63
30. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y (2007) *Methods* 42:321–324
31. Schoenberg LN, Cooke DW, Liu CF (1968) *Inorg Chem* 7:2386–2393
32. Swaminathan K, Busch DH (1961) *J Inorg Nucl Chem* 20:159–163
33. Groom CR, Bruno IJ, Lightfoot MP, Ward SC (2016) *Acta Crystallogr B* 72:171–179
34. Kamwaya ME, Teoh SG, Fiz J (1984) *Malaysia* 5:1–7
35. Koumoussi ES, Zampakou M, Raptoulou CP, Psycharis V, Beavers CM, Teat SJ, Psomas G, Stamatas TC (2012) *Inorg Chem* 51:7699–7710
36. Rizvi MA, Zaki M, Afzal M, Mane M, Kumar M, Shah BA, Srivastav S, Srikrishna S, Peerzada GM, Tabassum S (2015) *Eur J Med Chem* 90:876–888
37. Meyer-Almes FJ, Porschke D (1993) *Biochemistry* 32:4246–4253
38. Patra A, Sen TK, Ghorai A, Musie GT, Mandal SK, Ghosh U, Bera M (2013) *Inorg Chem* 52:2880–2890
39. Liu ZC, Wang BD, Yang ZY, Li Y, Qin DD, Li TR (2009) *Eur J Med Chem* 44:4477–4484
40. Howe GM, Wu KC, Bauer WR (1976) *Biochemistry* 19:4339–4346
41. Karsten Rippe BIF (1997) *Futura* 12:20–26
42. Qu X, Chaires JB (2000) *Methods Enzymol* 321:353–369
43. Raja DS, Bhuvanesh NSP, Natarajan K (2011) *Inorg Chem* 50:12852–12866
44. Li DD, Tian JL, Gu W, Liu X, Yan SP (2010) *J Inorg Biochem* 104:171–179
45. Jiang M, Li YT, Wu ZY, Liu ZQ, Yan CW (2009) *J Inorg Biochem* 103:833–844
46. Ramachandran E, Thomas SP, Poornima P, Kalaivani P, Prabhakaran R, Padma VV, Natarajan K (2012) *Eur J Med Chem* 50:405–415
47. Paitandi RP, Gupta RK, Singh RS, Sharma G, Koch B, Pandey DS (2014) *Eur J Med Chem* 84:17–29
48. Miller JN (1979) *Proc Anal Div Chem Soc* 16:203–208
49. Annaraj B, Balakrishnan C, Neelakantan MA (2016) *J Photochem Photobiol B* 160:278–291
50. Theetharappan M, Subha L, Balakrishnan C, Neelakantan MA (2017) *Appl Organomet Chem* 31:1–19