УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Сандра С. Јовичић Милић

СИНТЕЗА, СТРУКТУРНА, ТЕОРИЈСКА И БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМ(II) ЈОНА СА ЕТИЛЕНДИАМИНСКИМ ДЕРИВАТИМА ТРИПТОФАНА И СУПСТИТУИСАНИМ 2-АМИНОТИАЗОЛИМА

Докторска дисертација

Крагујевац, 2023.

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Sandra S. Jovičić Milić

SYNTHESIS, CHARACTERISATION, TEORETICAL AND BIOLOGICAL EXAMINATIONS OF PALLADIUM(II) ION COMPLEXES WITH ETHYLENEDIAMINE DERIVATIVES OF TRYPTOPHAN AND SUBSTITUTED 2-AMINOTHIAZOLES

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023.

Аутор
Име и презиме: Сандра С. Јовичић Милић
Датум и место рођења: 06.04.1988. Крагујевац, Република Србија
Садашње запослење: Истраживач-сарадник (научна област: хемија), Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: **Синтеза, структурна, теоријска и биолошка испитивања комплекса паладијум(II) јона са етилендиаминским дериватима триптофана и супституисаним 2-аминотиазолима**
Број страница: 97
Број слика: 38
Број библиографских података: 153
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): 546, Хемија - Неорганска хемија
Ментор/Коментор: **др Верица В. Јевтић**, ванредни професор, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 27.01.2021.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертација: IV-01-277/8, 14.04.2021.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. Др Верица Јевтић, ванредни професор, Универзитет у Крагујевцу, Природно-математички факултет 2. Др Јелена Пољаревић, доцент, Универзитет у Београду, Хемијски факултет 3. Др Едина Авдовић, научни сарадник, Универзитет у Крагујевцу, Институт за информационе технологије, Крагујевац
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: 1. Др Гордана Радић, ванредни професор, Универзитет у Крагујевцу , Факултет медицинских наука 2. Др Едина Авдовић, научни сарадник, Универзитет у Крагујевцу, Институт за информационе технологије, Крагујевац 3. Др Јелена Пољаревић, доцент, Универзитет у Београду, Хемијски факултет
Датум одбране дисертације:

Посвећено

мојој мајци и деци Анастасији и Алекси

ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација урађена је у Институту за хемију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу и део је пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Пројекат бр. 451-03-68/2022-14/200122).

Желим да се захвалим ментору, проф. др Верици Јевтић, на указаном поверењу и сугестијама у току израде Докторске дисертације.

Такође се захваљујем свим члановима комисије на корисним саветима и коментарима који су допринели побољшању квалитета ове дисертације.

Посебну захвалност дугујем др Един Авдовић на сарадњи и свесрдној помоћи током израде Докторске дисертације.

Такође, захваљујем се проф. др Срећку Трифуновићу, као и колегама др Маји Ђукић, др Данијели Стојковић, Ђорђу Петровићу и Маријани Касаловић на помоћи и подршци у раду.

Такође, бескрајно хвала супругу и деци који су свако на свој начин били мој ветар у леђа. Хвала и Драгану на подршци и разумевању.

НАЈВЕЋУ ЗАХВАЛНОСТ дугујем својој мајци на свој љубави и подршци у свим сегментима живота.

АПСТРАКТ

У оквиру ове докторске дисертације описана је синтеза, карактеризација и биолошка активност *O,O′*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3--ил) пропионске киселине дихлорхидрата (**L1-L4**) као лиганада и њихових паладијум(II) комплекса (**C1-C4**), као и комплекса паладијум(II) јона са 2-амино-6--метилбензотиазолом (**C5**) и 2-амино-6-хлоробензотиазолом (**C6**). Карактеризација новосинтетисаних једињења вршена је на основу резултата елементалне микроанализе и спектроскопских метода (IR, ^{1}H и ^{13}C NMR) и методом рендгенске структурне анализе (**C6**).

In vitro антимикробна активност свих лиганада и њихових паладијум(II) комплекса одређена је тестирањем на 19 микроорганизама. *In vitro* антитуморска активност лиганада **L1-L4** и комплекса **C1-C4** је одређена тестирањем на ћелијама хуманог и мишијег карцинома дебелог црева (HCT116 и CT26), док је за лиганаде **L5-L6** и комплексе **C5-C6** одређена на мишијим ћелијама карцинома дојке 4T1, ћелијама мишијег колоректалног карцинома CT26, нормалне линије мезенхималних матичних ћелија миша mMSC и хуманим ћелијама карцинома дојке MDA-MB-468, као и хуманог колоректалног карцинома HCT116.

За проучавање реакција супституције паладијум(II) комплекса са дериватима 2-аминотиазола коришћени су конституент DNA (5’GMP), трипептид глутатион (GSH) и аминокиселина (L-Met), а реакције су изучаване помоћу stopped-flow методе.

У циљу потврђивања начина везивања између свих испитиваних комплекса паладијума(II) и CT-DNA, вршена су мерења вискозности раствора у присуству и у одсуству сваког комплекса, а на основу резултата може се закључити да долази до интеракције путем интеркалације.

За боље разумевање инхибиторне активности паладијум(II) комплекса **C1-C4** примењене су молекулске докинг симулације и то коришћењем програмског пакета AutoDock 4.2.

КЉУЧНЕ РЕЧИ:

Комплекси паладијум(II) јона, лиганди едда типа, деривати 2-аминотиазола, DFT, антимикробна активност, цитотоксичка активност, кинетика, интеракције, метода молекулског докинга

ABSTRACT

The synthesis, characterization and biological activity of *O,O′*-dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N′*-di-(3,3′-1H-indol-3-yl) propionate acid dihydrochloride (**L1-L4**) as ligands and their palladium(II) complexes (**C1-C4**), as well as complexes of palladium(II) ions with 2-amino-6-methylbenzothiazole (**C5**) and 2-amino-6-chlorobenzothiazole (**C6**) are described in this doctoral dissertation. The characterization of newly synthesized compounds was performed based on the results of elemental microanalysis and spectroscopic methods (IR, ^{1}H and ^{13}C NMR) and using the X-ray structural analysis (**C6**).

In vitro antimicrobial activity of all ligands and their palladium(II) complexes was determined being tested on 19 microorganisms. *In vitro* antitumor activity of ligands **L1-L4** and complexes **C1-C4** was determined being tested on human and murine colon cancer cells (HCT116 and CT26, while the antitumor activity of ligands **L5-L6** and complexes **C5-C6** was determined on mouse breast cancer cells 4T1, mouse colorectal cancer cells CT26, normal mouse mesenchymal stem cell line mMSC and human breast cancer cells MDA-MB-468 as well as human colorectal cancer HCT116.

In order to study substitution reactions of palladium(II) complexes with 2-aminothiazole derivatives (**C5** and **C6**) DNA constituent (5'GMP), tripeptide glutathione (GSH) and amino acid (L-Met) were used and the reactions were studied using the stopped-flow method

In order to confirm the method of binding between all examined palladium(II) complexes and CT-DNA, the viscosity of the solution was measured in the presence and in the absence of each complex; based on the results the interaction was concluded to occur through intercalation.

For a better understanding of the inhibitory activity of the palladium(II) complex (**C1-C4**), molecular docking simulations were applied using the AutoDock 4.2 software package.

KEY WORDS:

Palladium(II) complexes, edda-type ligands, derivatives of 2-aminothiazole, DFT, antimicrobial activity, cytotoxic activity, kinetics, interactions, molecular docking method

С А Д Р Ж А Ј

1. ОПШТИ ДЕО

1.1. ЗНАЧАЈ ЈОНА МЕТАЛА У ЖИВИМ СИСТЕМИМА И У МЕДИЦИНИ

Јони метала имају важну улогу у свим живим системима, било да говоримо о људском и животињском организму, било да мислимо на биљни свет. Они имају утицај како на дисање и развој, тако и на размножавање. За транспорт кисеоника кроз организам одговорно је гвожђе, као саставни део хемоглобина, кобалт је саставни део цијанокобаламина - витамина Б12, цинк је важан за рад имунолошког система и улази у састав различитих ензима, а магнезијум улази у састав хлорофила, зеленог пигмента код биљака, алги и цијанобактерија, одговорног за процес фотосинтезе. Познато је да метални јони учествују у великом броју ензимских реакција и да металопротеини имају улогу у најмање једном кораку у скоро свим биолошким процесима [1].

У људском телу, посебно у течностима (било да мислимо на интрацелуларни или екстрацелуларни простор), велику улогу имају и јони натријума, калијума, калцијума и магнезијума. Натријум-калијумова пумпа, као облик активног транспорта јона кроз ћелијску мембрану је од значаја за стварање мембранског потенцијала. Током овог процеса јони натријума излазе из ћелије, а јони калијума улазе у ћелију. Јони се крећу из средине са мањом у средину са већом концентрацијом, уз потрошњу енергије и уз помоћ молекула носача [2].

Поред своје веома важне улоге у функционисању организма, метали у виду својих једињења су коришћени од давнина у лечењу многих болести. Још у 8. веку злато је добило епитет „еликсир младости", а Кинези и Арапи су га користили као лек још 2500 година пре нове ере [3]. Почетком 20. века једињења злата су се користила за лечење туберкулозе [4,5] и реуматоидног артритиса [6]. Поред злата, значајно место у медицини заузимају и комплекси сребра, који се користе као антимикробни агенси. Сребро(I) сулфадиазин је први комплекс сребра употребљен у ове сврхе [7]. Различита једињења гвожђа се и данас користе у лечењу анемије, а једињења бакра су нашла примену у лечењу Вилсонове болести [8]. У терапији херпеса користе се једињења цинка [9]. Једињења многих метала се користе и у дијагностичке сврхе, као на пример једињења гадолинијума(III) и мангана(II) у магнетно-резонанционој спектроскопији [10].

1.2. КАРЦИНОМ И ХЕМИОТЕРАПЕУТИЦИ

Карцином представља промену која настаје услед неконтролисаног раста и деобе ћелија. Трансформација из нормалне у туморску ћелију је вишестепени процес, а може бити захваћено околно ткиво или пак карцином може метастазирати и на удаљене органе. Узроци за овакве абнормалности ћелија су многобројни, али се могу свести на утицај спољашњих агенаса и/или на генетске факторе. Од спољашњих фактора треба истаћи ултраљубичасто и јонизујуће зрачење, као и дувански дим, алфатоксин и арсен, затим разне вирусе и бактерије.

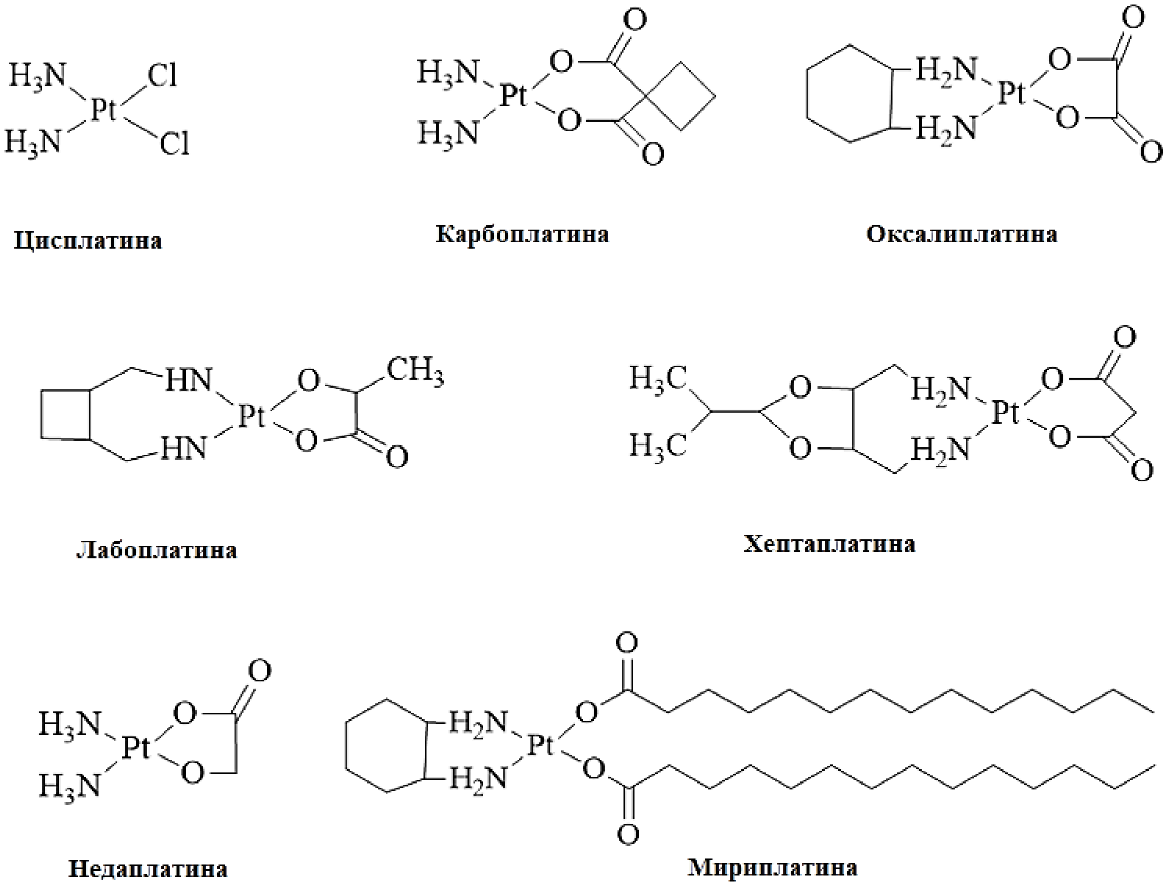
Према подацима Светске здравствене организације карцином је највећи узрочник смртности у Европи, после кардиоваскуларних болести. Чак 20% смртних случајева је узроковано неком врстом карцинома [11]. Три најзаступљеније врсте карцинома су карцином плућа, дојке и дебелог црева [12]. Најчешће дијагностикован карцином код мушкараца је карцином плућа, док је код жена то карцином дојке, али по смртности значајно место заузимају и карцином панкреаса и грлића материце [13]. Ток и исход болести у многоме зависе од раног откривања, као и адекватног избора терапије.

Прекретница у лечењу карцинома је настала 1965. године са Розенберговим открићем *cis*-диаминодихлоридоплатина(II) комплекса, цисплатине [14] (**слика 1**). Иако је до открића дошло сасвим случајно, даљим испитивањем добијеног комплекса на карциномима код мишева, утврђено је да је врло ефикасан у лечењу саркома 180 и леукемије 1210 [15]. Од 1979. године лек под називом платинол се користи у медицини у лечењу појединих карцинома, од којих највећу ефикасност показује у третману карцинома главе и врата, неких карцинома плућа и крви [16–19]. За разлику од цисплатине, транс изомер не показује антитуморску активност на истим туморима миша [20,21]. За антитуморску активност цисплатине одговорна је интеракција са молекулом DNA и то са N7 атомом имидазоловог прстена аденозина или гуанина, али у малом проценту [22]. Остатак неизреаговалих молекула се везује за протеине и изазива нежељена дејства [23]. Употреба циспатине је ипак ограничена како због резистенције неких тумора на овај лек, тако и због њених нежељених ефеката која се испољавају у виду повраћања, опадања косе, неуротоксичности и нефротоксичности. Такође, цисплатина се примењује интравенски, тако да се лек може применити само у болничким условима.

Сходно свему претходно поменутом, од великог је интереса синтетисати нове лекове који ће имати мање нежељених ефеката, а који ће показати већу селективност према туморским ћелијама у односу на здраве.

Синтетисани су пре свега аналози цисплатине и то заменом лабилних хлоридних јона, стабилним бидентатним лигандима. Врло је важно нагласити да активност комплекса зависи и од јачине везе коју остваре лабилни лиганди, јер се са повећањем јачине везе смањује антитуморска активност [24]. Током година многа новосинтетисана једињења су сматрана потенцијалном антитуморксим агенсима, али само неколицина њих је и ушла у употребу као лек. Неки од њих су: диаммин[1,1-циклобутандикарбоксилато(2)]-*O*,*O'*-платина(II) (карбоплатина) [25]; *cis*-димминциклохексан оксалатоплатина(II) (оксалиплатина) [26]; 1,2-диаминометил--циклобутан-платина(II)-лактат) (лобаплатина) [27]; *cis*-малонато[(4*R*,5*R*)-4,5--*bis*(амино-метил)-2-изопропил-1,3-диоксолан]платина(II) (хептаплатина) [28], [*cis*-диммин(гликолато-*O*,*O'*-платина(II)]) (недаплатина) [29] и *cis*-[((1*R*, 2*R*)-1,2--циклохександиамин-*N*,*N'*)*bis*(миристато)]платина(II) (мириплатина) [30] (**слика 1**).

Открићем и применом карбоплатине, избегнута је нефротоксичност, а не јављају се ни мучнина и повраћање, али се јавља тромбоцитопенија. Сличан је случај и са применом недаплатине. Оксалиплатина садржи 1,2-диамино-циклохексан (dach) одлазећи лиганд и показује активност и према туморима који су резистентни на цисплатину. Показује мању хематолошку токсичост и нефротоксичност, али изазива мучнину и повраћање, што је решено увођењем антиеметика [24].



Слика 1. Комплекси платине који су у употреби у лечењу тумора

1.3. ПАЛАДИЈУМ

Паладијум се налази у 10. групи Периодног система елемената, са редним бројем 46 и релативном атомском масом 106,42. Припада платинској групи метала. Открио га је Вилијам Хајд Воластон, 1803. године и дао му име према астероиду Паласу. То је сребрно-бели метал (**слика 2**), који се у једињењима најчешће јавља у оксидационом стању +2, а нешто ређе у оксидационом стању +4.

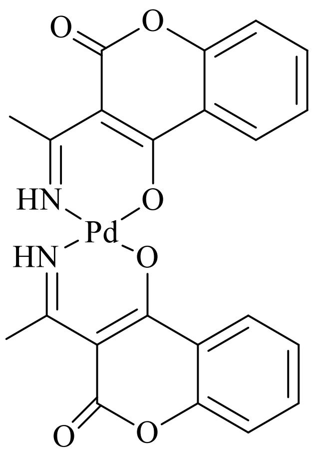
У природи га има у малим количинама, а ти ограничени извори су управо и узрок његовог значаја на берзи. Главни потрошач паладијума је аутомобилска индустрија, где се овај метал користи у производњи катализатора. На ову производњу је одлазило чак 71% укупне количине утрошеног паладијума у Сједињеним Америчким Државама 2018. године, док је остатак утрошен у петрохемији, стоматологији и медицини, као и у производњи накита [31].

Почетком 90-их година колоидни паладијум-хлорид је коришћен субкутано за лечење гојазности, али је показао доста нежељених ефеката и то у виду грознице, еуфорије и некрозе на месту убода. Касније је примењиван орално за лечење туберкулозе у дози од 65 mg/дану, али је терапија била неефикасна [32].

Слика 2. Паладијум и Вилијам Хајд Воластон - проналазач паладијума (Слике су преузете са https://en.wikipedia.org/wiki/Palladium и https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:William_Hyde_Wollaston)

За једињена паладијума(II) се може рећи да су структурни аналози једињењима платине(II) због сличних хемијских особина ова два јона (оба имају d^8 електронску конфигурацију). Оба граде квадратно-планарне комплексе, с тим што су комплекси платине стабилнији, док комплекси паладијум(II) јона подлежу хидролизи чак 1 000 000 пута брже. У томе се огледа њихова нижа антиканцерогена активност. Због веће реактивности комплекс не може непромењене структуре да стигне до циљане ћелије где би испољио своју активност. Да би се овај проблем превазишао многи аутори су предложили употребу хелатних лиганада [33]. Паладијум, као мека Луисова киселина, гради стабилне комплексе са меким Луисовим базама, као што су лиганди који садрже сумпор и азот као донорске атоме.

Иако су у први мах комплекси паладијума(II) показали слабију активност од комплекса платине(II) они су ипак даље испитивани. Тако се дошло до сазнања да поједини комплекси паладијума имају активност сличну као и цисплатина и карбоплатина, као што је случај са комплексом у коме је као лиганд коришћен дериват кумарина, а који је приказан на **слици 3**. Овај комплекс је показао значајну активност према хуманом аденокарциному плућа (A549), хуманом аденокарциному материце (HeLa) и хуманој мијелоидној леукемији (K562), која је чак 7800 пута већа од активности карбоплатине према истим ћелијским линијама карцинома [34].

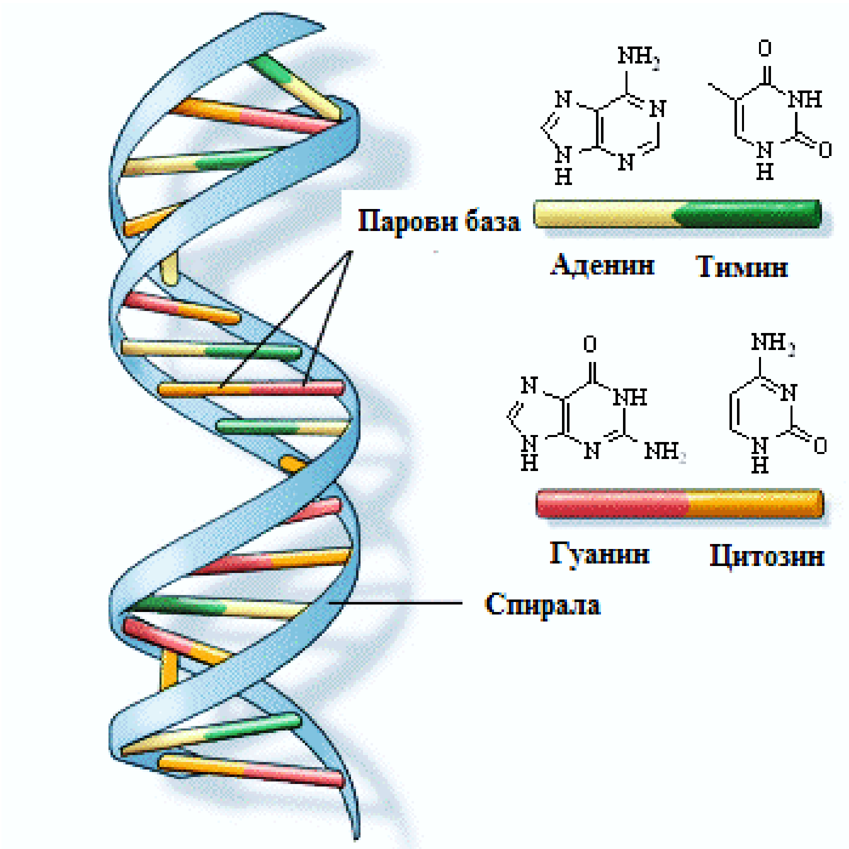


Слика 3. Комплекс паладијум(II) јона са дериватом кумарина

Данас се за лечење карцинома простате користи радиоактивни изотоп паладијума ^{103}Pd, а нежељени ефекти одговарају нежељеним ефектима који се јављају код примене радиотерапије [35,36].

1.4. ИНТЕРАКЦИЈЕ СА DNA КАО МЕХАНИЗАМ ДЕЛОВАЊА АНТИКАНЦЕРОГЕНИХ АГЕНАСА

DNA или дезоксирибонуклеинска киселина је полимер састављен од два полинуклеотидна ланца спирално увијених један око другог при чему се формира двострука спирала. Они носе генетске информације за раст и развој свих организама. Полинуклеотиди се састоје од једноставнијих мономерних јединица - нуклеотида [37,38]. Сваки нуклеотид се састоји од једне од четири базе (цитозин, гуанин, аденин или тимин), шећера дезоксирибозе и фосфатне групе. Комплементарне азотне базе су подељене у две групе, пиримидинске (тимин и цитозин) и пуринске (аденин и гуанин). Азотне базе два одвојена полинуклеотидна ланца су повезане водоничним везама да би се направила дволанчана DNA и то увек аденин са тимином, а цитозин са гуанином, док су нуклеотиди везани ковалентним (фосфодиестарским) везама које се налазе између шећера једног нуклеотида и фосфата следећег нуклеотида **(слика 4)**.



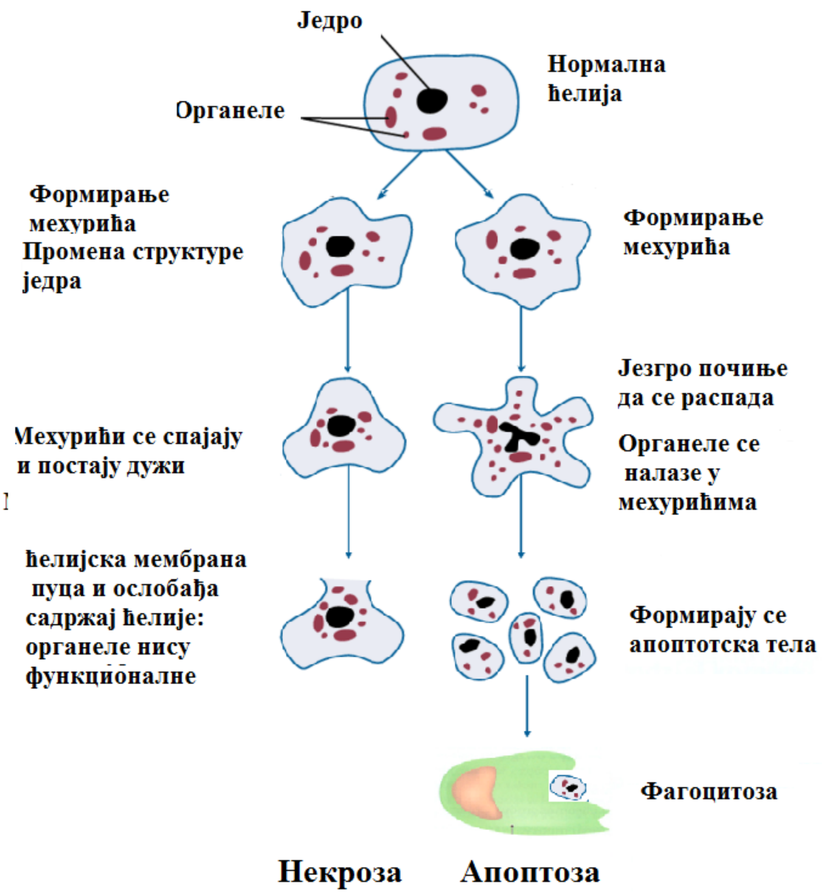
Слика 4. Приказ DNA ланца са базама које улазе у његов састав (преузето са *https://www.chemguide.co.uk/organicprops/aminoacids/dna1.html* и дорађено)

Комплекси прелазних метала се могу за DNA везати или ковалентним или нековалентним везама [39]. Ковалентна веза се остварује између јона метала и атома N(7) из гуанина, док су нековалентне интеракције електростатичко везивање и везивање у жљебовима.

Репликација и транскрипција DNA су веома важни за одигравање биолошких процеса синтезе различитих протеина и ензима. Такође, молекул DNA представља примарну интрацелуларну мету за многе антиканцерогене лекове. Интеракција лека и DNA обично изазива деформацију ћелија карцинома блокирањем њихове деобе. На тај начин долази до смрти ћелије [40]. Стога истраживање интеракција између малих молекула и DNA може да подржи развој нових комплекса јона прелазних метала како би се потенцијално открила њихова боља активност у поређењу са већ познатим комплексима платине(II).

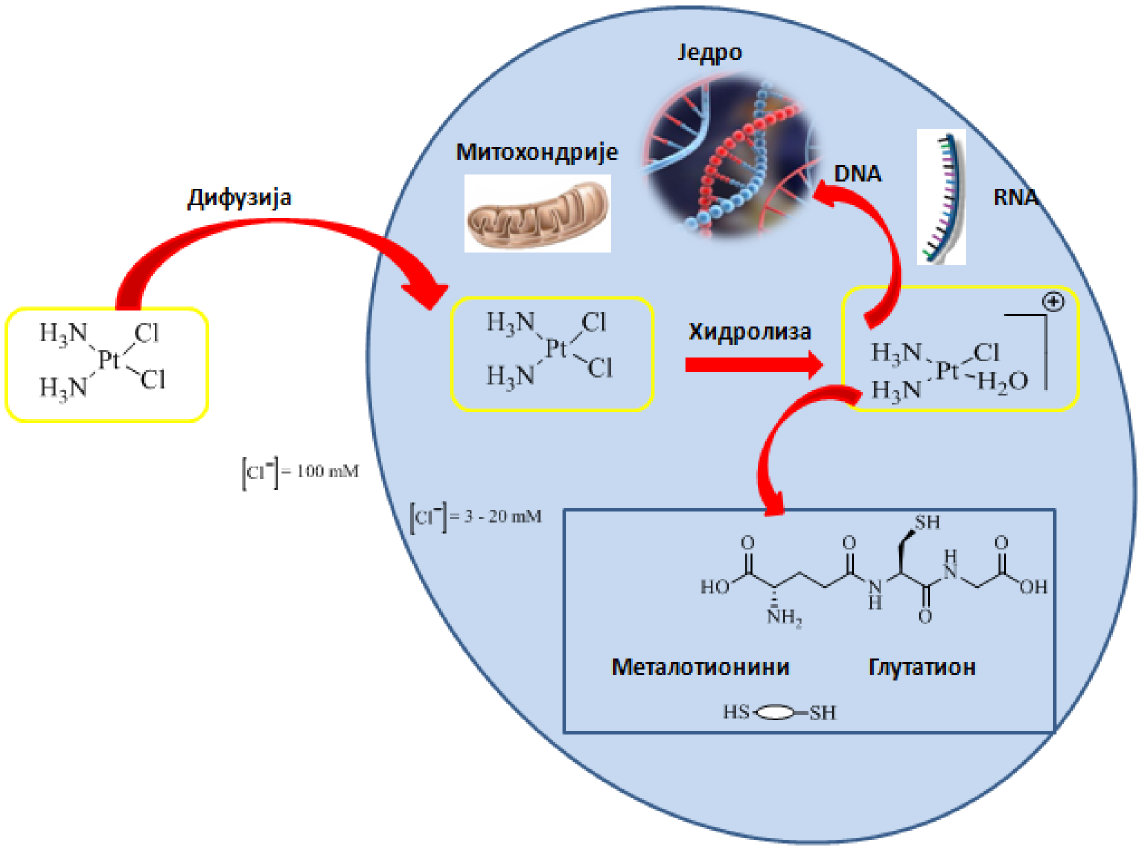
Ако говоримо о антитуморској активности цисплатине, можемо рећи да се она испољава управо везивањем за DNA, заустављајући репликацију, односно транскрипцију. Тако настаје апоптоза, као програмирана смрт ћелије. Процес апоптозе подразумева да сама ћелија извршава програмирану смрт, па запаљенска реакција изостаје. Због тога је ово пожељан облик ћелијске смрти. Апоптоза је активан процес, а да би се одвијала неопходна је синтеза ензима и протеина који у њему учествују. Такође, то је и генетски регулисан поцес који се одвија у више фаза, што је приказано на **слици 5**. Апоптотска тела која притом настају се уклањају процесом фагоцитозе од стране макрофага, делови ћелије се не ослобађају у околно ткиво па не долази до запаљенских реакција.

За разлику од апоптозе, некроза је непожељан, пасиван облик ћелијске смрти. Назива се још и „убиство ћелије”. При овом процесу долази до оштећења ћелијске мембране, а ћелијски садржај истиче у околно ткиво, што доводи до запаљенских реакција. Процес некрозе приказан је на **слици 5**.



Слика 5. Апоптоза и некроза (преузето са изменама са https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3f/N%C3%A9crose_apoptose.png)

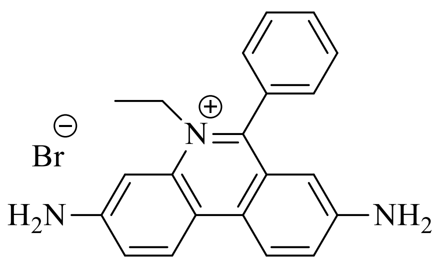
Након што се примени интравенски, цисплатина захваљујући високој концентрацији хлоридо јона у крви која спречава хидролизу долази непромењена до канцерогених ћелија. Тек када доспе до ћелије где је концентрација ових јона знатно нижа, долази до замене хлоридо лиганда молекулима воде и тек тако хидролизовани јони реагују са DNA [41–51]. У организму се налазе и многи макромолекули који могу бити потенцијална места за везивање цисплатине (RNA, протеини који садрже сумпор итд.) што доводи до нежељених дејстава лека. Механизам деловања цисплатине приказан је на **слици 6**.



Слика 6. Механизам дејства цисплатине

Такође, испитиване су и интеракције комплекса паладијум(II) јона са молекулом DNA [52], а резултати су показали да комплекси паладијума(II) остварују нековалентне везе са DNA (интеркалација).

Интеркалација представља уградњу молекула између парова база у DNA [53]. Једињење које се најчешће користи за спектрофотометријско испитивање интеракција је етидијум-бромид (3,8-диамино-5-етил-6-фенилфенантридинијум бромид, EB - **слика 7**). Ово једињење поседује способност да се интеркалира међу парове база DNA, а интензитет емисије флуоресценције расте са смањењем поларности растварача [54]. Нека једињења имају могућност да истисну интеркалирани EB и том приликом долази до смањења интензитета флуоресценције [55].

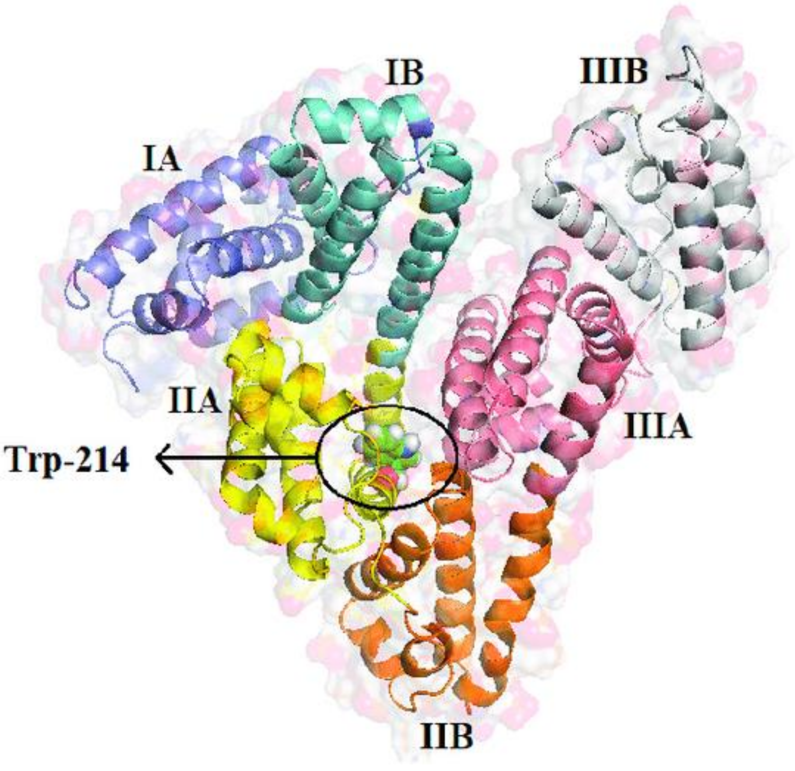


Слика 7. Структура етидијум-бромида

1.5. СЕРУМ АЛБУМИН - ПРОТЕИН ОДГОВОРАН ЗА ТРАНСПОРТ ЛЕКОВА

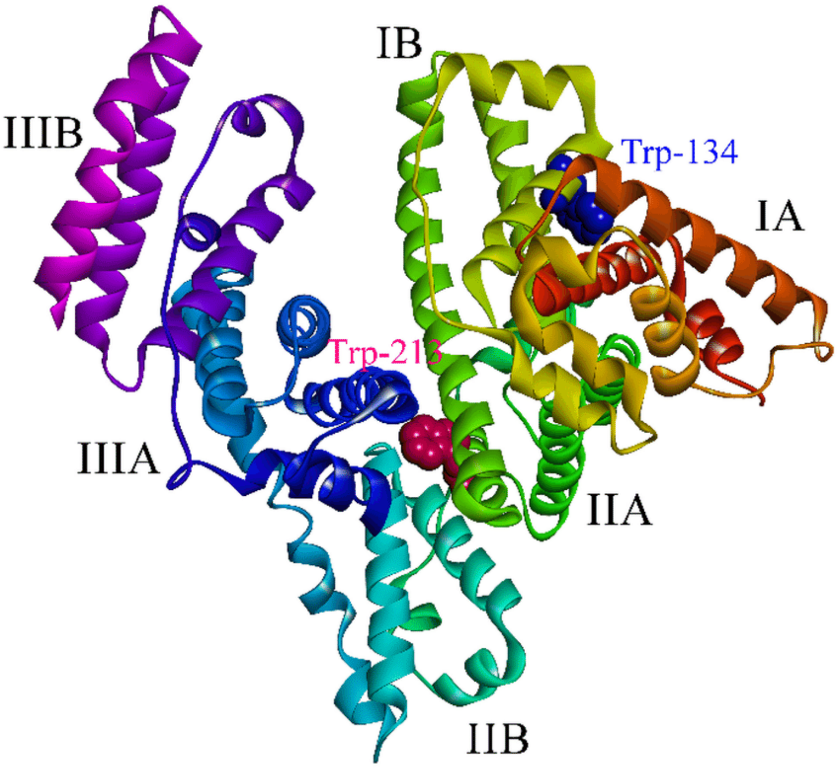
Најзаступљенији протеин у плазми је серум албумин (SA) који је кључни албумин за транспорт металних јона и других молекула кроз крвоток. Производи га јетра, а растворен је у крвној плазми. Природа и снага интеракције између комплекса јона прелазних метала и серум албумина имају велики утицај на дистрибуцију лека, апсорпцију, метаболизам и коначно на излучивање [56]. Серум албумин је задужен и за регулисање осмотског притиска који доприноси нормалној дистрибуцији течности између крвних судова и ткива, као и за одржавање нормалне pH вредности у крви [57]. Уколико се SA нађе у урину обично је знак болести бубрега.

Хумани серум албумина (HSA) је најзаступљенији транспортни протеин у крви човека (**слика 8**). Састоји се од по једног C- и N-терминалног краја и три домена (I, II, III) од којих сваки садржи два спирална под-домена (А и Б) умрежена дисулфидним мостовима. Сваки под-домен се састоји од 4-6 α- хеликса [58,59]. Када је ексцитован на 295 nm, HSA показује флуоресцентну емисију на око 360 nm, због присуства триптофана (Trp-214) [60]. Приликом везивања испитиваног комплекса за HSA долази до смањења интензитета флуоресценције, због промене у окружењу триптофана. Везивање комплекса за серум албумина може проузроковати промену конформације протеина, везивање супстрата, повезивање подјединица или пак денатурацију [61–63].



Слика 8. Хумани серум албумина (HSA) (преузето са изменама са https://www.researchgate.net/figure/A-Human-serum-albumin-HSA-structure-as-cartoon-representation-and-tryptophan-214_fig1_327206543)

Највише испитиван је говеђи серум албумина (BSA). Он је по структури врло сличан хуманом серуму албумина (HSA). За разлику од HSA, говеђи серум албумина садржи још један триптофански остатак (Trp-135). Структура BSA је приказана на **слици 9**. Због сличне структуре, раствори оба албумина показују исту флуоресцентну емисију [64].



Слика 9. Говеђи серум албумина (BSA) (преузето са https://www.researchgate.net/figure/Schematic-subdomains-of-bovine-serum-albumin-with-tryptophan-residues-PDB-ID-3V03-16_fig1_354931675)

Интеракције између неких комплекса јона прелазних метала и биомолекула који садрже сумпор обично доводе до појаве резистенције и токсичних споредних ефеката [65]. Стога би проучавање интеракција металних комплекса са различитим биолошки релевантним нуклеофилима могло бити веома важно за даљи развој нових потенцијалних лекова.

Од великог значаја су и металотионени, протеини локализовани на мембрани Голџијевог апарата. Металотионени везују тешке метале преко тиолне групе остатака цистеина и тако штите организам од токсичности и од оксидативног стреса. У људском телу велике количине се синтетишу првенствено у јетри и бубрезима. Металотионени су протеини са којима реагују комплекси платине(II).

Zhang и сарадници су први проучавали *in vivo* и *in vitro* својства комплекса паладијум(II) јона у реакцији са металотионенима. Доказано је да се ови јони *in vivo* везује за металотионене ковалентним везама у бубрезима, а *in vitro* индукују неоксидативну олигомеризацију нативних металотионена [66].

1.6. УТИЦАЈ МИКРООРГАНИЗАМА НА КВАЛИТЕТ ЖИВОТА

Микроорганизми су група врло ситних организама који су обично невидљиви голим оком. За њихово посматрање и проучавање од великог значаја је било конструисање микроскопа од стране ван Левенхука. У његовим записима су први пут описани неки микроорганизми.

Сматра се да су се први микроорганизми на Земљи појавили пре 3,5 милијарди година. Заступљени су како у води и ваздуху, тако и у земљишту и другим организмима. Због велике прилагодљивости различитим условима животне средине могу се наћи и на местима са екстремним условима.

Микроорганизми имају важну улогу у природи, као њени „чистачи”, јер утичу на процес разградње угинулих организама. Такође, задужени су и за многе важне процесе, па су тако нашли примену у прехрамбеној индустрији приликом производње хране, али и у медицини. Многе бактерије су заступљене на површини коже као и у телу, а да притом не изазивају никакве болести. Шта више, пробиотске бактерије су од великог значаја за здравље људи.

Поред свих корисних својстава, постоји и група патогених микроорганизама, изазивача болести. Борба човека са овим болестима датира од давнина. Још су стари Египћани приметили да се неке болести преносе са оболелих на здраве особе, а у античко време су биљке коришћене за лечење болести изазаваних микроорганизмима. Данас су инфективне болести узроковане патогеним микроорганизмима међу водећим узроцима смртности широм света. Значајан проблем код ових болести је што се могу пренети директно или индиректно са једне особе на другу, док се неке могу пренети са животиња на људе, или из контаминиране хране и воде [67].

Кроз историју, главни циљ многих истраживача је био да пронађу ефикасан и селективан лек за инфекције. Открићем антибиотика многе до тада неизлечиве болести постале су излечиве. Временом је настао други проблем. Због прекомерне и неконтролисане употребе антибиотика многе бактерије су развиле резистентност, као вид одбране на дејство лекова. Резистенција се може посматрати са два гледишта, и то биохемијског и генетског [68]. Са биохемијске тачке гледишта догађа се инактивација антибиотика његовом разградњом, затим модификација мете деловања смањивањем афинитета везивања антибиотика и циљаног места [69] или пак излучивање антибиотика помоћу ефлукс пумпе. Са генетске тачке гледишта резистенција се јавља као последица мутације гена или хоризонталног преноса гена [70].

Резистенција која се јавља у многоме отежава лечење и сам ток болести постаје неизвестан, па је брз развој нових антибиотика од огромног значаја.

1.7. РАЗВОЈ И ДЕЛОВАЊЕ АНТИБИОТИКА

Након Флеминговог открића пеницилина 1928. године [71] и његовог увођења у употребу за лечење бактеријских инфекција, забележено је све веће интересовање за синтезу и истраживање нових једињења са широким спектром антимикробног деловања. Пеницилин је био први ефикасан антибиотик у третману бактеријских инфекција. Данас је његова употреба ограничена управо због развоја резистенције многих сојева бактерија.

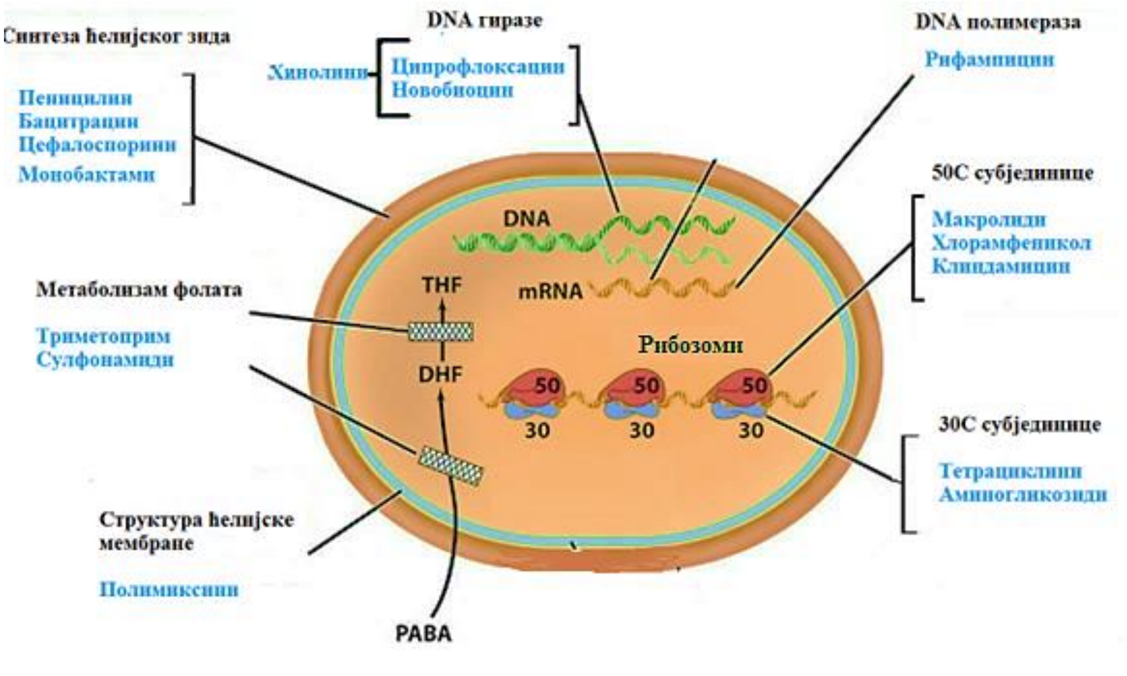
Антибиотици делују тако што или убијају бактерије или инхибирају њихов раст. Своје дејство могу испољити деловањем на ћелијски зид, цитоплазматичну мембрану или пак реметећи метаболичке процесе унутар саме ћелије (**слика 10**).

Селективно антибактеријско дејство β-лактамских антибиотика, као што су пеницилин, монобактам и цефалоспорини, заснива се управо на присуству и биосинтези ћелијског зида бактерија. Спречавајући реакцију завршне транспептидације, везујући се ковалентним везама за протеин, спречавају умрежавање пептидних ланаца пептидогликана. На тај начин онемогућено је формирање ригидне структуре ћелијског зида.

Антибиотици делују и тако што инхибирају синтезу протеина. У ову групу антибиотика спадају аминогликозиди, тетрациклини, као и макролиди. Они делују на бактеријске рибозоме. Аминогликозиди се везују за 30С рибозомске подјединице и иреверзибилно инхибирају синтезу протеина. За разлику од њих, тетрациклини се реверзибилно везују за 30С рибозомске подјединице. Тако се спречава везивање аминоацилне tRNA у рибозомима и онемогућава изградња пептидног ланца. Макролиди се везују за 50С рибозомске подјединице, за 23С rRNA, инхибирајући на тај начин активност пептидилтрансферазе.

Полимиксини испољавају дејство променом пермеабилности ћелијске мембране или активног транспорта кроз мембрану. Механизам њиховог дејства се заснива на реакцији са фосфатним групама молекула фосфолипидног двослоја код Грам-негативних бактерија.

Рифампицин, триметоприм, сулфонамиди и хинолини доводе до инхибиције биосинтезе и метаболизма нуклеинских киселина.

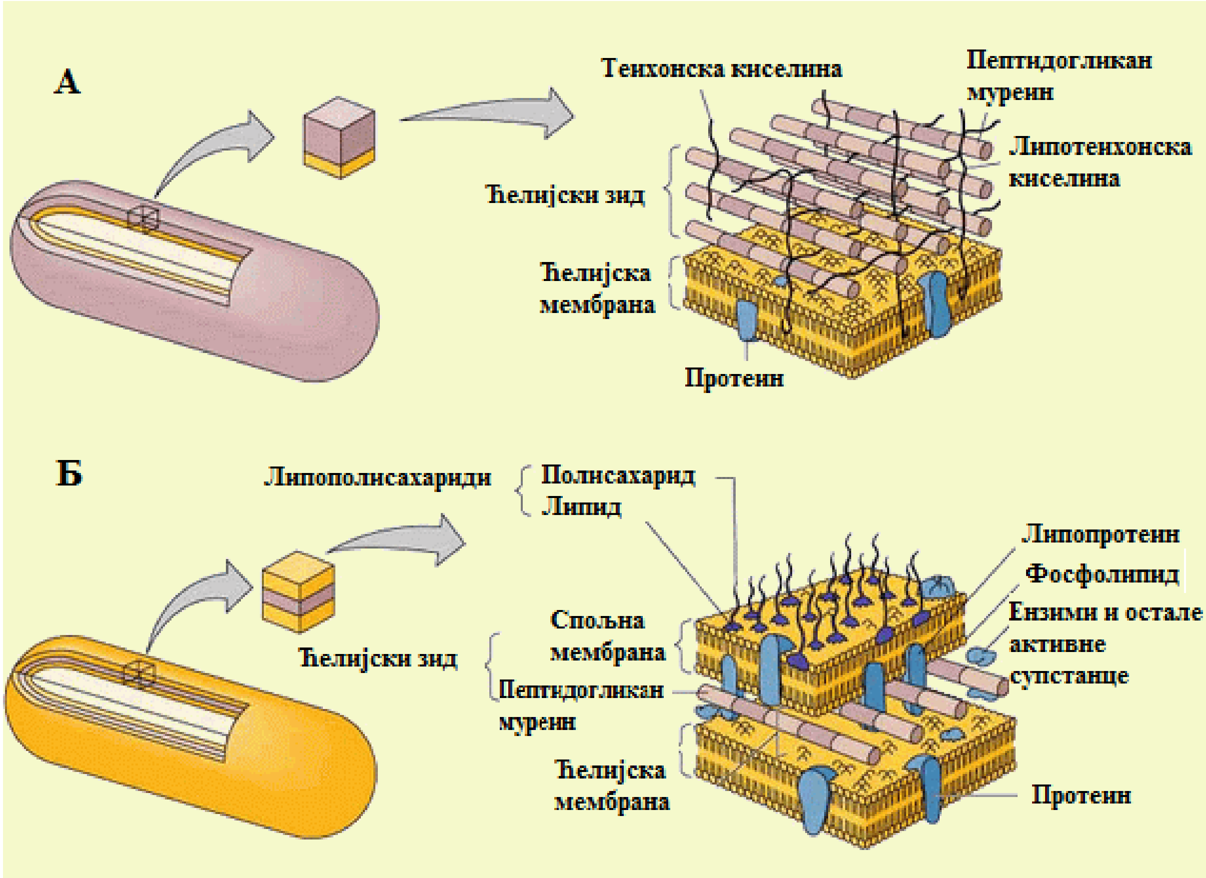


Слика 10. Маханизам дејства антимикробних агенаса (преузето са https://virtual-chem.blogspot.com са изменама)

Дејство и примена антибиотика зависи пре свега од грађе ћелијског зида бактерије, односно да ли су у питању Грам-негативне или Грам-позитивне бактерије (**слика 11**).

Грам-негативне бактерије су отпорније на дејство антибиотика јер садрже и спољашње мембране. Функција овог слоја је и да онемогући деловање одбрамбеног система организма, као и дејство детерџената и лизозима [72]. Ова мембрана спречава пролаз хидрофобних молекула, јер се на спољашњем делу фосфолипидног слоја налазе липополисахариди који су наелектрисани и хидрофилни [73].

За разлику од Грам-негативних бактерија, Грам-позитивне бактерије имају спољашњи слој изграђен углавном од пептидогликана, а у састав ћелијског зида улази и теихонска киселина. Дебљина њиховог ћелијског зида је око 25 nm.



Слика 11. Омотач Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија (преузето са *http://www.biologija.rs/prokariote.html*)

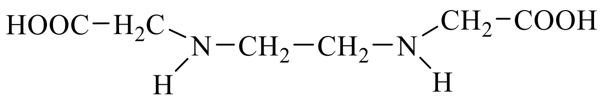
Због све већег броја инфекција изазваних резистентним сојевима микроорганизама од великог је значаја брзи развој нових антимикробних агенаса. Некада су се користили природни препарати, али после открића пеницилина па све до данас се све више ради на синтези нових једињења.

Многа једињења паладијума(II) су показала значајну антибактеријску активност. Тако су комплекси паладијума са тетрациклинима показали активност према соју *Echericia coli* HB101/Pbr322, и то чак 16 пута бољу од тетрациклина [74].

Комплекси паладијума(II) су показали широк спектар биолошких активности, као што су антифунгална, антитуберкулозна и антивирусна активност [74,75]. Резултати антимикробне активности великог броја комплекса паладијума(II) са различитим лигандима су раније испитивани [76–83].

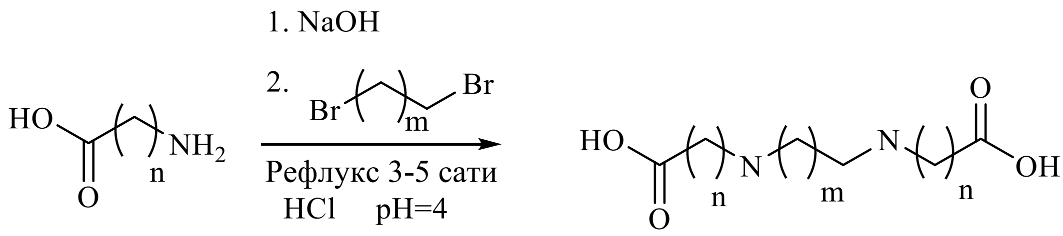
1.8. ЛИГАНДИ EDDA ТИПА

EDDA или етилендиамин-*N*,*N′*-дисирћетна киселина поседује у својој структури по два донорска атома кисеоника и азота, па уколико се потпуно координује за централни метални јон понаша се као тетрадентатни лиганд.



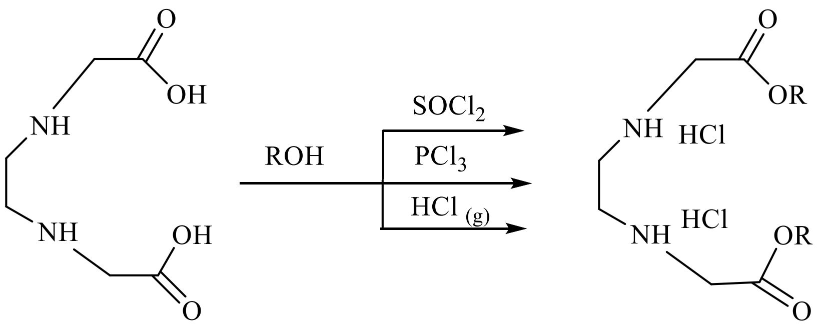
Слика 12. Структура етилендиамин-*N*,*N′*-дисирћетне киселине

N- или C-супституисани деривати етилендиамин-*N*,*N′*-дисирћетне киселине представљају лиганде EDDA-типа. Неки од њих су: етилендиамин-*N*,*N′*-ди-3-пропионат (eddp), етилендиамин-*N*,*N′*-ди-(*S*,*S*)-2-пропионат ((*S*,*S*)-eddp), етилендиамин-*N*,*N′*-ди- -(*S*,*S*)-2-(3-метил)-бутаноат ((*S*,*S*)-eddv) итд. Сви ови лиганди се синтетишу према методи која је већ описана од стране Берсворта (*Bersworth*).



Шема 1. Синтеза EDDA-типа лиганада

Лиганди овог типа се могу естерификовати, а естри се понашају као бидентатни лиганди при чему се координација врши преко донорских атома азота. Уколико дође до хидролизе естарских група, лиганди се координују тридентатно или тетрадентатно, у зависности од тога да ли су хидролизовале обе или само једна естарска група.

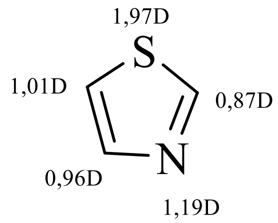


Шема 2. Естерификација лиганада EDDA-типа

Биолошка активност *N*,*N′*-бидентатних естара, R_2edda-типа деривата аминокиселина је већ раније испитивана [80,81,83–86], па су истраживања у оквиру ове докторске дисертације наставак ранијих студија.

1.9. ТИАЗОЛ

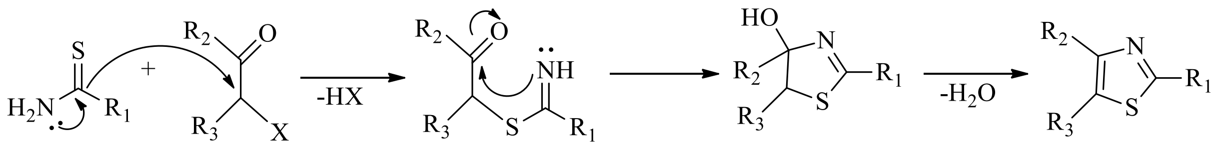
Тиазол (1,3-тиазол) је хетероциклично једињење које у својој структури садржи сумпор у положају 1 и азот у положају 3 (**слика 13**). Молекулска формула тиазола је C_3H_3NS [87]. Прстен је планаран и ароматичан, што се може закључити на основу хемијских померања протона у прстену у ^{1}H NMR спектрима (између 7,27 и 8,77 ppm). На основу прорачуна π-електронске густине може се закључити да је атом C-5 примарно место за одигравање реакција електрофилне супституције, док се на атому C-2 одигравају реакције нуклеофилне суспитуције. Тиазол је течност, бледо-жуте боје и мириса сличног пиридину.



Слика 13. Структура тиазола са приказаним π-електронским густинама

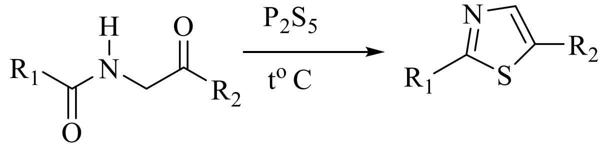
1.10. СИНТЕЗЕ НЕКИХ ДЕРИВАТА ТИАЗОЛА

Ханчова (*Hantzsch)* синтеза је једна од најстаријих метода за синтезу тиазола. Подразумева реакцију циклизације између алфа-халокарбонила и једињења која садрже N-C-S фрагмент, као што су тиоуреа, тиоамиди, тиосемикарбазони и тиосемикарбазиди [88].



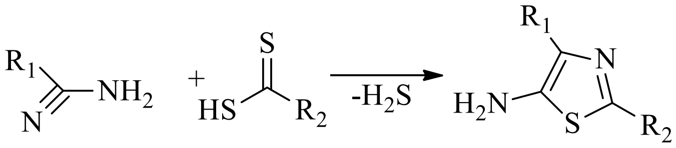
Шема 3. Ханчова синтеза

Габриелова (*Gabriel*) синтеза је још један начин за синтезу тиазола,а подразумева реакцију циклизације ациламинокарбонила и фосфор-пентасулфида на 170 °C [89,90].



Шема 4. Габриелова синтеза

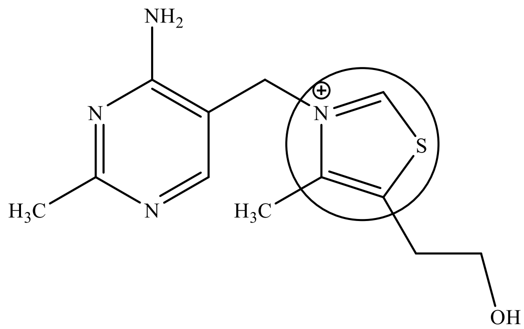
Кук-Хеилбронова (*Cook-Heilbron)* синтеза обухвата синтезу 2,4-дисупституисаних деривата 5-аминотиазола у реакцији α-аминонитрила и дитиокиселина или естара дитиокиселина, угљен-дисулфида, угљен-оксисулфида, или изотиоцијаната под благим реакционим условима.



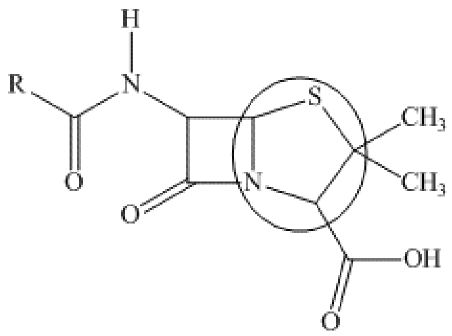
Шема 5. Кук-Хеилбронова синтеза

1.11. БИОЛОШКИ ЗНАЧАЈ ТИАЗОЛА

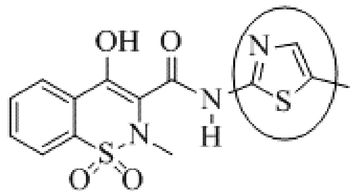
Тиазол и његови деривати показују широк спектар биолошке активности због чега су са медицинске тачке гледишта врло значајни. Још су Ханч и Вебер 1887. године описали биолошку активност тиазола. Он је саставни део многих једињења као што је тиамин-витамин Б1 (**слика 14**), али и многих лекова као што су пеницилин [71] и бацитрацин (антибиотско дејство) [91], малоксикам (анти-инфламаторно дејство) [92], тиазофурин (антитуморско дејство) [93], ритонавир (лек против HIV-a) (**слика 15**) [94].



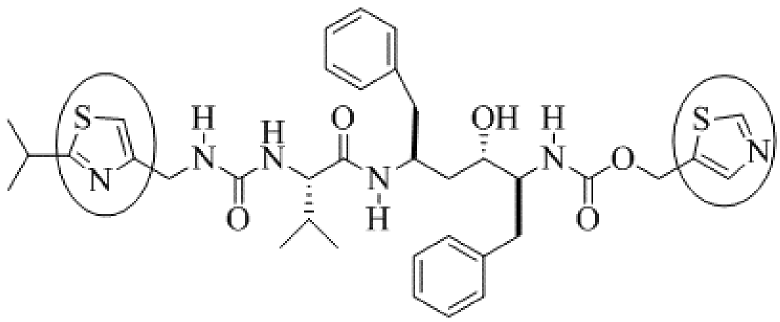
Слика 14. Структура тиамина (витамина Б1)



Пеницилин



Малоксикам



Ритонавир

Слика 15. Неки од лекова који у својој структури садрже тиазолов прстен

Због свега претходно наведеног синтетисан је и испитиван велики број деривата тиазола. Тако су Borcea и сарадници 2021. године приказали преглед антимикробне активности компонената на бази тиазола [95].

Cheng и сарадници су синтетисали и испитивали антимикробну активност две серије деривата 2-фенилацетамидо-тиазола на два соја Грам-негативних и два соја Грам-позитивних бактерија и резултати су показали значајну антимикробну активност [96].

Испитивана су и комплексна једињења паладијум(II) јона са неким дериватима тиазола. Због присуства атома сумпора и азота у структури, деривати тиазола представљају добре кандидате за реакције комплексирања са паладијум(II) јоном као меком Луисовом киселином.

Тако су резултати претходних испитивања комплексних једињења паладијума(II) са неким дериватима 2-аминотиазола показала значајну антимикробну активност према *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, као и значајну антитуморску активност према хуманом карциному простате [97].

2. ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА

Циљ ове докторске дисертације био је синтетисати и окарактерисати нове комплексе паладијум(II) јона, а затим испитати њихову биолошку активност, интеракцију са DNA и серумом албумина, као и компјутерским симулацијама прецизније одредити механизме њиховог деловања. Синтетисана једињења се могу поделити у две групе, па су и резултати приказани сходно томе.

Прву групу једињења чине четири лиганда, етилендиаминска деривата триптофана и њима одговарајући паладијум(II) комплекси.

Другу групу чине два паладијум(II) комплекса са супституисаним 2-аминотиазолима као лигандима.

У оквиру ове Докторске дисертације предвиђени су следећи задаци:

- ✓ Синтетисати полазни лиганд (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил) пропионску киселину, H_2-(*S,S*)-eddtrp
- ✓ Реакцијом естерификације полазног лиганда са етанолом, 1-пропанолом, 1-бутанолом или 1-пентанолом синтетисати одговарајуће *O,O′*-диалкил-(*S,S*)--етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионат дихлорхидрате
- ✓ Синтетисати комплексе паладијум(II) јона са претходно добијеним *O,O′*-диалкил--(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионато естрима
- ✓ Састав добијених једињења одредити на основу резултата елементалне микроанализе, а структуре претпоставити на основу спектроскопских података добијених из IR и NMR (^{1}H и ^{13}C) спектара
- ✓ Структуру добијених лиганада и комплекса оптимизовати методом функционала густине (DFT)
- ✓ Испитати антимикробну и антитуморску активност лиганада и паладијум(II) комплекса
- ✓ Утврдити могуће начине везивања новосинтетисаних паладијум(II) комплекса за молекул DNA
- ✓ Молекулским докинг симулацијама испитати инхибиторну активност новосинтетисаних паладијум(II) комплекса са молекулима DNA
- ✓ Синтетисати два нова паладијум(II) комплекса са 2-амино-6--метилбензотиазолом и 2-амино-6-хлоробензотиазолом као лигандима
- ✓ Састав и структуру добијених комплекса одредити на основу резултата елементалне микроанализе, као и из IR и NMR (^{1}H и ^{13}C) спектара
- ✓ Испитати антимикробну активност комплекса
- ✓ Испитати антитуморску активност нових паладијум(II) комплекса као и индекс селективности
- ✓ Одредити начин ћелијске смрти у случају комплекса паладијум(II) јона са 2-амино-6-метилбензотиазолом који је показао највећи цитотоксични капацитет и цитотоксичну селективност на ћелијској линији CT26
- ✓ Помоћу stopped-flow методе проучавати реакција супституције паладијум(II) комплекса са нуклеофилима као што је конституент DNA (5’GMP), трипептид глутатион (GSH) и аминокиселина (L-Met)
- ✓ Испитати интеракције комплекса са DNA ланцем, као и говеђим серумом албумина.

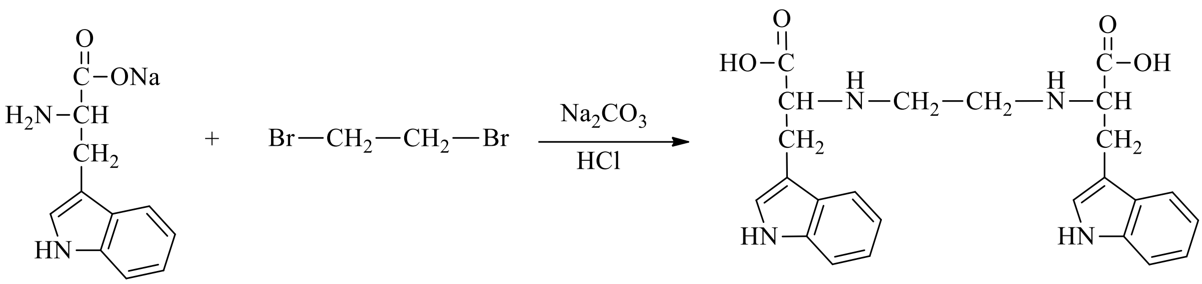
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. СИНТЕЗА ЛИГАНАДА

3.1.1. Синтеза (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил) пропионске киселине

Лиганд прекурсор (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил) пропионска киселина, је синтетисан према већ описаном поступку синтезе [98] тако што се у раствор који је добијен растварањем 1,00 g (0,025 mol) натријум-хидроксида (NaOH) у довољној количини воде додаје у малим порцијама 5,00 g (0,025 mol) триптофана. Смеша се рефлуктује 3 сата уз постепено додавање 1,08 mL (0,0125 mol, ρ=2,18 g/mL) 1,2-диброметана и 1,33 g (0,0125 mol) анхидрованог натријум-карбоната (Na_2CO_3) (**шема 6**). Након рефлуктовања реакциона смеша се охлади и уз помоћ раствора хлороводоничне киселине (HCl) (1:1) подеси се pH вредност на 5. Издваја се бели талог који се процеди, испере водом и осуши на ваздуху.

Принос: 3,88 g (72,99 %)



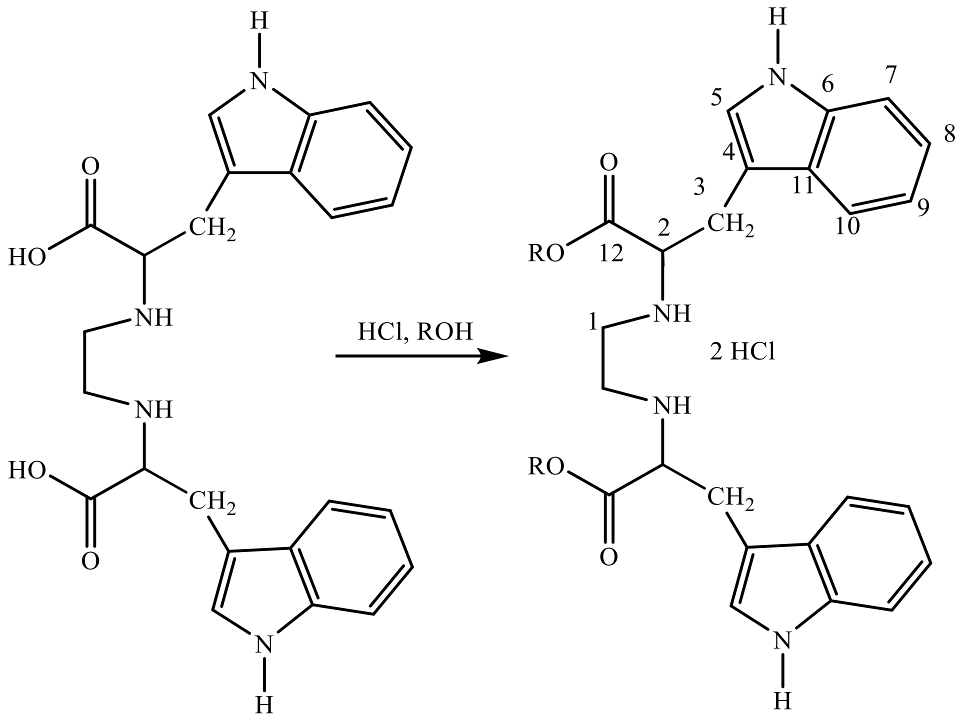
Шема 6. Приказ синтезе (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил) пропионске киселине

Резултати елементалне микроанализе $M(C_{24}H_{24}N_4O_4)$ = 434,18 g/mol

	C(%)	H(%)	N(%)
Израчунато	66,34	6,03	12,89
Нађено	66,05	6,01	12,45

3.1.2. Општи проступак за синтезу *O,O′*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил) пропионске киселине дихлорхидрата (L1-L4)

Поступак синтезе естара овог типа је већ раније описан [99]. У 40 mL апсолутног алкохола (етанол, 1-пропанол, 1-бутанол или 1-пентанол) претходно засићеног гасовитим хлороводоником додаје се 1,50 g (0,003 mol) синтетисане (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил) пропионске киселине (**шема 7**). Врши се рефлуктовање реакционе смеше у трајању од 12 сати. Након хлађења смеша се филтрира и раствор се оставља неколико дана у фрижидеру док се не издвоји талог браонкасте боје који потиче од *O,O′*-диалкил естра (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил) пропионске киселине дихлорхидрата. Талог се процеди и осуши на ваздуху.



	L1	L2	L3	L4
R	$-C_2H_5$	$-C_3H_7$	$-C_4H_9$	$-C_5H_{11}$

Шема 7. Општи приказ синтезе лиганада, **L1-L4** са нумеричким ознакама коришћеним при тумачењу NMR спектара

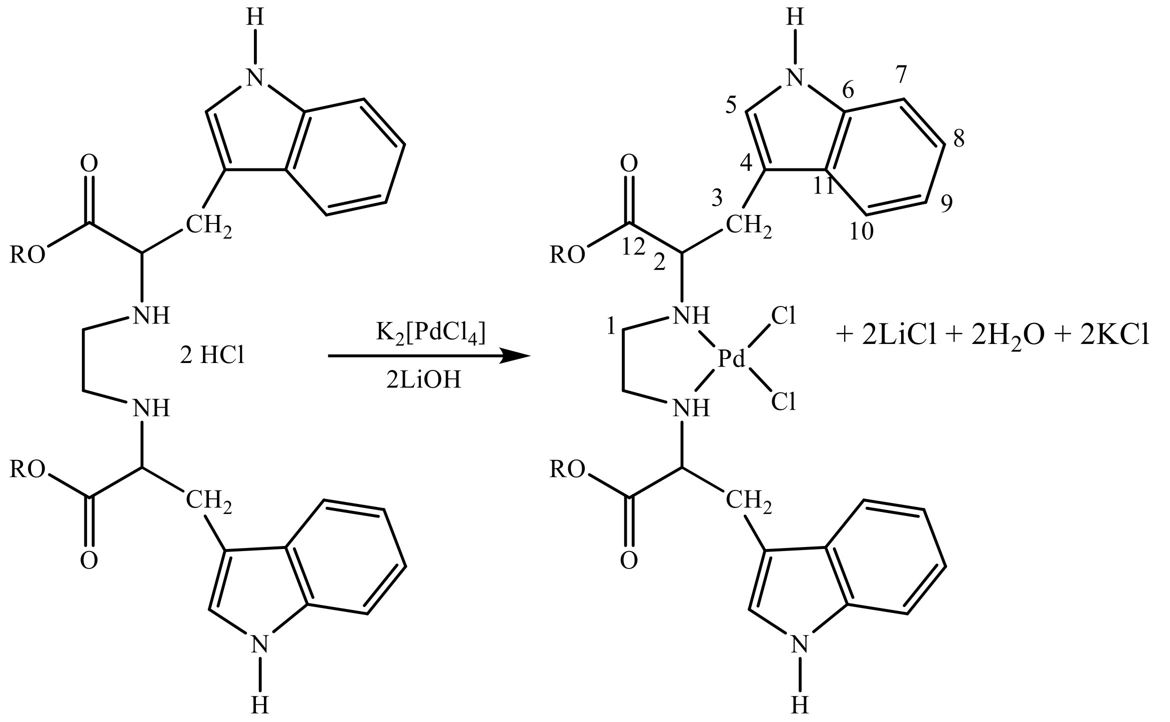
3.1.3. Деривати 2-аминотиазола као лиганди

За синтезу паладијум(II) комплекса коришћена су два деривата 2-аминотиазола и то: 2-амино-6-метилбензотиазол (**L5**) и 2-амино-6-хлоробензотиазол (**L6**). Оба коришћена лиганда су комерцијална. Ради карактеризације новосинтетисаних комплекса, тумачени су IR и NMR спектри лиганада у циљу праћења промена у хемијском померању услед формирања координативно-ковалентне везе између централног јона метала и електрон-донорских атома лиганада.

3.2. СИНТЕЗА КОМПЛЕКСА

3.2.1. Општи поступак за синтезу дихлоридо *O,O′*-диалкил (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил)пропионато-паладијум(II) комплекса (C1-C4)

У 10 mL дестиловане воде растворено је 0,30 mmol (0,098 g) калијум-терахлоридопаладата(II) ($K_2[PdCl_4]$). Одговарајућа количина (0,30 mmol) лиганда (0,17 g лиганда **L1**, 0,18 g лиганда **L2**, 0,19 g лиганда **L3** или 0,19 g лиганда **L4**) је такође растворена у води уз додатак литијум хидроксида (LiOH) у молском односу 1:2. Растворени лиганд се у малим порцијама додаје у водени раствор полазног комплекса паладијума (**шема 8**). Реакциона смеша се меша 2 сата након чега се талог одвоји цеђењем, испере водом и суши на ваздуху.



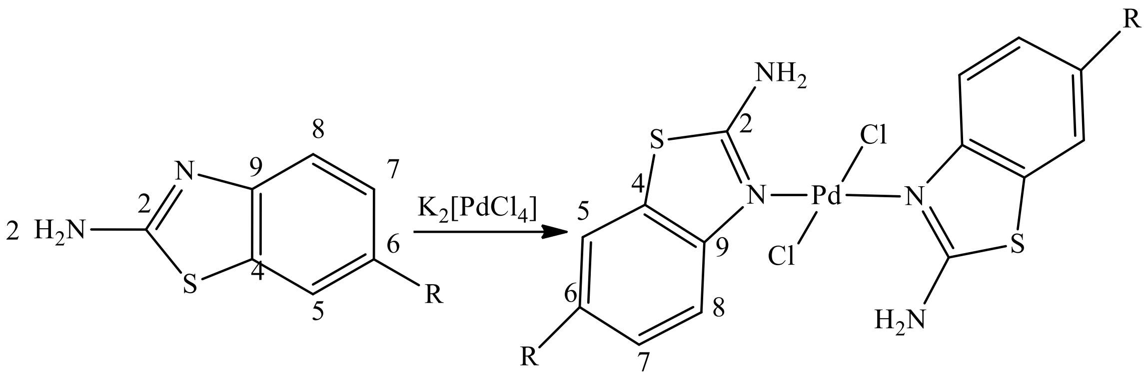
	C1	C2	C3	C4
R	$-C_2H_5$	$-C_3H_7$	$-C_4H_9$	$-C_5H_{11}$

Шема 8. Општи приказ синтезе комплекса **C1-C4** са нумеричким ознакама коришћеним при тумачењу NMR спектара

3.2.2. Општи поступак за синтезу паладијум(II) комплекса са дериватима 2-аминотиазола као лигандима (C5-C6)

Нови паладијум(II) комплекси са дериватима 2-аминотиазола (2-амино-6--метилбензотиазол (**L5**) и 2-амино-6-хлоробензотиазол (**L6**)) су добијени тако што је у 0,05 g (0,0015 mol) $K_2[PdCl_4]$ који је претходно растворен у 5 mL дестиловане воде додата одговарајућа количина лиганда **L5** (0,05 g (0,003 mol)) или **L6** (0,06 g (0,003 mol)). Лиганд је пре додавања растворен у 10 mL метанола. $K_2[PdCl_4]$ и лиганд реагују у молском односу 1:2 (**шема 9**). Смеша је мешана на магнетној мешалици 1 сат. Добијени талог је процеђен, испаран водом и осушен на ваздуху.

Мала количина талога која потиче од паладијум(II) комплекса са лигандом **L6** је растворена у 10 mL смеше DMF и етанола (1:1) и тако добијени жути раствор је чуван на собној температури. После неколико дана добијени су жути монокристали, који су били погодни за карактеризацију рендгенском структурном анализом.



	L5/C5	L6/C6
R	$-CH_3$	-Cl

Шема 9. Општи приказ синтезе комплекса (**C5-C6**)
са нумеричким ознакама коришћеним при тумачењу NMR спектара

3.3. МЕТОДЕ КОРИШЋЕНЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ СТРУКТУРЕ НОВОСИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА

Структура лиганада *O*,*O′*-диалкил естара (*S*,*S*)-етилендиамин-*N*,*N′*-ди-(3,3′-1H--индол-3-ил) пропионске киселине дихидрохлорида, (**L1-L4**) као и одговарајућих паладијум(II) комплекса (**C1-C4**) одређивана је експерименталним методама и то: елементалном микроанализом рађеном уз помоћ Vario EL III C, H, N Elemental Analyzer, инфрацрвеном спектроскопијом (IR) и нуклеарном-магнетно-резонанционом спектроскопијом (NMR), а све структуре су оптимизоване методом функционала густине (DFT).

За одређивање структуре паладијум(II) комплекса са дериватима 2-аминотиазола (2-амино-6-метилбензотиазол (**L5**) и 2-амино-6-хлоробензотиазол (**L6**)) коришћене су експерименталне методе и то: елементална микроанализа, инфрацрвена спектроскопија (IR) и нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија (NMR), док је структура комплекса ди(2-амино-6-хлоробензотиазол)дихлоридопаладата(II) (**C6**) потврђена и методом рендгенске структурне анализе.

IR спектри су снимљени на спектрофотометру Perkin-Elmer Spectrum One, коришћењем KBr технике (4000 - 400 cm^{-1}).

^{1}H и ^{13}C NMR спектри су снимљени на Varian Gemini-2000 (200 MHz) спектрофотомерту користећи DMSO-d_6 као растварач и тетраметилсилан као стандард.

***O,O′*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионат дихлорхидрат (L1)** [100]
Принос: 1,093 g (65,61%).

Резултати елементалне микроанализе M($C_{28}H_{36}Cl_2N_4O_4$) = 563,52 g/mol

	C(%)	H(%)	N(%)
Израчунато	59,68	6,44	9,94
Нађено	59,33	6,46	9,83

^{1}H NMR (DMSO-*d*$_6$, 200 MHz,) *δ* (ppm): 3,30 (m, 4H, C^1H_2), 3,60 (t, 2H, C^2H), 3,26 (d, 4H, C^3H_2), 7,40 (s, 2H, C^5H), 7,65 (d, 2H, C^7H), 7,50 (m, 2H, C^8H), 7,46 (m, 2H, C^9H), 7,14 (d, 2H, $C^{10}H$), 4,10 (q, 4H, $C^{13}H_2$), 1,08 (t, 6H, $C^{14}H_3$).
^{13}C NMR (DMSO-*d*$_6$, 50 MHz) *δ* (ppm): 43,50 (C^1), 62,17 (C^2), 25,20 (C^3), 113,70 (C^4), 126,27 (C^5), 136,30 (C^6), 118,75 (C^7), 118,23 (C^8), 127,03 (C^9), 121,30 (C^{10}), 125,02 (C^{11}), 173,38 (C^{12}), 61,80 (C^{13}), 13,73 (C^{14}).
IR (KBr, cm^{-1}): 3403, 3258, 2981, 2929, 2643, 1744, 1656, 1548, 1458, 1436, 1219, 1103, 1081, 746.

***O,O′*-дипропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)пропионат дихлорхидрат (L2)** [100]
Принос: 1,07 g (60,95%)

Резултати елементалне микроанализе M($C_{30}H_{40}Cl_2N_4O_4$) = 591,57 g/mol

	C(%)	H(%)	N(%)
Израчунато	60,91	6,82	9,47
Нађено	60,52	6,64	9,10

^{1}H NMR (DMSO-*d*$_6$, 200 MHz) *δ* (ppm): 3,33 (m, 4H, C^1H_2), 3,72 (t, 2H, C^2H), 3,40 (d, 4H, C^3H_2), 7,50 (s, 2H, C^5H), 7,72 (d, 2H, C^7H), 7,57 (m, 2H, C^8H), 7,24 (m, 2H, C^9H), 7,20 (d, 2H, $C^{10}H$), 4,17 (t, 4H, $C^{13}H_2$), 1,44 (m, 4H, $C^{14}H_3$), 0,75 (t, 6H, $C^{15}H_3$).
^{13}C NMR (DMSO-*d*$_6$, 50 MHz) *δ* (ppm): 53,07 (C^1), 57,03 (C^2), 26,37 (C^3), 111,72 (C^4), 135,00 (C^5), 136,40 (C^6), 118,70 (C^7), 127,09 (C^8), 121,30 (C^9), 118,16 (C^{10}), 132,16 (C^{11}), 174,52 (C^{12}), 67,15 (C^{13}), 21,34 (C^{14}), 10,18 (C^{15}).
IR (KBr, cm^{-1}): 3402, 3282, 2967, 2934, 2879, 1742, 1648, 1583, 1459, 1436, 1228, 1102, 1082, 736.

O,O′-**дибутил-(*S,S*)-етилендимин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)пропионат дихлорхидрат (L3)** [100]
Принос: 1,06 g (57,81%)

Резултати елементалне микроанализе M($C_{32}H_{44}Cl_2N_4O_4$) = 619,63 g/mol

	C(%)	H(%)	N(%)
Израчунато	62,03	7,16	9,04
Нађено	62,03	7,01	9,15

^{1}H NMR (DMSO-*d*$_6$, 200 MHz) *δ* (ppm): 3,25 (m, 4H, C^1H_2), 4,00 (t, 2H, C^2H), 3,32 (d, 4H, C^3H_2), 7,22 (s, 2H, C^5H), 7,45 (d, 2H, C^7H), 7,54 (m, 2H, C^8H), 7,03 (m, 2H, C^9H), 7,36 (d, 2H, $C^{10}H$), 4,18 (t, 4H, $C^{13}H_2$), 1,30 (m, 4H, $C^{14}H_3$), 1,10 (m, 4H, $C^{15}H_2$), 0,82 (t, 6H, $C^{16}H_3$).
^{13}C NMR (DMSO-*d*$_6$, 50 MHz) *δ* (ppm): 39,90 (C^1), 52,95 (C^2), 26,45 (C^3), 111,71 (C^4), 124,94 (C^5), 136,41 (C^6), 127,10 (C^7), 118,42 (C^8), 118,75 (C^9), 121,27 (C^{10}), 106,68 (C^{11}), 169,52 (C^{12}), 65,37 (C^{13}), 29,93 (C^{14}), 18,46 (C^{15}), 13,61 (C^{16}).
IR (KBr, cm^{-1}): 3400, 3285, 2960, 2932, 2871, 1742, 1653, 1583, 1459, 1435, 1229, 1104, 1083, 737.

O,O′-**дипентил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)пропионат дихлорхидрат (L4)** [100]
Принос: 1,11 g (58,07%).

Резултати елементалне микроанализе M($C_{34}H_{48}Cl_2N_4O_4$) = 647,68 g/mol

	C(%)	H(%)	N(%)
Израчунато	63,05	7,47	8,65
Нађено	63,06	6,99	9,04

^{1}H NMR (DMSO-*d*$_6$, 200 MHz) *δ* (ppm): 3,32 (m, 4H, C^1H_2), 3,98 (t, 2H, C^2H), 3,26 (d, 4H, C^3H_2), 7,35 (s, 2H, C^5H), 7,24 (d, 2H, C^7H), 7,50 (m, 2H, C^8H), 7,03 (m, 2H, C^9H), 7,08 (d, 2H, $C^{10}H$), 4,16 (t, 4H, $C^{13}H_2$), 1,39 (m, 4H, $C^{14}H_2$), 1,26 (m, 4H, $C^{15}H_2$), 1,09 (m, 4H, $C^{16}H_2$), 0,83 (t, 6H, $C^{17}H_3$).
^{13}C NMR (DMSO-*d*$_6$, 50 MHz) *δ* (ppm): 52,95 (C^1), 60,89 (C^2), 26,47 (C^3), 111,74 (C^4), 124,95 (C^5), 136,42 (C^6), 127,12 (C^7), 118,42 (C^8), 118,90 (C^9), 121,29 (C^{10}), 125,26 (C^{11}), 169,56 (C^{12}), 65,69 (C^{13}), 32,38 (C^{14}), 27,63 (C^{15}), 22,02 (C^{16}), 14,04 (C^{17}).
IR (KBr, cm^{-1}): 3400, 3283, 2958, 2927, 2862, 1744, 1620, 1582, 1459, 1436, 1230, 1105, 1081, 737.

2-амино-6-метилбензотиазол (L5) [101]

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 200 MHz) δ (ppm): 7,40 (s, 2H, C^5H), 7,00 (d, 2H, C^7H), 7,22 (d, 2H, C^8H), 7,35 (s, 4H, NH_2), 2,29 (s, 3H, CH_3).
^{13}C NMR (DMSO-d_6, 50 MHz) δ (ppm): 165,76 (C^2), 130,00 (C^4), 120,90 (C^5), 131,14 (C^6), 126,52 (C^7), 117,53 (C^8), 150,73 (C^9), 20,93 (CH_3).
IR (KBr, cm^{-1}): 3396, 3259, 3122, 1540, 1464, 1631, 808.

2-амино-6-хлоробензотиазол (L6) [101]

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 200 MHz) δ (ppm): 7,75 (s, 2H, C^5H), 7,20 (dd, 2H, C^7H), 7,30 (d, 2H, C^8H), 7,60(s, 4H, NH_2).
^{13}C NMR (DMSO-d_6, 50 MHz) δ (ppm): 167,20 (C^2), 132,67 (C^4), 120,55 (C^5), 125,61 (C^6), 124,66 (C^7), 118,67 (C^8), 151,75 (C^9).
IR (KBr, cm^{-1}): 3411, 3281, 2943, 1537, 1454, 1404, 1606, 805.

Дихлоридо-(*O,O′*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил) пропионат) паладијум(II) комплекс (C1) [100]
Принос: 0,14 g (69,15%).

Резултати елементалне микроанализе M($C_{28}H_{34}Cl_2N_4O_4Pd$) = 667,92 g/mol

	C(%)	H(%)	N(%)
Израчунато	50,35	5,13	8,39
Нађено	50,29	5,20	8,80

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 200 MHz) δ (ppm): 3,01 (m, 4H, C^1H_2), 3,66 (t, 2H, C^2H), 3,34 (d, 4H, C^3H_2), 7,58 (s, 2H, C^5H), 7,25 (d, 2H, C^7H), 7,54 (m, 2H, C^8H), 7,39 (m, 2H, C^9H), 7,04 (d, 2H, $C^{10}H$), 3,79 (q, 4H, $C^{13}H_2$), 1,15 (t, 6H, $C^{14}H_3$).
^{13}C NMR (DMSO-d_6, 50 MHz) δ (ppm): 54,88 (C^1), 64,29 (C^2), 29,35 (C^3), 111,60 (C^4), 135,60 (C^5), 136,50 (C^6), 118,49 (C^7), 127,32 (C^8), 121,10 (C^9), 121,28 (C^{10}), 131,17 (C^{11}), 178,34 (C^{12}), 64,27 (C^{13}), 14,84 (C^{14}).
IR (KBr, cm^{-1}): 3405, 3286, 2959, 2927, 2872, 1733, 1619, 1458, 1438, 1329, 1218, 1092, 1039, 1011, 938, 820, 744, 566.

Дихлоридо-(*O,O′*-дипропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионат) паладијум(II) комплекс (C2) [100]
Принос: 0,12 g (55,02%).

Резултати елементалне микроанализе M($C_{30}H_{38}Cl_2N_4O_4Pd$) = 695,98 g/mol

	C(%)	H(%)	N(%)
Израчунато	51,77	5,50	8,05
Нађено	51,55	5,40	7,84

^{1}H NMR (DMSO-d_6, 200 MHz) δ (ppm): 3,13 (m, 4H, C^1H_2), 3,65 (t, 2H, C^2H), 3,32 (d, 4H, C^3H_2), 7,26 (s, 2H, C^5H), 6,97 (d, 2H, C^7H), 7,54 (m, 2H, C^8H), 6,54 (m, 2H, C^9H), 7,04 (d, 2H, $C^{10}H$), 3,89 (t, 4H, $C^{13}H_2$), 0,71 (m, 4H, $C^{14}H_3$), 1,51 (t, 6H, $C^{15}H_2$).

^{13}C NMR (DMSO-*d*$_6$, 50 MHz) *δ* (ppm): 52,87 (C^1), 66,87 (C^2), 27,32 (C^3), 110,82 (C^4), 135,66 (C^5), 136,42 (C^6), 121,25 (C^7), 127,29 (C^8), 128,09 (C^9), 124,97 (C^{10}), 138,35 (C^{11}), 171,55 (C^{12}), 67,30 (C^{13}), 21,65 (C^{14}), 10,35 (C^{15}).
IR (KBr, cm^{-1}): 3407, 3278, 2969, 2936, 2877, 1743, 1620, 1459, 1436, 1340, 1230, 1104, 1082, 1010, 736, 612.

Дихлоридо-(*O,O′*-дибутил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионат) паладијум(II) комплекс (C3) [100]
Принос: 0,16 g (72,35%).

Резултати елементалне микроанализе M($C_{32}H_{42}Cl_2N_4O_4Pd$) = 724,03 g/mol

	C(%)	H(%)	N(%)
Израчунато	53,08	5,85	7,74
Нађено	52,89	5,77	7,60

^{1}H NMR (DMSO-*d*$_6$, 200 MHz) *δ* (ppm): 3,15 (m, 4H, C^1H_2), 3,65 (t, 2H, C^2H), 3,26 (d, 4H, C^3H_2), 7,70 (s, 2H, C^5H), 7,62 (d, 2H, C^7H), 7,32 (m, 2H, C^8H), 7,47 (m, 2H, C^9H), 7,65 (d, 2H, $C^{10}H$), 3,47 (t, 4H, $C^{13}H_2$), 1,78 (m, 4H, $C^{14}H_2$), 1,07 (m, 4H, $C^{15}H_2$), 0,76 (t, 6H, $C^{16}H_3$).
^{13}C NMR (DMSO-*d*$_6$, 50 MHz) *δ* (ppm): 52,93 (C^1), 56,46 (C^2), 26,52 (C^3), 111,62 (C^4), 124,94 (C^5), 136,40 (C^6), 127,14 (C^7), 118,60 (C^8), 121,28 (C^9), 124,46 (C^{10}), 107,74 (C^{11}), 171,30 (C^{12}), 64,63 (C^{13}), 30,11 (C^{14}), 18,58 (C^{15}), 13,62 (C^{16}).
IR (cm^{-1}): 3400, 3272, 2958, 2934, 2872, 1733, 1619, 1458, 1339, 1279, 1220, 1127, 1093, 1037, 930, 814, 746, 559.

Дихлоридо-(*O,O′*-дипентил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)--пропионат) паладијум(II) комплекс (C4) [100]
Принос: 0,14 g (63,27%).

Резултати елементалне микроанализе M($C_{34}H_{46}Cl_2N_4O_4Pd$) = 752,09 g/mol

	C(%)	H(%)	N(%)
Израчунато	54,30	6,16	7,45
Нађено	53,99	5,83	7,17

^{1}H NMR (DMSO-*d*$_6$, 200 MHz) *δ* (ppm): 3,37 (m, 4H, C^1H_2), 4,01 (t, 2H, C^2H), 3,75 (d, 4H, C^3H_2), 7,90 (s, 2H, C^5H), 7,49 (d, 2H, C^7H), 7,51 (m, 2H, C^8H), 7,41 (m, 2H, C^9H), 7,05 (d, 2H, $C^{10}H$), 3,96 (t, 4H, $C^{13}H_2$), 1,18 (m, 4H, $C^{14}H_2$), 0,80 (m, 4H, $C^{15}H_2$), 0,79 (m, 4H, $C^{16}H_2$), 0,85 (t, 6H, $C^{17}H_3$).
^{13}C NMR (DMSO-*d*$_6$, 50 MHz) *δ* (ppm): 52,33 (C^1), 64,78 (C^2), 27,87 (C^3), 111,52 (C^4), 124,27 (C^5), 136,31 (C^6), 127,20 (C^7), 118,40 (C^8), 116,09 (C^9), 121,02 (C^{10}), 105,96 (C^{11}), 171,16 (C^{12}), 64,78 (C^{13}), 27,87 (C^{14}), 27,56 (C^{15}), 21,77 (C^{16}), 13,83 (C^{17}).
IR (KBr, cm^{-1}): 3403, 3277, 2956, 2932, 2862, 1733, 1618, 1579, 1458, 1440, 1338, 1226, 1203, 1125, 1089, 1043, 964, 874, 813, 743, 587.

Ди(2-амино-6-метилтиазол)дихлоридопаладат(II) (C5) [101]
Принос: 0,05 g (71,12%).

Резултати елементалне микроанализе M($C_{16}H_{16}S_2N_4Cl_2Pd$) = 505,78 g/mol

	C(%)	H(%)	N(%)	S(%)
Израчунато	37,99	3,19	11,08	12,68
Нађено	37,85	3,10	11,00	12,56

^{1}H NMR (DMSO-*d*$_6$, 200 MHz) *δ* (ppm): 2,38 (s, 3H, CH_3), 7,51 (s, 2H, C^5H), 7,36 (dd, 2H, C^7H), 8,61 (d, 2H, C^8H), 8,80 (s, 4H, NH_2).
^{13}C NMR (DMSO-*d*$_6$, 50 MHz) *δ* (ppm): 166,61 (C^2), 127,21 (C^4), 121,57 (C^5), 131,91 (C^6), 126,03 (C^7), 118,40 (C^8), 145,81 (C^9), 20,84 (CH_3).
IR (KBr, cm^{-1}): 3411, 3281, 3082, 2943, 2920, 1611, 1572, 1534, 1496, 1474, 805, 529.

Ди(2-амино-6-хлоробензотиазол)дихлоридопаладат(II) (C6) [101]
Принос: 0,05 g (64,27%).

Резултати елементалне микроанализе M($C_{14}H_{10}S_2N_4Cl_4Pd$) = 546,59 g/mol

	C(%)	H(%)	N(%)	S(%)
Израчунато	30,76	1,84	10,25	11,73
Нађено	30,65	1,96	10,08	11,68

^{1}H NMR (DMSO-*d*$_6$, 200 MHz) *δ* (ppm): 7,86 (s, 2H, C^5H), 7,57 (dd, 2H, C^7H), 8,69 (d, 2H, C^8H), 9,05 (s, 4H, NH_2).
^{13}C NMR (DMSO-*d*$_6$, 50 MHz) *δ* (ppm): 167,99 (C^2), 127,84 (C^4), 121,49 (C^5), 126,55 (C^6, C^7), 119,75 (C^8), 146,74 (C^9).
IR (KBr, cm^{-1}): 3458, 3272, 3095, 1630, 1533, 1445, 1422, 811, 521.

3.3.1. Метода рендгенске структурне анализе

Жути кристали комплекса ди(2-амино-6-хлоробензотиазол) дихлоридопаладата(II) (**C6**) који су коришћени за рендгенску структурну анализу добијени су прекристализацијом из смеше DMF : етанол (1:1).

Дифракциони подаци за комплекс прикупљени су на Rigaku (Oxford Diffraction) Gemini S дифрактометру са CCD детектором користећи графитно-монохроматско MoK_α зрачење (λ = 0,71073 Å). Подаци су обрађени помоћу CrysAlisPro и CrysAlis RED софтерског пакета [102]. Одређивање просторних група је засновано на анализи Laue class и систематском одсуству рефлексије. Прикупљени подаци су кориговани уз помоћ Multi-scan методе, применом SCALE3 ABSPACK [102].

Структура је решена коришћењем SHELXT [103], а утачњена је употребом SHELXL-2018/3 програма [104]. За све атоме различите од водоника кориговани су параметри анизотропних померања. Атоми водоника везани за C атоме су постављени у израчунате положаје (CH = 0,93 Å са U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(C) за метинске групе и CH_3 = 0,97 Å са U_{iso}(H) = 1,5 U_{eq}(C) за метил групе). Атоми водоника везани за N атом пронађени су на Фуријеровим мапама и кориговани изотропски. Сва израчунавања су урађена уз помоћ PLATON [105] имплеметираног у WINGX [106] програмски пакет. MERCURY [107] је коришћен да би се молекул графички приказао. Основни кристалографски подаци приказани су у **табели 1**.

Табела 1. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре за комплекс **C6** [101]

Хемијска формула	$C_{14}H_{10}Cl_4N_4PdS_2{\cdot}2(C_3H_7NO)$
M_r	692,77
Кристални систем, просторна група	Трициклични, *P*-1
a, *b*, *c* (Å)	11,4816 (7), 11,8477 (6), 12,2358 (9)
α, β, γ (°)	110,381 (5), 108,769 (6), 99,459 (4)
V (Å^3)	1403,82 (17)
Z	2
F(000)	669
D_x (Mg m^{-3})	1,639
Сакупљене рефлексије	5523
θ опсег (°)	2,1 - 29,0
μ (mm^{-1})	1,22
Облик кристала, боја и величина кристала (mm)	Призма, жута, 0,29 × 0,22 × 0,20
Прикупљени подаци	
Корекција апсорпције	Multi-scan
T_{min},;T_{max}	0,920; 1,000
Измерене рефлексије, Независне рефлексије	12331, 6484
Посматране рефлексије [$I > 2\sigma(I)$]	5287
R_{int}	0,024
$(\sin\theta/\lambda)_{max}$ (Å^{-1})	0,685
θ values (°)	θ_{max} = 29,2, θ_{min} = 1,9
Опсег за *h*, *k*, *l*	$h = -15\rightarrow15$, $k = -14\rightarrow15$, $l = -15\rightarrow12$
Утачњавање	
R; wR [$I > 2\sigma(I)$]	0,0364; 0,0714
R; wR [сви подаци]	0,0508; 0,0771
Уклапање на F^2	1,052
Број рефлексија, параметара, ограничења	6484, 336, 0
H-атомски третман	H атоми третирани комбинацијом независног и ограниченог утачњавања
Шема одређивања тежине	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0309P)^2 + 0,0176P]$ где је $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
ρ_{max}, ρ_{min} (e Å^{-3})	0,42 - 0,61

3.3.2. Метода функционала густине (DFT)

За оптимизацију структура свих *O,O′*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-
-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил) пропионске киселине дихлорхидрата, као лиганада и одговарајућих паладијум(II) комплекса коришћена је DFT метода. Сви DFT прорачуни приказани у овој докторској дисертацији рађени уз помоћ WinMostar и Gaussian 09 [108,109] програмског пакета. Конформациона анализа лиганада је урађена помоћу WinMostar програма и у ту сврху је коришћен Merck Molecular Force Field (MMFF94) [110] у комбинацији са Monte-Carlo методом. Сви квантно-механички прорачуни су добијени коришћењем програма Gaussian 09.

За оптимизацију свих структура коришћен је metaGGA функционал, M06 у комбинацији са 6-311+G(d,p) базисним скупом за C, N, O, Cl и H и def2-TZVPD базисним скупом за атом Pd [111–113]. За симулацију ^{1}H и ^{13}C NMR спектара коришћен је GIAO (Gauge Independent Atomic Orbital) приступ [114,115]. Са циљем да се процени ефекат растварача (DMSO) употребљен је CPCM солватациони модел [116]. Исти метод је примењен и за тетраметилсилан (TMS) који је коришћен као стандард. Да би се добиле тачне вредности хемијског померања за сваки протон и угљеников атом испитиваних једињења потребно је израчунатих вредности хемијских померања одговарајућих атома одузети добијене вредности хемијског померања за TMS.

3.4. ОДРЕЂИВАЊЕ БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ НОВОСИНТЕТИСАНИХ ЈЕДИЊЕЊА

3.4.1. *In vitro* антимикробна активност

3.4.1.1. Коришћени реагенси и третирани микроорганизми

Сва једињења чија је антимикробна активност испитивана су растворена у диметилсулфоксиду (DMSO) и затим су добијени раствори разблажени у хранљивом течном медијуму да би се постигла концентрација од 10 %. Диметилсулфоксид (DMSO) је купљен од Acros Organics (New Jersey, USA).

Антимикробна активност *O,O′*-алкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-
-1H-индол-3-ил) пропионске киселине дихидрохлорхидрата (**L1-L4**) и одговарајућих паладијум(II) комплекса (**C1-C4**) одређивана је третирањем на 19 микроорганизама који су приказани у **табели 2**. Тестом је обухваћено 15 врста бактерија, од чега 3 пробиотске врсте, 5 стандардних ATCC сојева и 7 изолата и 4 врсте гљива.

Табела 2. Списак микроорганизама третираних лигандима **L1-L4** и комплексима **C1-C4**

Бактерије	Пробиотске бактерије
Bacillus subtilis	*Lactobacillus plantarum*
Bacillus cereus	*Bifidobacterium animalis* subsp.*lactis*
Bacillus pumilus NCTC 8241	*Bacillus subtilis* IP 5832
Staphylococcus aureus ATCC 25923	**Гљиве**
Staphylococcus aureus	*Rhodotorula sp.*
Escherichia coli ATCC 25922	*Saccharomyces boulardii*
Proteus mirabilis	*Candida albicans* ATCC 10231
Proteus mirabilis ATCC 12453	*Candida albicans*
Pseudomonas aeruginosa	
P. aeruginosa ATCC 27853	
Salmonella enterica	
Salmonella typhymirium	

Када су у питању комплекси паладијума(II) са дериватима 2-аминотиазола (**C5** и **C6**) антимикробна активност је одређивана на 11 врста микрорганизама и то 8 стандардних врста бактерија и 5 изолата, као и 3 врсте гљива. Ради поређења испитивана је и антимикробна активност лиганада. Тестирани микроорганизми наведени су у **табели 3**.

Табела 3. Списак микроорганизама третираних лигандима **L5-L6** и комплексима **C5-C6**

Бактерије	Гљиве
Bacillus subtilis	*Candida albicans* ATCC 10231
B. subtilis ATCC 6633	*Rhodothorula mucilaginosa*
Staphylococcus aureus	*Saccharomyces boulardii*
Staphylococcus aureus ATCC 25923	
Proteus mirabilis ATCC 12453	
Escherichia coli	
Escherichia coli ATCC 25922	
Salmonella enterica	

Сви изолати добијени су као поклон од Института за јавно здравље, Крагујевац, док су остали коришћени микроорганизми узети из колекције Лабораторије за микробиологију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Суспензије микроорганизама су припремане на тај начин што су колоније које су узимане директно са подлоге суспендоване у 5 mL физиолошког раствора (стерилног). Замућеност почетне суспензије подешена је помоћу денсиметра (DEN-1, BioSan, Latvia) и затим подешена упоређивањем са 0,5 Mc Farland стандардом [117] која означава густину суспензије од $1{,}5 \times 10^8$ CFU/mL и суспензији квасаца која садржи 10^6 CFU/mL. Почетне суспензије су разблажене стерилним 0,85 % физиолошким раствором у односу 1:100.

3.4.1.2. Микродилуциона метода

За одређивање антимикробне активности испитиваних једињења коришћена је микродилуциона метода са ресазарином [118] као показатељем раста микроорганизама и то очитавањем минималне инхибиторне концентрације (MIC) и минималне микробицидне концентрације (MMC). Коришћена је микротитарска плоча са 96 бунарчића у које је стављено по 100 μL хранљиве подлоге и то Mueller-Hinton бујона за бактерије и Sabouraud dextrose бујона за гљиве у чији први ред је додато 100 μL основног раствора тестираног једињења (концентрације 2000 μg/mL). Затим су, користећи мултифункционалу пипету, двоструким разблажењем добијени раствори концентрације од 1000 до 7,8 μg/mL. Потом је додато по 10 μL суспензије микроорганизама и то 10^8 CFU/mL за суспензију бактерија и 10^6 CFU/mL за суспензију гљива. На крају је у сваки бунарчић додат ресазурин, као индикатор раста ћелија. Плоче су инкубиране 24 сата за бактерије (на 37 °C) и 48 сата за квасце (на 28 °C). У току инкубације, ресузарин који је плавољубичасте боје под дејством оксидоредуктаза живих ћелија мења боју у розе флуоресцентну која потиче од резофурина.

Тетрациклин и флуконазол су коришћени као позитивна контрола. Забележено је да 10 % DMSO као растварач не инхибира раст микроорганизама. Сваки тест је садржао контролу раста и стерилности микроорганизама и сви су изведени у дупликату. Забележено је да су MIC и MMC вредности биле константне.

Просејавањем 10 μL узорка из бунарића, без видљивог раста или промене боје ресазурина на плочасти агар, одређује се минимална микробицидна концентрација (MMC). То је она концентрација на којој после инкубације раст није уочен.

Минимална инхибиторна концентрација (MIC) је најнижа концентрација тестираних једињења при којој није дошло до промене боје ресазурина у ружичасту.

3.4.2. *In vitro* цитотоксичка активност

3.4.2.1. Третиране ћелијске линије

Цитотоксичка активност *O*,*O′*-диалкил естара (*S*,*S*)-етилендиамин-*N*,*N′*-ди-(3,3′--1H-индол-3-ил) пропионске киселине дихлорхидрата (**L1-L4**) и њима одговарајућих паладијум(II) комплекса (**C1-C4**) одређивана је третирањем следећих ћелијских линија: хумани колоректални карцином (HCT116) и мишији колоректални карцином (CT26) (*American Type Culture Collection*) и упоређивана је са активношћу цисплатине.

Цитотоксичка активност 2-амино-6-метилбензотиазола (**L5**) и 2-амино-6--хлоробензотиазола (**L6**) и одговарајућих паладијум(II) комплекса испитивана је на 4 ћелијске линије. Коришћене су линије мишјег карцинома дојке 4T1 (CRL-2539™; *ATCC*, *USA*), мишијег колоректалног карцинома CT26 (CRL-2638™; *ATCC*, *USA*), хуманог карцинома дојке MDA-MB-468 (HTB-132™; *ATCC*, *USA*) и хуманог колоректалног карцинома HCT116 (CCL-247™; *ATCC*, *USA*) и мезенхималне матичне ћелије миша (mMSC; *Gibco* #S1502-100).

Цитотоксичност испитиваних једињења је утврђена MTT тестом. Ћелије су култивисане у DMEM медијуму који садржи 2 mM L-глутамина, 10 % топлотно-инактивираног говеђег серума, 100 U/mL пеницилина и 100 μg/mL стрептомицина на 37 ºC и 95 % ваздуха и 5% CO_2.

3.4.2.2. MTT тест

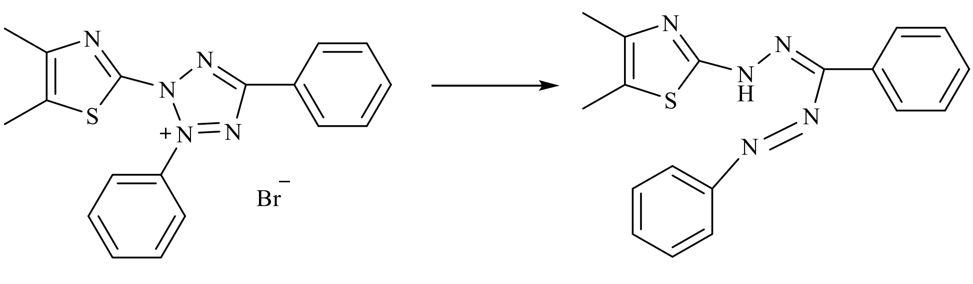
Цитотоксични ефекат тестираних једињења је испитиван користећи 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид (MTT). MTT тестом се индиректно одређује виталност ћелија [119,120]. NAD(P)H-зависни ензими ћелијске оксидоредуктазе су способни да редукују тетразолијум боју MTT у њен нерастворан формазан, који је љубичасте боје (**шема 10**) [121]. Цитотоксичност испитиване супстанце се одређује тако што се упоређује интензитет боје који се добија када се ћелија изложи само медијуму и оног интензитета који ћелија даје ако се изложи дејству испитиване супстанце. Настали формазан је растворан у органским растварачима, а интензитет боје се одређује спектрофотометријски.

Третиране ћелије су засејане у микротитар плочи са 96 бунарчића при густини од 5×10^3 ћелија/100 μL (по бунарчићу) у комплетном медијуму за раст и плоча је остављена да се инкубира преко ноћи на 37 °C. После 24 сата, медијум је замењен и у сваки бунарчић је додато 100 μL испитиваних супстанци. Ћелије су третиране различитим концентрацијама испитиваних супстанци које су растворене у медијуму у концентрацијама од 7,81 до 500 односно 1000 μM и са чистом комплетном подлогом као контролом. Тестиране супстанце су растворене у диметилсулфоксиду. Након 24 сата у бунарчиће је додато 5 mg/mL MTT раствора и плоче су инкубиране још 4 сата на 37 °C, након чега је медијум одливен а додато је 150 μL диметилсулфоксида и снимана је апсорбанца *Microplate reader Zenyth 3100 multimode detector* на таласној дужини од 595 nm. Одрживост ћелија је израчуната поређењем са нетретираним контролним ћелијама.

$$\% \text{ живих ћелија} = (E - M)/(C - M) \times 100$$

M - отвор са чистим медијумом;
C - отвор са нетретираним ћелијама;
E - отвор са ћелијама третираним испитиваним супстанцама.

Експеримент је поновљен три пута и IC_{50} вредности су добијене коришћењем Microsoft Office Excel 2010 програма.



Шема 10. Редукција 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромида (MTT) до формазана

3.5. ИНТЕРАКЦИЈЕ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА

3.5.1. Метода апсорпционе спектроскопије

Могући начини везивања новосинтетисаних комплекса паладијум(II) јона за молекул DNA испитиван је UV-VIS спектроскопијом и израчунате су константе везивања (K_b) за синтетисане комплексе и CT-DNA. Раствор комплекса фиксне концентрације у PBS пуферу је помешан са различитим запреминама CT-DNA раствора и остављен 5 дана на собној температури након чега су снимљени UV-VIS спектри. За израчунавање константе везивања (K_b) коришћена је следећа једначина [122]:

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

[DNA] је концентрација CT-DNA у базним паровима;
ε_f -је коефицијент екстинкције за невезани комплекс на одговарајућем λ_{max};
ε_A-је коефицијент екстинкције комплекса при датој концентрацији CT-DNA;
ε_{b}- је коефицијент екстинкције комплекса у потпуно везаном облику.
Константа везивања (K_b) је израчуната из односа нагиба и пресека праве.

3.5.2. Метода флуоресцентне спектроскопије

Да би се испитало да ли комплекси могу да истисну 3,8-диамин-5-етил-6--фенилфенантридијум бромид (EB) из DNA-EB комплекса, EB-компетитивне студије синтетизованих комплекса паладијум(II) јона урађене су флуоресцентном емисионом спектроскопијом. 3,8-диамин-5-етил-6-фенилфенантридијум бромид интерагује неспецифично са DNA и при томе емитује снажну флуоресценцију. DNA-EB је припремљен мешањем 23,1 μM EB и 23,1 μM CT–DNA у 0,01 M PBS пуферском раствору (pH = 7,4) за испитивање комплекса **C1-C4** и 48,2 μM EB (концентрација 1 mM) и 20,0 μM CT-DNA (концентрација 2,41 mM) у PBS пуферском раствору (pH = 7,4) за испитивање комплекса **C5** и **C6**. Могући ефекат везивања комплекса испитиван је постепено након додавања одређене количине раствора комплекса у раствор DNA-EB. Таласна дужина ексцитације била је 527 nm, док је опсег емисије био 550 - 750 nm.

За израчунавање константе гашења (K_{sv}) коришћена је Стерн-Волмерова једначина [123]:

$$\frac{Io}{I} = 1 + K_{SV}[Q]$$

I_0 и I су интензитети емисије у присуству и у одсуству испитиваних комплекса;
[Q] је концентрација комплекса;
K_{sv} је Стерн-Волмерова константа гашења.

Гафик зависности I_0/I од [Q] даје праву линију и вредност константе (K_{sv}) је израчуната из односа нагиба и пресека праве.

3.5.3. Мерење вискозности

Одређена је вискозност раствора CT-DNA са различитим концентрацијама испитиваних паладијум(II) комплекса. За сваки узорак, време протока је мерено више пута и израчунато је просечно време протока. Вискозитет саме CT-DNA је представљен као η_0, док је η вискозитет CT-DNA у присуству сваког комплекса. Збирни подаци су представљени као $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ према *r*. Прорачуни су урађени уз корекцију времена протока раствора који садрже CT-DNA (t) према времену протока самог пуфера (t_0).

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

3.5.4. Интеракције комплекса паладијума са серумом албумина

Најзаступљенији протеин у плазми је серумски албумин (SA) који је кључни албумин за транспорт металних јона и других молекула кроз крвоток. Природа и јачина интеракције између комплекса јона прелазних метала и серумског албумина имају велики утицај на дистрибуцију лека, апсорпцију, метаболизам и коначно на излучивање [124].

Са циљем да се испита могући начин везивања комплекса **C5** и **C6** коришћен је говеђи серум албумина (BSA). Смањење интензитета емисије раствора са фиксном концентрацијом BSA (2 μM) и различитим концентрацијама комплекса **C5** или **C6** (опсег између 2 - 20 μM) праћено је на 366 nm. Таласна дужина ексцитације била је 295 nm, док је опсег снимања био 300 - 500 nm. Није откривена емисија флуоресценције када су спектри комплекса **C5** и **C6** снимљени у пуферисаним растворима под истим експерименталним условима. Стерн-Волмерова једначина је коришћена за анализу података о гашењу флуоресценције:

$$\frac{Io}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV}[Q]$$

Io и I представљају интензитете флуоресценције BSA у одсуству и у присуству комплекса;
K_{SV} и k_q су динамичка константа гашења и константа брзине гашења BSA;
τo је просечни животни век BSA без комплекса (10^{-8} s за BSA);
[K] је концентрација комплекса паладијума(II).

За статичку интеракцију гашења, равнотежа између везаних и слободних молекула дата је Хиловом једначином [125]:

$$\log\frac{Io - I}{I} = \log K + n\log[Q]$$

Io и I представљају интензитете флуоресценције BSA у одсуству и у присуству комплекса;
K представља константу везивања;
n је број места везивања;
[Q] је концентрација испитиваних комплекса.

3.6. КИНЕТИЧКА МЕРЕЊА

У случају комплекса **C5** и **C6** вршена су и кинетичка мерења са циљем да се одреде константе брзине *pseudo*-првог реда k_{obsd}. У ту сврху коришћени у L-метионин (L-Met), гуанозин-5'-монофосфат (5'-GMP) и глутатион (GSH). Сви раствори су припремљени у 25 mM Hepes пуферу и 50 mM NaCl (pH = 7,2). За снимање спектра смеше комплексних и нуклеофилних раствора коришћен је UV-Vis спектрофотометар, у опсегу између 200 - 600 nm, како би се одредила одговарајућа таласна дужина за кинетичка мерења.

Једнаке запремине раствора комплекса (**C5** или **C6** у 0,01 mM Hepes пуферу) и нуклеофила (концентрација у опсегу између 0,1 - 0,5 mM у Hepes пуферу) су помешане директно у инструменту са заустављеним током (*stopped-flow*). За сваки експериментални услов урађено је пет или шест независних кинетичких циклуса са циљем да се одреде константе брзине *pseudo*-првог реда, k_{obsd}. Реакције су проучаване на три различите температуре (288, 298 и 310 K) да би се разјаснио механизам супституције. За израчунавање коришћени су програми OriginPro 2018, Microsoft Excel 2010 и Pro Data SX.

3.7. МОЛЕКУЛСКИ ДОКИНГ

Симулације молекулског докинга примењене су за боље разумевање инхибиторне активности дихлоридо *O*,*O*′-диалкил (*S*,*S*)-етилендиамин-*N*,*N*′-ди-(3,3′-1H-индол-3--ил)пропионато паладијум(II) комплекса (**C1-C4**). Инхибиторна активност испитиваних комплекса према дезоксирибонуклеинској киселини изведена је коришћењем програмског пакета AutoDock 4.2 [126]. Кристална структура DNA (PDB:4IS1) добијена је из RCSB Protein Data Bank [127]. У циљу припреме молекула DNA за докинг анализу уклоњени су молекули воде и кофактор помоћу програмског пакета Discovery Studio 4.0 [128]. Прорачуни Kollman парцијалних наелектрисања и додавања атома водоника урађени су коришћењем AutoDockTools (ADT). Оптимизација структура испитиваних молекула је извршена помоћу B3LYP-D3BJ функционала и два базисна сета 6-311+G(d,p) за C, N, O, Cl и H и def2-TZVPD за Pd. Сви прорачуни су урађени помоћу софтверског пакета Gaussian09 [100,109]. За симулацију молекулског докинга коришћена је ригидна структура DNA, док су испитивани комплекси имали флексибилну структуру. За израчунавање наелектрисања коришћена је Geistenger метода. Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) је коришћен за симулацију DNA – комплекси интеракција. У активном месту DNA одређене су мрежне кутије димензија 60 × 60 × 60 Å^3 са размаком од 0,375 Å. На овај начин је омогућено слободно кретање испитиваних једињења.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. ОПШТИ ПОСТУПАК ЗА СИНТЕЗУ *O,O′*-ДИАЛКИЛ ЕСТАРА (*S,S*)-ЕТИЛЕНДИАМИН-*N,N′*-ДИ-(3,3′-1H-ИНДОЛ-3-ИЛ) ПРОПИОНСКЕ КИСЕЛИНЕ ДИХЛОРХИДРАТА И ОДГОВАРАЈУЋИХ ПАЛАДИЈУМ(II) КОМПЛЕКСА

O,O′-диалкил естри (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил) пропионске киселине дихлорхидрата (**L1-L4**) добијени су у реакцији естерификације претходно добијене (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил) пропионске киселине и одговарајућег алкохола (етанола, 1-пропанола, 1-бутанола или 1-пентанола) што је приказано на **шеми 7**. (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол--3-ил) пропионска киселина је синтетисана у реакцији између натријумове соли L-триптофана и 1,2-диброметана (**шема 6**).

Новосинтетисани естри се делимично растварају у води, а добро су растворни у диметилсулфоксиду.

O,O′-диалкил (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил) пропионато-паладијум(II) комплекси, (**C1-C4**) настају у реакцији између етил, пропил, бутил и пентил естра (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил) пропионске киселине и калијум-тетрахлоридопаладата(II) ($K_2[PdCl_4]$) у молском односу 1:1 (**шема 8**). Тако добијени комплекси су нерастворни у води, а добро се растварају у диметилсулфоксиду.

4.2. ОДРЕЂИВАЊЕ СТРУКТУРЕ ЛИГАНАДА И КОМПЛЕКСА

Структуре лиганада и њима одговарајућих комплекса претпостављене су на основу резултата елементалне микроанализе, као и на основу спектроскопских података добијених из IR и NMR спектара. Све структуре су оптимизоване методом функционала густине (DFT) као теоријском методом.

Експериментално добијене вредности микроанализе за проценат заступљености угљеника, водоника и азота су у сагласности са израчунатим вредностима.

4.2.1. Инфрацрвени (IR) спектри лиганада и комплекса

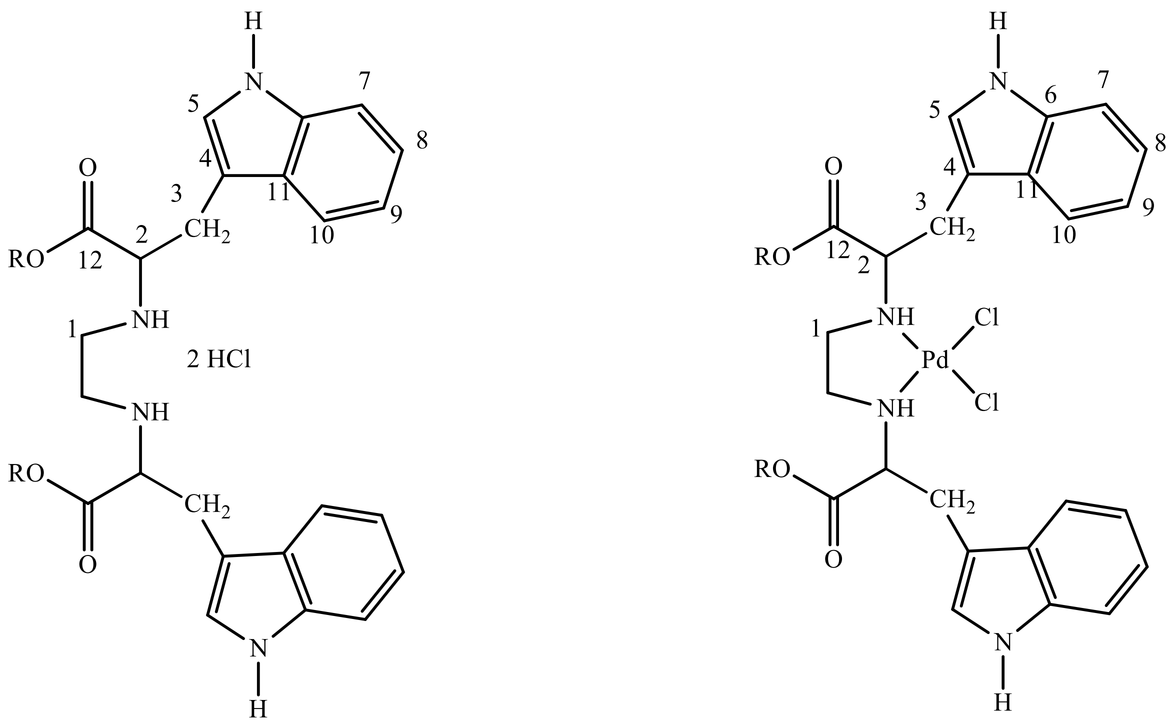
Карактеристичне апсорпционе траке за C=O групу које се јављају у IR спектрима и лиганада и комплекса на 1733 - 1744 cm^{-1} указују да ова група не учествује у координовању. Такође трака која потиче од C–O везе је уочена на око 1220 cm^{-1} за све синтетисане лиганде, док се трака за исту везу у спектрима комплекса налази на сличним вредностима и то у опсегу од 1220 - 1226 cm^{-1}. Две апсорпционе траке на око 3400 и 3270 cm^{-1} које одговарају валенционим вибрацијама N–H групе јављају се у IR спектрима свих синтетисаних лиганада и комплекса због постојања N–H групе и у етилендиаминском мосту и у прстену. Такође, вибрације истезања које се јављају у области између 559 - 612 cm^{-1} потврђују формирање Pd–N везе у свим синтетисаним комплексима [100].

4.2.2. Нуклеарно-магнетно-резонанциони (^{1}H и ^{13}C NMR) спектри лиганада и комплекса

^{1}H и ^{13}C NMR спектри лиганада и комплекса дају јаснију слику о начину координовања паладијум(II) јона. Нумерација атома угљеника која је коришћена приликом решавања спектара дата је на **слици 16**.

У ^{1}H NMR спектрима свих лиганада (**L1-L4**) сигнал који потиче од амино групе етилендиаминског моста се налази у области од 1,10 - 1,48 ppm. С' друге стране, у спектрима комплекса (**C1-C4**) исте групе дају сигнале на већим хемијским померањима и то у области од око 3,40 ppm. То јасно указује да је до координовања дошло управо преко протонованог азотовог атома из етилендиаминског моста. Карактеристичан синглет на око 11 ppm у спектрима свих лиганада и комплекса потиче од N–H групе из триптофана. То такође потврђује да овај атом азота не учествује у координацији. Протони метил групе за сва једињења дају сигнале у области од 0,75 - 1,51, док се сигнали водоникових атома из ароматичног прстена јављају између 6,54 и 7,90 ppm [100].

Сигнал на око 170 ppm у ^{13}C NMR спектрима свих лиганада и комплекса који потиче од угљениковог атома естарске групе потврђује да кисеоник из ове групе не учествује у координовању са паладијум(II) јоном [100].

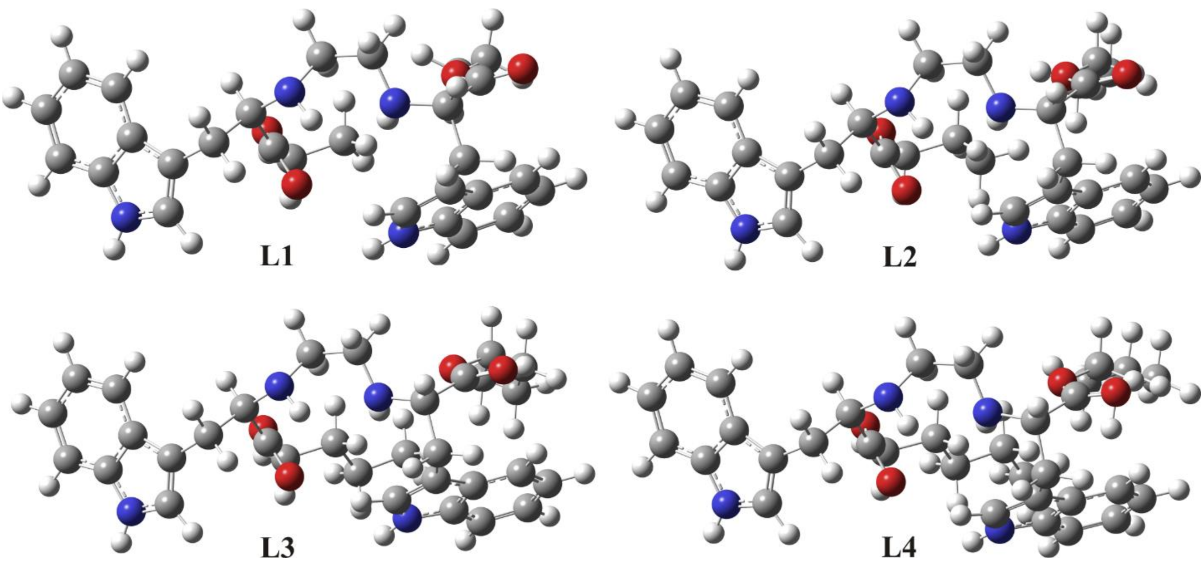


R_2-(*S*,*S*)-eddtrp·2HCl [$PdCl_2$(R_2-*S*,*S*-eddtrp)]

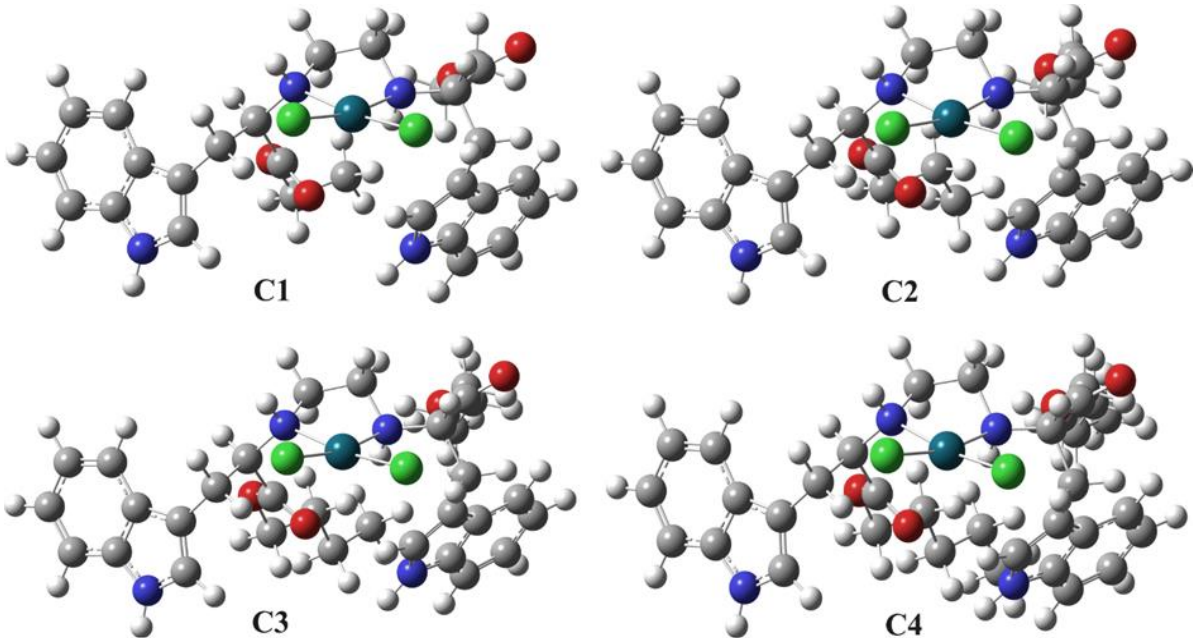
Слика 16. Нумерација атома угљеника у NMR спектрима

4.2.3. Метода функционала густине (DFT)

У циљу оптимизације структура свих новосинтетисаних естара и њима одговарајућих паладијум(II) комплекса коришћена је метода функционала густине (DFT) [100]. Пажљива анализа структуре лиганада указује да сва четири испитивана једињења могу имати више конформација. Стога је први задатак био да се одреде најстабилнији ротамери за сваки молекул. За одређивање најстабилнијих ротамера лиганада **L1-L4** (**слика 17**) извршена је конформациона анализа за све лиганде. MMFF94 заснован на Монте-Карло (Monte-Carlo) методи генерисала је 286 могућих конформација гасне фазе за сваки лиганд. Након уклањања дупликата и структура са енергијама већим од око 30 $kJmol^{-1}$, добијена је серија од 147, 165, 148 и 124 нискоенергетских конформера за **L1**, **L2**, **L3** и **L4**. Имајући у виду да молекуларна механика даје непоуздана енергетска предвиђања, све одабране MMFF94 структуре су прерачунате коришћењем M06/6-31G(d) нивоа теорије са циљем да се пронађе најстабилнија структура испитиваних лиганада. Двадесет конформера најниже енергије је одабрано из сва четири сета конформера за даље разматрање. Њихове структуре су поново оптимизоване и калкулације фреквенције су извршене на нивоу теорије M06/6-311G+(d,p). На овај начин је детектован најстабилнији ротамер за сваки лиганд (**слика 17**). За креирање геометрије комплекса коришћене су најстабилније геометрије лиганада. Оптимизоване структуре **C1-C4** приказане су на **слици 18**. Имајући у виду да нисмо могли експериментално да одредимо геометрију ни лиганда ни комплекса, у ту сврху је примењена DFT метода.



Слика 17. Оптимизоване геометрије испитиваних лиганада



Слика 18. Оптимизоване геометрије испитиваних комплекса

Да би се потврдило да предложене теоријске структуре испитиваних лиганада и комплекса одговарају структури синтетизованих, симулирани су NMR спектри. Експерименталне и израчунате вредности за хемијска померања, као и одговарајући коефицијенти корелације и средња апсолутна грешка приказани су у **табелама 4** и **5**, а пажљивом анализом добијених вредности може се закључити да су експерименталне вредности хемијских померања у доброј сагласности са израчунатим вредностима. Квалитет линеарне корелације оцењиван је помоћу два дескриптора: коефицијента корелације (R) и средње апсолутне грешке (MAE). Упркос чињеници да су лиганди веома флексибилни, вредности коефицијената корелације за хемијска померања у протонском NMR спектру леже у опсегу између 0,990 и 0,995, док су одговарајуће вредности коефицијената корелације за ^{13}C померања чак и нешто веће и леже у опсегу између 0,990 и 0,998. Сличне вредности коефицијената корелације добијене су за хемијска померања комплекса паладијум(II) јона. Релативно мале вредности за MAE, потврдиле су да се израчунате геометрије лиганада и комплекса добро слажу са експериментално утврђеним структурама. То очигледно значи да оптимизоване геометрије експериментално одговарају добијеним.

Табела 4. Експериментално добијена и израчуната хемијска померања (ppm) у ^{1}H NMR спектрима лиганада **L1-L4** и комплекса **C1-C4**

^{1}H NMR Једињења	Експерименталне вредности								Израчунате вредности							
	L1	**L2**	**L3**	**L4**	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**L1**	**L2**	**L3**	**L4**	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**
C1–H	3,30	3,33	3,25	3,32	3,01	3,13	3,15	3,37	2,56	2,59	2,60	2,63	2,90	2,99	2,97	2,98
C2–H	3,60	3,72	4,00	3,98	3,66	3,65	3,65	4,01	3,21	3,34	3,40	3,31	3,52	3,62	3,67	3,69
C3–H	3,26	3,40	3,32	3,26	3,34	3,32	3,26	3,75	3,11	3,08	3,16	3,31	3,50	3,49	3,52	3,51
C5–H	7,40	7,50	7,22	7,35	7,58	7,26	7,70	7,90	7,55	7,62	7,73	7,64	8,32	8,19	8,21	8,29
C7–H	7,65	7,72	7,45	7,24	7,25	6,97	7,62	7,49	7,71	7,84	7,79	7,75	7,69	7,89	7,72	7,76
C8–H	7,50	7,57	7,54	7,50	7,54	7,54	7,32	7,51	7,65	7,59	7,58	7,52	7,60	7,57	7,52	7,58
C9–H	7,46	7,24	7,03	7,03	7,39	6,54	7,47	7,41	7,53	7,62	7,46	7,47	7,49	7,56	7,57	7,46
C10–H	7,14	7,20	7,36	7,08	7,04	7,04	7,65	7,05	7,92	7,86	7,92	7,97	7,84	7,72	7,92	7,88
C13–H	4,10	4,17	4,18	4,16	3,79	3,89	3,47	3,96	3,70	3,65	3,78	3,77	3,74	3,52	3,72	3,73
C14–H	1,08	1,44	1,30	1,39	1,15	0,71	1,78	1,18	0,42	0,90	0,20	0,21	1,24	0,20	0,70	1,20
C15–H	/	0,75	1,10	1,26	/	1,51	1,07	0,80	/	0,45	1,00	0,91	/	0,35	0,98	0,89
C16–H	/	/	0,82	1,09	/	/	0,76	0,79	/	/	0,56	0,69	/	/	0,87	0,77
C17–H	/	/	/	0,83	/	/	/	0,85	/	/	/	0,93	/	/	/	0,80
N1–H	1,10	1,40	1,35	1,48	3,40	3,37	3,40	3,50	1,03	1,26	1,36	1,23	2,31	2,43	2,48	3,50
MAE	/	/	/	/	/	/	/	/	**0,330**	**0,435**	**0,406**	**0,444**	**0,378**	**0,541**	**0,328**	**0,335**
R	/	/	/	/	/	/	/	/	**0,995**	**0,995**	**0,992**	**0,990**	**0,985**	**0,989**	**0,990**	**0,990**

Табела 5. Експериментално добијена и израчуната хемијска померања (ppm) у ^{13}C NMR спектрима лиганада **L1-L4** и комплекса **C1-C4**

^{13}C NMR Једињења	Експерименталне вредности								Израчунате вредности							
	L1	**L2**	**L3**	**L4**	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**L1**	**L2**	**L3**	**L4**	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**
C1	43,50	53,07	39,90	52,95	54,88	52,87	52,93	52,33	50,12	49,98	50,64	50,91	54,97	55,19	55,37	55,29
C2	62,17	57,03	52,95	60,89	64,29	66,87	56,46	64,78	62,58	62,22	63,14	62,89	66,39	67,16	66,95	66,92
C3	25,20	26,37	26,45	26,47	29,35	27,32	26,52	27,87	33,98	33,07	33,32	33,88	32,08	32,54	33,19	33,05
C4	113,70	111,72	111,71	111,74	111,60	110,82	111,62	111,52	115,71	116,57	116,86	115,64	114,18	114,17	114,44	114,54
C5	126,27	135,00	124,94	124,95	135,60	135,66	124,94	124,27	136,90	137,42	136,62	136,42	137,88	137,99	138,12	136,87
C6	136,30	136,40	136,41	136,42	136,50	136,42	136,40	136,31	136,90	143,27	142,69	142,76	143,23	142,85	143,03	143,30
C7	118,75	118,70	127,10	127,12	118,49	121,25	127,14	127,20	117,61	122,15	118,81	118,63	117,88	122,70	122,08	118,72
C8	118,23	127,09	118,42	118,42	127,32	127,29	118,60	118,40	128,31	127,85	128,28	127,97	128,67	127,55	127,41	129,18
C9	127,03	121,30	118,75	118,90	121,10	128,09	121,28	116,09	125,24	127,07	125,20	125,41	125,48	127,35	127,84	125,77
C10	121,30	118,16	121,27	121,29	121,28	124,97	124,46	121,02	125,43	122,45	126,07	125,58	125,50	121,91	122,74	125,73
C11	125,02	132,16	106,68	125,26	131,17	138,35	107,74	105,96	133,40	132,71	133,10	133,55	133,44	142,85	133,84	133,80
C12	173,38	174,52	169,52	169,56	178,34	171,55	171,30	171,16	184,81	183,31	184,19	184,45	178,15	179,35	179,91	179,75
C13	61,80	67,15	65,37	65,69	64,27	67,30	64,63	64,78	63,59	68,40	67,46	67,01	65,00	69,64	69,09	69,11
C14	13,73	21,34	29,93	32,38	14,84	21,65	30,11	27,87	17,95	25,66	35,54	33,88	17,55	47,89	35,42	33,57
C15	/	10,18	18,46	27,63	/	10,35	18,58	27,56	/	12,38	21,86	30,96	/	11,57	20,37	29,86
C16	/	/	13,61	22,02	/	/	13,62	21,77	/	/	17,98	28,20	/	/	19,21	29,32
C17	/	/	/	14,04	/	/	/	13,83	/	/	/	16,61	/	/	/	14,75
MAE									**5,142**	**4,692**	**8,553**	**5,887**	**5,142**	**4,503**	**7,266**	**7,281**
R									**0,995**	**0,998**	**0,990**	**0,995**	**0,995**	**0,991**	**0,990**	**0,990**

4.3. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ *O,O′*-ДИАЛКИЛ ЕСТАРА (*S,S*)- -ЕТИЛЕНДИАМИН-*N,N′*-ДИ-(3,3′-1H-ИНДОЛ-3-ИЛ) ПРОПИОНСКЕ КИСЕЛИНЕ ДИХИДРОХЛОРИДА И ЊИХОВИХ ПАЛАДИЈУМ(II) КОМПЛЕКСА

4.3.1. *In vitro* антимикробна активност

Резултати *in vitro* антимикробне активности лиганада *O,O′*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил) пропионске киселине дихидрохлорида (**L1-L4)** и одговарајућух паладијум(II) комплекса (**C1-C4**) који су добијени тестирањем на 19 врста микроорганизама приказани су у **табели 6** [100]. Тетрациклин и флуконазол су коришћени као контрола.

Утврђено је да раст микроорганизама није инхибиран утицајем 10 % DMSO који је коришћен као растварач. MIC и MMC вредности за лиганде и комплексе зависе од врсте третираних микроорганизама, а добијене вредности за MIC су биле у распону од 7,81 до 1000 μg/mL. Резултати су показали да је антибактеријска активност свих тестираних једињења селективна. У суштини, антимикробна активност комплекса је готово иста као и активност њима одговарајућих лиганада. Изузетак су само лиганди **L3** и **L4** који испољавају дејство на Грам(-) бактерије и гљиве за разлику од одговарајућих комплекса.

Бактерија *Escherichia coli* ATCC 25922 показује највећу осетљивост према свим испитиваним лигандима и комплексима. Забележене вредности су истоветне или чак и веће од оних које су добијене за позитивну контролу-тетрациклин. **L3** и **L4** показују исту или већу активност према *Proteus mirabilis*, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Pseudomonas aeruginosa* и гљивама у поређењу са позитивним контролама. Од свих испитиваних једињења комплекси **C1**, **C2** и **C3** показују највећу активност према пробиотској врсти *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*.

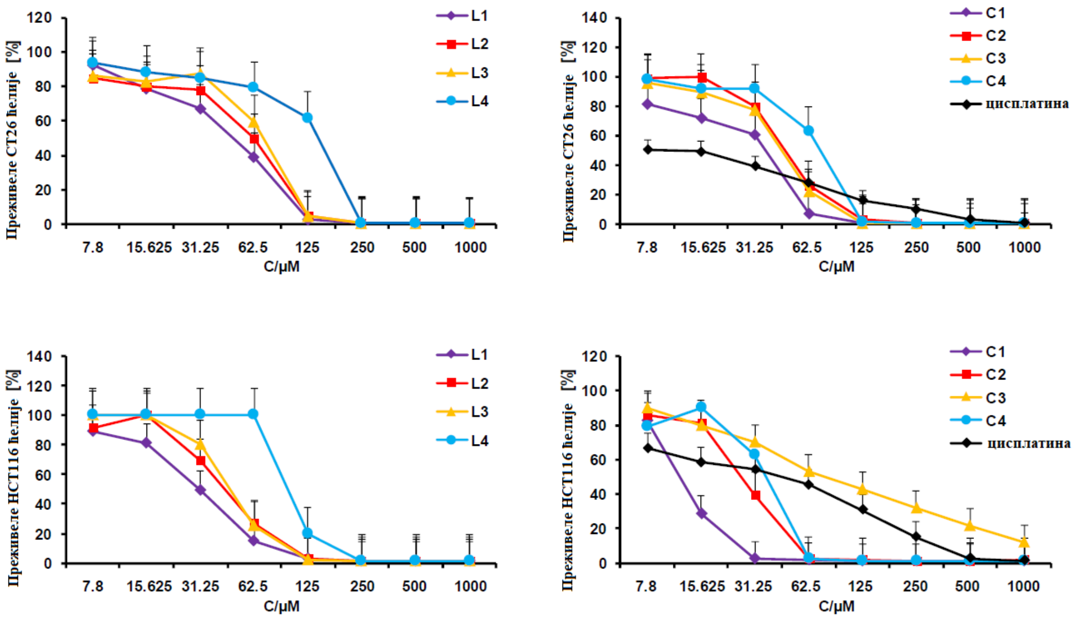
Табела 6. Вредности MIC и MMC за **L1-L4**; **C1-C4**; тетрациклин и флуконазол

Тестирана једињења	L1		C1		L2		C2		L3		C3		L4		C4		K1		K2	
Испитиване врсте	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC
Lactobacillus plantarum	500	1000	500	1000	500	1000	250	500	250	500	250	500	125	250	500	500	0,45	7,81	/	/
Bifidobacterium animalis subsp.lactis	250	250	15,63	125	125	250	62,50	62,50	125	250	62,50	125	7,81	7,81	125	250	31,25	62,5	/	/
Bacillus subtilis IP 5832	500	500	250	500	250	500	125	500	250	250	125	250	125	125	250	500	1,95	15,63	/	/
Bacillus subtilis	500	500	250	1000	500	1000	125	500	250	500	125	500	125	250	500	500	0,11	1,95	/	/
Bacillus cereus	500	500	250	250	500	500	250	250	125	125	125	125	62,50	125	125	125	0,45	3,91	/	/
Bacillus pumilus NCTC 8241	500	500	250	500	250	500	125	250	250	250	125	250	125	125	500	500	0,11	7,81	/	/
Staphylococcus aureus ATCC 25923	500	500	500	500	500	500	125	125	125	125	125	250	62,50	62,50	500	500	0,22	3,75	/	/
Staphylococcus aureus	500	500	500	500	500	500	125	250	125	250	125	250	62,50	125	250	500	0,98	15,62	/	/
Escherichia coli ATCC 25922	15,63	15,63	15,63	62,50	3,61	15,63	31,25	62,50	7,81	15,63	7,81	31,25	3,91	15,63	31,25	31,25	15,63	31,25	/	/
Proteus mirabilis	1000	1000	1000	>1000	500	1000	1000	1000	250	500	250	1000	250	250	500	500	250	>250	/	/
Proteus mirabilis ATCC 12453	500	1000	1000	>1000	500	500	1000	1000	125	250	250	500	125	250	500	500	125	125	/	/
Pseudomonas aeruginosa	500	1000	1000	>1000	500	1000	1000	1000	250	500	250	1000	250	500	500	1000	250	>250	/	/
P. aeruginosa ATCC 27853	1000	>1000	1000	>1000	1000	>1000	1000	1000	500	1000	1000	1000	62,5	500	250	1000	62,5	125	/	/
Salmonella enterica	1000	>1000	1000	>1000	500	1000	1000	1000	125	500	500	1000	125	250	500	500	15,63	31,25	/	/
Salmonella typhymirium	1000	>1000	1000	>1000	500	1000	1000	1000	125	500	500	1000	125	125	500	1000	15,63	125	/	/
Rhodotorula sp.	500	1000	500	1000	125	>1000	500	1000	125	250	1000	1000	125	250	1000	1000	/	/	62,50	1000
Saccharomyces boulardii	500	1000	1000	>1000	250	500	1000	>1000	250	250	1000	>1000	125	125	1000	>1000	/	/	31,25	1000
Candida albicans ATCC 10231	1000	>1000	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	1000	>1000	250	250	1000	1000	/	/	31,25	1000
Candida albicans	1000	>1000	1000	>1000	1000	>1000	1000	>1000	500	1000	1000	>1000	500	500	1000	>1000	/	/	62,50	1000

MIC- Вредност минималне инхибиторне концентрације (μg/mL); MMC- Вредност минималне микробицидне концентрације μg/mL; K1- Тетрациклин; K2- Флуконазол

4.3.2. In vitro антиканцерогена активност

Лиганди (**L1-L4**) и њима одговарајући комплекси (**C1-C4**) су тестирани према ћелијама хуманог и мишјег карцинома дебелог црева (HCT116 и CT26), а као контролна супстанца је коришћена цисплатина. Све испитиване супстанце показују дозно зависну антиканцерогену активност према обе третиране ћелијске линије, а резултати су приказани на **слици 19** [129].



Слика 19. Дозно-зависна антиканцерогена активност испитиваних лиганада (**L1-L4**) и комплекса (**C1-C4**) према ћелијама хуманог и мишјег карцинома дебелог црева

За испитиване лиганде најнижу активност показао је лиганд **L1**, док је лиганд **L4** показао најбољу активност приликом испитивања на обе ћелијске линије (HCT116 и CT26) што је приказано на **слици 19** и у **табели 7**. Лиганди **L1-L4** показују средњу активност према тестираним ћелијским линијама (IC_{50} = 38,11 - 97,12 μM).

Табела 7. IC_{50} вредности за испитиване лиганде **L1-L4** и комплексе **C1-C4** према ћелијским линијама CT26 и HCT116 измерене после 72 сата, MTT методом

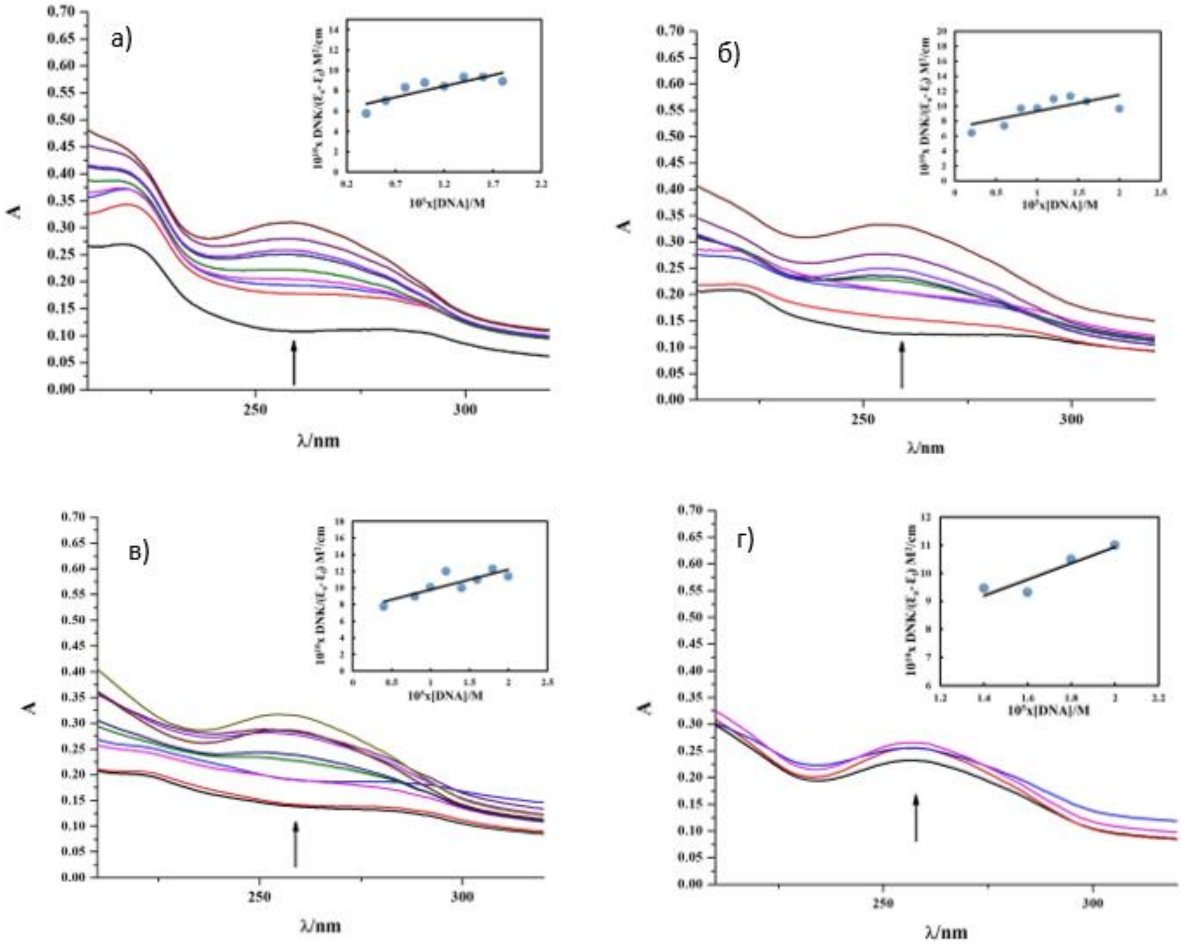
Тестирано једињење	**IC_{50} ± SD (μM)**	
	CT26	**HCT116**
L1	44,18 ± 8,21	38,11 ± 5,78
L2	58,14 ± 10,47	48,84 ± 8,41
L3	56,69 ± 8,79	55,02 ± 9,32
L4	91,48 ± 11,25	97,12 ± 11,47
C1	20,03 ± 4,25	5,02 ± 0,98
C2	55,57 ± 7,89	25,53 ± 4,11
C3	47,52 ± 6,98	87,51 ± 9,87
C4	67,16 ± 10,01	32,11 ± 4,58
цисплатина	10,01 ± 1,94	29,65 ± 2,24

У нижим концентрацијама (7,8 - 31,25 μM) све испитиване супстанце показују нижу активност према ћелијској линији CT26, у односу на цисплатину, 72 сата после третмана, што је и приказано на **слици 19**. Ипак, испитивани комплекси показују већу активност према ћелијама CT26 линије у концентрацији од 62,5 μM у односу на цисплатину (**слика 19**). IC_{50} вредности свих тестираних комплекса према ћелијама CT26 биле су веће у поређењу са IC_{50} вредношћу за цисплатину (**табела 7**). Једино комплекс **C3** показује нижу активност према ћелији HCT116 линије него што је то случај са цисплатином у свим испитиваним концентрацијама (**слика 19**). Оно што је најзначајније је да комплекси **C1** и **C2** и при нижим концентрацијама (концентрација **C1** 15,63 - 31,25 μM и концентрација **C2** 31,25 μM) показују бољу активност према ћелијама HCT116 линије, у односу на цисплатину (**слика 19**). Вредности за IC_{50} за комплексе **C1** и **C2** према ћелијама HCT116 линије су ниже у поређењу са IC_{50} вредностима за цисплатину (**табела 7**), док је IC_{50} вредност за комплекс **C1** према ћелијама HCT116 линије скоро 6 пута нижа у односу на IC_{50} вредност већ коришћеног цитостатика--цисплатине (**табела 7**). Добијени резултати показују да би комплекс **C1** могао да буде кандидат за даља *in vitro* и *in vivo* испитивања антиканцерогене активности и токсичности према здравим ћелијама.

4.4. ИНТЕРАКЦИЈЕ ПАЛАДИЈУМ(II) КОМПЛЕКСА (C1-C4) СА МОЛЕКУЛОМ CT-DNA

4.4.1. Апсорпционо спектроскопска метода

Опште је позната чињеница да се комплекси прелазних метала могу везати за DNA како путем ковалентних (замена лабилног лиганда N-донорском базом гуанина N7) и/или нековалентних (интеркалација, електростатичко или жлебно везивање) интеракција. Упркос томе, интензитет апсорпције комплекса у присуству DNA може се смањити (хипохромизам) или повећати (хиперхромизам) уз благо повећање таласне дужине апсорпције (батохромизам). Спектри апсорпције проучаваних паладијум(II) комплекса у присуству и одсуству CT-DNA приказани су на **слици 20** [129].



Слика 20. Апсорпциони спектри комплекса а) **C1**; б) **C2**; в) **C3**; г) **C4** у 0,01 M PBS (pH = 7,4) по додавању CT-DNA [Pd-комплекс] = 1 × 10^{-5} M, [DNA] = (0,2 - 2) × 10^{-5} M. (Стрелица показује промену апсорпције при повећању концентрације DNA. Додатак: График зависности [DNA]/(ε_A-ε_f) од [DNA] за поменути комплекс)

Након додатка CT-DNA у раствор комплекса **C1** може се уочити значајан хиперхромни ефекат раствора са појавом нове траке на 258 nm (**слика 20a**) која потврђује присуство интеракција [130]. Понашање осталих комплекса паладијума било је прилично слично овоме.

Да би се проценила јачина везивања између проучаваних комплекса и CT-DNA, унутрашње константе везивања су израчунате помоћу следеће једначине:

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

K_b се добија из односа нагиба и пресека праве у дијаграму $[DNA]/(\varepsilon_b - \varepsilon_f)$ у односу на [DNA];
[DNA] је концентрација DNA у паровима база;
$\varepsilon_A = A_{obsd}/$[комплекс];
ε_f је коефицијент гашења за невезани комплекс;
ε_b је коефицијент гашења за комплекс у потпуно везаном стању.

Добијене вредности приказане су у **табели 8**.

Табела 8. Вредности за константу везивања (K_b) за проучаване паладијум(II) комплексе

Комплекс	K_b (M^{-1})
C1	$(3,72 \pm 0,01) \times 10^4$
C2	$(3,10 \pm 0,02) \times 10^4$
C3	$(3,33 \pm 0,03) \times 10^4$
C4	$(5,80 \pm 0,01) \times 10^4$

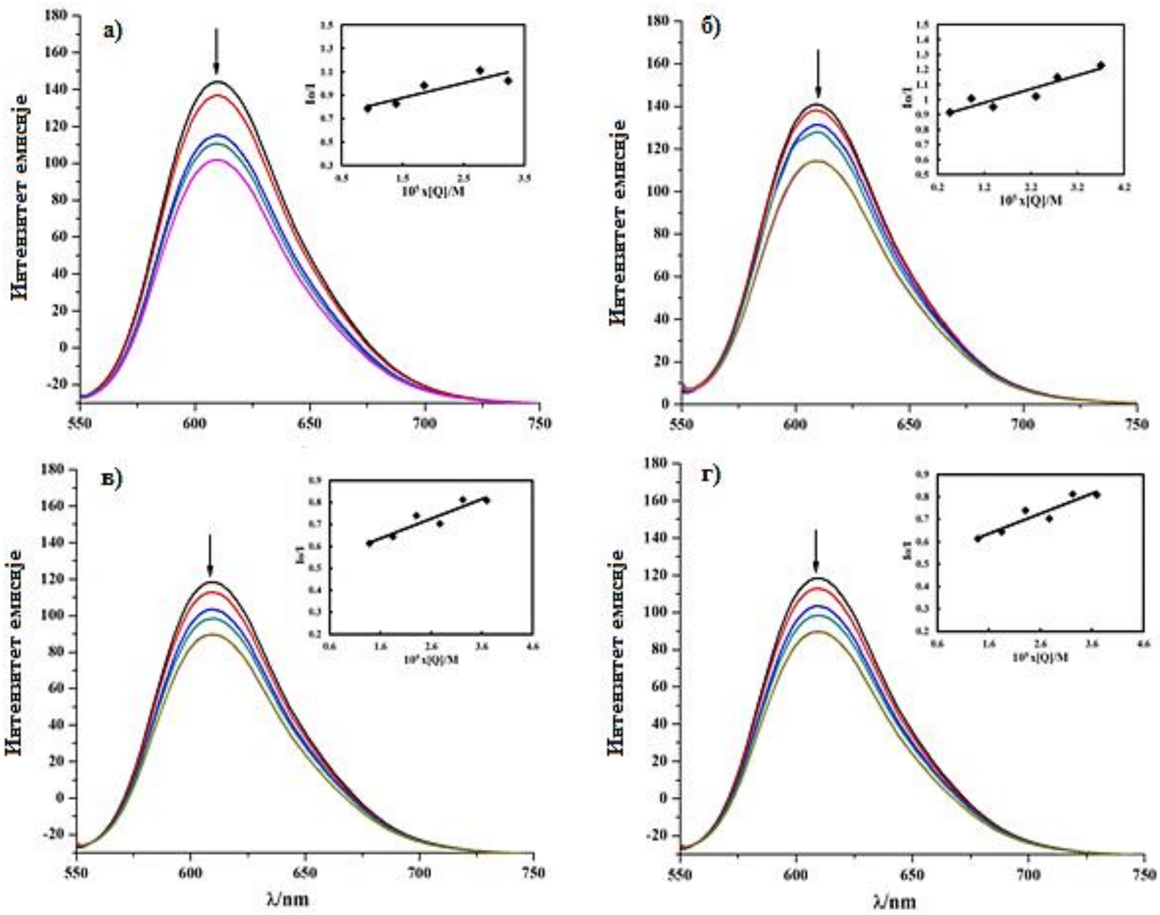
Високе вредности константе везивања (K_b) указују на добар афинитет везивања свих комплекса према CT-DNA. Комплекс **C4** показује највећу вредност K_b. Такође, у поређењу са вредношћу K_b за класични интеркалатор етидијум-бромид (EB), $K_b = (1,23 \pm 0,07) \times 10^5\ M^{-1}$ [131], може се видети да проучавани комплекси показују нижу вредност константе везивања.

4.4.2. Метода флуоресцентне спектроскопије

Етидијум-бромид (EB) је класични интеркалатор који даје значајан интензитет флуоресценције када се интеркалира у парове база DNA. Као резултат, јавља се интензивна емисија флуоресценције на 612 nm када се узорак побуђује на 527 nm, услед формирања једињења EB-DNA. Након додавања комплекса, који је способан да се интеркалира у DNA са истим или већим афинитетом од EB, детектује се смањење емисије флуоресценције EB-DNA једињења.

Криве гашења флуоресценције EB везаног за DNA у одсуству и у присуству испитиваних паладијум(II) комплекса приказане су на **слици 21**.

Ако се концентрација комплекса повећа, уочава се значајно смањење интензитета емисионог опсега на 612 nm, што указује на конкуренцију између комплекса и EB у везивању за DNA. Уочено гашење флуоресценције EB-DNA сугерише да сви проучавани комплекси замењују EB из EB-DNA комплекса и ступају у интеракцију са DNA [132].



Слика 21. Емисиони спектри EB везаног за DNA у присуству комплекса а) **C1**; б) **C2**; в) **C3**; г) **C4**. [EB] = 23,1 μM, [DNA] = 23,1 μM; [комплекс] = 0 - 46,2 μM; λ_{ex} = 527 nm. (Стрелице показују промене интензитета са повећањем концентрације комплекса. Додатак: Стерн-Волмерови дијаграми EB-DNA у присуству испитиваних комплекса)

Стерн-Волмерови дијаграми EB-DNA који су приказани као додаци на **слици 21** потврђују гашење емисије флуоресценције. Стерн-Волмерове константе гашења (K_{SV}) су израчунате из нагиба графикона I_0/I у односу на [Q] по једначини:

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

I_0 и I су интетнзитети емисије у одсуству и присуству комплекса;
[Q] је концентрација комплекса;
K_{sv} је константа гашења.

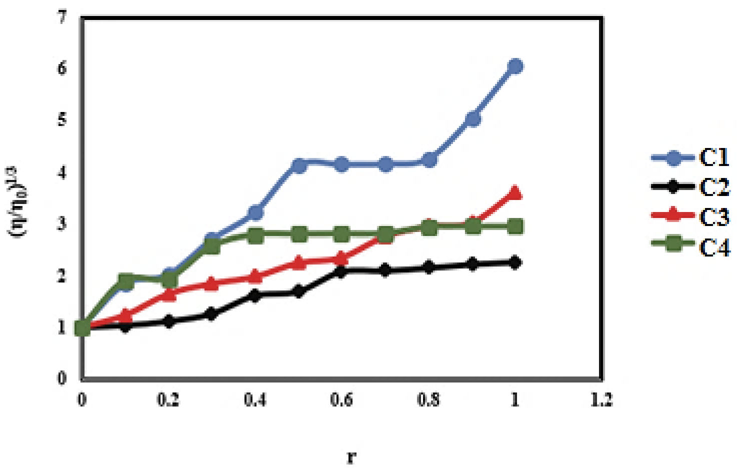
Добијене вредности су приказане у **табели 9**. Сви проучавани комплекси су показали високе вредности константе гашења што указује на њихову велику способност замене EB и везивања за DNA. Комплекс **C1** показује највећу K_{sv} вредност у поређењу са другим комплексима.

Табела 9. Израчунате вредности K_{sv} за проучаване паладијум(II) комплексе

Комплекс	K_{SV} (M^{-1})
C1	$(1{,}26 \pm 0{,}02) \times 10^4$
C2	$(9{,}15 \pm 0{,}03) \times 10^3$
C3	$(8{,}93 \pm 0{,}02) \times 10^3$
C4	$(7{,}70 \pm 0{,}04) \times 10^3$

4.4.3. Мерење вискозности

У циљу потврђивања начина везивања између комплекса **C1**, **C2, C3, C4** и CT-DNA вршена су мерења вискозности раствора у присуству и у одсуству сваког комплекса. Вискозност DNA је осетљива на промене дужине ланаца и сматра се најкритичнијим назнакама начина везивања DNA у раствору. Додавање све веће количине (до r = 1,0) комплекса у раствор DNA (2 mM) повећава релативни вискозитет DNA према следећем редоследу: **C1** > **C4** > **C3** > **C2** што је приказано на **слици 22**. Уочено повећање вискозитета може се објаснити повећањем укупне дужине DNA које је изазвано убацивањем једињења између парова база DNA услед интеракције путем интеркалације.

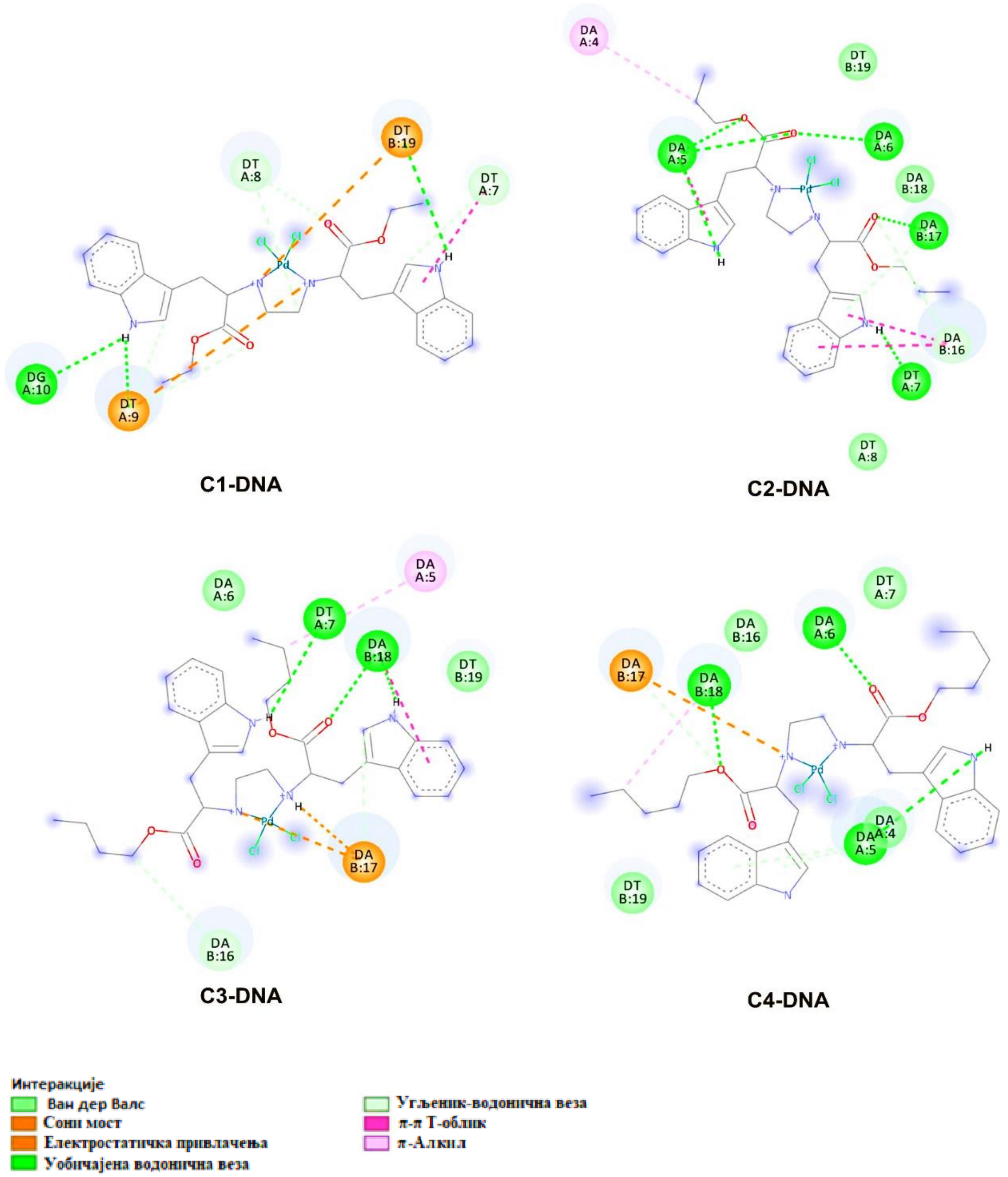


Слика 22. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ за CT-DNA (0,01 mM) на pH = 7,4 по додатку све веће количине комплекса **C1**, **C2**, **C3** и **C4** (r)

4.4.4. Метода молекулског докинга

In silico методе су изузетно корисне алатке за истраживање и разумевање интеракција биолошки активних једињења са различитим протеинима. Због тога имају веома важну улогу у дизајну биолошки активних молекула. У овој докторској дисертацији, симулацијом молекуларног докинга испитивана је инхибиторна активност претходно синтетизованих паладијум(II) комплекса са молекулима DNA [129]. На основу добијених резултата утврђено је да постоје бројне интеракције између испитиваних комплекса и DNA. Добијене вредности константе инхибиције (K_i), слободне енергије везивања (ΔG_{bind}) као и нековалентних интеракција за испитиване системе приказане су у **табелама 10** и **11**. Најстабилније конформације паладијум(II) комплекса (**C1-C4**) са DNA и најважније интеракције међу њима приказане су на **слици 23**. Уочено је да су водоничне везе (конвенционалне и угљеник-водоничне везе) са атомима кисеоника фосфатне и карбонилне групе најчешћи и најважнији тип интеракције свих испитиваних комплекса.

На основу добијених параметара слободне енергије везивања и константе инхибиције може се закључити да комплекс **C1** показује највећи инхибиторни ефекат на молекул DNA, што је у сагласности са експериментално добијеним резултатима. С друге стране, DNA комплекси са испитиваним једињењима **C2**, **C3** и **C4** имају већу енергију везивања и константу инхибиције у поређењу са **C1**-DNA комплексом. Добијени резултати су у корелацији са нижом инхибиторном активношћу ових комплекса утврђеном експерименталним методама. Наиме, **C2**, **C3** и **C4** комплекси формирају водоничне везе преко атома кисеоника из DNA хеликса на позицијама DA6, DA7, DA16, DA17, DA18. Поред тога, ови комплекси формирају важне електростатичке и хидрофобне интеракције што се такође може видети на **слици 22** и у **табелама 10** и **11**.



Слика 23. Интеракције испитиваних паладијум(II) комплекса (**C1-C4)** са молекулом DNA

Табела 10. Важне интеракције између DNA и паладијума(II) комплекса **C1** и **C2**, процењени типови интеракција и важни термодинамички параметри: слободна енергија везивања (**ΔG_{bind}**) и константа инхибиције (**K_i**)

Комплекс	**Интеракција**	**Тип интеракције**	**Растојање (Å)**	**ΔG_{bind} (kJ mol^{-1})**	**K_i (μM)**
C1-DNA	LIG:N – DT19:O	Електростатичка привлачења	5,1739	**-9,18**	**0,19**
	LIG:N – DT9:O	Електростатичка привлачења	4,3421		
	LIG – DT19:O2	Уобичајена водонична веза	2,6243		
	LIG – DT9:O2	Уобичајена водонична веза	1,8496		
	LIG – DG10:O4'	Уобичајена водонична веза	2,9404		
	DT8 – LIG:O	Угљеник-водонична веза	3,6378		
	DT9 –LIG:O	Угљеник-водонична веза	2,9221		
	LIG – DT8:O2	Угљеник-водонична веза	3,4577		
	LIG – DT7:O2	Угљеник-водонична веза	2,9510		
	LIG – DT9:O4'	Угљеник-водонична веза	3,0879		
	LIG – DT7	π-π T-облик	5,6233		
C2-DNA	DA5 – LIG:O	Уобичајена водонична веза	1,8325	**-6,96**	**7,92**
	DA5 – LIG:O	Уобичајена водонична веза	2,9727		
	DA6 – LIG:O	Уобичајена водонична веза	2,3823		
	DA6 – LIG:O	Уобичајена водонична веза	2,5593		
	DA17 – LIG:O	Уобичајена водонична веза	1,9895		
	LIG – DA5:O	Уобичајена водонична веза	2,1034		
	LIG – DT7:O4	Уобичајена водонична веза	1,7793		
	DA16 – LIG:O	Угљеник-водонична веза	3,1261		
	LIG – DA16:O5'	Угљеник-водонична веза	3,3101		
	DA17 – LIG	π -донорска водонична веза	2,8241		
	DA5 – LIG	π-π T-облик	4,3635		
	DA16 – LIG	π-π T-облик	5,0160		
	DA16 – LIG	π-π T-облик	4,4227		
	DA16 – LIG	π-π T-облик	5,6762		
	DA4 – LIG:C	π-Алкил	4,2960		

Табела 11. Важне интеракције између DNA и паладијума(II) комплекса **C3** и **C4**, процењени типови интеракција и важни термодинамички параметри: слободна енергија везивања (**ΔG_{bind}**) и константа инхибиције (**K_i**)

Комплекс	**Интеракција**	**Тип интеракције**	**Растојање (Å)**	**ΔG_{bind} (kJ mol^{-1})**	**K_i (μM)**
C3-DNA	LIG – DA17:O	Сони мост	1,9181	**-5,71**	**64,86**
	LIG – DA17:O	Електростатичка привлачења	5,2528		
	DA18 – LIG:O	Уобичајена водонична веза	1,76442		
	DA18 – LIG:O	Уобичајена водонична веза	2,49165		
	LIG – LIG:O	Уобичајена водонична веза	2,0378		
	LIG – DA18:O	Уобичајена водонична веза	2,0104		
	LIG – DT7:O4	Уобичајена водонична веза	1,94273		
	LIG:C – DA17:O	Угљеник-водонична веза	3,5227		
	LIG – DA16:O	Угљеник-водонична веза	3,5347		
	DA18 – LIG	π-π Т-облик	5,2892		
	DA5 – LIG	π-Алкил	4,5091		
C4-DNA	LIG – DA17:O	Електростатичка привлачења	5,2118	**-4,63**	**403,95**
	DA6 – LIG:O	Уобичајена водонична веза	1,9850		
	DA6 – LIG:O	Уобичајена водонична веза	2,8204		
	DA18 – LIG:O	Уобичајена водонична веза	1,9398		
	LIG – DA5:O	Уобичајена водонична веза	2,1720		
	DA17:C – LIG:O	Угљеник-водонична веза	3,1936		
	DA5 – LIG	π-Донорска водонична веза	3,2233		
	DA5 – LIG	π-Донорска водонична веза	2,8296		

4.5. ПОСТУПАК СИНТЕЗЕ И КАРАКТЕРИЗАЦИЈЕ ПАЛАДИЈУМ(II) КОМПЛЕКСА СА ДЕРИВАТИМА 2-АМИНОТИАЗОЛА КАО ЛИГАНДИМА (C5-C6)

4.5.1. Поступак за синтезу комплекса (C5-C6)

Комплекси паладијум(II) јона са 2-амино-6-метилбензотиазолом (**L5**) и 2-амино-6-хлоробензотиазолом (**L6**) добијени су у директној синтези између калијум-тетрахлоридопаладата(II) претходно раствореног у води и поменутих лиганада растворених у метанолу, а реакција се одиграва у молском односу 1:2 (**шема 9**).

Тако добијени комплекси ди(2-амино-6-метилбензотиазол)дихлоридопаладат(II) (**C5**) и ди(2-амино-6-хлоробензотиазол)дихлоридопаладат(II) (**C6**) су нерастворни у води, али се добро растварају у диметилсулфоксиду [101].

4.5.2. Карактеризација комплекса C5-C6

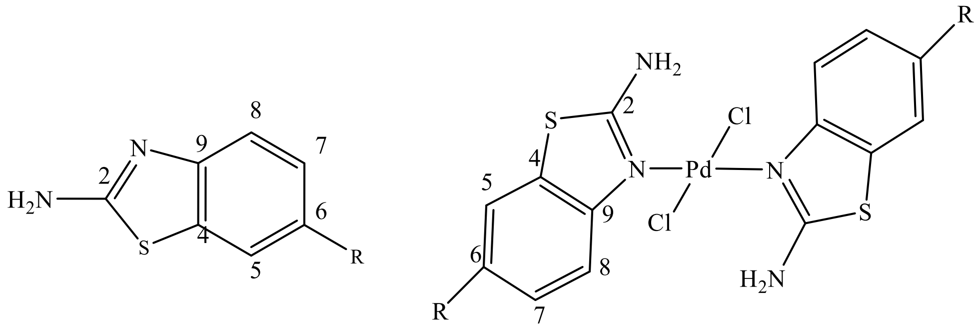
Карактеризација новосинтетисаних паладијум(II) комплекса (**C5** и **C6**) урађена је снимањем инфрацрвених (IR) и нуклеарно-магнетно резонанционих (^{13}C и ^{1}H NMR) спектара. Ради поређења добијених резултата снимљени су и спектри коришћених лиганада. Претпостављене структуре су потврђене на основу резултата елементалне микроанализе, а структура комплекса **C6** је потврђена и на основу резултата рендгенске структурне анализе.

4.5.3. Инфрацрвени спектри комплекса

IR спектри синтетисаних комплекса (**C5** и **C6**) садрже траке од асиметричних (за **C5** на 3411 cm^{-1} и за **C6** на 3458 cm^{-1}) и симетричних (за **C5** на 3281 cm^{-1} и за **C6** на 3272 cm^{-1}) вибрација NH_2 група. Дакле, можемо закључити да у оба комплекса амино групе не учествују у координовању. С обзиром да комплекс **C5** на угљениковом атому C^{6} ароматичног дела молекула садржи CH_3 супституент, уочене су две апсорпционе траке на 2943 cm^{-1} и 2920 cm^{-1}. Вибрације из ароматичних и хетероароматичних (тиазолни део) делова дале су апсорпционе траке на 1611, 1572, 1534, 1496 и 1474 cm^{-1} за комплекс **C5**, док је комплекс **C6** показао апсорпције на 1630, 1422 и 1533 cm^{-1}. У оба комплекса примећене су траке ниског интензитета на 529 cm^{-1} и 521 cm^{-1} које су приписане формирању Pd–N везе након комплексирања преко тиазолног азота и паладијум(II) јона из калијум-тетрахлидоропаладата (II) [101].

4.5.4. Нуклеарно-магнетно-резонанциони (^{13}C и ^{1}H NMR) спектри комплекса

Приликом интерпретације ^{1}H и ^{13}C NMR спектроскопских података коришћени су спектри лиганада **L5** и **L6** и новосинтетисаних комплекса **C5** и **C6** и вршено је њихово упоређивање. Структуре лиганада и комплекса са нумерацијама атома које су коришћене при решавању спектара приказане су на **слици 24**.



а) б)

	L5/C5	L6/C6
R	$-CH_3$	-Cl

Слика 24. Приказ структуре а) лиганада (**L5** и **L6)** и б) комплекса (**C5** и **C6**) са нумерацијом угљеникових атома коришћеном при решавању NMR спектара

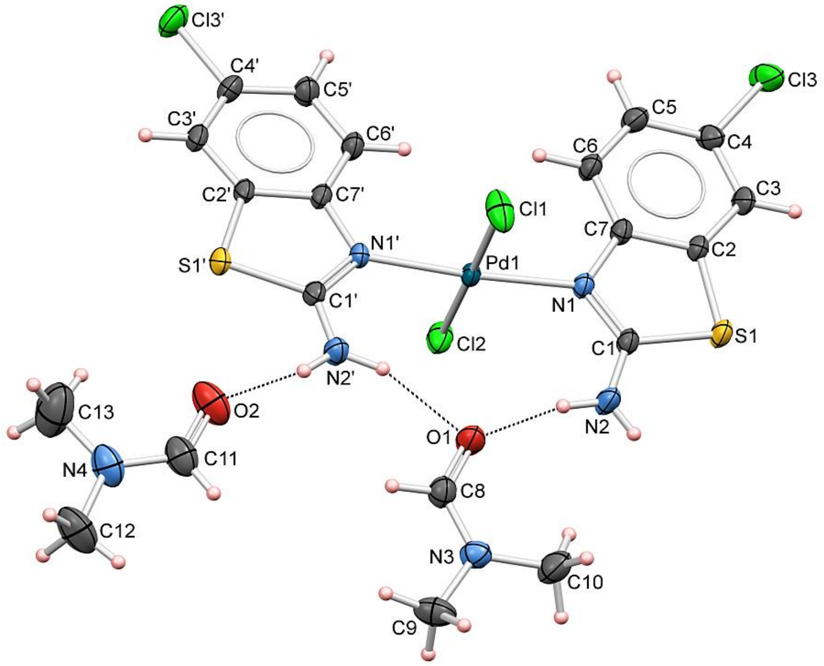
Сигнал метил протона у комплексу **C5** је примећен на 2,38 ppm (више за 0,90 ppm него у одговарајућем лиганду **L5**). Након комплексирања (комплекс **C5)** хемијска померања два протона из ароматичног дела (C^5 и C^7) су благо померена за $\Delta\delta$ 0,11 ppm односно $\Delta\delta$ 0,36 ppm. С друге стране, услед утицаја просторно блиских атома хлора на поремећаје електронске густине и смањење локалног дијамагнетног заштитног поља, сигнали ароматичних C^8 водоника су доста померени ($\Delta\delta$ 1,39 ppm). На исти начин, синглети протона из NH_2 група су уочени на 8,80 ppm (више за 1,45 ppm него у одговарајућем лиганду **L5**). Такође, у комплексу **C6**, синглет C^5 протона и дублет дублета C^7 протона су благо померени на више вредности (7,86 ppm односно 7,57 ppm). Међутим, у поређењу са почетним лигандом **L6** за исте вредности ($\Delta\delta$ 1,39 ppm односно $\Delta\delta$ 1,45 ppm), сигнали C^8 и NH_2 протона у **C6** су померени на више фреквенције (7,30 ppm односно 8,69 ppm).

^{13}C NMR спектар комплекса **C5** показује благо померене сигнале угљеникових атома C^2 ($\Delta\delta$ 0,85 ppm), C^5 ($\Delta\delta$ 0,67 ppm), C^6 ($\Delta\delta$ 0,77 ppm) и C^8 ($\Delta\delta$ 0,87 ppm) који су на вишим вредностима у односу на сигнале почетног лиганда **L5**. Остали атоми угљеника у комплексу **C5** су уочени на нижим вредностима хемијских померања у поређењу са одговарајућим лигандом **L5**. C^4 и C^9 угљеникови атоми показали су значајно смањење резонационих фреквенција ($\Delta\delta$ -2,79 ppm и $\Delta\delta$ -4,92 ppm) након комплексирања (127,21 ppm и 145,81 ppm). Сличан ефекат је примећен и у ^{13}C NMR спектрима новосинтетисаног комплекса **C6**. Хемијска померања угљеникових атома C^2 ($\Delta\delta$ 1,38 ppm), C^5 ($\Delta\delta$ 0,94 ppm,), C^6 ($\Delta\delta$ 0,94 ppm), C^7 ($\Delta\delta$ 1,89 ppm) и C^8 ($\Delta\delta$ 1,08 ppm) су уочена на вишим вредностима хемијских померања у односу на лиганд **L6**. Као и у случају комплекса **C5**, хемијска померања угљеникових атома C^4 (на 127,84 ppm) и C^9 (на 146,74 ppm) у комплексу **C6** на значајно нижим вредностима у односу на лиганд ($\Delta\delta$ -4,83 и $\Delta\delta$ -5,01).

4.5.5. Кристална структура ди(2-амино-6-хлоробензотиазол)дихлоридопаладата(II)

Структура комплекса ди(2-амино-6-хлоробензотиазол)дихлоридопаладата(II) (**C6**) потврђена је на основу резултата рендгенске структурне анализе и приказана је на **слици 25**.

Комплекс **C6** кристалише у триклиничном кристалном систему и *P*–1 просторној групи. Асиметрична јединица кристалне структуре је изграђена од комплекса метала **C6** и два молекула растварача диметилформамида, који је коришћен при прекристализацији. Атом паладијума Pd1 је окружен са два Cl^- јона и два N атома 2-амино-6-хлоробензотиазола као лиганда који формирају квадратно-планарну координацију. Најзначајније геометријске карактеристике за Pd1/N1/N1'/Cl1/Cl2 групу приказане су у **табели 12**. Иако благо искривљена, ова група је готово савршено планарна пошто је максимално померена од заштитног поља најмањих квадрата. Раван (Pd1/N1/N1'/Cl1/Cl2) је 0,047(2) Å за атом N1′ и угао између равни кроз N1–Pd1–Cl1 и N1'–Pd1–Cl2 атоме је 4,83(11)°. Углови између циклохексана и тиазоловог прстена у оба лиганда (**L6** и **L6′**) потврђују благу дисторзију планарности скелета лиганда (2,21(16)° у **L6** и 1,50(15)° у **L6′**). Угао између равни у којима се налазе оба лиганда **L6** и **L6′** формирају угао од 9,59(8)° дајући скоро савршену планарну структуру са нормалним правцима веза Pd1–Cl1 и Pd1–Cl2.



Слика 25. MERCURY [133] приказ молекулске структуре комплекса **C6**

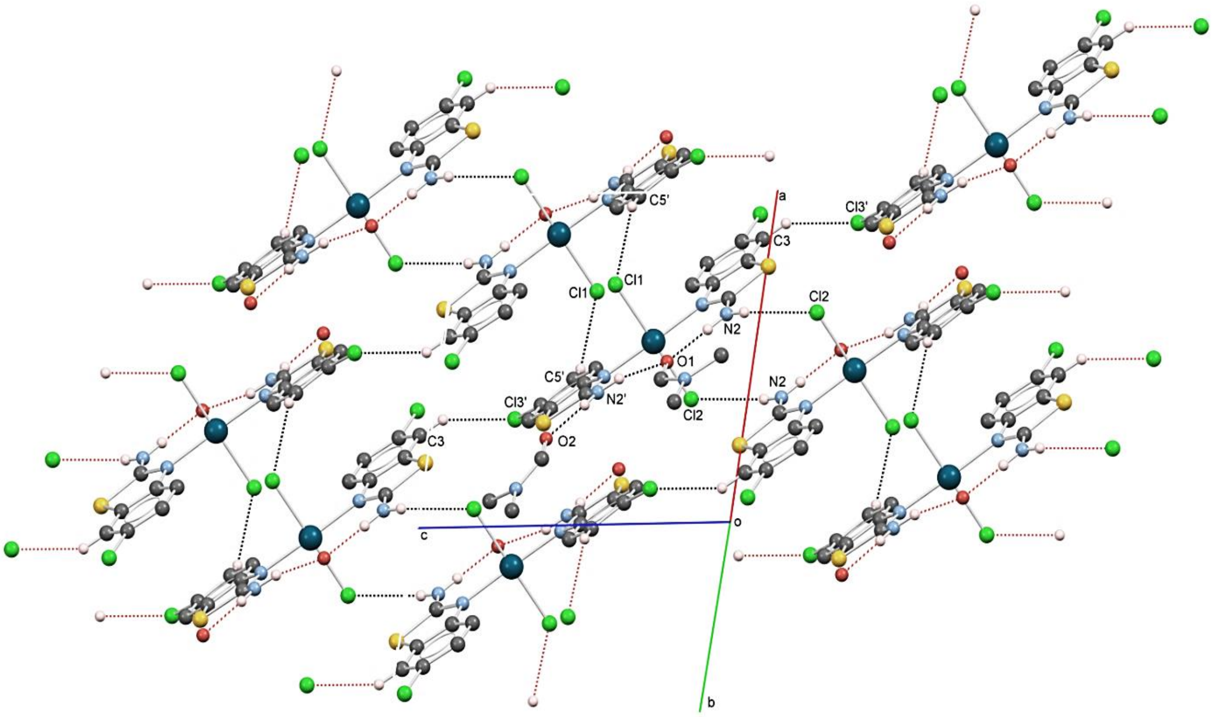
Табела 12. Одабрани геометријски параметри (дужина веза, углови веза и торзиони углови) за комплекс **C6**

Дужине веза [Å]	
Pd1–N1	2,027 (2)
Pd1–N1'	2,0118 (19)
Pd1–Cl1	2,2854 (9)
Pd1–Cl2	2,3045 (8)
Углови веза [°]	
N1'–Pd1–N1	175,21 (8)
N1'–Pd1–Cl1	89,00 (7)
N1–Pd1–Cl1	90,63 (7)
N1'–Pd1–Cl2	90,31 (7)
N1–Pd1–Cl2	90,01 (7)
Cl1–Pd1–Cl2	179,14 (3)
Торзиони углови [°]	
Pd1–N1–C1–S1	177,09 (13)
Pd1–N1'–C1'–N2'	−0,5 (4)
Pd1–N1'–C1'–S1'	179,84 (13)
Pd1–N1–C7–C6	0,8 (4)
Pd1–N1–C7–C2	−177,46 (19)
Pd1–N1'–C7'–C6'	1,1 (4)
Pd1–N1'–C7'–C2'	179,92 (18)

Кристална структура комплекса је стабилисана са три N–H···O водоничне везе које повезују метални комплекс са два молекула растварача, диметилформамида, док проширена мрежа водоничних веза која углавном укључује C–H···Cl и N–H···Cl интермолекулске водоничне везе (подаци су приказани у **табели 13**) стабилизују паковање кристала, што је приказано на **слици 26**, где су водоничне везе приказане као црне и црвене испрекидане линије.

Табела 13. Параметри водоничних веза у комплексу **C6**

D—H···*A*	*D*—H (Å)	H···*A* (Å)	*D*···*A* (Å)	*D*—H···*A* (°)
N2–H1···O1	0,84 (3)	2,06 (3)	2,871 (3)	163 (3)
N2'–H1'···O1	0,88 (3)	2,01 (3)	2,854 (3)	160 (2)
N2'–H2'···O2	0,81 (3)	1,96 (3)	2,753 (4)	168 (3)
C3–H3···Cl3^{i}	0,93	2,72	3,502 (3)	142,0
C5'–H5'···Cl1^{ii}	0,93	2,91	3,686 (3)	141,9
N2–H2···Cl2^{iii}	0,75 (3)	2,62 (3)	3,340 (3)	161 (3)



Слика 26. MERCURY [133] приказ начина паковања кристала у комплексу **C6**

4.6. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ ПАЛАДИЈУМ(II) КОМПЛЕКСА СА ДЕРИВАТИМА 2-АМИНОТИАЗОЛА КАО ЛИГАНДИМА

4.6.1. *In vitro* антимикробна активност

Резултати *in vitro* антимикробне активности испитиваних лиганада 2-амино-6-метилбензотиазола (**L5**), 2-амино-6-хлоробензотиазола (**L6**) и новосинтетисаних комплекса ди(2-амино-6-метилбензотиазол)дихлоридопаладата(II) (**C1**) и ди(2-амино-6-хлоробензотиазол)дихлоридопаладата(II) (**C6)** приказани су у **табели 14** [101].

Растварач који је употребљен за растварање испитиваних лиганада и комплекса (10% DMSO) не инхибира раст тестираних микроорганизама. Антимикробно дејство тестираних компоненти зависи искључиво од третиране врсте микроорганизама. У суштини, све тестиране супстанце су показале слабо, умерено или селективно дејство, али је уочена разлика између активности лиганада и одговарајућих паладијум(II) комплекса. Добијене вредности за MIC су у распону од 62,50 до вредности већих од 1000 μg/mL за лиганде и од 31,25 до 1000 μg/mL за комплексе.

На основу резултата, може се закључити да комплекси, у највећем броју случајева, показују бољу активност од одговарајућих лиганада. Комплекси показују бољу активност према Грам(+) бактеријама (*Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis* како према стандардним тако и према клиничким врстама) у односу на остале третиране микроорганизме, док је активност према Грам(-) бактеријама била ниска. Тестиране супстанце су испољиле умерену антифунгалну активност. У суштини су бољу активност показали лиганди него тестирани комплекси (измерене MIC/MMC вредности 62,50/1000 μg/mL). Врста *Rhodothorula mucilaginosa* је показала највећу осетљивост према тестираним компонентама која је чак у рангу осетљивости према позитивној контроли, флуконазолу.

Табела 14. Приказ резултата антимикробне активности лиганада (**L5** и **L6**) и паладијум(II) комплекса (**C5** и **C6**) и флуконазола (**K1**) и тетрациклина (**K2**)

Тестирана једињења	**L5**		**C5**		**L6**		**C6**		**K1**		**K2**	
Врсте микроорганизама	**MIC**[a]	**MMC**[b]	**MIC**	**MMC**	**MIC**	**MMC**	**MIC**	**MMC**	**MIC**	**MMC**	**MIC**	**MMC**
Bacillus subtilis	1000	1000	250	500	>1000	>1000	125	500	0,11	1,95	/	/
B. subtilis ATCC 6633	500	1000	31,25	62,50	500	500	31,25	62,50	1,95	15,63	/	/
Staphylococcus aureus	500	1000	500	1000	1000	>1000	1000	1000	0,98	15,63	/	/
S. aureus ATCC 25923	1000	1000	250	1000	>1000	>1000	500	500	0,22	3,75	/	/
Proteus mirabilis ATCC 12453	500	1000	250	500	1000	1000	500	1000	125	125	/	/
Escherichia coli	500	500	500	1000	1000	1000	500	500	15,63	31,25	/	/
E. coli ATCC 25922	62,50	500	125	500	125	>1000	125	250	15,63	31,25	/	/
Salmonella enterica	500	500	500	1000	1000	1000	1000	1000	15,63	31,25	/	/
Candida albicans ATCC 10231	250	250	500	500	500	1000	500	1000	/	/	31,25	1000
Rhodothorula mucilaginosa	62,50	125	125	250	62,50	125	250	500	/	/	62,5	1000
Saccharomyces boulardii	250	500	1000	1000	125	500	1000	1000	/	/	7,81	31,25

4.6.2. *In vitro* цитотоксичка активност

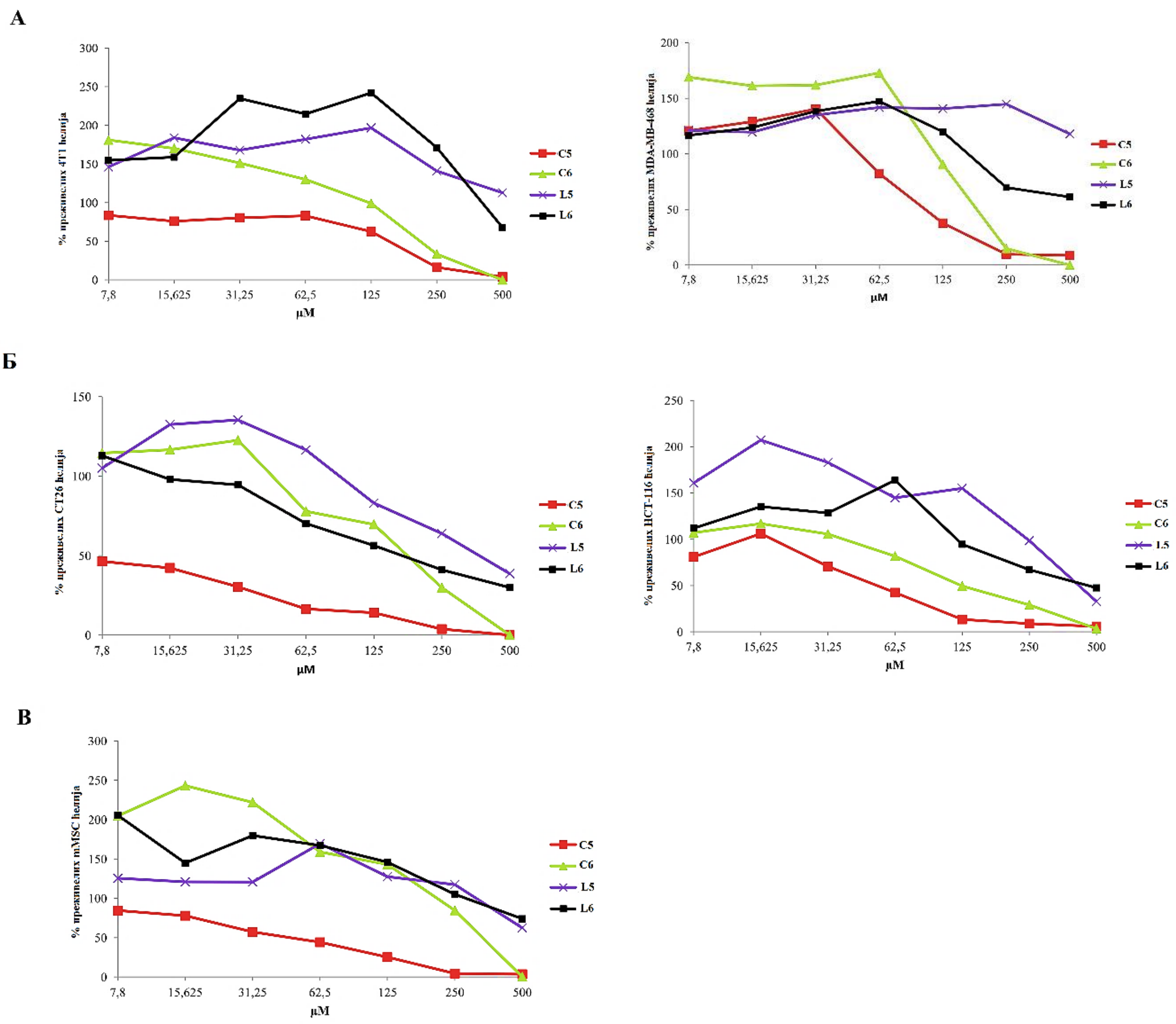
Потенцијална цитотоксичка активност два лиганда 2-амино-6-метилбензотиазола (**L5**) и 2-амино-6-хлоробензотиазола (**L6**) и одговарајућих новосинтетисаних паладијум(II) комплекса (**C5** и **C6**) испитивана је на мишјим ћелијама карцинома дојке 4T1, ћелијама мишјег колоректалног карцинома CT26, ћелијској линији мезенхималних матичних ћелија миша (mMSC) и хуманим ћелијама карцинома дојке MDA-MB-468 и хуманим ћелијама колоректалног карцинома HCT116 [101].

Анализиран је ефекат новосинтетисаних паладијум(II) комплекса и лиганада на вијабилност ћелија. Преживљавање туморских ћелија 4T1, CT26, MDA-MB-468 и HCT116 значајно је смањено након излагања испитиваним комплексима (**C5** и **C6**) и одговарајућим лигандима, а остварени ефекат је дозно зависан. Добијене IC_{50} вредности приказане су у **табели 15**, док је график дозно зависне цитотоксичке активности приказан на **слици 27**. Комплекс **C6** је испољио слабији цитотоксички ефекат на тестираним ћелијским линијама. Уочава се да је цитотоксичка активност комплекса **C5** битно већа на ћелијама мишјег карцинома колона CT26. IC_{50} вредности за комплекс **C6** су од 132,64 μM и више, док су IC_{50} вредности за комплекс **C5** знатно ниже, и то 12,34 μM за ћелије CT26 и 43,34 μM за ћелије HCT116. IC_{50} вредности су израчунате на основу резултата MTT теста, као средња вредност три независна мерења у трипликату.

Табела 15. IC_{50} вредности паладијум(II) комплекса и одговарајућих лиганада након инкубационог периода од 24 сата

Једињења	**IC_{50} ± SD (μM) (24 h)**				
	4T1	**MDA-MB-468**	**CT26**	**HCT116**	**mMSC**
C5	140,21 ± 3,41	128,015 ± 2,11	12,34 ± 0,74	43,34 ± 3,13	47,95 ± 8,06
C6	286,58 ± 4,26	254,82 ± 7,06	154,26 ± 2,49	132,64 ± 7,43	344,17 ± 7,99
L5	>500	>500	389,45 ± 5,14	432,65 ± 7,51	>500
L6	>500	>500	288,835 ± 12,35	>500	>500

Поред тога, слободни лиганди (**L5** и **L6**) су показали занемарљив ефекат на преживљавање ћелија, осим у највећим испитиваним концентрацијама. Слични резултати су добијени на свим коришћеним ћелијским линијама. Такође је важно истаћи да се комплекс **C6** (као и слободни лиганди **L5** и **L6**) показао потенцијално најмање токсичним за контролну, нетуморску ћелијску линију mMSC, док је за комплекс **C5** уочена већа редукција вијабилности mMSC ћелија. Ипак, сви комплекси и одговарајући лиганди су редуковали преживљавање mMSC ћелија на дозно зависан начин, а IC_{50} вредности су претежно више у поређењу са IC_{50} вредностима за туморске ћелије.



Слика 27. Дозно зависна цитотоксичка активност паладијум(II) комплекса (**C5** и **C6**)

Израчунат је и индекс селективности (SI) за комплексе **C5** и **C6**, а резултати су приказани у **табели 16.** Уочава се да комплекс **C5** има највећи степен цитотоксичке селективности (SI > 3) на CT26 ћелијама. Ови подаци указују да увођење централног металног јона повећава цитотоксичку активност испитиваних деривата 2-аминотиазола (**L5** и **L6**) са потенцијално већом стопом селективности.

Табела 16. Индекс селективности (SI) паладијум(II) комплекса **C5** и **C6**

Једињење	**Индекс селективности (IC_{50} mMSC/IC_{50})**	
	4T1	**CT26**
C5	0,34	3,89
C6	1,20	2,23

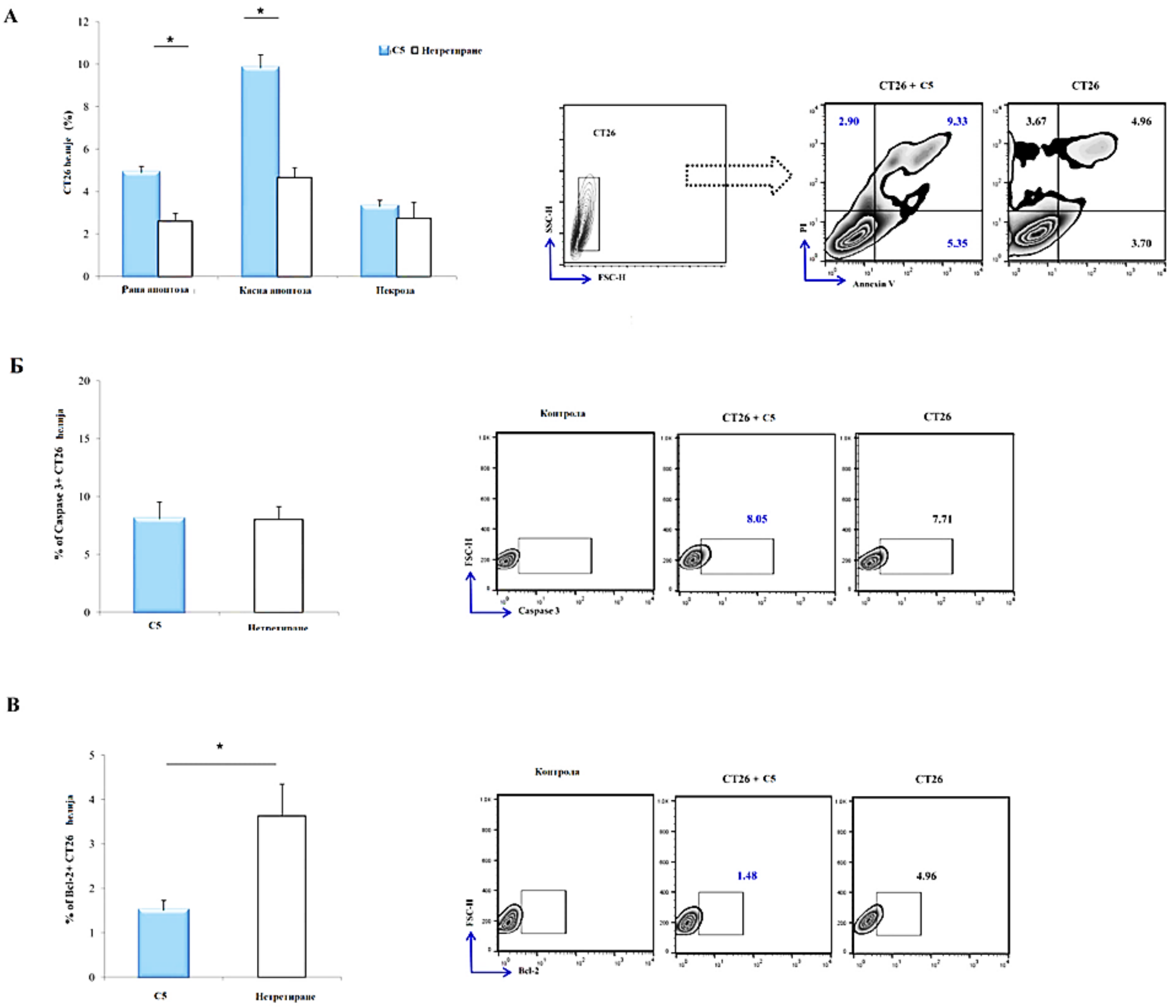
Наведени резултати указују да постоји потенцијално мања вероватноћа за настанак бројних нежељених ефеката услед примене комплекса паладијума(II) са 2-аминотиазолима као лигандима (**L5** и **L6**). Нежељена дејства условљена неселективним деловањем лекова на бази метала главна су ограничења у клиничкој употреби. На основу добијених резултата, испитани су потенцијални механизми антитуморског ефекта комплекса **C5** услед већег цитотоксичког потенцијала али и цитотоксичке селективности на ћелијској линији CT26.

4.6.3. Апоптоза

Даљи циљ истраживања био је да се расветле потенцијални механизми ћелијске смрти након третмана испитиваним комплексом.

Ћелије колоректалног карцинома миша (CT26) су претходно третиране комплексом **C5** (5 μM током 24 сата), а затим бојене анексином V (AnnV) и пропидијум-јодидом (PI). Проценат CT26 ћелија у раној фази апоптозе ($AnnV^{+}PI^{-}$CT26) након третмана комплексом **C5** био је значајно већи у поређењу са нетретираним ћелијама. Штавише проценат CT26 ћелија у касној фази апоптозе ($AnnV^{+}PI^{+}$CT26) претходно третираних **C5** комплексом је значајно већи у поређењу са нетретираним CT26 ћелијама. Није уочена статистички значајна разлика у проценту некротичних ћелија третираних **C5** комплексом у поређењу са контролном групом. Добијени резултати указују на доминантан развој апоптотичких догађаја у циљаним ћелијама након третмана **C5** комплексом. Резултати су приказани на **слици 28А**.

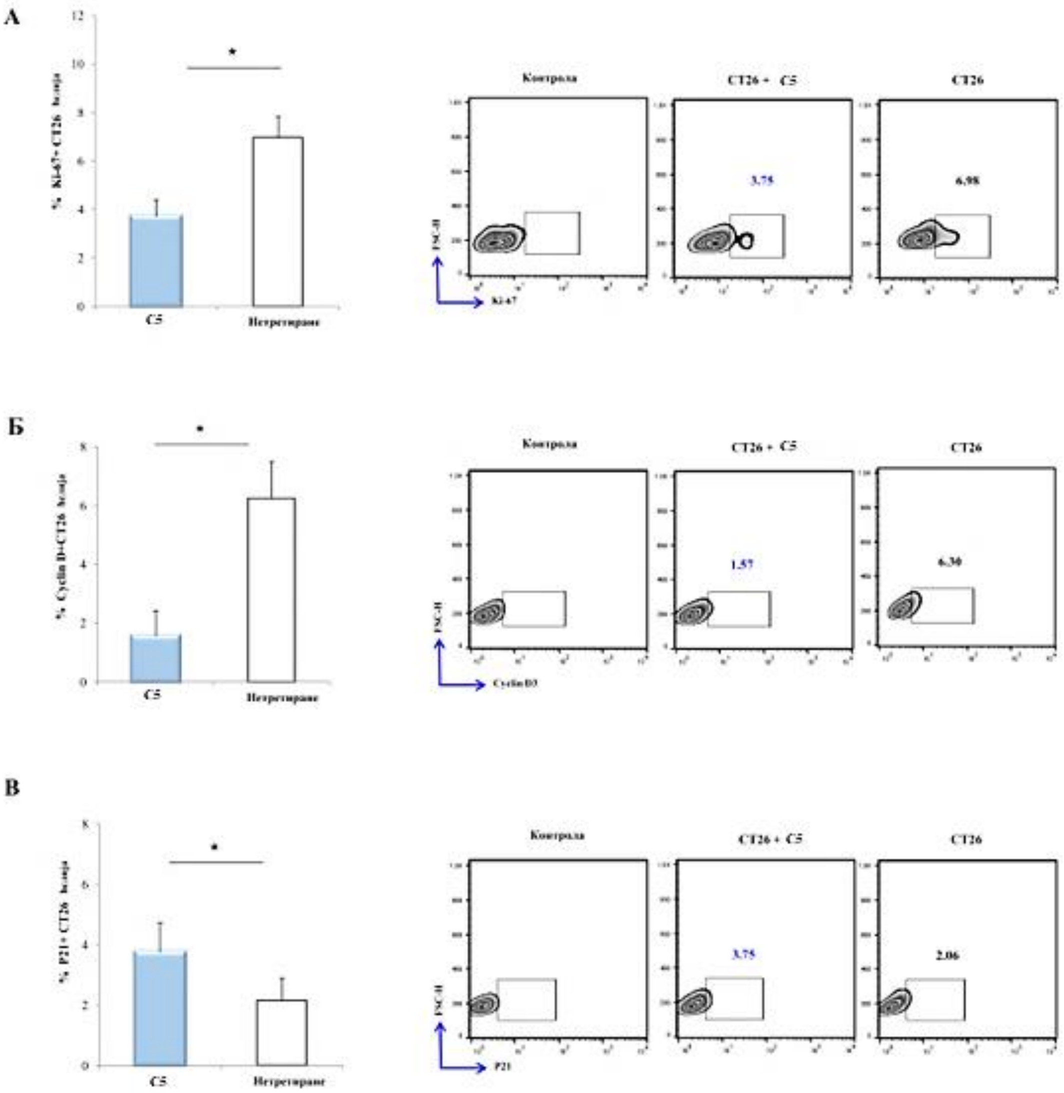
Како су претходни резултати јасно потврдили доминацију апоптотичног пута ћелијске смрти, следећи корак је био испитивање утицаја кључних молекула који регулишу апоптозу. Каспаза-3 је врста каспазе важна за разградњу ћелијских структура и протеина цитоскелета [134]. Међутим, анализа проточном цитометријом није указала на значајну разлику у проценту каспаза-3^{+}CT26 ћелија између ћелија које су третиране комплексом **C5** (5μM за 24h) и ћелија које нису третиране, што је приказано на **слици 28Б**. Bcl-2 је један је од кључних чувара интеграције спољне митохондријалне мембране и важан за одлагање апоптотичног догађаја [135]. Претходни третман **C5** комплексом је значајно смањио проценат Bcl-2^{+}CT26 ћелија у поређењу са контролном групом, што се може видети на **слици 28В**. Резултати не указују на разлику у експресији про-апоптотичке каспазе-3 између **C5**-третираних и нетретираних ћелија што имплицира да каспаза-3 не игра кључну улогу у појачаној апоптози после третмана[101]. Претходне студије су такође потврдиле да се у многим случајевима апоптоза може извршити деловањем других каспаза убица, без учешћа каспазе-3 [136]. С друге стране мања експресија анти-апоптотичког Bcl-2 молекула имплицира слабију заштиту митохондријалне мембране и веће шансе за развој апоптотичног процеса.



Слика 28. Третман комплексом **C5** доводи до смрти ћелија апоптозом

Све анализе су рађене методом проточне цитометрије, након 24-часовне инкубације **C5** комплекса са туморским ћелијама у концентарцији од 5 µM, а подаци су приказани као средња вредност ± SD ($p < 0,05$).

У наставку истраживања анализирана је експресија протеина Ki-67 као маркера пролиферације. Овај протеин се везује за нуклеарну DNA и игра важну улогу у пролиферацији ћелија и присутан је у цикличним ћелијама сисара са претежном експресијом током G2 фазе и митозе [137]. Проценат Ki-67^{+}CT26 ћелија третираних комплексом **C5** био је значајно нижи у поређењу са нетретираним ћелијама, што је и приказано на **слици 29А**. Смањена експресија молекула Ki-67 указује на то да **C5** комплекс инхибира пролиферацију туморских ћелија. У циљу испитивања узрока смањеног нивоа пролиферације туморских ћелија, урађене су анализе експресије Cyclin D молекула у ћелијама третираним комплексом **C5**. Cyclin D, као регулатор прогресије ћелијског циклуса, ступа у интеракцију са Cyclin-зависним киназама и обезбеђује прелазак из G1 у S фазу ћелијског циклуса [138]. Анализе проточне цитометрије су показале да је предтретман са комплексом **C5** значајно смањио проценат Cyclin D^{+}CT26 ћелија у поређењу са контролним нетретираним ћелијама што се може видети на **слици 29Б**. P21, један од кључних показатеља заустављања ћелијског циклуса, инхибира комплексе Cyclin-а и Cyclin зависних киназа, заустављајући транзицију G1/S ћелијског циклуса [139]. Третман **C5** комплексом значајно је повећао проценат P21^{+}CT26 ћелија у поређењу са контролном групом (**слика 29В**). Повећана експресија Cyclin D заједно са смањеном експресијом молекула P-21 указује на улогу комплекса **C5** у заустављању ћелијског циклуса [101].

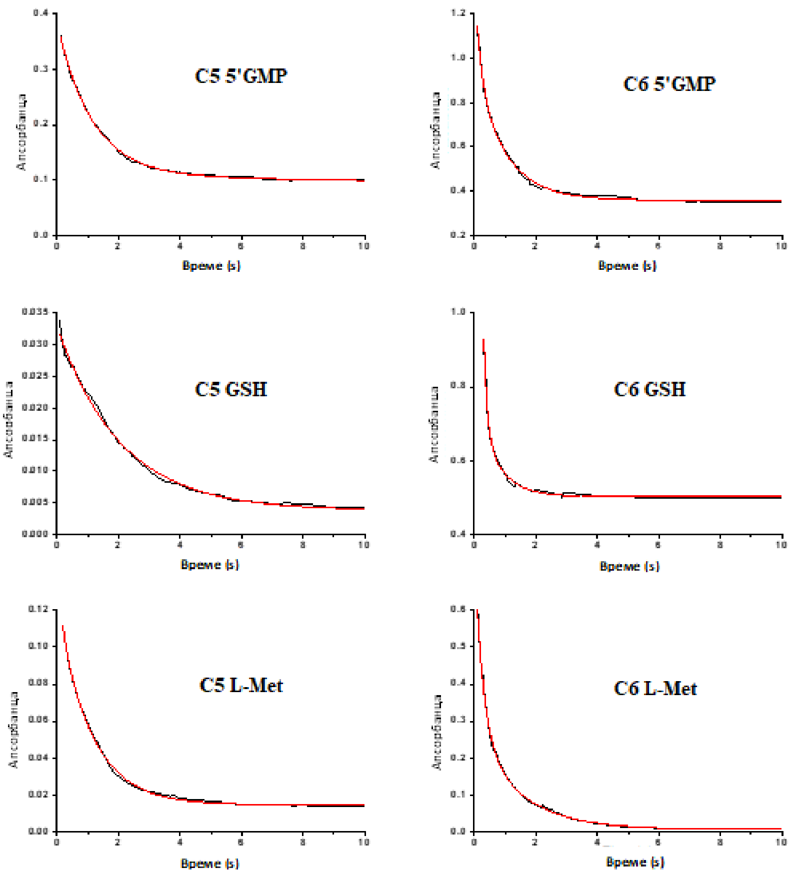


Слика 29. Комплекс **C5** смањује експресију Ki-67 у CT26 ћелијама (А)
Комплекс **C5** смањује проценат Cyclin D^{+}CT26 ћелија (Б)
Комплекс **C5** повећава проценат P21^{+}CT26 ћелија (В).

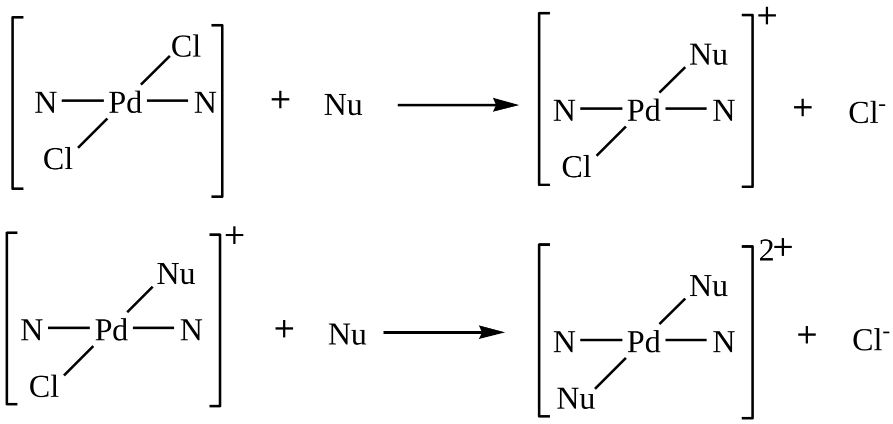
Све анализе су рађене методом проточне цитометрије, након 24-часовне инкубације **C5** комплекса са туморским ћелијама у концентарцији од 5 µM. Подаци су приказани као средње вредности ± SD ($p < 0,05$).

4.7. КИНЕТИЧКА МЕРЕЊА

Нуклеофили, као што је конституент DNA (5’GMP), трипептид глутатион (GSH) и аминокиселина (L-Met) коришћени су за проучавање реакција супституције паладијум(II) комплекса (**C5** и **C6**). Реакције су изучаване помоћу stopped-flow методе, мешањем једнаких запремина раствора комплекса и раствора нуклеофила и праћење је вршено на одређеној таласној дужини [140,141]. Са циљем да се обезбеде услови реакције *pseudo*-првог реда, концентрација нуклеофила су убек биле бар 10 пута веће од концентрације комплекса. Добијени кинетички подаци за проучаване реакције комплекса **C5** и **C6** са одговарајућим нуклеофилима, који су приказани на **слици 30** [101] показали су савршено уклапање са двоструком експонецијалном функцијом што је карактеристично за двостепене реакције. Супституционе реакције комплекса приказане су на **шеми 11**. Константе брзина реакција *pseudo*-првог реда за сваки корак реакције су израчунате као средња вредност независних 5 или 6 мерења, а вредности су приказане у **табелама 17-19**.



Слика 30. Кинетички подаци за реакције супституције паладијум(II) комплекса и различитих супституената



N = 2-амино-6-метил-бензотиазол (**C5**) или 2-амино-6-хлоробензотиазол (**C6**)
Nu = 5'GMP, GSH или L-Met

Шема 11. Супституционе реакције комплекса **C5** и **C6**

Табела 17. Добијене константе брзина реакција *pseudo*-првог реда (за први и други корак) за супституционе реакције комплексе **C5**/**C6** и **GSH** у 25 mM Hepes пуферу и 50 mM NaCl (pH = 7,2)

λ/nm	**T/K**	**$10^{-4}C_L$/M**	**k_{obsd1}/s^{-1}**	**k_{obsd2}/s^{-1}**	**k_{obsd1}/s^{-1}**	**k_{obsd2}/s^{-1}**
			C5		**C6**	
264	288	0,5	3,000(5)	0,230(5)[a]	3,987(6)	0,400(6)
		1	5,087(6)	0,425(6)	8,649(5)	0,760(5)
		1,5	7,867(5)	0,620(5)	12,776(5)	1,092(5)
		2	10,610(6)	0,820(6)	16,597(6)	1,468(6)
		2,5	13,620(6)	1,010(6)	20,457(6)	1,874(6)
	298	0,5	3,500(6)	0,300(6)	5,260(6)	0,460(6)
		1	6,049(6)	0,487(6)	10,216(5)	0,930(5)
		1,5	8,973(6)	0,687(6)	15,579(5)	1,367(5)
		2	12,100(5)	0,913(5)	20,340(5)	1,738(5)
		2,5	15,340(6)	1,147(6)	24,879(6)	2,197(6)
	310	0,5	4,800(5)	0,400(5)	7,027(5)	0,570(5)
		1	7,530(5)	0,647(5)	11,849(5)	1,070(5)
		1,5	10,340(5)	0,817(5)	17,486(6)	1,583(6)
		2	14,600(6)	1,126(6)	23,897(6)	2,087(6)
		2,5	19,260(5)	1,497(5)	30,067(6)	2,574(6)

[a]Број понављања приказан у заградама

Табела 18. Добијене константе брзина реакција *pseudo*-првог реда (за први и други корак) за супституционе реакције комплекса **C5**/**C6** и **L-Met** у 25 mM Hepes пуферу и 50 mM NaCl (pH = 7,2)

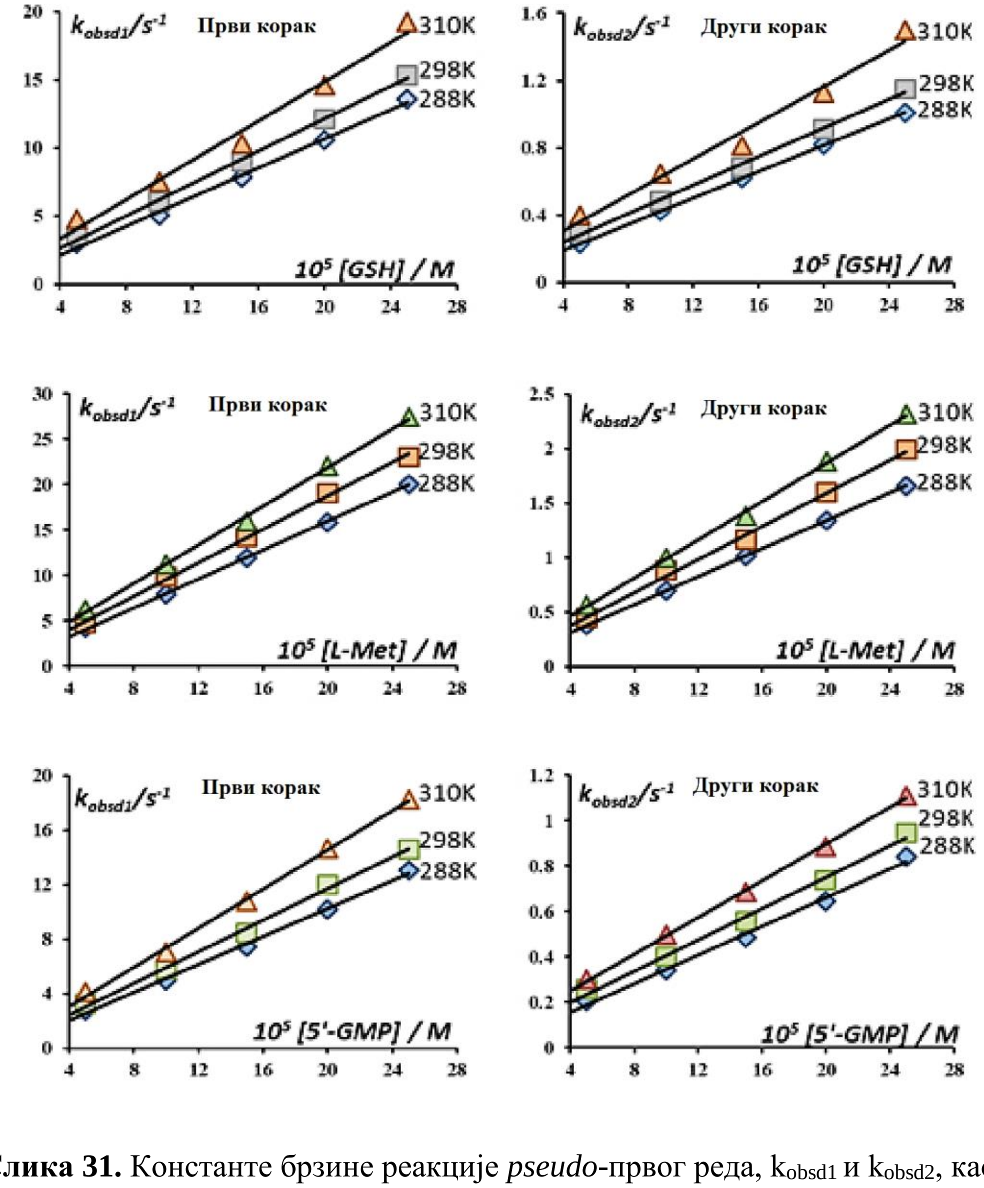
λ/nm	T/K	$10^{-4}C_L/M$	k_{obsd1}/s^{-1}	k_{obsd2}/s^{-1}	k_{obsd1}/s^{-1}	k_{obsd2}/s^{-1}
			C5		**C6**	
262	288	0,5	4,198(5)	0,386(5)	7,300(5)	0,540(5)
		1	7,926(5)	0,700(5)	12,470(6)	0,980(6)
		1,5	11,949(5)	1,020(5)	18,490(5)	1,386(5)
		2	15,943(6)	1,344(6)	25,555(6)	1,885(6)
		2,5	20,260(5)	1,660(5)	32,680(6)	2,290(6)
	298	0,5	4,670(6)	0,450(6)	9,130(6)	0,750(6)
		1	9,840(6)	0,887(6)	14,960(6)	1,160(6)
		1,5	14,260(5)	1,167(5)	21,816(6)	1,678(6)
		2	19,040(5)	1,597(5)	31,167(5)	2,117(5)
		2,5	22,970(6)	1,987(6)	38,479(5)	2,649(5)
	310	0,5	6,240(5)	0,570(5)	10,370(5)	0,879(5)
		1	11,241(6)	0,998(6)	17,879(5)	1,449(5)
		1,5	15,897(6)	1,387(6)	27,170(5)	1,974(5)
		2	22,060(6)	1,883(6)	36,260(5)	2,487(5)
		2,5	27,360(5)	2,316(5)	43,450(6)	3,067(6)

Табела 19. Добијене константе брзина реакција *pseudo*-првог реда (за први и други корак) за супституционе реакције комплекса **C5**/**C6** и **5'-GMP** у 25 mM Hepes пуферу и 50 mM NaCl (pH = 7,2)

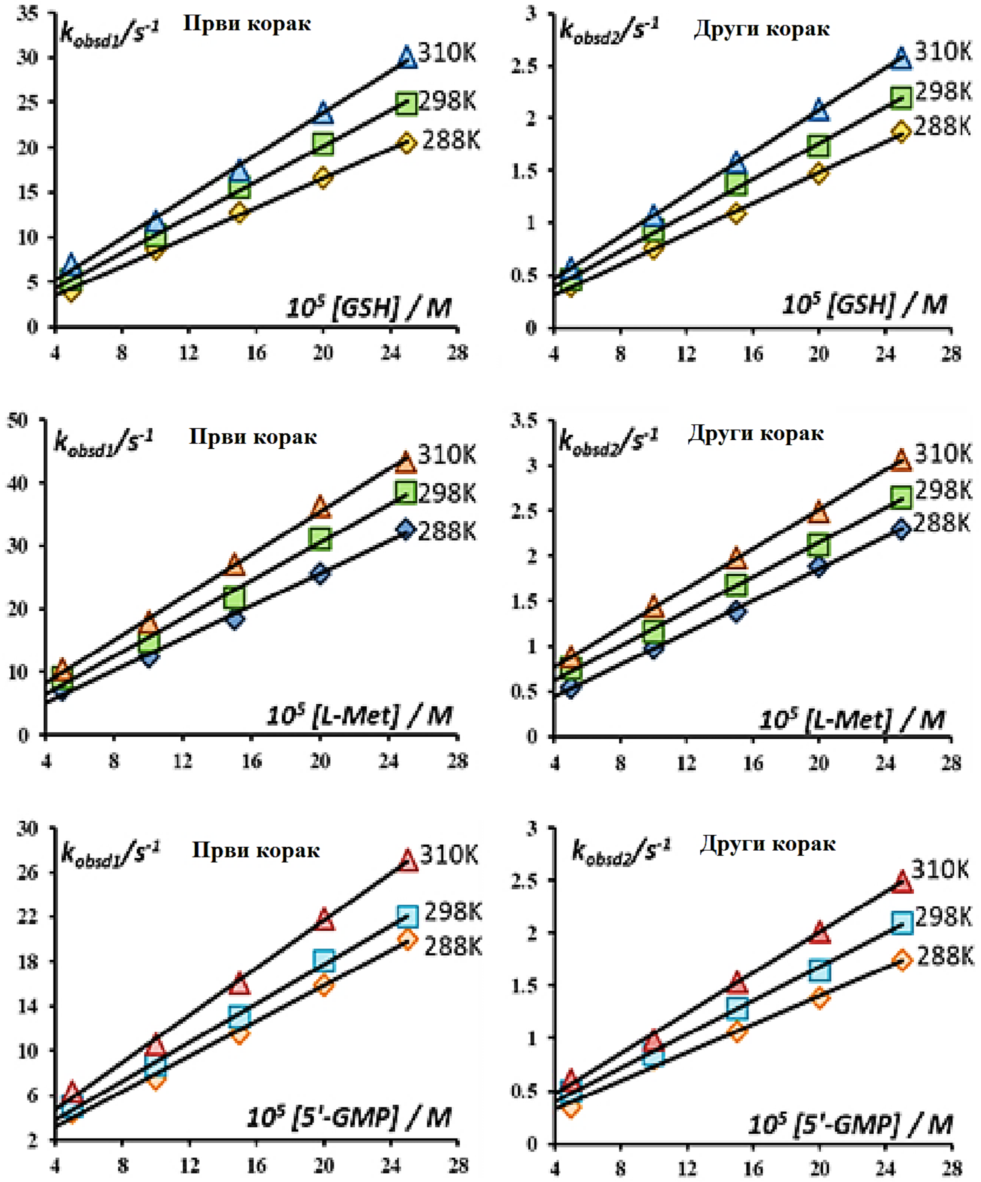
λ/nm	T/K	$10^{-4}C_L/M$	k_{obsd1}/s^{-1}	k_{obsd2}/s^{-1}	k_{obsd1}/s^{-1}	k_{obsd2}/s^{-1}
			C5		**C6**	
271	288	0,5	2,800(6)	0,204(6)	4,500(5)	0,350(5)
		1	4,980(6)	0,340(6)	7,500(6)	0,800(6)
		1,5	7,470(5)	0,487(5)	11,500(5)	1,060(5)
		2	10,142(5)	0,647(5)	15,870(5)	1,380(5)
		2,5	13,020(6)	0,840(6)	20,040(6)	1,740(6)
	298	0,5	3,248(6)	0,256(6)	5,010(6)	0,500(6)
		1	5,740(5)	0,401(5)	8,673(6)	0,846(6)
		1,5	8,470(5)	0,557(5)	13,02(6)	1,289(6)
		2	11,986(6)	0,738(6)	18,060(6)	1,647(6)
		2,5	14,587(5)	0,947(5)	21,974(5)	2,097(5)
	310	0,5	4,076(5)	0,300(5)	6,320(5)	0,610(5)
		1	7,047(6)	0,498(6)	10,587(6)	0,987(6)
		1,5	10,768(5)	0,684(5)	16,064(5)	1,587(5)
		2	14,616(6)	0,887(6)	21,837(5)	2,017(5)
		2,5	18,237(5)	1,110(6)	27,087(5)	2,499(5)

Први реакциони корак обухвата реверзибилну супституцију једног хлоридног јона, док други реакциони корак укључује реверзибилну супституцију другог хлоридног јона из координационе сфере полазног комплекса, што је приказано на **шеми 11**. Оба корака су праћена stopped-flow методом и завршени су у року од 10 секунди. Линеарна зависност константи брзине *pseudo*-првог реда за сваки корак реакције, $k_{obsd(i)}$ (i је корак 1 или 2), у односу на концентрације нуклеофила, коришћена је за израчунавање константи брзине другог реда (**слике 31** и **32**). У ту сврху коришћене су следеће једначине:

$$k_{obsd1} = k_1 [Nu] + k_{-1}$$
$$k_{obsd2} = k_2 [Nu] + k_{-2}$$



Слика 31. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd1} и k_{obsd2}, као функција концентрације нуклофила и температуре за супституционе реакције комплекса **C5** и одговарајућих нуклеофила у Hepes пуферу (pH = 7,2; 25 mM Hepes; 50 mM NaCl)



Слика 32. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obsd1} и k_{obsd2}, као функција концентрације нуклофила и температуре за супституционе реакције комплекса **C6** и одговарајућих нуклеофила у Hepes пуферу (pH = 7,2; 25 mM Hepes; 50 mM NaCl)

Израчунате вредности за константе брзине су сумиране у **табели 20**.

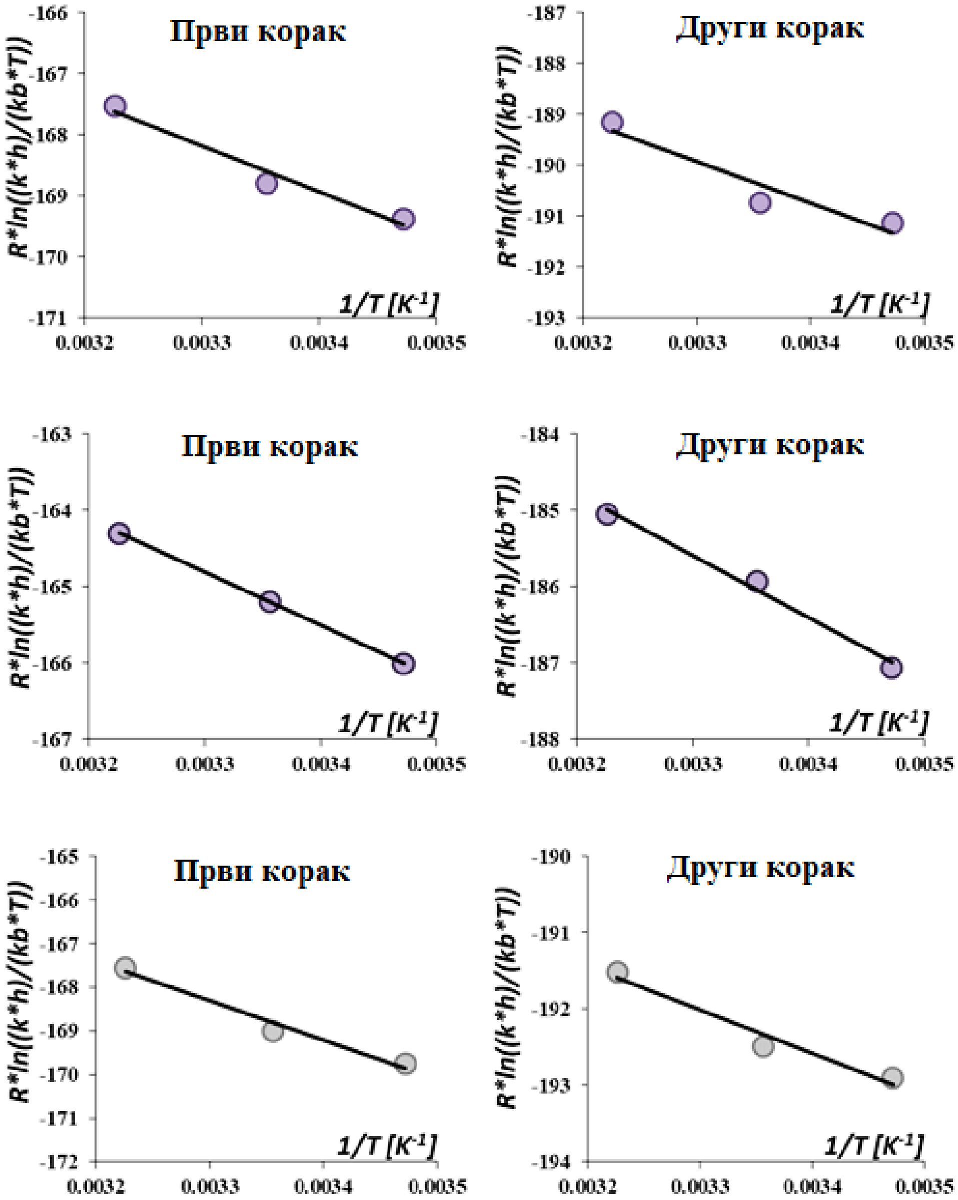
Табела 20. Константе и активациони параметри за први и други корак супституционих реакција комплекса **C5** и **C6** са одговарајућим нуклеофилима на три различите температуре у 25 mM Hepes пуферу и 50 mM NaCl (pH = 7,2)

	Nu	T (K)	$k_1 \times 10^4$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$k_{-1} \times 10^{-1}$ (s^{-1})	$\Delta H_1^{\neq}$ ($kJmol^{-1}$)	$\Delta S_1^{\neq}$ ($JK^{-1}mol^{-1}$)	$k_2 \times 10^3$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$k_{-2} \times 10^{-1}$ (s^{-1})	$\Delta H_2^{\neq}$ ($kJmol^{-1}$)	$\Delta S_2^{\neq}$ ($JK^{-1}mol^{-1}$)
C5	**GSH**	288	5,3 ± 0,1	0,35 ± 0,01			4,10 ± 0,03	0,08 ± 0,03		
		298	6,1 ± 0,2	2,73 ± 0,02	72 ± 1	-139 ± 3	4,63 ± 0,02	0,71 ± 0,02	76 ± 2	-159 ± 5
		310	7,4 ± 0,6	5,09 ± 0,02			5,78 ± 0,07	0,96 ± 0,03		
	L-Met	288	7,9 ± 0,1	0,64 ± 0,01			6,74 ± 0,03	0,13 ± 0,03		
		298	9,4 ± 0,5	4,16 ± 0,05	69,2 ± 0,5	-137 ± 2	7,93 ± 0,02	0,82 ± 0,02	73 ± 2	-156 ± 9
		310	10,9 ± 0,4	6,42 ± 0,04			9,40 ± 0,03	1,18 ± 0,02		
	5'-GMP	288	5,1 ± 0,1	0,30 ± 0,01			2,46 ± 0,02	0,20 ± 0,02		
		298	5,9 ± 0,2	1,29 ± 0,02	81 ± 2	-136 ± 7	2,90 ± 0,02	0,64 ± 0,02	75 ± 1	-163 ± 4
		310	7,3 ± 0,2	1,82 ± 0,02			3,47 ± 0,02	0,93 ± 0,02		
C6	**GSH**	288	8,3 ± 0,2	2,27 ± 0,02			7,32 ± 0,02	0,22 ± 0,02		
		298	10,1 ± 0,3	4,46 ± 0,03	81 ± 1	-132 ± 4	8,86 ± 0,03	0,54 ± 0,03	78 ± 1	-154 ± 4
		310	11,9 ± 0,4	6,27 ± 0,04			10,40 ± 0,04	0,69 ± 0,04		
	L-Met	288	12,4 ± 0,3	1,46 ± 0,03			9,19 ± 0,04	0,95 ± 0,04		
		298	15,3 ± 0,2	6,39 ± 0,02	81 ± 2	-129 ± 5	10,60 ± 0,01	2,44 ± 0,01	66 ± 2	-157 ± 7
		310	17,8 ± 0,7	16,64 ± 0,02			12,50 ± 0,06	3,47 ± 0,03		
	5'-GMP	288	7,84 ± 0,02	0,47 ± 0,02			7,04 ± 0,01	0,38 ± 0,01		
		298	9,13 ± 0,01	3,53 ± 0,02	69 ± 1	-137 ± 4	8,38 ± 0,02	0,77 ± 0,02	80 ± 2	-153 ± 9
		310	10,8 ± 0,2	5,44 ± 0,01			10,1 ± 0,2	0,98 ± 0,02		

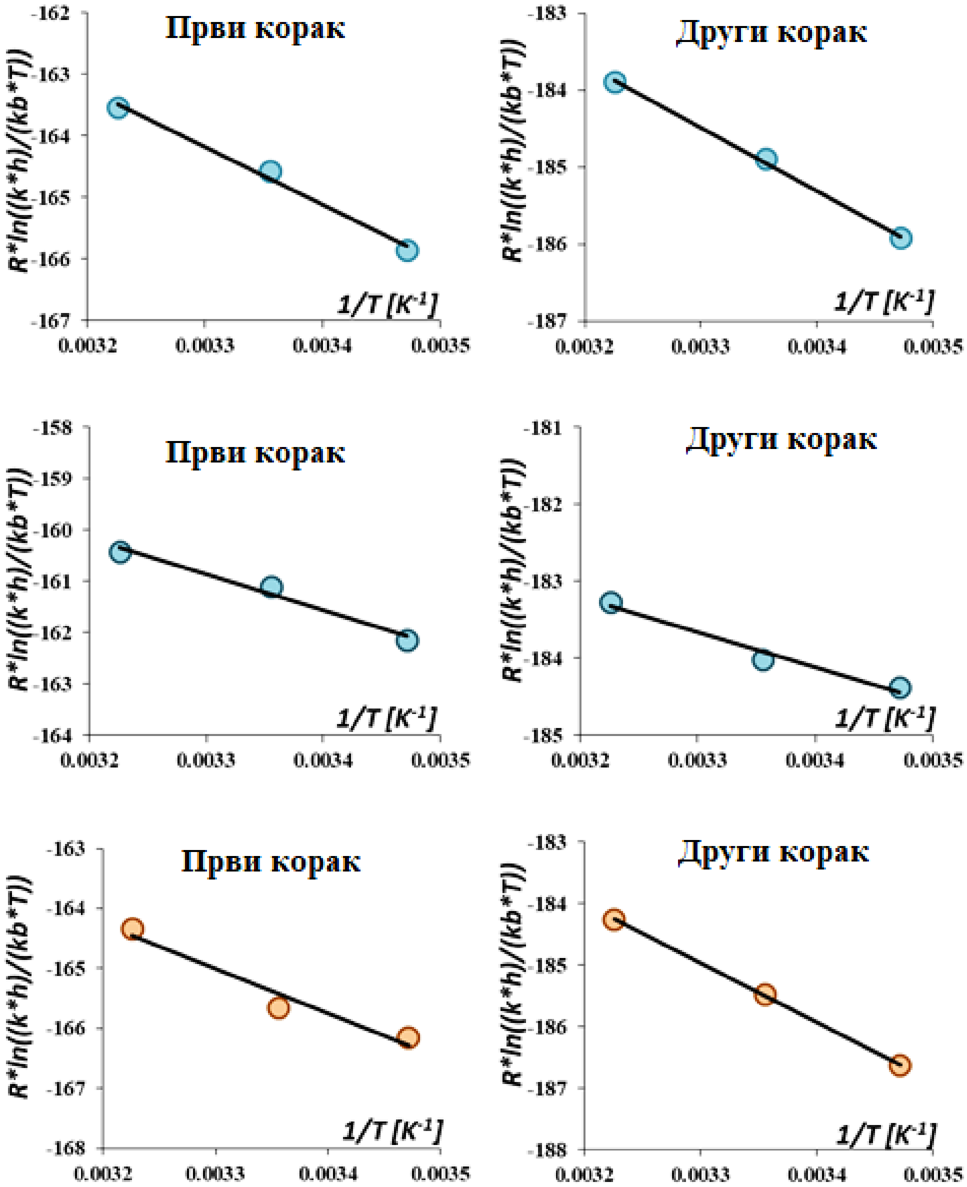
На основу приказаних резултата може се потврдити већа реактивност комплекса **C6** у односу на **C5** према свим одабраним нуклеофилима, што се може објаснити природом инертних лиганада, првенствено повезаних са групама на фенил прстену. Боља реактивност је примећена код комплекса код кога је супституент хлорид у поређењу са метил групом, а то се може објаснити већом запремином метил групе која отежава приступ нуклеофила и успорава реакцију. Такође, други корак реакције у свим проучаваним системима је 10 до 20 пута спорији од првог, јер је приступ другом молекулу нуклеофила сада тежи.

Може се закључити да и природа улазног нуклеофила има утицај на константу брзине, па се може видети да реактивност опада по следећем реду: L-Met > GSH > 5'-GMP, због различитих атома донора на нуклеофилима. Већ је познато да комплекси паладијума(II) реагују брже са донором сумпора него са донорима азота. Поред тога, јон паладијума(II) представља меку киселину и показује већи афинитет за меке базе (као што су атоми сумпора) [142]. Такође, већа реактивност тиоетра (L-Met) у поређењу са тиолом (GSH-трипептид) може се објаснити повећањем нуклеофилности атома сумпора услед позитивног индуктивног ефекта метил групе.

Сва мерења су вршена на три температуре, а асоцијативни начин супституције потврђен је негативним вредностима ентропије активације, $\Delta S^{\neq}$, и малим вредностима енталпије активације, $\Delta H^{\neq}$, што је приказано и на **сликама 33** и **34**.



Слика 33. График Ејрингове једначине за реакцију између комплекса **C5** и GSH (врх), L-Met (средина) и 5'-GMP (дно) у Hepes пуферу (pH = 7,2; 25 mM Hepes, 50 mM NaCl)

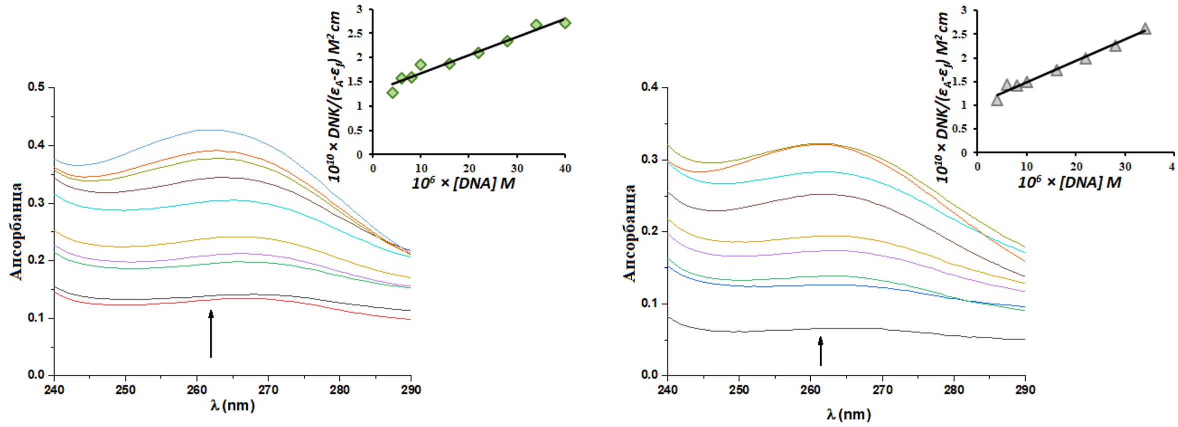


Слика 34. График Ејрингове једначине за реакцију између комплекса **C6** и GSH (врх), L-Met (средина) и 5'-GMP (дно) у Hepes пуферу (pH = 7,2; 25 mM Hepes, 50 mM NaCl)

4.8. ИНТЕРАКЦИЈЕ КОМПЛЕКСА C5 и C6 СА МОЛЕКУЛОМ CT-DNA

4.8.1. Апсорпционо спектроскопска метода

Интеракција комплекса **C5** и **C6** са DNA ланцем је испитивана коришћењем UV-Vis спектроскопије. Снимљени су спектри раствора који садрже фиксне концентрације комплекса (20 μM) и различите концентрације DNA (2 - 40 μM), а резултати су приказани на **слици 35** [101].



Слика 35. Апсорпциони спектар комплекса **C5** (лево) и **C6** (десно) у PBS пуферу након додатка CT-DNA. Стрелица показује промене апсорбанце са повећањем концентрације CT-DNA. Додатак: График зависности [DNA]/(ε_A-ε_f) од [DNA]

Хипохромизам је последица везивања комплекса за DNA путем интракалације, док је хиперхромизам последица електростатичких веза или нарушавањем структуре DNA. Са повећањем концентрације DNA долази до хипохромизма (268 nm → 263 nm за комплекс **C5**, 266 nm → 262 nm за комплекс **C6**) што указује на везивање комплекса за DNA, али тачан начин интеракције не може бити утврђен само помоћу UV-Vis спектара.

Константе везивања (K_b) су израчунате са циљем да се одреди јачина везе између комплекса и CT-DNA. У ту сврху је коришћена једначина:

$$\frac{[\mathrm{DNA}]}{(\varepsilon_A - \varepsilon_f)} = \frac{[\mathrm{DNA}]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)}$$

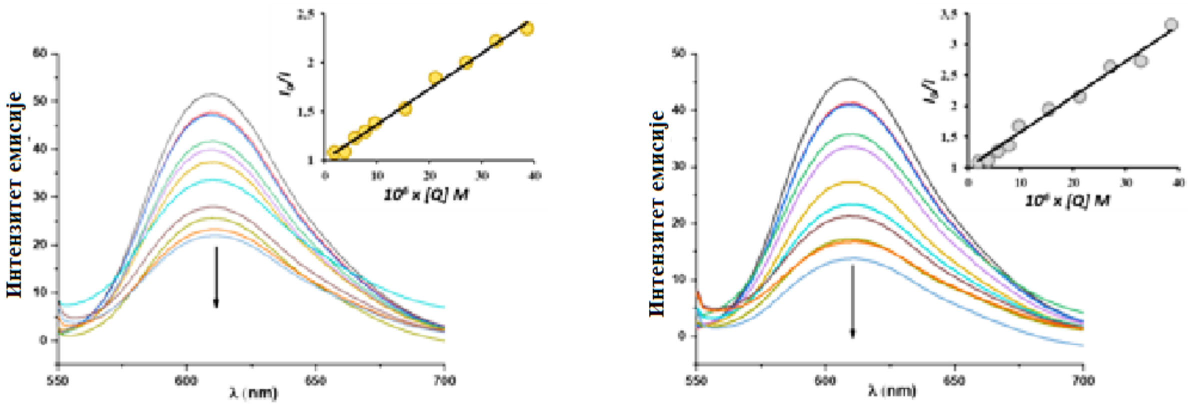
Резултати су приказани у **табели 21**. Висока вредност константе везивања потврђује да је дошло до везивања оба комплекса за CT-DNA, али комплекс **C6** интерагује јаче.

Табела 21. Вредности константе везивања (K_b) и Стерн-Волмерове константе (K_{sv})

Комплекс	K_b (M^{-1})	$K_{sv\,(EB)}$ (M^{-1})
C5	(2,9 ± 0,2) × 10^4	(3,7 ± 0,2) × 10^4
C6	(4,3 ± 0,2) × 10^4	(5,8 ± 0,2) × 10^4

4.8.2. Метода флуоресцентне спектроскопије

Комплекси паладијума(II) не показују флуоресцентну емисију у воденом раствору или у присуству DNA, док EB показује значајан интензитет флуоресцентне емисије у спектру када се интеркалира у DNA. Таласна дужина ексцитације за EB је 527 nm, а интензитет емисије је праћен на 610 nm за оба комплекса. Резултати јасно сугеришу да комплекси могу заменити EB из EB-DNA и везати се за DNA узрокујући значајно смањење интензитета флуоресцентне емисије [143,144]. Спектри флуоресценције EB-DNA са повећање концентрације комплекса **C5** или **C6** приказани су на **слици 36**.



Слика 36. Емисиони спектар комплекса EB-DNA у присуству компелкса **C5** (лево) и комплекса **C6** (десно). [EB] = 19,3 μM; [DNA] = 19,3 μM; [комплекс] = (0 – 38,6) μM; λ_{ex} = 527 nm. Стрелице показују промену интензитета после додатка све веће концентрације комплекса. Додатак: График зависности I_0/I од [Q]

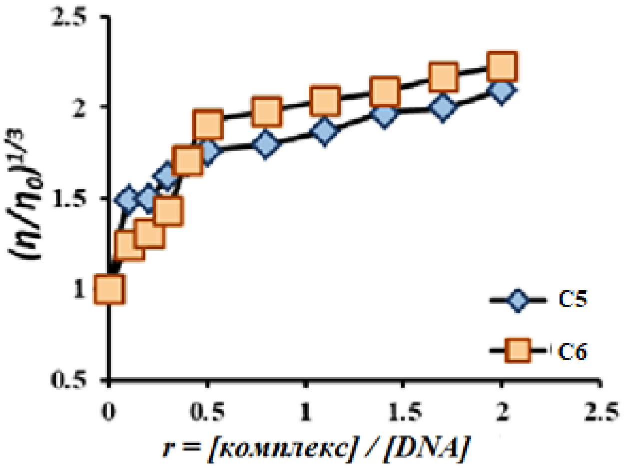
Стерн-Волмерове константе гашења (K_{sv}) су израчунате коришћењем следеће једначине:

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

Према K_{sv} вредностима које су приказане у **табели 21**, може се закључити да ови комплекси могу заменити EB из EB-DNA комплекса и везати се за DNA вероватно интеркалативним начином. Штавише, резултати добијени UV-Vis спектроскопијом и мерењима флуоресценције показали су велику способност комплекса да се вежу за DNA, али се још увек не може дефинисати одређени начин везивања. Да би се даље испитао могући начин везивања, урађена су мерења вискозности.

4.8.3. Мерење вискозности

Да би се добило више података о начину везивања комплекса **C5** и **C6** за CT-DNA вршено је мерење вискозности у одсуству и у присуству комплекса. Повећање вискозности раствора DNA одговара интеркалацији, док мале промене у вискозности DNA одговарају жлебном начину везивања за DNA [145,146]. У нашим експериментима додавање све веће концентрације комплекса паладијума(II) истој концентрацији раствора CT-DNA дало је благо повећање вискозности (**слика 37**), што се не може приписати класичним интеркалаторима [147].

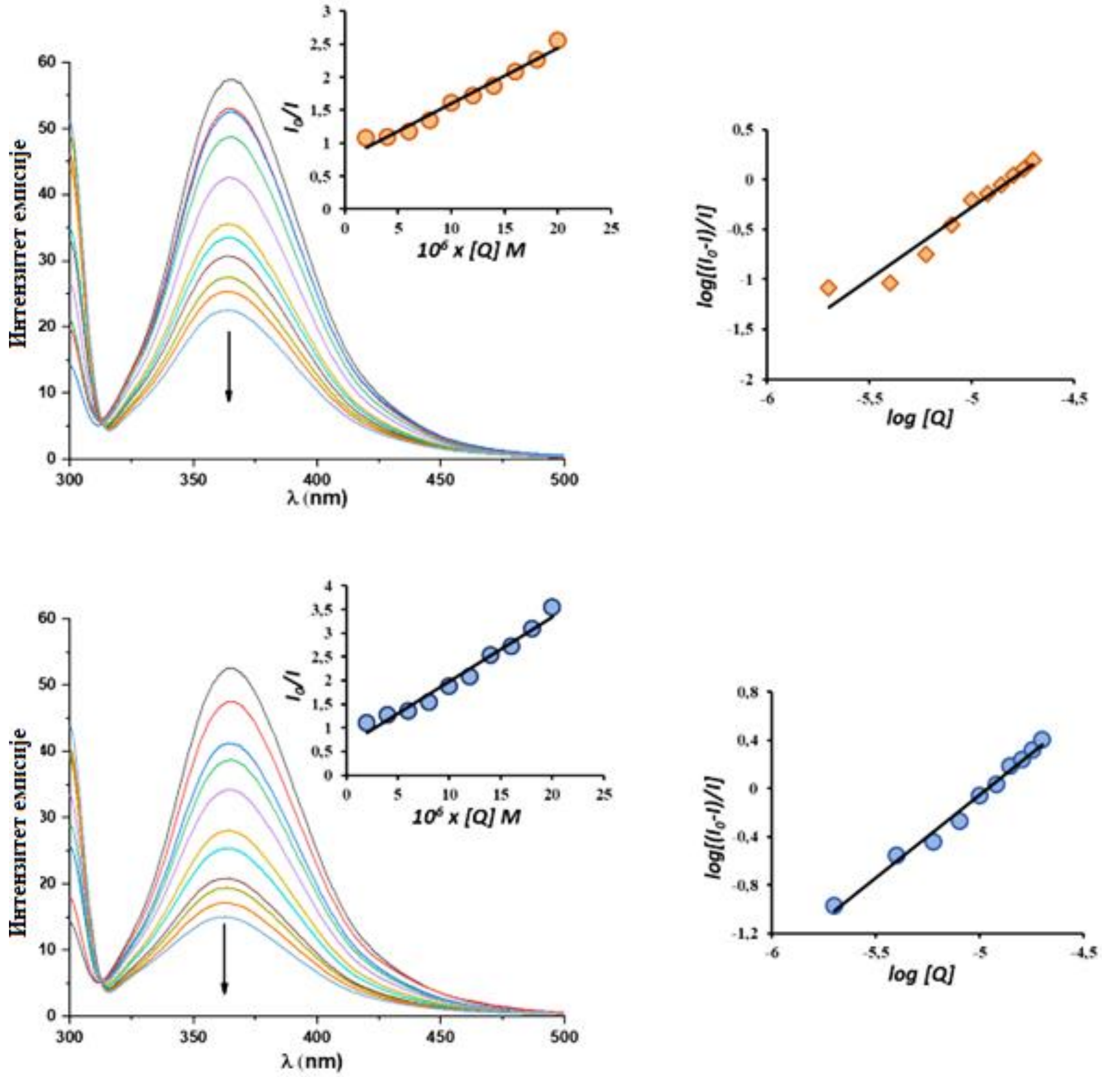


Слика 37. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ раствора CT-DNA (9,64 μM) у PBS пуферу са повећањем концентрације комплекса **C5** и **C6** (r)

4.9. ИНТЕРАКЦИЈЕ КОМПЛЕКСА C5 И C6 СА ГОВЕЂИМ СЕРУМОМ АЛБУМИНА

У серуму крвне плазме, албумин (SA) је најзаступљенији протеин који је укључен у транспорт малих молекула кроз крвоток [148–150]. Говеђи серум албумина (BSA) је највише проучаван серумски албумин због своје структурне хомологије (76%) и хомологије секвенце (80%) са хуманим серумом албумина (HSA) [151]. Већ је познато да BSA садржи два триптофана, Trp-134 и Trp-212, док HSA има само један, Trp-214. Њихови раствори показују интензивну емисију флуоресценције на око 360 nm, због остатака триптофана, након ексцитације на 295 nm [152].

Додавање комплекса **C5** или **C6** у раствор BSA доводи до смањења интензитета пикова (**слика 38**) услед промене у окружењу триптофана. Ако се место везивања постави у хидрофобни центар, додавање комплекса у раствор BSA ће изазвати померање ка мањим таласним дужинама ((λ_{max} са 365 nm на 363 nm за комплекс **C5**; са 366 nm на 362 nm за комплекс **C6**). Даље, оба комплекса паладијума(II) су показала значајно јаку интеракцију са BSA што потврђују високе вредности константи.



Слика 38. Емисиони спектри BSA у присуству комплекса **C5** (горњи део слике) и **C6** (доњи део слике), [BSA] = 2 μM, [комплекс] = 0 – 20 μM; λ_{ex}= 295 nm. Стрелице приказују промене интензитета по додатку растуће концентрације комплекса. Додатак: График зависности I_0/I од [Q]. Десни део слике представља Хилове графике. Стерн-Волмерова једначина је коришћена за израчунавање константи K_{sv} и k_q.

Израчунате вредности су приказане у **табели 22**. На основу добијених резултата може се закључити да оба комплекса имају добру могућност везивања.

Табела 22. Константе и параметри (K_{sv}, k_q, K и n) за интеракције BSA са комплексима **C5** и **C6**

Једињења	$K_{sv(BSA)} \times 10^5 (M^{-1})$	$k_{q(BSA)} \times 10^{13} (M^{-1} s^{-1})$	$K_{(BSA)} \times 10^6 (M^{-1})$	$n_{(BSA)}$
C5	(0,84 ± 0,01)	(0,84 ± 0,01)	(7,8 ± 0,5)	1,43
C6	(1,4 ± 0,1)	(1,4 ± 0,1)	(7,0 ± 0,5)	1,38

На основу резултата који су приказани у **табели 22** може се закључити да комплекс **C6** показује већи афинитет за везивање за BSA у поређењу са комплексом **C5**. Оба комплекса имају вредности K у оптималном опсегу, али су и даље ниже од авидина (10^{15} M^{-1}) [153] што указује на то да се комплекси паладијума(II) могу ослободити након што стигну до циљаних ћелија.

5. ЗАКЉУЧАК

Предмет ове докторске дисертације је синтеза нових *O,O′*-диалкил естара (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионске киселине дихлорхидрата. Синтетисани су: *O,O′*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионат дихлорхидрат (**L1**), *O,O′*-дипропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионат дихлорхидрат (**L2**), *O,O′*-дибутил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионат дихлорхидрат (**L3**) и *O,O′*-дипентил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионат дихлорхидрат (**L4**) и њима одговарајући паладијум(II) комплекси: дихлоридо-(*O,O′*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионат) паладијум(II) комплекс (**C1**), дихлоридо-(*O,O′*-дипропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионат) паладијум(II) комплекс (**C2**), дихлоридо-(*O,O′*-дибутил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионат) паладијум(II) комплекс (**C3**), дихлоридо-(*O,O′*-дипентил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионат) паладијум(II) комплекс (**C4**), као и комплекси паладијум(II) јона са 2-амино-6-метилбензотиазолом (**L5**) и 2-амино-6-хлоробензотиазолом (**L6**) као лигандима и то: (ди(2-амино-6-метилтиазол)дихлоридопаладат(II) (**C5**) и ди(2-амино-6-хлоробензотиазол)дихлоридопаладат(II) (**C6**).

Састав свих новосинтетисаних једињења одређен је на основу резултата елементалне микроанализе, а структуре су претпостављене на основу спектроскопских података добијених из IR и NMR (^{1}H и ^{13}C) спектара, док је структура комплекса **C6** (ди(2-амино-6-хлоробензотиазол)дихлоридопаладата(II)) потврђена на основу резултата рендгенске структурне анализе. У циљу одређивања геометрије лиганада **L1-L4** и комплекса **C1-C4** њихове структуре су оптимизоване методом функционала густине (DFT).

Испитивана је биолошка активност свих једињења и то *in vitro* антимикробна и *in vitro* антитуморска активност. У циљу одређивања антимикробне активности примењена је микродилуциона метода, а одређене су минималне инхибиторне активности (MIC) и минималне микробицидне активности (MMC). Тестирани *O,O′*-диалкил естри (*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионаске киселине дихлорхидрата (**L1-L4**) и паладијум(II) комплекси (**C1-C4**) показују највећу активност према бактерији *Escherichia coli* ATCC 25922, док комплекси **C5** и **C6**, показују добру активност према врстама *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*.

In vitro антитуморска активност лиганада и комплекса испитивана је коришћењем MTT методе. Одређене су IC_{50} вредности, док је као контролни цитостатик коришћена цисплатина. IC_{50} вредност за комплекс **C1** према ћелијама HCT116 је скоро 6 пута нижа у односу на IC_{50} вредност за цисплатину, док је комплекс **C5** показао највећи цитотоксички капацитет и цитотоксичку селективност на ћелијској линији CT26. За комплекс **C5** утврђено је да доминантно индукује програмирану ћелијску смрт-апоптозу.

Испитивана је и интеракција комплекса са DNA. Високе вредности константи везивања (K_b) указују на добар афинитет везивања свих комплекса за CT-DNA. Комплекс **C4** има највећу вредност константе везивања у поређењу са комплексима **C1**, **C2** и **C3**, док у случају комплекса паладијум(II) јона са дериватима 2-аминотиазола комплекс **C6** интерагује јаче. Да би се утврдио начин везивања комплекса за DNA мерена је вискозности и на основу добијених резултата може се закључити да се сви испитивани комплекси везују интеркалативним путем.

Да би се испитала инхибиторна активност комплекса **C1-C4** са молекулом DNA примењена је метода молекулског докинга. Утврђено је да су водоничне везе са атомима кисеоника фосфатне и карбонилне групе најчешћи тип интеракције свих молекула, док се на основу добијених параметара константе инхибиције и слободне енергије може закључити да комплекс **C1** има највећи инхибиторни ефекат на DNA.

У случају комплекса **C5** и **C6** испитивана је и интеракција са говеђим серумом албумина, BSA. На основу добијених резултата може се закључити да се оба комплекса везују за BSA, али да комплекс **C6** показује већи афинитет везивања.

За комплексе паладијум(II) јона са 2-аминотиазолима проучаване су и реакције супституције са конституентом DNA (5'GMP), трипептид глутатионом (GSH) и аминокиселином метионином (L-Met) применом stopped-flow методе. На основу добијених резултата може се закључити да комплекс **C6** показује већу реактивност у односу на комплекс **C5** према свим одабраним нуклеофилима, што се може објаснити већом запремином метил групе која отежава приступ нуклеофила и успорава реакцију. Природа улазног лиганда такође утиче на константу брзине, што за последицу има опадање реактивности по следећем реду: L-Met > GSH > 5'-GMP, због различитих атома донора на нуклеофилима.

Резултати приказани у оквиру ове докторске дисертације могу помоћи у синтези нових биолошки активних комплекса платинске групе метала.

6. ЛИТЕРАТУРА

[1] E. Monosson, Evolution in a Toxic World: How Life Responds to Chemical Threats, 2nd Edition, Island Press (2012) ISBN: 978-1597269773.
[2] N.C. Price, L. Stevens, Fundamentals of Enzymology: The Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins, Oxford University Press (1999) ISBN: 978-0198502296.
[3] P.J. Sadler, The biological chemistry of gold, Gold Bull. 9 (1976) 110-118.
[4] M. Cini, T.D. Bradshaw, S. Woodward, Using titanium complexes to defeat cancer: The view from the shoulders of titans, Chem Soc Rev. 46 (2017) 1040-1051.
[5] P.D.A. Hart, Chemotherapy of tuberculosis: Research during the past 100 years, Br Med J. 2 (1946) 849-855.
[6] J. Forestier, THE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS WITH GOLD SALTS INJECTIONS, The Lancet. 219 (1932) 441-444.
[7] H.S. Carr, T.J. Wlodkowski, H.S. Rosenkranz, Silver sulfadiazine: in vitro antibacterial activity, Antimicrob Agents Chemother. 4 (1973) 585-587.
[8] S. Lutsenko, Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways, Curr Opin Chem Biol. 14 (2010) 211-217.
[9] T. Kirschberg, J. Parrish, Metal chelators as antiviral agents, Curr Opin Drug Discov Devel. 10 (2007) 460-472.
[10] R.C. Gamble, P.G. Schmidt, Contrast agents for NMR imaging (1988) U.S. Patent 4728575.
[11] WHO, cancer @ www.who Int, Cancer. (2022) 1 (accessed February 3, 2022).
[12] Fact sheets, WHO https://www.who.int/news-room/fact-sheets/details/cancer (accessed September 15, 2022).
[13] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, CA Cancer J Clin. 68 (2018) 394-424.
[14] ROSENBERG B., VAN CAMP L. & KRIGAS T., Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode, Nature 205 (1965) 698-699.
[15] ROSENBERG B., VANCAMP L., TROSKO J. et al., Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents, Nature 222 (1969) 385-386.
[16] W. Hong, S. Shapshay, R. Bhutani, M. Craft, U. Alptekin, K. Yamaguchi, C. Vaughan, M. Strong, Induction chemotherapy in advanced squamous head and neck carcinoma with high-dose *cis*-platinum and bleomycin infusion, Cancer Res. 44 (1979) 19-25.
[17] J.M. Hill, E. Loeb, A. MacLellan, N.O. Hill, A. Khan, J.J. King, Clinical studies of platinum coordination compounds in the treatment of various malignant diseases, Cancer Chemother.Rep. 59 (1975) 647-659.
[18] M.S. Soloway, J.B. de Kernion, D. Rose, L. Persky, Effect of chemotherapeutic agents on bladder cancer: a new animal model, Surg Forum. 24 (1973) 542-544.
[19] L.K. Kvols, R.T. Eagan, E.T. Creagan, R.J. Dalton, Cis-platinum (CDDP) alone or in combination with cytoxan (CTX) and adriamycin (ADR) in advanced adenocarcinoma (ACA) of the lung, Proc Am Assoc Cancer Res, 19 (1978) 82.
[20] M.A. Tucker, C.B. Colvin, D.S. Martin, Substitution Reactions of Trichloroammineplatinate(II) Ion and the trans Effect, Inorg Chem. 3 (1964) 1373-1383.
[21] D.A. Juckett, B. Rosenberg, Actions of cis-Diamminedichloroplatinum on Cell Surface Nucleic Acids in Cancer Cells as Determined by Cell Electrophoresis Techniques, Cancer Res. 42 (1982) 3565-3573.

[22] B. Lippert, Cisplatin: Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug,Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich, Switzerland (1999) 1-563.
[23] M.A. Fuertes, C. Alonso, J.M. Perez, Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance, Chem Rev. 103 (2003) 645-662.
[24] M.A. Jakupec, M. Galanski, B.K. Keppler, Tumour-inhibiting platinum complexes-state of the art and future perspectives, Rev Physiol Biochem Pharmacol. 146 (2003) 1-54.
[25] A.H. Calvert, S.J. Harland, D.R. Newell, Z.H. Siddik, A.C. Jones, T.J. Mcelwain, S. Raju, E. Wiltshaw, I.E. Smith, J.M. Baker, M.J. Peckham, K.R. Harrap, Early clinical studies with cis-diammine-l,l-cyclobutane dicarboxylate platinum II, Cancer Chemother. Pharmacol. 9 (1982) 140-147.
[26] L. Kelland, The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy, Nat Rev Cancer. 7 (2007) 573-584.
[27] M.J. McKeage, Lobaplatin: A new antitumour platinum drug, Expert Opin Investig Drugs. 10 (2001) 119-128.
[28] C.H. Choi, Y.J. Cha, C.S. An, K.J. Kim, K.C. Kim, S.P. Moon, Z.H. Lee, Y.D. Min, Molecular mechanisms of heptaplatin effective against cisplatin-resistant cancer cell lines: Less involvement of metallothionein, Cancer Cell Int. 4 (2004) 6-17.
[29] S. Mabuchi, T. Kimura, Nedaplatin: A Radiosensitizing Agent for Patients with Cervical Cancer, Chemother Res Pract. 2011 (2011) 1-10.
[30] K. Miyazawa, S. Kishimoto, S. Fukushima, Y. Takeuchi, *In vitro* antitumor activity, intracellular accumulation, and DNA adduct formation of *cis*[((1R,2R)-1,2-cyclohexanediamine-*N*,*N'*bis(myristato)]platinum(II) suspended in lipiodol, Jpn J Canccer Res. 91 (2000) 99-104.
[31] Platinum-Group Metals Statistics and Information | U.S. Geological Survey, https://www.usgs.gov/centers/national-minerals-information-center/platinum-group-metals-statistics-and-information (accessed September 15, 2022).
[32] C.E. Garrett, K. Prasad, The art of meeting palladium specifications in active pharmaceutical ingredients produced by Pd-catalyzed reactions, Adv Synth Catal. 346 (2004) 889-900.
[33] C. Navarro-Ranninger, F. Zamora, J.R. Masaguer, J.M. Pérez, V.M. González, C. Alonso, Palladium(II) compounds of putrescine and spermine. Synthesis, characterization, and DNA-binding and antitumor properties, J Inorg Biochem. 52 (1993) 37-49.
[34] E. Budzisz, B.K. Keppler, G. Giester, M. Wozniczka, A. Kufelnicki, B. Nawrot, Synthesis, crystal structure and biological characterization of a novel palladium(II) complex with a coumarin-derived ligand, Eur J Inorg Chem. (2004) 4412-4419.
[35] N.N. Stone, R.G. Stock, Complications following permanent prostate brachytherapy, Eur Urol. 41 (2002) 427-433.
[36] L. Potters, Y. Cao, E. Calugaru, T. Torre, P. Fearn, X.H. Wang, A comprehensive review of CT-based dosimetry parameters and biochemical control in patients treated with permanent prostate brachytherapy, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 50 (2001) 605-614.
[37] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. Molecular biology of the cell. 4th edn., Ann Bot. 91 (2003) 401.

[38] DNA Basic Biology, https://web.archive.org/web/20170105045651/http:/basicbiology.net/micro/genetics/dna/ (archived from the original on 5 January 2017).
[39] M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry, J Photochem Photobiol B. 124 (2013) 1-19.
[40] F. Arjmand, S. Parveen, M. Afzal, L. Toupet, T. ben Hadda, Molecular drug design, synthesis and crystal structure determination of Cu II-Sn IV heterobimetallic core: DNA binding and cleavage studies, Eur J Med Chem. 49 (2012) 141-150.
[41] K.S. Lovejoy, R.C. Todd, S. Zhang, M.S. McCormick, J.A. D'Aquino, J.T. Reardon, A. Sancar, K.M. Giacomini, S.J. Lippard, cis-Diammine(pyridine)chloroplatinum(II), a monofunctional platinum(II) antitumor agent: Uptake, structure, function, and prospects, Proc Natl Acad Sci U S A. 105 (2008) 8902-8907.
[42] L.S. Hollis, A.R. Amundsen, E.W. Stern, Chemical and biological properties of a new series of cis-diammineplatinum(II) antitumor agents containing three nitrogen donors: cis-$[Pt(NH_3)_2(N\text{-donor})Cl]^+$, J Med Chem. 32 (1989) 128-136.
[43] H.S Feigelson,. and B.E Henderson, Estrogens and breast cancer. Carcinogenesis, 17(1996), 2279-2284.
[44] S. Mukhopadhyay, C.M. Barnés, A. Haskel, S.M. Short, K.R. Barnes, S.J. Lippard, Conjugated platinum(IV)-peptide complexes for targeting angiogenic tumor vasculature, Bioconjug Chem. 19 (2008) 39-49.
[45] N.W.S. Kam, T.C. Jessop, P.A. Wender, H. Dai, Nanotube molecular transporters: Internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells, J Am Chem Soc. 126 (2004) 6850-6851.
[46] M. Bottini, F. Cerignoli, M.I. Dawson, A. Magrini, N. Rosato, T. Mustelin, Full-length single-walled carbon nanotubes decorated with streptavidin-conjugated quantum dots as multivalent intracellular fluorescent nanoprobes, Biomacromolecules 7 (2006) 2259-2263.
[47] Y. Liu, D.C. Wu, W. de Zhang, X. Jiang, C. bin He, T.S. Chung, S.H. Goh, K.W. Leong, Polyethylenimine-grafted multiwalled carbon nanotubes for secure noncovalent immobilization and efficient delivery of DNA, Angew Chem. Int Ed 44 (2005) 4782-4785.
[48] N.W.S. Kam, H. Dai, Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: Generality and biological functionality, J Am Chem Soc. 127 (2005) 6021-6026.
[49] T.W. Hambley, A.R. Battle, G.B. Deacon, E.T. Lawrenz, G.D. Fallon, B.M. Gatehouse, L.K. Webster, S. Rainone, Article: 6231. J Inorg Biochem 77 (1999) 3-12.
[50] G. L. Cohen, J. A. Ledner, W. R. Bauer, H. M. Ushay, C. Caravana, S. J. Lippard Mechanism of Oxidative Cleavage of a-Hydroxyalkylchromium Complexes, 102 (1980) 2488-2489.
[51] K.R. Barnes, A. Kutikov, S.J. Lippard, Synthesis, Characterization, and Cytotoxicity of a Series of Estrogen-Tethered Platinum(IV) Complexes, Chem Biol. 11 (2004) 557-564.
[52] E.S. Koumousi, M. Zampakou, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, C.M. Beavers, S.J. Teat, G. Psomas, T.C. Stamatatos, First palladium(II) and platinum(II) complexes from employment of 2,6-diacetylpyridine dioxime: Synthesis, structural and spectroscopic characterization, and biological evaluation, Inorg Chem. 51 (2012) 7699-7710.

[53] R. Senthil Kumar, K. Sasikala, S. Arunachalam, DNA interaction of some polymer-copper(II) complexes containing 2,2′-bipyridyl ligand and their antimicrobial activities, J Inorg Biochem. 102 (2008) 234-241.
[54] A.G. Krishna, D.V. Kumar, B.M. Khan, S.K. Rawal, K.N. Ganesh, Taxol-DNA interactions: Fluorescence and CD studies of DNA groove binding properties of taxol, Biochim Biophys Acta 1381 (1998) 104-112.
[55] L. Pérez-Flores, A.J. Ruiz-Chica, J.G. Delcros, F.M. Sánchez-Jiménez, F.J. Ramírez, Effect of spermine conjugation on the interaction of acridine with alternating purine-pyrimidine oligodeoxyribonucleotides studied by CD, fluorescence and absorption spectroscopies, Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 69 (2008) 1089-1096.
[56] T. Topală, A. Bodoki, L. Oprean, R. Oprean, Bovine serum albumin interactions with metal complexes, Clujul Medical. 87 (2014) 5.
[57] X.M. He, D.C. Carter, Atomic structure and chemistry of human serum albumin, Nature. 358 (1992) 209-215.
[58] K.M. Knudsen Sand, M. Bern, J. Nilsen, H.T. Noordzij, I. Sandlie, J.T. Andersen, Unraveling the interaction between FcRn and albumin: Opportunities for design of albumin-based therapeutics, Front Immunol. 5 (2015) 682.
[59] S. Wang, S. Liu, Y. Zhang, J. He, D.H. Coy, L. Sun, Human Serum Albumin (HSA) and Its Applications as a Drug Delivery Vehicle Abstract, Health Sci. J. 14 (2020) 1-8.
[60] M.F. Alam, S. Varshney, M.A. Khan, A.A. Laskar, H. Younus, In vitro DNA binding studies of therapeutic and prophylactic drug citral, Int J Biol Macromol. 113 (2018) 300-308.
[61] A. Tarushi, E. Polatoglou, J. Kljun, I. Turel, G. Psomas, D.P. Kessissoglou, Interaction of Zn(II) with quinolone drugs: Structure and biological evaluation, Dalt. Trans. 40 (2011) 9461-9473.
[62] C. Tan, J. Liu, H. Li, W. Zheng, S. Shi, L. Chen, L. Ji, Differences in structure, physiological stability, electrochemistry, cytotoxicity, DNA and protein binding properties between two Ru(III) complexes, J Inorg Biochem. 102 (2008) 347-358.
[63] A. Zianna, G.D. Geromichalos, A.G. Hatzidimitriou, E. Coutouli-Argyropoulou, M. Lalia-Kantouri, G. Psomas, Palladium(II) complexes with salicylaldehyde ligands: Synthesis, characterization, structure, in vitro and in silico study of the interaction with calf-thymus DNA and albumins, J Inorg Biochem. 194 (2019) 85-96.
[64] E.L. Gelamo, M. Tabak, Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants, Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 56 (2000) 2255-2271.
[65] Ž.D. Bugarčić, J. Bogojeski, B. Petrović, S. Hochreuther, R. van Eldik, Mechanistic studies on the reactions of platinum(II) complexes with nitrogen- and sulfur-donor biomolecules, Dalt. Trans. 41 (2012) 12329-12345.
[66] Q. Zhang, W. Zhong, B. Xing, W. Tang, Y. Chen, Binding properties and stoichiometries of a palladium(II) complex to metallothioneins *in vivo* and *in vitro*, J Inorg Biochem. 72 (1998) 195-200.
[67] A.P. Dobson, E. Robin Carper, Infectious diseases and human population history, BioScience. 46 (1996) 115-126.
[68] S. Džidić, J. Šušković, B. Kos, Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects, Food Technol Biotechnol. 46 (2008) 11-21.
[69] J.M. Munita, C. A. Arias, Mechanisms of Antibiotic Resistance, Microbiol. Spectr. 4 (2016) 1-24.

[70] J.M.A. Blair, M.A. Webber, A.J. Baylay, D.O. Ogbolu, L.J.V. Piddock, Molecular mechanisms of antibiotic resistance, Nat Rev Microbiol. 13 (2015) 42-51.

[71] F. Alexander, ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A PENICILLIUM, WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR USE IN THE ISOLATION OF B. INFLUENZAE, ATW - Internationale Zeitschrift Fur Kernenergie. 46 (1929) 226-236.

[72] G.J. Tortora, B.R. Funke, C.L. Case, Microbiology: an introduction, 7th ed. Pearson Educaton, San Francisco, CA 2002.

[73] M. Cristani, M. D'Arrigo, G. Mandalari, F. Castelli, M.G. Sarpietro, D. Micieli, V. Venuti, G. Bisignano, A. Saija, D. Trombetta, Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity, J Agric Food Chem. 55 (2007) 6300-6308.

[74] W. Guerra, E. De Andrade Azevedo, A.R. De Souza Monteiro, M. Bucciarelli-Rodriguez, E. Chartone-Souza, A.M.A. Nascimento, A.P.S. Fontes, L. Le Moyec, E.C. Pereira-Maia, Synthesis, characterization, and antibacterial activity of three palladium(II) complexes of tetracyclines, J Inorg Biochem. 99 (2005) 2348-2354.

[75] A. Garoufis, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, Palladium coordination compounds as anti-viral, anti-fungal, anti-microbial and anti-tumor agents, Coord Chem Rev. 253 (2009) 1384-1397.

[76] A. Bansal, R. Singh, R. V. Singh, Toxicity, Spectroscopic Characterization and Electrochemical Behaviour of New Macrocyclic Complexes of Lead(II) and Palladium(II) Metals, Met Based Drugs. 7 (2000) 211-218.

[77] S.S. Konstantinović, B.C. Radovanović, S.P. Sovilj, S. Stanojević, Antimicrobial activity of some isatin-3-thiosemicarbazone complexes, J Serb Chem Soc 73 (2008) 7-13.

[78] S. Chandra, M. Tyagi, S. Agrawal, Spectral and antimicrobial studies on tetraaza macrocyclic complexes of Pd II, Pt II, Rh III and Ir III metal ions, J Saudi Chem Soc. 15 (2011) 49-54.

[79] M. Gülcan, M. Sönmez, I. Berber, Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of a new pyrimidine Schiff base and its Cu(II), Ni(II), Co(II), Pt(II), and Pd(II) complexes, Turk J Chem. 36 (2012) 189-200.

[80] D.P. Dimitrijević, G.P. Radić, V.V. Jevtić, M. Mišić, D. Baskić, S.R. Trifunović, Stereospecific ligands and their complexes. XX. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of ethylenediamine-*N,N′*-di-*S,S*-(2,2′-dibenzyl)acetic acid, J Mol Struct. 1071 (2014) 128-132.

[81] D.Lj. Stojković, V.V. Jevtić, G.P. Radić, M.B. Đukić, R.M. Jelić, M.M. Zarić, M.V. Andjelković, M.S. Mišić, D.D. Baskić, S.R. Trifunović, Stereospecific ligands and their complexes. XXIV. Synthesis, characterization and some biological properties of Pd(II) and Pt(II) complexes with R_2-*S,S*-eddtyr, New J. Chem. 42 (2018) 3924-3935.

[82] E.H. Avdović, D.Lj. Stojković, V.V. Jevtić, D. Milenković, Z.S. Marković, N. Vuković, I. Potočňák, I.D. Radojević, Lj.R. Čomić, S.R. Trifunović, Preparation and antimicrobial activity of a new palladium(II) complexes with a coumarin-derived ligands. Crystal structures of the 3-(1-(o-toluidino)ethylidene)-chroman-2,4-dione and 3-(1-(m-toluidino) ethylidene)-chroman-2,4-dione, Inorg. Chim. Acta 484 (2019) 52-59.

[83] G.P. Radić, V.V. Glođović, I.D. Radojević, O.D. Stefanović, Lj.R. Čomić, V.M. Đinović, S.R. Trifunović, Stereospecific ligands and their complexes. XI: Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes

with some alkyl esters of (*S*,*S*)-ethylenediamine-*N*,*N′*-di-2-(3-methyl)-butanoic acid, Inorg. Chim. Acta 391 (2012) 44-49.

[84] J.M. Vujić, G.N. Kaluđerović, M. Milovanović, B.B. Zmejkovski, V. Volarević, D. Živić, P. Đurđević, N. Arsenijević, S.R. Trifunović, Stereospecific ligands and their complexes. Part VII. Synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity of platinum(II) complexes with *O*,*O′*-dialkyl esters of (*S*,*S*)-ethylenediamine-*N*,*N′*-di-2-(4-methyl)pentanoic acid, Eur J Med Chem. 46 (2011) 4559-4565.

[85] J.M. Vujić, M. Cvijović, G.N. Kaluđerović, M. Milovanović, B.B. Zmejkovski, V. Volarević, N. Arsenijević, T.J. Sabo, S.R. Trifunović, Palladium(II) complexes with R_2edda derived ligands. Part IV. *O*,*O′*-dialkyl esters of (*S*,*S*)-ethylenediamine-*N*,*N′*-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride and their palladium(II) complexes: Synthesis, characterization and in vitro antitumoral activity, Eur J Med Chem. 45 (2010) 3601-3606.

[86] D.Lj. Stojković, V.V. Jevtić, G.P. Radić, D.V. Todorović, M. Petrović, M. Zarić, I. Nikolić, D. Baskić, S.R. Trifunović, Stereospecific ligands and their complexes. XXII. Synthesis and antitumor activity of palladium(II) complexes with some esters of (*S*,*S*)-ethylenediamine-*N*,*N′*-di-(2,2′-di(4-hydroxy-benzyl))-acetic acid, J Inorg Biochem. 143 (2015) 111-116.

[87] A.R. Katritzky, A.F. Pozharskiĭ, Handbook of heterocyclic chemistry, 2nd edition (2000).

[88] A. Leoni, A. Locatelli, R. Morigi, M. Rambaldi, Novel thiazole derivatives: A patent review (2008-2012; Part 1), Expert Opin Ther Pat. 24 (2014) 201-216.

[89] A. Ayati, S. Emami, A. Asadipour, A. Shafiee, A. Foroumadi, Recent applications of 1,3-thiazole core structure in the identification of new lead compounds and drug discovery, Eur J Med Chem. 97 (2015) 699-718.

[90] S. Nayak, S.L. Gaonkar, A Review on Recent Synthetic Strategies and Pharmacological Importance of 1,3-Thiazole Derivatives, Mini Rev Med Chem. 19 (2019) 215-238.

[91] T. Moulard, J.F. Lagorce, J.C. Thomes, C. Raby, Biological Evaluation of Compounds with -NCS- Group or Derived from Thiazole and Imidazole. Activity on Prostaglandin Synthetase Complex, J Pharm Pharmacol. 45 (1993) 731-735.

[92] M. Z. Rehman, C.J. Anwar, S. Ahmad, An Efficient Synthesis of 2-Alkyl-4--hydroxy-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxides, Bull Korean Chem Soc. 26 (2005) 1771-1775.

[93] M. Popsavin, L. Torović, M. Svirčev, V. Kojić, G. Bogdanović, V. Popsavin, Synthesis and antiproliferative activity of two new tiazofurin analogues with 2′-amido functionalities, Bioorg Med Chem Lett. 16 (2006) 2773-2776.

[94] M.V.N. de Souza, M.V. de Almeida, Drugs anti-HIV: Past, presente and future perspectives, Quim Nova. 26 (2003) 366-372.

[95] A.M. Borcea, I. Ionuț, O. Crișan, O. Oniga, An overview of the synthesis and antimicrobial, antiprotozoal, and antitumor activity of thiazole and bisthiazole derivatives, Molecules 26 (2021) 624.

[96] K. Cheng, J.Y. Xue, H.L. Zhu, Design, synthesis and antibacterial activity studies of thiazole derivatives as potentec KAS III inhibitors, Bioorg Med Chem Lett. 23 (2013) 4235-4238.

[97] D. Simić, M. Zarić, I. Nikolić, R. Živković-Zarić, P. Čanović, A. Kočović, I. Radojević, I. Raković, S. Jovičić Milić, Đ. Petrović, D. Stojković, N. Vuković, M. Kačániová, M. Vukić, V. Jevtić, Newly synthesized palladium(II) complexes with aminothiazole derivatives: *in vitro* study of antimicrobial activity and antitumor

activity on the human prostate cancer cell line, Dalton Trans. 51 (2022) 1191-1205.
[98] L.N. Schoenberg, D.W. Cooke, C.F. Liu, Nuclear Magnetic Resonance Determination of the Absolute Configuration of Complexes of Cobalt(III) with Asymmetric Tetradentate Ligands, Inorg Chem. 7 (1968) 2386-2393.
[99] D.B. Haydock, T.P.C. Mulholland, Some derivatives of *NN′*-biscarboxymethyl- and *NN′*-bis-(β-carboxyethyl)-ethylenediamine, J Chem Soc. C (1971) 2389-2395.
[100] S.S. Jovičić Milić, V.V. Jevtić, D.Lj. Stojković, Đ.S. Petrović, E.H. Avdović, Z.S. Marković, I.D. Radojević, Lj. Čomić, V.S. Mladenović, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with *O,O'*-dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-(3,3′-1H-indol-3yl)-propionic acid, Inorg Chim Acta 510 (2020).
[101] S.S. Jovičić Milić, V.V. Jevtić, S.R. Radisavljević, B.V. Petrović, I.D. Radojević, I.R. Raković, Đ.S. Petrović, D.Lj. Stojković, M. Jurišević, N. Gajović, A. Petrović, N. Arsenijević, I. Jovanović, O.R. Klisurić, N.L.Vuković, M. Vukić, M. Kačániová, Synthesis, characterization, DNA interactions and biological activity of new palladium(II) complexes with some derivatives of 2-aminothiazoles, J Inorg Biochem. 233 (2022) 111587.
[102] CrysAlis PRO, Rigaku Oxford diffraction Ltd: Yarnton, Oxfordshire, 2020.
[103] G.M. Sheldrick, SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination, Acta Crystallogr A. 71 (2015) 3-8.
[104] G.M. Sheldrick, Crystal structure refinement with SHELXL, Acta Crystallogr C Struct Chem. 71 (2015) 3-8.
[105] A.L. Spek, Single-crystal structure validation with the program PLATON, J Appl Crystallogr. 36 (2003) 7-13.
[106] L.J. Farrugia, WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography, J Appl Crystallogr. 32 (1999) 837-838.
[107] C.F. MacRae, I. Sovago, S.J. Cottrell, P.T.A. Galek, P. McCabe, E. Pidcock, M. Platings, G.P. Shields, J.S. Stevens, M. Towler, P.A. Wood, Mercury 4.0: From visualization to analysis, design and prediction, J Appl Crystallogr. 53 (2020) 226-235.
[108] Winmostar Website: https://winmostar.com/en/ (2022).
[109] G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. Montgomery, J. A., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, "Gaussian 09."Gaussian, Inc.,Wallingford CT (2009).
[110] T.A. Halgren, Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94, J. Comput. Chem. 17 (1996) 490-519.
[111] A.D. Becke, E.R. Johnson, A density-functional model of the dispersion interaction, J Chem Phys. 123 (2005) 154101.

[112] E.R. Johnson, A.D. Becke, Van der Waals interactions from the exchange hole dipole moment: Application to bio-organic benchmark systems, Chem Phys Lett. 432 (2006) 600-603.

[113] D. Rappoport, F. Furche, Property-optimized Gaussian basis sets for molecular response calculations, J Chem Phys. 133 (2010) 134105.

[114] K. Wolinski, J.F. Hinton, P. Pulay, Efficient implementation of the gauge-independent atomic orbital method for NMR chemical shift calculations, J Am Chem Soc. 112 (1990) 8251-8260.

[115] J.R. Cheeseman, G.W. Trucks, T.A. Keith, M.J. Frisch, A comparison of models for calculating nuclear magnetic resonance shielding tensors, J Chem Phys. 104 (1996) 5497-5509.

[116] Y. Takano, K.N. Houk, Benchmarking the Conductor-like Polarizable Continuum Model (CPCM) for Aqueous Solvation Free Energies of Neutral and Ionic Organic Molecules, J Chem Theory Comput. 1 (2005) 70-77.

[117] J.M. Andrews, BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4), J Antimicrob Chemoth. 56 (2005) 60-76.

[118] S.D. Sarker, L. Nahar, Y. Kumarasamy, 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 42 (2007) 321-324.

[119] D. Nijhawan, N. Honarpour, X. Wang, Apoptosis in Neural Development and Disease, Annu. Rev. Neurosci. 23 (2000) 73-87.

[120] G.N. Kaludjerović, D. Miljković, M. Momčilović, V.M. Đinović, M.M. Stojković, T.J. Sabo, V. Trajković, Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death *in vitro*, Int J Cancer. 116 (2005) 479-486.

[121] J.C. Stockert, R.W. Horobin, L.L. Colombo, A. Blázquez-Castro, Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives, Acta Histochem. 120 (2018) 159-167.

[122] E.A. Dolgopolova, A.A. Berseneva, M.S. Faillace, O.A. Ejegbavwo, G.A. Leith, S.W. Choi, H.N. Gregory, A.M. Rice, M.D. Smith, M. Chruszcz, S. Garashchuk, K. Mythreye, N.B. Shustova, Confinement-Driven Photophysics in Cages, Covalent-Organic Frameworks, Metal-Organic Frameworks, and DNA, J Am Chem Soc. 142 (2020) 4769-4783.

[123] J.R. Lakowicz, G. Weber, Quenching of Fluorescence by Oxygen. a Probe for Structural Fluctuations in Macromolecules, Biochemistry 12 (1973) 4161-4170.

[124] T. Topală, A. Bodoki, L. Oprean, R. Oprean, Bovine serum albumin interactions with metal complexes, Clujul Medical. 87 (2014) 5.

[125] M. Jiang, M.X. Xie, D. Zheng, Y. Liu, X.Y. Li, X. Chen, Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin, J Mol Struct. 692 (2004) 71-80.

[126] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell and A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexiblity, J Comput Chem. 30 (2009) 2785-2791.

[127] M. Vandevenne, D.A. Jacques, C. Artuz, C.D. Nguyen, A.H.Y. Kwan, D.J. Segal, J.M. Matthews, M. Crossley, J.M. Guss, J.P. Mackay, New insights into DNA recognition by zinc fingers revealed by structural analysis of the oncoprotein ZNF217, J Biol Chem. 288 (2013) 10616-10627.

[128] BIOVIA Discovery Studio, https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio/ (accessed September 15, 2022).

[129] S.S. Jovičić Milić, V.V. Jevtić, E.H. Avdović, B. Petrović, M. Međedović, Đ.S. Petrović, M. Milovanović, J. Milovanović, N. Arsenijević, D.Lj. Stojković, G.P. Radić, M.J. Stanković, DNA binding, molecular docking study and antitumor activity of [$PdCl_2$(R_2-(*S*,*S*)-eddtrp)] complexes, Monatsh Chem. 152 (2021) 951-958.
[130] M.M. Milutinović, J.V. Bogojeski, O. Klisurić, A. Scheurer, S.K.C. Elmroth, Ž.D. Bugarčić, Synthesis and structures of a pincer-type rhodium(III) complex: Reactivity toward biomolecules, Dalton Trans. 45 (2016) 15481-15491.
[131] A.A.R. Despaigne, J.G. da Silva, P.R. da Costa, R.G. dos Santos, H. Beraldo, ROS-mediated cytotoxic effect of copper(II) hydrazone complexes against human glioma cells, Molecules. 19 (2014) 17202-17220.
[132] F. Dimiza, S. Fountoulaki, A.N. Papadopoulos, C.A. Kontogiorgis, V. Tangoulis, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, A. Terzis, D.P. Kessissoglou, G. Psomas, Non-steroidal antiinflammatory drug-copper(II) complexes: Structure and biological perspectives, Dalton Trans. 40 (2011) 8555-8568.
[133] C.F. MacRae, I. Sovago, S.J. Cottrell, P.T.A. Galek, P. McCabe, E. Pidcock, M. Platings, G.P. Shields, J.S. Stevens, M. Towler, P.A. Wood, Mercury 4.0: From visualization to analysis, design and prediction, J Appl Crystallogr. 53 (2020) 226-235.
[134] D.R. McIlwain, T. Berger, T.W. Mak, Caspase functions in cell death and disease, Cold Spring Harb Perspect Biol. 5 (2013).
[135] Y. Kiraz, A. Adan, M. Kartal Yandim, Y. Baran, Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis, Tumour Biology. 37 (2016) 8471-8486.
[136] L. Beroske, T. Van den Wyngaert, S. Stroobants, P. Van der Veken, F. Elvas, Molecular imaging of apoptosis: The case of caspase-3 radiotracers, Int J Mol Sci. 22 (2021) 3948.
[137] M. Sobecki, K. Mrouj, A. Camasses, N. Parisis, E. Nicolas, D. Llères, F. Gerbe, S. Prieto, L. Krasinska, A. David, M. Eguren, M.C. Birling, S. Urbach, S. Hem, J. Déjardin, M. Malumbres, P. Jay, V. Dulic, D.L.J. Lafontaine, R. Feil, D. Fisher, The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin, Elife. 5 (2016) 1-33.
[138] F.I. Montalto, F. De Amicis, Cycle Control, Adhesion and Invasion in Tumor, Cells 9 (2020) 1-15.
[139] A. Karimian, Y. Ahmadi, B. Yousefi, Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage, DNA Repair (Amst). 42 (2016) 63-71.
[140] S. Jovanović-Stević, S. Radisavljević, A. Scheurer, D. Ćoćić, B. Šmit, M. Petković, M.N. Živanović, K. Virijević, B. Petrović, Bis(triazinyl)pyridine complexes of Pt(II) and Pd(II): studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/HSA interactions, molecular docking and biological activity, J Biol Inorg Chem. 26 (2021) 625-637.
[141] S. Radisavljević, A. Scheurer, D. Bockfeld, D. Ćoćić, R. Puchta, L. Senft, M. Pešić, I. Damljanović, B. Petrović, New mononuclear gold(III) complexes: Synthesis, characterization, kinetic, mechanistic, DNA/BSA/HSA binding, DFT and molecular docking studies, Polyhedron 209 (2021) 115446.
[142] S. Jovanović, K. Obrenčević, Ž.D. Bugarčić, I. Popović, J. Žakula, B. Petrović, New bimetallic palladium(II) and platinum(II) complexes: Studies of the nucleophilic substitution reactions, interactions with CT-DNA, bovine serum albumin and cytotoxic activity, Dalton Trans. 45 (2016) 12444-12457.

[143] S. Radisavljević, I. Bratsos, A. Scheurer, J. Korzekwa, R. Masnikosa, A. Tot, N. Gligorijević, S. Radulović, A. Rilak Simović, New gold pincer-type complexes: Synthesis, characterization, DNA binding studies and cytotoxicity, Dalton Trans. 47 (2018) 13696-13712.

[144] L. Pérez-Flores, A.J. Ruiz-Chica, J.G. Delcros, F.M. Sánchez-Jiménez, F.J. Ramírez, Effect of spermine conjugation on the interaction of acridine with alternating purine-pyrimidine oligodeoxyribonucleotides studied by CD, fluorescence and absorption spectroscopies, Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 69 (2008) 1089-1096.

[145] K.J. Kilpin, W. Henderson, B.K. Nicholson, Synthesis and reactivity of gold(III) complexes containing cycloaurated iminophosphorane ligands, Inorg Chim Acta. 362 (2009) 3669-3676.

[146] S. Salehzadeh, F. Hajibabaei, N.H. Moghadam, S. Sharifinia, S. Khazalpour, R. Golbedaghi, Binding Studies of Isoxsuprine Hydrochloride to Calf Thymus DNA Using Multispectroscopic and Molecular Docking Techniques, J Fluoresc. 28 (2018) 195-206.

[147] V.G. Vaidyanathan, B.U. Nair, Photooxidation of DNA by a cobalt(II) tridentate complex, J Inorg Biochem. 94 (2003) 121-126.

[148] A. Tarushi, E. Polatoglou, J. Kljun, I. Turel, G. Psomas, D.P. Kessissoglou, Interaction of Zn(II) with quinolone drugs: Structure and biological evaluation, Dalton Trans. 40 (2011) 9461-9473.

[149] X.M. He, D.C. Carter, Atomic structure and chemistry of human serum albumin, Nature 358 (1992) 209-215.

[150] R.E. Olson, D.D. Christ, Chapter 33. Plasma Protein Binding of Drugs, Annu Rep Med Chem. 31 (1996) 327-336.

[151] S. Paul, R. Ghanti, P.S. Sardar, A. Majhi, Synthesis of a novel coumarin derivative and its binding interaction with serum albumins, Chem Heterocycl Compd. 55 (2019) 607-611.

[152] C. Tan, J. Liu, H. Li, W. Zheng, S. Shi, L. Chen, L. Ji, Differences in structure, physiological stability, electrochemistry, cytotoxicity, DNA and protein binding properties between two Ru(III) complexes, J Inorg Biochem. 102 (2008) 347-358.

[153] J. Kljun, I. Bratsos, E. Alessio, G. Psomas, U. Repnik, M. Butinar, B. Turk, I. Turel, New Uses for Old Drugs: Attempts to Convert Quinolone Antibacterials into Potential Anticancer Agents Containing Ruthenium, Inorg Chem. 52 (2013) 9039-9052.

ПРИЛОГ

Inorganica Chimica Acta 510 (2020) 119743

Contents lists available at ScienceDirect

Inorganica Chimica Acta

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

Research paper

Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with *O,O′*-dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N′*-di-(3,3′-1H-indol-3yl)-propionic acid

Sandra S. Jovičić Milić[a], Verica V. Jevtić[a,*], Danijela Lj. Stojković[a,b], Đorđe S. Petrović[a], Edina H. Avdović[a,b], Zoran S. Marković[b], Ivana D. Radojević[c], Ljiljana Čomić[c], Violeta S. Mladenović[d]

[a] University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34000, Serbia
[b] University of Kragujevac, Institute of Information Technologies, Department of Science , Jovana Cvijića bb, Kragujevac 34000, Serbia
[c] University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34000, Serbia
[d] University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Internal Medicine, Svetozara Markovića 69, Kragujevc 34000, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:
Palladium(II) complexes
IR and NMR spectroscopy
DFT calculations
Antimicrobial activity

ABSTRACT

A series of four new ligands of general formula R_2-*S,S*-eddtrp·2HCl (**L1–L4**) and their palladium(II) complexes of general formula [$PdCl_2$(R_2-*S,S*-eddtrp)] (**C1–C4**) where R = ethyl, 1-propyl, 1-butyl and 1-pentyl; *S,S*-eddtrp·2HCl = ethylenediamine-*N,N′*-di-(3,3′-1H-indol-3yl)propionic acid dihydrochloride have been synthesized and characterized by elemental microanalysis, infrared, ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopy. The proposed structures of all compounds were examined by density functional theory (DFT). The ligands (**L1–L4**) and Pd(II) complexes (**C1–C4**) were screened for their antimicrobial activity against 19 microorganisms and minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) were determinated. All tested ligands and complexes exhibited the highest antimicrobial activity on *Escherichia coli* ATCC 25922, being in range or higher than positive control, tetracycline.

1. Introduction

Infectious diseases caused by pathogenic microorganisms, such as bacteria, viruses, fungi or parasites, are among the leading causes of mortality worldwide. The significant problem with these diseases is that they can be transmitted directly or indirectly from one person to another, while some can be transmitted from animals to humans, or from contaminated food and water [1]. Throughout history, the main aim of many researchers has been to find an effective and selective medicine for such infections.

After the discovery of Penicillin [2] its usage in the treatment of bacterial infections as a cure, growing interest for synthesis and research of new compounds, with wide range of antimicrobial activities, has been recorded. Bacterial infections pose a worldwide problem since, during the time, microorganisms have gained resistance to large number of drugs used in therapy. Infections caused by antibiotic-resistant bacteria affect lives every day posing a threat to health similar to influenza, tuberculosis and HIV combined [3]. Due to that fact, synthesis and research of new biological agents is very useful.

The palladium(II) complexes have shown wide range of biological activities, such as anticancer, antifungal, antitubercular and antimicrobial activities [4,5]. Results of antimicrobial activity of the large number of palladium(II) complexes with different ligands have already been published [6–14].

In order to continue investigation into biological activity of *N,N′*-bidentate esters, R_2edda-type, derived from aminoacids [10,11,14–17], we wanted to describe the synthesis and characterization of the *O,O′*-diethyl(**L1**), *O,O′*-dipropyl(**L2**), *O,O′*-dibutyl(**L3**) and *O,O′*-dipentyl(**L4**) ethylenediamine-*N,N′*-di-(3,3′-1H-indol-3yl)-propionate and corresponding palladium(II) complexes. Also, the aim of this paper is to show results of *in vitro* antimicrobial activities of newly synthesized ligands and their palladium(II) complexes.

2. Experimental and computational method

2.1. Materials and methods

S,S-ethylenediamine-*N,N′*-di-(3,3′-1H-indol-3yl)-propionic acid

* Corresponding author.
E-mail address: verica.jevtic@pmf.kg.ac.rs (V.V. Jevtić).

https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119743
Received 16 March 2020; Received in revised form 5 May 2020; Accepted 7 May 2020
Available online 11 May 2020

Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly (2021) 152:951–958
https://doi.org/10.1007/s00706-021-02820-9

ORIGINAL PAPER

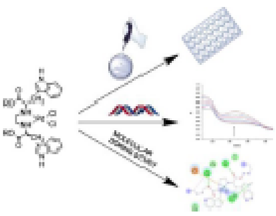
DNA binding, molecular docking study and antitumor activity of [$PdCl_2(R_2$-(*S,S*)-eddtrp)] complexes

Sandra S. Jovičić Milić[1] · Verica V. Jevtić[1] · Edina H. Avdović[2] · Biljana Petrović[1] · Milica Mededović[1] · Đorđe S. Petrović[1] · Marija Milovanović[3] · Jelena Milovanović[3] · Nebojša Arsenijević[3] · Danijela Lj. Stojković[2] · Gordana P. Radić[4] · Miloš J. Stanković[5]

Received: 29 March 2021 / Accepted: 5 July 2021 / Published online: 7 August 2021

Abstract
The cytotoxic activity of ligands (*O,O'*-dialkyl esters of *S,S*-ethylenediamine-*N,N'*-di-(3,3'-1*H*-indol-3yl)propionic acid dihydrochloride (alkyl = ethyl, propyl, butyl, pentyl) and corresponding palladium(II) complexes were determined against human and murine colorectal cancer cells (HCT116 and CT26) and compared to the activities of cisplatin. All tested compounds showed a dose-dependent cytotoxic activity toward used cell lines. According to IC_{50} values for cytotoxic activities of tested compounds, complex of Pd(II) ion with *O,O'*-diethyl ester of *S,S*-ethylenediamine-*N,N'*-di-(3,3'-1*H*-indol-3yl)-propionic acid dihydrochloride showed significantly, six times higher cytotoxic activity against HC116 cell line, than cisplatin. The interactions of the complexes with calf thymus DNA were analyzed by absorption and emission spectral studies (ethidium bromide displacement studies). The high values of DNA-binding constants (K_b) indicate the good binding affinity for all investigated complexes toward DNA. During the examination of competitive reactions with ethidium bromide, the results showed that complexes can replace ethidium bromide bound DNA and interact with DNA. The molecular docking simulations were applied for better understanding of inhibitory activity of palladium(II) complexes. The obtained values of free binding energies and constants of inhibition also show that the complex of Pd(II) ion with *O,O'*-diethyl ester of *S,S*-ethylenediamine-*N,N'*-di-(3,3'-1*H*-indol-3yl)propionic acid dihydrochloride has the best inhibitory effect on DNA molecules.

Graphic abstract



Keywords Cytotoxic activity · Absorption spectra · Computational chemistry · MTT assay

Introduction

According to World Health Organization data after ischemic heart disease and stroke, claiming the greatest number of lives, cancer is the second leading cause of death in the world. The three most common types of cancer are lung, breast, and colorectal cancer [1]. The International Agency for Research on Cancer (IARC) estimates that one in six women and one in five men in the world are diagnosed with some types of cancer [2]. The course and result of the disease largely depend on early diagnosis and the choice of adequate therapy.

After the discovery of the antitumor effect of cisplatin and its related platinum complexes, a large number of

✉ Verica V. Jevtić
verica.jevtic@pmf.kg.ac.rs

Extended author information available on the last page of the article

Journal of Inorganic Biochemistry 233 (2022) 111857

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

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

Synthesis, characterization, DNA interactions and biological activity of new palladium(II) complexes with some derivatives of 2-aminothiazoles

Sandra S. Jovičić Milić [a], Verica V. Jevtić [a,*], Snežana R. Radisavljević [a], Biljana V. Petrović [a], Ivana D. Radojević [b], Ivana R. Raković [c], Đorđe S. Petrović [a], Danijela Lj. Stojković [d], Milena Jurišević [e], Nevena Gajović [f], Anđela Petrović [f], Nebojša Arsenijević [f], Ivan Jovanović [f], Olivera R. Klisurić [g], Nenad L. Vuković [a], Milena Vukić [a], Miroslava Kačániová [h]

[a] University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
[b] University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
[c] University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia
[d] University of Kragujevac, Institute for Information Technologies, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia
[e] University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Clinical pharmacy, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia
[f] University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia
[g] University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Physics, Trg Dositeja Obradovića 4, 21000 Novi Sad, Serbia
[h] Slovak University of Agriculture, Faculty of Horticulture and Landscape Engineering, Department of Fruit sciences, Viticulture and Enology, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra-Chrenová, Slovakia

ARTICLE INFO

Keywords:
Palladium(II) complexes
Thiazole derivatives
bsa/DNA binding
Cytotoxicity study
Antimicrobial activity

ABSTRACT

Newly palladium(II) complexes (C1, C2) with derivatives of 2-aminothiazoles (L1 = 2-amino-6-methylbenzothiazole, L2 = 2-amino-6-chlorobenzothiazole), general formula $[PdL_2Cl_2]$ were synthesized and characterized by elemental microanalyses, IR, NMR spectroscopy and X-ray spectroscopy in case of $[Pd(L2)_2Cl_2]$. The kinetic of the substitution reactions of complexes and the nucleophiles, such as guanosine-5′-monophosphate (5′-GMP), tripeptide glutathione (GSH) and amino acid L-methionine (L-Met), were studied by stopped-flow technique. The complex C2 was always more reactive, while the order of the reactivity of the nucleophiles, due to the associative mode of the reaction, was L-Met > GSH > 5′-GMP. In order to determine the type of interactions between palladium(II) complexes and calf thymus DNA (CT-DNA), we used electronic absorption spectroscopy, viscosity measurements, and fluorescence spectroscopic studies, while interactions with bovine serum albumin (BSA) were determined only with fluorescence spectroscopic studies. The observed results confirmed that both complexes bound to DNA by groove binding. The significantly strong interaction with BSA, especially for complex C2, was also observed. *In vitro* cytotoxic activity was evaluated against four tumor cell lines, 4 T1, CT26, MDA-MB-468, HCT116 and mesenchymal stem cells (mMSC). C1 complex showed higher cytotoxic activity against CT26 cell line. Flow cytometry analysis showed that C1 stimulated apoptosis of tumor cells *via* inhibition of expression of antiapoptotic Bcl-2 molecule and decelerated proliferation by decreasing Cyclin-D and increasing expression of P21. *In vitro* antimicrobial activity for ligands and corresponding palladium(II) complexes was investigated by microdilution method and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) were determined. Tested compounds exhibited selective and moderate activity.

1. Introduction

As the leading cause of death, cancer is a global health problem, causing almost 10 million deaths in 2020 [1]. The era of antitumor drugs began with the discovery of cisplatin and its use in medicine. Considering the large number of side effects of cisplatin and the appearance of resistance, the goal of this paper was to synthesize new components that could be more selective and as such manifest the highest antitumor potencies and fewer side effects [2–4]. The replication and transcription of DNA is known to be very important for the

* Corresponding author.
E-mail address: verica.jevtic@pmf.kg.ac.rs (V.V. Jevtić).

https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111857
Received 17 February 2022; Received in revised form 27 April 2022; Accepted 7 May 2022
Available online 13 May 2022
0162-0134/

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

A549	Хумани аденокарцином плућа
ADT	AutoDockTools
BSA	Говеђи серум албумина
C1	Дихлоридо-(*O,O′*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил) пропионат) паладијум(II) комплекс
C2	Дихлоридо-(*O,O′*-дипропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол--3ил)-пропионат) паладијум(II) комплекс
C3	Дихлоридо-(*O,O′*-дибутил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол--3ил)-пропионат) паладијум(II) комплекс
C4	Дихлоридо-(*O,O′*-дипентил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол--3ил)-пропионат) паладијум(II) комплекс
C5	Ди(2-амино-6-метилтиазол)дихлоридопаладат(II)
C6	Ди(2-амино-6-хлоробензотиазол)дихлоридопаладат(II)
^{13}C NMR	Угљеник-13 нуклеарна магнетна резонаца
CT-DNA	Циркулишућа туморска ДНК (Circulating tumor DNA)
CT26	Мишији колоректални карцином
DFT	Метода функционала густине
DNA	Дезоксирибонуклеинска киселина
DMF	Диметил-формамид
DMSO	Диметил-сулфоксид
EB	Етидијум-бромид
EDDA	Етилендиамин-*N,N′*-дисирћетна киселина
eddp	Етилендиамин-*N,N′*-ди-3-пропионат
GIAO	Gauge Independent Atomic Orbital
GSH	Глутатион
5’-GMP	Гуанозин-5’-монофосфат
H_2-(*S,S*)-eddtrp	(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3-ил) пропионска киселина
HCT116	Хумани колоректални карцином
HeLa	Хумани аденокарцином материце
HIV	Вирус хумане имунодефицијенције (Human Immunodeficiency Virus)
^{1}H NMR	Протонска нуклеарна магнетна резонанца
HSA	Хумани серум албумина
IC_{50}	Концентрација једињења која је неопходна за 50% инхибиције *in vitro*
IR	Инфрацрвена спектроскопија
K562	Хумана мијелоидна леукемија
$K_2[PdCl_4]$	Калијум-терахлоридопаладат(II)
K_b	Константа везивања
KBr	Калијум-бромид
k_{obsd}	Константа брзине *pseudo*-првог реда
K_{sv}	Стерн-Волмерова константа гашења
L1	*O,O′*-диетил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)-пропионат дихлорхидрат
L2	*O,O′*-дипропил-(*S,S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)пропионат дихлорхидрат
L3	*O,O′*-дибутил-(*S,S*)-етилендимин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)пропионат дихлорхидрат

L4	*O,O′*-дипентил-(*S*,*S*)-етилендиамин-*N,N′*-ди-(3,3′-1H-индол-3ил)пропионат дихлорхидрат
L5	2-амино-6-метилбензотиазол
L6	2-амино-6-хлоробензотиазол
LGA	Lamarckian Genetic Algorithm
LiOH	Литијум-хидроксид
L-Met	L-метионин
MAE	Средња апсолутна грешка
MDA-MB-468	Хумани карцином дојке
MIC	Минимална инхибиторна концентрација
MMC	Минимална микробицидна концентрација
mMSC	Мезенхималне матичне ћелије миша
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид
PBS	Фосфатни пуфер (Phosphate-buffered Saline)
R	Коефицијент корелације
RNA	Рибонуклеинска киселина
rRNA	Рибозомска рибонуклеинска киселина
SA	Серум албумин
(*S*,*S*)-eddv	Етилендиамин-*N*,*N′*-ди-(*S*,*S*)-2-(3-метил)-бутаноат
(*S*,*S*)-eddp	Етилендиамин-*N*,*N′*-ди-(*S*,*S*)-2-пропионат
TMS	Тетраметилсилан
tRNA	Транспортна рибонуклеинска киселина
4T1	Мишји карцином дојке
UV-VIS	Ултраљубичаста видљива спектроскопија

ЛИСТА СЛИКА

ЛИСТА ШЕМА

ЛИСТА ТАБЕЛА

БИОГРАФИЈА

Сандра С. Јовичић Милић је рођена 06.04.1988. године у Крагујевцу. Основну школу завршила је 2003. године у Крагујевцу, а средњу Медицинску школу - смер фармацеутски техничар 2007. године такође у Крагујевцу. Природно--математички факултет у Крагујевцу, група хемија, уписала је школске 2007/2008 године где је дипломирала 25.10.2011. године са просечном оценом 8,75, а након тога је завршила и Мастер академске студије 21.09.2012. на истом факултету са просечном оценом 9,56. Од 2012. до 2018. године радила је у ФЦА Србија.

Докторске академске студије хемије уписала је школске 2013/2014 године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Почиње са радом на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу 2018. године као истраживач приправник. Положила је све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 10. Изабрана је у звање истраживач-сарадник 2021. године.

Учествовала је у извођењу практичне наставе из предмета Хемија (за студенте физике) и Међународне норме стандардизације и акредитације школске 2019/2020 године, као и из предмета Хемија (за студенте физике) и Бионеорганска хемија школске 2020/2021. Била је ангажована на пројекту бр. 172016 под називом „Синтеза, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине органских једињења и одговарајућих комплекса метала”. До сада има пет публикованих радова у часописима са SCI листе, а учествовала је и на бројним конференцијама од националног и међународног значаја. Члан је Српског хемијског друштва и Српског кристалографског друштва.

СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

1. **Списак научних радова из докторске дисертације објављених у часописима са SCI-листе:**

   1.1. **S.S. Jovičić Milić,** V.V. Jevtić, D.Lj. Stojković, Đ.S. Petrović, E.H. Avdović, Z.S. Marković, I.D. Radojević, Lj. Čomić, V.S. Mladenović, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with *O,O'*-dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-(3,3'-1H-indol-3yl)-propionic acid, *Inorganica Chimica Acta* 510 (2020)119743. DOI:10.1016/j.ica.2020.119743 IF_{2020}=2,545 **M22**

   1.2. **S.S. Jovičić Milić**, V.V. Jevtić, E.H. Avdović, B. Petrović, M. Međedović, Đ.S. Petrović, M. Milovanović, J. Milovanović, N. Arsenijević, D.Lj. Stojković, G.P. Radić, M.J. Stanković, DNA binding, molecular docking study and antitumor activity of $[PdCl_2(R_2$-(*S,S*)-eddtrp)] complexes, *Monatshefte Fur Chemie* 152 (2021) 951-958. https://doi.org/10.1007/s00706-021-02820-9, IF_{2021}=1,613 **M23**

   1.3. **S.S. Jovičić Milić**, V.V. Jevtić, S.R. Radisavljević, B.V. Petrović, I.D. Radojević, I.R. Raković, Đ.S. Petrović, D.Lj. Stojković, M. Jurišević, N. Gajović, A. Petrović, N. Arsenijević, I. Jovanović, O.R. Klisurić, N.L.Vuković, M. Vukić, M. Kačániová, Synthesis, characterization, DNA interactions and biological activity of new palladium(II) complexes with some derivatives of 2-aminothiazoles, *Journal of Inorganic Biochemistry* 233 (2022) 111587. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111857, IF_{2021}=4,336 **M21**

2. **Списак осталих радова објављених у међународним часописима са SCI-листе:**

   2.1. Đ.S. Petrović, **S.S. Jovičić Milić**, M.B. Đukić, I.D. Radojević, R.M. Jelić, M.M. Jurišević, G.P. Radić, N.M. Gajović, N.N. Arsenijević, I.P. Jovanović, N.V. Marković, D.Lj. Stojković, V.V. Jevtić, Synthesis, characterization, HSA/DNA binding, cytotoxicity study, and antimicrobial activity of new palladium(II) complexes with some esters of (*S,S*)-propylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)butanoic acid, *Inorganica Chimica Acta* 528 (2021) 120601, DOI: https://doi.org/10.1016/j.ica.2021.120601, ISSN 0020-1693, IF_{2021}=3,118 **M22**

   2.2. D. Simić, M. Zarić, I. Nikolić, R. Živković-Zarić, P. Čanović, A. Kočović, I. Radojević, I. Raković, **S. Jovičić Milić**, Đ. Petrović, D. Stojković, N. Vuković, M. Kačániová, M. Vukić, V. Jevtić, Newly synthesized palladium(II) complexes with aminothiazole derivatives: in vitro study of antimicrobial activity and antitumor activity on the human prostate cancer cell line , *Dalton Transactions*. (2022). https://doi.org/10.1039/d1dt03364f, IF_{2021}=4,569, **M21**

3. **Списак саопштења на међународним (М34) и националним (М64) конференцијама штампаним у изводима:**

3.1. D.Lj.Stojković, V.V. Jevtić, S.R. Trifunović, N.L. Vuković, M. Vukić, I. Potočňák, E.H. Avdović, **S.Jovičić**, *Synthesis and crystal structure of 3-(1-(3-hydroxypropylamino) ethylidene)hroman-2,4-dione*; XXIII Conference of the Serbian Crystallographic Society, Andrevlje, 2016, p.85. ISBN:978-86-912959-3-6, **M64**

3.2. D.Lj. Stojković, V.V. Jevtić, S.R. Trifunović, N. Vuković, M.D. Vukić, O.R. Klisurić, E.H. Avdović, **S. Jovičić**, *Synthesis and crystal structure of methyl ester of phenylalanine ammonium-thiocyanate*, XXIII Conference of the Serbian Crystallographic Society, Vršac, 2017, p. 27. **M64**

3.3. E.H. Avdović, V.V. Jevtić, M.P. Kasalović, D.Lj. Stojković, **S. Jovičić**, N. Vuković, Z. Marković, I. Potočňák, S.R. Trifunović, *Synthesis and crystal structure of 3-(1-m-toluidino-ethylidene)-chromane-2,4-dione*, XXV Conference of the Serbian crystalographicsociety, Bajina Bašta, 2018, p. 47. **M64**

3.4. Ђ. Петровић, Д. Стојковић, **С. Јовичић,** М. Касаловић, *Синтеза и карактеризација бутил естра (S,S)-етилендиамин-N,N'-ди-(2,2'-ди(4-хидрокси-бензил))-сирћетне киселине и одговарајуће гпаладијум(II)-комплекса*, VI Конференција младих хемичара Србије, Београд, 2018, **М64**

3.5. **S. Jovičić Milić**, V.V. Jevtić, N.L. Vuković, M. Kačániová, S.R. Trifunović, E.H. Avdović, Đ.S. Petrović, M.P. Kasalović, G.P. Radić, *Synthesis and characterization of new palladium(II) complex with 2-amino-5-methyl-4-phenylthiazole*, 13th Students' Congress of SCTM, Skopje, Republic of N.Macedonia, ISBN 978-9989-760-17-4, **M34**

3.6. **S.S. Jovičić Milić**,E.H. Avdović, V.V. Jevtić, Đ.S. Petrović, D. Dimić, J.M. Dimitrić Marković, I. Potočňák, S.R.Trifunović, *Synthesis and crystal structure of new octapamin derivative of coumarin*, XXVI Conference of the Serbian Crystallographic Society, Silver Lake 2019, ISBN 978-86-912959-5-0, p. 44, **M64**

3.7. Đ.S. Petrović, G.P. Radić, D.LJ. Stojković, S.R. Trifunović,E.H. Avdović, **S.S. Jovičić,** *Synthesis and characterization of palladium(II)-complexes with some O,O'-dialkyl esters of 1,3-propylene diamine-N,N'-di-2-(3-methyl)-butanoic acid*, XXI Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry, Saint Perersburg, 2019, ISBN-978-5-6043248-4-4, p. 213, **M34**

3.8. S.R. Trifunović,V.V. Jevtić, **S.S. Jovičić,** L.N. Vuković, Đ.S. Petrović, M. Kačániová, *Synthesis and characterization of new palladium(II)-complexes with some thiazole*, XXI Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry, Saint Perersburg, 2019, ISBN-978-5-6043248-4-4, **M34**

3.9. D. Stojković, V. Jevtić, Đ. Petrović, **S. Jovičić Milić**, N. Vuković, M. Vukić, M. Đukić, O. Klisurić, Synthsis and crystal structure of 2-acetylbutyrolactone with methyl ester of L-tryptophane, XXVII Konferencija Srpskog kristalografskog društva, Kragujevac (2021), 28; ISBN: 978-86-6009-085-2, **M64**

3.10. Đ. Petrović, V. Jevtić, **S. Jovičić Milić**, D. Stojković, O. Klisurić, Synthsis and crystal structure of propylenediamine-*N*,*N'*-di-2-(3-methyl)-butanoate acid, XXVII Konferencija Srpskog kristalografskog društva, Kragujevac (2021), 30; ISBN: 978-86-6009-085-2, **M64**

3.11. **S. Jovičić Milić**, V. Jevtić, Đ. Petrović, D. Stojković, N. Vuković, M. Vukić, O. Klisurić, M. Kačániová, Synthsis and crystal structure complex of palladium(II) ion with 2-amino-6-chlorobenzotiazole, XXVII Konferencija Srpskog kristalografskog društva, Kragujevac (2021), 66; ISBN: 978-86-6009-085-2, **M64**

3.12. D.Lj. Stojković, V.V. Jevtić, Đ.S. Petrović, **S.S. Jovičić Milić**, Synthesis and characterization of platinum(II) complex with 2-amino-6-methylbenzo thiazole, 8th Conference of Young Chemists of Serbia, Belgrade, 2022, 76; ISBN 978-86-7132-080-1, **M64**

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

СИНТЕЗА, СТРУКТУРНА, ТЕОРИЈСКА И БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМ(II) ЈОНА СА ЕТИЛЕНДИАМИНСКИМ ДЕРИВАТИМА ТРИПТОФАНА И СУПСТИТУИСАНИМ 2-АМИНОТИАЗОЛИМА

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада.*

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 19.12.2022. године

Jovičić Milić

потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

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

СИНТЕЗА, СТРУКТУРНА, ТЕОРИЈСКА И БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМ(II) ЈОНА СА ЕТИЛЕНДИАМИНСКИМ ДЕРИВАТИМА ТРИПТОФАНА И СУПСТИТУИСАНИМ 2-АМИНОТИАЗОЛИМА истоветне.

У Крагујевцу, 19.12.2022. године

J. Jovičić Milić

потпис аутора

Образац 3

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Сандра С. Јовичић Милић,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

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

СИНТЕЗА, СТРУКТУРНА, ТЕОРИЈСКА И БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМ(II) ЈОНА СА ЕТИЛЕНДИАМИНСКИМ ДЕРИВАТИМА ТРИПТОФАНА И СУПСТИТУИСАНИМ 2-АМИНОТИАЗОЛИМА

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

Овом Изјавом такође

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам[1]

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

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

1) Ауторство

2) Ауторство - делити под истим условима

3) Ауторство - без прерада

4) Ауторство - некомерцијално

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

6) Ауторство - некомерцијално - без прерада[2]

У Крагујевцу, 19.12.2022. године,

J. Jovičić Milić

потпис аутора

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