



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Bata Konovalov

**SINTEZA I ANTITUMORSKA AKTIVNOST
DINUKLEARNIH PLATINA(II) KOMPLEKSA SA
NAFTIRIDINIMA KAO MOSTNIM LIGANDIMA**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2024



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Bata Konovalov

**SYNTHESIS AND ANTITUMOR ACTIVITY OF
DINUCLEAR PLATINUM(II) COMPLEXES WITH
NAPHTHYRIDINES AS BRIDGING LIGANDS**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2024

Autor
Ime i prezime: Bata Konovalov
Datum i mesto rođenja: <i>11. marta 1970. godine, Jagodina, Republika Srbija</i>
Sadašnje zaposlenje: <i>Inspektor preventivne zaštite, Ministarstvo unutrašnjih poslova, Sektor za vanredne situacije, Odeljenje za vanredne situacije u Jagodni</i>
Doktorska disertacija
Naslov: Sinteza i antitumorska aktivnost dinuklearnih platina(II) kompleksa sa naftiridinima kao mostnim ligandima
Broj stranica: 120
Broj slika: 59
Broj bibliografskih podataka: 211
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: <i>Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu</i>
Naučna oblast (UDK): <i>546, Hemija – Neorganska hemija</i>
Mentor: dr Snežana Rajković, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu
Ocena i obrana
Datum prijave teme: 28.10.2020.
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske disertacije: IV/01-94/13 od 12.02.2021. godine
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
<ol style="list-style-type: none"> 1. dr Snežana Rajković, redovni profesor, Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, uža naučna oblast: Neorganska hemija, mentor 2. dr Miloš I. Đuran, redovni profesor u penziji, dopisni član SANU, uža naučna oblast: Neorganska hemija, predsednik komisije 3. dr Biljana Petrović, redovni profesor, Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, uža naučna oblast: Neorganska hemija, član komisije 4. dr Goran Janjić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, naučna oblast: Hemija, član komisije 5. dr Marija Živković, docent, Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, uža naučna oblast: Organska hemija, član komisije

Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije:

1. dr Miloš I. Đuran, redovni profesor u penziji, redovni član SANU, uža naučna oblast: Neorganska hemija, predsednik komisije
2. dr Biljana Petrović, redovni profesor, Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, uža naučna oblast: Neorganska hemija, član komisije
3. dr Goran Janjić, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, naučna oblast: Hemija, član komisije
4. dr Marija Živković, vanredni profesor, Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, uža naučna oblast: Tarmaceutska organska hemija, član komisije
5. dr Ivana Đorđević, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, naučna oblast: Hemija, član komisije

Datum odbrane disertacije:

Posvećeno mojim roditeljima...

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija rađena je u Institutu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu pod mentorskim rukovodstvom dr Snežane Rajković, redovnog profesora, koja je i predložila temu za ovaj rad. Iskreno najveću zahvalnost dugujem svom mentoru na pozivu da postanem deo njene istraživačke grupe, koja je imala strpljenja da me sasluša, i nesebično mi ukazala na sve pravilnosti i nepravilnosti u mom istraživačkom radu, na ukazanoj nesebičnoj pomoći, na savetima kao u davnim studentskim danima na redovnim studijama. Takođe joj dugujem ogromnu i iskrenu zahvalnost na idejama, savetima i podršci tokom pisanja svih radova, a naposljetku i ove doktorske disertacije.

Zahvaljum se dr Milošu Đuranu, redovnom članu SANU koji je uspeo da me vrati u klupu nakon tri decenije.

Zahvaljujem se članovima komisije dr Biljani Petrović, dr Goranu Janjić na doprinosu koji su dali svojim sugestijama i savetima prilikom pisanja ove disertacije.

Zahvaljujem saradnicama u laboratoriji i posebnu zahvalnost dugujem Anđeli Franich – asistentu, koja mi je davala vetar u leđa i olakšala moj rad u laboratoriji. Hvala na pomoći, podršci i razgovorima.

Zahvaljujem se svim kolegama Instituta za hemiju na podršci i prijateljstvu.

Naposljetku, najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici. Roditeljima, jer su mi omogućili obrazovanje, pružili neizmernu ljubav, na vaspitanju i veri koje su mi usadili, na podršci i strpljenju tokom svih ovih godina mog postojanja i jer su me naučili da sledim svoj put.

Vaš Bata

APSTRAKT

U okviru ove doktorske disertacije prikazana je sinteza i karakterizacija dinuklearnih platina(II) kompleksa, opšte formule [$\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}$] $_{2}(\mu\text{-X})(\text{ClO}_{4})_{2}$ (X je 1,5-nphe u **Pt1-Pt7** i 1,6-nphe u **Pt8** i **Pt9**); L je 2NH_{3} u **Pt1** i **Pt8** kompleksima ili bidentatno koordinovani diamini. Na osnovu rezultata UV-Vis i fluorescentne spektroskopije za reakcije kompleksa platine(II) sa CT-DNK zaključeno je da ispitivani kompleksi sa CT-DNK ostvaruju elektrostatičke interakcije. Načini vezivanja **Pt1-Pt7** kompleksa za DNK izučavani su primenom molekuskog dokovanja. Utvrđeno je da ispitivani kompleksi sa DNK mogu ostvariti elektrostatičke interakcije, vezuju se za fosfatne grupe. Hidroliza Ac-L-Met-Gly u prisustvu **Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w** kompleksa ispitivana je primenom ^1H NMR, a potvrđena je na osnovu kvantno-hemijskih proračuna. Na osnovu eksperimentalnih podataka, koji su dobijeni primenom UV-Vis i fluorescentne spektroskopije za reakcije **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa sa HSA, zaključeno je da ispitivani kompleksi sa HSA ostvaruju statičke interakcije, što je potvrđeno i na osnovu rezultata molekuskog dokovanja. Na osnovu rezultata bioloških ispitivanja zaključeno je da **Pt1** i **Pt2** kompleksi u *in vitro* uslovima pokazuju značajnu citotoksičnu aktivnost prema ćelijskoj liniji karcinoma debelog creva. Rezultati dobijeni ispitivanjem ćelijske apsorpcije ukazuju da pasivni transport nije odgovoran za razlike u pogledu ćelijske apsorpcije ispitivanih kompleksa. U odnosu na ispitivane ćelijske linije **Pt8** kompleks je pokazao veći citotoksični potencijal prema čvrstim tumorima u odnosu na **Pt9** kompleks. Nađeno je da **Pt8** kompleks indukuje apoptozu 4T1 i A549 ćelija, zbog čega dolazi do povećanja ekspresije pro-apoptotičnog kaspaze-3 i smanjenja ekspresije anti-apoptotičnog Bcl-2 i Ki-67 proteina.

KLJUČNE REČI

- dinuklearni kompleksi platine(II)
- 1,5-naftiridin
- 1,6-naftiridin
- DNK
- BSA i HSA
- Citotoksičnost
- Molekulski doking
- Dipeptidi
- Hidroliza peptidne veze

ABSTRACT

This dissertation presents the synthesis and characterization of dinuclear platinum(II) complexes of the general formula $[\{Pt(L)Cl\}_2(\mu-X)](ClO_4)_2$ (X is 1,5-nphe, **Pt1-Pt7** and 1,6-nphe, **Pt8** i **Pt9**); L is 2NH₃ in **Pt1** and **Pt8** complexes or bidentate coordinated diamines. From the results of UV-Vis and fluorescence spectroscopy for the reactions of platinum(II) complexes with CT-DNA, it was found that the tested complexes with DNA achieve electrostatic interactions. Molecular docking studies performed to evaluate the potential binding mode of **Pt1-Pt7** complexes at the double stranded DNA showed that groove spanning and backbone tracking were the most stable binding modes. Hydrolysis of Ac-L-Met-Gly in the presence of **Pt2w**, **Pt3w** and **Pt5w** complexes was studied by ¹H NMR, and confirmed based on quantum chemical calculations. Based on the experimental data, obtained by UV-Vis and fluorescence spectroscopy for the reactions of the **Pt2**, **Pt3** and **Pt5** complexes with HSA, it was concluded that the investigated complexes with HSA achieve static interactions, which was additionally confirmed based on the results of molecular docking. The biological assays showed that **Pt1** and **Pt2** complexes *in vitro* show significant cytotoxic activity against the colon cancer cell line. The results of the cellular uptake study showed that passive transport is not responsible for the differences in cellular uptake of the complexes studied. In relation to the cell lines tested, the **Pt8** complex showed higher cytotoxic potential against solid tumors compared to the **Pt9** complex. It was found that the **Pt8** complex induces apoptosis of 4T1 and A549 cells, due to which there is an increase in the expression of the pro-apoptotic caspase-3 and a decrease in the expression of the anti-apoptotic Bcl-2 and Ki-67 proteins.

KEY WORDS

- Dinuclear platinum(II) complexes
- 1,5-naphthyridine
- 1,6-naphthyridine
- DNA
- BSA and HSA
- Cytotoxicity
- Molecular docking
- Dipeptide
- Hydrolysis of peptide bond

SADRŽAJ

1. OPŠTI DEO.....	1
1.1 Mononuklearni kompleksi platine(II).....	1
1.1.1 Mehanizam delovanja cisplatine.....	3
1.2 Polinuklearni kompleksi platine(II).....	6
1.3 Naftiridini	11
1.3.1 Kompleksna jedinjenja sa 1,5-naftiridinom.....	12
1.3.2 Derivati 1,6-naftiridina	14
1.3.3 Derivati 1,8-naftiridina	15
1.4 Dezoksiribonukleinska kiselina.....	16
1.4.1 Kovalentno vezivanje.....	18
1.4.2 Nekovalentno vezivanje.....	20
2. PREDMET ISTRAŽIVANJA.....	30
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	31
3.1 Hemikalije i reagensi	31
3.2 Fizička merenja.....	31
3.3 Sinteza dinuklearnih kompleksa platine(II).....	32
3.4 Dobijanje [$\{Pt(L)(H_2O)\}_2(\mu-1,5-nphe)\}^{4+}$ kompleksa.....	34
3.5 Ispitivanje interakcija Pt1-Pt9 kompleksa sa CT-DNK.....	34
3.5.1 Elektronska apsorpciona spektrofotometrija.....	34
3.5.2 Fluorescentna spektroskopija.....	35
3.6 Ispitivanje interakcija Pt(II) kompleksa sa serum albuminima	36
3.7 1H NMR spektroskopija.....	36
3.8 Kvantno-hemijski proračuni	37
3.9 Molekulski doking.....	37
3.10. Biološka ispitivanja	38
3.10.1 Pripremanje rastvora platina(II) kompleksa.....	38
3.10.2 Čelijske linije	38
3.10.3 MTT test.....	38
3.10.4 Apoptoza	38
3.10.5 Kaspaza-3, Bcl-2 i Ki-67 ekspresija	39
3.10.6 Test čelijske apsorpcije Pt1-Pt7 kompleksa.....	39
4. REZULTATI I DISKUSIJA	41
4.1 Sinteza i karakterizacija dinuklearnih platina(II) kompleksa koji sadrže 1,5-naftiridin ili 1,6-naftiridin kao mostni ligand	43
4.1.1 Sinteza Pt1-Pt9 kompleksa	43

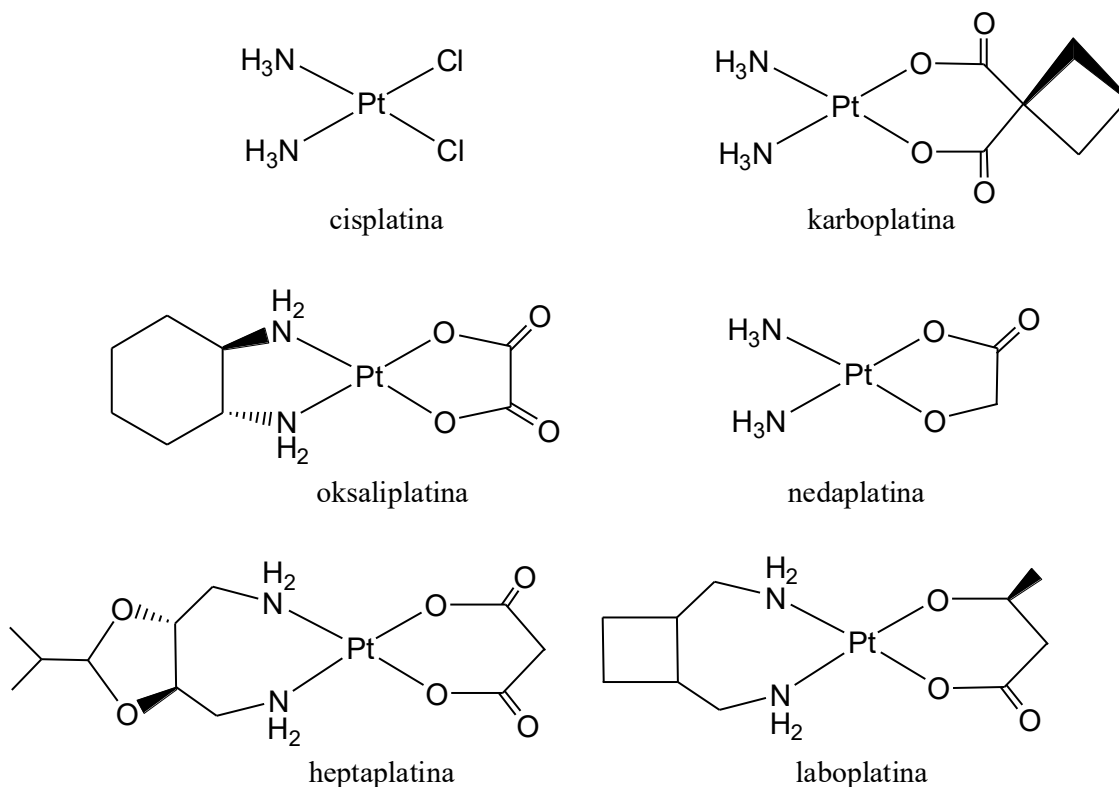
4.1.2 Spektroskopska karakterizacija Pt1-Pt9 kompleksa	43
4.2. Ispitivanje interakcija dinuklearnih platine(II) kompleksa sa biomolekulima	46
4.2.1 Interakcije dinuklearnih kompleksa platine(II) sa DNK.....	46
4.2.2 Interakcije dinuklearnih kompleksa platine(II) sa BSA.....	51
4.3. Molekulski doking.....	55
4.4 Biološka ispitivanja	59
4.4.1 Ispitivanje citotoksične aktivnosti Pt1–Pt7 kompleksa	59
4.4.2 Ispitivanje citotoksične aktivnosti Pt8 i Pt9 kompleksa	64
4.5 Ispitivanje interakcija Pt2, Pt3 i Pt5 kompleksa i njihovih akva derivata sa <i>N</i> - acetilovanim metionil-glicinom i humanim serum albuminom	70
4.5.1 Reakcije Pt2w, Pt3w i Pt5w kompleksa sa Ac–L–Met–Gly.....	71
4.5.2 Interakcije Pt2, Pt3 i Pt5 kompleksa sa HSA.....	77
5. ZAKLJUČAK	83
LITERATURA.....	85
PRILOG	94
BIOGRAFIJA.....	120

1. OPŠTI DEO

Početak dvadesetog veka, nakon otkrića da azotni iperiti (bis(2-hloroetil)-etilamin, bis(2-hloroetil)-metilamin i tris(2-hloroetil)-amin), pokazuju hemioterapijska svojstva, počinje intenzivno ispitivanje i primena organskih jedinjenja u hemioterapiji [1]. Od tada je sintetisan veliki broj kako organskih, tako i neorganskih jedinjenja, uključujući i kompleksna jedinjenja sa ciljem njihove primene kao antitumorskih agenasa. Podaci Svetske zdravstvene organizacije ukazuju da su različite vrste malignih tumora još uvek glavni uzrok smrtnosti ljudske populacije [2]. Istraživanja su pokazala da je u 2018. godini od ove vrste oboljenja umrlo oko 9,6 miliona ljudi. Zbog toga su istraživanja u ovoj oblasti usmerena na sintezu novih jedinjenja koja se mogu primenjivati u medicini za lečenje malignih tumora.

1.1 Mononuklearni kompleksi platine(II)

Kompleksno jedinjenje, koje je prvo upotrebljeno u kliničkoj praksi za lečenje kancerogenih oboljenja, je cisplatina (*cis*-diammindihloridoplatinum(II), *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] (*cis*-Pt, Slika 1). Pored ovog, još dva kompleksna jedinjenja platine(II), karboplatina, [Pt(cbdca-*O,O'*)(NH₃)₂] i oksaliplatina, [Pt(*ox-O,O'*)(dach)], su odobrena u svetu za lečenje kancerogenih oboljenja (Slika 1) [3,4]. U pojedinim zemljama odobrena je upotreba još tri kompleksna jedinjenja platine(II) (Slika 1). Nedaplatina se koristi u Japanu za lečenje tumora testisa, glave, vrata, jajnika, grlića materice i tumora pluća [5]. Heptapaltina se primenjuje u Južnoj Koreji za tretman tumora želuca, dok se lobaplatina u Kini koristi za lečenje hronične mijeloidne leukemije, kod metastaza tumora dojke i karcinoma pluća [4-6]. Već više od 40 godina kompleksi platine(II) su najčešće korišćeni hemioterapeutici. Činjenica da stopa izlečenja raka testisa nakon tretmana pacijenata cisplatinom premašuje 95%, opravdava primenu ovog kompleksnog jedinjenja u medicini [7]. Značaj kompleksnih jedinjenja platine u lečenju tumorskih oboljenja dodatno je naglašen činjenicom da je karboplatina od strane Svetske zdravstvene organizacije uvrštena na listu esencijalnih hemioterapeutika [8]. Podatak iz 2009. godine, američkog centra za kontrolu i prevenciju bolesti, govori da se za lečenje tumorskih oboljenja samo pet hemioterapeutika (metotreksat, raloksifen, medroksiprogesteron, tamoksifen i leuprolid) koriste više od antitumorskih agenasa platine(II) [9]. U Tabeli 1 prikazani su kompleksi platine(II) koji se nalaze u kliničkoj upotrebi. Uprkos činjenici da su kompleksna jedinjenja platine najviše ispitivani hemioterapeutski agensi, već više od petnaest godina nijedno kompleksno jedinjenje platine nije odobreno za kliničku upotrebu, ali su istraživanja u ovoj oblasti i dalje veoma intenzivna.



Slika 1. Strukturne formule klinički odobrenih antitumorskih kompleksa platine(II).

Gledajući na globalnom nivou, potražnja za antitumorskim agensima platine je u stalnom porastu, bez obzira na neželjene efekte, koji su posledica primene ovih hemioterapeutika. Pored toksičnosti (nefrotoksičnost, neurotoksičnost, ototoksičnost, kardiotoksičnost, opadanje kose, osećaj mučnine) i ograničene rastvorljivosti, javlja se i rezistencija na određene ćelijske linije, što je podstaklo istraživače da i dalje istražuju u ovoj oblasti [10-12]. Istraživanja su usmerena na sintezu novih kompleksnih jedinjenja platine, kao i na ispitivanje mehanizma njihovog antitumorskog delovanja. Kompleksna jedinjenja platine, koja se strukturno razlikuju od cisplatine i njenih analoga, pružaju brojne mogućnosti za pronalaženje antitumorskih agenasa čiji će mehanizam delovanja biti drugačiji u odnosu na mehanizam delovanja cisplatine [13-16].

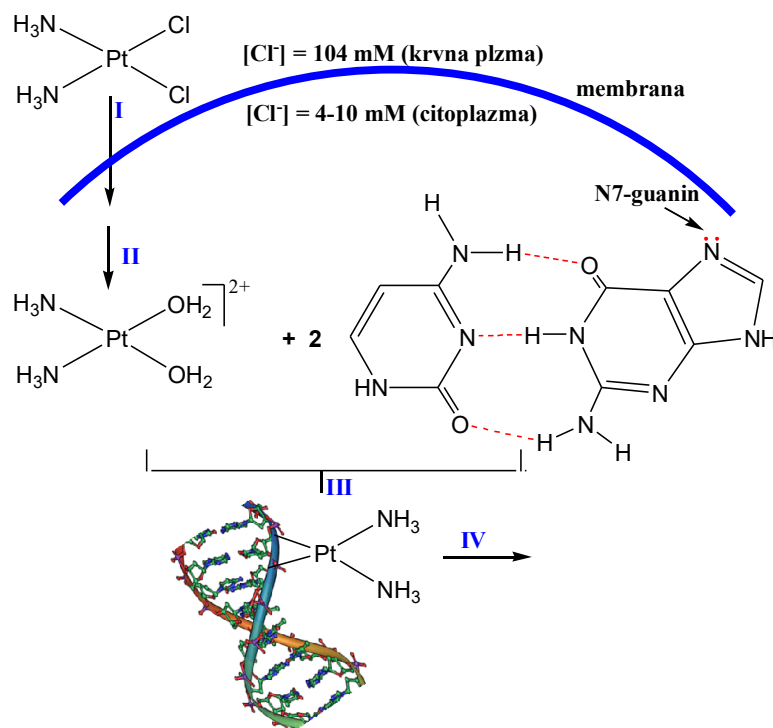
Tabela 1. Kompleksi platine(II) koji se nalaze u kliničkoj upotrebi.

Opšti naziv	Skraćeni naziv u toku istraživanja	Komercijalni naziv	Odobren za upotrebu	Primena
cisplatina	CDDP	platinol	1978	globalna
karboplatina	JM8	paraplatin	1989	globalna
oksaliplatina	1-OHP	eloxatin	2002	globalna
nedaplatina	254-S	aqupla	1995	Japan
heptaplatina	SKI 2053R	SunPla	1999	Južna Korea
laboplatina	D-19466	-	2010	Kina

1.1.1 Mehanizam delovanja cisplatine

Citotoksični efekat cisplatine najvećim delom je posledica reakcije sa DNK, kao i interakcije sa proteinima i enzimima. Cisplatina, kao i njeni analozi, mogu se kovalentno vezati za ćelijsku DNK, pri čemu zaustavljaju replikaciju i indukuju apoptozu [17,18].

Mehanizam delovanja cisplatine i antitumorskih agenasa platine(II), koji su u kliničkoj upotrebi, ispitan je u mnogobrojnim naučnim eksperimentima od strane hemičara, biologa, farmaceuta i lekara. Kompleksna jedinjenja prikazana na slici 1, poseduju kvadratno-planarnu geometriju, neutralna su, u *cis* položaju sadrže dva amminska (NH_3) ili jedan bidentatno koordinovani diaminski ligand. Ulogu odlazećih grupa imaju dva monodentatna anjonska liganda (hlorido ligand, Cl^-) ili jedan helatno koordinovani anjon dikarboksilne kiseline [19,20]. Amminski ili helatno koordinovani diaminski ligand predstavljaju stabilan deo molekula i ostaju koordinovani za Pt(II) jon tokom procesa unutarćelijskih transformacija. Za razliku od njih, *odlazeći ligandi*, koji mogu biti monodentatni ili helatni anjonski ligandi, napuštaju koordinacionu sferu Pt(II) jona. Sam mehanizam je veoma složen proces koji se odvija u četiri faze (Slika 2): transport kompleksa u ćeliju, hidroliza kompleksa, interakcija sa DNK i procesi koji dovode do ćelijske smrti, odnosno do apoptoze [20].



Slika 2. Mehanizam delovanja cisplatine i analognih antitumorskih agenasa koji sadrže platinu(II). I–ulazak u ćeliju, II–hidroliza, III–interakcija sa DNK, IV–apoptoza [20].

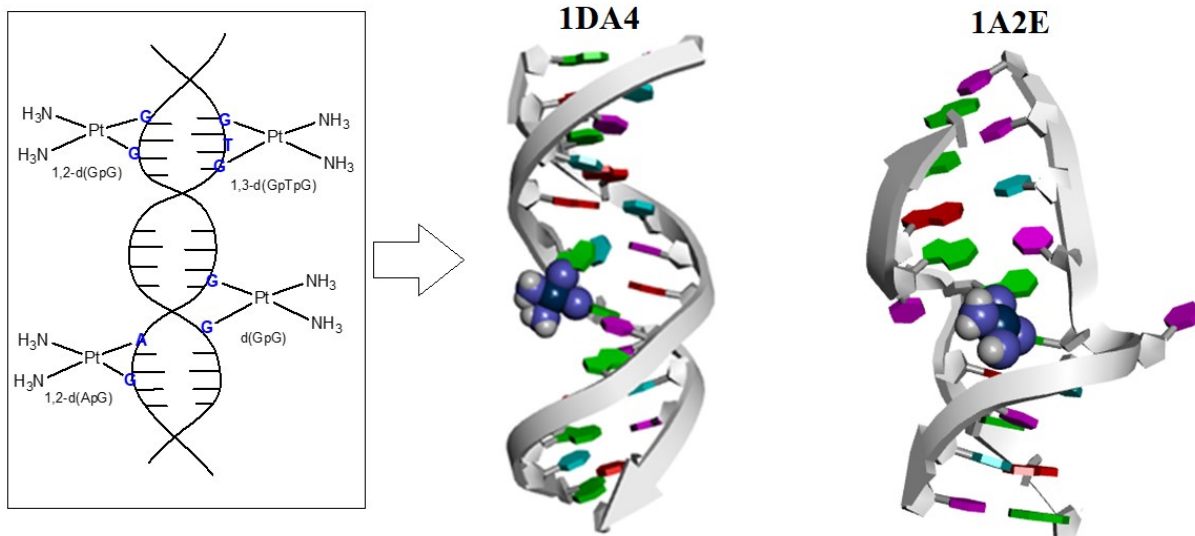
Mehanizam kojim cisplatina difunduje u ćelije još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Ranije se smatralo da cisplatina ulazi u unutrašnjost ćelije isključivo pasivnom difuzijom, kao neutralni molekul. Međutim, kasnije je nađeno da cisplatina može ući u ćeliju i putem aktivnog transporta, posredstvom membranskih proteina [21]. Zbog veličine i planarnosti cisplatina lako može ući u ćeliju pasivnom difuzijom. Shodno tome, ne može doći do zasićenja ćelije cisplatinom, već difuzija zavisi od koncentracije cisplatine koja je data intravenozno [22–24]. Transport cisplatine u ćeliju ne može biti inhibiran čak ni prisustvom njenih analoga [21]. Veliki

broj studija pokazao je da cisplatina u ćeliju ulazi i putem aktivnog transporta i da aktivni transport predstavlja dominantan mehanizam preuzimanja. Aktivni transport cisplatine povezan je sa plazma-membranskim bakar transportnim proteinom (CTR1) [21,25,26]. Na sličan način transport oksaliplatine vrši se posredstvom organskih katjonskih transportnih proteina (OCTs) [27]. Međutim, neki aldehidi usled reakcije sa membranskim proteinima mogu inhibirati aktivni transport cisplatine u ćeliju [28]. Kombinacija oba mehanizma (pasivni i aktivni transport) na najbolji način može objasniti ulazak kompleksa platine(II) u ćeliju.

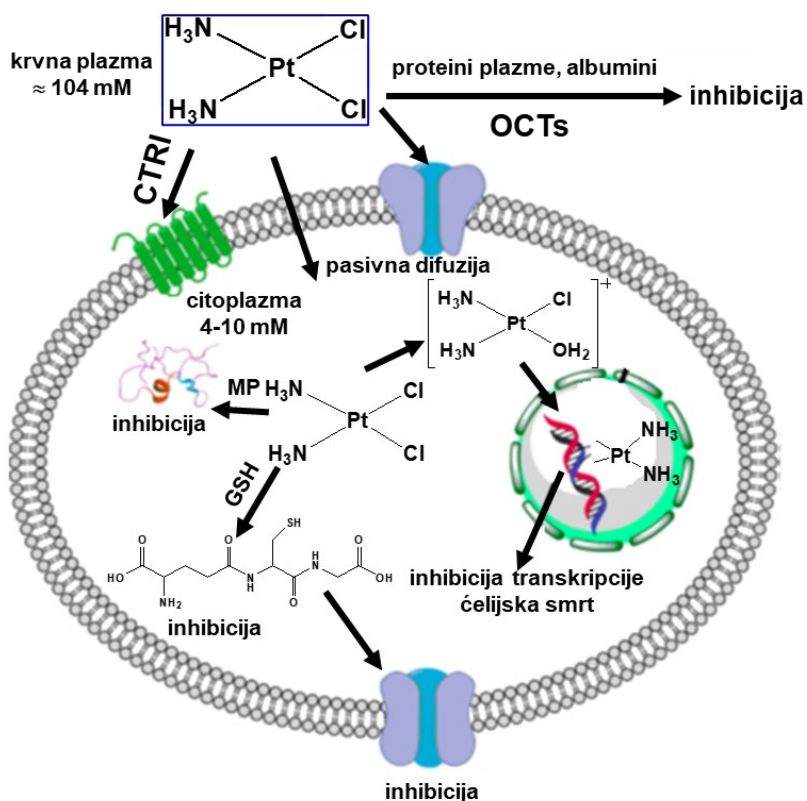
Kvadratno-planarna geometrija cisplatine omogućava brze supstitucione reakcije liganada, koje su neophodne da bi došlo do reakcije sa DNK. Pre kovalentnog vezivanja za DNK dolazi do supstitucionih reakcija, u kojima se hlorido ligandi supstituišu sa molekulima vode. Usled visoke koncentracije hloridnih anjona (~100 mM) u krvnoj plazmi se ne odigravaju supstitucione reakcije, ali nakon prelaska u citoplazmu, gde je koncentracija Cl^- manja od 20 mM, dolazi do supstitucije Cl^- liganda sa molekulima vode [29]. Poluvreme reakcije nastajanja $\text{cis-}[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$ kompleksnog jona je približno 2 časa. Nastali pozitivno naelektrisani katjon može da privuče negativno naelektrisani DNK molekul. Karboplatina i oksaliplatina sadrže helatno koordinovani anjonski ligand, zbog čega su supstitucione reakcije u vodi mnogo sporije, tako da su vodeni rastvori ovih kompleksnih jedinjenja stabilni u periodu koji se meri nedeljama, pa čak i mesecima [30–34].

Kompleksni jon, $\text{cis-}[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$ ulazi u jedro, a nakon toga koordinovani molekul vode može se supstituisati sa azotom iz nukleinskih baza DNK. Veliki broj naučnih studija podržava hipotezu da je DNK glavna meta za interakcije sa antitumorskim agensima koji sadrže Pt(II) jon, ali postoji veliki broj dokaza da i interakcije sa proteinima i RNK takođe imaju važnu ulogu u ovim procesima [35–37]. Najčešće mesto vezivanja Pt(II) je N7 atom nukleinske baze guanina i N3 adenina. Formiranje monofunkcionalnog adukta Pt(II)-DNK potvrđeno je primenom ^{195}Pt NMR [38]. Nakon koordinovanja za DNK, može se i drugi hlorido ligand supstituisati sa N-atomom nukleinskih baza, formirajući unakrsne veze sa DNK. Platina(II) može ostvariti vezu sa N-atom nukleinskih baza unutar istog lanca DNK (unutarlančano povezivanje) ili iz dva različita lanca DNK (međulančano povezivanje). Najčešći način kovalentnog vezivanja cisplatine za DNK je 1,2-d(GpG) unutarlančano (~65%) i verovatno njena antitumorska aktivnost je posledica ovog načina vezivanja. Pored toga, cisplatina može ostvariti 1,2-(ApG) (~25%) i 1,3-(GpTpG) (~10%) unutarlančano vezivanje, kao i međulančano d(GpG) (<1%) koordinovanje (Slika 3). Nakon koordinovanja cisplatine za DNK, dolazi do distorzije njene spiralne strukture, usled čega dolazi do inhibicije, replikacije i transkripcije DNK [39,40]. Sličan tip interakcija sa DNK ostvaruje karboplatina, kao i oksaliplatina [41,42]. Na slici 3 prikazani su različiti načini kovalentnog vezivanja antitumorskih agenasa platine(II) za DNK.

Pored reakcije sa DNK, u organizmu postoje i drugi biomolekuli koji mogu reagovati sa antitumorskim agensima koji sadrže platinu(II) i na taj način sprečiti njihovo antitumorsko delovanje (Slika 4) [44]. Trenutno svi hemioterapeutici koji sadrže Pt(II) jon se primenjuju intravenozno, zbog čega odmah mogu stupiti u interakciju sa komponentama koje se nalaze u krvi, od kojih je jedna humani serum albumin (HSA). Ovaj protein je najzastupljeniji protein humane plazme. Tiolne grupe iz cisteina, kao i tioetarske iz metionina, se veoma lako koordinuju za Pt(II) i na taj način inhibiraju dejstvo cisplatine i njenih analoga [45,46]. Kada uđe u ćeliju kompleks platine(II) reaguje sa proteinima iz grupe metalotioneinina (MT) koji su bogati sumporom, kao i sa glutationom (GSH) [47].



Slika 3. Načini kovalentnog vezivanja cisplatinine za DNK [43]. Prikaz unutarlančanog (struktura sa pdb kodom 1DA4) i međulančanog (struktura sa pdb kodom 1A2E) kovalentnog vezivanja kompleksa platine(II) za DNK, u kristalnim strukturama ekstrahovanih iz PDB [48,49].



Slika 4. Šematski prikaz reakcija koje se odigravaju u ekstracelularnom i intracelularnom prostoru nakon tretmana cisplatinom [44].

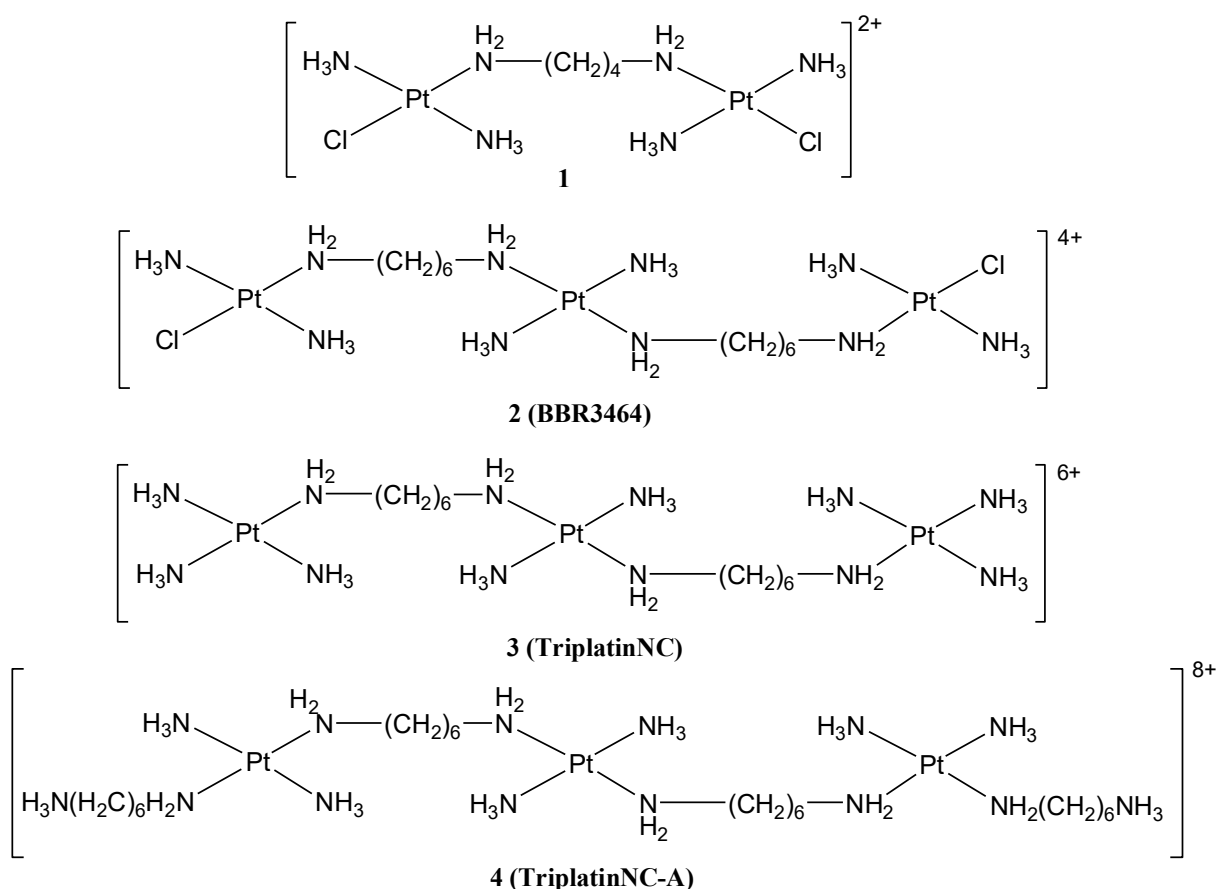
1.2 Polinuklearni kompleksi platine(II)

Polinuklearni kompleksi platine(II) predstavljaju novu klasu jedinjenja platine sa potencijalnom primenom u hemioterapiji [50–53]. U ovim kompleksnim jedinjenjima dva ili više platina(II) jona povezani su mostnim ligandima. Mostni ligandi mogu biti fleksibilni alifatični ili kruti aromatični ligandi [54–57]. Nađeno je da polinuklearni kompleksi sa molekulom DNK ostvaruju interakcije koje se razlikuju od kovalentnog vezivanja cisplatine i njenih analoga. Za razliku od neutralnih platina(II) citostatika, koji su u kliničkoj upotrebi, polinuklearni kompleksi platine(II) u rastvoru postoje u katjonskom obliku [58].

Polinuklearni kompleksi platine(II) u svojoj strukturi mogu imati iste ili različite mononuklearne platina(II) jedinice, pri čemu one mogu imati *cis*- ili *trans*-geometriju. Polinuklearni analozi *cis*- ili *trans*-platine(II), koji sadrže *cis*-{PtCl(NH₃)₂} ili *trans*-{PtCl(NH₃)₂} jedinice povezane alifatičnim diaminima kao mostnim ligandima, prikazani su na slici 5. Mostni ligandi sadrže promenljiv broj ugljenikovih atoma, što olakšava međulančano ili unutarlančano povezivanje polinuklearnih kompleksa sa DNK. Dokazano je da polinuklearni kompleksi platine(II) sa DNK ostvaruju interakcije koje se razlikuju od interakcija cisplatine. Dinuklearni *trans*-[PtCl(NH₃)₂]₂(μ-(H₂N(CH₂)₄NH₂))Cl₂ (Slika 5, kompleks 1) sa DNK može da formira 1,2-, 1,3- i 1,4-unutarlančane veze koordinujući se za N7 atom guanina [59,60]. U 1,3- i 1,4-aduktima dva vezujuća guanina razdvojena su jednom odnosno sa dve nukleinske baze [59]. Ovaj način vezivanja Pt(II) za DNK smanjuje rezistenciju upotrebljenog dinuklearnog kompleksa platine(II) u odnosu na cisplatinu prema ćelijama raka jajnika [50]. U cilju povećanja broja interakcija sa DNK sintetisan je trinuklearni kompleks platine(II) (Slika 5, kompleks 2) [61]. Nakon sistematskog ispitivanja trinuklearni bis[*trans*-diamminhloridoplatina(II)] [*μ-trans*-diamminbis(heksadiamin)platina(II)]nitrat (BBR3464, kompleks 2) je ušao u fazu predkliničkih ispitivanja. BBR3464 je pokazao veliki stepen citotoksičnosti prema brojnim kancerogenim ćelijskim linijama, a sa DNK formira karakteristične unutarlančane veze koje su odgovorne za njegovu citotoksičnost [62–64]. Glavni adukt koji se formira potiče od 1,4-unutarlančanog vezivanja. Ovaj način vezivanja dovodi do usmerenog savijanja i lokalnog odmotavanja DNK. Druga istraživanja su pokazala da BBR3464 izaziva promene u strukturi DNK, tako što B konformaciju prevodi u Z ili u A [65,66]. *In vitro* i *in vivo* ispitivanja su pokazala da određene kancerogene ćelijske linije koje su rezistentne na cisplatinu, primenom BBR3464 njihova rezistentnost se može smanjiti čak i do tri puta [50,63,67–69]. Sve to sugeriše da BBR3464 može imati veliki terapijski potencijal. Glavni nedostatak BBR3464 je njegova sistemska toksičnost. U prvoj fazi kliničkih ispitivanja nađeno je da povećanjem doze BBR3464 dolazi do teške mijelosupresije i gastrointestinalnih poremećaja. S druge strane, u urinu je nađena veoma niska koncentracija ovog agensa kao i niska nefrotoksičnost. U drugoj fazi vršena su ispitivanja na karcinom jajnika, mikroćelijski i nemikroćelijski karcinom pluća, želuca i gastroezofagealni adenokarcinom, ali su rezultati bili različiti [70–73]. BBR3464 je pokazao bolju aktivnost u odnosu na cisplatinu prema nemikroćelijskom karcinomu pluća i uznapredovanom karcinomu jajnika. U poslednjem slučaju, BBR3464 je prikazao aktivnost koja zaslužuje dalju evaluaciju.

Polinuklearni kompleksi platine(II) u kojima je u odnosu na BBR3464 kompleks odlazeći hlorido ligand (Cl⁻) supstituisan sa amonijakom (Slika 5, TriplatinNC, kompleks 3) ili nekim drugim aminom (TriplatinNC-A, kompleks 4) su pokazali veliki afinitet prema DNK, kao i antitumorsku aktivnost [74]. Rezultati rendgenske strukturne analize ukazuju da TriplatinNC i TriplatinNC-A sa DNK ostvaruje nekovalentne interakcije, i to elektrostatičke prirode kao i vodonične veze. Naime, amino grupe ovih platina(II) kompleksa formiraju sa fosfatnim grupama DNK interakcije, koje su u literaturi imenovane kao *phosphate clamps*. Za termin *phosphate clamps* još uvek ne postoji adekvatan prevod na srpski jezik, jer ovaj termin

se retko pominje u literaturi. U okviru ove disertacije mi smo *phosphate clamps* preveli kao fosfatno vezivanje ili vezivanje za fosfatnu kičmu. Radi jednostavnosti, u daljem tekstu, ova vrsta interakcije biće imenovana kao fosfatno vezivanje. Vezivanje duž fosfatne kičme može dovesti do promene konformacije B-DNK u A-DNK, kao i B-DNK u Z-DNK [74–76]. Konformacione promene indukuju bolje vezivanje u mali žljeb, jedinjenja kao što je Hoechst 33258, a ne utiču na interkalaciju etidijum-bromida (EB) [77,78]. Ispitivanja su pokazala da zbog visokog pozitivnog naelektrisanja TriplatinNC i TriplatinNC-A mogu kondenzovati DNK i indukovati agregaciju malih t-RNK molekula [79,80]. Pored toga, oni posredno inhibiraju delovanje topoizomeraze-I. Prema tome, biološki mehanizam delovanja TriplatinNC i TriplatinNC-A uključuje nukleinske kiseline, kondenzaciju ili njihovu agregaciju, kao i inhibiciju enzimske aktivnosti topoizomeraze-I [79].

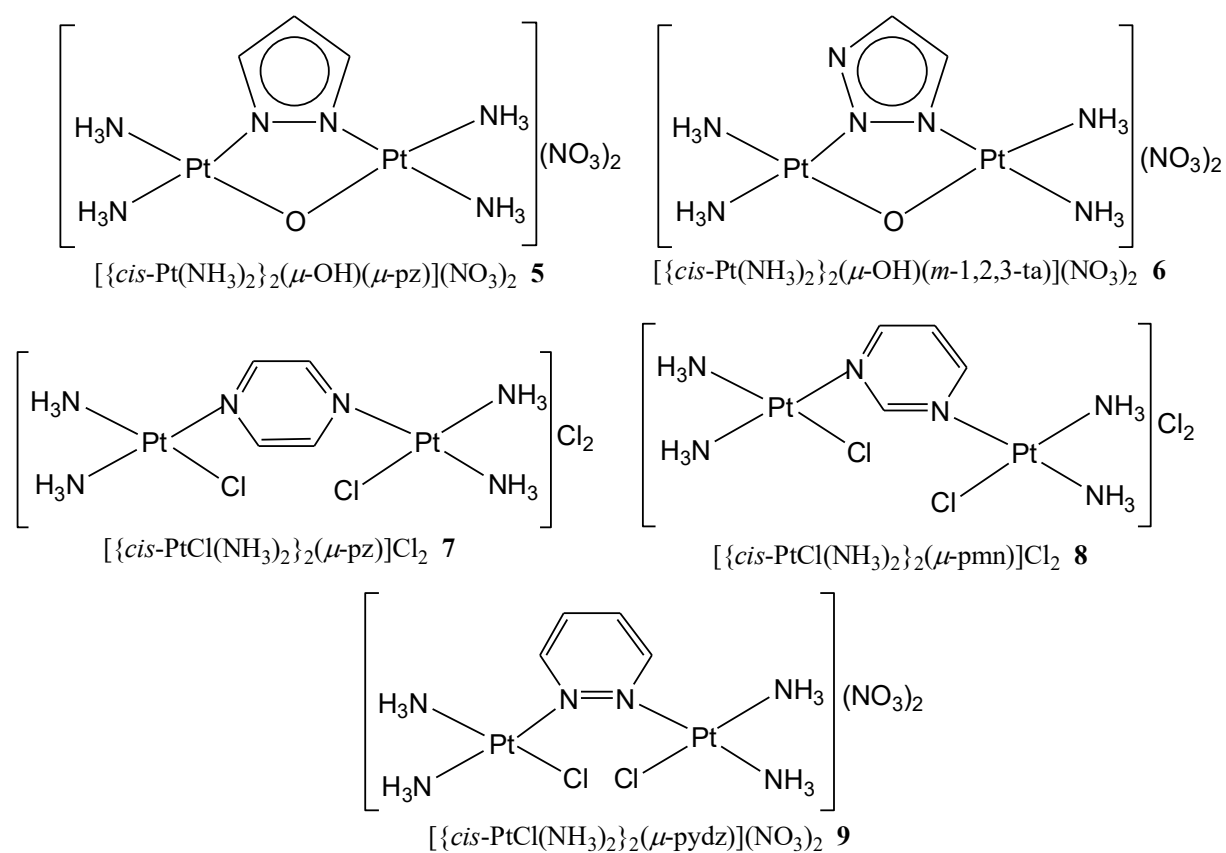


Slika 5. Strukturne formule dinuklearnih i trinuklearnih kompleksa platine(II).

Ispitivanja su pokazala da TriplatinNC i TriplatinNC-A pokazuju mikromolarnu toksičnost prema ćelijama koje su osetljive na cisplatinu i prema kancerogenim ćelijama jajnika koje su rezistentne na cisplatinu [81]. Sposobnost prevazilaženja rezistencije u odnosu na cisplatinu pripisuje se ćelijskoj akumulaciji ovih kompleksa, koja je verovatno posledica njihove katjonske prirode i njihovog specifičnog načina vezivanja za DNK. TriplatinNC indukuje apoptozu posredstvom kaspaze koja zavisi od funkcije p53 i pro-apoptotičnog proteina BAX, na način sličan cisplatinu i BBR3464 kompleksu. TriplatinNC-A indukuje apoptozu koja

zavisi od p53 ili BAX proteina. S obzirom na ulogu p53 i BAX proteina u ćelijskoj smrti koja je izazvana cisplatinom, TriplatinNC-A može imati značajnu kliničku vrednost, ako rezultati mogu biti primenljivi i na *in vivo* modelima.

Sintetisana je serija dinuklearnih kompleksa platine(II) koji kao mostni ligand sadrže diazine i njihove derivate. Dinuklearni kompleksi, prikazani na slici 6, [*cis*-Pt(NH₃)₂(μ-OH)(μ-pz)](NO₃)₂ (kompleks 5) i [*cis*-Pt(NH₃)₂(μ-OH)(μ-1,2,3-ta-N1,N2)](NO₃)₂ (kompleks 6), (pz je pirazin, 1,2,3-ta je 1,2,3-triazol) su pokazali visoku citotoksičnost u *in vitro* uslovima u odnosu na neke kancerogene humane ćelijske linije koje su pokazale rezistentnost na cisplatinu [82,83]. Prisustvo odlazeće hidroksilne (OH⁻) grupe omogućava određenu fleksibilnost Pt–Pt rastojanja, što dovodi do 1,2-unutarlančanog (1,2-d(GpG)) povezivanja sa minimalnom distorzijom DNK.

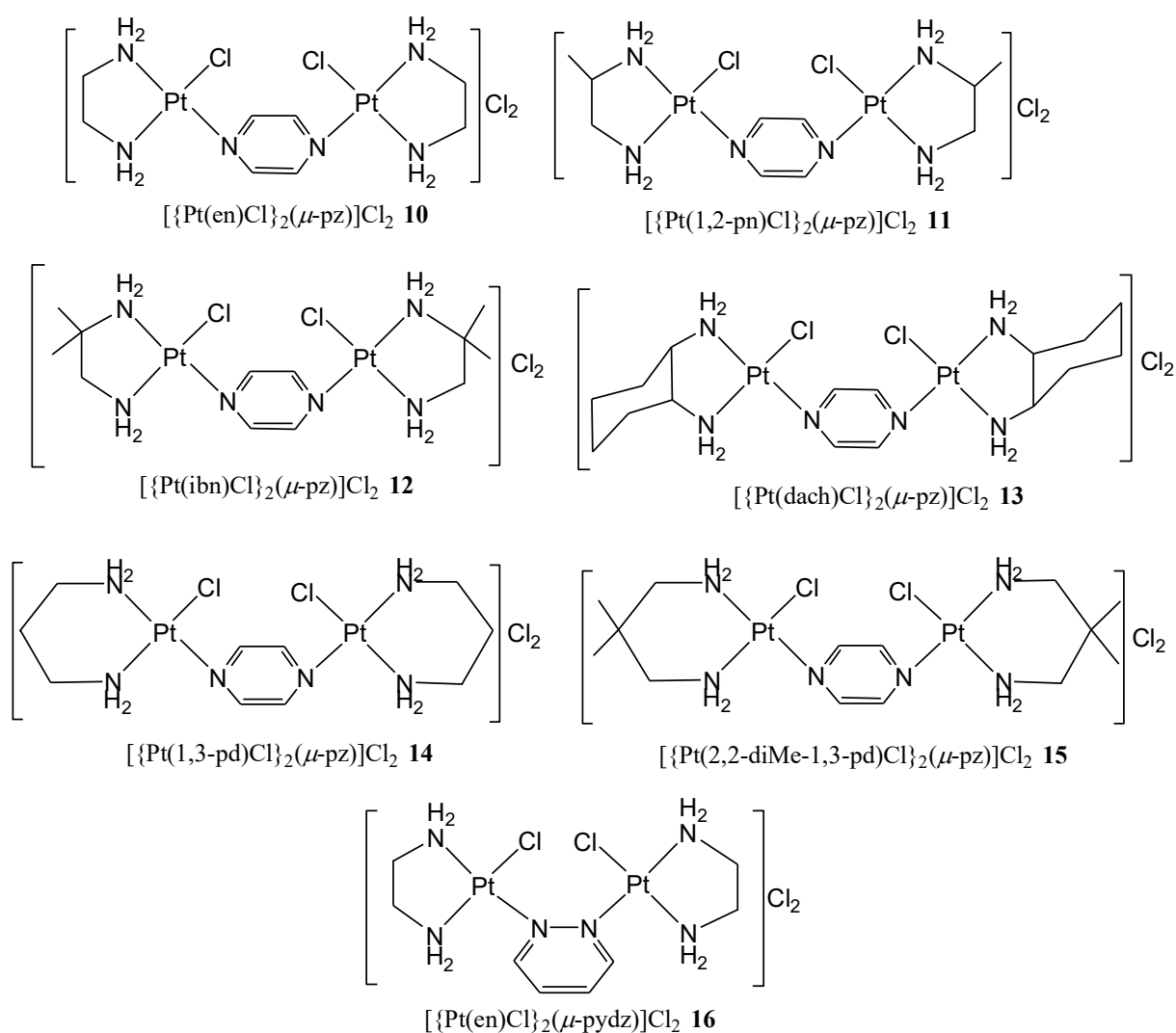


Slika 6. Strukturne formule dinuklearnih kompleksa platine(II) sa azolima i azinima kao mostnim ligandima.

U cilju ispitivanja uticaja Pt–Pt rastojanja u dinuklearnim kompleksima na njihovu citotoksičnost, sintetisana je serija izomernih azina, koji kao mostne ligande sadrže pirazin (pz), pirimidin (pmn) i piridazin (pydz) ([*cis*-PtCl(NH₃)₂Cl]₂(μ-pz)]Cl₂ (kompleks 7), [*cis*-PtCl(NH₃)₂Cl]₂(μ-pmn)]Cl₂ (kompleks 8) i [*cis*-PtCl(NH₃)₂Cl]₂(μ-pydz)](NO₃)₂ (kompleks 9)) [84]. Eksperimenti su rađeni na humanim ćelijskim linijama i na dve L1210 kancerogene ćelijske linije leukemije miševa (jedna osetljiva a druga rezistentna na cisplatinu). Nađeno je

da kompleksi pokazuju manju citotoksičnost u poređenju sa cisplatinom prema humanim ćelijskim linijama, osim prema IGROV ćelijskoj liniji tumora jajnika.

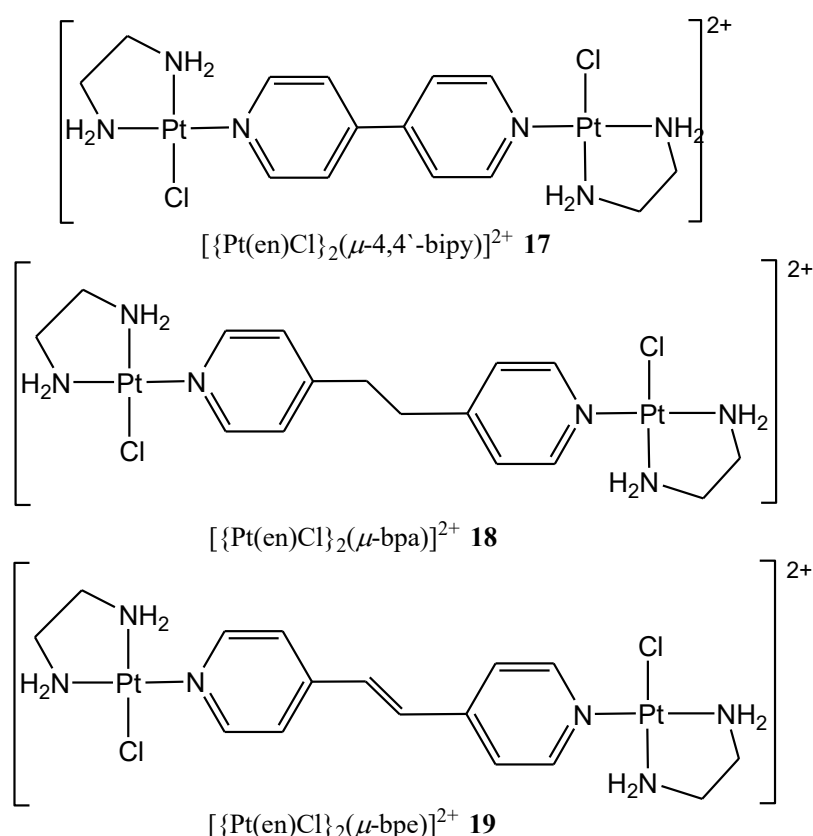
Sintetisana je i strukturno okarakterisana serija dinuklearnih $[\{Pt(L)Cl\}_2(\mu\text{-pz})]^{2+}$ kompleksa, u kojima je L bidentatno koordinovani diaminski ligand (L je etilendiamin, en; (\pm)-1,2-propilendiamin, 1,2-pn; izobutilendiamin, ibn; *trans*-(\pm)-1,2-diaminocikloheksan, dach; 1,3-propilendiamin, 1,3-pd; 2,2-dimetil-1,3-propilendiamin, 2,2-diMe-1,3-pd), kao i $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu\text{-pydz})]^{2+}$ kompleks [85–87]. Primenom rendgenske strukturne analize određene su kristalne strukture $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu\text{-pz})]Cl_2$, $[\{Pt(2,2\text{-diMe-1,3-pd})Cl\}_2(\mu\text{-pz})]Cl_2$ i $Pt(en)Cl\}_2(\mu\text{-pydz})]Cl_2$ kompleksa (Slika 7, kompleksi **10**, **15** i **16**). Ispitivana je i antitumorska aktivnost sintetisanih kompleksa u *in vitro* uslovima na humanim ćelijama fibroplasta pluća (MRC5) i na dve linije kancerogenih ćelija, melanom (A375) i karcinom debelog creva (HTC116).



Slika 7. Strukturne formule dinuklearnih kompleksa platine(II) sa pirazinom, pirimidinom i piridazinom kao mostnim ligandima.

Nađeno je da $[\{\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-pydz})]^{2+}$ kompleks pokazuje antitumorsku aktivnost koja se može porediti sa aktivnošću cisplatinine. Takođe, ispitivanja u *in vivo* uslovima su pokazala da $[\{\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-pydz})]^{2+}$ pokazuje manju embriotoksičnost prema embrionima zebrića (*Danio rerio*) u poređenju sa cisplatinom [88].

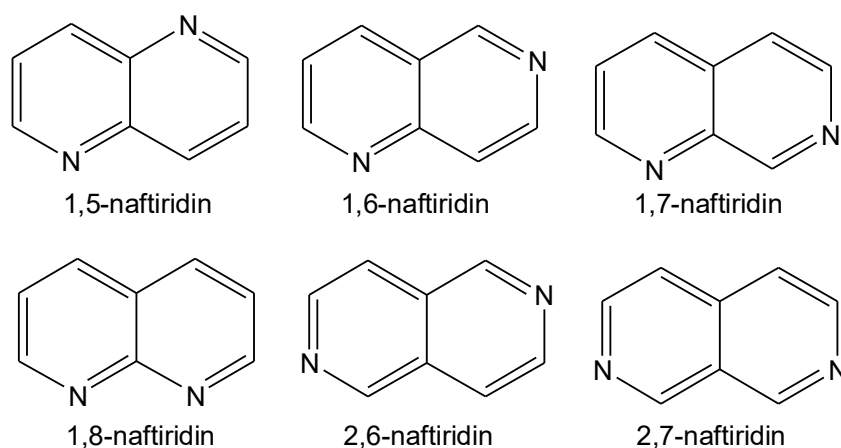
Pored antitumorske aktivnosti dinuklearni kompleksi platine(II) mogu inhibirati i angiogenezu, fiziološki proces koji se karakteriše grananjem i širenjem novih krvnih sudova iz već postojećih, a koji je od vitalnog značaja za rast tumora. Sintetisani su dinuklearni kompleksi platine(II) sa bipiridinima kao mostnim ligandima. Na slici 8 prikazane su strukturne formule dinuklearnih kompleksa koji kao mostne ligande sadrže 4,4'-bipiridin (4,4'-bipy, kompleks 17), 1,2-bis(4-piridil)etan (bpa, kompleks 18) i 1,2-bis(4-piridil)etene (bpe, kompleks 19). Ispitivana je *in vitro* citotoksičnost ovih kompleksa prema humanim ćelijskim linijama karcinoma pluća (A549), melanomu (A375), karcinomu debelog creva (HCT-116), kao i prema normalnoj ćelijskoj liniji fibroplasta pluća (MRC5). Na osnovu IC_{50} vrednosti zaključeno je da ispitivani kompleksi pokazuju neznatan citotoksični efekat prema svim ispitivanim ćelijskim linijama, pri čemu ne pokazuju selektivnost između normalnih i kancerogenih ćelijskih linija. Međutim, kompleks 19 pokazuje dva puta veću citotoksičnost u odnosu na komplekse 17 i 18. Rezultati molekuskog dokinga akva derivata kompleksa 17, 18 i 19 na DNK, su pokazali da ovi kompleksi ostvaruju elektrostatičke interakcije sa fosfatnim grupama DNK, zbog velikog pozitivnog naelektrisanja, premošćavajući mali žljeb. Prema tome, akva kompleksi zbog specifičnog načina vezivanja za DNK u odnosu na hlorido komplekse pokazuju veću antikancerogenu aktivnost [89,90].



Slika 8. Strukturne formule dinuklearnih kompleksa platine(II) sa bipiridinima kao mostnim ligandima.

1.3 Naftiridini

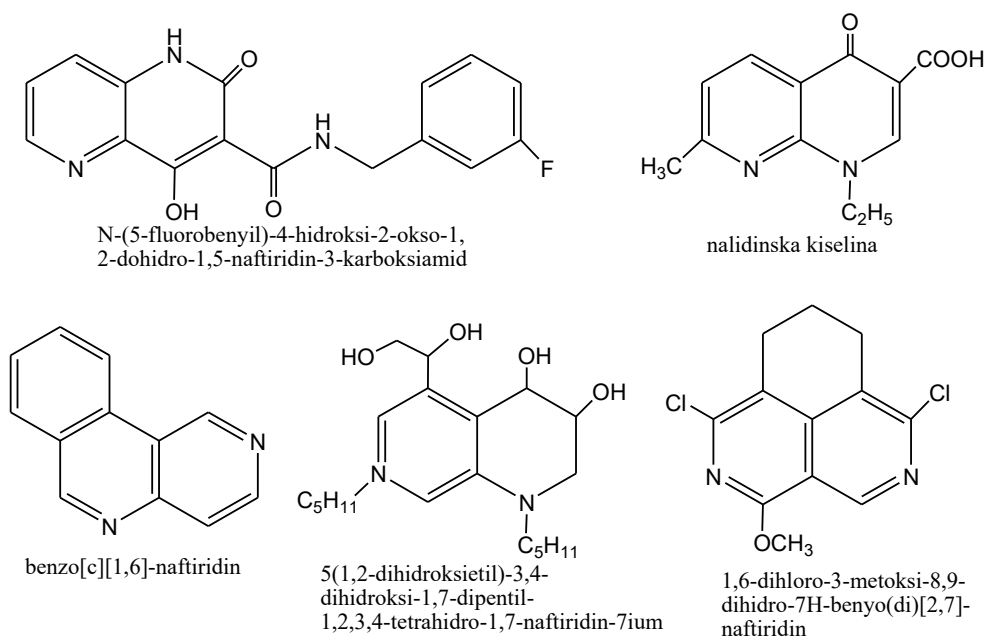
Naftiridini (diazanaftaleni) su heterociklični analozi naftalena u kojima su dva piridinska prstena kondenzovana, sa različitim međusobnim rasporedom atoma azota. Na slici 9 prikazane su strukturne formule šest izomera naftiridina. Prvi derivat 1,8-naftiridina sintetisao je Arnold Reiser (Arnold Reissert) 1893. godine [91]. Tokom godina, ovi kondenzovani piridinski prstenovi dobijali su različite nazive, *piridopiridini*, *benzodiazini*, *diazadikalini* ili po „aza“ sistemu *diazanaftaleni*. Konačno, 1936. godine, ova jedinjenja su indeksirana u *Chemical Abstracts* kao *naftiridini*. Sinteza prvog nesupstituisanog naftiridina (1,5-naftiridina) objavljena je 1927. godine. 1,5-Naftiridin sintetisan je po modifikovanoj Skraupovoj (Skraup) sintezi, po kojoj su hinolini sintetisani polazeći od 3-aminopiridina [92]. Prvi rad o sintezi 1,6-, 1,7- i 2,7-naftiridina objavljen je 1958. godine [93], a sinteza 2,6-naftiridina objavljena je 1965. godine [94,95]. U poslednjih 20 godina objavljeno je preko 600 radova koji se odnose na 1,5-naftiridin, a 400 procedura je zaštićeno patentom.



Slika 9. Strukturne formule izomera naftiridina.

Naftiridini, kao i njihovi derivati, zbog širokog spektra biološke aktivnosti sve više su predmet izučavanja. Na slici 10 prikazane su strukturne formule nekih derivata naftiridina, za koje je utvrđeno da pokazuju biološku aktivnost.

Veliko interesovanje za hemiju 1,5-naftiridina posledica je biološke aktivnosti ovog jedinjenja. 1,5-Naftiridin je pokazao antiproliferativnu, antibakterijsku, antiparazitsku, antivirusnu kao i antiinflamatornu aktivnost. Ovo jedinjenje primenjuje se u kombinaciji sa drugim jedinjenjima za lečenje kardiovaskularnih i hormonskih oboljenja, kao i bolesti centralnog nervnog sistema. Pored toga, 1,5-naftiridin se primenjuje u sintetičkoj neorganskoj i organskoj hemiji kao ligand, zatim kao akceptor vodonika, a ispituju se i mogućnosti njegove primene za proizvodnju dioda koje emituju svetlost (OLED), senzora, poluprovodnika i solarnih ćelija.



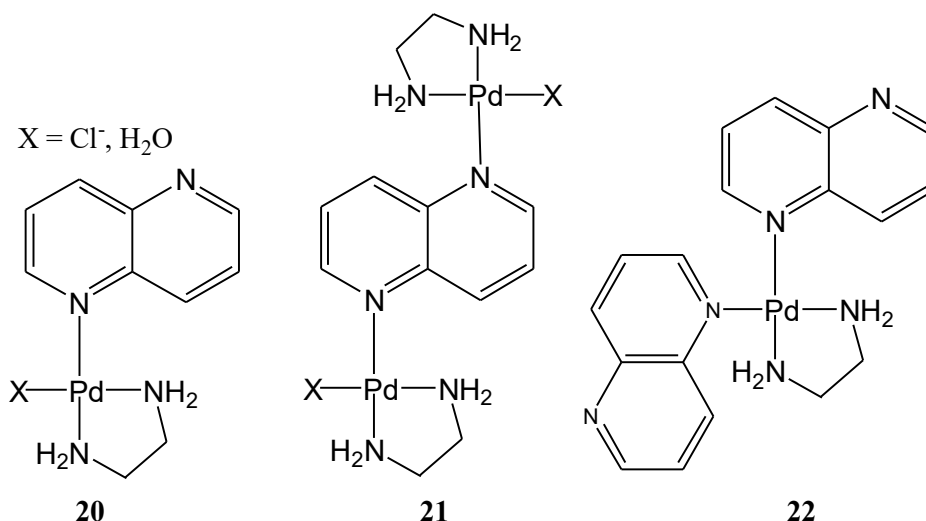
Slika 10. Derivati naftiridina koji pokazuju biološku aktivnost.

1.3.1 Kompleksna jedinjenja sa 1,5-naftiridinom

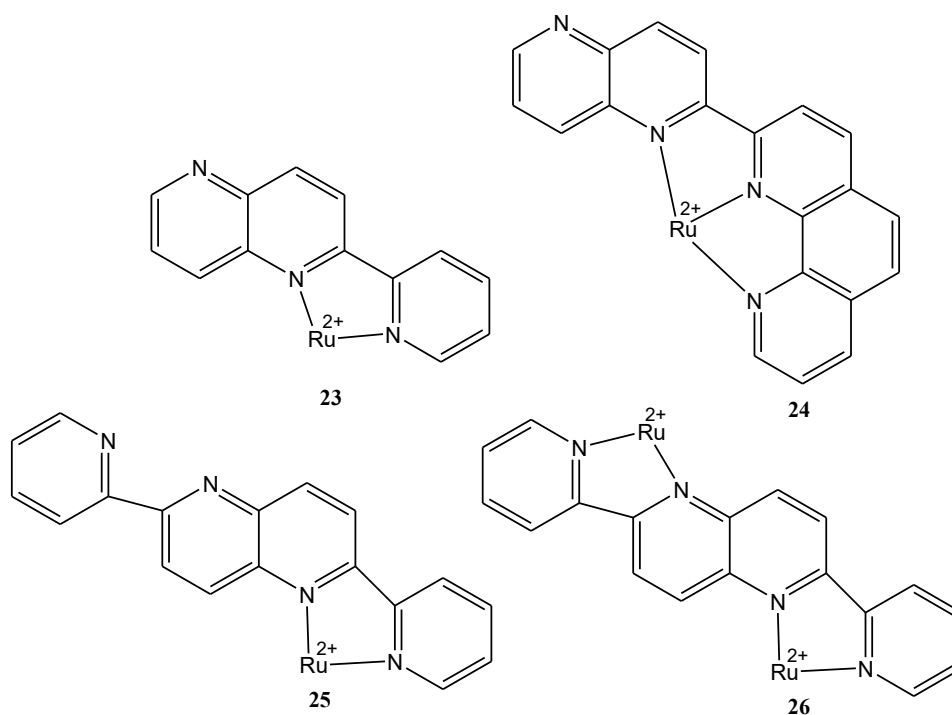
Zbog svoje strukture, odnosno međusobnog položaja atoma azota u 1,5-naftiridinu, ovaj ligand se ne može bidentatno koordinovati za jon metala. Sintetisani su heteroleptički kompleksi platine(II) koji u koordinacionoj sferi imaju dva liganda hidroksinaftiridin i 2-(2,4-difluorofenil)piridin [96,97]. Primenom potenciometrijskih titracija, 1D i 2D ^1H NMR spektroskopije ispitivane su reakcije 1,5-naftiridina sa kompleksima paladijuma(II) u vodenom rastvoru [98]. Na slici 11 prikazane su strukturne formule kompleksa koji nastaju u reakciji 1,5-naftiridina sa $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ ili $[\text{Pd}(\text{en})\text{Cl}_2]$ kompleksima, u 1:2 i 1:1 molskim odnosima (kompleksi **20** i **21**), u vodi kao rastvaraču, kao i oligomerna vrsta koja nastaje u reakciji, kada se reaktanti pomešaju u 2:1 molskom odnosu (kompleks **22**). U zavisnosti od pH vrednosti rastvora identifikovane su različite vrste kompleksa.

U reakciji 1,5-naftiridinskog derivata, koji sadrži *N*-heterociklične supstituente i $[\text{Ru}(\text{bpy-d}_8)_2\text{Cl}_2]$, dobijeni su različiti kompleksi rutenijuma(II) u kojima su derivati 1,5-naftiridina bidentatno ili tridentatno koordinovani [99]. U reakciji 2-(piridin-2-il)-1,5-naftiridin sa ekvivalentnom količinom $[\text{Ru}(\text{bpy-d}_8)_2\text{Cl}_2]$, dobijen je heteroleptički Ru(II) kompleks (Slika 12; kompleks **23**), dok u reakciji 2-(1,5-naftiridin-2-il)-1,10-fenantrolina sa $[\text{Ru}(\text{tpy})_2\text{Cl}_3]$ nastaje kompleks sa tridentatno koordinovanim derivatom 1,5-naftiridina (Slika 12; kompleks **24**). Neki derivati 1,5-naftiridina, koji su disupstituisani, mogu koordinovati jedan ili dva jona metala, pri čemu nastaju mononuklearni ili dinuklearni kompleksi rutenijuma(II), (kompleksi **25** i **26**; Slika 12).

U reakciji AgNO_3 , CF_3COOAg i $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Ag}$ sa 1,5-naftiridinom sintetizovani su polinuklearni srebro(I) kompleksi [100]. 1,5-Naftiridinski kompleksi cinka(II) korišćeni su kao molekuli za povezivanje porfirinskih monomernih jedinica [101]. U ovim kompleksima 1,5-naftiridin je mostni ligand koji povezuje dve Zn-porfirinske jedinice.



Slika 11. Kompleksi paladijuma(II) sa 1,5-naftiridinom koji su okarakterisani u vodenom rastvoru.



Slika 12. Načini koordinovanja derivata 1,5-naftiridina za rutenijum(II).

Sintetisani su kompleksna jedinjenja europijuma sa strukturno rigidnim 4-hidroksi-1,5-naftiridinskim ligandom, kao i sa njegovim derivatima [102]. Europijum(III) jon zbog velikog jonskog poluprečnika ($r = 107 \text{ pm}$) gradi kompleksna jedinjenja sa koordinacionim brojem 8 ili 9 [103]. Bian i saradnici sintetizovali su kompleksno jedinjenje europijuma(III), koje u svojoj strukturi sadrži četiri bidentatno koordinovana 4-hidroksi-1,5-naftiridinska liganda. Ista istraživačka grupa sintetizovala je i kompleksna jedinjenja europijuma(III) sa

tridentatno koordinovanom 8-hidroksi-1,5-naftiridin-2-karboksilnom kiselinom [104] i 6-(difenilfosforil)-4-hidroksi-2-metil-1,5-naftiridinom [105]. Kompleksna jedinjenja dispozijuma(III) sa četiri bidentatno koordinovana 4-hidroksi-8-metil-1,5-naftiridin-3-karbonitrilnim ligandom su sintetizovana i okarakterisana. U spoljašnjoj koordinacionoj sferi ovih kompleksa nalaze se joni alkalijskih metala (Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+) [106].

Već je pomenuto da se primena 1,5-naftiridina, njegovih derivate, kao i kompleksnih jedinjenja, zasniva na njihovoj biološkoj aktivnosti, kao i fizičkim svojstvima. Detaljnim ispitivanjem biološke aktivnosti ovih jedinjenja zaključeno je da se ona mogu primenjivati kao antibakterijski, antiparazitski, antivirusni i antiinflamatorni agensi. Pored toga oni mogu inhibirati neke enzime, delovati kod kardiovaskularnih oboljenja kao i oboljenja centralnog nervnog sistema.

Zahvaljujući fizičkim svojstvima 1,5-naftiridina, kao i njegovih derivata, ova jedinjenja su našla primenu kao senzori, kao emiteri svetlosti (OLED), nalaze se i u solarnim ćelijama, dodaju se kao aditivi litijumskim baterijama, a pored toga imaju i poluprovodničke osobine [107].

1.3.2 Derivati 1,6-naftiridina

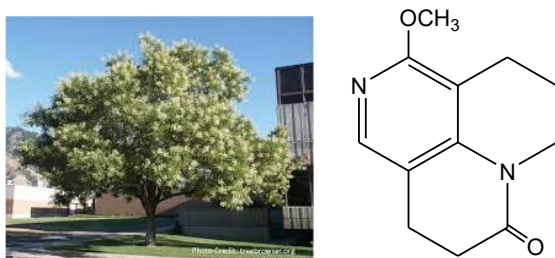
U literaturi nema mnogo podataka o primeni 1,6-naftiridina i njegovih derivata. Pored numeracije atoma azota u položajima 1 i 6, ovaj naftiridin se često označava i kao 2,5-naftiridin. Poslednjih 10 godina hemija 1,6-naftiridina dobija na značaju prvenstveno zbog potvrđene antitumorske aktivnosti njegovih derivata [108]. Evidentan je sve veći interes kako za sintezu tako i za biološka ispitivanja derivata 1,6-naftiridina. Jedinjenja koja sadrže 1,6-naftiridin primenjuju se za lečenje različitih vrsta malignih tumora, zbog njihove antitumorske ili antiproliferativne aktivnosti. U Tabeli 2, prikazane su ćelijske linije na kojima su derivati 1,6-naftiridina pokazali antitumorsku aktivnost. Ova jedinjenja su potencijalni inhibitori većeg broja enzima, kao što su topo-I, mTOR, p38 mitogen-aktivirana protein kinaza, c-Met kinaza, tirozin kinaza slezine (Syk) i proteasoma. Strukturni analog 1,6-naftiridina, kao što je Genz-644282 inhibira rak pluća, debelog creva bubrega i melanoma. Pored toga, nađeno je da derivati 1,6-naftiridina imaju herbicidna, antimikrobna, antiamebična, antianalgetička, antioksidativna

Tabela 2. Ćelijske linije koje su korišćene za ispitivanje antitumorske aktivnosti derivata 1,6-naftiridina.

Jedinjenje	Tip malignog tumora					
	debelo crevo	leukemija	dojka	pluća	grlić materice	melanom
derivati 1,6- naftiridina	HCC-2998					
	Colon 38					
	HT-29	Murine-p388				
	KM20L2	MOLM-13				
	HCT-116	L1210	MDA-MB-435	LLTC		UACC-62
	Colo 205	CPT45	MCF-7	H460	Hela	LOXIMVI
	WiDr	k-562	MGMB	HOP-62		SK-MEL-28
	SNU-C4	RPMI-82261	T-47D	SW1573		
	SW620	THP-1				
	SW480					
	CT38					

i mnoga druga svojstva. Ova jedinjenja sa molekulima DNK ostvaruju interakcije, a deluju i kao inhibitori receptora rasta. Pored toga, ova jedinjenja utiču na aktivnost polnih hormona, pokazuju anti-HIV aktivnost, regulišu krvni pritisak i mnoge druge metaboličke promene [108].

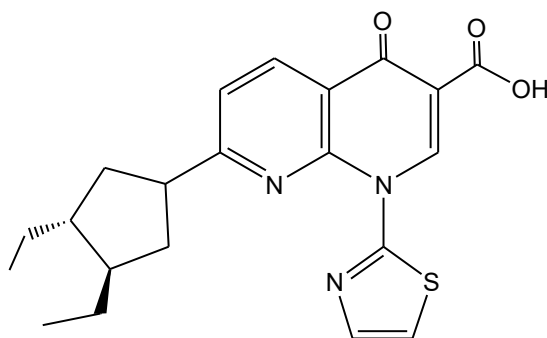
Na slici 13 prikazana je strukturna formula prirodnog proizvoda derivata 1,6-naftiridina, 1-metoksi-4,5,9,10-tetrahidropirido[3,2,1][1,6]-naftiridina-6(8H), koji je izolovan iz korena biljke koja pripada rodu *Sophora*. Dokazano je da ovo jedinjenje pokazuje antibakterijsku aktivnost.



Slika 13. Drvo Pagoda, iz čijeg korena je izolovan 1-metoksi-4, 5, 9, 10-tetrahidroksi[3,2,1] [1, 6]-naftiridin-6(8H).

1.3.3 Derivati 1,8-naftiridina

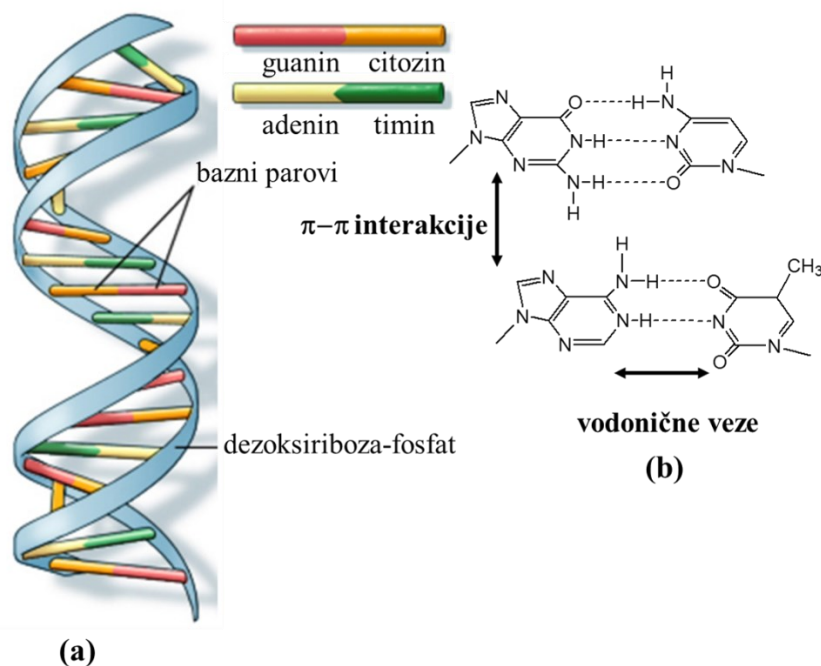
Do sada su najviše izučavani derivati 1,8-naftiridina zbog njegovog antibakterijskog dejstva, koje potiče od nalidinske kiseline. Pored toga, 1,8-naftiridin i njegovi derivati pokazali su se kao dobri ligandi za koordinovanje jona metala. Sintetisani su kompleksi 1,8-naftiridina i njegovih derivata sa različitim jonima metala, kao što su: Cu, Au, Zn, Mo, Re, Hg, Fe, Co, Ni, Ru, Rh, Pd, Pt, Eu i Tr. Derivati 1,8-naftiridina su pokazali biološku aktivnost i to kao anti-HIV, antikancerogeni, antiinflamatorni, antimalarijski, antibakterijski, antiprotozoalni, antimikobakterijski i antitrombocitni agensi. Derivati 1,8-naftiridina, koji imaju supstituente na N1 i C7 atomima, su pokazali i citotoksičnu aktivnost prema kancerogenim ćelijskom linijama leukemije miševa P388. Nađeno je da derivat 1,8-naftiridina, vosaroksina (Slika 14), pokazuje potencijalnu antitumorsku aktivnost i trenutno je u fazi kliničkih ispitivanja. Pretpostavlja se da ovo jedinjenje deluje tako što inhibira topoizomerazu II. Topoizomeraza II je jedna od meta za antitumorske agense poput doksorubicina, etopozida, elipticina i amsakrina [109].



Slika 14. Strukturna formula vosaroksina.

1.4 Dezoksiribonukleinska kiselina

Dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) je biomakromolekul, koji se nalazi u jedru eukariotskih ćelija, nosilac je naslednih informacija, odgovoran za mehanizam genetskih procesa, rast, razvoj i starenje ćelija. Polimer DNK je u obliku dvostruke spirale, čiji su lanci antiparalelni, a izgrađen je od monomernih nukleotida. U sastav nukleotida ulaze purinske (adenin i guanin) i pirimidinske (timin i citozin) baze, monosaharid dezoksiriboza i fosfatna grupa. Kovalentnom, *N*-glikozidnom vezom purinske i pirimidinske baza su vezane za dezoksiribozu, gradeći nukleozide. Nukleozidi su međusobno povezani fosfodiastarskim vezama, gradeći nukleotide. Struktura DNK potvrđena je od strane Votsona (J. Watson) i Krika (F. Crick) 1953. godine. Komplementarni lanci DNK su jedan oko drugog uvijeni gradeći dvostruku spiralu, koja postoji zahvaljujući vodoničnim vezama između adenina jednog i timina drugog lanca, kao i između citozina i guanina (Slika 15a). Pored vodoničnih veza između komplementarnih baza, struktura DNK je stabilizovana i π - π privlačnim (*steking*) interakcijama između hidrofobnih aromatičnih prstenova susednih baza unutar istog lanca (Slika 15b). Nukleinske baze se nalaze unutar dvostruke spirale a hidrofилni deo DNK, polianjonski dezoksiriboza-fosfatni lanac je na spoljnoj strani dvostruke spirale. DNK se javlja u nekoliko polimorfnih oblika, a konformacije A-, B- i Z-DNK su najzastupljenije (Slika 16) [110]. Na konformacione forme DNK ne utiče samo primarni niz, već i drugi faktori, kao što su hidratacija i jonska jačina sredine [111].



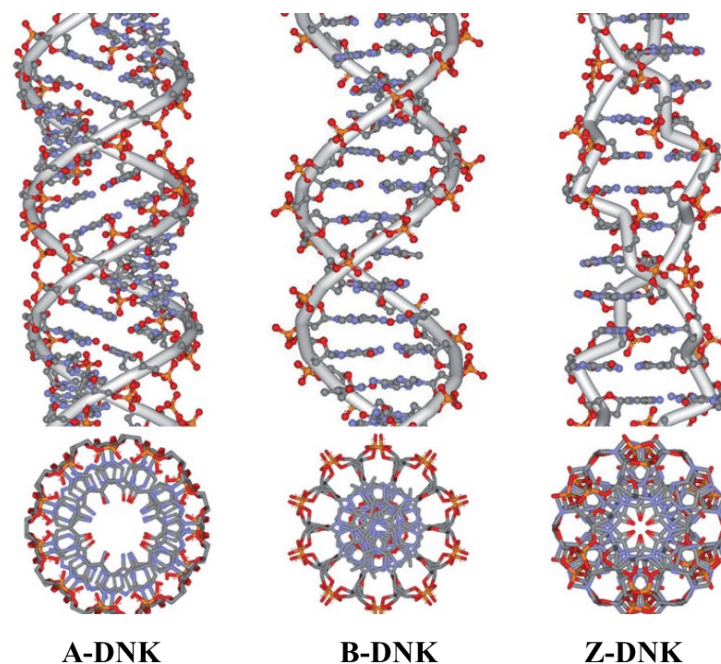
Slika 15. Šematski prikaz dela DNK (a) sa vezama i π - π interakcijama (a,b).

Najzastupljeniji konformer pri fiziološkim uslovima je B-DNK. Ovaj konformer desne orijentacije ima 10 baznih parova po jednom zavoju spirale, sa smaknućem od $36,0^\circ$ po paru, i prečnikom heliksa od 2 nm. Konformacija koja je označena kao A-DNK je nešto šira i kompaktnija. Orijentacija polinukleotidnih lanaca je ista kao kod B-DNK. Ovaj konformer je stabilan pri manjem sadržaju vode u vlaknima ($\approx 75\%$). U rastvorima u kojima je koncentracija

NaCl veća od 2,5 mol/L, DNK poseduje levo orjentisanu konformaciju, koja je označena kao Z-DNK. U ovoj konformaciji dvostruka spirala ima *cik-cak* oblik, po kome je konformacija i dobila ime. Z-DNK konformer je uži u odnosu na A- i B-DNK. Spiralna struktura dva antiparalelno orijentisana lanca formira dva žljeba, mali (*minor groove*) i veliki (*major groove*). Ova dva žljeba se razlikuju ne samo po veličini i sekvenci nukleinskih baza već i po hidrataciji, elektrostatickom potencijalu i položaju vodoničnih veza. Ovi žjebovi su pogodni za vezivanje enzima i lekova [112].

Dezoksiribonukleinska kiselina ima važnu ulogu u ključnim ćelijskim procesima, a mnogi lekovi ispoljavaju svoje dejstvo vezivanjem za DNK. Od otkrića antitumorske aktivnosti cisplatine i njenih analoga velika pažnja je fokusirana na sintezu i ispitivanje antitumorske aktivnosti jedinjenja koja sadrže jone metala. Kompleksna jedinjenja prelaznih metala, zbog njihovih različitih struktura, imaju veliki potencijal da modifikuju DNK kroz različite tipove interakcija. Zbog toga, ova klasa jedinjenja postaje predmet mnogih ispitivanja, sa primenom za ciljanu terapiju.

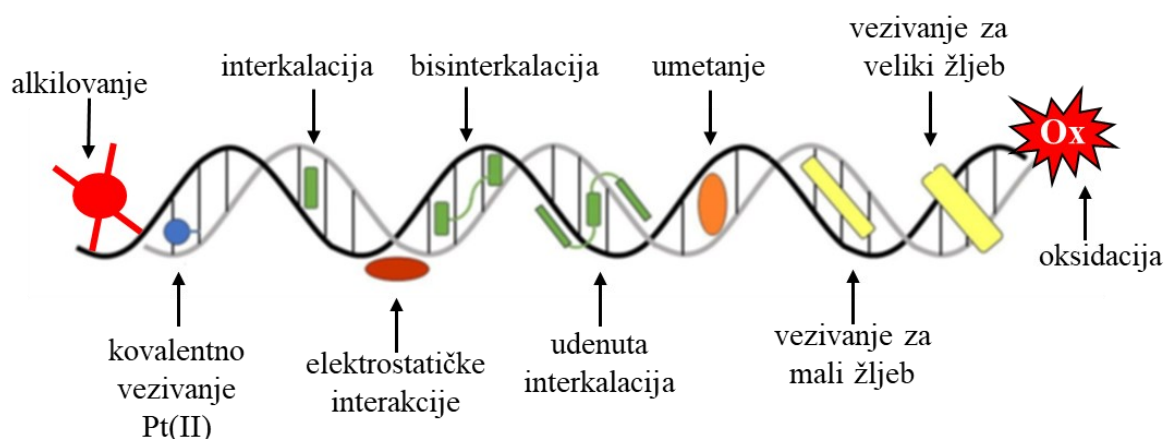
Vezivanjem malih organskih i neorganskih molekula za DNK može se zaustaviti replikacija i transkripcija, odnosno može se usporiti ili sprečiti deoba ćelija [113]. DNK je meta za mnoge terapijski važne lekove, kao što su antibiotici, antivirusni i antitumorski lekovi [114]. Mali molekuli mogu se vezati za DNK i na taj način inhibirati ili kontrolisati određene funkcije. Proučavanje interakcija DNK sa klinički primenjivanim lekovima ili onim koji se nalaze u fazi ispitivanja je veoma značajno, ne samo za razumevanje mehanizma delovanja već i za dizajniranje novih lekova. Međutim, sam mehanizam delovanja leka sa DNK još uvek je relativno malo poznat.



Slika 16. Strukturu polimorfnih oblika A-DNK, B-DNK i Z-DNK [116].

Zbog svoje veličine i složenosti strukture, DNK ima mnogo potencijalnih mesta za vezivanja, kako lekova tako i potencijalnih antitumorskih agenasa. Generalno postoje dva načina vezivanja enzima, lekova ili potencijalnih antitumorskih agenasa za DNK: ireverzibilno

(kovalentno vezivanje) i reverzibilno (nekovalentno vezivanje) Slika 17 [117,118]. Reverzibilno vezivanje zasniva se na nekovalentnim interakcijama između molekula ili jona sa DNK. U ovaj tip interakcija ubrajaju se: elektrostatičke interakcije, vodonične veze, van der Valsove, hidrofobne i aromatične ($\pi-\pi$) interakcije. Prema tome, molekuli ili joni reverzibilno za DNK mogu se vezati elektrostatički (fosfatno vezivanje za kičmu DNK lanca), mogu interkalirati (grade se aromatične ($\pi-\pi$) interakcije sa azotnim bazama između kojih je umetnuta interagujuća vrsta) ili pak se vezivati u mali ili veliki žljeb. Nedavno je nađeno da neki kompleksi rodijuma(III) ostvaruju novi način interakcije sa DNK, koji je označen kao umetanje. Pored ovih načina nađeno je da neki kompleksi metala sa DNK mogu intereagovati na dva ili više načina. Kombinacijom različitih načina vezivanja može se poboljšati kompleks-DNK interakcija, što može dovesti do bolje biološke aktivnosti kompleksa. U Tabeli 3 prikazani su neki molekuli koji sa DNK grade kovalentne veze, interkaliraju ili ulaze u žljebove [119].



Slika 17. Šematski prikaz različitih načini interakcije lekova ili potencijalnih antitumorskih agenasa sa DNK [117].

1.4.1 Kovalentno vezivanje

Kovalentno vezivanje je uobičajen način reakcije DNK sa lekovima koji se upotrebljavaju za lečenje kancerogenih oboljenja. Veza koja se pri tome formira je nepovratna, nastaje hemijskom reakcijom i dovodi do trajne modifikacije genoma, menjajući njegovu strukturu i funkciju. Kovalentno vezivanje dalje se može podeliti na reakcije alkilovanja, koordinovanje platine(II) kompleksa i oksidaciju DNK. Agensi koji alkiluju DNK su lekovi koji se najduže primenjuju u hemioterapiji. U ovu grupu agenasa spadaju azotni i sumporni iperiti, nitrozoureaze, triazeni i etilenimini. Ova jedinjenja reaguju sa nukleofilnim delovima u DNK, kao što su N7 i N1 atomi nukleinskih baza guanina, odnosno adenina, pri čemu nastaju kovalentni adukti, koji inhibiraju replikaciju DNK [118]. Slično ovim organskim molekulima i kompleksi metala, nakon supstitucije liganada sa atomima azota iz nukleinskih baza mogu se kovalentno vezati za DNK. Cisplatina sa DNK formira kovalentne veze, pri čemu nastaju unutarlančani i međulančani adukti (Slika 3). Sličan način reakcija ostvaruju i analozi cisplatine (Slika 1), kao i kompleksna jedinjenja drugih jona metala (Ni(II), Ru(II), Ru(III) itd.).

Tabela 3. Primeri DNK interakcija poznatih agenasa [118].

Nekovalentno		kovalentno vezivanje
vezivanje za žljeb	DNK interkalatori	
berenil	aminoakridini	busulfan
bisbenzimidazol	arilaminoalkoholi	kamptotecin
bleomucin	kumarini	hlorambucil
hlorokvin	cistoditin J	cisplatina
hromomucin A3	diplamin	klomezon
diamido-2-fenilindol	YO-1 i YOYO-1	ciklodizon
distamycin A	daunomicin	jonizujuće zračenje
guanil-bisfuramidin	hinolini i hinoksalini	azotni iperit
mitramicin	etidijum-bromid	nitrozoureaze:
netamicin	proflavin	1,3-bis(hloroetil)-1-
netropsin	ehinomicin	nitrozopureaza; 1-(2-hloroetil)-
fentamidin	hlorfeniramin	3-nitrozoureaza; 1-(2-hloroetil)-3-
pilkamicin	metapirilen	(2,6-diokso-3-piperidil)-1-
SN6999	tamoksifen	nitrozoureaza
SN7167	bis-naftalimid	busulfan
Hoeat 33257	doksorubicin	kamfotecin
	M-AMSA	cisplatina
	indoli	

Različita oksidaciona stanja i koordinacioni brojevi jona metala, kao i mogućnost izbora liganada, omogućavaju sintezu velikog broja kompleksnih jedinjenja, koja mogu imati visok stepen selektivnosti u odnosu na brojne biološke mete. Način interakcija kompleksa metala sa DNK posledica su geometrije i rasporeda liganada u koordinacionoj sferi jona metala. Zbog geometrije cisplatine, dugo se smatralo da samo kompleksi koji imaju kvadratno-planarnu geometriju, mogu da interkaliraju u DNK heliks. Kompleksna jedinjenja kvadratno-planarne geometrije bolji su interkalatori u poređenju sa oktaedarskim i tetraedarskim kompleksima [120]. Potvrđena je sposobnost interkalacije platina(II) kompleksa, koji kao bidentatne ligande sadrže bupiridin (bpy), fenantrolin (phen) ili terpiridin (terpy) [116]. Mononuklearni platina(II) kompleks, $[\text{Pt}(\text{phen})(\text{en})]^{2+}$ (gde je phen = 1,10-fenantrolin, en = etilendiamin) može da interkalira između baznih parova DNK. Međutim, u oktaedarskim kompleksima, kao što je $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{2+}$ ili $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, geometrijski raspored phen liganda može da ometa potpunu interkalaciju. Kompleksno jedinjenje $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ ne može se kovalentno vezati za DNK zbog sternog efekta voluminoznog phen liganda. Ispitivanja u kojima su poređena kompleksna jedinjenja cinka(II) (tetraedarski kompleksi) i kobalta(II) (oktaedarski kompleksi), koja sadrže porfirinski prsten kao ligand, pokazala su da kompleksno jedinjenje kobalta(II) interkalira u DNK, dok je interkalacija kompleksa cinka(II) bila inhibirana prisustvom vode u aksijalnom položaju. Jasno je da različiti kompleksi prelaznih metala mogu na različite načine interagirati sa molekulom DNK.

Posebno su dizajnirani neki Pt(IV) i Ru(II) kompleksi, koji tek nakon fotoaktivacije se kovalentno vezuju za DNK, čime se može kontrolisati citotoksični mehanizam njihovog delovanja. Na ovaj način može se prevazići toksičnost, koja se obično povezuje sa agensima za

alkilovanje DNK, kao i sa cisplatinom i njenim derivatima [118]. Trinuklearni platina(II) kompleks BBR3464 (Slika 5, kompleks 2) sadrži dva hlorido liganda, koji se mogu supstituisati sa atomima azota purinskih ili pirimidinskih baza i na taj način nagraditi kovalentnu vezu sa DNK. Pored toga ovo kompleksno jedinjenje zbog centralnog Pt(II) jona, koji u koordinacionoj sferi sadrži 4 atoma azota, sa DNK može nagraditi vodonočne veze, ili elektrostatičke interakcije zbog +4 naelektrisanja.

U slučaju oksidacije DNK, kovalentno vezivanje je posledica interakcije sa reaktivnim vrstama koje sadrže kiseonik (*reactive oxygen species*, ROS) ili sa oksometalatima. Nastajanje ROS vrsta obično je katalizovano prisustvom jona metala, koji aktivira molekul kiseonika i redukuje ga. U ovom procesu nastaju reaktivni intermedijere, kao što su superoksidi ($O_2^{\bullet-}$) i vodonik-peroksid (H_2O_2), koji mogu dalje reagovati gradeći hidroksilne radikale (HO^{\bullet}) i druge metal-okso vrste [121]. U reakciji ROS-a (ili metal-okso vrsta) sa DNK obično nastaju različite mutagene modifikacije, u zavisnosti od prirode radikala i od nukleobaza, a u reakciji sa dezoksiribozom dolazi do izdvajanja vodonika i stupnjevitih radikalskih reakcija koje se završavaju skraćivanjem heliksa [122].

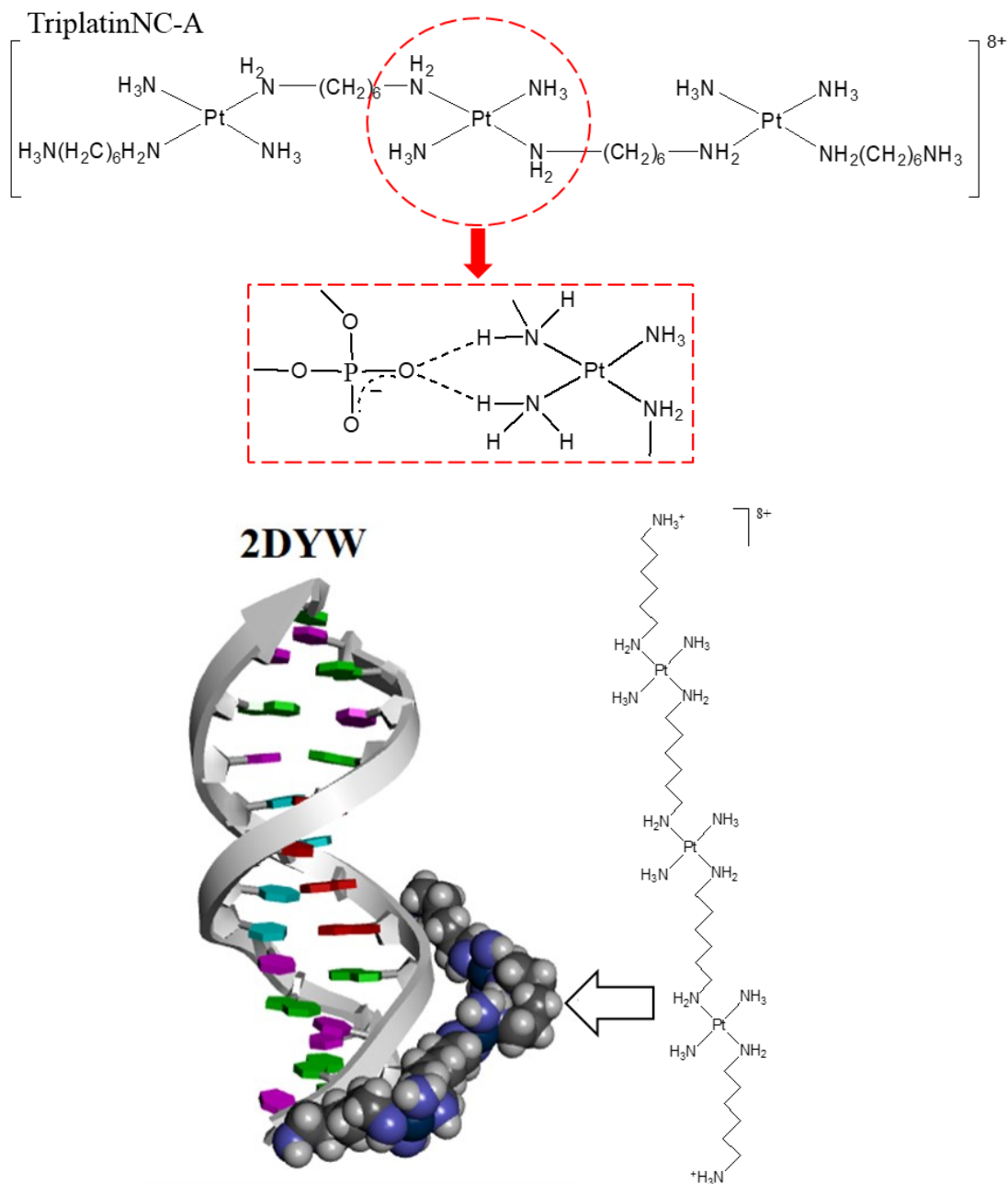
1.4.2 Nekovalentno vezivanje

Nekovalentni način vezivanja može se ostvariti putem elektrostatičkih interakcija, interkalacijom, vezivanjem za mali ili veliki žljeb, umetanjem i udenutom interkalacijom.

Elektrostatičke interakcije. Elektrostatičke interakcije su tip nekovalentnog vezivanja, koji se javlja između malih, pozitivno naelektrisanih jona i negativno naelektrisanja fosfatnih grupa DNK. Katjonske vrste, kao što su joni metala ili poliamini, vezuju se duž DNK skeleta, ostvarujući nespecifične interakcije sa negativnim naelektrisanjem fosfatnih grupa [118]. Elektrostatičke interakcije izazivaju neznatnu promenu u strukturi DNK i obično predstavljaju prvi korak u vezivanju kompleksa metala za DNK. Ovaj tip interakcija zavise od jonske jačine rastvora, i sa njenim opadanjem elektrostatičke interakcije između kompleksnih jona metala ili poliamini sa DNK se smanjuju [119].

Pored elektrostatičkih interakcija, kompleksna jedinjenja i drugi molekuli mogu istovremeno sa atomima kiseonika iz fosfatnih grupa nagraditi vodonične veze (elektrostatički pojačane vodonične veze). Polinuklearni kvadratno-planarni tetraam(m)inski platina(II) kompleksi vezuju se za fosfatne grupe DNK a interakcija je nazvana fosfatno vezivanje. U ovom tipu interakcije aminske N-H grupe grade vodonične veze sa kiseonikovim atomima iz fosfatnih grupa DNK, pri čemu jedan atom kiseonika ostvaruje dve vodonične veze sa am(m)inima koji se nalaze u koordinacionoj sferi platine(II) (Slika 18a). U zavisnosti od toga da li pozitivno naelektrisana vrsta interaguje sa jednim ili dva lanca DNK, ovo vezivanje može da bude unutarlančano ili međulančano. Kada se povezuju fosfatne grupe istog lanca, to vezivanje se naziva unutarlančano fosfatno vezivanje ili vezivanje duž fosfatne kičme (od eng. *backbone tracking*). Kod međulančanog fosfatnog vezivanja razlikujemo dva načina vezivanja, u zavisnosti od toga da li se vezivanje lanaca vrši poprečno ili uzdužno. Kod poprečno fosfatnog vezivanja, pozitivno naelektrisana vrsta interaguje istovremeno sa najviše dve fosfatne grupe sa istog lanca, stoga se ovaj način vezivanja može nazavati premošćavanje žljeba (od eng. *groove spanning*). S druge strane, kod uzdužnog fosfatnog vezivanja, u interakcijama učestvuje tri ili više fosfatnih grupa lanca. Vezana vrsta se pruža duž lanca DNK, prekrivajući žljeb, i istovremeno ometajući prilaz ka njemu. U ovim interakcijama ne učestvuju azotne baze DNK, stoga se ovaj način vezivanja naziva prekrivanje žljeba (od eng. *groove covering*). Ovaj tip interakcije sa DNK ostvaruje trinuklearni kompleks TriplatinNC-A (Slika 5, kompleks 4), koji se vezuje za fosfatne grupe duž istog lanca (ili unutarlančano fosfatno vezivanje, Slika 18b), ili premošćava mali žljeb (od eng. *minor groove spanning*). Primenom metode molekulskog dokinga ispitivane su interakcije kompleksa **17**, **18** i **19** (Slika 8), kao i njihovih akva derivata

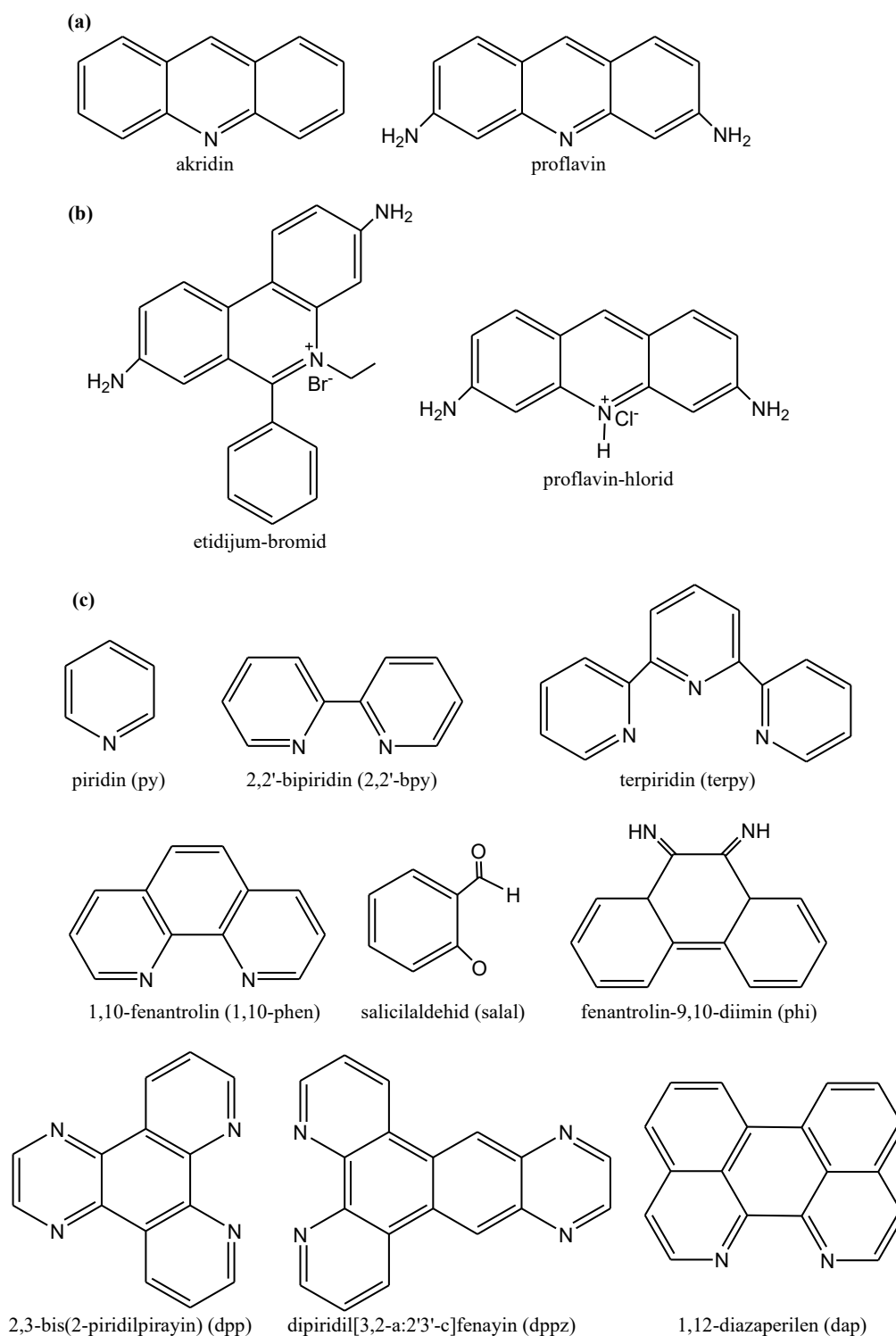
sa DNK. Nađeno je da se hlorido kompleksi vezuju za mali žljeb koji je bogat A-T sekvencom, dok akva derivati, zbog visokog pozitivnog naelektrisanja, ostvaruju elektrostatičke interakcije, koje su prvi put opisane na ovim primerima i nazvane su prekrivanje malog žljeba (od eng. *minor groove covering*).



Slika 18. Šematski prikaz vodoničnih veza koje nastaju između kiseonikovog atoma fosfatnih grupa DNK i amino N-H grupa, koji se nalaze u koordinacionoj sferi platine(II) (a). Prikaz vezivanja TriplatinNC-A duž fosfatne kičme DNK preuzet iz Proitenske baze podataka (PDB), iz kristalne strukture sa pdb kodom 2DYW [75].

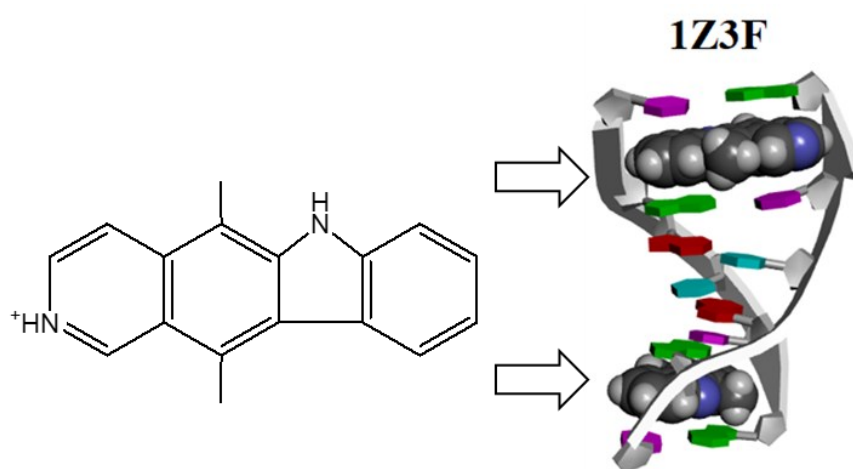
Interkalacija. Početkom 60-ih godina prošlog veka L. S. Lerman (*Leonard Solomon Lerman*) proučavajući načine interakcije akridina i proflavina (Slika 19a) sa DNK, da bi

objasnio jak afinitet ovih molekula za DNK, predložio je novi način interakcije koji je nazvan interkalacija (Slika 19c) [123]. U svojoj strukturi interkalatori obično imaju aromatične



Slika 19. Strukturne formule interkalatora (a, b). Najčešće proučavani interkalirajući ligandi (c).

prstenove koji mogu biti kondenzovani i imaju pozitivno naelektrisanje. Na slici 19b prikazane su strukturne formule interkalatora etidijum-bromida i proflavin-hlorida. Za interkalaciju je karakterističan ulazak planarnih aromatičnih molekula ili liganada između baznih parova DNK sa kojima ostvaruju π - π steking interakcije. Interkalatori pokazuju manju selektivnost u poređenju sa molekulima ili jonima koji ulaze u žljebove (interaguju sa azotnim bazama, ali ne grade sa njima steking interakcije). Dokazano je da postoji specifičan način interakcije aromatičnih prstenova modifikovanih polinuklearnih kompleksa. Interkalacija dovodi do povećanja rastojanja između baznih parova, pri čemu dolazi do distorzije spirale i izduženja DNK, što je praćeno odmotavanjem heliksa [119]. Strukturne modifikacije izazvane interkalatorima mogu dovesti do funkcionalnih promena, kao što je inhibicija transkripcije i replikacije, koje mogu usporiti ili sprečiti rast ćelija. Interkalatori su planarni a njihova prosečna površina je $\approx 28 \text{ \AA}^2$ [116]. Neki od najviše proučavanih liganada, koji imaju svojstva interkalatora prikazani su na slici 19c. Na slici 20 prikazana je struktura klasične interkalacije antitumorskog agensa elipticina za DNK.

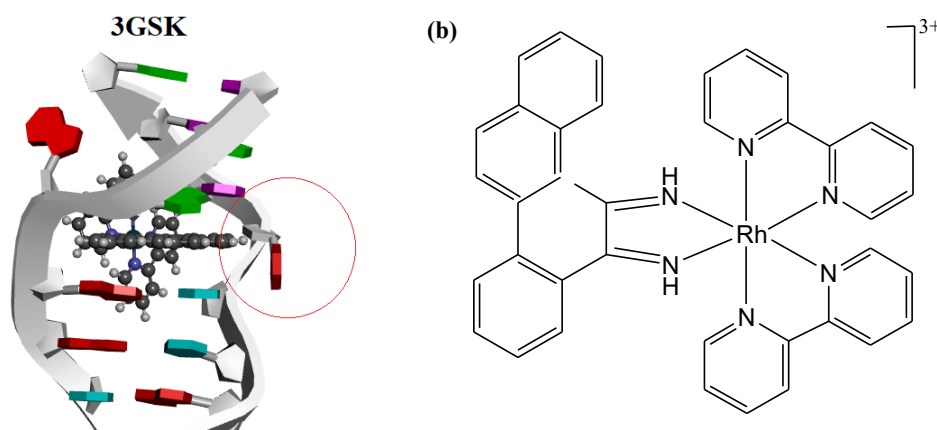


Slika 20. Prikaz klasične interkalacije antitumorskog agensa elipticina za DNK. Preuzet iz Proitenske baze podataka (PDB), iz kristalne strukture sa pdb kodom 1Z3F [124].

Koordinovanjem organskih aromatičnih liganada za jone *d*-metala, nastaje nova klasa interkalatora (metalointerkalatori) [125]. Aromatični ligandi metalointerkalatora interkaliraju između baznih parova zahvaljujući π - π steking interakcijama, dok drugi neinterkalirajući ligandi ovih molekula mogu ostvariti interakcije sa žljebovima, zbog čega je ponekad teško razlikovati interkalaciju i interakciju sa žljebovima. U zavisnosti od strukture, neki metalointerkalatori mogu imati i udenutu interkalaciju (od eng. *threading intercalation*), kod koje planarni deo interagujuće vrste gradi steking interakcije sa azotnim bazama, dok ostatak interaguje sa malim ili velikim žljebom DNK [126].

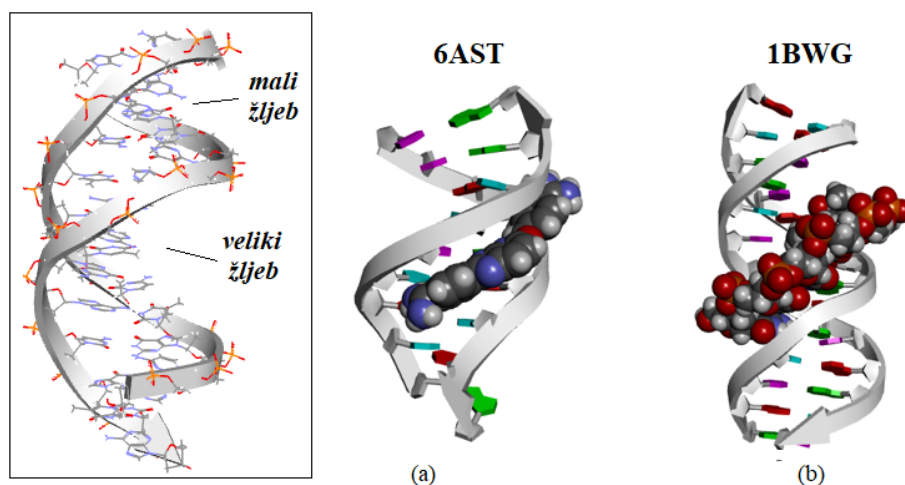
Umetanje. Ovaj tip interakcije kompleksa sličan je interakciji metalointerkalatora sa DNK. Kompleksi metala, koji sadrže planarne ligande, ulaze u DNK putem umetanja a ligand ostvaruje interakcije sa baznim parovima. Međutim, dok metalointerkalatori uzrokuju odmotavanje DNK spirale, jer aromatični ligandi interkaliraju između baznih parova, ova vrsta kompleksa zamenjuje jednu nukleinsku bazu a sa drugom ostvaruje π interakcije (Slika 21a). [125]. Ova vrsta interakcije lako se može prepoznati u *in vivo* uslovima [127]. Kompleks [Rh(bipi)₂(chrisi)] koji ostvaruje ovaj tip interakcije sa DNK prikazan je na slici 21b. Ova vrsta kompleksa može ciljano reagovati sa DNK i predstavlja obećavajuća jedinjenja za primenu u

hemioterapiji, koja imaju potpuno drugačiji mehanizam delovanja u poređenju sa cisplatinom i doksorubicinom.



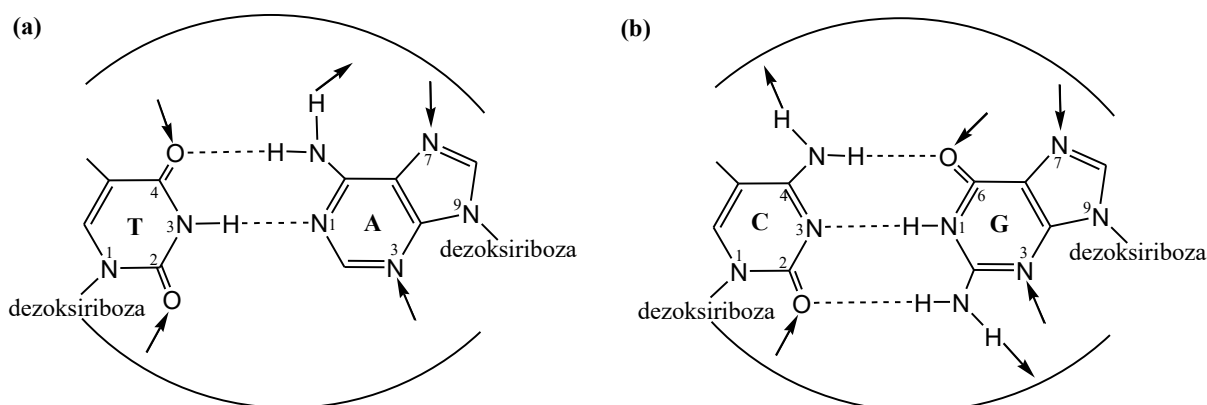
Slika 21. Prikazi strukture u kojoj je [Rh(bipy)₂(chrisi)] (chrisi je 5,6-hrizenhinolindiimin) kompleks umetnut u *stacking* strukturu DNK. Struktura je preuzeta iz Proitenske baze podataka (PDB), iz kristalne strukture sa pdb kodom 3GSK [128] (a). Strukturna formula umetanje, [Rh(bipy)₂(chrisi)] kompleksa (b).

Vezivanje za veliki i mali žljeb. Interakcija molekula ili jona sa malim ili velikim žljebom DNK ostvaruje se zahvaljujući elektrostatičkim, van der Valsovi i hidrofobnim interakcijama kao i građenjem vodoničnih veza (Slika 22) [129]. Mali i veliki žljeb u B-DNK konformaciji razlikuju se u elektrostatičkom potencijalu, mogućnosti građenja vodoničnih veza, sternom efektu i hidrataciji. U poređenju sa malim žljebom, u velikom žljebu se nalazi više funkcionalnih grupa, zbog čega se veliki broj proteina vezuje upravo za ovaj žljeb [130]. Međutim, mali molekuli stupaju u interakcije sa malim žljebom DNK u kome su favorizovane van der Valsove interakcije. Klasični molekuli koji ulaze u mali žljeb sadrže nekondenzovane aromatične prstenove, koji mogu da rotiraju i zauzmu pogodne konformacije za ulazak u ovaj žljeb [131]. Kao što je ranije pomenuto ovaj žljeb je uži i sadrži više A-T od G-C sekvence, tako da mali žljeb poseduje veći elektronegativni potencijal [129,132]. Dodatna specifičnost, a takođe i stabilnost žljebova je posledica intermolekulskih vodoničnih veza (Slika 15).



Slika 22. Prikaz vezivanja antitumorskog agensa u malom (a) i velikom žljebu (b) DNK. Strukture su preuzete iz Proitenske baze podataka (PDB), iz kristalnih struktura sa pdb kodom 6AST (a) i 1BWG (b) [133,134].

Molekuli ili joni koji ulaze u mali žljeb mogu formirati vodonične veze sa A-T parovima, preko kiseonika koji se nalazi u položaju C2 timina i atoma azota N3 adenina (Slika 23a). Međutim, vodonične veze između guanina i citozina u G-C paru inhibiraju vodonično vezivanje malih molekula ili jona za N3 atom guanina (Slika 23b). Postojanje vodonične veze između atoma kiseonika u položaju C2 citozina i amino grupe guanina inhibira ulazak malih molekula ili jona u mali žljeb u položaju G-C para [130,131]. Prirodni antibiotik netropsin zbog svoje strukture vezuje se u malom žljebu, koji je bogat A-T parovima. Pored toga, molekuli kao što su 2-(4-amidino-fenil)-1H-indol-6-karboksamidin (DAPI) i Hoechst 33258 takođe se vezuju u malom žljebu.

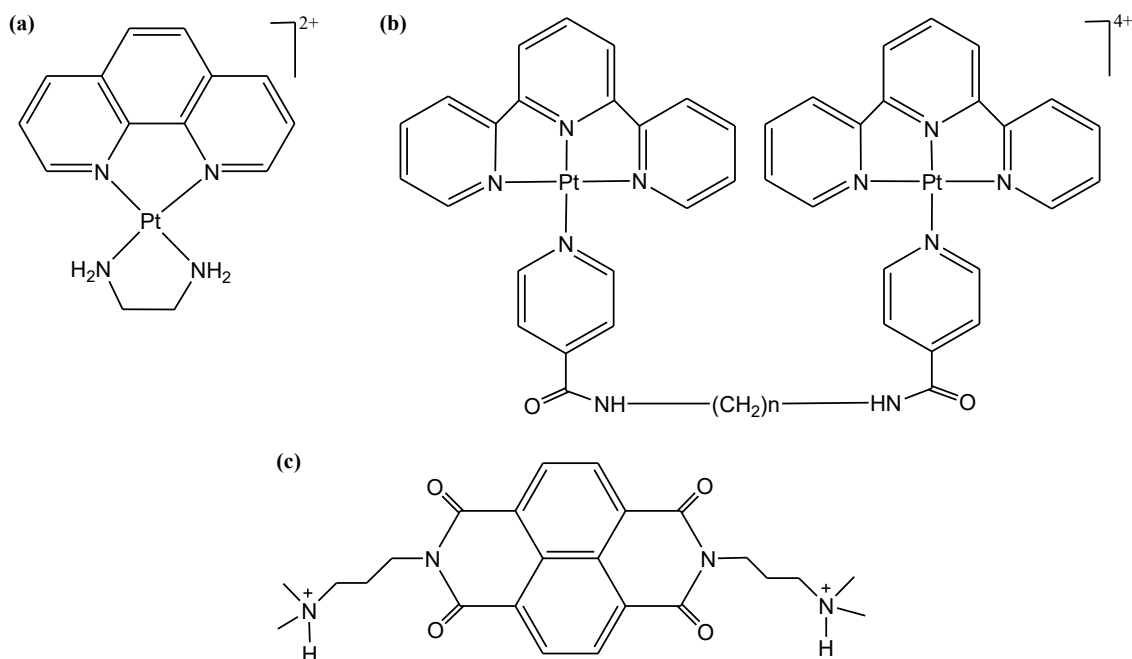


Slika 23. Prikaz parova nukleinskih baza, vodoničnih veza koje oni grade, kao i akceptorskih atoma u malom i velikom žljebu [127].

Kompleksna jedinjenja rutenijuma(II) sa voluminoznim ligandima, kod kojih je favorizovano građenje vodoničnih veza sa DNK, mogu da uđu samo u veliki žljeb. Tako na primer, Λ -[Ru(TMP)₃]²⁺ (TMP = 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolin) i [Ru(phen)₂(11-(9-akridinil)dipirido[3,2-a:20,30-c]fenazin)]²⁺ intereaguju samo sa C-G baznim parovima velikog žljeba. Kompleksno jedinjenje bakra, [Cu(ferocenilmetilbis(2-piridilmetilamin)(dppz)](ClO₄)₂, sa DNK ostvaruje isti način interakcije. Tetrakatsjonski spiralni supramolekulski cilindar, [Fe₂(C₂₅H₂₀N₄)₃]Cl₄ je jedno od prvih kompleksnih jedinjenja za koje je utvrđeno da stupa u interakciju sa velikim žljebom [119].

Dvostruki način vezivanja. Analizom struktura jedinjenja koja se vezuju za DNK, može se zaključiti koje su to strukturne karakteristike za pojedine, gore opisane načine vezivanja. Postojanje aromatičnih prstenova, naročito kondenzovanih, uslov je za interkalaciju molekula, kao što je postojanje jona metala, koja nisu sterno zaklonjena i imaju koordinovane lako odlazeće ligande, uslov za kovalentno vezivanje molekula ili jona za DNK. Pokazalo se da jedinjenja koja imaju višestruko pozitivno naelektrisanje, imaju afinitet da se elektrostatički vežu za fosfatnu kičmu DNK, dok vezivanje za žljeb nema jasno izražene strukturne karakteristike. Pokazano je da voluminozna jedinjenja imaju veći afinitet vezivanja za veliki žljeb. Ukoliko neko jedinjenje poseduje istovremeno dve ili više strukturnih karakteristika, moguće je da ostvare dvostruki način vezivanja za DNK.

Koordinaciono nezasićeni kompleksi ili kompleksi koji sadrže labilne ligande mogu se za DNK vezati istovremeno kovalentnom vezom i interkalirati. Jedan od prvih proučavanih metalinterkalatora je kvadratno-planarni $[\text{Pt}(\text{phen})(\text{en})](\text{NO}_3)_2$ kompleks (phen = 1,10-fenantrolin, en = etilendiamin (Slika 24a) [117]. Na osnovu podataka rendgenske strukturne analize zaključeno je da kompleks reaguje sa DNK na način sličan klasičnom interkalatoru etidijum-bromidu. Interkalacija nije ograničena samo na kvadratno-planarne komplekse. Sposobnost interkalacije kompleksa zavisi od njihove geometrije, simetrije, kao i od sposobnosti liganada da interkaliraju. Oktaedarski kompleksi cinka, iridijuma, gvožđa, kobalta, osmijuma, rodijuma i rutenijuma kao i tetraedarski kompleksi kobalta(II) ($[\text{Co}(\text{phen})_2]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$) su sintetisani i potvrđeno je da sa DNK ostvaruju interakcije tipa interkalacija.

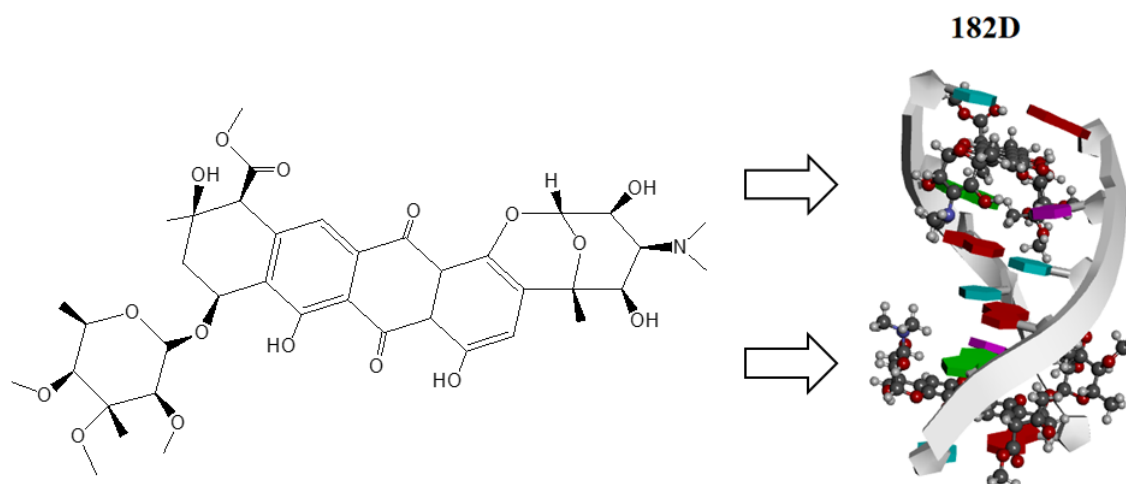


Slika 24. Strukturne formule metalinterkalatora $[\text{Pt}(\text{phen})(\text{en})](\text{NO}_3)_2$ (a), fleksibilnog Pt(II) bisinterkalatora (b) i udenutog interkalatora naftalen-diimid (c).

Bisinterkalacija. Bisinterkalatori su bifunkcionalni molekuli, koji u svojoj strukturi sadrže dva aromatična interkalirajuća prstena, koji su povezani alifatičnim lancem i imaju sposobnost istovremene interkalacije (Slika 24b). Ovi molekuli često se jače vezuju za DNK u poređenju sa monointerkalatorima [130]. Povećanjem broja aromatičnih prstenova, može se postići veća selektivnost i specifičnost vezivanja za DNK. Pored toga, alifatični niz, koji povezuje dva aromatična dela ovih molekula, mogu sa DNK nagraditi vodonične veze, van der Valsove interakcije ili ući u žljebove [117].

Udenuta interkalacija. Specifičan način interakcije molekula ili jona sa DNK, koji mogu istovremeno da interkaliraju, dok se ostatak molekula vezuje unutar žljeba. Planarni deo molekula izgleda kao da je uđenut u *stejing* arhitekturu DNK, dok preostali deo viri izvan *stejing* strukture, interagujući sa žljebom. Stoga je ovaj način vezivanja nazvan udenuta interkalacija. Ovaj tip interkalatora često sadrži voluminozne grupe, koje su obično i pozitivno naelektrisane. Aromatični deo ovih interkalatora, interkalira između baznih parova, dok se

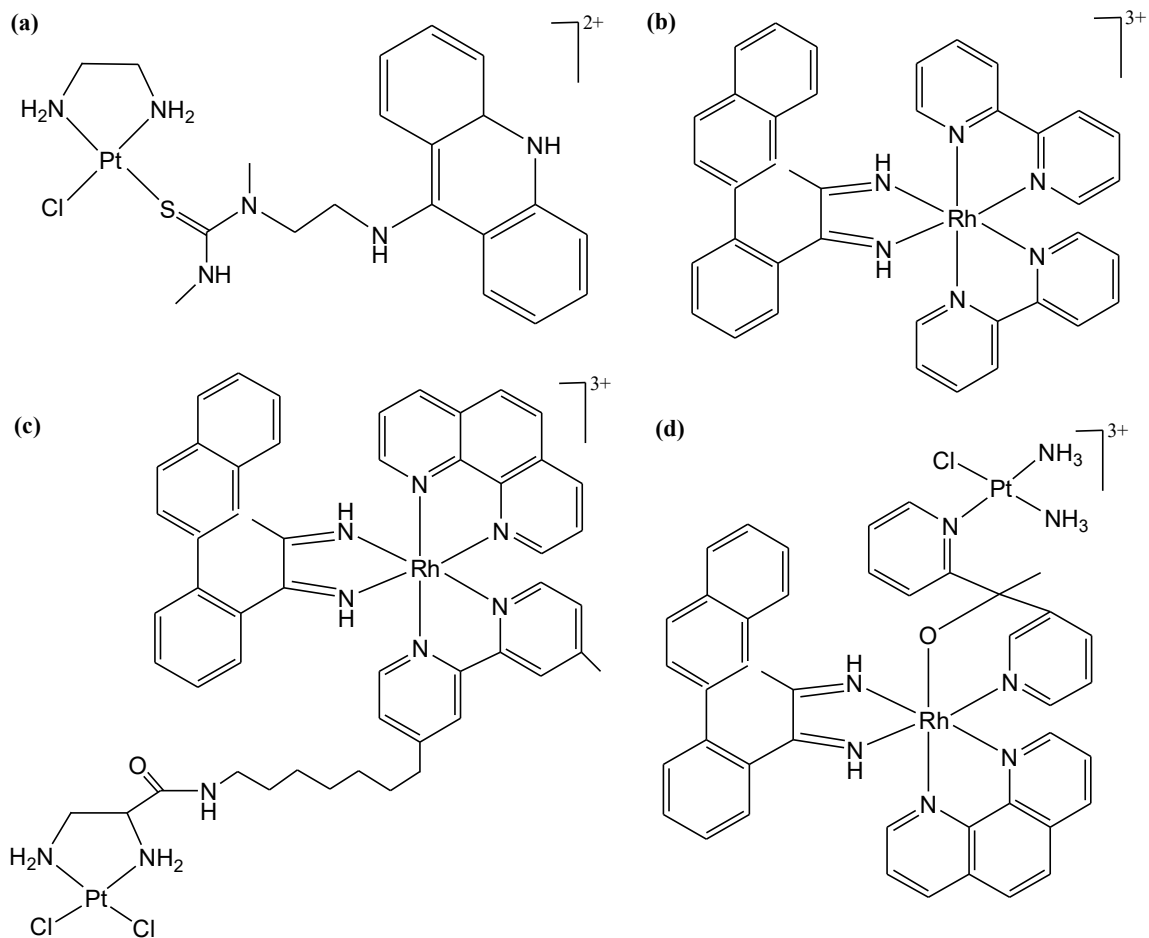
katjonski supstituenti vezuju za mali i veliki žljeb, a u nekim slučajevima i sa fosfatnom kičmom. Naftalen diimid je tipičan primer ovog tipa interkalatora i njegova struktura prikazana je na slici 24c. Ovaj tip interkalacije dovodi do znatnih strukturnih promena u DNK, koje su praćene raskidanjem vodoničnih veza ili π - π interakcija. Sporija disocijacija ovih interkalatora u poređenju sa klasičnim može imati važnu ulogu u inhibiciji transkripcije i replikacije DNK. Prirodni antraciklin antibiotik nogalamicin, veoma sporo disosuje i pokazuje visok stepen citotoksičnosti [117]. Nogalamicin ima šećerne jedinice na oba kraja planarne aglikonske hromofore (Slika 24). Šećerne jedinice nisu planarne, zbog čega ne učestvuju u interkalaciji. Potvrđeno je da kod ove strukture, šećerne jedinice interruguju i sa malim i sa velikim žljebom (Slika 24). Da bi došlo do interkalacije, DNK mora ili da se privremeno otvori ili savija duž ose heliksa da bi omogućila umetanje hromofora između parova baza. Konformaciona promena nogalamicina je primećena u aduktu sa DNK, posmatrano u odnosu na slobodni nogalamicin. Vezivanje nogalamicina za DNK izaziva ozbiljnu deformaciju baznih parova interkalacionog mesta, u geometrijama vodoničnog vezivanja leka i stepenu hidratacije. Položaj leka u ovom aduktu je stabilizovan brojnim nekovalentnim interakcijama, uključujući van der Valsove interakcije i vodonične veze sa rastvaračem i DNK heliksom.



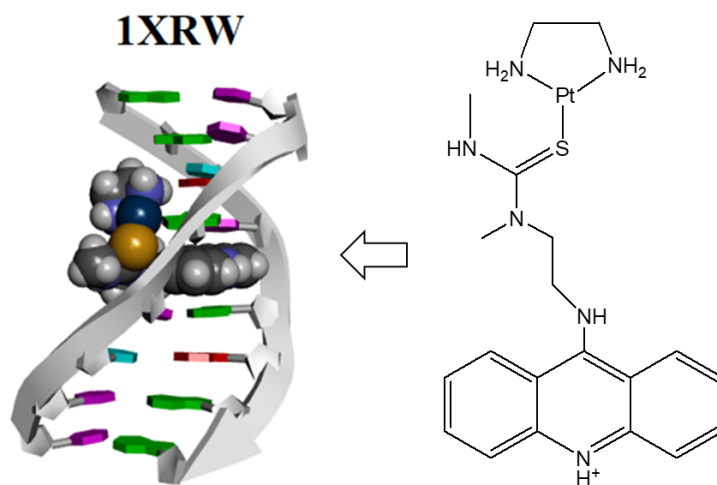
Slika 24. Prikazi strukture nogalamicina i nogalamicin-DNK adukta, kod koje se lek vezuje za DNK preko udenute interkalacije. Struktura adukta je preuzeta iz Proitenske baze podataka (PDB), iz kristalnih struktura sa pdb kodom 182D [135].

Koordinacija i interkalacija. Kompleksi metala koji imaju aromatične ligande, za DNK se mogu vezati kovalentno (jon metala) ili interkalirati (aromatični ligand). Tipičan primer kompleksa koji u reakciji sa DNK se kovalentno vezuje i interkalira je $[\text{PtCl}(\text{en})(\text{ACRAMTU})](\text{NO}_3)_2$, (ACRAMTU je 1-[2-(akridin-9-ilamino)etil]-1,3-dimetiltiourea, Slika 25a). Ovo kompleksno jedinjenje sa DNK formira monofunkcionalne adukte, sa istovremenom interkalacijom akridinske hromofore između baznih parova koji se nalaze u neposrednoj blizini mesta koordinovanja (Slika 26).

Koordinovanjem za N7 atom guanina i interklacijom u veliki žljeb nastaje dominantni Pt/DNK adukt (80%). Pored ovog načina $[\text{PtCl}(\text{en})(\text{ACRAMTU})](\text{NO}_3)_2$ kompleks se može vezati i za N3 atom iz adenina i interkalirati u mali žljeb (20%). Ovaj način interakcije potvrđen je primenom NMR spektroskopije. U ovim reakcijama ne formiraju se bifunkcionalni adukti sa DNK, ne dolazi do spiralnog savijanja, ali u blizini mesta kordinovanja primećeno je odmotavanje heliksa [117].



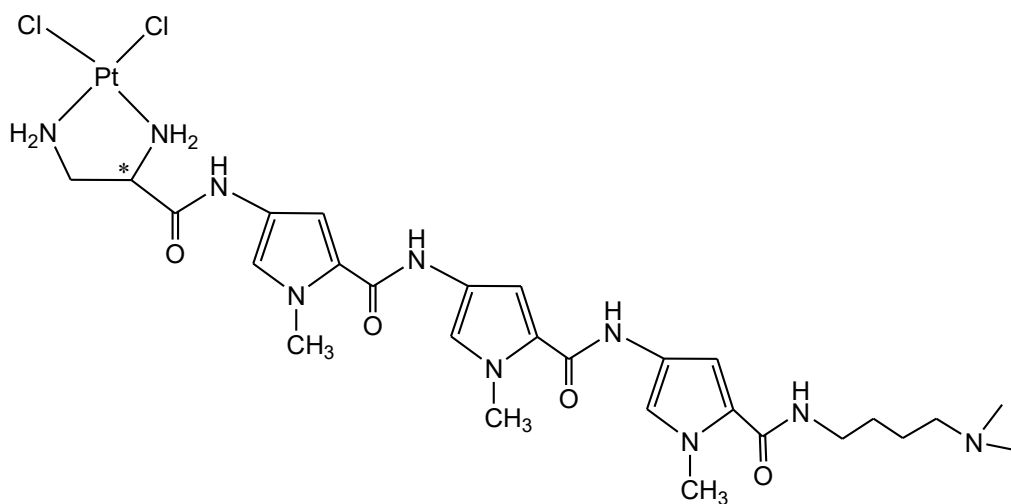
Slika 25. Strukturne formule kompleksa koji sa DNK ostvaruju dvostruki način vezivanja - koordinacija i interkalacija, $[PtCl(en)(ACRAMTU)]^{2+}$ (a), umetanje, $[Rh(bpi)_2(chrisi)]$ (b), koordinacija i umetanje, dinuklearni mešoviti kompleks Rh(III)/Pt(II) (c i d).



Slika 26. Prikazi strukture u kojoj [PtCl(en)(ACRAMTU)] kompleks istovremeno interkalira i koordinaciono se vezuje za DNK. Struktura je preuzeta iz Proitenske baze podataka (PDB), iz kristalne strukture sa pdb kodom 1XRW [136].

Koordinovanje i umetanje. Dinuklearni mešoviti kompleks rodijuma(III) (Slika 25c) i platine(II) je prvi sintetisani kompleks za koji je nađeno da se za DNK može kovalentno vezati i istovremeno umetati. Platina(II) se kovalentno vezuje, a deo kompleksa koji sadrži rodijum(III) sa DNK ostvaruje interakciju umetanjem. U kompleksnom jedinjenju [Rh(chrisi)(phen)(DPE-PtCl(NH₃)₂)]Cl₃, gde je DPE = 1,1-di(piridin-2-il)etanol (Slika 25d), Pt(II) jon može sa DNK nagraditi samo jednu kovalentnu vezu, a ispitivanja su pokazala da to nije N7 atom guanina već N3 adenina u malom žljebu [132].

Koordinovanje i vezivanje u žljebove. Modifikovanjem kompleksnih jedinjenja, koja su strukturno slična cispladini, može se postići dvostruka interakcija sa DNK i to putem kovalentnog vezivanja i vezivanjem pogodnih liganada u žljebove. Na slici 27 prikazano je kompleksno jedinjenje platine(II) sa distamicinom, koji se slično netropsinu vezuje za mali žljeb [117].



Slika 27. Strukturna formula kompleksnog jedinjenja platine(II) sa distamicinom (* - hiralni C-atom).

2. PREDMET ISTRAŽIVANJA

Naučna istraživanja u okviru ove doktorske disertacije obuhvataju sinteze i karakterizacije dinuklearnih kompleksa platine(II), koji kao mostne ligande sadrže 1,5-naftiridin (1,5-nphe) ili 1,6-naftiridin (1,6-nphe), ispitivanje njihovih interakcija sa biološki važnim molekulima (DNK, BSA, HSA i *N*-acetilovanim metionil-glicinom (Ac-L-Met-Gly)), primenu molekuskog dokovanja, kao i biološka ispitivanja. Zadaci u okviru ovih istraživanja su:

1. Sinteza dinuklearnih kompleksa platine(II), opšte formule $[\{Pt(L)Cl\}_2(\mu-X)](ClO_4)_2$, gde je X 1,5-naftiridin (1,5-nphe, **Pt1-Pt7**) ili 1,6-naftiridin (1,6-nphe, **Pt8** i **Pt9**) mostni ligand. Ligand L je $2NH_3$ (amminski ligand) u **Pt1** i **Pt8** kompleksima ili bidentatno koordinovani diaminski etilendiamin (en, **Pt2** i **Pt9**), (\pm)-1,2-propilendiamin (1,2-pn, **Pt3**), *trans*-(\pm)-1,2-diaminocikloheksan (dach, **Pt4**) 1,3-propilendiamin (1,3-pd, **Pt5**), 2,2-dimetil-1,3-propilendiamin (2,2-diMe-1,3-pd, **Pt6**) i (\pm)-1,3-pentandiamin (1,3-pnd, **Pt7**). Karakterizacija kompleksa izvršiće se primenom spektroskopskih metoda, UV-Vis (ultravioletna-vidljiva spektrofotometrija), NMR (1H i ^{13}C) (nuklearno-magnetno-rezonantna spektroskopija), IR (infra-crvena spektroskopija) i MS (masene spektrometrije, **Pt1-Pt7**).
2. Primenom UV-Vis spektrofotometrije i fluorescentne spektroskopije ispitiće se interakcije sintetisanih kompleksa sa CT-DNK (**Pt1-Pt9**), BSA (**Pt8** i **Pt9**) i HSA (**Pt2**, **Pt3** i **Pt5**). Rekcije akva derivata **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa (**Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w**) sa *N*-acetilovanim metionil-glicinom (Ac-L-Met-Gly) ispitiće se primenom 1H NMR spektroskopije.
3. Metodom molekuskog dokovanja ispitiće se načini interakcija dinuklearnih platina(II) kompleksa sa DNK, HSA i BSA. Metodom kvanto-mehaničkih proračuna NMR spektara ispitiće se načini koordinovanja i reakcije **Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w** kompleksa sa Ac-L-Met-Gly.
4. Citotoksični potencijal **Pt1-Pt7** kompleksa u *in vitro* uslovima ispitiće se na tumorskim ćelijskim linijama miševa, karcinom dojke (4T1), debelog creva (CT26) i pluća (LLC1), kao i na zdravim ćelijskim linijama (humane ćelije fibroblasta pluća (MRC-5) i mezenhimalne matične ćelije miša (MSC) izolovane iz koštane srži). Citotoksični potencijal **Pt8** i **Pt9** kompleksa u *in vitro* uslovima ispitiće se na tumorskim ćelijskim linijama miševa (karcinom dojke (4T1) i debelog creva (CT26)), kao i na humanim tumorskim ćelijskim linijama (karcinom dojke (MDA-MB-468), debelog creva (HCT-116) i pluća (A549)). Predviđeno je i ispitivanje na zdravim mezenhimalnim matičnim ćelijama miša (MSC).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Hemikalije i reagensi

Kalijum-tetrahloridoplatinat(II) ($K_2[PtCl_4]$), etilendiamin (en), (\pm)-1,2-propilendiamin (1,2-pn), *trans*-(\pm)-1,2-diaminocikloheksan (dach), 1,3-propilendiamin (1,3-pd), 2,2-dimetil-1,3-propilendiamin (2,2-diMe-1,3-pd), (\pm)-1,3-pentandiamin (1,3-pnd), 1,5-naftiridin (1,5-nphe), 1,6-naftiridin (1,6-nphe), dezoksiribonukleinska kiselina izolovana iz grudne žlezde teleta (CT-DNK), goveđi serum albumin (BSA), humani serum albumin (HSA), 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinium bromid (ethidium-bromid, EtBr), fosfatni pufer (PBS, pH 7,4; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl) i deuterijum-oksidi (D_2O) su komercijalno dostupne hemikalije i nabavljene su od Sigma-Aldrich Chemical Co. Sve hemikalije upotrebljene u ovom radu bile su analitičkog stepena čistoće. Dipeptid L-metionilglicin (L-Met-Gly) nabavljen je od kompanije Bachem A. G. Terninalna amino grupa u ovom dipeptide acetilovana je po postupku koji je publikovan u literaturi [137]. Mononuklearni kompleksi *cis*- $[PtCl_2(NH_3)_2]$, $[Pt(L)Cl_2]$ (L je en, 1,2-pn, dach, 1,3-pd, 2,2-diMe-1,3-pd, 1,3-pnd), koji su upotrebljeni kao polazne supstance za sintezu odgovarajućih dinuklearnih kompleksa platine(II) sintetisani su po modifikovanim postupcima koji su publikovani [138-140]. Sastav i čistoća kompleksa provereni su primenom elementalne mikroanalize, UV-Vis spektrofotometrije (ultravioletna-vidljiva spektrofotometrija) kao i NMR (1H i ^{13}C) (nuklearno-magnetno-rezonantna spektroskopija) i IR spektroskopije (infra-crvena spektroskopija). Bidestilovana voda koja je demineralizovana (otpornost $> 10 M\Omega \cdot cm$) upotrebljena je za pripremanje rastvora.

3.2 Fizička merenja

Za merenje pH vrednosti korišćen je pH-metar Mettler Toledo Seven Copmact S220-U, koji je kalibrisan u odnosu na Metler Toledo puferske rastvore za pH = 4,0 i pH = 7,0. Sva pH merenja su rađena na 25 °C.

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

Elektronski apsorpcioni spektri (UV-Vis) su snimljeni na Shimadzu UV-Vis spektrofotometru, koji je opremljen sa termostatom u kvarcnim kivetama Suprasil debljine 1,00 cm. Koncentracije rastvora dinuklearnih platina(II) kompleksa bile su $5 \cdot 10^{-5}$ M. UV-Vis spektri

su snimani u opsegu od 200 nm do 400 nm na 25 °C. Eksperimentalni rezultati su obrađivani primenom kompjuterskog programa Microsoft Office Excel.

Fluorescentna merenja su rađena na RF-1501 PC spektrofotometru (Shimadzu, Japan). Ekscitacija i emisija rastvora snimane su na 10 nm.

Infra-crveni (IR) spektri su snimljeni na Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR spektrometru, primenom KBr tehnike. Spektri su snimani u opsegu od 450 – 4000 cm⁻¹.

Nuklearno-magnerno rezonantni (NMR) ¹H i ¹³C spektari snimljeni su u deuterisanoj vodi (D₂O) kao rastvaraču uz primenu trimetil-sililpropan-3-sulfonat (TSP) kao referentnog standarda (¹H na 200 MHz, ¹³C na 50 MHz)). Spektri su snimani na Varian Gemini 200 MHz spektrometru. Hemijska pomeranja su data u ppm, a konstante kuplovanja u hercima (Hz).

Masena spektroskopija visokog razlaganja (HRMS) sintetisanih jedinjenja je izvršena na Agilent 6224 Accurate Mass TOF LC/MS masenom spektrometru na Univerzitetu u Ljubljani.

3.3 Sinteza dinuklearnih kompleksa platine(II)

Sintetisani dinuklearni platina(II) kompleksi su opšte formule [$\{Pt(L)Cl\}_2(\mu-X)](ClO_4)_2$. Kada je X mostni 1,5-naftiridinski ligand (1,5-nphe), L je 2NH₃ (**Pt1**), en (**Pt2**), 1,2-pn (**Pt3**), dach (**Pt4**), 1,3-pd (**Pt5**), 2,2-diMe-1,3-pd (**Pt6**) ili 1,3-pnd (**Pt7**), dok u slučaju kada je X mostni 1,6-naftiridinski ligand (1,6-nphe), L je 2NH₃ (**Pt8**), odnosno en (**Pt9**). Kompleksi su sintetisani po postupcima koji su opisani u literaturi, polazeći od mononuklearnih *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] kompleksa, odnosno [Pt(L)Cl₂] kompleks [84,85,141,142].

Sintetisani mononuklearni *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] i [Pt(L)Cl₂] kompleksi su prevedeni u odgovarajuće monodimetilforamid komplekse, *cis*-[PtCl(NH₃)₂(DMF)]⁺, odnosno u [Pt(L)Cl(DMF)]⁺ kompleks. U suspenziju koja sadrži 0,30 mmol *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], odnosno [Pt(L)Cl₂] kompleksa u dimetilformamidu (DMF) dodato je 49,26 mg (0,29 mmol) AgNO₃, molski odnos Pt(II):AgNO₃ = 1:0,98. Reakciona smeša ostavljena je na mešalici u mraku za vreme od 24 h. Talog AgCl odvojen je ceđenjem a rastvor svetlo-žute boje koji sadrži *cis*-[PtCl(NH₃)₂(DMF)]⁺ odnosno [Pt(L)Cl(DMF)]⁺ kompleksni jon upotrebljen je za sintezu odgovarajućih dinuklearnih kompleksa platine(II), koji sadrže 1,5- odnosno 1,6-naftiridinski mostni ligand. U dimetilformamidu rastvoreno je 19,5 mg (0,15 mmol) 1,5-naftiridina ili 1,6-naftiridina. U ovaj rastvor dodat je rastvor koji sadrži *cis*-[PtCl(NH₃)₂(DMF)]⁺ ili [Pt(L)Cl(DMF)]⁺ kompleksni jon. Reakciona smeša ostavljena je na mešalici u mraku za vreme od 24 h. Nakon uparavanja rastvarača na rotacionom vakuum uparivaču, suvi ostatak je ispran nekoliko puta etrom, a zatim je rastvoren u vodenom rastvoru LiClO₄ (0,5 M). Iz dobijenog rastvora izdvojio se talog žute boje, dinuklearnih kompleksa platine(II), koji je odvojen ceđenjem, ispran metanolom, a zatim etrom i osušen pod standardnim uslovima. Prinos dinuklearnih [$\{Pt(L)Cl\}_2(\mu-X)](ClO_4)_2$ kompleksa bio je između 35 i 64%. Čistoća i sastav kompleksa potvrđeni su primenom elementalne mikroanalize, NMR (¹H i ¹³C) i IR spektroskopije, kao i UV-Vis spektrofotometrije. Struktura **Pt1–Pt7** dodatno je potvrđena i primenom ESI-HRMS spektroskopije.

Izračunato za [*cis*-{PtCl(NH₃)₂}₂(μ-1,5-nphe)](ClO₄)₂ (**Pt1**) (C₈H₁₈N₆Cl₄O₈Pt₂: Mr = 858,23): C, 11,20%; H, 2,11%; N, 9,79%. Nađeno: C, 11,13%; H, 2,19%; N, 9,65%. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ, ppm): 8,24 (dd, 2H, C3H, C7H), 9,69 (d, 2H, C4H, C8H), 10,38 (d, 2H, C2H, C6H). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O, δ, ppm): 130 (C3,C7), 147 (C4,C8), 147 (C4a,C8a), 161 (C2,C6). IR (KBr, ν, cm⁻¹): ~3299, 3225 (ν_{as}(N-H)); 1622, 1514 (C=N/C=N 1,5-naftiridin);

1093, 1083, 625 (ClO₄⁻). UV-Vis (H₂O, λ_{max}, nm): 317 (ε = 10,5·10³ M⁻¹cm⁻¹). ESI-HRMS (CH₃CN): [[{PtCl(NH₃)₂}₂(μ-1,5-nphe)]ClO₄]⁺ (*m/z* = 758,97), [PtCl(NH₃)₂(μ-1,5-nphe)]⁺ (*m/z* = 395,04), [{PtCl(NH₃)₂}₂(μ-1,5-nphe)]²⁺ (*m/z* = 328,51), [PtCl(NH₃)₂]⁺ (*m/z* = 262,98).

Izračunato za [{Pt(en)Cl}₂(μ-1,5-nphe)](ClO₄)₂ (**Pt2**) (C₁₂H₂₂N₆Cl₄O₈Pt₂: Mr = 910,31): C, 15,83%; H, 2,44%; N, 9,23%. Nađeno: C, 15,48%; H, 2,56%; N, 8,99%. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ, ppm): 8,17 (m, 2H, C3H, C7H), 9,61 (d, 2H, C4H, C8H), 10,25 (d, 2H, C2H, C6H). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O, δ, ppm): 129 (C3,C7), 141 (C4,C8), 147 (C4a,C8a), 159 (C2,C6). IR (KBr, ν, cm⁻¹): ~ 3280-3197 (ν_{as}(N-H)); 1631, 1586, 1511 (C=N/C=N 1,5-naftiridin); 1145, 1089, 626 (ClO₄⁻). UV-Vis (H₂O, λ_{max}, nm): 317 (ε = 11,0·10³ M⁻¹cm⁻¹). ESI-HRMS (CH₃CN): [[{Pt(en)Cl}₂(μ-1,5-nphe)]ClO₄]⁺ (*m/z* = 811,00), [Pt(en)Cl(μ-1,5-nphe)]⁺ (*m/z* = 421,05 [{Pt(en)Cl}₂(μ-1,5-nphe)]²⁺ (*m/z* = 354,03), [Pt(en)Cl]⁺ (*m/z* = 290,00).

Izračunato za [{Pt(1,2-pn)Cl}₂(μ-1,5-nphe)](ClO₄)₂ (**Pt3**) (C₁₄H₂₆N₆Cl₄O₈Pt₂: Mr = 938,36): C, 17,92%; H, 2,79%; N, 8,96%. Nađeno: C, 17,73%; H, 2,66%; N, 8,89%. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ, ppm): 8,16 (d, 2H, C3H, C7H), 9,58 (m, 2H, C4H, C8H), 10,22 (d, 2H, C2H, C6H). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O, δ, ppm): 130 (C3,C7), 142 (C4,C8), 147 (C4a,C8a), 161 (C2,C6). IR (KBr, ν, cm⁻¹): ~235, 3144, 3068 (ν_{as}(N-H)); 1590, 1514 (C=N/C=N 1,5-naftiridin); 1105, 1087, 626 (ClO₄⁻). UV-Vis (H₂O, λ_{max}, nm): 317 (ε = 9,7·10³ M⁻¹cm⁻¹). ESI-HRMS (CH₃CN): [[{Pt(1,2-pn)Cl}₂(μ-1,5-nphe)]ClO₄]⁺ (*m/z* = 839,03), [Pt(1,2-pn)Cl(μ-1,5-nphe)]⁺ (*m/z* = 435,07), [{Pt(1,2-pn)Cl}₂(μ-1,5-nphe)]²⁺ (*m/z* = 370,04), [Pt(1,2-pn)Cl]⁺ (*m/z* = 303,02).

Izračunato za [{Pt(dach)Cl}₂(μ-1,5-nphe)](ClO₄)₂ (**Pt4**) (C₂₀H₃₄N₆Cl₄O₈Pt₂: Mr = 1018,49): C, 23,59%; H, 3,36%; N, 8,25%. Nađeno: C, 23,29%; H, 3,42%; N, 8,36%. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ, ppm): 8,16 (m, 2H, C3H, C7H), 9,58 (m, 2H, C4H, C8H), 10,23 (m, 2H, C2H, C6H). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O, δ, ppm): 130 (C3,C7), 142 (C4,C8), 147 (C4a,C8a), 161 (C2,C6). IR (KBr, ν, cm⁻¹): ~ 3273, 3231 (ν_{as}(N-H)); 1595, 1513 (C=N/C=N 1,5-naftiridin); 1170, 1095, 624 (ClO₄⁻). UV-Vis (H₂O, λ_{max}, nm): 317 (ε = 10,5·10³ M⁻¹cm⁻¹). ESI-HRMS (CH₃CN): [[{Pt(dach)Cl}₂(μ-1,5-nphe)]ClO₄]⁺ (*m/z* = 919,09), [Pt(dach)Cl(μ-1,5-nphe)]⁺ (*m/z* = 475,10), [{Pt(dach)Cl}₂(μ-1,5-nphe)]²⁺ (*m/z* = 409,07), [Pt(dach)Cl]⁺ (*m/z* = 343,05).

Izračunato za [{Pt(1,3-pd)Cl}₂(μ-1,5-nphe)](ClO₄)₂ (**Pt5**) (C₁₄H₂₆N₆Cl₄O₈Pt₂: Mr = 938,36): C, 17,92%; H, 2,79%; N, 8,96%. Nađeno: C, 17,81%; H, 2,84%; N, 8,85%. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ, ppm): 8,18 (m, 2H, C3H, C7H), 9,58 (d, 2H, C4H, C8H), 10,27 (d, 2H, C2H, C6H). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O, δ, ppm): 130 (C3,C7), 142 (C4,C8), 148 (C4a,C8a), 161.2 (C2,C6). IR (KBr, ν, cm⁻¹): ~ 3241, 3135 (ν_{as}(N-H)); 1599, 1590, 1510 (C=N/C=N 1,5-naftiridin); 1096, 1080, 623 (ClO₄⁻). UV-Vis (H₂O, λ_{max}, nm): 317 (ε = 12,3·10³ M⁻¹cm⁻¹). ESI-HRMS (CH₃CN): [[{Pt(1,3-pd)Cl}₂(μ-1,5-nphe)]ClO₄]⁺ (*m/z* = 839,03), [Pt(1,3-pd)Cl(μ-1,5-nphe)]⁺ (*m/z* = 435,07), [{Pt(1,3-pd)Cl}₂(μ-1,5-nphe)]²⁺ (*m/z* = 370,04), [Pt(1,3-pd)Cl]⁺ (*m/z* = 303,02).

Izračunato za [{Pt(2,2-diMe-1,3-pd)Cl}₂(μ-1,5-nphe)](ClO₄)₂ (**Pt6**) (C₁₈H₃₄N₆Cl₄O₈Pt₂: Mr = 995,05): C, 21,74%; H, 3,45%; N, 8,45%. Nađeno: C, 21,54%; H, 3,52%; N, 8,69%. ¹H NMR (200 MHz, D₂O, δ, ppm): 8,16 (dd, 2H, C3H, C7H), 9,57 (d, 2H, C4H, C8H), 10,27 (d, 2H, C2H, C6H). ¹³C NMR (50 MHz, D₂O, δ, ppm): 130 (C3,C7), 142 (C4,C8), 148 (C4a,C8a), 161 (C2,C6). IR (KBr, ν, cm⁻¹): ~ 3255 (ν_{as}(N-H)); 1603, 1514 (C=N/C=N 1,5-naftiridin); 1174, 1089, 625 (ClO₄⁻). UV-Vis (H₂O, λ_{max}, nm): 316 (ε = 9,0·10³ M⁻¹cm⁻¹). ESI-HRMS (CH₃CN): [[{Pt(2,2-diMe-1,3-pd)Cl}₂(μ-1,5-nphe)]ClO₄]⁺ (*m/z* = 895,10), [Pt(2,2-diMe-1,3-pd)Cl(μ-1,5-nphe)]⁺ (*m/z* = 463,10), [{Pt(2,2-diMe-1,3-pd)Cl}₂(μ-1,5-nphe)]²⁺ (*m/z* = 397,07), [Pt(2,2-diMe-1,3-pd)Cl]⁺ (*m/z* = 331,05).

Izračunato za $[\{\text{Pt}(1,3\text{-pnd})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt7**) ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{O}_8\text{Pt}_2$: Mr = 995,05): C, 21,74%; H, 3,45%; N, 8,45%. Nađeno: C, 21,54%; H, 3,52%; N, 8,69%. ^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ , ppm): 8,17 (m, 2H, C3H, C7H), 9,58 (m, 2H, C4H, C8H), 10,23 (m, 2H, C2H, C6H). ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O , δ , ppm): 130 (C3,C7), 142 (C4,C8), 147 (C4a,C8a), 161 (C2,C6). IR (KBr, ν , cm^{-1}): ~ 3233 ($\nu_{\text{as}}(\text{N-H})$); 1595, 1514 (C=N/C=N 1,5-naftiridin); 1093,1080, 623 (ClO_4^-). UV-Vis (H_2O , λ_{max} , nm): 317 ($\epsilon = 11,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). ESI-HRMS (CH_3CN): $[[\{\text{Pt}(1,3\text{-pnd})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})]\text{ClO}_4]^+$ ($m/z = 895,10$), $[\text{Pt}(1,3\text{-pnd})\text{Cl}(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})]^+$ ($m/z = 463,10$), $[\{\text{Pt}(1,3\text{-pnd})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})]^{2+}$ ($m/z = 397,07$), $[\text{Pt}(1,3\text{-pnd})\text{Cl}]^+$ ($m/z = 331,05$).

Izračunato za $[\text{cis-}\{\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-}1,6\text{-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt8**) ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{O}_8\text{Pt}_2$: Mr = 858,23): C, 11,20; H, 2,11; N, 9,79. Nađeno: C, 11,33; H, 2,19; N, 9,88%. ^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ , ppm): 7,96 (dd, C3H), 8,90 (d, C8H), 9,09 (d, C4H), 9,52 (d, C7H), 9,68 (d, C2H), 9,84 (s, C5H). ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O , δ , ppm): 128 (C3), 129 (C8, C4a), 140 (C4), 152 (C7) 152 (C2), 156 (C8a), 161 (C2), 165 (C5). IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3433 ($\nu_{\text{as}}(\text{N-H})$) 3210, 3099 ($\nu_{\text{s}}(\text{N-H})$); 1631, 1584 (C=N/C=N 1,6-naftiridin); 1108, 1086, 626 (ClO_4^-). UV-Vis (H_2O , λ_{max} , nm): 320 ($\epsilon = 5,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Izračunato za $[\{\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,6\text{-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt9**) ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{Cl}_4\text{O}_8\text{Pt}_2$: Mr = 910,31): C, 15,83; H, 2,44; N, 9,23. Nađeno: C, 15,97; H, 2,49; N, 9,34%. ^1H NMR (200 MHz, D_2O , δ , ppm): 7,90 (dd, C3H), 8,86 (d, C8H), 9,01 (d, C4H), 9,39 (d, C7H), 9,62 (d, C2H), 9,78 (s, C5H). ^{13}C NMR (50 MHz, D_2O , δ , ppm): 125 (C3), 127 (C8, C4a), 143 (C4), 152 (C7), 155 (C8a), 161 (C2), 165 (C5). IR (KBr, ν , cm^{-1}): 3467 ($\nu_{\text{as}}(\text{N-H})$) 3230, 3102 ($\nu_{\text{s}}(\text{N-H})$); 1632, 1585 (C=N/C=N 1,6-naftiridin); 1089, 625 (ClO_4^-). UV-Vis (H_2O , λ_{max} , nm): 323 ($\epsilon = 6,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.4 Dobijanje $[\{\text{Pt}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})]^{4+}$ kompleksa

Hlorido kompleksi $[\{\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt2**), $[\{\text{Pt}(1,2\text{-pn})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt3**) i $[\{\text{Pt}(1,3\text{-pd})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt5**), prevedeni su u odgovarajuće akva analoge, $[\{\text{Pt}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})]^{4+}$ (**Pt2w**), $[\{\text{Pt}(1,2\text{-pn})(\text{H}_2\text{O})\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})]^{4+}$ (**Pt3w**) i $[\{\text{Pt}(1,3\text{-pd})(\text{H}_2\text{O})\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})]^{4+}$ (**Pt5w**), reakcijom sa 1,98 ekvivalenta AgNO_3 u odnosu na hlorido komplekse platine(II) u deuterijum-oksidu kao rastvaraču, po postupku koji je ranije publikovan [143,144]. Talog AgClO_4 odvojen je ceđenjem, a sveže pripremljeni rastvori **Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w** kompleksa čuvani su u frižideru i korišćeni u daljim eksperimentima.

3.5 Ispitivanje interakcija Pt1-Pt9 kompleksa sa CT-DNK

3.5.1 Elektronska apsorpciona spektrofotometrija

Interakcije dinuklearnih **Pt1-Pt9** kompleksa sa CT-DNK ispitivane su primenom UV-Vis spektrofotometrije. Apsorpcioni spektri snimani su u 0,01 M rastvoru fosfatnog pufera (PBS) na 37 °C i pri pH = 7,4. Koncentracija CT-DNK određena je iz odnosa apsorpcije na 260 i 280 nm (A_{260}/A_{280}). Ako je odnos apsorpcije od 1,8 do 1,9, to znači da se CT-DNK oslobodila proteinskog dela i rastvor se može upotrebiti za ispitivanja

interakcija. Rastvor CT–DNK je stabilan do 7 dana, ako se čuva u frižideru na 4°C. Koncentracija CT–DNK izračunata je iz odnosa apsorpcije na 260 nm i ekstincionog koeficijenta $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($c = A/\epsilon \cdot d$, $d = 1 \text{ cm}$) [145]. Pripremljeni su rastvori Pt(II)/CT–DNK u različitim molskim odnosima. U rastvorima Pt(II)/CT–DNK koncentracija dinuklearnih platina(II) kompleksa bila je konstantna, dok je koncentracija CT–DNK bila promenljiva. U seriji rastvora koji su pripremljeni polazeći od **Pt1–Pt7** kompleksa sa CT–DNK koncentracija platina(II) kompleksa bila je 8 μM , a koncentracija CT–DNKa od 0–16 μM . Serija rastvora **Pt8** i **Pt9** kompleksa sa CT–DNK, takođe je pripremljena sa fiksnom koncentracijom platina(II) kompleksa (7,20 μM) i različitim koncentracijama CT–DNK od 0–12,8 μM ($r = [\text{CT–DNK}]/[\text{kompleks}] = 0–1,6$).

Da bi odredili unutrašnju konstantu vezivanja (K_b) CT–DNK za ispitivane dinuklearne komplekse platine(II) snimani su UV–Vis spektri Pt(II)/CT–DNK rastvora, K_b je određena primenom jednačine:

$$[\text{DNK}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNK}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b \cdot (\epsilon_b - \epsilon_f)$$

gde je $[\text{DNK}]$ koncentracija CT–DNK, ϵ_a je ekstincioni koeficijent Pt(II) kompleksa pri određenoj koncentraciji CT–DNK, ϵ_f i ϵ_b predstavljaju ekstincione koeficijente slobodnog kompleksa i kompleksa kada je vezan za CT–DNK. Rezultati UV–Vis meranja prikazani su grafički kao zavisnost $[\text{DNK}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ (y -osa) od koncentracije $[\text{DNK}]$ (x -osa). Nagib linearne zavisnosti je $1/(\epsilon_b - \epsilon_f)$, dok je odsečak na y -osi $1/K_b \cdot (\epsilon_b - \epsilon_f)$. Brojna vrednost unutrašnje konstante vezivanja (K_b) određena je iz odnosa nagiba linearne zavisnosti i odsečka na y -osi.

Slobodna (Gibsova) energija (ΔG) za **Pt8(Pt9)/CT–DNK** adukte izračunata je na osnovu jednačine

$$\Delta G = -RT \ln K_b$$

gde je R univerzalna gasna konstanta ($R = 8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$), T je temperature (K) a K_b je izračunata unutrašnja konstanta vezivanja.

3.5.2 Fluorescentna spektroskopija

Primenom emisione fluorescentne spektroskopije ispitivane su interakcije **Pt1–Pt9** kompleksa sa CT–DNK u prisustvu interkalatora etidijum-bromida. Etidijum-bromid i CT–DNK pomešani su u 1:1 molskom odnosu u 0,01 M PBS ($\text{pH} = 7,4$). Nakon toga, napravljena je serija rastvora dodavanjem dinuklearnih kompleksa platine(II), u kojima je odnos koncentracija Pt(II) kompleksa u odnosu na CT–DNK/EtBr bio od 0 do 0,9. Emisioni spektri snimani su u opsegu od 550–750 nm, sa ekscitacijom na $\lambda_{\text{ex}} = 527 \text{ nm}$ i emisijom na $\lambda_{\text{em}} = 612 \text{ nm}$. Stern–Volmerova (*Stern–Volmer*) konstanta (K_{sv}) određena je primenom jednačine

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

gde su I_0 i I intenziteti fluorescencije u odsustvu i prisustvu platina(II) kompleksa u rastvor CT–DNK/EtBr, a $[Q]$ je koncentracija ispitivanih dinuklearnih kompleksa platine(II). Dobijeni rezultati predstavljeni su grafički kao zavisnost I_0/I od $[Q]$. Iz nagiba dobijene linearne zavisnosti određena je brojna vrednost Stern–Volmerove (K_{sv}) konstante.

Konstanta vezivanja (K_a), kao i broj vezujućih mesta Pt(II) kompleksa za CT–DNK dobijeni su primenom logaritamske Skečerdove (*Scatchard*) jednačine:

$$\log(I_0 - I)/I = \log K_a + n \cdot \log [Q].$$

Rezultati su prikazani grafički kao zavisnost $\log(I_0-I)/I$ od $\log[Q]$. Vrednost K_a dobijena je iz preseka prave sa y -osom, a broj vezujućih mesta (n) iz nagiba prave.

3.6 Ispitivanje interakcija Pt(II) kompleksa sa serum albuminima

Interakcije **Pt8** i **Pt9** kompleksa sa BSA ispitivane su primenom emisije fluorescentne spektroskopije. Emisioni spektri snimani su u opsegu od 300–500 nm, sa ekscitacijom na $\lambda_{ex} = 295$ nm [146]. Napravljena je serija rastvora BSA/Pt(II) u kojima je koncentracija BSA bila konstantna (8 μ M), a koncentracija Pt(II) se povećavala (do 25 μ M). Smanjenje intenziteta fluorescencije, usled interakcija BSA sa Pt(II) kompleksima, praćeno je na $\lambda = 352$ nm. Emisioni spektri snimani su pod istim eksperimentalnim uslovima, 0,01 M PBS (pH = 7,4) na 25 °C. Stern–Volmerova (K_{sv}) konstanta određena je primenom jednačine

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q]$$

gde je I_0 intenziteti fluorescencije triptofana u BSA, a I intenziteti fluorescencije triptofana u BSA u prisustvu Pt(II) kompleksa. Konstanta gašenja fluorescencije je k_q , τ_0 je prosečno vreme fluorescencije BSA u odsustvu kompleksa ($\tau_0 = 10^{-8}$ s), a $[Q]$ je koncentracija Pt(II) kompleksa. Stern–Volmerova (K_{sv}) konstanta, dobijena je grafički iz nagiba prave, kada se na y -osu nanese vrednosti I_0/I a na x -osu $[Q]$. Konstanta vezivanja kompleksa za BSA određena je primenom Skečerdove jednačina

$$\log(I_0-I)/I = \log K_a + n \cdot \log[Q]$$

Iz grafičke zavisnosti $\log(I_0-I)/I$ od $\log[Q]$ određena je brojna vrednost K_a kao i broj vezujućih mesta (n).

Interakcije kompleksa **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** sa humanim serum albuminom (HSA) ispitivane su primenom elektronske apsorpcione spektrofotometrije i emisije spektroskopije. Apsorpcioni spektri HSA/Pt(II) kompleksa snimani su u oblasti od 220–450 nm, pri čemu je koncentracija HSA bila konstantna (8 μ M), a koncentracija dinuklearnih Pt(II) kompleksa je bila u opsegu od 0 do 160 μ M. Svi apsorpcioni spektri su snimljeni pod istim eksperimentalnim uslovima u 0,01 M PBS (pH = 7,4) na 25 °C.

Snimljeni su i emisioni spektri istih rastvora u opsegu od 300–500 nm, sa ekscitacijom na $\lambda_{ex} = 295$ nm. Smanjenje intenziteta emisije posmatrano je na 360 nm. Stern–Volmerove konstanta, kao i ostale konstante, izračunate su primenom Stern–Volmerove i Skečerdove jednačine.

3.7 ¹H NMR spektroskopija

Reakcije akva derivata **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa (**Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w**) sa *N*-acetilovanim dipeptidom L-metionil-glicinom (Ac-L-Met-Gly) ispitivane su primenom ¹H NMR spektroskopije. Rastvori **Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w** kompleksa koncentracije 20 mM i 20 mM rastvor Ac-L-Met-Gly u D₂O kao rastvaraču pomešani su u 1:1 molskom odnosu. Sve reakcije su ispitivane pri pH = 2,0–2,5 na 25 °C [144].

3.8 Kvantno-hemijski proračuni

Kvanto-mehanički proračuni NMR spektara **Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w** kompleksa rađeni su primenom Gaussian 09 programskog paketa [147]. Primenom Solvatacionog modela zasnovanog na gustini (SMD) izvršena je optimizacija struktura glicina, dipeptida (Met-Gly) i kompleksa platine(II), kao i njihovih odgovarajućih NMR spektara. Proračunima vibracionih frekvencija potvrđeno je postojanje odgovarajućih geometrija. Korišćeni su strogi kriterijumi konvergencije bez simetričnih ili geometrijskih ograničenja. Za ove proračune korišćen je wb97xd funkcional, 6-311g+(d,p) bazis za nemetale, kao i LanL2DZ bazis za platinu, uz računanje njenog *pseudo-potencijala*.

Mehanizam koordinovanja Ac-L-Met-Gly dipeptida za dinuklearne **Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w** komplekse predviđen je korišćenjem B3LYP metode, 6-31G(d,p) bazisa za nemetale i Lanl2dz bazisa za platinu. Solvatacija je uključena korišćenjem SMD metode.

3.9 Molekulski doking

Hidroliza kompleksa platine(II) u citoplazmatičnom matriksu ćelije predstavlja ključni korak u antikancerogenoj aktivnosti hlorido kompleksa platina(II) i njihovoj reakciji sa DNK [148]. Shodno tome, primenom molekulskog dokinga ispitivani su načini vezivanja hidrolizovanih **Pt1–Pt7** (**Pt1w–Pt7w**) kompleksa sa DNK, čija je struktura preuzeta iz Proteinske baze podataka (skraćeno PDB, struktura sa pdb kodom 1BNA) [149]. Odabrana struktura DNK predstavlja sintetički dvolančani d(CpGpCpGpApApTpTpCpGpCpG) dodekamer, sa dva regiona bogata G-C parovima, i jednim regionom bogatim A-T parom, smešten između dva navedena regiona. Molekulski doking urađen je i na apo obliku (forma bez gvožđa) rekombinantnog N-režnja humanog serum transferina (skraćeno ApoTfN, struktura sa pdb kodom 1BP5) [150]. Strukture **Pt1w–Pt7w** kompleksa optimizovane su wb97xd metodom, uz korišćenje 6-31g** bazisa za nemetala i LanL2DZ bazis za platinu. Merz–Kollman-ova atomska naelektrisanja su izračunata za sve atome, prema šemi putem RESP procedure [151].

Za pripremu struktura DNK i transportnog proteina korišćen je softverski program AutoDock 4.2 [152]. Program AutoDockTools [152] je korišćen za generisanje doking parametara za optimizovane strukture ispitivanih platina(II) kompleksa, DNK i proteinske strukture. Strukture biomolekula (DNK ili proteina) posmatrane su kao rigidni sistem, dok su Pt(II) kompleksi imali slobodnu promene strukture, jer su neke (jednostuke) veze imale slobodu rotacije. Kutija koja definiše ispitivani prostor, a koja sadrži ceo biomolekul, je korišćena za vezivanje ispitivanih platina(II) kompleksa tokom molekulskog dokinga, dok je Lamarckov genetski algoritam korišćen kao metoda pretrage za virtuelni skrining sa 50 orijentacija za svaki doking proračun. Za vizuelizaciju i analizu rezultata dokinga korišćen je Discoveri Studio (BIOVIA softverski proizvod) [153].

Primenom molekulskog dokinga ispitivane su interakcije **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa sa rigidnom strukturom Humanog serum albumina (HSA), primenom AutoDockTools za pripremu doking proračuna i softverskog programa AutoDock za proračune [154]. Najstabilniji modeli vezivanja dobijeni su primenom rigidnog dokinga sa 100 mogućih orijentacija, uz korišćenje *Lamarckian* genetskog algoritma. Strukture HSA (pdb kod: 1BM0) [155] su dobijene iz Proteinske baze podataka (*Protein Data Bank*, skraćeno PDB) [156]. Za analizu interakcija na mestima vezivanja za HSA korišćena je simulacija primenom Discoveri Studio [153].

3.10. Biološka ispitivanja

3.10.1 Pripremanje rastvora platina(II) kompleksa

Napravljena je serija rastvora ispitivanih dinuklearnih platina(II) kompleksa, kao i cisplatine u bidestilovanoj vodi, koncentracije 10 mM, a zatim su rastvori filtrirani kroz Millipore filter od 0,22 mm. Ovako dobijeni rastvori su razblaženi ćelijskim medijumom neposredno pre upotrebe. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid) je rastvoren (5 mg/mL) u fiziološkom rastvoru fosfatnog pufera (pH = 7,20) i filtriran kroz Millipore filter od 0,22 mm pre upotrebe. Svi reagensi su kupljeni od Sigma Chemicals.

3.10.2 Ćelijske linije

Mišije ćelijske linije karcinoma dojke (4T1), debelog creva (CT26) i pluća (LLC1), humane ćelijske linije karcinoma dojke (MDA-MB-468), debelog creva (HCT-116) i pluća (A549), kao i normalne humane ćelijske linije fibroblast pluća (MRC-5) su dobijene od *American Tpe Culture Collection* (ATCC, SAD). Mezenhimalne matične ćelije miša (mMSC), izolovane iz koštane srži, dobijene su od Gibco-a (kataloški br. S1502-100) i korišćene su kao kontrole (netumorske ćelije). Sve ćelijske linije čuvane su u DMEM medijumu („Dulbecco's Modified Eagle's Medium“), koji sadrži 10% fetalnog govedeg seruma (FBS), penicilin, streptomycin, L-glutamin i neesencijalne aminokiseline (Sigma Aldrich, Minhen, Nemačka). Ćelijske linije su kultivisane na 37 °C u vlažnoj atmosferi (5% CO₂/95% vazduha). Bojenje tripan plavim je obezbedilo upotrebu samo živih ćelija za *in vitro* eksperimente.

3.10.3 MTT test

Citotoksičnost **Pt1–Pt9** kompleksa ispitivana je primenom MTT kolorimetrijskog testa [157]. Ispitivane ćelijske linije razblažene su medijumom do $5 \cdot 10^4$ ćelija/mL i alikvoti ($5 \cdot 10^3$ ćelija/100 mL) su postavljeni u posude koje sadrže 96 otvora. Posude su inkubirane 24 h pod standardnim uslovima (37 °C/5%CO₂). Nakon inkubacije dodate su odgovarajuće količine ispitivanih **Pt1–Pt9** kompleksa i cisplatine. Netretirane ćelijske linije služile su kao kontrolne ćelije. Nakon toga svi uzorci su inkubirani 48–72 h, a zatim je uklonjen medijum i u svaki otvor dodat je MTT rastvor (pH 7,2; 5 mg/mL). Nakon 4 h inkubacije na 37 °C u 5% CO₂, medijum koji sadrži MTT je uklonjen i za rastvaranje suvog ostatka upotrebljen je dimetilsulfoksid (DMSO) (150 µL), kome je dodat glicinski pufer (20 µL). Na $\lambda = 595$ nm očitana je apsorpcija rastvora na ELISA čitaču (Zenyth 3100, AnthosLabtec Instruments). Procenat citotoksičnosti izračunat je primenom formule

$$\% \text{ citotoksičnosti} = 100 - ((E - B) / (S - B) \cdot 100) \quad [158]$$

gde je E apsorpcija tretiranih ćelija, B je apsorpcija kontrolnih ćelija, S je apsorpcija mrtvih ćelija. Ispitivani kompleksi testirani su i određena im je IC₅₀ vrednost u tri odvojena eksperimenta. Indeks selektivnosti izračunat je iz odnosa IC₅₀ (mMSC) / IC₅₀ (4T1 ili CT26).

3.10.4 Apoptoza

Analiza apoptoze (ćelijske smrti) uzrokovana **Pt1–Pt9** kompleksima ili cisplatinom određena je protočnom citometrijom primenom Annexin V-FITC apoptoznog kompleta. Za detekciju apoptoze ćelije su postavljene u posude kulture T25 i ostavljene su da rastu preko noći. Nakon što su ćelije dostigle konfluentnost, medijum je zamenjen testiranim kompleksima (15 µM). Tretirane ćelije su inkubirane na 37 °C u 5% CO₂ tokom 24 h. Kultivisane ćelije su isprane dva puta sa fosfatnim puferom i resuspendovane u vezujućem puferu (10 x pufer: 0,1 M Hepes/NaOH (pH 7,40), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl₂) tako da je koncentraciji ćelija bila $1 \cdot 10^6$

mL⁻¹. U 100 µL suspenzije koja sadrži ispitivane ćelije i komplekse dodat je Aneksin FITC i propidijum-jodid (PI), a nakon toga smeša je inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi (25 °C) u mraku. Nakon inkubacije, 400 µL vezujućeg pufera je dodato u svaku epruvetu i obojene ćelije su analizirane nakon 1 h korišćenjem FACS Calibur protočne citometrije (BD, San Jose, SAD). Pošto, Aneksin V-FITC bojenje prethodi gubitak integriteta membrane koji prati kasnija faza identifikovana od strane PI, Aneksin FITC pozitivan a PI negativan ukazuje na ranu apoptozu, dok je za preživlele ćelije Aneksin V-FITC negativan, PI negativan. Za ćelije koje su u kasnoj apoptozi ili su mrtve i Aneksin V-FITC i PI su pozitivni. Određeni su procenti obojenih ćelija, a podaci su analizirani softverom FlowJo (Tree Star).

3.10.5 Kaspaza-3, Bcl-2 i Ki-67 ekspresija

Da bi se detaljno ispitao način ćelijske smrti ekspresija kaspaze-3, Bcl-2 i Ki-67 određena je na tumorskim ćelijama 4T1 i A549, koje su tretirane **Pt8** kompleksom, nakon 24 h. Koncentracija **Pt8** kompleksa za 4T1 ćelijsku liniju bila je 46,4 µM, a za A549 49,6 µM. Nakon inkubacije ćelije su fiksirane i permeabilizovane puferom (BD Bioscience). Za detekciju kaspaze-3 korišćena su antitela zečije Anti-Caspase 3 (IC1799G, Novus Biologicals, San Diego, USA) i praćene su sekundarnim FITC-konjugovanim DNK anti-zečijim IgG mAb (Abcam), dok je ekspresija Bcl-2 detektovana korišćenjem FITC konjugovanih anti-mišijih Bcl-2 monoklonskih antitela (10C4, eBioscience, San Dijego, SAD). Za bojenje Ki-67 tretirane i netretirane ćelije su inkubirane sa antitelima Ki-67 (11-5698-82, eBioscience, San Diego, SAD). Na kraju inkubacije sa relevantnim antitelima, tumorske ćelije su analizirane protočnom citometrijom na FACS Calibur Flov Citometer (BD Biosciences, San Jose, CA). Svi podaci su analizirani korišćenjem FlovJo (Tree Star).

3.10.6 Test ćelijske apsorpcije Pt1–Pt7 kompleksa

Pripremanje uzoraka

Dva puta po 10⁶ LLC1 ćelija je zasejano u ukupnoj zapremini od 5 mL RPMI medijuma. Ispitivane ćelije su inkubirane 24 h, a nakon toga u rastvore je dodato po 2 µM **Pt1–Pt7** kompleksa za vreme od 2 h na 37 °C. Nakon toga, medijum-kompleks je uklonjen, a ćelije su isprane sa 5 mL PBS i peletirane.

Ćelije su pripremljene na sledeći način. Uzorci su izmereni na analitičkoj vagi u bočici (zapremina 1,5 mL). Zatim je u uzorak dodato 0,3 mL koncentrovane azotne kiseline i 0,1 mL vodonik-peroksida. Uzorci su lagano zagrevani oko 15 minuta na vodenom kupatilu na 85 °C. Nakon toga, uzorci su razblaženi u normalnim sudovima do 10 mL. Tako pripremljeni uzorci su analizirani primenom ICP-QMS (*The Quadrupole Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Kvadrupolna induktivno spregnuta masena spektrometrija plazme.

Hemikalije i instrumentacija

Sve upotrebljene hemikalije bile su analitičkog stepena čistoće (Sigma-Aldrich). Da bi se smanjio nivo kontaminacije tokom pripreme uzorka, koncentrovana azotna kiselina (65%, v/v) je dodatno prečišćena destilacijom. Vodonik-peroksid je bio puriss. p.a. 30% (v/v). Standardni rastvor plazme platine 1000 µg/mL (Alfa Aesar) je korišćen za kalibraciju instrumenta uz odgovarajuće razblaživanje. Za pripremu svih standarda i uzoraka korišćena je ultra čista voda. Ultra čista voda je pripremljena propuštanjem dvostruko dejonizovane vode kroz Milli-Q sistema (18,2 MΩ).

Analiza je izvršena tehnikom masene spektrometrije (ICP-QMS) na instrumentu Thermo Scientific iCAP Q ICP-MS (Thermo Scientific). Sva merenja na ICP-QMS su rađena u režimu diskriminacije kinetičke energije (KED) sa helijumom kao kolizionim ćelijskim

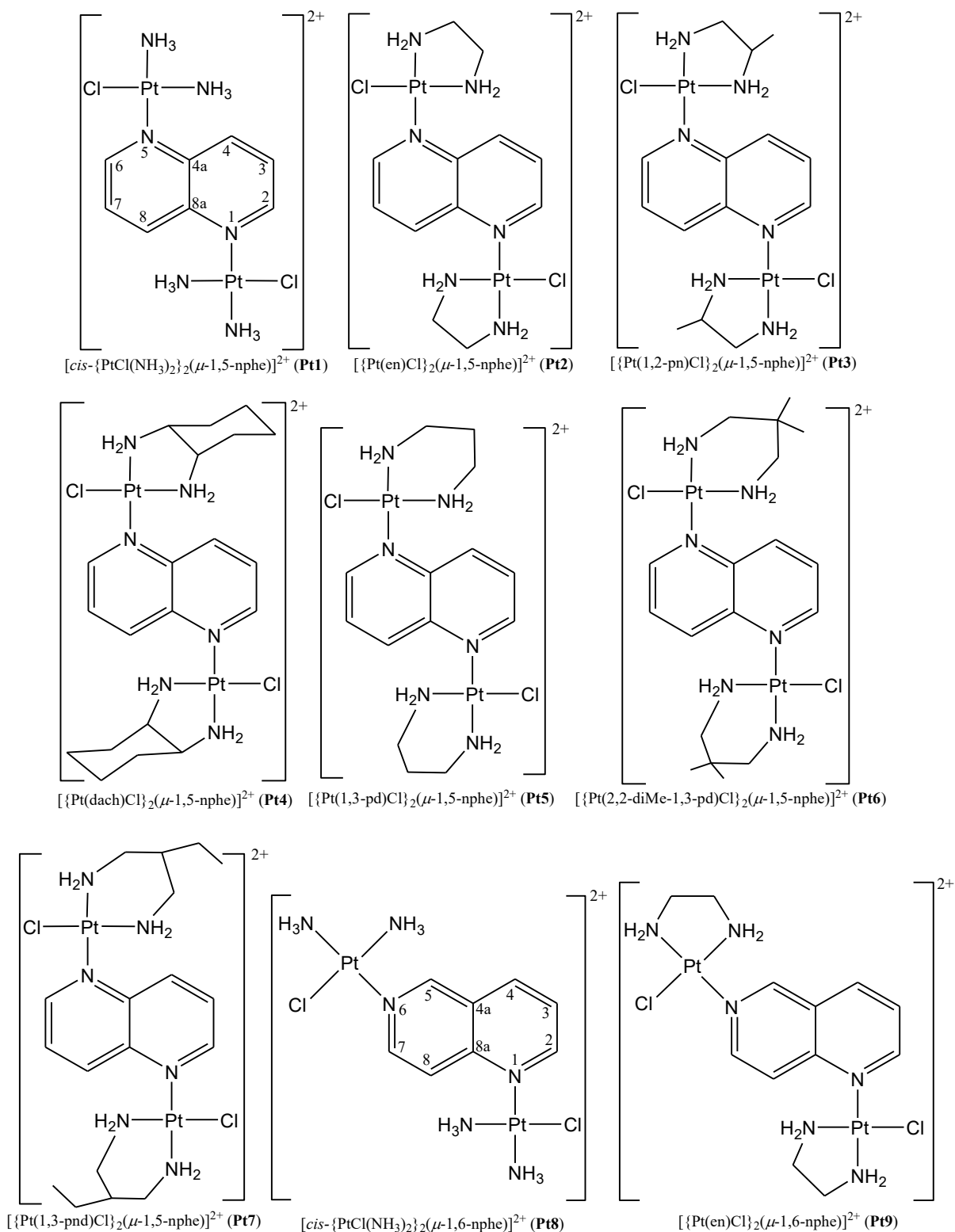
gasom. Kvantifikacija svih uzoraka je urađena korišćenjem eksterne standardne kalibracije. Korišćeno je šest standardnih rastvora u kojima je koncentracija platine bila: 1, 2, 5, 10, 25 i 50 $\mu\text{g/L}$, a slepa proba pripremljena u 1% destilovanoj azotnoj kiselini. Koeficijent korelacije linearne regresije bio je 1,0000.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Devet novih dinuklearnih platina(II) kompleksa, opšte formule $[\{\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-X})](\text{ClO}_4)_2$, gde je X 1,5-naftiridin (1,5-nphe, **Pt1-Pt7**) ili 1,6-naftirid (1,6-nphe, **Pt8** i **Pt9**) mostni ligand. Ligand L je 2NH_3 (amminski ligand) u **Pt1** i **Pt8** kompleksima ili bidentatno koordinovani diaminski etilendiamin (en, **Pt2** i **Pt9**), (\pm) -1,2-propilendiamin (1,2-pn, **Pt3**), *trans*- (\pm) -1,2-diaminocikloheksan (dach, **Pt4**), 1,3-propilendiamin (1,3-pd, **Pt5**), 2,2-dimetil-1,3-propilendiamin (2,2-diMe-1,3-pd, **Pt6**) i (\pm) -1,3-pentandiamin (1,3-pnd, **Pt7**) sintetisani su polazeći od mononuklearnih *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ ili $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}_2]$ kompleksa (Slika 28) [141,142]. Kompleksi **Pt1-Pt7** imaju isti mostni 1,5-naftiridinski ligand, ali se razlikuje po monodentatno koordinovanim amminskim (**Pt1**) i bidentatno koordinovanim diaminskim ligandima (**Pt2-Pt7**). Mostni 1,6-nphe ligand povezuje dve *cis*- $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2]^+$ jedinice u **Pt8** odnosno dve $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}]^+$ jedinice u **Pt9** kompleksu. Sintetisani kompleksi su okarakterisani pomoću elementalne mikroanalize, UV-Vis spektrofotometrijom, IR i NMR (^1H i ^{13}C) spektroskopijom. Strukture **Pt1-Pt7** dodatno su potvrđene i na osnovu rezultata masene spektroskopije (HRMS).

Primenom UV-Vis spektrofotometrije i fluorescentne spektroskopije ispitivane su interakcije sintetisanih dinuklearnih kompleksa platine(II) sa dezoksiribonukleinskom kiselinom, koja je izolovana iz grudne žlezde teleta (CT-DNK). Pored toga, primenom fluorescentne spektroskopije i UV-Vis spektrofotometrije ispitivane su interakcije pojedinih sintetisanih kompleksa platine(II) sa serum albuminom koji je izolovan iz krvi goveda (BSA) i *N*-acetilovanim metionil-glicinom (Ac-L-Met-Gly). Metodom molekuskog dokinga dobijene su informacije o načinu interakcija dinuklearnih platina(II) kompleksa sa DNK i albuminima (HSA i BSA). Dodatno, primenom teorijskih proračuna dobijeni su podaci o načinima vezivanja **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa sa HSA, kao i reakcije akva derivata ovih kompleksa, **Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w**, sa *N*-acetilovanim metionil-glicinom [141,142,144].

In vitro citotoksična aktivnost **Pt1-Pt9** kompleksa ispitivana je na ćelijskim linijama humanih (karcinom dojke (MDA-MB-468), debelog creva (HCT-116) i pluća (A549),) kao i mišijih karcinoma (karcinom dojke (4T1), debelog creva (CT26) i pluća (LLC1),) a za poređenje upotrebljene su zdrave humane ćelijske linije fibroblasta pluća (MRC-5) i mezenhimske matične ćelije miševa (mMSC). Ispitivan je uticaj različitih diaminskih, kao i amminskog liganda u **Pt1-Pt9** kompleksima, a takođe i uticaj položaja heteroatoma (N) u aromatičnim kondenzovanim prstenovima naftiridinskih liganada [141,142].

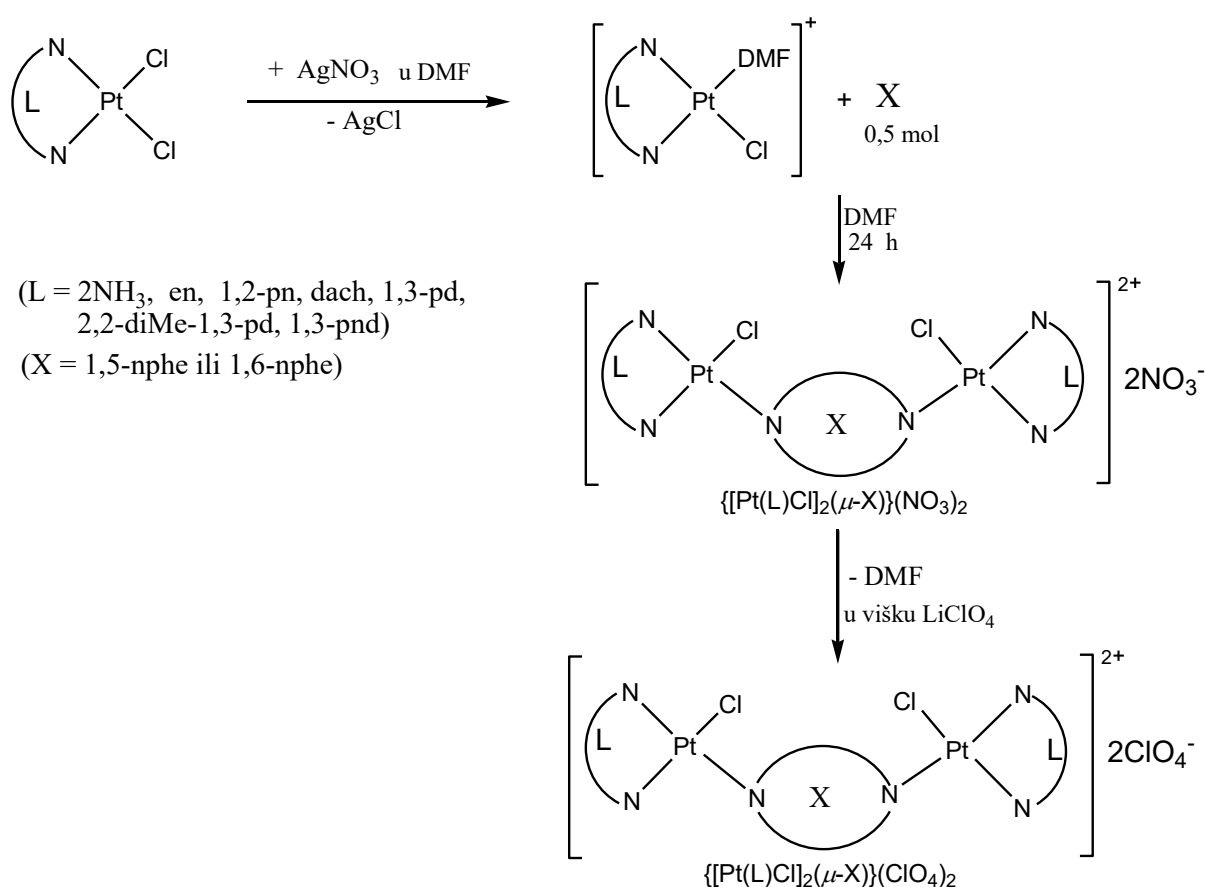


Slika 28. Strukturne formule ispitivanih dinuklearnih **Pt1-Pt9** kompleksa. Ugljenkovi atomi u heterocikličnim naftiridinskim ligandima numerisani su u skladu sa IUPAC-ovim pravilima.

4.1 Sinteza i karakterizacija dinuklearnih platina(II) kompleksa koji sadrže 1,5-naftiridin ili 1,6-naftiridin kao mostni ligand

4.1.1 Sinteza Pt1-Pt9 kompleksa

Šematski prikaz sinteze dinuklearnih **Pt1-Pt9** kompleksa dat je na slici 29. U reakciji mononuklearnih *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] ili [Pt(L)Cl₂] kompleksa sa AgNO₃ u 1:0,98 molском odnosu u dimetilformamidu (DMF) kao rastvaraču dolazi do supstitucije jednog hlorido liganda molekulom rastvarača (DMF), pri čemu u rastvoru nakon odvajanja taloga (AgCl) ceđenjem, ostaje *cis*-[PtCl(NH₃)₂(DMF)]⁺ odnosno [Pt(L)Cl(DMF)]⁺ kompleks. U rastvor monodimetilforamid kompleksa dodat je rastvor mostnog liganada (1,5-nphe odnosno 1,6-nphe) u DMF-u u 2 : 1 molском odnosu. Nakon uparavanja rastvarača, talog je rastvoren u vodenom rastvoru LiClO₄. Dinuklearni **Pt1-Pt9** kompleksi su dobijeni kao amorfne supstance bledežute boje [141,142].



Slika 29. Šematski prikaz sinteze dinuklearnih [Pt(L)Cl₂(μ-X)](ClO₄)₂ kompleksa.

4.1.2 Spektroskopska karakterizacija Pt1-Pt9 kompleksa

NMR spektroskopija. Na Slici P1 (Prilog) prikazani su NMR (¹H i ¹³C) spektri sintetizovanih **Pt1-Pt9** kompleksa, a hemijska pomeranja za slobodne mostne ligande i **Pt1-Pt9** komplekse data su u Tabeli 4. Nakon helatnog koordinovanja L liganda (L = en, 1,2-pn, dach, 1,3-pd, 2,2-di-Me-1,3-pd i 1,3-pnd) za Pt(II) jon u [Pt(L)Cl₂(μ-X)]²⁺ kompleksima, u ¹H

NMR spektru signali koji potiču od alifatičnih metil, metilenskih i metinskih protona bidentatno koordinovanih diaminskih liganada se pomeraju ka nižem polju, odnosno ka višem hemijskom pomeranju. Takođe, signali koji potiču od ugljenikovih atoma slobodnih L liganada, nakon koordinovanja za Pt(II) jon se pomeraju ka višem hemijskom pomeranju.

U aromatičnoj oblasti u ^1H NMR spektrima **Pt1–Pt7** kompleksa kao i slobodnog 1,5-naftiridinskog liganda nalaze se tri grupe signala (H2/H6, H3/H7 i H4/H8). Nakon koordinovanja 1,5-nphe za dve $[\text{Pt}(\text{L})\text{Cl}]^+$ jedinice signali koji potiču od protona slobodnog liganda se pomeraju ka nižem polju, odnosno ka višem hemijskom pomeranju za $\Delta\delta = 1,65\text{--}2,26$ ppm (H2/H6), $\Delta\delta = 1,66\text{--}2,38$ ppm (H4/H8) i $\Delta\delta = 0,68\text{--}0,76$ ppm (H3/H7). Pomeranje signala koji odgovaraju aromatičnim protonima naftiridinskog prstena posledica su delokalizacije π -elektrona na pozitivno naelektrisani platina(II) jon. Nakon mostnog koordinovanja 1,6-naftiridinskog liganda za platina(II) jone, u aromatičnoj oblasti za **Pt8** i **Pt9** kompleks javlja se šest signala. Signali za **Pt8** kompleks se nalaze u oblasti od 7,96 do 9,84 ppm, a za **Pt9** u oblasti od 7,90 do 9,78 ppm (Tabela 4).

Tabela 4. ^1H i ^{13}C NMR hemijska pomeranja (δ , ppm) za slobodne 1,5-nphe i 1,6-nphe mostne ligande, kao i za odgovarajuće dinuklearne platina(II) komplekse u D_2O kao rastvaraču

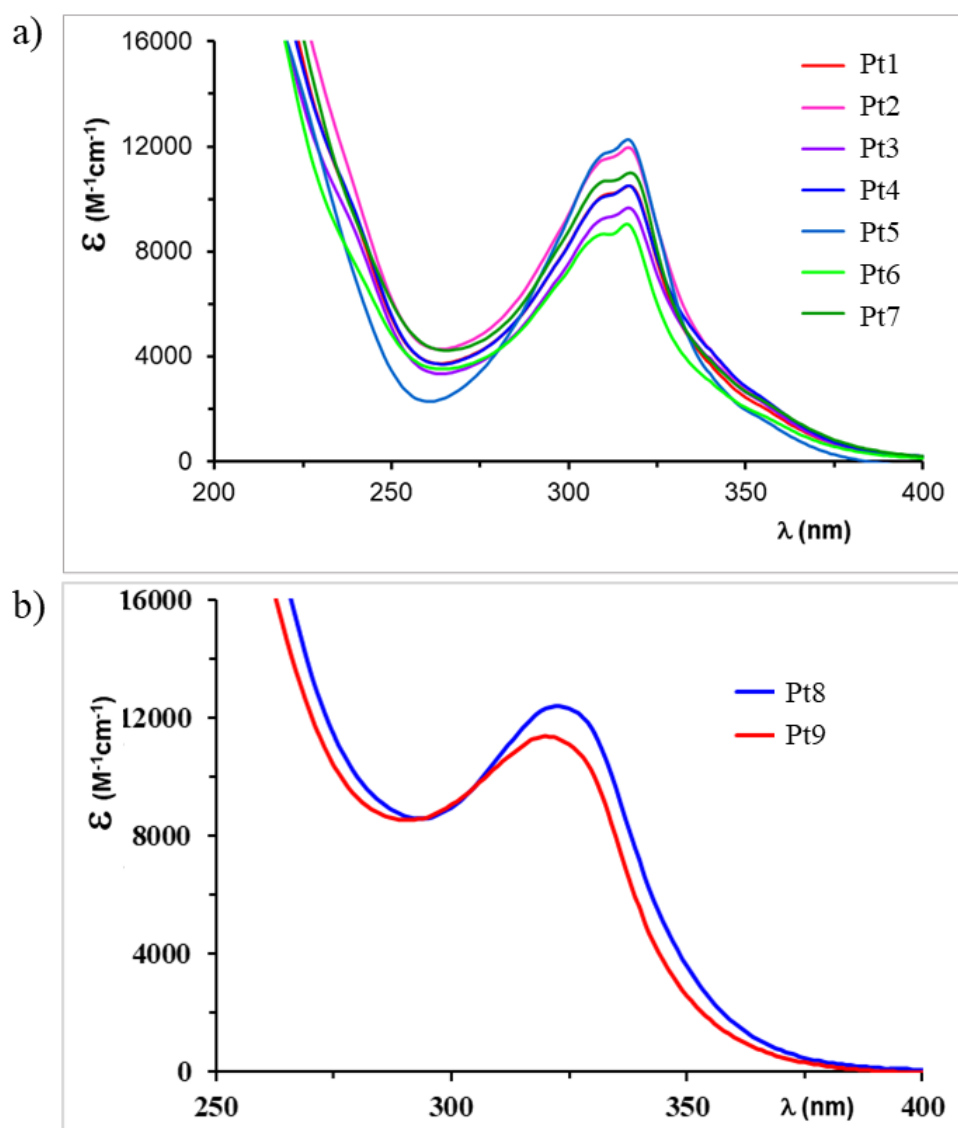
ligand/ kompleks	NMR						
	^1H			^{13}C			
	H2/H6	H4/H8	H3/H7	C2/C6	C4/C8	C3/C7	C4a/C8a
1,5-nphe	8,57 <i>dd</i>	7,91 <i>d</i>	7,48 <i>dd</i>	154	138	128	143
Pt1	10,38 <i>d</i>	9,69 <i>d</i>	8,24 <i>dd</i>	161	147	131	148
Pt2	10,25 <i>d</i>	9,61 <i>d</i>	8,17 <i>m</i>	160	141	129	148
Pt3	10,22 <i>d</i>	9,58 <i>m</i>	8,16 <i>d</i>	161	143	130	148
Pt4	10,23 <i>m</i>	9,58 <i>m</i>	8,16 <i>m</i>	162	142	130	147
Pt5	10,27 <i>d</i>	9,58 <i>d</i>	8,18 <i>m</i>	161	142	130	148
Pt6	10,27 <i>d</i>	9,57 <i>d</i>	8,16 <i>dd</i>	161	142	131	148
Pt7	10,23 <i>m</i>	9,58 <i>m</i>	8,17 <i>m</i>	161	143	130	148

	^1H			^{13}C						
	H2/H5	H3/H8	H4/H8	C2	C3	C4	C5	C7	C8 C4a	C8a
1,6-nphe	8,86 <i>d</i>	7,55 <i>m</i>	8,28 <i>d</i>	155	124	140	158	148	125	151
Pt8	9,68 <i>d</i> H2 9,84 <i>s</i> H5	7,96 <i>dd</i> H3 8,90 <i>d</i> H8	9,09 <i>d</i> H4 9,52 <i>d</i> H7	161	128	140	165	152	129	156
Pt9	9,62 <i>d</i> H2 9,78 <i>s</i> H5	7,90 <i>dd</i> H3 8,86 <i>d</i> H8	9,01 <i>d</i> H4 9,39 <i>d</i> H7	161	125	143	165	152	127	155

U ^{13}C NMR spektrima **Pt1–Pt7** kompleksa u aromatičnoj oblasti javljaju se četiri signala (C2/C6, C3/C7, C4/C8 i C4a/C8a) koji su pomereni ka nižem polju u odnosu na signale

slobodnog 1,5-naftiridinskog liganda ($\Delta\delta = 3\text{--}9$ ppm, Tabela 4). Nakon koordinovanja 1,6-naftiridina za dve *cis*-[PtCl(NH₃)₂]⁺ jedinice u **Pt8**, odnosno dve [Pt(en)Cl]⁺ jedinice u **Pt9** kompleksu, signali koji odgovaraju C-atomima mostnog liganda pomeraju se za $\Delta\delta = 1\text{--}7$ ppm ka višem hemijskom pomeranju (Tabela 4). Hemijska pomeranja za H i C atome u saglasnosti su sa rezultatima za slične komplekse koji su ranije opisani u literaturi [85-87].

UV-Vis spektrofotometrija. UV-Vis apsorpcioni spektri **Pt1–Pt9** kompleksa, koncentracije $5 \cdot 10^{-5}$ M u vodi kao rastvaraču, snimani su u opsegu od 200 nm do 400 nm na 25 °C. Talasne dužine na kojima platina(II) kompleksi pokazuju maksimum apsorpcije (λ_{max} , nm), kao i odgovarajući molarni ekstincioni koeficijenti (ϵ , M⁻¹cm⁻¹) prikazani su u Eksperimentalnom delu rada (Poglavlje: 3.3). Na slici 30a prikazani su UV-Vis spektri sintetisanih **Pt1–Pt7**, a na Slici 30b **Pt8** i **Pt9** kompleksa. Sličnost UV-Vis spektara sintetisanih kompleksa sugerise na isti način kooridovanja 1,5-naftiridina u **Pt1–Pt7** i 1,6-naftiridina u **Pt8** i **Pt9** kompleksima. Apсорpcioni maksimumi **Pt1–Pt7** kompleksa nalaze su u oblasti ~316–317 nm i mogu se pripisano LMCT prelazima (prenos naelektrisanja liganda na metal).



Slika 30. UV-Vis spektri dinuklearnih **Pt1–Pt7** (a) i **Pt8** i **Pt9** (b) kompleksa.

Zbog $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronskih prelaza, nakon koordinovanja mostnog liganda za Pt(II) jon, dolazi do blagog batohromnog pomeranja apsorpcionih maksimuma. Apsorpcioni maksimumi **Pt8** ($\lambda_{\max} = 320$ nm) i **Pt9** ($\lambda_{\max} = 323$ nm) kompleksa, takođe pokazuju batohromno pomeranje nakon koordinovanja 1,6-nphe, zbog $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronskih prelaza u heterocikličnom 1,6-nphe ligandu.

IR spektroskopija. IR spektri **Pt1–Pt9** kompleksa snimljeni u opsegu od 4000 do 450 cm^{-1} pokazuju trake koje odgovaraju koordinovanim 1,5-nphe i 1,6-nphe ligandima, kao i trake bidentatno koordinovanih diaminskih (L) i monodentatno koordinovanih amminskih liganada. IR spektri sintetizovanih kompleksa prikazani su na slici P2. U IR spektrima dinuklearnih platina(II) kompleksa su uočene dve veoma jake i široke trake u oblasti od 3300–3099 cm^{-1} , koje odgovaraju asimetričnim i simetričnim vibracijama koordinovanih diaminskih liganada u **Pt2–Pt7** i **Pt9** kompleksima i amminskom ligandu u **Pt1** i **Pt8** kompleksima [159]. Traka srednje jačine u oblasti 1632–1584 cm^{-1} potiče od C=C i C=N vibracija aromatičnog 1,5- i 1,6-naftiridinskog prstena. Jake trake u oblasti 1174–1080 cm^{-1} , kao i jake sa jednim maksimumom na ~ 625 cm^{-1} ukazuju na postojanje ClO_4^- jona u spoljašnjoj koordinacionoj sferi dinuklearnih platina(II) kompleksa i mogu se pripisati $\nu(\text{ClO})$ i $\delta(\text{OClO})$ vibracijama [160].

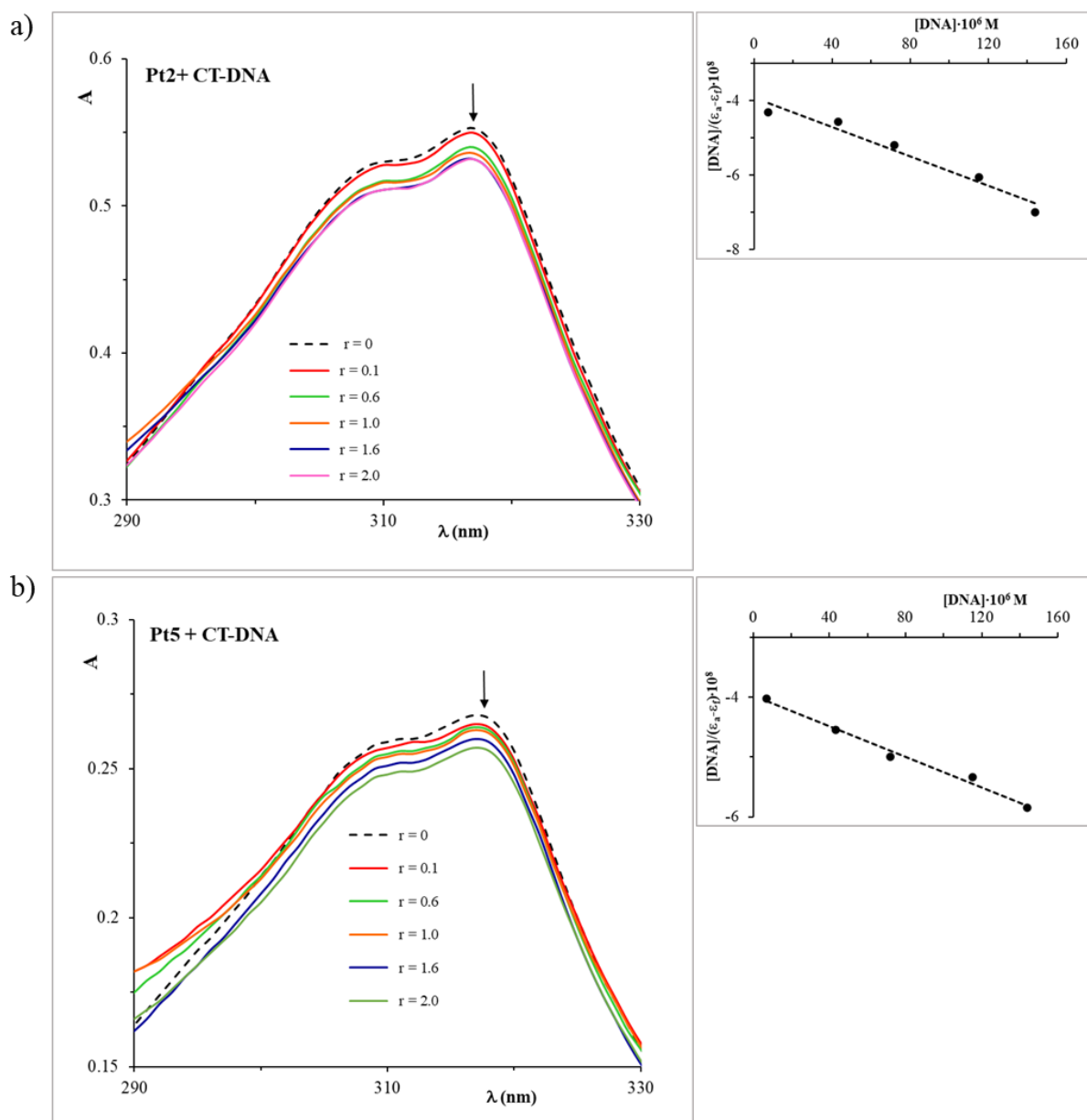
4.2. Ispitivanje interakcija dinuklearnih platine(II) kompleksa sa biomolekulima

4.2.1 Interakcije dinuklearnih kompleksa platine(II) sa DNK

Dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) je jedan od vezujućih molekula u biološkim sistemima koja je odgovorna za širok spektar intracelularnih interakcija [159–164]. Antitumorski kompleksi platine(II), koji se trenutno nalaze u kliničkoj primeni se vezuju za DNK, zbog čega su ispitivanja načina interakcije potencijalnih antitumorskih kompleksa platine(II) sa DNK veoma značajna. Primenom elektronske apsorpcione spektrofotometrije (UV-Vis) i fluorescentne spektroskopije ispitivane su interakcije **Pt1–Pt9** kompleksa sa DNK.

UV-Vis spektrofotometrijska merenja

UV-Vis spektrofotometrija je jednostavna i efikasna metoda, koja se koristi za određivanje načina koordinovanja ili interakcija kompleksa metala sa DNK [165,166]. Kompleksi prelaznih metala mogu sa DNK ostvariti kovalentne ili nekovalentne interakcije, što je i prikazano u Opštem delu ovog rada (Poglavlje: 1.3). Interakcije **Pt1–Pt9** kompleksa sa DNK, koja je izolovana iz grudne žlezde teleta (CT-DNK) praćene su primenom UV-Vis spektrofotometrije u rastvoru fosfatnog pufera (PBS, pH = 7,4) na 37 °C. Apsorpcioni spektri **Pt2** i **Pt5**, kao i **Pt8** i **Pt9** kompleksa u odsustvu i prisustvu rastuće koncentracije CT-DNK prikazani su na slikama 31 i 32. Koncentracija ispitivanih dinuklearnih kompleksa bila je konstantna (8 μM), dok je koncentracija CT-DNK bila u opsegu od 0 do 20 μM za reakcije sa **Pt1–Pt7** i od 0 do 16 μM za reakcije **Pt8** i **Pt9** kompleksa sa CT-DNK. Rezultati koji su dobijeni za **Pt1–Pt7** komplekse su skoro identični, tako da su u ovom radu prikazani samo UV-Vis spektri interakcija **Pt2** (Slike 31a) i **Pt5** (Slike 31b) kompleksa sa CT-DNK. Kao što se može videti sa slike 31 intenzitet apsorpcije **Pt2** i **Pt5** kompleksa opada nakon dodatka CT-DNK. Smanjenje apsorpcionog maksimuma, odnosno hipohromizam, u ispitivanim reakcijama je $H\% \approx 5$. U UV-Vis spektrima nije došlo do pomeranja apsorpcionog maksimuma nakon dodatka CT-DNK u rastvor kompleksa.

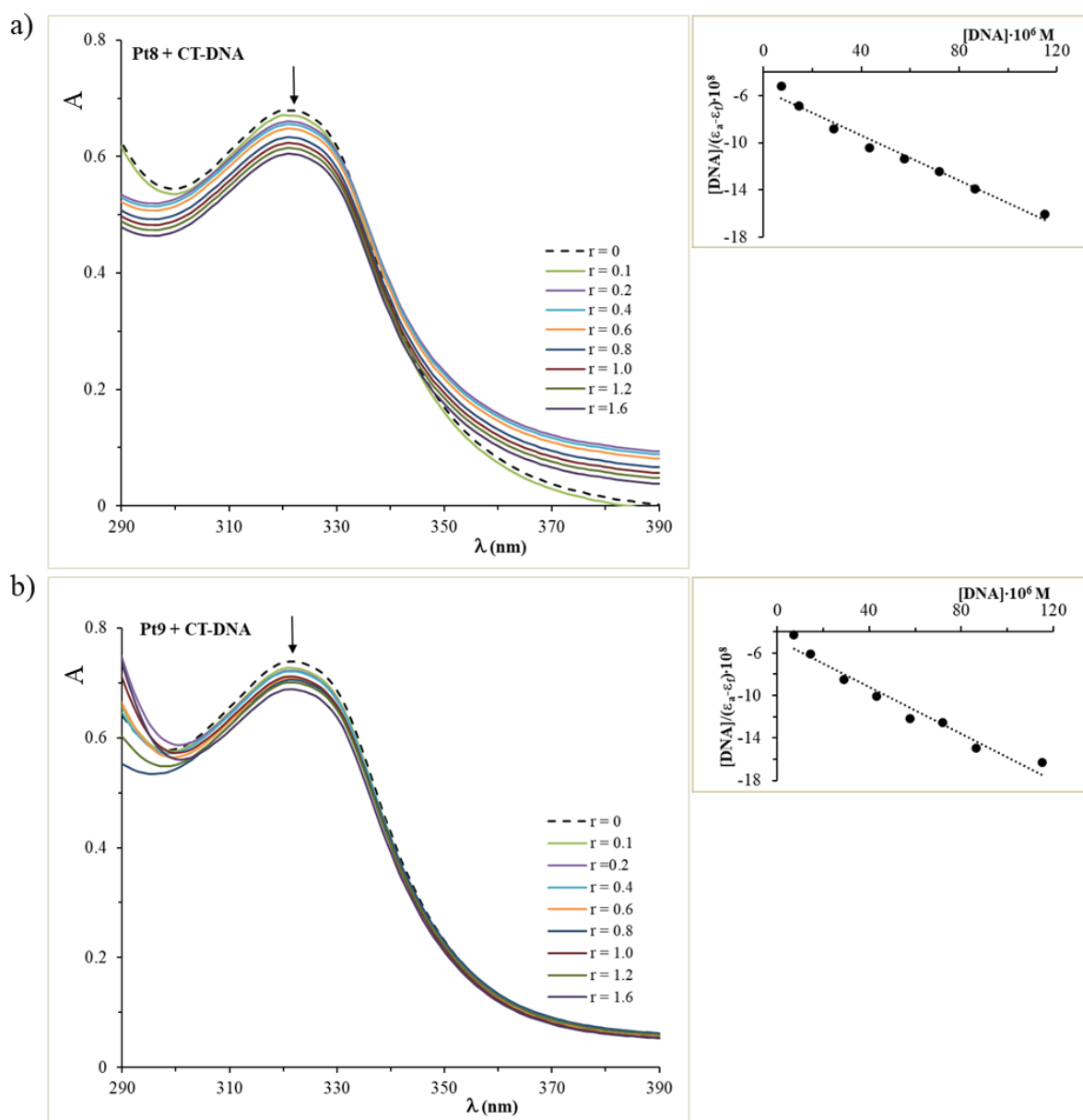


Slika 31. Apsorpcijski spektri **Pt2** (a) i **Pt5** (b) kompleksa u 0,01 M fosfatnom puferu pre i nakon dodatka CT-DNK. Strelicom je označena promena apsorpcije nakon dodatka CT-DNK u rastvor platina(II) kompleksa. Na graficima desno prikazana je linearna zavisnost $[\text{DNK}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ u odnosu na $[\text{DNK}]$ za **Pt2** odnosno **Pt5** kompleks.

Unutrašnje konstante vezivanja (K_b) izračunate su na osnovu promene apsorpcije na odgovarajućoj talasnoj dužini nakon dodatka CT-DNK prema jednačini koja je data u Eksperimentalnom delu rada (3.4) Dobijeni rezultati prikazani su grafički kao zavisnost $[\text{DNK}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ od koncentracije DNK. Nagib dobijene prave ima vrednost $1/(\epsilon_b - \epsilon_f)$, dok je odsečak na y osi $1/K_b \cdot (\epsilon_b - \epsilon_f)$. Unutrašnja konstanta vezivanja (K_b) određena je iz odnosa nagiba prave i odsečka na y osi (Slika 31). Dobijene vrednosti za unutrašnje konstante vezivanja (K_b) su prikazane u Tabeli 5. Na osnovu brojnih vrednosti K_b , kao i na osnovu brojnih vrednosti hipohromizma ($H\% \approx 5$), može se zaključiti da ispitivani **Pt1–Pt7** kompleksi, koji imaju rigidni mostni 1,5-naftiridinski ligand sa CT-DNK ostvaruje veoma slabe interakcije. Veća brojna

vrednost K_b za **Pt1** kompleks u odnosu na **Pt2–Pt7** može se pripisati uticaju dva monodentatno koordinovana amminski liganda, što dovodi do veće fleksibilnosti **Pt1** kompleksa u odnosu na dinuklearne komplekse platine(II) koji sadrže bidentatno koordinovane diaminske ligande (**Pt2–Pt7**). Na osnovu brojnih vrednosti K_b izračunata je promena Gibsove energije (ΔG , Tabela 5) Pt(II)/CT-DNK adukta primenom jednačine: $\Delta G = -RT \ln K_b$. Negativne vrednosti Gibsove energije ukazuju na spontanost interakcija dinuklearnih kompleksa platine(II) sa CT-DNK.

Na slici 32 prikazani su UV-Vis spektri interakcija **Pt8** i **Pt9** kompleksa sa CT-DNK. Na osnovu UV-Vis spektrofotometrijskih podataka može se zaključiti da i u reakcijama dinuklearnih Pt(II) kompleksa, kod kojih je 1,6-nphe mostni ligand, nakon dodatka CT-DNK u rastvor kompleksa intenzitet apsorpcije blago opada sa veoma malim hipohromizmom, na



Slika 32. Apsorpcioni spektri **Pt8** (a) (**Pt9**) (b) kompleksa u 0,01 M fosfatnom puferu pre i nakon dodatka CT-DNK. Strelicom je označena promena apsorpcije nakon dodatka CT-DNK u rastvor platina(II) kompleksa. Na graficima desno prikazana je linearna zavisnost $[DNK]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ u odnosu na $[DNK]$ za **Pt8** odnosno **Pt9** kompleks.

osnovu čega možemo zaključiti da dolazi do slabih interakcija ispitivanih kompleksa sa CT-DNK. Dobijene vrednosti za unutrašnje konstante vezivanja (K_b) su prikazane u Tabeli 5. Na osnovu brojnih vrednosti unutrašnjih konstanti vezivanja (K_b) za **Pt8** i **Pt9** komplekse možemo zaključiti da ovi kompleksi sa CT-DNK ostvaruju slabe interakcije. Unutrašnja konstanta vezivanja (K_b) za klasični interkalator etidijum-bromida (EtBr), iznosi $1,23 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ [167] i jasno je da su vrednosti K_b koje su dobijene u našim eksperimentima oko 100 puta manje u poređenju sa K_b za EtBr. Pretpostavka je da ispitivani kompleksi sa CT-DNK ostvaruju interakcije koje su elektrostatičke prirode i posledica su interakcije pozitivno naelektrisanog kompleksnog katjona (+2) i negativno naelektrisanih fosfatnih grupa u CT-DNK.

Veća brojna vrednost K_b za **Pt8** kompleks u odnosu na **Pt9**, takođe se može pripisati uticaju dva monodentatno koordinovana amminski liganda, što dovodi do veće fleksibilnosti **Pt8** u odnosu na dinuklearni kompleks platine(II) koji sadrži bidentatno koordinovani etilendiaminski ligand (**Pt9**). Negativne vrednosti Gibsove energije ukazuju na spontanost interakcija **Pt8** i **Pt9** kompleksa sa CT-DNK.

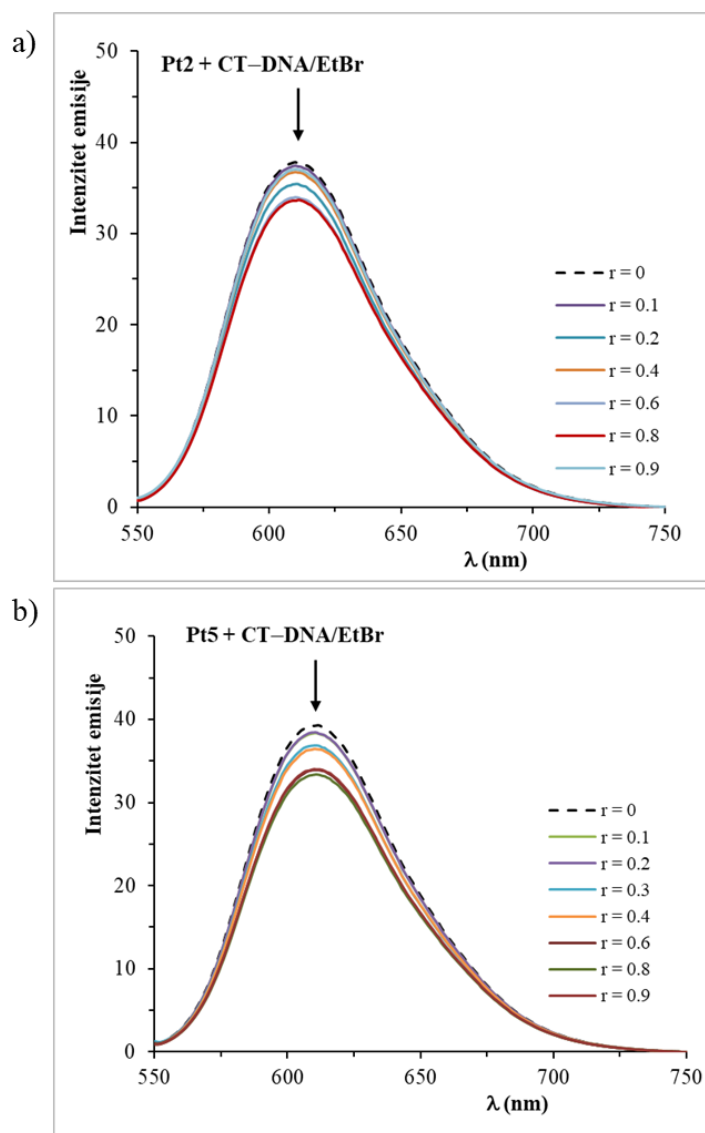
Kao što je prikazano u Tabeli 5, mostni naftiridinski ligandi ne utiču na jačinu interakcija ispitivanih kompleksa sa CT-DNK. Unutrašnje konstante vezivanja za **Pt1** i **Pt8** ($K_b(\text{Pt1}) = 5,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_b(\text{Pt8}) = 5,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$), kao i za **Pt2** i **Pt9** ($K_b(\text{Pt2}) = 3,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, $K_b(\text{Pt9}) = 3,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$) komplekse su približno iste, na osnovu čega možemo zaključiti da položaj atoma azota u kondenzovanim piridinskim prstenovima ne utiče na jačinu interakcija ovih kompleksa sa CT-DNK.

Fluorescentna spektroskopija

Primenom emisione fluorescentne spektroskopije ispitivane su interakcije dinuklearnih platina(II) kompleksa sa CT-DNK. Kao tipičan interkalator za ova ispitivanja korišćen je etidijum-bromid (EtBr). Etidijum-bromid je fluorescentna boja, koja sadrži heterociklični aromatični fenantridin, koji zbog interkalacije planarnog fenantridinskog prstena između baznih parova DNK heliksa emituje intenzivnu fluorescenciju [168]. Interakcije **Pt1–Pt9** kompleksa sa EtBr/CT-DNK aduktom ispitivane su u rastvoru fosfatnog pufera (PBS, pH = 7,4) na 25 °C. U emisionom spektru etidijum-bromida nakon dodatka CT-DNK javlja se intenzivna emisija na $\lambda_{em} = 612 \text{ nm}$ ($\lambda_{ex} = 527 \text{ nm}$) [169]. Nakon dodatka dinuklearnih platina(II) kompleksa (**Pt1–Pt9**) dolazi do blagog smanjenja fluorescentne emisije sa povećanjem koncentracije ispitivanih dinuklearnih platina(II) kompleksa. Smanjenje fluorescencije ukazuje da dolazi do istiskivanja interkaliranog EtBr i pojave slobodnog EtBr, čiji je intenzitet emisije slabiji od intenziteta interkaliranog EtBr.

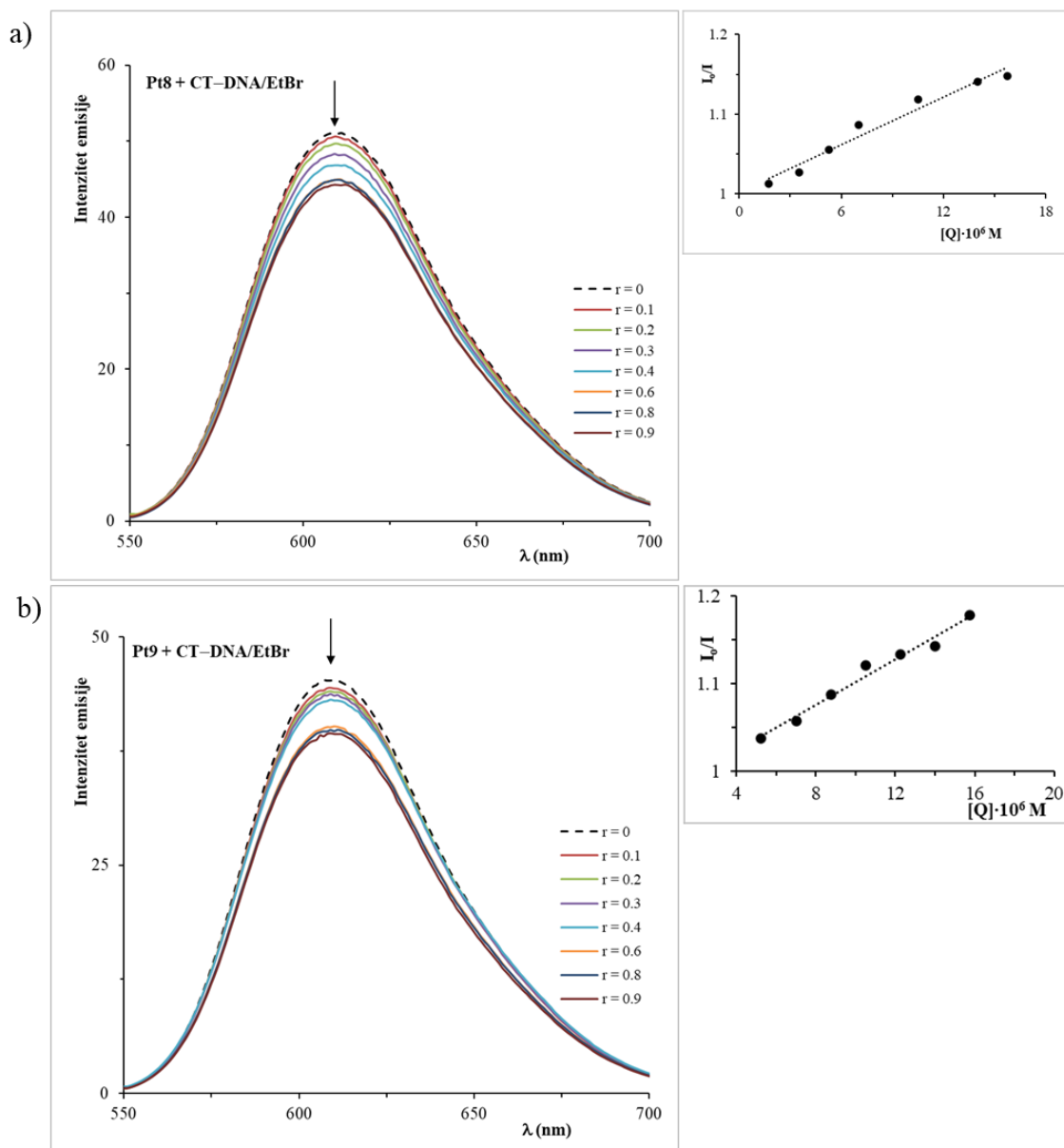
Emisioni spektri EtBr/CT-DNK adukta u prisustvu **Pt1–Pt7** kompleksa su veoma slični. Na slici 33. prikazani su emisioni spektri EtBr/CT-DNK adukta i odgovarajući spektri nakon dodatka **Pt2** i **Pt5** kompleksa, a na slici 34. emisioni spektri EtBr/CT-DNK u odsustvu i prisustvu **Pt8** i **Pt9** kompleksa. Nakon dodatka rastvora platina(II) kompleksa intenzitet emisije na 612 nm blago opada, što ukazuje na veoma slabo vezivanje ispitivanih platina(II) kompleksa za CT-DNK.

Intenzitet interakcija **Pt1–Pt9** kompleksa sa EtBr/CT-DNK aduktom određen je na osnovu Stern-Volmerove konstante (K_{sv}) primenom Stern-Volmerove jednačine (Eksperimentalni deo Poglavlje 3.5.2.) Dobijeni rezultati prikazani su grafički kao zavistnost I_0/I od $[Q]$. Iz nagiba dobijene prave određena je Stern-Volmerova konstanta (K_{sv}).



Slika 33. Emisioni spektri EtBr/CT-DNK u prisustvu **Pt2** (a) i **Pt5** (b) kompleksa u 0,01 M fosfatnom puferu

Dobijene vrednosti za Stern-Volmerovu konstantu (K_{sv}), kao i za konstantu stabilnosti (K_a), koja je određena primenom Skečerdove jednačine (Eksperimentalni deo Poglavlje 3.5.2.), (Tabela 5) ukazuju da naši ispitivani kmpleski nisu dobri interkalatori i da sa CT-DNA ostvaruju slabe interakcije, koje se mogu pripisati interakcijama pozitivno naelektrisanih kompleksnih jona i negativno naelektrisanih fosfatnih grupa u DNK (elektrostatičke inetrakcije). Ovi rezultati su u saglasnosti sa vrednostima za unutrašnje konstante vezivanje (K_b) koje su dobijene primenom UV-Vis spektrofotometrije. Broj vezivnih mesta za ispitivane komplekse ($n \approx 1$), potvrđuje da se kompleksi vezuju na isti način. Poređenjem brojnih vrednosti K_a kompleksa koji kao mostni ligand sadrže 1,6-nphe (**Pt8** i **Pt9**), jasno je da prisustvo dva NH_3 liganda u **Pt8** kompleksu u odnosu na bidentatno koordinovani etilendiaminski ligand u **Pt9** doprinosi većoj fleksibilnosti **Pt8** kompleksa a samim tim ovaj kompleks ostvaruje jače interakcije sa DNK. Vrednosti K_{sv} ukazuju da dinuklearni **Pt1–Pt9** kompleksi u malom procentu istiskuju etidijum-bromid iz EtBr/CT-DNK adukta.



Slika 34. Emisioni spektri EtBr/CT-DNK u prisustvu **Pt8** (a) i **Pt9** (b) kompleksa u 0,01 M fosfatnom puferu. Na graficima desno prikazana je linearna zavisnost I_0/I od koncentracije kompleksa ($[Q]$)

4.2.2 Interakcije dinuklearnih kompleksa platine(II) sa BSA

Serum albumin, kao najzastupljeniji protein koji se nalazi u krvnoj plazmi, pored uloge u održavanju koloidnog osmotskog pritiska, ima važnu ulogu u transportu mnogih biomolekula kao što su steroidi, masne kiseline i hormoni. Ispitivanje načina vezivanja biološki aktivnih jedinjenja sa serum albuminom mogu dati korisne informacije o vezi između strukture i terapijske efikasnosti lekova, njihove biodistribucije, toksičnosti, a nekada čak i o mehanizmu delovanja leka [170]. Serum albumin igra važnu ulogu u transportu mnogih farmaceutskih preparata do obolelog mesta jer čini skoro 55% ukupnih proteina u krvnoj plazmi [171]. Serum albumin izolovan iz krvi goveda (*bovine serum albumin*, BSA) je najviše izučavani serum albumin zbog lake dostupnosti i njegove strukturne sličnosti sa humanim serum albuminom

(*humane serum albumin*, HSA) [172,173]. Ova dva proteina imaju veoma sličnu primarnu strukturu (Slika 35 [174]. Humani serum albumin sadrži jedan triptofan na poziciji Trp-214, dok BSA sadrži dva triptofanska ostatka, Trp-134 i Trp-214. Primarnu strukturu BSA čini 583 aminokiselinskih ostataka. U proteinu se razlikuju tri domena: domene I, II i III. Svaki domen sadrži po dva poddomena koji su označeni kao poddomen A i poddomen B. Poznato je da se lekovi obično vezuju za poddomen IIA i IIIA [175,176]. Pored toga što su odgovorni za transport lekova, ovi proteini su odgovorni i za smanjenje toksičnosti kompleksa platine(II) koji se trenutno primenjuju za lečenje malignih oboljenja. Interakcije lekova i/ili potencijalnih lekova sa BSA mogu se pratiti primenom fluorescentne spektroskopije, na osnovu smanjenja intenziteta emisije BSA na $\lambda_{em,max} = 352$ nm.

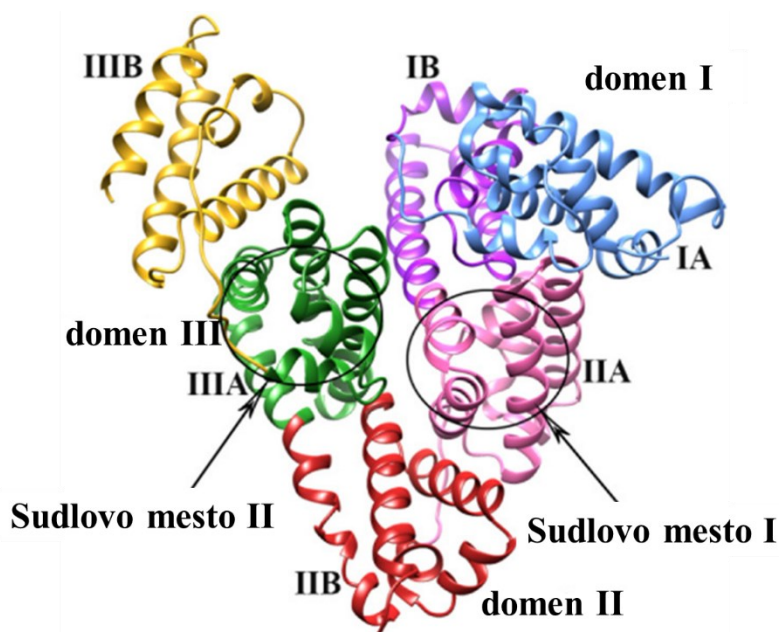
Tabela 5. Unutrašnje konstante vezivanja (K_b) i promena Gibsove energije (ΔG) dobijene primenom UV-Vis spektrofotometrije za reakcije **Pt1–Pt9** sa CT-DNK. Stern-Volmerove konstante (K_{sv}), konstante stabilnosti (K_a) i broj vezivnih mesta (n) ispitivanih dinuklearnih platina(II) kompleksa sa CT-DNK dobijene primenom fluorescentne spektroskopije

kompleks	$K_b \cdot 10^3$ (M^{-1})	ΔG (kJ/mol)	$K_{sv} \cdot 10^4$ (M^{-1})	$K_a \cdot 10^4$ (M^{-1})	n
Pt1	5,1	-22,0	1,1	4,8	1,0
Pt2	3,5	-21,0	1,4	0,7	1,0
Pt3	3,8	-21,2	1,4	3,9	0,9
Pt4	3,7	-21,2	0,9	1,0	1,0
Pt5	2,5	-20,2	1,5	3,9	1,0
Pt6	2,4	-20,1	1,9	2,9	0,9
Pt7	3,2	-20,8	0,6	1,1	0,7
Pt8	5,2	-22,1	1,0	5,3	1,1
Pt9	3,8	-21,2	1,2	0,4	1,0

Fluorescentna spektroskopija

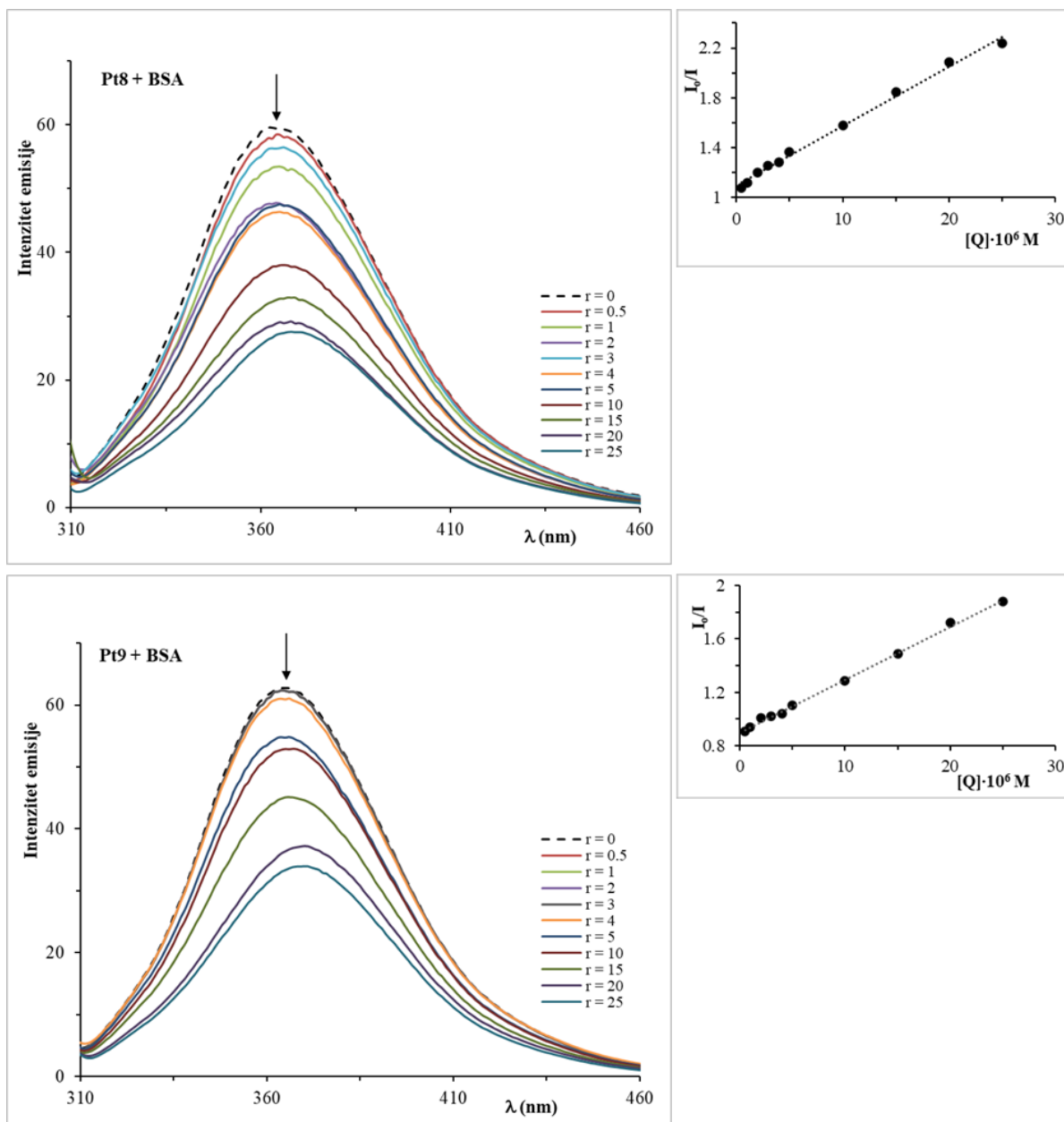
Primenom emisione fluorescentne spektroskopije ispitivane su interakcije **Pt8** i **Pt9** kompleksa sa BSA. Fluorescencija proteina ukazuje na prisustvo triptofana, tirozina i fenilalanina, odnosno prisustvo aromatičnih aminokiselina [177]. Kada se ekscitovanje vrši na $\lambda_{ex} = 295$ nm fluorescencija je posledica prisustva triptofana u proteinu. Fluorescencija tirozina praktično je potpuno ugašena ako je jonizovan ili blizu C- ili N-terminalne aminokiseline, a fluorescencija fenilalanina je takođe ugašena ako je u proteinu prisutan triptofan [178,179]. Rastvor goveđeg serum albumina (BSA) daje intenzivnu fluorescentnu emisiju na $\lambda_{em,max} = 352$ nm, kada je ekscitovan na 295 nm. Nakon dodatka **Pt8** ili **Pt9** kompleksa u rastvor BSA uočeno je da sa povećanjem koncentracije kompleksa, dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije (Slika 36), na osnovu čega se može zaključiti da ispitivani kompleksi intereaguju sa ovim

biomolekulom. Promene u emisionim spektrima BSA/Pt(II) kompleksa ukazuju na interakcije proteina sa kompleksima, koje dovode do promene u sekundarnoj strukturi BSA [180].



Slika 35. 3D struktura BSA sa obeleženim domenima, subdomenima i najčešćim vezivnim mestima za lekove (Sudlovo mesto I i Sudlovo mesto II).

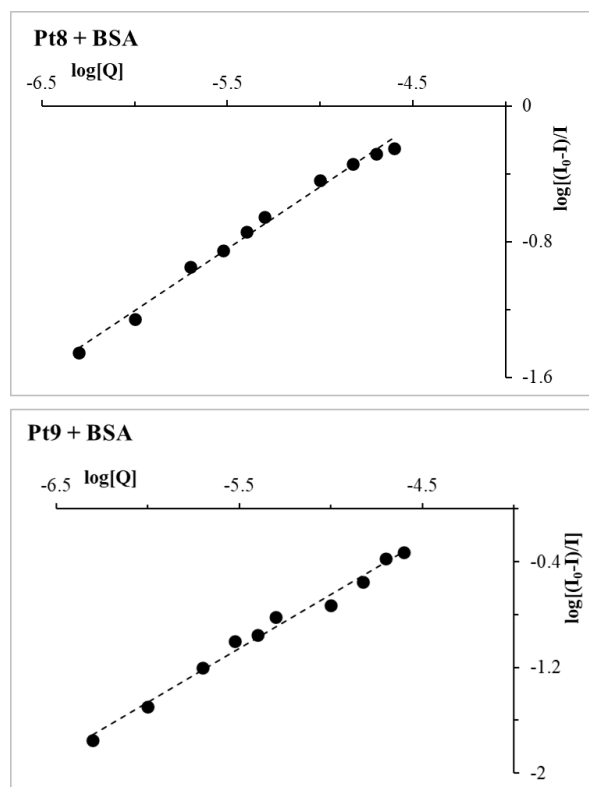
Na osnovu smanjenja intenziteta emisije BSA sa povećanjem koncentracija **Pt8** i **Pt9** kompleksa, primenom jednačina koje su prikazane u eksperimentalnom delu rada (Poglavlje 3.6.) određene su: Stern-Volmerova konstante stabilnosti (K_{sv}), konstante brzine „gašenja“ fluorescencije (k_q), konstante vezivanja (K_a) kao i broj vezivnih mesta (n). Vrednosti konstanti prikazane su u Tabeli 6. Prosečno vreme fluorescencije BSA u odsustvu kompleksa je $\tau_0 = 10^{-8}$ s, na osnovu čega je izračunata konstanta brzine „gašenja“ fluorescencije ($k_q, M^{-1} s^{-1}$). Iz linearosti Stern-Volmerovih grafika može se zaključiti da oba kompleksa dovode do gašenja emisije triptofata u BSA. Vrednosti K_{sv} i k_q ukazuju da se ispitivani kompleksa mogu vezati za BSA. Približne brojne vrednosti K_{sv} za **Pt8** i **Pt9** komplekse (Tabela 6) ukazuju na veoma sličan afinitet vezivanja ovih kompleksa za BSA. Konstante „gašenja“ fluorescencije su veće od 10^{10} ($k_q > 10^{12} M^{-1} s^{-1}$) što ukazuje na statički mehanizam gašenja emisije [181]. Vrednosti konstanti vezivanja (K_a) i broj vezivnih mesta (n) izračunati su na osnovu Skečerdove jednačine (Poglavlje 2.6.) iz linearne zavisnosti $\log[(I_0-I)/I]$ od $\log[Q]$ (Slika 37). Na osnovu vrednosti K_a može se zaključiti da se **Pt8** i **Pt9** kompleksi mogu vezati za BSA. Vrednosti K_a za ispitivane komplekse su manje u poređenju sa K_a za avidin ($K_a=10^{15} M^{-1}$), koji ostvaruje najjače nekovalentne interakcije sa biomolekulima, tako da se veza **Pt8** /**Pt9**-BSA može lako raskinuti čak i pre dolaska do ciljanog mesta u ćeliji [182,183]. Konstanta vezivanja K_a je približno 4 puta veća za **Pt8** u odnosu na **Pt9** kompleks, što se može pripisati prisustvu dva amminska liganda u **Pt8** kompleksu, koji mogu ostvariti veći broj vodoničnih veza sa BSA u odnosu na **Pt9** kompleks, koji sadrži bidentatno koordinovani etilendiaminski ligand. Broj vezivnih mesta za oba kompleksa je ≈ 1 , što znači da ispitivani kompleksi ostvaruju samo interakciju sa jednim vezivnim mestom u molekulu BSA.



Slika 36. Emisioni spektri BSA u prisustvu **Pt8** i **Pt9** kompleksa. $[BSA] = 1,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, $[Q] = (0 - 2,5) \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$. Grafik desno predstavlja zavisnost I_0/I od koncentracije kompleksa ($[Q]$)

Tabela 6. Stern-Volmerova konstante (K_{sv}), konstante gašenja (k_q), konstante vezivanja (K_a) i broj vezivnih mesata (n) za interakcije između BSA i dinuklearnih **Pt8** i **Pt9** kompleksa.

kompleks	$K_{sv} \cdot 10^4 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	$k_q \cdot 10^{12} \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$K_a \cdot 10^4 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	n
Pt8	4,9	4,9	1,0	0,8
Pt9	3,8	3,8	0,3	0,8



Slika 37. Linearna zavisnost $\log[(I_0-I)/I]$ od $\log[Q]$ na osnovu Skečerdove jednačine za interakcije **P t8** i **Pt9** kompleksa sa BSA

4.3. Molekulski doking

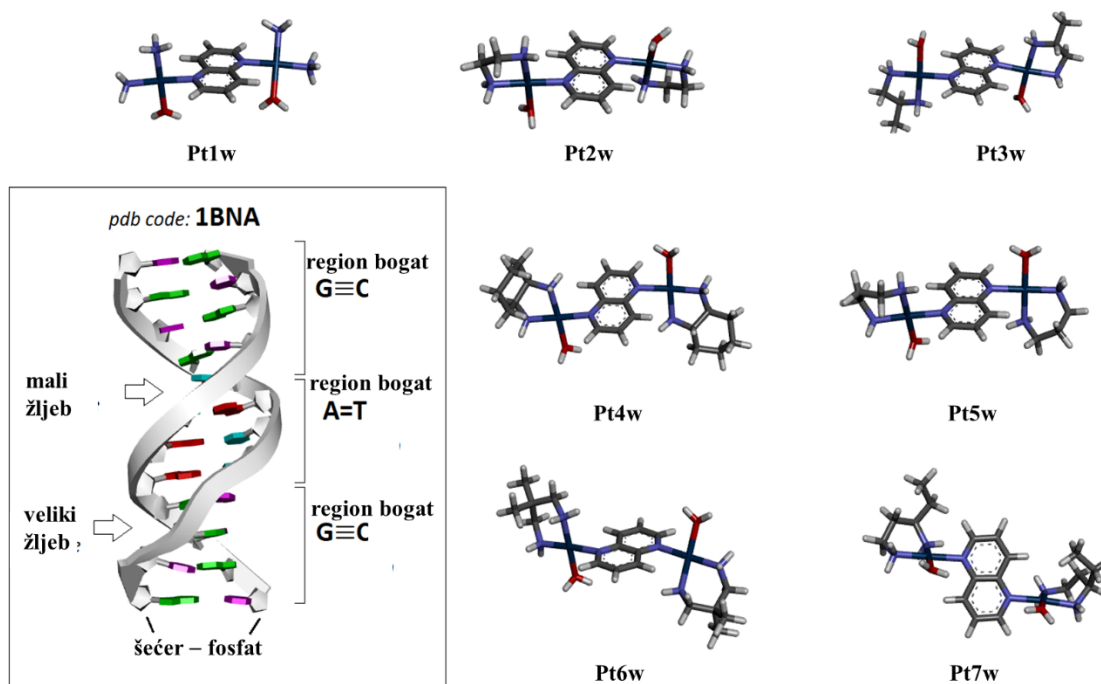
Molekulski doking je veoma korisna tehnika kojom se može predvideti način interakcije ili vezivanja kako lekova, tako i potencijalnih terapijskih agenasa za DNK (Slike 3, 5, 18, 20, 22 i 26). U odnosu na način vezivanja za DNK polinuklearni platina(II) kompleksi se mogu podeliti u dve grupe: kompleksi koji se kovalentno vezuju za DNK (trinuklearni kompleks platine(II) BBR3464, *neklasični* kompleks platine(II), (Slika 5) i kompleksi koji sa DNK ostvaruju nekovalentne interakcije [184,185]. Kristalna struktura Pt(II)/DNK adukta u kome je trinuklearni kompleks platine(II) (triplatinNC-A, Slika 5) nekovalentno vezan za DNK, pokazuje novi način vezivanja, koji se razlikuje od interkalacije i vezivanja za žljebove (Slika 22). Ovaj način nekovalentnog vezivanja označen je kao vezivanje za fosfatnu kičmu DNK (od eng. *phosphate clamp motif*), koji uključuje unutarlančano fosfatno vezivanje, duž fosfatne kičme DNK (*backbone tracing*) i premošćavanje žljeba (*groove spanning*) [186].

Rezultati molekulskog dokinga ispitivanih kompleksa sa DNK su pokazali da je fosfatno vezivanje jedinstveno nekovalentno vezivanje kompleksa koji imaju naelektrisanje +2 za DNK, a obuhvata vezivanje duž fosfatne kičme i premošćavanje žljeba.

U ovom radu rezultati molekulskog dokinga korišćeni su da bi se pretpostavio mogući način vezivanja akva derivata (**Pt1w–Pt7w**) dinuklearnih **Pt1–Pt7** kompleksa za DNK. Naime, poznato je da supstitucija labilnih liganada molekulom vode (hidroliza) u kompleksima platine(II), koji se trenutno primenjuju za lečenje tumorskih oboljenja, predstavlja ključni korak u njihovoj antitumorskoj aktivnosti, kao i u njihovim reakcijama sa DNK [148]. Shodno tome,

primenom molekuskog dokinga ispitivane su interakcije $[cis-\{Pt(H_2O)(NH_3)_2\}_2(\mu-1,5-nphe)]^{4+}$, **Pt1w** i $[\{Pt(L)(H_2O)\}_2(\mu-1,5-nphe)]^{4+}$, **Pt2w–Pt7w** kompleksa sa DNK, čija je struktura uzeta iz Proteinske baze podataka (pdb code: 1BNA) [148]. Struktura DNK i optimizovane strukture dinuklearnih **Pt1w–Pt7w** kompleksa prikazane su na slici 38.

Energije vezivanja, adukta koji imaju najveću stabilnost, su u opsegu od $-8,60$ do $-10,63$ kcal/mol, (Tabela 7). U aduktima koji su prikazani na slici 39, kao i na slikama P3–P6, **Pt1w–Pt7w** kompleksi sa DNK grade vodonične veze koje nastaju između (Pt)–N–H i (Pt)–O–H grupa kompleksa platine(II) i kiseonika fosfatnih grupa DNK. Ovi načini nekovalentnog vezivanja patina(II) kompleksa za DNK označeni su kao fosfatno vezivanje. Većina kompleksa (**Pt1w–Pt6w**, Slika 39) se vezuje za fosfatnu kičmu uz premošćavanje žljeba (*groove spanning*), dok samo **Pt7w** (Slika 39) se vezuje duž fosfatne kičme (*backbone tracing*). Razlika u energijama vezivanja je rezultat različitog broja vodoničnih veza, njihove geometrije kao i da li su (Pt)–N–H i (Pt)–O–H grupe uključene u vodonično vezivanje. Međutim, rezultati analize razlaganja energije vezivanja (Tabela 7) pokazuju da elektrostatička energija (E2) ima veći doprinos privlačenja od energije vodoničnog vezivanja (E1). Naime, postoje veoma jaka elektrostatička (Kulonova) privlačenja između pozitivno naelektrisanih akva kompleksa platine(II) (+4) i negativnog naelektrisanja fosfatne kičme DNK. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koji su dobijeni na osnovu UV-Vis spektrofotometrije. Primenom eksperimentalne UV-Vis metode, nađeno je da dolazi do elektrostatičkih interakcija između pozitivno naelektrisanih kompleksa platine(II) i negativnog naelektrisanja fosfatne kičme DNK.



Slika 38. Struktura DNK (pbd code:1BNA) i optimizovane strukture ispitivanih dinuklearnih $[\{Pt(L)(H_2O)\}_2(\mu-1,5-nphe)]^{4+}$ kompleksa (**Pt1w–Pt7w**).

Molekulski doking je urađen i za hlorido derivate ispitivanih kompleksa, i zaključeno je da pet dinuklearnih platina(II) kompleksa (**Pt1**, **Pt2**, **Pt4**, **Pt5** i **Pt7**) prvenstveno se za DNK vežu na

način označen kao premošćavanje žljeba, dok je vezivanje unutar malog žljeba energetski favorizovano za **Pt3** i **Pt6** komplekse (Slika P7). Nađeno je da akva derivati dinuklearnih platina(II) kompleksa (**Pt1w–Pt7w**) imaju sklonost da se za DNK vežu po modelu premošćavanja žljeba, osim **Pt7w** kompleksa, koji ima nešto veću sklonost da se veže duž fosfatne kičme DNK. Ispitivani kompleksi kao mostni ligand sadrže 1,5-nphe, i u odnosu na polinuklearne platina(II) komplekse koji su prikazani na Slici 5, koji između terminalnih platina(II) jona imaju tetraamminskiplatina(II) jedinice, pokazuju isti način vezivanja za DNK, samo što ispitivani dinuklearni platina(II) kompleksi pokazuju nešto veću tendenciju da ostvare interakciju putem premošćavanja žljeba. Energija vezivanja (kcal/mol) i rezultati analize razlaganja energije vezivanja za **Pt1w–Pt7w** komplekse sa DNK. Ovi rezultati su dobijeni primenom molekuskog dokinga.

Tabela 7. Energija vezivanja (kcal/mol) i rezultati analize razlaganja energije vezivanja za **Pt1w–Pt7w** komplekse sa DNK. Ovi rezultati su dobijeni primenom molekuskog dokinga.

kompleks	ukupna energija (E _t)	razlaganje energije (E _t = E1+E2+E3+E4-E5)				
		E1	E2	E3	E4	E5
Pt1w	-8,60	-2,44	-8,35	+0,59	+2,20	+0,59
Pt2w	-10,63	-2,52	-9,21	+10,63	+1,10	+10,63
Pt3w	-9,14	-2,55	-7,70	+2,29	+1,10	+2,29
Pt4w	-9,33	-3,28	-7,15	+2,22	+1,10	+2,22
Pt5w	-9,38	-3,46	-7,03	+2,45	+1,10	+2,45
Pt6w	-10,27	-3,91	-7,46	+2,74	+1,10	+2,74
Pt7w	-9,47	-4,77	-6,35	+2,35	+1,65	+2,35

Et-

ukupna slobodna energija vezivanja

E1-vdV (van der Valsova energija) + H-veza (energija vodoničnog vezivanja)+ desolvaciona energija

E2-energija elektrostatičkog vezivanja

E3- ukupna unutrašnja energija

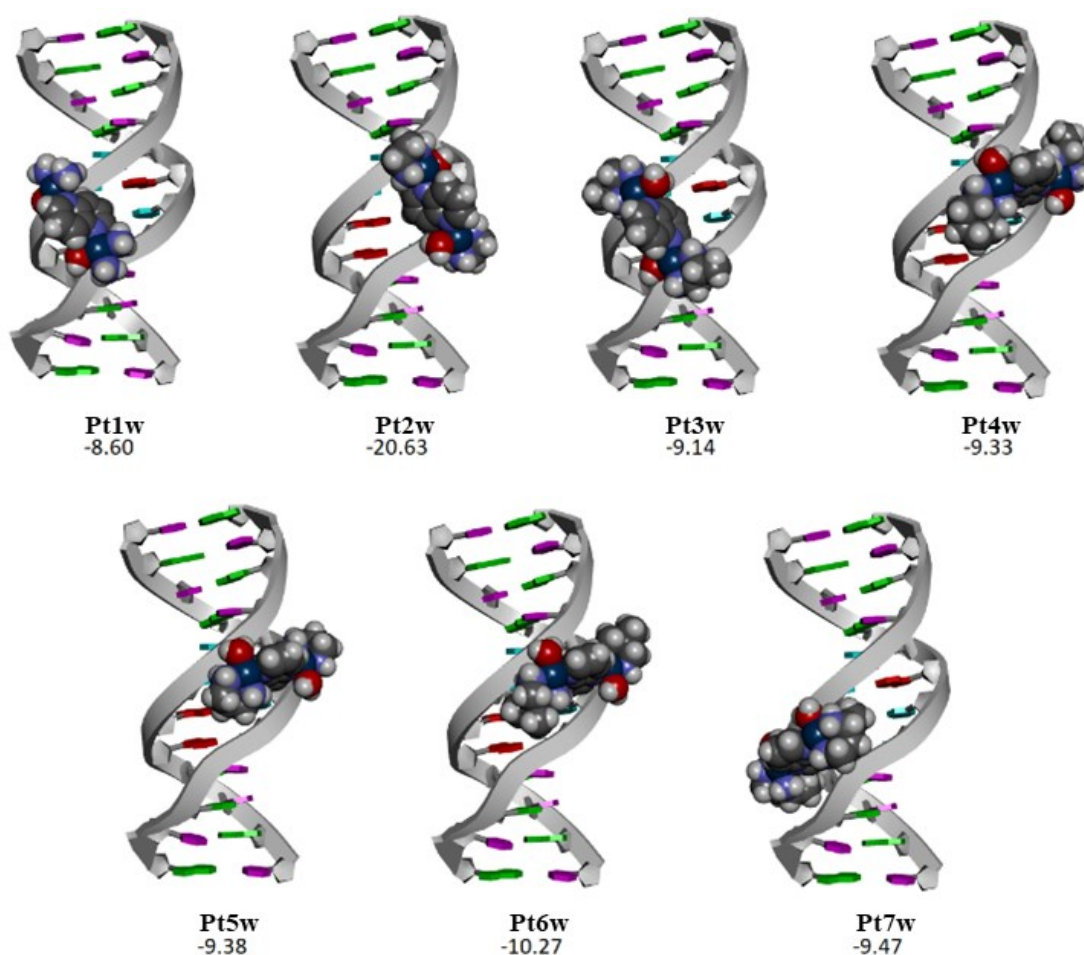
E4-torziona slobodna energija

E5- nevezivna energija sistema

Poznato je da polinuklearni kompleksi platine(II) sa biološki važnim ligandima kao što su spermin i spermidin, pokazuju biološku sličnost sa kompleksima prikazanim na Slici 5. Međutim, platina(II) kompleksi sa sperminom ili spermidinom u reakciji sa DNK prvenstveno grade međulančane unakrsne veze dugog dometa [184–186]. U literaturi postoje podaci da dinuklearni platina(II) kompleksi, opšte formule $[\{Pt(NH_3)_3\}_2(\mu-(H_2N(CH_2)_nNH_2))]^{4+}$, mogu da izazovu konformacione promene u strukturi DNK (prelazak B → Z formu DNK ili prelazak B → A formu DNK), za razliku od nekoordinovanog spermina [65,187]. Način vezivanja, koji je označen kao premošćavanje žljeba, znatno više utiče na tercijarnu strukturu B-DNK heliksa, što ukazuje na kondenzaciju DNK [78]. Kao posledica ovih konformacionih promena dolazi do oslobađanja interkaliranog etidijum-bromida (EtBr) i gašenja njegove fluorescencije, što olakšava vezivanje drugih molekula za mali žljeb. Kooperativno vezivanje je rezultat vezivanja za mali žljeb i fosfatnog vezivanja polinuklearnih kompleksa platine(II) [75-77], dok je gašenje

fluorescencije EtBr povezano sa konformacionim promenama u terciarnoj strukturi DNK u kojoj nije favorizovana interkalacija EtBr. Takođe, poznato je da kompleksi TriplatinNC i TriplatinNC-A prikazani na Slici 5, znatno više utiču na kondenzaciju DNK u poređenju sa nekoordinovanim sperminom [79,80]. Gašenje fluorescencije EtBr i premošćavanje žljeba, koje je predviđeno molekulskim dokingom, ukazuje da vezivanje ispitivanih dinuklearnih platina(II) kompleksa dovodi do kondenzovanja DNK.

Kompleksi triplatinNC–tipa (Slika 5) pokazuju veći afinitet da sa DNK ostvare vezivanje duž fosfatne kičme (region bogat G≡C), dok za premošćavanje žljeba (region bogat A=T)) pokazuje manji afiniteta [78,79]. Rezultati molekulskog dokinga su pokazali da ispitivani dinuklearni kompleksi platine(II) imaju veći afinitet za vezivanje uz premošćavanje žljeba (*groove spanning*) u regionu koji je bogat A=T nukleinskim bazama, dok je manje uobičajeno vezivanje duž fosfatne kičme (*backbone tracking*). Razlike u načinima vezivanja ispitivanih dinuklearnih platina(II) kompleksa i kompleksa triplatinNC–tipa za DNK posledica su prirode mostnih liganda. Ispitivani kompleksi u svojoj strukturi imaju veoma rigidan, aromatični 1,5-naftiridinski ligand, dok centralni deo triplatinNC–tipa kompleksa čine fleksibilne platina(II)-amminske jedinice, koje imaju tendenciju elektrostatičkog i vodoničnog vezivanja za DNK. Prema tome, dominantnu ulogu u određivanju načina vezivanja **Pt1–Pt7** kompleksa za DNK ima mostni aromatični ligand.



Slika 39. Strukture najstabilnijih načina vezivanja **Pt1w–Pt7w** kompleksa za DNK, koje su dobijene primenom molekulskog dokinga.

Faktori od kojih najviše zavisi citotoksičnost kompleksa platine su ćelijska apsorpcija, metabolička transformacija kompleksa platine(II) usled reakcije sa biomolekulima, kao i formiranje adukata sa DNK. Povećanje pozitivnog naelektrisanja polinuklearnih Pt(II) kompleksa dovodi do povećanja ćelijske apsorpcije, zbog čega je ćelijska apsorpcija Triplatin NC (**3**) kompleksa znatno bolja u poređenju sa kompleksom **1**, dinuklearnim kompleksu prikazanim na slici 5 [81]. Zbog nekovalentnih interakcija sa DNK kompleks **3** (TriplatinNC) u poređenju sa cisplatinom (kovalentni način vezivanja) ima mnogo veću moć ćelijske apsorpcije. Naši rezultati su u skladu sa ovim zapažanjem, jer svi ispitani dinuklearni platina(II) kompleksi pokazuju nešto bolju ćelijsku apsorpciju u poređenju sa cisplatinom.

Uprkos sličnim načinima vezivanja ispitivanih kompleksa za DNK, u poređenju sa TriplatinNC, razlike u njihovoj citotoksičnosti mogu se pripisati manjem pozitivnom naelektrisanju **Pt1-Pt7** kompleksa (+2) i prisustvu hemijski aktivnih Pt-Cl veza, koje čine ispitivane komplekse drugačijim hemijskim agensima u reakcijama sa biomolekulima.

4.4 Biološka ispitivanja

Naftiridin, kao i njegovi izomeri, zbog potencijalnih antiinflamatornih, antivirusnih, antimikrobnih, antituberkuloznih, antikancerogenih i drugih svojstava postaju predmet intenzivnog proučavanja [188]. Mononuklearni platina(II) kompleks, *cis*-[PtCl(NH₃)₂(1,8-naph)]NO₃, pokazao je približno isti citotoksični kapacitet kao i cisplatina, prema nekim kancerogenim ćelijskim linijama [189]. Pored toga, kompleksi iridijuma(III) i rodijuma(III) sa 1,8-naftiridinom pokazali su citotoksičnu aktivnost prema ćelijskim linijama karcinoma debelog creva i dojke [190]. Derivati cisplatine, sa dibenzo[*c,h*][1,6]naftiridin-6-on su redukovali preživljavanje ćelija humanog karcinoma debelog creva [191]. Cilj ovog dela rada bio je da se ispita citotoksični potencijal dinuklearnih kompleksa platine(II) koji kao mostni ligand sadrže 1,5-naftiridin (**Pt1-Pt7**) ili 1,6-naftiridin (**Pt8** i **Pt9**).

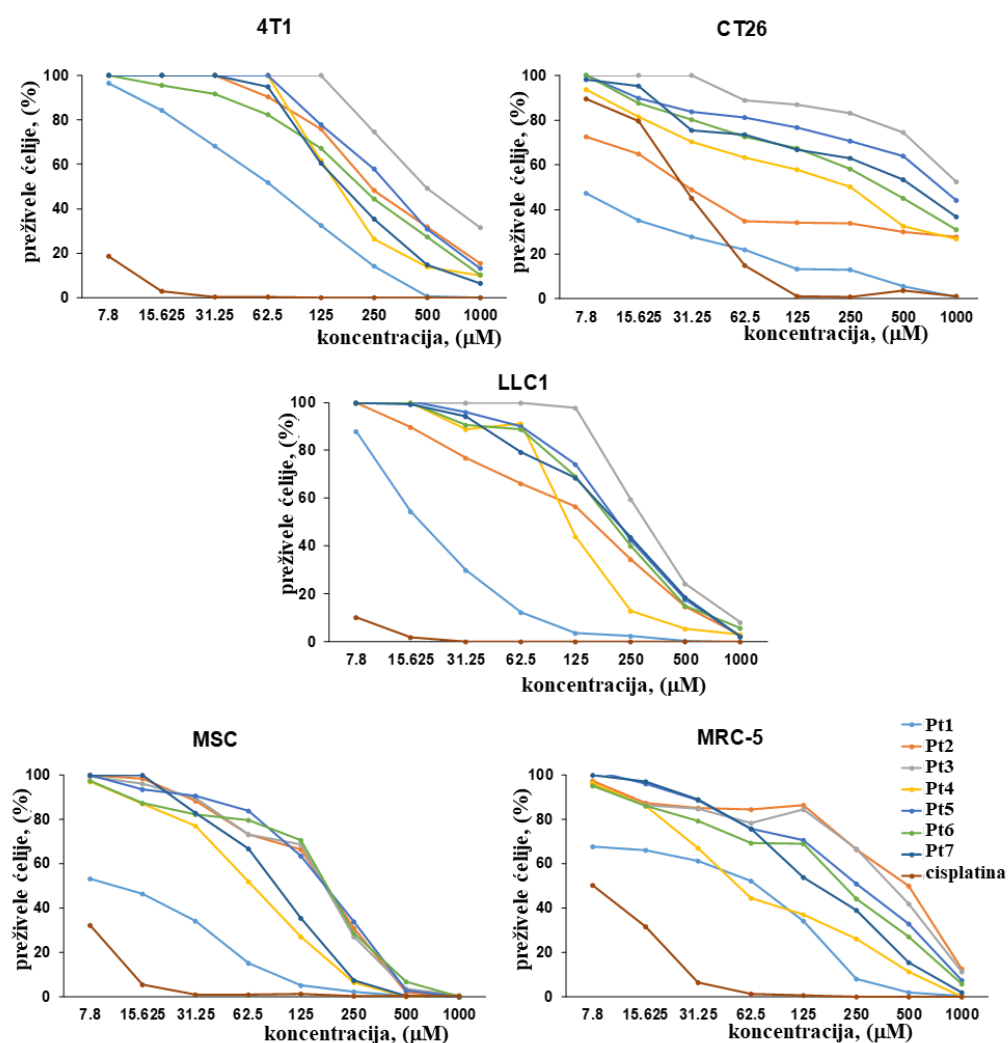
4.4.1 Ispitivanje citotoksične aktivnosti **Pt1-Pt7** kompleksa

Citotoksični potencijal sintetisanih **Pt1-Pt7** kompleksa primenom MTT kolorimetrijskog testa u *in vitro* uslovima ispitivan je na tri tumorske ćelijske linije miševa, karcinom dojke (4T1), debelog creva (CT26) i pluća (LLC1), kao i na dve zdrave ćelijske linije, humane ćelije fibroblasta pluća (MRC-5) i mezenhimalne matične ćelije miša (MSC) izolovane iz koštane srži. Rezultati citotoksičnosti ispitivanih kompleksa poređeni su sa citotoksičnim potencijalom cisplatine. Rezultati ispitivanja prikazani su u Tabeli 8, kao IC₅₀ vrednosti (IC₅₀ vrednosti **Pt1-Pt7** kompleksa i cisplatine određene su sa grafika koji prikazuje procenat preživljavanja (vijabilnost) ćelija u funkciji koncentracije ispitivanog kompleksa, kao ona koncentracija agensa (µM) koja smanjuje preživljavanje ispitivane kulture ćelija za 50%). Vrednosti prikazane u Tabeli 8 predstavljaju srednju vrednost tri nezavisna eksperimenta ± standardna devijacija, pri čemu je svaki eksperiment rađen tri puta.

Rezultati MTT testa su pokazali da **Pt1-Pt7** kompleksi skoro i ne pokazuju citotoksični efekat prema ćelijskim linijama karcinoma dojke (4T1), dok je citotoksični efekat prema ćelijskim linijama karcinoma pluća (LLC1) miševa veoma nizak (Tabela 8, Slika 40). U oba slučaja **Pt1** kompleks je pokazao najveće smanjenje citotoksičnog potencijala, posebno prema LLC1 ćelijama. Procenat preživelih LLC1 ćelija nakon tretiranja sa **Pt1** kompleksom i cisplatinom pri koncentraciji od 62,5 µM je bio veoma sličan (Slika 40). U poređenju sa

Table 8. IC₅₀ (μM) vrednosti za ispitivane Pt1–Pt7 komplekse i cisplatinu nakon 72 h inkubacije na 4T1, CT26, LLC1, MSC i MRC-5 ćelijskim linijama. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD (standardna devijacija) iz tri eksperimenta

kompleks	Ćelijske linije				
	4T1	CT26	LLC1	MSC	MRC-5
Pt1	64,5±9,2	3,3±1,0	18,2±3,1	8,1±1,3	37,0±1,7
Pt2	191,3±36,2	42,0±7,2	111,7±16,3	121,8±3,1	378,7±4,0
Pt3	523,6±83,6	>1000	337,7±56,2	117,6±2,5	310,8±4,9
Pt4	193,2±39,5	174,9±18,9	119,7±20,0	66,8±3,8	93,8±11,4
Pt5	327,2±76,1	>1000	183,8±21,4	133,5±6,9	198,2±2,5
Pt6	185,7±22,0	331,0±92,1	171,4±22,1	120,0±8,2	150,6±3,3
Pt7	186,2±31,5	483,5±87,6	159,9±18,5	72,2±12,8	135,2±3,9
cisplatina	<7,8	29,1±5,9	<7,8	<7,8	<7,8



Slika 40. Procenat preživelih 4T1, CT26, LLC1, MSC i MRC-5 ćelija nakon 72 h u prisustvu Pt1–Pt7 kompleksa i cisplatine.

cisplatinom, svi dinuklearni **Pt1–Pt7** kompleksi pokazuju manje citotoksične efekte u odnosu na zdrave ćelijske linije (MSC i MRC-5). Analizom IC_{50} vrednosti može se zaključiti da ispitivani kompleksi pokazuju veoma nisku citotoksičnu aktivnost prema 4T1 i LLC1 ćelijskim linijama (Tabela 8). Najveću aktivnost pokazao je **Pt1** kompleks prema ćelijskim linijama karcinoma pluća (LLC1, $IC_{50} = 18,2 \pm 3,1$) i prema ćelijskim linijama karcinoma dojke (4T1, $IC_{50} = 64,5 \pm 9,2$), ali mnogo slabiju u poređenju sa cisplatinom ($IC_{50} < 7,8$). Kompleksi **Pt1** i **Pt2** pokazali su nešto veću citotoksičnu aktivnost prema mišijem karcinomu debelog creva (CT26), naročito **Pt1** kompleks čija je aktivnost ($IC_{50} = 3,3 \pm 1,0$) višestruko veća od cisplatine ($IC_{50} = 29,1 \pm 5,9$). Međutim, pri nižim koncentracijama ($< 30 \mu\text{M}$) i **Pt2** kompleks pokazao je bolju citotoksičnu aktivnost prema CT26 ćelijskim linijama u odnosu na cisplatinu (Slika 40), nakon 72 h. IC_{50} vrednost za **Pt2** kompleks bila je viša u odnosu na IC_{50} za cisplatinu (Tabela 8). Međutim, IC_{50} za **Pt1** kompleks bila je znatno niža u poređenju sa IC_{50} za cisplatinu (Tabela 8).

Na osnovu IC_{50} vrednosti prikazanih u Tabeli 8, možemo zaključiti da **Pt1** i **Pt2** kompleksi pokazuju selektivnu aktivnost u odnosu na CT26 ćelijsku liniju u poređenju sa zdravim ćelijskim linijama MSC i MRC-5. IC_{50} vrednost **Pt1** kompleksa za CT26 bila je 2,5 odnosno 12 puta niža u odnosu na IC_{50} vrednosti koje je ovaj kompleks pokazao prema MSC i MRC-5 ćelijskim linijama. Skoro identičan odnos IC_{50} vrednosti prema CT26, MSC i MRC-5 ćelijskim linijama dobijen je i u slučaju tretiranja ćelijskih linija sa **Pt2** kompleksom (Tabela 8).

Ćelijska smrt (apoptoza)

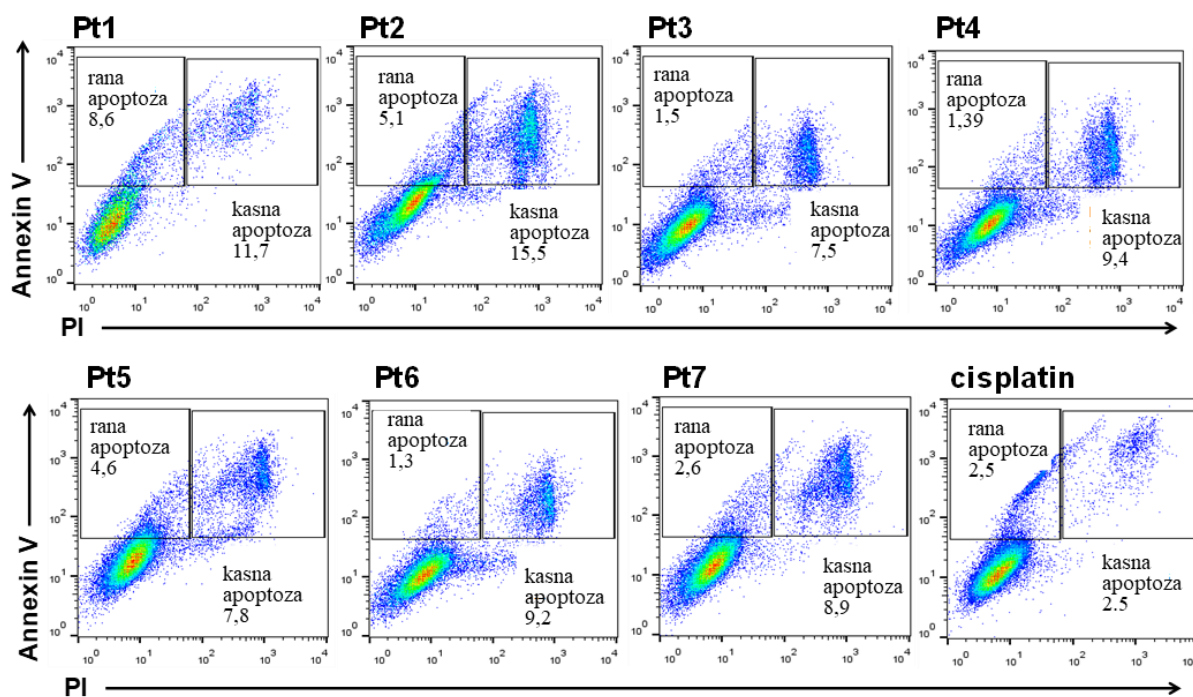
Apoptoza (programirana smrt ćelije) javlja se kako u fiziološkim tako i u patološkim procesima u organizmu. Ovaj oblik ćelijske smrti ograničen je na pojedinačne ćelije, koje izvršavaju „samouništenje“ i praćen je zapaljenskim procesima. Usled primene mnogih hemoterapeutika dolazi do apoptoze.

Primenom protočne citometrijske analize ispitivana je indukcija apoptoze CT26 ćelijskih linija pod uticajem **Pt1–Pt7** kompleksa i cisplatine. Nakon 24 h inkubacije CT26 ćelija sa ispitivanim kompleksima i cisplatinom ($15 \mu\text{M}$) uzorci su obojene Annexin V i propidijum-jodidom (PI). Svi testirani kompleksi nakon 24 h indukuju apoptotičku smrt CT26 ćelija (Slika 41). Prema MTT testu preživljavanja, kompleksi **Pt1** i **Pt2** su imali veći citotoksični efekat na CT26 u poređenju sa cisplatinom pri koncentracija od $15 \mu\text{M}$.

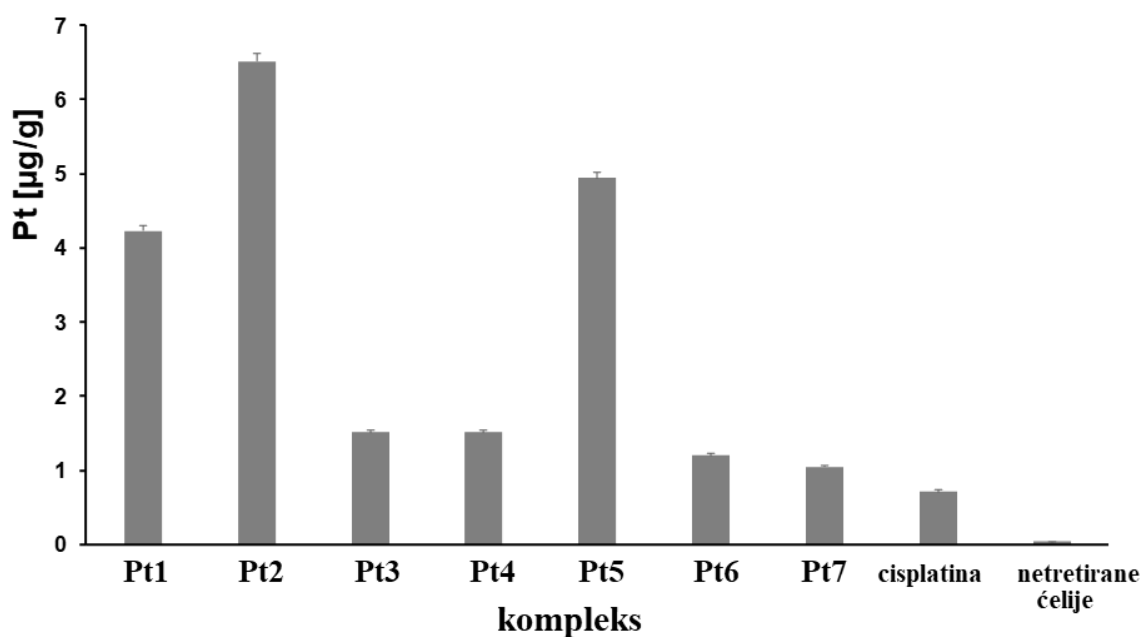
Ćelijska apsorpcija

Poznato je da antitumorski kompleksi platine(II) u ćeliju mogu ući pasivnom difuzijom kroz plazma membranu ili aktivnim transportom, posredstvom brojnih transportnih proteina [192]. Za aktivni transport platine(II) kompleksa odgovorni su Cu-transportni proteini (Ctrs), organski katjon transporteri (OCTs), nosači rastvorenih supstanci (SLCs) i ATP-vezujući setovi (ABC) koji mogu da transportuju neke lekove [192]. Da bi odredili količinu **Pt1–Pt7** kompleksa, kao i cisplatine, koja ulazi u tumorsku ćeliju, izvršena je kvantifikacija sadržaja kompleksa u LLC1 ćelijama primenom masene spektrometrije sa indukovano-spregnutom plazmom (ICP-QMS). Rezultati šest nezavisnih eksperimenata su prikazani na slici 42 i Tabeli 9. Svi ispitivani dinuklearni Pt(II) kompleksi su pokazali viši nivo ćelijske apsorpcije u poređenju sa cisplatinom. Kompleks **Pt1** koji sadrži dve Pt(II) jedinice strukturno slične cisplatinu, kao i **Pt2** i **Pt5** kompleksi (**Pt2** sadrži petočlani etilendiamin a **Pt5** šestočlani 1,3-propandiaminski prsten), pokazuju znatno veću apsorpciju od strane ćelije (5–9 puta) u odnosu na preostale ispitivane komplekse platine(II). Veoma slaba ćelijska apsorpcija **Pt3**, **Pt4**, **Pt6** i **Pt7** kompleksa je posledica prisustva alkil grupa na petočlanom etilendiaminskom (**Pt3** i **Pt4**)

i šestočlanom 1,3-propandiaminskom (**Pt6** i **Pt7**) prstenu. Kako ne postoji drastična razlika u veličini (sterni efekat) **Pt2** i **Pt3** kompleksa, kao i **Pt5**, **Pt6** i **Pt7**, jasno je da pasivni transport nije odgovoran za drastične razlike u pogledu ćelijske apsorpcije ispitivanih kompleksa. Naime, uvođenjem alkil supstituenata povećava se elektronska gustina na helatnim prstenovima i hidrofobnom delu kompleksa, ali time istovremeno dolazi do smanjenja fleksibilnosti prstena.



Slika 41. Dijagrami toka koji pokazuju procenete ranih apoptotičkih, kasnih apoptotičkih i preživelih CT26 ćelija nakon 24 h inkubacije sa **Pt1–Pt7** kompleksima i cisplatinom (15 μM)



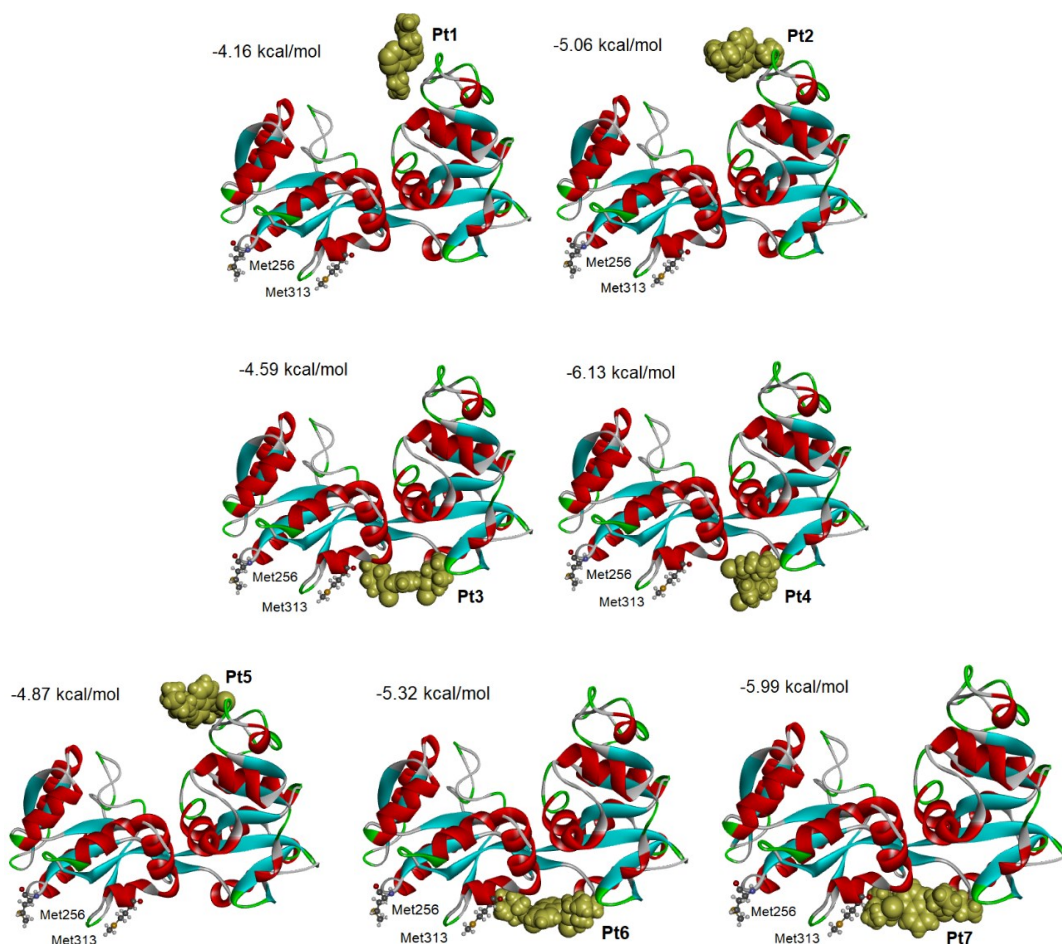
Slika 42. Ćelijska apsorpcija **Pt1–Pt7** kompleksa i cisplatine (2 μM) od strane LLC1 ćelija nakon 2 h inkubacije na 37 $^{\circ}\text{C}$ u DMSO. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija iz šest nezavisnih eksperimenata

Fleksibilnost nesupstituisanih petočlanih i šestočlanih prstenova posledica je brze inverzije prstena (promena konformacije). Konformacija supstituisanih diaminskih prstenova u kojoj su supstituenti u aksijalnom (ili pseudoaksijalnom) položaju je veoma nepovoljna zbog sternog odbijanja supstituenata [193]. Poznato je da molekulsko prepoznavanje, koje dovodi do specifičnih interakcija između proteina i liganada, prvenstveno zavisi od entalpijskog efekta, dok entropijski efekat, koji je posledica fleksibilnosti liganada, može da kompenzuje slabije interakcije proteina i liganada [194]. U našem radu, veća fleksibilnost nesupstituisanih helatnih diaminskih prstenova omogućava bolju dostupnost NH₂ grupe za građenje vodoničnih veza, kao i veću konformacionu slobodu kompleksa u kontaktu sa biomolekulima. Da bi razjasnili mehanizam ćelijske apsorpcije i transporta **Pt1–Pt7** kompleksa, primenom molekulskog dokinga ispitivane su interakcije kompleksa sa humanim serum transferinom (ApoTfN).

Tabela 9. Koncentracija platina(II) kompleksa (µg/g) koju su apsorbovale LLC1 ćelije nakon 2 h inkubacije na 37 °C u DMSO kao rastvaraču. Rezultati su dobijeni primenom masene spektrometrije sa indukovano-spregnutom plazmom (ICP-QMS). Rezultati predstavljaju srednju vrednost šest nezavisnih merenja. Koeficijent korelacije linearne regresije je 10000.

kompleks	koncentracija platina(II) kompleksa (µg/g)	
	apsorbovano	standardna devijacija
Pt1	4,23	0,07
Pt2	6,52	0,10
Pt3	1,51	0,03
Pt4	1,51	0,04
Pt5	4,94	0,07
Pt6	1,20	0,03
Pt7	1,05	0,02
cisptatina	0,72	0,02
netretirana ćelija	0,01	0,01

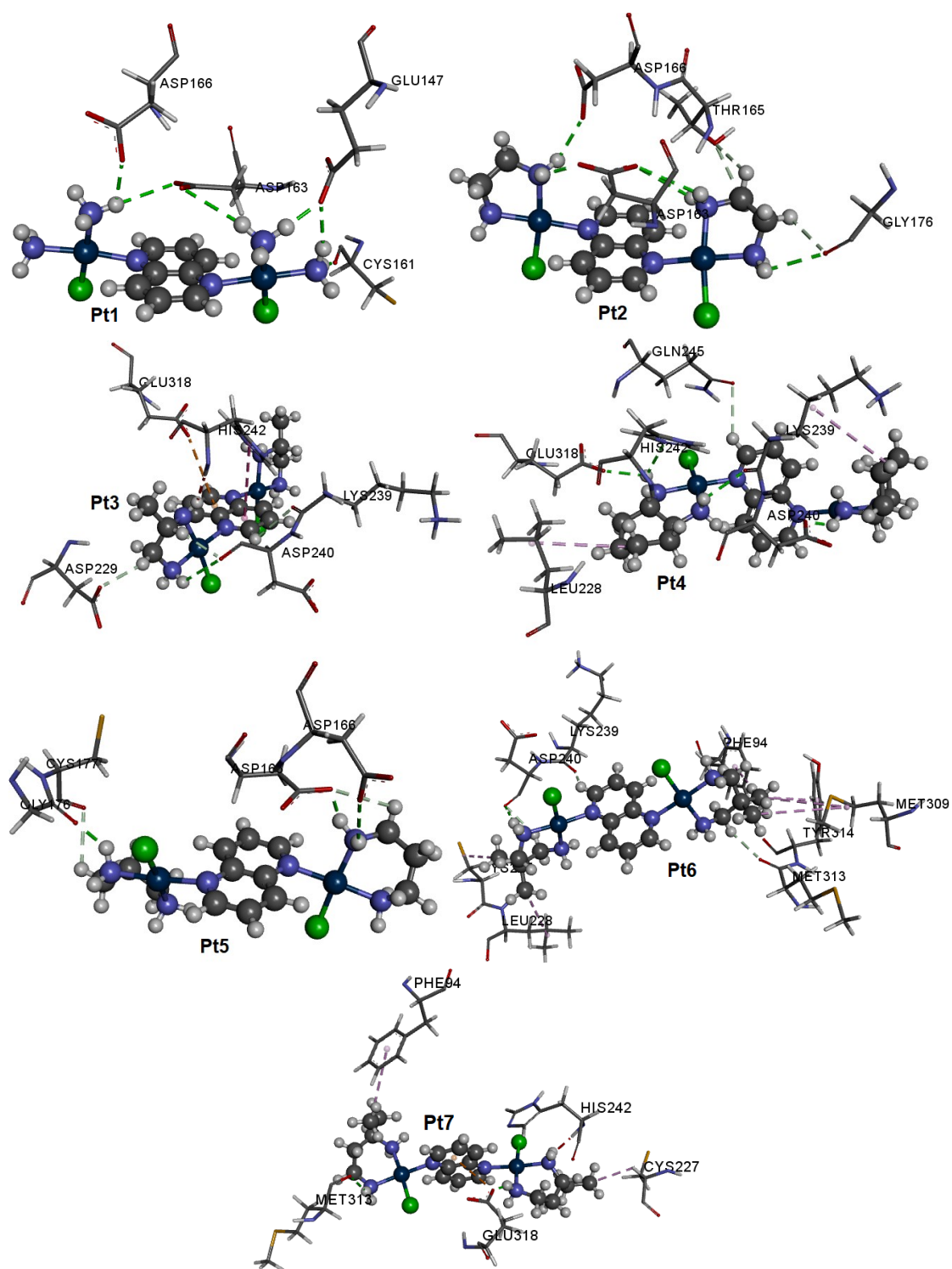
Rezultati molekulskog dokinga su pokazali da se **Pt1**, **Pt2** i **Pt5** kompleksi vezaju za petlju humanog seruma transferina, dok su **Pt3**, **Pt4**, **Pt6** i **Pt7** kompleksi vezani u oblasti između dve spirale (Slika 43 i 44). Osim toga mesto vezivanja **Pt3**, **Pt4**, **Pt6** i **Pt7** kompleksa veoma je blizu metioninskom ostatku na poziciji 313 (Met–313). Ovaj metioninski ostatak ima afinitet za koordinovanje za platinu(II), što je potvrđeno i NMR spektroskopijom (koordinovanje jedinjenja platine(II) za N-režanj transferina). Primarna uloga humanog serum transferina je vezivanje i transport jona metala, prvenstveno jona gvožđa(III), u ćeliju posredstvom receptora endocitoze. Naši rezultati su pokazali da male količine **Pt3**, **Pt4**, **Pt6** i **Pt7** kompleksa se koordinuju za humani serum transferin, što utiče na količinu kompleksa koji uđe u ćeliju. Pored toga, rezultati molekulskog dokinga ukazuju na sličnosti u vezivanju **Pt3**, **Pt4**, **Pt6** i **Pt7** kompleksa za protein, što je direktna potvrda i slične ćelijske apsorpcije ovih kompleksa.



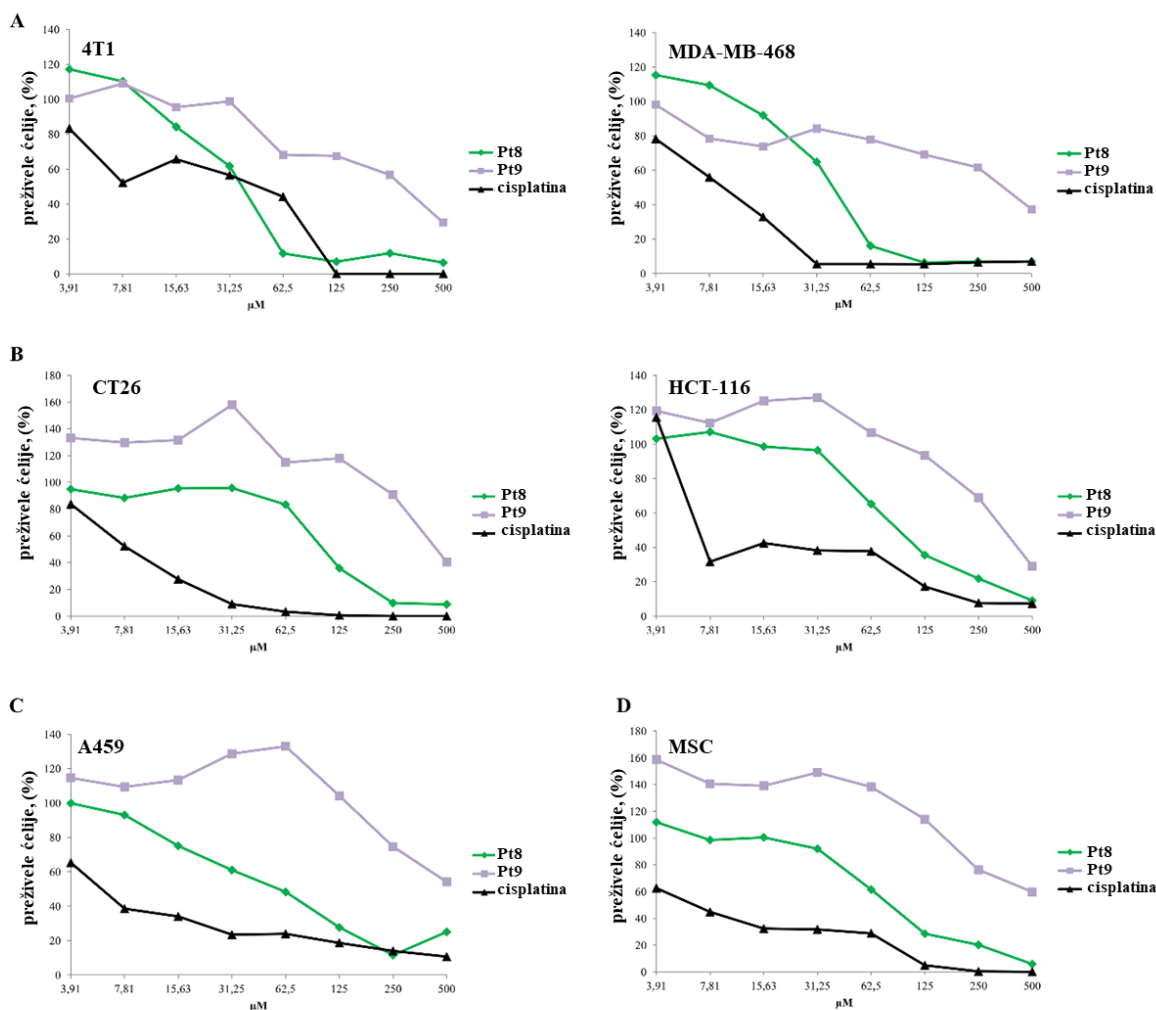
Slika 43. Strukture najstabilnijih adukata **Pt1–Pt7** kompleksa sa humanim serum transferinom (ApoTfN) (forma bez gvožđa (apo) rekombinantnog N-režnja), koje su dobijeni primenom molekuskog dokinga.

4.4.2 Ispitivanje citotoksične aktivnosti **Pt8** i **Pt9** kompleksa

Citotoksični potencijal **Pt8** i **Pt9** kompleksa primenom MTT kolorimetrijskog testa u *in vitro* uslovima ispitivan je na dve tumorske ćelijske linije miševa, karcinom dojke (4T1) i debelog creva (CT26), kao i na tri humane tumorske ćelijske linije: karcinom dojke (MDA-MB-468), debelog creva (HCT-116) i pluća (A549). Pored ovih ćelijskih linija, ispitivanja su vršena i na zdravim mezenhimalnim matičnim ćelijama miša (MSC), koje su izolovane iz koštane srži. Rezultati citotoksičnosti ispitivanih kompleksa poređeni su sa citotoksičnim potencijalom cisplatine. Citotoksični potencijal **Pt8** i **Pt9** kompleksa meren je nakon 48 h inkubacije. Rezultati ispitivanja prikazani su na Slici 45, a u Tabeli 10 date su dobijene IC_{50} vrednosti. Dinuklearni platina(II) kompleksi, koji kao mostni ligand sadrže 1,6-naftiridin su pokazali manji citotoksični potencijal u poređenju sa cisplatinom, a procenat preživelih ćelija bio je manje zavistan od koncentracije (Slika 45).



Slika 44. Najstabilnije orijentacije i mesta vezivanja **Pt1–Pt7** kompleksa sa prikazom aminokiselina u okruženju za humani serum transferin (ApoTfN) (forma bez gvožđa (apo) rekombinantnog N-režnja), koje su dobijene primenom molekuskog dokinga.



Slika 45. Procenat preživelih 4T1, MDA-MB-468, CT26, HCT-116, A459 i MSC ćelija nakon 48 h inkubacije u prisustvu **Pt8**, **Pt9** kompleksa i cisplatina

Na osnovu MTT testa može se zaključiti da **Pt9** kompleks ima manju citotoksičnu aktivnost u odnosu na ispitivane ćelijske linije ($IC_{50} > 281,03$, Table 10). Kompleks **Pt8** ima veći citotoksični potencijal prema čvrstim (solidnim) tumorima u poređenju sa **Pt9** kompleksom. Poređenjem IC_{50} vrednosti za **Pt8** i cisplatinu jasno je da je **Pt8** kompleks na ispitivanim ćelijskim linijama pokazao najmanje dva puta manju citotoksičnost (Slika 45, Tabela 10).

Tabela 10. IC₅₀ (μM) vrednosti za ispitivane **Pt8**, **Pt9** komplekse i cisplatinu nakon 48 h inkubacije na 4T1, MDA-MB-468, CT26, HCT-116, A549 i MSC ćelijskim linijama. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD (standardna devijacija) iz tri eksperimenta.

kompleks ćelijske linije	Pt8	Pt9	cisplatina
4T1	46,41±2,83	281,03±9,29	22,14±0,83
MDA-MB-468	48,02±1,48	359,96±3,74	5,77±0,59
CT26	88,93±6,78	460,77±13,86	7,75±0,65
HCT-116	95,68±4,61	1375,35±3,29	27,58±1,54
A549	49,63±2,86	>500	3,70±0,90
MSC	82,68±2,59	>500	4,59±1,04

Na osnovu razlika u N-donorskim ligandima, **Pt8** sadrži dva amminska (NH₃) liganda, dok **Pt9** sadrži bidentatno koordinovan etilendiamin, može se objasniti razlika u citotoksičnom potencijalu ova dva kompleksa. Na osnovu ovih ispitivanja može se zaključiti da ligandi mogu imati ključnu ulogu u citotoksičnoj aktivnosti kompleksa platine(II). Kompleks **Pt8** je pokazao nešto bolju aktivnost prema 4T1, MDA-MB-468 i A549 ćelijama sa IC₅₀ vrednostima 46,41; 48,02 i 49,63 μM (Table 10). Pri višim koncentracijama (62,5–500 μM) **Pt8** kompleks pokazao je sličnu citotoksičnost prema ćelijskim linijama karcinoma dojke 4T1 (miša) i MDAMB- 468 (humane) kao i cisplatina (Slika 45). Citotoksičnost cisplatine i **Pt8** kompleksa prema humanom karcinomu pluća (A549) bila je uporediva pri koncentracijama u opsegu 125–500 μM. Međutim, pri nižim koncentracijama, citotoksični efekat cisplatine bio je znatno jači. Zdrave mezenhimalne matične ćelije miša (MSC) tretirane su **Pt8** i **Pt9** kompleksima, kao i cisplatinom, da bi utvrdili neželjeni citotoksični efekat prema zdravom tkivu (Slika 45, Tabela 10). **Pt9** kompleks pokazao je veoma visoku toksičnost prema MSC kao i prema tumorskim ćelijama, dok je aktivnost **Pt8** kompleksa zavisila od koncentracije. Međutim, IC₅₀ vrednost **Pt8** kompleksa bila je znatno veća u poređenju sa IC₅₀ vrednostima za čvrste (solidne) tumore. Dobijene IC₅₀ vrednosti za oba kompleksa (**Pt8** i **Pt9**) su bile najmanje 16 puta veće u poređenju sa IC₅₀ vrednostima za cisplatinu (Tabela 10).

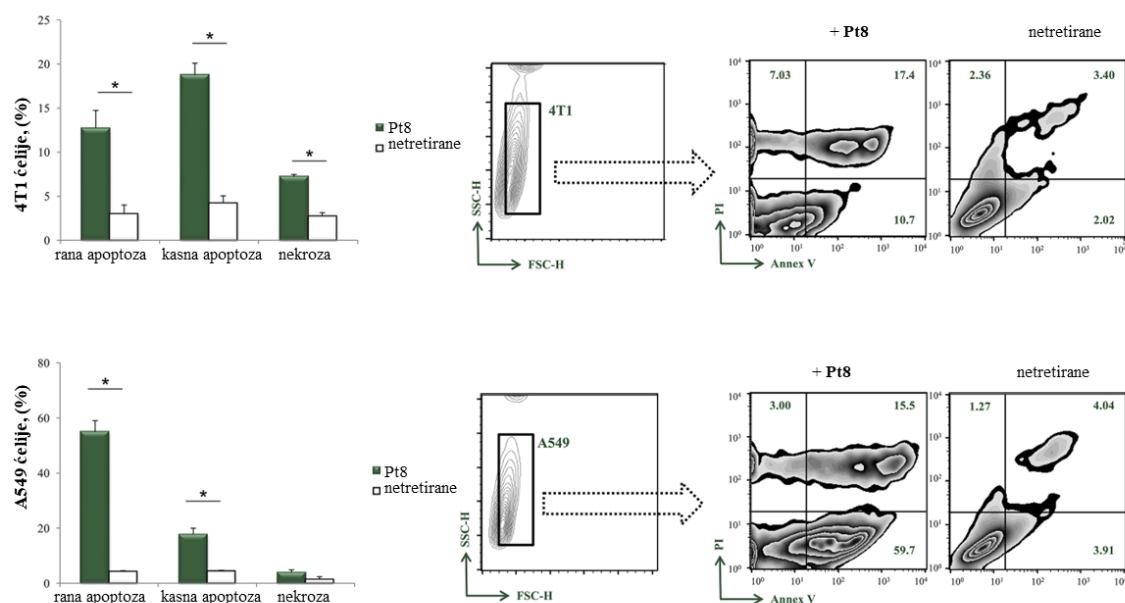
Na osnovu dobijenih rezultata izračunat je indeks selektivnosti (IS) za **Pt8**, **Pt9** komplekse i cisplatinu. Indeks selektivnosti predstavlja odnos IC₅₀ vrednosti koje su dobijene za zdrave ćelijske linije (MSC) i IC₅₀ vrednosti za tumorske ćelijske linije (4T1 i A549). Na osnovu IS vrednosti prikazanih u Tabeli 11, može se zaključiti da **Pt8** i **Pt9** kompleksi imaju najmanje devet puta veći indeks selektivnosti u poređenju sa cisplatinom. Na osnovu ovih podataka može se zaključiti da **Pt8** i **Pt9** kompleksi mogu imati manje neželjenih efekata u odnosu na cisplatinu. U poređenju sa cisplatinom **Pt8** kompleks ima niže IC₅₀ vrednosti i viši indeks selektivnosti, zbog čega je dalje korišćen za utvrđivanje mogućeg mehanizma delovanja na 4T1 i A549 ćelijske linije.

Tabela 11. Indeks selektivnosti (IS) **Pt8**, **Pt9** i cisplatine u odnosu na 4T1 i A549 ćelijske linije.

kompleks	indeks selektivnosti (IS) ($IC_{50} \text{ MSC} / IC_{50}$)	
	4T1	A549
Pt8	1,781715	1,666106
Pt9	3,070847	1,356001
cisplatina	0,207317	0,592258

Ćelijska smrt

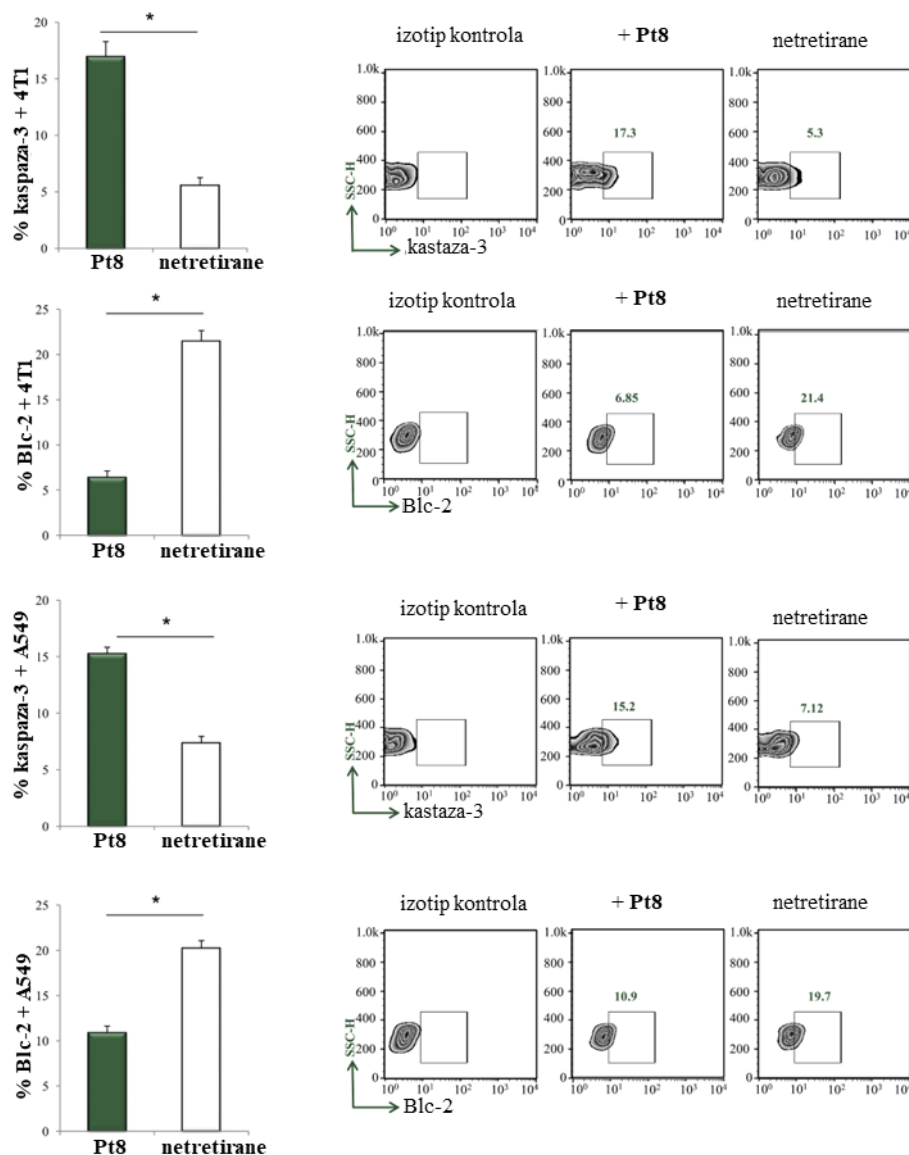
Primenom protočne citometrijske analize ispitivana je indukcija apoptoze 4T1 i A549 ćelijskih linija u prisustvu **Pt8** kompleksa. Nakon 24 h inkubacije 4T1 ćelija u prisustvu **Pt8** kompleksa ($46,405 \mu\text{M}$) populacija apoptotičkih 4T1 ćelija u ranoj fazi apoptoze bila je četiri puta veća u poređenju sa netretiranim 4T1 ćelijama ($12,70\% : 3,01\%$) (Slika 46). Povećanje procenta kasne apoptoze 4T1 ćelija ($18,87\% : 4,22\%$), kao i nekrotičnih ćelija ($7,23\% : 2,74\%$) takođe je zavisilo od prisustva **Pt8** kompleksa. Pri koncentraciji od $49,625 \mu\text{M}$ **Pt8** kompleksa dolazi do povećanja apoptotičkih ćelija humanog karcinoma pluća (A549) u ranoj (13 puta, $4,21\% : 54,9\%$) i kasnoj (4 puta, $4,36\% : 17,7\%$) fazi apoptoze (Slika 46). Ovi rezultati su pokazali da u prisustvu **Pt8** kompleksa znatno se smanjuje broj preživelih ćelija raka i da ovaj kompleks indukuje apoptotičku smrt ćelija.



Slika 46. Procenat rano apoptotičnih, kasno apoptotičnih i nekrotičnih 4T1 i A549 ćelija nakon inkubacija sa **Pt8** kompleksom u poređenju sa netretiranim ćelijama. Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Protočna citometrijska analiza Annexin V/PI dvostrukog bojenja nakon inkubacije ćelija sa **Pt8** kompleksom nakon 24 h (* $p < 0,05$).

Programirana ćelijska smrt može biti indukovana kaspaza-3 putem. Ovaj put aktivacije nastaje kao posledica disbalansa pro-apoptotičnog kaspaza-3 i anti-apoptotičnog Bcl-2 proteina. Radi pojašnjenja mehanizma pojačane apoptoze 4T1 i A549 ćelija nakon tretiranja sa

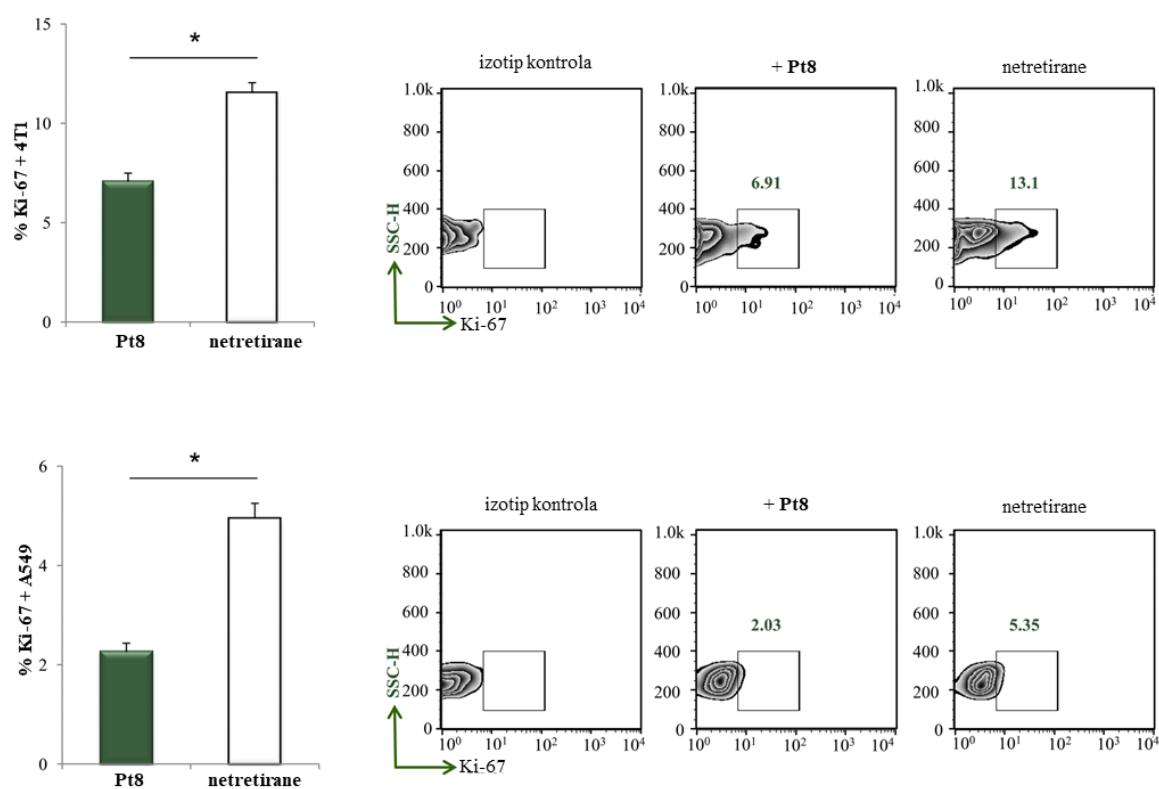
Pt8 kompleksom, primenom protočne citometrije analiziran je uticaj kompleksa na ekspresiju kaspaza-3 i Bcl-2 proteina. Analizom dobijenih rezultata koji su prikazani na slici 47, može se zaključiti da ćelije koje su tretirane **Pt8** kompleksom za razliku od netretiranih imaju značajno povećanje procenta kaspaza-3 proteina. U prisustvu ispitivanog kompleksa procenat kaspaza-3 proteina za 4T1 ćelijsku liniju povećan je sa 5,05% na 16,93% , dok je povećanje u slučaju A549 ćelija bilo od 7,3% na 15,24%. Istovremeno, pod istim reakcionim uslovima zabeleženo je smanjenje ekspresije anti-apoptotičnog Bcl-2 proteina u odnosu na netretirane ćelije. Za 4T1 ćelije smanjenje je bilo dva puta, a za A549 tri puta. U prisustvu **Pt8** kompleksa došlo je do procentualnog povećanja pro-apoptotičnog i smanjenja anti-apoptotičnog proteina. Sve ovo ide u prilog zaključku da ispitivani **Pt8** kompleks unet u tumorske ćelije indukuje njihovu apoptozu.



Slika 47. Ekspresija kaspaza-3 i Bcl-2 proteina u 4T1 i A549 ćelijskim linijama nakon 24 h inkubacije u prisustvu **Pt8** kompleksa (* $p < 0,05$).

Protein Ki-67 nalazi se u jedru ćelije i predstavlja marker za određivanje proliferativnog indeksa tumorskih ćelija. Ekspresija ovog proteina usko je povezana sa ćelijskim ciklusom

[195]. Poznato je da postoji pozitivna korelacija između ekspresije ovog proteina i raka dojke [196]. Visoka ekspresija Ki-67 proteina ukazuje na metastaze. Prema tome, praćenje indeksa ovog proteina može doprineti ranom otkrivanju tumorskih oboljenja i metastaza. Primenom protočne citometrije određen je procenat Ki-67 proteina u 4T1 ćelijama nakon tretmana sa **Pt8** kompleksom. Rezultati su pokazali da za razliku od netretiranih (11,52%), procenat Ki-67 se znatno smanjuje u 4T1 ćelijama (6,92%), koje su tretirane sa **Pt8** kompleksom (Slika 48). Do dvostrukog smanjenja ekspresije Ki-67 proteina došlo je i na A549 ćelijama nakon 24 h inkubacije sa **Pt8** kompleksom (netretirane A549 – 4,95%; A549+**Pt8** – 2,25%, Slika 48). Na osnovu ovih ispitivanja može se zaključiti da u prisustvu **Pt8** kompleksa proliferacija kancerogenih ćelija je usporena. Prema tome, antitumorska aktivnost ispitivanog **Pt8** kompleksa manifestuje se apoptozom i inhibicijom proliferacije tumorskih ćelija.

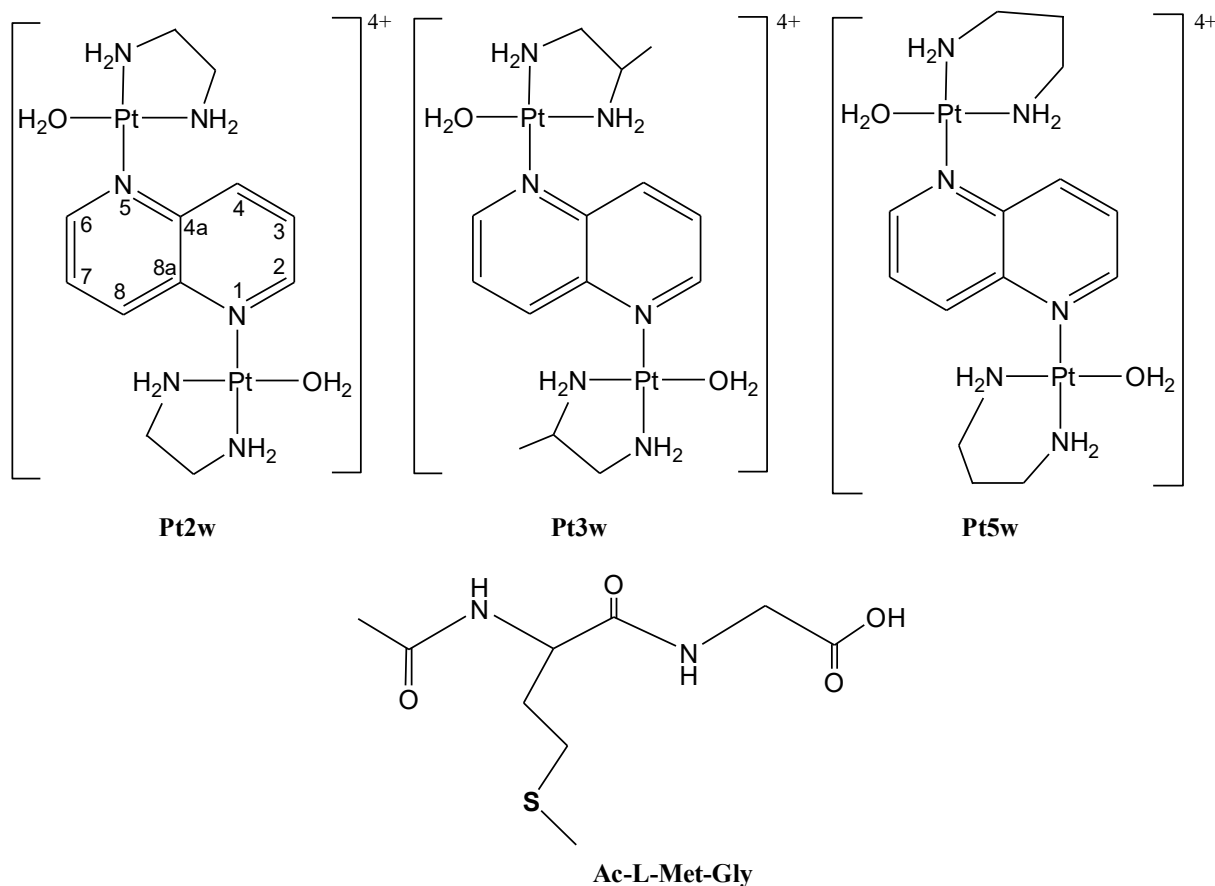


Slika 48. Analiza ekspresije Ki-67 proteina u 4T1 i A549 ćelijskim linijama nakon 24 h inkubacije u prisustvu **Pt8** kompleksa (* $p < 0,05$).

4.5 Ispitivanje interakcija Pt2, Pt3 i Pt5 kompleksa i njihovih akva derivata sa *N*-acetilovanim metionil-glicinom i humanim serum albuminom

U ovom delu rada primenom ^1H NMR spektroskopije ispitivane su reakcije akva derivata **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa (**Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w**) sa *N*-acetilovanim L-metioninglicinom (Ac-L-Met-Gly). Pored toga, na osnovu kvantno-hemijskih proračuna predložen je mehanizam hidrolize peptidne veze u ispitivanom dipeptidu. Primenom UV-Vis spektrofotometrije i fluorescentne spektroskopije ispitivane su interakcije **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa sa humanim serum albuminom (HSA), a molekulskim dokingom određena su mesta

vezivanja ovih kompleksa za protein [144]. Na Slici 49 prikazane su molekulske formule **Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w** kompleksa, kao i ispitivanog Ac-L-Met-Gly dipeptida.



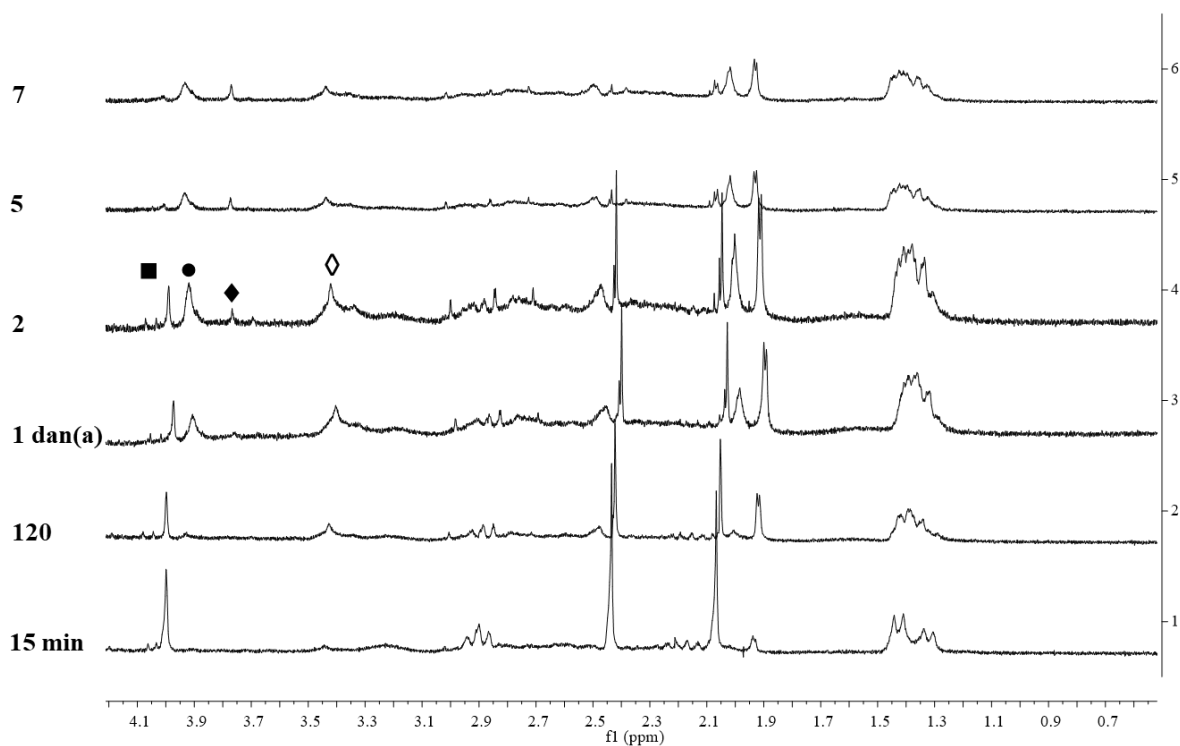
Slika 49. Strukturne formule **Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w** kompleksa i *N*-acetilovanog L-metionilglicina (Ac-L-Met-Gly).

4.5.1 Reakcije Pt2w, Pt3w i Pt5w kompleksa sa Ac-L-Met-Gly

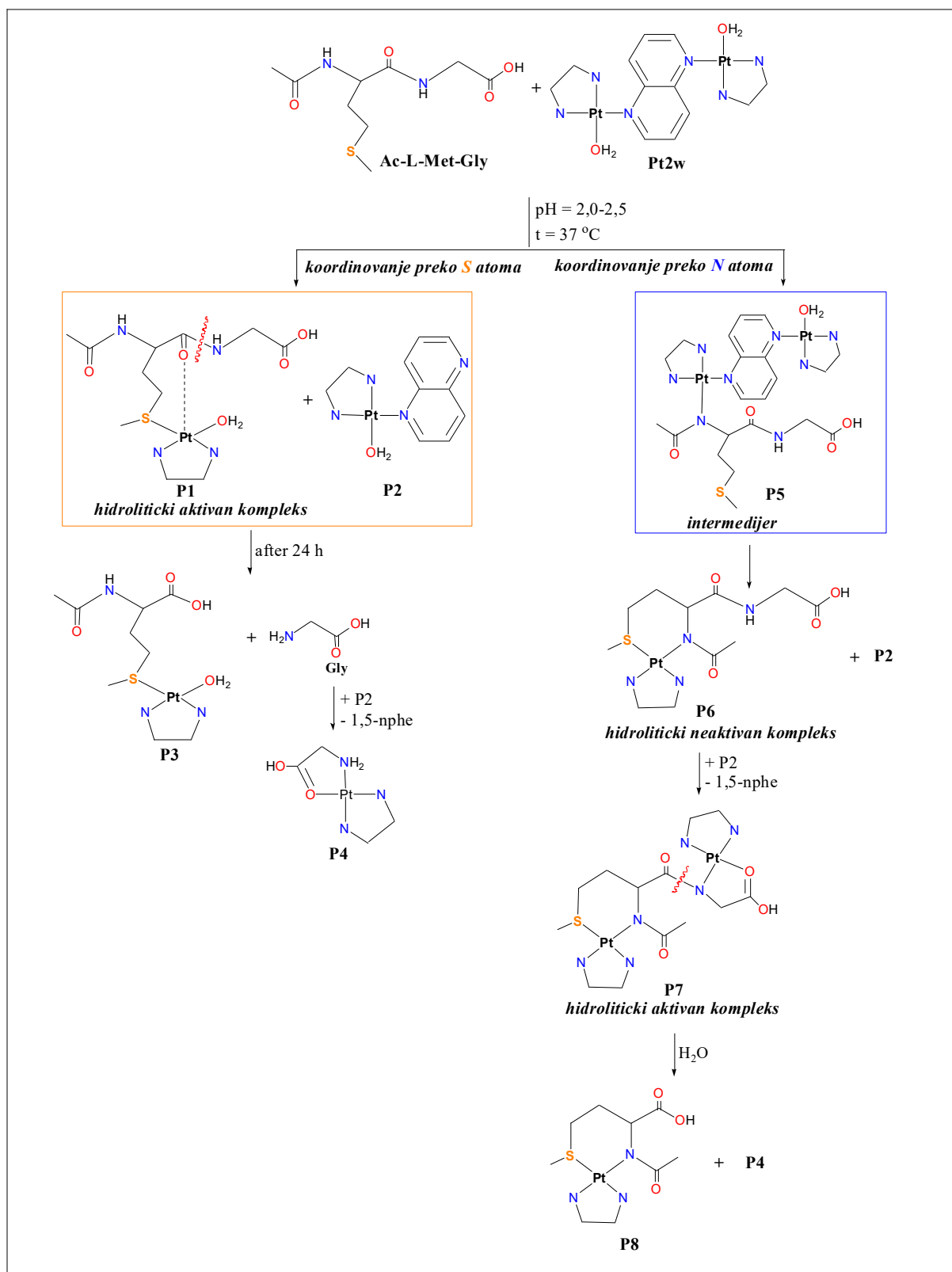
Hidroliza Ac-L-Met-Gly - eksperimentalni rezultati

Primenom ¹H NMR spektroskopije ispitivane su reakcije **Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w** kompleksa (Slika 49) sa *N*-acetilovanim L-metionil-glicinom (Ac-L-Met-Gly). Platina(II) kompleksi i dipeptid mešani su u 1:1 molskom odnosu u D₂O kao rastvaraču na 37 °C i pH oblasti od 2,0 do 2,5. Ranija ispitivanja su pokazala da je reakcije neophodno izvoditi u kiseloj sredini, da ne bi došlo do građenja polimernih hidrokso-platina(II) kompleksa [85-87,139,197-199]. Ispitivan je storni uticaj bidentatno koordinovanih diaminskih liganada (L = en, 1,2-pn i 1,3-pd) u **Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w** kompleksima na hidrolizu Met-Gly peptidne veze u Ac-L-Met-Gly. Na osnovu ¹H NMR spektara jasno je da u reakcijama **Pt2w** i **Pt5w** sa Ac-L-Met-Gly ne dolazi do hidrolize Met-Gly peptidne veze za vreme od 24 h, jer se u toku reakcionog vremena nije pojavio signal na 3,77 ppm koji odgovara metilenskim protonima slobodnog glicina. U ¹H

NMR spektru Ac-L-Met-Gly u prisustvu **Pt3w** kompleksa tokom 24 h reakcionog vremena javlja se signal na 3,77 ppm, što ukazuje da Met-Gly peptidna veza hidrolizuje (Slika 50, Slike P8 i P9). Nakon 15 minuta reakcije dolazi do smanjenja intenziteta signala na 2,11 ppm, koji potiče od S-CH₃ protona nekoordinovanog Ac-L-Met-Gly i povećanja intenziteta signala u oblasti od 2,40 do 2,54 ppm, koji odgovara S-CH₃ protonima koordinovanog dipeptida za Pt(II) jon preko atoma sumpora. Ova hemijska pomeranja su u saglasnosti sa literaturnim podacima za reakcije platina(II) kompleksa sa različitim peptidima koji sadrže metionin [85–87,199–204]. Koordinovanje tioetarskog sumpora iz dipeptida za **Pt2w** i **Pt3w** komplekse praćeno je raskidanjem jedne Pt(II)-1,5-nphe veze u intermedijernom platina(II)-peptid kompleksu ($[\{Pt(en)(Ac-L-Met-Gly-S)\}(\mu-1,5-nphe)\{Pt(en)(H_2O)\}]^{4+}$), pri čemu nastaju dva mononuklearna kompleksa (**P1** i **P2**, Slika 51). U ¹H NMR spektru javljaju se promene i u aromatičnoj oblasti. Evidentno je smanjenje intenziteta dubleta na 10,22–10,27 ppm, koji potiče od C₂H i C₆H protona mostnog 1,5-nphe liganda, i pojava novog signala na 9,76 ppm, koji potiče od monodentatno koordinovanog 1,5-nphe u **P2** kompleksu.



Slika 50. ¹H NMR spektri reakcije **Pt3w** kompleksa sa Ac-L-Met-Gly dipeptidom (D₂O, t = 37 °C, pH = 2,0–2,5). (■) metilenski protoni glicina u nekoordinovanom Ac-L-Met-Gly, (●) metilenski protoni glicina u Ac-L-Met-Gly koji je koordinovan za Pt(II), (◆) metilenski protoni slobodnog glicina i (◇) metilenski protoni bidentatno koordinovanog glicina za Pt(II)



Slika 51. Reakciona šema reakcije Ac-L-Met-Gly dipeptida sa **Pt2w** kompleksom.

Pojava novih signala u aromatičnoj oblasti posledica je raskidanja jedne Pt(II)-N(1,5-nphe) veze u dinuklearnim kompleksima. Nakon raskidanja jedne Pt(II)-1,5-nphe veze, dva protona (C2H i C6H) mostnog 1,5-nphe liganda više nisu ekvivalentna (**P2** kompleks) (Tabela P1). U

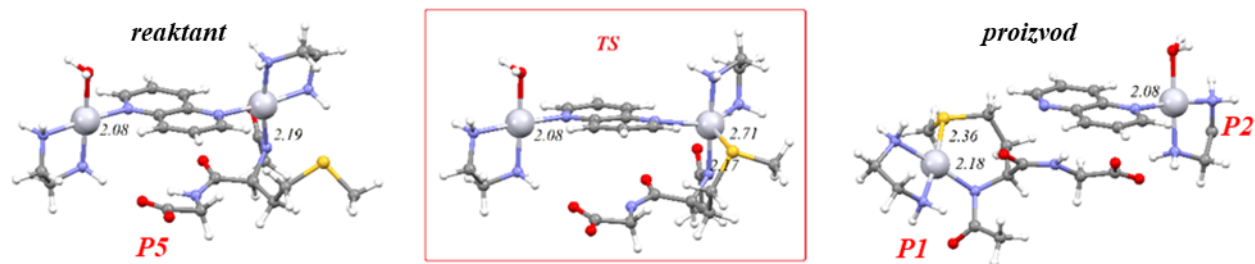
reakcijama platina(II) i paladijum(II) kompleksa koji sadrže *N*-heterociklične mostne ligande sa peptidima koji sadrže histidin ili metionin, nađeno je da dolazi do razlaganja dinuklearnih kompleksa [85,86]. Kompleks **P1** je hidrolitički aktivan i katalizuje hidrolizu Met–Gly peptidne veze u dipeptidu Ac–L–Met–Gly, koji je monodentatno koordinovan preko atoma sumpora za Pt(II) jon. Signal na 3,77 ppm koji potiče od metilenskih protona slobodnog glicina, rezultat je hidrolize Met–Gly peptidne veze i javlja se u ¹H NMR spektru nakon 24 h reakcionog vremena. Krajnji proizvod reakcije hidrolize je kompleks **P3**. Dalje, slobodni glicin reaguje sa kompleksom **P2** pri čemu nastaje kompleks **P4** koji sadrži bidentatno koordinovani diaminski ligand i glicin koordinovan preko atoma azota i kiseonika (N,O-Pt(II)) (Slika 51). Bidentna koordinacija glicina u ovom kompleksu je potvrđena u ¹H NMR spektru prisustvom signala na 3,44–3,52 ppm. Nakon 5 dana reakcionog vremena u ¹H NMR spektru bili su prisutni signali na 3,93; 3,77 i 3,44 ppm. Međusobna zavisnost signala na 3,77 i 3,44 ppm je očigledna, jer ovi signali potiču od metilenskih protona slobodnog glicina i istih protona bidentatno koordinovanog glicina za Pt(II) jon. Pored toga, signal na 3,77 ppm je takođe direktno povezan i sa signalom na 3,93 ppm, koji potiče od –CH₂– protona glicina u Ac–L–Met–Gly kada je dipeptid preko atoma sumpora koordinovan za Pt(II) jon.

Kompleksi **Pt2w** i **Pt3w** sadrže petočlane diaminske prstenove i pokazuju slične reakcije sa Ac–L–Met–Gly, dok je reakcioni mehanizam **Pt5w** (šestočlani diaminski prsten) kompleks sa Ac–L–Met–Gly drugačiji. U reakciji **Pt5w** kompleksa sa Ac–L–Met–Gly signal na 3,77 ppm nije se pojavio ni nakon 7 dana reakcionog vremena (Slika P9). Međutim, u toku ovog reakcionog vremena u ¹H NMR spektru evidentan je signal na 3,44 ppm. Pretpostavka je da ovaj signal potiče od bidentatno koordinovanog glicinskog ostatka Ac–L–Met–Gly dipeptida. U kompleksu **P7** (Slika 51) za Pt(II) glicinski ostatak je bidentatno koordinovan preko atoma kiseonika karboksilne grupe i amidnog atoma azota peptidne Met–Gly veze. Nakon ovog načina koordinovanja Met–Gly peptidna veza hidrolizuje.

Hidroliza Ac–L–Met–Gly, N-koordinacija. Teorijsko praćenje reakcije

Na osnovu podataka koji su dobijeni primenom ¹H NMR spektroskopije za reakcije **Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w** kompleksa sa Ac–L–Met–Gly i teorijskih proračuna, moguće je predvideti primarni reakcioni put ispitivanih reakcija. U tu svrhu korišćeni su podaci dobijeni pretragom Kembričke baze strukturnih podataka (Cambridge Structural Database, CSD). Analizom dve kristalne strukture koje su ekstrahovane iz CSD zaključeno je da se metionin za Pt(II) jon koordinuje preko tioetarskog atoma sumpora i atoma azota (kristalna struktura sa refcod-om CMETPT, Slika P10) i da karboksilna grupa ne učestvuje u koordinovanju [205]. Dipeptid Met–Gly koordinuje se na isti način za Pt(II) jon kao i metionin (kristalna struktura sa refcod-om LORCUQ, Slika P10) [205]. Pretragom CSD nije pronađena nijedna kristalna struktura koja odgovara koordinovanju *N*-acetilovanog L-metionilglicina (Ac–L–Met–Gly) za Pt(II) jon.

Potencialna prelazna stanja (TS) modelovana su samo za reakciju **Pt2w** kompleksa sa Ac–L–Met–Gly. Pretpostavka je da dipeptid pokazuje isti način koordinovanja za ispitivane komplekse platine(II) (**Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w**). Modelovanjem prelaznih stanja razmatrane su koordinacije ne samo preko očekivanih atoma sumora i azota, već i koordinovanje preko atoma kiseonika karboksilne grupe i kiseonika peptidne veze. Rezultati molekuskog modelovanja dali su samo jedno prelazno stanje u kome jedan Pt(II) jon ima polaznu kvadratno-planarnu geometriju, dok na drugom Pt(II) jonu dolazi do geometrijskih promena, koje su praćene supstitucijom molekula vode sa dipeptidom. Platina(II) jon na kome dolazi do geometrijskih promena poseduje geometriju distorgovane kvadratne-piramide, jer je dipeptid pseudokoordinovan preko atoma azota i sumpora (Slika 52).

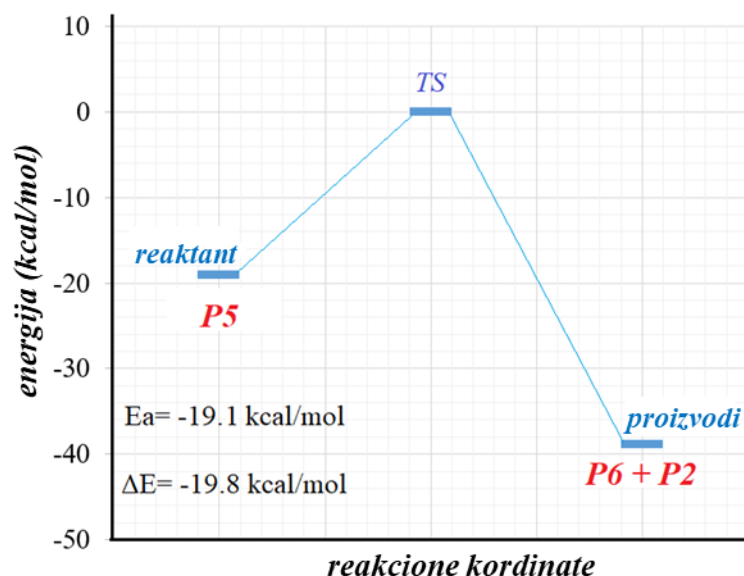


Slika 52. Strukture prelaznog stanja (TS), reaktanta i proizvoda reakcije **Pt2w** kompleksa sa Ac-L-Met-Gly, pretpostavljene na osnovu rezultata kvantno-hemijskih proračuna.

Za prelazno stanje (TS, Slika 52) urađen je IRC proračun, kojim se predviđaju mogući proizvodi i reaktanti za pronađeno prelazno stanje. Rezultati proračuna pokazali su da kao proizvod nastaju dva mononuklearna kompleksa (**P6** i **P2**, Slika 51 i 52). U ovom slučaju reaktant je dinuklearni kompleks platine(II), u kome je dipeptid (Ac-L-Met-Gly) monodentatno koordinovan za Pt(II) preko amidnog atoma azota *N*-terminalne aminokiseline (kompleks **P5**, Slika 51). Na osnovu ovih proračuna može se izvesti zaključak da u prvom koraku dolazi do supstitucije vode na jednom Pt(II) jonu sa amidnim atomom azota. U drugom koraku (energetski profil reakcije, Slika 53), koordinuje se i tioetarski sumpor iz metionina, pri čemu dolazi do raskidanja jedne Pt-N(1,5-nphe) veze. Na ovaj način nastaju dva mononuklearna kvadratno-planarna platina(II) kompleksa (**P2** i **P6**), koji sadrže bidentatno koordinovani etilendiamin, a razlikuju se u strukturi dva preostala koordinaciona mesta (Slika 51). U **P6** kompleksu, dipeptid je bidentatno koordinovan za Pt(II) jon, a u **P2** kompleksu preostala dva koordinaciona mesta zauzimaju akva ligand i 1,5-naftiridin.

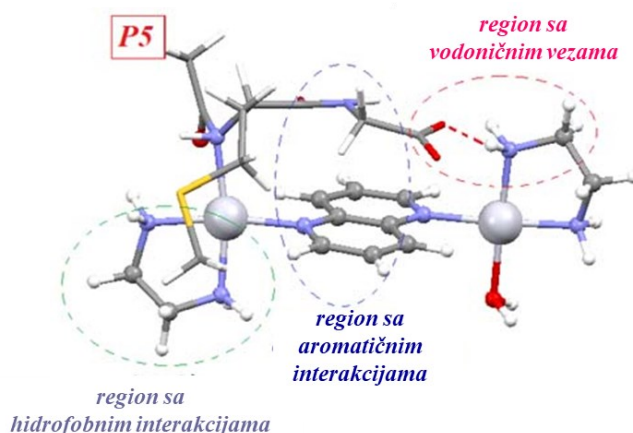
Energija aktivacije za drugu korak reakcije (kada je dipeptid bidentatno koordinovan) iznosi 19,1 kcal/mol (Slika 53). Nastali proizvodi su za 19,8 kcal/mol stabilniji od reaktanata (kompleks **P5**, Slika 51), što ukazuje da je bidentna koordinacija dipeptida termodinamički favorizovana.

Kompleks **P6** je hidrolitički neaktivan jer u koordinacionoj sferi ima bidentatno koordinovan etilendiamin i bidentatno koordinovan Ac-L-Met-Gly dipeptid. Nastajanje ovog kompleksa uočeno je kao prvi reakcioni korak za sva tri kompleksa, dok je za **Pt5w** ovo bio jedini način koordinovanja. U literaturi postoje podaci da se amidni atom azota acetilovane terminalne amino grupe peptida koji kao *N*-terminalnu aminokiselinu sadrže metionin i histidin ne koordinuje za komplekse paladijuma(II) i platine(II), pri čemu u ovim reakcijama dolazi do hidrolize peptidne veze koja sadrži karboksilnu grupu koordinovane aminokiseline [85,86,199,200]. Koordinovanje amidnog atoma azota *N*-acetilovane terminalne amino grupe metionina u Ac-L-Met-Gly može se objasniti na osnovu supramolekulskog profila **P5** kompleksa (Slika 51), koji je dobijen proračunima za predviđanje mehanizma koordinovanja dipeptida za **Pt2w** kompleks (Slika 54). Bez obzira na favorizovano koordinovanje atoma sumpora iz Ac-L-Met-Gly, koordinovanje amidnog atoma azota metionina je moguće zbog dodatne stabilizacije nastalog kompleksa. Stabilizacija je rezultat unutar-molekulskih interakcija između fragmenata dipeptida i **Pt2w** kompleksa, koji nisu uključeni u koordinovanje. Vizuelnom analizom ovog kompleksa mogu se odrediti tri regiona unutar-molekulskih interakcija. Helatni etilendiaminski ligand formira hidrofobne interakcije sa -S-CH₃ grupom dipeptida (oblast sa hidrofobnim interakcijama), dok ostatak glicina stupa u interakciju sa π -aromatičnim sistemom mostnog 1,5-nphe liganda, pri čemu dolazi do N-H/ π , C-H/ π , i π/π interakcije (oblast sa aromatičnim interakcijama).



Slika 53. Energetski profil za drugi korak koordinovanja Ac-L-Met-Gly dipeptida za **Pt2w** kompleks

Pored toga, karboksilna grupa glicina formira vodonične veze sa NH₂ grupom etilendiaminskog liganda (region sa vodoničnim vezama). U ovom supramolekulskom profilu, mononuklearni kompleks ne bi imao regione sa aromatičnim interakcijama i vodoničnom vezom, što bi značajno smanjilo stabilizaciju supramolekulske strukture, koja nastaje koordinovanjem dipeptida preko atoma sumpora. Ovaj način koordinovanja dovodi i do koordinovanja atoma sumpora što na kraju dovodi do hidrolize Met-Gly peptidne veze. Poznato je da katalitička sposobnost kompleksa platine(II) opada sa porastom sternog efekta helatnog diaminskog liganda [86,199], što je posledica dva efekta koji se javljaju istovremeno, a koji dovode do stabilizacije supramolekulske strukture **P5** kompleksa (Slika 51 i 54). Produžavanje alifatičnog lanca diaminskog liganda dovodi do jačih hidrofobnih interakcija, a istovremeno donorska sposobnost NH₂ grupe za građenje vodoničnih veza se povećava. Prema tome, pomenuti efekti utiču negativno na brzinu hidrolize peptidne veze, jer stabilizuju strukturu kompleksa prikazanu na slici 54.



Slika 54. Supramolekularni profil **P5** kompleksa, koji je dobijen proračunima za predviđanje mehanizma koordinovanja dipeptida za **Pt2w** kompleks.

Bez obzira što u strukturi **P5** kompleksa postoji molekul vode koji je neophodan za hidrolizu peptidne veze, **P5** kompleks je hidrolitički neaktivan. Razlog je velika udaljenosti između akva liganda i Met–Gly peptidne veze (Slika 54), a pored toga ovaj kompleks je nestabilan i nakon 24 h reakcionog vremena razlaže se na dva mononuklearna kompleksa (**P6** i **P2**, Slika 51). Kompleks **P2** sadrži dva monodentatno koordinovana liganda (H_2O i 1,5-nphe), koji predstavljaju dobre odlazeće ligande, zbog čega se mogu supstituisati sa glicinskim ostatkom iz **P6** kompleksa, što dovodi do formiranja dinuklearnog **P7** kompleksa (Slika 51). Kompleks **P7** je hidrolitički aktivan i katalizuje hidrolizu Met–Gly peptidne veze. Rezultati kvantno-hemijskih proračuna su pokazali da signal, koji potiče od metilenskih protona glicina se nalazi na 4,39 ppm (Tabela P2). Postojanje ovog signala nije uočeno u eksperimentalnim 1H NMR spektrima, što je verovatno posledica nestabilnosti **P7** kompleksa, i njegovog brzog razlaganja na **P8** i **P4** komplekse (Slika 51). Postojanje **P4** kompleksa dokazano je pojavom signala na 3,50 ppm u 1H NMR spektru, koji odgovara bidentatno koordinovanom glicinu za Pt(II) jon.

Posledica brze hidrolize **P7** kompleksa je u tautomeriji, jer peptidna veza postoji u amidnom i iminolnom obliku, koji su u ravnoteži, ali je ravnoteža pomerenka ka amidnom obliku. Po jačini peptidna veza je između jednostruke i dvostruke veze. Pre koordinovanja za **P2** kompleks, mora doći do deprotonovanja peptidnog atoma azota, što narušava ravnotežu amid-iminol tautomera. Peptidna veza ima samo amidnu formu, zbog čega može i da hidrolizuje (peptidna veza u iminolnom obliku ima karakteristike dvostruke veze), a hidroliza je potpomognuta i kiselom sredinom.

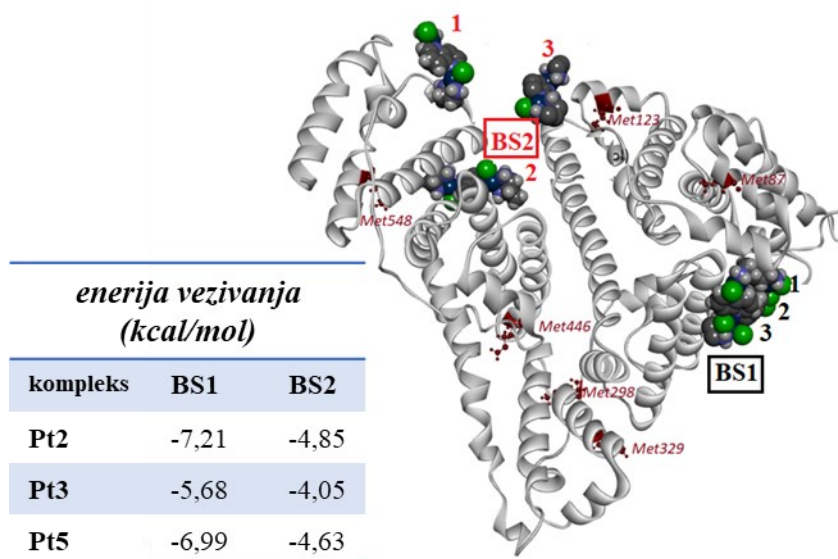
Hidroliza peptidne veze u dinuklearnom **P7** kompleksu se može pratiti i promenama signala koji potiču od koordinovanog metioninskog ostatka. Izračunata hemijska pomeranja protona koja odgovaraju nekoordinovanom metioninu u Ac–L–Met–Gly su 4,07 (Met- α -CH), 1,99 (Met- β -CH₂), 2,13 (Met- δ -CH₃) i 2,54 ppm (Met- γ -CH₂) u saglasnosti su sa eksperimentalno nađenim hemijskim pomeranjima (3,95, 2,04, 2,10, 2,60 ppm). Pomeranja signala ka većim vrednostima posledica su bidentatnog *S,N*-koordinovanja dipeptida (Tabela P3). Signal na oko 2,40 ppm koji se javljaju u reakcijama dipeptida sa ispitivanim kompleksima potiče od Met- δ -CH₃ protona i ukazuje na postojanje **P6** kompleksa i reakcioni put sa koordinovanim Ac–L–Met–Gly dipeptida preko atoma azota metionina. U 1H NMR spektrima ispitivanih reakcija pojavljuje se i signal na $\approx 3,00$ ppm, koji potiče od Met- γ -CH₂ protona u **P8** kompleksu i ukazuje na hidrolizu dinuklearnog **P7** kompleksa. Prema tome teorijski proračuni 1H NMR spektra su veoma korisni, jer se na osnovu njih mogu kvantifikovati dva reakciona puta, koordinovanje i hidroliza.

4.5.2 Interakcije Pt2, Pt3 i Pt5 kompleksa sa HSA

Molekulski doking

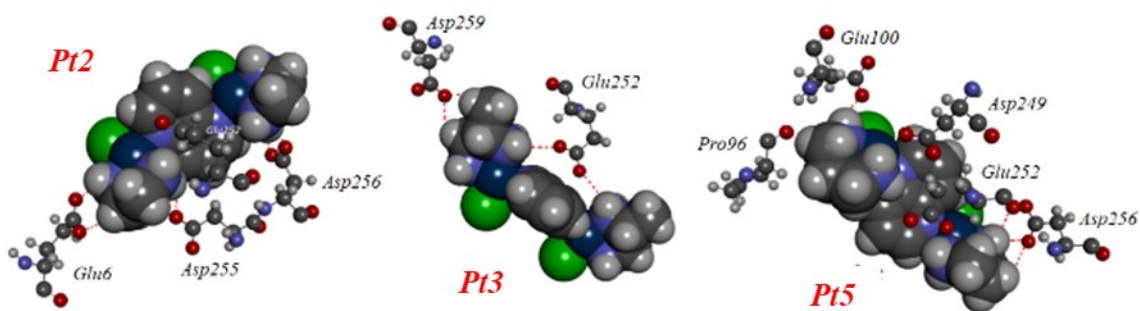
Metodom molekulskog dokinga ispitivane su interakcije **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa sa humanim serum albuminom (HSA) da bi utvrdili da li ispitivani kompleksi mogu da hidrolizuju proteine, odnosno da li pretpostavljeni mehanizam hidrolize se može primeniti na veće molekule. Humani serum albumin je najzastupljeniji protein krvne plazme, ima antioksidativnu i enzimisku aktivnost, kao i transportnu ulogu. Pored toga, ovaj protein je odgovoran za održavanje koloidnog osmotskog pritiska krvi. U organizmu putem ovog proteina transportuju se masne kiseline, steroidi, hormoni i mnogi lekovi. Poznato je da u HSA postoji 7 mesta za koja se mogu vezati masne kiseline (FBS) i 9 mesta za koja se vezuju lekovi (DBS, Slika P11)

[206]. Većina mesta vezivanja masnih kiselina poklapa se sa mestima vezivanja ya lekove (DBS) i razlikuju se samo u dva mesta vezivanja, DBS6 (između IIA i IIB poddomena) i DBS9 (između IIIA i IB poddomena). U HSA nalazi se šest metioninskih ostataka (Slika 55), od kojih se 4 nalaze unutar mesta vezivanja lekova (Met123 u DBS1, Met329 u DBS6, Met446 u DBS4 i Met-548 u DBS5), dok se dva nalaze van transportnih mesta lekova (Met87 i Met298).



Slika 55. Struktura humanog serum albumina (HSA) sa mapiranim metioninskim ostacima i mestima vezivanja (BS, *binding site*) ispitivanih dinuklearnih platina(II) kompleksa (**Pt2**, **Pt3** i **Pt5**).

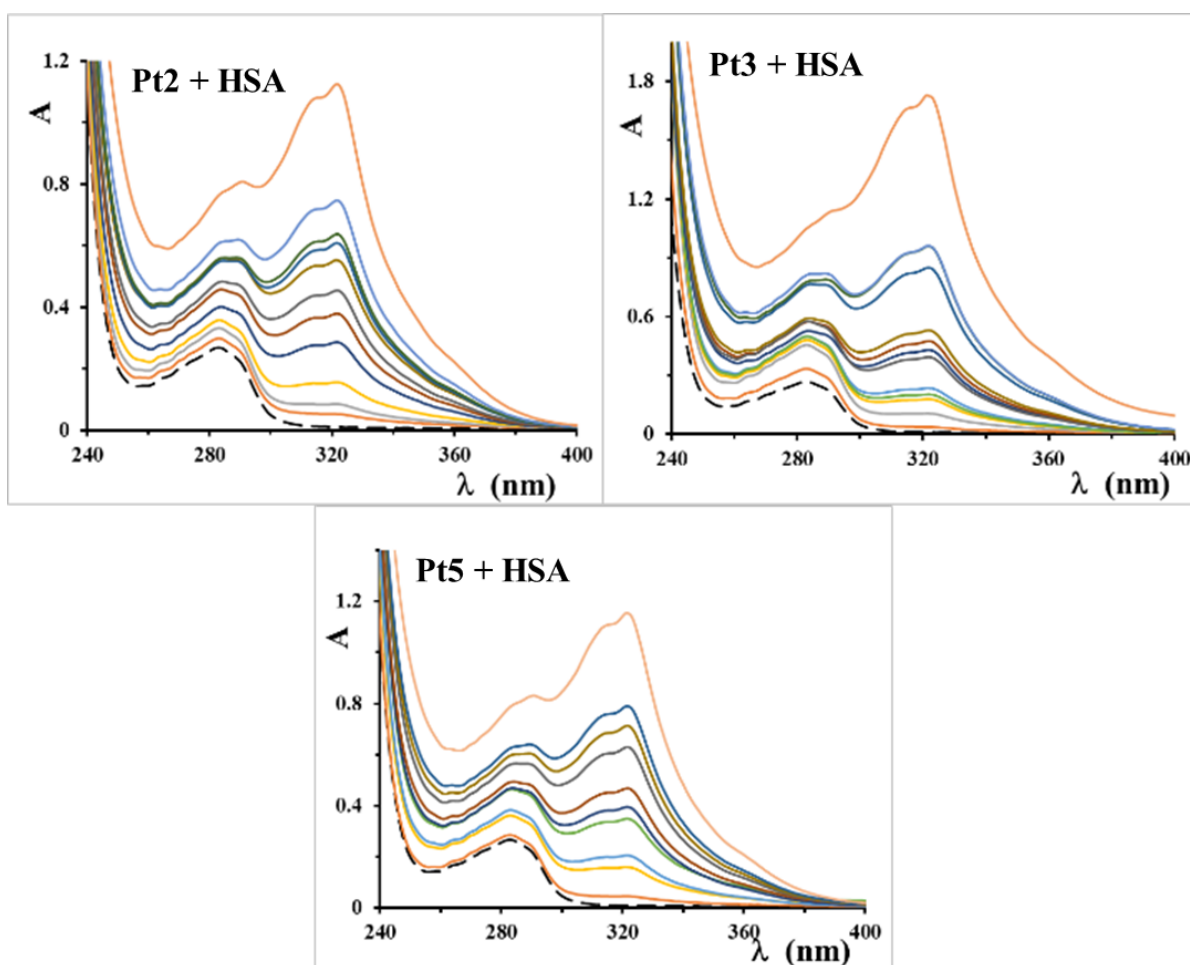
Rezultati molekuskog dokinga su pokazali da se ispitivani kompleksi (**Pt2**, **Pt3** i **Pt5**) prvo vezuju za vezivno mesto BS1, koje se nalazi između IA i IIA poddomena i za koje se ne vezuju lekovi. Na osnovu ovoga može se pretpostaviti da HSA nije transportni protein za ispitivane dinuklearne komplekse, jer se vezuju za površinu proteina, a ne za transportna mesta. S obzirom da u BS1 mestu vezivanja nema metionina, ne očekuje se ni hidroliza HSA u prisustvu ispitivanih kompleksa. BS1 vezivno mesto je negativno naelektrisano, jer sadrži aminokiseline asparaginsku i glutaminsku, koje sa ispitivanim kompleksima pored vodoničnih mogu ostvariti i elektrostatičke interakcije (Slika 56). Drugo mesto vezivanja (BS2) nije isto za ispitivane komplekse, ali ovo nije ni mesto vezivanja lekova i ne sadrži metionin koji bi se mogao koordinovati za Pt(II) jone. Energije vezivanja za BS2 su znatno niže (za 1,6 do 2,4 kcal/mol, Slika 55) u poređenju sa energijama vezivanja kompleksa za BS1. Na osnovu ovih proračuna može se izvesti zaključak da povećanjem koncentracije kompleksa, ne dolazi do hidrolize HSA.



Slika 56. Prikaz interakcija sa aminokiselinama u prvom mestu vezivanja (BS1) humanog serum albumina za ispitivane komplekse

Elektronska apsorpciona spektrofotometrija

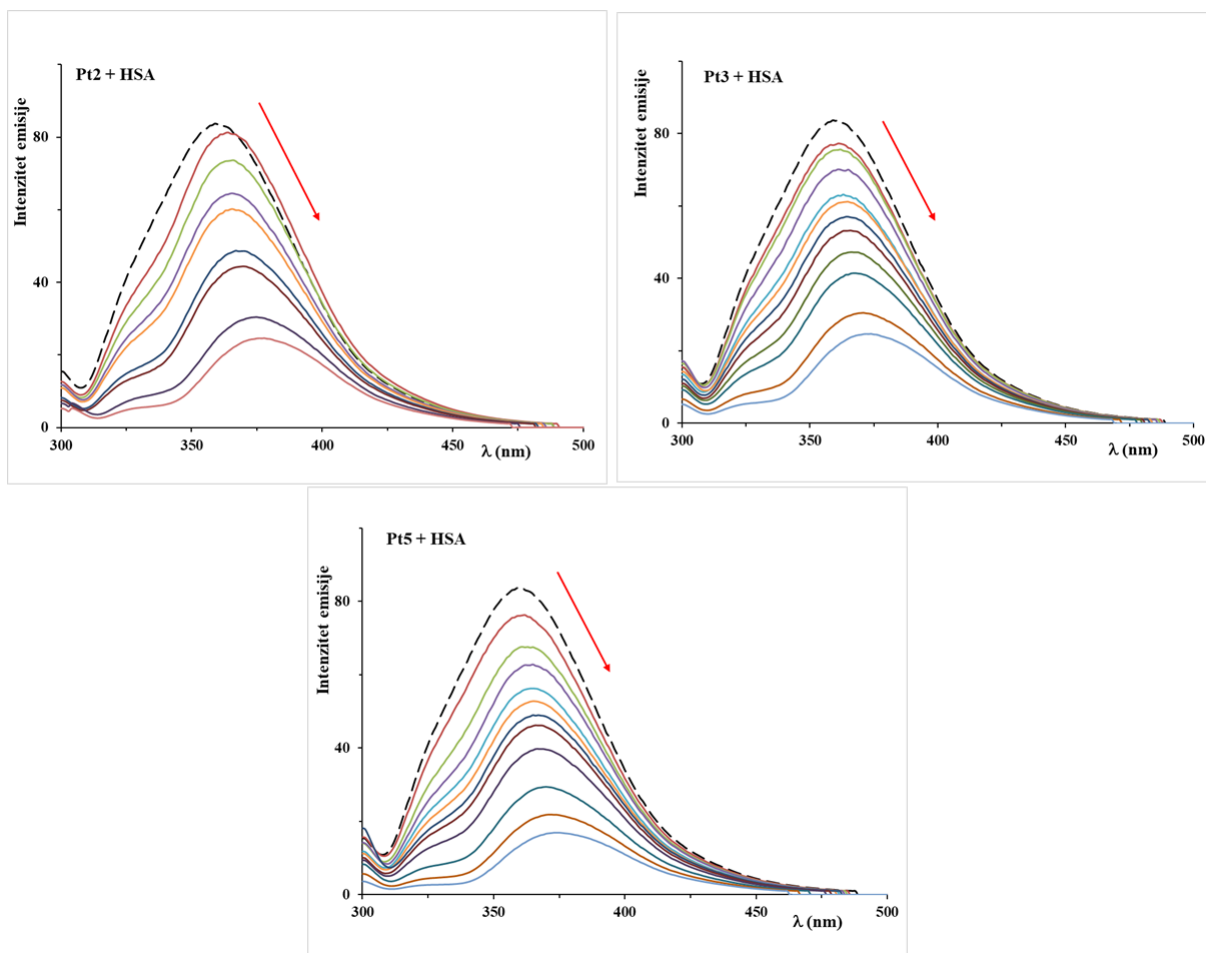
Interakcija između humanog serumskog albumina (HSA) i jedinjenja prisutnih u krvnoj plazmi dovodi do promena u sekundarnoj strukturi proteina ili do promene polariteta mikrookruženja, u delu proteina gde se nalazi ostatak aminokiseline triptofana [207]. Elektronska apsorpciona spektrofotometrija je jedna od metoda, koja se koristi za proučavanje interakcija kompleksa platine(II) sa HSA. U elektronskom apsorpcionom spektru HSA javljaju se dve apsorpcione trake u opsegu 200–240 nm i 260–300 nm, koje potiču od aromatičnih aminokiselina (triptofan (Trp), tirozin (Tir) i fenilalanin (Phe)). Promene u oblasti od 200–240 nm pripisuju se promenama u sekundarnoj strukturi proteina [208,209]. Maksimum apsorpcije na 280 nm je veoma osetljiv na promene u mikrookruženju triptofana, tako da promene u ovom delu spektra ukazuju na promene u konformaciji proteina. UV-Vis spektri HSA u odsustvu i prisustvu rastuće koncentracije **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa prikazani su na slici 57. Na osnovu ovih spektara može se zaključiti da nakon dodatka dinuklearnih platina(II) kompleksa u rastvor HSA ne dolazi do pomeranja apsorpcionog maksimuma ($\lambda_{\max} = 280$ nm). Na osnovu UV-Vis spektara može se zaključiti da promene u mikrookruženju aminokiseline triptofana nastaju usled interakcija **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa sa HSA [210]. U ispitivanim reakcijama može se uočiti hiperhromno pomeranje maksimuma apsorpcije, koje je u opsegu od 70,74% do 74,45%. Sve ovo ukazuje da dolazi do strukturnih promena u HSA usled nekovalentnih interakcija, koje mogu biti posledica vodoničnog vezivanja ili elektrostatičkih interakcija [211]. Na osnovu ove spektroskopske tehnike može se zaključiti da ispitivani kompleksi sa HSA ostvaruju statičke interakcije.



Slika 57. UV-Vis spektri HSA ($c = 8 \mu\text{M}$) u prisustvu **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa ($c = 0\text{-}160 \mu\text{M}$) u PBS ($\text{pH} = 7,4$)

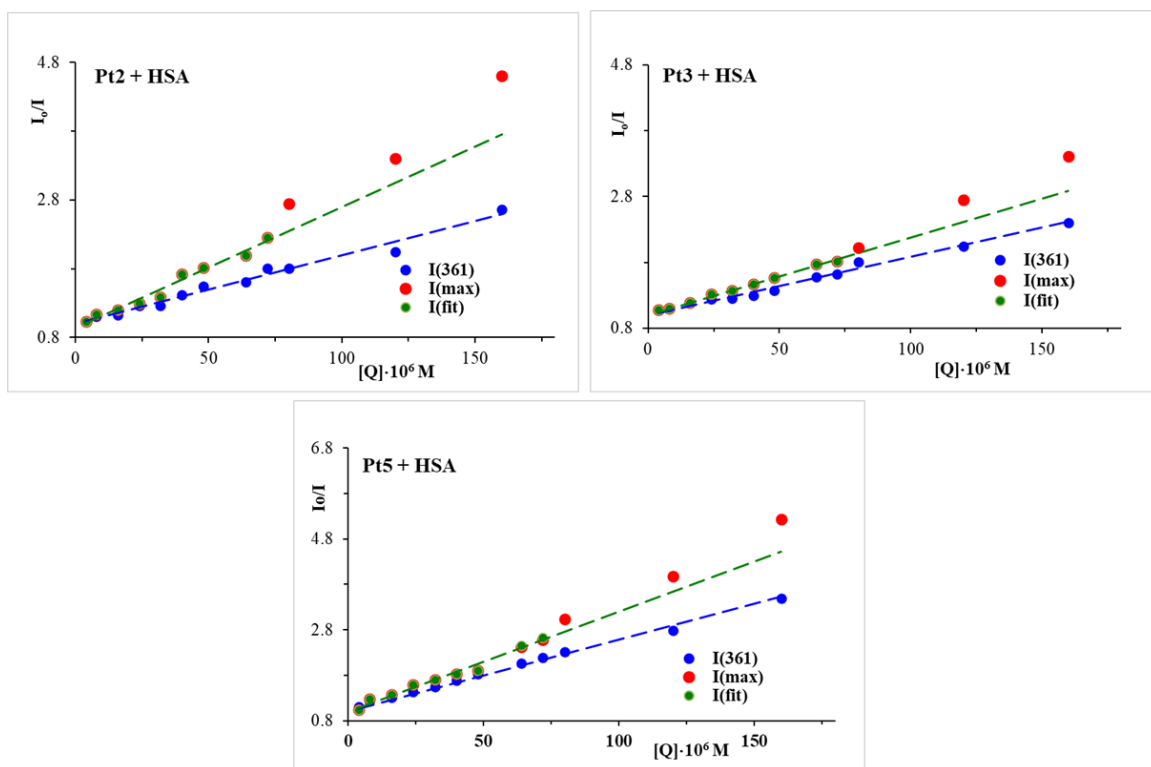
Emisiona fluorescentna spektroskopija

Da bi potvrdili rezultate UV-Vis spektrofotometrije, reakcije **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa ispitivane su i primenom emisiona fluorescentne spektroskopije. Emisioni spektri HSA u prisustvu rastućih koncentracija **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa snimljeni su u opsegu od 300 do 500 nm, uz ekscitaciju na $\lambda_{\text{max}} = 295 \text{ nm}$ (Slika 58). Intenzitet fluorescencije HSA na 361 nm opada sa povećanjem koncentracije **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa, uz istovremeno blago batohromno (crveno) pomeranje emisionog maksimuma. Promene u emisionim spektrima ukazuju na promene u mikrookruženju ostatka aromatične aminokiseline triptofana usled povećanja polariteta grupe na ostatku HSA ili interakcije kompleksa sa polarnim grupama, što sugeriše da su to glavni faktori koji doprinose stabilizaciji HSA /platine(II) sistema.



Slika 58. Emisioni spektri HSA ($c = 8 \mu\text{M}$) u prisustvu **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa ($c = 0\text{--}160 \mu\text{M}$)

Stern-Volmerova konstanta (K_{sv}), konstanta brzine gašenja (k_q), konstanta vezivanja (K_a) i broj mesta vezivanja (n) određene su primenom jednačina koje su prikazane u eksperimentalnom delu rada (Poglavlje 2.6.). Za izračunavanje vrednosti K_{sv} , k_q , K_a i n korišćena su dva modela proračuna. U prvom modelu uzete su vrednosti intenziteta emisije (I) na 361 nm, odnosno intenzitet emisije na talasnoj dužini na kojoj HSA ima maksimum emisije bez prisustva platina(II) kompleksa (I_{max}). U drugom modelu, uzete su maksimalne vrednosti emisije (I_{max}) za svaki pojedinačni spektar, jer sa povećanjem koncentracije kompleksa platine(II) maksimum emisije pomera se ka većim vrednostima talasnih dužina (batohromno pomeranje, Slika 59). Proračuni su pokazali, da bez obzira koji model proračuna se koristi, vrednosti K_{sv} su reda veličine 10^4 . Primenom drugog modela za **Pt5** kompleks dobijena je vrednost $K_{sv} = 2,21 \cdot 10^4$, dok je primenom prvog modela za isti kompleks $K_{sv} = 1,58 \cdot 10^4$ (Tabela 11). Dobijene vrednosti za konstante brzine gašenja (k_q) su veće u odnosu na konstante brzine gašenja biopolimera ($\approx 2,00 \cdot 10^{10}/\text{Ms}$), što ukazuje na statičko gašenje fluorescencije, odnosno na formiranje HSA/Pt(II) adukta u osnovnom stanju.



Slika 59. Stern-Volmerovi grafici interakcija HSA sa **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksima

Primenom prvog modela proračuna grafik I_0/I u zavisnosti od koncentracije **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa pokazuje linearnost u opsegu ispitivanih koncentracija, dok drugi model pokazuje pozitivno odstupanje od linearnosti pri koncentracijama većim od $80 \mu\text{M}$. Ovo pozitivno odstupanje ukazuje na udeo dinamičkog gašenja fluorescencije, ali dijagram pokazuje da je udeo statičkog gašenja i dalje veći od dinamičkog gašenja. Iz Stern-Volmerove jednačine mogu se izračunati vrednosti konstanti vezivanja ($K_a = 0,66\text{--}9,53 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (prvi model) i $K_a = 3,08\text{--}12,85 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (drugi model), kao i broj vezivnih mesta na HSA (n), što je u ovom slučaju 1.

Tabela 11. Stern-Volmerova konstanta (K_{sv}), konstanta gašenja (k_q), konstanta vezivanja (K_a) i broj vezujućih mesat (n) za interakcije između HSA i dinuklearnih **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa.

kompleks	prvi model				drugi model			
	$K_{sv} \cdot 10^4$ (M^{-1})	$k_q \cdot 10^{12}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$K_a \cdot 10^4$ (M^{-1})	n	$K_{sv} \cdot 10^4$ (M^{-1})	$k_q \cdot 10^{12}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$K_a \cdot 10^4$ (M^{-1})	n fit
Pt2	1,00	1,00	9,53	1,2	1,63	1,63	12,85	1,2
Pt3	0,88	0,88	0,66	0,9	1,18	1,18	3,08	0,9
Pt5	1,58	1,58	2,51	1,0	2,21	2,21	6,63	1,0

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove disertacije prikazane su metode sinteze i karakterizacija devet dinuklearnih kompleksa platine(II), koji kao mostni ligand sadrže 1,5-naftiridin (**Pt1-Pt7**) ili 1,6-naftiridin (**Pt8** i **Pt9**). Karakterizacija kompleksa izvršena je na osnovu rezultata elementalne mikroanalize, ^1H i ^{13}C NMR spektroskopije, UV-Vis spektrofotometrije, kao i IR spektroskopije. Pored toga, strukture **Pt1-Pt7** kompleksa dodatno su potvrđene rezultatima masene spektroskopije (HRMS).

Rezultati koji su dobijeni primenom UV-Vis spektrofotometrije i fluorescentne spektroskopije za ispitivanje interakcija sintetisanih kompleksa sa dezoksiribonukleinskom kiselinom koja je izolovana iz grudne žlezde teleta (CT-DNK) su pokazali da ispitivani kompleksi grade fosfatne veze sa CT-DNK, koje predstavljaju vrstu elektrostatickih interakcija. Većina ispitivanih dinuklearnih kompleksa, odnosno njihovi akva derivati, grade međulančane fosfatne veze, uz premošćavanje malog žljeba. Mostni naftiridinski ligandi (1,5-nphe, 1,6-nphe) ne utiču značajno na način i jačinu interakcija ispitivanih kompleksa sa CT-DNK. Dobijeni eksperimentalni podaci su potvrđeni na osnovu rezultata molekuskog dokinga.

Primenom fluorescentne spektroskopije ispitivane su interakcije **Pt8** i **Pt9** sa BSA. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ispitivani kompleksi se vezuju za BSA. Međutim, vrednosti K_a za ispitivane komplekse su manje ($1,00 \cdot 10^4$, **Pt8**; $0,27 \cdot 10^4$, **Pt9**) u odnosu na K_a za avidin (10^{15} M^{-1}), koji ostvaruje najjače nekovalentne interakcije sa biomolekulima, zbog čega se nekovalentne interakcije **Pt8/Pt9**-BSA mogu lako raskinuti i pre dolaska do ciljanog mesta u ćeliji. Konstanta vezivanja (K_a) je ≈ 4 puta veća za **Pt8** u odnosu na **Pt9** kompleks, što se može pripisati prisustvu dva amminski liganda u **Pt8** kompleksu, koji mogu ostvariti veći broj vodoničnih veza sa BSA u odnosu na **Pt9** kompleks, koji sadrži bidentatno koordinovani etilendiaminski ligand.

Eksperimentalni rezultati (^1H NMR) i kvantno-hemijski proračuni za reakcije *N*-acetilovanog L-metionil-glicina (Ac-L-Met-Gly) i **Pt2w**, **Pt3w** i **Pt5w** kompleksa su pokazali da ispitivani kompleksi selektivno hidrolizuju Met-Gly peptidnu vezu.

Primenom UV-Vis spektrofotometrije i fluorescentne spektroskopije ispitivane su interakcije **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** sa HSA. Na osnovu dobijenih rezultata jasno je da su dominantne statičke interakcije kompleksi platine(II) sa HSA. Rezultati molekuskog dokinga su pokazali da se ispitivani kompleksi prvo vezuju za netransportno mesto HSA, za koje se ne vezuju lekovi (nalazi se između IA i IIA poddomena), na osnovu čega se može zaključiti da HSA nije transportni protein za ispitivane dinuklearne komplekse. Pored toga rezultati proračuna su pokazali da u prisustvu **Pt2**, **Pt3** i **Pt5** kompleksa ne hidrolizuje ni jedna peptidna veza u HSA.

In vitro citotoksična aktivnost **Pt1-Pt7** kompleksa ispitivana je na tri tumorske ćelijske linije miševa (karcinom dojke (4T1), debelog creva (CT26) i pluća (LLC1)) i na dve zdrave ćelijske linije (humane ćelije fibroblasta pluća (MRC-5) i mezenhimalne matične ćelije miša (MSC) izolovane iz koštane srži). Rezultati MTT testa su pokazali da ispitivani kompleksi skoro i ne pokazuju citotoksični efekat prema ćelijskim linijama karcinoma dojke (4T1), dok je citotoksični efekat prema ćelijskim linijama karcinoma pluća (LLC1) miševa veoma nizak. Značajnu citotoksičnu aktivnost prema ćelijskoj liniji karcinoma debelog creva (CT26) pokazali su **Pt1** i **Pt2** kompleks. Ove vrednosti mogu se porediti sa citotoksičnom aktivnosti cisplatine. Ispitivani kompleksi nakon 24 h indukuju apoptotičku smrt CT26 ćelija. Kompleksi, **Pt1**, **Pt2** i **Pt5** su pokazali znatno veću apsorpciju od strane ćelije u odnosu na **Pt3**, **Pt4**, **Pt6** i **Pt7** komplekse, na osnovu čega se može zaključiti da pasivni transport nije odgovoran za razlike u pogledu ćelijske apsorpcije ispitivanih kompleksa. Primenom molekuskog dokinga nađeno je da se **Pt1**, **Pt2** i **Pt5** kompleksi vezuju za petlju humanog seruma transferina, dok se **Pt3**, **Pt4**, **Pt6** i **Pt7** kompleksi vezuju u mestu koje ima u blizini Met ostatak. Stoga postoji mogućnost njihovog koordinovanja za humanim serum transferin, što smanjuje njegov transport unutar ćelije.

In vitro citotoksična aktivnost **Pt8** i **Pt9** kompleksa ispitivana je na dve tumorske ćelijske linije miševa (karcinom dojke (4T1) i debelog creva (CT26)), na tri humane tumorske ćelijske linije (karcinom dojke (MDA-MB-468), debelog creva (HCT-116) i pluća (A549)) i na zdravim mezenhimalnim matičnim ćelijama miša (MSC). **Pt8** kompleks je pokazao veći citotoksični potencijal prema čvrstim tumorima u odnosu na **Pt9** kompleks. Nađeno je da **Pt8** kompleks indukuje apoptozu 4T1 i A549 ćelija, zbog čega dolazi do povećanja ekspresije pro-apoptotičnog kaspaze-3 i smanjenja ekspresije anti-apoptotičnog Bcl-2 i Ki-67 proteina.

LITERATURA

1. A. Gilman, L. S. Goodman, M. M. Wintrobe, W. Dameshek, M. J. Goodman, M. T. McLennan, *J. Am. Med. Assoc.*, 1946, **132**, 126–132.
2. WHO report on cancer: Setting priorities, investing wisely and providing care for all. World Health Organization, 2020. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330745>.
3. R. Canetta, M. Rozenzweig, S.K. Carter, *Cancer Treat. Rev.(Suppl. A)*, 1985, **12**, (1985) 125–136.
4. J.H. Ahn, Y.K. Kang, T.W. Kim, H. Bahng, H.M. Chang, W.C. Kang, W.K. Kim, J.S. Lee, J.S. Park, *Cancer Chemother. Pharmacol*, 2002, **50**, 104–110.
5. W.S. Lee, G.W. Lee, H.W. Kim, O.J. Lee, Y.J. Lee, G.H. Ko, J.S. Lee, J.S. Jang, W.S. Ha, *Cancer Res. Treat.*, 2005, **37**, 208–211.
6. R. Voegeli, W. Schumacher, J. Engel, J. Respondek, P. Hilgard, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1990, **116**, 439–442.
7. N. Howlader, A. M. Noone, M. Krapcho, N. Neyman, R. Aminou, W. Waldron, S. F. Altekruse, C. L. Kosary, J. Ruhl, Z. Tatalovich, H. Cho, A. Mariotto, M. P. Eisner, D. R. Lewis, H. S. Chen, E. J. Feuer, K. A. Cronin, *SEER Cancer Statistics Review, 1975–2009*; National Cancer Institute: Bethesda, MD, 2012.
8. World Health Organization. “WHO Model List of Essential Medicines,” 2013.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Ambulatory Care Drug Database System. Accessed: 2015; http://www.cdc.gov/nchs/ahcd/ahcd_database.htm.
10. A.A. Argyriou, P. Polychronopoulos, G. Iconomou, E. Chroni, H.P. Kalofonos, *Cancer Treat. Rev.*, 2008, **34**, 368–377.
11. K. Barabas, R. Milner, D. Lurie, C. Adin, *Vet. Comp. Oncol.*, 2008, **6**, 1–18.
12. S.R. McWhinney, R.M. Goldberg, H.L. McLeod, *Mol. Cancer Ther.*, 2009, **8**, 10–16.
13. P.C.A. Bruijninx, P.J. Sadler, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2008, **12**, 197–206.
14. W. Sttiroyens, P. Dodion, M. Rozenzweig, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1990, **116**, 392–396.
15. Y. Sedletska, M. J. Giraud-Panis, J. M. Malinge, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, 2005, **5**, 251–265.
16. K. S. Lovejoy, S. J. Lippard, *Dalton Trans.*, 2009, **48**, 10651–10659.
17. X. Han, X. Gao, *Curr. Med. Chem.*, 2001, **8**, 551–581.
18. S. Neidle, C. M. Nunn, *Nat. Prod. Rep.*, 1998, **15**, 1–15.
19. S. Dhar, S. J. Lippard, *In Platinum and Other Heavy Metal Chemical Reviews Review*

- Compounds in Cancer Chemotherapy*, A. Bonetti, R. Leone, F. M. Muggia, S. B. Howell, Eds.; Humana Press: NJ, 2009.
20. T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, S. J. Lippard, *Philos. Trans. R. Soc. A*, 2015, **373**, 20140185.
 21. D. P. Gately, S. B. Howell, *A Review. Br. J. Cancer* 1993, **67**, 1171–1176.
 22. G. R. Gale, C. R. Morris, L. M. Atkins, A. B. Smith, *Cancer Res.*, 1973, **33**, 813–818.
 23. M. Ogawa, G. R. Gale, S. S. Keirn, *Cancer Res.*, 1975, **35**, 1398–1401.
 24. S. P. Binks, M. Dobrota, *Biochem. Pharmacol.*, 1990, **40**, 1329–1336.
 25. S. B. Howell, R. Safaei, C. A. Larson, M. J. Sailor, *Mol. Pharmacol.*, 2010, **77**, 887–894.
 26. P. Abada, S. B. Howell, *Met.-Based Drugs*, 2010, **2010**, 317581.
 27. S. Zhang, K. S. Lovejoy, J. E. Shima, I. L. Lagpacan, Y. Shu, A. Lapuk, Y. Chen, T. Komori, J. W. Gray, X. Chen, S. J. Lippard, *Cancer Res.*, 2006, **66**, 8847–8857.
 28. J. M. Dornish, E. O. Pettersen, *Biochem. Pharmacol.*, 1990, **39**, 309–318.
 29. J. W. Reishus, D. S. Jr. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, **83**, 2457–2462.
 30. U. Frey, D. J. Ranford, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 1333–1340.
 31. E. Jerremalm, P. Videhult, G. Alvelius, W. J. Griffiths, T. Bergman, S. Eksborg, H. Ehrsson, *J. Pharm. Sci.*, 2002, **91**, 2116–2121.
 32. A. J. Di Pasqua, J. Goodisman, D. J. Kerwood, B. B. Toms, R. L. Dubowy, J. C. Dabrowiak, *Chem. Res. Toxicol.*, 2006, **19**, 139–149.
 33. A. Junker, R. Farinotti, *Ann. Pharmacother.*, 2009, **43**, 390–391.
 34. A. J. Di Pasqua, D. J. Kerwood, Y. Shi, J. Goodisman, J. C. Dabrowiak, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 4821–4825.
 35. A. Casini, J. Reedijk, *Chem. Sci.*, 2012, **3**, 3135–3144.
 36. R. Mezencev, *Curr. Cancer Drug Targets*, 2015, **14**, 794–816.
 37. M. F. Osborn, J. D. White, M. M. Haley, V. J. DeRose, *ACS Chem. Biol.*, 2014, **9**, 2404–2411.
 38. D. P. Bancroft, C. A. Lepre, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 6860–6871.
 39. A. M. J. Fichtinger-Schepman, J. L. van der Veer, J. H. J. den Hartog, P. H. M. Lohman, J. Reedijk, *Biochemistry*, 1985, **24**, 707–713.
 40. M. Kartalou, J. M. Essigmann, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 2001, **478**, 1–21.
 41. F. A. Blommaert, H. C. M. van Dijk-Knijnenburg, F. J. Dijt, L. den Engelse, R. A. Baan, F. Berends, A. M. J. Fichtinger-Schepman, *Biochemistry*, 1995, **34**, 8474–8480.
 42. J. M. Woynarowski, W. G. Chapman, C. Napier, M. C. S. Herzig, P. Juniewicz, *Mol. Pharmacol.*, 1998, **54**, 770–777.
 43. E. Alessio, *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, 2011.
 44. T. C. Johnstone, J. J. Wilson, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**, 12234–12249.
 45. B. P. Espósito, R. Najjar, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **232**, 137–149.
 46. A. I. Ivanov, J. Christodoulou, J. A. Parkinson, K. J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow, P. J. Sadler, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 14721–14730.
 47. C. A. Rabik, M. E. Dolan, *Cancer Treat. Rev.*, 2007, **33**, 9–23.
 48. C. J. van Garderen, L. P. van Houte, *Eur. J. Biochem.*, 1994, **225**, 1169–1179.

49. F. Coste, J. M. Malinge, L. Serre, W. Shepard, M. Roth, M. Leng, C. Zelwer, *Nucleic Acids Res.*, 1999, **27**, 1837-1846.
50. C. Billecke, S. Finniss, L. Tahash, C. Miller, T. Mikkelsen, N. P. Farrell, O. Bögler, *Neuro-Oncology*, 2006, **8**, 215-226.
51. N. Farrell, Y. Qu, U. Bierbach, M. Valsecchi, E. Menta, *Cisplatin; Verlag Helvetica Chimica Acta*, 2006.
52. N. Farrell, Y. Qu, M. P. Hacker, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 2179-2184.
53. N. Farrell, *Cancer Invest.*, 1993, **11**, 578-589.
54. B. P. Esposito, R. Najjar, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **232**, 137-179.
55. Y. P. Ho, S. C. F. Au-Yeung, K. K. W. To, *Med. Res. Rev.*, 2003, **23**, 633-655.
56. N. J. Wheate, J. G. Collins, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **241**, 133-145.
57. N. J. Wheate, J. G. Collins, *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents*, 2005, **5**, 267-279.
58. Q. Liu, Y. Qu, R. Van Antwerpen, N. Farrell, *Biochemistry*, 2006, **45**, 4248-4256.
59. Y. Zou, B. Van Houten, N. Farrell, *Biochemistry*, 1994, **33**, 5404-5410.
60. D. Yang, S. S. G. E. van Boom, J. Reedijk, J. H. van Boom, N. Farrell, A. H. -J. Wang, *Nat. Struct. Biol.*, 1995, **2**, 577-578.
61. V. Brabec, J. Kašpárková, O. Vrána, O. Nováková, J. W. Cox, Y. Qu, N. Farrell, *Biochemistry*, 1999, **38**, 6781-6790.
62. P. Perego, C. Caserini, L. Gatti, N. Carenini, S. Romanelli, R. Supino, D. Colangelo, I. Viano, R. Leone, S. Spinelli, G. Pezzoni, C. Manzotti, N. Farrell, F. A. Zunino, *Mol. Pharmacol.*, 1999, **55**, 528-534.
63. J. D. Roberts, J. Peroutka, G. Beggiolin, C. Manzotti, L. Piazzoni, N. Farrell, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **77**, 47-50.
64. T. D. McGregor, Z. Balcarová, Y. Qu, M.-C. Tran, R. Zaludová, V. Brabec, N. Farrell, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **77**, 43-46.
65. T. D. McGregor, W. Bousfield, Y. Qu, N. Farrell, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **91**, 212-219.
66. G. Pratesi, P. Perego, D. Polizzi, S. C. Righetti, R. Supino, C. Caserini, C. Manzotti, F. C. Giuliani, G. Pezzoni, S. Tognella, S. Spinelli, N. Farrell, F. A. Zunino, *Br. J. Cancer*, 1999, **80**, 1912-1919.
67. L. Orlandi, G. Colella, A. Bearzatto, G. Abolafio, C. Manzotti, M. G. Daidone, N. Zaffaroni, *Eur. J. Cancer*, 2001, **37**, 649-659.
68. G. Colella, M. Pennati, A. Bearzatto, R. Leone, D. Colangelo, C. Manzotti, M. G. Daidone, N. Zaffaroni, *Br. J. Cancer*, 2001, **84**, 1387-1390.
69. C. Sessa, G. Capri, L. Gianni, F. Peccatori, G. Grasselli, J. Bauer, M. Zucchetti, L. Viganò, A. Gatti, C. Minoia, P. Liati, S. Van den Bosch, A. Bernareggi, G. Camboni, S. Marsoni, *Ann. Oncol.*, 2000, **11**, 977-983.
70. A. H. Calvert, H. Thomas, N. Colombo, M. Gore, H. Earl, L. Sena, G. Camboni, P. Liati, C. Sessa, *Eur. J. Cancer*, 2001, **37** (Supplement 6), S260.
71. G. Scagliotti, S. Novello, L. Crinò, F. De Marinis, M. Tonato, C. Noverasco, G. Selvaggi, F. Massoni, B. Gatti, G. P. Camboni, *Lung Cancer*, 2003, **41** (Supplement 2), S223.
72. D. I. Jodrell, T. R. J. Evans, W. Steward, D. Cameron, J. Prendiville, C. Aschele, C. Noverasco, M. Lind, J. Carmichael, N. Dobbs, G. Camboni, B. Gatti, F. De Braud, *Eur. J. Cancer*, 2004, **40**, 1872-1877.

73. T. A. Hensing, N. H. Hanna, H. H. Gillenwater, M. Gabriella Camboni, C. Allievi, M. A. Socinski, *Anti-Cancer Drugs*, 2006, **17**, 697–704.
74. Y. Qu, A. Harris, A. Hegmans, A. Petz, P. Kabolizadeh, H. Penazova, N. Farrell, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 1591–1598.
75. S. Komeda, T. Moulaei, K. K. Woods, M. Chikuma, N. P. Farrell, L. D. A. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 16092–16103.
76. J. B. Mangrum, N. P. Farrell, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 6640–6650.
77. A. Harris, Y. Qu, N. P. Farrell, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 1196–1198.
78. A. Prisecaru, Z. Molphy, R. G. Kipping, E. J. Peterson, Y. Qu, A. Kellett, N. P. Farrell, *Nucleic Acids Res.*, 2014, **42**, 13474–13487.
79. J. Malina, N. P. Farrell, V. Brabec, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 12812–12816.
80. J. Malina, N. P. Farrell, V. Brabec, *Inorg. Chem.*, 2014, **53**, 1662–1671.
81. A. L. Harris, X. Yang, A. Hegmans, L. Povirk, J. J. Ryan, L. Kelland, N. P. Farrell, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 9598–9600.
82. S. Komeda, M. Lutz, L. A. Spek, M. Chikuma, J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 4230–4236.
83. S. Komeda, M. Lutz, A. L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma, J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 4738–4746.
84. S. Komeda, G. V. Kalayda, M. Lutz, A. L. Spek, Y. Yamanaka, T. Sato, M. Chikuma, J. Reedijk, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 1210–1219.
85. D. P. Ašanin, M. D. Živković, S. Rajković, B. Warzajtis, U. Rychlewska, M. I. Djuran, *Polyhedron*, 51 (2013) 255–262.
86. S. Rajković, D. P. Ašanin, M. D. Živković, M. I. Djuran, *Polyhedron*, 65 (2013) 42–47.
87. S. Rajković, U. Rychlewska, B. Warzajtis, D. P. Ašanin, M. D. Živković, M. I. Djuran, *Polyhedron*, 67 (2014) 279–285.
88. L. Senerovic, M. D. Živković, A. Veselinović, A. Pavić, M. I. Djuran, S. Rajković, J. Nikodinović-Runić, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 1442–1451.
89. M. D. Živković, T. Ilić-Tomić, I. S. Đorđević, J. Nikodinović-Runić, A. Pavić, G. V. Janjić, S. Rajković, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2020, **25**, 395–409.
90. A. A. Franich, I. S. Đorđević, M. D. Živković, S. Rajković, G. V. Janjić, M. I. Djuran, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2022, **27**, 65–79.
91. A. Reissert, *Berichte*, 1893, **26**, 2137–2144.
92. B. Bobranski, E. A. Sucharda, *Berichte*, 1927, **60**, 1081.
93. N. Ikekawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 1958, **6**, 263–269.
94. G. Giacomello, F. Gualteri, F. M. Ricceri, M. L. Stein, *Tetrahedron Lett.*, 1965, **6**, 1117–1121.
95. R. Tan, A. Taurins, *Tetrahedron Lett.*, 1965, **6**, 2737–2381.
96. C. T. Chien, J. R. Shiu, C. P. Chang, Y. S. Hon, D. F. Huang, P. T. Chou, C. Y. Liu, T. J. Chow, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2012, **59**, 357–364.
97. A. Poloek, C. -T. Chen, *Proc. SPIE* 2019, 8829, 88291R-1.
98. S. Zhu, K. X. Moreno, R. M. Jenkins, J. A. Walmsley, *Dalton Trans.*, 2008, 6401–6408.

99. A. N. Singh, R. Thummel, *Inorg. Chem.*, 2009, **48**, 6459–6470.
100. S. Djuric, S. Vojnovic, A. Pavic, M. Mojicevic, H. Wadepohl, N. D. Savic, M. Popsavin, J. Nikodinovic-Runic, M. I. Djuran, B. D. Glisic, *J. Inorg. Biochem.*, 2020, **203**, 110872.
101. J. Matsui, T. Sodeyama, Y. Saiki, T. Miyazawa, T. Yamada, K. Tamaki, T. Murashima, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **25**, 635–639
102. H. Wei, Z. Zhao, C. Wei, G. Yu, Z. Liu, B. Zhang, J. Bian, Z. Bian, C. Huang, *Adv. Funct. Mater.*, 2016, **26**, 2085–2096.
103. C. Huang, *Rare Earth Coordination Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2010.
104. C. Wei, H. Wei, W. Yan, Z. Zhao, Z. Cai, B. Sun, Z. Meng, Z. Liu, Z. Bian, C. Huang, *Inorg. Chem.*, 2016, **55**, 10645–10653
105. C. Wei, B. Sun, Z. Cai, Z. Zhao, Y. Tan, W. Yan, H. Wei, Z. Liu, Z. Bian, C. Huang, *Inorg. Chem.*, 2018, **57**, 7512–7515.
106. Y. Bi, C. Chen, Y. -F. Zhao, Y. -O. Zhang, S. -D. Jiang, B. -W. Wang, J. -B. Han, J. -L. Sun, Z. -Q. Bian, Z. -M. Wang, et al. *Chem. Sci.*, 2016, **7**, 5020–5031.
107. M. Fuertes, C. Masdeu, E. Martin-Encinas, A. Selas, G. Rubiales, F. Palacios, C. Alonso, *Molecules*, 2020, **25**, 3252.
108. A. L. Ruchelman, S. K. Singh, A. W. X. H. Ray, Y. -M. Yang, T. -K. Li, A. Lin, L. F. Lin, E. J. LaVoie, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, **11**, 2061.
109. M. Lavanya, C. Lin, J. Mao, D. Thirumalai, S. R. Aabaka, X. Yang, J. Mao, Z. Huang, J. Zhao, *Topics Curr. Chem.*, 2021, **379**:13.
110. V. P. Litvinov, *Adv. Heterocycl. Chem.*, 2006, **91**, 189–300.
111. S. Neidle, *Principles of Nucleic Acid Structure*, 1st ed. (Academic Press, Boston, 2008), pp. 38–80.
112. Z. Shakked, G. Guerstein-Guzikevich, M. Eisenstein, F. Frolow, D. Rabinovich, *Nature*, 1989, **342**, 456–460.
113. M. H. Shamsi, H. -B. Kraatz, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, 2013, **23**, 4–23.
114. O. Kennard, *Pure Appl. Chem.*, 1993, **65**, 1212–1222.
115. G. Bischoff, S. Hoffmann, *Curr. Med. Chem.*, 2002, **9**, 321–348.
116. J. C. García-Ramos, R. Galindo-Murillo, F. Cortés-Guzmán, L. Ruiz-Azuara, *J. Mex. Chem. Soc.*, 2013, **57(3)**, 245–259.
117. L. Andrezalova, Y. Orsyaghova, *J. Inorg. Biochem.*, 2021, **225**, 111624.
118. N. Z. Fonton, T. Brown, A. Kellett, *ChemBioChem.*, 2021, **22**, 2184–2205.
119. M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, *J. Photoch. Photobio. B*, 2013, **124**, 1–19.
120. K. B. Garbutcheon-Singh, P. Leverett, S. Myers, J. R. Aldrich-Wright, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 918–926.
121. A. Kellett, O. Howe, M. O’Connor, M. McCann, B. S. Creaven, S. McClean, A. Foltyn-Arfa Kia, A. Casey, M. Devereux, *Free Radical Biol. Med.*, 2012, **53**, 564–576.
122. J. Cadet, J. R. Wagner, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2013, **5**:a012559, 1–18.
123. L.S. Lerman, *J. Mol. Biol.*, 1961, **3**, 18–30.
124. A. Canals, M. Purciolas, J. Aymami, M. Coll, *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2005, **61**, 1009.

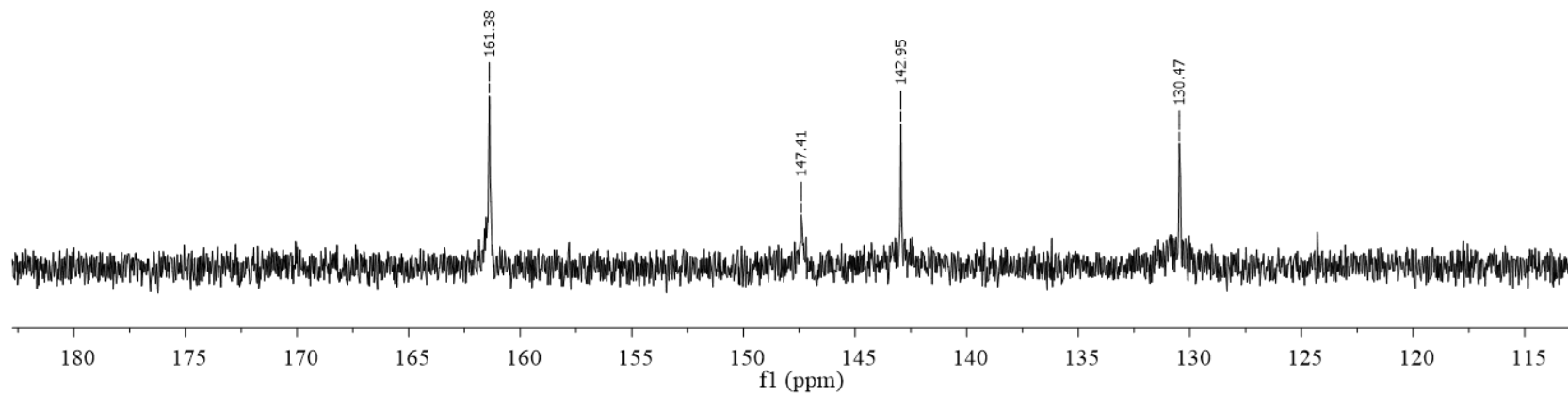
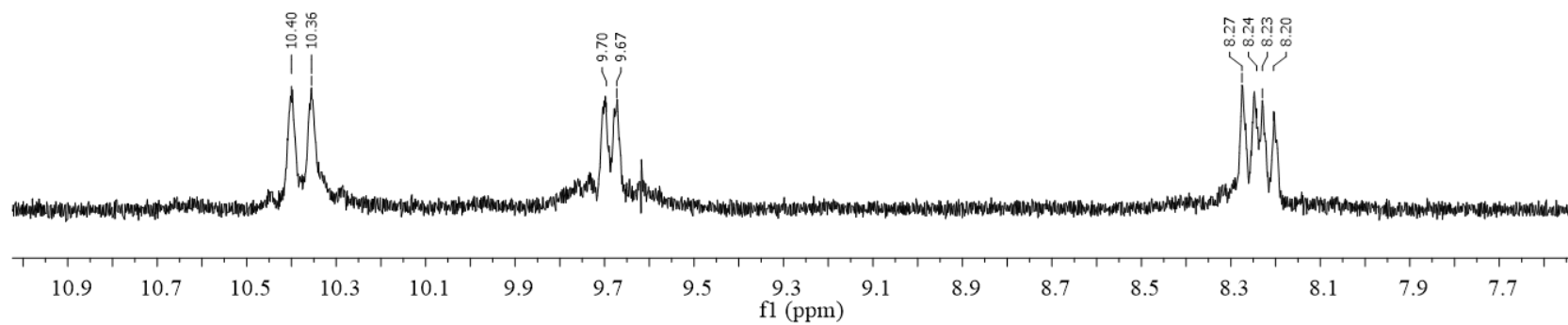
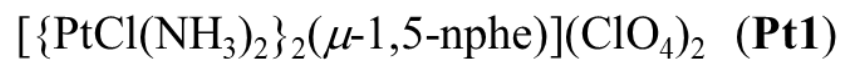
125. B.M. Zeglis, V.C. Pierre, J.K. Barton, *Chem. Commun.*, 2007, **44**, 4549–4696.
126. H.-K. Liu, P.J. Sadler, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 349–359.
127. A.C. Komor, J.K. Barton, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 3617–3630.
128. B. M. Zeglis, V. C. Pierre, J. T. Kaiser, J. K. Barton, *Biochemistry*, 2009, **48**, 4247.
129. J.A. Smith, F.R. Keene, F. Li, J.G. Collins, *Noncovalent DNA Binding of Metal Complexes*, in: J. Reedijk, K. Poepelmeier (Eds.), *Comprehensive Inorganic Chemistry II*, Elsevier, Ltd, 2013, pp. 709–750,
130. G.M. Blackburn, M.J. Gait, D. Loakes, D.M. Williams, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 3th ed., RSC Publishing, Cambridge, 2006
131. L. Strekowski, B. Wilson, *Mutat. Res.*, 2007, **623**, 3–13.
132. A. G. Weidmann, J. K. Barton, *Inorg. Chem.*, 2015, **54**, 9626–9636.
133. N. K. Harika, M. W. Germann, W. D. Wilson, *Chemistry* 2017, **23**, 17612-17620
134. J.L. Asensio, T. Brown, A.N. Lane, *Structure* 1999, **7**, 1-11.
135. C. K. Smith, G. J. Davies, E. J. Dodson, M. H. Moore, *Biochemistry*, 1995, **34**, 415-425.
136. H. Baruah, M. W. Wright, U. Bierbach, *Biochemistry*, 2005, **44**, 6059-6070.
137. L. Zhu, N. M. Kostić, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 3994–4001.
138. S. C. Dhara, *Indian J. Chem.*, 1970, **8**, 193–194.
139. S. U. Milinković, T. N. Parac, M. I. Djuran, N. M. Kostić, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, 2771–2776.
140. M. D. Živković, D. P. Ašanin, S. Rajković, M. I. Djuran, *Polyhedron*, 2011, **30**, 947–952.
141. B. Konovalov, M. D. Živković, J. Z. Milovanović, D.B. Djordjević, A.N. Arsenijević, I. R. Vasić, G. V. Janjić, A. Franich, D. Manojlović, S. Skrivanj, M. Z. Milovanović, M. I. Djuran, S. Rajković, *Dalton Trans.*, 2018, **47**, 15091–15102.
142. B. Konovalov, A. A. Franich, M. Jovanović, M. Jurisević, N. Gajović, M. Jovanović, N. Arsenijević, V. Maric, I. Jovanović, M. D. Živković, S. Rajković, *Applied Organometallic Chemistry*, 2020, **35(3)** e6112.
143. G. Mahal, R. van Eldik, *Inorg. Chem.*, 1985, **24**, 4165-4170.
144. B. Konovalov, I.S. Đorđević, A.A. Franich, B. Šmit, M.D. Živković, M.I. Djuran, G.V. Janjić, S. Rajković, *J. Mol. Struct.*, 2023, **1288**, 135810.
145. F. Dimiza, F. Perdih, V. Tangoulis, I. Turel, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.*, 2011, **105**, 476–489.
146. A. A. Franich, M. Živković, T. Ilić-Tomić, S. I. Đorđević, J. Nikodinović-Runić, A. Pavić, G. V. Janjić, S. Rajković, *J. Biol.Inorg. Chem.*, 2020, **25**, 395–409.
147. M.J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Jr. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, E. J. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V.

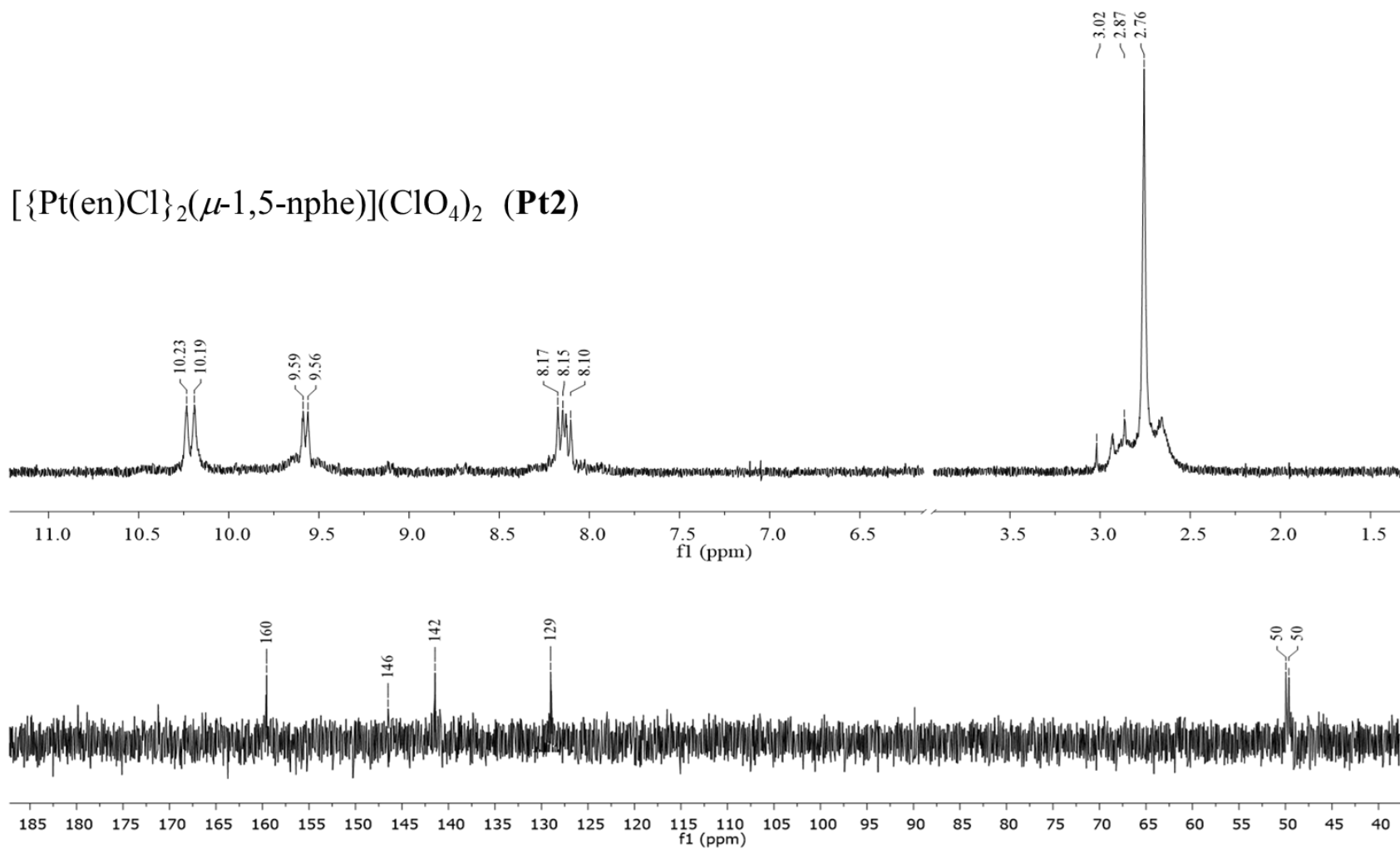
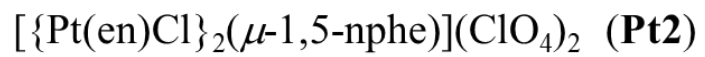
- G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian09. Gaussian, Inc., Wallingford CT. 2009.*
148. C. Zhu, J. Raber, L. A. Eriksson, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 12195–12205.
 149. H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1981, **78**, 2179–2183.
 150. L. Wang, H. Yan, *Biochemistry*, 1998, **37**, 13021–13032.
 141. C. I. Bayly, P. Cieplak, W. D. Cornell, P. A. Kollman, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 10269–10280.
 152. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.*, 2009, **30**, 2785–2791.
 153. Dassault Systèmes BIOVIA, *Discovery Studio Modeling Environment*, Release 2017, 2016.
 154. O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 2010. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
 155. S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K Kobayashi, *Protein Eng.*, 1999, **12**, 439-446.
 156. H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *The Protein Data Bank. Nucleic Acids Research*, 2000. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
 157. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, 1983, **16**, 55–63.
 158. M. Nikolic, M. Mijajlovic, V. Jevtic, Z. Ratković, S. Novakovic, G. Bogdanovic, J. Milovanovic, A. Arsenijevic, B. Stojanovic, S. Trifunovic, G. Radic, *J. Mol. Struct.*, 2016, **1116**, 264-271.
 159. S. Chattopadhyay, P. Chakraborty, M. G. B. Drew, A. Ghosh, *Inorg. Chim. Acta*, 2009, **362**, 502–508.
 160. K. N. Lazarou, I. Chadjistamatis, A. Terzis, S. P. Perlepes, C. P. Raptopoulou, *Polyhedron*, 2010, **29**, 1870–1879.
 161. J. E. Quin, J. R. Devlin, D. Cameron, K. M. Hannan, R. B. Pearson, R. D. Hannan, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.*, 2014, **1842**, 802–816.
 162. V. Brabec, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 2002, **71**, 1–68.
 163. C. X. Zhang, S. J. Lippard, *Curr. Opin. Chem. Bio.*, 2003, **7**, 481–486.
 164. V. Brabec, O. Novakova, *Drug Resist. Updat.*, 2006, **9**, 111–122.
 165. Q. L. Zhang, J. G. Liu, J. Z. Liu, H. Li, Y. Yang, H. Xu, H. Chaoa, L. N. Ji, *Inorg. Chim. Acta*, 2002, **339**, 34–40.
 166. S. Jovanović, K. Obrenčević, Ž. D. Bugarčić, I. Popović, J. Žakula, B. Petrović, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 12444–12457.
 167. O. Novakova, H. Chen, O. Vrana, A. Rodger, P. J. Sadler, V. Brabec, *Biochemistry*, 2003, **42**, 11544–11554.
 168. W. D. Wilson, L. Ratmeyer, M. Zhao, L. Strekowski, D. Boykin, *Biochemistry*, 1993, **32**, 4098–4104.
 169. S. Radisavljević, I. Bratsos, A. Scheurer, J. Korzekwa, R. Masnikosa, A. Tot, N. Gligorijević, S. Radulović, A. Rilak Simović, *Dalton Trans.*, 2018, **47**, 13696–13712.

170. O. Dömötör, C. G. Hartinger, A. K. Bytzek, T. Kiss, B. K. Keppler, E. A. Enyedy, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2013, **18**, 9–17.
171. A. R. Timerbaev, C. G. Hartinger, S. S. Aleksenko, B. K. Keppler, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 2224–2248.
172. J. N. Tian, J. Q. J. Liu, *Mol. Struct.*, 2004, **691**, 197–202.
173. X. He, D. Carter, *Nature*, 1992, **358**, 209–215.
174. Y. Y. Lou, K. L. Zhou, D. Q. Pan, J. L. Shen, J. H. Shi, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2017, **167**, 158–167.
175. M. Manjushree, H. D. Revanasiddappa, *J. Mol. Liq.*, 2017, **237**, 23–37.
176. S. Minic, D. Stanic-Vucinic, M. Radomirovic, M. Radibratovic, M. Milcic, M. Nikolic, T. C. Velickovic, *Food Chem.*, 2018, **239**, 1090–1099.
177. J. H. Shi, D. Q. Pan, M. Jiang, T. T. Liu, Q. Wang, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2016, **164**, 103–111.
178. J. H. Shi, D. Q. Pan, X. X. Wang, T. T. Liu, M. Jiang, Q. Wang, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2016, **162**, 14–23.
179. J. H. Shi, K. L. Zhou, Y. Y. Lou, D. Q. Pan, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2018, **188**, 362–371.
180. D. Čoćić, S. Jovanović, M. Nišavić, D. Baskić, D. Todorović, S. Popović, Ž. D. Bugarčić, B. Petrović, *J. Inorg. Biochem.*, 2017, **175**, 67–79.
181. S. Deepa, A. K. Mishra, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, **38**, 556–563.
182. G. Psomas, D. P. Kessissoglou, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 6252–6276.
183. V. Rajendiran, R. Karthik, M. Palaniandavar, H. Stoeckli-Evans, V. S. Periasamy, M. A. Akbarsha, B. S. Srinag, H. Krishnamurthy, *Inorg. Chem.* 2007, **46**, 8208–8221
184. H. Rauter, R. Di Domenico, E. Menta, A. Oliva, Y. Qu, N. Farrell, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 3919–3927.
185. N. Farrell, Y. Qu, U. Bierbach, M. Valsecchi, E. Menta, in: B. Lippert (Eds.), *30 years of Cisplatin – Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Verlag, 1999, p. 479–496.
186. T. D. McGregor, J. Kasparikova, K. Nepelchova, O. Novakova, H. Penazova, O. Vrana, V. Brabec, N. Farrell, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2002, **7**, 397–404.
187. P. Wu, M. Kharatishvili, Y. Qu, N. Farrell, *J. Inorg. Biochem.*, 1996, **63**, 9–18.
188. A. Madaan, R. Verma, V. Kumar, A. T. Singh, S. K. Jain, M. Jaggi, *Arch. Pharm.*, 2015, **348**, 837–860.
189. N. Margiotta, S. Savino, V. Gandin, C. Marzano, G. Natile, *Chem. Med. Chem.*, 2014, **9**, 1161–1168.
190. M. Graf, Y. Gothe, N. Metzler-Nolte, K. Sünkel, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 2017, **643**, 306–310.
191. N. Desbois, D. Pertuit, J. Moretto, C. Cachia, B. Chauffert, F. Bouyer, *Eur. J. Med. Chem.* 2013, **69**, 719–727.
192. T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 3436–3486.
193. A. Ehnbohm, S. K. Ghosh, K. G. Lewis, J. A. Gladysz, *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**, 6799–6811.
194. G. R. Stockwell, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.*, 2006, **356**, 928–944.
195. X. Sun, P. D. Kaufman, *Chromosoma*, 2018, **127**, 175–186.

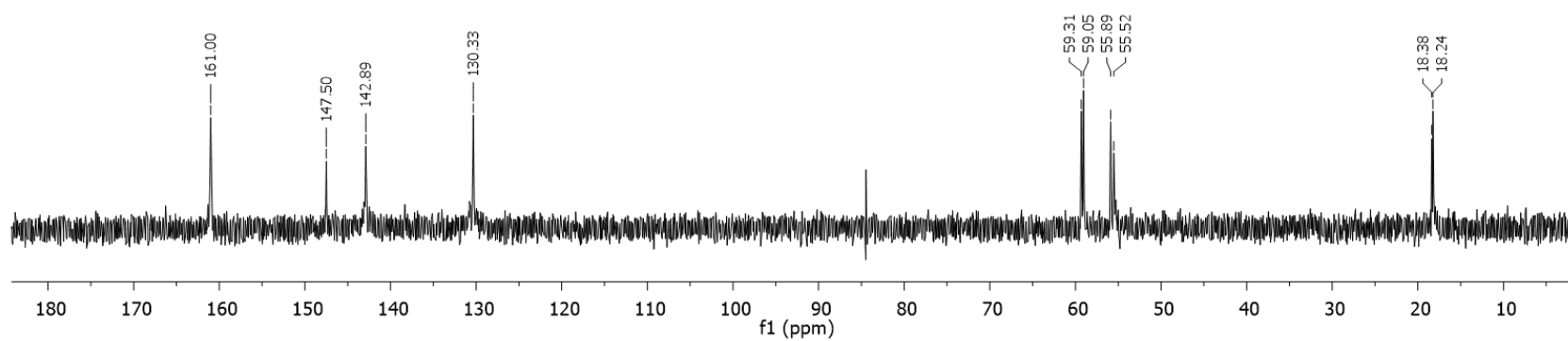
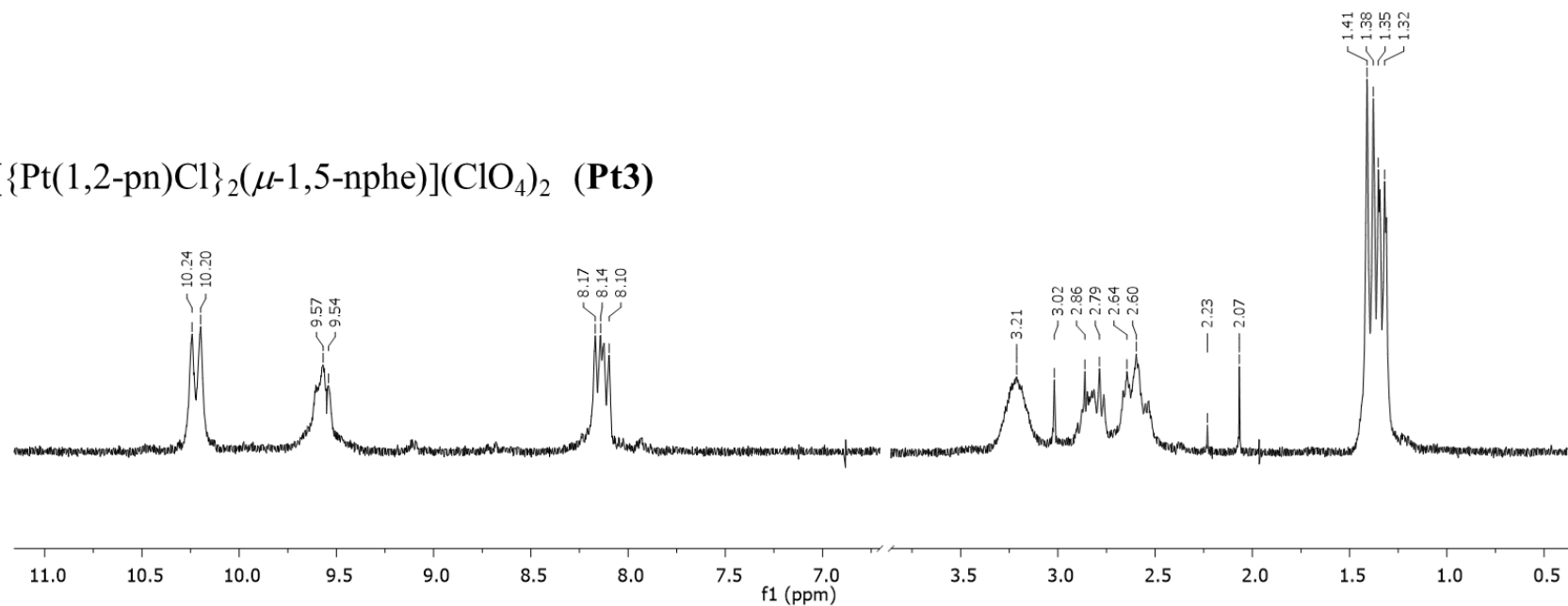
- 196 X. Chen, C. He, D. Han, M. Zhou, Q. Wang, J. Tian, L. Li, F. Xu, E. Zhou, K. Yang, *Future Oncol.*, 2017, **13**, 843–857.
197. T. N. Parac, N. M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 51–58.
198. T. N. Parac, N. M. Kostić, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 5946–5951.
199. S. Rajković, M. D. Živković, B. Warázajtis, U. Rychlewska, M. I. Djuran, *Polyhedron*, 2016, **117**, 367–376.
200. N. M. Milović, N. M. Kostić, Metal ions in biological systems, palladium(II) and platinum(II) complexes as synthetic peptidases, In: A. Sigel, H. Sigel (Eds.), Vol. XXXVIII, Marcel Dekker Inc., 2001, pp. 145–186.
201. I. E. Burgeson, N. M. Kostic, *Inorg. Chem.*, 1991, **30**, 4299–4305.
202. M. D. Živković, S. Rajković, B. Đ. Glišić, N. S. Drašković, M. I. Djuran, *Bioorg. Chem.*, 2017, **72**, 190–198.
203. S. Rajković, B. Warzajtis, M. D. Živković, B. Đ. Glišić, U. Rychlewska, M. I. Djuran, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2018, **Vol. 2018**, Article ID 3294948.
204. M. D. Živković, A. A. Franich, D. P. Ašanin, N. S. Drašković, S. Rajković, M. I. Djuran, *J. Solution Chem.*, 2020, **49**, 1082–1093.
205. C. R. Groom, I. J. Bruno, M.P. Lightfoot, S.C. Ward, *Acta Cryst.*, 2016, **B72**, 171–179.
206. F. Liu, J. Mu, B. Xing, *Curr. Pharm. Design*, 2015, **21**, 1866–1888.
- 207 K. Sakthikumar, R.V. Solomon, J. D. Raja, *RSC Adv.*, 2019, **9**, 14220–14241.
208. X.-L. Han, F.-F. Tian, Y.-S. Ge, F.-L. Jiang, L. Lai, D.-W. Li, Q.-L. Yu, J. Wang, C. Lin, Y. Liu, *Photochem. Photobiol.*, 2012, **B109**, 1–11.
209. S.-L. Zhang, G.L. Damu, L. Zhang, R.-X. Geng, C.-H. Zhou, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 164–175.
210. J. Jayabharathi, V. Thanikachalam, M. V. Perumal, *Spectrochim. Acta A*, 2011, **79**, 502–507.
211. J. R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, Springer Science & Business Media, 2013.

PRILOG

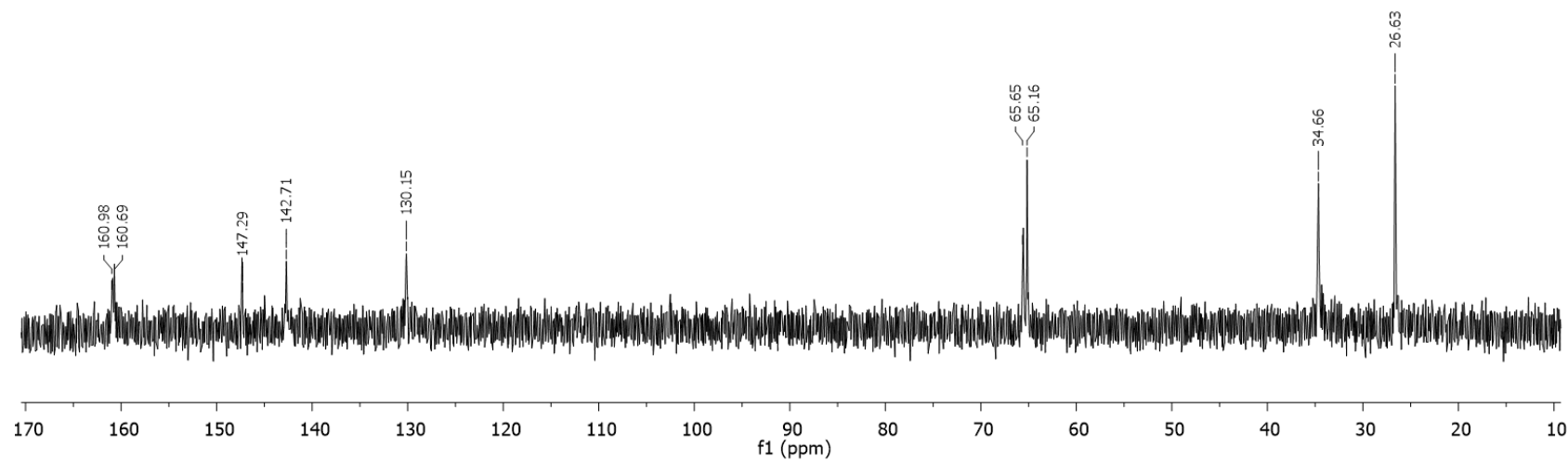
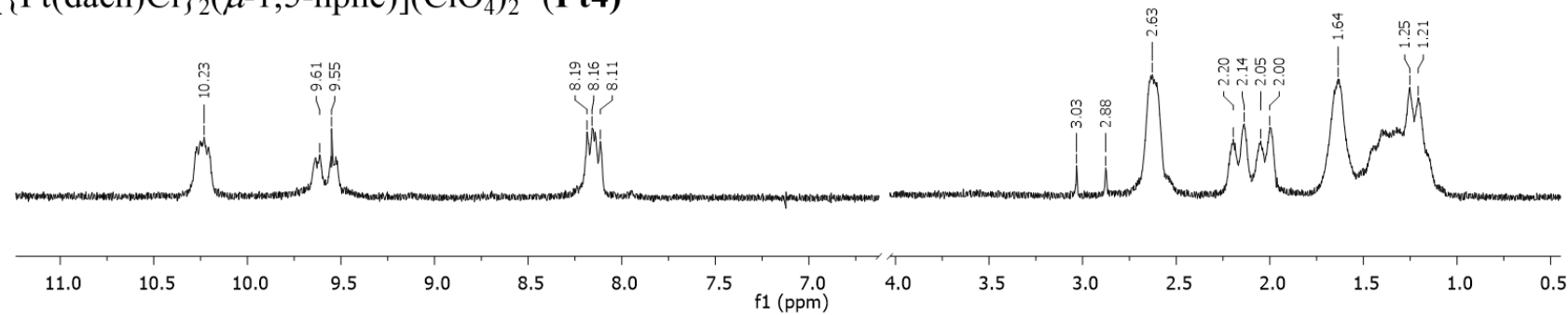


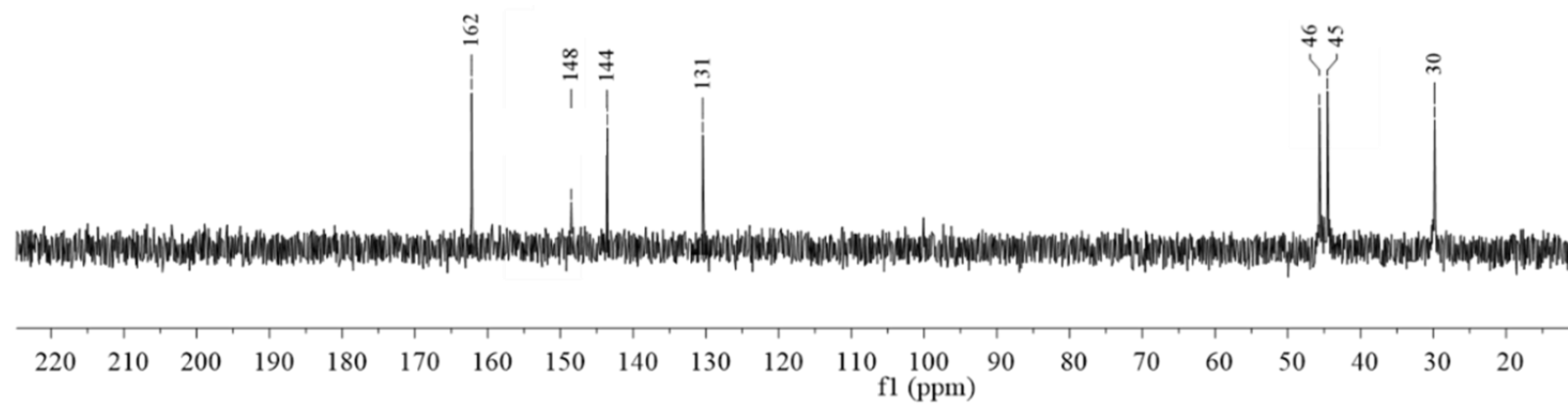
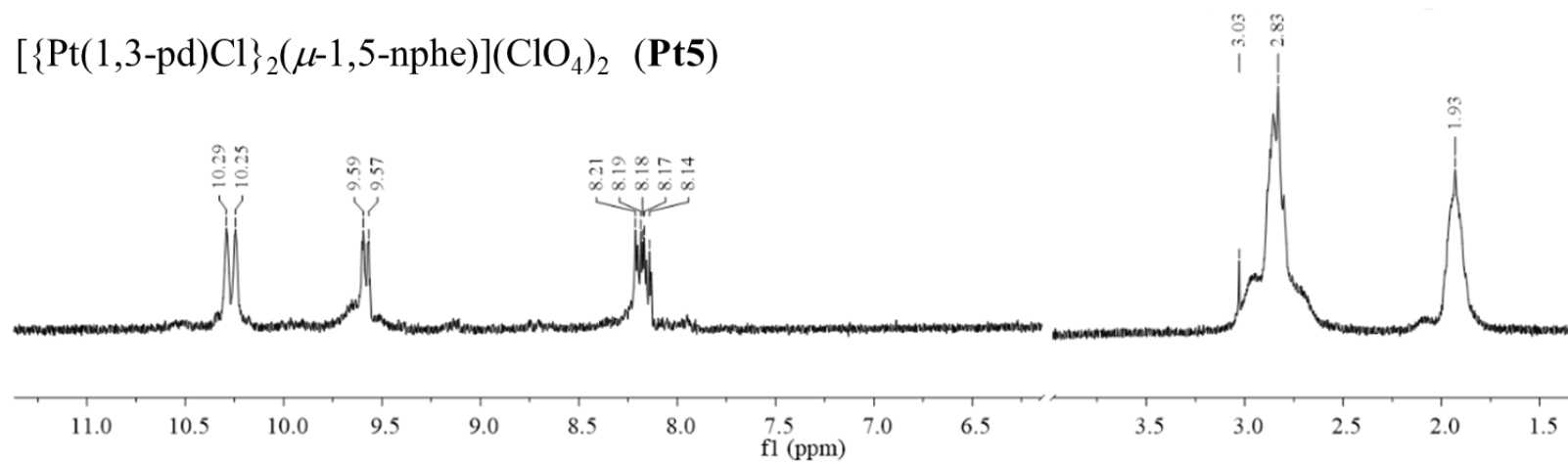
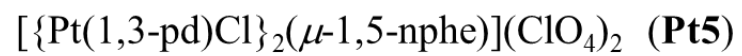


[{Pt(1,2-pn)Cl}₂(μ-1,5-nphe)](ClO₄)₂ (Pt3)

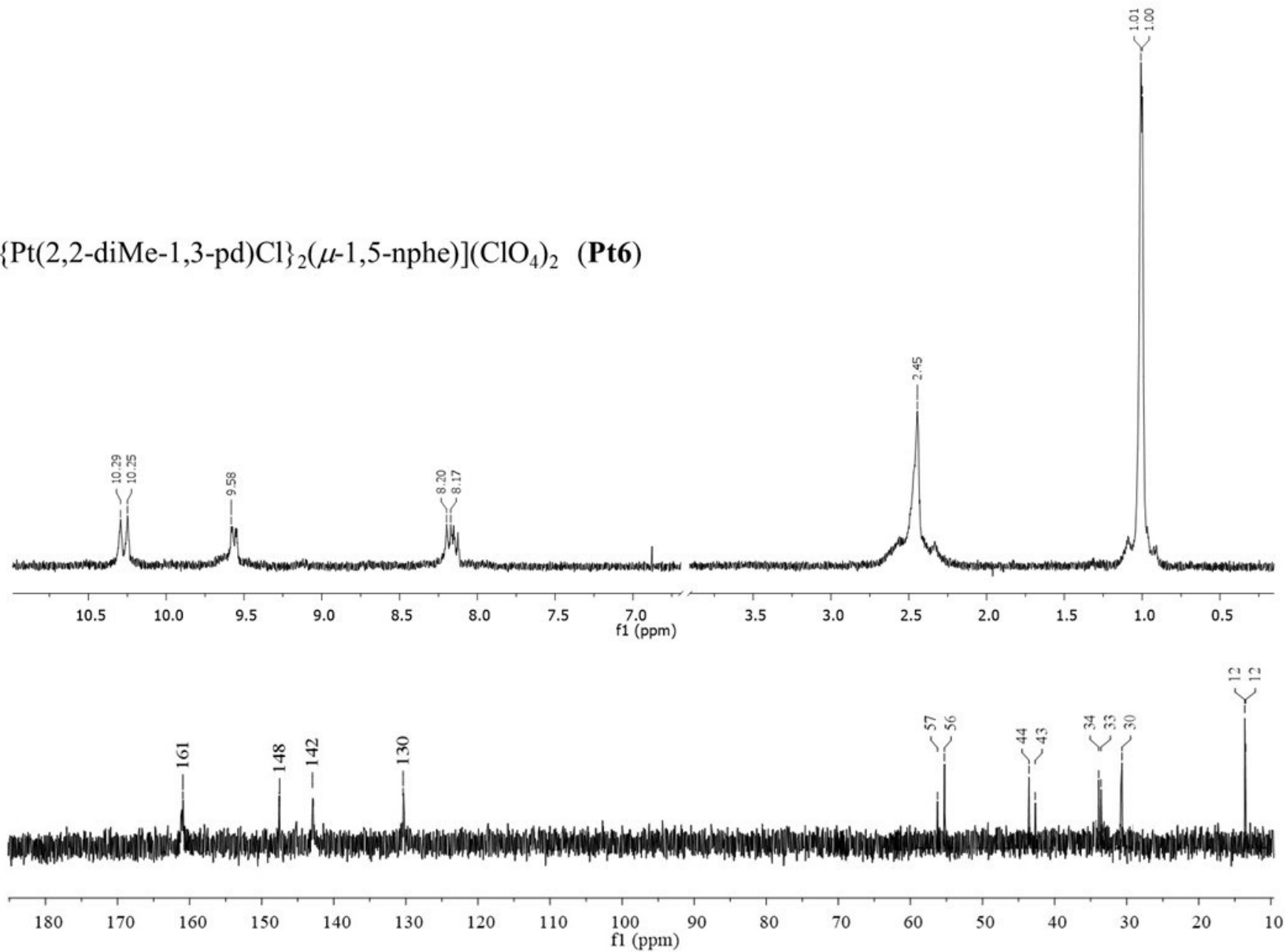


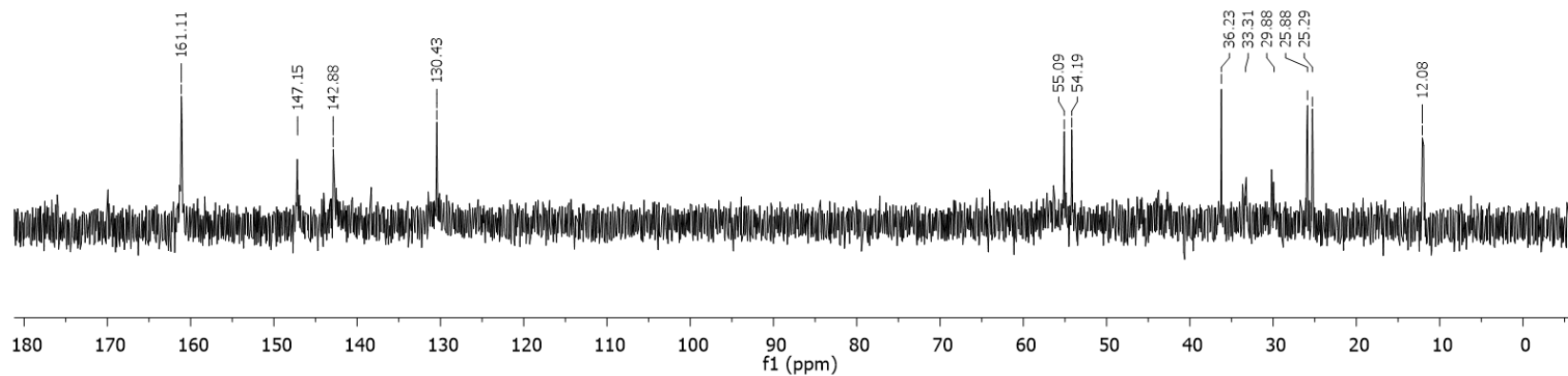
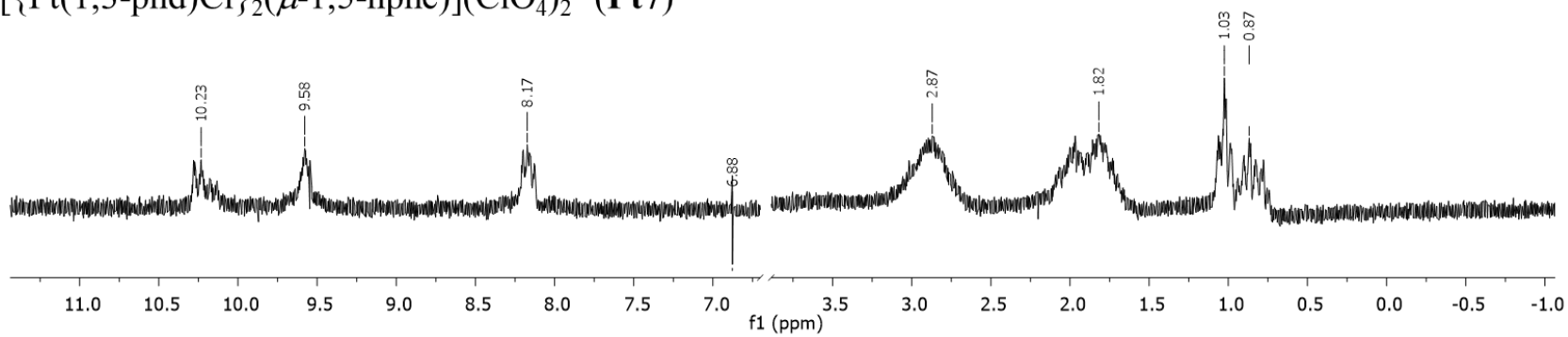
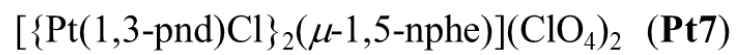
$[\{\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (Pt4)

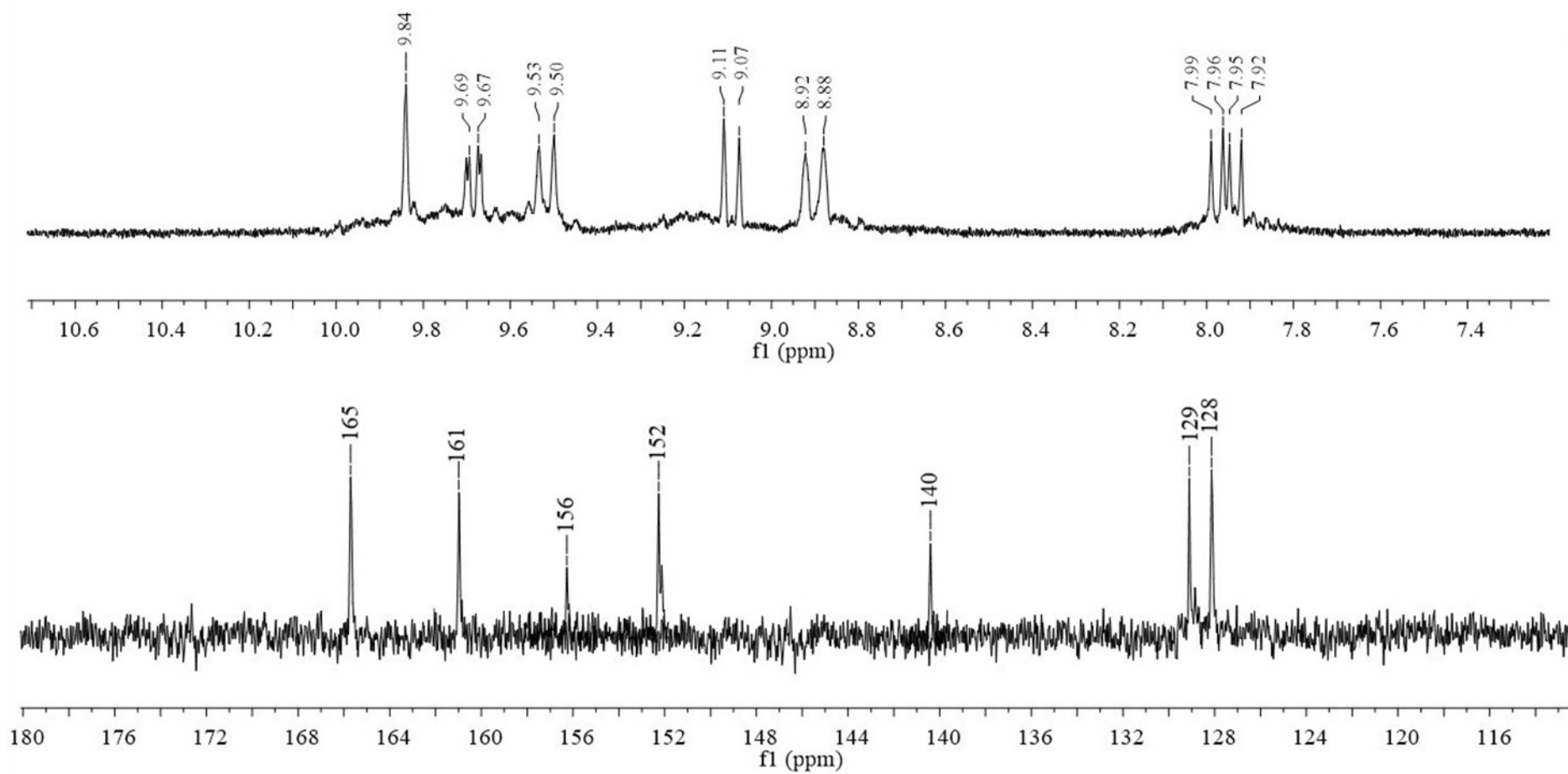
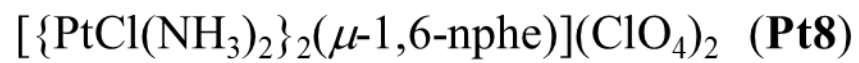


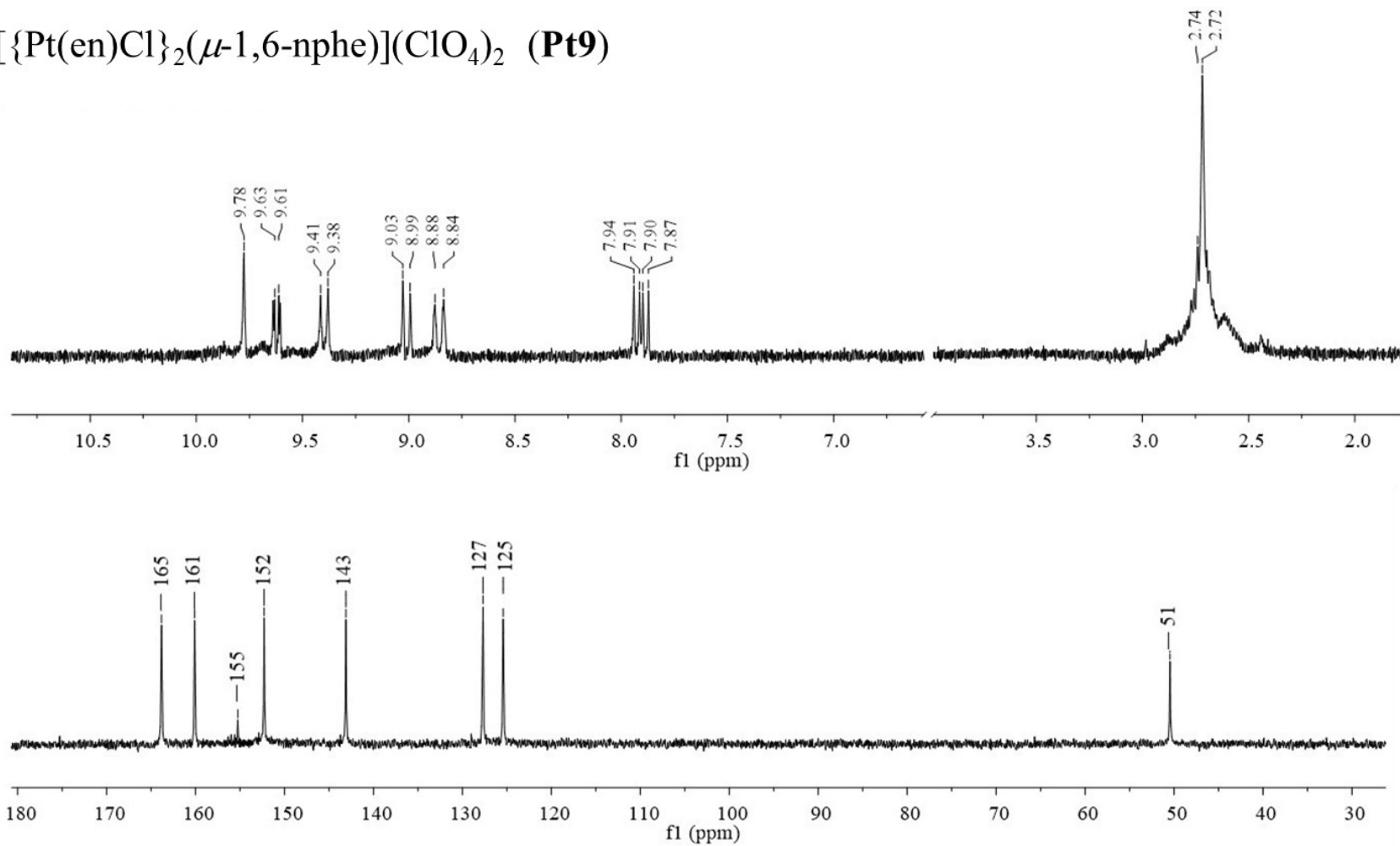
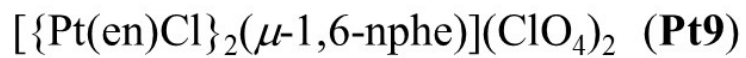


$[\{\text{Pt}(2,2\text{-diMe-}1,3\text{-pd})\text{Cl}\}]_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt6**)



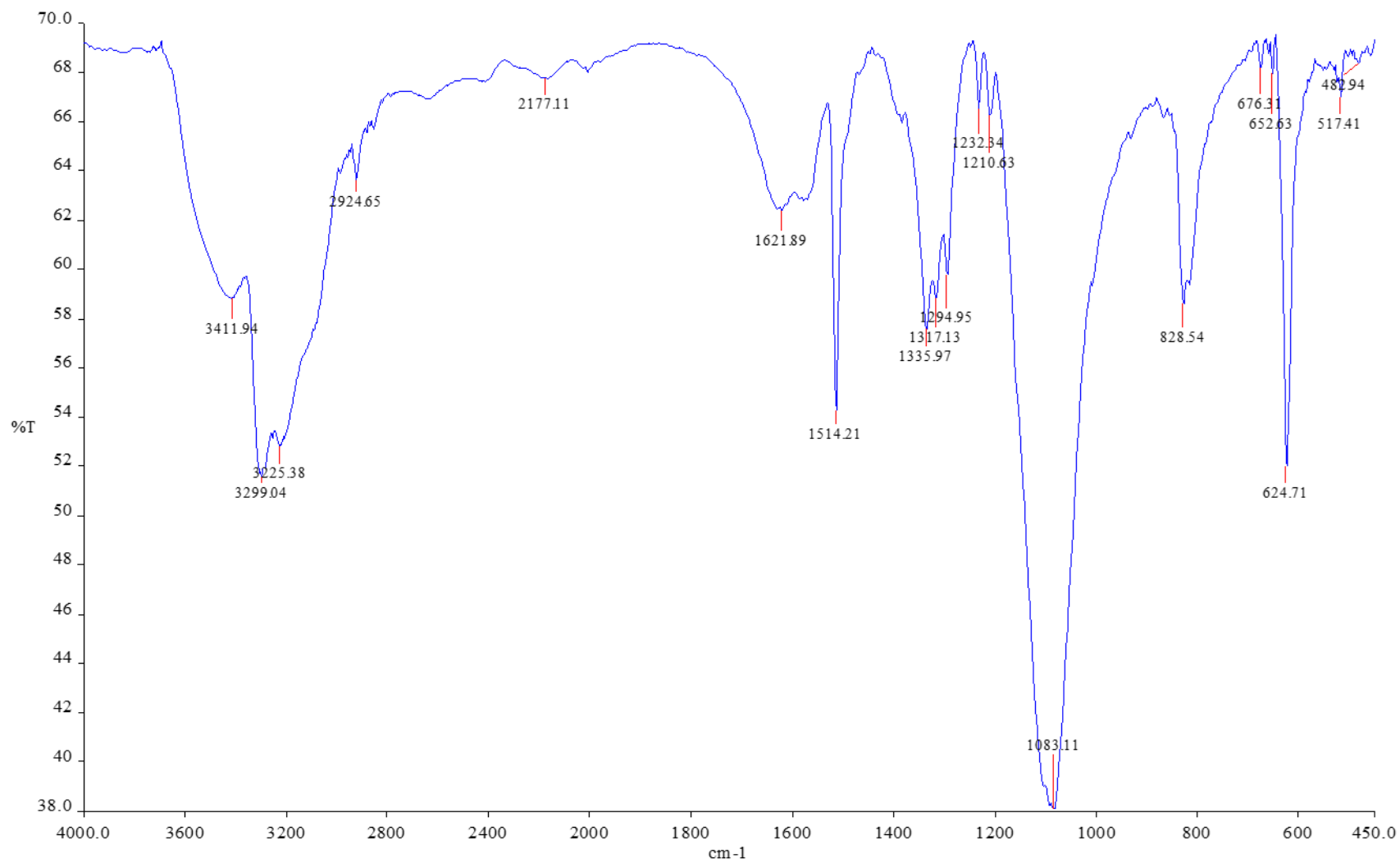




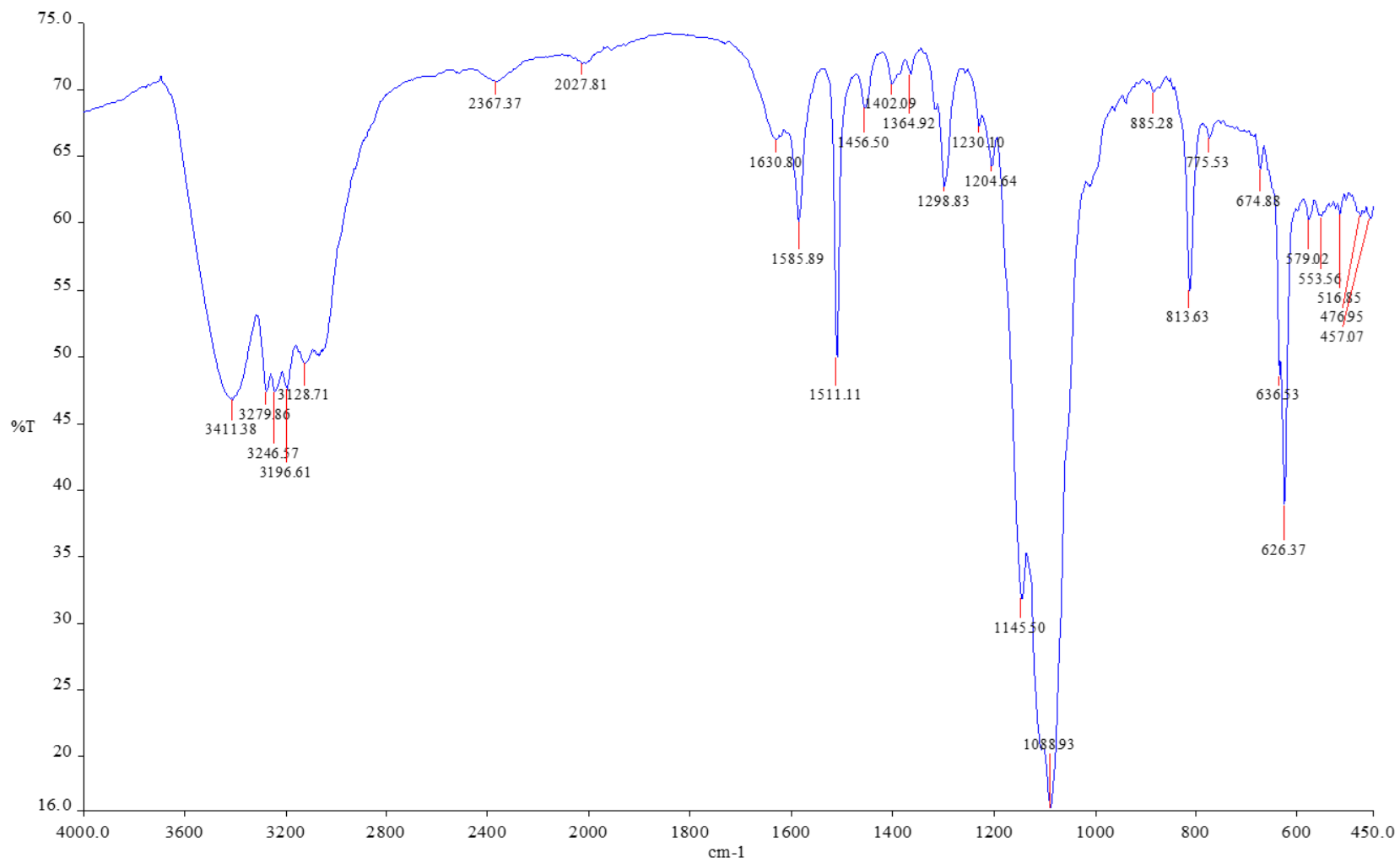


Slika P1. ^1H i ^{13}C NMR spektri **Pt1–Pt9** kompleksa (200 MHz (^1H), 50 MHz (^{13}C), D_2O).

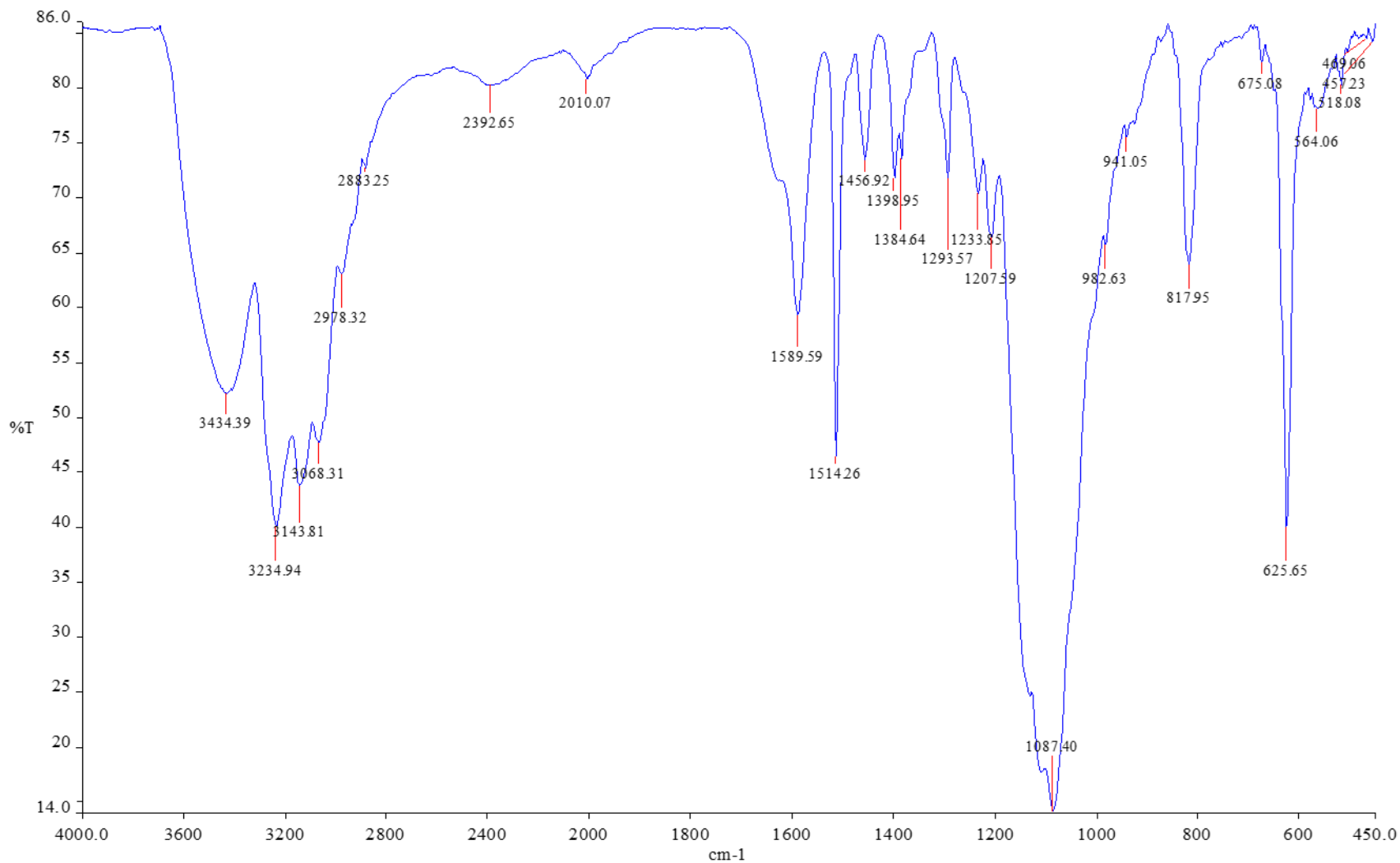
$[\{\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-1,5-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt1**)



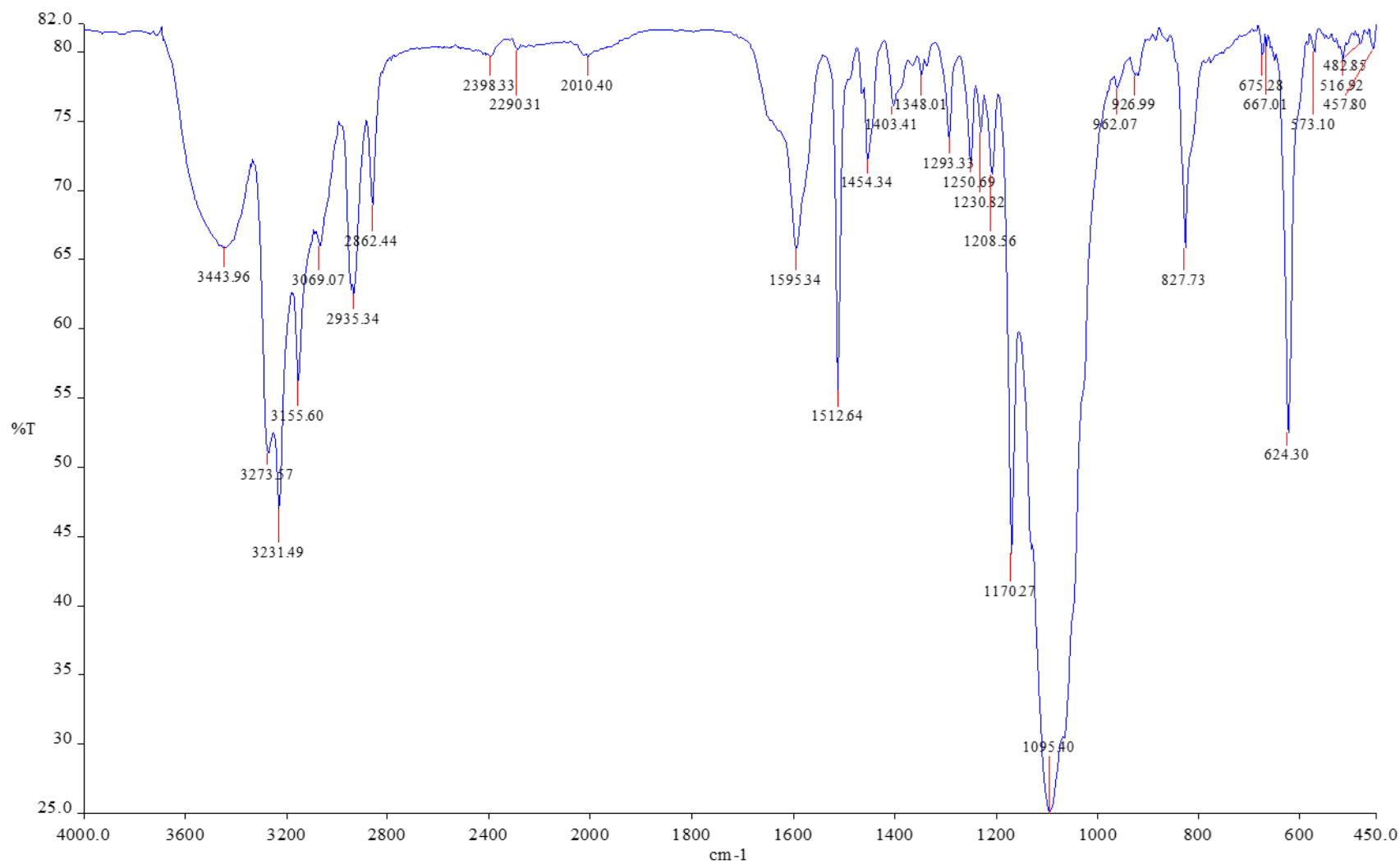
$[\{\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (Pt2)



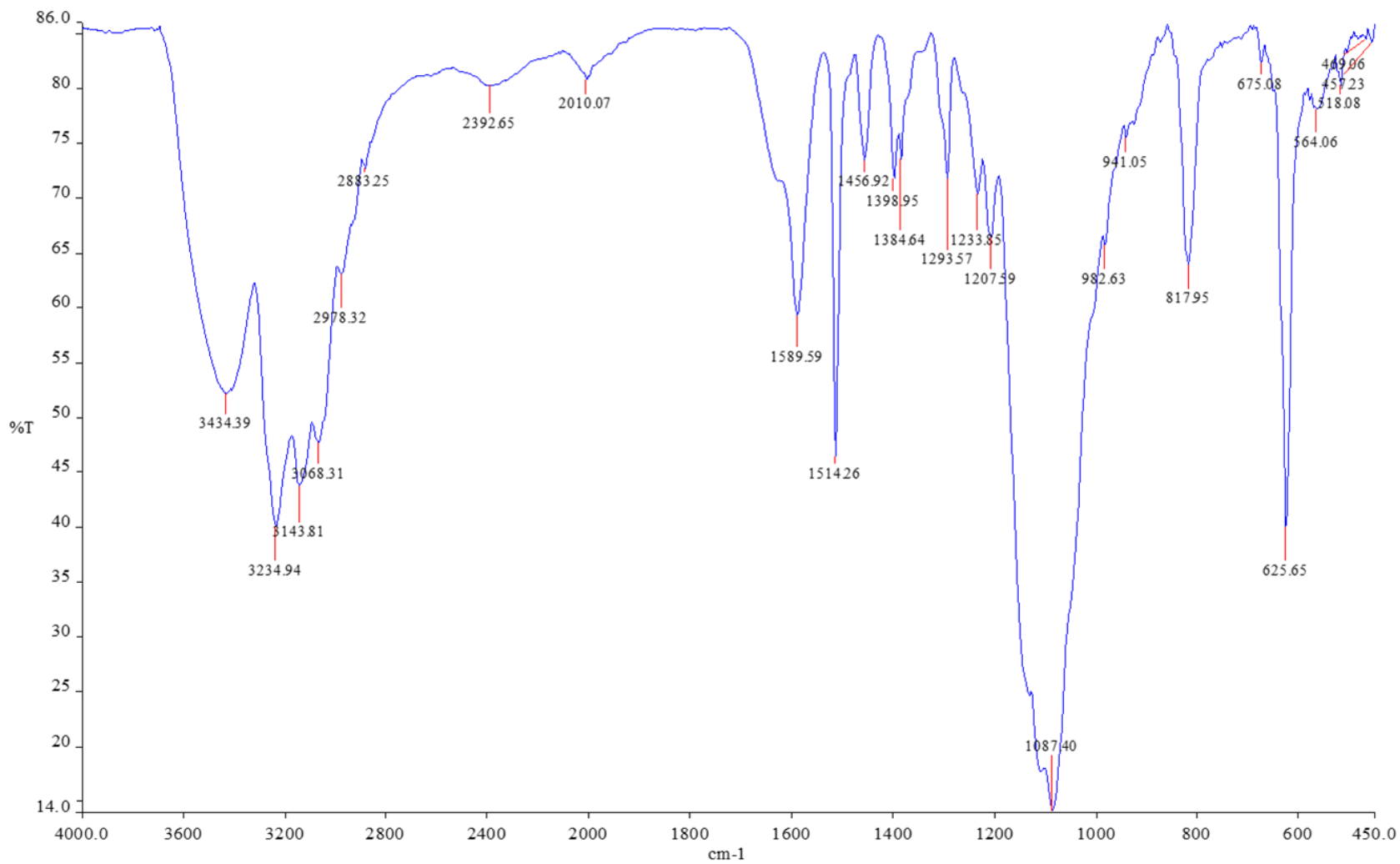
$[\{\text{Pt}(1,2\text{-pn})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt3**)



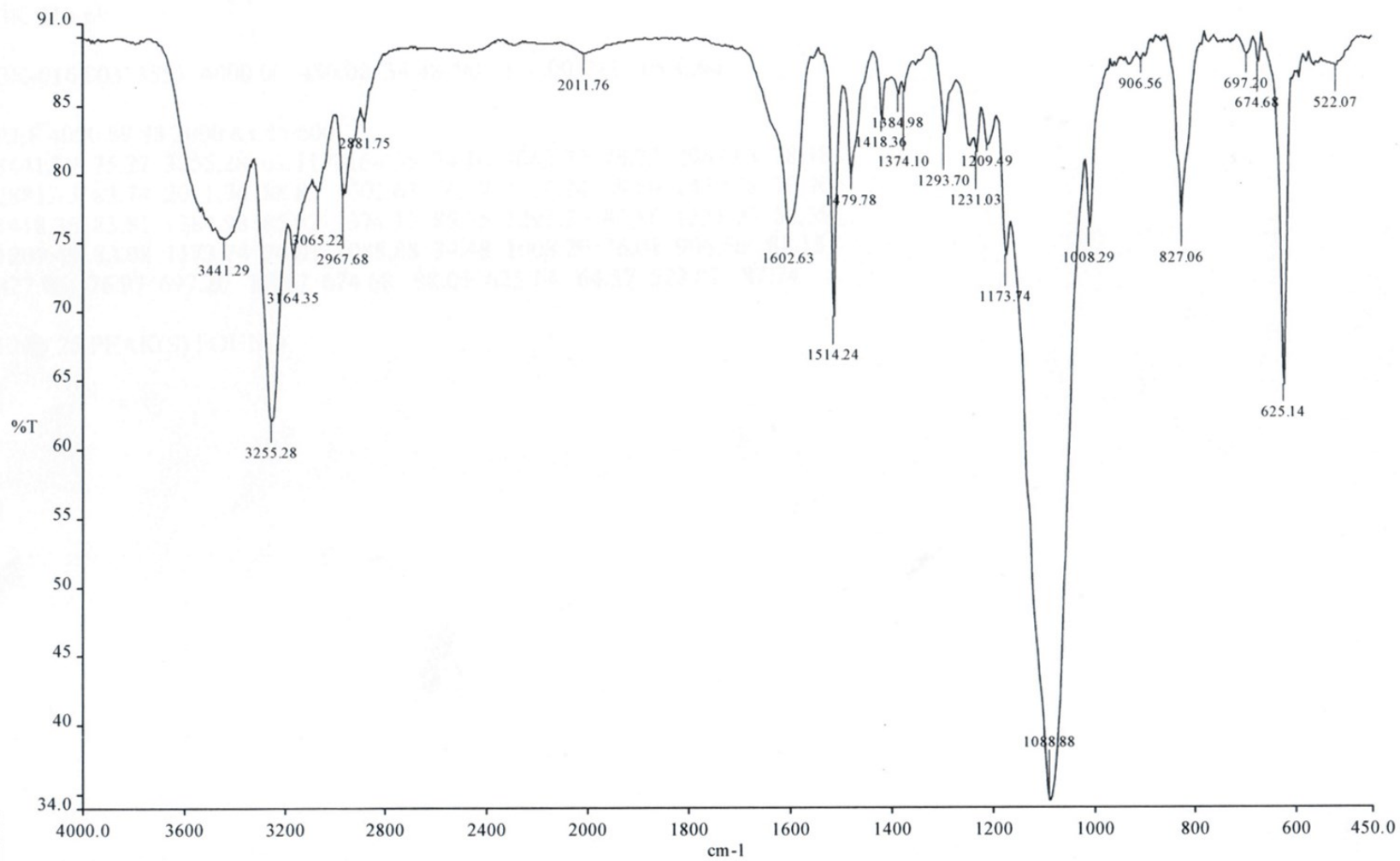
$[\{\text{Pt}(\text{dach})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt4**)



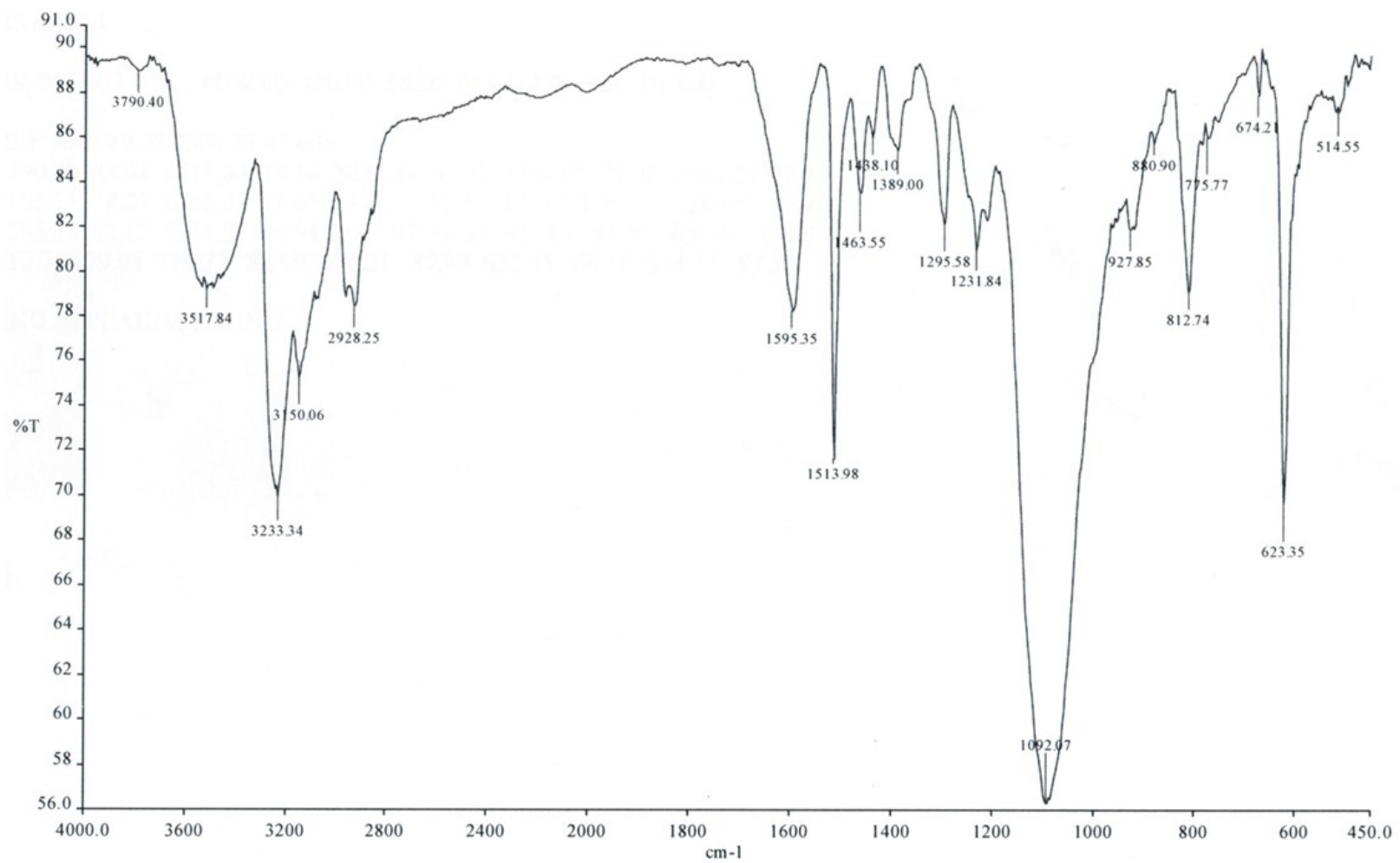
[{Pt(1,3-pd)Cl}₂(μ-1,5-nphe)](ClO₄)₂ (Pt5)



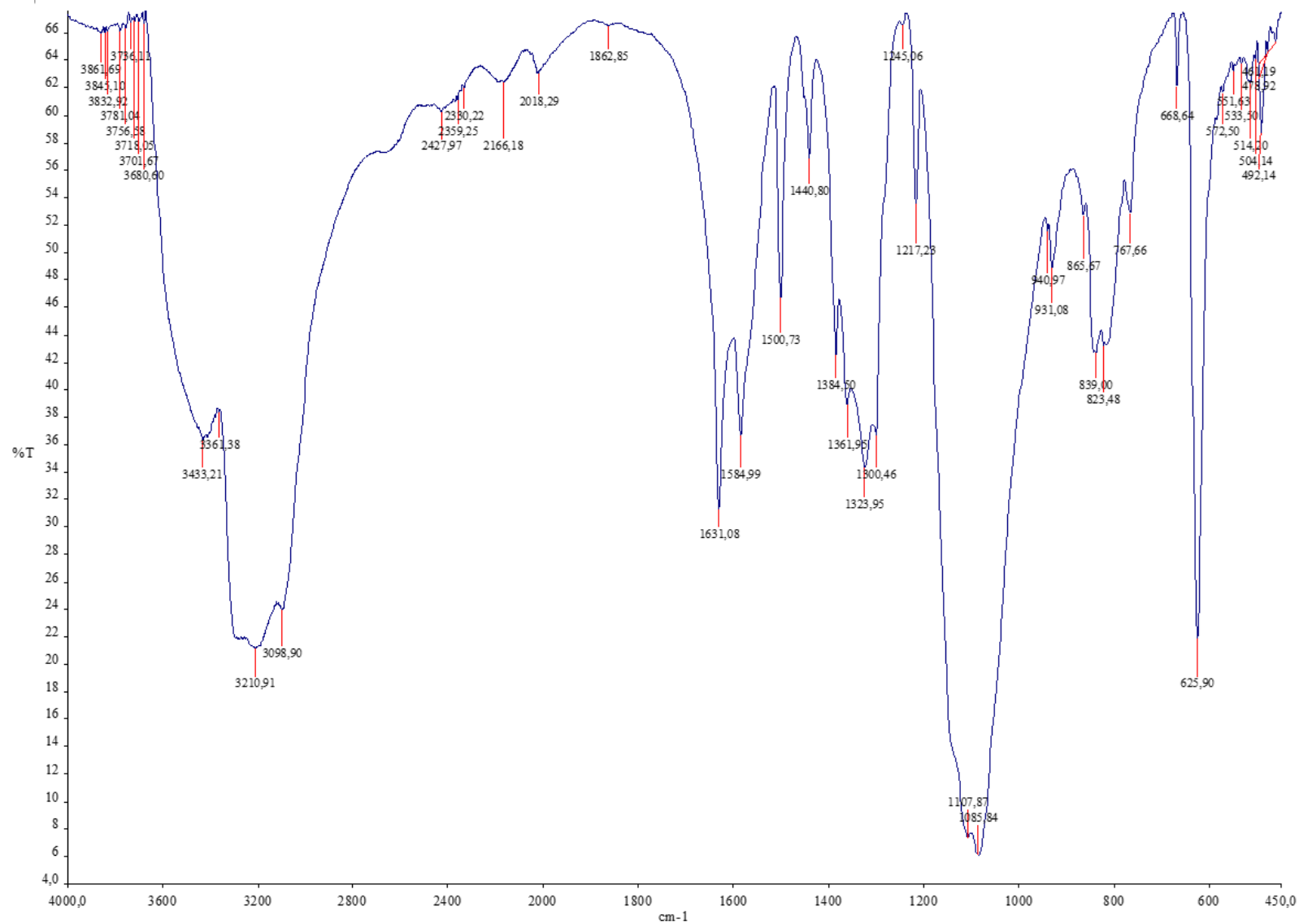
$[\{\text{Pt}(2,2\text{-diMe-}1,3\text{-pd})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt6**)

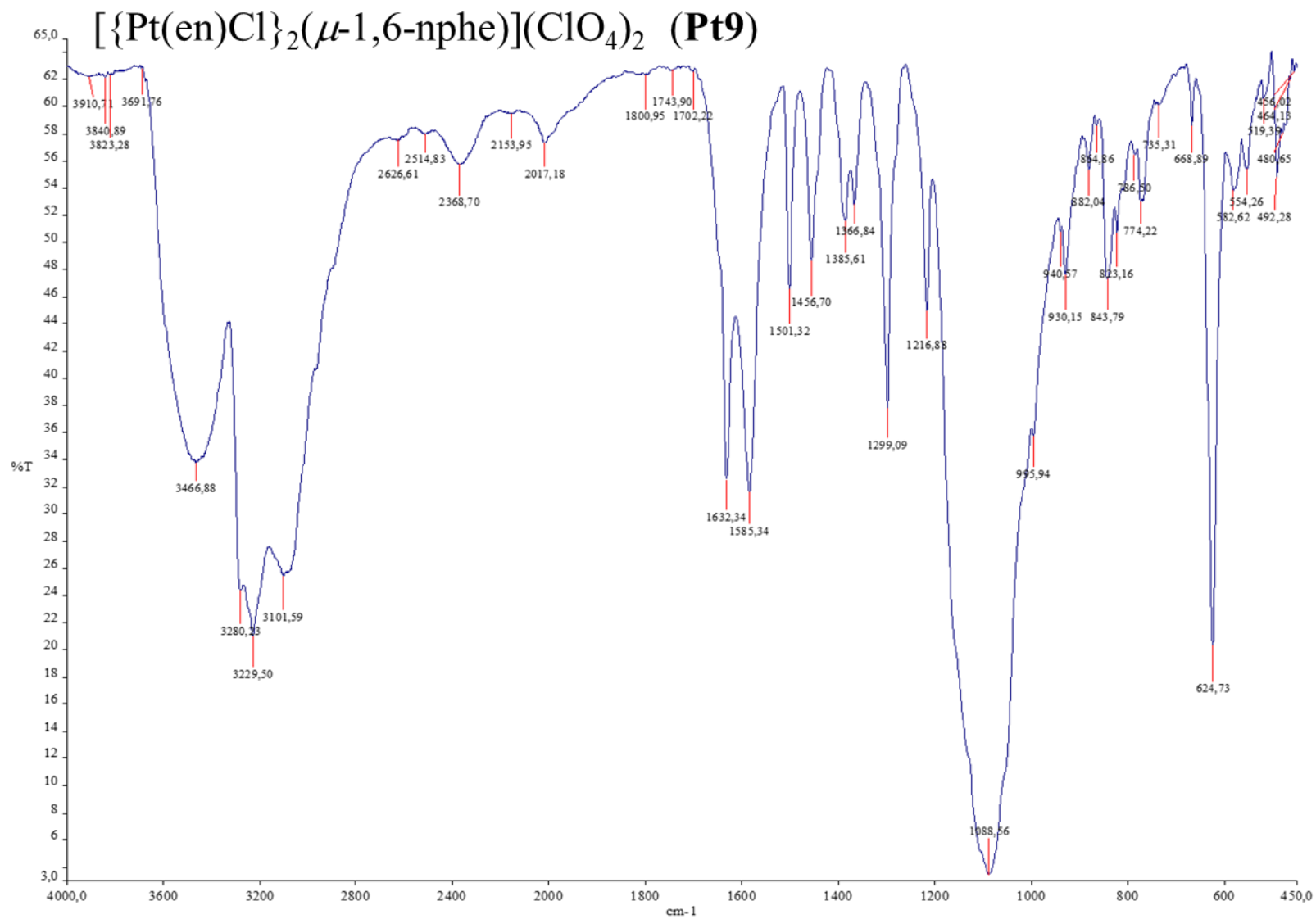


$[\{\text{Pt}(1,3\text{-pnd})\text{Cl}\}_2(\mu\text{-}1,5\text{-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (**Pt7**)

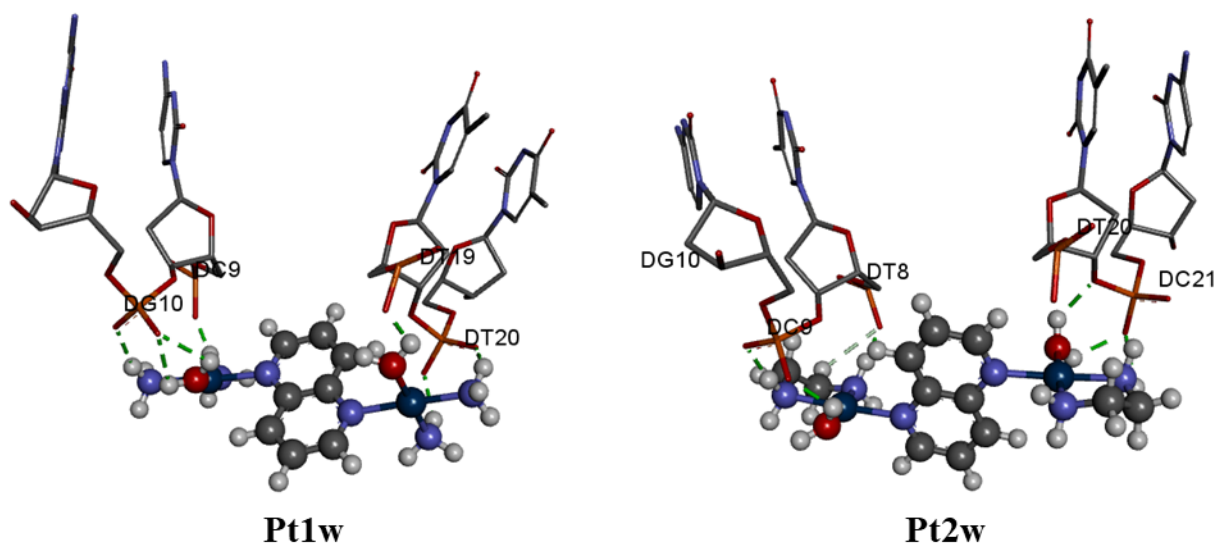


$[\{\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-1,6-nphe})](\text{ClO}_4)_2$ (Pt8)

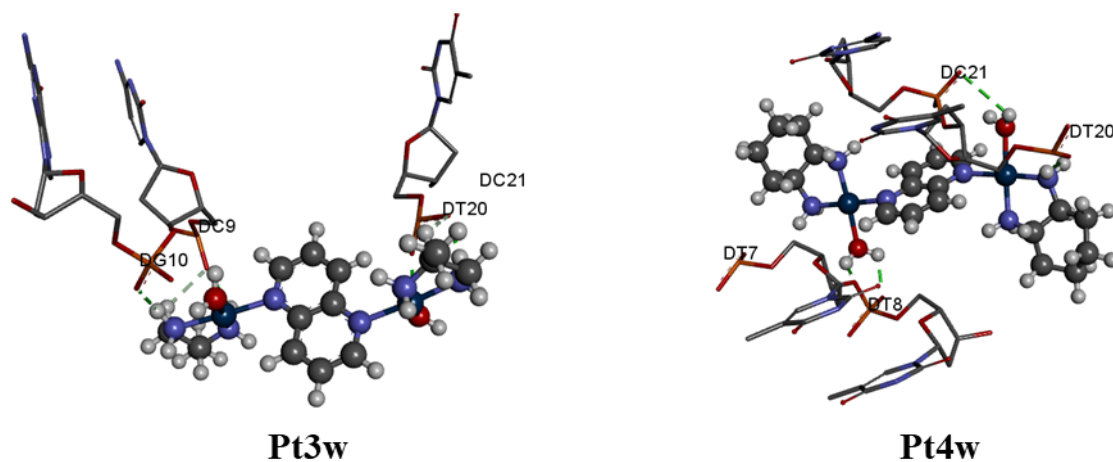




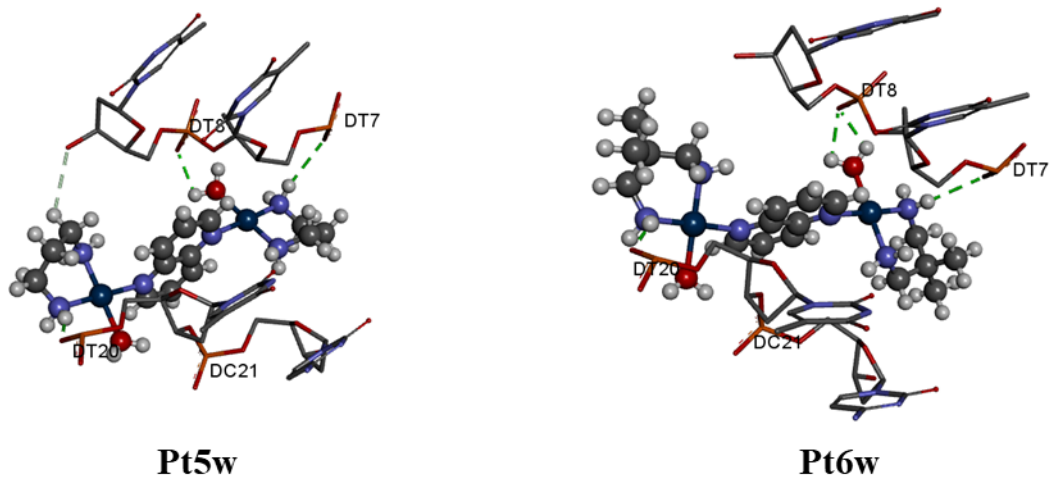
Slika P2. IR spektri Pt1–Pt9 kompleksa (KBr pilula, 298 K)



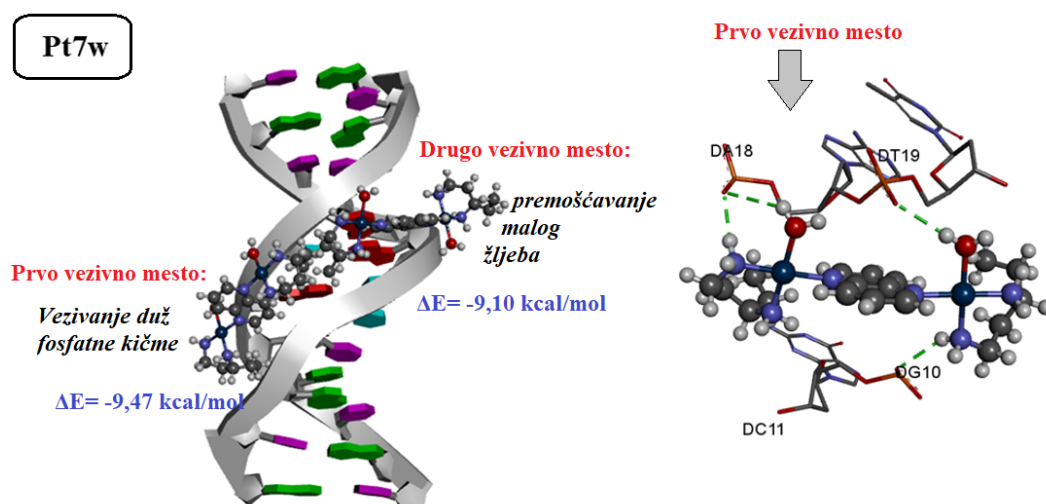
Slika P3. Prikaz amino-kiselinskog okruženja u najstabilnijem mestu vezivanja kompleksa **Pt1w** i **Pt2w** za DNK, koja su dobijena molekulskim dokingom.



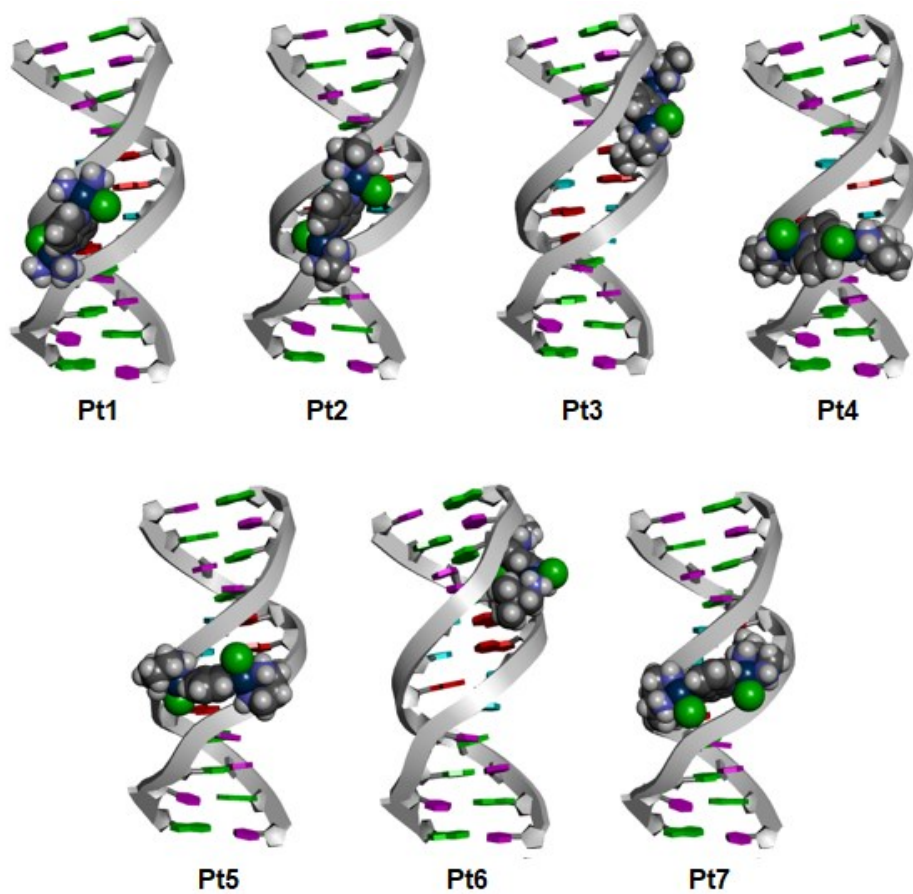
Slika P4. Prikaz amino-kiselinskog okruženja u najstabilnijem mestu vezivanja kompleksa **Pt3w** i **Pt4w** za DNK, koja su dobijena molekulskim dokingom.



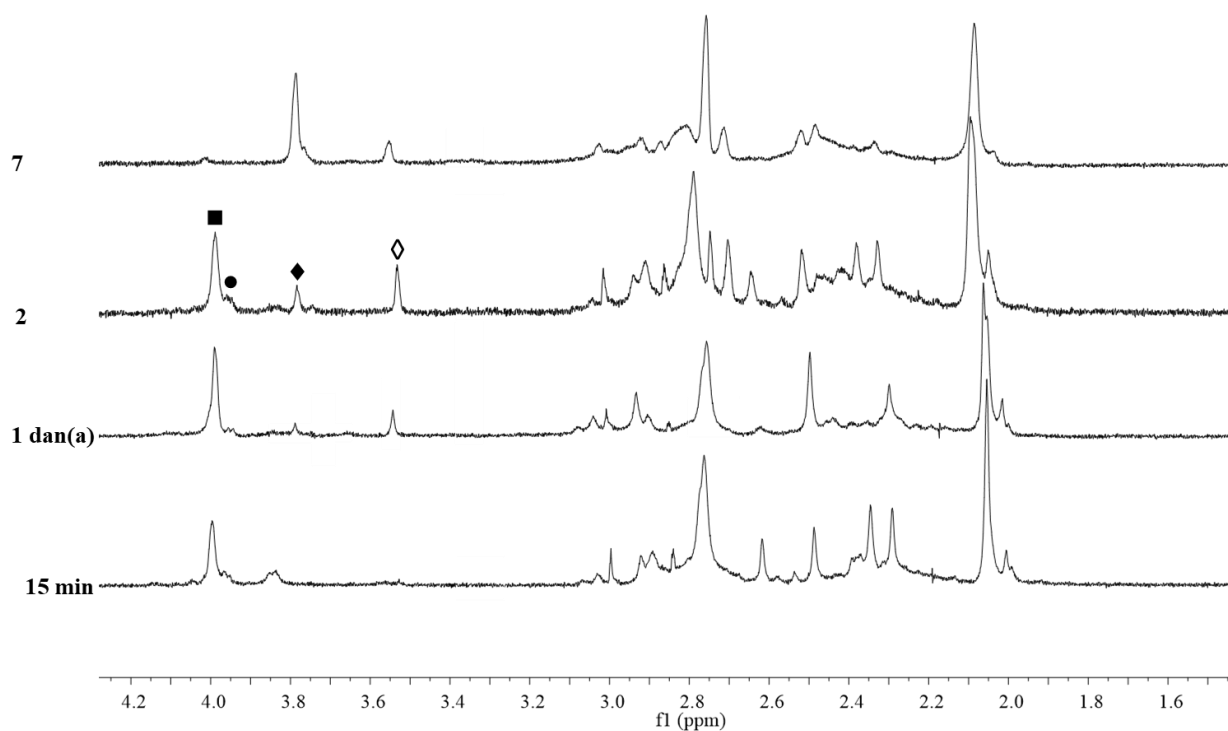
Slika P5. Prikaz amino-kiselinskog okruženja u najstabilnijem mestu vezivanja kompleksa **Pt5w** i **Pt6w** za DNK, koja su dobijena molekulskim dokingom.



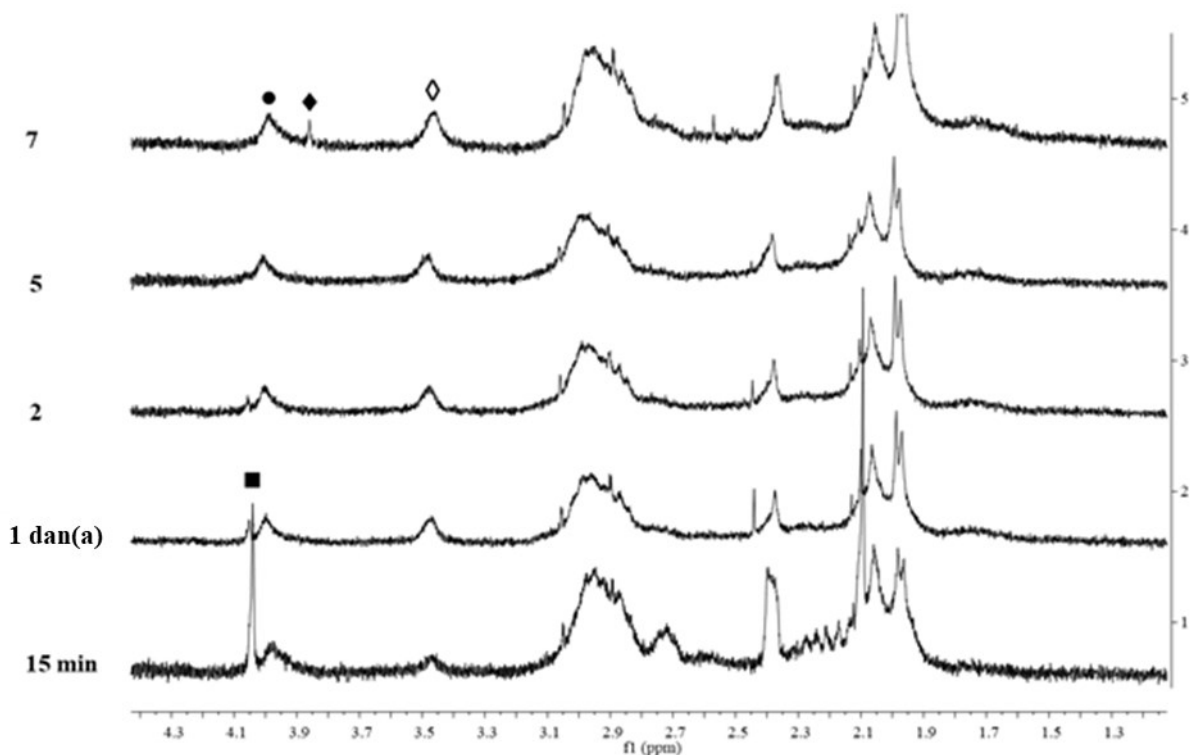
Slika P6. Dva najstabilnija načina vezivanja (levo) i amino-kiselinsko okruženje u najstabilnijem mestu vezivanja **Pt7w** kompleksa za DNK (desno), koja su dobijena molekulskim dokingom.



Slika P7. Strukture najstabilnijih adukata **Pt1-Pt7** kompleksa sa DNA, koja su dobijena molekulskim dokingom.



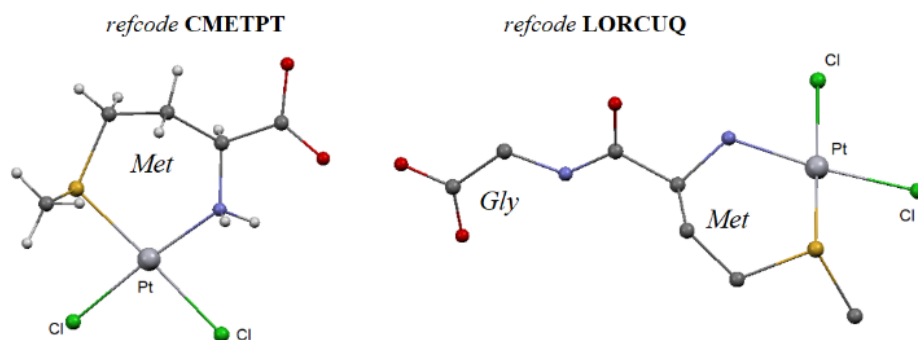
Slika P8. ^1H NMR spektri reakcije **Pt2w** kompleksa sa Ac-L-Met-Gly dipeptidom (D_2O , $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 2.0\text{--}2.5$). (■) metilenski protoni glicina u nekoordinovanom Ac-L-Met-Gly, (●) metilenski protoni glicina u Ac-L-Met-Gly koordinovanom za Pt(II), (◆) metilenski protoni slobodnog glicina i (◇) metilenski protoni bidentatno koordinovanog glicina za Pt(II)



Slika P9. ^1H NMR spektri reakcije **Pt5w** kompleksa sa Ac-L-Met-Gly dipeptidom (D_2O , $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 2.0\text{--}2.5$). (■) metilenski protoni glicina u nekoordinovanom Ac-L-Met-Gly, (●) metilenski protoni glicina u Ac-L-Met-Gly koordinovanom za Pt(II), (◆) metilenski protoni slobodnog glicina i (◈) metilenski protoni bidentatno koordinovanog glicina za Pt(II)

Tabela P1. Eksperimentalna i izračunata ^1H NMR hemijska pomeranja za 1,5-nphe u **Pt2w** i **P2** kompleksima.

kompleks	NMR		
	H2 / H6	H4 / H8	H3 / H7
Eksperimentalno Pt2w	10,22	9,58	8,16
Izračunato Pt2w	8,9	9,6	7,5
Izračunato P2	7,3	8,6	8,8



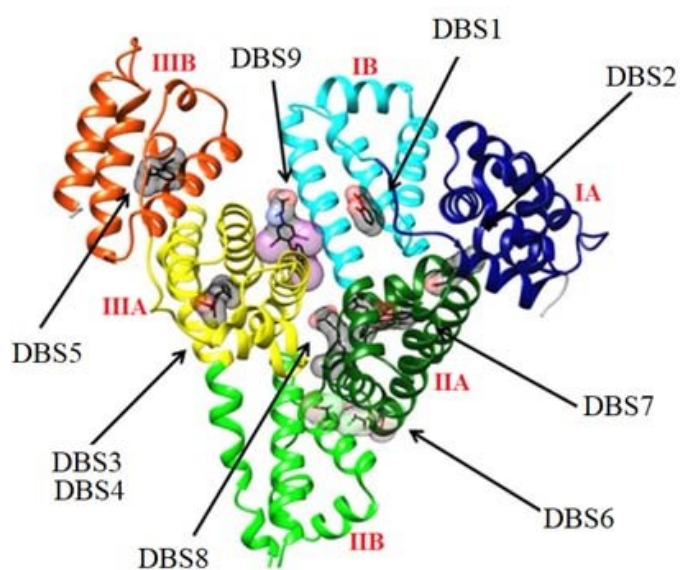
Slika P10. Kristalne strukture kompleksa platine(II) sa aminokiselinom metioninom i dipeptidom glicil-metioninom, ekstrahovane iz CSD [26].

Tabela P2. Izračunata ^1H NMR hemijska pomeranja za Gly-CH₂ protone ispitivanih **Pt4** i **P7** kompleksa.

	Ispitivani kompleksi	
	P4	P7
Strukture		
Gly-CH ₂	3.38	4.39

Tabela P3. Izračunata ^1H NMR hemijska pomeranja za protone metionina u Ac-L-Met-Gly dipetidu i odgovarajućim **P6** i **P8** kompleksima (eksperimentalne vrednosti su u prikazane u zagradi).

Met-protoni	Ispitivani kompleksi		
	Ac-L-Met-Gly	P6	P8
Met- α -CH	4.07 (3.95)	4.62	4.45
Met- β -CH ₂	1.99 (2.04)	2.62	2.61



Slika P11. Struktura humanog serum albumina (HSA) sa obeleženim mestima za koja se vezuju lekovi (DBS).

Cite this: *Dalton Trans.*, 2018, **47**, 15091

Synthesis, cytotoxic activity and DNA interaction studies of new dinuclear platinum(II) complexes with an aromatic 1,5-naphthyridine bridging ligand: DNA binding mode of polynuclear platinum(II) complexes in relation to the complex structure†

Bata Konovalov,^a Marija D. Živković,^b Jelena Z. Milovanović,^c Dragana B. Djordjević,^c Aleksandar N. Arsenijević,^c Ivana R. Vasić,^b Goran V. Janjić,^d Andjela Franich,^a Dragan Manojlović,^{e,f} Sandra Skrivanj,^e Marija Z. Milovanović,^c Miloš I. Djuran^g and Snežana Rajković^h *^a

The synthesis, spectroscopic characterization, cytotoxic activity and DNA binding evaluation of seven new dinuclear platinum(II) complexes **Pt1–Pt7**, with the general formula $[\{Pt(L)Cl\}_2(\mu-1,5-nphe)](ClO_4)_2$ (1,5-nphe is 1,5-naphthyridine; while L is two amines (**Pt1**) or one bidentate coordinated diamine: ethylenediamine (**Pt2**), (\pm)-1,2-propylenediamine (**Pt3**), *trans*-(\pm)-1,2-diaminocyclohexane (**Pt4**), 1,3-propylenediamine (**Pt5**), 2,2-dimethyl-1,3-propylenediamine (**Pt6**), and 1,3-pentanediamine (**Pt7**)), were reported. *In vitro* cytotoxic activity of these complexes was evaluated against three tumor cell lines, murine colon carcinoma (CT26), murine mammary carcinoma (4T1) and murine lung cancer (LLC1) and two normal cell lines, murine mesenchymal stem cells (MSC) and human fibroblast (MRC-5) cells. The results of the MTT assay indicate that all investigated complexes have almost no cytotoxic effects on 4T1 and very low cytotoxicity toward LLC1 cell lines. In contrast to the effects on LLC1 and 4T1 cells, complexes **Pt1** and **Pt2** had significant cytotoxic activity toward CT26 cells. Complex **Pt1** had a much lower IC_{50} value for activity on CT26 cells compared with cisplatin. In comparison with cisplatin, all dinuclear **Pt1–Pt7** complexes showed lower cytotoxicity toward normal MSC and MRC-5 cells. In order to measure the amount of platinum(II) complexes taken up by the cells, we quantified the cellular platinum content using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-QMS). Molecular docking studies performed to evaluate the potential binding mode of dinuclear platinum(II) complexes **Pt1–Pt7** and their aqua derivatives **W1–W7**, respectively, at the double stranded DNA showed that groove spanning and backbone tracking are the most stable binding modes.

Received 14th May 2018,
Accepted 18th September 2018
DOI: 10.1039/c8dt01946k

rsc.li/dalton

^aUniversity of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: snezana@kg.ac.rs

^bUniversity of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^cUniversity of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Microbiology and Immunology, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^dUniversity of Belgrade, Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, Njegoševa 12, 11000 Belgrade, Serbia

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

^fSouth Ural State University, Lenin prospekt 76, 454080 Chelyabinsk, Russia


^gSerbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, 11000 Belgrade, Serbia

†Electronic supplementary information (ESI) available: Tables S1–S3, Fig. S1–S14 and Schemes S1 and S2. See DOI: 10.1039/c8dt01946k

Introduction

Platinum-based drugs as classical chemotherapeutic agents have been widely applied in treating solid tumors, especially cisplatin, which is considered as the fundamental component of standard chemotherapy.^{1–3} The anticancer activity of cisplatin is based on its ability to form intrastrand covalent adducts with DNA by binding of Pt to the N7 atoms of two adjacent guanine bases.^{4,5} The negative side effects during treatment (such as nephrotoxicity, ototoxicity, cardiotoxicity, neurotoxicity, vomiting, resistance, *etc.*) encouraged researchers to design new classes of platinum complexes with improved anti-tumor properties.^{6,7} Polynuclear platinum complexes represent a novel class of promising antitumor agents with potential clinical significance.⁸ These complexes have more than one

Synthesis, DNA-/bovine serum albumin-binding affinity, and cytotoxicity of dinuclear platinum(II) complexes with 1,6-naphthyridine-bridging ligand

Bata Konovalov¹ | Andjela A. Franich¹ | Marina Jovanović² |
Milena Jurisević³ | Nevena Gajović² | Marina Jovanović⁴ |
Nebojša Arsenijević² | Veljko Maric⁵ | Ivan Jovanović² | Marija D. Živković³ |
Snežana Rajković¹ 

¹Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

²Faculty of Medical Sciences, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁴Faculty of Medical Sciences, Department of Internal Medicine, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁵Faculty of Medicine Foca, Department of Surgery, University of East Sarajevo, Foca, Bosnia and Herzegovina

Correspondence

Snežana Rajković, Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia.

Email: snezana@kg.ac.rs

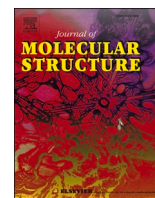
Funding information

Serbian Ministry of Education, Science and Technological Development, Grant/Award Numbers: 175069, 175071, 451-03-68/2020-14/200122; Serbian Academy of Sciences and Arts, Grant/Award Numbers: 01-2019-F65, F128; Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Grant/Award Numbers: MP02/19, JP15/19, JP11/18, JP02/20; Bilateral Project with PR China, Grant/Award Number: 06/2018

The dinuclear platinum(II) complexes, $[\{PtCl(NH_3)_2\}_2(\mu-1,6-nphe)](ClO_4)_2$ (**Pt1**) and $[\{Pt(en)Cl\}_2(\mu-1,6-nphe)](ClO_4)_2$ (**Pt2**) (en is a bidentate-coordinated ethylenediamine and 1,6-nphe is the bridging 1,6-naphthyridine ligand) were synthesized and characterized by different spectroscopic methods. The DNA-binding evaluation of complexes **Pt1** and **Pt2** was done by UV-Vis, fluorescence emission spectroscopy, and their interaction with bovine serum albumin (BSA). The cytotoxic activity of these complexes was determined against mouse breast (4T1) and colon (CT26) cancer cell lines, human breast (MDA-MB-468), colon (HCT-116), and lung (A549) cancer cell lines as well as mouse mesenchymal stem cells (mMSC). Complex **Pt1** showed higher cytotoxic capacity toward solid cancer cell lines compared with **Pt2** and lower cytotoxic capacity toward mMSC cells compared with cisplatin. Furthermore, molecular mechanism studies showed that **Pt1** complex induced 4T1 and A549 cell apoptosis therefore increasing expression of pro-apoptotic caspase-3 and decreasing expression of anti-apoptotic Bcl-2 and Ki-67. Antitumor capacity of **Pt1** complex might be manifested at least in two ways: by facilitating apoptosis and by inhibiting tumor cells proliferation.

KEYWORDS

1,6-naphthyridine, apoptosis, cytotoxicity, dinuclear platinum(II) complexes, DNA/BSA binding



Dinuclear platinum(II) complexes with 1,5-nphe bridging ligand: Spectroscopic and molecular docking study of the interactions with N-acetylated L-methionylglycine and human serum albumin

Bata Konovalov^a, Ivana S. Đorđević^b, Andjela A. Franich^a, Biljana Šmit^c, Marija D. Živković^d, Miloš I. Djuran^e, Goran V. Janjić^{b,*}, Snežana Rajković^{a,*}

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

^b University of Belgrade, Institute of Chemistry Technology and Metallurgy, National Institute of the Republic of Serbia, Njegoševa 12, Belgrade 11000, Serbia

^c University of Kragujevac, Institute for Information Technologies, Department of Science, Jovana Cvijića bb, Kragujevac 34000, Serbia

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

^e Serbian Academy of Sciences and Arts, Knez Mihailova 35, Belgrade 11000, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

Dinuclear platinum(II) complexes
1,5-Naphthiridine bridging ligand
Ac-L-Met-Gly
HSA
Docking study

ABSTRACT

The hydrolysis of N-acetylated L-methionylglycine dipeptide (Ac-L-Met-Gly) in the presence of dinuclear platinum(II)-aqua complexes with general formula $[\{Pt(L)(H_2O)\}_2(\mu-1,5-nphe)]^{4+}$ (1,5-nphe is 1,5-naphthyridine; L is bidentately coordinated ethylenediamine (**1w**), (\pm)-1,2-propylenediamine (**2w**) and 1,3-propylenediamine (**3w**)) is described in detail. The hydrolytic activity of these complexes was monitored by ¹H NMR spectroscopy, which confirmed the regioselective cleavage of the Met-Gly-amide bond in this peptide. Quantum-chemical calculations revealed the primary reaction path with coordination of dipeptide via the terminal amide nitrogen of methionine followed by its coordination for the sulphur atom, in which the decomposition of the resulted platinum(II)-dipeptide complex and the coordination of its glycine residue precedes the hydrolytic cleavage of the Met-Gly amide bond. In the secondary reaction path, in which Ac-L-Met-Gly is coordinated via the methionine sulphur atom, the decomposition of the starting $[\{Pt(L)(H_2O)\}_2(\mu-1,5-nphe)]^{4+}$ complex is followed by the regioselective hydrolysis of the investigated dipeptide. The binding affinity of the chloride derivatives of the corresponding dinuclear platinum(II)-aqua complexes, $[\{Pt(L)Cl\}_2(\mu-1,5-nphe)]^{2+}$ (**1-3**) towards the human serum albumin (HSA), a transport protein, was investigated using electronic absorption and fluorescence emission measurements, and results indicated the static interactions between these complexes and HSA. A docking study revealed a unique binding site on HSA, based on the electrostatic and the hydrogen bonding, which does not have a methionine residue nearby, therefore does not exist danger of HSA hydrolysis by these complexes.

1. Introduction

Hydrolysis of peptide bonds in peptides and proteins occurs in many biological processes, but the exact mechanism of this reaction is poorly understood. In addition, the hydrolysis reaction is used in the structure determination of peptides and proteins. The proteolytic enzymes used for the hydrolysis reaction often only function in a narrow temperature and pH range. In addition, the high cost and limited or fixed selectivity of proteolytic enzymes make them difficult to use. This led to the search for alternative cleaving agents that are stable at physiological pH and room temperature. Mononuclear platinum(II) and palladium(II)

complexes can be used as alternative cleaving agents, so that hydrolytic reactions between these complexes and peptides containing methionine or histidine have been extensively studied [1]. Platinum(II) and palladium(II) complexes are known to bind to the sulphur or nitrogen atom in the side chain of methionine [1–4] or histidine [1,5–7], respectively, and promote cleavage of the amide bond involving the carboxylic group of the anchoring amino acid. Our study in this field has also shown that dinuclear platinum(II) and palladium(II) complexes with aromatic nitrogen-containing heterocyclic compounds as bridging ligands very efficiently promote the hydrolysis of the amide bond in methionine- and histidine-containing peptides [8–14]. This study showed that dinuclear

* Corresponding authors.

E-mail addresses: goran.janjjic@ihtm.bg.ac.rs (G.V. Janjić), snezana.rajkovic@pmf.kg.ac.rs (S. Rajković).

<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135810>

Received 10 April 2023; Received in revised form 8 May 2023; Accepted 19 May 2023

Available online 20 May 2023

0022-2860/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

BIOGRAFIJA

Bata Konovalov je rođen 11. marta 1970. godine u Jagodini. Osnovnu školu „25. maj“ i Gimnaziju završio je u Jagodini sa odličnim uspehom. Na Prirodno-matematički fakultet, grupa hemija, smer istraživanje i razvoj, upisao se školske 1989/90. godine, a nakon toga odlazi na odsluženje vojnog roka. Diplomirao je 15. aprila 1996. godine. Bavi se istraživačkim radom iz oblasti neorganske hemije. Predmet njegovog istraživanja je sinteza i strukturna karakterizacija dinuklearnih kompleksa platine(II) sa naftiridinima kao mostnim ligandima, kao i ispitivanje antitumorske aktivnosti i interakcija sintetizovanih kompleksa sa bioligandima. Do sada je objavio tri naučna rada i jedno saopštenja na nacionalnoj naučnoj konferenciji štampano u izvodu.

U periodu od 03. 03. 2007. do 30. 08. 2007. godine radio je kao tehnolog u proizvodnji boja i lakova u preduzeću „Kolorhem“ doo, Jagodina. Školske 2007/08 radio je kao nastavnik hemije u O.Š. „Ljubiša Urošević“, Jagodina, a od 2009. godine zaposlen je u Ministarstvu unutrašnjih poslova u Sektoru za vanredne situacije, Odeljenje za vanredne situacije u Jagodni na radnom mestu inspektor preventivne zaštite.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Синтеза и антићуморска активност динуклеарних платина(II) комплекса са нафтиридинима као мостним лигандим

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

Овом Изјавом такође потврђујем:

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

У Крагујевцу, 04. 10. 2023. године,


потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

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

**Синтеза и антитуморска активност динуклеарних платина(II) комплекса са
нафтиридинима као мостним лигандим**

истоветне.

У Крагујевцу, 04. 10. 2023. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Бата Коновалов,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Синтеза и антитуморска активност динуклеарних платина(II) комплекса са нафтиридинима као мостним лигандим

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, 04. 10. 2023. 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/>