



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**

Душан Љ. Томовић

**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ИСПИТИВАЊЕ
БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ БИНУКЛЕАРНИХ
КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА S-АЛКЕНИЛ ДЕРИВАТИМА
ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: др Гордана П. Радић, ванредни професор

Крагујевац, 2018. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>
Име и презиме: Душан Љ. Томовић
Датум и место рођења: 03.11.1988. год. Крагујевац, Република Србија
Садашње запослење: Асистент на Факултету медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, Република Србија
<i>II Докторска дисертација</i>
Наслов: Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине
Број страница: 120
Број слика: 27
Број библиографских података: 240
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Фармација
Ментор: проф. др Гордана П. Радић
<i>III Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 30.12.2016. год.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-584/16 од 07.06.2017.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Небојша Н. Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Микробиологија и имунологија; Онкологија</i>, председник;2. Проф. др Тибор Ј. Сабо, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област <i>Општа и неорганска хемија</i>, члан;3. Доц. др Верица В. Јевтић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Неорганска хемија</i>, члан;4. Доц. др Јована В. Богојески, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Неорганска хемија</i>, члан;5. НС др Ивана Д. Радојевић, научни сарадник Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за научну област <i>Биологија</i>, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: <ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Небојша Н. Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Микробиологија и имунологија; Онкологија</i>, председник;2. Проф. др Тибор Ј. Сабо, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област <i>Општа и неорганска хемија</i>, члан;3. Доц. др Верица В. Јевтић, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Неорганска хемија</i>, члан;4. Доц. др Јована В. Богојески, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Неорганска хемија</i>, члан;5. НС др Ивана Д. Радојевић, научни сарадник Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, за научну област <i>Биологија</i>, члан.
Датум одбране дисертације:

Апстракт

Увод: У овој Докторској дисертацији испитиване су кинетичка, антимикуробна и антитуморска активност новосинтетисаних бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине. Истраживања у овој области су фокусирана на проналажење биолошки активних комплексних једињења. Тиосалицилна киселина и њени деривати су веома интересантни као лиганди, јер показују велику разноликост у могућностима за координовање.

Материјал и методе: У оквиру овог истраживања описани су поступци синтезе S-алкенил деривата тиосалицилне киселине (алкенил = пропенил- и изобутенил-) и одговарајућих бинуклеарних комплекса бакра(II). Састав награђених једињења потврђен је на основу резултата елементарне микроанализе. Структура синтетисаних бидентатних лиганата окарактерисана је на основу резултата инфрацрвене (IR) и нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије

(¹H и ¹³C NMR), док је структура одговарајућих комплекса претпостављена на основу резултата инфрацрвене (IR) спектроскопије, магнетних мерења и моларне проводљивости. Стварна структура синтетисаног комплекса бакра(II), предвиђена је на основу резултата рендгенске структурне анализе. Антимикуробна активност је испитивана микродилуционом методом са ресазурином. Супституционе реакције су праћене у присуству гуанозин-5'-монофосфата, као и СТ-ДНК (ДНК из тимуса говечета). Цитотоксична активност новосинтетисаних једињења је испитивана помоћу МТТ колориметријске технике.

Резултати: Потврђена је стварна структура бинуклеарног комплекса бакра(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине. Међу Грам-позитивним бактеријама, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 је показао највећу отпорност, док је најосетљивији био *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Комплекси бакра(II) показали су ниску антифунгалну активност. Реакције супституције испитиваних комплекса биле су веома брзе, а показано је да могу интераговати са СТ-ДНК. Бакар(II)-комплекси су показали незнатно нижу цитотоксичност у поређењу са *цисплатином*. Њихов цитотоксични ефекат при концентрацијама од 250 до 1000 µМ на НСТ-116 ћелије је као ефекат *цисплатине*.

Закључак: Откриће комплекса бакра(II) са антимикуробном и антитуморском активношћу може битно подстаћи даља истраживања у области координовања бакар(II)-јона са лигандима од фармаколошког значаја, који ће имати шири спектар дејства у медицинској примени са прихватљивим крајњим исходом лечења.

Кључне речи: S-алкенил деривати тиосалицилне киселине, бинуклеарни комплекси бакра(II), кристална структура, биолошка активност

Abstract

Introduction: This PhD thesis covers the examination of the kinetic, antimicrobial and anticancer activities of the newly synthesized binuclear complexes of copper(II) with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. Researches in this area are focused on finding biologically active complex compounds. Thiosalicylic acid and its derivatives are very interesting as ligands because they manifest a great diversity in coordination possibilities.

Materials and methods: This study described the methods for the synthesis of the S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid (alkenyl = propenyl- and isobutenyl-) and the corresponding binuclear complexes of copper(II). The composition of the obtained compounds was confirmed by the results of the elemental microanalysis. The structure of synthesized bidentate ligands was characterized by the results of infrared (IR) and nuclear-magnetic-resonance spectroscopy (^1H and ^{13}C NMR), while the structure of the corresponding complexes was assumed by the results of infrared (IR) spectroscopy, magnetic measurements and molar conductivity. The real structure of the synthesized complex copper(II) was predicted by the results of the X-ray structural analysis. The antimicrobial activity was examined by the microdilution method with resazurin. The substitution reactions were monitored in the presence of guanosine-5'-monophosphate, as well as CT-DNA (calf thymus DNA). The cytotoxic activity of the newly obtained compounds was examined by MTT colorimetric technique.

Results: The real structure of the binuclear complex of copper(II) with S-isobutenyl derivative of thiosalicylic acid was confirmed. Among Gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 manifested the highest resistance, while *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* was the most sensitive one. Copper(II)-complexes manifested a low antifungal activity. Substitution reactions of the tested complexes were very fast, and it was shown that they could interact with CT-DNA. Copper(II)-complexes displayed slightly lower cytotoxicity compared to *cisplatin*. Copper(II)-complexes with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid (for concentrations from 250 to 1000 μM) had cytotoxic effect on HCT-116 cells as *cisplatin*.

Conclusion: The discovery of the copper(II)-complexes with antimicrobial and anticancer activity can significantly stimulate further research in the field of copper(II) coordination with ligands of pharmacological significance, which will have a wider spectrum of effects in medical applications with the acceptable final outcome of a treatment.

Key words: S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid, binuclear copper(II)-complexes, crystal structure, biological activity

*„Неки људи виде ствари какве јесу и питају зашто.
Сањао сам ствари које никад нисам видео и рекао зашто не.”
Роберт Ф. Кенеди*

На крају једне од најважнијих и најозбиљнијих деоница у мом школовању, желео бих да од срца упутим речи захвалности људима који су ми били покретачка енергија да завршим ову Докторску дисертацију.

Пре свега, срдечно се захваљујем мојој менторки проф. др Гордани П. Радић на разумевању, подршци (и када није све ишло како треба) и сугестијама током дизајнирања, спровођења истраживања, сумирања и публикавања резултата, као и на читању и прегледању рукописа ове Докторске тезе.

Такође се захваљујем и члановима комисије, проф. др Небојши Арсенијевићу, проф. др Тибору Сабоу, доц. др Верици Јевтић, доц. др Јовани Богојески и научној сарадници др Ивани Радојевић, који су читањем рукописа овог рада својим саветима помогли да рад добије на стручности, јасноћи и квалитету.

Посебно драгим колегама са катедре дугујем захвалност на добронамерним и пријатељским саветима. Наш заједнички рад остаће ми у најлепшем сећању и бити подстрек за даље напредовање и усавршавање.

Неизмерно хвала породици за љубав коју сте ми увек пружали. Хвала вам што сте мој понос и инспирација и вама посвећујем ову Докторску дисертацију.

Хвала свим пријатељима, рођацима и колегама који су веровали у мене.

Ваши Дуле

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. БАКАР	2
1.1.1. Хомеостаза бакра	3
1.1.2. Бакар и поремећаји људског здравља	3
1.1.3. Координовање бакар(II)-јона у комплексним једињењима	6
1.2. ТИОСАЛИЦИЛНА КИСЕЛИНА	9
1.2.1. Деривати тиосалицилне киселине и њихова примена	13
1.3. СТРУКТУРА И КАРАКТЕРИСТИКЕ КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА ТИОСАЛИЦИЛНОМ КИСЕЛИНОМ КАО ЛИГАНДОМ.....	17
1.4. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА БАКРА(II).....	19
1.4.1. Антимикробна активност комплекса бакра(II)	19
1.4.2. Интеракције са дезоксирибонуклеинском киселином (ДНК)	24
1.4.2.1. Интеракције бакар(II)-комплекса са нуклеобазама	24
1.4.3. Антитуморска активност комплекса бакра(II) и деривата тиосалицилне киселине као независних лиганата	29
1.4.3.1. Комплекси бакра(II) као инхибитори топоизомеразе I и II	35
1.4.3.2. Комплекси бакра(II) као протеазом инхибитори	36
2. ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	37
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	39
3.1. ПОСТУПАК СИНТЕЗЕ ЛИГАНАДА.....	40
3.2. ПОСТУПАК СИНТЕЗА КОМПЛЕКСА	41
3.2.1. Синтеза комплекса бакра(II) са S-пропенил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1).....	41
3.2.2. Синтеза комплекса бакра(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2)	41
3.3. АНАЛИЗЕ И МЕТОДЕ МЕРЕЊА	42
3.3.1. Елементална микроанализа.....	42

3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија	42
3.3.3. Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија.....	42
3.3.4. Магнетна мерења	42
3.3.5. Моларна проводљивост.....	43
3.3.6. Рендгентска структурна анализа	44
3.3.6.1. Рендгенска структурна анализа комплекса бакар(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$ (C2)...	44
3.4. БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА.....	46
3.4.1. <i>In vitro</i> антимикробна активност	46
3.4.1.1. Хранљиве подлоге и растварање испитиваних супстанци	46
3.4.1.2. Припремање и стандардизација суспензија	47
3.4.1.3. Испитивани микроорганизми	47
3.4.1.4. Испитивање осетљивости тестираних микроорганизама	48
3.4.1.4.1. Микродилуциона метода	49
3.4.2. Кинетичка мерења	50
3.4.3. Интеракције комплекса са ДНК	52
3.4.3.1. Апсорпциона спектроскопска мерења	52
3.4.3.1.1. UV-Vis ДНК интеракције	52
3.4.3.1.2. UV-Vis апсорбционе студије.....	53
3.4.3.2. Флуоресцентна мерења	53
3.4.3.3. Мерења вискозности.....	54
3.4.4. <i>In vitro</i> антитуморска активност	54
3.4.4.1. Припремање раствора испитиваних једињења	54
3.4.4.2. Ћелијска култура.....	55
3.4.4.3. Цитотоксични тестови	55
3.4.4.3.1. МТТ колориметријски тест	55
4. РЕЗУЛТАТИ	58
4.1. СИНТЕЗЕ И ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА	59
4.1.1. Нови бакар(II) комплекси са одговарајућим S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-alkenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$	59

4.1.2. Елементална микроанализа новосинтетисаних бакар(II)-комплекса	60
4.1.3. Инфрацрвени спектри S-алкенил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бакар(II)-комплекса	62
4.1.4. Нуклеарно-магнетно-резонанциони (¹ H и ¹³ C) спектри S-алкенил деривата тиосалицилне киселине	62
4.1.5. Магнетна мерења	63
4.1.6. Моларна проводљивост.....	63
4.1.7. Кристална структура бинуклеарног комплекса бакра(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине, [Cu ₂ (S-isobutenyl-thiosal) ₄ (DMSO) ₂] (C2)	63
4.2. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ	68
4.2.1. <i>In vitro</i> антимикробна активност	68
4.2.2. Супституционе реакције [Cu ₂ (S-alkenyl-thiosal) ₄ (H ₂ O) ₂] са 5'-GMP	70
4.2.3. Интеракције испитиваних комплекса бакра(II) са ДНК	73
4.2.4. <i>In vitro</i> антитуморска активност	77
5. ДИСКУСИЈА	79
5.1. СИНТЕЗЕ И ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА	81
5.2. ИСПИТИВАЊА <i>IN VITRO</i> АНТИМИКРОБНЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА S-АЛКЕНИЛ ДЕРИВАТИМА ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ	85
5.3. СУПСТИТУЦИОНЕ РЕАКЦИЈЕ КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА S-АЛКЕНИЛ ДЕРИВАТИМА ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ СА 5'-GMP И ЊИХОВА ИНТЕРАКЦИЈА СА ДНК	87
5.4. ИСПИТИВАЊА <i>IN VITRO</i> АНТИТУМОРСКЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА S-АЛКЕНИЛ ДЕРИВАТИМА ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ	89
6. ЗАКЉУЧАК	92
7. СПИСАК СКРАЋЕНИЦА И АКРОНИМА.....	95
8. ЛИТЕРАТУРА	99
9. БИОГРАФИЈА АУТОРА.....	121
10. БИБЛИОГРАФИЈА АУТОРА	123
11. ПРИЛОЗИ.....	127

1. УВОД

1.1. БАКАР

Бакар је важан биогени елемент који је састојак неких једињења која људи у организам уносе егзогеним путем. Многобројне студије су потврдиле вишеструку улогу бакра у биолошким системима. Улога бакра је повезана са церулоплазмином, албумином и другим протеинима. Посебна пажња је усмерена и на учешће бакра у хуманим болестима при чему је фокус на молекуларној физиологији транспорта бакра [1]. Актуелна истраживања су усмерена и на испитивање хомеостазе бакра, његов утицај на метаболизам гвожђа као и улоге бакра у биолошким процесима који су физиолошки или патолошки код људи [2,3].

Повећано интересовање за комплексе бакра проистиче из њихове потенцијалне употребе као антибактеријских, антивирусних, антиинфламаторних, антитуморских агенаса, инхибитора ензима или хемијских нуклеаза. Поједина истраживања су указала на изражену биохемијску активност комплекса бакра(II) са нестероидним антиинфламаторним лековима (NSAIDs). Бројни комплекси бакра(II) са нестероидним антиинфламаторним лековима показују повећани антиинфламаторни и антиулцерозни ефекат уз смањену гастроинтестиналну токсичност у поређењу са некомплексираним лековима [4]. Они обухватају класу потенцијалних антиинфламаторних лекова са мање израженим споредним ефектима за чије деловање је одговорна супероксид-дизмутаза (SOD)-миметичка активност. Друге студије су пак концентрисане на хемотерапеутска својства комплексних једињења бакра [5,6]. Многи аутори скрећу пажњу и на антивирусну активност комплекса бакра(II). На пример, показано је да се инфективност вируса инфлуенце А смањује на површинама које су обложене багром [7]. Проучавања у овој области могу бити од помоћи у дизајнирању и производњи бакар импрегнираних материјала који поседују широк спектар антимикуробне активности. Значај тих материјала се огледа у потенцијалној деактивацији неких вируса (HIV или H1N1 вируса) [7,8].

1.1.1. Хомеостаза бакра

Бакар унет путем исхране (органски бакар) се прерађује у јетри, а затим даље транспортује у организму без могућности изазивања токсичних ефеката. Неоргански бакар, онај који се може наћи у пијаћој води и у препаратима који се користе као допуна исхрани, углавном заобилази јетру и доспева у крв у слободном облику. Такав бакар је потенцијално токсичан, јер може продрети кроз крвно-мождану баријеру [9].

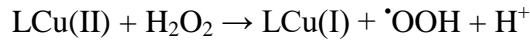
Око 50% просечне дневне потребе за уносом бакра, која износи око 25 μmol (1,5 mg), се апсорбује из желуца или танког црева. Апсорбовани бакар се транспортује до јетре путем порталног система циркулације везан за албумине, а затим преноси до периферних ткива, углавном везан за церулоплазмин, а у мањој мери за албумине. Вишак бакра излучује се путем жучи до црева одакле се из организма избацује преко фекалија (12,5 $\mu\text{mol}/24$ часа).

Бакар улази у састав бројних металоензима који су укључени у формирање хемоглобина, лек/ксенобиотик метаболизам, метаболизам угљених хидрата, биосинтезу катехоламина, умрежавање колагена, еластина и кератина из косе као и у антиоксидативним одбрамбеним механизмима [9]. Бакар-зависни ензими, цитохром С оксидазе, супероксид дисмутазе, фероксидазе, моноамин оксидазе и допамин β -монооксидазе функционису у циљу смањења продукције реактивних кисеоничних врста или молекуларног кисеоника. Симптоми који могу бити повезани са недостатком бакра код људи су нормоцитна, хипохромна анемија, леукопенија и остеопороза. Дефицит бакра се ретко прати у општој популацији [10].

1.1.2. Бакар и поремећаји људског здравља

Поремећаји повезани са оксидативним стресом. Иако хомеостатски механизми играју значајну улогу у превенцији токсичности бакра, повишен ниво бакра може довести до нежељених ефеката на здравље, укључујући анемију, имунотоксичност, као и оштећења јетре и бубрега [11]. Ови ефекти углавном настају услед оксидативног оштећења мембрана или макромолекула. С обзиром на капацитет бакра за продукцију великих количина реактивних кисеоничних врста (ROS - **R**eactive **o**xxygen **s**pecies), вишак бакра може да доведе до здравствених поремећаја који су повезани са оксидативним стресом, од којих се многи могу делимично повезати са његовом редукционом активношћу. Бакар олакшава оксидативно оштећење ткива путем

слободних радикала аналогно Фентоновој реакцији [12]. Применом електрон спин резонантне спектроскопије доказано је настајање хидроксилних радикала уз помоћ "spin-trapping" технике. ROS се производе путем реакција фентонског типа на следећи начин (где L представља неки органски лиганд):



Недостатак бакра такође утиче, индиректно или директно, на компоненте оксидативног одбрамбеног система и као резултат тога повећава се продукција ROS и оксидативно оштећење липида, ДНК и протеина, што је примећено у моделима хуманих ћелијских култура или код клиничких синдрома тешких недостатака бакра [2,13]. Поред тога, бакар се може везати за слободне тиолне групе цистеина узрокујући оксидацију и накнадно укрштање протеина што доводи до њиховог поремећаја (смањења) активности [14].

Ацерулоплазминемија. Церулоплазмин је гликопротеин који садржи бакар и производи се у јетри, а притом везује око 95% бакра у серуму. Овај гликопротеин показује фероксидазну активност зато што катализује превођење Fe(II) у Fe(III) јон који се затим преноси до трансферина. Потпуно одсуство серумског церулоплазмينا (ацерулоплазминемија) може довести до нагомилавања гвожђа унутар ретикулоендотелијалног система и паренхималних ћелија [15]. Важно је напоменути да је ацерулоплазминемија аутозомно рецесивни поремећај који доводи до измењеног метаболизма гвожђа. Прати га мутација алела за церулоплазмин на хромозому 3q [10]. На клиничком нивоу манифестације ацерулоплазминемије се карактеришу испољавањем: шећерне болести, пигментне дегенерације ретине, дистоније, екстрапирамедалних знакова, церебралне атаксије и деменције. Иако оштећење мозга у ацерулоплазминемији није довољно разјашњено, добро је познато да оксидативни стрес посредован гвожђем може бити повезан са смрћу неуронских ћелија [16].

Вилсонова болест. Вилсонова болест је аутозомно рецесивна болест за коју је карактеристичан поремећај метаболизма бакра. Примарни је генетски дефект АТР7В гена [16,17]. Биолошка улога АТР7В гена је кодирање протеина за транспорт бакра који се налази на Голџијевом апарату и за пренос бакра у секреторни пут где ће бити излучен у жуч [18]. Главни допринос патофизиологији Вилсонове болести је оксидативно оштећење посредовано багром, активацијом путева ћелијске смрти, што

на крају доводи до нагомилавања вишка бакра у екстрахепатичним ткивима. Хепатично преоптерћење бакром, повезано са Вилсоновом болешћу, хистопатолошки се манифестује запаљењем и цитоскелетним променама у хепатоцитима. Долази до повећања јетре и на њој се јављају чворићи. Код већине болесника болест се манифестује постепеним развојем цирозе [19]. Клиничком сликом болести доминирају тешки неуролошки симптоми. Ако је дијагностикована на време, може се третирати на неколико начина, укључујући примену хелационих средстава, дијете са ограниченим уносом бакра и појачана цинк суплементација [20].

Менкесова болест. Менкесова болест је рецесивни поремећај узрокован дефектима у гену који кодира АТП-азу одговорну за транспорт бакра (АТР7А) [21]. Код људи, АТР7А функционише као интрацелуларна пумпа за транспорт бакра на Голџијевом апарату. Преузимање бакра и излучивање путем јетре су нормални код оболелих од ове болести, али је апсорпција бакра из гастроинтестиналног тракта озбиљно смањена. Због знатно смањене апсорпције бакра код оболелих од Менкесове болести, инкорпорација бакра у ензиме који га садрже, а који су неопходни за нормалан раст и развој, је редукована [22]. Периферна ткива показују тенденцију акумулирања бакра у виду бакарног металотионеина. На клиничком нивоу, Менкесова болест се карактерише прогресивним неуролошким оштећењем и смрћу у раном неонаталном периоду. Блокада интестиналне апсорпције бакра се значајно одражава на недостатак бакра у мозгу фетуса који је у развоју, што доводи до тешког оштећења мозга [10].

Алцхајмерова болест. То је најчешћи облик деменције који се карактерише прогресивним когнитивним и функционалним оштећењима. Пронађено је да повећан ниво бакра у цереброспиналној течности прати нормалну концентрацију бакра у плазми код пацијената са Алцхајмеровом болешћу [23], док су други истраживачи пријавили да је пронађен повишен ниво бакра у плазми код оболелих од поменуте болести. Осим тога, у једној проспективној студији је примећено да повећан унос бакра путем исхране у комбинацији са намирницама богатим засићеним и *trans*-масним киселинама може бити повезан са убрзаним слабљењем когнитивне функције [24]. Могућа повезаност бакра са испољавањем ове болести се огледа кроз интеракцију са прекурсорима амилоидног протеина и β -амилоидног пептида у самоагрегирајућим плаковима и неурофибриларним формацијама, карактеристичним за Алцхајмерову болест, што доприноси патогенези ове болести путем ћелијског оксидативног стреса [25]. Јони бакра могу индуковати агрегацију амилоидног пептида и производњу ROS који оксидују β -амилоидни пептид. Повишен ниво бакра инхибира производњу

β -амилоидног пептида [9,26], док његов дефицит повећава секрецију тог пептида. Недостатак бакра резултира и повећаном продукцијом ROS и оксидативним оштећењем протеина [2]. Широко је прихваћено да код пацијената са Алцхајмеровом болешћу постоји абнормална дистрибуција бакра у мозгу са акумулацијом овог елемента у амилоидним плаковима и недостатком бакра у суседним ћелијама [27]. Међутим, неопходна су додатна истраживања како би се у потпуности расветлила улога јона бакра у овој болести.

Инфламација. Церулоплазмин делује као реактивни протеин акутне фазе у стресу и траумама. Као последица тога, повишене концентрације бакра су пронађене као одговор на упале, инфекције и различите хроничне болести, као што је артритис. Серумски ниво бакра је већи од нормалног код различитих инфламаторних болести код људи [28]. Виши ниво церулоплазмине је одговоран за повећање серумског нивоа бакра. Уочен је антиинфламаторни ефекат бакра и код људи. Са друге стране, акутне или хроничне упале активирају промене метаболизма бакра, што се одражава на промену нивоа бакра у серуму и ткивима [29]. Повећање количине серумског бакра код запаљенских процеса може проузроковати повећање нивоа церулоплазмине, који је протеин акутне фазе. Добро је познато да је улога церулоплазмине код артритиса неутрализација слободно радикалских кисеоничних врста, углавном анјонског супероксида, у покушају да се заустави хроничан процес [30,31].

Канцер. Повећан ниво церулоплазмине и бакра у различитим ткивима повезан је са прогресијом рака [32]. Иако прецизна улога бакра у развоју канцера тренутно није довољно позната, могуће је укључивање кроз производњу ROS у оксидативном стресу. Недавно је показано да су протеини бакра повезани са метаболичким променама у ћелијама карцинома и, што је најважније, играју улогу у ангиогенези стимулацијом пролиферације и миграције хуманих ендотелијалних ћелија [6].

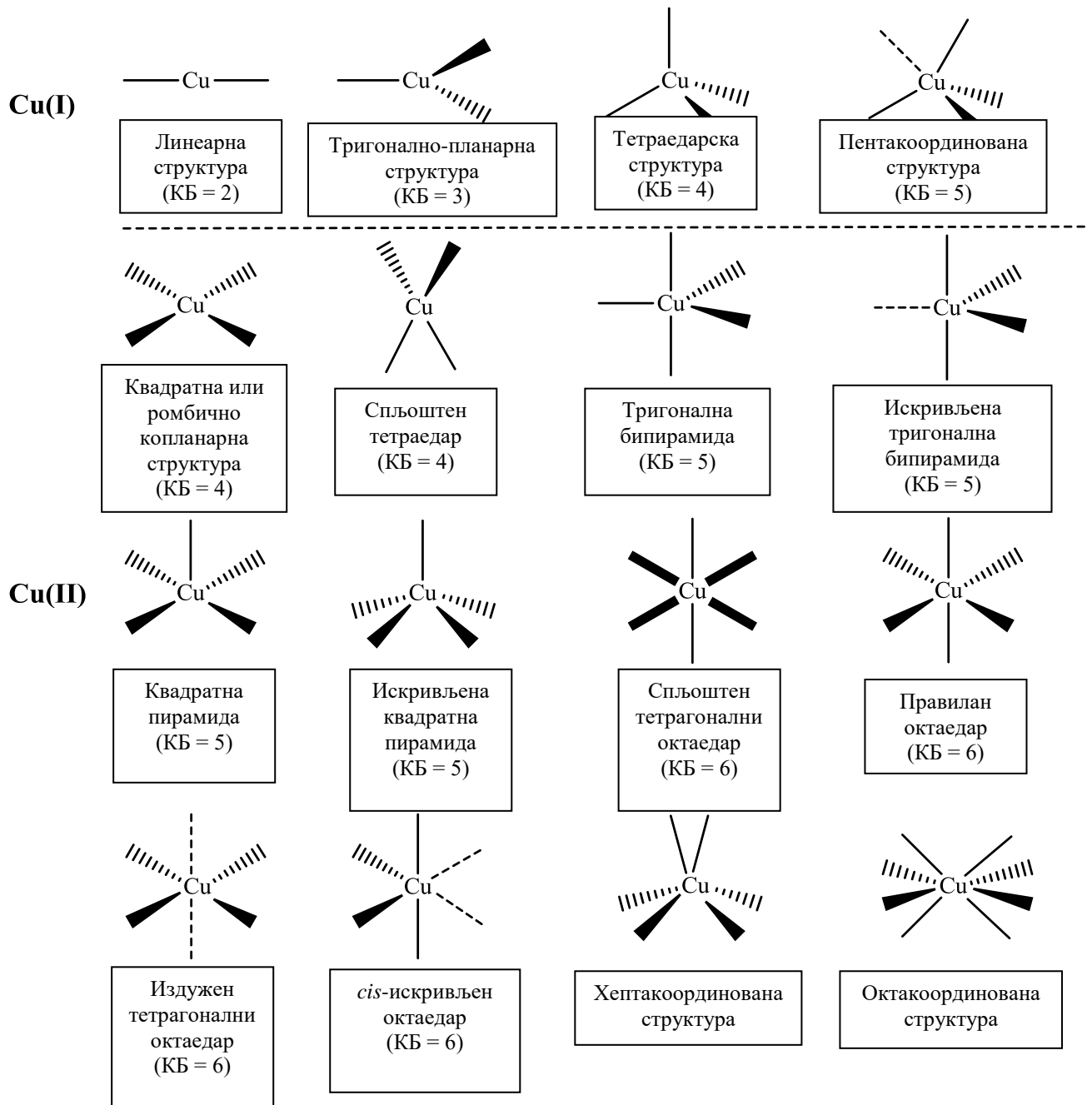
1.1.3. Координовање бакар(II)-јона у комплексним једињењима

Координациона хемија бакар(II)-јона је врло разноврсна, јер овај јон може да гради комплексе са лигандима различите дентатности. Електронска конфигурација бакар(II)-јона је $(Ar)3d^9$. У највећем броју једињења, у чији састав улази овај прелазни метал, бакар се налази у оксидационом стању +2. То није једино оксидационо стање овог елемента. Бакар се може у једињењима срести и у оксидационим стањима: 0, +1, +3 и +4.

Координциони број (КБ) у комплексима бакра(II) варира од 4 до 8 (Слика 1). Најчешће се могу видети следеће геометријске структуре комплекса: квадратно-планарна (КБ = 4), тригонално бипирамидална или квадратно пирамидална (КБ = 5) и октаедарска (КБ = 6). Правилна октаедарска геометрија се врло ретко среће. Углавном комплекси са координционим бројем 6 имају умерену или благу Јан-Талерову (Jahn-Teller) дисторзију [33].

Велика разноликост геометријских структура омогућава координовање бакар(II)-јона са лигандима који могу бити потпуно различити што се дентатности тиче (од монодентатних до хексадентатних). Координовање се најчешће врши преко тврдих донорских атома (sp^3 хибридизовани атоми азота и кисеоника).

Такође, редокс потенцијал физиолошки доступног $Cu(I)/Cu(II)$ пара варира драматично у зависности од одговарајућег лигандног окружења (донорски атоми, геометрија и могућност хелатације) и рН вредности [6].



Слика 1. Координациони бројеви и геометрија комплексних једињења бакра

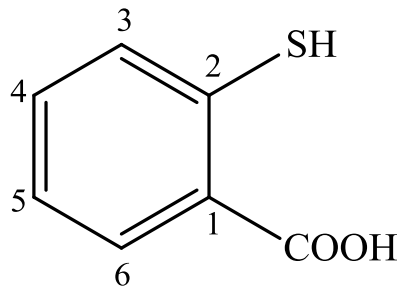
1.2. ТИОСАЛИЦИЛНА КИСЕЛИНА

Тиосалицилна киселина (2-меркаптобензоева киселина, *o*-HS-C₆H₄-COOH) се може координовати за велики број јона метала, обично у депротонваној форми. То својство показује, јер се као лиганд може понашати као тврда (карбоксилат) и мека (тиолат) база. Координациона хемија тиосалицилне киселине као лиганда има дугу историју. Као ефективни лиганди тиосалицилне киселине помињу се тиоетри (RS-C₆H₄-COOH) и карбоксилатни естри (HS-C₆H₄-COOR) тиосалицилне киселине. Велику могућност координовања показују и азот-супституисани деривати 2-меркаптотоникотинске киселине и 3- и 4- изомери меркаптобензоеве киселине [34].

Тиосалицилна киселина је хибрид тиол-карбоксилне киселине познатије под алтернативним називима попут: 2-меркаптобензоева киселина, *орто*-меркаптобензоева киселина или 2-сулфанилбензоева киселина. Она је комерцијално лако доступна супстанца беличасте боје, без мириса, у чврстом агрегатном стању. Лако је растворљива у нижим алкохолима и у води при алкалним условима, док је растворљивост у води при нижим рН вредностима слабо изражена. Једињење је дипротична киселина са рКа вредностима 4,92 и 9,96 за први и други степен дисоцијације [35]. Ти наводи су према најновијим истраживањима другачији и износе за рКа₁ = 3,76 ± 0,05 и рКа₂ = 8,33 ± 0,07. Сигнали из ¹Н и ¹³С NMR спектра тиосалицилне киселине представљени су у Табели 1, док је нумерација атома поменуте киселине представљена на Слици 2.

Табела 1. Вредности хемијских померања за водоникове и угљеникове атоме у молекулу тиосалицилне киселине

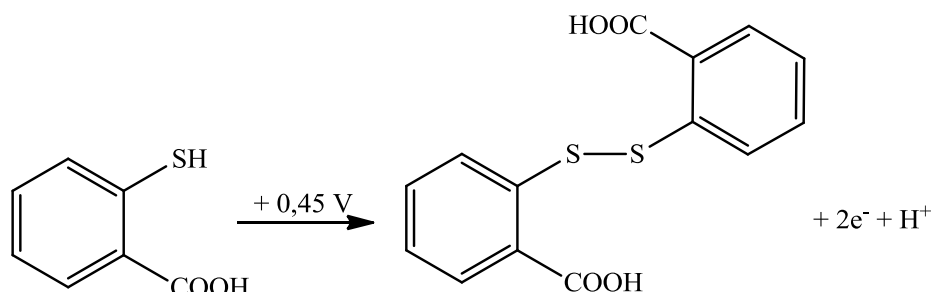
¹ H NMR спектар тиосалицилне киселине			¹³ C NMR спектар тиосалицилне киселине		
	Растварач			Растварач	
	CDCl ₃	(CD ₃) ₂ SO		CDCl ₃	(CD ₃) ₂ SO
H3	7,31 dd (J 7,1; 1,2)	7,49 dd (J 8,1; 0,9)	C1	124,8	126,5
H4	7,35 ddd (J 7,5; 7,5; 1,4)	7,35 ddd (J 7,8; 7,8; 1,7)	C2	139,3	138,1
H5	7,10 ddd (J 7,5; 7,5; 1,2)	7,16 ddd (J 7,5; 7,5; 1,1)	C3	131,1	130,9
H6	8,12 dd (J 7,8; 1,8)	7,91 dd (J 8,0; 1,4)	C4	133,3	132,4
ОН	неопажено	13,01 br	C5	124,8	124,6
SH	4,61 s	5,33 br	C6	132,7	131,4
			C=O	171,5	167,6



Слика 2. Обележавање атома у тиосалицилној киселини

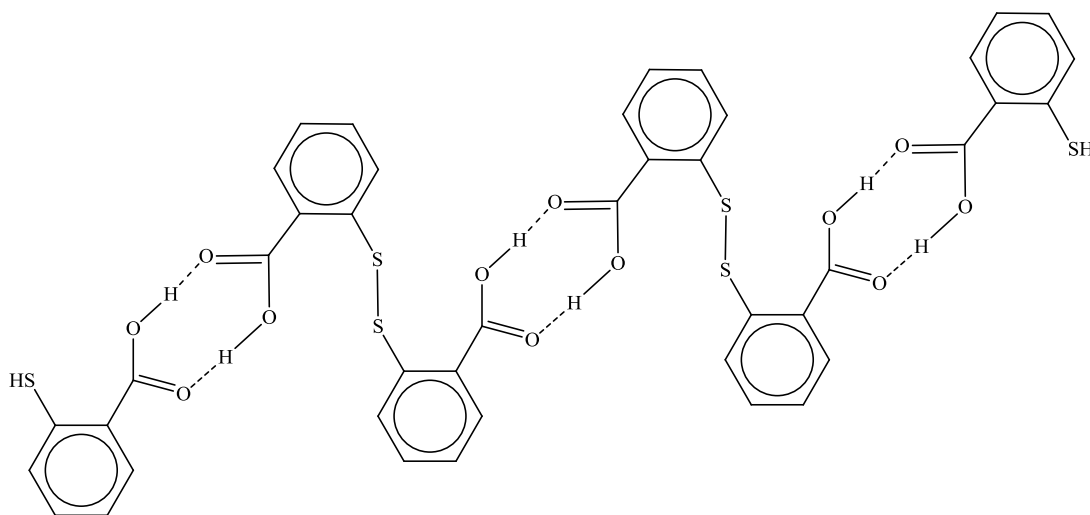
Тиосалицилна киселина је постојана на ваздуху у чврстом агрегатном стању. Такође се у киселим условима она јавља у непромењеном облику. Повећањем рН-вредности средине, 50% молекула се оксидује до одговарајућег дисуфида $\text{HOOC-C}_6\text{H}_4\text{-S-S-C}_6\text{H}_4\text{-COOH}$ (примећено при $\text{pH} = 6$) што је интересантно за електрохемијска истраживања (Слика 3) [36]. На $\text{pH} = 7$, целокупна количина тиосалицилне киселине се оксидује до дисулфидне форме. Да повећање рН-вредности

средине доводи до настанка дисулфидних форми овог једињења потврђено је када су приликом покушаја да се добију калцијумове, стронцијумове или баријумове соли тиосалицилне киселине у базном амонијачном раствору настали комплекси поменутих метала са дисулфидом тиосалицилне киселине [37].



Слика 3. Оксидација тиосалицилне киселине до одговарајућег дисулфида

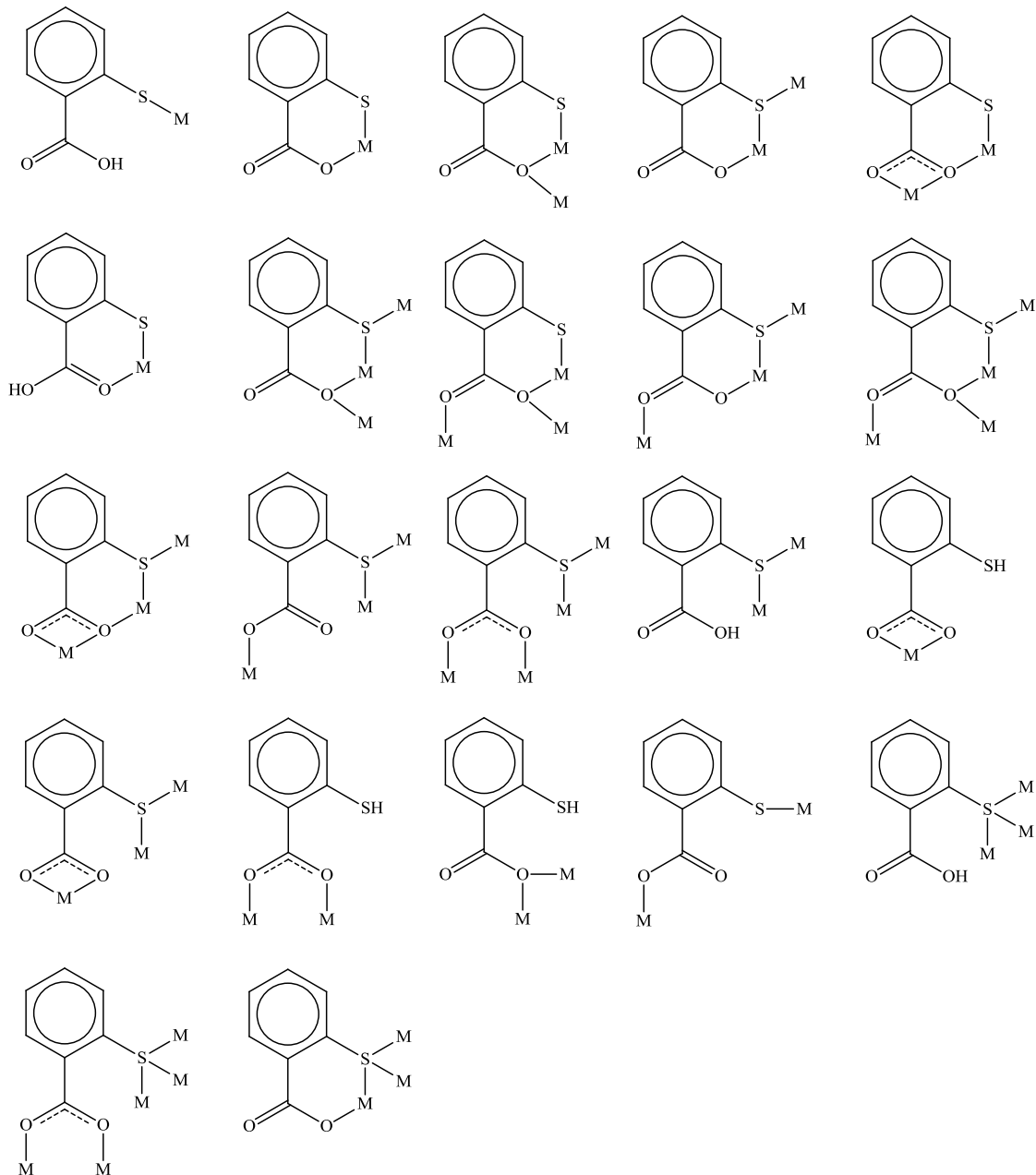
Рендгенском кристалном анализом потврђена је и тиол-дисулфидна ко-кристална структура $\text{HS-C}_6\text{H}_4\text{-COOH HOOC-C}_6\text{H}_4\text{-S-S-C}_6\text{H}_4\text{-COOH}$ [36]. Основна јединица кристала је тетрамерна јединица формирана димеризацијом два молекула тиосалицилне киселине (димерна формација карбоксилне киселине), која се онда на сваком крају повезује са још једним молекулом тиосалицилне киселине, формирајући, такође, димерни облик карбоксилне киселине (Слика 4).



Слика 4. Градивна јединица структуре кристала
 $\text{HS-C}_6\text{H}_4\text{-COOH HOOC-C}_6\text{H}_4\text{-S-S-C}_6\text{H}_4\text{-COOH}$

Узимајући у обзир да тиосалицилна киселина у свом молекулу садржи и „тврде“ (кисеоникови атоми) и „меке“ (сумпоров атом) доноске атоме, није изненађујуће што

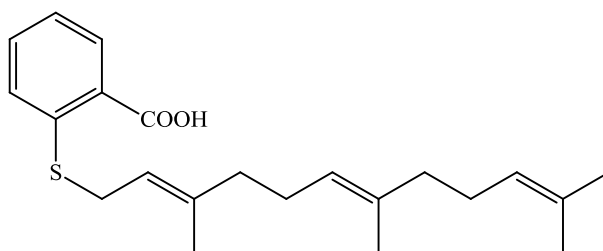
тиосалицилатни лиганд показује низ могућности за координовање са различитим градитељима комплекса. Неки чешћи начини координовања, који су уочени у структурама метал-тиосалицилатних комплекса, приказани су на Слици 5. При представљању ових различитих начина координовања није разматрано протоновано стање тиосалицилатног лиганда. У већини случајева координовања неопходно је прво да дође до депротоновања карбоксилне групе тиосалицилатног лиганда. За комплексе у којима је начин везивања тиосалицилатног лиганда непознат, понекад се користи скраћеница tsal (или Htsal у случају монопротичног лиганда) [38].



Слика 5. Најчешћи начини координовања тиосалицилатне киселине у комплексним једињењима

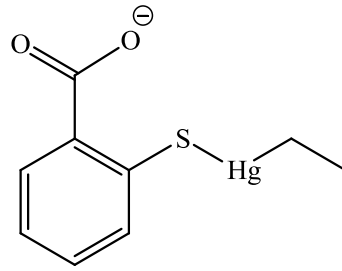
1.2.1. Деривати тиосалицилне киселине и њихова примена

Један од значајних деривата, *S-trans*, *trans*-фарнезилтиосалицилна киселина (ФТС) (Слика 6) је нетоксични Ras (Ras proteins – **Rat sarcoma proteins**) антагониста [39-41]. Може да инхибира онкогено активирани Ras и заустави раст Ras-зависних тумора. Познато је да развој многих малигних обољења удружен са хроничном активацијом Ras сигналног система. Ras протеини припадају породици малих ГТПаза које делују као кључни регулатори ћелијских сигналних путева контролишући тако пролиферацију ћелија, њихову диференцијацију [42], миграције [43-45], преживљавање и смрт [46]. ФТС показује антиинфламаторну активност, а показало се да је ефикасна и код поновљених хематолошких малигнитета [39]. Салирасиб (фарнезилтиосалицилна киселина) је коришћен *in vitro* као потенцијални хемиотерапеутик избора код пацова који су оболели од глиобластома, јер не изазива неспецифичну неуротоксичност [41].



Слика 6. Структура фарнезилтиосалицилне киселине

Од 1931. године натријум-етилмеркуритиосалицилат (Тимеросал-Слика 7) је био коришћен као адитив бактерицидних и фунгицидних лекова (који су паковани и дистрибуирани у облику мулти-дозних ампула) и у вакцинама [47-50]. Више деценија од увођења у употребу, ово једињење је коришћено без обраћања довољно пажње да ли може проузроковати неке опасне ефекте на људски организам када се примени путем интрамускуларних или интравенских инјекција. Светска здравствена организација (WHO - **World Health Organization**) сматра да су мале дозе тимеросала безбедне за вишекратну примену вакцина код трудница и одојчади.



Слика 7. Структура тимеросала

Због сумње на неуротоксичне ефекте [47,48,51] код људи који су користили лекове где је тимеросал употребљаван као адјуванс, владине организације појединих земаља су препоручиле да се укине коришћење тимеросала као адјуванса. Привремено су, 2001. године, повучене из рутинских распореда вакцинасања код деце све такве вакцине у Европи и САД (мада је и даље у Сједињеним Америчким Државама и земљама које су погођене транзицијом присутан тимеросал у вакцинама против вируса свињског грипа H1N1) [47].

Дбреа и сарадници [52] су упоређивали токсичност тимеросала са метилмеркури једињењима, при чему је примећена слична токсичност ових једињења. Међутим, запажена је нешто повољнија фармакокинетика етилмеркури једињења, јер се краће задржавају у крви. Пошто је главни орган где једињења живе испољавају токсичност мозак, ни краће време присуства у крви није довољан безбедносни фактор. Жива показује велики афинитет према атому сумпора. Овај елемент је присутан у облику тиола и дисулфида у пептидима, протеинима и ДНК. Жива развија своје неуротоксичне ефекте везивањем за тиоле или дисулфиде у нервном систему, чиме инхибира деловање ензима, доводи до промена у структури протеина или блокира биолошки активне тиоле [53]. Медицинске студије које се баве испитивањем токсичног потенцијала тимеросала и других једињења живе прате укупну количину живе која се може наћи у узорцима различитих људских ткива, крви, урина, фекалија или косе.

Због испољавања алергијских реакција на тимеросал код људи и појаве еколошких проблема, његова примена се све више напушта. Статистички значајна појава алергије на тимеросал је примећена код жена, здравствених радника и куvara [54].

Код особа са развијеним фотоконтактним дерматитисом након примене 0,5% пироксикама (нестероидни антиинфламаторни лек) показало се да је епикутани пач (“patch”) тест на тимеросал и тиосалицилну киселину позитиван [55,56]. Наиме,

пацијенти који покажу контактну алергијску осетљивост на тимеросал и тиосалицилну киселину у великом су ризику да развију фотосензитивну реакцију на пироксикам [55,57].

Тиоксантони се такође могу добити реакцијом тиосалицилне киселине са крунским етрима (најчешће су то циклични олигомери етилен оксида) у присуству концентроване сумпорне киселине на собној температури (Схема 1). Они представљају важну класу биолошки активних једињења. Тиоксантонски прстен је заступљен у великом броју природних и синтетских једињења која могу показивати антитуморско и антипаразитско дејство. Екстракти добијени од биљака које садрже тиоксантоне су коришћени у традиционалној медицини [58].

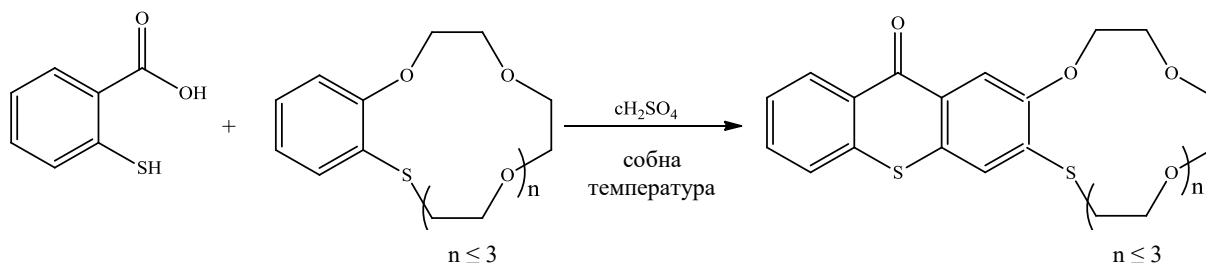


Схема 1. Синтетички пут за добијање тиоксантона

Неки амидни деривати тиосалицилне киселине имају фармакофоре сличне бензотиазепинима (дилтиазем) па могу *in vitro* блокирати калцијумске канале. Сходно томе ови деривати могу имати потенцијално значајну улогу у контроли крвног притиска. За остваривање фармаколошког ефекта одговорна је амидна група у дериватима чији синтетички пут је приказан на Схеми 2 [59].

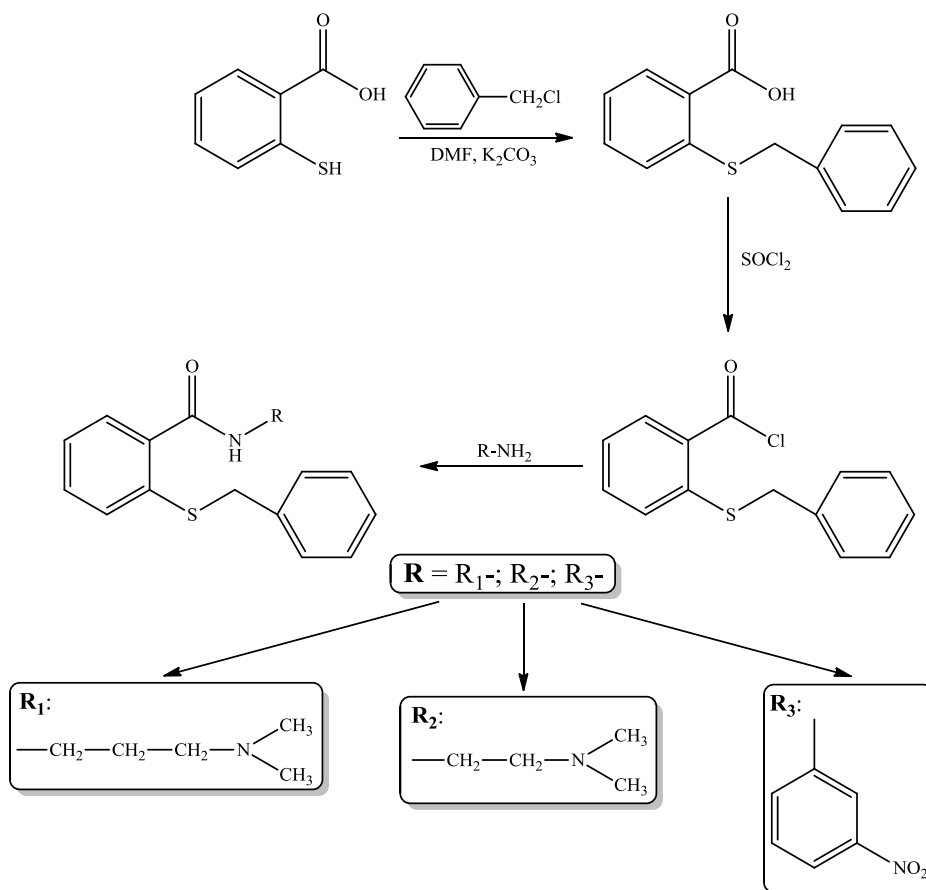


Схема 2. Добијање тиосалициламидних деривата

Тиосалицилна киселина и њени деривати имају многобројне примене, почевши од употребе код инфламаторних, алергијских и респираторних обољења па до потенцијалне примене у спречавању цирозе јетре. Као ефективни лиганди за координовање могу се користити тиестри тиосалицилне киселине. Различити S-алкил деривати (R = бензил-, метил-, етил-, пропил-, бутил-) [60-63] су припремљени алкиловањем поменуте киселине уз помоћ одговарајућих алкил халогенида у алкалном водено-етанолном раствору (Схема 3) [60].

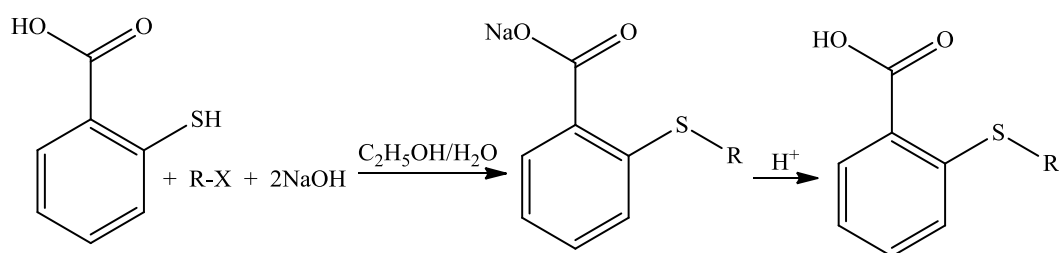


Схема 3. Реакција за добијање одговарајућих S-алкил деривата тиосалицилне киселине

1.3. СТРУКТУРА И КАРАКТЕРИСТИКЕ КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА ТИОСАЛИЦИЛНОМ КИСЕЛИНОМ КАО ЛИГАНДОМ

С обзиром на то да тиосалицилна киселина може да се координује на мноштво различитих начина и да поседује донорске атоме са различитим тврдо/меким карактеристикама по Пирсоновој класификацији, начин координовања за бакар(II)-јон потенцијално ће зависити од особина лиганата и услова у којима се одвијају реакције.

Бакар(II)-јон може да се комплексира са тиоетарским лигандима који су добијени од одговарајућег деривата тиосалицилне киселине (Схема 4), а да при томе везивање буде остварено и преко донорских атома који су меке Луисове базе. Наиме, из скице геометрије насталих комплекса се види да је бакар(II)-јон у екваторијалној равни повезан са четири атома сумпора из тиоетарских група, а у аксијалним позицијама координовање је остварено преко азотових донорских атома из новонасталих амидних група. Комплекси бакра са тиолато лигандима су стабилни у чврстом агрегатном стању. У растворима могу бити стабилни неколико дана, а ако се изложе ваздуху већ после пар сати долази до деградације комплекса. Вредности магнетних мерења за бакар(II)-комплексе су у нормалном распону за хексакоординоване комплексе. У овом истраживању комплекси нису показали правилну октаедарску структуру, већ је била присутна умерена Јан-Талерова (Jahn-Teller) дисторзија [64].

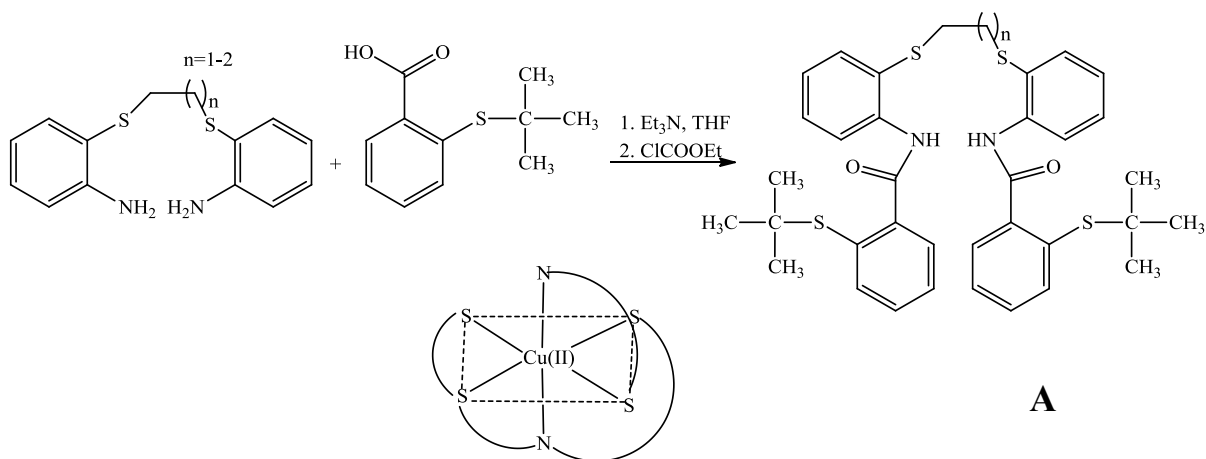
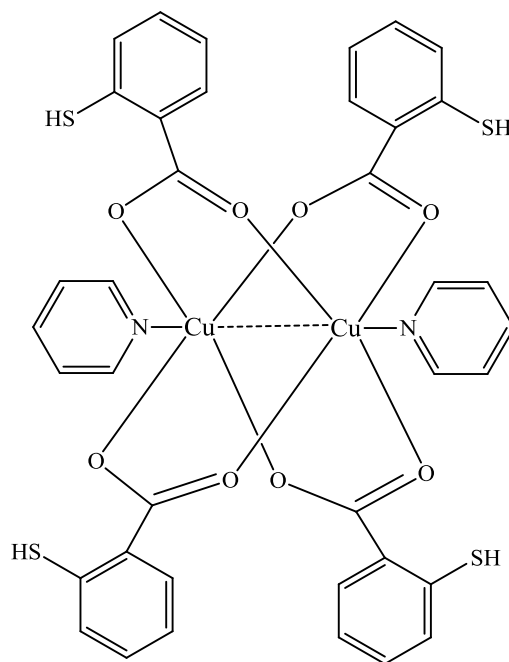


Схема 4. (А) Синтеза комплекс **Б** *бра*(II) са тиоетарским лигандима
(Б) Геометрија насталих комплекса

Комплекси бакра(II) су веома стабилни у димерном облику, тако да више нису ретки случајеви у којима настају бинуклеарни комплекси са централним јонима овог

прелазног метала. Иако се првенствено није очекивало координовање бакар(II)-јона са тврдим кисеониковим донорским атомима, у истраживању Ferrer и сарадника у реакцији бакар(II)-хлорида, тиосалицилне киселине (тиосалицилној киселини је додаван натријум-хидроксид како би се депротонувала) и пиридина настао је бинуклеарни комплекс где је бакар(II)-јон координован преко кисеоникових атома из тиосалицилне киселине и азотових атома из два молекула пиридина (Слика 8). У насталом комплексу метални центри су такође међусобно повезани [65].

Да је дошло до кординовања преко кисеоникових атома из карбоксилне групе говоре подаци добијени из инфрацрвених спектра. Наиме, дошло је до померања вредности асиметричних вибрација у области нижих вредности што указује да се координовање десило преко кисеоникових атома депротоноване карбоксилне групе у молекулу тиосалицилне киселине.



Слика 8. Структура бинуклеарног комплекса бакра(II) са тиосалицилном киселином

1.4. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА БАКРА(II)

1.4.1. Антимикробна активност комплекса бакра(II)

Лечење инфективних болести и даље остаје важан и изазован проблем данашњице. Упркос великом броју антибиотика доступних за медицинску употребу, резистенције на њихово деловање у последњим деценијама створиле су значајну медицинску потребу за новим класама антимикробних средстава. Такође, постоји и потреба за откривањем нових једињења са антимикробном активношћу, који се по механизму деловања разликују од оних познатих класа антимикробних агенаса према којима су многи клинички патогени развили резистенцију [66].

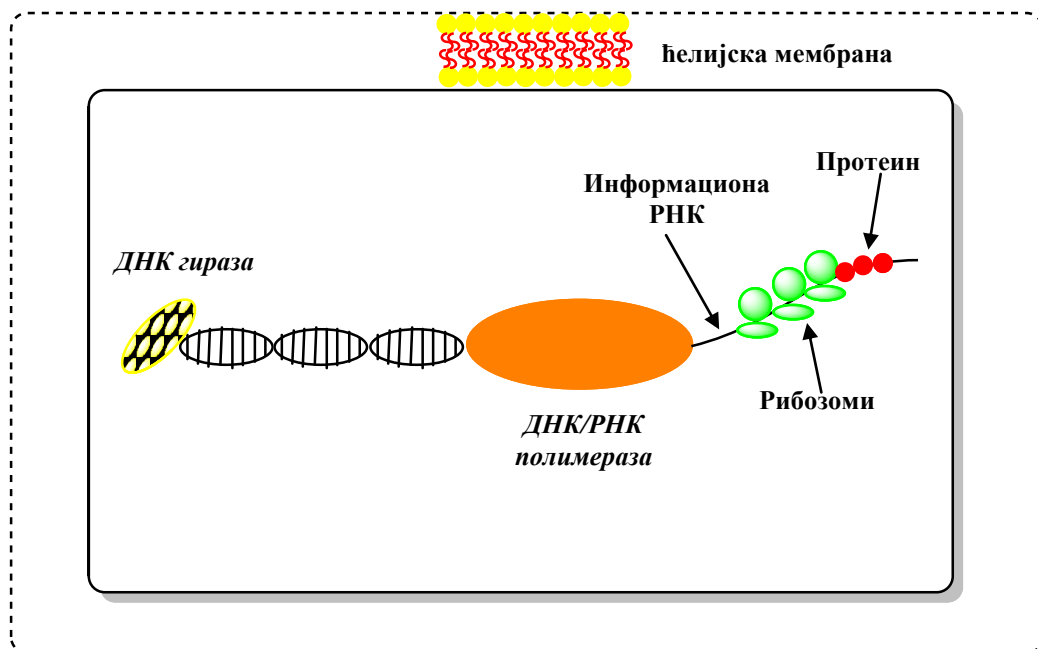
Прокариотски организми пружају далеко већу разноликост на молекуларном нивоу од еукариотских. Ова чињеница се темељи првенствено на структури и саставу њиховог ћелијског зида. Хемијски састав ћелијског зида Грам-негативних бактерија је знатно комплекснији од ћелијског зида Грам-позитивних бактерија, па зато не чуди њихова већа отпорност према медикаментозној терапији. Наиме, ћелијски зид Грам-негативних бактерија садржи, поред унутрашње, цитоплазматске мембране, спољашњу мембрану која је јединствен структурни ентитет за микроорганизме ове групе. Простор између две мембране је периплазма, где се не налази само пептидогликан (муреин), већ и мноштво јединствених протеина. Асиметрични двослој спољашње мембране чине липополисахариди. Иако је спољашња мембрана липофилна, па се очекује лак пролазак као кроз фосфолипидни двослој, она представља заштитну баријеру за пролазак хидрофобних једињења. Спољашња мембрана садржи и многе специфичне протеине, који често пролазе кроз мембрану и функционишу као уски (а понекад и специфични) дифузиони канали за пропуштање молекула мале молекулске масе. Неки протеини могу имати улогу транспортера за које се са вишим афинитетом везују молекули веће молекулске масе. [67]. Грађа ћелијског зида Грам-позитивних бактерија је знатно једноставнија. Интегритет цитоплазматске мембране одржава дебео слој пептидогликана који је сачињен од наизменично поређаних молекула *N*-ацетилглукозамина и *N*-ацетилмураминске киселине повезаних гликозидним везама. У састав ћелијског зида Грам-позитивних бактерија улазе и липотеихоинска, теихоинска киселина, различити моносахариди (маноза, арабиноза, галактоза) и протеини [68].

Антибиотици своје дејство на бактеријске ћелије остварују преко различитих механизма (Слика 9). Инхибитори синтезе ћелијског зида, као што су β -лактами (пеницилини, цефалоспорини, карбапенеми и монобактами), спречавају умрежавање пептидних ланаца пептидогликана и формирање ригидне структуре ћелијског зида [69]. Смањена осетљивост Грам-негативних бактерија на β -лактаме последица је структурне специфичности ћелијског зида ових бактерија и присуства липополисахаридног комплекса (ЛПС).

Антибактеријски ефекат се може постићи и блокадом синтезе протеина, па тако аминокликозиди (стрептомицин, гентамицин, амикацин итд.) и тетрациклини инхибирају 30S субјединице рибозома, док се макролиди, линкозамиди и хлорамфеникол везују за 50S субјединицу бактеријских рибозома и тако спречавају елонгацију пептидног ланца.

Инхибиција синтезе ДНК постиже се деловањем на ДНК гиразу (топоизомераза II), а овај механизам антибактеријског дејства карактеристичан је за флуорохинолоне (ципрофлоксацин, енрофлоксацин). Рифампицин је инхибитор РНК полимеразе, а како овај ензим ћелија сисара није осетљив на рифампицин, омогућено је селективно дејство. Антибактеријски агенси који делују инхибицијом функција цитоплазматичне мембране (полимиксини), понашају се као катјонски детерџенти, односно површински активна једињења која мењају пермеабилност мембране. Инхибиција ћелијског метаболизма заснива се на заустављању бактеријске синтезе фолне киселине. Пошто ћелије сисара не синтетишу фолну киселину, омогућено је селективно дејство инхибитора фолата само на ћелије бактерија. Сулфонамиди се компетитивно везују за активно место дихидроптероат синтетазе, чиме се инхибира синтеза дихидрофолата. Триметоприм инхибира други важан ензим у биосинтези фолне киселине - дихидрофолат редуктазу, коју синтетишу и ћелије сисара, а селективно дејство омогућено је услед већег афинитета триметоприма према бактеријској дихидрофолат редуктази [70].

Антимикробни агенси који доводе до реверзibilних промена испољавају привремени ефекат (бактериостатски или фунгистатски), док они који изазивају ирреверзibilне промене делују трајним ефектом (бактерицидни или фунгицидни) [71].

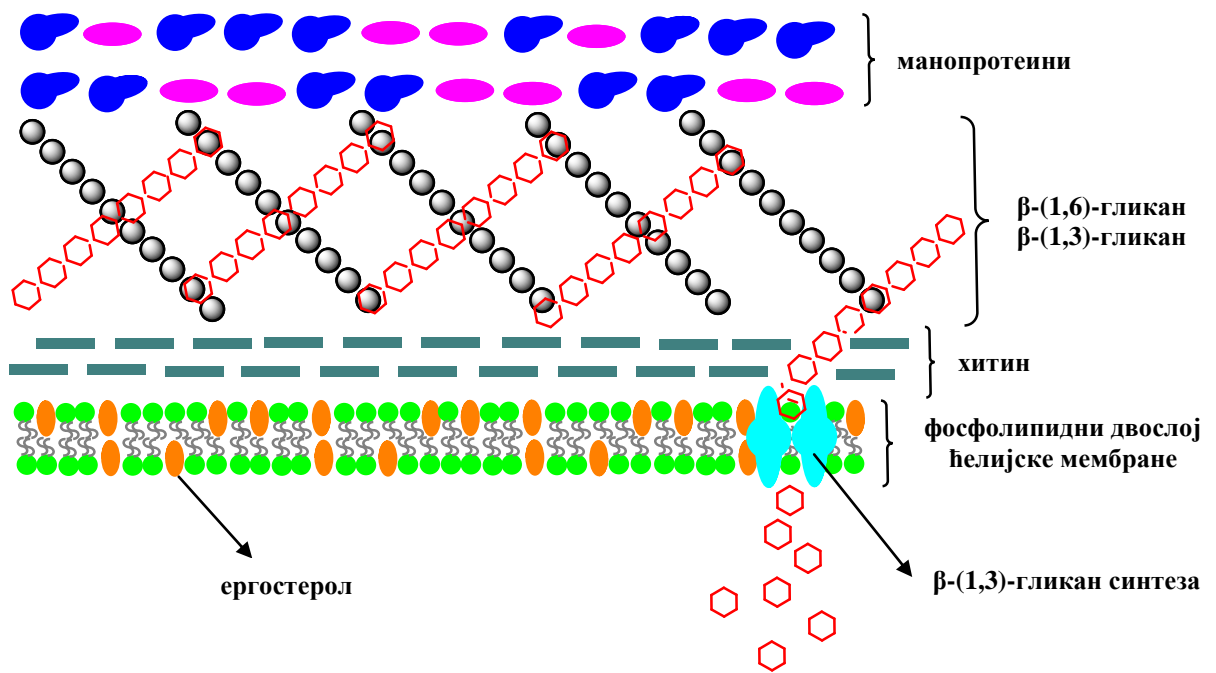


<p><u>Инхибитори синтезе фолата:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Сулфонамиди ▪ Триметоприм 	<p><u>Инхибитори РНК полимеразе:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Рифампицин 	<p><u>Инхибитори функције ћелијске мембране:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Амфотерицин Б ▪ Полимиксини
<p><u>Инхибитори синтезе ћелијског зида:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ β-лактами: карбапенеми, цефалоспорини, монобактами, пеницилини ▪ Остали: бацитрацин, фосфомицин, ванкомицин 	<p><u>Инхибитори ДНК гиразе:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Флуорохинолони 	<p><u>Инхибитори синтезе протеина:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Аминогликозиди ▪ Хлорамфеникол ▪ Клиндамицин ▪ Макролиди ▪ Стрептограмини ▪ Тетрациклини

Слика 9. Места дејства антибактеријских агенаса

Различите структуре које улазе у састав ћелијског зида и мембране гљива могу да буду мете деловања антигљивичних лекова (Слика 10). Они своје ефекте остварују најчешће на следеће начине:

- 1) везивањем за ергостерол у мембранама ћелија гљивица (амфотерицин Б, нистатин),
- 2) блокирањем синтезе прекурсора ергостерола (кетоконазол, миконазол),
- 3) инхибирањем синтезе глуканске компоненте ћелијског зида гљивица (каспофунгин),
- 4) везивањем за кератин из коже којим се гљивице хране (гризеофулвин),
- 5) ометањем синтезе РНК и ДНК, инхибицијом ензима тимидилат синтаза (флуцитозин),
- 6) инхибирањем сквален епоксидазе што условљава накупљање токсичног сквалена у ћелијама гљивица (алиламини) [70].

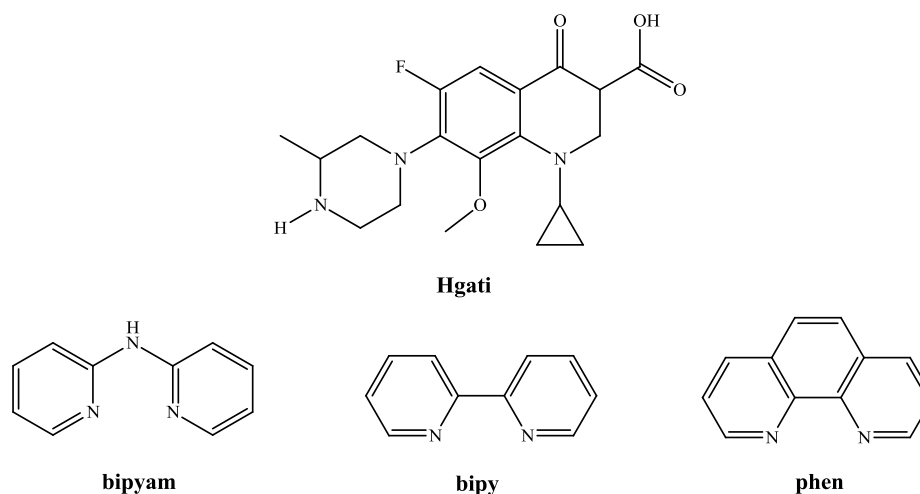


Слика 10. Ћелијска мембрана и ћелијски зид ћелије гљива

У погледу антимикуробне активности доказано је да су комплекси бабра(II) са дериватима петочланих хетероцикличних система довели до инхибиције раста бактерија: *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* [72]. Модификацијом лиганда са различитим хетероцикличним Шифовим базама синтетисани су комплекси са ширим спектром антибактеријске (*Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Salmonella typhi, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*) и антигљивичне (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Microsporium canis*, *Trichophyton longifusus*, *Fusarium solani* и *Candida glabrata*) активности [73,74]. Нови концепт у унапређивању бактерицидног ефекта комплекса бакра(II) са новосинтетисаним лигандима заснива се на испитивању липофилности добијених једињења. Повећањем липофилности побољшава се продор комплекса на циљано место у бактеријама [75].

Такође, добијени су комплекси бакра(II) са неким хинолонима, што представља добар приступ у развоју лекова који показују антибактеријску активност уз могућност смањења нивоа резистенције [76]. Како би се проширио спектар деловања микробиолошких агенаса синтетисани су комплекси бакра(II) са гатифлоксацином (хинолон треће генерације) и 2,2'-бипиридиламином (bipyam), 2,2'-бипиридином (bipy), или 1,10-фенантролином (phen) као колигандима (Слика 11). Испитивани комплекси су показали дејство како према Грам-позитивним (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), тако и према Грам-негативним бактеријама (*Xanthomonas campestris*, *Escherichia coli*) у опсегу МИК (минимална инхибиторна концентрација) концентрација 0,19-1,53 μM [77].



Слика 11. Структура лигананда - гатифлоксацина (*Hgati*) и колигананда - 2,2'-бипиридиламином (*bipyam*), 2,2'-бипиридином (*bipy*), или 1,10-фенантролином (*phen*)

На пољу побољшања антифунгалног ефекта тестиран је комплекс бакар(II)-јона са молекулом амфотерицина Б при концентрацији комплекса од 0,05 до 0,5 μM . Побољшање антимицотичне активности амфотерицин Б-бакар(II) комплекса према *Candida albicans*, у поређењу са почетним обликом антибиотика може бити резултат прооксидативне активности бакар(II)-јона. Наведени јони могу изазвати слободне

радикалне реакције које доводе до пероксидације и разарања структуре липида, протеина и полисахарида. То, такође, може довести до оштећења мембрана и губитка есенцијалних јона и метаболита, што доводи до дехидратације и смрти ћелија гљивица [78].

1.4.2. Интеракције са дезоксирибонуклеинском киселином (ДНК)

1.4.2.1. Интеракције бакар(II)-комплекса са нуклеобазама

Основни циљ бионеорганске хемије је да разјасни механизам деловања комплекса јона метала у биолошким системима. Као што је познато, нуклеинске киселине представљају основни генетски материјал ћелије. Из тог разлога представљају главну биолошку мету антиканцерогене терапије у људском телу. Стога су, дизајнирање и синтеза комплекса јона прелазних метала који интерагују са ДНК, постали веома важни последњих година [79,80]. Комплекси јона прелазних метала који могу при физиолошким условима да раскидају фосфоестарске везе, нарушавајући при томе структуру полинуклеотидног ланца ДНК, привлаче све већу пажњу због своје потенцијалне примене као метало-лекова, алата у молекуларној биологији, регулатора експресије гена и друго. Познато је да бакар(II)-јони имају битну улогу у биолошким системима и да улазе у састав неких фармаколошких агенаса. Многи комплекси бакра(II) су показали потенцијално антиканцерогено дејство како у *in vitro* тако и у *in vivo* условима [80].

Показано је да комплекси бакра(II) имају широк спектар активности и нижу токсичност од оних које садрже платину као јон метала. Претпоставља се да комплекси бакра(II) имају другачији механизам од комплекса платине који имају способност да се ковалентном везом везују за молекуле ДНК. Међутим, врло је мало информација о деловању комплекса бакра на молекуларном нивоу. Већина истраживања су, у последње време, фокусирана на способност ових комплекса или њихових фрагмената да интерагују са ДНК. Такође, други ћелијски састојци, као што су топоизомеразе и протеазе мултипротеински комплекси, су нове мете за испољавање активности.

Од 1969. године је примећено да бакар показује висок афинитет везивања према молекулу ДНК [81]. Кристална структура производа који је настао у реакцији бакар(II)-хлорида са молекулом ДНК датира од 1991. године. Бакар је остварио везу преко N7 атома гуанина [82]. У основи интеракције малих молекула са ДНК се могу поделити на

ковалентне (неповратне) или нековалентне (повратне) интеракције. Комплекси бабра су способни да остваре нековалентно везивање за двоструко хеликоидну структуру ДНК, уместо ковалентног везивања. Нековалентни типови интеракција са ДНК укључују: електростатичко, интеркалативно и ужлебљено везивање дуж главних или малих ДНК жлебова. У студијама о интеракцијама између ДНК и бакар(II)-јона које датирају из раних седамдесетих година прошлог века, уочено је да овај јон узрокује одмотавање и поновно стварање двоструке спирале ДНК у зависности од експерименталних услова [83-87]. Пошто је бакар(II)-јон редокс активан јон, може изазвати оксидативно оштећење ДНК као и раскидање веза [88].

Координациона хемија бакар(II)-јона је веома „богата” и разноврсна тако да овај јон метала може градити комплексе са великим бројем лигананда који најчешће као донорске атоме имају атоме азота, кисеоника или сумпора. Уколико додатне групе на поменутиим лигандима могу градити водоничне везе, електростатичке, хидрофобне или π - π интеркције, то се одражава на побољшање афинитета везивања као и на бољу селективност у циљаном препознавању специфичних ДНК секвенци. Иако се бакар(II)-јони координативно-ковалентно везују са фосфатним групама и нуклеобазама - посебно за гуанин-цитозин (Г-Ц) базне парове [86,87], комплекси бабра(II) се додатно могу везати за молекуле ДНК преко нековалентних веза на шта утичу структура комплекса и природа лигананда.

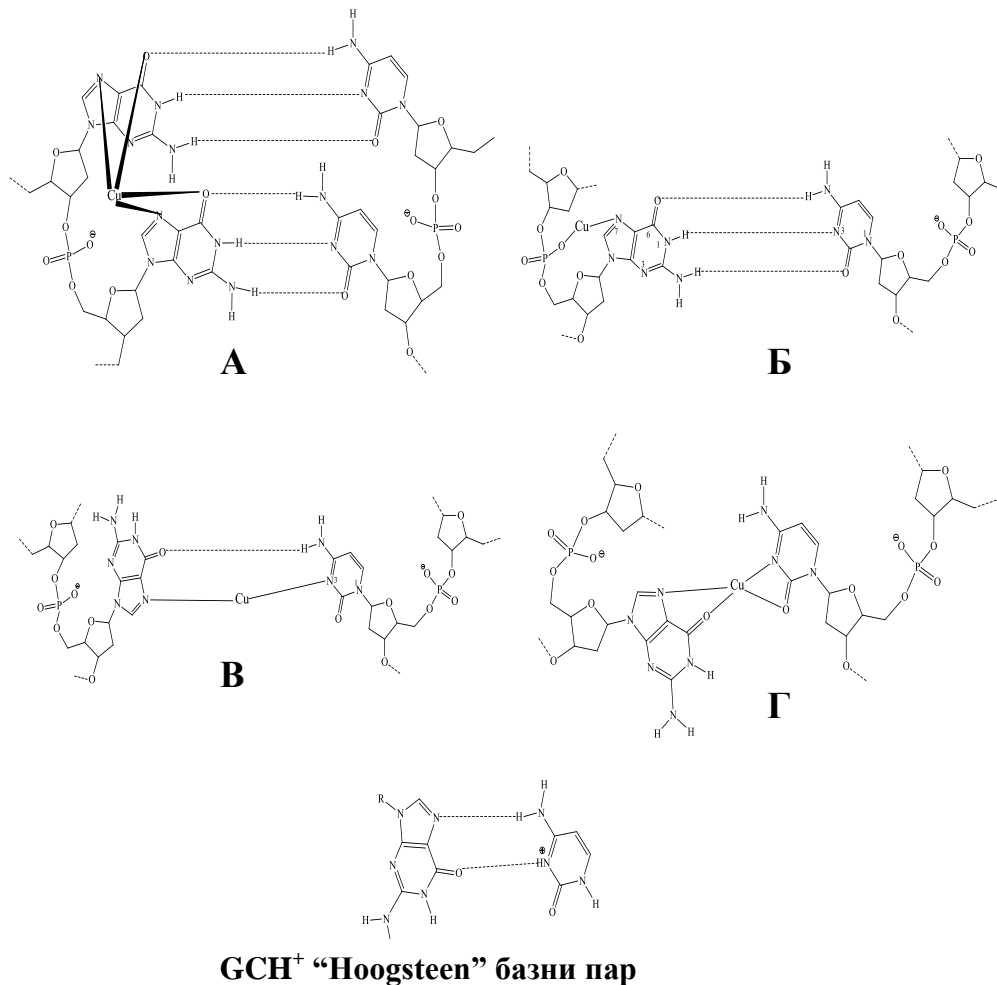
Директно интераговање централног јона метала из бакар(II)-комплекса са донорским атомима азота или кисеоника из нуклеобаза или фосфатних група у ДНК и то нековалентним типом интеракција као што су интеркалација, везивање за донорске атоме изложених страна жлебова, електростатичке интеракције. Све се то одражава на високе вредности константи везивања и може утицати на структуру ДНК и њене биолошке функције. π - π интеркције између нуклеобаза и ароматичних лигананда додатно стабилизују везивање. N7 атом из гуанина и аденина и O4 атом из тимина су потенцијална места за интеракције у великом жлебу, док су у малом жлебу расположива следећа места: O2-цитозина, O2-тимина, N3-гуанина и N3-аденина.

Када долази до ковалентног везивања N7-гуанина је приоритетно место за координовање бакар(II)-јона, што потврђују раније публиковани радови [89]. У врло ниским концентрацијама могу се десити и неспецифична везивања за фосфатне групе из ДНК ланца [90,91].

Richard и срадници су 1973. године предложили могуће механизме везивања бакар(II)-јона за ДНК [92].

При ниским концентрацијама, бакар(II)-јон остварује координацију за два суседна гуанина истог ланца (Слика 12, А) при чему настаје „сендвич“ комплекс [90,92]. Уметање јона метала између два гуанина доводи до побољшања π -интеракција и водоничних веза са комплементарним цитозинима. Са повећањем концентрације формирају се N7-гуанин/фосфат хелати (Слика 12, Б). N7/PO хелација прекида водоничне везе у гуанин-цитозин пару и тако дестабилизује двоструки хеликс ДНК. Раздвајањем гуанин-цитозин парова N3 положај цитозина постаје доступан за везивање [92]. Овај начин хелирања је примећен код бакар(II)-јона у кристалној сруктури бакар(II)-d(5'-CGCGCG-3')₂ која је добијена кокристализацијом комплекса бакра(II) са олигонуклеотидом [93].

Остали модели везивања бакар(II)-јона за Г-Ц базне парове укључују формирање бакар посредованог Hoogsteen Г-Ц базног пара (Слика 12, В) што изискује промену конформације гликозидне везе гуанина из *anti*- у *sin*-конформацију. Такође је могуће везивање посредством N7/O6-гуанина и N3/O2-цитозина (Слика 12, Г).



Слика 12. Различити начини везивања бакар(II)-јона у ДНК молекулу

Доказано је да физичко-хемијске карактеристике, као што су планарност, хидрофобност, природа колиганда, као и координациона геометрија комплексних једињења игра важну улогу у начину везивања односно интеркалирања комплекса бакра у молекул ДНК.

Посебна пажња је усредсређена на бакар(II)-комплексе са *N*-донорским лигандима који су показали велику способност за интеракцију са ДНК и *in vitro* антитуморску активност. Деривати бакра који садрже 1,10-фенантролин или сродне диимино хелате су описани као цитотоксични агенси са израженим дејством, јер постижу IC₅₀ вредности и у микроларном оспегу. У складу са тим, новија истраживања су посвећена испитивању тернарних бакар(II)-комплекса заснованим на комбинацији бидентатних диимино лиганата (*N-N* = фенантролин (phen), бипиридин (bipy) или њихови супституисани деривати) и других колиганата (на пример, салицилна киселина [94], тетрациклини [95], терпиридин [96], имидазолидин-2-тионони [97], оксамидобензоат [98], хинолини [99], оксамид [100], сулфонамиди [101], антрацен [102], амини [103], кумарини [104] и фталати [105]).

Selvakumar и сарадници су испитујући неке имино диацетато бакар(II)-комплексе, увидели да дати комплекси показују способност везивања за ДНК кроз парцијалну интеркалацију хетероцикличног прстена са базама полинуклеотидног ланца ДНК. Такође је примећено да увођење метил група на фенантролински прстен осим парцијалне интеркалације поменутог ароматичног система, омогућава формирање јачих водоничних веза што се на крају одражава на бољу интеракцију са ДНК. Сличне резултате су показале и друге студије и тиме је потврђена претпоставка да планарни и несупституисани диимински лиганди могу да интерагују са ДНК интеркалацијом. Насупрот томе, лиганди са непланарним хетероцикличним ароматичним прстеновима имају слабије изражене интеркалаторске способности [106].

Поред лиганата типа хетероцикличних диимино пажњу заслужују и лиганди као што су: салфен [107], изоеуксантон [108], флавоноиди [109] и неке друге Шифове базе [110,111-112]. У свим овим студијама је примећено да планарна структура лиганда има кључну улогу у подстицању везивања за ДНК. На афинитет комплекса бакра за интеракцију са молекулима ДНК, такође, утиче увођење лиганда који су подобни за π - π интеракције [113].

У многим случајевима, интеракција комплексних једињења са ДНК доводи до деформација у структури ДНК [114], при чему је фаворизован процес одмотавања ланца ДНК. Нови антинеопластични комплекси бакра(II) се понашају као „хемијске

нуклеазе”, што се остварује на неколико начина: (1) оксидацијом нуклеобаза, (2) хидролизом фосфоестарских веза и (3) оксидацијом шећерне (дезоксирибоза) компоненте. Због својих редукционих особина комплекси бабра(II) се користе за оксидативно цепање ДНК. Комплекси бабра имају висок афинитет везивања за ДНК и функционишу као редокс катализатори. Касније, многе студије су откриле да комплекси бабра промовишу цепање ДНК плазмида преко оксидативног пута [99,101,115]. Сматра се да се деградација ДНК посредством комплекса бабра одиграва кроз реакције Фентоновог типа. Та реакција је извор ROS, као што су хидроксилни радикали [116] или различити метални интермедијери [117], који узрокују и директну оксидацију и цепање ДНК полинуклеотидног ланца [118].

Са друге стране, у литератури су познати примери бабра(II)-комплекса који цепају ДНК хидролитичким механизмом [110,119-121]. О томе су први, 1996. године, писали Burstyn и сарадници наводећи да је бабра(II)-ТАСН комплекс (ТАСН = 1,4,7-триазоциклононан) раскидао супернамотану ДНК како у аеробним, тако и у анаеробним условима, што је предоминантно указивало на хидролитички механизам цепања [122]. Важно је нагласити да оксидативни агенси раскидају везе у ДНК тако да настају фрагменти који нису исти као они који настају природном хидролизом и не могу да се разграде под дејством ензима [123].

Истраживачи неке комплексе бабра зову „молекулским маказама” (класичне хемијске нуклеазе), јер могу у молекулу ДНК изазвати једноструке или двоструке прекиде. Након оштећења ДНК, ћелијски одговор се састоји у активацији механизма који су одговорни за поправку. Уколико њихова улога изостане, долази до ћелијске смрти. Двоструки прекиди су чешће повезани са наступањем ћелијске смрти, док се једноструки прекиди у молекулу ДНК лакше исправљају одговарајућим механизмом за поправку [124]. Апоптотска ћелијска смрт је најчешће последица оштећења ДНК. Међутим, то не мора увек да буде случај, постоје радови који потврђују да процес апоптозе може бити активиран трансдукцијом сигнала у ћелијама које су третиране комплексима бабра. У неким случајевима, комплекси бабра(II) могу детерминисати усходну регулацију проапоптотских протеина и нисходну регулацију антиапоптотских протеина. Апоптоза индукована неким комплексима бабра(II) у Сасо-2 ћелијама је повезана са повећањем нивоа р53 протеина и смањењем експресије Bcl-2 [101]. Такође, активација каспаза у посредованој ћелијској смрти узрокованој комплексима бабра још није потпуно разјашњена. Код врло малог броја комплекса бабра(II), који узрокују

апоптозу ћелија рака, забележено је да то чине кроз укључивање каспазе-3 [125] и/или активацију каспазе-9 [126].

1.4.3. Антитуморска активност комплекса бакра(II) и деривата тиосалицилне киселине као независних лиганата

Уобичајени терапијски приступи у лечењу рака првенствено имају за циљ ерадикацију неопластичих ћелија постизањем цитотоксичног ефекта. На основу ове претпоставке, класични антитуморски агенси, укључујући антрациклине, антиметаболите и лекове из платинске групе, су развијени како би се остварило дејство на ћелије карцинома које су у пролиферативној фази. Нови приступ у системској терапији рака су омогућила знања о генетским покретачима малигних фенотипова [127].

Цисплатина је лек који је прописиван скоро половини пацијената са карциномом [128,129], и даље се сматра једним од најважнијих лекова у терапији рака. Упркос свом успеху, клиничка употреба *цисплатине* је ограничена због низа озбиљних нежељених ефеката и стицања резистенције ћелија карцинома на овај лек. *Цисплатина* своје дејство испољава ковалентно се везујући за ДНК ланац.

Ова ограничења су покренула експоненцијални раст у развоју алтернативних лекова на бази јона метала неплатинског типа, који имају алтернативне механизме деловања на различите врсте рака. Међу неплатинским једињењима, комплекси бакра(II) привукли су посебну пажњу. Пошто су јони бакра ендогени јони метала претпоставља се да су мање токсични за нормалне ћелије него за ћелије рака. На основу ових запажања, очекује се да су мање токсични од комплекса платине, док задржавају ефективну цитотоксичност према ћелијама карцинома [130].

Тачна улога комплекса бакра у лечењу карцинома није довољно разјашњена [131,132]. Претпоставља се да је бакар укључен у генерисању ROS и процес ангиогенезе тако што стимулише пролиферацију и миграцију хуманих ендотелних ћелија [132,133]. Повишен ниво бакра је пронађен код многих типова хуманих карцинома, као што су карцином простате, дојке, дебелог црева, плућа и мозга. Повишен ниво церулоплазмине и бакра повезан је са прогресијом канцера. Присуство бакарних протеина је удружено са метаболичким променама у ћелијама рака. На основу наведеног, комплекси бакра могу бити од потенцијалног терапеутског значаја као антиангиогени молекули у лечењу различитих типова канцера [6,133,134].

Комплекси бабра(II) који имају цитотоксичну активност садрже као лиганде полидентатне Шифове базе, петочлане ароматичне хетероцикле (имидазол, пиразол, триазол), шесточлане ароматичне хетероцикле (phen и bipy), терцијарне фосфине. Координовање лиганата у комплексима бабра(II) се остварује преко доносних атома кисеоника, азота, сумпора или фосфора [6,130,134].

О'Halloran је испитивао цитотоксичну активност комплекса бабра(II) на ћелијским линијама карцинома колона и показао да комплекс $(\text{Cu}[\text{N-salicylidene-(glutamato)}(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{H}_2\text{O})$ у концентрацији од 50 и 100 $\mu\text{mol/L}$ показује изразиту цитотоксичну активност на хуманој ћелијској линији HT-29 карцинома колона после 72 сата утицаја. Апоптозу активира генерисање велике количине слободних радикала [135]. Такође су Marzano и сарадници показали да ацилдиазинил тиокарбазонски комплекси бабра(II) показују потенцијалну цитотоксичну активност на хуманим ћелијама аденокарцинома колона HT-29 ($\text{IC}_{50} = 0,011\text{-}2,22 \mu\text{M}$) [130].

Раја и сарадници су демонстрирали цитотоксичну активност серије комплекса бабра(II) са 2-оксо-1,2-дихидрохинолин-3-карбалдехидним дериватима као лигандима. Наведени комплекси су били ефикасни у неутралисању радикала, а цитотоксичну активност су испољавали према хуманим ћелијским линијама карцинома грлића материце (HeLa), ларингеалног епитела (HEp-2), јетре (HepG2) и коже (A431) [110,136]. Бакар(II)-комплекси са семикарбазонским дериватима су показали одличну биолошку активност па се потенцијално размишља и о њиховој примени у сврху дијагностичких и терапијских радиофармака [137-139]. Комплекси $\{[\text{Cu}_3(\text{ZL})_2(\text{H}_2\text{O})_6] \cdot 6\text{H}_2\text{O}\}_n$ (ZL = 1-хидрокси-2-(1H-имидазол-1-ил)етан-1,1-диилдифосфонска киселина) и $[\text{Cu}(\text{IPrDP})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (IPrDP = 1-хидрокси-2-(1H-имидазол-1-ил)пропан-1,1-диилдифосфонска киселина) је тестирана цитотоксична активност на хуманим ћелијским линијама карцинома плућа (A549), остеосаркома (U2OS), колона (HCT116), јетре (HepG2) и аденокарцинома дојке (MDA-MB-231) и при томе је утврђено да показују дозно- и временски-зависне цитотоксичне ефекте. Најбољи цитотоксични ефекат, који је сличан ефекту *цисплатине*, је примећен на ћелијским линијама HCT116. Комплекс са IPrDP лигандом је инхибирао пролиферацију ћелијских линија карцинома индуковањем застоја ћелијског циклуса у G2/M фази, показујући сличан механизам деловања као *цисплатина* [140].

Комплекси бабра(II) са дериватима 7H-2,6-диаминопурина и 4H-3,5-диамино-1,2,4-триазола су показали умерену антипролиферативну активност према хуманим ћелијским линијама карцинома дојке (MCF7), колона (HCT116) и јетре (HepG2). Према

IC₅₀ вредностима редослед цитотоксичне активности опада у низу: MCF7 > HCT116 > HepG2. Активност је упоређена у односу на референтни лек, доксорубицин.

Различите студије потврђују да истраживања у циљу синтезе и испитивања биолошке активности комплекса бакра(II) са тиосалицилном киселином као лигандом већ дуже време привлаче пажњу. Нова истраживања, у светлу испитивања цитотоксичног потенцијала комплекса бакра(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине су показала незнатно нижу цитотоксичну активност на хуманим HCT116 ћелијским линијама у односу на *цисплатину*, док је цитотоксични ефекат синтетисних комплекса бакра(II) на мишјим ћелијским линијама CT26 и CT26.CL25 у концентрацијама од 31,25 до 250 µM био значајно мањи у поређењу са референтним леком [61,62].

И сами деривати тиосалицилне киселине, који су од интереса као лиганди у овом истраживању, могу дати значајан допринос у постизању антитуморског дејства. То најбоље осликава дизајнирање пегированих конјугата са фарнезилтиосалицилном киселином у сврху носача у системима за испоруку лекова (нпр. паклитаксел) до циљаног места тј. ћелије канцера ради остваривања дејства.

Паклитаксел (ПТКС) је једна од првих терапијских линија избора код пацијената са малигним карциномом дојке, јајника, плућа и напредних форми Капоши саркома. Механизам дејства се заснива на ометању функционисања микротубула током ћелијске деобе. Успешну клиничку примену ПТКС ограничава лоша растворљивост у води и системска токсичност. Таксол је Cremophor EL®/етанолна формулација ПТКС која се клинички примењује. Међутим, Cremophor EL® може изазвати реакције хиперактивности, неуропатију и друге озбиљне нежељене ефекте [39,40].

Превазилажење ових проблема је омогућено развојем различитих система за испоруку лекова као што су липозоми, мицеле, дендримери, наночестице и хидрогели. Полимерне мицеле су нарочито интересантне, јер могу обезбедити „програмирано” ослобађање лека. Мала величина честица (10-100 nm) у којима је инкапсулиран лек омогућава да он стигне до туморског ткива на које треба да оствари ефекат. Раније спроведене студије указују да је величина честица од 100 nm критична да би систем испоруке ефикасно доставио лек до циљаних ћелија рака [40,49,54,141-144]. Носачи у полимерним мицелама су направљени од фармаколошки инертних материјала, а све у циљу избегавања *in vivo* токсичности. Некад, због антитуморске активности самих носача, може се постићи синергистички ефекат са испорученим леком.

Мицеле које су дизајниране као ПЕГ-хидрофобни конјугати лекова (пролекови) могу послужити за испоруку антитуморских лекова који су у води слабо растворљиви. Тај систем је формиран спајањем два молекула *S-trans*, *trans*-фарнезилтиосалицилне киселине (ФТС) на поли(етиленгликол) (ПЕГ, молекулске масе = 5000) преко естарске везе (ПЕГ_{5K}-ФТС₂). ФТС представља хидрофобни сегмент полимерне мицеле.

Проантитуморска активност ФТС је задржана и након спајања са ПЕГ_{5K}. Систем ПЕГ_{5K}-ФТС₂ лако формира мале мицеле (20-30 nm) које су ефикасне у испоруци ПТКС. *In vivo* студија је показала да антитуморска активност ПТКС/ПЕГ_{5K}-ФТС₂ мицела је знатно боља у поређењу са таксолом [39,145]. Даљим унапређењем ПЕГ-ФТС система формиране су ПТКС/ПЕГ_{5K}-ФТС₄ мицеле које су се показале као још ефикасније формулације у инхибицији раста тумора *in vivo*. Њихов синтетички пут и механизам испоруке лека представљен је на Схеми 5 и Слици 13. Значајно побољшање је постигнуто и модулацијом ПЕГ са витамином Е [146,147] као и конјугацијом ПЕГ са два молекула ембелина [148,149]. Увођењем флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc) групе у ПЕГ_{5K}-ФТС₂ систем (ПЕГ_{5K}-Fmoc-ФТС₂), повећан је капацитет и стабилност формулације мицеларних система за испоруку антитуморских лекова [150].

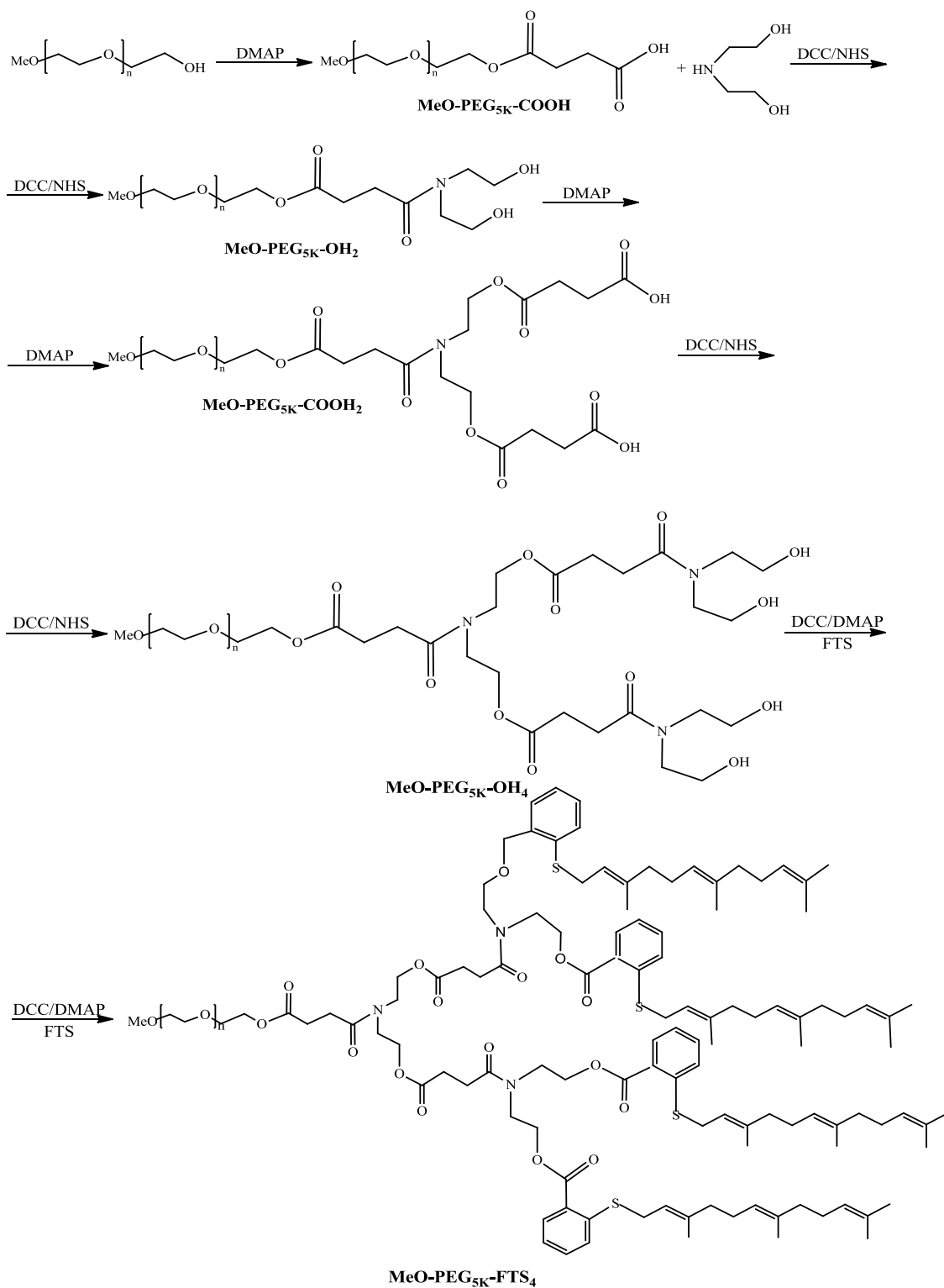
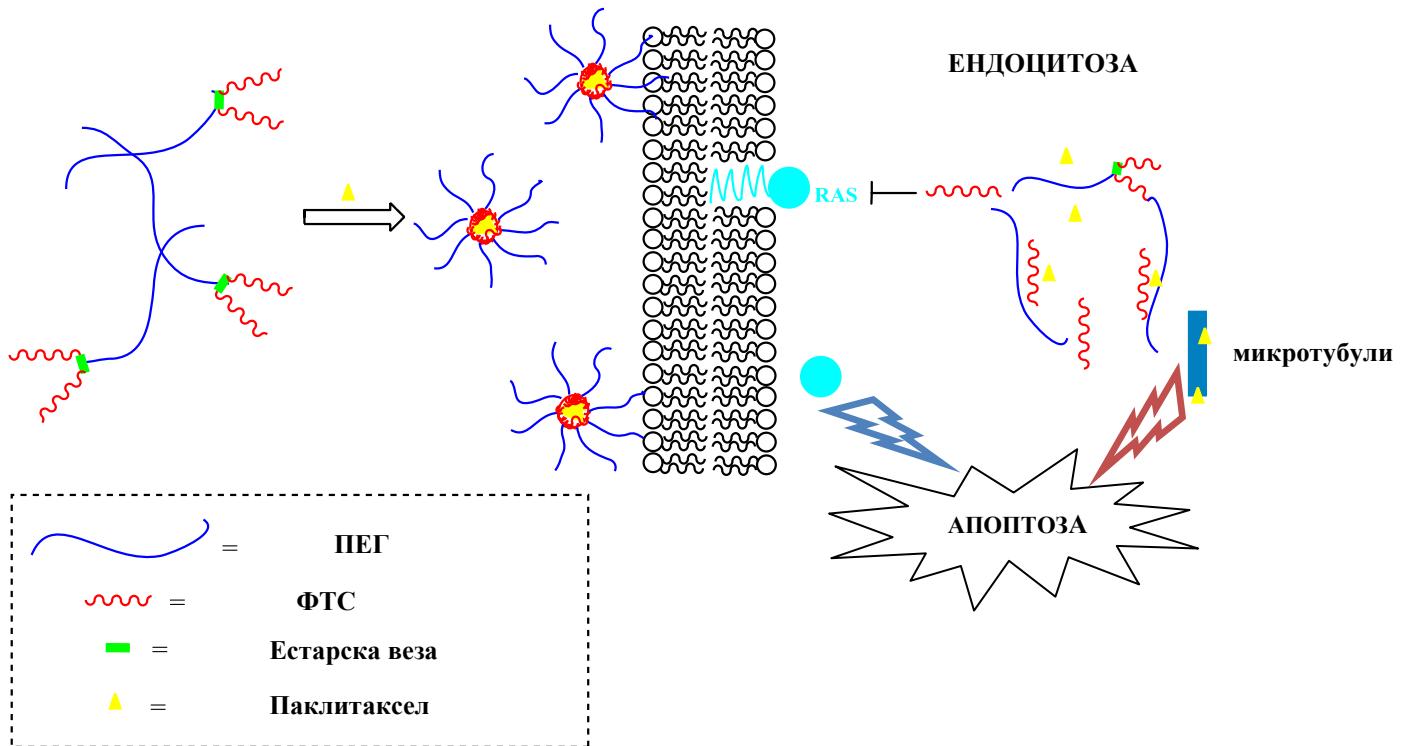


Схема 5. Синтеза ПЕГ_{5K}-ФТС₄ конјугата

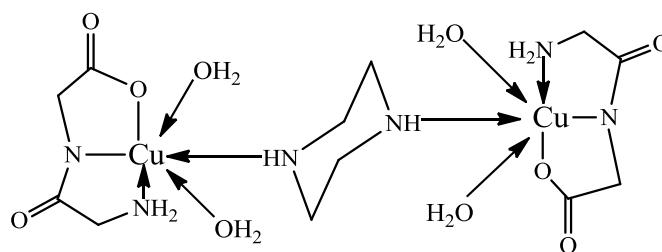


Слика 13. Испорука паклитаксела помоћу ПЕГ-ФТС система као носача

Фарнезилтиослицилна киселина је, такође, показала повољан ефекат на ћелијске линије малигног меланوما тако што инхибира раст ћелија меланوما својим цитостатским и проапоптотским дејством заустављајући ћелијски циклус у G_{114} или $G_{2/M}$ фази. То је значајно, јер та врста тумора лако развија резистенцију на стандардне терапијске опције. За разлику од других карцинома, меланоми немају обичну мутацију p53, али су присутни други дефекти апоптотског пута узроковани губитком ћелијског ефектора смрти Araf-1. Други апоптотски ефектори, као што су антиапоптотски протеин Bcl-2, често су прекомерно изражени у меланому. Повећана експресија Bcl-2 у меланому је повезана са супримираним одговором на хемотерапију и смањеним преживљавањем пацијената [144].

1.4.3.1. Комплекси бакра(II) као инхибитори топоизомеразе I и II

Интеракција комплекса бакра(II) са ДНК топоизомеразама и инхибиција њихове функције представља нови приступ у лечењу канцера. ДНК топоизомеразе I и II су ензими једра који одмотавају и замотавају ДНК, а самим тим имају важну функцију у ДНК репликацији и транскрипцији. Топоизомераза I прекида један ланац двоструког хеликса ДНК, док топоизомераза II прекида оба ланца ДНК. Након прекида фосфатне осовине ДНК, долази до одмотавања и савијања ланца ДНК, а затим репарирања прекинутог места и на крају до повезивања оба ланца, тако да се молекул ДНК конвертује из једног тополошког изомера у други [151]. Агенси чије су биолошке мете деловања топоизомеразе се могу поделити у две групе: топоизомеразни отрови и каталитички инхибитори. Пошто су топоизомеразе неопходне за репликацију нуклеинских киселина, њиховом инхибицијом се спречава репликација ДНК туморских ћелија и смањује њихово неконтролисано дељење. Деривати α -хетероцикличних тиосемикарбазона су показали способност да инхибирају топоизомеразу II како у *in vitro* тако и у *in vivo* условима [152]. Такође је испитиван потенцијал инхибиције топоизомеразе II и антиканцерогени ефекат на НерG2 ћелијске линије комплекса бакра(II) са хинолинским дериватима, јер је примећено да хинолински деривати могу поседовати проапоптотске карактеристике [153]. За разлику од поменутих комплекса бинуклеарни комплекс бакра(II) $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{L})_2(\text{ppz})(\text{H}_2\text{O})_4]$ (где је H_2L = дипептид глицилглицин; а ppz = пиперазин) (Слика 14) је пак способан да препозна одређене секвенце у молекулу ДНК, инхибира експресију топоизомеразе I и тиме контролише репликацију туморских ћелија. Овај комплекс доводи до оксидативног цепања ДНК и инхибиције активности топоизомеразе I при веома ниским концентрацијама, $\text{IC}_{50} = 12,5 \mu\text{M}$ [154].



Слика 14. Бинуклеарни комплекс бакра(II) са глицилглицином и пиперазином као лигандима

1.4.3.2. Комплекси бакра(II) као протеазом инхибитори

Протеазом је велики мултипротеински комплекс који се налази у једру и цитоплазми и селективно модулише и деградира интрацелуларне протеине. Еукариотски протеазом садржи једну 20S структурну јединицу (језгро) и две 19S регулаторне подјединице (капице). Језгро је шупље и у њему се врши разградња протеина. Крајеви језгра су повезани са 19S регулаторним подјединицама које садрже места за везивање убиквитина. Да би протеазом препознао и обрадио протеински супстрат мора бити повезана са убиквитином [155]. Након препознавања, протеини бивају преузети у 20S јединицу где су изложени дејству различитих пептидаза. Убиквитин протеазом-зависни систем деградације је неопходан за одвијање многих ћелијских функција, укључујући процесе који су од примарне важности за канцерогенезу као што је пролиферација, апоптоза, ангиогенеза и формирање метастаза [156]. Показано је да су ћелије рака осетљивије на инхибицију протеазома од нормалних ћелија. Циљано деловање на убиквитин-протеазом пут представља повољну стратегију у лечењу канцера [157], стога не чуди развој инхибитора протеазома као нових антиканцерогених агенаса привлачи све већу пажњу истраживача. Остваривање антитуморског дејства комплекса бакра(II) преко инхибиције протеазома први су описали Dou и сарадници. Они су показали да су испитивани комплекси бакра(II) селективно индуковали апоптотску смрт ћелија рака али не и нормалних ћелија [156].

2. ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу свега представљеног у уводу постављена је следећа хипотеза нашег истраживања:

Реакцијом S-алкенил деривата тиосалицилне киселине и бакар(II)-нитрата очекује се да настају бинуклеарни комплекси чији састав и структуру треба потврдити на основу резултата елементалне микроанализе, инфрацрвене спектроскопије, магнетних мерења, моларне проводљивости и рендгенске структурне анализе. Такође, можемо очекивати да ће S-алкенил деривати тиосалицилне киселине и одговарајући комплекси бакра(II) показати одређену биолошку активност.

У сврху провере радне хипотезе предвидели смо следеће циљеве истраживања:

Генерални циљ

Синтетисати S-алкенил деривате тиосалицилне киселине (алкенил = пропенил-(L1), и изобутенил-(L2)), и одговарајуће комплексе бакра(II) са наведеним бидентатним лигандима (C1 и C2).

Специфични циљеви

1. Састав награђених једињења одредити на основу резултата елементалне микроанализе.
2. Структуру добијених бидентатних лиганада и одговарајућих комплексних једињења претпоставити на основу инфрацрвене (IR), нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије (^1H и ^{13}C NMR), резултата магнетних мерења и моларне проводљивости.
3. Стварну структуру добијених једињења потврдити и на основу резултата рендгенске структурне анализе, где је то могуће.
4. Испитати интеракцију новосинтетисаних комплекса са гуанозин-5'-монофосфатом, праћењем супституционих реакција при физиолошким условима. Такође, треба утврдити постојање интеракције између синтетисаних комплекса и СТ-ДНК.
5. Испитати биолошку активност (антимикробну и антитуморску) S-алкенил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бинуклеарних комплекса бакра(II).

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ПОСТУПАК СИНТЕЗЕ ЛИГАНАДА

S-алкенил деривати тиосалицилне киселине (алкенил = пропенил-(**L1**) и изобутенил-(**L2**)) су добијени реакцијом алкиловања тиосалицилне киселине одговарајућим алкенил-халогенидима, која се одвија у базној средини и смеси вода-етанол као растварачу. То подразумева да је у раствор добијен растварањем тиосалицилне киселине (1 mmol) у 50,00 mL 30% етанола додат раствор натријум-хидроксида (2,00 mmol у 5,00 mL дестиловане воде). У тако припремљену бистру реакциону смешу потом је постепено додаван у малим порцијама одговарајући алкенил-халогенид (2,00 mmol) који је претходно растворен у 5,00 mL етанола. Тако добијена реакциона смеша остављена је током ноћи на 60°C. Након тога раствор је пренет у кристализациону шољу и ради удаљавања етанола упарен је на воденом купатилу. У добијени водени раствор додат је (2,00 mM) раствор хлороводоничне киселине при чему је настао бели талог одговарајућег S-алкенил деривата тиосалицилне киселине. Тако добијени производ је затим процеђен, испран великом количином дестиловане воде и осушен преко ноћи на вакууму [60].

S-пропенил дериват тиосалицилне киселине, (**L1**): Тачка топљења 180-181°C, бео прах, (S-propenyl-thiosal) = C₁₀H₁₀O₂S (Mr = 194,25).

IR (KBr, cm⁻¹): 3446, 3075, 2917, 2654, 2557, 1680, 1586, 1562, 1465, 1415, 1314, 1273, 1256, 1153, 1061, 1045, 889, 741, 701, 651, 551.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 3,21 (d, 2H, -CH₂), 5,92 (m, 1H, =CH), 4,93 (m, 2H, =CH₂) 7,47-7,91 (m, 4H, -Ar).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃, δ ppm): 38,2 (-CH₃), 115,9 (=CH₂), 136,5 (=CH), 125,3; 125,6; 130,2; 131,7; 133,8; 140,1 (-Ar), 172,0 (-COOH).

S-изобутенил дериват тиосалицилне киселине, (**L2**): Тачка топљења 182-183°C, бео прах, (S-isobutenyl-thiosal) = C₁₁H₁₂O₂S (Mr = 208,28).

IR (KBr, cm⁻¹): 3445, 3076, 2967, 2647, 2556, 1676, 1585, 1562, 1463, 1412, 1317, 1272, 1253, 1154, 1061, 1046, 810, 743, 651, 550.

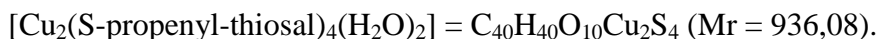
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1,82 (s, 3H, -CH₃), 4,98 (m, 2H, =CH₂), 3,44 (t, 2H, -CH₂), 7,42-8,30 (m, 4H, -Ar).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 22,5 (- CH_3), 46,1 (- CH_2), 112,1 (=CH $_2$), 125; 126,5; 126,7; 133,2; 134,1; 142,6 (-Ar), 168,1 (-COOH).

3.2. ПОСТУПАК СИНТЕЗА КОМПЛЕКСА

3.2.1. Синтеза комплекса бакра(II) са S-пропенил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1)

Раствору добијеном растварањем 0,1000 g (0,4139 mmol) бакар(II)-нитрата трихидрата у 10,0 mL дестиловане воде, лагано је додаван S-пропенил дериват тиосалицилне киселине (0,1607 g; 0,8278 mmol). Реакциона смеша је загревана 3 сата на воденом купатилу, а током тог периода у малим порцијама је додаван водени раствор литијум-хидроксида (0,0199 g; 0,8278 mmol). Плави талог насталог бакар(II)-комплекса (C1) је одвојен цеђењем, испран дестилованом водом и сушен на ваздуху. Принос реакције: 0,1604 g (81,5%).

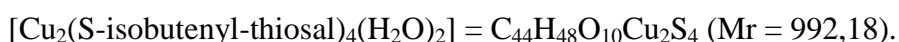


Изрaчунато: C, 51,77%; H, 4,56%; S, 13,49%. Нађено: C, 51,54%; H, 4,42%; S, 13,29%. $\mu(294 \text{ K}) = 1,84 \mu\text{B}$. Моларна проводљивост комплекса је 5,06 $\mu\text{S/cm}$ (48 s).

IR (KBr, cm^{-1}): 3441, 3076, 2918, 1610, 1549, 1460, 1435, 1400, 1281, 1258, 1229, 1156, 1062, 1044, 846, 744, 695, 658, 556.

3.2.2. Синтеза комплекса бакра(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2)

Раствору добијеном растварањем бакар(II)-нитрата трихидрата (0,1000 g; 0,4139 mmol) у 10,0 mL дестиловане воде, лагано је додаван S-изобутенил дериват тиосалицилне киселине (0,1723 g; 0,8278 mmol). Реакциона смеша је загревана 3 сата на воденом купатилу, а током тог периода у малим порцијама је додаван водени раствор литијум-хидроксида (0,0199 g; 0,8278 mmol). Плави талог насталог комплекса бакра(II) (C2) је одвојен цеђењем, испран дестилованом водом и сушен на ваздуху. Монокристали C2 комплекса, $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$, погодни за рендгенску структурну анализу добијени су поступком споре прекристализације комплекса $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ из система DMSO- H_2O (диметилсулфоксид)-вода. Принос реакције: 0,2228 g (82,1%).



Израчунато: C, 53,66%; H, 5,10%; S, 12,73%. Нађено: C, 53,47%; H, 5,18%; S, 12,64%. $\mu(294\text{ K}) = 1,86\ \mu\text{В}$. Моларна проводљивост комплекса је $9,43\ \mu\text{S}/\text{cm}$ (48 s).

IR (KBr, cm^{-1}): 3446, 2969, 2915, 1613, 1589, 1400, 1281, 1257, 1157, 1062, 847, 744, 719, 656, 510.

3.3. АНАЛИЗЕ И МЕТОДЕ МЕРЕЊА

3.3.1. Елементална микроанализа

Елементална микроанализа (C, H, S) је извршена на Катедри за органску хемију Хемијског факултета Универзитета у Београду. Анализа је спроведена на апарату Vario III C, H, N, S Elemental Analyzer у CHS моду.

3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија

Снимање инфрацрвених спектра свих синтетисаних једињења је урађено на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу помоћу спектрофотометра Perkin-Elmer FTIR 31725X. За снимање је коришћена техника KBr пилуле.

3.3.3. Нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија

Снимање нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра (^1H и ^{13}C NMR) лигананда је спроведено на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу на Varian Gemini-200 NMR спектрофотометру користећи D_2O као растварач. Хемијска померања су дата у односу на триметилсилан (TMS), употребом DDS као инертног стандарда.

3.3.4. Магнетна мерења

Магнетна мерења синтетисаних комплекса вршена су на Хемијском факултету Универзитета у Београду, на температури од 294 K, Евансовим методом коришћењем апарата MSB (Magnetic Susceptibility Balance) - MK1 (Scherwood Scientific Ltd., Cambridge England) са $\text{Hg}[\text{Co}(\text{SCN})_4]$ као калибрантом. Дијамагнетичне корекције израчунате су на основу Паскалових константи.

3.3.5. Моларна проводљивост

Моларна проводљивост (Λ) свеже припремљених раствора комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине (концентрације $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) у диметилсулфоксиду као растварачу мерена је на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу помоћу EC-Meter BASIC 30+ кондуктометра (CRISON) на температури од 20°C . Помоћу овог инструмента одређена је, мерењем електричног отпора R (Ω) у експерименталној ћелији (познате константе ћелије k), најпре специфична проводљивост (κ) раствора испитиваних комплекса, на основу једначине:

$$\kappa = \frac{1}{R} \cdot \frac{l}{A}$$

$$k = \frac{l}{A}$$

Константа кондуктометријске ћелије (k) за EC-Meter BASIC 30+ износи 1 cm^{-1} . Моларна проводљивост раствора комплекса је потом израчуната на основу једначине:

$$\Lambda = \frac{\kappa}{C}$$

где је C моларна концентрација комплекса изражена у mol/dm^3 .

3.3.6. Рендгентска структурна анализа

Рендгенска структурна анализа је урађена у Лабораторији за теоријску физику и физику кондензоване материје института Винча анализом X-зрака.

3.3.6.1. Рендгенска структурна анализа комплекса бакар(II) са

S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине



Монокристали погодни за рендгенску структурну анализу су добијени спором прекристализацијом из система DMSO-вода. Дифракциони подаци о монокристалној структури за комплекс, $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$ (**C2**), сакупљени су на собној температури на дифрактометру Oxford Diffraction Gemini S који је опремљен са MoK α зрачним извором и CCD детектором. Обрађивање података и корекције емпиријске апсорпције извршене су помоћу софтвера CrysAlisPro [158]. Кристална структура је решена уз помоћ директних метода, коришћењем SIR2002 [159], а утачњена применом SHELXL програма [160]. Атоми водоника везани за угљеникове атоме су постављени на геометријски идеалним позицијама са C–H растојањима фиксираним на 0,93 Å од Csp² и 0,97 и 0,96 Å, од метилен и метил Csp³. Изотропни параметри померања постављени су на 1,2 Ueq и 1,5 Ueq од матичних атома угљеника. Утврђено је да се DMSO лиганд налази у деформисаном положају на две позиције, са факторима заузимања локације 0,80 и 0,20. Третирање атома сумпора довело је до значајног побољшања модела кристалне структуре, док су параметри померања неуређених С атома били ограничени на изотропне параметре због нестабилности даљег пречишћавања. Основни кристалографски подаци, као и они који се односе на решавање и утачњавање структуре комплекса $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$, су наведени у Табели 2. Програми PARST [161] и PLATON [162] су коришћени за извођење геометријских израчунавања, док је програм Mercury [163] коришћен за молекулску графику.

Табела 2. Основни кристалографски подаци и подаци неопходни за решавање и утачњавање структуре комплекса, $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$ (C2)

Емпиријска формула	$\text{C}_{48}\text{H}_{56}\text{O}_{10}\text{Cu}_2\text{S}_6$
М	1112,4
Боја, кристални облик	Зелена, призма
Величина кристала (mm)	0,322 · 0,270 · 0,120
Температура (К)	293(2)
λ (Å)	0,71073
Кристални систем	Моноклиничан
Просторна група	$P2_1/n$
Димензије јединичних компоненти	
a (Å)	10,8516(4)
b (Å)	10,2909(2)
c (Å)	24,7049(8)
β (°)	100,417(3)
V (Å ³)	2713,4(2)
Z	2
D_{calc} (mg/m ³)	1,366
μ (mm ⁻¹)	1,066
θ опсег за прикупљање података (°)	од 2,59 до 28,94
Сакупљене рефлексије	12000
Независне рефлексије, R_{int}	6152; 0,0232
Комплетност (%) до $\theta = 26^\circ$	99,9
Метода побољшања	Матрица најмањих квадрата на F^2
Подаци / параметри	4576/308
Фактор слагања на основи F^2	1,021
Завршни R_1/wR_2 индекси [$I > 2\sigma(I)$]	0,0486/0,1257

3.4. БИОЛОШКА ИСПИТИВАЊА

3.4.1. *In vitro* антимикуробна активност

3.4.1.1. Хранљиве подлоге и растварање испитиваних супстанци

Испитиване супстанце су растворене у диметилсулфоксиду, а затим разблажене течном хранљивом подлогом (Mueller-Hinton бујон) до концентрације раствора од 10%. Диметилсулфоксид је купљен од Acros Organics, док је ресазурин набављен од Alfa Aesar. Доксициклин (Галеника АД, Београд), је растворен у Mueller-Hinton бујону (Торлак, Београд), док су антимикуотици, флуконазол (Pfizer Inc.) и кетоконазол (Sigma-Aldrich) растворени у декстрозном Sabouraud бујону (Торлак, Београд).

Mueller-Hinton бујон је стандаризована подлога коју прописује Национални комитет за клиничке лабораторијске стандарде Америке. Погодна је за тестирање првенствено антибиотика из разлога што обезбеђује оптималне услове за већину брзорастућих аеробних и факултативно анаеробних бактерија. У састав подлоге улази: 2 g месног екстракта, 17,5 g казеин-хидролизата и 1,5 g скроба. Припрема се састоји у томе да се 21 g праха суспендује у 1000 mL хладне дестиловане воде. Подлога се пажљиво загрева до кључања док се потпуно не раствори. Потом се разлива у ерленмајере и стерилише у аутоклаву 15 минута на температури од 121°C.

Sabouraud декстрозни бујон је неселективна подлога за узгој и одржавање патогених и непатогених гљива, посебно дерматофита. рН вредност подлоге, која износи 5-6, је погодна за раст, а има незнатно инхибиторно дејство на контаминирајуће бактерије у клиничким узорцима. Ова подлога се састоји од: 5 g панкреатичне дигестије казеина, 5 g пептичне дигестије животињског ткива, 40 g декстрозе и 15 g агара. Подлога има већу селективност за гљиве ако се дода хлорамфеникол.

3.4.1.2. Припремање и стандардизација суспензија

Суспензије бактерија и гљива су припремљене тако што су колоније узимане директно са подлоге и суспендоване у 5 mL стерилног физиолошког раствора. Густина почетне суспензије је подешавана коришћењем дензитометра (DEN-1, BioSan, Летонија), при чему је вршено упоређивање са 0,5 McFarland стандардом [164]. Како би се прилагодила густина према 0,5 McFarland стандарду, суспензије бактерија су садржале око 10^8 јединица за формирање колонија (CFU- Colony-forming units)/mL, а суспензије квасца су садржале око 10^6 CFU/mL. Суспензије гљивичних спора су припремљене пажљивим скидањем спора са растућих филаментозних гљива. Почетне суспензије спора гљива су додатно разблажене у 0,85% стерилном физиолошком раствору у односу 1:100 за бактерије и односу 1:1000 за гљиве.

3.4.1.3. Испитивани микроорганизми

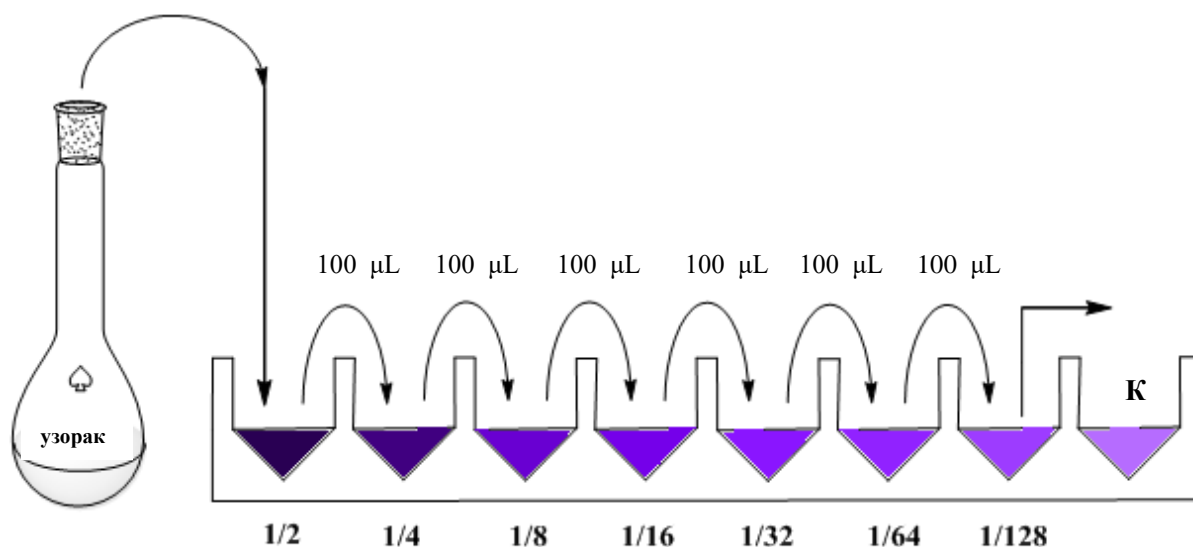
Антимикробна активности синтетисаних комплекса је испитана на Институту за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу. Антимикробна активност комплекса бакра(II) са одговарајућим S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине је одређена тестирањем на 18 микроорганизама од чега су 9 врста бактерије и то 3 врсте пробиотских бактерија, 2 клиничка изолата и 4 стандардне врсте. Такође, тестиране су и 2 врсте квасца као и 7 врста филаментозних гљива што је представљено у Табели 3.

Табела 3. Испитивани микроорганизми који су употребљени за одређивање антимикробне активности комплекса бакра(II) са одговарајућим S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине

Бактерије	Грам-позитивне бактерије	<i>Bacillus cereus</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923
		<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832
	Грам-негативне бактерије	<i>Salmonella enterica</i>
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853
		<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 12453
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922		
Гљиве	Квасци	<i>Saccharomyces boulardii</i>
		<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231
	Филаментозне гљиве	<i>Penicillium expansum</i>
		<i>Penicillium chrysogenum</i>
		<i>Penicillium italicum</i>
		<i>Trichoderma viride</i> ATCC® 13233
		<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC® 204305
		<i>Aspergillus flavus</i> ATCC® 9170
		<i>Aspergillus niger</i> ATCC® 16404

3.4.1.4. Испитивање осетљивости тестираних микроорганизама

Испитивање осетљивости микроорганизама дилуционом методом заснива се на одређивању минималне инхибиторне концентрације (МИК), као најниже концентрације испитиване супстанце која инхибира раст тестираних микроорганизама. Тако добијени резултати омогућавају квалитативну и квантитативну процену ефекта испитиваних једињења. Разликују се два типа дилуционе методе: микродилуциона и макродилуциона метода. Суштина дилуционе методе се огледа у припреми серије двоструких разблажења испитиваних супстанци (Слика 15).

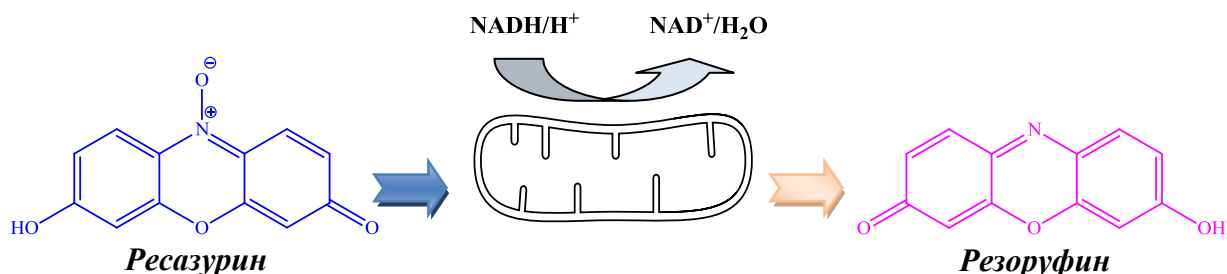


Слика 15. Припрема серије двоструких разблажења

3.4.1.4.1. Микродилуциона метода

Антимикробна активност је испитивана микродилуционом методом са ресазурином [165]. Одређена је минимална инхибиторна концентрација (МИК) и минимална микробицидна концентрација (ММК).

Ресазурин је индикатор ћелијског раста. Има плаво-љубичасту (нефлуоресцентну) боју и не показује токсично деловање на бактеријске ћелије. У периоду инкубације, ресазурин се редукује у резорурфин у присуству оксидоредуктаза живе ћелије (Слика 16). Очигледан доказ да је дошло до редукције је промена боје из плаво-љубичасте у розе. Крајњи производ редукције ресазурина је хидрорезорурфин који је безбојан и нефлуоресцентан.



Слика 16. Редукација ресазурина у резорурфин

За испитивање је коришћена микротитар плоча са 96 отвора у које је стављено по 100 µL хранљиве подлоге, Mueller-Hinton бујон за бактерије и Sabouraud-

-декстрозни бујон за гљиве. По 100 μL раствора испитиваних једињења почетне концентрације 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ је додато у први ред микротитар плоче. Двоструким разблажењем добијени су раствори концентрација у области од 1000 до 7,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$. У сваки бунарић је додато по 10 μL ресазурина. Затим је додавано по 10 μL суспензија бактерија и гљива. Тестирана једињења су испитана при концентрацији бактерија од 10^5 CFU/mL и концентрацији гљива од 10^3 CFU/mL. Припремљене плоче су инкубирани на 37°C током 24 сата за бактерије, на 28°C током 48 и 72 сата за гљиве. Минимална инхибиторна концентрација је дефинисана као најнижа концентрација испитиваних супстанци на којој није дошло до промене боје ресазурина из плаве у розу боју. Минимална микробицидна концентрација је одређена пресејавањем 10 μL узорка из отвора у којима није уочен раст на плочастом агару. Концентрација на којој после периода инкубације није уочен раст је дефинисана као минимална микробицидна концентрација.

Пошто концентровани диметилсулфоксид има бактерицидно дејство, постављена је контрола растварача којом је искључена могућност да диметилсулфоксид има утицај на раст микроорганизама до концентрације од 10%. Концентрација диметилсулфоксида је у експерименту и додатно смањена серијом двоструких разблажења, тако да не прелази 5%. Сваки експеримент је садржао три врсте контроле:

- 1) контролу раста (која подразумева присуство и раст бактерија без испитиване супстанце),
- 2) контролу стерилности (која подразумева одсуство живих бактерија) и
- 3) позитивну контролу (која подразумева присуство комерцијалног антибиотика).

Као позитивне контроле, у нашем истраживању, употребљени су доксицилин (антибиотик), флуконазол и кетоконазол (антимикотици).

3.4.2. Кинетичка мерења

Кинетика и механизам супституционих реакција бакар(II)-комплекса са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине као бидентатним лигандима изучавана је на Stopped-flow спектрофотометру у 25 mM *Hepes* пуферу, $\text{pH} \approx 7,2$. Све реакције су изучаване као реакције *псеудо*-првог реда, што значи да је концентрација лиганда била најмање 10 пута већа од концентрације комплекса. Супституционе реакције су изучаване на више температура (283, 288, 293, 303, 310 K).

Радна таласна дужина је одређена снимањем спектра смеше комплекса и лиганда у одређеним временским интервалима у опсегу таласних дужина између 220 и 450 nm. Таласна дужина на којој је највећа промена у апсорбанци у односу на време узета је као радна таласна дужина. Супституционе реакције су започете мешањем еквимоларних количина раствора комплекса и лиганда директно у Stopped-flow спектрофотометру. Спектрофотометријско одређивање константе брзине *псеудо*-првог реда, k_{obsd} , врши се праћењем промене апсорбанце раствора A_t у функцији времена t на одређеној таласној дужини, на основу једначине:

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

Зависност $\ln(A_t - A_\infty)$ од времена t је линеарна, тако да се из нагиба праве добија вредност за k_{obsd} . Величина A_∞ представља апсорбанцу након „бесконечно” дугог временског интервала (обично после 8-10 полувремена реакције). За одређивање вредности константи коришћен је компјутерски програм Microsoft Excell 2010 и OriginPro 8. Експериментални подаци су представљени у Табелама 4 и 5.

Табела 4. Константе брзине реакције *псеудо*-првог реда у функцији концентрације нуклеофила и температуре у реакцији између комплекса **С1** и 5'-GMP (5'-гуанозин-монофосфат) на $\text{pH} = 7,2$ (25 mM *Нерес пуфер*)

Т(К)	$10^4 C_{5'-\text{GMP}}/\text{M}$	Први корак $k_{\text{obsd1}} \cdot \text{s}^{-1}$	Други корак $k_{\text{obsd2}} \cdot \text{s}^{-1}$
310,0	2,40	800,57(6)	56,97(6)
	2,00	654,50(6)	46,14(6)
	1,40	351,00(6)	32,41(6)
	1,00	278,00(6)	22,30(6)
	0,50	125,00(5)	12,03(5)

^aБрој кинетичких мерења је представљен у заградама

Табела 5. Константе брзине реакције псеудо-првог реда у функцији концентрације нуклеофила и температуре у реакцији између комплекса C2 и 5'-GMP (5'-гуанозин-монофосфат) на рН = 7,2 (25 mM Нерес пуфер).

Т(К)	$10^4 C_{5'-GMP}/M$	Први корак $k_{obsd1} \cdot s^{-1}$	Други корак $k_{obsd2} \cdot s^{-1}$
310,0	2,40	1687(6)	131(6)
	2,00	1215(6)	99(6)
	1,40	869(6)	69(6)
	1,00	776(6)	57(6)
	0,50	427(5)	36(5)

^aБрој кинетичких мерења је представљен у заградама

3.4.3. Интеракције комплекса са ДНК

3.4.3.1. Апсорпциона спектроскопска мерења

Интеракције комплекса са ДНК су проучаване помоћу UV-Vis спектрофотометрије у циљу одређивања константе везивања (K_b). PBS (Фосфатни пуферски раствор = 0,01M, $C_{NaCl} = 0,137$ M, $C_{KCl} = 0,0027$ M, рН = 7,4) пуфер је коришћен за апсорпциона мерења. Серија раствора комплекс-ДНК је припремљена мешањем раствора комплекса константне концентрације (8 μ M) са инкрементима ДНК полазног раствора (1,25 mM).

3.4.3.1.1. UV-Vis ДНК интеракције

Основни раствор СТ-ДНК је припремљен у PBS пуферу, дајући однос UV апсорбанција на 260 nm и 280 nm (A_{260}/A_{280}) од око 1,8-1,9, што је указивало да је ДНК довољно ослобођена од протеина. Концентрација је утврђена на основу интензитета апсорпције на 260 nm ($\epsilon = 6600$ M⁻¹ cm⁻¹) [166]. UV-Vis спектри су снимани на Perkin-Elmer Lambda 35 или 25 спектрофотометру, користећи кварчне кивете дужине 1,0 cm (3,0 mL).

3.4.3.1.2. UV-Vis апсорбционе студије

Константа везивања, K_b , одређује се праћењем промена апсорбанце на одговарајућој таласној дужини након додавања ДНК раствора растуће концентрације на основу следеће једначине (1):

$$[\text{ДНК}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f) = [\text{ДНК}]/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/[K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)] \quad (1)$$

K_b се израчунава из односа нагиба и одсечка праве $[\text{ДНК}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_f) = f([\text{ДНК}])$, где је $[\text{ДНК}]$ концентрација ДНК, $\varepsilon_A = A_{\text{obsd}}/[\text{комплекс}]$, ε_f је екстинциони коефицијент некоординованог комплекса, а ε_b је екстинциони коефицијент координованог комплекса.

3.4.3.2. Флуоресцентна мерења

Интеракције комплекса са ДНК су испитиване и помоћу флуоресцентне спектроскопије. Мерења флуоресценције су одрађена на RF-1501 РС спектрофлуорометру (Shimadzu, Japan). Интензитет флуоресценције је мерен на таласној дужини ексцитације 527 nm, а флуоресцентне емисије на 612 nm. Ширина ексцитационог и емисионог прореза (10 nm) и брзина снимања су константне за све експерименте. Интеракције комплекса са ДНК су проучаване у присуству ЕБ (етијидијум--бромид) да би се утврдило да ли комплекс може да замени ЕБ из његовог ДНК-ЕБ комплекса. ДНК-ЕБ комплекс је припремљен мешањем 50 μM ЕБ и 50 μM ДНК (pH = 7,4). Могући ефекти везивања комплекса за ДНК су проучавани снимањем промене флуоресцентног емисионог спектра након додавања раствора комплекса (0-80 μM) у раствор ДНК-ЕБ. Пре мерења систем је инкубиран на собној температури у току 5 минута. Емисија раствора је снимана у области од 550 до 750 nm.

Степен интеракције комплекса и ДНК молекула одређује се израчунавањем Стерн-Волмерове (Stern-Volmer) константе (K_{sv}) применом Стерн-Волмерове једначине (2):

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

где су I_0 и I интензитети емисије у одсуству и присуству комплекса, $[Q]$ је укупна концентрација комплекса, K_{sv} је Стерн-Волмерова константа, која се може добити из нагиба праве зависности I_0/I од концентрације комплекса $[Q]$.

3.4.3.3. Мерења вискозности

Вискозности ДНК раствора су одређиване у присуству растућих количина комплекса **C1** и **C2**. Време протока је мерено помоћу дигиталне штоперице. За сваки узорак је мерење поновљено три пута, а затим је израчунато просечно време протока. Подаци су анализирани као $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ у односу на r , где је η вискозност ДНК у присуству комплекса, а η_0 је вискозност само ДНК у пуферском раствору. Вискозности су израчунате на основу посматраног времена протока за растворе који садрже ДНК (t) кориговано за време протока само пуфера (t_0), $\eta = (t - t_0)/t_0$.

3.4.4. *In vitro* антитуморска активност

Испитивање антитуморске активности синтетисаних једињења је извршено у Центру за молекулску медицину и испитивање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу коришћењем МТТ теста.

3.4.4.1. Припремање раствора испитиваних једињења

Комплекси су растворени у 10% диметилсулфоксиду који је разблажен у дестилованој води до концентрације од 10 mM и филтриран кроз Millipore филтер промера отвора 0,22 mm. Ови раствори су разблажени у медијуму за гајење непосредно пре употребе. МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум-бромид је растворен (5 mg/mL) у раствору соног фосфатног пуфера чија рН износи 7,2 и филтриран је кроз Millipore филтер промера отвора 0,22 mm пре употребе. Сви реагенси су набављени од Sigma Chemicals.

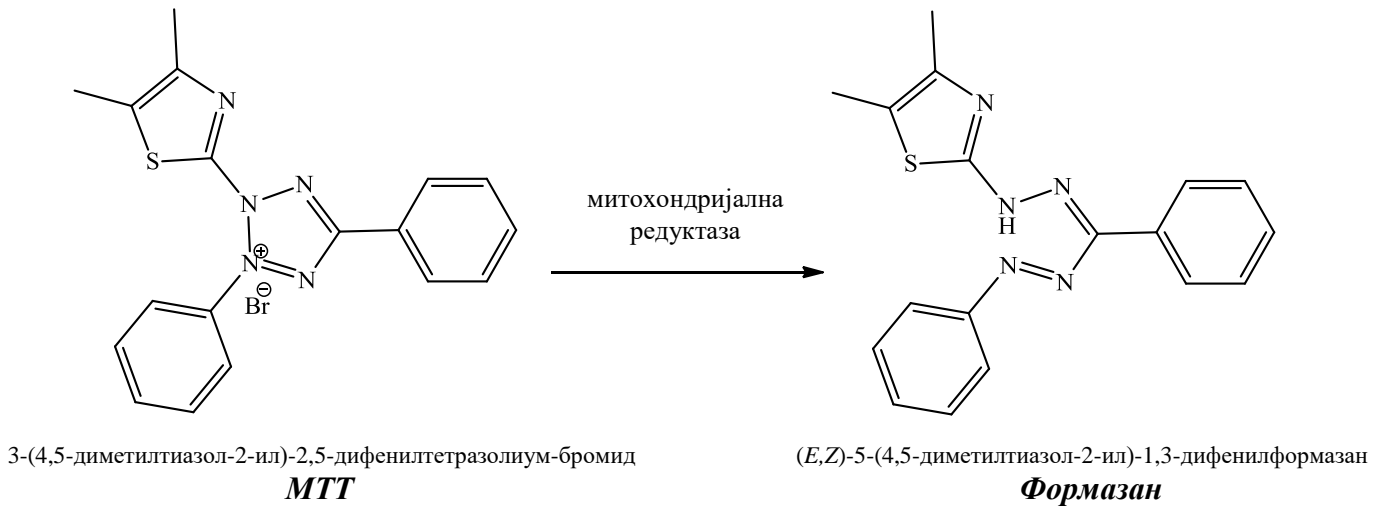
3.4.4.2. Ћелијска култура

Антитуморска активност бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине као лигандима, је испитивана *in vitro* на хуманим туморским ћелијама карцинома колона НСТ-116 (ATCC® CCL-247™). Ћелије су пребачене у DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) медијум (Sigma Aldrich, Минхен, Немачка) са 10% феталног говеђег серума (FBS-Fetal Bovine Serum, Sigma Aldrich, Минхен, Немачка), пеницилином (100 IU/mL), стрептомицином (100 µg/mL) у влажној атмосфери ваздуха са 5% CO₂ на температури од 37°C. Субконфлуентни монослојеви, у фази раста, су сакупљани кратким третирањем са 0,25% трипсином и 0,02% EDTA (етилендиаминтетрасирћетна киселина) који су растворени у соном фосфатном пуферу (PBS, PAA Laboratories GmbH), а након тога испрани три пута у соном фосфатном пуферском систему без серума. Број виталних ћелија је одређиван методом искључивања бојом уз помоћ трипан плавог. Наиме, трипан плаво је боја која може да прође само кроз оштећену ћелијску мембрану невијабилних ћелија и боји цитоплазму, док је код вијабилних ћелија ова могућност искључена.

3.4.4.3. Цитотоксични тестови

3.4.4.3.1. МТТ колориметријски тест

Ефекти тестираних једињења на ћелијску вијабилност ће бити одређивани коришћењем МТТ колориметријске технике [167]. МТТ тест је метода која се заснива на индиректном одређивању процента преживелих ћелија. МТТ или 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум-бромид, је окарактерисан као кристал жуте боје, растворљив у води, који због позитивног наелектрисања лако пролази кроз ћелијску мембрану. У метаболички активним ћелијама МТТ се редукује до нерастворних љубичастих кристала формазана (Слика 17). Митохондријална редуктаза (сукцинат дехидрогеназа), која је иначе активна само у живим ћелијама, катализује ову реакцију, па је редукција првобитног једињења до плаво обојеног продукта формазана директно пропорционална броју живих ћелија.



Слика 17. Редуција тетразолијумове соли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромида (MTT) до формаза помоћу митохондријалне редуктазе

НСТ-116 ћелије су биле разблажене у подлози за раст до $5 \cdot 10^4$ ћелија/mL и аликвоту ($5 \cdot 10^3$ ћелија/100 mL), а затим су пренете у 96 појединачних отвора. У посебне отворе је сипан медијум без ћелија како би се одредила оптичка густина самог медијума (бленк). Следећег дана подлога је била одливена и замењена са 100 μ L испитиваних једињења, при чему су серијом двоструких разблажења добијени раствори концентрација у опсегу од 1000 μ M до 7,8 μ M у подлози за раст. Свако разблажење је тестирано у трипликату. Ћелије су инкубирани на 37°C у присуству 5% CO₂ током 72 h. После инкубације супернатант је уклоњен и додат је 15% раствор МТТ (5 mg/mL PBS, 10 μ L) у DMEM медијуму без FBS и пренети у сваки отвор. Плоче су инкубирани још 4 сата на 37°C у 5% CO₂. Након те инкубације медијум са МТТ је уклоњен, а диметилсулфоксид (150 μ L) и глицински пуфер (20 μ L) су сипани да би се растворили кристали формаза. Растварање кристала је потпомогнуто и вортексовањем плоча у трајању од 10 минута. Оптичка густина у сваком отвору је одређена коришћењем мултифункционалног читача микротитар плоча Zenyth 3100 Multimode detector.

Ефекат испитиване супстанце је одређен поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму и интензитета који дају ћелије излагане испитиваној супстанци. Продуковани формаза се раствара у органским растварачима, а интензитет

боје је одређен спектрофотометријски на таласној дужини од 595 nm. Процент цитотоксичности смо израчунали коришћењем формуле:

$$\text{Цитотоксичност (\%)} = 100 - (E-B)/(C-B) \cdot 100$$

Б - односи се на бунаре где је само медијум,

С - означава укупну вијабилност/спонтану смрт нетретираних циљних ћелија,

Е - односи се на експерименталне бунаре.

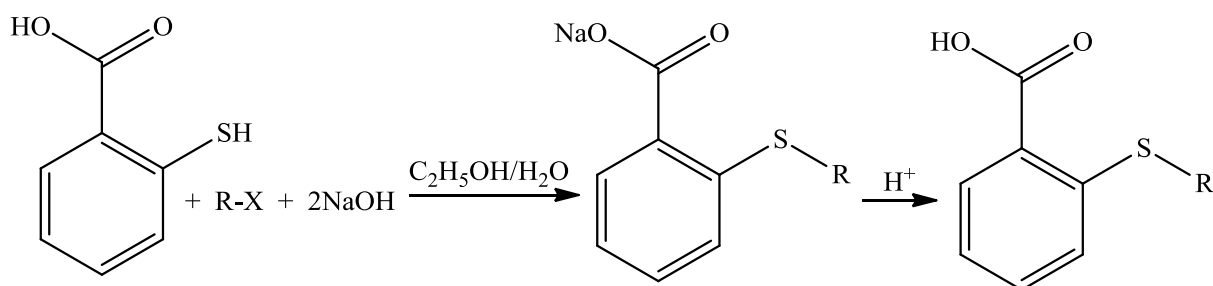
За сваки од тестираних комплекса процењивана је цитотоксичност у три одвојена експеримента.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. СИНТЕЗЕ И ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА

4.1.1. Нови бакар(II) комплекси са одговарајућим S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-alkenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$

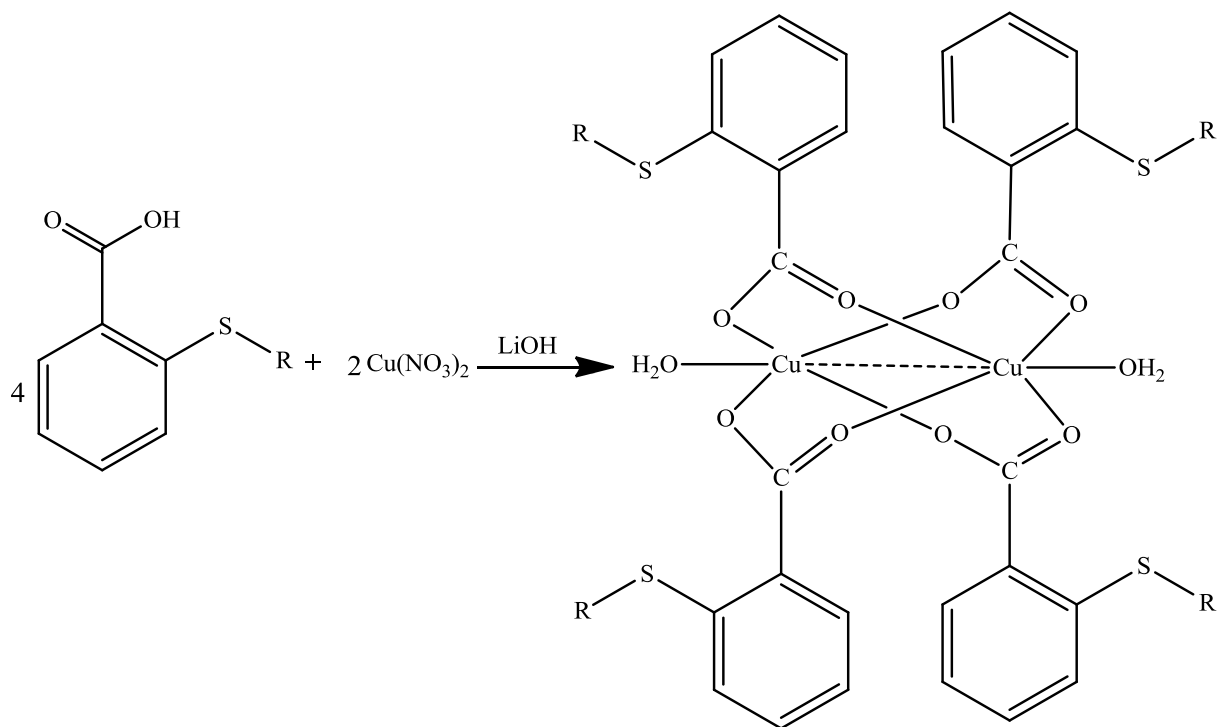
S-алкенил деривати тиосалицилне киселине (R = пропенил-(L1), изобутенил-(L2)) су припремљени алкиловањем поменуте киселине уз помоћ одговарајућих алкенил халогенида у алкалном водено-етанолном раствору (Схема 6) [60].



R = пропенил- (L1), изобутенил- (L2)

Схема 6. Реакција за добијање S-алкенил деривата тиосалицилне киселине

Комплекси бакар(II) ($[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$) и ($[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$) су синтетисани у задовољавајуће добрим приносима (преко 80%). Директном реакцијом између бакар(II)-нитрата трихидрата и лиганда (S-пропенил дериват тиосалицилне киселине или S-изобутенил дериват тиосалицилне киселине) у воденом раствору добијени су одговарајући комплекси (Схема 7). Литијум-хидроксид је додаван у реакциону смешу како би се извршило депротоновање карбоксилне групе у молекулу лиганда, а самим тим и обезбедили услови да се формира координативно-ковалентна веза преко доносних атома кисеоника карбоксилне групе. Као крајњи производ синтезе настали су одговарајући бинуклеарни комплекси у којима два јона бакара међусобно повезују мономерне компоненте у димерну форму.

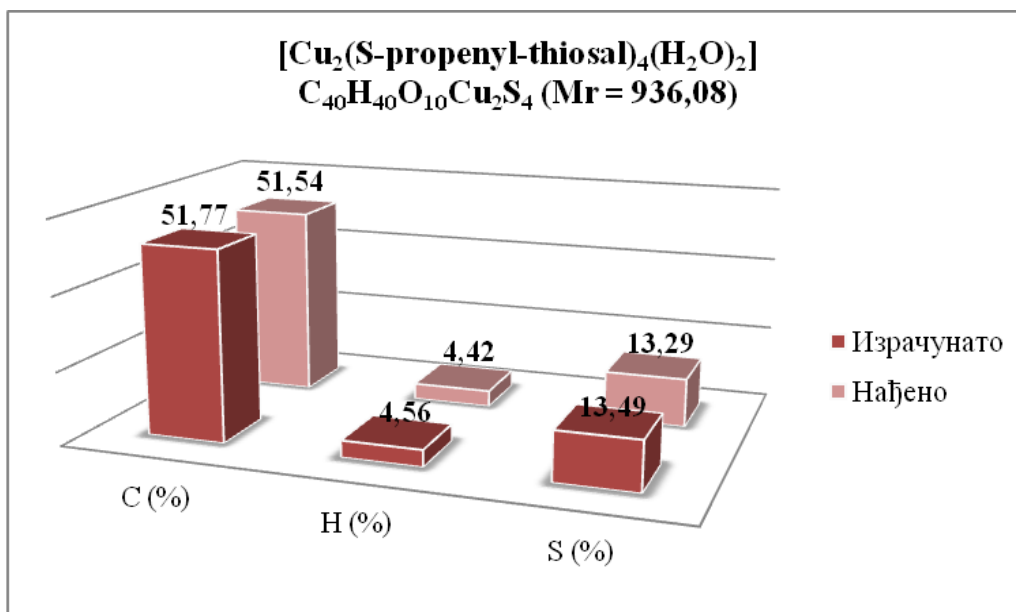


R = пропенил- (C1), изобутенил- (C2)

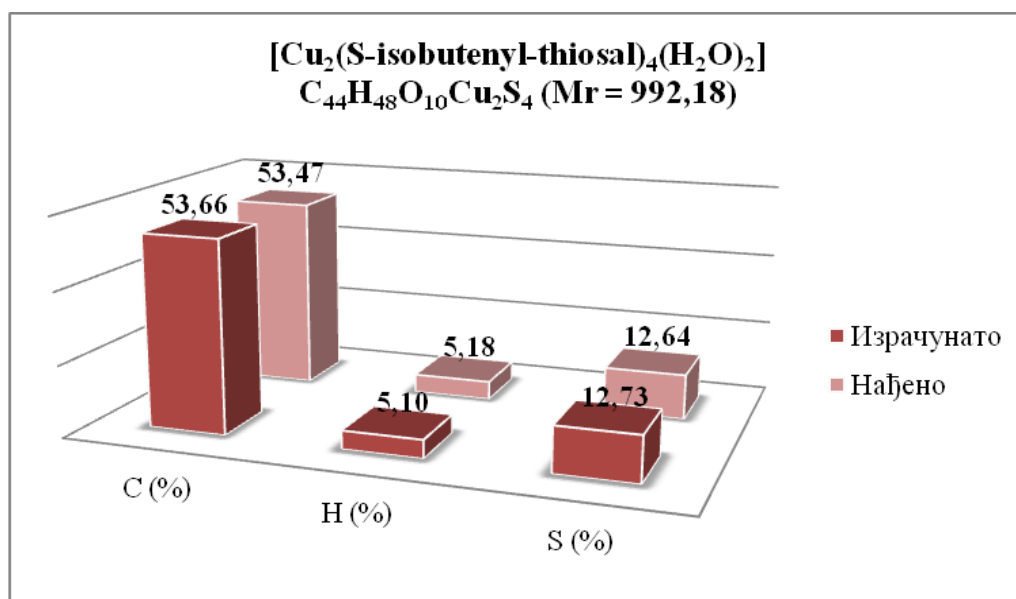
Схема 7. Реакција за добијање одговарајућих бакар(II)-комплекса са *S*-алкенил дериватима тиосалицилне киселине

4.1.2. Елементална микроанализа новосинтетисаних бакар(II)-комплекса

Састав бинуклеарних комплекса бакра(II) са бидентатним лигандима типа *S*-алкенил деривата тиосалицилне киселине је представљен на Слици 18а и Слици 18б.



Слика 18а. Резултати елементалне микроанализе за бинуклеарни комплекс бакра(II) са S-пропенил дериватом тиосалицилне киселине



Слика 18б. Резултати елементалне микроанализе за бинуклеарни комплекс бакра(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине

4.1.3. Инфрацрвени спектри S-алкенил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бакар(II)-комплекса

Како би се утврдио начин везивања S-алкенил деривата тиосалицилне киселине за бакар(II)-јон у награђеним комплексима, снимљени су инфрацрвени спектри слободних лиганада и синтетисаних комплекса. Најважније траке у инфрацрвеним спектрима S-алкенил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бинуклеарних бакар(II)-комплекса су приказане у Табели 6.

Табела 6. Најважније траке у инфрацрвеним спектрима S-алкенил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бинуклеарних бакар(II)-комплекса

ЛИГАНДИ/КОМПЛЕКСИ	-S-R	-COO ⁻ (as)	-COO ⁻ (sim)
S-propenyl-thiosal (L1)	702(m)	1680(s)	1415(s)
S-isobutenyl-thiosal (L2)	702(m)	1676(s)	1412(s)
[Cu ₂ (S-propenyl-thiosal) ₄ (H ₂ O) ₂] (C1)	696(m)	1610(s) 1596(s)	1401(s)
[Cu ₂ (S-isobutenyl-thiosal) ₄ (H ₂ O) ₂] (C2)	697(m)	1613(s) 1589(s)	1400(s)

s (strong) - траке јаког интензитета, m (medium) - траке средњег интензитета

4.1.4. Нуклеарно-магнетно-резонанциони (¹H и ¹³C) спектри S-алкенил деривата тиосалицилне киселине

Вредности хемијских померања за атоме водоника и угљеника у молекулима лиганада представљене су у Табели 7.

Табела 7. Хемијска померања водоникових и угљеникових атома у ¹H и ¹³C NMR спектрима S-алкенил деривата тиосалицилне киселине

	ЛИГАНДИ	
	S-propenyl-thiosal (L1)	S- isobutenyl-thiosal (L2)
¹ H NMR (CDCl ₃ , δ ppm)	3,21 (d, 2H, -CH ₂), 5,92 (m, 1H, =CH), 4,93 (m, 2H, =CH ₂) 7,47-7,91 (m, 4H, -Ar)	1,82 (s, 3H, -CH ₃), 4,98 (m, 2H, =CH ₂), 3,44 (t, 2H, -CH ₂), 7,42-8,30 (m, 4H, -Ar)
¹³ C NMR (CDCl ₃ , δ ppm)	38,2 (-CH ₃), 115,9 (=CH ₂), 136,5 (=CH), 125,3; 125,6; 130,2; 131,7; 133,8; 140,1 (-Ar), 172,0 (-COOH)	22,5 (-CH ₃), 46,1 (-CH ₂), 112,1 (=CH ₂), 125; 126,5; 126,7; 133,2; 134,1; 142,6 (-Ar), 168,1 (-COOH)

4.1.5. Магнетна мерења

Резултати магнетних мерења за бинуклеарне комплексе бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине дати су у Табели 8.

Табела 8. Вредности магнетних момената испитиваних комплекса бакра(II)

КОМПЛЕКСИ	μ_{eff}
$[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1)	$\mu(294\text{K}) = 1,84 \mu_{\text{B}}$
$[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2)	$\mu(294\text{K}) = 1,86 \mu_{\text{B}}$

4.1.6. Моларна проводљивост

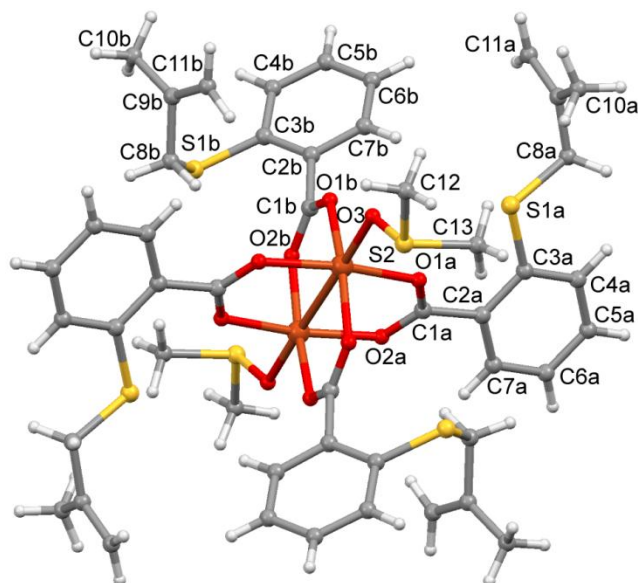
Вредности моларне проводљивости за испитиване комплексе бакра(II) су представљене у Табели 9.

Табела 9. Мерења моларне проводљивости бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине

КОМПЛЕКСИ	$\Lambda_{\text{M}}, \text{Scm}^2\text{mol}^{-1}$ (растварач)
$[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1)	5,06 (DMSO)
$[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2)	9,43 (DMSO)

4.1.7. Кристална структура бинуклеарног комплекса бакра(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$ (C2)

Рендгенском структурном анализом је потврђена структура комплекса бакра(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине (C2), као што је приказано на Слици 19.



Слика 19. Кристална структура $[Cu_2(S\text{-isobutenyl-thiosal})_4(DMSO)_2]$ (**C2**) и начин обележавања атома у молекулу комплекса

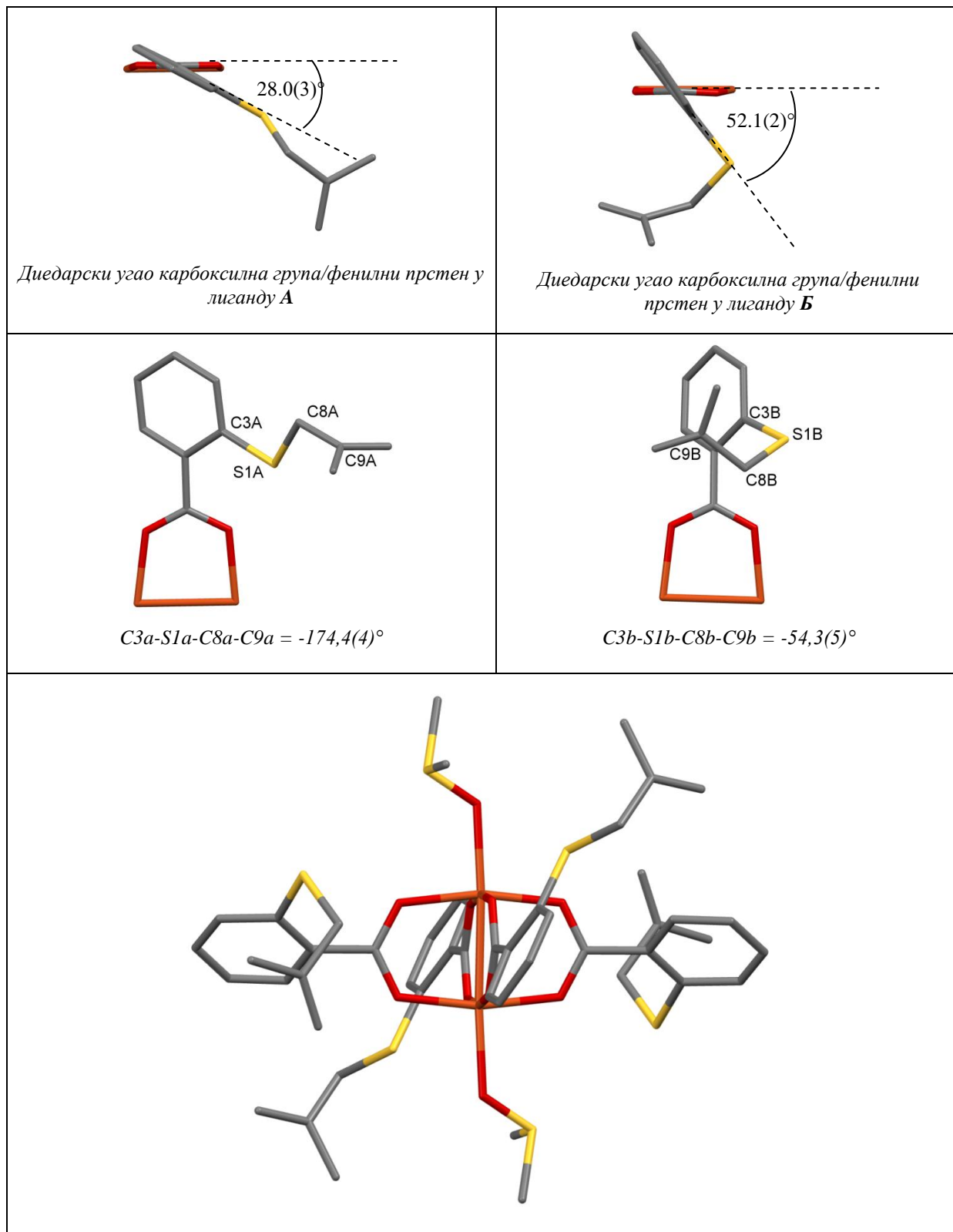
У Табели 10 су приказане одабране дужине и углови веза у молекулу испитиваног комплекса бакра(II) (**C2**).

Табела 10. Одабране дужине веза (Å) и углови веза (°) у комплексу **C2**

дужине веза (Å)		углови веза (°)	
Cu1...Cu1 ⁱ	2,643(7)	O1a–Cu1–O1b	88,4(1)
Cu1–O1a	1,974(2)	O1a–Cu1–O2b ⁱ	89,8(1)
Cu1–O2a	1,968(2)	O1b–Cu1–O2a ⁱ	90,0(1)
Cu1–O1b	1,952(2)	O2a ⁱ –Cu1–O2b ⁱ	89,4(1)
Cu1–O2b	1,967(2)	O1a–Cu1–O3	98,1(1)
Cu1–O3	2,148(2)	O1b–Cu1–O3	98,1(1)
O1a–C1a	1,257(4)	O2a ⁱ –Cu1–O3	93,9(1)
O2a–C1a	1,254(4)	O2b ⁱ –Cu1–O3	93,9(1)
O1b–C1b	1,256(4)	O1a–Cu1–O2a ⁱ	168,1(1)
O2b–C1b	1,256(4)	O1b–Cu1–O2b ⁱ	167,98(9)
C3a–S1a	1,762(3)	C1a–C2a–C3a	127,8(3)
C8a–S1a	1,817(5)	O1a–C1a–O2a	125,7(3)
C3b–S1b	1,761(4)	O1b–C1b–O2b	125,6(3)
C8b–S1b	1,799(7)	Cu1 ⁱ –Cu1–O3	175,17(8)

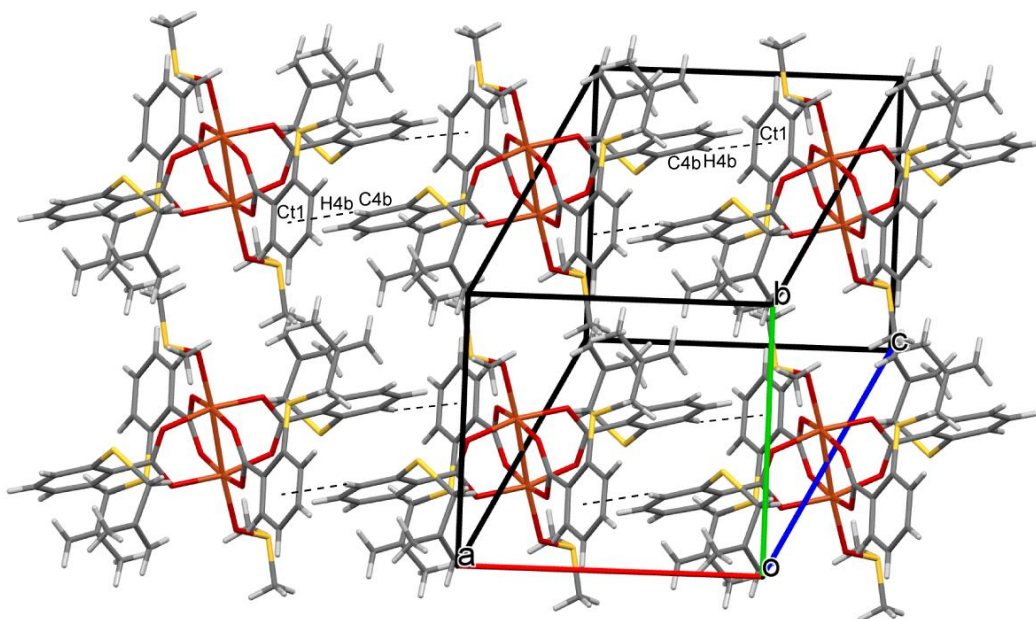
Симетријске операције: (i) $-x, -y, -z+1$.

У комплексу **C2** лиганди **A** и **B** показују значајне конформационе разлике што се може видети на Слици 20.



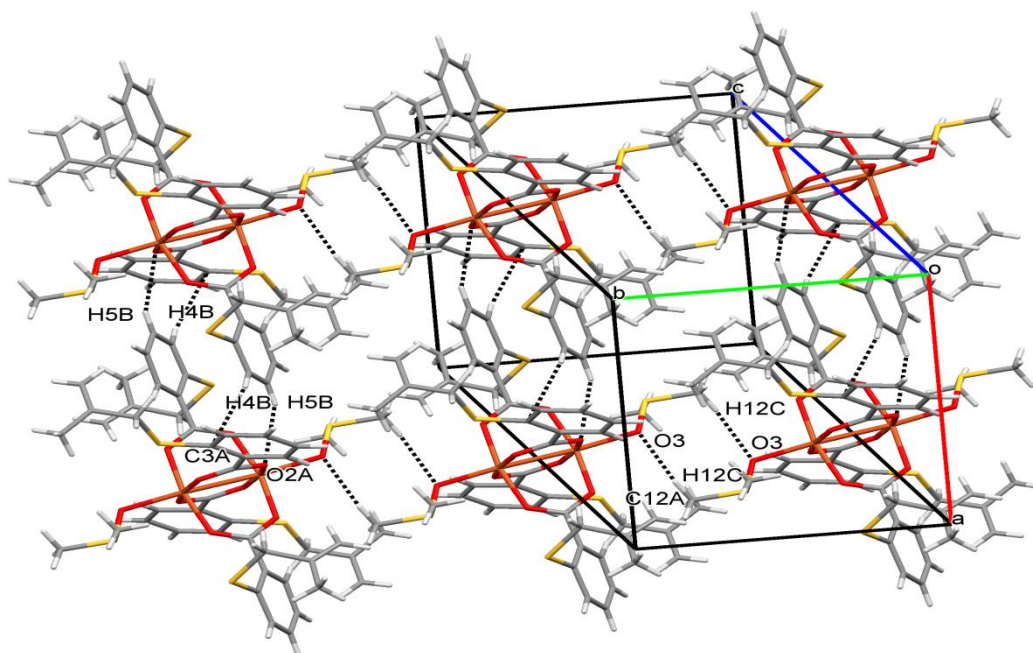
Слика 20. Различите конформације *S*-изобутенил деривата тиосалицилне киселине приказаног као лиганд **A** (лево) и **B** (десно)

У кристалном паковању, слабе С-Н... π интеракције између суседних ароматичних лиганата повезују молекуле комплекса у ланце који се протежу дуж *a* кристалографске осе [C4b-H4b... π ⁱⁱ; C... Cg1 = 3,742(5); Н...Cg1 = 2,89 Å; С-Н...Cg1 154°; Cg1: центроид кроз C2a/C7a фенилних прстена; (ii) = -x+1,-y,-z+1]. С-Н... π интеракције су приказане испрекиданним линијама. Начин паковања молекула у кристалу приказан је на Слици 21.



Слика 21. Кристално паковање бинуклеарног комплекса бакар(II) са *S*-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине

Узимајући у обзир главну оријентацију аксијалног DMSO лиганда, посматрани су кратки и усмерни С-Н...О контакти између аксијалних лиганата [C12a-H12c...O3ⁱⁱⁱ; Н...О 2,47 Å, С-Н...О 163°; (iii) -x,-y-1,-z+1] који повезују ланце молекула дуж *b* кристалографске осе (Слика 22).



Слика 22. Приказ стабилизације кристалне структуре молекула $[Cu_2(S\text{-isobutenyl-thiosal})_4(DMSO)_2]$ (C2) slabим C–H... π и C–H...O интеракцијама

У Табели 11. Приказане су интра и интермолекулске водоничне везе комплекса C2 уочене рендгенском структурном анализом (\AA , $^\circ$).

Табела 11. Одабране дужине водоничних веза (\AA) и углови веза ($^\circ$) у C2 комплексу

D–H...A	D–H (\AA)	D...A (\AA)	H...A (\AA)	D–H...A ($^\circ$)
C56–H56a...O1a	0,96	3,424(4)	2,55	150
C55–H55a...O3 ⁱ	0,96	3,347(4)	2,42	162
C5b–H5b...O2a ⁱⁱ	0,96	3,514(4)	2,63	157
C4b–H4b...Cg1 ⁱⁱ	0,96	3,744(6)	2,89	154

Cg1: центроид кроз C2a, C3a, C4a, C5a, C6a, C7a фенилни прстен;
Симетријске операције: (i) $-x, -y-1, -z+1$; (ii) $-x+1, -y, -z+1$.

4.2. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ

4.2.1. *In vitro* антимикуробна активност

Резултати испивања *in vitro* антимикуробних активности за слободне лиганде и одговарајуће бакар(II)-комплексе су приказани у Табели 12. МИК и ММК вредности за доксициклин, флуконазол и кетоконазол, наведене су у Табели 13. Сва испитивана једињења показују селективну и умерену антимикуробну активност. Вредности МИК и ММК за новосинтетисане комплексе биле су у распону од 31,25 до > 1000 µg/mL. Најбољи резултати су и даље нижи од вредности за позитивне контроле.

Табела 12. *In vitro* антимикуробна активност бидентатних лиганата S-алкенил деривата тиосалицилне киселине (L1 и L2) и одговарајућих бинуклеарних бакар(II)-комплекса (C1 и C2)

Испитиване врсте микроорганизама	L1		C1		L2		C2	
	МИК ^a	ММК ^b	МИК	ММК	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	250	500	31,25	500	1000	1000	500	500
<i>Lactobacillus plantarum</i>	500	1000	500	500	1000	1000	500	500
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	500	1000	500	1000	500	1000	500	500
<i>Bacillus cereus</i>	62,5	250	1000	1000	62,5	250	1000	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	1000	> 1000	1000	1000	> 1000	> 1000	1000	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 12453	> 1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000	> 1000	500	500
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	1000	> 1000	1000	> 1000	1000	> 1000	1000	> 1000
<i>Salmonella enterica</i>	500	1000	1000	1000	250	1000	1000	> 1000
<i>Saccharomyces boulardii</i>	500	1000	500	1000	1000	> 1000	500	1000
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231	1000	> 1000	1000	1000	1000	> 1000	500	500
<i>Penicillium chrysogenum</i>	250	1000	500	> 1000	500	> 1000	250	1000
<i>Penicillium italicum</i>	1000	1000	250	> 1000	500	> 1000	250	> 1000
<i>Penicillium expansum</i>	1000	1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC® 13233	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500	1000
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC® 9170	1000	1000	500	1000	1000	1000	500	1000
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC® 204305	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<i>Aspergillus niger</i> ATCC® 16404	> 1000	> 1000	500	1000	> 1000	> 1000	500	1000

^a МИК вредности (µg/mL) – минимална инхибиторна концентрација

^b ММК вредности (µg/mL) – минимална микробицидна концентрација

Табела 13. *In vitro* антимикробна активност позитивних контрола (доксциклин за бактерије; флуконазол и кетоконазол за гљивице)

Испитиване врсте микроорганизама	Доксициклин		Флуконазол		Кетоконазол	
	МИК ^а	ММК ^б	МИК	ММК	МИК	ММК
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	31,25	62,50	/	/	/	/
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,45	7,81	/	/	/	/
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	1,95	15,63	/	/	/	/
<i>Bacillus cereus</i>	0,98	7,81	/	/	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	0,22	3,75	/	/	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	62,5	125	/	/	/	/
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 12453	15,63	62,5	/	/	/	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	15,63	31,25	/	/	/	/
<i>Salmonella enteric</i>	15,63	31,25	/	/	/	/
<i>Saccharomyces boulardii</i>	/	/	31,25	1000	/	/
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231	/	/	31,25	1000	31,25	/
<i>Penicillium chrysogenum</i>	/	/	62,5	500	62,5	/
<i>Penicillium italicum</i>	/	/	1000	1000	125	/
<i>Penicillium expansum</i>	/	/	/	/	62,5	/
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC® 13233	/	/	/	/	62,5	/
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC® 9170	/	/	62,50	125	125	/
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC® 204305	/	/	/	/	125	/
<i>Aspergillus niger</i> ATCC® 16404	/	/	62,5	62,5	62,5	/

^а МИК вредности (µg/mL) – минимална инхибиторна концентрација

^б ММК вредности (µg/mL) – минимална микробицидна концентрација; ”/“– није тестирано.

4.2.2. Супституционе реакције $[\text{Cu}_2(\text{S-alkenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ са 5'-GMP

Како би се испитао афинитет координовања нових комплекса са нуклеобазама, проучавали смо супституционе реакције комплекса $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1) и $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2) са одабраним нуклеофилом 5'-GMP (5'-гуанозин-монофосфат) који је фрагмент ДНК (Схема 8).

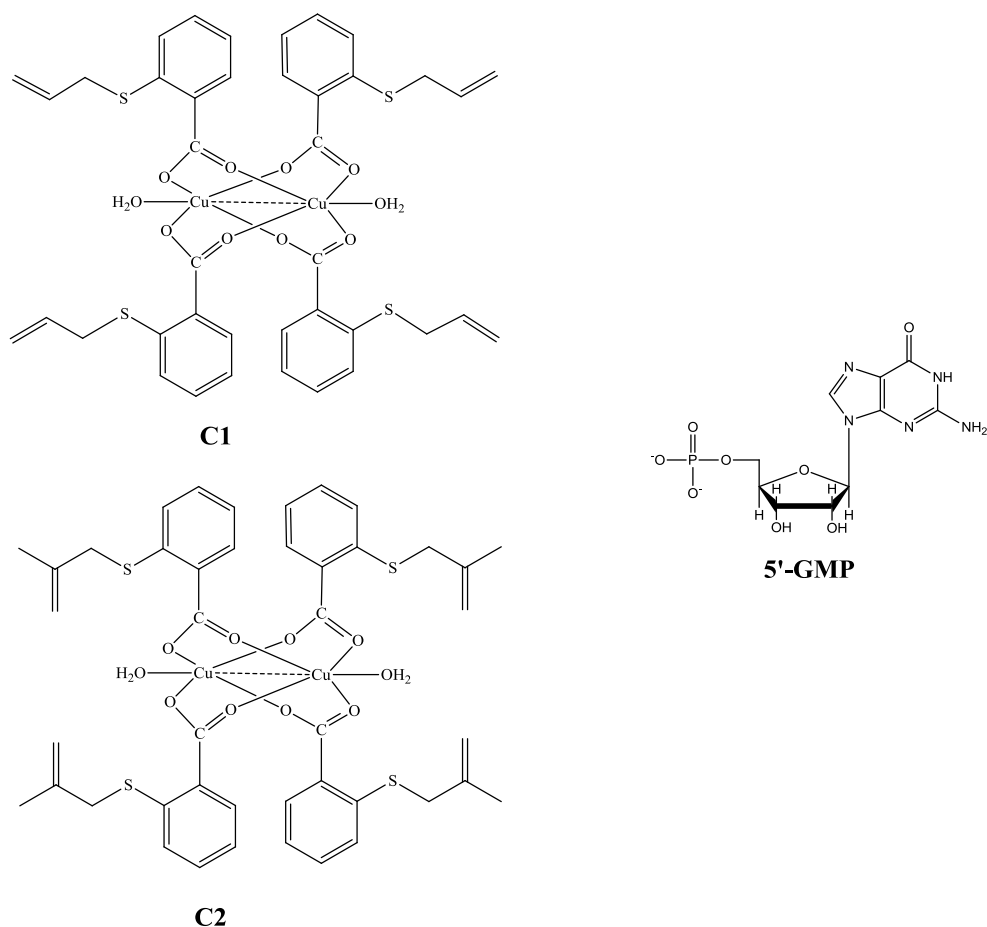


Схема 8. Структура новосинтетисаних бакар(II)-комплекса и 5'-GMP

Промена апсорбанце је праћена на радној таласној дужини, као функција времена на 310 K и $\text{pH} \approx 7,2$. Посматране реакције се одигравају као што је представљено на Схеми 9. Реакције супституције код оба комплекса су се одвијале у два узастопна корака, која су зависна од концентрације нуклеофила.

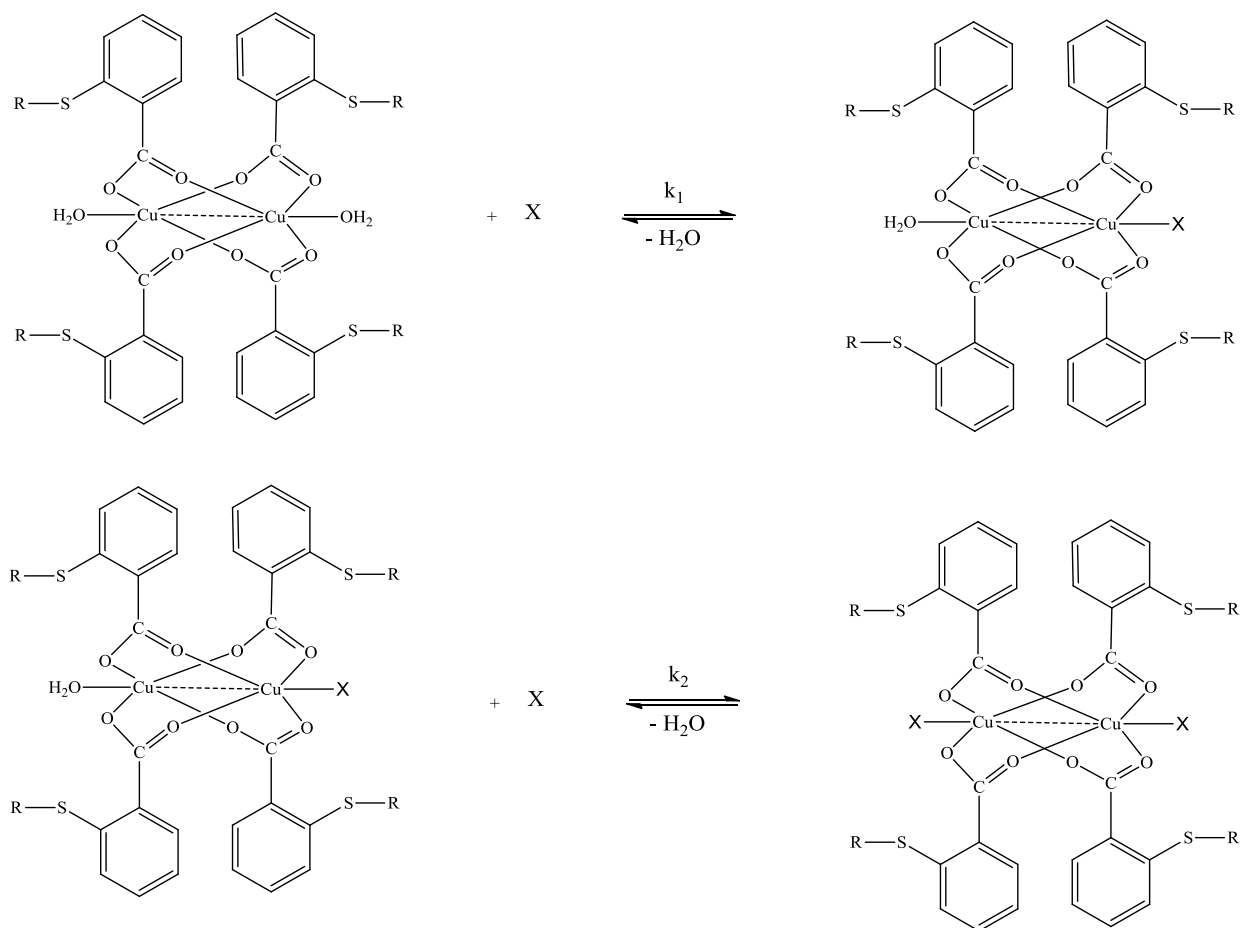


Схема 9. Супституционе реакције комплекса бакра(II) са *S*-алкенил дериватима тиосалицилне киселине

Константе брзине реакција *псеудо*-првог реда су одређене из графика зависности k_{obsd} у функцији укупне концентрације нуклеофила, према једначинама (1) и (2), $\text{Nu} = 5'\text{-GMP}$, где је нагиб крива обележен са k_1 или k_2 . У графику однос $k_{\text{obsd}1,2}$ у функцији концентрације нуклеофила приказана је као линеарна зависност за све комплексе и кораке супституције. Резултати су резимирани у Табели 14.

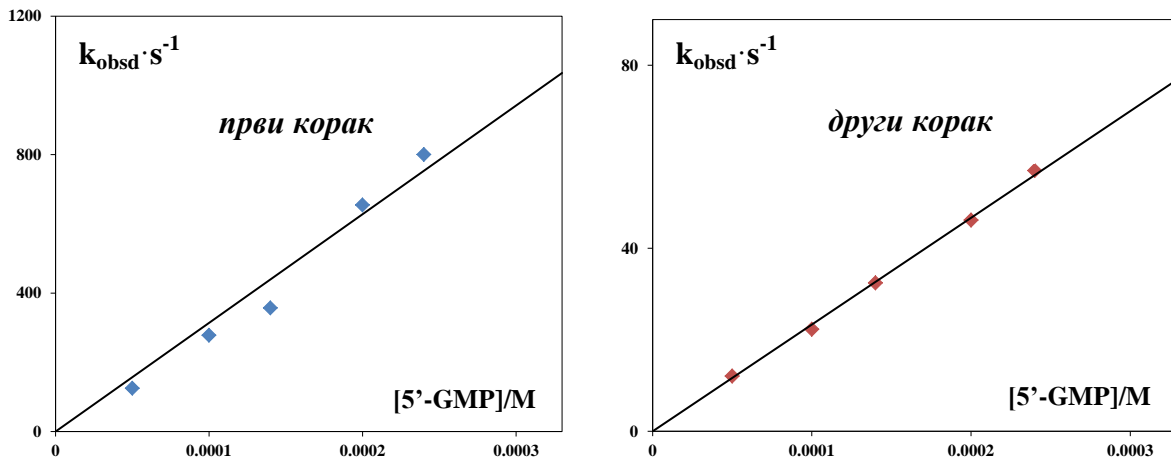
$$k_{\text{obsd}1} = k_1[\text{Nu}] \quad (1)$$

$$k_{\text{obsd}2} = k_2[\text{Nu}] \quad (2)$$

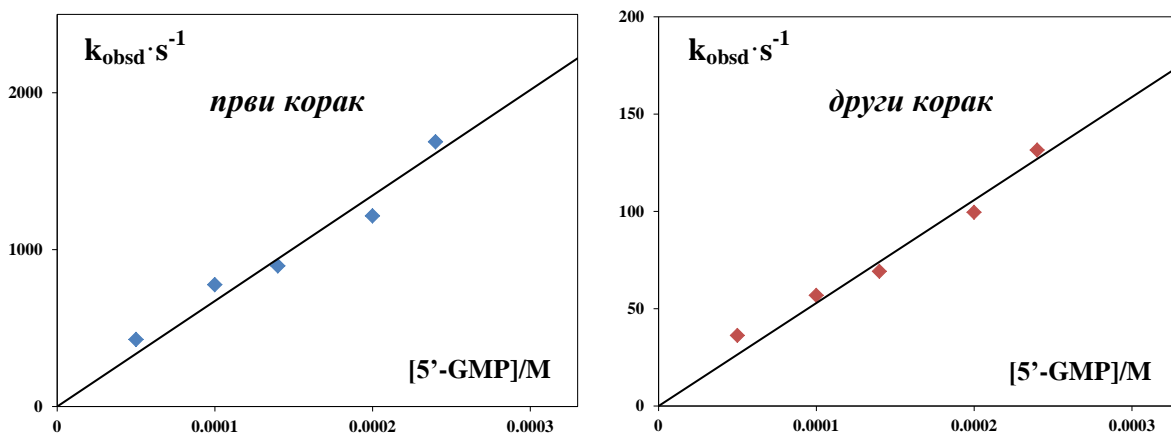
Табела 14. Константе брзина реакција супституције нових комплекса бакра(II) са 5'-GMP на $pH = 7,2$ (25 mM *Hepes* пуфер) на 310 K

5'-GMP		
	<i>Први корак</i> $k_2[M^{-1} s^{-1}]$	<i>Други корак</i> $k_2[M^{-1} s^{-1}]$
Комплекс C1	$(6,7 \pm 0,2) 10^6$	$(5,2 \pm 0,1) 10^5$
Комплекс C2	$(3,1 \pm 0,1) 10^6$	$(2,3 \pm 0,1) 10^5$

На Сликама 23а и 23б је приказана зависност k_{obsd} у односу на концентрацију нуклеофила за комплекс C1 и C2.



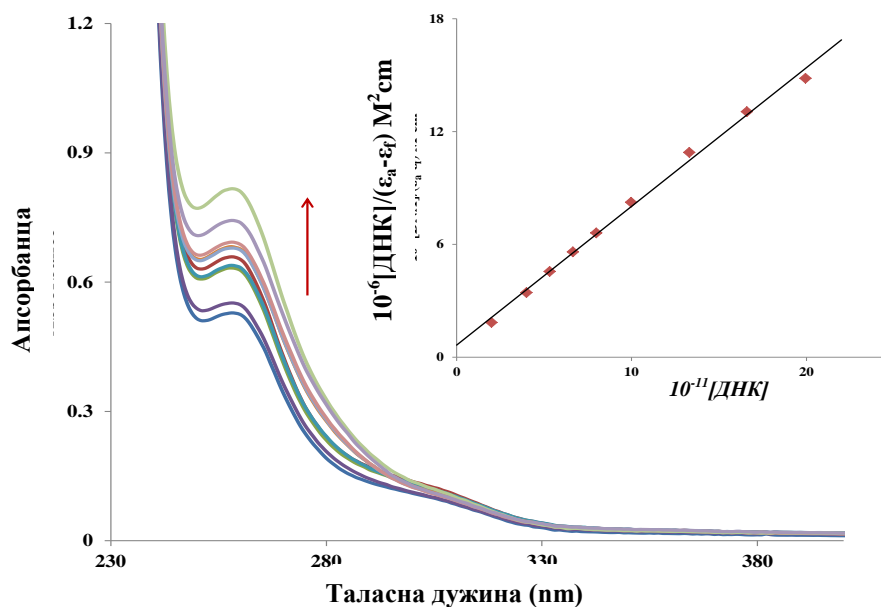
Слика 23а. Константе брзине реакције *псеудо*-првог реда у функцији концентрације нуклеофила за први и други корак реакција супституције комплекса C1 са 5'-GMP на $pH = 7,2$ и 310 K у 25 mM *Hepes* пуфер



Слика 23б. Константе брзине реакције *псеудо*-првог реда у функцији концентрације нуклеофила за први и други корак реакција супституције комплекса C2 са 5'-GMP на $pH = 7,2$ и 310 K у 25 mM *Hepes* пуфер

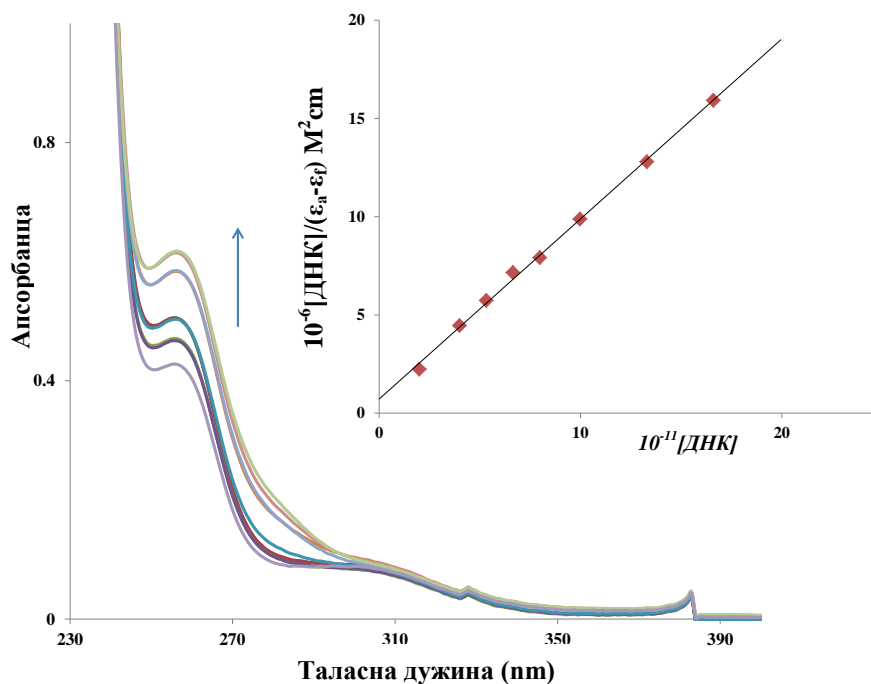
4.2.3. Интеракције испитиваних комплекса бакра(II) са ДНК

Интеракције комплекса **C1** и **C2** са СТ-ДНК су испитане применом UV-Vis титрације. Спектри UV-Vis титрације за бинуклеарне комплексе бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине су приказани на Сликама 24а и 24б.



* Стрелица показује хиперхромизам у спектралном опсегу

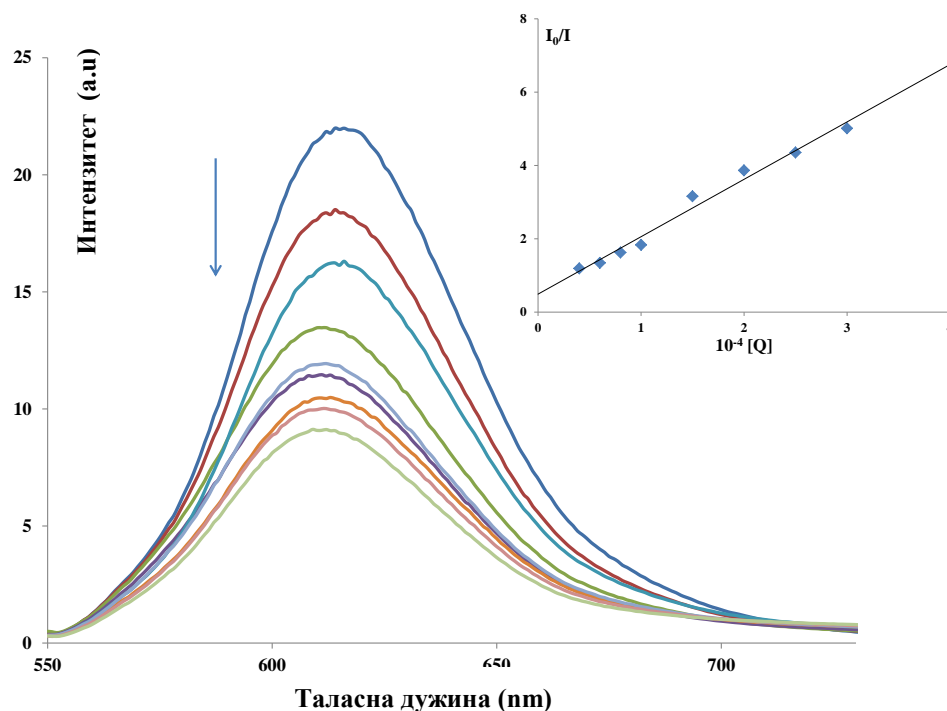
Слика 24а. Спектар UV-Vis титрације за комплекс **C1** (10 μM) у PBS пуферу са утицајем повећања концентрације СТ-ДНК (0-15 μM). * Уз додатак график зависности $[\text{ДНК}] / (\epsilon_A - \epsilon_F)$ у функцији $[\text{ДНК}]$.



* Стрелица показује хиперхромизам у спектралном опсегу

Слика 246. Спектар UV-Vis титрације за комплекс C2 (10 μM) у PBS пуферу са утицајем повећања концентрације СТ-ДНК (0-15 μM). * График зависности $[\text{ДНК}] / (\epsilon_A - \epsilon_f)$ у функцији $[\text{ДНК}]$.

Спектар флуоресцентне титрације за комплекс C1 је представљен на Слици 25. Константа за комплекс C1 израчуната је коришћењем Стерн-Волмерове једначине што је приложено уз приказ спектра за поменути комплекс.



* Стрелица показује промене интензитета флуоресценције након повећања концентрације комплекса **C1** (4-30 μM).

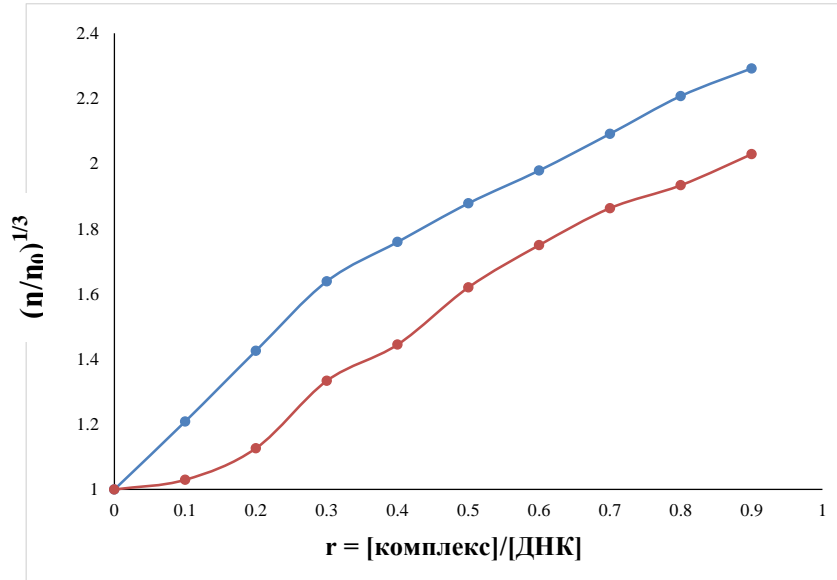
Слика 25. Спектар флуоресцентне титрације ЕБ (10 μM) везаног за ДНК (10 μM) у присуству различитих количина комплекса **C1**. * Уз приказ је представљен Стерн-Волмеров график за флуоресцентну титрацију ЕБ-ДНК са комплексом **C1**.

Према константама приказаним у Табели 15, може се приметити да комплекси бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине веома добро интерагују са СТ-ДНК, што је у сагласности са UV-Vis спектроскопским студијама.

Табела 15. Добијене константе за интеракцију између комплекса **C1** и **C2** са СТ-ДНК.

	СТ-ДНК	
	K_b [M^{-1}]	K_{sv} [M^{-1}]
Комплекс C1	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^5$
Комплекс C2	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^6$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^5$

У циљу даље карактеризације везивања испитиваних комплекса за ДНК, мерен је вискозитет раствора ДНК у присуству растућих количина комплекса С1 и С2 (Слика 26).

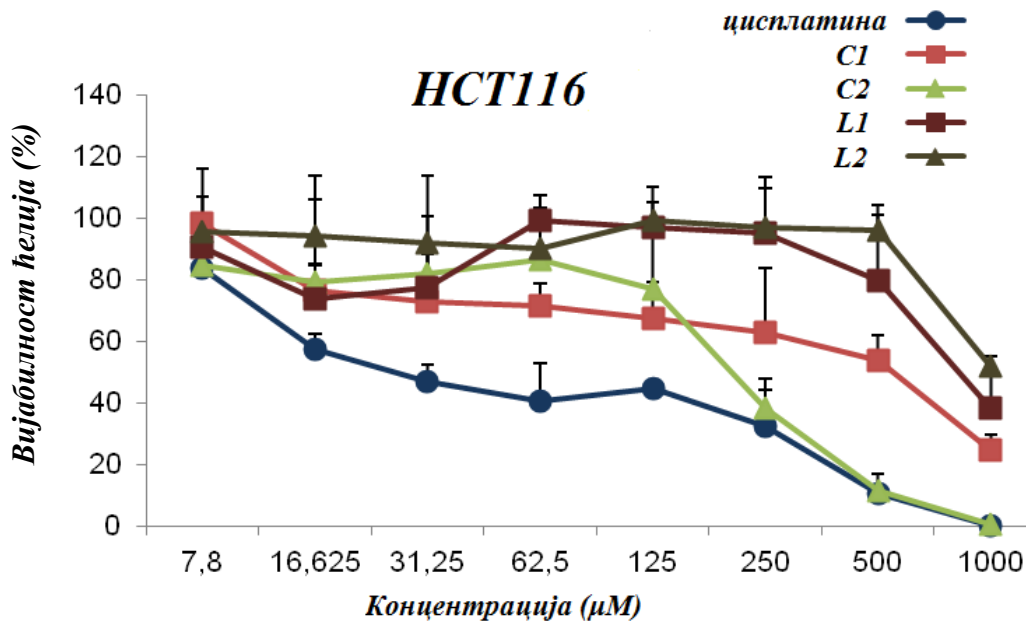


Плава линија представља комплекс С1, црвена линија представља комплекс С2.

Слика 26. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ СТ-ДНК (0,01 mM) у пуферском раствору (Фосфатни пуферски систем = 0,01 M, $C_{NaCl} = 0,137$ M, $C_{KCl} = 0,0027$ M, pH = 7,4) у присуству комплекса С1 и С2 у растућим количинама (r).

4.2.4. *In vitro* антитуморска активност

Испитивање *in vitro* антитуморске активности новосинтетисаних једињења (S-алкенил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих бинуклеарних бакар(II)-комплекса) је спроведено на хуманим ћелијама карцинома колона НСТ-116. Цитотоксична активност бидентатних лиганата и њихових одговарајућих бакар(II)-комплекса на поменутој ћелијској линији након 24 часа представљена је на Слици 27.



* Свака тачка представља средњу вредност \pm SD (стандардна девијација) три експеримента са три понављања по дози.

Слика 27. Репрезентативни график преживљавања ћелија НСТ-116 након 24 часа раста ћелија у присуству одговарајућих комплекса бакра(II) и лиганд прекурсора*

Резултати IC_{50} (μM) вредности испитиваних лиганата, *цисплатине* и одговарајућих комплекса представљени су у Табели 16. Ако сагледамо све тестиране новосинтетисане лиганде и комплексе (не узимајући у обзир *цисплатину* као стандард), комплекс **C2** је показао највећу активност. IC_{50} вредност за комплекс **C2** је око пет пута мање од IC_{50} вредности за лиганде **L1** и **L2**, двоструко мање од IC_{50} вредности за комплекс **C1**. Вредности IC_{50} за сва испитивана једињења су видно ниже у поређењу са стандардом *цисплатином*.

Табела 16. IC_{50} (μM) вредности за испитиване лиганде и одговарајуће комплексе бакра(II) након 24 сата од излагања НСТ116 ћелија израчунате на основу резултата МТТ теста*

Испитивана једињења	Ћелијска линија (НСТ116)
L1	911,23±52,87
L2	992,21±48,57
<i>Цисплатина</i>	18,27±3,54
C1	588,23±25,32
C2	202,11±16,14

* Подаци су приказани као средња вредност \pm SD (стандардна девијација) резултата добијених из три независна експеримента.

5. ДИСКУСИЈА

После глобалног успеха клиничке примене *цисплатине* (*cis*-диамминдихлоридоплатина(II)-комплекс) у хемотерапији рака, настављено је са истраживањем и откривањем нових комплексних једињења са различитим јонима прелазних метала као новим антитуморским агенсима [5,6,130,132,134,168]. То је првенствено условио неповољан фармаколошки профил *цисплатине* (неселективно дејство, широк спектар нежељених ефеката, појава резистенције итд.). Истраживања у овој области усмерена су ка испитивању биолошки активних супстанци које се неће ковалентно везивати за ДНК ланац, већ ће показати способност остваривања нековалентне везе [5,6,130,132,134].

Интересовања све већег броја истраживачких група је фокусирано на комплексе бакра(II), што је подстакнуто присуством овог метала у металопротеинима и металоензимима [169,170], као и због антимицробног, антиинфламаторног и цитотоксичног потенцијала његових једињења [5,6,130,131,134]. Лиганди карбоксилатног типа су занимљиви за истраживања, јер карбоксилна група показује мноштво различитих начина координовања од којих су неки још неидентификовани [171]. То условљава формирање различитих врста структура комплекса бакра(II) у присуству органских лиганата [170-172]. Лиганди са тиолном групом као што су тиосалицилна киселина и њени деривати су у фокусу испитивања јер се могу координовати са мноштвом јона прелазних метала [38,173,174]. Такође, као ефикасни лиганди за координовање се могу користити тиоетри тиосалицилне киселине [61,62,175], што је случај и са нашим истраживањем.

5.1. СИНТЕЗЕ И ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА

Задатак ове Докторске дисертације је првенствено био да се синтетишу S-алкенил деривати тиосалицилне киселине (алкенил = пропенил-(L1), и изобутенил-(L2)) као бидентатни лиганди и одговарајући бинуклеарни комплекси бакар(II) (C1 и C2). Састав новосинтетисаних једињења је утврђен на основу резултата елементалне миклоанализе за угљеник, водоник и сумпор. Експериментално нађене вредности процентуалне заступљености угљеника, водоника и сумпора су у сагласности са израчунатим вредностима.

Инфрацрвени спектри су нам пружили вредне информације о начину координовања слободних S-алкенил деривата тиосалицилне киселине за централни јон метала у одговарајућим бакар(II)-комплексима. Асиметричне валенционе вибрације карбоксилне групе су првенствено коришћене у сврху утврђивања да ли се координација одвијала посредством депротоноване карбоксилне групе (апсорпционе траке су лоциране у области $1600-1650\text{ cm}^{-1}$) или је изостала координација преко ове групе са централним јоном метала (у том случају се апсорпционе траке налазе у области $1700-1750\text{ cm}^{-1}$) [176-178]. Снимљени спектри комплекса C1 и C2 су показали да је извршено координовање дозорских атома карбоксилне групе лиганата за бакар(II)-јон. То потврђују апсорпционе траке лиганата у области на око $1676-1680\text{ cm}^{-1}$ које потичу од асиметричних валенционих вибрација карбоксилних група, а њихово померање у област ниже фреквенције указује на настајње комплекса. Наиме, изоловани $[\text{Cu}_2(\text{S-alkenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ комплекси су показали двоструке оштре и јаке асиметричне валенционе вибрације које потичу од карбоксилних група S-алкенил деривата тиосалицилне киселине координованих за централни јон метала на око $1548-1615\text{ cm}^{-1}$. То се може објаснити донацијом електрона од кисеоника у празне d-орбитале бакар(II)-јона. Запажене двоструке апсорпционе траке комплекса указују на малу разлику у координовању карбоксилних група лиганата за бакар(II)-јон. Присуство по две апсорпционе траке за карбоксилатни ајон у инфрацрвеним спектрима комплекса указује на мале разлике у енергијама, које су последица присутних великих алкенил група као и њихов стерни утицај на фенил групе из тиосалицилне киселине. За апсорпционе траке -S-R није примећено значајно померање након координовања лиганата за централни јон метала што је потенцијално указивало да сумпор није био дозорски атом приликом координовања.

Такође, јаке, оштре појединачне траке симетричне валенционе вибрације координованих карбоксилних група S-алкенил деривата тиосалицилне киселине су биле у очекиваној области (око 1400 cm^{-1}).

У спектрима комплекса се могу јавити додатне траке у области $\approx 3400\text{ cm}^{-1}$, заједно са тракама на $\approx 890\text{ cm}^{-1}$ што означава присуство координоване воде. Утицај природе метал-лиганд везе најбоље потврђују новоформиране траке на $\approx 400\text{ cm}^{-1}$, које указују на $\nu(\text{Cu-O})$ [179].

^1H и ^{13}C NMR спектри су допринели да се са још већом сигурношћу уверимо у структуру S-алкенил деривата тиосалицилне киселине. Хемијска померања за угљеникове и водоникове атоме у молекулима нису одступала од резултата сродних студија [61,62], па смо, на основу претходно објављених резултата структурно сличних лиганада, претпоставили да су S-алкенил деривати тиосалицилне киселине координовани за централни јон метала и да су при томе настали бинуклеарни комплекси.

На ^1H NMR спектрима оба лиганда су уочени мултиплитети сигнала који одговарају ароматичној области, што је приписано водониковим атомима из бензеновог прстена. Хемијска померања водоникових атома везаних за угљеникове атоме у алкенил остацима лиганада показују да се сигнали од протона у суседству атома угљеника са протонима на двоструким везама ($\text{C}=\text{C}-\text{H}$) налазе на вишим вредностима него они који у суседству имају sp^3 -хибридизовне угљеникове атоме са протонима ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$). То се може објаснити повећаном електронегативношћу угљеникових атома за шта је одговорно повећање удела s-орбитале у њиховим хибридизованим орбиталама, што даље условљава да сваки пик који потиче од протона везаних за такве угљеникове атоме буде значајно померен ка вишим вредностима хемијског померања.

Број пикова у ^{13}C NMR спектрима лиганада назначавала колико има нееквивалентних угљеникових атома у једињењу. Сигнали од угљеникових атома из алкенил остатака се налазе у различитим областима нижег поља. Они који су везани за атом сумпора су у области значајно нижих вредности, а они сигнали у областима нешто виших вредности су приписани атомима угљеника на двострукој вези. Хемијска померања угљеникових атома из ароматичног језгра су примећена на $\approx 130\text{ ppm}$, док се у области вишег поља налазе сигнали од угљеникових атома из карбоксилних група лиганада.

На основу података из инфрацрвених спектра није било могуће добити потпуни увид у структуру новосинтетисаних бакар(II)-комплекса са S-алкенил дериватима

тиосалицилне киселине. Поузданије сагледавање структуре су омогућили резултати рендгенске структурне анализе.

У већини случајева бинуклеарни бакар(II) карбоксилатни комплекси имају општу хемијску формулу $[\text{Cu}_2(\text{COOR})_4\text{L}_2]$ са типичном неутралном "paddle-wheel" структуром у којој је сваки од четири карбоксилатна лиганда у екваторијалној равни повезан са оба бакар(II)-јона. Сваки од атома бакра може да оствари координативно-ковалентне везе са по једним монодентатним лигандом у аксијалној позицији. Често се као лиганд у аксијалној позицији налази молекул растварача: ацетон, етанол, пиридин, тетраhydroфуран (THF), метил-цијанид (CH_3CN), диметиламин (DMA) [180,181] или вода [172,182]. Кристално паковање се састоји од низа димерних јединица које су међусобно повезане slabим међумолекулским интеракцијама као што је водонична веза [183]. Тако добро дефинисани димерни комплекси се обимно истражују, посебно њихове магнетне особине и електрохемијско понашање у растворима [184,185].

На основу вредности моларне проводљивости, у диметилсулфоксиду као растварачу, синтетисане комплексе бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине можемо сврстати у неелектролите [186-190]. Врло мала проводљивост указује да су добијени комплекси неутрални [191,192]. Резултати магнетних мерења са вредностима $\approx 1,90 \mu_B$ за бакар(II)-комплексе такође могу сугерисати на могуће заузимање искривљене октаедарске геометрије око централног јона метала [192,193]. Ове субнормалне вредности магнетних момената синтетисаних комплекса су у сагласности са литературом и иду у прилог бинуклеарној структури комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине [192]. Бинуклеарни комплекси су стабилни у димерној форми [62,175]. Ниске вредности магнетних момента (μ_{eff}) такође указују на антиферомагнетичну интеракцију између два јона метала што је типично за бинуклеарне комплексе бакра(II) опште формуле: $[\text{Cu}(\text{R}-\text{COO})_2\text{L}]_2$ [183,194,195]. Кључни фактор који одређује величину те интеракције, у димерним комплексима бакра(II) са лигандима карбоксилатног типа, је електронска структура мостног $-\text{COO}^-$ остатка [194-197].

Дужина алкил остатка у лиганду, као и јачина метал-лиганд везе су од изузетног значаја приликом одређивања својстава и примене комплексних једињења прелазних метала. Кристална структура и њено паковање су у функцији оба горе поменути утицаја. Показано је да су лиганди карбоксилатног типа, који имају халогене елементе на α -положају сиромашни електронима (нпр. трифлуороацетатни анион) и да имају тенденцију да фаворизују стварање мономерних облика бакар(II) карбоксилатних

комплекса због слабије Cu-O везе. Насупрот томе, повећање релативне базности карбоксилатног остатка доводи до продужења Cu-Cu везе у бинуклеарним комплексима. Дужи алкил ланци утичу на додатну стабилизацију бинуклеарних и полинуклеарних комплекса током њихове синтезе, па се самим тим могу очекивати промене у кристалним структурама са дужим ланцем алкил карбоксилата [185].

Рендгенском структурном анализом комплекса је показано да $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$ (**C2**) комплекс кристалише у моноклиничној $P2_1/n$ просторној групи. Монокристална структура комплекса састоји се од центросиметричних, динуклеарних комплексних молекула у којима су два бакар(II)-јона повезана са четири лиганда S-изобутенил деривата тиосалицилне киселине формирајући на тај начин "paddle-wheel" тип структуре.

Сваки бакар(II) централни јон метала се налази у искривљеном квадратно-пирамидалном окружењу насталом од стране атома карбоксилатног кисеоника из лиганда у основној равни и кисеониковог атома из DMSO молекула у аксијалној позицији. Бакар(II)-јон је измештен из равни квадратне основе према аксијалном кисеониковом атому за 0,205(1) Å.

У нашем истраживању растојање Cu...Cu је 2,6430(7) Å. То је незнатно дуже у односу на вредност дужине везе од 2,614 Å која је нађена у димерном бакар(II)-ацетату [198], али је блиско упоредива с оним вредностима које су нађене у полиморфном комплексу $[\text{Cu}_2(\text{S-propyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$, који је показао вредности од 2,6407(4) Å у полиморфу I и 2,6398(9) Å у полиморфу II [63].

Дужине координатних веза у комплексу бакар(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине су у оквиру вредности које су нађене у комплексу са S-пропил дериватом као лигандом (од 1,957(4) до 1,982(4) Å), као и оних које су измерене у еквивалентном комплексу бакар(II) са несупституисаним бензоатним лигандом (од 1,948 до 1,985 Å) [199]. У комплексу **C2**, лиганди А и Б показују значајне конформационе разлике. У истраживању Iqbal и сарадника је потврђено да структура комплекса може у мањој мери да зависи и од електронских својстава групе која се налази у *para* положају на фенилном прстену у односу на карбоксилну групу [185]. Стога, не чуде конформационе разлике у структури **C2** комплекса у нашем раду које су вероватно условљене стерним фактором волуминозне групе у *ortho* положају према карбоксилној групи.

Прва конформациона разлика се огледа у томе да су фенилни прстенови нађени у различитим ротацијама око формално једноструке C1-C2 везе, па диедарски углови

између средњих равни фенилних прстенова C2/C7 и карбоксилних група износе $28,0(3)^\circ$ у лигандима А и $52,1(2)^\circ$ у лигандима Б. Максимални диедарски угао од $57,3^\circ$ за комплексе овог типа примећен је у S-пропил деривату тиосалицилне киселине [63], док су у комплексу са бензоатним лигандима [199] одговарајући диедарски углови у распону од $7,9$ до $22,4^\circ$. Друга конформациона разлика између два различита лиганда у молекулу C2 комплекса се односи на S-изобутенил супституент, који у лиганду А заузима издужени облик са торзионим углом C3a-S1a-C8a-C9a од $-174,4(3)^\circ$. У лиганду Б, веће извртање посматрано за фенил прстен је праћено изричитим преклапањем S-изобутенил супституента, што резултује торзионим углом C3b-S1b-C8b-C9b од $-54,3(5)^\circ$. То преклапање S-изобутенилног дела у лиганду Б има важну улогу у распоређивању волуминозног S-изобутенилног супституента поред S-диметилне групе аксијалних лиганда.

5.2. ИСПИТИВАЊА *IN VITRO* АНТИМИКРОБНЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА S-АЛКЕНИЛ ДЕРИВАТИМА ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ

Након утврђивања стварне структуре комплекса, приступило се испитивању биолошких активности комплекса бакар(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине. Антимикробна активност лиганда и одговарајућих бакар(II)-комплекс испитана је на одабраним врстама бактерија и гљива. Антимикробно дејство је тумачено на основу вредности МИК и ММК. Нови концепт побољшања бактерицидног ефекта бакар(II)-комплекс са новосинтетисаним лигандима је базиран на липофилности добијених једињења. Повећање липофилности се одражава на побољшан пролазак комплекса до циљаног места у бактеријској ћелији [75].

Главна мета комплекса бакра(II) за испољавање бактерицидног дејства је бактеријска ДНК, иако се не могу искључити ни други интрацелуларни циљеви као што су РНК или протеини. Познато је да су координациона једињења бакра редокс активна и да могу посредовати у цепању ДНК [200]. На пример, комплекс бакра(II) са 1,10-фенантролинским лигандом је био прва синтетисана хемијска нуклеаза [201]. Ова нуклеазна активност зависи од присуства егзогених супстанци као што су аскорбати, тиоли и пероксиди које су неопходне како би се произвеле активне врсте које су одговорне за цепање ДНК [202,203]. Нуклеазна активност је важан механизам за

остваривање дејства бакар(II)-једињења. Као што је већ поменуто, ова активност зависи од присуства редукционих средстава, што у већини бактерија чине тиоли мале молекулске масе. Код већине Грам-негативних бактерија тај тиолни молекул је глутатион, док је код Грам-позитивних бактерија (укључујући *S. aureus*) присутан бацилитиол (BSH или Cys-GlcN-mal) [204].

Такође је утврђено да на ћелије сисара платина(II) једињења испољавају много јачи ефекат од једињења бакра(II) или паладијума(II), што указује на то да начин деловања комплекса у ћелијама сисара је различит од оног који остварује у бактеријским ћелијама [205].

Грађа ћелијског зида бактерија може бити препрека комплексима бакра(II) за остваривање жељеног бактерицидног ефекта. Тенденција растварања наших комплекса у неводеним растварачима, нам је указала на њихов липофилни карактер. То је важан фактор којим појашњавамо зашто је јача антимикробна активност према Грам-позитивним него Грам-негативним бактеријама. Липополисахариди лоцирани са спољашње стране ћелијског зида Грам-негативних бактерија су хидрофилног карактера па онемогућавају пролазак једињења са хидрофобним особинама, док у структури ћелијског зида Грам-позитивних бактерија је теихојинска киселина која може бити мета за везивање бакар(II)-комплекса, па отуда израженије дејство.

Уопштено сагледавајући, у нашем истраживању, активности комплекса су биле веће или сличне у поређењу са одговарајућим слободним лигандима. Изузетак, где су слободни лиганди имали веће активности, су бактерије *Bacillus cereus* (за L1 и L2) и *Salmonella enterica* (за L2). Грам-позитивне бактерије показале су нешто већу осетљивост него Грам-негативне. Међу Грам-позитивним бактеријама, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 је показао највећу отпорност (МИК/ММК су 1000/>1000 µg/mL). Пробиотске бактерије су показале највећу осетљивост. Најосетљивији је био *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, са МИК вредношћу од 31,25 µg/mL за комплекс C1. Свеукупно, комплекси бакра(II) показали су ниске антифунгалне активности. Тестирана једињења су имала мало или готово занемарљиво дејство на раст квасца и других гљива, при чему су вредности МИК и ММК биле од 250 до > 1000 µg/mL.

У претходно публикованим резултатима са структурно сличним комплексима бакра(II) са одговарајућим S-алкил дериватима тиосалицилне киселине (алкил = метил-; етил-; пропил-; бутил-; бензил-) вршена су испитивања на Грам-позитивним и Грам-негативним бактеријама, као и на гљивама [61, 63]. Активности комплекса биле

су сличне или веће од активности одговарајућих слободних лиганата. Сви тестирани комплекси показали су умерену или селективну антибактеријску активност и ниску антифунгалну активност, што је у складу са резултатима нашег истраживања.

Досадашња истраживања антимикуробне активности бинуклеарних и мононуклеарних бакар(II)-комплекса са карбоксилатним типом лиганата дала су различите закључке. Неки бинуклеарни бакар(II) карбоксилатни комплекси не показују антибактеријску активност. Недостатак специфичности сугерише да сензитивност различитих микроорганизама према комплексима није повезана само са различитом структуром ћелијског зида [206]. Међутим, постоје и студије које показују добре антимикуробне активности бакар(II)-комплекса, укључујући активности које су боље и од стандардних лекова [75,207-209]. Други бакар(II)-карбоксилатни комплекси пак показују умерену антибактеријску активност [207-214], што је у складу са нашим ранијим истраживањем [61]. У већини студија, као и у овом случају, примећена је слаба антигљивична активност [207,211-212].

5.3. СУПСТИТУЦИОНЕ РЕАКЦИЈЕ КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА S-АЛКЕНИЛ ДЕРИВАТИМА ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ СА 5'-GMP И ЊИХОВА ИНТЕРАКЦИЈА СА ДНК

Изучавање интеракција бакар(II)-комплекса са нуклеобазама је од изузетне важности јер је ДНК примарна мета многих антитуморских комплекса, а пре свега *цисплатине*. Испитивања су показала претежно формирање монофункционалних производа преко N7 азотовог атома гуанина при чему настају 1,2- или 1,3- интра/интерланчани адукти [114,215-216].

Реакције супституције код оба комплекса су се одвијале у два узастопна корака, оба зависна од концентрације нуклеофила. Као што се и очекивало, реакције супституције ових комплекса биле су веома брзе. Комплекс C2 је показао већу реактивност према 5'-GMP од комплекса C1. Пошто се комплекси разликују само по S-алкенил групи, разлика у реактивности се може приписати јачем индуктивном ефекту изобутенил групе у поређењу са пропенил групом. За оба комплекса, други корак супституције се одвија значајно спорије од првог корака.

Изражена способност везивања бакар(II)-комплекса за ДНК се може приписати њиховој биокомпатибилности, великом афинитету према нуклеобазама и поседовању

биолошки погодних редокс-потенцијала. Они могу „препознати” одређене секвенце ДНК молекула, везати се за њих и довести до промене у њиховом функционисању [217].

Константе везивања испитиваних комплекса за ДНК су упоредиве са онима које су нађене за неке бинуклеарне метал(II)-комплексе [218,219]. Добијене вредности су карактеристичне за једињења на бази метала која се везују за ДНК интеркалацијом.

Интеракције комплекса **C1** и **C2** са СТ-ДНК су испитиване применом UV-Vis спектрофотометријске титрације одређивањем константи везивања (K_b). Титрације комплекса су спроведене на собној температури при чему је коришћена фиксна концентрација комплекса (10 μM) у PBS пуферу, а мењане су количине СТ-ДНК (0-15 μM) [220,221]. Додавање СТ-ДНК у раствор било ког од испитиваних комплекса бакра(II) довело је до значајног "hyperchromic" ефекта са појавом нове апсорпционе траке на 258 nm, али са минималним променама апсорбције у опсегу 300-500 nm. Наведена запажања сугеришу на значајну интеракцију између новосинтетисаних комплекса бакра(II) и СТ-ДНК преко спољашњих контаката, претпостављајући да се ради о водоничним везама и електростатичким интеракцијама [222,223]. Изражен афинитет комплекса метала може бити узрокован додатном π - π^* интеракцијом посредством ароматичних фенил прстенова [224].

Интеракције комплекса **C1** и **C2** са СТ-ДНК су такође испитиване флуориметријском методом са етидијум-бромидом (ЕБ). ЕБ флуоресцира слабо у слободном раствору (без СТ-ДНК) [222,223], али у присуству СТ-ДНК је примећена јака емисија на ~ 600 nm због интеркалације ЕБ између парова база ДНК. Додавање комплекса **C1** или **C2** у СТ-ДНК-ЕБ комплекс довело је до значајног смањења у интензитету флуоресценције, услед измене ЕБ комплексом [225,226]. Смањење флуоресценције је корисна метода за праћење молекуларних интеракција у хемијским и биолошким системима због своје високе осетљивости. Стерн-Волмерове константе за комплексе **C1** и **C2** су израчунате коришћењем Стерн-Волмерове једначине. Велике вредности K_{sv} за испитиване комплексе указују на интеркалативно везивање комплекса за СТ-ДНК [224]. Хидрофобна својства ових комплекса, који садрже S-алкенил остатаке везане за фенилни прстен, олакшавају везивање за ДНК.

Квантитативне студије измене са ЕБ су спроведене уз промену концентрације комплекса и праћење интензитета емисије ЕБ-ДНК [220,221]. Растућа концентрација комплекса **C1** или **C2** (0-30 μM) резултирала је значајним смањењем интензитета флуоресценције, са приметним померањем ка црвеном делу спектра. Стога се намеће

закључак да су оба комплекса **C1** и **C2** способна да истисну молекул ЕБ из комплекса ЕБ-ДНК и могу значајно интераговати са молекулом ДНК [227-229].

На основу вредности добијених константи може се приметити да комплекси бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине значајно интерагују са СТ-ДНК, што је у сагласности са UV-Vis спектроскопским студијама.

Како би се даље окарактерисало везивање ових комплекса за ДНК, мерен је вискозитет раствора ДНК у присуству и одсуству комплекса. Вискозитет раствора ДНК је осетљив на промене у дужини ланца ДНК, тако да се, у одсуству података о кристалној структури, ово сматра најбитнијим доказом у идентификацији начина везивања за ДНК у раствору [230,231]. Повећање концентрације (до $r = 1,0$) комплекса **C1** и **C2** у ДНК раствору (0,01 mM) довело је до повећања релативне вискозности ДНК, која је била изражена након додавања комплекса **C1**. У случају класичне интеркалације, једињење се умеће између базних парова ДНК, што доводи до повећања вискозности ДНК. Јачина интеракције је обично пропорционална са повећањем вискозности ДНК. Према томе, посматрано повећање вискозности за комплексе бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине представља још један индикатор интеркалативне интеракције са ДНК.

5.4. ИСПИТИВАЊА *IN VITRO* АНТИТУМОРСКЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА БАКРА(II) СА S-АЛКЕНИЛ ДЕРИВАТИМА ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ

Хемијске карактеристике прелазних метала пружају могућност развоја нових антитуморских лекова са различитим механизмом деловања, тако да комплекси који садрже бакар или неке друге метале представљају нову генерацију алтернативних антитуморских агенаса. Casioreínas® су мешавина више различитих хелатних комплекса бакра(II) који су дизајнирани тако да остваре слично дејство као *цисплатина*. Показано је да ова једињења испољавају неколико пута јачу цитотоксичну активност на ћелијама карцинома грлића материце од *цисплатине* [232]. Различити комплекси бакра(II) су такође цитотоксични према другим врстама ћелија карцинома код човека. Тернарни комплекс бакра(II) аминокумарина са фенантролином инхибира раст РС3 хумане ћелије карцинома простате и HL-60 хумане ћелије мијелоидне леукемије [104]. Бензен-1,2-дитиол модификовани, на бази *цисплатине*, бакар(II) и цинк(II)-комплекси су показали широк спектар цитотоксичне активност према

следећим ћелијским линијама хуманих карцинома укључујући: HeLa (хумани рак грлића материце), Hep2 (хумани канцер ларингеалног епитела), HepG2 (хумани рак јетре) и MCF-7 (хумане ћелије карцинома дојке) [233]. Третманом са 10-деацетилбакатин тиосемикарбазоном заустављен је раст само вијабилних MCF-7 ћелија карцинома дојке, док је додавање бакра у исто једињење довело до значајне ћелијске смртности [234].

У новије време, студије које се баве испитивањем цитотоксичне активности бакар(II)-комплекса показале су да се механизам деловања заснива на интеркалацији у ДНК ланац и њеном цепању [112,235] или тако што индукују апоптотске сигналне механизме [236,237]. Frías González и сарадници су доказали да (μ_4 -оксо)тетра- μ_4 -ацетат{4-хидрокси-3,5-bis(морфолинометил)}тетра бакар(II)-комплекс има цитотоксичну активност на СеСа ћелијским линијама, са селективношћу за HeLa и CaSki ћелије, док је примећено да испољава ниску цитотоксичност према нормалним фибробластима [238].

Један од важнијих фактора у процесу развоја нових хемиотерапеутских агенаса, који одређује даљу судбину неког једињења, у преклиничким и клиничким испитивањима је селективна токсичност. Познато је да је појава нежељених токсичних ефеката уско повезана са неселективним дејством антитуморских агенаса на здрава ткива. Антиканцерогени потенцијал једињења у нашем истраживању је упоређен са активношћу хемиотерапеутика на бази платине - *цисплатином*.

У нашој студији, МТТ тест за вијабилност ћелија је показао да два новосинтетисана бидентатна лиганда и њихови одговарајући бакар(II)-комплекси након 24 часа показују цитотоксичну активност на ћелијама карцинома колона човека НСТ-116. Цитотоксични ефекат комплекса бакра(II) био је већи у односу на цитотоксичност лиганда, нарочито у концентрацији од 31,25 до 250 μM . Комплекси бакра(II) су такође показали нешто нижу цитотоксичност у поређењу са *цисплатином*. Међутим, веће концентрације С2 (250-1000 μM) имале су готово једнак цитотоксични ефекат на НСТ-116 ћелије као *цисплатина*.

И друге студије су пратиле *in vitro* антитуморску активност комплекса бакра(II) на хуманим ћелијама колоректалног карцинома колона [140,186,239]. Тако су комплекси бакра(II) са дериватима изатин тиокарбазона показали да је цитотоксична активност на ћелијама карцинома колона (НСТ-116) дозно-зависна са значајно ниским вредностима IC_{50} (0,08-8,6 μM). Утврђено је да је њихов ефекат јачи од 5-флуороурацила (7,3 μM). Смрт ћелијске линије НСТ-116 се може приписати

индукцији апоптозе, што доказују следеће апоптотске карактеристике као што су кондензовање језгра у облику полумесеца, истурења на мембрани и појава апоптотских тела у цитоплазми третираних ћелија. У студији која се бавила испитивањем преузимања и акумулације комплекса бакра(II) са бензимидазолским дериватима у НСТ-116 ћелијама је доказано да су густине бакра у језгру и митохондријама третираних НСТ-116 ћелија биле 38,49 односно 3,03 $\mu\text{g/g}$ протеина, што је било више него у контролној групи ћелија (8,51 $\mu\text{g/g}$ протеина (језгро) односно 1,5 $\mu\text{g/g}$ протеина (митохондрије)). То сугерише да комплекси могу проћи кроз мембрану ових ћелија и даље се акумулирати у језгрима и митохондријама, вршећи своје биолошке ефекте [240].

Позитивни резултати *in vitro* студија цитотоксичне активности сугеришу да комплекси бакра(II) имају потенцијал за примену као антитуморски лекови неплатинске групе [239]. Међутим, неопходно је даље истраживање механизма антитуморске активности ових комплекса [140,239].

6. ЗАКЉУЧАК

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

1. Нови комплекси бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине - синтеза и хемијска карактеризација:

- Састав награђених комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине је потврђен на основу резултата елементалне микроанализе при чему је утврђено да су експериментално нађене вредности процентуалне заступљености за угљеник, водоник и сумпор у сагласности са израчунатим вредностима.
- Структура синтетисаних бидентатних лиганата претпостављена је на основу резултата инфрацрвене (IR) и нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије (^1H и ^{13}C NMR), док је структура одговарајућих комплекса претпостављена на основу резултата инфрацрвене (IR) спектроскопије, магнетних мерења и моларне проводљивости. Резултати побројаних мерења су потврдили да је дошло до координовања бакар(II)-јона за дозорске атоме у молекулу тиосалицилне киселине.
- Стварна структура синтетисаног комплекса бакра(II), $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$ (C2), потврђена је на основу резултата рендгенске структурне анализе при чему се показало да су настали бинуклеарни комплекси где су два бакар(II)-јона координована са четири лиганда S-изобутенил деривата тиосалицилне киселине

2. Испитивања *in vitro* антимикуробне активности комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине:

- Активности комплекса су биле веће или сличне у поређењу са одговарајућим слободним лигандима. Изузетак, где су слободни лиганди показали већу активност, су бактерије *Bacillus cereus* за ((S-propenyl-thiosal) (L1) и (S-isobutenyl-thiosal) (L2)) и *Salmonella enterica* за (S-isobutenyl-thiosal) (L2)).
- Грам-позитивне бактерије показале су нешто већу осетљивост него Грам-негативне. Међу Грам-позитивним бактеријама, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 је показао највећу отпорност. Пробиотске бактерије су

показале највећу осетљивост. Најосетљивији је био *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Комплекси бакра(II) показали су ниску антифунгалну активност.

3. Супституционе реакције комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине са 5'-GMP и њихова интеракција са ДНК:

- Реакције супституције код оба комплекса су се одвијале у два узастопна корака, која су зависна од концентрације нуклеофила. Реакције супституције ових комплекса биле су веома брзе. Комплекс $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**C2**) је показао већу реактивност према 5'-GMP од комплекса $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**C1**).
- Велике вредности K_b за испитиване комплексе указују на интеркалативно везивање комплекса са СТ-ДНК.
- Квантитативне студије измене са ЕБ су показале да су растуће концентрације комплекса $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**C1**) или $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**C2**) (0-30 μM) резултирале значајним смањењем интензитета флуоресценције, што указује да су оба комплекса способна да истисну молекулу ЕБ из комплекса ЕБ-ДНК, па се могу везати за одређена места у оквиру ДНК молекула.
- Повећање концентрације (до $r = 1,0$) комплекса **C1** и **C2** у ДНК раствору (0,01 mM) довело је до повећања релативне вискозности ДНК, што представља још један индикатор интеркалативне интеракције са ДНК.

4. Испитивања *in vitro* антитуморске активности комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине:

- Два новосинтетисана бидентатна лиганда и одговарајући бинуклеарни бакар(II)-комплекси након 24 часа су показали цитотоксичну активност на хуманим ћелијама карцинома колоне НСТ-116. Цитотоксични ефекат комплекса бакра(II) био је виши у односу на цитотоксичност лиганда.
- Комплекси бакра(II) су такође показали нешто нижу цитотоксичност у поређењу са *цисплатином*. Међутим, у већим концентрацијама примећено је да комплекс $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**C2**) има готово једнак цитотоксични ефекат на НСТ-116 ћелије као *цисплатина*.

7. СПИСАК СКРАЋЕНИЦА И АКРОНИМА

- IR – инфрацрвена спектроскопија (енгл. **I**nfrared spectroscopy)
- NMR – нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија (енгл. **N**uclear **M**agnetic **R**esonance spectroscopy)
- МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум-бромид
- 5'-GMP – 5'-гуанозин-монофосфат
- СТ-ДНК – ДНК из тимуса говечета (енгл. **c**alf **t**hymus **D**N**A**)
- [Cu₂(S-propenyl-thiosal)₄(H₂O)₂] (**C1**) – комплекс бакра(II) са S-пропенил дериватом тиосалицилне киселине
- [Cu₂(S-isobutenyl-thiosal)₄(H₂O)₂] (**C2**) – комплекс бакра(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине
- [Cu₂(S-propyl-thiosal)₄(DMSO)₂] – комплекс бакра(II) са S-пропенил дериватом тиосалицилне киселине
- S-propenyl-thiosal (**L1**) – S-пропенил дериват тиосалицилне киселине
- S-isobutenyl-thiosal (**L2**) – S-изобутенил дериват тиосалицилне киселине
- NSAIDs – нестероидни антиинфламаторни лекови (енгл. **N**onsteroidal **a**nti-**i**nflammatory **d**rugs)
- SOD – супероксид-дизмутаза (енгл. **S**uperoxide **d**ismutase)
- HIV – вирус хумане имунодефицијенције (енгл. **h**uman **i**mmunodeficiency **v**irus)
- ROS – реактивне кисеоничне врсте (енгл. **R**eactive **o**xxygen **s**pecies)
- Fe – гвожђе (лат. **F**erum)
- КБ – координациони број
- o*-HS-C₆H₄-COOH – *o*-меркаптобензоева киселина
- RS-C₆H₄-COOH – тиоетри тиосалицилне киселине
- HS-C₆H₄-COOR – карбоксилатни естри тиосалицилне киселине
- HOOC-C₆H₄-S-S-C₆H₄-COOH – дисулфид тиосалицилне киселине
- CDCl₃ – деутерисани хлороформ
- CD₃SO – деутерисани диметилсулфоксид
- ФТС – S-*trans*, *trans*-фарнезилтиосалицилне киселине (енгл. S-*trans*, *trans*-**F**arnesylthiosalicylic Acid)
- Ras – (енгл. Ras proteins – **R**at **s**arcoma proteins)
- WHO – Светска здравствена организација (енгл. **W**orld **H**ealth **O**rganization)
- САД – Сједињене Америчке Државе
- ЛПС комплекс – липополисахаридног комплекса
- ДНК – Дезоксирибонуклеинска киселина

РНК – Рибонуклеинска киселина
bipyam – 2,2'-бипиридиламин
bipy – бипиридин
phen – фенантролин
ТАСН – 1,4,7-триазоциклононан
НТ-29 – хумана ћелијска линија аденокарцинома колона
РС3 – хумана ћелијска линија карцинома просте
НЛ-60 – хумана ћелијска линија мијелоидне леукемије
HeLa – хумана ћелијска линија карцинома грлића материце
НЕР-2 – хумана ћелијска линија карцинома ларингеалног епитела
НерG2 – хумана ћелијска линија карцинома јетре
А431 – хумана ћелијска линија карцинома коже
А549 – хумана ћелијска линија карцинома карцинома плућа
U2OS – хумана ћелијска линија остеосаркома
НСТ116 – хумана ћелијска линија карцинома колона
MDA-MB-231 – хумана ћелијска линија аденокарцинома дојке
MCF7 – хумана ћелијска линија карцинома дојке
ZL – 1-хидрокси-2-(1Н-имидазол-1-ил)етан-1,1-диилдифосфонска киселина
PrDP – 1-хидрокси-2-(1Н-имидазол-1-ил)пропан-1,1-диилдифосфонска киселина
СТ26 – мишја ћелијска линија недиференцираног карцинома колона
СТ26.CL25 – мишја ћелијска линија карцинома колона
ПТКС – паклитаксел
ПЕГ – поли(етиленгликол)
Fmoc – флуоренилметилоксикарбонил група
H₂L – дипептид глицилглицин
ppz – пиперазин
DMSO – диметилсулфоксид
D₂O – деутерисана вода
TMS – триметилсилан
DDS – диметоксиДФенилсилан
Hg[Co(SCN)₄] – жива-тетратиоцијанокобалтат(II)
R – електрични отпор (Ω) у експерименталној ћелији (познате константе ћелије k)
κ – специфична проводљивост раствора испитиваних комплекса
k – константа кондуктометријске ћелије

C – моларна концентрација комплекса изражена у mol/dm^3 .

CFU – јединица за формирање колонија (енгл. **Colony-forming units**)

МИК – минимална инхибиторна концентрација

ММК – минимална микробицидна концентрација

k_{obsd} – константа брзине *псеудо*-првог реда

A_t – апсорбанца раствора у функцији времена t на одређеној таласној дужини

A_∞ – апсорбанца након „бесконечно” дугог временског интервала (обично после 8-10 полувремена реакције)

PBS – Фосфатни пуферски раствор = 0,01M, $C_{\text{NaCl}} = 0,137 \text{ M}$, $C_{\text{KCl}} = 0,0027 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,4$

K_b – константа везивања

ϵ_f – екстинциони коефицијент некоординованог комплекса

ϵ_b – екстинциони коефицијент координованог комплекса.

ЕБ – етидијум-бромид

K_{sv} – Стерн-Волмерова (енгл. **Stern-Volmer**) константа

η – вискозност ДНК у присуству комплекса

η_0 – вискозност само ДНК у пуферском раствору

DMEM – (енгл. **Dulbecco's modified Eagle's medium**) медијум

FBS – фетални говеђи серум (енгл. **Fetal Bovine Serum**)

EDTA – етилендиаминтетрасирћетна киселина

$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ – етанол

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ – бакар(II)-нитрат

LiOH – литијум-хидроксид

BSh – бацилителиол

SeCa – хумана ћелијска линија карцинома грлића материце

CaSki – хумана ћелијска линија карцинома грлића материце

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Puig S, Thiele DJ. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol.* 2002; 6(2): 171-80.
2. Uriu-Adams JY, Keen CL. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med.* 2005; 26(4-5): 268-98.
3. Crisponi G, Nurchi VM, Fanni D, Gerosa C, Nemolato S, Faa G. Copper-related diseases: from chemistry to molecular pathology. *Coord Chem Rev.* 2010; 254(7-8): 876-89.
4. Weder JE, Dillon CT, Hambley TW, Kennedy BJ, Lay PA, Biffin R et al. Copper complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs: an opportunity yet to be realized. *Coord Chem Rev.* 2002. 232(1-2): 95-126.
5. Gielen M, Edward T. *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents.* Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2005.
6. Tisato F, Marzano C, Porchia M, Pellei M, Santini C. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med Res Rev.* 2010;30(4): 708-49.
7. Noyce JO, Michels H, Keevil CW. Inactivation of influenza A virus on copper versus stainless steel surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(8): 2748-50.
8. Lebon F, Boggetto N, Ledecq M et al. Metal-organic compounds: a new approach for drug discovery: *Nl*-(4-methyl-2-pyridyl)-2,3,6-trimethoxybenzamide copper(II) complex as an inhibitor of human immunodeficiency virus 1 protease. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63(10): 1863-73.
9. Brewer GJ. The risks of copper toxicity contributing to cognitive decline in the aging population and to Alzheimer's disease. *J Am Coll Nutr.* 2009; 28(3): 238-42.
10. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. *Copper.* *Biomed Pharmacother.* 2003; 57(9): 386-98.
11. Bonham M, O'Connor JM, Hannigan BM, Strain JJ. The immune system as a physiological indicator of marginal copper status? *Br J Nutr.* 2002; 87(5): 393-403.
12. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2003; 189(1-2): 147-63.
13. Hedera P, Peltier A, Fink JK, Wilcock S, London Z, Brewer GJ. Myelopolyneuropathy and pancytopenia due to copper deficiency and high zinc levels of unknown origin II. The denture cream is a primary source of excessive zinc. *Neurotoxicology.* 2009; 30(6): 996-9.

14. Cecconi I, Scaloni A, Rastelli G, Moroni M, Vilardo PG, Costantino L et al. Oxidative modification of aldose reductase induced by copper ion. Definition of the metal-protein interaction mechanism. *J Biol Chem.* 2002; 277(44): 42017-27.
15. Harris ZL, Klomp LW, Gitlin JD. Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67(5 Suppl): S972-7.
16. Miyajima H. Aceruloplasminemia, an iron metabolic disorder. *Neuropathology.* 2003; 23(4): 345-50.
17. Brewer GJ. Copper in medicine. *Curr Opin Chem Biol.* 2003; 7(2): 207-12.
18. Gitlin JD. Wilson Disease. *Gastroenterology.* 2003; 125(6): 1868-77.
19. Müller T, Langner C, Fuchsbichler A, Heinz-Erian P, Ellemunter H, Schlenck B et al. Immunohistochemical analysis of Mallory bodies in Wilsonian and non-Wilsonian hepatic copper toxicosis. *Hepatology.* 2004; 39(4): 963-9.
20. Brewer GJ, Askari FK. Wilson's disease: clinical management and therapy. *J Hepatol.* 2005; 42 Suppl(1): S13-21.
21. Tang J, Donsante A, Desai V, Patronas N, Kaler SG. Clinical outcomes in Menkes disease patients with a copper-responsive ATP7A mutation, G727R. *Mol Genet Metab.* 2008; 95(3): 174-81.
22. DiDonato M, Sarkar B. Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1360(1): 3-16.
23. Basun H, Forssell LG, Wetterberg L, Winblad B. Metals and trace elements in plasma and cerebrospinal fluid in normal aging and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1991; 3(4): 231-58.
24. Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Schneider JA, Wilson RS et al. Dietary copper and high saturated and trans fat intakes associated with cognitive decline. *Arch Neurol.* 2006; 63(8): 1085-8.
25. Haeffner F, Smith DG, Barnham KJ, Bush AI. Model studies of cholesterol and ascorbate oxidation by copper complexes: relevance to Alzheimer's disease beta-amyloid metallochemistry. *J Inorg Biochem.* 2005; 99(12): 2403-22.
26. Hureau C, Faller P. Aβ-mediated ROS production by Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochimie.* 2009; 91(10): 1212-7.
27. Cater MA, McInnes KT, Li QX, Volitakis I, La Fontaine S, Mercer JF et al. Intracellular copper deficiency increases amyloid-beta secretion by diverse mechanisms. *Biochem J.* 2008; 412(1): 141-52.

28. Lewis AJ. The role of copper in inflammatory disorders. *Agents and Actions*. 1984; 15(5-6): 513-9.
29. Silverio Amancio OM, Alves Chaud DM, Yanaguibashi G, Esteves Hilário MO. Copper and zinc intake and serum levels in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Nutr*. 2003; 57(5): 706-12.
30. Zoli A, Altomonte L, Caricchio R, Galossi A, Mirone L, Ruffini MP et al. Serum zinc and copper in active rheumatoid arthritis: correlation with interleukin 1 β and tumour necrosis factor α . *Clin Rheumatol*. 1998; 17(5): 378-82.
31. Louro MO, Cocho JA, Mera A, Tutor JC. Immunochemical and enzymatic study of ceruloplasmin in rheumatoid arthritis. *J Trace Elem Med Biol*. 2000; 14(3): 174-8.
32. Gupte A, Mumper RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev*. 2009; 35(1): 32-46.
33. Murphy B, Hathaway B. The stereochemistry of the copper(II) ion in the solid-state—some recent perspectives linking the Jahn-Teller effect, vibronic coupling, structure correlation analysis, structural pathways and comparative X-ray crystallography. *Coord Chem Rev*. 2003; 243: 237-62.
34. Vivekananda KV, Dey S, Wadawale A, Bhuvanesh N, Jain VK. Supramolecular 3-/4-Mercaptobenzoic Acid Complexes of Palladium(II) and Platinum(II) Stabilized by Hydrogen Bonding. *Eur J Inorg Chem*. 2014; 12: 2153-61.
35. Vlassopoulos D, Wood SA, Mucci A. Gold speciation in natural waters: II. The importance of organic complexing—Experiments with some simple model ligands. *Geochim Cosmochim Acta*. 1990; 54(6): 1575-86.
36. Rowland CE, Cantos PM, Toby BH, Frisch M, Deschamps JR. Controlling Disulfide Bond Formation and Crystal Growth from 2-Mercaptobenzoic Acid. *Cahill Cryst Growth Des*. 2011; 11(4): 1370-4.
37. Murugavel R, Baheti K, Anantharaman G. Reactions of 2-Mercaptobenzoic Acid with Divalent Alkaline Earth Metal Ions: Synthesis, Spectral Studies, and Single-Crystal X-ray Structures of Calcium, Strontium, and Barium Complexes of 2,2'-Dithiobis(benzoic acid). *Inorg Chem*. 2001; 40(27): 6870-8.
38. Wehr-Candler T, Henderson W. Coordination chemistry of the thiosalicylate ligand. *Coord Chem Rev*. 2016; 313: 111-55.
39. Sun J, Chen Y, Li K, Huang Y, Fu X, Zhang X et al. A prodrug micellar carrier assembled from polymers with pendant farnesyl thiosalicylic acid moieties for improved delivery of paclitaxel. *Acta Biomater*. 2016; 43: 282-291.

40. Zhang X, Huang Y, Zhao W, Chen Y, Zhang P, Li J et al. PEG-farnesyl thiosalicylic acid telodendrimer micelles as an improved formulation for targeted delivery of paclitaxel. *Mol Pharm.* 2014; 11(8): 2807-14.
41. Goldberg L, Ocherashvili A, Daniels D, Last D, Cohen ZR, Tamar G et al. Salirasib (farnesyl thiosalicylic acid) for brain tumor treatment: a convection-enhanced drug delivery study in rats. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7(11): 3609-16.
42. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature.* 1993; 366: 643- 54.
43. Walsh AB, Bar-Sagi D. Differential activation of the Rac pathway by Ha-Ras and K-Ras. *J Biol Chem.* 2001; 276: 15609-15.
44. Joneson T, White MA, Wigler MH, Bar Sagi D. Stimulation of membrane ruffling and MAP kinase activation by distinct effectors of RAS. *Science.* 1996; 271: 810-2.
45. Goldberg L, Kloog Y. A Ras inhibitor tilts the balance between Rac and Rho and blocks phosphatidylinositol 3-kinase-dependent glioblastoma cell migration. *Cancer Res.* 2006; 66: 11709-17.
46. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(1): 11-22.
47. Trümpler S, Meermann B, Nowak S, Buscher W, Karst U, Sperling M. *In vitro* study of thimerosal reactions in human whole blood and plasma surrogate samples. *J Trace Elem Med Biol.* 2014; 28(2): 125-30.
48. Minami T, Miyata E, Sakamoto Y, Kohama A, Yamazaki H, Ichida S. Expression of metallothionein mRNAs on mouse cerebellum microglia cells by thimerosal and its metabolites. *Toxicology.* 2009; 261(1-2): 25-32.
49. Makani S, Gollapudi S, Yel L, Chiplunkar S, Gupta S. Biochemical and molecular basis of thimerosal-induced apoptosis in T cells: a major role of mitochondrial pathway. *Genes Immun.* 2002; 3(5): 270-8.
50. Park EK, Mak SK, Kültz D, Hammock BD. Evaluation of cytotoxicity attributed to thimerosal on murine and human kidney cells. *J Toxicol Environ Health A.* 2007; 70(24): 2092-5.
51. Migdal C, Foggia L, Tailhardat M, Courtellemont P, Haftek M, Serres M. Sensitization effect of thimerosal is mediated in vitro via reactive oxygen species and calcium signaling. *Toxicology.* 2010; 274(1-3): 1-9.
52. Dórea JG. Exposure to mercury during the first six months via human milk and vaccines: modifying risk factors. *Am J Perinatol.* 2007a; 24: 387-400.

53. Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol.* 2006; 36: 609-62.
54. Suneja T, Belsito DV. Thimerosal in the detection of clinically relevant allergic contact reactions. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 45(1): 23-7.
55. Serrano G, Bonillo J, Aliaga A, Cuadra J, Pujol C, Pelufo C et al. Piroxicam-induced photosensitivity and contact sensitivity to thiosalicylic acid. *J Am Acad Dermatol.* 1990; 23(3 Pt 1): 479-83.
56. Santucci B, Cannistraci C, Cristaudo A, Camera E, Picardo M. Thimerosal positivities: the role of organomercury alkyl compounds. *Contact Dermatitis.* 1998; 38(6): 325-8.
57. Goncalo M, Figueiredo A, Goncalo S. Hypersensitivity to thimerosal: the sensitizing moiety. *Contact Dermatitis.* 1996; 34(3): 201-3.
58. Sharghi H, Beni AS. One-pot synthesis of novel thioxanthone crown ethers. *ARKIVOC.* 2007; 13: 1-7.
59. Joshi A, Shrivastava DN, Base CS. Synthesis, Characterization and Pharmacological Evaluation of Thiosalicylamide Derivative as a Class of Calcium Channel Blocker. *Int J Pharm Chem.* 2016; 6(1): 1-22.
60. Radić GP, Glođović VV, Radojević ID, Stefanović OD, Čomić LjR, Ratković ZR et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complex with same S-alkyl derivates of thiosalicylic acids. Crystal structure of the *bis*(S-benzyl-thiosalicylate)-palladium(II)-complex, [Pd(S-bz-thiosal)₂]. *Polyhedron.* 2012; 31(1): 69-76.
61. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Radojević ID, Čomić LjR et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-methyl derivatives of thiosalicylic acid. *Polyhedron.* 2014; 79: 80-7.
62. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Novaković SB, Bogdanović GA et al. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *J Mol Struct.* 2016; 1116: 264-71.
63. Bukonjić AM, Tomović DLj, Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR et al. Antibacterial, antibiofilm and antioxidant screening of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear

- copper(II)-complex with S-propyl derivative of thiosalicylic acid. *J Mol Struct.* 2017; 1128: 330-7.
64. Shukla R, Mandal S, Bharadwaj PK. Synthesis and characterization of copper(II) and nickel(II) complexes with ligands having $N_2S_2^*S_2$ ($S^* =$ thioether) donors: pseudo-reversible Cu^{III}/Cu^{II} couple. *Polyhedron.* 1993; 12(1): 83-8.
65. Ferrer EG, Williams PAM. Synthesis and characterization of a dimeric complex of Cu(II) with thiosalicylic acid and pyridine. *Polyhedron.* 1997; 16(19): 3323-5.
66. Bugg TD. Editorial: Antibacterial targets for the 21st century. *Bioorg Chem.* 2014; 55: 1.
67. Nikaido H. *Encyclopedia of Microbiology (3rd Edition): Outer Membrane, Gram-Negative Bacteria*, Academic press, 2009: 439-52.
68. Saier Jr. MH. *Encyclopedia of Microbiology (3rd Edition): Cell Membrane, Prokaryotic*, Academic press, 2009: 341-56.
69. Green DW. The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin Ther Tar.* 2002; 6: 1-20.
70. Janković SM. *Farmakologija i toksikologija*. 3 izd, Medicinski fakultet u Kragujevcu, Kragujevac, 2011: 525-79.
71. Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 2004; 38: 864-70.
72. Chohan ZH, Shad HA, Youssoufi MH, Hadda TB. Some new biologically active metal-based sulfonamide. *Eur J Med Chem.* 2010; 45: 2893-901.
73. Patil SA, Naik VH, Kulkarni AD, Badami PS. DNA cleavage, antimicrobial, spectroscopic and fluorescence studies of Co(II), Ni(II) and Cu(II) complexes with *SNO* donor coumarin Schiff bases. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2010; 75(1): 347-54.
74. Shebl M, Khalil SM, Ahmed SA, Medien HA. Synthesis, spectroscopic characterization and antimicrobial activity of mono-, bi- and trinuclear metal complexes of a new Schiff base ligand. *J Mol Struct.* 2010; 980(1-3): 39-50.
75. Siddiqi ZA, Khalid M, Kumar S, Shahid M, Noor S. Antimicrobial and SOD activities of novel transition metal complexes of pyridine-2,6-dicarboxylic acid containing 4-picoline as auxiliary ligand. *Eur J Med Chem.* 2010; 45(1): 264-9.
76. Katsarou ME, Efthimiadou EK, Psomas G, Karaliota A, Vourloumis D. Novel copper(II) complex of N-propyl-norfloxacin and 1,10-phenanthroline with enhanced antileukemic and DNA nuclease activities. *J Med Chem.* 2008; 51(3): 470-8.

77. Kostelidou A, Kalogiannis S, Begou OA, Perdih F, Turel I, Psomasa G. Synthesis, structure and biological activity of copper(II) complexes with gatifloxacin. *Polyhedron*. 2016; 119: 359-70.
78. Chudzik B, Tracz IB, Czernel G, Fiołka MJ, Borsuk G, Gagoś M. Amphotericin B-copper(II) complex as a potential agent with higher antifungal activity against *Candida albicans*. *Eur J Pharm Sci*. 2013; 49(5): 850-7.
79. Lu J, Sun Q, Li JL, Jiang L, Gu W, Liu X et al. Two water-soluble copper(II) complexes: synthesis, characterization, DNA cleavage, protein binding activities and *in vitro* anticancer activity studies. *J Inorg Biochem*. 2014; 137: 46-56.
80. Baskaran S, Krishnan MM, Arumugham MN, Kumar R. DFT analysis and DNA binding, cleavage of copper(II) complexes. *J Mol Liq*. 2016; 221: 1045-53.
81. Eichhorn GL, Shin YA. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. *J Am Chem Soc*. 1968; 90(26): 7323-8.
82. Kagawa TF, Geierstanger BH, Wang AH, Ho PS. Covalent modification of guanine bases in double-stranded DNA. The 1.2-Å Z-DNA structure of d(CGCGCG) in the presence of CuCl₂. *J Biol Chem*. 1991; 266(30): 20175-84.
83. Eichhorn GL, Clark P. Interactions of metal ions with polynucleotides and related compounds, V. The unwinding and rewinding of DNA strands under the influence of Cu(II) ions. *PNAS*. 1965; 53: 586-93.
84. Coates JH, Jordan DO, Srivastava VK. The binding of copper (II) ions to DNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1965; 20: 611-15.
85. Yatsimirskii KB, Kriss EE, Akhrameeva TI. Complex formation of copper ions with deoxyribonucleic acid. *Doklady Akademii Nauk SSSR*. 1966; 168: 840-3.
86. Daune M, Chambron J. Binding sites on DNA and stability of the double helix. *J Chim Phys Phys-Chim Biol*. 1968; 65: 72-7.
87. Schreiber JP, Daune M. Interaction of metallic ions with DNA. IV. Binding of cupric ion to DNA. *Biopolymers*. 1969; 8: 139-52.
88. Wende C, Lüdtke C, Kulak N. Copper complexes of N-donor ligands as artificial nucleases. *Eur J Inorg Chem*. 2014; 16: 2597-612.
89. Forster W, Bauer E, Schutz H, Berg H, Akimenko M, Minchenkova LE. Thermodynamics and kinetics of the interaction of copper(II) ions with native DNA. *Biopolymers*. 1979; 18: 625-61.

90. Sissoeff I, Grisvard J, Guille E. Studies on metal ions-DNA interactions: specific behaviour of reiterative DNA sequences. *Prog Biophys Mol Biol.* 1976; 31: 165-99.
91. Tajmir-Riahi HA, Langlais M, Savoie R. A laser Raman spectroscopic study of the interaction of calf-thymus DNA with Cu(II) and Pb(II) ions: metal ion binding and DNA conformational changes. *Nucleic Acid Res.* 1988; 16: 751-62.
92. Richard H, Schreiber JP, Daune M. Interactions of metallic ions with DNA, V. DNA renaturation mechanism in the presence of Cu²⁺. *Biopolymers.* 1973; 12: 1-10.
93. Rohner M, Medina-Molner A, Spingler B. *N,N,O* and *N,O,N* Meridional *cis* coordination of two guanines to copper(II) by d(CGCGCG)₂. *Inorg Chem.* 2016; 55: 6130-40.
94. O'Connor M, Kellett A, McCann M, Rosair G, McNamara M, Howe O et al. Copper(II) complexes of salicylic acid combining superoxide dismutase mimetic properties with DNA binding and cleaving capabilities display promising chemotherapeutic potential with fast acting *in vitro* cytotoxicity against cisplatin sensitive and resistant cancer cell lines. *J Med Chem.* 2012; 55(5): 1957-68.
95. Silva PP, Guerra W, Silveira JN, Ferreira AM, Bortolotto T, Fischer FL et al. Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage. *Inorg Chem.* 2011; 50(14): 6414-24.
96. Abdi K, Hadadzadeh H, Weil M, Salimi M. Mononuclear copper(II) complex with terpyridine and an extended phenanthroline base, [Cu(tpy)(dppz)]²⁺: Synthesis, crystal structure, DNA binding and cytotoxicity activity. *Polyhedron.* 2012; 31(1): 638-48.
97. Pivetta T, Cannas MD, Demartin F, Castellano C, Vascellari S, Verani G et al. Synthesis, structural characterization, formation constants and *in vitro* cytotoxicity of phenanthroline and imidazolidine-2-thione copper(II) complexes. *J Inorg Biochem.* 2011; 105(3): 329-38.
98. Zheng YJ, Li XW, Li YT, Wu ZY, Yan CW. Synthesis and structure of new tetracopper(II) complexes bridged by 2-{*N'*-[2-(dimethylamino)ethyl]oxamido} benzoate: DNA-binding and anticancer activity. *J Photochem Photobiol B.* 2012; 114: 27-37.
99. Buchtík R, Trávníček Z, Vančo J. *In vitro* cytotoxicity, DNA cleavage and SOD-mimic activity of copper(II) mixed-ligand quinolinonato complexes. *J Inorg Biochem.* 2012; 116: 163-71.

100. Li XW, Tao L, Li YT, Wu ZY, Yan CW. Bimetallic complexes constructed from asymmetrical *N,N'*-bis(substituted)-oxamide: cytotoxicities, and reactivities towards DNA and protein. *Eur J Med Chem.* 2012; 54: 697-708.
101. García-Giménez JL, González-Alvarez M, Liu-González M, Macías B, Borrás J, Alzuet G. Toward the development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with *N*-(9*H*-purin-6-yl)benzenesulfonamide and 1,10-phenantroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocytes. Evaluation of p53 and Bcl-2 proteins in the apoptotic mechanism. *J Inorg Biochem.* 2009; 103(6): 923-34.
102. Aliaga-Alcalde N, Marques-Gallego P, Kraaijkamp M, Herranz-Lancho C, Dulk H, Gorner H et al. Copper Curcuminoids Containing Anthracene Groups: Fluorescent Molecules with Cytotoxic Activity. *J Inorg Chem.* 2010; 49: 9655-63.
103. Chen QY, Fu HJ, Huang J, Zhang RX. Synthesis, characterization, bioactivities of copper complexes with *N*-allyl di(picolyl)amine. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2010; 75(1): 355-60.
104. Jia L, Xu XM, Xu J, Chen LH, Jiang P, Cheng FX et al. Synthesis, characterization, cytotoxic activities, and DNA-binding studies of ternary copper(II) complexes with new coumarin derivatives. *Chem Pharm Bull.* 2010; 58(8): 1003-8.
105. Kellett A, O'Connor M, McCann M, McNamara M, Lynch P, Rosair G et al. *Bis*-phenanthroline copper(II) phthalate complexes are potent *in vitro* antitumour agents with 'self-activating' metallo-nuclease and DNA binding properties. *Dalton Trans.* 2011; 40(5): 1024-7.
106. Selvakumar B, Rajendiran V, Uma Maheswari P, Stoeckli-Evans H, Palaniandavar M. Structures, spectra, and DNA-binding properties of mixed ligand copper(II) complexes of iminodiacetic acid: the novel role of diimine co-ligands on DNA conformation and hydrolytic and oxidative double strand DNA cleavage. *J Inorg Biochem.* 2006; 100(3): 316-30.
107. Campbell NH, Karim NH, Parkinson GN, Gunaratnam M, Petrucci V, Todd AK, Vilar R, Neidle S. Molecular basis of structure-activity relationships between salphen metal complexes and human telomeric DNA quadruplexes. *J Med Chem.* 2012; 55(1): 209-22.
108. Wang H, Shen R, Wu J, Tang N. Antitumor activity and DNA-binding investigations of the Zn(II) and Cu(II) complexes with isoeuxanthone. *Chem Pharm Bull.* 2009; 57: 814-8.

109. Tang LJ, Chen X, Sun YN, Ye J, Lu J, Han Y et al. Synthesis and biological studies of 4',7,8-trihydroxy-isoflavone metal complexes. *J Inorg Biochem.* 2011; 105(12): 1623-29.
110. Raja DS, Bhuvanesh NSP, Natarajan K. Effect of N(4)-phenyl substitution in 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde semicarbazones on the structure, DNA/protein interaction, and antioxidative and cytotoxic activity of Cu(II) complexes. *Inorg Chem.* 2011; 5: 12852-66.
111. Roy S, Maheswari PU, Lutz M, Spek AL, Dulk H, Barends S. DNA cleavage and antitumour activity of platinum(II) and copper(II) compounds derive from 4-methyl-2-N-(2-pyridylmethyl)aminophenol: spectroscopic, electrochemical and biological investigation. *Dalton Trans.* 2009; 48: 10846-60.
112. Krishnamoorthy P, Sathyadevi P, Cowley AH, Butorac RR, Dharmaraj N. Evaluation of DNA binding, DNA cleavage, protein binding and *in vitro* cytotoxic activities of bivalent transition metal hydrazone complexes. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(8): 3376-87.
113. Kellett A, Howe O, O'Connor M, McCann M, Creaven BS, McClean S et al. Radical-induced DNA damage by cytotoxic square-planar copper(II) complexes incorporating o-phthalate and 1,10-phenanthroline or 2,2'-dipyridyl. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53(3): 564-76.
114. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(4): 307-20.
115. Buchtík R, Trávníček Z, Vančo J, Herchel R, Dvořák Z. Synthesis, characterization, DNA interaction and cleavage, and *in vitro* cytotoxicity of copper(II) mixed-ligand complexes with 2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinone. *Dalton Trans.* 2011; 40(37): 9404-12.
116. Koppenol WH. The Haber-Weiss cycle-70 years later. *Redox Rep.* 2001; 6(4): 229-34.
117. Kremer ML. Mechanism of the Fenton reaction. Evidence for a new intermediate. *Phys Chem Chem Phys.* 1999; 1: 3595-605.
118. Fleming AM, Muller JG, Ji I, Burrows CJ. Characterization of 2'-deoxyguanosine oxidation products observed in the Fenton-like system Cu(II)/H₂O₂/reductant in nucleoside and oligodeoxynucleotide contexts. *Org Biomol Chem.* 2011; 9(9): 3338-48.
119. Anbu S, Kandaswamy M, Kamalraj S, Muthumarry J, Varghese B. Phosphatase-like activity, DNA binding, DNA hydrolysis, anticancer and lactate dehydrogenase inhibition activity promoting by a new *bis*-phenanthroline dicopper(II) complex. *Dalton Trans.* 2011; 40(28): 7310-8.

120. Manikandamathavan VM, Parameswari RP, Weyhermüller T, Vasanthi HR, Nair BU. Cytotoxic copper(II) mixed ligand complexes: crystal structure and DNA cleavage activity. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(9): 4537-47.
121. Rajalakshmi S, Weyhermüller T, Dinesh M, Nair BU. Copper(II) complexes of terpyridine derivatives: a footstep towards development of antiproliferative agent for breast cancer. *J Inorg Biochem.* 2012; 117: 48-59.
122. Hegg EL, Burstyn JN. Copper(II) macrocycles cleave single-stranded and double-stranded DNA under both aerobic and anaerobic conditions. *Inorg Chem.* 1996; 35(26): 7474-7481.
123. Hegg EL, Burstyn JN. Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry. *Coord Chem Rev.* 1998; 173(1): 133-165.
124. Povirk LF, Austin MJ. Genotoxicity of bleomycin. *Mutat Res.* 1991; 257(2): 127-43.
125. Chakraborty A, Kumar P, Ghosh K, Roy P. Evaluation of a Schiff base copper complex compound as potent anticancer molecule with multiple targets of action. *Eur J Pharmacol.* 2010; 647(1-3): 1-12.
126. Qiao X, Ma ZY, Xie CZ, Xue F, Zhang YW, Xu JY et al. Study on potential antitumour mechanism of a novel Schiff base copper (II) complex: Synthesis, Crystal structure, DNA binding, Cytotoxicity and Apoptosis induction activity. *J. Inorg. Biochem.* 2011; 105(5): 728-37.
127. Terenzi A, Pirker C, Keppler BK, Berger W. Anticancer metal drugs and immunogenic cell death. *J Inorg Biochem.* 2016; 165: 71-9.
128. Johnstone TC, Park GY, Lippard SJ. Understanding and improving platinum anticancer drugs-phenanthriplatin. *Anticancer research.* 2014; 34: 471-6.
129. Zhang CX, Lippard SJ. New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol.* 2003; 7: 481-9.
130. Marzano C, Pellei M, Tisato F, Santini C. Copper Complexes as Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2009; 9: 185-211.
131. Goodman VL, Brewer GJ, Merajver SD. Copper deficiency as an anti-cancer strategy. *Endocr Relat Cancer.* 2004; 11(2): 255-63.
132. Iakovidis I, Delimaris I, Piperakis SM. Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach. *Mol Biol Int.* 2011; 2011: 594529.

133. Daniel KG, Gupta P, Harbach RH, Guida WC, Dou QP. Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2004; 67: 1139-51.
134. Prudhomme M. *Advances in Anticancer Agents in Medicinal Chemistry.* Clermont-Ferrand: Bentham Science Publishers; 2013(2).
135. O'Halloran TV. Transition metals in control of gene expression. *Science.* 1993; 261(5122): 715-25.
136. Raja DS, Bhuvanesh NSP, Natarajan K. Structure activity relationship study of copper(II) complexes with 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carbaldehyde (40-methylbenzoyl) hydrazone: synthesis, structures, DNA and protein interaction studies, antioxidative and cytotoxic activity. *J Biol Inorg Chem.* 2012; 17: 223-37.
137. Castle TC, Maurer RI, Sowrey FE, Went MJ, Reynolds CA, McInnes EJ et al. Hypoxia-targeting copper *bis*(selenosemicarbazone) complexes: comparison with their sulfur analogues. *J Am Chem Soc.* 2003; 125: 10040-49.
138. Paterson BM, Donnelly PS. Copper complexes of *bis*(thiosemicarbazones): from chemotherapeutics to diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem Soc Rev.* 2011; 40: 3005-18.
139. Ali SMH, Yan YK, Lee PPF, Khong KZX, Sk MA, Lim KH et al. Copper(II) complexes of substituted salicylaldehyde dibenzyl semicarbazones: synthesis, cytotoxicity and interaction with quadruplex DNA. *Dalton Trans.* 2014; 43: 1449-59.
140. Qiu L, Lv G, Guo L, Chen L, Luo S, Zou M et al. Synthesis, crystal structure and antitumor effect of a novel copper(II) complex bearing zoledronic acid derivative. *Eur J Med Chem.* 2015; 89: 42-50.
141. Maher M, Ao H, Banke T, Nasser N, Wu NT, Breitenbucher JG, Chaplan SR, Wickenden AD. Activation of TRPA1 by farnesyl thiosalicylic acid. *Mol Pharmacol.* 2008; 73(4): 1225-34.
142. Alexandre H, Delsinne V, Goval JJ, Van Cauwenberge A. Effect of taxol and okadaic acid on microtubule dynamics in thimerosal-arrested primary mouse oocytes: a confocal study. *Biol Cell.* 2003; 95(6): 407-14.
143. Alexandre H, Delsinne V, Goval JJ. The thiol reagent, thimerosal, irreversibly inhibits meiosis reinitiation in mouse oocyte when applied during a very early and narrow temporal window: a pharmacological analysis. *Mol Reprod Dev.* 2003; 65(4): 454-61.

144. Smalley KS, Eisen TG. Farnesyl transferase inhibitor SCH66336 is cytostatic, proapoptotic and enhances chemosensitivity to cisplatin in melanoma cells. *Int J Cancer*. 2003; 105(2): 165-75.
145. Zhang X, Lu J, Huang Y, Zhao W, Chen Y, Li J et al. PEG farnesylthiosalicylate conjugate as a nanomicellar carrier for delivery of paclitaxel. *Bioconjugate Chem*. 2013; 24: 464-72.
146. Lu J, Huang Y, Zhao W, Chen Y, Li J, Gao X et al. Design and characterization of PEG derivatized vitamin E as a nanomicellar formulation for delivery of paclitaxel. *Mol Pharmacol*. 2013; 10: 2880-90.
147. Mi Y, Liu Y, Feng SS. Formulation of Docetaxel by folic acid-conjugated *D*- α -tocopheryl polyethylene glycol succinate 2000 (Vitamin E TPGS_{2k}) micelles for targeted and synergistic chemotherapy. *Biomaterials*. 2011; 32: 4058-66.
148. Huang Y, Lu J, Gao X, Li J, Zhao W, Sun M et al. PEG-derivatized embelin as a dual functional carrier for the delivery of paclitaxel. *Bioconjugate Chem*. 2012; 23: 1443-51.
149. Lu J, Huang Y, Zhao W, Marquez RT, Meng X, Li J et al. PEG-derivatized embelin as a nanomicellar carrier for delivery of paclitaxel to breast and prostate cancers. *Biomaterials*. 2013; 34: 1591-600.
150. Xu J, Zhang X, Chen Y, Huang Y, Wang P, Wei Y et al. Improved Micellar Formulation for Enhanced Delivery for Paclitaxel. *Mol Pharm*. 2017; 14(1): 31-41.
151. Qin Y, Meng L, Hu C, Duan W, Zuo Z, Lin L et al. Gambogic acid inhibits the catalytic activity of human topoisomerase II α by binding to its ATPase domain. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(9): 2429-40.
152. Zeglis BM, Divilov V, Lewis JS. Role of metalation in the topoisomerase II α inhibition and antiproliferation activity of a series of α -heterocyclic-N4-substituted thiosemicarbazones and their Cu(II) complexes. *J Med Chem*. 2011; 54(7): 2391-8.
153. Claassen G, Brin E, Crogan-Grundy C, Vaillancourt MT, Zhang HZ, Cai SX. Selective activation of apoptosis by a novel set of 4-aryl-3-(3-aryl-1-oxo-2-propenyl)-2(1*H*)-quinolinones through a Myc-dependent pathway. *Cancer Lett*. 2009; 274(2): 243-9.
154. Tabassum S, Al-Asbahy WM, Afzal M, Arjmand F, Bagchi V. Molecular drug design, synthesis and structure elucidation of a new specific target peptide based metallo drug for cancer chemotherapy as topoisomerase I inhibitor. *Dalton Trans*. 2012; 41(16): 4955-64.

155. Peters JM, Franke WW, Kleinschmidt JA. Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem.* 1994; 269(10): 7709-18.
156. Dou QP, Smith DM, Daniel KG, Kazi A. Interruption of tumor cell cycle progression through proteasome inhibition: implications for cancer therapy. *Prog Cell Cycle Res.* 2003; 5: 441-6.
157. Drexler HC. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(3): 855-60.
158. Agilent, CrysAlis PRO, Agilent Technologies, Yarnton, Oxfordshire, England, 2013.
159. Burla MC, Camalli M, Carrozzini B, Cascarano GL, Giacovazzo C, Polidori G et al. SIR2002: the program. *J Appl Crystallogr.* 2003; 36(4): 1103-1103.
160. Sheldrick GM. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr, Sect A: Found Crystallogr.* 2007; 64(1): 112-22.
161. Nardelli M. PARST95—an update to PARST: a system of Fortran routines for calculating molecular structure parameters from the results of crystal structure analyses. *J Appl Crystallogr.* 1995; 28(5): 659-659.
162. Spek AL. Single-crystal structure validation with the program PLATON. *J Appl Crystallogr.* 2003; 36(1): 7-13.
163. Macrae CF, Edgington PR, McCabe P, Pidcock E, Shields GP, Taylor R et al. Mercury: visualization and analysis of crystal structures. *J Appl Crystallogr.* 2006; 39(3): 453-7.
164. Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 4). *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(1): 60-76.
165. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 2007; 42(4): 321-4.
166. Meadows KA, Liu F, Sou J, Hudson BP, McMillin DR. Spectroscopic and photophysical studies of the binding interactions between copper phenanthroline complexes and RNA. *Inorg Chem.* 1993; 32(13): 2919-23.
167. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
168. Santini C, Pellei M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev.* 2014; 114(1): 815-62.
169. Dittler-Klingemann AM, Orvig C, Ekkehardt Hahn F, Thaler F, Hubbard CD, Van Eldik R et al. Geometric Factors in the Structural and Thermodynamic Properties of

- Copper(II) Complexes with Tripodal Tetraamines. *Inorg Chem.* 1996; 35(26): 7798-7803.
170. Buvaylo EA, Kokozay VN, Vassilyeva OY, Skelton BW, Jezoerska J, Ozarowski A. A new Cu/Zn carboxylato-bridged 1D polymer: Direct synthesis, X-ray structure and magnetic properties. *Inorg Chim Acta.* 2011; 373(1): 27-31.
171. Solanki A, Sadhu MH, Patel S, Devkar R, Kumar SB. Ternary complexes of Copper(II) and Cobalt(II) Carboxylate with Pyrazole based ligand: Syntheses, Characterization, Structures and Bioactivities. *Polyhedron.* 2015; 102: 267-75.
172. Sundberg MR, Uggla R, Melnik M. Comparison of the structural parameters in copper(II) acetate-type dimers containing distorted square pyramidal CuO₄O and CuO₄N chromophores. *Polyhedron.* 1996; 15(7): 1157-63.
173. Nomiya K, Kondoh Y, Onoue K, Kasuga NC, Nagano H, Oda M et al. Synthesis and characterization of polymeric, anionic thiosalicylato-Ag(I) complexes with antimicrobial activities. *J Inorg Biochem.* 1995; 58(4): 255-67.
174. Nomiya K, Yokoyama H, Nagano H, Oda M, Sakuma S. Synthesis and Characterization of Trisodium Salt of *Bis*(thiosalicylato)aurate(I): Na₃[Au(TSA)₂] \cdot 5H₂O. *J Inorg Biochem.* 1995; 60(4): 289-97.
175. Gilbert JG, Addison AW, Nazarenko AY, Butcher RJ. Copper(II) complexes of new unsymmetrical NSN thioether ligands. *Inorg Chim Acta.* 2001; 324(1): 123-30.
176. Schoenberg LN, Cooke DW, Liu CF. Nuclear magnetic resonance determination of the absolute configuration of complexes of cobalt(III) with asymmetric tetradentate ligands. *Inorg Chem.* 1968; 7: 2386-93.
177. Swaminathan K, Busch DH. The synthesis and infrared absorption spectra of complexes of cobalt with pentadentate propylenediaminetetraacetic acid. *J Inorg Nucl Chem.* 1961; 20(1): 159-63.
178. Nakamoto K. Infrared spectra of the inorganic and coordination compounds. New York: Willey; 1963.
179. Karayannis NM, Mikulski CM, Sonsino SD, Bradshaw EE, Pytlewski LL. Isoxazole as a ligand. *Inorg Chim Acta.* 1975; 14: 195-200.
180. Agterberg FPW, ProvóKluit HAJ, Driessen WL, Reedijk J, Oevering H, Buijs W et al. Three dinuclear copper(II) carboxylates with the paddle-wheel cage structure as intermediates in copper(II) catalyzed oxidations of carboxylic acids. X-ray crystal structures of [tetrakis(diphenyl acetato- μ -O,O')bis(acetonitrile-N)dicopper(II)] tetrakis(acetonitrile), [tetrakis(diphenylacetato- μ -O,O')bis(acetone-O)dicopper(II)] and

- [*tetrakis(1-phenyl-1-carboxylato- μ -O,O'-cyclopentane)-bis(ethanol-O)dicopper(II)*]
bis(ethanol). Inorg Chim Acta. 1998; 267(2): 183-92.
181. Morgan YR, Turner P, Kennedy BJ, Hambley TW, Lay PA, Biffin JR et al. Preparation and characterization of dinuclear copper-indomethacin anti-inflammatory drugs. Inorg Chim Acta. 2001; 324(1-2): 150-61.
182. Weder JE, Hambley TW, Kennedy BJ, Lay PA, Foran GJ, Rich AM. Determination of the Structures of Antiinflammatory Copper(II) Dimers of Indomethacin by Multiple-Scattering Analyses of X-ray Absorption Fine Structure Data. Inorg Chem. 2001; 40(6): 1295-302.
183. Kozlevčar B, Leban I, Petrič M, Petriček S, Roubeau O, Reedijk J. Phase transitions and antiferromagnetism in copper(II) hexanoates: a new tetranuclear type of copper carboxylate paddle-wheel association. Inorg Chim Acta. 2004; 357(14): 4220-30.
184. Motreff A, Da Costa RC, Allouchi H, Duttine M, Mathoniere C, Duboc C et al. A fluorine copper(II)-carboxylate complex which magnetically and reversibly responds to humidity in the solid state. J Fluorine Chem. 2012; 134: 49-55.
185. Iqbal M, Ahmad I, Ali S, Muhammad N, Ahmed S, Sohail M. Dimeric "paddlewheel" carboxylates of copper(II): Synthesis, crystal structure and electrochemical studies. Polyhedron. 2013; 50(1): 524-31.
186. Abd-Elzahera MM, Labiba AA, Mousa HA, Moustafa SA, Ali MM, El-Rashedy AA. Synthesis, anticancer activity and molecular docking study of Schiff base complexes containing thiazole moiety. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. 2016; 5(1): 85-96.
187. Andersen O. Principles and recent developments in chelation treatment of metal intoxication. Chem Rev. 1999; 99: 2683-710.
188. Chohan ZH, Pervez H, Rauf A, Khan KM, Supuran CT. Isatin derived antibacterial and antifungal compounds and their transition metal complexes. J Enzyme Inhib Med Chem. 2004; 19: 417-23.
189. Golcu A, Tumer M, Demirelli H, Wheatley RA. Cd(II) and Cu(II) complexes of polydentate Schiff base ligands: synthesis, characterization, properties and biological activity. Inorg Chim Acta. 2005; 358: 1785-97.
190. Joseyphus RS, Dhanaraj CJ, Nair MS. Synthesis and characterization of some Schiff base transition metal complexes derived from vanillin and L(+)-alanine. Transit Met Chem. 2006; 31: 699-702.

191. Geary WJ. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Coord Chem Rev.* 1971; 7(1): 81-122.
192. Raman N, Ravichandran S, Thangaraja C. Copper(II), cobalt(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of Schiff base derived from benzil-2,4-dinitrophenylhydrazone with aniline. *J Chem Sci.* 2004; 116(4): 215-9.
193. Hathaway BJ, Billing DE. The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the copper(II) ion. *Coord Chem Rev.* 1970; 5(2): 143-207.
194. Jotham RW, Kettle SFA, Marks JA. Antiferromagnetism in transition-metal complexes. Part VI. Low-lying excited states of dinuclear copper(II) complexes with bridging multidentate Schiff's base groups and some related compounds. *J Chem Soc, Dalton Trans.* 1974; 2: 125-8.
195. Meier JL, Coughenour CE, Carlisle JA, Carlisle GO. The magnetic properties of a series of copper(II) aspirinates. *Inorg Chim Acta.* 1985; 106: 159-63.
196. Elmali A. The magnetic super-exchange coupling in copper(II) acetate monohydrate and a redetermination of the crystal structure. *Turk J Phy.* 2000; 24: 667-72.
197. Underhill AE, Bougourd SA, Flugge ML, Gale SE, Gomm PS. Metal complexes of anti-inflammatory drugs. Part VIII: Suprofen complex of copper(II). *J Inorg Biochem.* 1993; 144: 139-44.
198. Van Niekerk JN, Schoening FR. A new type of copper complex as found in the crystal structure of cupric acetate, $\text{Cu}_2(\text{CH}_3\text{COO})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. *Acta Crystallogr.* 1953; 6: 227-32.
199. Reyes-Ortega Y, Alcántara-Flores JL, Hernández-Galindo MC, Ramírez-Rosales D, Bernès S, Ramírez-García JC et al. Magnetic properties and crystal structure of a one-dimensional phase of *tetrakis*(μ_2 -benzoato-*O,O'*)-*bis*(dimethyl sulfoxide)dicopper(II). *J Am Chem Soc.* 2005; 127(46): 16312-7.
200. Sigman DS, Mazumder A, Perrin DM. Chemical nucleases. *Chem Rev.* 1993; 93(6): 2295-2316.
201. Sigman DS, Graham DR, D'Aurora V, Stern AM. Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline-cuprous complex. Inhibition of *E. coli* DNA polymerase I. *J Biol Chem.* 1979; 254: 12269-72.
202. Reich KA, Marshall LE, Graham DR, Sigman DS. Cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline-copper ion complex. Superoxide mediates the reaction dependent on NADH and hydrogen peroxide. *J Am Chem Soc.* 1981; 103(12): 3582-4.

203. Veal JM, Merchant K, Rill RL. The influence of reducing agent and 1,10-phenanthroline concentration on DNA cleavage by phenanthroline + copper. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(12): 3383-8.
204. Newton GL, Rawat M, La Clair JJ, Jothivasan VK, Budiarto T, Hamilton CJ et al. Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli. *Nat Chem Biol.* 2009; 5: 625-27.
205. Beeton ML, Aldrich-Wright JR, Bolhuis A. The antimicrobial and antibiofilm activities of copper(II) complexes. *J Inorg Biochem.* 2014; 140: 167-72.
206. Betanzos-Lara S, Gracia-Mora I, Granada-Macyas P, Flores-Alamo M, Barba-Behrens N. Synthesis, characterization, and biological activity of cobalt(II), nickel(II), copper(II), and zinc(II) complexes of secnidazole. *Inorg Chim Acta.* 2013; 397: 94-100.
207. El-Gamel NE, Zayed MA. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activity evaluation of metal complexes of sparfloxacin. *Spectrochim Acta Part A.* 2011; 82: 414-23.
208. Geeta B, Shrivankumar K, Muralidhar Reddy P. Binuclear cobalt(II), nickel(II), copper(II) and palladium(II) complexes of a new Schiff-base as ligand: Synthesis, structural characterization, and antibacterial activity. *Spectrochim Acta Part A.* 2010; 77(4): 911-15.
209. Siddiqi ZA, Sharma PK, Shahid M, Khalid M, Anjuli, Siddique A et al. Superoxide scavenging and antimicrobial activities of novel transition metal complexes of oxydiacetate dianion as primary ligand: spectral characterization, cyclic voltammetric investigations and crystal structure. *Eur J Med Chem.* 2012; 57: 102-11.
210. Abou-Hussein AA, Linert W. Synthesis, spectroscopic and biological activities studies of acyclic and macrocyclic mono and binuclear metal complexes containing a hard-soft Schiff base. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc.* 2012; 95: 596-609.
211. Amer S, El-Wakiel N, El-Ghamry H. Synthesis, spectral, antitumor and antimicrobial studies on Cu(II) complexes of purine and triazole Schiff base derivatives. *J Mol Struct.* 2013; 1049: 326-35.
212. Creaven BS, Egan DA, Karcz D, Kavanagh K, McCann M, Mahon M et al. Synthesis, characterisation and antimicrobial activity of copper(II) and manganese(II) complexes of coumarin-6,7-dioxyacetic acid (cdoaH₂) and 4-methylcoumarin-6,7-dioxyacetic acid (4-MecdoaH₂): X-ray crystal structures of [Cu(cdoa)(phen)₂] \cdot 8H₂O and [Cu(4-Mecdoa)(phen)₂] \cdot 13H₂O (phen=1,10-phenanthroline). *J Inorg Biochem.* 2007; 101(8): 1108-19.

213. Efthimiadou EK, Katsarou ME, Karaliota A, Psomas G. Copper(II) complexes with sparfloxacin and nitrogen-donor heterocyclic ligands: structure–activity relationship. *J Inorg Biochem.* 2008; 102: 910-20.
214. Chalkidou E, Perdih F, Turer I, Kessissoglou PD, Psomas G. Copper(II) complexes with antimicrobial drug flumequine: structure and biological evaluation. *J Inorg Biochem.* 2012; 113: 55-65.
215. Pratumwieng R, Soikum C, Chaveerach P, Chaveerach U. Binding studies of (*N*-(methylpyridin-2-yl)-amidino-*O*-methylurea)copper(II) complexes to four nitrogenous bases and 5'-GMP. *Inorg Chim Acta.* 2014; 423: 421-29.
216. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature.* 1969; 222(5191): 385-6.
217. Kamath A, Naik K, Netalkar SP, Kokare DG, Revankar VK. Pyrazole-bridged late first row transition metal complexes derived from hexadentate compartmental ligand: synthesis, characterization, antibacterial activity, and DNA binding/cleavage studies. *Med Chem Res.* 2013; 22: 1948-56.
218. Qing J, Gu W, Liu H, Gao FX, Feng L, Yan SP et al. The first dinuclear copper(II) and zinc(II) complexes containing novel Bis-TACN: syntheses, structures, and DNA cleavage activities. *Dalton Trans.* 2007; 10: 1060-66.
219. Mao JW, Zhou H, Chen YF, Cheng GZ, Pan ZQ. Synthesis, structure, DNA interaction, and hydrolytic function toward bis(*p*-nitrophenyl) phosphate of a heterobinuclear macrocyclic complex. *Transit Met Chem.* 2012; 37(4): 385-91.
220. Long EC, Barton JK. *Acc Chem Res.* On demonstrating DNA intercalation. 1990; 23(9): 271-3.
221. Pasternack RF, Gibbs EJ, Villafranca JJ. Interactions of porphyrins with nucleic acids. *Biochemistry.* 1983; 22(10): 2406-14.
222. Koumoussi ES, Zampakou M, Raptopoulou CP, Psycharis V, Beavers CM, Teat SJ et al. First palladium(II) and platinum(II) complexes from employment of 2,6-diacetylpyridine dioxime: synthesis, structural and spectroscopic characterization, and biological evaluation. *Inorg Chem.* 2012; 51: 7699-710.
223. Rizvi MA, Zaki M, Afzal M, Mane M, Kumar M, Shah BA et al. Nuclear blebbing of biologically active organoselenium compound towards human cervical cancer cell (HeLa): in vitro DNA/HSA binding, cleavage and cell imaging studies. *Eur J Med Chem.* 2015; 90: 876-88.

224. Arthi P, Haleel A, Srinivasan P, Prabhu D, Arulvasu C, Kalilur Rahiman A. Antibacterial, DNA interaction and cytotoxic activities of pendant-armed polyamine macrocyclic dinuclear nickel(II) and copper(II) complexes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014; 129: 400-14.
225. LePecq JB, Paoletti C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. *J Mol Biol.* 1967; 27(1): 87-106.
226. Boger DL, Fink BE, Brunette SR, Tse WC, Hedrick MP. A simple, high-resolution method for establishing DNA binding affinity and sequence selectivity. *J Am Chem Soc.* 2001; 123(25): 5878-91.
227. Meyer-Almes FJ, Porschke D. Mechanism of intercalation into the DNA double helix by ethidium. *Biochemistry,* 1993; 32: 4246-53.
228. Liu ZC, Wang BD, Yang ZY, Li Y, Qin DD, Li TR. Synthesis, crystal structure, DNA interaction and antioxidant activities of two novel water-soluble Cu²⁺ complexes derivated from 2-oxo-quinoline-3-carbaldehyde Schiff-bases. *Eur J Med Chem.* 2009; 44(11): 4477-84.
229. Howe GM, Wu KC, Bauer WR. Binding of platinum and palladium metallointercalation reagents and antitumor drugs to closed and open DNAs. *Biochemistry,* 1976; 19: 4339-46.
230. Li DD, Tian JL, Gu W, Liu X, Yan SP. Four new copper(II) complexes with 1,3-tpbd ligand: Synthesis, crystal structures, magnetism, oxidative and hydrolytic cleavage of pBR322 DNA. *J Inorg Biochem.* 2010; 104(4): 431-41.
231. Jiang M, Li YT, Wu ZY, Liu ZQ, Yan CW. Synthesis, crystal structure, cytotoxic activities and DNA-binding properties of new binuclear copper(II) complexes bridged by *N,N'*-bis(*N*-hydroxyethylaminoethyl)oxamide. *J Inorg Biochem.* 2009; 103(5): 833-44.
232. Gracia-Mora I, Ruiz-Ramirez L, Gomez-Ruiz C, Tinoco-Mendez M, Marquez-Quinones A, Lira LR et al. Knigth's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeínas, evaluated by an *in vitro* human and murine cancer cell line panel. *Met Based Drugs.* 2001; 8: 19-28.
233. Raman N, Jeyamurugan R, Senthilkumar R, Raj Kapoor B, Franzblau SG. *In vivo* and *in vitro* evaluation of highly specific thiolate carrier group copper(II) and zinc(II) complexes on Ehrlich ascites carcinoma tumor model. *Eur J Med Chem.* 2010; 45: 5438-51.

234. Murugkar A, Unnikrishnan B, Padhye S, Bhonde R, Teat S, Triantafillou E et al. Hormone anchored metal complexes. 1. Synthesis, structure, spectroscopy and *in vitro* antitumor activity of testosterone acetate thiosemicarbazone and its metal complexes. *Met Based Drugs*. 1999; 6: 177-82.
235. Lakshmi Praba J, Arunachalam S, Gandhi DA, Thirunalasundari T. Synthesis, nucleic acid binding and cytotoxicity of polyethyleneimine-copper(II) complexes containing 1,10-phenanthroline and L-valine. *Eur J Med Chem*. 2011; 46: 3013-21.
236. Boulsourani Z, Geromichalos GD, Repana K, Yiannaki E, Psycharis V, Raptopoulou CP et al. Preparation and pharmacological evaluation of mixed ligand copper(II) complexes with triethanolamine and thiophenyl-2 saturated carboxylic acids. *J Inorg Biochem*. 2011; 105: 839-49.
237. Tardito S, Isella C, Medico E, Marchio L, Bevilacqua E, Hatzoglou M et al. The thioxotriazole copper(II) complex A0 induces endoplasmic reticulum stress and paraptotic death in human cancer cells. *J Biol Chem*. 2009; 284: 24306-19.
238. Frías González SE, Angeles Anguiano E, Mendoza Herrera A, Escutia Calzada D, Ordaz Pichardo C. Cytotoxic, pro-apoptotic, pro-oxidant, and non-genotoxic activities of a novel copper(II) complex against human cervical cancer. *Toxicology*. 2013; 314(1): 155-65.
239. Qasem Ali A, Guan Teoh S, Eltaher Eltayeb N, Khadeer Ahamed MB, Abdul Majid AMS. Synthesis of copper(II) complexes of isatin thiosemicarbazone derivatives: *In vitro* anti-cancer, DNA binding, and cleavage activities. *Polyhedron*. 2014; 74: 6-15.
240. Hu J, Liao C, Guo Y, Yang F, Sang W, Zhao J. Copper(II) complexes inducing apoptosis in cancer cells, and demonstrating DNA and HSA interactions. *Polyhedron*. 2017; 132: 28-38.

9. БИОГРАФИЈА АУТОРА

Душан Љ. Томовић је рођен 03.11.1988. године у Крагујевцу. Основну школу и Медицинску школу са домом ученика „Сестре Нинковић” у Крагујевцу, смер за фармацеутског техничара, завршио је са одличним успехом. Интегрисане академске студије фармације на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписао је 2007. године где је и дипломирао 2012. године са просечном оценом 9,59 (девет и 59/100). На завршној години основних студија био је стипендиста Фонда за младе таленте Министарства омладине и спорта Републике Србије. За време основних студија три пута је награђиван од стране факултета као један од најуспешнијих студената у генерацији (2008, 2010. и 2011. године). Стручни испит за магистра фармације је положио 26.09.2013. године у Министарству здравља Републике Србије.

Докторске академске студије (смер: клиничка и експериментална фармакологија) уписао је школске 2012/2013. године. У периоду април 2013 - мај 2014, одобрено му је учешће, као стипендисти, на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Преклиничка испитивања биоактивних супстанци” чији је руководилац доц. др Снежана Марковић (евиденциони број пројекта- - ИИИ 41010). Положио је усмени докторски испит 21. јула 2014. године са оценом 10 (десет).

Од 09. јуна 2014. године засновао је радни однос као сарадник у настави за ужу научну област Фармацеутска хемија на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, а од септембра 2016. године је ангажован у извођењу наставе у звању асистента.

Од 01. маја 2018. године му је одобрено прикључење на пројекат Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Синтеза, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине органских једињења и одговарајућих комплекса метала” чији је руководилац проф. др Срећко Трифуновић (евиденциони број пројекта - ОИ 172016). Говори енглески језик и познаје рад на рачунару.

Душан Љ. Томовић је аутор или коаутор осам научних радова објављених у целости у домаћим и међународним часописима на SCI листи као и већег броја саопштења на конференцијама од домаћег и међународног значаја.

10. БИБЛИОГРАФИЈА АУТОРА

Списак радова

- 1) **Tomović DLj**, Bukonjić AM, Jevtić VV, Ratković ZR, Bogojeski JV, Đeković A et al. DNA binding, antibacterial and antifungal activities of copper(II) complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. *Transit Met Chem.* 2018;43(2): 137-148. **M23 (IF 1.261)**
- 2) Bukonjić AM, **Tomović DLj**, Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR et al. Antibacterial, antibiofilm and antioxidant screening of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-propyl derivative of thiosalicylic acid. *J Mol Struct.* 2017; 1128:330-7. **M23 (IF 2.011)**
- 3) **Tomović DLj**, Bukonjić AM, Kočović A, Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV et al. Synthesis, characterization and cytotoxicity of binuclear copper(II)-complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. *Ser J Exp Clin Res.* 2017; 18(1): 13-8. **M51**
- 4) Mijajlović MŽ, Nikolić MV, **Tomović DLj**, Bukonjić AM, Kočović A, Jevtić VV et al. Synthesis, characterization of platinum(IV)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the S-butyl derivative of thiosalicylic acid. *Ser J Exp Clin Res.* 2017; 18(3): 195-201. **M51**
- 5) Nikolić MV, Mijajlović MŽ, **Tomović DLj**, Bukonjić AM, Jevtić VV, Ratković ZR et al. Synthesis and characterization of zinc(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. *Ser J Exp Clin Res.* 2018; 19(2): 113-7. **M51**
- 6) Milovanović B, **Tomović D**, Janković SM, Grubor I, Nikolić Lj, Nikolić M et al. Factor Influencing the Fear of Needles among Students of Medicine and Pharmacy. *Acta facultatis medicae Naissensis* 2017; 34(2): 147-158. **M51**
- 7) Janković SM, Aleksić DZ, Bukonjić AM, **Tomović DLj**. Factors influencing knowledge transfer from faculty to PhD students. *Racionalna terapija* 2016; 8(1):1-9. **M53**
- 8) **Tomović DLj**. Uticaj emocionalne inteligencije farmaceuta i farmaceutskih tehničara na poboljšanje potencijala za ostvarenje komplijanse. *Racionalna terapija* 2013; 5(2):43-59. **M53**

**Списак саопштења на домаћим и међународним научним конференцијама
који су штампани у изводу**

- 1) Radić G, **Tomović D**, Bukonjić A, Stanković A, Jevtić V, Ratković Z, Bogojeski J, Radojević I, Čomić Lj, Trifunović S. Antimicrobial Activity of Copper(II)-Complexes with Some S-Alkenyl Derivatives of Thiosalicylic Acid. International Symposium on Bioorganic Chemistry (ISBOC-11) Konstanz Symposium Chemical Biology; 2017 September 27-29, Konstanz; 2017, p. 150. **M34**
- 2) Mijajlović MŽ, Bukonjić AM, **Tomović DLj**, Kočović A, Nikolić MV, Jevtić VV, Ratković ZR, Radojević ID, Maksimović JZ, Vasić SM, Čomić LjR, Trifunović SR, Radić GP. Antibiofilm activity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. The International Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Bioscience Conference, Novi Sad 2016, p. 218. **M34**
- 3) Bukonjić A, **Tomović D**, Stanković A, Nikolić M, Mijajlović M, Jevtić V, Ratković Z, Potočňák I, Trifunović S, Radić G. The crystal structure of *bis*(2-(1-aminocyclohexyl)-ethanoato)copper(II)-complex. 24th Conference of the Serbian Crystallographic Society; 2017 June 22-24; Vršac: Serbian Crystallographic Society; 2017, p. 58-9. **M64**
- 4) **Tomović D**, Bukonjić A, Kočović A, Nikolić M, Mijajlović M, Jevtić V, Ratković Z, Bogdanović G, Novaković S, Trifunović S, Radić G. The crystal structure of binuclear copper(II)-complex with S-benzyl derivative of thiosalicylic acid. 23rd Conference of the Serbian Crystallographic Society; 2016 June 9-11; Andrevlje, Novi Sad: Serbian Crystallographic Society; 2016, p. 26-7. **M64**
- 5) Kočović A, **Tomović D**, Bukonjić A, Nikolić M, Mijajlović M, Jevtić V, Ratković Z, Bogdanović G, Novaković S, Trifunović S, Radić G. The crystal structure of binuclear copper(II)-complex with S-isobutenyl derivative of thiosalicylic acid. 23rd Conference of the Serbian Crystallographic Society; 2016 June 9-11; Andrevlje, Novi Sad: Serbian Crystallographic Society; 2016, p. 44-5. **M64**
- 6) Bukonjić A, **Tomović D**, Kočović A, Nikolić M, Mijajlović M, Jevtić V, Ratković Z, Bogdanović G, Novaković S, Trifunović S, Radić G. Two polymorphs of binuclear copper(II)-complex with S-propyl derivative of thiosalicylic acid. 23rd Conference of the Serbian Crystallographic Society; 2016 June 9-11; Andrevlje, Novi Sad: Serbian Crystallographic Society; 2016, p. 52-3. **M64**
- 7) Sekulić MR, **Tomović DLj**, Đonović N, Milovanović D. Medikamentozna terapija pacijenata sa hipertenzijom u psihijatrijskoj dnevnoj bolnici Kliničkog centra Kragujevac. XLI oktobarski zdravstveni dani – Sažeci radova, Srpsko Lekarsko Društvo, okružna podružnica Kragujevac: Medicinski časopis 2016; 50 (Suplement 1): s. 28. **M64**

- 8) **Tomović D.** Implementacija emocionalne inteligencije u farmaceutsku zdravstvenu zaštitu radi ostvarenja partnerskog odnosa sa pacijentima. XXXVII oktobarski zdravstveni dani – Sažeci radova, Srpsko Lekarsko Društvo, okružna podružnica Kragujevac: Medicinski časopis 2012; 46 (Suplement 1): s. 29. **M64**
- 9) Đurić D, Radonjić V, Milovanović S, Đurić S, Pavlović I, Stojilković S, **Tomović D.** Kako slikati patnju? PONS Med J 2012; 9 (Suplement 1): s. 16. **M64**
- 10) Milovanović S, Radonjić V, Đurić D, Đurić S, Jovanović Z, Stojilković S, **Tomović D.** Boje melanholije. PONS Med J 2012; 9 (Suplement 1): s. 17. **M64**
- 11) Radonjić V, Milovanović S, Đurić D, Đurić S, Milovanović O, **Tomović D.** Stojilković S. Mistično i pragmatično u terapiji izliva crne žuči. PONS Med J 2012; 9 (Suplement 1): s. 18. **M64**
- 12) **Tomović D.** The importance of emotional intelligence (EIQ) to achieve academic success of pharmacy students. 7th International Medical Student's Congress. Novi Sad July 19-22 2012; Abstracts: p. 208. **M64**
- 13) **Tomović D.** Da li emocionalna inteligencija (EIQ) utiče na prosečnu ocenu studenata farmacije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Kragujevcu? 53. Kongres studenata biomedicinskih nauka Srbije sa međunarodnim učešćem. Kopaonik 26-30. april 2012; Knjiga sažetaka: s. 384. **M64**
- 14) Đurić D, Vulović K, Bukonjić A, **Tomović D.** Stojilković S. Nove funkcije farmaceutskog marketinga u okviru farmaceutske zdravstvene zaštite. XXXVI oktobarski zdravstveni dani – Sažeci radova, Srpsko Lekarsko Društvo, okružna podružnica Kragujevac: Medicinski časopis 2011; 45 (Suplement 1): s. 19. **M64**

11. ПРИЛОЗИ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

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

Редни број – РБ:

Идентификациони број – ИБР:

Тип документације – ТД: Монографска публикација

Тип записа – ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада – ВР: Докторска дисертација

Аутор – АУ: Душан Љ. Томовић

Ментор/коментор – МН: проф. др Гордана П. Радић

Наслов рада – НР: Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине

Језик публикације – ЈП: српски/ћирилица

Језик извода – ЈИ: српски/енглески

Земља публикавања – ЗП: Република Србија

Уже географско подручје – УГП: Централна Србија, Шумадија

Година – ГО: 2018. година

Издавач – ИЗ: Ауторски репринт

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

Физичи опис рада – ФО: 8 поглавља, 120 страна, 9 схема, 16 табела, 27 слика и 240 референци

Научна област: Фармација

Научна дисциплина – ДИ: Фармацеутска хемија

Предметна одредница/ кључне речи – ПО: S-алкенил деривати тиосалицилне киселине, бинуклеарни комплекси бакра(II), кристална структура, биолошка активност

УДК

Чува се – ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу

Важна напомена – ВН:

Извод – ИД:

Увод: У овој Докторској дисертацији испитиване су кинетичка, антимикуробна и антитуморска активност новосинтетисаних бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима тиосалицилне киселине. Истраживања у овој области су фокусирана на проналажење биолошки активних комплексних једињења. Тиосалицилна киселина и њени деривати су веома интересантни као лиганди, јер показују велику разноликост у могућностима за координовање.

Материјал и методе: У оквиру овог истраживања описани су поступци синтезе S-алкенил деривата тиосалицилне киселине (алкенил = пропенил- и изобутенил-) и одговарајућих бинуклеарних комплекса бакра(II). Састав награђених једињења потврђен је на основу резултата елементалне микроанализе. Структура синтетисаних бидентатних лиганата окарактерисана је на основу резултата инфрацрвене (IR) и нуклеарно-магнетно-резонанционе спектроскопије (^1H и ^{13}C NMR), док је структура одговарајућих комплекса претпостављена на основу резултата инфрацрвене (IR) спектроскопије, магнетних мерења и моларне проводљивости. Стварна структура синтетисаног комплекса бакра(II), предвиђена је на основу резултата рендгенске структурне анализе. Антимикуробна активност је испитивана микродилуционом методом са ресазурином. Супституционе реакције су праћене у присуству гуанозин-5'-монофосфата, као и СТ-ДНК (ДНК из тимуса говечета). Цитотоксична активност новосинтетисаних једињења је испитивана помоћу МТТ колориметријске технике.

Резултати: Потврђена је стварна структура бинуклеарног комплекса бакра(II) са S-изобутенил дериватом тиосалицилне киселине. Међу Грам-позитивним бактеријама, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 је показао највећу отпорност, док је најосетљивији био *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Комплекси бакра(II) показали су ниску антифунгалну активност. Реакције супституције испитиваних комплекса биле су веома брзе, а показано је да могу интераговати са СТ-ДНК. Бакар(II)-комплекси су показали незнатно нижу цитотоксичност у поређењу са *цисплатином*. Њихов цитотоксични ефекат при концентрацијама од 250 до 1000 μM на НСТ-116 ћелије је као ефекат *цисплатине*.

Закључак: Откриће комплекса бакра(II) са антимикуробном и антитуморском активношћу може битно подстаћи даља истраживања у области координовања бакар(II)-јона са лигандима од фармаколошког значаја, који ће имати шири спектар дејства у медицинској примени са прихватљивим крајњим исходом лечења.

Кључне речи: S-алкенил деривати тиосалицилне киселине, бинуклеарни комплекси бакра(II), кристална структура, биолошка активност

Датум прихватања теме од стране ННВ – ДП: 31.05.2017. год.

Датум одбране – ДО:

Чланови комисије – КО:

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

KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

Accession number – ANO:

Identification number – INO:

Documentation type – DT: Monographic publication

Type of record – TR: Textual printed material

Contents code – CC: Ph.D. Thesis

Author – AU: Dušan Lj. Tomović

Menthor/co-mentor – MN: Associate Professor Gordana P. Radić, M.Sc, PhD.

Title – TI: Synthesis, characterization and examination of the biological activity of binuclear complexes of copper(II) with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid

Language of text – LT: Serbian/Cyrillic

Language of abstract: Serbian/English

Country of publication – CP: Republic of Serbia

Locality of publication: Central Serbia, Šumadija

Publication year – PY: 2018.

Publisher – PU: Author reprint

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

Physical description – PD: 8 chapters, 120 pages, 9 schemes, 16 tables, 27 imagines and 240 references

Scientific field – SF: Pharmacy

Scientific discipline – SD: Pharmaceutical chemistry

Subject/key words – SKW: S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid, binuclear copper(II)-complexes, crystal structure, biological activity

UDC

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

Note – N:

Abstract – AB:

Introduction: This PhD thesis covers the examination of the kinetic, antimicrobial and anticancer activities of the newly synthesized binuclear complexes of copper(II) with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. Researches in this area are focused on finding biologically active complex compounds. Thiosalicylic acid and its derivatives are very interesting as ligands because they manifest a great diversity in coordination possibilities.

Materials and methods: This study described the methods for the synthesis of the S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid (alkenyl = propenyl- and isobutenyl-) and the corresponding binuclear complexes of copper(II). The composition of the obtained compounds was confirmed by the results of the elemental microanalysis. The structure of synthesized bidentate ligands was characterized by the results of infrared (IR) and nuclear-magnetic-resonance spectroscopy (^1H and ^{13}C NMR), while the structure of the corresponding complexes was assumed by the results of infrared (IR) spectroscopy, magnetic measurements and molar conductivity. The real structure of the synthesized complex copper(II) was predicted by the results of the X-ray structural analysis. The antimicrobial activity was examined by the microdilution method with resazurin. The substitution reactions were monitored in the presence of guanosine-5'-monophosphate, as well as CT-DNA (calf thymus DNA). The cytotoxic activity of the newly obtained compounds was examined by MTT colorimetric technique.

Results: The real structure of the binuclear complex of copper(II) with S-isobutenyl derivative of thiosalicylic acid was confirmed. Among Gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 manifested the highest resistance, while *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* was the most sensitive one. Copper(II)-complexes manifested a low antifungal activity. Substitution reactions of the tested complexes were very fast, and it was shown that they could interact with CT-DNA. Copper(II)-complexes displayed slightly lower cytotoxicity compared to *cisplatin*. Copper(II)-complexes with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid (for concentrations from 250 to 1000 μM) had cytotoxic effect on HCT-116 cells as *cisplatin*.

Conclusion: The discovery of the copper(II)-complexes with antimicrobial and anticancer activity can significantly stimulate further research in the field of copper(II) coordination with ligands of pharmacological significance, which will have a wider spectrum of effects in medical applications with the acceptable final outcome of a treatment.

Key words: S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid, binuclear copper(II)-complexes, crystal structure, biological activity

Accepted by the Scientific Board on – ASB: 31st May 2017.

Defended on – DE:

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

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

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Душан Љ. Томовић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

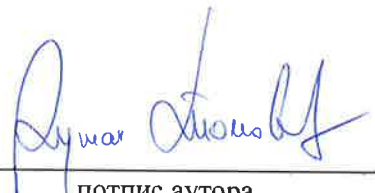
Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности
бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима
тиосалицилне киселине

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

Овом Изјавом такође потврђујем:

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

У Крагујевцу, 3.7.2018. године,


_____ потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Душан Љ. Томовић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности
бинуклеарних комплекса бакра(II) са S-алкенил дериватима
тиосалицилне киселине

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

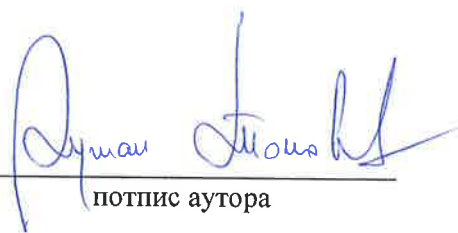
не дозвољавам¹

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

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

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу _____, 3.7.2018. године,


_____ потпис аутора

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

DNA binding, antibacterial and antifungal activities of copper(II) complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid

**Dušan Lj. Tomović, Andriana
M. Bukonjić, Verica V. Jevtić, Zoran
R. Ratković, Jovana V. Bogojeski, Ana
Đeković, Ivana D. Radojević, et al.**

Transition Metal Chemistry

ISSN 0340-4285

Volume 43

Number 2

Transit Met Chem (2018) 43:137-148

DOI 10.1007/s11243-018-0201-0





DNA binding, antibacterial and antifungal activities of copper(II) complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid

Dušan Lj. Tomović¹ · Andriana M. Bukonjić¹ · Verica V. Jevtić² · Zoran R. Ratković² · Jovana V. Bogojeski² · Ana Đeković⁵ · Ivana D. Radojević³ · Ljiljana R. Čomić³ · Slađana B. Novaković⁴ · Goran A. Bogdanović⁴ · Srećko R. Trifunović² · Gordana P. Radić¹ · Snežana Cupara¹

Received: 25 October 2017 / Accepted: 1 January 2018 / Published online: 23 January 2018
© Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018

Abstract

The biological activities of two binuclear copper(II) complexes containing S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid are reported [alkenyl = propenyl (**L1**), isobutenyl (**L2**)]. The structure of the complex with the S-isobutenyl derivative (**C2**) was confirmed by single-crystal X-ray structure analysis, which revealed that the structure consists of centrosymmetric, dinuclear complex molecules $[\text{Cu}_2(\text{S-}i\text{-butenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$ containing two Cu(II) centers bridged by four S-isobutyl-thiosalicylate ligands in a paddle-wheel type structure. The Cu(II) atom is situated in a distorted square-pyramidal environment formed by carboxylate oxygen atoms in the basal plane and a DMSO ligand in the axial position. The reactivities of the complexes toward guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP) were investigated. Complex **C2** ($[\text{Cu}_2(\text{S-}i\text{-butenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$) reacted more rapidly with 5'-GMP than complex **C1**. The interactions of complexes **C1** and **C2** with calf thymus DNA (CT-DNA) were examined by absorption (UV–Vis) and emission spectral studies (ethidium bromide displacement studies), revealing good DNA interaction abilities. The antimicrobial activities of the free ligands and their complexes were tested by microdilution method, and both minimal inhibitory and microbicidal concentrations were determined. All the tested substances demonstrated selective and moderate antibacterial activity on gram-positive bacteria, but low antibacterial activity on gram-negative bacteria. Also, the tested substances demonstrated low antifungal activity.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11243-018-0201-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Gordana P. Radić
vasic_gordana@yahoo.com

✉ Snežana Cupara
snezanacupara@yahoo.com

¹ Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, Kragujevac 34000, Republic of Serbia

² Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34000, Republic of Serbia

³ Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34000, Republic of Serbia

⁴ Laboratory of Theoretical Physics and Condensed Matter Physics, Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, PO Box 522, Belgrade 11001, Republic of Serbia

⁵ State University of Novi Pazar, Vuka Karadžića bb, Novi Pazar 36300, Republic of Serbia

Introduction

Numerous complexes of transition metals are known to be active biological agents, with a wide range of indications for medical applications [1–4]. In particular, complexes of copper(II) can have remarkable potential for the expression of antimicrobial, antiviral, anti-inflammatory and cytotoxic activity [1–3, 5, 6]. Thiosalicylic acid and its derivatives have a variety of applications, from the treatment of inflammatory, allergic and respiratory diseases [7] to potential applications in the prevention of cirrhosis of the liver [8] and in investigation of the contact sensitivity of drugs [9]. Derivatives of thiosalicylic acid can also be coordinated with many transition metal ions [10, 11]. Esters of thiosalicylic acid may also be used as effective ligands for metal complexation [12–14].

Complexes of copper(II) with a five-membered aromatic heterocyclic ligand proved to be capable of bacterial growth inhibition against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [15]. The complexes of modified ligands with different heterocyclic Schiff bases showed a broad spectrum of

antibacterial (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus*) and antifungal (*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Cladosporium*) activities [16, 17]. Also, copper(II) complexes of some antibiotics (such as ofloxacin and norfloxacin) have been obtained, which is a good approach to the development of antibiotics with reduced levels of resistance [18]. A new concept in improving the bactericidal effect of copper(II) complexes involves selection of ligands based on the lipophilicity of the resulting complex. Increasing lipophilicity enhances the penetration of the complex through the bacterial membranes [19]. The antimicrobial activity of dinuclear and mononuclear copper(II) complexes with substituted carboxylate ligands against bacteria, yeasts and molds has been demonstrated [13, 19–29].

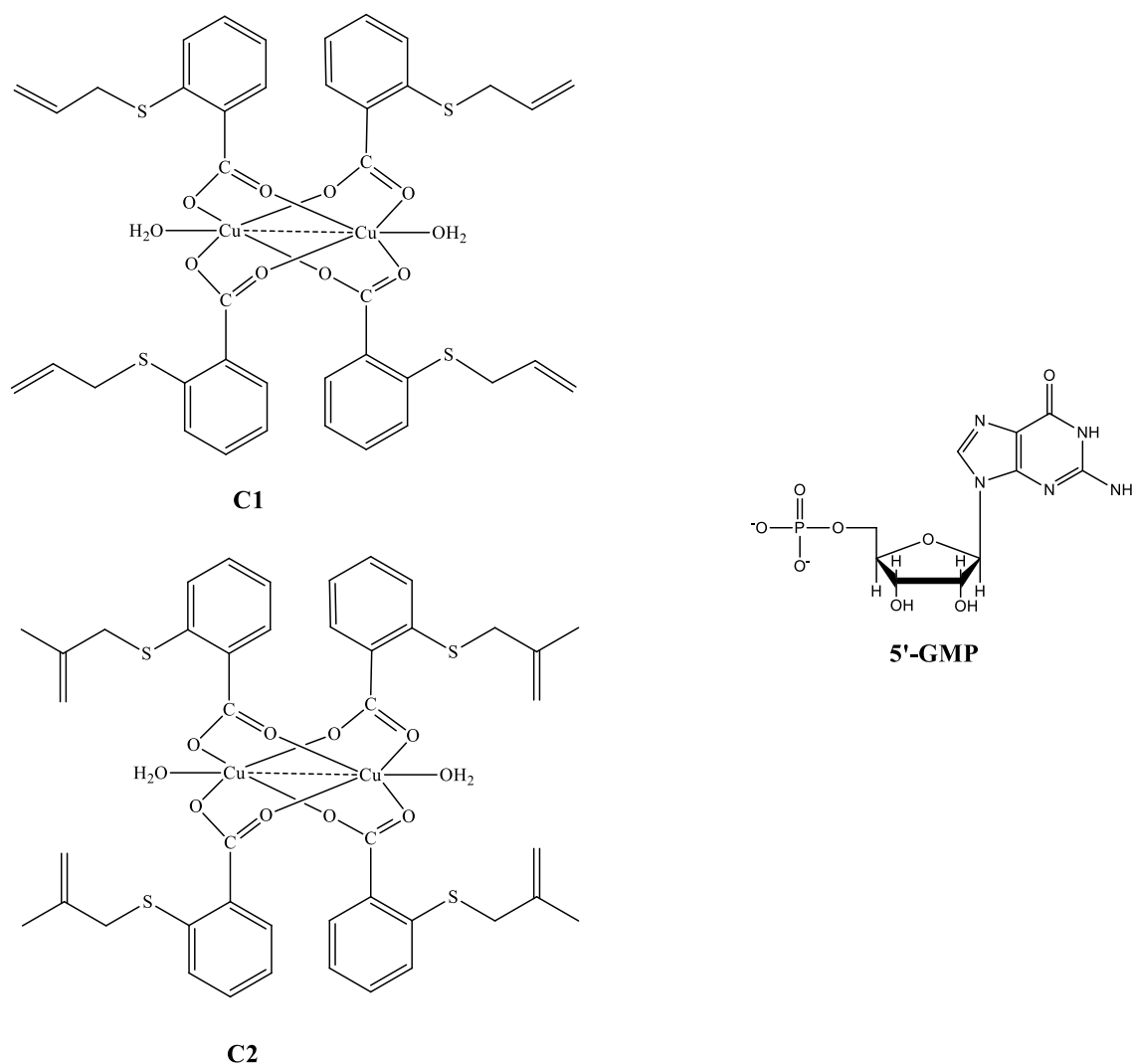
In this paper, we report on the biological activities of previously synthesized S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid

and their corresponding copper(II) complexes [30, 31]. The in vitro antibacterial and antifungal screening of the two proligands, S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid [alkenyl = propenyl (**L1**) and isobutenyl (**L2**)], and their corresponding copper(II) complexes (**C1** and **C2**) is described. We have also investigated the interactions of the complexes with guanosine-5'-monophosphate (Scheme 1) and with CT-DNA. The X-ray crystal structure of complex **C2** is also presented.

Experimental

Materials and measurements

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



Scheme 1 Structures of the Cu(II) complexes and 5'-GMP

a Vario III C, H, N, S Elemental Analyzer in CHS mode. Infrared spectra were recorded on a PerkinElmer FTIR 31725-X spectrophotometer using KBr pellets. Conductivity measurements were made at room temperature on freshly prepared 10^{-3} M DMSO solutions using a coronation digital conductivity meter. Kinetics and mechanism of substitution reactions of the complexes with selected ligands were studied in a stopped-flow spectrophotometer in 25 mM Hepes buffer, pH \approx 7.2 (Acros Organics, Belgium).

Syntheses

The S-alkenyl derivatives of the thiosalicylic acid [alkenyl = propenyl (**L1**), isobutenyl (**L2**)] were prepared [30, 31] by reaction of thiosalicylic acid with the corresponding alkenyl halides in aqueous alkali ethanol solution.

Synthesis of the complexes

Copper(II) nitrate trihydrate (0.1000 g, 0.4139 mmol) was dissolved in water (10.0 mL) on a steam bath, and the required S-alkenyl thiosalicylate [alkenyl = propenyl (**L1**)—0.1607 g, 0.8278 mmol; isobutenyl (**L2**)—0.1724 g, 0.8278 mmol] was added. The mixture was heated for 3 h, during which a solution of LiOH (0.0199 g, 0.8278 mmol) in water (10.0 mL) was added in small portions. The solution was then filtered and evaporated to small volume. The blue precipitate was separated by filtration, washed with cold water and air-dried [30, 31]. In order to obtain single crystals of $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**C2**) suitable for X-ray diffraction, the complex was recrystallized from $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ mixture.

Complex **C1** $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2] = \text{Cu}_2\text{C}_{41}\text{H}_{43}\text{O}_{10}\text{S}_4$ (Mr = 951.126): Calcd.: C, 51.77; H, 4.56; S, 13.49. Found: C, 51.54; H, 4.42; S, 13.29%. $\mu(294 \text{ K}) = 1.84 \mu_{\text{B}}$. Molar conductivity 5.06 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (48s). IR (KBr, cm^{-1}): 3441s, 3076s, 2918m, 1610s, 1549s, 1460m, 1435m, 1400s, 1281w, 1258w, 1229w, 1156w, 1062m, 1044w, 846w, 744m, 695w, 658w, 556w.

Complex **C2** $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2] = \text{Cu}_2\text{C}_{45}\text{H}_{51}\text{O}_{10}\text{S}_4$ (Mr = 1007.232): Calcd.: C, 53.66; H, 5.10; S, 12.73. Found: C, 53.47; H, 5.18; S, 12.64%. $\mu(294 \text{ K}) = 1.86 \mu_{\text{B}}$. Molar conductivity 9.43 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (48s). IR (KBr, cm^{-1}): 3446s, 2969s, 2915m, 1613s, 1589s, 1400s, 1281w, 1257w, 1157w, 1062m, 847w, 744m, 719w, 656w, 510w [31].

Single-crystal X-ray crystallography

Single-crystal diffraction data for complex **C2** were collected at room temperature on an Oxford Diffraction Gemini S diffractometer equipped with a Mo $\text{K}\alpha$ radiation

source and CCD detector. Data reduction and empirical absorption corrections were performed with CrysAlisPro [32]. The structure was solved by direct methods, using SIR2002 [33], and refined using the SHELXL program [34]. The hydrogen atoms attached to C atoms were placed at geometrically idealized positions with C–H distances fixed at 0.93 from Csp^2 and 0.97 and 0.96 Å from methylene and methyl Csp^3 , respectively. The isotropic displacement parameters were set at $1.2U_{\text{eq}}$ and $1.5U_{\text{eq}}$ of the parent C atoms. The DMSO ligand was found to be disordered over two positions, with site occupation factors of 0.80 and 0.20. The treatment of the S atom led to a considerable improvement in the crystal structure model, while the displacement parameters of the disordered C atoms were restrained to isotropic parameters due to instability of the further refinement. All attempts to model the disorder of the S-isobutenyl substituents of the thiosalicylate ligands were unsuccessful. The crystallographic data are listed in Table 1. The PARST [35] and PLATON [36] programs were used to perform geometrical calculations, and the program Mercury [37] was employed for molecular graphics.

Table 1 Crystallographic data for **C2**

Empirical formula	$\text{C}_{48}\text{H}_{56}\text{O}_{10}\text{Cu}_2\text{S}_6$
Formula weight	1112.4
Color, crystal shape	Green, prism
Crystal size (mm)	$0.322 \times 0.270 \times 0.120$
Temperature (K)	293(2)
Wavelength (Å)	0.71,073
Crystal system	Monoclinic
Space group	$P2_1/n$
<i>Unit cell dimensions</i>	
<i>a</i> (Å)	10.8516(4)
<i>b</i> (Å)	10.2909(2)
<i>c</i> (Å)	24.7049(8)
β (°)	100.417(3)
<i>V</i> (Å ³)	2713.4(2)
<i>Z</i>	2
<i>D</i> _{calc} (Mg/m ³)	1.366
μ (mm ⁻¹)	1.066
θ range for data collection (°)	2.59–28.94
Reflections collected	12,000
Independent reflections, <i>R</i> _{int}	6152, 0.0232
Completeness (%) to $\theta = 26^\circ$	99.9
Refinement method	Full-matrix least squares on <i>F</i> ²
Data/parameters	4576/308
Goodness of fit on <i>F</i> ²	1.021
Final <i>R</i> ₁ / <i>wR</i> ₂ indices [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	0.0486/0.1257

Kinetic measurements

The substitution reactions of complexes **C1** and **C2** with the nucleophile 5'-GMP were studied spectrophotometrically. Spectral changes resulting from the mixing of the complex and nucleophile solutions were recorded over the wavelength range from 200 to 400 nm in order to establish a suitable wavelength at which kinetic measurements could be performed.

Substitution reactions were initiated by mixing equal volumes of complex and ligand solutions directly in the stopped-flow instrument and followed for at least eight half-lives. The substitution reaction was monitored by the change in absorbance with time under *pseudo*-first-order conditions. The observed *pseudo*-first-order rate constants, k_{obs} , were calculated as the average values from four to six independent kinetic runs using the program OriginPro 8. Experimental data are presented in Tables S1 and S2.

UV–Vis DNA interactions

A stock solution of CT-DNA was prepared in PBS buffer, giving a ratio of UV absorbances at 260 and 280 nm (A_{260}/A_{280}) of ca. 1.8–1.9, indicating that the DNA was sufficiently free of protein. The concentration was determined from the UV absorbance at 260 nm ($\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [38]. The UV–Vis spectra were obtained on a PerkinElmer Lambda 35 or 25 double-beam spectrophotometer, using 1.0 cm path length quartz cuvettes (3.0 mL). Fluorescence measurements were made on an RF-1501 PC spectrofluorometer (Shimadzu, Japan). The fluorescence spectra were recorded in the range 550–750 nm upon excitation at 527 nm in all cases. The excitation and emission bandwidths were both 10 nm.

UV–Vis absorption studies

In order to quantitatively compare the binding strength of the complexes, the intrinsic binding constants K_b were determined by monitoring the changes in absorption of the MLCT band with increasing concentration of CT-DNA, using Eq. (1).

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

where K_b is given by the ratio of slope to the y intercept in plots of $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}]$ is the concentration of DNA in base pairs, $\epsilon_A = A_{\text{obs}}/[\text{complex}]$, ϵ_f is the extinction coefficient for the unbound complex and ϵ_b is the extinction coefficient for the complex in the fully bound form.

Ethidium bromide displacement studies

The relative binding of the complexes to CT-DNA was determined by calculating the quenching constant (K_{sv}) from the slopes of straight lines obtained from Stern–Volmer Eq. (2).

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

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

Viscosity measurements

The viscosities of DNA solutions were measured in the presence of increasing amounts of complexes **C1** and **C2**. The flow time was measured with a digital stopwatch. Each sample was measured three times, and the average flow time was calculated. The data were analyzed as $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ against r , where η is the viscosity of DNA in the presence of the complex and η_0 is the viscosity of DNA alone in the buffer solution. The viscosities were calculated from the observed flow time of the DNA-containing solutions (t) corrected for the flow time of the buffer alone (t_0), $\eta = (t - t_0)/t_0$.

In vitro antimicrobial assays

The test compounds were dissolved in DMSO and then diluted with nutrient liquid medium to achieve a concentration of 10%. DMSO was purchased from Acros Organics. Resazurin was obtained from Alfa Aesar. Doxycycline (Galenika A.D., Belgrade) was dissolved in Mueller–Hinton broth (Torlak, Belgrade), while antimycotics, fluconazole (Pfizer Inc.) and ketoconazole (Sigma-Aldrich) were dissolved in Sabouraud dextrose broth (Torlak).

The antimicrobial activities were assessed against 18 microorganisms. These included six strains of pathogenic bacteria, including four standard strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 12453 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), plus two clinical isolates (*Bacillus cereus* and *Salmonella enterica*). Three species of probiotic bacteria (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* PMFKGP33, *Lactobacillus plantarum* PMFKG-P31 and *Bacillus subtilis* IP 5832 PMFKG-P32), seven mold species (*Aspergillus niger* ATCC 16404, *Aspergillus flavus* ATCC 9170, *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, *Trichoderma viridae* ATCC 13233, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium italicum* and *Penicillium expansum*) and two yeast species (*Candida albicans* ATCC 10231 and *Saccharomyces boulardii* PMFKGP34) were also tested. The clinical isolates were

a generous gift from the Institute of Public Health, Kragujevac. The other microorganisms were provided from the collection held by the Laboratory of Microbiology Faculty of Science, University of Kragujevac.

The bacterial suspensions were prepared by the direct colony method. The turbidity of the initial suspension was adjusted using a densitometer (DEN-1, BioSan, Latvia). When adjusted to the turbidity of the 0.5 McFarland's standard [39], the bacterial suspensions contained about 10^8 colony-forming units (CFU)/mL and the yeast suspensions contained 10^6 CFU/mL. Tenfold dilutions of the initial suspension were additionally prepared in sterile 0.85% saline. The suspensions of fungal spores were prepared by gentle stripping of spores from slopes with growing aspergilli. The resulting suspensions were diluted 1:1000 in sterile 0.85% saline.

Antimicrobial activities were tested by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) using the microdilution plate method with resazurin [40]. The 96-well plates were prepared by dispensing 100 μ L of nutrient broth, Mueller–Hinton broth for bacteria and Sabouraud dextrose broth for fungi, into each well. A 100- μ L aliquot from the stock solution of the test compound (concentration 2000 μ g/mL) was added into the first row of the plate. Then, twofold serial dilutions were performed with a multichannel pipette. The obtained concentration range was from 1000 to 7.8 μ g/mL. The method has been described in detail in a previous paper [30].

Doxycycline, fluconazole and ketoconazole were used as positive controls. 10% DMSO (as a solvent control test) was found not to inhibit the growth of the microorganisms. Each test included growth and sterility controls.

All the tests were performed in duplicate, and the MICs were constant. Minimum bactericidal and fungicidal concentrations were determined by plating 10 μ L of samples from wells where no indicator color change or no mycelia growth was recorded, onto nutrient agar medium. At the end of the incubation period, the lowest concentration with no growth (no colony) was defined as the minimum microbicidal concentration.

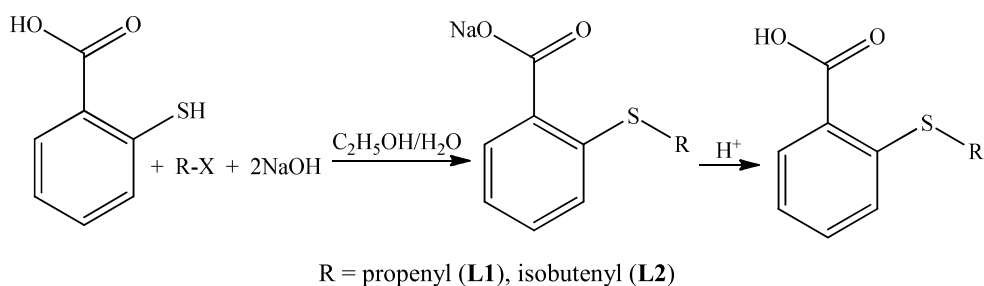
Results and discussion

Synthesis and chemical characterization

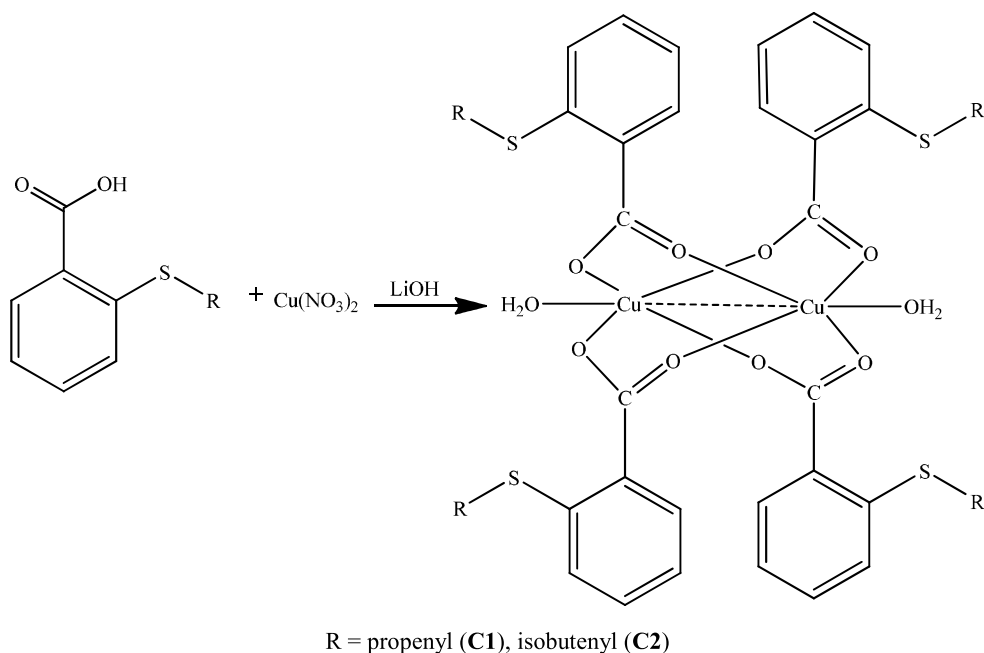
S-alkenyl (R = propenyl (**L1**), isobutenyl (**L2**)) derivatives of thiosalicylic acid were prepared [30, 31] by alkylation of thiosalicylic acid with the corresponding alkenyl halogenides in alkaline water–ethanol solution (Scheme 2). The corresponding complexes were obtained by direct reaction of copper(II) nitrate with the S-alkenyl derivatives (molar ratio 1:2) in aqueous solution with satisfactory yields (more than 80%) (Scheme 3). The structure of complex **C2** was determined by X-ray crystallography. In order to obtain single crystals of $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (**C2**) suitable for X-ray diffraction analysis, the complex was recrystallized from $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ solvent mixture. It can be assumed that S-propenyl complex **C1** has the same overall structure as the S-isobutenyl complex **C2**. The molar conductance values of both complexes in DMSO measured at 10^{-3} M concentration are in the range of 5–10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, indicating that both complexes behave as non-electrolytes.

The X-ray crystal structure of complex **C2** consists of centrosymmetric, dinuclear complex molecules $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$ in which two Cu(II) centers are bridged by four S-isobutenyl-thiosalicylate ligands in a paddle-wheel type structure (Fig. 1). Each Cu(II) center is situated in a distorted square-pyramidal environment formed by carboxylate oxygen atoms in the basal plane and a DMSO ligand in the axial position. Selected geometrical parameters for the crystal structure are given in Table 2. The Cu atom is displaced from the square base toward the axial O atom by 0.205(1) Å. The Cu...Cu distance of 2.6430(7) Å is slightly longer in comparison with the value of 2.614 Å found in dimeric copper(II) acetate [41], but closely comparable to those found in polymorphic $[\text{Cu}_2(\text{S-propyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$, which has values of 2.6407(4) and 2.6398(9) Å in polymorphs I and II, respectively [29].

The coordination bond lengths of the S-isobutenyl-thiosalicylate ligand (Table 2) are within the values



Scheme 2 Synthesis method of S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid



Scheme 3 Synthesis of copper(II)-complex with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid

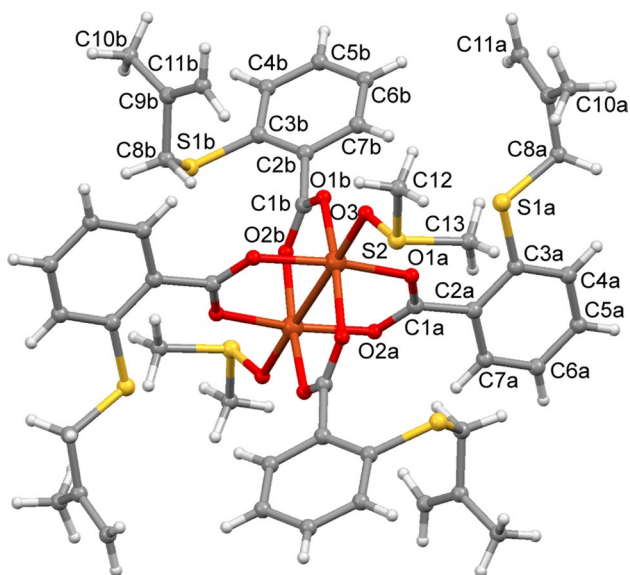


Fig. 1 Crystal structure of $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{DMSO})_2]$ with the atom-labeling scheme. For the sake of clarity, only the major component of the DMSO ligand is presented

reported for other complexes of S-propyl derivatives [1.957(4)–1.982(4) Å], as well as those reported for the equivalent Cu(II) complex with the unsubstituted benzoate ligand (1.948–1.985 Å) [42]. In complex **C2** (Fig. 1), ligands A and B show significant conformational differences. The phenyl rings display different rotation about the formally single C1–C2 bonds; hence, the dihedral

Table 2 Selected bond lengths (Å) and angles (°) of **C2**

Cu1...Cu1 ⁱ	2.6430(7)	O1a–Cu1–O1b	88.4(1)
Cu1–O1a	1.974(2)	O1a–Cu1–O2b ⁱ	89.8(1)
Cu1–O2a	1.968(2)	O1b–Cu1–O2a ⁱ	90.0(1)
Cu1–O1b	1.952(2)	O2a ⁱ –Cu1–O2b ⁱ	89.4(1)
Cu1–O2b	1.967(2)	O1a–Cu1–O3	98.1(1)
Cu1–O3	2.148(2)	O1b–Cu1–O3	98.1(1)
O1a–C1a	1.257(4)	O2a ⁱ –Cu1–O3	93.9(1)
O2a–C1a	1.254(4)	O2b ⁱ –Cu1–O3	93.9(1)
O1b–C1b	1.256(4)	O1a–Cu1–O2a ⁱ	168.1(1)
O2b–C1b	1.256(4)	O1b–Cu1–O2b ⁱ	167.98(9)
C3a–S1a	1.762(3)	C1a–C2a–C3a	127.8(3)
C8a–S1a	1.817(5)	O1a–C1a–O2a	125.7(3)
C3b–S1b	1.761(4)	O1b–C1b–O2b	125.6(3)
C8b–S1b	1.799(7)	Cu1 ⁱ –Cu1–O3	175.17(8)

Symmetry codes: (i) $-x, -y, -z + 1$

angles between the mean planes of phenyl C2/C7 and carboxyl groups are 28.0(3) and 52.1(2)° in ligands A and B, respectively (Fig. S1). The maximal dihedral angle of 57.3° for complexes of this type is observed in the S-propyl derivative [29], while in the complex with benzoate ligands [42] the corresponding dihedral angles range from 7.9° to 22.4°. Another conformational difference between the two different ligands of **C2** concerns the S-isobutenyl substituent, which in ligand A prefers an extended form with a C3a–S1a–C8a–C9a torsion angle of $-174.4(3)^\circ$ (Fig. S1). In ligand B, the larger twisting observed for the

phenyl ring is accompanied by pronounced folding of the S-isobutenyl substituent, resulting in a C3b–S1b–C8b–C9b torsion angle of $-54.3(5)^\circ$. The folding of the S-isobutenyl moiety in ligand B seems to have an important role in arranging the bulky S-isobutenyl substituent next to the S-dimethyl moieties of the axial ligands.

In the crystal packing, weak C–H... π interactions between the neighboring aromatic ligands link the complex molecules into chains extending along the *a* crystallographic axis [C4b–H4b... π^{ii} ; C... Cg1 = 3.742(5); H... Cg1 = 2.89 Å; C–H...Cg1 154°; Cg1: centroid of C2a/C7a ring; (ii) = $-x + 1, -y, -z + 1$], as shown in Fig. 2. Taking into account the major orientation of the axial DMSO ligand, one can observe short and directional C–H...O contacts between the axial ligands [C12a–H12c...O3ⁱⁱⁱ; H...O 2.47 Å, C–H...O 163°; (iii) = $-x, -y - 1, -z + 1$] which link the molecular chains along the *b* crystallographic axis (Fig. S2).

Substitution of the complexes with 5'-GMP

To get an idea of the robustness of these complexes in living tissue, the substitution reactions of **C1** and **C2** with a selected nucleophile 5'-GMP, a fragment of DNA (Scheme 1), were investigated. The change in absorbance was followed at suitable wavelengths, as a function of time at 310 K and pH ≈ 7.2 . The proposed reaction pathways for all observed substitution processes are presented in Scheme 4. The substitution reactions of both complexes proceeded in two successive reaction steps, both of which were dependent on the nucleophile concentration.

The rate constants for substitution could be determined, under *pseudo*-first-order conditions, from a plot of k_{obs} versus the total nucleophile concentration, according to Eqs. (3)

and (4), where Nu = 5'-GMP; the slope of the line represents k_1 or k_2 . Plots of $k_{\text{obs}1,2}$ versus nucleophile concentration showed a linear dependence with no meaningful intercept for all complexes and substitution steps. The results are summarized in Table 3.

$$k_{\text{obs}1} = k_1[\text{Nu}] \quad (3)$$

$$k_{\text{obs}2} = k_2[\text{Nu}] \quad (4)$$

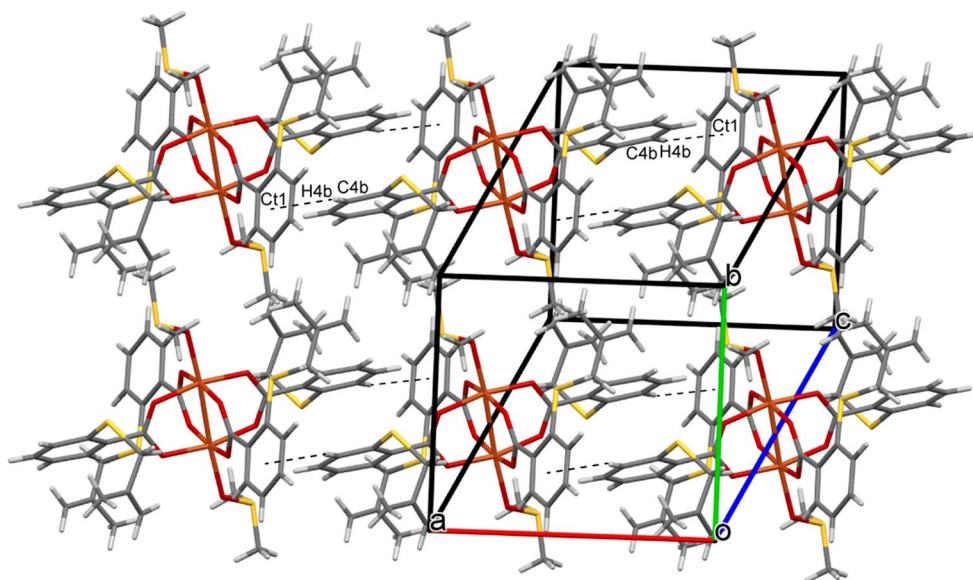
Figure 3 shows the dependence of k_{obs} on nucleophile concentration for complex **C1** (see also Fig. S3).

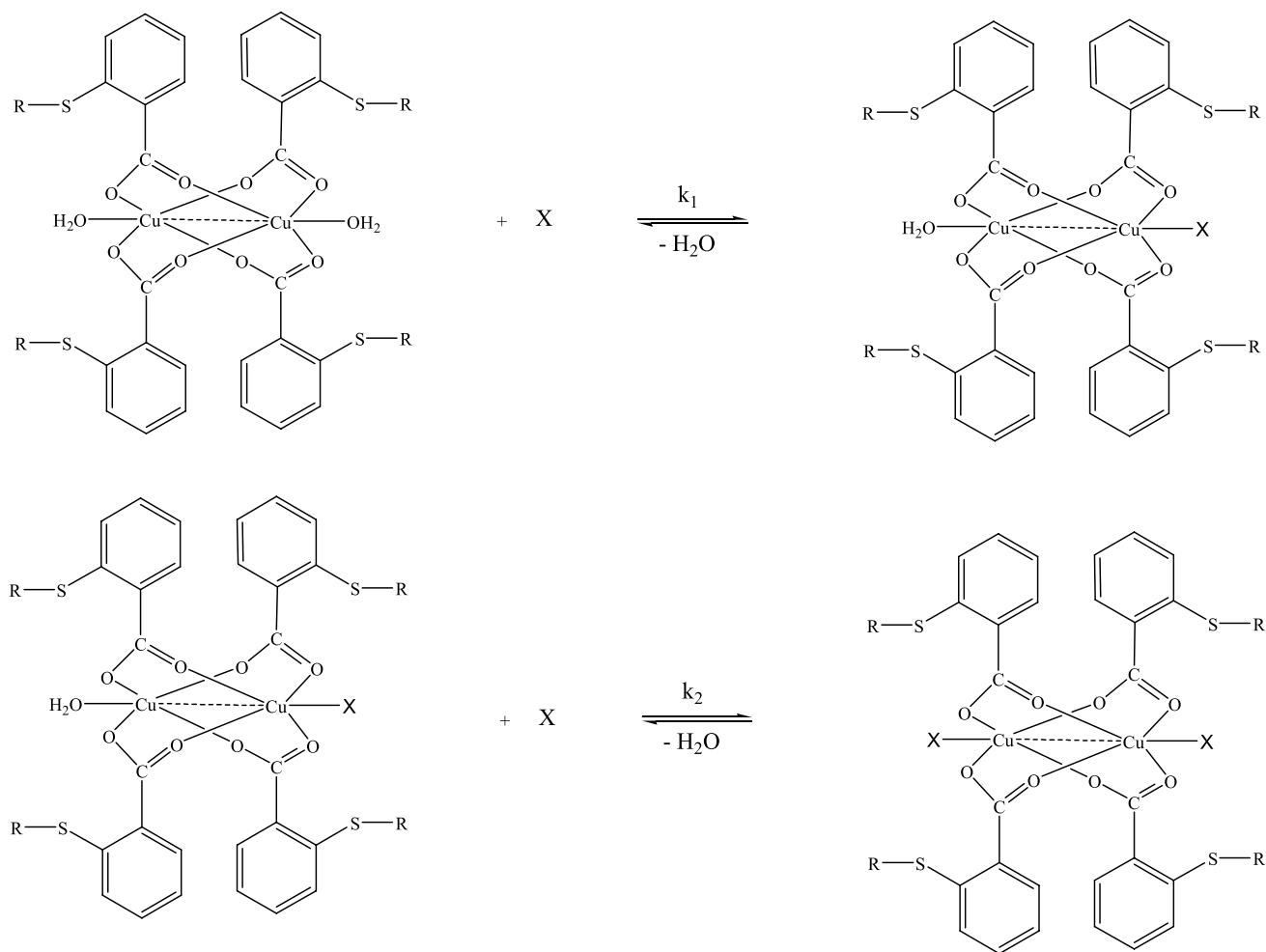
As expected, the substitution reactions of these complexes were very rapid, as shown in Table 3. Complex **C2** is more reactive toward 5'-GMP than complex **C1**. Since these complexes differ only in the S-alkenyl group, the difference can be attributed to the stronger inductive effect of the isobutenyl group compared to the propenyl group. For both complexes, the second substitution step is significantly slower than the first.

Interactions of the complexes with DNA

The interactions of complexes **C1** and **C2** with CT-DNA were investigated by UV–Vis titrations. The intrinsic equilibrium binding constants (K_b) were evaluated. Complex absorption titration studies were carried out at room temperature using a fixed concentration of the complexes (10 μM) in PBS buffer and varying the amount of CT-DNA (0–15 μM) [43, 44]. Addition of CT-DNA to a solution of either complex resulted in a significant hyperchromic effect with the appearance of a new band at 258 nm, but with only insignificant absorption changes in the region of 300–500 nm; see Figs. 4 and S4. These observations suggest a strong interaction between the complexes and CT-DNA

Fig. 2 Crystal packing of complex **C2**. Dashed lines indicate the C–H... π interactions connecting the complex molecules along the *a* axis. For the sake of clarity, only the major component of the DMSO ligand is presented





X = 5'-GMP

R = propenyl-, isobutenyl-

Scheme 4 Substitution reactions of copper(II)-complexes with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid

Table 3 Rate constants for the first and second reaction step of the substitution reactions of the Cu(II)-complexes with 5'-GMP at pH = 7.2 (25 mM Hepes buffer) at 310 K

	5'-GMP	
	First step k_2 [$M^{-1} s^{-1}$]	Second step k_2 [$M^{-1} s^{-1}$]
Complex 1	$(6.7 \pm 0.2) 10^6$	$(5.2 \pm 0.1) 10^5$
Complex 2	$(3.1 \pm 0.1) 10^6$	$(2.3 \pm 0.1) 10^5$

through external contacts, presumably hydrogen bonding and electrostatic interactions [45, 46].

The interactions of complexes **C1** and **C2** with CT-DNA were also investigated by ethidium bromide (EB) displacement studies. EB fluoresces weakly in free solution [45, 46]; however, in the presence of CT-DNA

it strongly emits at ~ 600 nm due to intercalation of EB between DNA base pairs. The addition of either complex **C1** or **C2** to the CT-DNA-EB complex led to significant quenching in fluorescence intensity, due to the displacement of EB. The quenching parameters for the complexes **C1** and **C2** were calculated using the Stern–Volmer equation. Quantitative EB displacement studies were performed by changing the concentrations of the complex and monitoring the emission intensity of the EB-DNA [43, 44]. Increasing concentration of **C1** or **C2** (0–30 μM) resulted in a significant decrease in fluorescence intensity, with a noticeable redshift. Hence, both complexes **C1** and **C2** are capable of displacing EB from the EB-DNA complex and can therefore strongly interact with DNA binding sites (Fig. 5) [47–49].

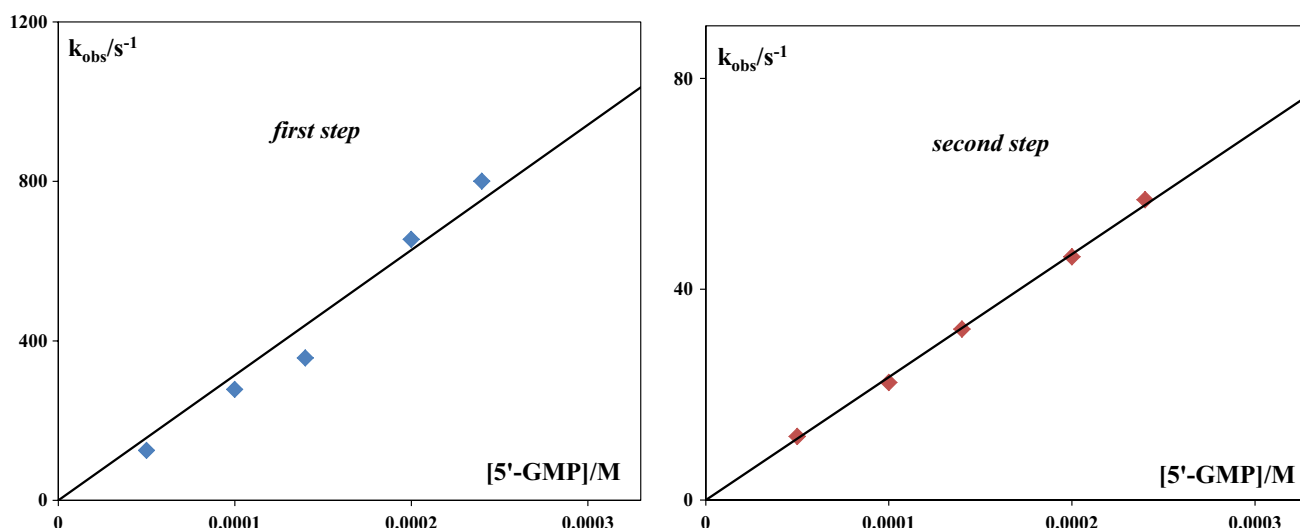


Fig. 3 Pseudo-first-order rate constants plotted as a function of nucleophile concentration for the first and second steps of the substitution reactions of complex **C1** with 5'-GMP at pH = 7.2 and 310 K in 25 mM Hepes buffer

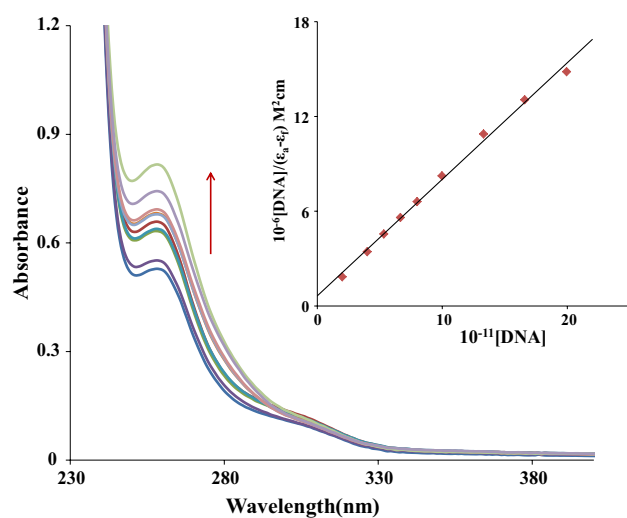


Fig. 4 UV-Vis titration spectra of complex **C1** (10 μM) in PBS buffer (phosphate buffer solution = 0.01 M, $C_{\text{NaCl}} = 0.137$, $C_{\text{KCl}} = 0.0027$ M, pH 7.4) with increasing concentration of CT-DNA (0–15 μM). Arrow shows hyperchromism in the spectral band. Inset: plot of $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F)$ versus $[\text{DNA}]$

According to the constants presented in Table 4, these complexes interact strongly with CT-DNA, in good agreement with the UV-Vis spectroscopic studies.

In order to further characterize the binding of these complexes to DNA, viscosity measurements of DNA solutions were performed in the presence and absence of the complexes. The viscosity of DNA is sensitive to changes in length, and in the absence of X-ray crystal structure data, this is regarded as the most critical evidence in identifying the DNA binding mode in solution [50, 51]. The addition

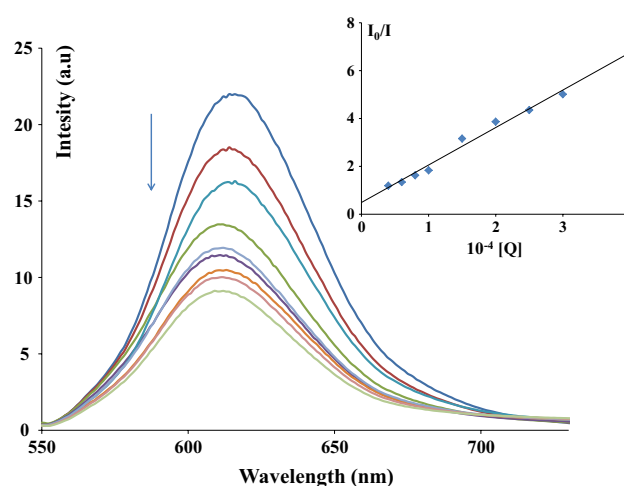


Fig. 5 Fluorescence titration spectra of EB (10 μM) bound to DNA (10 μM) in the presence of varying amounts of complex **C1**. [Arrow shows changes in fluorescence intensity upon increasing concentration of **C1** (4–30 μM)]. Inset: Stern-Volmer plots for EB-DNA fluorescence titration with **C1**

Table 4 Obtained constants for interaction between complexes **C1** and **C2** with CT-DNA

	CT-DNA	
	K_b [M^{-1}]	K_{sv} [M^{-1}]
Complex 1	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^6$	$(1.7 \pm 0.1) \times 10^5$
Complex 2	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^6$	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^5$

of increasing amounts (up to $r = 1.0$) of complexes **C1** and **C2** to a DNA solution (0.01 mM) resulted in an increase in the relative viscosity of DNA (Fig. S5), which was more pronounced upon the addition of complex **C1**. In the case of classic intercalation, the DNA base pairs are separated to host the bound compound, resulting in an increase in DNA viscosity, the magnitude of which is usually proportional to the strength of the interaction. Hence, the observed viscosity increase for these complexes is another indication of an intercalative interaction with DNA.

Microbiological studies

The results of in vitro testing of antimicrobial activities for both the free ligands and their copper(II) complexes are shown in Table 5. MIC and MMC values, along with those for doxycycline, fluconazole and ketoconazole, are listed in Table 6. All of the test compounds showed moderate and selective antimicrobial activities. MIC and MMC values for the complexes were in range 31.25 to > 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The best results were however still lower than the positive control values.

In general, the activities of the complexes were higher than, or similar to the corresponding free ligands. The exception, where the free ligands gave higher activities, are bacteria *Bacillus cereus* (for **L1** and **L2**) and *Salmonella enterica* (for **L2**). Gram-positive bacteria demonstrated slightly

higher sensitivities than the gram-negative strains. Among gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 demonstrated the highest resistance (MICs/MMCs are 1000/> 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The probiotic bacteria showed the highest sensitivities. The most sensitive was *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, with an MIC value of 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for complex **C1**. Overall the copper(II) complexes showed low antifungal activities. The test compounds showed little or no effect on the growth of yeasts and other fungi, with MIC and MMC values which were from 250 to > 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

In previous work, the Cu(II) complexes of some other S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid (alkyl = benzyl; methyl; ethyl; propyl; butyl) were tested against gram-positive and gram-negative bacteria as well as fungi [13, 29]. In general, the activities of the complexes were higher or similar than those of the corresponding free ligands. All the tested complexes demonstrated moderate or selective antibacterial activity and low antifungal activity, which is in accordance with the present results.

Previous research into the antimicrobial activities of dinuclear and mononuclear copper(II) complexes of carboxylate ligands has provided diverse conclusions. Some binuclear Cu(II) carboxylate complexes show no antibacterial activity [20]. The lack of specificity suggests that the sensitivity of various microorganisms to the complexes is not related to the different cell wall structures [20]. There

Table 5 In vitro antimicrobial activity of the ligands **L1** and **L2** and the copper(II)-complexes **C1** and **C2** with positive controls

Species	ML06—L1		MN06—C1		ML07—L2		MN07—C2	
	MIC ^a	MMC ^b	MIC	MMC	MIC	MMC	MIC	MMC
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	250	500	31.25	500	1000	1000	500	500
<i>Lactobacillus plantarum</i>	500	1000	500	500	1000	1000	500	500
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	500	1000	500	1000	500	1000	500	500
<i>Bacillus cereus</i>	62.5	250	1000	1000	62.5	250	1000	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1000	> 1000	1000	1000	> 1000	> 1000	1000	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	> 1000	> 1000	1000	> 1000	> 1000	> 1000	500	500
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1000	> 1000	1000	> 1000	1000	> 1000	1000	> 1000
<i>Salmonella enterica</i>	500	1000	1000	1000	250	1000	1000	> 1000
<i>Saccharomyces boulardii</i>	500	1000	500	1000	1000	> 1000	500	1000
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1000	> 1000	1000	1000	1000	> 1000	500	500
<i>Penicillium chrysogenum</i>	250	1000	500	> 1000	500	> 1000	250	1000
<i>Penicillium italicum</i>	1000	1000	250	> 1000	500	> 1000	250	> 1000
<i>Penicillium expansum</i>	1000	1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233	1000	1000	1000	1000	1000	1000	500	1000
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170	1000	1000	500	1000	1000	1000	500	1000
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	> 1000	> 1000	500	1000	> 1000	> 1000	500	1000

^aMIC values ($\mu\text{g}/\text{mL}$)—inhibitory activity

^bMMC values ($\mu\text{g}/\text{mL}$)—microbicidal activity; “/” —not tested

Table 6 In vitro antimicrobial activity of the positive controls (doxycycline for bacteria; fluconazole and ketoconazole for fungi)

Species	Doxycycline		Fluconazole		Ketoconazole	
	MIC ^a	MMC ^b	MIC	MMC	MIC	MMC
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	31.25	62.50	/	/	/	/
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.45	7.81	/	/	/	/
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	1.95	15.63	/	/	/	/
<i>Bacillus cereus</i>	0.98	7.81	/	/	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.22	3.75	/	/	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	62.5	125	/	/	/	/
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	15.63	62.5	/	/	/	/
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15.63	31.25	/	/	/	/
<i>Salmonella enterica</i>	15.63	31.25	/	/	/	/
<i>Saccharomyces boulardii</i>	/	/	31.25	1000	/	/
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	/	/	31.25	1000	31.25	/
<i>Penicillium chrysogenum</i>	/	/	62.5	500	62.5	/
<i>Penicillium italicum</i>	/	/	1000	1000	125	/
<i>Penicillium expansum</i>	/	/	/	/	62.5	/
<i>Trichoderma viridae</i> ATCC 13233	/	/	/	/	62.5	/
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 9170	/	/	62.50	125	125	/
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	/	/	/	/	125	/
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	/	/	62.5	62.5	62.5	/

^aMIC values (μg/mL)—inhibitory activity^bMMC values (μg/mL)—microbicidal activity; “/”—not tested

are studies that show good antimicrobial activities of Cu(II) complexes, including activities better than standard drugs [19, 25–27]. Others Cu(II) carboxylate complexes exhibit moderate antibacterial activity [21–28], which is in accordance with our previous [13] and current research. In most studies, as in the present case, weak antifungal activity is observed [22, 23, 25].

Conclusion

In the crystal structure of the dinuclear complex [Cu₂(S-isobutenyl-thiosal)₄(DMSO)₂], the two Cu(II) centers are bridged by four S-isobutenyl-thiosalicylate ligands in a paddle-wheel type structure. The metal atoms are situated in a distorted square-pyramidal environment, provided by oxygen atoms of carboxylate ligands in the basal plane, and a DMSO ligand in the axial position. The order of reactivity of the studied complexes toward 5'-GMP showed that the S-isobutenyl derivative reacted more rapidly than the S-isobutenyl derivative as free ligand. Both of these complexes exhibited strong interactions with DNA. Both the free ligands and their copper(II) complexes demonstrated selective and moderate antibacterial activities against gram-positive bacteria and low antibacterial

activities against gram-negative bacteria. Also, the tested substances showed low antifungal activities.

Supplementary data

CCDC 1535567 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html> or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223 336 033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

Acknowledgements This work was financially supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Projects 172016, 173032, 172034, 172035, 172011).

References

1. Tisato F, Marzano C, Porchia M, Pellei M, Santini C (2010) *Med Res Rev* 30:708–749
2. Marzano C, Pellei M, Tisato F, Santini C (2009) *Anticancer Agents Med Chem* 9:185–211
3. Prudhomme M (2013) *Advances in anticancer agents in medicinal chemistry*. Bentham Science Publishers, Clermont-Ferrand

4. Gielen M, Tiekink ER (2005) *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine*. Wiley, Chichester
5. Goodman VL, Brewer GJ, Merajver SD (2004) *Endocr Relat Cancer* 11:255–263
6. Iakovidis I, Delimaris I, Piperakis SM (2011) *Mol Biol Int* 2011:1–13
7. H. Jacobelli, US Patent 20050267095
8. Reif S, Weis B, Aeed H et al (1999) *J Hepatol* 31:1053–1061
9. Serrano G, Bonillo J, Aliaga A et al (1990) *J Am Acad Dermatol* 23:479–483
10. Ferrer EG, Williams PA (1997) *Polyhedron* 16:3323–3325
11. Wehr-Candler T, Henderson W (2016) *Coord Chem Rev* 313:111–155
12. Gilbert JG, Addison AW, Nazarenko AY, Butcher RJ (2001) *Inorg Chim Acta* 324:123–130
13. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV et al (2014) *Polyhedron* 79:80–87
14. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV et al (2016) *J Mol Struct* 1116:264–271
15. Chohan ZH, Shad HA, Youssoufi MH, Hadda TB (2010) *Eur J Med Chem* 45:2893–2901
16. Patil SA, Naik VH, Kulkarni AD, Badami PS (2010) *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 75:347–354
17. Shebl M, Khalil SM, Ahmed SA, Medien HA (2010) *J Mol Struct* 980:39
18. Katsarou ME, Efthimiadou EK, Psomas G, Karaliota A, Vourloumis D (2008) *J Med Chem* 51:470–478
19. Siddiqi ZA, Khalid M, Kumar S, Shahid M, Noor S (2010) *Eur J Med Chem* 45:264–269
20. Betanzos-Lara S, Gracia-Mora I, Granada-Macyas P, Flores-Alamo M, Barba-Behrens N (2013) *Inorg Chim Acta* 397:94–100
21. Abou-Hussein AA, Linert W (2012) *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 95:596–609
22. Amer S, El-Wakiel N, El-Ghamry H (2013) *J Mol Struct* 1049:326–335
23. Creaven BS, Egan DA, Karcz D (2007) *J Inorg Biochem* 101:1108–1119
24. Efthimiadou EK, Katsarou ME, Karaliota A, Psomas G (2008) *J Inorg Biochem* 102:910–920
25. El-Gamel NE, Zayed MA (2011) *Spectrochim Acta Part A* 82:414–423
26. Geeta B, Shrivankumar K, Muralidhar Reddy P (2010) *Spectrochim Acta Part A* 77:911–915
27. Siddiqi ZA, Sharma PK, Shahid M, Khalid M, Siddique A, Kumar S (2012) *Eur J Med Chem* 57:102–111
28. Chalkidou E, Perdih F, Turer I, Kessissoglou PD, Psomas G (2012) *J Inorg Biochem* 113:55–65
29. Bukonjić AM, Tomović DL, Nikolić MV et al (2017) *J Mol Struct* 1128:330–337
30. Radić GP, Glođović VV, Radojević ID et al (2012) *Polyhedron* 31:69–76
31. Tomović DL, Bukonjić AM, Kočović A et al (2017) *Serb J Exp Clin Res.* 18:13–18
32. Agilent, CrysAlis PRO (2014) PRO. England, Agilent Technologies, Yarnton, Oxfordshire
33. Burla MC, Camalli M, Carrozzini B et al (2003) *J Appl Crystallogr* 36:1103
34. Sheldrick GM (2008) *Acta Crystallogr A* 64:112–122
35. Nardelli M (1995) *J Appl Crystallogr* 28:659
36. Spek AL (2003) *J Appl Crystallogr* 36:7–13
37. Macrae CF, Edgington PR, McCabe P et al (2006) *J Appl Crystallogr* 39:453–457
38. Meadows KA, Liu F, Sou J, Hudson BP, McMillin DR (1993) *Inorg Chem* 32:2919–2923
39. Andrews JM (2005) *J Antimicrob Chemoth* 56:60–76
40. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y (2007) *Methods* 42:321–324
41. Van Niekerk JN, Schoening FR (1953) *Acta Crystallogr* 6:227–232
42. Reyes-Ortega Y, Alcantara-Flores JL, Hernandez-Galindo MC (2005) *J Am Chem Soc* 127:16312–16317
43. Long EC, Barton JK (1990) *Acc Chem Res* 23:271–273
44. Pasternack RF, Gibbs EJ, Villafranca JJ (1983) *J Biochem* 22:251
45. Koumoussi ES, Zampakou M, Raptopoulou CP et al (2012) *Inorg Chem* 51:7699–7710
46. Rizvi MA, Zaki M, Afzal M et al (2015) *Eur J Med Chem* 90:876–888
47. Meyer-Almes FJ, Porschke D (1993) *Biochemistry* 32:4246–4253
48. Liu ZC, Wang BD, Yang ZY, Li Y, Qin DD, Li TR (2009) *Eur J Med Chem* 44:4477–4484
49. Howe GM, Wu KC, Bauer WR (1976) *Biochemistry* 19:4339–4346
50. Li DD, Tian JL, Gu W, Liu X, Yan SP (2010) *J Inorg Biochem* 104:171–179
51. Jiang M, Li Y, Wu Z, Liu Z, Yan C (2009) *J Inorg Biochem* 103:833–844

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, AND CYTOTOXICITY OF BINUCLEAR COPPER(II)-COMPLEXES WITH SOME S-ALKENYL DERIVATIVES OF THIOSALICYLIC ACID

Dusan Lj. Tomovic¹, Andriana M. Bukonjic¹, Aleksandar Kocovic¹, Milos V. Nikolic¹, Marina Z. Mijajlovic¹, Verica V. Jevtic², Zoran R. Ratkovic², Aleksandar N. Arsenijevic¹, Jelena Z. Milovanovic¹, Bojana Stojanovic¹, Srecko R. Trifunovic², Gordana P. Radic¹

¹Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac,

²Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac

³Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

SINTEZA, KARAKTERIZACIJA I CITOTOKSIČNOST BINUKLEARNIH BAKAR(II)-KOMPLEKSA SA NEKIM S-ALKENIL DERIVATIMA TIOSALICILNE KISELINE

Dušan Lj. Tomović¹, Andriana M. Bukonjić¹, Aleksandar Kočović¹, Miloš V. Nikolić¹, Marina Ž. Mijajlović¹, Verica V. Jevtić², Zoran R. Ratković², Aleksandar N. Arsenijević¹, Jelena Z. Milovanović¹, Bojana Stojanović¹, Srećko R. Trifunović², Gordana P. Radić¹

¹Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

²Institut za hemiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu

³Centar za molekulske medicine i istraživanje matičnih ćelija, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

Received / Priljen: 12. 07. 2016.

Accepted / Prihvaćen: 25. 07. 2016.

ABSTRACT

New complexes of copper(II) with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid (alkenyl = propenyl-(L1), isobutenyl-(L2)) have been synthesized and characterized by microanalysis, infrared spectra, magnetic measurements, and by NMR spectra. The cytotoxic activity of two newly synthesized precursor S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid were tested using an MTT colorimetric technique on HCT-116 human colon carcinoma cells. The cytotoxic effect of the copper(II)-complexes were higher compared to the cytotoxicity of the corresponding ligand (for concentrations from 31.25 to 250 μ M). Copper(II)-complexes showed a slightly lower cytotoxicity compared to cisplatin. Complexes of copper(II) with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid (at concentrations from 250 to 1000 μ M) had a cytotoxic effect on HCT-116 cells compared to cisplatin.

Keywords: S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid, copper(II)-complexes, IR and NMR spectroscopy, cytotoxic activity

SAŽETAK

Novi bakar(II)-kompleksi sa nekim S-alkenil derivatima tiosalicilne kiseline (alkenil = propenil-(L1), izobutenil-(L2)) su sintetisani i okarakterisani na osnovu rezultata mikroanalize, infracrvenih spektara i magnetnih merenja, dok su odgovarajući S-alkenil derivati okarakterisani i na osnovu NMR spektara. Citotoksična aktivnost dva novosintetisana liganda S-alkenil derivata tiosalicilne kiseline je ispitivana pomoću MTT kolorimetrijske tehnike na humanim ćelijama karcinoma debelog creva, HCT-116. Citotoksični efekat bakar(II)-kompleksa je bio veći u poređenju sa citotoksičnošću odgovarajućih liganada (u koncentracijama od 31,25 do 250 μ M). Bakar(II)-kompleksi su pokazali neznatno nižu citotoksičnost u poređenju sa cisplatinom. Bakar(II)-kompleksi sa S-alkenil derivatima tiosalicilne kiseline (u koncentracijama od 250 do 1000 μ M) imali su citotoksični efekat na HCT-116 ćelijama kao cisplatin.

Ključne reči: S-alkenil derivati tiosalicilne kiseline, bakar(II)-kompleksi, IR i NMR spektroskopija, citotoksična aktivnost



ABBREVIATIONS

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

IR - infrared

NMR - nuclear magnetic resonance

Cu - copper

Zn - zinc

VD - Wilson's disease

MD - Menkes disease

ROS - reactive oxygen species

Cu(NO₃)₂ - copper(II)-nitrate trihydrate

LiOH - lithium hydroxide

DMSO - dimethyl sulfoxide

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS - fetal bovine serum

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid

PBS - phosphatebuffered saline

BM - bending magnet



INTRODUCTION

After successful application of “cisplatin” (*cis*-diamminedichloroplatinum(II)) to chemotherapy in cancer patients, the exploration of other metal-complexes as new anticancer agents has continued, to enhance their specificity towards cancer cells, reduce toxic side effects, and prevent the development of resistance in human cancer cells (1-5).

Copper is an essential element for all organisms who live in environments rich in oxygen. This redox active metal converts oxidation state easily from a Cu(I) to Cu(II), and vice versa, as in chemical reactions and in physiological conditions (6). Copper is essential for the function of several enzymes and proteins, such as cytochrome oxidase, Zn, Cu-superoxide dismutase, lysyl oxidase, tyrosinase, and dopamine-b-monoxygenase (1, 6, 7).

The importance of copper is also reflected in the fact that its deficiency leads to congenital genetic diseases, such as Wilson’s disease (VD) and Menkes disease (MD) (8). Copper chelation therapy has attracted considerable attention for use in research and treatment of various neurodegenerative disorders (9).

The presence of proteins found in copper has been associated to metabolic changes in cancer cells. The exact role of copper in the treatment of cancer has not been sufficiently clarified (6, 10). It is assumed that copper is involved in the generation of ROS (reactive oxygen species) and the process of angiogenesis by stimulating the proliferation and migration of human endothelial cells (10-12).

Thiosalicylic acid and its derivatives have a wide range of applications. It has been used for the determination of metals (13, 14); as modifiers of graphite paste electrodes (15); as photoinitiators of free radical polymerization (16); in cosmetics (17); in the treatment of dermatological (18), inflammatory, allergic, and respiratory diseases (19); and as Ras-tumour growth inhibitors (20).

Copper(II)-complexes may exert cytotoxic activity on colon carcinoma cell lines. O’Halloran found that a copper complex $[Cu[N\text{-salicylidene-(glutamate)}(H_2O)_2] \cdot H_2O]$ at concentrations of 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ was shown to have distinct cytotoxic activity in human HT-29 colon cancer cells after 72 hours. Apoptosis was activated by the generation of large quantities of free radicals (21).

Various studies have confirmed the synthesis and structural characterization of different complexes of copper(II) with thiosalicylic acid as a ligand (22, 23). Complexes of copper(II) with the S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid showed moderate antimicrobial activity and low antifungal activity (24). With consideration for these effects, new research examining the cytotoxic potential of copper(II) with S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid has found that these derivatives exhibit a lower cytotoxicity compared to cisplatin in the human HCT-116 cell line and in murine cell lines CT26 and CT26.CL25 (25).

The first aim of our study was to synthesize two new ligands acting as S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid (alkenyl = propenyl-(L1), isobutenyl-(L2)), and two corresponding copper(II)-complexes with these ligands. The composition and structure of S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid was assumed on the basis of microanalysis, IR, and NMR spectroscopy. The composition and structure of synthesized complexes was confirmed based on the microanalysis, IR spectroscopy, and magnetic measurements. Another aim of our study was to investigate the cytotoxic potential of copper(II)-complexes with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid on the human colon cancer cell line HCT-116.

MATERIALS AND METHODS

Materials and measurements

The reagents were obtained commercially and used without further purification. Elemental analyses were conducted on a Vario III CHNOS Elemental Analyser, Elemental Analysensysteme GmbH. For infrared spectra, a Perkin-Elmer FTIR 31725-X spectrophotometer, and KBr pellet technique were employed.

Syntheses

General procedure for the synthesis of S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid

The S-alkenyl derivatives of the thiosalicylic acid ligand (alkenyl = propenyl-(L1), isobutenyl-(L2)) were prepared (26) by alkylation of thiosalicylic acid using the corresponding alkenyl halides in alkaline water-ethanol solution.

S-propenyl derivative of thiosalicylic acid (S-propenyl-thiosal), (L1): M.p. 180-181°C, white powder, IR (KBr, cm^{-1}): 3446, 3075, 2917, 2654, 2557, 1680, 1586, 1562, 1465, 1415, 1314, 1273, 1256, 1153, 1061, 1045, 889, 741, 701, 651, and 551. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 3.21 (d, 2H, CH_2), 5.92 (m, 1H, CH), 4.93 (m, 2H, CH_2) and 7.47-7.91 (m, 4H, Ar). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 38.2 (CH_3), 115.9 (CH_2), 136.5 (CH), 125.3; 125.6; 130.2; 131.7; 133.8; 140.1 (Ar), and 172.0 (COOH).

S-isobutenyl derivative of thiosalicylic acid (S-isobutenyl-thiosal), (L2): M.p. 182-183°C, white powder, IR (KBr, cm^{-1}): 3445, 3076, 2967, 2647, 2556, 1676, 1585, 1562, 1463, 1412, 1317, 1272, 1253, 1154, 1061, 1046, 810, 743, 651, and 550. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1.82 (s, 3H, CH_3), 4.98 (m, 2H, CH_2), 3.44(t, 2H, CH_2), and 7.42-8.30 (m, 4H, Ar). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 22.5 (CH_3), 46.1 (CH_2), 112.1 (CH_2), 125; 126.5; 126.7; 133.2; 134.1; 142.6 (Ar), and 168.1 (COOH).

Preparation of copper(II)-complex with S-propenyl derivative of thiosalicylic acid $[Cu_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1)

Copper(II)-nitrate trihydrate (0.1000 g, 0.4139 mmol) was dissolved in 10.0 mL of water on a steam bath, and S-propenyl derivative of thiosalicylate (0.1607 g, 0.8278



mmol) was subsequently added. The reaction mixture was heated for 3 h, and during this period 10.0 ml of LiOH water solution (0.0199 g, 0.8278 mmol) was added in small portions. The solution was filtered and evaporated to a small volume. The blue precipitate of copper(II)-complex was separated by filtration, washed with cold water, and air-dried. Yield: 0.1604 g (81.5%). Anal. Calc. for $[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2] = \text{Cu}_2\text{C}_{41}\text{H}_{43}\text{O}_{10}\text{S}_4$ (Mr = 951.126): C, 51.77; H, 4.56; and S, 13.49. Found: C, 51.54; H, 4.42; and S, 13.29. $\mu(294\text{ K}) = 1.84\ \mu_{\text{B}}$.

IR (KBr, cm^{-1}): 3441, 3076, 2918, 1610, 1549, 1460, 1435, 1400, 1281, 1258, 1229, 1156, 1062, 1044, 846, 744, 695, 658, and 556.

Preparation of copper(II)-complex with S-isobutenyl derivative of thiosalicylic acid $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2)

Copper(II)-nitrate trihydrate (0.1000 g, 0.4139 mmol) was dissolved in 10.0 mL of water on a steam bath, and S-isobutenyl derivative of thiosalicylate (0.1723 g, 0.8278 mmol) was subsequently added. The reaction mixture was heated for 3 h, and during this period 10.0 mL of LiOH water solution (0.0199 g, 0.8278 mmol) was added in small portions. The solution was filtered and evaporated to a small volume. The blue precipitate of copper(II)-complex was separated by filtration, washed with cold water, and air-dried. Yield: 0.2228 g (82.1%). Anal. Calc. for $[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2] = \text{Cu}_2\text{C}_{45}\text{H}_{51}\text{O}_{10}\text{S}_4$ (Mr = 1007.232): C, 53.66; H, 5.10; and S, 12.73. Found: C, 53.47; H, 5.18; and S, 12.64. $\mu(294\text{ K}) = 1.86\ \mu_{\text{B}}$.

IR (KBr, cm^{-1}): 3446, 2969, 2915, 1613, 1589, 1400, 1281, 1257, 1157, 1062, 847, 744, 719, 656, and 510.

Preparation of drug solutions

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

Cell culture

HCT-116 cells were kindly provided by Dr Danijela Vignjević (Institute Curie, Paris, France). Cells were main-

tained in DMEM (Sigma Aldrich, Munich, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma Aldrich, Munich, Germany), penicillin (100 IU/mL), and streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$) in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 at 37°C. Subconfluent monolayers in the logarithmic growth phase were harvested by a brief treatment with 0.25% trypsin and 0.02% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS, PAA Laboratories GmbH) and washed three times in serum-free PBS. The number of viable cells was determined by trypan blue exclusion.

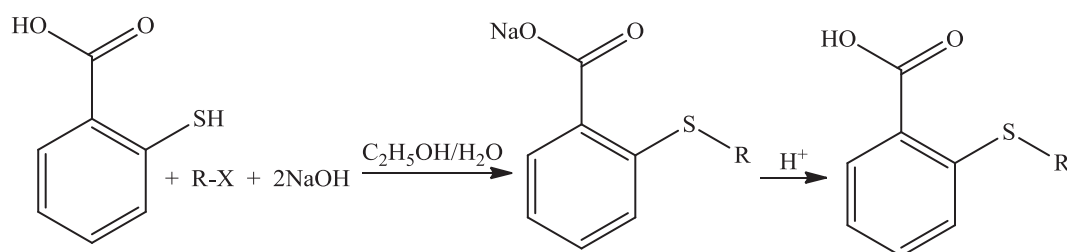
Cytotoxicity assays

The effects of the tested compounds on cell viability were determined using the MTT colorimetric technique (27). HCT-116 cells were diluted with growth medium to $5 \cdot 10^4$ cells/mL, and aliquots ($5 \cdot 10^3$ cells/100 mL) were placed in individual wells in 96-well plates. The next day the medium was exchanged with 100 μL of different compounds, which had been serially diluted 2-fold in the medium to concentrations ranging from 1000 μM to 7.8 μM in growth medium. Each compound was tested in triplicate. Cells were incubated at 37°C in 5% CO_2 for 72 h. After incubation the supernatant was removed, and 15% MTT solution (5 mg/mL in PBS, 10 μL) in DMEM without FBS was added to each well. After an additional 4 h of incubation at 37°C in 5% CO_2 , the medium with MTT was removed and DMSO (150 μL) with glycine buffer (20 μL) was added to dissolve the crystals. The plates were shaken for 10 min. The optical density of each well was determined at 595 nm using microplate Zenyth 3100 Multimode detector. The percentage of cytotoxicity was calculated using the formula: % cytotoxicity = $100 - ((E-B)/(S-B) \cdot 100)$, where B is the background of medium alone, S is total viability/spontaneous death of untreated target cells, and E is experimental well. Each of the tested complexes was evaluated for cytotoxicity in three separate experiments.

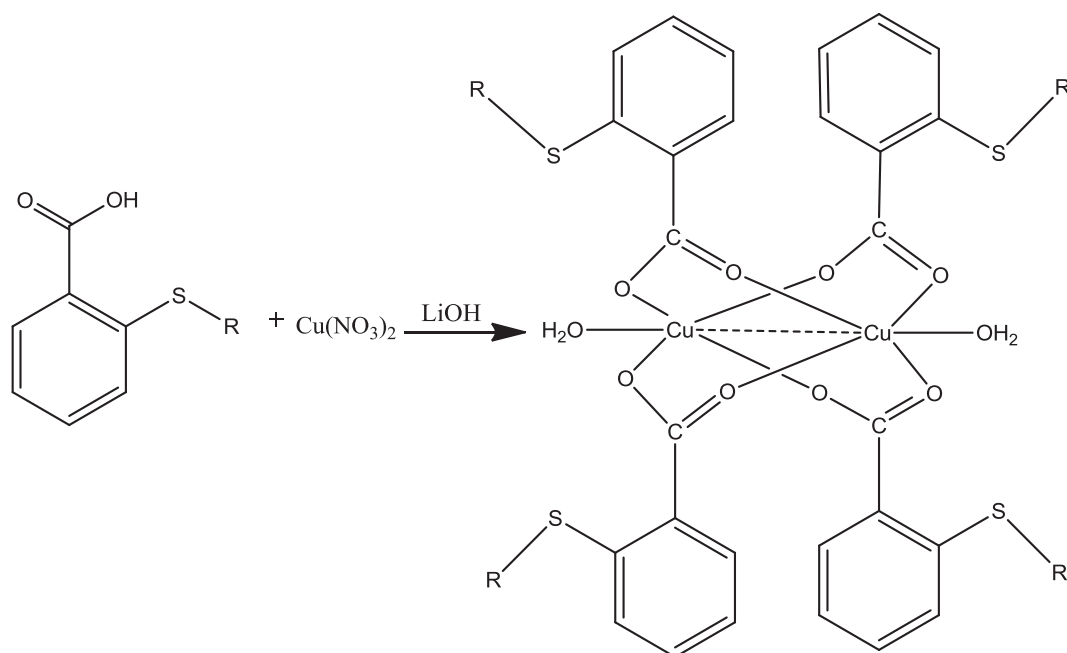
RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and chemical characterization

S-alkenyl (R = propenyl-(L1), isobutenyl-(L2)) derivatives of thiosalicylic acid were prepared (26) by alkylation of thiosalicylic acid using the corresponding alkenyl halogenides in an alkaline water-ethanol solution (Scheme 1). The corresponding complexes were obtained by a direct



Scheme 1. Synthesis method of S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid, R = propenyl-(L1), isobutenyl-(L2).



Scheme 2. Synthesis of copper(II)-complex with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid, R = propenyl-(C1), isobutenyl-(C2).

Table 1. The most important infrared bands (cm^{-1}) of the investigated compounds.

Compound	-S-R	-COO ⁻ (as)	-COO ⁻ (sim)
S-propenyl-thiosal (L1)	702(m)	1680(s)	1415(s)
$[\text{Cu}_2(\text{S-propenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C1)	696(m)	1610(s) 1596(s)	1401(s)
S-isobutenyl-thiosal (L2)	702(m)	1676(s)	1412(s)
$[\text{Cu}_2(\text{S-isobutenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ (C2)	697(m)	1613(s) 1589(s)	1400(s)

s-strong, m-medium

reaction of copper(II)-nitrate trihydrate with S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid (molar ratio 1:2) in a water solution with satisfactory yields (more than 80%) (Scheme 2).

Infrared spectra of the isolated complexes were measured to find the coordination mode of the S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. The asymmetric stretching frequencies of the carboxyl group were used to determine whether it was coordinated (the absorption bands are located in the region $1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$) or uncoordinated (the absorption bands are located in the region $1700\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$) to the metal ion (28–30). The infrared spectra of complexes C1 and C2 indicated that the carboxyl groups of S-alkenyl derivatives of thiosalicylic were definitely coordinated to the central copper(II)-complexes.

The isolated $(\text{Cu}_2(\text{S-alkenyl-thiosal})_4(\text{H}_2\text{O})_2)$ complexes show double sharp and strong asymmetric stretching frequencies of the carboxyl groups of the coordinated S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid to Cu(II)-ion at approximately $1548\text{--}1615\text{ cm}^{-1}$ (Table 1). The observed clear double bands for isolated complexes suggest small differences in the coordination of the carboxyl groups of the ligands to the copper(II)-ion. Based on previously published

results from structurally similar ligands, we can conclude that there was a coordination of S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid with copper(II)-ions in forming binuclear complexes.

Additionally, the strong sharp single symmetric stretching bands of the coordinated carboxyl groups of the S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid lie in the expected region (approximately 1400 cm^{-1}).

Magnetic measurements

Binuclear copper(II)-complexes (31, 32) are stable in dimeric form. The low value of μ_{eff} at room temperature (approximately 1.86 BM) is indicative of an antiferromagnetic interaction between the two metal centres typical of binuclear carboxylates of copper(II) of the type: $[\text{Cu}(\text{R-COO})_2\text{L}]_2$ (33–35). The main factor determining the magnitude of the antiferromagnetic interaction in the dimeric copper(II) carboxylates is the electronic structure of the bridging OCO moiety, as published previously (31, 32–35).

Anticancer activity of copper(II)-complexes

The MTT assay for cell viability shows that the two newly synthesized precursor S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid, as well as their corresponding copper(II)-complexes, exhibit cytotoxic activity in HCT-116 human colon carcinoma cells after 24 hours (Figure 1). The cytotoxic effect of the copper(II)-complexes was higher than the cytotoxicity of the corresponding ligands, especially for concentrations from 31.25 to $250\text{ }\mu\text{M}$. Copper complexes showed slightly lower cytotoxicity compared to cisplatin. However, higher concentrations of C2 ($250\text{--}1000\text{ }\mu\text{M}$) had an almost equal cytotoxic effect on HCT-116 cells, relative to cisplatin.

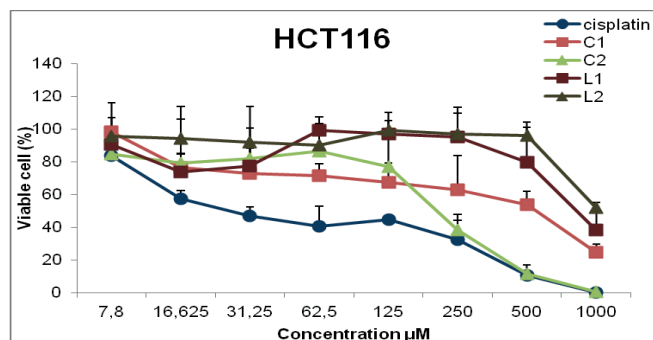


Figure 1. Representative graphs of HCT-116 cell survival after 24 h cell growth in the presence of copper(II) complexes and ligand precursors. Each point represents a mean value and standard deviation of 3 experiments with 3 replicates per dose.

CONCLUSION

The complexes of copper(II) with *S*-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid (alkenyl = propenyl-(L1), isobutenyl-(L2)) have been synthesized and characterized by microanalysis, infrared spectroscopy, and magnetic measurements. The cytotoxic effect of the copper(II)-complex was higher compared to the cytotoxicity of the corresponding ligands. Copper(II)-complexes showed slightly lower cytotoxicity compared to cisplatin. Complexes with *S*-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid in concentrations from 250 to 1000 μM had a cytotoxic effect on HCT-116 cells that was similar to cisplatin.

Acknowledgement

This work was financially supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Projects 172016, 172034, 175069 and 175103), and Faculty of Medical Sciences for grant MP 2014/01.

REFERENCES

1. Tisato F, Marzano C, Porchia M, Pellei M, Santini C. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med Res Rev.* 2010;30(4):708-49.
2. Marzano C, Pellei M, Tisato F, Santini C. Copper Complexes as Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2009;9:185-211.
3. Prudhomme M. *Advances in Anticancer Agents in Medicinal Chemistry.* Clermont-Ferrand: Bentham Science Publishers; 2013(2).
4. Santini C, Pellei M, Gandin V, Porchia M, Tisato F, Marzano C. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev.* 2014;114(1):815-62.

5. Marcel, Gielen, Tiekink, Edward. *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents.* Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2005.
6. Goodman VL, Brewer GJ, Merajver SD. Copper deficiency as an anti-cancer strategy. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(2):255-63.
7. Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science.* 1999;284:805-8.
8. Daniel KG, Harbach RH, Guida WC, Dou QP. Copper storage diseases: Menkes, Wilson's, and cancer. *Front Biosci.* 2004;9:2652-62.
9. Molina-Holgado F, Hider RC, Gaeta A, Williams R, Francis P. Metals ions and neurodegeneration. *Biometals.* 2007;20:639-54.
10. Iakovidis I, Delimaris I, Piperakis SM. Copper and its complexes in medicine: a biochemical approach. *Mol Biol Int.* 2011;2011:594529.
11. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Radic Biol Med.* 1985;1:3-25.
12. Daniel KG, Gupta P, Harbach RH, Guida WC, Dou QP. Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:1139-51.
13. Chhakar Ak, Kakkar LR. Extractive-spectrophotometric method for the determination of palladium using thiosalicylic acid and hexylamine. *Fresenius J Anal Chem.* 1993;347(12):483-5.
14. Gregory GREC and Jeffery PG. Salicylideneamino-2-thiophenol a new reagent for the photometric determination of tin: application to the analysis of ores, rocks and minerals. *Analyst.* 1967;92:293-9.
15. Gismera MJ, Procopio JR, Sevilla MT, Hernandez L. Copper(II) ion-selective electrodes based on dithiosalicylic and thiosalicylic acids. *Electroanalysis.* 2003;15(2):126-32.
16. Aydin M, Arsu N, Yagci Y. One-component biomolecular photoinitiating systems. *Macromol Rapid Commun.* 2003;24:718-23.
17. Shander D, Ahluwalia G, Grosso D. Us Patent 5411991.
18. Tarbet B. Skin disorders, therapy using fungicides. U.S. Patent Application No. 10/706,708.
19. Jacobelli H. US Patent 20050267095.
20. Halaschek-Wiener J, Kloog Y, Wacheck V, Jansen B. Farnesyl thiosalicylic acid chemosensitizes human melanoma in vivo. *J Invest Dermatol.* 2003;120(1):109-15.
21. O'Halloran TV. Transition metals in control of gene expression. *Science.* 1993;261(5122):715-25.
22. Ferrer EG, Williams PAM. Synthesis and characterization of dimeric complex of Cu(II) with thiosalicylic acid and pyridine. *Polyhedron.* 1997;16(19):3323-5.
23. Bott RC, Healy PC, Sagatysb DS. Electrochemical synthesis and structural characterization of the trinuclear copper(I)-copper(II) complex: *bis[bis(triphenylphosphine)copper(I)][bis(thiosalicylate)copper(II)]*. *Chem Commun.* 1998;2403-4.



24. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Radojević ID, Čomić LjR et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-methyl derivatives of thiosalicylic acid. *Polyhedron*. 2014;79:80-7.
25. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Novaković SB, Bogdanović GA et al. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivatives of thiosalicylic acid. *Journal of Molecular Structure*. 2016;1116:264-71.
26. Radić GP, Glodović VV, Radojević ID, Stefanović OD, Čomić LjR, Ratković ZR et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complex with same alkyl derivatives of thiosalicylic acids: Crystal structure of the *bis*(S-benzyl-thiosalicylate)--palladium(II)-complex, [Pd(S-bz-thiosal)₂]. *Polyhedron*. 2012;31(1):69-76.
27. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
28. Schoenberg LN, Cooke DW, Liu CF. Nuclear magnetic resonance determination of the absolute configuration of complexes of cobalt(III) with asymmetric tetradentate ligands. *Inorg Chem*. 1968;7:2386-93.
29. Swaminathan K, Busch DH. The synthesis and infrared absorption spectra of complexes of cobalt with pentadentate propylenediaminetetraacetic acid. *J Inorg Nucl Chem*. 1961;20(1):159-63.
30. Nakamoto K. *Infrared spectra of the inorganic and coordination compounds*. New York: Wiley; 1963.
31. Ferrer, EG, PAM Williams. Synthesis and characterization of a dimeric complex of Cu(II) with thiosalicylic acid and pyridine. *Polyhedron*. 1997;16(19):3323-5.
32. Elmali A. The magnetic super-exchange coupling in copper(II) acetate monohydrate and a redetermination of the crystal structure. *Turkish Journal of Physics*. 2000;24:667-72.
33. Jotham RW, Kettle SFA, Marks JA. Antiferromagnetism in transition-metal complexes. Part VI. Low-lying excited states of dinuclear copper(II) complexes with bridging multidentate Schiff's base groups and some related compounds. *J Chem Soc, Dalton Trans*. 1974;2:125-8.
34. Meier JL, Coughenour CE, Carlisle JA, Carlisle GO. The magnetic properties of a series of copper(II) aspirinates. *Inorg Chim Acta*. 1985;106:159-63.
35. Underhill AE, Bougourd SA, Flugge ML, Gale SE, Gomm PS. Metal complexes of anti-inflammatory drugs. Part VIII: Suprofen complex of copper(II). *J Inorg Biochem*. 1993; 144:139-44.