

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Tamara A. Petrović

**Sinteza, karakterizacija i citotoksična
aktivnost kompleksa renijuma(V) sa N,O-
ligandima**

doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Tamara A. Petrović

**Synthesis, characterization, and cytotoxic
activity of rhenium(V) complexes with N,O-
ligands**

doctoral dissertation

Belgrade, 2025.

Mentor:

dr Jelena Poljarević

docent Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta

Članovi komisije:

dr Sanja Grgurić-Šipka

redovni profesor Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta

dr Milica Milenković

vandredni profesor Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta

dr Sandra Arandelović

naučni savetnik Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane: _____ 2025. godine.

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je pri Katedri za opštu i neorgansku hemiju, Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta.

Želim da se iskreno zahvalim mentorki dr Jeleni Poljarević koja je predložila temu ovog rada, kao i na pomoći, podršci i korisnim savetima tokom izrade i pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se i članovima komisije, dr Sanji Grgurić- Šipka na saradnji, rukovođenju i pomoći prilikom izrade ove disertacije kao i dr Sandri Aranđelović sa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije na saradnji i korisnim sugestijama vezanim za biološki deo koji je urađen u okviru ove doktorske disertacije. Zahvaljujem se i dr Milici Milenković na podršci, saradnji i konstruktivnim savetima koji su doprineli mom profesionalnom razvoju.

Zahvaljujem se kolegama iz laboratorije 525, naročito dr Ljiljani Mihajlović koja je predložila da kompleksi renijuma budu predmet mog naučno-istraživačkog rada, kao i na podršci i saradnji svih ovih godina. Veliko hvala i mojim kolegama dr Stefanu Nikoliću i Ani Kandić na podršci i dobroj atmosferi koja vlada svih ovih godina u našoj laboratoriji. Zahvaljujem se i dr Nevenki Gligorijević na zajedničkoj saradnji i pomoći pri izradi naučnih radova koji čine ovu doktorsku disertaciju.

Veliko hvala dugujem dr Tiboru Sabou, koji mi je pružio priliku da budem deo njegovog tima, kao i na poverenju, saradnji i značajnim životnim savetima. Takođe želim da se zahvalim i mom prvom asistentu dr Aleksandru Saviću koji me je naučio prve korake u hemijskoj laboratoriji. Veliko hvala upućujem i dr Mileni Krstić za podršku i saradnju svih ovih godina.

Zahvalnost upućujem mojim najdražim cimerima i prijateljima Bojanu i Stefanu Đokiću, kao i mojoj najboljoj prijateljici Aleksandri Nešković na nesebičnoj podršci i iskrenom prijateljstvu tokom svih ovih godina.

Veliko hvala mojoj porodici: Ani i Radu Petrović kao i baba Radi (koja nije više sa nama) na podršci, ljubavi i brizi svih ovih godina. I za kraj moram pomenuti moju šašavu družinu kućnih ljubimaca Mileta, Mini i Brksa, koji su svojim nestašlucima i dogodovštinama činili da moj svaki dan bude ispunjen osmehom.

***Ovu doktorsku disertaciju posvećujem mojoj majci Ani i mom zauvek
najboljem prijatelju Mateji Vujoviću.***

SAŽETAK

Sinteza, karakterizacija i citotoksična aktivnost kompleksa renijuma(V) sa N,O-ligandima

U ovom radu opisana je sinteza, karakterizacija i biološka aktivnost šest kompleksnih jedinjenja oksorenijuma(V) sa derivatima 2-piridinkarboksilne kiseline.

Strukture oktaedarskih, neutralnih, bidentatnih kompleksnih jedinjenja utvrđene su standardnim spektroskopskim metodama: infracrvenom spektroskopijom, NMR spektroskopijom, masenom spektrometrijom dok je pretpostavljena molekulska formula potvrđena elementalnom analizom, dok je za tri kompleksa urađena i rendgenska strukturna analiza. S obzirom na to da π - π interakcije između dva aromatična prstena mogu imati značajnu ulogu u interakciji kompleksnih jedinjenja sa DNK ispitivano je prisustvo nekovalentnih interakcija sintetisanih kompleksa. Kako dijagrami izračunatih nekovalentnih interakcija ukazuju na postojanje π - π interakcija između aromatičnih prstenova, možemo dovesti u vezu novosintetisane komplekse renijuma(V) sa njihovom biološkom aktivnosti.

Biološki testovi rađeni su u *in vitro* uslovima pri čemu je citotoksični potencijal novosintetisanih kompleksa utvrđen MTT metodom na panelu humanih tumorskih ćelijskih linija: A549 (ćelije adenokarcinoma pluća), PANC-1 (ćelije adenokarcinoma pankreasa), MDA-MB-231 i MCF-7 (ćelije karcinoma dojke), LS-174 (ćelije adenokarcinoma debelog creva), EA. hy 926 (transformisane endotelne ćelije krvnih sudova), OVCAR-3 (ćelije adenokarcinoma jajnika) i zdravoj (netumorskoj) ćelijskoj liniji MRC-5 (poreklom od fetalnih fibroblasta pluća), poređenjem sa *cisplatinom*, kao referentnim kompleksnim jedinjenjem. U cilju poboljšanja citotoksične aktivnosti proučen je sinergijski efekat šest kompleksa sa verapamil-hidrohloridom na PANC-1 ćelijskoj liniji. Kompleks renijuma(V) sa pikolinskom kiselinom (**K1**) i kompleks renijuma(V) sa 2,6-dipikolinskom kiselinom (**K6**) su ispoljili najjači citotoksični potencijal prema PANC-1 ćelijskoj liniji, pri čemu je **K1** izabran kao kandidat za dalja biološka ispitivanja.

Ključne reči: oksorenijum(V) kompleksi, *in vitro* citotoksična aktivnost, PANC-1 ćelijska linija, verapamil, DFT proračuni, rendgenska strukturna analiza

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Opšta i neorganska hemija

ABSTRACT

Synthesis, Characterization, and Cytotoxic Activity of Rhenium(V) Complexes with N,O-Ligands

This study describes the synthesis, characterization, and biological activity of six oxorhenium(V) complexes with derivatives of 2-pyridinecarboxylic acid.

The structures of octahedral, neutral, and bidentate complex compounds were determined using standard spectroscopic methods, including infrared spectroscopy, NMR spectroscopy, and mass spectrometry. The molecular formulas were confirmed through elemental analysis, and X-ray structural analysis was performed for three complexes. Since π - π interactions between aromatic rings can significantly influence the interaction of complex compounds with DNA, the non-covalent interactions in the synthesized complexes were analyzed. As the calculated non-covalent interaction diagrams confirm the presence of π - π interactions, a correlation can be drawn between the newly synthesized rhenium(V) complexes and their biological activity.

Biological tests were conducted under *in vitro* conditions. The cytotoxic potential of the novel synthesized complexes was assessed using the MTT assay on a panel of human tumor cell lines: A549 (lung adenocarcinoma cells), PANC-1 (pancreatic adenocarcinoma cells), MDA-MB-231 and MCF-7 (breast carcinoma cells), LS-174 (colon adenocarcinoma cells), EA. hy 926 (transformed human vascular endothelial cells), OVCAR-3 (ovarian adenocarcinoma cells), and the healthy (non-tumor) cell line MRC-5 (derived from fetal lung fibroblasts). *Cisplatin*, as a standard chemotherapeutic drug for solid tumors, was used as a reference complex. The synergistic effect of the six complexes with verapamil chloride was investigated to enhance cytotoxic activity in the PANC-1 cell line. Complex rhenium(V) with picolinic acid (**K1**) and complex rhenium(V) with 2,6-dipicolinic acid (**K6**) exhibited the strongest cytotoxic potential against the PANC-1 cell line, with **K1** selected as a candidate for further biological studies.

Keywords: oxorhenium(V) complexes, *in vitro* cytotoxic activity, PANC-1 cell line, verapamil, DFT calculations, X-ray structural analysis

Scientific Field: Chemistry

Specific Scientific Field: General and Inorganic Chemistry

LISTA SKRAĆENICA

WHO - Svetska zdravstvena organizacija (World Health Organization)

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

ROS - reaktivne kiseonične vrste

FDA - Uprava za hranu i lekove (Food and Drug Administration)

S180 - ćelijska linija sarkoma miša

L1210 - ćelijska linija limfocitne leukemije miša

CRT1 - bakar transportni protein

HAS - humani serum albumin

IGROV-1 - humana tumorska ćelijska linija jajnika

MFC-7 - humana tumorska ćelijska linija dojke

T-47D - humana tumorska ćelijska linija dojke

SW480 - humana ćelijska linija kolorektalnog karcinoma

HT29 - humana ćelijska linija kolorektalnog karcinoma

PDT - fotodinamička terapija

A2870 - humana tumorska ćelijska linija jajnika

LS174T - humana tumorska ćelijska linija debelog creva

PSE - periodni sistem elemenata

HCT116 - humana ćelijska linija kolorektalnog karcinoma

A549 - humana tumorska ćelijska linija pluća

L-BSO - L-butionin sulfoksimin

GSH - glutation

CT26 - tumorska ćelijska linija debelog creva miša

SGC-7901 - humana tumorska ćelijska linija želuca

DFT – Teorija funkcionalne gustine (eng. Density Functional Theory)

PC-3 - humana tumorska ćelijska linija prostate

T98G - humana tumorska ćelijska linija glioblastoma

UV-Vis - ultraljubičasta - vidljiva spektroskopija

Raji - humana tumorska ćelijska linija limfoma

Jukart - humana tumorska ćelijska linija T-limfocita

MDA-MB-231 - humana ćelijska linija adenokarcinoma dojke

ATP - adenozin trifosfat

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid

HeLa - humana tumorska ćelijska linija grlića materice

A549R - humana tumorska ćelijska linija pluća rezistentna na *cisplatinu*
HepG2 - humana tumorska ćelijska linija jetre
LO2 - humana zdrava ćelijska linija jetre fetusa
Lyso Tracker - indikator za lizozom
Mito Tracker - indikator za mitohondriju
NCI-H460 - humana tumorska ćelijska linija pluća
NADP⁺/NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
ER - endoplazmatični retikulum
DMSO - dimetil sulfoksid
HEDP - hidroetilidendifosfonat
U87 - humana tumorska ćelijska linija glioblastoma
U251 - humana tumorska ćelijska linija glioblastoma
AR42J - tumorska ćelijska linija pankreasa miša
NCI-H69 - humana tumorska ćelijska linija pankreasa
NMR - nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija
MRC-5 - humana zdrava ćelijska linija poreklom od fetalnih fibroblasta pluća
DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium (hranljivi ćelijski medijum)
DU145 - humana tumorska ćelijska linija prostate
DU145cis - humana tumorska ćelijska linija prostate rezistentna na *cisplatinu*
A2780cis - humana tumorska ćelijska linija jajnika rezistentna na *cisplatinu*
NAD - nikotinamid adenin dinukleotid
FemX - humana tumorska ćelijska linija kože
Caco-2 - humana ćelijska linija kolorektalnog karcinoma
A375 - humana tumorska ćelijska linija kože
C6 - tumorska ćelijska linija glioma pacova
Vero - zdrava animalna ćelijska linija bubrega
IC - infracrvena spektroskopija
MS - masena spektrometrija
LS1-74 - humana tumorska ćelijska linija debelog creva
EA. hy926 - transformisane endotelne ćelije krvnih sudova
OVCAR-3 - humane ćelije adenokarcinoma jajnika
ESI-MS - masena spektrometrija sa elektrosprej jonizacijom
HRMS-ESI - masena spektrometrija visoke rezolucije sa elektrosprej jonizacijom
VRP - verapamil hidrohlorid
RPMI - Roswell Park Memorial Institute (hranljivi ćelijski medijum)

FCS - fetalni govedi serum

PBS - fosfatni pufer

SDS - natrijum dodecil sulfat

Pgp - P-glikoprotein

PI - propidium jodid

SI - indeks selektivnosti

CDDP - *cisplatina*

ICP - MS - masena spektrometrija sa indukovano kuplovanom plazmom

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Kancer - statistika i postojeći oblici terapije	3
2.2. Primena metala u terapiji tumora	4
2.3. <i>Cisplatina</i> i njeni analozi	6
2.4. Mehanizam delovanja <i>cisplatine</i> i njenih analoga	8
2.5. Kompleksi ostalih prelaznih metala kao potencijalni antitumorski agensi.....	9
2.5.1. Kompleksi rutenijuma(III) i rutenijuma(II) u klinici	9
2.5.2. Kompleksna jedinjenja osmijuma i iridijuma	12
2.6. Renijum - metal nove generacije	15
2.6.1. Kompleksi renijuma(I) i njihova primena u medicinskoj hemiji.....	16
2.6.2. Kompleksna jedinjenja renijuma(V) i njihova primena.....	26
2.7. Pikolinska kiselina i njeni derivati	37
2.8. Cilj rada.....	42
3. EKSPERIMENTALNI DEO	45
3.1. Sinteza polaznog oksorenijum(V) kompleksa i odgovarajućih oksorenijum(V) kompleksa sa N,O- ligandima.....	45
3.1.1. Sinteza polaznog kompleksnog jedinjenja trihloro-okso-bis(trifenilfosfin)renijuma(V) [ReOCl ₃ (PPh ₃) ₂]	45
3.1.2. Sinteza dihloro-okso-trifenilfosfin- N,O-(piridin-2-karboksilato-)renijum(V) kompleksa [ReOCl ₂ (L1)(PPh ₃)] (K1)	45
3.1.3. Sinteza dihloro-okso-trifenilfosfin-N,O-(3-metilpiridin-2-karboksilato)renijum(V) kompleksa [ReOCl ₂ (L2)(PPh ₃)] (K2)	46
3.1.4. Sinteza dihloro-okso-trifenilfosfin-N,O-(6-metilpiridin-2-karboksilato)renijum(V) kompleksa [ReOCl ₂ (L3)(PPh ₃)] (K3)	46
3.1.5. Sinteza dihloro-okso-trifenilfosfin-N,O-(2,3-dikarboksilato)renijum(V) kompleksa [ReOCl ₂ (L4)(PPh ₃)] (K4)	47
3.1.6. Sinteza dihloro-okso-trifenilfosfin-N,O-(2,5-dikarboksilato)renijum(V) kompleksa [ReOCl ₂ (L5)(PPh ₃)] (K5)	47
3.1.7. Sinteza dihloro-okso-trifenilfosfin-N,O-(2,6-dikarboksilato)renijum(V) kompleksa [ReOCl ₂ (L6)(PPh ₃)] (K6)	48
3.2. Materijal i metode	48
3.2.1. Supstance korišćene u sintezama	48
3.2.2. Spektroskopske metode kojima su okarakterisana sintetisana jedinjenja.....	49
3.2.3. Elementalna analiza	49
3.2.4. Detalji računskih proračuna.....	50
3.2.5. Rendgenska strukturna analiza.....	50

3.2.7.	Biološka ispitivanja u <i>in vitro</i> uslovima	51
4.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	55
4.1.	Sinteza kompleksnih jedinjenja K1 - K3.....	55
4.2.	Sinteza kompleksnih jedinjenja K4 - K6.....	55
4.3.	Spektroskopska karakterizacija sintetisanih kompleksa renijuma(V).....	56
4.3.1.	Infracrvena spektroskopija	57
4.3.2.	¹ H NMR spektroskopija	58
4.3.3.	¹³ C NMR spektroskopija.....	59
4.3.4.	Masena spektrometrija	60
4.3.5.	Detalji računskih proračuna.....	60
4.3.6.	Rendgenska strukturna analiza.....	62
4.4.	Biološka ispitivanja u <i>in vitro</i> uslovima	66
4.4.1.	MTT metoda	66
4.4.2.	Određivanje efekta kombinovanog dejstva novosintetisanih kompleksa sa verapamil hidrohloridom - VRP na PANC-1 ćelijskoj liniji.....	69
4.4.3.	Određivanje uticaja L-BSO na aktivnost kompleksa na PANC-1 ćelijskoj liniji.....	72
4.4.4.	Analiza ćelijskog ciklusa na PANC-1 ćelijskoj liniji pomoću protočne citometrije	73
4.4.5.	Morfološka analiza ćelijske smrti pomoću fluorescentne mikroskopije.....	75
5.	ZAKLJUČCI.....	77
6.	LITERATURA	80
7.	PRILOG	89
	BIOGRAFIJA	112

1. UVOD

Sa sve većim porastom broja obolelih pacijenata od kancera svake godine u svetu, raste i potreba za poboljšanjem postojećih metoda dijagnostike kao i pronalaženjem novih efikasnijih i selektivnijih lekova, koji bi zamenili već postojeće i sveli neželjene efekte na minimum. U cilju pronalaženja rešenja za ovako kompleksnu bolest najbolji pristup podrazumeva uključenje multidisciplinarnog istraživanja koje uključuje nauke poput hemije, biologije i farmacije.

Ova sinergija nauka omogućava stvaranje efikasnijih, preciznijih i sigurnijih terapijskih rešenja, čime se značajno povećavaju šanse za uspešno lečenje kancera i poboljšanje kvaliteta života pacijenata.

Kako je *cisplatina*, lek koji se i dalje najviše koristi u terapiji različitih vrsta kancera, prema strukturnim svojstvima kompleksno jedinjenje prelaznog metala ne čudi činjenica da je polje koordinacione hemije u konstantnoj ekspanziji. Naučnici širom sveta, koji se bave medicinskom hemijom, poslednje dve decenije marljivo i naporno rade na sintetisanju novih kompleksnih jedinjenja sa različitim prelaznim metalima i njihovom ispitivanju u *in vitro* i *in vivo* uslovima kao i proučavanju mehanizma delovanja u biološkim sistemima u cilju pronalaženja kandidata koji bi ušli u dalje kliničke studije i jednoga dana bili korišćeni u terapiji obolelih pacijenata.

Poslednjih godina sve više je u fokusu ispitivanje citotoksičnog potencijala kompleksnih jedinjenja renijuma sa različitim organskim ligandima, koji bi bili zamena za već postojeće platinske komplekse, u cilju prevazilaženja rezistencije i sporednih neželjenih efekata. Do sada su se mnogi kompleksi pokazali kao izuzetno aktivni i u *in vitro* i u *in vivo* uslovima. Takođe, kompleksna jedinjenja različitih prelaznih metala sa N,O- ligandima poput pikolinske kiseline i njenih derivata veoma su izučavana u oblasti medicinske hemije, pri čemu su mnogi kompleksi bili aktivniji od *cisplatine*, što predstavlja osnov za njihova dalja biološka ispitivanja. Stoga je predmet ove doktorske disertacije sinteza, karakterizacija i citotoksična aktivnost kompleksa renijuma(V) sa N,O-ligandima.

- ❖ U **Opštem delu** dat je opširan pregled literature koji obuhvata definiciju kancera kao bolesti i statističke podatke stanja u svetu i Srbiji. Pažnja je posvećena upotrebi prelaznih metala u terapiji tumora. Zatim dat je detaljan opis i mehanizam delovanja kompleksnih jedinjenja koja se već koriste u kliničkoj praksi. Na kraju, diskutovane su različite naučne studije u vezi sa renijumom i derivatima pikolinske kiseline koji su poslednjih decenija u fokusu pažnje.
- ❖ U **Ciljevima** su predstavljene opšte hipoteze ove doktorske disertacije.

- ❖ U **Eksperimentalnom delu** su opisane sinteze kompleksnih jedinjenja renijuma(V) sa derivatima pikolinske kiseline kao i tehnike i metode korišćene za strukturnu karakterizaciju dobijenih kompleksa i pregled bioloških testova pomoću kojih je ispitan antitumorski potencijal novosintetisanih jedinjenja.
- ❖ U odeljku **Rezultati i diskusija** detaljno su opisane strukture kompleksa pretpostavljene na osnovu rezultata spektroskopskih metoda i rendgenske strukturne analize kao i rezultati proučavanja nekovalentnih interakcija ovih kompleksa do kojih se došlo pomoću DFT i različitih bioloških testova *in vitro* uslovima.
- ❖ U delu **Zaključci** predstavljeni su najvažnijih zaključci dobijeni tokom izrade ove doktorske disertacije.

2. OPŠTI DEO

2.1. Kancer - statistika i postojeći oblici terapije

Kancer se može definisati kao grupa oboljenja koju karakteriše nekontrolisana deoba ćelija u organizmu. Oboljenje nastupa onoga trenutka kada metabolički procesi u telu prestanu normalno da funkcionišu i kada stare ćelije ne umiru, već naprotiv, počinju nekontrolisano da se razmnožavaju, pri čemu dovode do obrazovanja masa u tkivima koja se definiše kao tumor. Tumori formirani na ovaj način mogu se proširiti na okolna tkiva i organe u ljudskom organizmu. Do sada je poznato da postoji oko 200 različitih tipova kancera, prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (eng. WHO - World Health Organization), i predstavlja jedno od oboljenja sa najvećom stopom smrtnosti. Kancer zauzima drugo mesto na listi najčešćih uzroka smrti, odmah iza kardiovaskularnih bolesti, sa stopom smrtnosti od 2,74 miliona zabeleženoj 2022. godine [1, 2, 3]. U Srbiji, u 2022. godini, broj novoobolelih pacijenata iznosi 42 039, od toga 23 881 smrtnih ishoda, prema podacima Internacionalne agencije za istraživanje kancera (eng. International Agency for Research on Cancer). Kod oba pola, na prva tri mesta kao najučestaliji uzročnici oboljenja nalaze se karcinom pluća, kolorektalni karcinom i karcinom dojke [4]. Ovi podaci su u skladu sa podacima Svetske zdravstvene organizacije (WHO), čija statistika ukazuje da je 2022. godine registrovano 2,5 miliona novoobolelih pacijenata od karcinoma pluća, kao i da je 10% od svih zabeleženih slučajeva oboljenja upravo posledica kolorektalnog karcinoma, sa predviđanjem da će njegova stopa porasti za 3,2 miliona novih slučajeva do 2040. godine. Statistički podaci u vezi sa karcinomom dojke su takođe veoma zabrinjavajući, pošto ukazuju da je u 157 od 185 zemalja u svetu karcinom dojke najčešći oblik oboljenja kod žena u 2022. godini [5, 6, 7].

Najčešći oblici terapije u lečenju kancera su: hemioterapija, radioterapija, imunoterapija i terapija laserom [8]. Hemioterapija predstavlja primarni i najzastupljeniji oblik terapije koji je razvijen još 1940. godine za lečenje čvrstih (eng. solid) tumora. U osnovi podrazumeva primenu leka - citostatika, koji dovodi do inhibicije rasta ili ćelijske smrti tumorskih ćelija. Glavna meta ovih jedinjenja su najčešće biomolekuli poput DNK (deoksiribonukleinske kiseline), sa kojom ostvaruje kovalentnu interakciju ili se interkalira u dvostruki heliks i na taj način dovodi do oštećenja jednog ili oba lanca ovog molekula, kao i stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta - ROS-a, što za posledicu ima kontrolisanu ćelijsku smrt - apoptozu. Takođe, citostatici mogu dovesti do inhibicije enzima poput topoizomerase, koji dovodi do zaustavljanja ćelijske deobe u toku ćelijskog ciklusa [9, 10].

Glavni nedostatak hemioterapije predstavlja neselektivnost dejstva i pojava rezistencije na dejstvo leka. U toku raspodele u organizmu, citostatik sprečava deobu kako tumorskih tako i zdravih ćelija, pri čemu dovodi do oštećenja okolnih tkiva i organa. Takođe još jedan od razloga veoma niske efikasnosti hemioterapije je i pojava rezistencije tumorskih ćelija na dejstvo leka, koja se javlja kada ćelije postanu otporne na antikancerski agens (lek) i počnu ponovo da se dele i formiraju metastaze što je proces širenja ćelija primarnog tumora na druge organe i delove tela [10]. Radioterapija, kao još jedan oblik terapije, koristi veliku energiju zračenja, što može dovesti do oštećenja DNK molekula i prouzrokovati stres u endoplazmatičnom retikulumu i dovesti do oslobađanja ROS-a, pri čemu će nastupiti ćelijska smrt. Međutim, kao i kod hemioterapije i radioterapija ima svoje nedostatke, a to su: neselektivnost mesta delovanja, što dovodi do smrti zdravih ćelija imunog sistema i tako izaziva ozbiljne neželjene efekte na zdravim tkivima [11]. Imunoterapija je terapijska kombinacija različitih antitela i citokina, koja za cilj ima pokretanje imunog sistema, što dovodi do uništavanja tumorskih ćelija. Prednosti ove terapije su: veća efikasnost, selektivnost, manja toksičnost i smanjenje neželjenih efekata. Uprkos svim navedenim prednostima, imunoterapija kod određenog broja pacijenata se pokazala kao neadekvatna, zbog niske efikasnosti i neželjenih dejstava koji su u sprezi sa imunim sistemom pacijenta [11, 12].

Uzimajući u obzir sva tri navedena tipa terapije, dolazi se do zaključka da bi se kombinacijom imunoterapije sa hemio- i/ili radioterapijom mogli postići dobri rezultati i otkloniti svi postojeći nedostaci, tako što će se znati detaljan mehanizam delovanja koji zavisi od vrste tumora i njegove lokacije, optimalna doza, kao i opšte stanje pacijenta (stadijum oboljenja, starost, prisustvo drugih hroničnih bolesti) [11, 12].

2.2. Primena metala u terapiji tumora

Još od davnina se zna da su se jedinjenja metala koristila u terapijske svrhe. Asirci, Egipćani i Kinezi koristili su cinabarit (živa(II)-sulfid) u medicinske svrhe kao antiseptik i sedativ, dok se kod Rimljana koristio za lečenje trahoma i veneričnih bolesti. Razvojem filozofije kod starih Grka sve više se proučavalo i pisalo o potencijalnoj primeni različitih jedinjenja metala u medicinske svrhe. Takođe, ovi narodi koristili su bakar za sterilizaciju rana, dok su zlato upotrebljavali za lečenje malih boginja i čira na dvanaestopalačnom crevu, a srebro je našlo primenu u zaceljivanju rana i borbi protiv infekcija. Jedno od prvih jedinjenja koje se koristilo u Kini za lečenje sifilisa, reumatoidnog artritisa, psorijaze i kao antiseptik, bilo je arsen-trioksid. Početkom 18. i 19. veka arsen-trioksid je našao

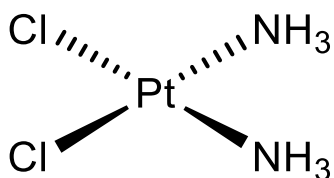
primenu i u lečenju leukemije, dok ga kasnije nije zamenila primena radio- i hemioterapije [2, 13]. Ovo saznanje je veoma logično, uzimajući u obzir činjenicu da su metali esencijalna komponenta mnogih ćelija. Prelazni metali poput bakra, kobalta, gvožđa, mangana, nikla i vanadijuma, sačinjavaju metalne centre koji se nalaze u katalitičkom mestu mnogih enzima, a koji su ključni deo mnogih metaboličkih procesa u organizmu, kao što su katalitički procesi, prenos elektrona, inhibicija enzima ili stvaranje ROS-a. Još neke od funkcija u kojima prelazni metali imaju ulogu su stabilizacija 3D strukture proteina, regulacija i ekspresija hormona kao i ekspresija gena [13, 14, 15].

Prelazne metale karakteriše širok spektar oksidacionih stanja i koordinacionih brojeva, što se ogleda u raznolikosti njihove koordinacione geometrije. Metalni joni se u vodenim rastvorima obično nalaze kao pozitivno naelektrisane vrste i tako ostvaruju interakciju sa negativno naelektrisanim biološkim molekulima. U zavisnosti od ligandnog sistema, koji je obično organski molekul naelektrisanje kompleksnog jedinjenja može da varira, što dovodi do formiranja katjonskih, anjonskih ili neutralnih kompleksnih jedinjenja. Takođe, prelazni metali podležu reakcijama oksido-redukcije i na taj način menjaju membranski potencijal ćelije, što olakšava vezivanje za željeni receptor. Uzimajući u obzir sve navedeno, ne iznenađuje činjenica da prelazni metali interaguju sa molekulima potput DNK, stvarajući adukte koji izazivaju oštećenja na samom biomolekulu i sprečavaju njegovu dalju sintezu, što dovodi do ćelijske smrti [13, 14, 15].

Prekretnica primene prelaznih metala u terapiji lečenja kancera desila se 1965. godine kada je Rozenberg slučajno otkrio *cisplatinu* (*cis*-diammindihloroplatina(II)) koristeći platinske elektrode pri proučavanju sposobnosti deljenja *E. coli* (Ešerihije koli) pri različitim frekvencijama naizmenične struje. Iznenadjuće, različite frekvencije dovele su do toga da *E. coli* promeni svoj oblik u štapićasti, pri čemu je zaključeno da je došlo do rasta ćelija, ali ne i njihove deobe. Za ovakav efekat zaslužene su upravo platinske elektrode, jer kada su one uronjene u rastvor, došlo je do formiranja adukta u vidu *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]. Ovakvo saznanje podstaklo je Rozenberga i njegove saradnike da bi se upravo ovo planarno jedinjenje platine(II) moglo primeniti u lečenju kancera. Pretpostavka se pokazala tačnom jer se prilikom testiranja citotoksičnog potencijala na ćelijskim linijama sarkoma miša - S180 i limfocitne leukemije - L1210 *cisplatinu* pokazala kao veoma efikasan citostatik, za razliku od svog *trans* izomera koji nije pokazao nikakvu aktivnost. Ovo otkriće postavilo je temelje današnjoj grani nauke koja se bavi primenom kompleksa prelaznih metala kao potencijalnih antitumorskih agenasa [1, 2, 13, 14, 15, 16, 17].

2.3. Cisplatina i njeni analozi

Cisplatina je klinički odobren lek od strane FDA - Uprave za hranu i lekove (eng. Food and Drug Administration) 1978. godine i od tada se koristi u lečenju raka prostate, jajnika, pluća, materice, creva, bešike i mnogih drugih. U organizam se unosi intravenski, zajedno sa fiziološkim rastvorom (Slika 1) [1, 8, 13, 15, 18, 19].



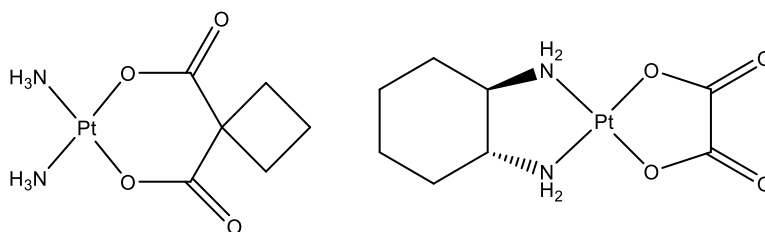
Slika 1. Strukturna formula *Cisplatine*

Uprkos sjajnim rezultatima, ovo jedinjenje deluje neselektivno, pri čemu dovodi do apoptoze kako tumorskih tako i zdravih ćelija i ispoljava jake neželjene efekte kao što su: nefrotoksičnost, neurotoksičnost, ototoksičnost i hepatotoksičnost. Zbog svih navedenih ograničenja, teško je odrediti i dozu koja neće biti štetna po pacijenta. Stoga su istraživači širom sveta počeli sa razvojem analoga *cisplatine* koji će prevazići sve nedostatke, a istovremeno ispoljiti istu ako ne i bolju aktivnost. Do danas, samo su pet analoga *cisplatine* našli primenu u klinici za lečenje različitih tipova kancera (Tabela 1) [1, 8, 13, 15, 18, 19, 20].

Tabela 1. Prikaz klinički odobrenih platinskih lekova (tabela preuzeta iz [18])

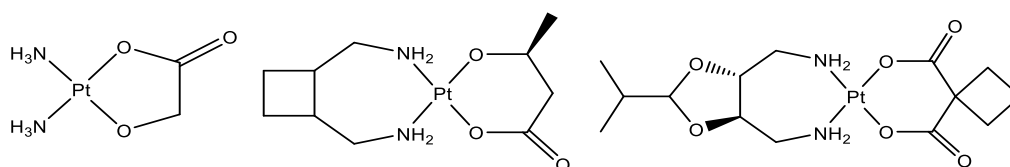
Generički naziv	Istraživački naziv	Tržišni naziv	Godina odobrenja od strane FDA	Zemlja korišćenja
Cisplatina	CDDP	Platinol	1978	ceo svet
Oksaliplatina	1-OHP	Eloksatin	2002	ceo svet
Karboplatina	JM8	Paraplatin	1989	ceo svet
Nedaplatina	254-S	Akvapla	1995	Japan
Lobaplatina	D-19466	洛铂	2010	Kina
Heptaplatina	SKI 2053R	SunPla	1999	Južna Koreja

Drugu generaciju analoga *cisplatine* čine dva jedinjenja odobrena od FDA i to su karboplatina i oksaliplatina. U kliničkoj su upotrebi širom sveta od 1989. odnosno 2002. godine. Oba jedinjenja imaju manju nefrotoksičnost nego *cisplatina* [1, 8, 13, 15, 18, 19, 20]. Razlog za manju toksičnost karboplatine leži u zameni hloridnih liganada ciklobutandikarboksilato bidentatnim ligandom. Upravo zbog ovog bidentatnog liganda moguće je povećati dozu leka kod obolelih pacijenata. Stoga se karboplatina koristi u lečenju karcinoma jajnika, mozga, vrata i glave, oka, bubrega, pluća, bešike i dojke. Oksaliplatina je prvi put je sintetisana u Japanu i našla je primenu u lečenju karcinoma debelog creva. U kombinaciji se drugim lekovima ispoljava i dobru citotoksičnost prema metastazama karcinoma debelog creva i želuca. Umesto hlorida kao odlazeće grupe u sastavu se nalazi 1,2-diammincikloheksan, koji povećava lipofilnost leka, čime se olakšava transport leka kroz ćelijsku membranu (Slika 2) [1, 13, 18, 19].



Slika 2. Strukturne formule karboplatine i oksaliplatine

Tri analoga platine(II) poput nedaplatine, lobaplatine i heptaplatine čine treću generaciju analoga *cisplatine* i koriste se u azijskim zemljama za lečenje različitih tipova kancera. Nedaplatina se najčešće upotrebljava zajedno sa paklitakselom i gemcitabinom u lečenju kancera vrata, glave, jednjaka i pluća. Lobaplatina ostvaruje kovalentne interakcije sa molekulom DNK, pri čemu dovodi do njegovog oštećenja i ćelijske smrti. U kliničkim ispitivanjima ispoljava jak antitumorski potencijal u kombinaciji sa paklitakselom prema kanceru testisa, dojke, jajnika, pluća, želuca i mijeloidne leukemije. Heptaplatina koristi se u Južnoj Koreji samostalno ili sa drugim lekovima u suzbijanju kancera debelog creva. U drugoj fazi kliničkih ispitivanja heptaplatina pokazala je obećavajuće rezultate prema uznapredovalom kanceru želuca i kanceru jednjaka (Slika 3) [1, 13, 18, 19].

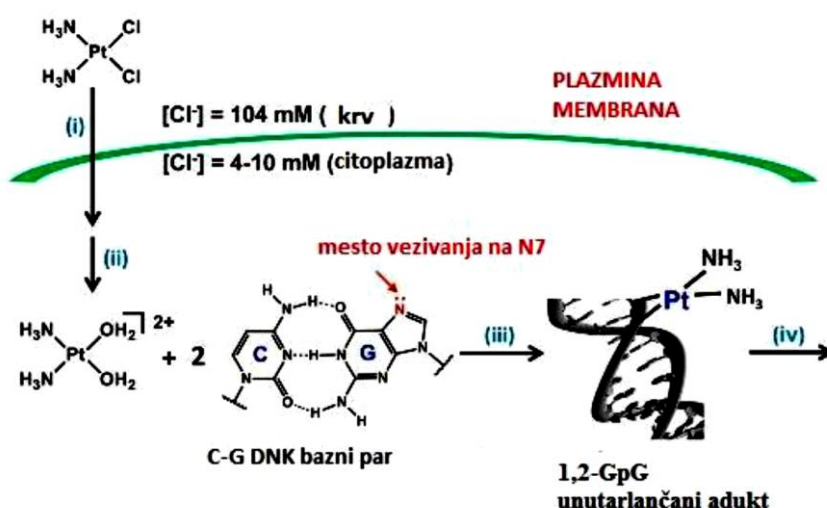


Slika 3. Strukturne formule nedaplatine, lobaplatine i heptaplatine

2.4. Mehanizam delovanja *cisplatine* i njenih analoga

Mehanizam delovanja se sastoji iz četiri koraka: 1. unos u ćeliju, 2. aktivacija, 3. vezivanje za DNK, 4. apoptoza (Slika 4). Dva načina na koja *cisplatina* ući u ćeliju su pasivna difuzija kroz membranu i/ili aktivan transport posredstvom membranskih proteina. Studije su pokazale da je za aktivni transport *cisplatine* odgovoran bakar - transporter CRT1. Pošto je koncentracija hloridnog jona u krvi ($[Cl^-] = 104 \text{ mM}$) viša nego u citoplazmi ($[Cl^-] = 4\text{-}10 \text{ mM}$), *cisplatina* dolazi uglavnom neizmenjena do ćelije. Mala veličina i kvadratno-planarna geometrija *cisplatine* omogućavaju da se supstitucija liganada lako izvrši. Izmjena liganada se dešava u citoplazmi ćelije pre nego što se *cisplatina* veže za DNK molekul, pri čemu se jedan ili oba hloridna liganda zamenjuju molekulom vode [1, 15, 18].

Vreme polужivota tako nastalog akva adukta $cis\text{-}[Pt(NH_3)_2Cl(H_2O)]^+$ je dva sata. Zatim se ovakav kompleksni jon *cisplatine* vezuje dominantno za N7 azotov atom guanina, ređe adenina i na taj način formira kovalentno koordinativnu vezu između platine i slobodnog elektronskog para sa azotovog atoma. Najzastupljeniji adukti koji nastaju ovim vezivanjem, jesu 1,2-GpG unutarlančani adukti, koji se formiraju između susednih guanozidnih parova unutar jednog lanca DNK heliksa. Kod karboplatine i oksaliplatine hlorido ligandi su zamenjeni helatnim ligandima, koji se sporije izmenjuju sa molekulima vode, tako da su vodeni rastvori ovih lekova stabilni nekoliko nedelja. Vezivanje ova dva jedinjenja za molekul DNK se odvija po istom principu kao kod *cisplatine*. Kada nastanu adukti *cisplatine* i njenih analoga sa DNK molekulom, dolazi do njegove distorzije, što onemogućava dalju replikaciju i transkripciju i samim tim ćelija pokreće mehanizme koji je uvode u apoptozu [1, 18].



Slika 4. Grafički prikaz mehanizma delovanja *cisplatine* (slika preuzeta iz [18])

2.5. Kompleksi ostalih prelaznih metala kao potencijalni antitumorski agensi

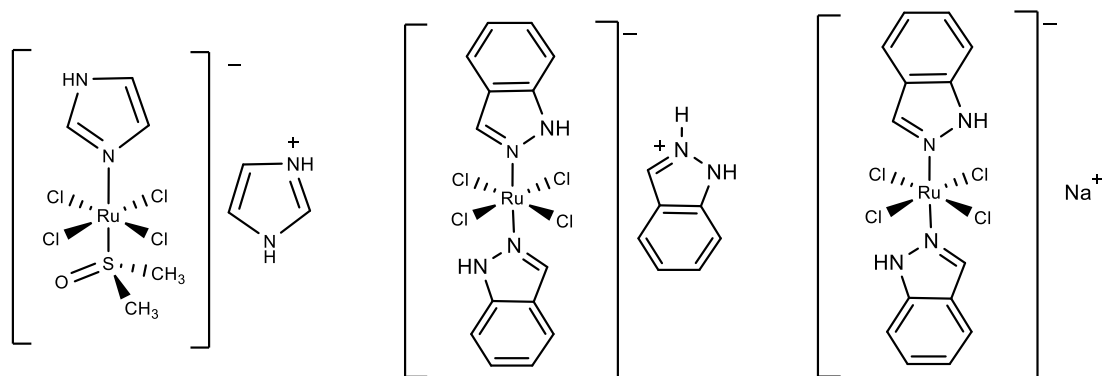
Zbog svih gore pomenutih nedostataka platinskih lekova, medicinski i koordinacioni hemičari širom sveta su poslednjih decenija usmerili svoje istraživanje u pravcu sintetisanja novih kompleksa različitih prelaznih metala koji bi mogli da ispolje bolji antitumorski potencijal uz manje štetnih efekata. Stoga, je do otkrića kompleksnih jedinjenja rutenijuma, zlata, srebra, gvožđa, bakra, titanijuma, osmijuma, iridijuma i renijuma [16]. Ova jedinjenja nazvana su metaloterapeuticima i dizajnirana su tako da interaguju sa DNK, kao i različitim proteinima, i posredstvom različitih mehanizama delovanja, mogu dovesti do apoptoze tumorskih ćelija [19]. Svojstva koje treba da zadovolje novosintetisana jedinjenja su: stabilnost u fiziološkim uslovima, rastvorljivost u vodi odnosno ćelijskom medijumu, lipofilnost, niska toksičnost i selektivnost prema tumorskim ćelijama [8, 16, 19].

2.5.1. Kompleksi rutenijuma(III) i rutenijuma(II) u klinici

Prvi naslednici *cisplatin*e koji su ušli u klinička ispitivanja i koja su ispoljila jaku *in vitro* i *in vivo* citotoksičnu aktivnost na različitom panelu humanih tumorskih ćelija su jedinjenja rutenijuma(III) i rutenijuma(II). Prednosti rutenijumskih kompleksa u odnosu na platinske su te, što se rutenijum može naći u više oksidacionih stanja +2, +3 i +4. Oktaedarska geometrija rutenijumskih kompleksa omogućava koordinovanje raznovrsnih ligandnih sistema za metalni centar kao i laku izmenu labilnih aksijalnih liganada što dovodi do lakšeg vezivanja kompleksnog jedinjenja za željenu biološku metu [19, 21]. Manja toksičnost i veća selektivnost rutenijumskih kompleksa može se objasniti činjenicom da se rutenijum i gvožđe nalaze u istoj grupi u PSE (Periodni sistem elemenata), pa se smatra da ovi kompleksi mogu da se vežu za transferin - protein koji prenosi gvožđe u krvi i na taj način se omogućava njegov transport kroz organizam, što dovodi do bolje apsorpcije [21]. Opšte je poznato da tumorske ćelije imaju veću potrebu za gvožđem, pa stoga imaju i više transferinskih receptora. Stoga Kepler i saradnici smatraju da se rutenijumski kompleksi mogu transportovati u tumorske ćelije koristeći put „trojanskog konja“ [22]. Iako je tačan mehanizam delovanja mnogih kompleksa rutenijuma još uvek nepoznat, zna se da se većina ovih jedinjenja, za razliku od jedinjenja platine, vezuje za oba lanca DNK molekula, dovodeći do zaustavljanja ćelijskog ciklusa, što za posledicu ima ćelijsku smrt. Različita naučna istraživanja su pokazala da pojedini rutenijumski

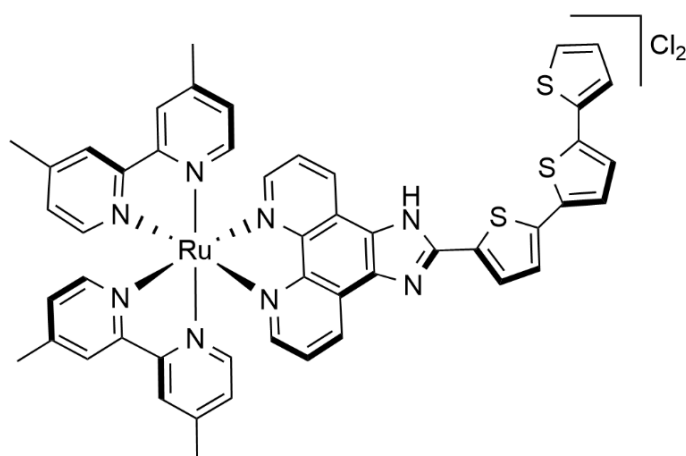
kompleksi, pored vezivanja za DNK, mogu da indukuju generisanje reaktivnih kiseoničnih vrsta i dovode do inhibicije proteinske kinaze [2].

Kompleksna jedinjenja rutenijuma(III) poput NAMI-A – imidazolijum-[*trans*-tetrahlrido(dimetilsulfoksid)(imidazol)rutenat(III)], KP1019 – indazolijum-[*trans*-tetrahlridobis(1H-indazol)rutenat(III)] i natrijumove soli KP1019 poznate pod oznakom - KP1339 ušla su u fazu I ili fazu II kliničkih ispitivanja [21, 22]. Nakon intravenoznog unošenja u organizam i NAMI-A i KP1019 se nekovalentnim interakcijama se vezuju za HSA (humani serum albumin) pri čemu dolazi do redukcije rutenijuma(III) u rutenijum(II), posredstvom glutaciona, cisteina ili askorbinske kiseline [20]. S druge strane, NAMI-A ispoljava 1000 puta manju *in vitro* citotoksičnost od *cisplatin*e prema nekoliko humanih tumorskih ćelijskih linija, kao što su: IGROV-1 (ćelije karcinoma jajnika), MFC-7 i T-47D (ćelije karcinoma dojke), dok je na preko 60 različitih tumorskih ćelijskih linija neaktivan. *In vivo* testiranja na miševima ukazuju da NAMI-A primarno deluje na metastaze, ali takođe su i najnovije studije pokazale da je jedinjenje izrazito toksično prema više ćelijskih vrsta leukemije [22, 23]. Umereni *in vitro* citotoksični potencijal, $IC_{50} = 35 - 95 \mu M$ ispoljavaju KP1019 i KP1339 prema humanim tumorskim ćelijama kolorektalnog karcinoma-SW480 i HT29 pri inkubaciji od 24 h, dok se njihova aktivnost smanjuje kako raste inkubaciono vreme [22]. U kliničkim ispitivanjima u fazi II NAMI-A se nalazi od 1999. godine, a KP1019 od 2006. godine. Najveći nedostak koji se javio kod NAMI-A je ispoljavanje neželjenih efekata, dok slaba rastvorljivost KP1019 otežava njegova dalja ispitivanja. Naučnici su onda pokušali da uvođenjem natrijumovog jona kao katjona prevaziđu problem rastvorljivosti i tako je nastalo jedinjenje KP1339, koje se od 2010. godine nalazi u kliničkim ispitivanjima (Slika 5) [23, 24].



Slika 5. Strukturne formule NAMI-A, KP1019 i KP1339

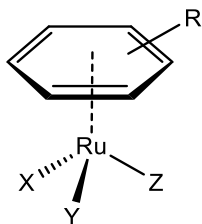
Jedan kompleks rutenijuma(II) se primenjuje u PDT-u (fotodinamička terapija) kao fotosenzitizer. Fotodinamička terapija, po definiciji predstavlja oštećenje tkiva posredstvom vidljive svetlosti u prisustvu fotosenzitizera i kiseonika. Fotosenzitizeri se dele na tip I i tip II, pri čemu oba dovode do degradacije i oštećenja biomolekula uz pomoć molekulskog kiseonika. Rutenijum(II) je izabran da bude metalni centar zbog svojih raznovrsnih fotohemijskih i fotofizičkih karakteristika, kao i mogućnosti da generiše singletni kiseonik i učestvuje u inter- i intramolekulskim reakcijama prenosa elektrona. Takođe u organometalnoj hemiji postoji veliki broj koordinacionih jedinjenja rutenijuma(II) sa polipiridinima, što je i bila inspiracija pri sintetisanju TLD-1433. U uslovima sa normalnim nivoom kiseonika TLD-1433 ispoljava jaku fotocitotoksičnost, dok u uslovima hipoksije njegova aktivnost zavisi od tipa tumorske ćelijske linije (Slika 6) [25].



Slika 6. Strukturna formula TLD-1433

Ovo jedinjenje je prvi fotosenzitizer na bazi rutenijuma koji se od 2017. godine nalazi u fazi I i fazi 2a kliničkih ispitivanja u cilju lečenja karcinoma bešike [25, 26].

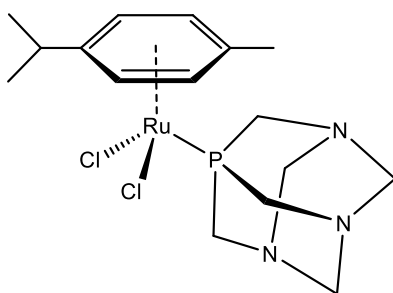
Takođe vredna pomena je i serija RAPTA jedinjenja rutenijuma(II) koji su kandidati za pretklinička ispitivanja, opšte formule $[Ru(aren)Cl_2PTA]$, gde je PTA= 1,3,5-triaza-7-fosfatriciklo[3.3.1.1]dekan. Sva jedinjenja RAPTA serije karakteriše pseudo oktaedarska „piano-stool” geometrija (geometrija klavirske stolice) pri čemu arenski prsten predstavlja sedlo, a ostala tri liganda noge klavirske stolice (Slika 7) [27, 28].



Slika 7. Grafički prikaz „piano-stool“ geometrija Ru(II) arenskih kompleksa

Metalni jon ostvaruje η^6 koordinaciju sa hidrofobnim arenskim prstenom koji sprečava oksidaciju rutenijuma(II) i pospešuje lipofilnost ovih jedinjenja, čime je olakšan transport kroz ćelijsku membranu. Supstituenti na arenskom prstenu kao i mono i/ili bidentatni ligandi koji su deo “klavirske stolice”, čine pogodne odlazeće grupe od kojih zavise fizičko-hemijska svojstva i biološka aktivnost ovih jedinjenja. Uzimajući u obzir sve pomenuto RAPTA porodica kompleksnih jedinjenja pokazala je odličnu stabilnost i rastvorljivost u vodi, što ih čini odličnim kandidatima za biološka ispitivanja [27, 28].

Kao najbolji kandidat izdvojo se kompleks RAPTA-C, koji se vezuje za humani serum albumin i transferin, pri čemu dolazi do njegove povećane akumulacije u tumorskim ćelijama, što za posledicu ima stvaranje ROS-a u mitohondrijama i indukovanje apoptoze, pri čemu zdrave ćelije ostaju netaknute (Slika 8). Pretkliničke studije pokazuju da ovo jedinjenje dovodi do smanjenja metastaza na plućima na modelu miša. Na modelu embriona pileta RAPTA-C dovodi do smanjenja veličine humanog tumora jajnika ćelijske linije A2870 kao i humanog kolorektalnog tumora ćelijske linije LS174T na modelu miša [29].

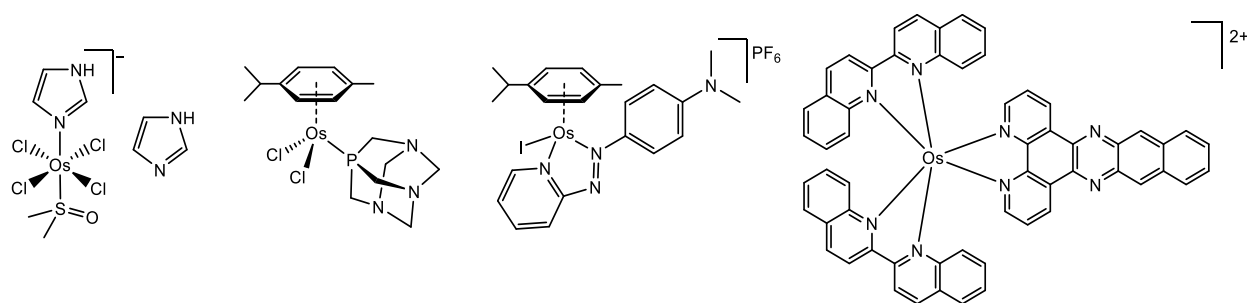


Slika 8. Strukturna formula RAPTA-C

2.5.2. Kompleksna jedinjenja osmijuma i iridijuma

Iako se bioneorganska i medicinska hemija najviše razvijala u oblasti platinskih i rutenijumskih kompleksa kao potencijalnih lekova u terapiji tumora, u poslednjih dvadeset godina došlo je do zaokreta i naučnici su usresredili svoju pažnju na prelazne metale poput osmijuma, iridijuma i renijuma [20]. Uzimajući u obzir činjenicu da se osmijum nalazi u 8. grupi PSE kao i rutenijum, a u istoj periodi kao i platina, može se očekivati da će njegovi kompleksi naći primenu kao antitumorski agensi [30]. Osmijum može poslužiti kao sjajna alternativa za rutenijumske komplekse, jer su osmijumski kompleksi stabilniji i inertniji u fiziološkim uslovima. Do sada su već sintetisani analozi dobro poznatih rutenijumskih kompleksa sa osmijumom kao centralnim metalnim jonom pod

oznakama: Os-NAMI-A, TLD-1824, Os-RAPTA-C. Za razliku od NAMI-A njegov osmijumski analog - Os-NAMI-A, ne podleže hidrolizi u ćelijama, a ispoljava jaku citotoksičnost u *in vitro* uslovima. Ovo saznanje ukazuje da hidroliza datog jedinjenja nije usko povezana sa njegovom biološkom aktivnošću. Mek Farland i saradnici testirali su TLD-1824 u *in vitro* i *in vivo* uslovima, pri čemu su došli do zaključka da se jedinjenje može koristiti u PDT-u kao fotosenzitizer, jer je aktivno u opsegu od 200-900 nm, u uslovima normalnog nivoa kiseonika, kao i hipoksiji. Pomenuta svojstvase odražavaju na odličnu *in vivo* aktivnost TLD-1824 prema kanceru creva na modelu miša [31, 32]. Različiti osmijum(II)arenski kompleksi ispoljili su citotoksičnost u nanomolarnom opsegu prema humanim tumorskim ćelijskim linijama jajnika, dojke, prostate, pluća, debelog creva i bešike. Jedinjenje koje je privuklo najviše pažnje poslednjih godina, poznatije kao FY-026, ispoljilo je deset puta veću aktivnost od *cisplatin*e prema nekoliko tumorskih ćelijskih linija. *In vivo* testiranja ukazuju da jedinjenje dovodi do usporavanja rasta tumora humane ćelijske linije kolorektalnog karcinoma-HCT116 na miševima. Isto tako FY-026 je veoma aktivno prema humanim tumorskim ćelijskim linijama jajnika - A2870 i humanim tumorskim ćelijskim linijama pluća - A549 u kombinaciji sa L-BSO (L-butionin sulfoksimin) koji je inhibitor γ -glutamylcistein sintetaze i koji utiče na smanjenje nivoa glutationa (GSH) u ćelijama. Glutation ima važnu ulogu u metaboličkim procesima, kao i procesima koji se odvijaju u ćelijama poput detoksikacije i transporta (Slika 9) [31, 33].



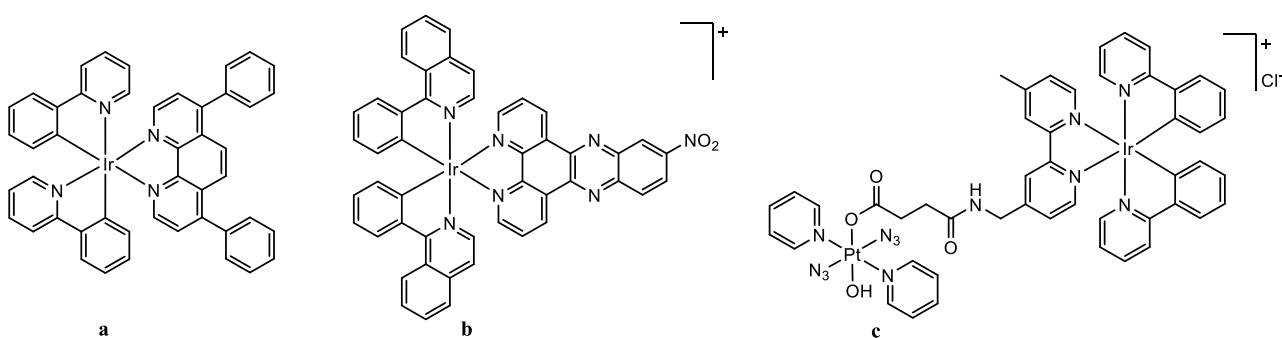
Slika 9. Strukturne formule Os-NAMI-A, Os-RAPTA-C, FY-026 i TLD-1824

Vredna pomena je i studija iz 2023. godine u kojoj pet novosintetisanih osmijum(II) kompleksa na bazi derivata 1,10-fenantrolina zbog svojih izuzetnih luminescentnih karakteristika mogu biti korišćeni kao fotosenzitizeri u PDT-u. Svi kompleksi su bili neaktivni u mraku prema različitom panelu tumorskih ćelijskih linija, ali kada su bili izloženi zračenju na 740 nm, svi su pokazali izuzetnu fotocitotoksičnost u vrednostima ispod 10 μ M. *In vivo* studija rađena je na modelu miša na mišijoj tumorskoj ćelijskoj liniji debelog creva - CT26, kojima je injekcijskim putem dato najaktivnije jedinjenje osmijuma(II). Miševi su prvo nekoliko dana bili u mraku, a onda su podvrgnuti zračenju na 740 nm uz pomoć lasera. Nakon 14 dana, primećeno je da je kod ove grupe miševa došlo

do smanjenja veličine tumora, a najvažnije od svega je da miševi nisu pokazali ni jedan znak stresa, bolova, ni gubitka telesne mase [34].

Iridijum kao prelazni metal postoji u više oksidacionih stanja i najzastupljenija oktaedarska geometrija u kompleksnim jedinjenjima mu omogućava stabilnost u biološkim uslovima i ostvarivanje lakše interakcije sa biološkim metama. Kompleksi iridijuma(III) izdvojili su se kao potencijalno terapijski aktivna jedinjenja u *in vitro* i *in vivo* uslovima upravo iz razloga što su ovi kompleksi inertni, stabilni, rastvorni u vodi, netoksični, i ispoljavaju antitumorski potencijal prema tumorskim ćelijama [35, 36, 37]. U različitim naučnim studijama otkriveno je da je najčešći mehanizam delovanja ovih kompleksa generisanje ROS-a u mitohondrijama, što dovodi do apoptoze tumorskih ćelija, a takođe dovode do inhibicije rasta tumora posredstvom interakcija sa DNK [35]. Kompleksi iridijuma(III) u pobuđenom tripletnom stanju mogu reagovati sa molekulskim kiseonikom i stvoriti singletni kiseonik, što ukazuje da su kompleksi iridijuma(III) odlični kandidati za fotosenzitizere tipa II u PTD-u [35].

Studije sprovedene u poslednjoj deceniji ukazuju na to da se kao pogodni ligandi za koordinaciju sa iridijum(III) jonom izdvajaju N,N-ligandi fenantrolinskog tipa. U naučnoj studiji iz 2013. godine izdvojio se kompleks iridijuma(III) sa derivatom fenantrolina i u *in vitro* uslovima ispoljio bolju citotoksičnu aktivnost na različitom panelu humanih tumorskih ćelijskih linija od *cisplatin*e. Usled povećane lipofilnosti ovog kompleksa, omogućava se lakši prolaz kroz lipidni membranski sloj. Zbog svoje hidrofobne prirode kao primaran mehanizam delovanja ovog kompleksnog jedinjenja utvrđeno je da on može izazvati stres u endoplazmatičnom retikulumu ćelije, što dovodi do disfunkcije mitohondrije usled čega nastupa ćelijska smrt - apoptoza (Slika 10 a) [38].



Slika 10. Strukturne formule kompleksa iridijuma(III) sa N,N-ligandima

Još jedno značajno istraživanje iz 2019. godine pokazuje da različiti polazni fenilpiridinski kompleksi iridijuma(III) u reakciji sa ligandima fenantrolinskog tipa ispoljavaju vrlo jaku citotoksičnu aktivnost prema humanoj tumorskoj ćelijskoj liniji želuca - SGC-7901. Svi kompleksi

lokalizovani su u mitohondriji i imaju mogućnost generisanje ROS-a, što dovodi do ćelijske smrti - apoptoze tumorskih ćelija, a takođe u *in vivo* ispitivanju jedan kompleks je ispoljio veoma izražen antitumorski potencijal, jer je doveo do smanjenja tumora kod miša za samosedam dana (Slika 10 b) [39]. Sadler i saradnici došli su na ideju da se povežu iridijum(III) i platinu(IV) u jedno kompleksno jedinjenje, ne bi li na taj način ostvarili sinergijski efekat koji bi omogućio prevazilaženje prepreka poput visoke toksičnosti, rezistencije, lipofilnosti i rastvorljivosti u vodenim uslovima. Ovakvo kompleksno jedinjenje sadrži kinetički inertnu platinu(IV) koja je stabilna u mraku i poboljšava citotoksičnost, jer usled zračenja dolazi do generisanja azidil radikala i nastajanja platina(II) - DNK adukata. Sa druge strane dolazi do lakog generisanja pobuđenog stanja iridijuma(III) i stvaranja singletnog kiseonika usled zračenja plavom svetlošću na 465 nm što doprinosi fotocitotoksičnosti ovog jedinjenja. Upotrebom konfokalne mikroskopije na humanoj tumorskoj ćelijskoj liniji pluća - A549, utvrđeno je da je jedinjenje lokalizovano u mitohondriji i da dovodi do generisanja ROS-a, koji se nakon zračenja plavom svetlosti oslobađaju iz mitohondrije i šire po celoj ćeliji dovodeći do razaranja membrane jedra, nakon čega se platina(II)-adukti vezuju za DNK što za posledicu ima ćelijsku smrt (Slika 10 c) [40].

2.6. Renijum - metal nove generacije

Renijum su 1925. godine otkrili nemački naučnici Nodak, Take i Berg i dali mu ime po reci Rajni [41, 42]. S obzirom na to da je procenat renijuma u zemljinoj kori $10^{-7}\%$ smatra se vrlo dragocenim prelaznim metalom. Takođe u prirodi se nalazi u obliku smeše dva izotopa ^{185}Re i ^{187}Re [42, 43]. Nalazi se u 7. grupi PSE i može se naći u oksidacionim stanjima od -3 do +7. Usled velikog broja oksidacionih stanja u kojima se ovaj metal može naći, česta je pojava da se kao finalni proizvod reakcije dobije smeša jedinjenja renijuma, stoga je jako važno prilagoditi eksperimentalne uslove koji će biti ponovljivi [43, 44]. Različite renijumske vrste se mogu ponašati kao meka ili tvrda Luisova kiselina, pri čemu njegovi relativno stabilni, nezasićeni intermedijeri mogu biti donori ili akceptori elektrona. Stoga je polje organometalne i koordinacione hemije jedinjenja renijuma postalo veoma istraženo u poslednjoj deceniji [44, 45]. Veliku pažnju privukli su klasteri renijuma i polinuklearni kompleksi koji se mogu koristiti u heterogenoj katalizi. Komercijalno dostupna jedinjenja renijuma koja se najčešće koriste pri katalizi ili kao prekursori u hemijskim sintezama različitih oksidacionih stanja i geometrija prikazani su u Tabeli 2 [44, 45].

Tabela 2. Primeri komercijalno dostupnih jedinjenja renijuma (tabela preuzeta iz [44])

Oksidacioni broj	Geometrija kompleksa	Komercijano dostupno jedinjenje
VII (d⁰)	tetraedarska	[XReO ₄] X=Na, K, NH ₄
VI (d¹)	iskrivljeni oktaedar	[ReO ₃]
V (d²)	oktaedarska	[ReCl ₅] [ReOCl ₃ (PPh ₃) ₂]
IV (d³)	oktaedarska	[K ₂ ReCl ₆]
III (d⁴)	oktaedarska	[Re ₃ Cl ₉]
II (d⁵)	pseudo-oktaedarska	/
I (d⁶)	oktaedarska	[ReX(CO) ₅] X= I, Br, Cl
0 (d⁷)	oktaedarska	[Re ₂ (CO) ₁₀]

Jedinjenja renijuma viših oksidacionih stanja od VII do V uglavnom grade kompleksna jedinjenja sa okso, nitrido i imido tipom liganada, dok je za jedinjenja u kojima je renijum nižeg oksidacionog stanja karakteristično da ligandi budu elektron-donori poput halogenida, amina, fosfina i karbonila [44]. Istraživanja su pokazala da su na sobnoj temperaturi luminescentni derivati na bazi Re(CO)₃ pogodni za razvoj senzora i optičkih materijala. Poslednjih desetak godina najveću ekspanziju doživela je oblast organometalnih jedinjenja renijuma koja se mogu primenjivati u medicini i radioterapiji. Sve češće se ispituje antitumorski potencijal renijumskih kompleksa zbog njihove stabilnosti, strukturne raznolikosti i fizičko-hemijskih svojstava [46]. Uzimajući sve pomenuto u obzir, ne čudi da je broj publikacija vezanih za renijum rastao za 50% godišnje od 1990. godine do sada [45].

2.6.1. Kompleksi renijuma(I) i njihova primena u medicinskoj hemiji

Još davne 1940. godine kada je Valter Hiber sintetisao i okarakterisao organometalna karbonilna jedinjenja renijuma, proučavao je i uticaj supstitucije jednog karbonila sa halogenidom. Tako je nastao fragment kompleksnog jedinjenja [ReI(CO)₃]⁺ koji se pokazao kao veoma stabilan u prisustvu koordinujućih rastvarača kao i razblažene hlorovodonične kiseline. Ovakvo saznanje ukazuje na to da se u zavisnosti od prirode i izbora liganada kod ovako stabilnih i kinetički inertnih karbonilnih kompleksa renijuma može uticati na ispoljavanje luminescencije, što ih čini pogodnim za fotosenzitizere i agense koji se mogu koristiti u dijagnostici [47]. Jedinjenja koja su ispoljila

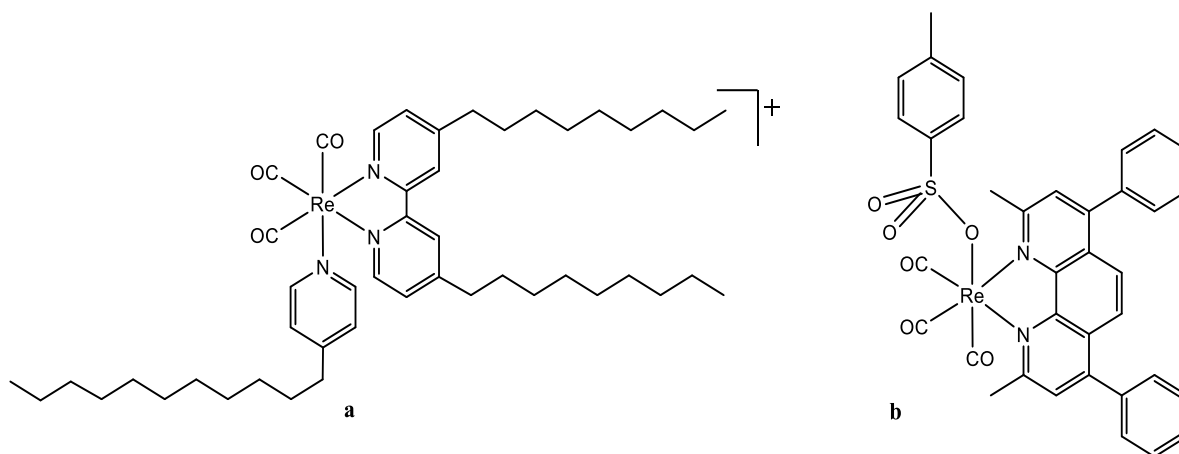
najbolju citotoksičnost i luminescenciju u svom sastavu imaju $\text{Re}(\text{CO})_3$ fragment, što omogućava koordinaciju različitih funkcionalnih grupa liganada. Pokazalo se da se su ovakva kompleksna jedinjenja pogodna da izvrše brže i dublje prodiranje ćelije, kao i da je njihov citotoksični potencijal proporcionalan njihovoj lipofilnosti [48]. Na osnovu DFT (eng. Density Functional Theory) proračuna potvrđeno je da stabilnosti renijum(I) karbonil kompleksa doprinose upravo ligandi koji poseduju sledeće donorske atome: $\text{N} > \text{S} > \text{O}$, s toga i ne čudi to što je najveći broj novosintetisanih kompleksnih jedinjenja upravo sa N,N-tipom liganada [47]. Zbog toga nije iznenađujuće to da su najveću antiproliferativnu aktivnost ispoljila kompleksna jedinjenja opšte formule $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bisimin})\text{L}]$, gde je L= monodentatni derivat piridina ili halogenid. Kao piridinski derivati najčešće su korišćeni 2,2'-bipiridin ili derivati na bazi fenantrolina. Mnoga kompleksna jedinjenja sa ovakvim ligandima ispoljila su istu ili čak bolju citotoksičnu aktivnost od *cisplatin*e [49].

2.6.1.1. Pregled biološki aktivnih kompleksa renijuma(I) u *in vitro* i/ili *in vivo* uslovima i njihove biološke mete

Jedna od mogućih bioloških meta karbonilnih kompleksa renijuma(I) koji ne poseduju labilne ligande jeste molekul DNK. Ovi kompleksi mogu ostvariti nekovalentne interakcije posredstvom interkalacije ili vezivanjem za manji žleb (eng. minor groove) DNK molekula [20]. U studiji iz 2014. godine pokazano je da se citotoksični efekat može poboljšati i do četiri puta, u odnosu na polazni renijumski kompleks, ako se za renijum(I) kao ligand koordinuje fendion - derivat 1,10-fenantrolina. *In vitro* citotoksičnost je ispitana na humanim tumorskim ćelijskim linijama : PC3 - prostate, MFC-7 - dojke i T98G - glioblastoma. Rezultati ukazuju da je fendion kao nekoordinovani ligand izuzetno toksičan, čak više i od *cisplatin*e, dok je polazni karbonilni kompleks renijuma u potpunosti neaktivan, ali ono što je vredno pomena je da je kompleksno jedinjenje renijuma(I) sa fendionom ispoljilo umerenu citotoksičnu aktivnost $\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$ na svim pomenutim ćelijskim linijama. Uz pomoć UV-Vis titracija i gel elektroforeze utvrđeno je da se ovo kompleksno jedinjenje vezuje za oba lanca molekula DNK, pri čemu ne dolazi do narušavanja njegove strukture, potpuno drugačije od fendiona, koji ima tendenciju da se interkalira između lanaca DNK [50]. Balakrishnan i saradnici su zaključili da kada se za renijum(I) karbonil koordinuju bipiridin i kao aksijalni ligand piridin, pri čemu oba liganda kao supstituente imaju dugačke hidrofobne alkil nizove koji doprinose lipofilnosti kompleksa, dolazi do poboljšanja citotoksičnosti na obe humane tumorske ćelijske linije limfoma (Raji) i T-limfocita (Jukart). Interkalacija između baznih parova manjeg žleba (eng. minor groove) molekula telećeg DNK potvrđena je UV-Vis titracijama, gel elektroforezom, cirkularnim dihroizmom

i računarskim proračunima (eng. molecular docking). Utvrđeno je da što je duži hidrofbni alkil niz, to su jače π - π interakcije pri čemu kompleksno jedinjenje dovodi do stabilizacije B-forme DNK molekula. Teorijskim proračunima je potvrđeno da se ove interakcije ostvaruju najviše u manjem žlebu (eng. minor groove) DNK, u regiji koju čine bazni parovi G - C zbog hidrofbnih interakcija koje su omogućene funkcionalnim grupama baznog para i što dužeg alkil niza renijum(I) kompleksa (Slika 11 a) [51].

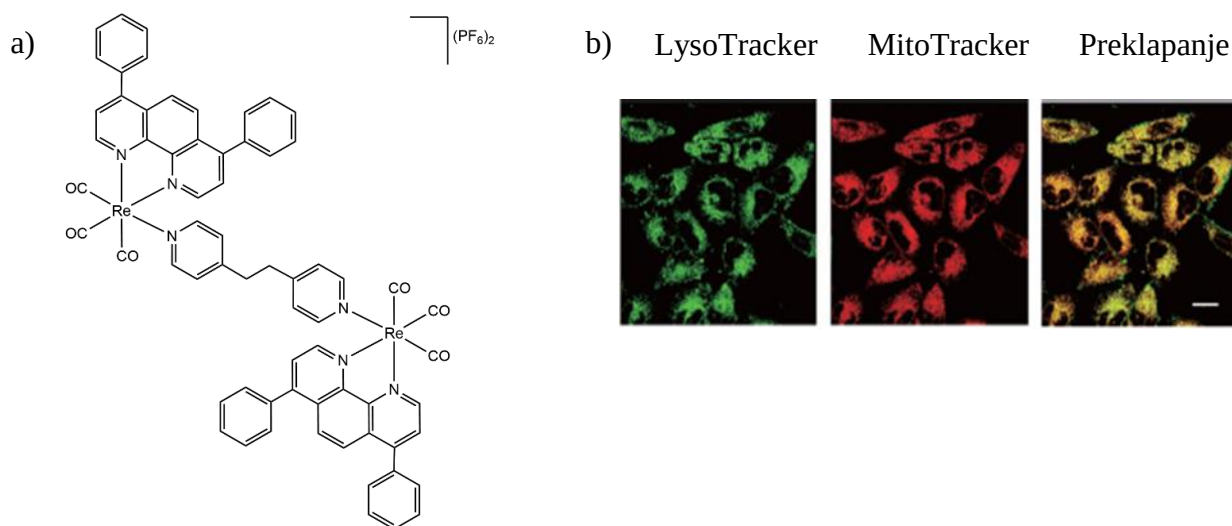
Da za renijum(I) ne moraju biti koordinovani samo N,N - ligandi govori i studija iz 2018. godine. U tom istraživanju su pored dobro poznatih derivata fenantrolina kao bidentatnog ligandnog sistema, korišćeni i monodentatni ligandi poput sulfonato i karboksilato jedinjenja kao što su: *p*-toluensulfonato, 1-naftalensulfonato, 2-naftalensulfonato, pikolinato, derivati nikotinske kiseline, N-acetiltiptofanato, acetilsalicilato, fulfenamato, ibuprofenato, mefenamato, tolfenamato, naproksenato, pri čemu je napravljena serija od 12 kompleksnih jedinjenja. Sva novosintetisana jedinjenja ispoljila su jaku *in vitro* citotoksičnost prema humanim tumorskim ćelijama dojke (MDA-MB-231 i MCF-7), od čega je nekoliko jedinjenja imalo $IC_{50} < 0,50 \mu M$. Dobro poznatim eksperimentima je utvrđeno vezivanje ovih kompleksnih jedinjenja za DNK molekul izolovan iz teleta. Pomoću UV-Vis titracija pokazano je da pri interkalaciji dolazi do hiperhromnog i batohromnog pomeranja usled interakcije π -orbitale baznog para i π^* -antivezivne orbitale iz aromatične hromofore liganda (Slika 11 b) [52].



Slika 11. Strukturne formule kompleksa renijuma(I) sa N,N-ligandima.

Pored DNK molekula kao biološke mete izdvajaju se još i ćelijske organele poput mitohondrije i lizozoma. Mitohondrija je ćelijska organela koja obezbeđuje energiju jer učestvuje u stvaranju ATP-a (adenozin-trifosfata) putem procesa koji se naziva oksidativna fosforilacija, dok lizozom učestvuje u razgradnji ćelijskih makromolekula i drugih delova ćelije. Obe organele imaju ključnu ulogu u procesu ćelijske smrti, dok njihova disfunkcija omogućava dalji opstanak i deobu

tumorskih ćelija [53]. Stoga je pri ispitivanju novosintetisanih kompleksnih jedinjenja jako važno odrediti lokalizaciju u ćeliji i potencijalni mehanizam indukcije ćelijske smrti. Je i saradnici su sintetisali četiri nova mono- i bi-nuklearna fosforescentna jedinjenja renijuma(I) sa dobro poznatim aromatičnim N,N-ligandima na bazi fenantrolina. *In vitro* citotoksičnost ispitana je uz pomoć kolorimetrijskog testa inhibicije rasta - MTT metode (MTT je 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid), pri čemu su tri jedinjenja ispoljila vrlo jak citotoksični potencijal na više humanih tumorskih ćelijskih linija: HeLa (grlić materice), A549 i A549R (pluća), HepG2 (jetra) i na zdravoj ćelijskoj liniji LO2 (jetra fetusa). Da bi potvrdili lokalizaciju novosintetisanih kompleksa uz pomoć konfokalne mikroskopije na HeLa ćelijskoj liniji, sva četiri kompleksa inkubirana su zajedno sa reafensom za bojenje lizozoma (LysoTracker) odnosno mitohondrija (MitoTracker), pri čemu se došlo do interesantnog zaključka koji je usko povezan sa lipofilnošću renijumskih kompleksa. Naime, za dva kompleksa renijuma(I), čija je vrednost $\log P$ između -5 - 0 potvrđena je lokalizacija u lizozomima, dok su dva jedinjenja, čiji je $\log P$ između 0 - 5, lokalizovana u mitohondrijama. Na osnovu ovih saznanja, dalji eksperimenti su pokazali da je kod kompleksa sa nižom lipofilnošću glavni mehanizam delovanja apoptoza, dok je kod kompleksa veće lipofilnosti to paraptoza - programirana ćelijska smrt kod koje izostaje fragmentacija DNK molekula, pri čemu dolazi do uvećanja mitohondrija i endoplazmatičnog retikuluma (Slika 12) [53, 54].

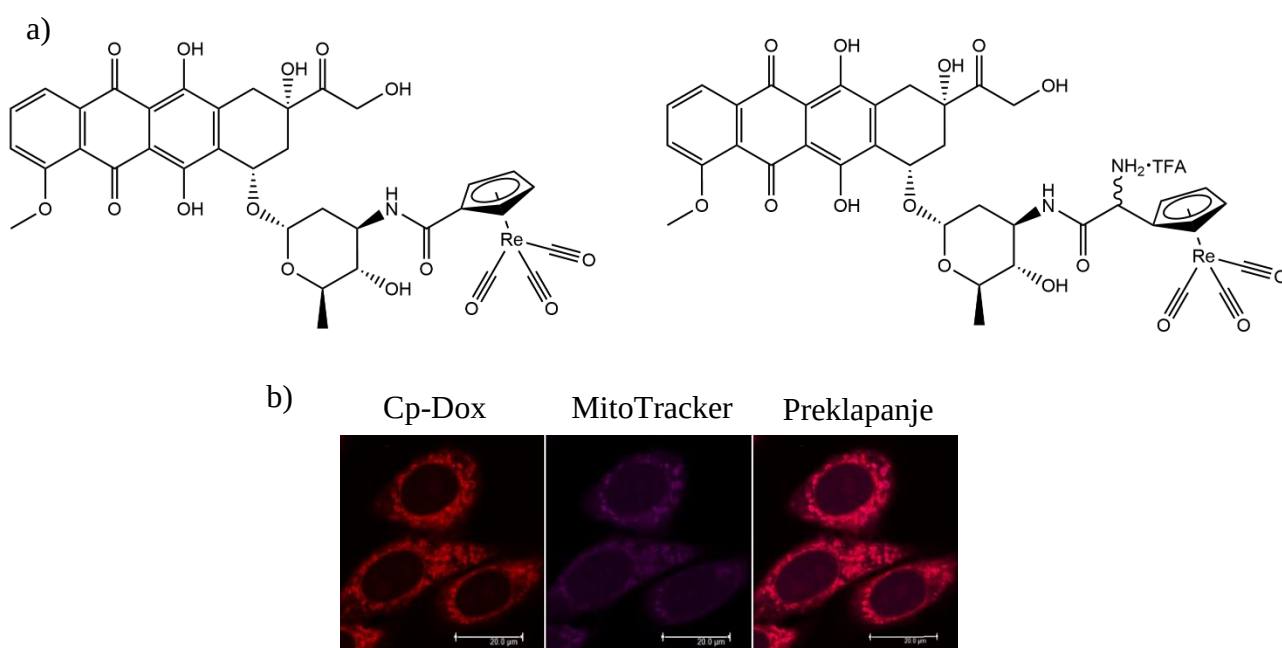


Slika 12. a) Strukturna formula binuklearnog kompleksa renijuma(I) b) Konfokalna mikroskopija na HeLa ćelijskoj liniji (slika preuzeta iz [53])

Oksidativni stres dovodi do stvaranje ROS-a, što je jedan od bitnih procesa koji se odvija u mitohondriji, pri čemu dolazi do proliferacije i diferencijacije ćelija usled čega nastupa apoptoza. Polazeći od ovakve hipoteze naučnici su sintetisali kompleksna jedinjenja trikarbonilrenijuma(I) sa

2-acetilpiridin-fenilhidrazonom i *para*-nitrofenilhidrazonom, međutim, došli su do interesantnog zapažanja. Oba jedinjenja su aktivna prema humanoj tumorskoj ćelijskoj liniji pluća - NCI-H460 a rezultatiprotočne citometrije pokazuje da dolazi do indukovanja apoptoze, kao posledica oštećenja mitohondrije. Znajući ovo, urađen je i eksperiment proizvodnje ROS-a, gde se došlo do interesantnog zaključka da su, zapravo, oba kompleksa ispoljila jače antioksidativno dejstvo pri čemu dolazi do smanjenja koncentracije ROS-a čak i pri malim koncentracijama upotrebljenog kompleksa [55].

Da renijumski kompleksi mogu uticati i na promenu primarne mete i mehanizma dejstva, u cilju prevazilaženja rezistencije dobro poznatog leka, govori studija Žila Gasera i saradnika iz 2016. godine. Doksorubicin je organsko jedinjenje koje se upotrebljava kao citostatik za mnoge vrste kancera, nalazi se u jedru ćelije pri čemu dovodi do inhibicije topoizomerase II usled interkalacije sa DNK molekulom. Kvantifikacija novosintetisanih konjugata doksorubicina sa renijum ciklopentadienil kompleksima utvrđena je ICP-MS-om na HeLa ćelijskoj liniji. Analizom je potvrđena akumulacije oba derivata renijuma u mitohondriji, što je utvrđeno konfokalnom mikroskopijom (Slika 13) [56].

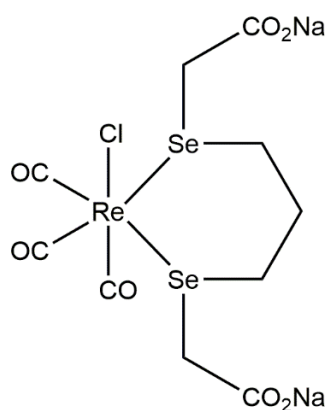


Slika 13. a) Strukturne formule Cp-Dox i Cp-N-Dox b) Konfokalna mikroskopija na HeLa ćelijskoj liniji (slika preuzeta iz [56])

Oba kompleksna jedinjenja su veoma lipofilna pri čemu je jedno kompleksno jedinjenje i protonovano na fiziološkom pH. Vrlo dobro je poznato da se jedinjenja visoke lipofilnosti i katjenskog karaktera najčešće nalaze u mitohondriji. Pored ovih saznanja proučen je i uticaj

renijumskih kompleksa na potencijal membrane mitohondrije pomoću protočne citometrije na HeLa ćelijskoj liniji. Ovom analizom otkriveno je da nakon inkubacije od 48 h oba kompleksa dovode do značajne promene potencijala membrane mitohondrije, što nije slučaj kod samog doksorubicina. Pored svih ovih zapažanja, utvrđeno je da oba kompleksa mogu da se vežu za DNK i da dovode do inhibicije topoizomeraze II. Zbog svih prethodno navedenih svojstava, otkriveno je da oba kompleksa indukuju programiranu ćelijsku smrt - apoptozu, a direktna potvrda ovakvog zaključka je jak citotoksični potencijal prema HeLa ćelijskoj liniji sa IC_{50} vrednostima u nanomolarnom opsegu [56].

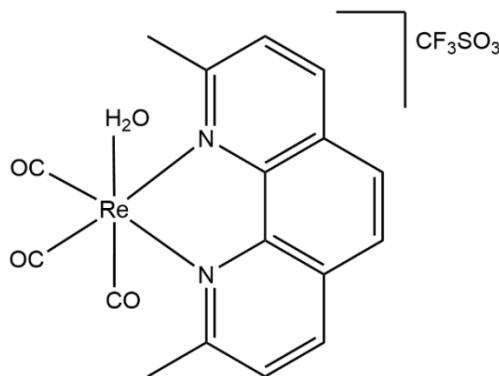
Još 2011. godine su Kermagoret i saradnici sintetisali diselenato renijum(I) kompleksna jedinjenja i ispitali njihov citotoksični potencijal na četiri različite humane tumorske ćelijske linije, pri čemu se jedan kompleks izdvojio kao najaktivniji na ćelijskoj liniji tumora dojke MCF-7 sa IC_{50} vrednosti od 4,75 μ M. Ono što u strukturnom pogledu izdvaja ovaj kompleks jeste da pored koordinacije selena za metalni centar poseduje i dve karboksilne funkcionalne grupe koje mogu biti transformisane u dinatrijum karboksilat, koji je rastvoran u vodi što omogućava bolji transport u ćeliju (Slika 14) [57].



Slika 14. Strukturna formula diselenato renijum(I) kompleksa.

Motivisani ovim otkrićem Koler i saradnici su 2015. godine izvršili prvo ikada *in vivo* testiranje kompleksnog jedinjenja renijuma(I). Zbog ispoljenog jakog citotoksičnog efekta, dobre rastvorljivosti, stabilnosti i lipofilnosti, upravo je diselenato renijum(I) izabran kao idealan kandidat za testiranje na modelu miševa, koji su prethodno tretirani sa humanom tumorskom ćelijskom linijom dojke - MDA-MB-231. Doza od 10 mg/kg se pokazala bezbednom na miševima koji su bili tretirani ovim kompleksom dnevno u vremenskom periodu od četiri nedelje. Kao rezultat ovog testiranja uočeno je da dolazi do smanjenja veličine tumora [58].

Da je izbor liganda važan pokazuje i naučni rad Knopfa i saradnika iz 2017. godine u kojem je ispitano sedam novih jedinjenja trikarbonil renijuma(I) koja su dobijena zamenom hloridnog liganda sa akva ligandom, opšte formule $fac-[Re(CO)_3(diammin)(H_2O)](CF_3SO_3)$ u cilju poboljšavanja rastvorljivosti jedinjenja, kako bi bili što pogodniji za biološka ispitivanja. Kao najaktivniji kandidat prema HeLa ćelijskoj liniji i nekoliko ćelijskih linija koje su rezistentne na *cisplatinu*, izdvojilo se jedinjenje koje kao ligand poseduje 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Slika 15) [59].

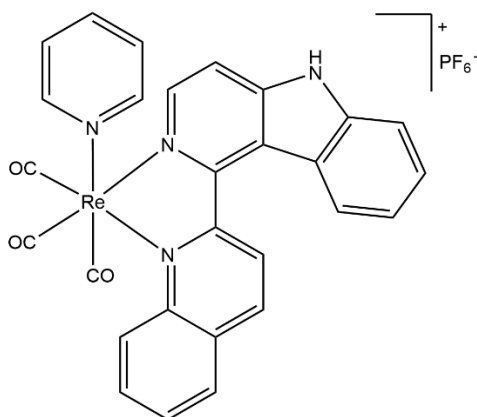


Slika 15. Strukturna formula $fac-[Re(CO)_3(diammin)(H_2O)](CF_3SO_3)$.

Konfokalom mikroskopijom na HeLa ćelijskoj liniji potvrđeno je da se ovo jedinjenje ne nalazi ni u mitohondriji, jedru ili endoplazmatičnom retikulumu, već u vakuolama citoplazme. Jedinjenje je takođe inkubirano i sa indikatorom za lizozom (LysoTracker) da bi se utvrdila njegova kolokalizacija, pri čemu je otkriveno da vakuole imaju slična svojstva kao i lizozomi. Vredno pomena je i saznanje da ovo jedinjenje ne dovodi do proizvodnje ROS-a u intracelularnom prostoru. Za potrebe *in vivo* analiza, sintetisan je analog ovog kompleksnog jedinjenja sa tehnicijumom kao metalnim centrom i to ^{99m}Tc koji se koristi u radiomedicini. Ovo jedinjenje je ubrizgano u miševе u dozi od 0,10 $\mu\text{mol/kg}$, paralelno sa tim je u istoj dozi jedinjenje renijuma(I) dato drugoj grupi miševa i praćena je njihova biodistribucija u različitim vremenskim intervalima u srcu, jetri, krvi, bubrezima, kostima, urinu i mišićima. Koncentracija oba metala praćena je ICP-MS-om i utvrđeno je da se renijum(I) ponaša kao i ^{99m}Tc analog, što znači da se ovo jedinjenje potencijalno može koristiti u dijagnostici. Takođe u toku različitih vremenskih intervala primećeno je da se akva ligand menja hloridnim u uzorcima krvne plazme i urina. Ovo ukazuje da je distribucija jedinjenja renijuma(I) u tumorskim ćelijama omogućena izmenom aksijalnog liganda [59].

Dva kompleksa trikarbonil renijuma(I) sa piridinom i β -karbonilnim derivatima ispoljila su jak antitumorski potencijal na više humanih tumorskih ćelijskih linija, a čak su aktivnija od *cisplatinе*

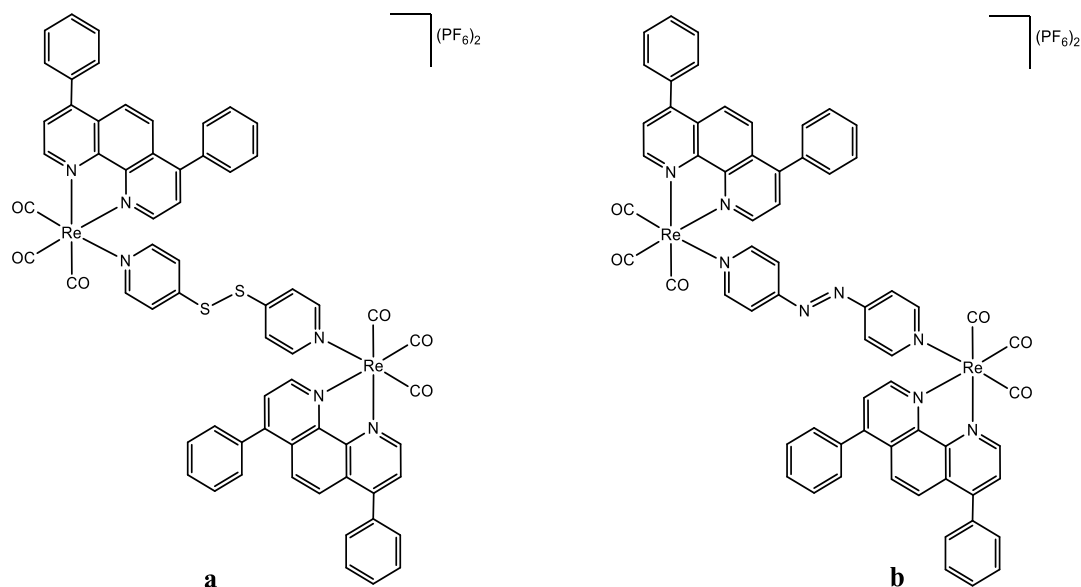
na ćelijskoj liniji pluća koja je rezistentna na *ciplatinu* - A549R. Takođe je veoma važnoda su oba kompleksa manje toksična prema zdravoj ćelijskoj liniji u odnosu na tumorske ćelijske linije. Pomoću fluorescentne mikroskopije je potvrđeno da najaktivniji kompleks dovodi do disfunkcije lizozoma, jer dolazi do smanjene aktivnosti lizozomne hidrolaze - katepsina B. Western blot analizom na ćelijskoj liniji A549, utvrđeno je da kompleks renijuma(I) inkubiran sa proteinom LC3B dovodi do blokade autofagije. Renijum(I) kompleks uzrokuje disfunkciju lizozoma, pri čemu dolazi do nagomilavanja proteina LC3B, čime je dalji mehanizam autofagije blokiran. Ovo je prvo do sada u literaturi opisano jedinjenje renijuma(I) kod kojeg je indukcija apoptoze povezana sa zaustavljanjem procesa autofagije (Slika 16) [60].



Slika 16. Strukturna formula kompleksa trikarbonil renijuma(I) sa β -karbonilnim derivatom

In vivo analiza ukazuje da dolazi do smanjenja veličine tumora u toku od 21 dan, kod miševa tretiranih ćelijskom linijom A549 na kojima je ispitivan uticaj kompleksnog jedinjenja renijuma(I) [60].

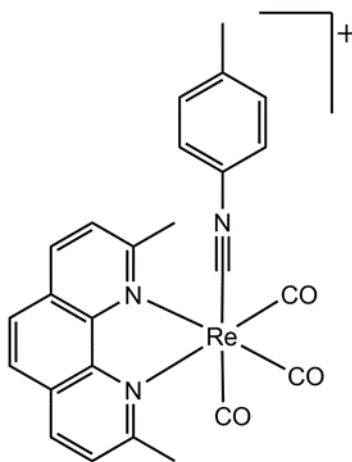
U cilju što boljeg transporta u ćelijama dva lipofilna, binuklearna renijum(I) kompleksa opšte formule $[\text{Re}_2(\text{CO})_6(\text{dip})_2\text{L}](\text{PF}_6)_2$ (dip = 4,7-difenil-1,10-fenantrolin; L = 4,4'-azopiridin (ReN) ili 4,4'-ditiopiridin (ReS)) su sintetisana i ispitana u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Slika 17 a i b) [61].



Slika 17. Strukturne formule binuklearnih kompleksa renijuma(I)

Oba jedinjenja su ispoljila do sada najbolju zabeleženu citotoksičnost, kada su jedinjenja renijuma(I) u pitanju, prema nekoliko humanih tumorskih ćelijskih linija. Kompleksno jedinjenje koje sadrži 4,4'-ditiopiridin kao ligand je pokazalo bolju aktivnost od *cisplatin*e na humanoj tumorskoj ćelijskoj liniji pluća - A549. Takođe je vredno pomena da oba jedinjenja imaju potencijal da prevaziđu rezistentnost *cisplatin*e na humanoj tumorskoj ćelijskoj liniji pluća, koja je rezistentna na *cisplatinu* - A549R. Fluorescencijom na HeLa ćelijskoj liniji utvrđena je akumulacija oba kompleksna jedinjenja u mitohondriji, pri čemu dolazi do promena u strukturi organela kao i do disfunkcije potencijala membrane mitohondrije. Zbog ovakvog efekta koji oba jedinjenja ispoljavaju dolazi do nagomilavanja ROS-a u mitohondriji, što za direktnu posledicu ima izazivanje ćelijske smrti - apoptoze, što je potvrđeno pomoću ćelijskog ciklusa i protočne citometrije na HeLa ćelijskoj liniji. Usled ovakvih promena dolazi i do poremećaja u metabolizmu mnogih enzima, a takođe dešava se i oksidacija glutationa – GSH, pri čemu nastaje njegov oksidovani oblik – GSSG, koji onda reaguje sa glutation peroksidazom što utiče na redoks-zavisne enzime. Kada se jedinjenja renijuma(I) inkubirana 12 h sa HeLa ćelijskom linijom, primećeno je da dolazi do smanjenja nivoa GSH/GSSG, dok se nivo $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ povećava, što ukazuje da ovi kompleksi mogu uticati na metabolizam enzima i redoks zavisnih vrsta. Za potrebe *in vivo* istraživanja, miševi su prvih 9 dana bili tretirani kompleksima renijuma(I) u dozi od 5 mg/kg, pri čemu je 19. dana primećeno da oba kompleksa dovode do smanjenja veličine tumora, pri čemu nije primećeno da je došlo do bilo kakvih patoloških promena kod miševa [61].

Još jedno istraživanje iz 2020. godine bavilo se ispitivanjem uticaja aksijalnog liganda na bazi derivata izonitrila, pri čemu je sintetisano 11 različitih renijum(I) kompleksnih jedinjenja sa N,N-tipom liganada. *In vitro* analizom na HeLa ćelijskoj liniji, utvrđeno je da su sva jedinjenja ispoljila citotoksičnu aktivnost sa IC₅₀ vrednostima u rangu od 1,2 do 53 µM (Slika 18) [62].



Slika 18. Strukturna formula kompleksa renijuma(I) sa izonitrilom

Izvedeni su sledeći zaključci: najaktivnija su jedinjenja koja poseduju elektron-donorske grupe na polipiridinskim prstenovima, dok je najmanja aktivnost primećena kod jedinjenja sa elektron-privlačnim grupama kao što je trifluorometil, dok se ispostavilo da izonitril kao aksijalni ligand nema prevelikog uticaja na citotoksični efekat. Takođe je vredno napomenuti da je lipofilnost ispitivanih jedinjenja u skladu sa citotoksičnošću i elektronskim efektima. Konfokalnom mikroskopijom na HeLa ćelijskoj liniji pokazano je da su kompleksi renijuma(I) lokalizovani u mitohondriji sa tendencijom deobe jedne mitohondrije na dve, što dovodi do oticanja i stresa u endoplazmatičnom retikulumu (ER). Kao još jedna potvrda da pomenuta jedinjenja mogu izazvati stres u endoplazmatičnom retikulumu, urađen je i Western blot, gde su sva jedinjenja dovela do povećanja ekspresije proteina CHOP, koji je odgovoran za regulaciju funkcije ER. Za potrebe *in vivo* analize sintetisani su analozi ovih jedinjenja sa tehnicijumom i praćena je njihova biodistribucija kod miševa. Kompleks renijuma(I) i analog tehnicijuma se akumuliraju u bubrezima i delimično u jetri, dok je akumulacija druga dva para analoga primećena u srcu i plućima. Pošto je biodistribucija kompleksa renijuma(I) i tehnicijumskih analoga veoma slična, smatra se da bi renijum(I) jedinjenja mogla da se koriste u medicini u oblasti dijagnostike i radioterapije. Zbog odličnog citotoksičnog potencijala ovih jedinjenja, ispitan je i efekat smanjenja veličine tumora na humanoj tumorskoj ćelijskoj liniji jajnika - A2780 u *in vivo* uslovima na miševima. Miševi su bili tretirani različitom koncentracijom najaktivnijeg jedinjenja renijuma(I) u toku 27 dana. U ovom vremenskom roku

primećeno je da niže koncentracije leka ne dovode do inhibicije rasta tumora i da je optimalna doza pri kojoj dolazi do smanjenja veličine tumora 20 mg/kg [62].

2.6.2. Kompleksna jedinjenja renijuma(V) i njihova primena

Oksorenijum(V) kompleksi našli su se u centru pažnje prvi put 1967. godine, kada su Wilkinson i Čat uspeali da koordinuju terciarni fosfin za renijum(V). Sinteza podrazumeva redukciju renijuma(VII) u obliku perrenata koncentrovanom HCl, pri čemu nastaje kompleksno jedinjenje renijuma(V), zelene boje, *trans* konfiguracije, formule $[\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2]$. Ovakvo kompleksno jedinjenje oktaedarske geometrije se može koristiti kao polazni kompleks pri sintezi novih oksorenijum(V) kompleksa sa veoma raznovrsnim ligandnim sistemima. Pri reakciji sa mono ili polidentatnim ligandima dolazi do supstitucije hlora i trifenilfosfin liganada. Stoga su poslednjih decenija oksorenijum(V) kompleksna jedinjenja našla primenu kao katalizatori za različite transformacije poput aldolne kondenzacije, epoksidacije olefina i redukcije perhlorata. Takođe, sve više interesovanja privlači i primena ovih kompleksa u biomedicinske svrhe [63].

2.6.2.1. Katalitička primena oksorenijum(V) kompleksa

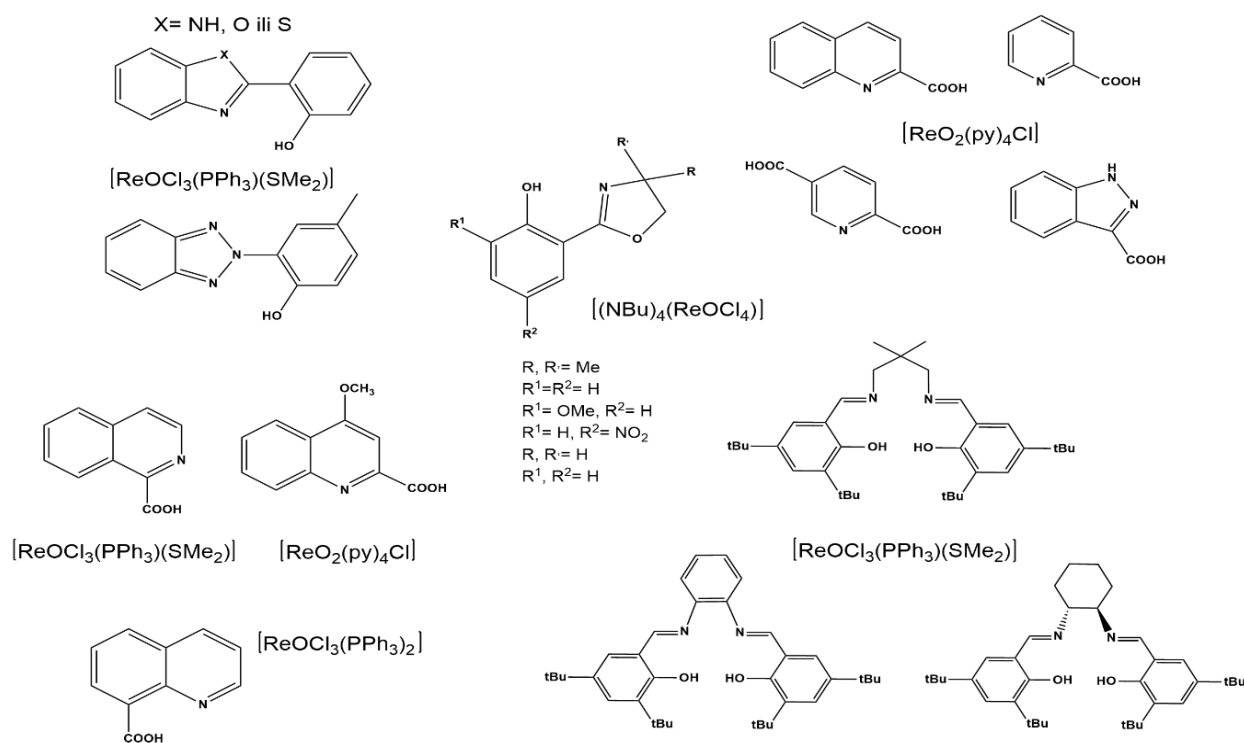
Zbog svoje stabilnosti, oksorenijum(V) kompleksi čine pogodne kandidate za katalitičke reakcije, kao što je epoksidacija olefina. Više različitih naučnih studija na ovu temu je publikovano u poslednjih 20 godina, gde su kao ligandni sistemi korišćena jedinjenja poput pirazola, fenolata, naftolata, acetilacetonata, β -ketoimina, tetradentatnih Šifovih baza, oksazolinilmetoksido derivata, međutim, rezultati su pokazali nižu katalitičku aktivnost u odnosu na jedinjenja renijuma(VII). Stoga je u poslednjoj deceniji sve više publikacija usmereno ka sintezi novih, efikasnijih kompleksa oksorenijuma(V), koji će ukloniti prethodne nedostatke. Poznato je da oksorenijum(V) kompleksi učestvuju u katalitičkoj reakciji prenosa atoma kiseonika sa piridin N-oksida na fosfine. Mačura i saradnici su razvili jedinjenja oksorenijuma(V) na bazi fenolata i karboksilata, koja su stabilna na vazduhu i otporna na vlagu kako na sobnoj temperaturi tako i u rastvoru do nekoliko dana. Svi kompleksi su testirani u reakciji epoksidacije ciklooktena, pri čemu je procenat konverzije bio između 58 i 75% [64]. U još jednom istraživanju Mačure i saradnika iz 2013. godine u svrhu epoksidacije ciklooktena i stirena ispitana su jedinjenja sintetisana od različitih polaznih oksorenijum(V) kompleksa, gde su kao ligandi upotrebljeni hinolin i izohinolin karboksilne kiseline. Svi kompleksi

su stabilni na vazduhu na sobnoj temperaturi i otporni na vlagu, a reakcija epoksidacije ciklooktena i stirena izvedena je na različitim temperaturama i vremenskim intervalima. Analizom rezultata zaključeno je da ovi kompleksi oksorenijuma(V) nemaju uticaj na epoksidaciju stirena, dok se pri temperaturi od 50 °C nakon 24 h može postići konverzija ciklooktena i do 68% [65].

Da za jon renijuma ne moraju uvek biti koordinovani bidentatni ligandi govori i naučni rad Cvetlera i saradnika iz 2016. godine u kojoj je kao ligandni sistem izabran tetradentatni iminofenolat sa različitim supstituentima na N,N-donorskim atomima. Ovi kompleksi se mogu koristiti kao i prethodni za epoksidaciju ciklooktena, ali takođe i za redukciju perhlorata. Perhlorati su visoko štetni polutanti koji ispoljavaju štetne efekte po ljudsko zdravlje i životnu sredinu, te je od velike važnosti izvršiti njihovu redukciju u hloride. Redukcija perhlorata u prisustvu organskih sulfida pokazala je da je kompleks koji poseduje dimetilpropil grupu u mostu, jedini koji je pokazao umerenu aktivnost na sobnoj temperaturi, pri čemu se prinos reakcije poboljšao kada je temperatura povećana na 50 °C. Pretpostavlja se da su razlozi umerene aktivnosti ovog kompleksa upravo sterna i elektronska svojstva *terc*-butil grupe, koja smanjuje katalitičku moć ovog jedinjenja. Jedinjenje u kome je okso grupa u *trans* položaju u odnosu na hlorido ligand je očekivano najneaktivnije, jer su prethodna istraživanja pokazala da je *cis* konformacija ključna za katalitičku aktivnost. Ovakvi rekcioni uslovi uglavnom pogoduju kompleksnim jedinjenjima *cis* konfiguracije, međutim u ovom radu je pokazano da upravo *cis* izomer ispoljava jako slab katalitički potencijal, što je veoma interesantan zaključak. Što se tiče epoksidacije ciklooktena, ona je praćena u različitim rastvaračima pri različitim temperaturama, pri čemu su sva jedinjenja pokazala umereni prinos konverzije u prinosu od 50 do 70% u toluenu u prvih 7 sati eksperimenta. Pored ovih eksperimenata ispitana je i sposobnost prenosa atoma kiseonika iz DMSO-a na trifenilfosfin u deuterisanom benzenu u toku 24 h, pri čemu su najveće razlike primećene između *cis* i *trans* oksorenijum(V) kompleksa. Kod kompleksa *cis* konfiguracije uopšte ne dolazi do oksidacije trifenilfosfina, dok je kod kompleksa u kom su hlorido i okso grupa u *trans* položaju dolazi do potpune oksidacije trifenilfosfina u trifenilfosfin - oksid [66].

Rad Šahnera i saradnika iz 2019. godine govori da su kompleksi na bazi fenol-dimetiloksazolinskih liganda idealni kandidati kako za epoksidaciju ciklooktena tako i za redukciju perhlorata do hlorida u vodenim uslovima. Pri reakciji epoksidacije, različiti stereoizomeri su imali sličnu katalitičku aktivnost, što znači da stereohemija nije imala značajan uticaj. Kao najbolji katalizatori pokazali su se kompleksi oksorenijuma(V) sa ligandima koji u svojoj strukturi poseduju elektron-donorske grupe, dok je najaktivnije bilo jedinjenje koje kao supstituent poseduje NO₂ elektron- akceptorsku grupu gde je stepen konverzije ciklooktena bio 80. Ovi rezultati su u skladu sa podacima dobijenim cikličnom voltametrijom. Kod redukcije perhlorata posredstvom organskih

sulfida, stereochemija ima veoma bitan uticaj na katalitičku aktivost. Jedinjenje u kome su N,N donorski atomi iz liganada u *trans* položaju pokazalo se kao najaktivnije dok je njegov *cis* izomer bio potpuno neaktivan [67]. Prikaz polaznih kompleksa oksorenijuma(V) i različitih ligandnih sistema korišćenih u katalitičke svrhe nalazi se na Slici 19 [64-67].



Slika 19. Prikaz strukturnih formula ligandnih sistema i polaznih kompleksa oksorenijuma(V) korišćenih u katalitičke svrhe [64-67]

2.6.2.2. Kompleksi oksorenijuma(V) u nuklearnoj medicini

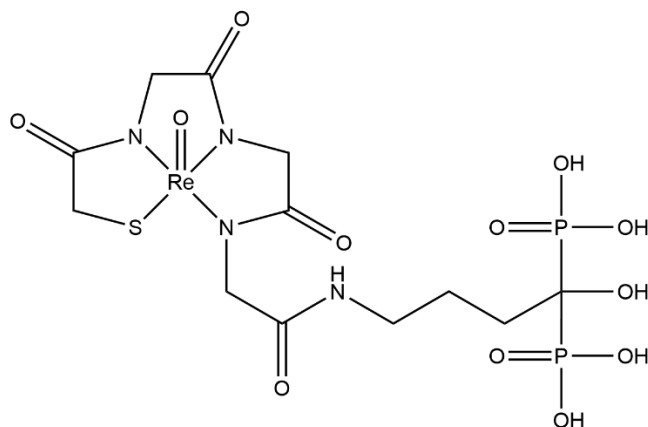
Nuklearna medicina predstavlja granu medicine u kojoj se radioaktivni izotopi elemenata koji se nalaze u sklopu namenski dizajniranog molekula koji ima ulogu nosača, koriste za tretiranje tumorskog tkiva bez izazivanja oštećenja na zdravom okolnom tkivu. Tradicionalan pristup je podrazumevao korišćenje izotopa poput ¹⁸F, ¹⁵O, ¹³N, ¹¹C, ¹³¹I, ali je njihova primena veoma ograničena zbog njihove rasprostranjenosti, kao i njihovog kratkog vremena polu-života. Stoga da bi se ovakve prepreke prevazišle, došlo je do razvoja novih radiofarmaceutika. Do 2012. godine je 41 radiofarmaceutik bio odobren od strane FDA od čega je 14 jedinjenja bazirano na izotopima poput

^{18}F , ^{11}C , ^{14}C , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{13}N , dok je ^{16}O jedinjenja u svojoj strukturi imalo $^{99\text{m}}\text{Tc}$, koji je najrasprostranjeniji radiofarmaceutik do danas, a koji emituje γ zračenje [68]. Na biodistribuciju kod radiofarmaceutika na bazi metala i nosača utiče lipofilnost, naelektrisanje i veličina. Izbor metala je jako važan faktor, jer upravo oksidaciono stanje metala, geometrija oko metalnog centra, radijus, atomski broj i naelektrisanje doprinose izboru nosača koji bi kao donorske atome trebalo da poseduje N, S ili O atome. Savršen spoj se ostvaruje ako je jedinjenje kinetički inertno i termodinamički stabilno [69]. Mehanizam delovanja radiofarmaceutika na tumorske ćelije se sastoji od radiometala koji se vezuje za molekul nosača i koji pod uticajem emisije jake energije radijacije dovodi do nepopravljivih oštećenja na DNK molekulu, pri čemu izaziva smrt tumorske ćelije. Najčešći emitovane čestice su α i β čestice [68, 69].

Pored tehnecijuma poslednjih decenija se izdvojio renijum, koji poseduje dva radio izotopa ^{186}Re i ^{188}Re . Renijum i tehnecijum nalaze se u istoj grupi PSE, a poseduju vrlo slične fizičko-hemijska svojstvazbog lantanoidne kontrakcije koja se javlja kod metala druge i treće grupe prelaznih metala. Zbog ovoga tehnecijum i renijum su uporedivi u smislu veličine, naelektrisanja, dipolarnog momenta, lipofilnosti, pa ne čudi sve češća upotreba radioizotopa renijuma u nuklearnoj medicini. U oksidacionom stanju +7 veoma stabilan tetradentatni perrenatni jon ReO_4^- pokazao se kao idealan prekursor za sintezu radiofarmaceutika na bazi renijuma(V). Do 2022. godine u Nacionalnoj američkoj medicinskoj biblioteci zabeleženo je 14 studija kojima je u kliničkim ispitivanjima korišćen neki od dva radioizotopa renijuma [70].

Radioizotop ^{186}Re ima kratko vreme polu-života $t_{1/2} = 3,7$ dana, i pri raspadu se razlaže na ^{186}W i ^{186}Os . Emituje β^- čestice niske energije koje prodiru u tkivo samo do 4,5 mm, što ga čini pogodnim sredstvom za radioterapiju tumora veličine nekoliko milimetara ili centimetara. Za razliku od njega, izotop ^{188}Re poseduje vreme polu-života $t_{1/2} = 17$ h i pri raspadu emituje samo β^- čestice sa mogućnošću penetracije tkiva do 11 mm, što omogućava njegovu primenu kod čvrstih tumora (eng. solid tumors). Generator na bazi $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ se koristi za proizvodnju ovog izotopa [68, 69, 70]. Oba izotopa renijuma, ^{186}Re i ^{188}Re se mogu koordinovati za hidroetilidendifosfonat (HEDP) i koristiti kao radiofarmaceutici za lečenje veoma bolnih metastaza kostiju. Pošto oba izotopa nemaju afinitet vezivanja za kosti, moraju biti koordinovani za ovakav organski fosfat, da bi u reakciji hidrolize doveli do formiranja hidroksidnih mostova tako što će se fosforilovani kiseonik ili oksorenijum(V) jon koordinovati za jone kalcijuma koji se nalaze na površini hidroksiapatitnih kristala. U istraživanjima kod pacijenata koji boluju od kancera prostate, a sa metastazama na kostima, primenjen je ^{186}Re izotop i praćen je indeks smanjenja bola kod pacijenata u toku od 7 nedelja i zaključeno je da je kod 80% ispitanika došlo do smanjenja bola. Još jedna studija ukazuje da u zavisnosti od

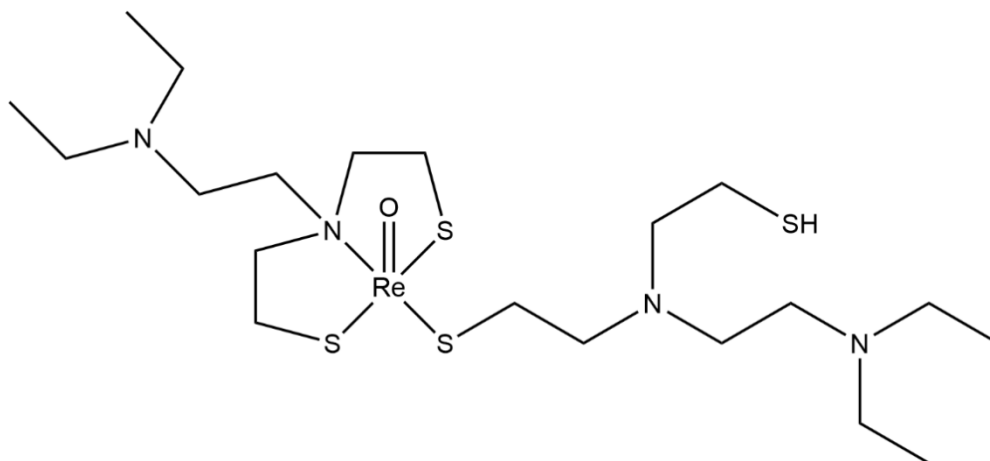
primljene doze ^{186}Re -HEDP, smanjenje bola kod ispitanika može biti između 38% i 82%, a efekat bi se ispoljilo između prve i treće nedelje od uzimanja terapije, i trajao bi od 5 do 12 meseci. Najveći nedostatak ovakvog tretmana je sporedni efekat hematološke prirode koji ^{186}Re -HEDP, jer je uočen pad broja trombocita kod 36% ispitanika. Da bi se nedostaci ^{186}Re prevazišli izvršena su israživanja sa ^{188}Re -HEDP. U kliničkom ispitivanju učestvovala su 22 muškarca koja boluju od kancera prostate, sa veoma bolnim metastazama na kostima, koji su primili različite doze radiofarmaceutika i kod kojih se takođe kao glavni neželjeni efekat ispoljila trombocitopenija i to kod 86% ispitanika, pri čemu je maksimalna doza radiofarmaceutika iznosila 3,3 GBq. Kod 64% pacijenata koji su primili maksimalnu dozu leka došlo je do smanjenja bola koje je trajalo od 3 do 6 meseci. Međutim, još jedan neželjeni efekat je primećen kod svih ispitanika, a to je supresija koštane srži do koje je došlo zbog prevelike izloženosti β - česticama (Slika 20) [71, 72].



Slika 20. Strukturna formula ^{186}Re -HEDP

Glioblastom predstavlja jedan od najagresivnijih oblika kancera mozga kod odraslih osoba. Čak i posle primene terapije, ovaj tumor ima tendenciju vraćanja od 90%, a ono što još više otežava lečenje je sama lokacija tumora. Stoga, lekovi koji bi se primenjivali moraju proći krvno-moždanu barijeru da bi dospeli do samog tumora. Kada se beta emiter poput ^{186}Re -BMEDA inkubira zajedno sa lipozomom, nastaje stabilno jedinjenje koje se može koristiti za tretiranje glioblastoma u vidu brahioterapije [73]. Brahioterapija predstavlja direktan unos radiofarmaceutika, u visokoj dozi, u neposrednu blizinu tumora, bez oštećenja po okolna tkiva [74]. Dve grupe pacova, podeljene u kontrolnu i eksperimentalnu grupu, bile su tretirane humanim tumorskim ćelijskim linijama glioblastoma - U87 i U251. Kontrolnoj grupi je davan neradioaktivni lipozomom, dok je eksperimentalna grupa bila podvrgnuta tretmanu sa različitim dozama ^{186}Re -BMEDA lipozoma. Prvi put je zabeleženo da su pacovi u eksperimentalnoj grupi preživeli do 120 dana i da je bezbedna maksimalna doza oksorenijum farmaceutika iznosila 1845 Gy. Ovakav način terapije u odnosu na

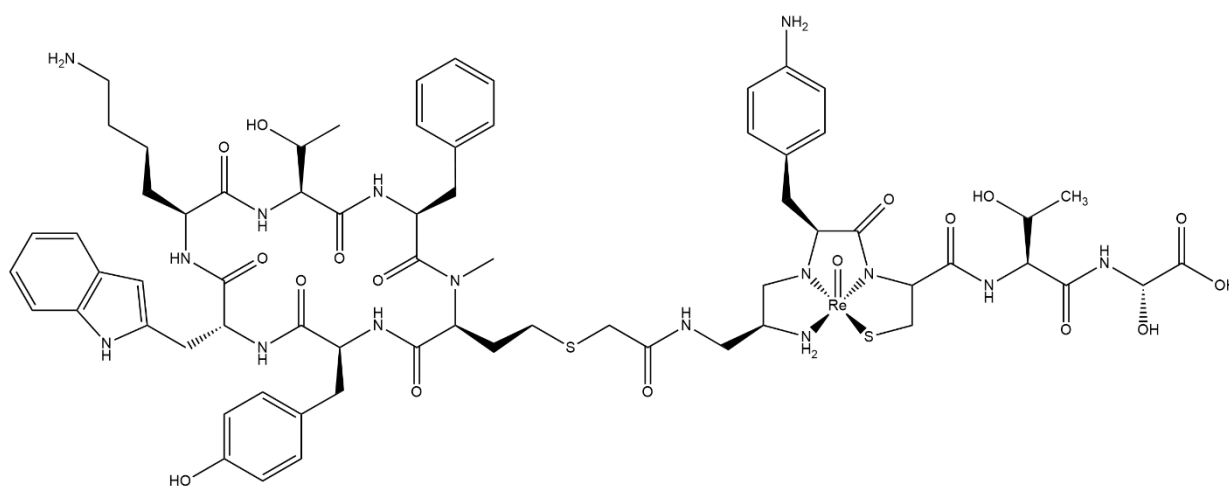
konvencionalne je mnogo efikasniji, jer ukazuje da radiofarmaceutik, kada je inkubiran zajedno sa lipozomom, može direktno da se transportuje do tumorskog tkiva i da je količina beta zračenja dovoljna za njegovo tretiranje. Histologija moždanog tkiva pokazala je značajne rezultate, jer je kod pacova u kontrolnoj grupi došlo do povećanja veličine tumora, dok je u eksperimentalnoj grupi kod svih pacova uočeno odsustvo tumora bez ispoljavanja toksičnih efekata na okolna tkiva (Slika 21) [73].



Slika 21. Strukturna formula ^{186}Re -BMEDA

Dve studije iz 2009. i 2014. godine vršile su ispitivanje da li bi se u klinici za tretiranje oboljenja zajedno sa jedinjenjima na bazi $^{99\text{m}}\text{Tc}$ mogli koristiti renijumski analozi. [75, 76]. Edelman i saradnici su radili uporednu studiju jedinjenja $^{99\text{m}}\text{Tc}$ i ^{188}Re na nemikrocelularnom karcinomu pluća (eng. non-small lung cancer) i plućnom karcinomu malih ćelija (eng. small cell lung cancer). Kod oba tipa kancera uočeno je postojanje velikog broja receptora za somatostatin [75]. Somatostatin je neuropeptid koji je odgovoran za regulaciju hormona poput somatotropina, glukagona, insulina, tireotropina i gastrina [76]. Stoga su Elderman i naučnici koristili peptid - P2405, koji je sačinjen od 11 amino kiselina i koji se može vezati za samostatin - zavisne receptore kod oba tipa karcinoma. Peptidi su se pokazali kao bolji nosači u radioterapiji u odnosu na antitela zbog svojih dimenzija, boljeg delovanja na čvrste tumore, kao i brže eliminacije iz organizma. U ovom istraživanju učestvovali su pacijenti kojima je bio dijagnostifikovan IIIb ili IV stadijum oboljenja pluća. Svim ispitanicima je davan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -P2405 radiofarmaceutik, dok je grupa od 8 pacijenata primila i različite doze renijumskog analoga - ^{188}Re -P2405. Na osnovu svih analiza utvrđeno je da je maksimalna apsorbovana doza zračenja 13 Gy, dok je najveći sporedni efekat bio smanjenje broja limfocita, pri čemu nije primećeno dugotrajno oštećenje štitne žlezde. Vraćanje tumora nije primećeno kod pet od osam pacijenata i njihovo stanje je bilo stabilno i 8 nedelja nakon tretmana. U budućnosti bi lečenje

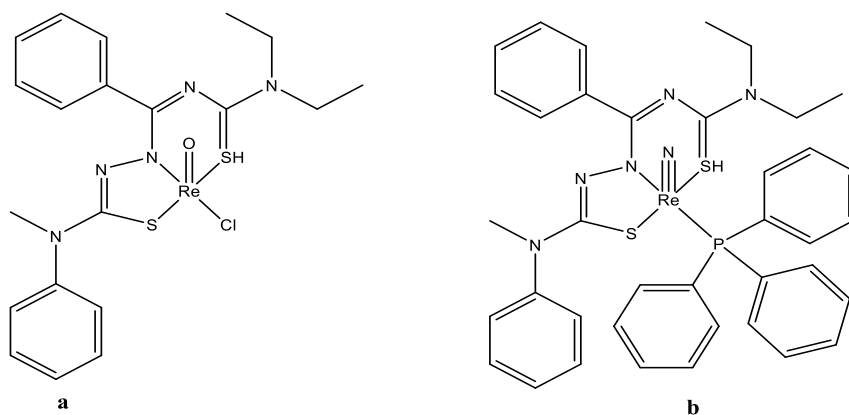
uz pomoć ^{188}Re -P2405 moglo postati praksa, jer iako u ovoj studiji nije primećeno da dolazi do smanjenja veličine tumora, dolazi do stabilizacije bolesti, ali da bi se ovakav zaključak potvrdio, neophodno je izvršiti ispitivanje na mnogo većem uzorku [75]. Studija iz 2014. godine ispitala je uticaj ^{188}Re -P2405 na smanjenje veličine tumora pankreasa. Za potrebe eksperimenta korišćeni su miševi koji su tretirani sa tumorskom ćelijskom linijom pankreasa miša - AR42J. Svakog trećeg dana u periodu od 16 dana miševima je ubrizgavana različita doza ^{188}Re -P2405. Nakon trinaest dana veličina tumora u kontrolnoj grupi bila je 318 mm^3 , dok su u grupama koje su tretirane malom, srednjom i velikom koncentracijom radiofarmaceutika veličine bile 91, 44 i 13 mm^3 . Sve primenjene doze su se pokazale bezbednim po miševe, dok je akumulacija ^{188}Re -P2405 u bubrezima veoma mala. Veoma je važno napomenuti da kod svih tretiranih grupa miševa nije došlo do gubitka telesne težine, promene u organima ili mortaliteta. Takođe, ispitano je i vezivanje neradioaktivnog $^{185/188}\text{Re}$ -P2405 za somatostatin receptore na ćelijskoj membrani kod AR42J i humanoj tumorskoj ćelijskoj liniji pankreasa- NCI-H69. Rezultati su pokazali da se ovaj peptid mnogo bolje vezuje za receptore humanog porekla, što ukazuje da bi se ^{188}Re -P2405 mogao koristiti i za ljude. S toga je u Americi trenutno u kliničkim ispitivanjima ^{188}Re -P2405, pod nazivom Tozaride kao potencijalni lek za lečenje karcinoma pluća i prostate (Slika 22) [76].



Slika 22. Strukturna formula ^{188}Re -P2405

2.6.2.3. Renijum(V) kompleksi u medicinskoj hemiji

Abram i saradnici su bili prvi koji su 2009. godine sintetisali seriju oksorenijum(V) kompleksa sa tridentatnim N,S,N- tiosemikarbazonima i ispitali njihov *in vitro* citotoksični potencijal. Tiosemikarbazoni su dobo poznati ligandni sistemi, jer mogu da ostvare koordinaciju sa mnogim prelaznim metalima, pri čemu nastaje stabilno kompleksno jedinjenje. Takođe, tiosemikarbazoni se mogu koristiti kao antibakterijska ili antivirusna sredstva, kao i antimalarici. Šest novih stabilnih oksorenijum(V) kompleksa na bazi različitih derivata tiosemikarbazona koji su dobijeni u sintezi N-[N',N'-dialkilamino(tiokarbonil)]benzimidazol hlorida i 4,4-dialkiltiosemikarbazida, ispitani su na humanoj tumorskoj ćelijskoj liniji dojke - MFC-7. Kada se uporede IC₅₀ vrednosti slobodnih liganada može uočava se da je citotoksičnost usko povezana sa različitim derivatima tiosemikarbazona. Stoga, što je manji alkil niz, to je jedinjenje aktivnije, pa je tako IC₅₀ za metil derivat 0,39 µM, dok je zamena samo jedne metil grupe fenil grupom dovodi do sniženja aktivnosti pri čemu je IC₅₀ = 0,85 µM. Na aktivnost, takođe, može uticati i veličina aromatičnog prstena, pa je tako aktivnije jedinjenje ono koje poseduje 6-člani prsten u svojoj strukturi u odnosu na ona koja poseduju 5-člani i 7-člani prsten. Međutim, ono što je važno napomenuti je da ovakav trend nije primećen kod oksorenijum(V) kompleksnih jedinjenja. Ovakvo zapažanje dovodi do zaključka da mehanizam dejstva kompleksnog jedinjenja u biološkim sistemima može biti potpuno drugačiji u odnosu na slobodni ligand. Da bi se ispitala uloga oksorenijum fragmenta i hlorido liganda, sintetisan je analog najaktivnijeg oksorenijum(V) kompleksa pri čemu je okso O²⁻ grupa zamenjena nitrido grupom N³⁻, a hlorido ligand zamenjen sa trifenilfosfinom. Međutim, ovo jedinjenje je bilo neaktivno prema MFC-7 ćelijskoj liniji čak i pri koncentraciji od 20 µM. Jedna od mogućnosti kako ovi kompleksi dovode do apoptoze ćelija je stvaranje adukta DNK i topoizomeraze II posredstvom tiosemikarbazona, što dovodi do inhibicije ribonukleotid reduktaze (Slika 23 a i b) [77].

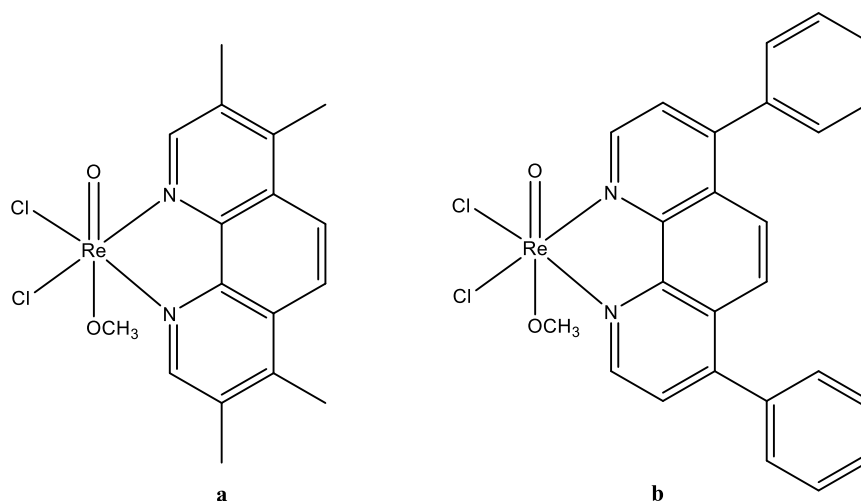


Slika 23. Strukturne formule kompleksa renijuma(V)

U studiji iz 2013. godine istraživačka grupa Abrama i saradnika je nastavila dalje svoj rad u cilju širenja biblioteke jedinjenja oksorenijuma(V) i nitridorenijuma(V) sa raličitim tiosemikarbazonima i tiosemikarbazidima, kako bi ispitali uticaj supstitucije liganada na aktivnost kompleksa. U reakciji sa kalijum cijanidom ili amonijum tiocijanatom, polaznim renijumskim kompleksom i odgovarajućim tiosemikarbazonom/tiosemikarbazidom vršena je supstitucija monodentatnog hlorido liganada cijanidnim ili izotiocijanidnim ligandom. Kao nov S,O- bidentatni ligand korišćena je benziltiourea, pri čemu je novi kompleks oksorenijuma(V) dobijen u koncertovanoj reakciji („one-pot reaction“), koja je karakteristična po tome što se sinteza odvija kroz niz reakcija od polaznog do željenog renijum kompleksa bez izolovanja međuproizvoda (Slika 24 a i b) [78].

nekroze dolazi do disfunkcije mitohondrije, povećane proizvodnje ROS-a, kao i poremećaja u sintezi ATP-a [80].

Dva kompleksa oksorenijuma(V) sa derivatima 1,10-fenantrolina ispitana su u *in vitro* uslovima na 12 humanih tumorskih ćelijskih linija i jednoj zdravoj humanoj ćelijskoj liniji (Slika 25 a i b) [79].



Slika 25. Strukturne formule oksorenijum(V) kompleksa a i b sa derivatima 1,10-fenantrolina

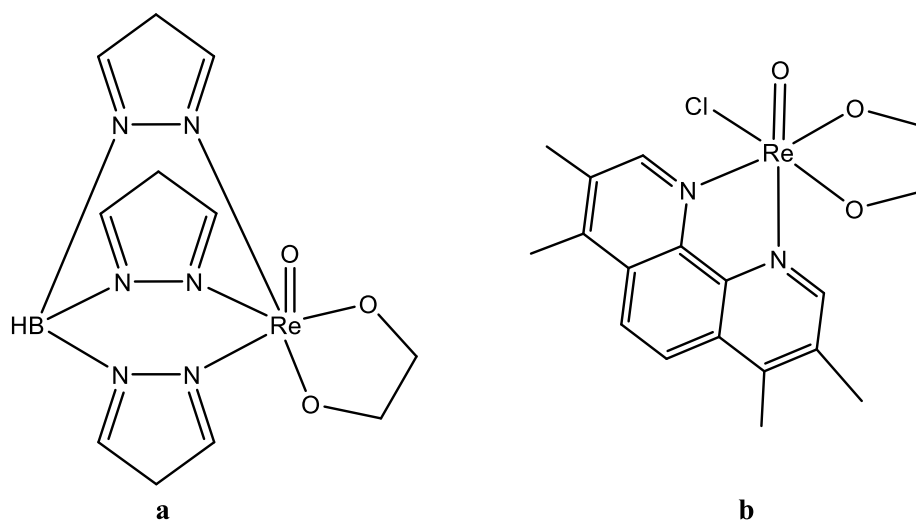
Rezultati ukazuju da oba kompleksa imaju IC_{50} vrednosti u sub-mikromolarnom opsegu i da su aktivniji od *cisplatin*e. Takođe, važno je napomenuti da kompleks b ispoljava 20 puta veću aktivnost od *cisplatin*e na humanoj tumorskoj ćelijskoj liniji pluća - A549, a razlog ovako dobre aktivnosti krije se u lipofilnosti ovog jedinjenja. Analizom ćelijskog ciklusa na A549 ćelijskoj liniji utvrđeno je da oba jedinjenja dovode do zaustavljanja ciklusa u G fazi, što znači da ne dolazi do dalje deobe ćelija. Da oba oksorenijum(V) kompleksa izazivaju nekrozu, potvrđeno je pomoću nekrostatina-1 koji je inhibitor proteinskih kinaza RIP1 i RIP3 koje su ključne pri procesu nekroze. Ova analiza je urađena na tri različite humane tumorske ćelijske linije, pri čemu je pokazano da dolazi do smanjenja aktivnosti oba kompleksa kada su inkubirani zajedno sa nekrostatinom-1. Konfokalnom mikroskopijom je potvrđeno da dolazi do oštećenja na plazminoj membrani na A549 ćelijskoj liniji što je još jedan od dokaza da dolazi do nekroze. Takođe, protočnom citometrijom na A549 ćelijskoj liniji potvrđeno je da dolazi do formiranja ROS-a, kao i da oba jedinjenja dovode i do promena potencijala membrane mitohondrije čak i kada su RIP1 i RIP3 blokirani od strane nekrostatina-1. U *in vivo* ispitivanjima na miševima koji su bili tretirani kompleksom a i kompleksom b u toku 6 dana nije primećen gubitak telesne težine, kao ni znakovi toksičnosti, što ukazuje da bi ova jedinjenja mogla da zamene *cisplatinu* jer su bezbednija po organizam. Takođe je praćena i stabilnost kompleksa

1 u ljudskoj krvi, pri čemu je vreme polu-života zadržavanja jedinjenja u krvi uporedivo sa *cisplatinom*, što bi značilo da bi ova jedinjenja mogla biti potencijalni kandidati za dalja klinička ispitivanja [79].

Patra i saradnici su 2023. godine sintetisali hidrolitički stabilne oksorenijum(V) komplekse za potrebe dve različite naučne studije i ispitali da li dolazi do poboljšanja citotoksične aktivnosti aktivnosti kada se labilni hlorido ligandi koji podležu hidrolizi zamene O,O-bidentatnim etilen glikolom [81, 82]. U prvoj studiji željeni oksorenijum(V) kompleks je stabilan u toku 72 h, što je potvrđeno NMR analizom, pa je ispitan njegov *in vitro* citotoksični potencijal na nekoliko humanih tumorskih ćelijskih linija, kao i na zdravoj humanoj ćelijskoj liniji. Najbolja aktivnost uočena je na HeLa ćelijskoj liniji gde je ovaj kompleks bio 1,5 puta aktivniji od *cisplatine* i 8,6 puta aktivniji od karboplatine, dok je aktivnost prema zdravoj MRC-5 ćelijskoj liniji 2,4 puta manja od *cisplatine*. Lokalizacija jedinjenja je potvrđena ICP-MS analizom, pri čemu rezultati ukazuju da se jedinjenje predominantno nalazi u mitohondriji i delimično u jedru i citosolu. Pošto je jedinjenje prisutno u jedru, kao jedna od mogućih bioloških meta nameće se molekul DNK. Ova pretpostavka potvrđena je analizom na A549 ćelijskoj liniji, jer nastaju adukti željenog kompleksa i DNK molekula, pri čemu kompleks oksorenijuma(V) indukuje oštećenje na samom DNK molekulu. S obzirom da je najveća koncentracija jedinjenja u mitohondriji na A549 ćelijskoj liniji ispitan je njegov uticaj na potencijal membrane mitohondrije pomoću protočne citometrije pri čemu dolazi do smanjenja potencijala što ukazuje da kompleks dovodi do disfunkcije mitohondrije. Stoga je protočnom citometrijom kvantifikovan nivo ROS-a, pri čemu je potvrđeno da jedinjenje renijuma dovodi do njihove indukcije što za direktnu posedicu ima izazivanje stresa u ER. Ono što je najbitnije je utvrđivanje mehanizma dejstva željenog kompleksa gde je pomoću protočne citometrije i Western blot analize otkriveno da ovaj kompleks renijuma ima dualno dejstvo, jer istovremeno uzrokuje i apoptozu i nekrozu na A549 ćelijskoj liniji. Značajan porast citotoksičnog potencijala ovog kompleksnog jedinjenja primećen je u kombinovanoj terapiji zajedno sa *cisplatinom*, kada se ova dva jedinjenja zajedno inkubiraju 48 h na A549 ćelijskoj liniji. Takođe *in vivo* ispitivanja na modelu embriona zebrice ukazuju da ovo jedinjenje nije toksično pri koncentraciji od 12 μM i da bi se u budućnosti moglo koristiti za tretiranje čvrstih tumora [81].

Druga studija iste grupe naučnika je napravila analog sa etilenglikolom po ugledu na gore pomenut Lipardov najaktivniji kompleks oksorenijuma(V) . Ono što ovaj rad razlikuje od do sada objavljenih je detaljno proučavanje stabilnosti najaktivnijeg kompleksa koja je praćena NMR spektroskopijom u različitim rastvaračima: mešavina DMSO/D₂O i ćelijskom medijumu DMEM u toku 72 h. Ovu analizu je veoma važno uraditi pre daljih bioloških testova jer se mora utvrditi da li je

jedinjenje stabilno i pogodno za MTT analizu koja traje 72 časa. Uočeno je da je bidentatni etilen glikol labilan i da pri rastvaranju jedinjenja u smeši DMSO/D₂O odmah dolazi do njegove hidrolize supstitucijom hlorido liganda sa vodom, ali je onda takav novi adukt stabilan 72 h. Ista stvar je uočena i kada je jedinjenje rastvoreno u DMEM medijumu, ali do ovih izmena dolazi tek nakon 12 h, pri čemu je onda novonastali hidrolizovani oblik stabilan u toku 72 h. Uzimajući u obzir ove zaključke, urađena je MTT analiza na panelu različitih humanih tumorskih ćelijskih linija. Najveća aktivnost je uočena na HeLa ćelijskoj vrsti. Takođe na parovima humanih tumorskih ćelijskih linija pluća, prostate i jajnika (A549/A549cis, DU145/ DU145cis, A2780/ A2780cis) koje su osetljive ili rezistentne na *cisplatinu* IC₅₀ vrednost je bila u rang 0,1 – 0,4 µM, što ukazuje da je jedinjenje dovoljno potentno da prevaziđe rezistentnost *cisplatine*. Kao i u prethodnom, radu, pomoću ICP-MS utvrđeno je da se jedinjenje većinskim delom nalazi u mitohondriji, a zatim u jedru i citosolu. Uz pomoć već dobro poznatih metoda ustanovljeno je da oksorenijum(V) kompleks dovodi do promene u potencijalu membrane mitohondrije, kao i njene disfunkcije, što za posledicu ima indukovanje ROS-a i izazivanje stresa u ER. Kao primarni mehanizam dejstva ovog najaktivnijeg kompleksa ustanovljeno je da do ćelijske smrti dolazi nekrozom (Slika 26 a i b) [82].



Slika 26. Strukturne formule kompleksa oksorenijuma(V) sa etilen glikolom

2.7. Pikolinska kiselina i njeni derivati

Jedinjenja na bazi piridina, kao što je 2-piridinkarboksilna kiselina (pikolinska kiselina) i njeni derivati, predstavljaju jedan od najraznovrsnijih ligandnih sistema [83]. Piridinski derivati ispoljavaju antituberkulozno, antihelminičko, fungicidno, antitumorsko i antibakterijsko dejstvo [84]. Od 1980. godine polje hemije koje se bavilo proučavanjem ovih tipova jedinjenja, doživelo je

procvat upravo zbog upotrebe pikolinske kiseline u dijetetskim suplementima [83]. Ono što pikolinsku kiselinu čini posebnom je činjenica da je jedan od krajnjih metabolita triptofana, koji se nalazi u različitim biološkim tečnostima poput krvnog seruma, majčinog mleka i pankreasnog soka [83, 85]. U jonskom obliku pikolinska kiselina se ponaša kao helatni ligand jer se koordinacija za metalni centar ostvaruje i putem atoma azota iz piridinskog prstena, kao i atoma kiseonika iz karboksilne grupe [86]. Pored pikolinske kiseline, za koordinacione hemičare su još interesantniji njeni 2-piridindikarboksilni derivati (dipikolinski derivati), jer je koordinacija za metalni jon olakšana prisustvom azota i četiri kiseonika, pa je samim tim unapređena i biološka aktivnost. Karakteristično za ova jedinjenja je činjenica da su u većini slučajeva rastvorna u vodi, dok prisustvo dve karboksilne grupe omogućava lakši transport kroz ćelijsku membranu [87]. Derivat koji se najčešće koristi je 2,6-piridindikarboksilna kiselina (2,6-dipikolinska kiselina). Kristalnu strukturu ovog molekula rešio je Takusagava još 1973. godine. Farmakološke studije ukazuju da pogodnost korišćenja ovog derivata leži u činjenici da je jedinjenje niske toksičnosti i amfifilne prirode. Takođe, 2,6-dipikolinska kiselina se javlja u prirodnim sistemima kao produkt oksidativne razgradnje vitamina, koenzima, alkaloida i predstavlja važnu komponentu fulvičnih kiselina. Pored toga, 2,6-dipikolinska kiselina je jedan od intermedijera u procesu razgradnje triptofana, kao i prekursora za koenzim NAD. [88, 89]. Kompleksi sa gvožđem su poznata redukciona sredstva koja učestvuju u važnim biološkim procesima, kao što je razgradnja molekula DNK što dalje dovodi do apoptoze [89]. Derivati poput 2,4-dipikolinske kiseline se koriste kao zaštita od temperaturne degradacije enzima, dok je 2,5-dipikolinska kiselina našla primenu u mnogim poljima, kao što je kataliza, antimikrobna aktivnost, inhibicija enzima, hemija čvrstog stanja, magnetizma, fluorescencije i analitičke hemije. [83, 90]. U poslednje vreme sve je više publikacija u kojima su pikolinska kiselina i njeni derivati upotrebljavani kao metaloterapeutici koji ispoljavaju jak citotoksični potencijal, zajedno sa širokim spektrom prelaznih metala poput titanijuma, vanadijuma, hroma, mangana, kobalta, nikla, bakra, cinka, rutenijuma, paladijuma, osmijuma, iridijuma, platine i lantanida [83, 88].

Grupa Grgurić-Šipka i saradnika bavila se proučavanjem rutenijum(II) cimenskih kompleksa sa različitim pikolinskim i dipikolinskim derivatima. Kompleksi sa dipikolinatima pokazali su slabu citotoksičnost u *in vitro* uslovima na širokom panelu humanih tumorskih ćelijskih linija, a razlog tome može biti prisustvo labilnog hloridnog liganda u strukturi polaznog kompleksa rutenijuma(II), koji se lako može izmeniti sa molekulom vode prilikom ulaska u ćeliju. Kasnije studije pokazale su da kada se kao ligandi koriste različiti derivati pikolinske kiseline, dolazi do poboljšanja citotoksične aktivnosti naročito na humanoј tumorskoј ćelijskoј liniji grlića materice-HeLa, dok je protočnom citometrijom ustanovljeno da ovo jedinjenje sprečava odvijanje S faze ćelijskog ciklusa,

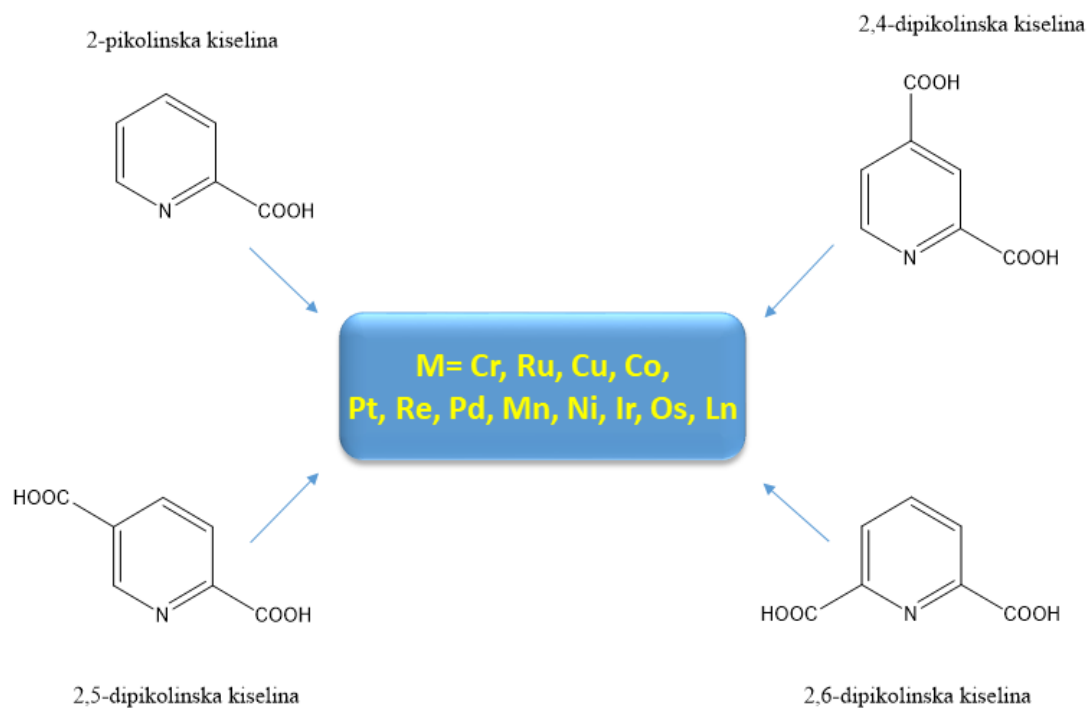
što znači da je glavna biološka meta ovog jedinjenja molekul DNK. Da je uticaj suspsituenata na piridinskom prstenu važan govori i studija u kojoj su za rutenijum(II) cimen bili koordinovani halogeno derivati pikolinske kiseline, kao i izohinolin-3-karboksilna kiselina. Umerenu citotoksičnu aktivnost prema humanoj tumorskoj ćelijskoj liniji kože - FemX ispoljili su kompleksi rutenijuma(II) sa 5-bromo-pikolinskom kiselinom i 6-fluoro-pikolinskom kiselinom. Najaktivniji prema svim testiranim humanim tumorskim ćelijskim linijama bio je kompleks sa izohinolin-3-karboksilnom kiselinom, a razlog tome leži u njegovoj strukturi koja doprinosi većoj lipofilnosti, pa je samim tim zadržavanje ovog kompleksnog jedinjenja u tumorskoj ćeliji mnogo duže [83, 91 - 93]. U cilju prevazilaženja nedostataka, De Grandis i saradnici su pored pikolinske kiseline za metalni centar koordinovali i fosfine ili diimine. Jedinjenja su testirana u *in vitro* uslovima na panelu humanih tumorskih ćelijskih linija prostate- DU-145, kolorektalnog adenocarcinoma - Caco-2, grlića materice - HeLa, karcinoma jetre - HepG2, dojke -MDA-MB-231 i zdravoj ćeliji fibroplasta pluća - MRC-5. Kompleksno jedinjenje koje u svojoj strukturi poseduje pored pikolinske kiseline i dva difosfinska liganda ima najveću lipofilnost i ispoljava bolju citotoksičnu aktivnost od *cisplatin*e na dve ćelijske linije DU-145 i MDA-MB-231, dok je glavni mehanizam dejstva ovog jedinjenja inhibicija topoizomerase-I [83, 94]. Abdolmaleki i saradnici su 2022. godine istražili citotoksični potencijal kompleksa rutenijuma(III) sa tri ekvivalenta pikolinske kiseline. Jedinjenje je aktivnije od oksaliplatin e prema humanoj tumorskoj ćelijskoj liniji kože - A375 i dovodi do poremećaja potencijala membrane mitohondrije, što za posledicu ima povećanje koncentracije ROS-a, što dovodi do apoptoze ćelija [95].

Prelazni metali poput kobalta, bakra, mangana i nikla, koji su esencijalni za živi organizam, i hroma, koji spadaju u neesencijalne metale zajedno sa cinkom i kadmijumom, a čija su antimikrobna i antioksidativna svojstva već dobro poznata, su za potrebe nekoliko studija upotrebljeni za sintezu serije kompleksnih jedinjenja sa 2,5-dipikolinskom kiselinom, pikolinskom kiselinom, 2,6-dipikolinskom kiselinom i N,N-tipom liganada poput - 1,10-fenantrolina i 2,2-bipiridina, kao i 5-nitropikolinske kiseline u cilju ispitivanja njihove potencijalne primene kao metaloterapeutika. Kompleksi hroma(III) sa pikolinskom i 2,6-dipikolinskom kiselinom, zajedno sa 2,2-bipiridinom su se pokazali kao odlični antioksidativni i antimikrobni agensi, dok je citotoksični potencijal ispitivan u vremenskom intervalu od 24 h i 48 h. Samo je kompleks hroma sa 2,6-dipikolinskom kiselinom i slobodnim 2,2-bipiridinom pokazao umeren citotoksični potencijal prema humanoj tumorskoj ćelijskoj liniji kože – HaCaT, pri maksimalnoj koncentraciji, pri inkubaciji od 24 h, pri čemu njegov potencijal opada sa produžetkom vremena inkubacije. Da li odabir metala može uticati na citotoksičnost ispitano je u studiji gde se za različite prelazne metale poput bakra, kobalta i nikla na

jednoj strani i cinka na drugoj strani koordinuju ligandni sistemi poput 2,5-dipikolinske kiseline i 1,10-fenantrolina, čiji je jak citotoksični potencijal poznat od ranije. Za potrebe sprovedena eksperimenta u *in vitro* uslovima korišćena je animalna tumorska ćelijska linija glioma pacova - C6 i sva četiri jedinjenja su testirana pri čemu je vreme inkubacije bilo 24 h i 48 h. Svi kompleksi su imali uporedivu aktivnost sa 1,10-fenantrolinom i pikolinskom kiselinom u roku od 24 h, dok su se kao najbolji kandidati izdvojili kompleksi bakra i cinka čija je aktivnost prilikom inkubacije od 48 h bila znatno bolja nego slobodnih liganada [90, 96, 97].

Jedna vrlo interesantna činjenica je da kada se u molskom odnosu 1:1 pomešaju tetrahloroplatinat(II) i pikolinska kiselina, nastaje *trans*-kompleksno jedinjenje platine(II) sa N,O-bidentatnim ligandom koje je ispoljilo jak citotoksičan efekat na panelu različitih humanih tumorskih ćelijskih linija. Svi kompleksi imaju IC₅₀ u mikromolarnom opsegu i aktivniji su od karboplatine. Takođe, ovo su prva kompleksna jedinjenja platine(II) *trans* konfiguracije koja su aktivna u *in vitro* uslovima, za razliku od *transplatine* koja je u potpunosti neaktivna [98]. U studiji iz 2020. godine pokazano je da je uprkos korišćenju dva različita tipa ligandnih sistema, od kojih je jedan prirodni proizvod - kofein, ipak je najaktivnije jedinjenje ono u kom se za sva koordinaciona mesta paladijuma(II) veže pikolinska kiselina. Ovakvo novosintetisano jedinjenje je aktivno prema humanim tumorskim ćelijskim linijama kolorektalnog adenocarcinoma - CaCo-2 i dojke - MCF-7 što postavlja temelj za dalje istraživanje kompleksa prelaznih metala sa više ekvivalenata pikolinske kiseline i njenih derivata [85].

Do sada veoma poznato polazno kompleksno jedinjenje trikarbonilrenijum(I) je iskorišćeno za sintezu kompleksa sa pikolinskom kiselinom i pokazalo je obećavajuće rezultate na dve različite humane tumorske ćelijske linije grlića materice - HeLa i pluća - A549. Rezultati ukazuju da je jedinjenje aktivno na tumorskim ćelijskim linijama, iako je manje toksično od doksorubicina koji je korišćen kao pozitivna kontrola. Najveći nedostatak ovog jedinjenja je što mu je citotoksični potencijal skoro isti kao i doksorubicinu na zdravoj animalnoj ćelijskoj liniji bubrega - Vero [99]. Sličan problem se javio u studiji iz 2023. godine kada je serija kompleksnih jedinjenja bakra(II) sa 2,6-dipikolinskom kiselinom i različitim N,N- tipom liganada bila izuzetno aktivna, čak aktivnija i od *cisplatine* u opsegu IC₅₀ vrednosti od 0,23 do 25 µM na pet različitih humanih tumorskih ćelijskih linija, ali su sva jedinjenja bila izuzetno toksična prema zdravoj ćelijskoj liniji - MRC-5 [100]. Vrlo obećavajući rezultati i mogućnost za dalja naučna istraživanja leže u kompleksima lantanida, iridijuma(III) i osmijuma(II) sa pikolinskom kiselinom i njenim derivatima jer su sva do sada sintetisana jedinjenja ispoljila snažan citotoksični potencijal u mikromolarnom opsegu koji nadmašuje i aktivnost *cisplatine* (Slika 27) [83, 101, 102].



Slika 27. Grupa metala čija su kompleksna jedinjenja sa prikazanim derivatima pikolinske kiseline do sada opisana u literaturi kao potencijalna biološki aktivna jedinjenja

2.8. Cilj rada

Cilj rada ove doktorske disertacije bio je:

- 1) Direktna sinteza kompleksa oksorenijuma(V) sa derivatima pikolinske kiseline uz optimizaciju uslova sinteze (tip rastvarača, temperatura, molski odnosi reaktanata, reakciono vreme i sl.) u cilju povećanja čistoće i prinosa proizvoda;
- 2) Optimizacija uslova kristalizacije sintetisanih kompleksnih jedinjenja u cilju dobijanja kristala pogodnih za rendgensku strukturnu analizu;
- 3) Karakterizacija dobijenih kompleksa pomoću instrumentalnih metoda:
 - IC spektroskopija (ATR - tehnika snimanja);
 - NMR spektroskopija; 1D NMR (^1H i ^{13}C);
 - Rendgenska strukturna analiza kompleksa dobijenih u kristalnom obliku;
 - Masena spektrometrija sa elektrosprej jonizacijom (ESI-MS) i masena spektrometrija visoke rezolucije sa elektrosprej jonizacijom (HRMS-ESI);
- 4) Određivanje sastava i čistoće dobijenih kompleksa pomoću elementalne analize;
- 5) Proučavanje nekovalentnih interakcija radi boljeg razumevanja odnosa strukture jedinjenja i njihove biološke aktivnosti pomoću DFT (Density Functional Theory) proračuna;
- 6) Određivanje stabilnost novosintetisanih kompleksnih jedinjenja u dimetil sulfoksidu (DMSO);
- 7) Određivanje *in vitro* citotoksične aktivnosti sintetisanih kompleksa pomoću MTT metode na sledećim humanim tumorskim ćelijskim linijama: **A549** (ćelije adenokarcinoma pluća), **PANC-1** (ćelije adenokarcinoma pankreasa), **MDA-MB-231** i **MCF-7** (ćelije karcinoma dojke), **LS-174** (ćelije adenokarcinoma kolona), **EA. hy 926** (transformisane ćelije endotela krvnih sudova), **OVCAR-3** (ćelije adenokarcinoma jajnika) i zdravoj (netumorskoj) ćelijskoj liniji **MRC-5** (poreklom od fetalnih fibroblasta pluća) upotrebom MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromida) kao reagensa i poređenjem sa *cisplatinom*, *cis-diamindihloroplatina(II)*, kao referentnim kompleksnim jedinjenjem, koji kao standardni lek nalazi primenu u terapiji solidnih tumora;
- 8) Određivanje efekta kombinovanog dejstva novosintetisanih kompleksa sa veripamil hidrohloridom na PANC-1 ćelijskoj liniji (ćelije adenokarcinoma pankreasa);

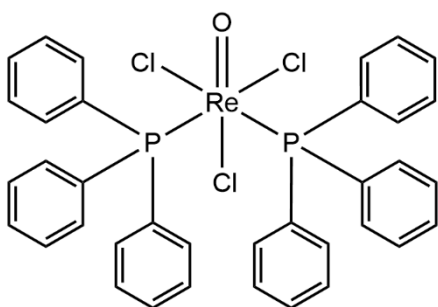
- 9) Pronalaženje najaktivnijeg kandidata koji će biti podvrgnut daljim biološkim testovima u cilju boljeg razumevanja njegovog mehanizma dejstva;
- 10) Određivanje uticaja L-BSO na aktivnost kompleksa na PANC-1 ćelijskoj liniji (ćelije adenokarcinoma pankreasa);
- 11) Analiza ćelijskog ciklusa na PANC-1 ćelijskoj liniji (ćelije adenokarcinoma pankreasa) pomoću protočne citometrije (Flow cytometry);
- 12) Morfološka analiza ćelijske smrti pomoću fluorescentne mikroskopije;

NAŠ RAD

3. EKSPERIMENTALNI DEO

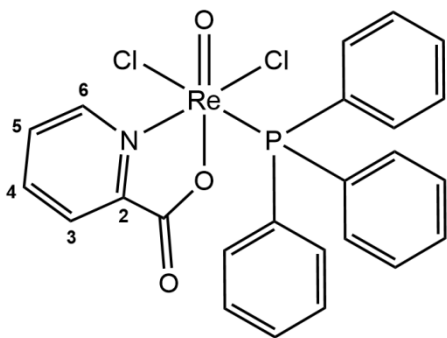
3.1. Sinteza polaznog oksorenijum(V) kompleksa i odgovarajućih oksorenijum(V) kompleksa sa N,O- ligandima

3.1.1. Sinteza polaznog kompleksnog jedinjenja trihloro-okso-bis(trifenilfosfin)renijuma(V) [ReOCl₃(PPh₃)₂]



Polazni kompleks oksorenijuma(V) sintetisan je po već poznatoj proceduri opisanoj u literaturi [103]. U šolji za uparavanje na ledenom kupatilu nalazilo se 0,50 g (2,68 mmol) renijuma u prahu, metalik sive boje, zatim je dodano 10 mL 30% vodonik-peroksida, polako u kapima, pri čemu dolazi do burne reakcije rastvaranja renijuma. Nakon što je sav vodonik-peroksid ukapan, ledeno kupatilo je zamenjeno vodenim koje je zagrevano do ključanja. Reakciona smeša je uparavana do ukupne zapremine od 2 mL pri čemu boja prelazi iz metalik sive u žutu. Tako uparen rastvor, ohlađen je do sobne temperature. U tako ohlađen rastvor dodato je u kapima 10 mL koncentrovane HCl pri čemu pri čemu se žuti rastvor obezbojio. U balonu od 100 mL odmereno je 5,00 g (19,06 mmol) trifenilfosfina koji je rastvoren u 25 mL glacijalne sirćetne kiseline. U suspenziju je zatim dodat prethodno pripremljen rastvor renijuma, kap po kap, pri čemu je rastvor u balonu odmah postao fluorescentno zelene boje. Ovako pripremljen rastvor je mešan 1 h na magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi. Nakon toga zeleni talog je proceden na Bihnerovom levku sa dvostrukim filter papirom i ispran sa 20 mL etra. Dobijeno je 1,71 g (2,05 mmol) proizvoda u obliku zelenog taloga (76,68%). IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 501,8 (**Re-O** st), 541,0 (**Re-N** st), 746,2 - 694,0 (ar **C-H** δ oop) 998,5 (**Re=O** st), 1092,6 (**P-C** st), 3058,7 (ar **C-H** st).

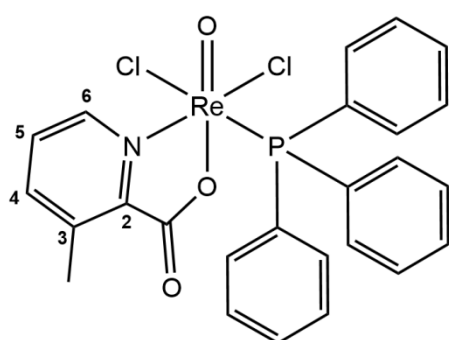
3.1.2. Sinteza dihloro-okso-trifenilfosfin- N,O-(piridin-2-karboksilato-)renijum(V) kompleksa [ReOCl₂(L1)(PPh₃)] (**K1**)



Kompleks **K1** sintetisan je po znatno izmenjenoj proceduri u odnosu na opisanu opisanu u literaturi [104]. Pikolinska kiselina (**L1**, 0,03 g, 0,24 mmol) rastvorena je u 5 mL acetonitrila i u taj rastvor ukapana je suspenzija [ReOCl₃(PPh₃)₂] (0,20 g, 0,24 mmol) u 5 mL acetonitrila. Reakciona smeša refluksovana je 3 h na 78 °C pri čemu nastaje rastvor braon boje. Ljubičasti kistali dobijeni su isparavanjem

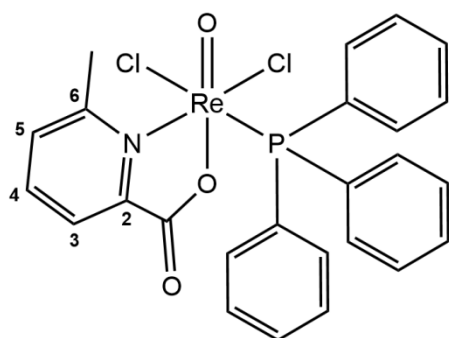
matičnog rastvora sedam dana nakon obrade reakcije. Prinos: 49,14%. IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 502,4 (**Re-O** st), 530,2 (**Re-N** st), 712,7 - 690,4 (ar **C-H** δ oop) 992,1 (**Re=O** st), 1096,7 (**P-C** st), 1614,0 (**C=N** st), 1689,79 (**C=O** st), 3057,5 (ar **C-H** st). ^1H NMR (399,73 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 7,33 - 7,66 (m, 16H, **PPh₃** and **H⁵**); 8,39 - 8,49 (m, 2H, **H³** i **H⁴**); 12,02 (d, 1H, **H⁶**). ^{13}C NMR (100,52 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 125,49 - 148,14 (**C2-C6** + **PPh₃**); 164,74 (**C=O**). Elementalna analiza: izračunato za $\text{RePC}_{24}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{Cl}_2$ (%): N 2,13; C 43,84; H 2,89; nađeno (%): N 21,91; C 44,04; H 2,99. Maseni spektar ESI/MS (m/z), CH_3CN : 657,00 $[\text{M}]^+$, (teorijski izračunat m/z za $[\text{M}]^+ = 657$ za $\text{RePC}_{24}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{Cl}_2$); 622,03 $[\text{M-Cl}]^+$ (teorijski izračunat m/z za $[\text{M-Cl}]^+ = 622$ za $\text{RePC}_{24}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{Cl}$).

3.1.3. Sinteza dihloro-okso-trifenilfosfin-N,O-(3-metilpiridin-2-karboksilato)renijum(V) kompleksa $[\text{ReOCl}_2(\text{L2})(\text{PPh}_3)]$ (**K2**)



Postupak sinteze kompleksa **K2** je identičan proceduri sinteze kompleksa **K1**, uz korišćenje 3-metilpikolinske kiseline (**L2**, 0,03 g, 0,24 mmol) i $[\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2]$ (0,20 g, 0,24 mmol). Crveni kristali dobijeni su isparavanjem matičnog rastvora sedam dana nakon obrade reakcije. Prinos 39,11%. IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 502,1 (**Re-O** st), 530,6 (**Re-N** st), 711,8 - 691,8 (ar **C-H** δ oop) 988,2 (**Re=O** st), 1098,7 (**P-C** st), 1612,6 (**C=N** st), 1700,5 (**C=O** st), 3058,5 (ar **C-H** st). ^1H NMR (399,73 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 2,23 (s, 3H, **CH₃**); 7,29 - 7,53 (m, 17H, **PPh₃**, **H⁴** i **H⁵**); 8,42 (d, 1H, **H⁶**). ^{13}C NMR (100,52 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 19,41 (**CH₃**); 126,39 - 153,20 (**C2-C6** + **PPh₃**); 165,19 (**C=O**). Elementalna analiza: izračunato za $\text{RePC}_{25}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{Cl}_2$ (%): N 2,09; C 44,71; H 3,13; nađeno (%): N 2,12; C 44,94; H 3,00. Maseni spektar ESI/MS (m/z), CH_3OH : 694,20 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (teorijski izračunat m/z za $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 694$ za $\text{NaRePC}_{25}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{Cl}_2$); 709,98 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (teorijski izračunat m/z za $[\text{M}+\text{K}]^+ = 710$ za $\text{KRePC}_{25}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{Cl}_2$).

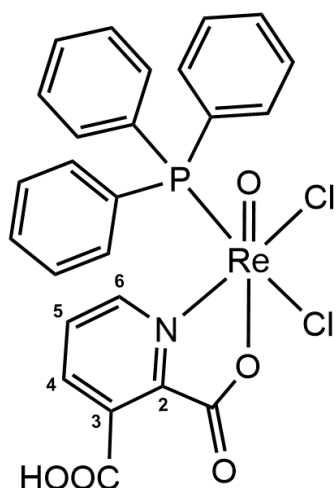
3.1.4. Sinteza dihloro-okso-trifenilfosfin-N,O-(6-metilpiridin-2-karboksilato)renijum(V) kompleksa $[\text{ReOCl}_2(\text{L3})(\text{PPh}_3)]$ (**K3**)



Postupak sinteze kompleksa **K3** je identičan proceduri za dobijanje kompleksa **K1**, uz korišćenje 6-metilpikolinske kiseline (**L3**, 0,03 g, 0,24 mmol) i $[\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2]$ (0,20 g, 0,24 mmol). Plavi kristali dobijeni su isparavanjem matičnog rastvora sedam dana nakon obrade reakcije. Prinos 64,60%. IR (ATR) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 501,4 (**Re-O** st), 529,3 (**Re-N** st), 760,9 - 691,8 (ar **C-H** δ oop) 994,0 (**Re=O** st), 1095,4 (**P-C** st), 1614,4

(C=N st), 1707,0 (C=O st), 3057,7 (ar C-H st). ^1H NMR (399,73 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 2,93 (s, 3H, CH_3); 7,28 - 7,48 (m, 16H, PPh_3 i H^4); 7,55 (d, 1H, H^3); 7,62 (d, 1H, H^5). ^{13}C NMR (100,52 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 30,84 (CH_3); 126,39 - 153,20 (C2-C6 + PPh_3); 165,19 (C=O). Elementalna analiza: izračunato za $\text{RePC}_{25}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{Cl}_2$ (%): N 2,09; C 44,71; H 3,13; nađeno (%): N 1,87; C 45,23; H 3,06. Maseni spektar ESI/MS (m/z), CH_3OH : 636,05 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ (teorijski izračunat m/z za $[\text{M}-\text{Cl}]^+ = 636$ za $\text{RePC}_{25}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{Cl}$).

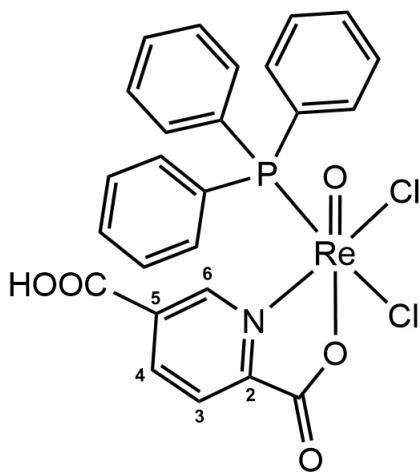
3.1.5. Sinteza dihloro-okso-trifenilfosfin-N,O-(2,3-dikarboksilato)renijum(V) kompleksa $[\text{ReOCl}_2(\text{L4})(\text{PPh}_3)]$ (K4)



Kompleks **K4** sintetisan je na sledeći način: 2,3-dipikolinska kiselina (**L4**, 0,10 g, 0,12 mmol) rastvorena je u 5 mL metanola i u taj rastvor ukapana je suspenzija $[\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2]$ (0,10 g, 0,12 mmol) u 5 mL dihlormetana. Reakciona smeša refluksovana je 24 h na 35 °C pri čemu je boja rastvora bila ljubičasta. Reakciona smeša uparena je do suva pri čemu je nastao željeni proizvod u obliku ljubičastog taloga. Prinos: 64,14%. IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 511,4 (**Re-O** st), 541,7 (**Re-N** st), 746,7 - 693,0 (ar C-H δ oop) 996,9 (**Re=O** st), 1094,4 (**P-C** st), 1482,8 (**COO**⁻ st sy), 1588,2 (C=N st), 1679,8 (**COO**⁻ st as), 1712,3 (C=O, st), 2951,7 (ar C-H st), 3056,7 (**COO-H** st).

^1H NMR (399,73 MHz, DMSO) δ (ppm) = 7,39 - 7,64 (m, 16H, PPh_3 i H^5); 8,50 - 8,62 (m, 2H, H^4 i H^6); 12,16 (d, 1H, **OH**). ^{13}C NMR (100,52 MHz, DMSO) δ (ppm) = 128,00 - 134,74 (PPh_3 + C2-C6); 162,27 i 165,96 (C=O). Maseni spektar ESI/MS (m/z), CH_3OH : 666,00 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ (teorijski izračunat m/z za $[\text{M}-\text{Cl}]^+ = 666$ za $\text{RePC}_{25}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{Cl}$).

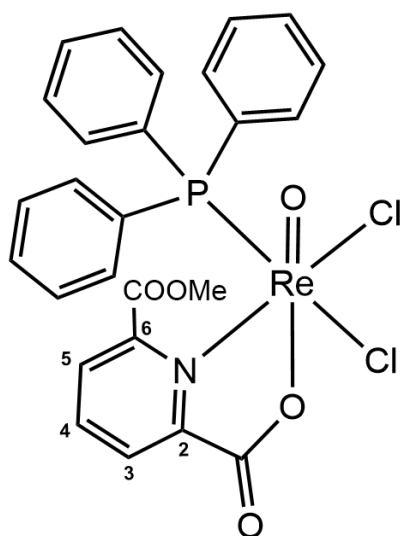
3.1.6. Sinteza dihloro-okso-trifenilfosfin-N,O-(2,5-dikarboksilato)renijum(V) kompleksa $[\text{ReOCl}_2(\text{L5})(\text{PPh}_3)]$ (K5)



Kompleks **K5** sintetisan je na sledeći način: 2,5-dipikolinska kiselina (**L5**, 0,10 g, 0,12 mmol) rastvorena je u 5 mL metanola i u taj rastvor ukapana je suspenzija $[\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2]$ (0,10 g, 0,12 mmol) u 5 mL metanola. Reakciona smeša refluksovana je 24 h na 68 °C pri čemu je boja rastvora bila zelena. Željeni proizvod u obliku zelenog taloga dobijen je filtracijom. Prinos: 45,17%. IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 503,9 (**Re-O** st), 531,2 (**Re-N** st), 746,8 - 693,0 (ar C-H δ oop) 995,0 (**Re=O** st), 1098,7 (**P-C** st), 1435,8 (**COO**⁻ st sy), 1577,1 (C=N

st), 1614,2 (COO^- st as), 1708,8 (C=O st), 2862,6 (ar C-H st), 3058,9 (COO-H st). ^1H NMR (399,73 MHz, DMSO) δ (ppm) = 7,40 - 7,56 (m, 15H, PPh_3); 7,89 (d, 1H, H^4); 8,33 (d, 1H, H^3); 8,70 (d, 1H, H^6). ^{13}C NMR (100,52 MHz, DMSO) δ (ppm) = 125,83 - 134,00 (PPh_3 , **C2** and **C3**); 145,78 (**C5**); 147,03 (**C4**); 149,22 (**C6**); 164,06 (C=O). Elementalna analiza izračunato za $\text{RePC}_{25}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{Cl}_2$ (%): N-1,99; C-42,78; H-2,71; nađeno (%): N- 1,84; C- 43,04; H- 2,63. Maseni spektar ESI/MS (m/z), CH_3OH : 666,00 $[\text{M-Cl}]^+$ (teorijski izračunat m/z za $[\text{M-Cl}]^+ = 666$ za $\text{RePC}_{25}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{Cl}$).

3.1.7. Sinteza dihaloro-okso-trifenilfosfin-N,O-(2,6-dikarboksilato)renijum(V) kompleksa $[\text{ReOCl}_2(\text{L6})(\text{PPh}_3)]$ (**K6**)



Kompleks **K6** sintetisan je po izmenjenoj proceduri opisanoj u literaturi[104]. Postupak sinteze kompleksa **K6** je identičan proceduri za dobijanje kompleksa **K1**, uz korišćenje 2,6-dipikolinske kiseline (**L6**, 0,04 g, 0,24 mmol) i $[\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2]$ (0,10 g, 0,12 mmol). Reakciona smeša refluksovana je 24 h na 35 °C pri čemu je boja rastvora bila plava. Željeni proizvod u obliku plavog taloga dobijen je filtracijom. Prinos: 57,06%. IR (ATR) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 515,3 (Re-O st), 531,2 (Re-N st), 762,7 - 696,2 (ar C-H δ oop) 1001,3 (Re=O st), 1095,6 (P-C st), 1334,6 (C-O st), 1471,6 (COO^- st sy), 1605,6 (COO^- st as), 1706,2 (COO st), 1743,9

(COOMe st), 3068,0 - 2962,3 (ar C-H st). ^1H NMR (399,73MHz, DMSO) δ (ppm) = 3,39 (s, 3H, CH_3); 7,39-7,65 (m, 15H, PPh_3); 7,91 (d, 1H, H^4); 8,11 (t, 1H, H^3); 8,28 (d, 1H, H^5). ^{13}C NMR (100,52 MHz, DMSO) δ (ppm) = 53,30 (CH_3); 127,06-133,89 (PPh_3 , **C3**, **C4**, i **C5**); 145,66 (**C2**); 151,37 (**C6**); 163,39 (C=O); 164,09 (C=O). Maseni spektar ESI/MS (m/z), CH_3OH : 680,04 $[\text{M-Cl}]^+$ (teorijski izračunat m/z za $[\text{M-Cl}]^+ = 680$ za $\text{RePC}_{26}\text{H}_{21}\text{NO}_5\text{Cl}$).

3.2. Materijal i metode

3.2.1. Supstance korišćene u sintezama

Polazni kompleks $[\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2]$ je sintetisan po već opisanoj proceduri [103]. Korišćeni su komercijalno dostupni ligandi: pikolinska kiselina (**L1**), 3-metilpikolinska kiselina (**L2**), 6-metilpikolinska kiselina (**L3**), 2,3-dipikolinska kiselina (**L4**), 2,5-dipikolinska kiselina (**L5**) i 2,6-

dipikolinska kiselina (L6) kupljeni su od Arcos organics. Korišćeni su komercijalno dostupni rastvarači bez daljeg prečišćavanja.

3.2.2. Spektroskopske metode kojima su okarakterisana sintetisana jedinjenja

3.2.2.1. Infracrvena spektroskopija

Infracrveni spektri svih uzoraka snimljeni su pomoću uređaja Nicolet 6700 FT-IR spektrometra (ATR tehnika snimanja).

3.2.2.2. NMR spektroskopija

Svi NMR spektri snimljeni su u deuterisanim rastvaračima kao što su d_6 -DMSO ili d -CDCl₃ koristeći TMS kao interni standard. Položaji signala u spektru izraženi su u δ -jedinicama (ppm). Varian instrument (Agilent, USA) frekvencije 399,73 MHz korišćen je za snimanje ^1H NMR spektara, odnosno 100,52 MHz za snimanje ^{13}C NMR spektara.

3.2.2.3. Masena spektrometrija

Maseni spektri snimljeni su pomoću masenog LTQ Orbitrap XL spektrometra sa elektrosprej jonizacijom (ESI-MS) u pozitivnom modu koristeći acetonitril ili metanol kao rastvarač, dok je za najaktivnije jedinjenje, radi potvrde čistoće proizvoda snimljen i dodatni spektar na masenom spektrometru visoke rezolucije sa elektrosprej jonizacijom (HRMS-ESI), Sciex X500R Q-TOF, u pozitivnom modu koristeći metanol kao rastvarač.

3.2.3. Elementalna analiza

Elementalna analiza urađena je u laboratoriji za Mikro analizu na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beču.

3.2.4. Detalji računskih proračuna

Svi DFT proračuni za komplekse **K4** - **K6** su rađeni pomoću programskog paketa Gaussian 09 koristeći funkcional B3LYP(D3) i bazis set def2-TZVP [105]. Kristalna struktura kompleksa **K6** je preuzeta iz Kembričke kristalografske baze podataka (eng. Cambridge Structural Database) i korišćena je kao početna 3D struktura za optimizaciju njegove geometrije.[106, 107]. Kristalna struktura molekula **K6** korišćena je kao početna 3D struktura i za optimizaciju geometrije kompleksa **K4** i **K5**. Za sva tri kompleksna jedinjenja izračunate su vibracione frekvencije. Odsustvo negativnih vrednosti vibracionih frekvencija potvrđuje da optimizovane geometrije odgovaraju minimumu energije. Za računanje nekovalentnih interakcija korišćeni su programi Multiwfn i VMD.

3.2.5. Rendgenska strukturna analiza

Rendgenska strukturna analiza za komplekse **K1** - **K3**, urađena je na Institutu za hemiju, Univerziteta u Gracu, Austrija. Sva merenja izvršena su na uređaju Bruker APEX-II CCD difraktometru korišćenjem monohromatskog Mo-K α zračenja talasne dužine 0,71073 Å, iz mikrofokusne zatopljene tube opremljene višeslojnim monohromatorom na 100 K. Kristalne strukture za tri navedena kompleksna jedinjenja rešena su pomoću direktne metode SHELXS-97 [108] i koristeći metodu najmanjih kvadrata na F² (SHELXL-2014/6) [109]. Svi kristalografski podaci i parametri dati su u Tabelama 5 i 6, dok se kristalne strukture pod jedinstvenom oznakom u obliku CIF fajlova mogu naći u Kembričkoj kristalografskoj bazi podataka (Cambridge Structural Database, **CCDC 2126604** - **2126606**).

3.2.6. Stabilnost novosintetisanih kompleksnih jedinjenja u dimetil sulfoksidu (DMSO)

Da bi se ispitalo da li su kompleksi pogodni za biološka ispitivanja, urađena je analiza njihove stabilnosti kompleksa u DMSO-u. Ovaj rastvarač se koristi za pripremanje štok rastvora kompleksnih jedinjenja u biološkim testovima. Stabilnost kompleksa praćena je pomoću ¹H NMR spektroskopije u vremenskom intervalu od 0 do 72 h jer toliko traje inkubaciono vreme prilikom MTT metode. Za potrebe ove analize izabran je po jedan predstavnik iz dve grupe kompleksa i to su kompleksi **K2** i **K5** koji su rastvoreni u deuterisanom DMSO-u i ¹H NMR spektri su snimani u sledećim vremenskim intervalima: 0 h, 1 h, 24 h, 48 h i 72 h.

3.2.7. Biološka ispitivanja u *in vitro* uslovima

Za potrebe ove doktorske disertacije urađeni su sledeći biološki eksperimenti:

1. Određivanje *in vitro* citotoksične aktivnosti novosintetisanih kompleksa pomoću MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromida) metode na različitom panelu humanih tumorskih ćelijskih linija:
 - ❖ A549 - ćelije adenokarcinoma pluća,
 - ❖ PANC-1 - ćelije adenokarcinoma pankreasa
 - ❖ MDA-MB-231 - ćelije karcinoma dojke
 - ❖ MCF-7 - ćelije karcinoma dojke
 - ❖ LS-174 - ćelije adenokarcinoma debelog creva
 - ❖ EA. hy 926 - ćelije endotela krvnih sudova
 - ❖ OVCAR-3 - ćelije adenokarcinoma jajnika
 - ❖ MRC-5 - zdrava ćelijska linija (poreklom od fetalnih fibroblasta pluća) ;
2. Određivanje sinergijskog efekta novosintetisanih kompleksa sa verapamil-hloridom - VRP na PANC-1 ćelijskoj liniji (ćelije adenokarcinoma pankreasa);
3. Određivanje uticaja kompleksa- **K1** na aktivnost L-BSO na PANC-1 ćelijskoj liniji (ćelije adenokarcinoma pankreasa);
4. Analiza ćelijskog ciklusa na PANC-1 ćelijskoj liniji (ćelije adenokarcinoma pankreasa) pomoću protočne citometrije (Flow cytometry);
5. Morfološka analiza ćelijske smrti pomoću fluorescentne mikroskopije;

3.2.7.1. Ćelijske kulture i reagensi

Ćelijske linije A549 - ćelije adenokarcinoma pluća, PANC-1 - ćelije adenokarcinoma pankreasa, LS-174 - ćelije adenokarcinoma debelog creva, EA. hy 926 - ćelije endotela krvnih sudova (EA. hy 926 ćelijska linija je hibridna, nastala je fuzijom humanih endotelnih ćelija iz vene pupčanika (HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cells) i humane tumorske ćelijske linije A549 poreklom epitela pluća. Tako da je EA. hy 926 ćelijska linija kontinuirana a ima karakteristične markere endotelnih ćelija), OVCAR-3 - ćelije adenokarcinoma jajnika i MRC-5 - zdrava ćelijska linija (poreklom od fetalnih fibroblasta pluća) kultivisane su u monosloju pomoću hranljivog ćelijskog medijuma Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, kupljenog od Sigma Chemicals Co, USA. S druge strane, ćelijske linije MDA-MB-231 i MCF-7 - ćelije karcinoma dojke, kultivisane

su u monosloju pomoću hranljivog ćelijskog medijuma Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), kupljenog od Sigma- Aldrich Co, USA. Hranljivi ćelijski medijumi su obogaćeni sa 10% ili 20% fetalnog goveđeg seruma (FCS), pH= 7,2 kupljenog od Sigma- Aldrich Co, USA, kao i 2 mM L-glutaminom i 25 mM 4-(2- hidroksietil) piperazin-1-etansulfonska kiselina (HEPES) i smešom Penicilin/Streptomycin kupljenog od Sigma- Aldrich Co, USA finalne koncentracije za penicillin - 100 U/mL i streptomycin - 100 µg/mL. Sve ćelijske vrste gajene su u inkubatoru na 37 °C u 5% atmosferi CO₂ i određene vlažnosti vazduha.

3.2.7.2. MTT metoda

In vitro citotoksičnost svih sintetisanih kompleksnih jedinjenja i *cisplatine* kao referentnog jedinjenja određena je pomoću MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromida, kupljenog od Sigma- Aldrich Co) metode po već opisanoj proceduri [110, 111]. Procedura se sastoji od nekoliko koraka: ćelije su zasejane na pločici od 96 - bunarića (Thermo Scientific Nunc™) i inkubirane 24 h, nakon toga ćelije su tretirane rastvorom kompleksnih jedinjenja određene koncentracije i inkubirane naredna 72 h. Osnovni rastvor kompleksnog jedinjenja (štok) napravljen je u DMSO-u koncentracije 10 mM nakon čega je napravljeno serijsko razblaženje rastvora odgovarajućim ćelijskim medijumom pri čemu su koncentracije bile 100, 50, 25, 12,5, 6,25 µM, dok procenat DMSO-a nije prelazio 1% (v/v). Nakon 72 h u svaki bunarić je dodano je 20 µL rastvora MTT (koncentracije 5 mg/mL napravljenog u fosfatnom puferu - PBS, na pH = 7,2). Tako spremljene pločice inkubirane su 4 h na 37 °C u 5% atmosferi CO₂ i određene vlažnosti vazduha. Zatim su pločice tretirane sa 100 µL 10% natrijum dodecil sulfata (SDS). Apsorbance uzoraka snimane su nakon 24 h na enzimsko vezanom testu imunosorbenta (ELISA) pomoću instrumenta (Thermo Labsystems Multiskan EX 200–240 V ili MULTISCAN SkyHigh, Thermo Scientific) na talasnoj dužini od 570 nm. IC₅₀ vrednosti (µM) dobijene su iz tri nezavisna eksperimenta i predstavljaju koncentraciju jedinjenja koja uzrokuje 50% inhibicije rasta ćelija, izračunate iz dijagrama vijabilnosti ćelije.

3.2.7.3. Određivanje efekta kombinovanog dejstva novosintetisanih kompleksa sa verapamil hidrohloridom - VRP na PANC-1 ćelijskoj liniji

Verapamil je poznati blokator kalcijumovog kanala koji dovodi do inhibicije P-glikoproteina i omogućava prevazilaženja rezistencije na lekove u ćeliji tako što dovodi do akumulacije leka unutar ćelije pri čemu ćelije postaju osetljive na taj lek. P-glikoprotein (Pgp) pripada porodici ATP-zavisnih proteina plazmine membrane i kada nije blokiran u tumorskim ćelijama dolazi do njegove preterane ekspresije što dovodi da smanjenja citotoksičnog efekta leka [112]. Za potrebe ovog eksperimenta korišćen je verapamil hidrohlorid 5-[N-(3,4-dimetoksifenilet)metilamino]-2-(3,4-dimetoksifenil)-2-izopropilvaleronitril hidrohlorid (VRP), kupljen od Alkaloid (Skoplje) rastvorenog u sterilnom rastvoru natrijum-hlorida koncentracije 2,5 mg/mL. Da bi se odredio efekat VRP na P-glikoprotein svi kompleksi i *cisplatina* testirani su zajedno sa različitim koncentracijama VRP na PANC-1 ćelijskoj liniji. Izvođenje eksperimenta se zasniva na MTT metodi koja je prethodno opisana [113]. Eksperimentalni deo se sastoji od sledećih koraka: koncentracija štoka rastvora VRP bila je 1 mM koji je kasnije razblažen da bi se napravili rastvori koncentracije 30 i 100 μ M, nakon toga su PANC-1 ćelije tretirane sa odgovarajućom koncentracijom VRP i inkubirane 30 min. Po isteku tog vremena dodani su rastvori kompleksa i *cisplatine* u koncentracijama od 6,25, 12,5, 25, 50, 100 μ M i inkubirani su naredna 72 h. Kao kontrola služile su ćelije koje su tretirane samo sa VRP. U cilju određivanja IC_{50} vrednosti urađena su tri nezavisna eksperimenta.

3.2.7.4. Određivanje uticaja L-BSO na aktivnost kompleksa na PANC-1 ćelijskoj liniji

Određivanje aktivnosti L-BSO (L-butionin sulfoksimin) je važno jer je on inhibitor γ -glutamilstein sintetaze koji utiče na smanjenje nivoa glutaciona (GSH) u ćelijama [33]. Kupljen je od Sigma-Aldrich u obliku praha. Praškasti L-BSO rastvoren je u sterilnom fiziološkom rastvoru koncentracije 10 mM i profiltriran je kroz sterilizovani filter pora 0,2 μ m. Ovako pripremljen štok rastvor je čuvan na -20 °C zaštićen aluminijumskom folijom od svetlosti. Eksperiment je izveden na PANC-1 ćelijskoj liniji koristeći *cisplatinu* kao referentno jedinjenje, a kompleks **K1** pokazao se kao pogodan kandidat jer je ispoljio citotoksični potencijal na ovoj ćelijskoj liniji. Kao i kod prethodnog eksperimenta i ovaj je urađen pomoću MTT metode, koja je ranije opisana [110]. Uslovi su sledeći: prvo su PANC-1 ćelije bile tretirane sa L-BSO koncentracije 100 μ M i inkubirane sat vremena, nakon čega su bile tretirane sa kompleksom **K1** ili *cisplatinom* određenih koncentracija- 6,25, 12,5, 25, 50, 100 μ M i ponovo inkubirane 72 h. Kao kontrola korišćene su ćelije koje su bile tretirane samo sa L-BSO. U cilju određivanja IC_{50} vrednosti urađena su najmanje dva nezavisna eksperimenta.

3.2.7.5. Analiza ćelijskog ciklusa na PANC-1 ćelijskoj liniji pomoću protočne citometrije

Protočnom citometrijom urađena je analiza ćelijskog ciklusa koristeći bojenje propidijum jodidom (PI) po objavljenoj proceduri [114]. Ćelije PANC-1 gajene su u odgovarajućem hranljivom medijumu i zasejane u gustini od $2 \cdot 10^5$ ćelija po bunariću mikrotitar ploče od 6 bunarića kupljenoj od Thermo Scientific Nunc™. Prvi korak podrazumeva dodatak VRP koncentracije 30 μ M i inkubaciju od 30 minuta. Nakon toga ćelije su tretirane kompleksom **K1** ili *cisplatinom* u opsegu koncentracija do 100 μ M inkubirane su narednih 48 h. Kao kontrola korišćene su ćelije koje su tretirane samo sa VRP. Nakon 48 h bunarići s ćelijama su isprani hladnim rastvorom fosfatnog pufera (PBS) i ćelije su fiksirane 70% etanolom i ostavljene preko noći. Nakon fiksacije ćelija, ponovljen je korak ispiranja sa PBS-om i ćelije su inkubirane zajedno sa ribonukleazom A (RNaseA, koncentracija: 1 mg/ mL) i inkubirane 30 min na 37 °C. Pre samog početka analize ćelije su obojene sa PI koncentracije 400 μ g/mL. Uzorci su snimljeni pomoću Calibur Becton Dickinson flow cytometer koristeći fluorescentno aktivirani ćelijski sorter (FACS), na talasnoj dužini ekscitacije 488 nm (Argon-ion laser). Analiza dobijenih podataka vršena je pomoću računarskog softvera Cell Quest. Rezultati predstavljeni pomoću histograma ćelijskog ciklusa dobijeni su izvođenjem najmanje dva nezavisna eksperimenta.

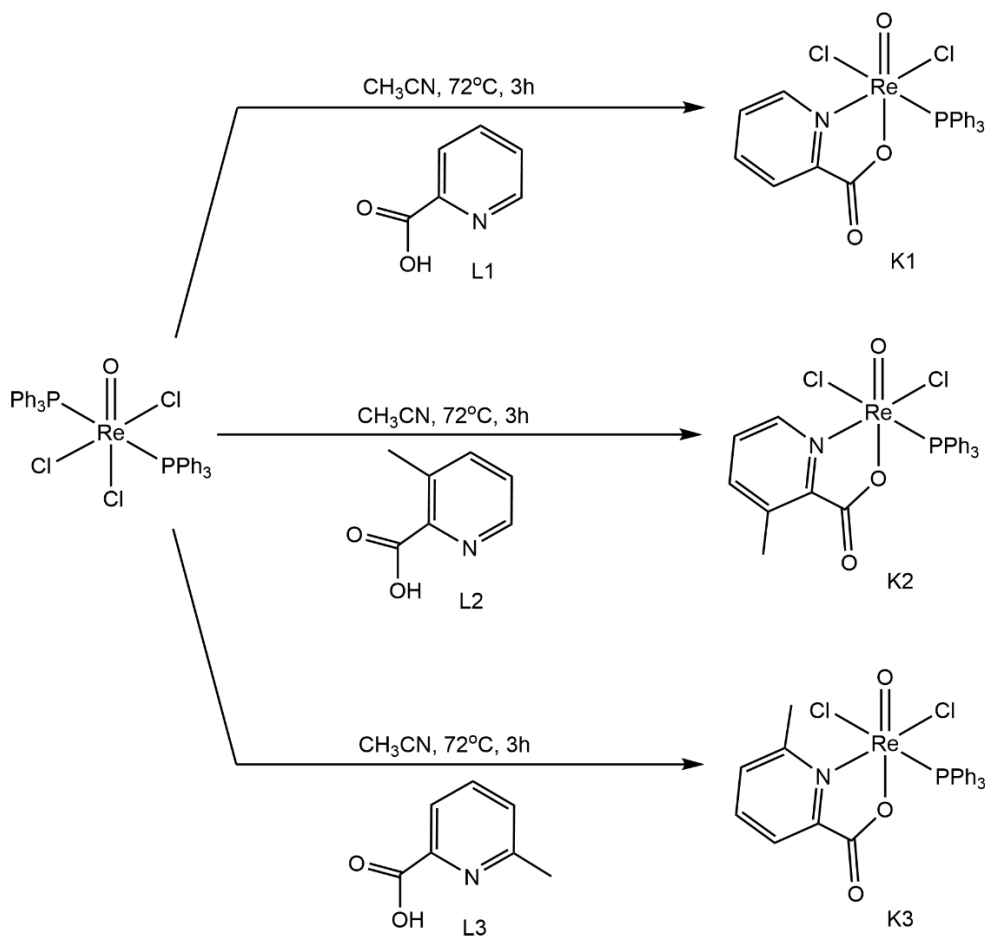
3.2.7.6. Morfološka analiza ćelijske smrti pomoću fluorescentne mikroskopije

Ćelije PANC-1 ćelijske linije zasađene su u gustini od $1 \cdot 10^5$ u 2 mL odgovarajućeg medijuma na mikrotitar pločama od 6 bunarića kupljenih od Thermo Scientific Nunc™. Nakon inkubacije od 24 h tretirane su kompleksom **K1** ili *cisplatinom* odgovarajuće koncentracije i inkubirane su narednih 72 h. Nakon toga ćelije su obojene etidijum bromidom koncentracije 3 μ g/mL i akridinom oranžom koncentracije 5 μ g/mL po već objavljenoj proceduri [115, 116]. Za snimanje uzoraka korišćen je fluorescentni mikroskop - Carl Zeiss (PALM MicroBeam with Axio Observer.Z1 koristeći AxioCam MRm, (filteri Alexa Fluor 489 I Alexa Fluor 546) koristeći Zeiss Fluar 10 $\times$ /0.50 ili LD Plan-NeoFluar 20 $\times$ /0,4 objektiv). Slike su dobijene pomoću digitalnog softvera za obradu slika-AxioVision Version 4,91; Carl Zeiss Imaging Solutions.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Sinteza kompleksnih jedinjenja K1 - K3

Kompleksna jedinjenja **K1** - **K3** dobijena reakcijom polaznog $[\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2]$ kompleksa i odgovarajućih liganada L1 - L3 refluksovanjem reakcione smeše na 78 °C u acetonitrilu tokom 3 h. Kristali novოსინтетисаних комплекса добијени су из матичног раствора спорим испаривањем растварача (shema 1).

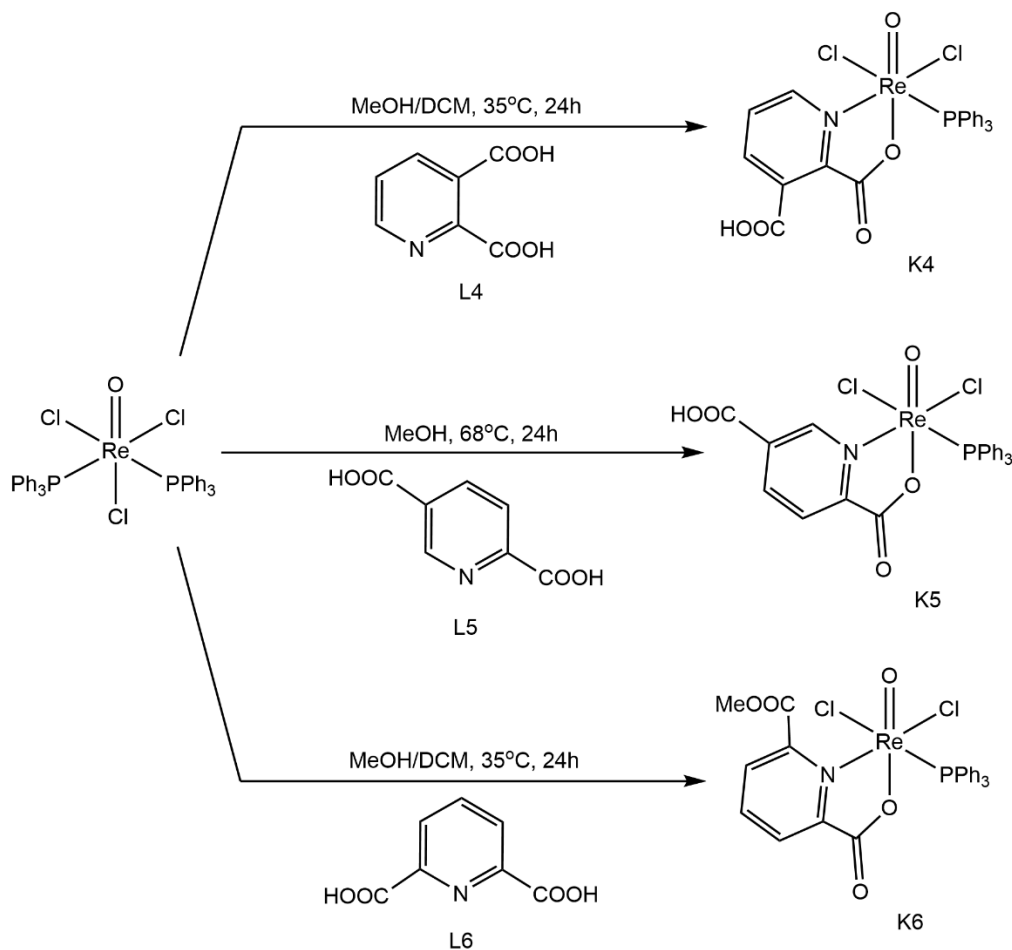


Schema 1. Prikaz sintetičkog puta za dobijanje kompleksnih jedinjenja K1 - K3

4.2. Sinteza kompleksnih jedinjenja K4 - K6

Kompleksna jedinjenja **K4** i **K6** dobijena su polazeći od $[\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2]$ kompleksa i odgovarajućih liganada L4 i L6 refluksovanjem reakcione smeše u smeši rastvarača DCM/MeOH (1:1 V/V) na 35 °C u toku 24 h, dok je kompleks **K5** dobijen korišćenjem polaznog $[\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2]$

i liganda L5 refluksovanjem reakcione smeše u metanolu na 68 °C u toku od 24 h. Željeni proizvodi u obliku taloga sva tri kompleksa dobijeni su isparavanjem ili ceđenjem reakcione smeše (shema 2).



Schema 2. Prikaz sintetičkog puta za dobijanje kompleksnih jedinjenja K4 – K6

4.3. Spektroskopska karakterizacija sintetisanih kompleksa renijuma(V)

Sintetisani kompleksi renijuma(V) analizirani su standardnim spektroskopskim metodama za određivanje strukture hemijskih jedinjenja: infracrvenom spektroskopijom, NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom. Takođe sastav kompleksa je potvrđen elementalnom analizom. Kristalna struktura kompleksa **K1** - **K3** utvrđena je rendgenskom strukturnom analizom.

Napomena: Iako su kompleksi **K1** i **K6** već opisani u literaturi [104], njihova karakterizacija je detaljno tumačena u ovoj disertaciji s obzirom na modifikovan postupak sinteze kao i dodatne spektroskopske tehnike koje su primenjene za njihovu karakterizaciju.

4.3.1. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija kao jedna od metoda karakterizacije strukture jedinjenja služi za detekciju funkcionalnih grupa u molekulu. U koordinacionoj hemiji pomoću IC spektara može se utvrditi da li dolazi do koordinacije liganada za metalni jon na osnovu promene položaja apsorpcionih traka funkcionalnih grupa koje učestvuju u koordinaciji. Za potrebe ove disertacije snimljeni su IC spektri nekoordinovanih liganada kao i svih novonastalih kompleksnih jedinjenja da bi se na osnovu poređenja istih moglo doći do zaključka da li dolazi do bidentatne koordinacije liganada preko atoma azota iz piridinskog prstena i atoma kiseonika karboksilne grupe za jon renijuma. Kada se porede spektri kompleksa i odgovarajućih liganada primećuje se odsustvo intenzivne, široke trake valencione O-H istežuće vibracije u oblasti od 3453 do 2855 cm^{-1} kod kompleksa **K1** - **K3**. Upravo odsustvo ove trake ukazuje da atom kiseonika iz karboksilne grupe učestvuje u koordinaciji za metalni centar. Zbog prisustva dve karboksilne grupe kod kompleksa **K4** i **K5** sa dipikolinskim derivatima dolazi do pomeranja trake slobodne valencione O-H istežuće vibracije ka nižem talasnom broju u odnosu na nekoordinovane ligande. Kod liganada **L3** i **L4** ova traka je široka i nalazi se u oblasti od 3432,1 do 3102,3 cm^{-1} , dok se u kompleksima **K4** i **K5** uočava vrlo oštra traka na 3056,7 i 3058,9 cm^{-1} što je još jedna potvrda koordinacije.

Oštre trake srednjeg intenziteta valencionih C-H istežućih vibracija aromatičnog prstena kod svih šest kompleksa nalaze se od 3068 do 2862,6 cm^{-1} . Još jedna bitna razlika u IC spektrima kompleksa **K1** - **K3** u odnosu na ligande **L1** - **L3** jeste odsustvo apsorpcionih traka u oblasti od 2649 do 2050 cm^{-1} koje su karakteristične za intramolekulsku vodoničnu vezu O-H...N tipa što znači da i atom azota iz piridinskog prstena učestvuje u koordinaciji. Kada je reč o traci valencione C=O istežuće vibracije karbonilne grupe kod svih sintetisanih kompleksa nema značajnijih pomeranja u odnosu na slobodne ligande.

U spektrima kompleksa **K4** - **K6** sa dipikolinskim kiselinama uočavaju se karakteristične oštre asimetrične trake valencionih istežućih vibracija estara COO^- istežuća asimetrična u oblasti od 1706,2 do 1605,6 cm^{-1} kao i simetričnih traka valencionih istežućih vibracija COO^- istežuća simetrična na talasnim brojevima od 1482,8 do 1435,8 cm^{-1} . Karakteristična traka valencione P-C istežuće vibracije iz trifenilfosfin grupe kod svih šest jedinjenja se nalazi u oblasti od 1098 do 1095 cm^{-1} . Usled koordinacije odgovarajućih liganada za renijuma(V) dolazi do pomeranja ka manjim talasnim brojevima apsorpcione Re=O trake. Još jedna potvrda da atom azota iz piridina ima ulogu u koordinaciji jeste prisustvo Re-N apsorpcione trake u opsegu od 529,3 do 541,7 cm^{-1} .

4.3.2. ^1H NMR spektroskopija

U cilju karakterizacije novosintetisanih kompleksnih jedinjenja renijuma(V) i potvrde koordinacije N,O - liganada snimljeni su ^1H NMR spektri liganada i kompleksnih jedinjenja u istom deuterisanom rastvaraču radi poređenja. Kompleksna jedinjenja možemo podeliti u dve grupe i to **K1** - **K3** kompleksi renijuma(V) sa derivatima pikolinske kiseline i kompleksi **K4** - **K6** sa dipikolinskim kiselinama radi lakše analize dobijenih spektara. Najznačajnija promena u odnosu na ligande **L1** -**L6**, koja se uočava kod svih kompleksa **K1** - **K6** je odsustvo signala protona iz karboksilne grupe što ukazuje da se koordinacija vrši upravo preko atoma kiseonika karboksilne grupe.

Takođe u spektrima kompleksa uočava se široki multiplet koji predstavlja 15 protona trifenilfosfin grupe u opsegu od 7,30 do 7,64 ppm. Singlet metil grupe kod 3-metilpikolinske kiseline prisutan je na hemijskom pomeranju 2,76 ppm, dok se pri koordinaciji ovaj signal pomera ka nižem hemijskom pomeranju od 2,23 ppm u kompleksu **K2**. Sasvim suprotna situacija uočava se kod 6-metilpikolinske kiseline gde je signal metil grupe na hemijskom pomeranju od 2,60 ppm, dok se u kompleksu **K3** ovaj singlet nalazi na većem hemijskom pomeranju od 2,93 ppm jer se metil grupa nalazi odmah do atoma azota piridina koji je koordinovan za metalni centar. Takođe potvrda da kod kompleksa **K6** dolazi do formiranja metil estra jeste prisustvo signala metil grupe na hemijskom pomeranju od 3,39 ppm koje izostaje kod odgovarajućeg liganda.

Da koordinacija ima uticaj na hemijska pomeranja protona iz piridinskog prstena govori i podatak da se singlet koji odgovara protonu **H⁶** nekoordinovane pikolinske kiseline nalazi na 8,78 ppm, dok je u kompleksu **K1** ovaj proton uočen na hemijskom pomeranju od 12,02 ppm. Protoni **H³** i **H⁴** kompleksa **K1** u obliku multiplleta nalaze se u oblasti od 8,39 do 8,49 ppm dok se kod kompleksa **K2** protoni **H⁴** i **H⁵** nalaze u oblasti od 7,29 do 7,53 ppm. Dubleti uočeni na 7,55 i 7,62 ppm odgovaraju protonima **H³** i **H⁵** kompleksa **K3** odnosno 8,42 ppm protona **H⁶** kompleksa **K2**.

Kod kompleksa sa dipikolinskim kiselinama uočava se razlika u hemijskom pomeranju protona slobodne karboksilne grupe i ta promena je najviše izražena kod liganda **L4** gde je signal na hemijskom pomeranju od 13,55 ppm dok se pri koordinaciji u kompleksu **K4** ovaj signal nalazi na nižem hemijskom pomeranju od 12,16 ppm. Multiplet u oblasti od 8,50 do 8,62 ppm odgovara protonima **H⁴** i **H⁶** piridinskog prstena kompleksa **K4**. Dubleti na 7,89 ppm i 7,91 ppm odgovaraju protonu **H⁴** kompleksa **K5** i **K6**, dok se u kompleksu **K6** odnosno **K5** proton **H³** piridinskog prstena nalazi na hemijskom pomeranju 8,11 ppm odnosno 8,33 ppm. Takođe u spektru kompleksa **K6** na 8,29 ppm uočava se dublet protona **H⁵**, dok se na najvišem hemijskom pomeranju od 8,70 ppm nalazi

dublet protona H^6 kompleksa **K5**. Prikaz najznačajnijih hemijskih pomeranja u ^1H NMR spektrima liganada i odgovarajućih kompleksa nalazi se u Tabeli 3 u nastavku.

Tabela 3. Prikaz najznačajnijih hemijskih pomeranja u ^1H NMR spektrima liganada i odgovarajućih kompleksa

ligand/kompleks	δ (ppm)	H^3	H^4	H^5	H^6	CH_3	OH
L1		8,25	7,97	7,60	8,78		10,73
K1		8,39	8,49	7,66	12,02		
L2			7,71	7,47	8,44	2,76	
K2			7,29	7,53	8,42	2,23	
L3		7,83	7,42	8,02		2,60	
K3		7,55	7,48	7,62		2,93	
L4			8,24	7,63	8,73		13,55
K4			8,50	7,64	8,62		12,16
L5		8,43	8,15		9,14		13,60
K5		8,33	7,89		8,70		
L6		8,15 - 8,24					13,33
K6		8,11	7,91	8,29		3,39	

4.3.3. ^{13}C NMR spektroskopija

Kao još jedna metoda karakterizacije snimljeni su i ^{13}C NMR spektri liganada i kompleksnih jedinjenja u istom deuterisanom rastvaraču radi poređenja. Ono što je karakteristično za svih šest kompleksa je da se ne uočava značajna promena signala u spektrima u odnosu na ligande. Kod kompleksa **K1 - K3** signal ugljenika karbonilne grupe je na pomeranju od 164 ppm. Kod kompleksa **K4 - K6** sa dipikolinskim kiselinama signal slobodne karbonilne grupe je na hemijskom pomeranju od 165 ppm, dok je signal karbonilne grupe koja učestvuje u koordinaciji pomenen ka nižem hemijskom pomeranju od 163 ppm. Signali ugljenika piridinskog prstena kao i signali ugljenika trifenilfosfin grupe kod svih kompleksa nalaze se u oblasti od 123 do 152 ppm. Takođe signali ugljenika metil grupe nalaze se na hemijskom pomeranju od 19, 30 i 53 ppm u kompleksima **K2**, **K3** odnosno **K6**.

4.3.4. Masena spektrometrija

Sva kompleksna jedinjenja okarakterisana su i masenom spektrometrijom koja je snimana tehnikom elektrosprej jonizacije u pozitivnom modu koristeći acetonitril ili metanol kao rastvarač. Da bi se utvrdilo da li dobijene m/z vrednosti odgovaraju predloženim fragmentacionim jonima urađeno je i teorijsko računanje m/z vrednosti pomoću Kalkulatora distribucije izotopa (eng. Isotope Distribution Calculator). Za najaktivniji kompleks sa 2,6-dipikolinskom kiselinom (**K6**) radi potvrde čistoće novosintetisanog jedinjenja snimljen je i maseni spektar visoke rezolucije koristeći elektrosprej tehniku jonizacije u pozitivnom modu, u metanolu. Jedino se kod kompleksa **K2** uočava da su molekulski joni uvećani za jon natrijuma ili kalijuma koji potiču iz izvora uređaja, dok se kod kompleksa **K1** uočava prisustvo dva jona: molekulskog jona i molekulskog jona bez jednog hlorido liganda. Što se tiče ostalih kompleksa: **K3 - K6** potvrđeno je prisustvo molekulskog jona bez jednog hlorido liganda. Svi podaci vezani za masene spektre predstavljeni su u Tabeli 4 u nastavku teksta.

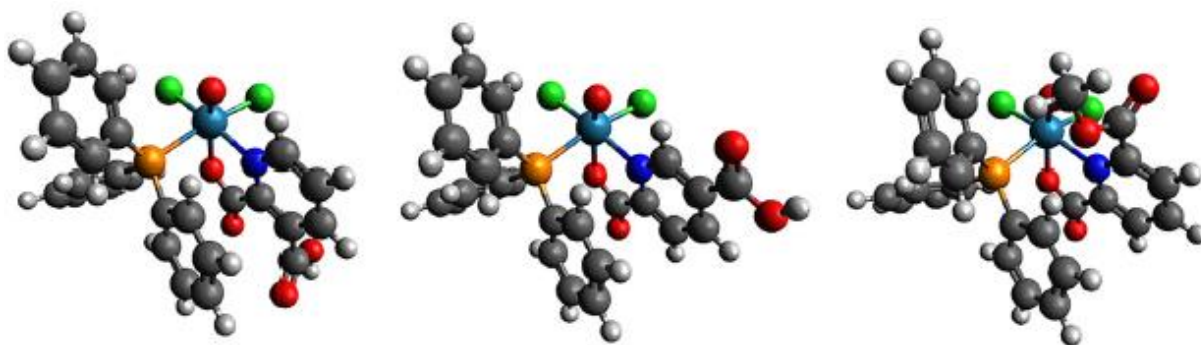
Tabela 4. Fragmentacioni joni u masenim spektrima kompleksa K1 - K6, pozitivan mod snimanja

Kompleksna jedinjenja	m/z fragmentacionog jona (dobijen)	m/z fragmentacionog jona (teorijski izračunat) sajt: Isotope Distribution Calculator https://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm
K1	$m/z = 657 [M]^+$ $m/z = 622,03 [M-Cl]^+$	$m/z = 657 [M]^+$ $m/z = 622 [M-Cl]^+$
K2	$m/z = 694,20 [M+Na]^+$ $m/z = 709,98 [M+K]^+$	$m/z = 694 [M+Na]^+$ $m/z = 710 [M+K]^+$
K3	$m/z = 636,05 [M-Cl]^+$	$m/z = 636 [M-Cl]^+$
K4	$m/z = 666 [M-Cl]^+$	$m/z = 666 [M-Cl]^+$
K5	$m/z = 666 [M-Cl]^+$	$m/z = 666 [M-Cl]^+$
K6	$m/z = 680,04 [M-Cl]^+$	$m/z = 680 [M-Cl]^+$

4.3.5. Detalji računskih proračuna

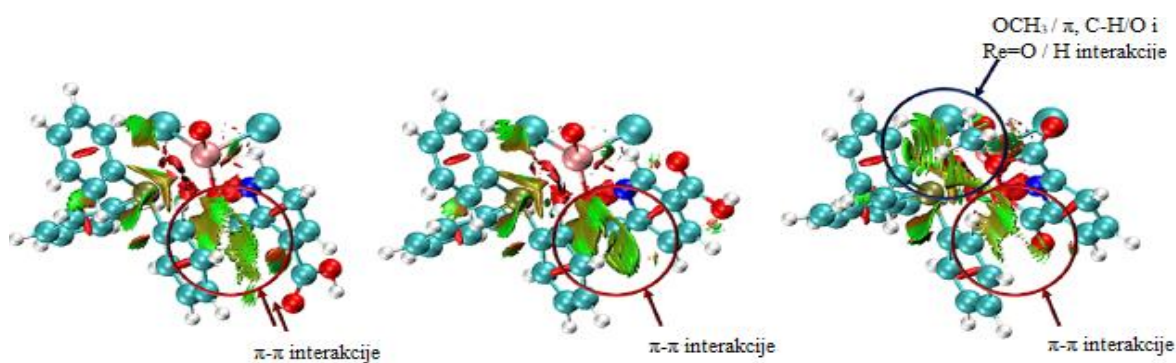
Optimizovana struktura kompleksa **K6** je u skladu sa kristalnom strukturom preuzetom iz Kembričke kristalografske baze, opisanoj u literaturi [104]. Ono što treba istaći je da su optimizovane strukture kompleksa **K4** i **K5** pokazale značajne razlike u poređenju sa optimizovanom strukturom kompleksa **K6**, a glavna razlika je u nekovalentnim interakcijama. Kod sva tri kompleksa dolazi do interakcije jednog aromatičnog prstena trifenilfosfin grupe i piridinskog prstena liganda. Takođe,

analizom optimizovanih geometrija uočeno je da metoksi (-OCH₃) grupa ostvaruje drugačije nekovalentne interakcije u kompleksu **K6** u odnosu na komplekse **K4** i **K5**. Atom kiseonika iz -OCH₃ grupe ostvaruje C–H/O interakciju sa atomom vodonika iz trifenilfosfin grupe (dužina interakcije: 2,284 Å). Osim toga dolazi do interakcije između vodonika iz -OCH₃ grupe i kiseonika iz Re=O veze. Ovo je takođe praćeno C–H/π interakcijom između vodonika iz -OCH₃ grupe i aromatičnog prstena iz trifenilfosfin grupe (Slika 28).



Slika 28. Optimizovane 3D strukture kompleksa K4 - K6

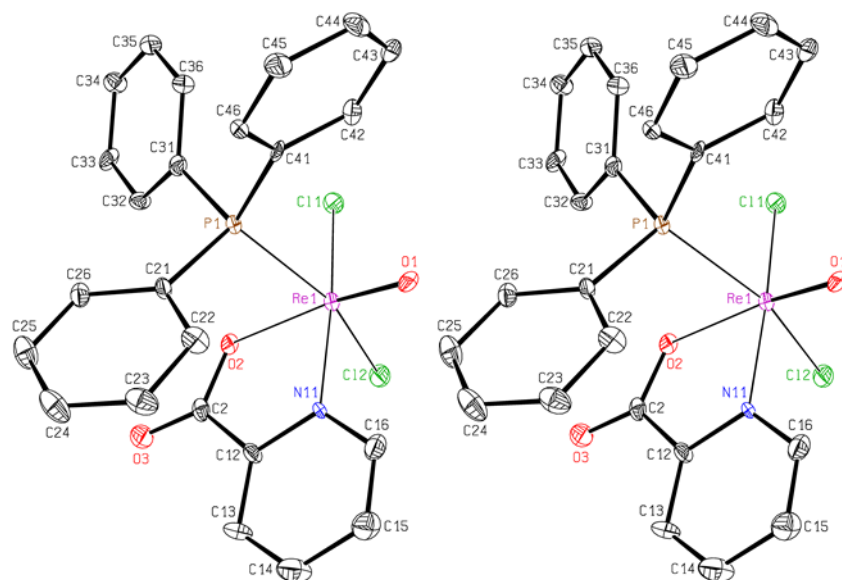
Analizom dijagrama izračunatih nekovalentnih interakcija - NCI utvrđeno je da postoje π – π interakcije između aromatičnih prstenova (zelene površine između aromatičnih prstenova predstavljaju Van der Valsove interakcije). Takođe analiza je pokazala da je -OCH₃ grupa kompleksa **K6** uključena u -OCH₃/π, C–H/O i Re=O/H interakcije. Ove interakcije mogu imati ulogu u proučavanju interakcija kompleksnih jedinjenja i DNK molekula jer je poznato da su metalni kompleksi sa planarno-heterocikličnim ligandima stabilniji i efikasnije se vezuju za DNK zahvaljujući π – π interakcijama i vodoničnim vezama (Slika 29).



Slike 29. Prikaz nekovalentnih interakcija kompleksa K4 - K6

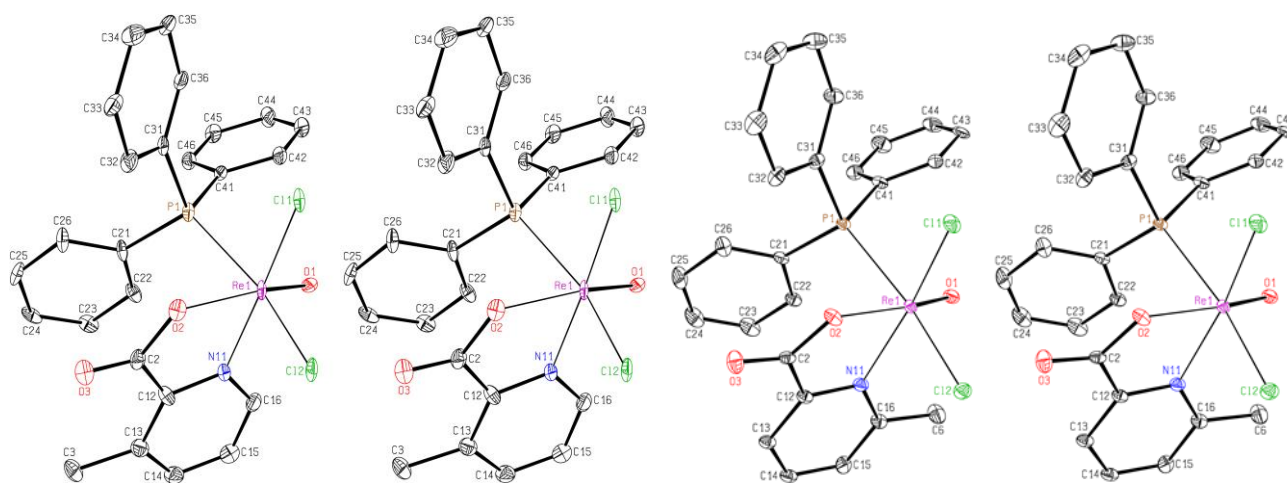
4.3.6. Rendgenska strukturna analiza

Rendgenskom strukturnom analizom potvrđene su strukture kompleksa **K1** - dihloro-okso-trifenilfosfin-N,O-(piridin-2-karboksilato) renijum(V) $[\text{ReOCl}_2(\text{L1})(\text{PPh}_3)]$ koja je u skladu sa podacima iz literature [106], **K2** - dihloro-okso-trifenilfosfin-N,O-(3-metilpiridin-2-karboksilato) renijum(V) $[\text{ReOCl}_2(\text{L2})(\text{PPh}_3)]$, **K3** - dihloro-okso-trifenilfosfin-N,O-(6-metilpiridin-2-karboksilato) renijum(V) $[\text{ReOCl}_2(\text{L3})(\text{PPh}_3)]$. Kristali za analizu dobijeni su sporim isparavanjem matičnog rastvora. Za rešavanje strukture sva tri kompleksa korišćena je jednačina: $w = 1/[\sigma^2(\text{Fo}^2) + (aP)^2 + bP]$ gde je $P = (\text{Fo}^2 + 2\text{Fc}^2)/3$. Svi atomi, osim atoma vodonika, su utačnjeni anizotropno. Apsolutna konfiguracija kompleksa **K1** potvrđena je efektom disperzije merenjima difrakcije na kristalu. S obzirom na to da se u kompleksu **K2** uočava pojava dvojnikanje (eng. crystal twinning), što podrazumeva da više kristalnih domena dele parametre kristalne rešetke u okviru jednog kristala [117], onda se za rešavanje apsolutne konfiguracije mora primeniti matrica $(-1\ 0\ 0 / 0\ -1\ 0 / 0\ 0\ -1)$, pri čemu je faktor skale bio $[0,0165(6)]$. Atomi vodonika aromatičnih prstenova koji čine C-H vezu nalaze se na rastojanju od 0,95 Å, dok je metil grupa predstavljena kao idealni tetraedar sa uglovima koji omogućavaju rotaciju oko C-C veze dok se vodonici C-H veze nalaze na rastojanju od 0,98 Å. Sva tri kompleksna jedinjenja kristališu bez rastvarača i imaju oktaedarsku geometriju (Slika 30).



Slika 30. ORTEP prikaz molekulske strukture kompleksa K1 (koja je u skladu sa literaturnim podacima [106])

Kompleks **K1** je necentrosimetričan što znači da ne poseduje centar inverzije za razliku od kompleksa **K2** i **K3** koji su centrosimetrični. Analizom je potvrđeno da su N,O- ligandi bidentatno koordinovani za metalni centar. Atom kiseonika iz karboksilne grupe koordinovan je za renijum(V) i dužine veza iznosi: **K1**: Re1-O2 2,043 (6) Å; C2-O2 1,314 (10) Å, **K2**: Re1-O2 2,033 (5) Å; C2-O2 1,339 (10) Å, **K3**- Re1-O2 2,033 Å; C2-O2 1,312 (10) Å, pri čemu se nalazi u *trans* položaju u odnosu na kiseonik iz Re=O grupe: **K1**: Re1-O1 1,673 (6) Å; ugao: O1-Re1-O2 158,4 (3) °, **K2**: Re1-O1 1,669 (5) Å; ugao: O1-Re1-O2 158,9 (3) °, **K3**- Re1-O1 1,676 (4) Å; ugao: O1-Re1-O2 161,01 (19) °. Atom azota piridinskog prstena je takođe koordinovan za jon metala i dužine veze iznosi: **K1**: Re1-N11 2,127 (9) Å, **K2**: Re1-N11 2,127 (7) Å, **K3**- Re1-N11 2,172 (5) Å. Atom azota je u *trans* položaju u odnosu na atom hlora, pri čemu je dužine veze i vrednost ugla sledeća: **K1**: Re1-Cl1 2,333 (2) Å; ugao: N11-Re1-Cl1 169,9 (3) °, **K2**: Re1-Cl1 2,327 (2) Å; ugao: N11-Re1-Cl1 170,5 (2) °, **K3**- Re1-Cl1 2,3387 (15) Å; ugao: N11-Re1-Cl1 163,46 (14) °. Oktaedarska geometrija potvrđena je još i činjenicom da su renijum i fosfor iz trifenilfosfina u *trans* položaju: **K1**: Re1-P1 2,453 (2) Å, **K2**: Re1-P1 2,460 (2) Å, **K3**- Re1-P1 2,4658 (15) Å, pri čemu su u *trans* položaju u odnosu na hlor obrazujući i odgovarajući ugao: **K1**: Re1-Cl2 2,371 (3) Å; ugao: Cl2-Re1-P1 159,5 (9) °, **K2**: Re1-Cl2 2,371 (2) Å; ugao: Cl2-Re1-P1 159,5 (6) °, **K3**- Re1-Cl2 2,3837 (15) Å; ugao: Cl2-Re1-P1 164,85 (5) °, (Slika 31). Svi podaci o kristalnoj strukturi kompleksa **K1** - **K3** nalaze se u Tabeli 5, dok su dužine veza i uglovi predstavljeni u Tabeli 6.



Slika 31. ORTEP prikaz molekulske strukture kompleksa K2 i K3

Tabela 5. Podaci o kristalnim strukturama kompleksa K1 - K3

Kompleksna jedinjenja	K1	K2	K3
Kristallografski podaci			
Empirijska formula	C ₂₄ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃ PRe	C ₂₅ H ₂₁ Cl ₂ NO ₃ PRe	C ₂₅ H ₂₁ Cl ₂ NO ₃ PRe
Molekulska masa	657,47	671,50	671,50
Opis kristala	blok, ljubičast	blok, ljubičast	blok, ljubičast
Veličina kristala (mm)	0,17 x 0,10 x 0,07	0,15 x 0,13 x 0,10	0,17 x 0,11 x 0,03
Kristalni sistem, prostorna grupa	monoklinični, C c	monoklinični, P 2 ₁ /c	monoklinični, P 2 ₁ /c
Dimenzije jedinične ćelije (Å): a	7,5444(6) Å	7,5811(6) Å	7,8790(3) Å
b	39,252(3) Å	39,165(4) Å	37,8688(16) Å
c	7,8754(6) Å	7,8657(7) Å	7,8750(4) Å
β	96,220(5)°	96,531(5)°	95,958(2)°
Zapremina	2318,5(3) Å ³	2320,3(4) Å ³	2336,96(18) Å ³
Z (broj stehiometrijskih jedinica)	4	4	4
Izračunata gustina	1,884 Mg/m ³	1,922 Mg/m ³	1,909 Mg/m ³
F(000)	1272	1304	1304
Linearni koeficijent apsorpcije μ	5,568 mm ⁻¹	5,566 mm ⁻¹	5,526 mm ⁻¹
Transmisioni maksimum i minimum	0,745 i 0,493	0,745 i 0,352	0,745 i 0,263
Određena jedinična ćelija	2,77° < Θ < 27,66°	2,66° < Θ < 25,92°	2,60° < Θ < 29,19°
Korišćena refleksija	4963 na 100 K	9217 na 100 K	9900 na 100 K
Prikupljanje podataka			
Temperatura	100 K	100 K	100 K
Opseg Θ za prikupljanje podataka	2,77 do 28,0°	1,56 do 27,90°	2,15 do 29,0°
Refleksija prikupljena/jedinstvena	12911 / 4531	35679 / 5542	33733 / 6205
Značajne jedinstvene refleksije	4180 sa I > 2σ(I)	4525 sa I > 2σ(I)	5077 sa I > 2σ(I)
R(int), R(σ)	0,0512, 0,0707	0,0998, 0,1089	0,0965, 0,0945
Procenat do Θ max	99,9%	99,9%	100,0%
Utačnjavanje			
Podaci/parametri/ograničenja	4531 / 293 / 2	5542 / 305 / 0	6205 / 304 / 0
Faktor slaganja od F²	1,022	1,102	1,154
Konačni R faktor [I > 2σ(I)]	R1=0,0337, wR2=0,0621	R1=0,0580, wR2=0,1218	R1=0,0482, wR2=0,1071
R faktor	R1=0,0378, wR2=0,0632	R1=0,0734, wR2=0,1283	R1=0,0605, wR2=0,1111
Parametri težinske šeme, a i b	0,0063, 0,0000	0,0194, 3,6002	0,0000, 2,3928
Najveći Δ/ σ poslednjeg ciklusa	0,001	0,003	0,002
Najveći diferencioni pik i šupljina	1,851 i -1,654e/Å ³	1,548 i -1,560e/Å ³	1,701 i -1,342e/Å ³
CCDC identifikacioni broj *	2126604	2126605	2126606

*CCDC identifikacioni broj označava broj pod kojim je kristalna struktura kompleksnog jedinjenja sačuvana u Kembričkoj kristallografskoj bazi podataka (Cambridge Structural Database)

Tabela 6. Podaci o dužini veza i uglovima za komplekse K1 - K3

Dužine veza (Å)	K1	K2	K3
Re1-O1	1,673(6)	1,669(5)	1,676(4)
Re1-O2	2,043(6)	2,033(5)	2,034(4)
Re1-N11	2,127(9)	2,127(7)	2,172(5)
Re1-Cl1	2,333(2)	2,327(2)	2,3387(15)
Re1-Cl2	2,371(3)	2,371(2)	2,3837(15)
Re1-P1	2,453(2)	2,460(2)	2,4658(15)
C2-O3	1,217(10)	1,205(9)	1,209(7)
C2-O2	1,314(10)	1,339(10)	1,312(7)
Uglovi (°)	K1	K2	K3
O1-Re1-O2	158,4(3)	158,9(3)	161,01(19)
N11-Re1-Cl1	169,9(3)	170,5(2)	163,46(14)
Cl2-Re1-P1	159,5(9)	159,5(6)	164,85(5)
C12-N11-C16	117,0(9)	118,3(8)	117,7(5)
C12-N11-Re1	116,1(7)	117,9(6)	114,6(4)
C16-N11-Re1	123,6(7)	123,7(6)	127,7(4)
O2-C2-O3	124,9(8)	122,4(8)	124,0(6)
O2-C2-C12	112,7(7)	112,4(7)	112,2(5)
O3-C2-C12	122,4(8)	125,2(8)	123,8(5)
C2-O2-Re1	122,3(5)	122,6(5)	123,4(4)

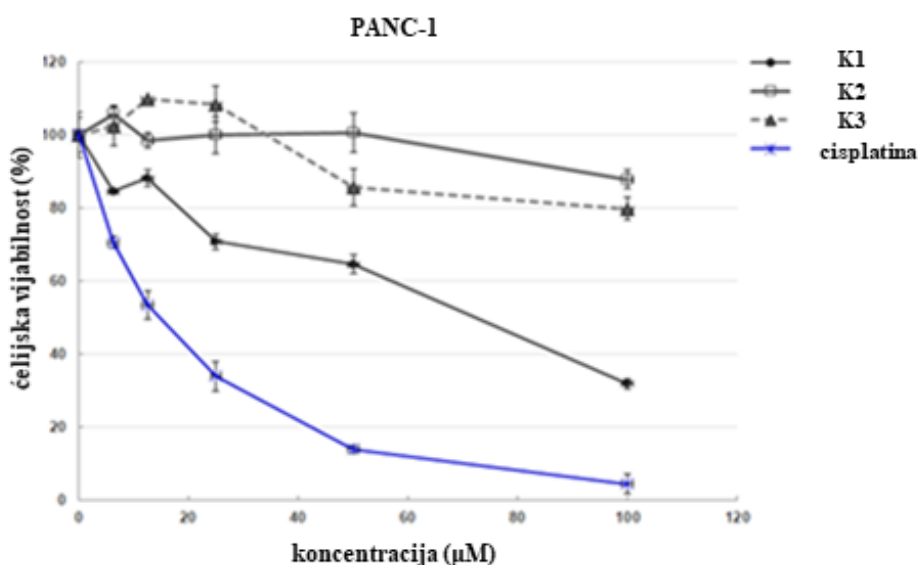
4.3.7. Stabilnost novosintetisanih kompleksnih jedinjenja u dimetil sulfoksidu (DMSO)

Najčešći rastvarač koji se koristi u biološkim testovima je DMSO. U dosadašnjim istraživanjima u literaturi je opisano kako DMSO može uticati na biološku aktivnost kompleksa Ru(II)-arenskih kompleksa sa N ili O donorskim ligandima, jer može doći do zamene liganda ili arenskog dela kompleksa sa DMSO [118]. S toga je vrlo važno ispitati stabilnost sintetisanih kompleksnih jedinjenja u tom rastvaraču u vremenskom intervalu od 72 h koliko traje inkubacija kompleksa sa ćelijama pri MTT metodi. Stabilnost kompleksa rastvorenih u deuterisanom DMSO-u se prati ¹H NMR spektroskopijom u različitim vremenskim intervalima 0 h, 1 h, 24 h, 48 h i 72 h. Kao predstavnici dve grupe kompleksnih jedinjenja izabrani su kompleks **K2** i **K5**. Kod kompleksnog jedinjenja **K2** nije uočena ni jedna promena u toku 72 h, dok se kod kompleksa **K5** nakon 48 h uočava pojava dodatnih pikova na hemijskom pomeranju 8,15 i 8,45 ppm, koji najverovatnije potiču od liganda. Napomene radi pri biološkim testovima svi rastvori kompleksa pravljani su neposredno pred izvođenje date analize i koncentracija DMSO-a nije bila veća od 1% u totalnoj zapremini što znači da je svih šest kompleksa stabilno i pogodno za rad sa ćelijama.

4.4. Biološka ispitivanja u *in vitro* uslovima

4.4.1. MTT metoda

Citotoksični potencijal novosintetisanih renijum(V) kompleksa u poređenju sa cisplatinom kao referentnim jedinjenjem određen je kolorimetrijskom MTT metodom inhibicije rasta na panelu humanih tumorskih ćelijskih linija, i zdravoj netumorskoj ćelijskoj liniji MRC-5. Serija kompleksa **K1** - **K3** ispitana je na ćelijskim linijama A549, PANC-1, LS-174, EAhy.926, MDA-MB-231 i MCF-7. Ćelije su tretirane ispitivanim jedinjenjima 72 h nakon čega je konstruisan dijagram preživljavanja ćelija (%) u zavisnosti od koncentracije agensa. Sa navedenog dijagrama dobijen je podatak o koncentraciji agensa koji izaziva smanjenje preživljavanja ćelija za 50%, odnosno IC_{50} vrednost u μM opsegu. Najaktivniji je bio kompleks **K1** koji je ispoljio aktivnost u rang od 68,90 do 96,07 μM pri čemu je najaktivniji bio na ćelijskim linijama PANC-1 ($IC_{50} = 69,84 \pm 2,3 \mu M$) i MDA-MB-231 ($IC_{50} = 68,90 \pm 1,73 \mu M$), (Tabela 7 i Slika 32).

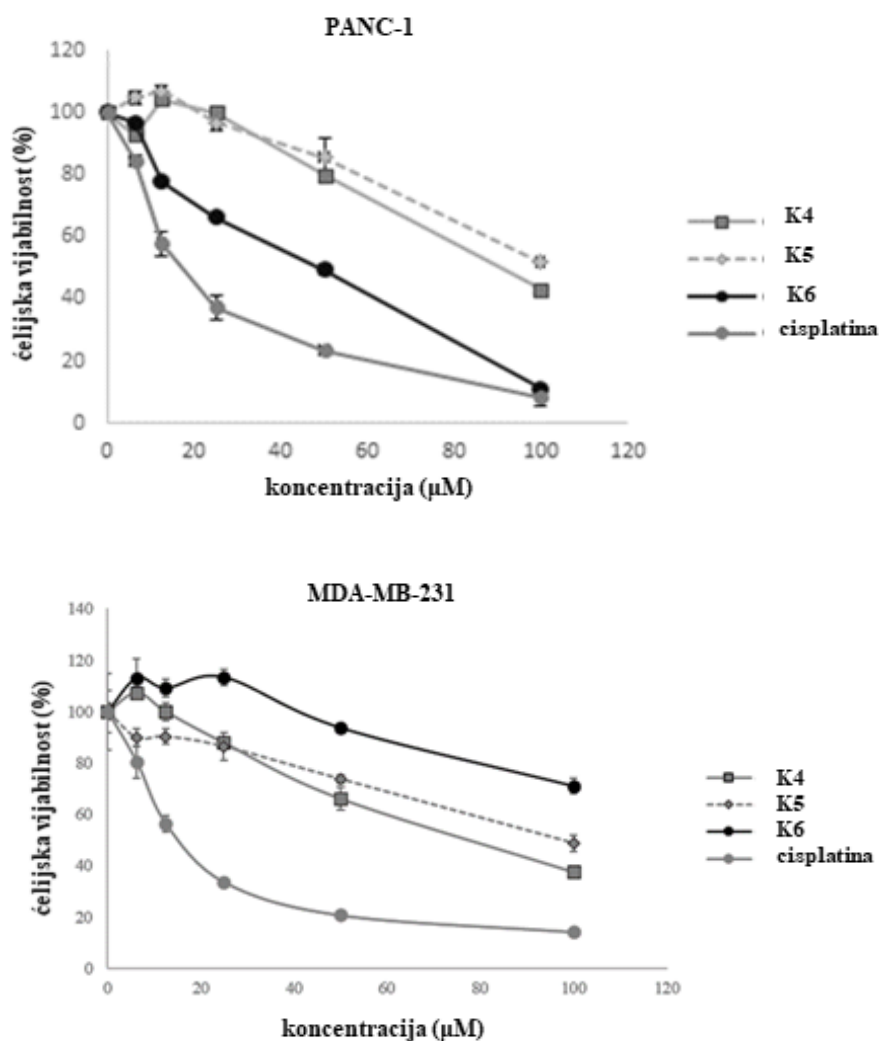


Slika 32. Dijagram ćelijske vijabilnosti kompleksa K1 - K3 i cisplatine na PANC-1 ćelijskoj liniji

Obe ćelijske linije se karakterišu kao visoko invanzivne i rezistentne na mnoge lekove. Vredna pomena je činjenica da je kompleks **K1** ispoljio manji citotoksični potencijal prema zdravoj MRC-5 ćelijskoj liniji, u odnosu na tumorske ćelijske linije. Treba istaći da kompleks **K1** ipak nije aktivniji od cisplatine što se vidi i po vrednosti indeksa selektivnosti (SI) (Tabela 8). Takođe, analizom dobijenih IC_{50} vrednosti za sva tri kompleksa nameće se zaključak da se kod kompleksa **K2**

i **K3** uvođenjem elektron-privlačne metil grupe na različitim položajima aromatičnog prstena liganada ne postiže veća citotoksična aktivnost ispitivanih jedinjenja.

Kompleksna jedinjenja **K4** - **K6** sa dipikolinskim derivatima bila su testirana na isti način MTT metodom. U ovom eksperimentu korišćene su sledeće humane tumorske ćelijske linije: A549, MDA-MB-231, PANC-41 i OVCAR-3. Sva tri jedinjenja ispoljila su aktivnost na PANC-1 i MDA-MB-231 ćelijskim linijama sa IC_{50} vrednostima u rang od 48,73 do 97,42 μM (Tabela 7.). Kompleks **K6** izdvojio se kao najaktivnije jedinjenje prema PANC-1 ćelijskoj liniji čija je $IC_{50} = 48,73 \pm 0,31$ predstavljena na dijagramu vijabilnosti ćelija (Slika 33).



Slika 33. Dijagram ćelijske vijabilnosti kompleksa K4 - K6 i *cisplatine* na PANC-1 i MDA-MB-231 ćelijskim linijama

Sva tri kompleksa nisu ispoljila aktivnost ni pri maksimalnoj koncentraciji od 100 μ M prema tumorskim A549 i OVCAR-3 ćelijskim linijama, kao ni na zdravoj MRC-5 ćelijskoj liniji. Da dodatna elektron-akceptorska karboksilna grupa i njen položaj na aromatičnom prstenu liganada nemaju preveliki uticaj vidi se kada se uporede IC₅₀ vrednosti kompleksa **K4** i **K5**. S druge strane elektron-privlačni metil-estar koji je prisutan kod kompleksa **K6** utiče na poboljšanje citotoksičnog efekta na PANC-1 ćelijskoj liniji.

Tabela 7. *In vitro* citotoksičnost kompleksa renijuma(V) određena MTT metodom

Kompleksno jedinjenje	IC ₅₀ (μ M)							
	A549	MDA-MB-231	MCF-7	LS-174	PANC-1	Eahy.926	OVCAR-3	MRC-5
K1	96,07 $\pm$ 1,57	68,90 $\pm$ 1,73	86,43 $\pm$ 0,72	93,36 $\pm$ 3,73	69,84 $\pm$ 2,3	92,68 $\pm$ 3,94	n.d.	80,22 $\pm$ 1,80
K2	>100	>100	>100	>100	>100	>100	n.d.	>100
K3	>100	>100	>100	>100	n.d.	>100	n.d.	>100
K4	>100	78,74 $\pm$ 0,29	n.d.***	n.d.	92,70 $\pm$ 6,01	n.d.	>100	>100
K5	>100	97,42 $\pm$ 1,15	n.d.	n.d.	87,41 $\pm$ 3,75	n.d.	>100	>100
K6	>100	>100	n.d.	n.d.	48,73 $\pm$ 0,31	n.d.	>100	>100
<i>cisplatina</i> *	1,97 $\pm$ 1,04	7,30 $\pm$ 1,14	5,77 $\pm$ 0,55	22,22 $\pm$ 1,65	17,38 $\pm$ 3,42	12,13 $\pm$ 3,76	n.d.	10,03 $\pm$ 0,27
<i>cisplatina</i> **	1,97 $\pm$ 1,04	16,05 $\pm$ 0,12	n.d.	n.d.	14,70 $\pm$ 1,06	n.d.	9,88 $\pm$ 0,59	10,48 $\pm$ 0,16

* vrednost dobijena u studiji kada su analizirani kompleksi **K1** - **K3**

** vrednost dobijena u studiji kada su analizirani kompleksi **K4** - **K6**

*** nije urađena analiza za datu ćelijsku liniju

Tabela 8. Vrednosti SI - indeksa selektivnosti za kompleks K1 i *cisplatinu*

SI ^a						
Kompleksno jedinjenje	A549	MDA-MB-231	MCF-7	LS-174	PANC-1	Eahy.926
K1	0,84	1,16	0,93	0,86	1,15	0,87
<i>cisplatina</i>	0,84	1,37	1,74	0,45	0,58	0,83

a- indeks selektivnosti (SI) za kompleks **K1** i *cisplatinu* na tumorskim ćelijskim linijama upoređen sa zdravom ćelijskom linijom (npr. SI PANC-1 = IC₅₀ MRC-5 / IC₅₀ PANC-1)

4.4.2. Određivanje efekta kombinovanog dejstva novosintetisanih kompleksa sa verapamil hidrohloridom - VRP na PANC-1 ćelijskoj liniji

Ćelije PANC-1 ćelijske linije predstavljaju dobar model za *in vitro* biološka ispitivanja novih lekova jer ispoljavaju rezistenciju na većinu klinički korišćenih lekova, pa je testiranje novih supstanci na njima veoma korisno, jer se na taj način može ispitati mehanizam delovanja potencijalnog leka. Do rezistencije dolazi između ostalog zbog delovanja ATP - zavisnih pumpi, transmembranskih kanala za translokaciju supstrata, koja transportuje određeni lek van ćelije pri čemu se koncentracija leka u ćelijama smanjuje. Familiji ATP-zavisnih pumpi pripada i transmembranski P-glikoprotein (Pgp) koji ima afinitet vezivanja za hidrofobne, pozitivno naelektrisane molekule [119, 120]. Verapamil je specifični inhibitor P-glikoproteina. Verapamil dovodi do blokiranja transmembranskih kanala za transport kalcijuma i kalijuma i ostvaruje interakcije sa adrenergičkim receptorima [121, 122]. Verapamil pripada prvoj generaciji inhibitora koji može doprineti u prevazilaženju rezistencije, a koji dovode do povećanja akumulacije antitumorskog agensa u ćelijama [123, 124]. Stoga ispitan je efekat VRP na novosintetisanim kompleksima renijuma(V) koji poseduju hidrofobnu trifenilfosfin grupu u sklopu svog ligandnog sistema. Citotoksičan potencijal svih šest kompleksa različitih koncentracija (25, 50, 100 μM), ispitan je na ćelijama PANC-1 ćelijske linije u prisustvu i odsustvu VRP različitih koncentracija (30 ili 100 μM). Analizom rezultata pokazano je da dodatak VRP koncentracije 100 μM uzrokuje poboljšanje citotoksičnog efekta svih ispitivanih kompleksa, a naročito kompleksa **K1**, čija IC_{50} vrednost iznosi $51,38 \pm 2,8 \mu\text{M}$ i **K6**, čija IC_{50} vrednost iznosi $10,20 \pm 0,79 \mu\text{M}$ (Tabela 9, Slike 34, 35, 36.).

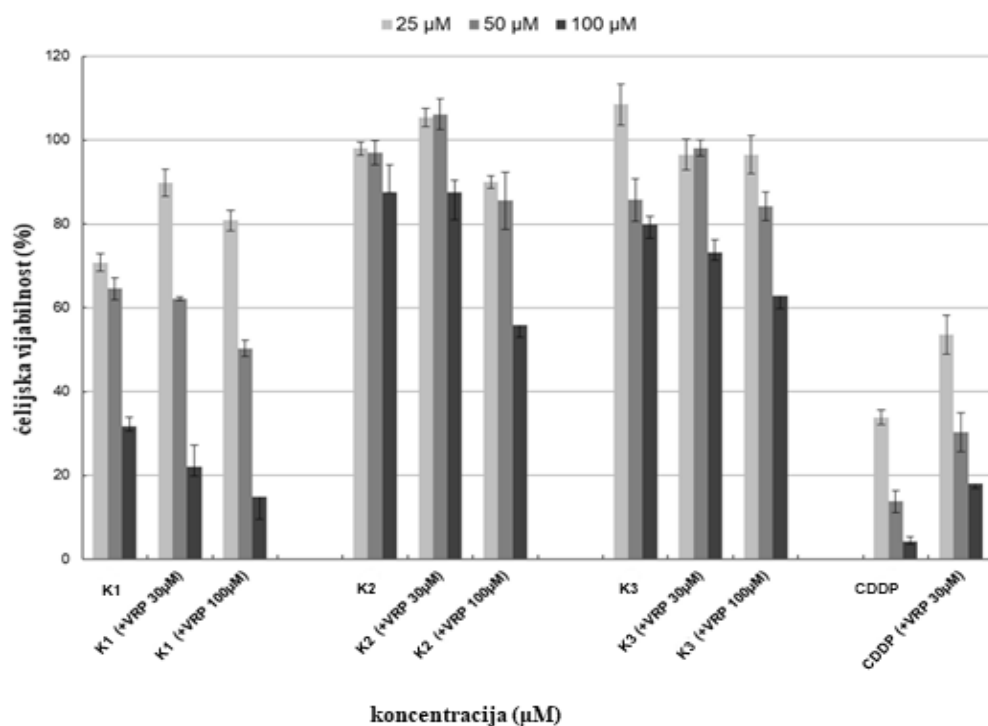
Tabela 9. IC_{50} vrednosti na PANC-1 ćelijskoj liniji u prisustvu ili odsustvu VRP ili L-BSO nakon inkubacije od 72 h

PANC-1 IC_{50} (μM)				
Jedinjenje	Kompleks	+ VRP (30 μM)	+ VRP (100 μM)	+ L-BSO (100 μM)
K1	$69,84 \pm 2,3$	$65,15 \pm 0,68$	$51,38 \pm 2,8$	$57,67 \pm 6,51$
K4	$92,70 \pm 6,01$	$87,17 \pm 3,15$	$97,86 \pm 2,31$	n.d.***
K5	$87,41 \pm 3,75$	$93,74 \pm 0,26$	> 100	n.d.
K6	$48,73 \pm 0,31$	$28,69 \pm 0,11$	$10,20 \pm 0,79$	n.d.
<i>cisplatina*</i>	$17,38 \pm 3,4$	$28,38 \pm 2,8$	n.d.	$13,38 \pm 4,72$
<i>cisplatina**</i>	$14,70 \pm 1,06$	$28,89 \pm 1,01$	n.d.	n.d.

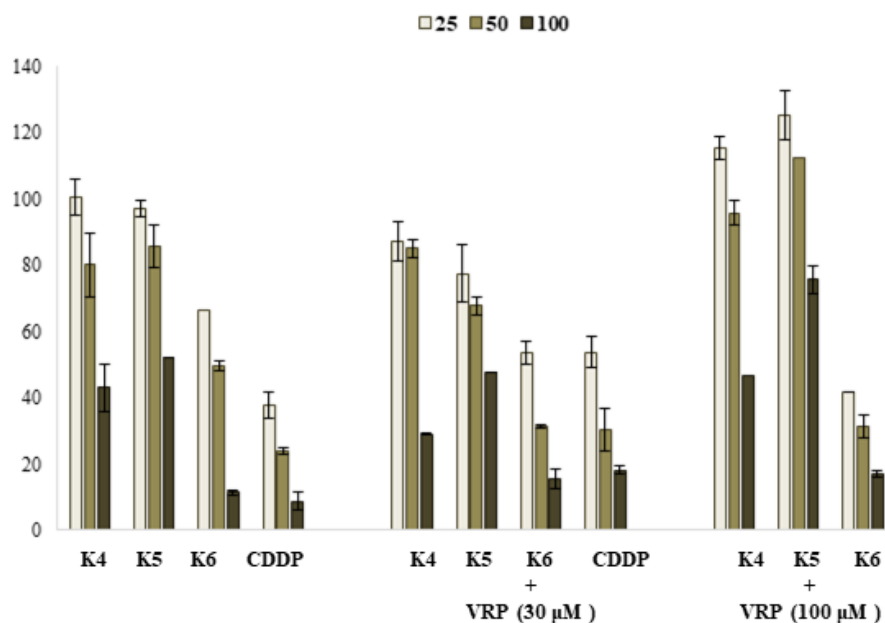
* vrednost dobijena u studiji kada su analizirani kompleksi **K1** - **K3**

** vrednost dobijena u studiji kada su analizirani kompleksi **K4** - **K6**

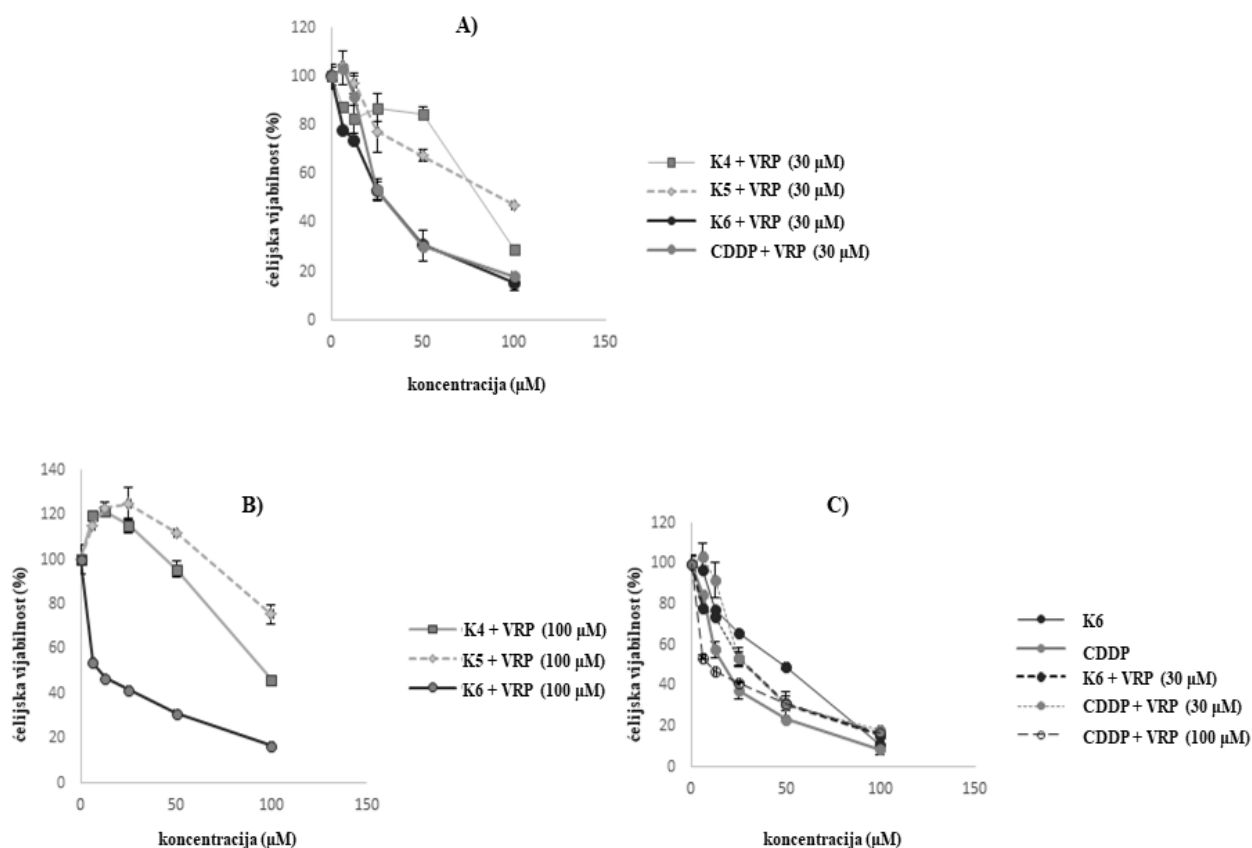
*** nije urađena analiza za datu ćelijsku liniju



Slika 34. Dijagrami ćelijske vijabilnosti kompleksa K1 - K3 i CDDP različitih koncentracija (25, 50, 100 µM) u prisustvu ili odsustvu VRP (30 ili 100 µM) na PANC-1 ćelijskoj liniji nakon 72 h (Rezultati prikazani zajedno sa standardnom devijacijom dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta)



Slika 35. Dijagrami ćelijske vijabilnosti kompleksa K4 - K6 i CDDP različitih koncentracija (25, 50, 100 µM) u prisustvu ili odsustvu VRP (30 ili 100 µM) na PANC-1 ćelijskoj liniji nakon 72 h (Rezultati prikazani zajedno sa standardnom devijacijom dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta)



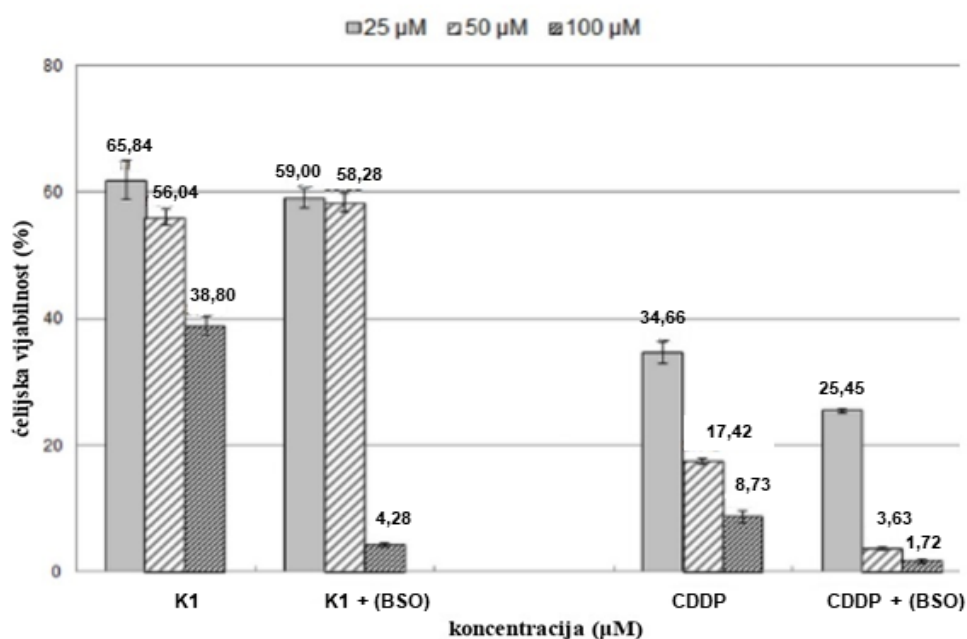
Slika 36. Dijagrami ćelijske vijabilnosti kompleksa K4 - K6 i CDDP na PANC-1 ćelijskoj liniji dobijeni MTT metodom nakon 72 h: A) kompleksi K4 - K6 i CDDP sa VRP koncentracije 30 μM; B) kompleksi K4 - K6 sa VRP koncentracije 100 μM; C) kompleks K6, CDDP i kombinacija kompleksa K6 sa VRP koncentracije 30 μM kao i kombinacija CDDP sa VRP različitih koncentracija (30 μM, 100 μM) (Rezultati prikazani zajedno sa standardnom devijacijom dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta)

Kod kompleksa K2 - K5 primećeno je da VRP ne dovodi do značajne promene citotoksičnog potencijala, što je u skladu sa pretpostavkama da je transportnim proteinima olakšan transport leka van ćelija, ako se u sklopu kompleksnog jedinjenja nalazi voluminozni organski molekul kakav je trifenilfosfin, dok je kod *cisplatine* potpuno drugačija situacija, jer dolazi do značajnog poboljšanja citotoksičnog efekta, koje je od ranije poznato i opisano u literaturi [125, 126]. Stoga je kao standard u ovom eksperimentu korišćena kombinacija VRP različitih koncentracija sa *cisplatinom* pri čemu dolazi do značajnog poboljšanja IC₅₀ vrednosti CDDP. Svi rezultati su u skladu sa postojećim naučnim studijama u kojima je istražena osetljivost tumorskih ćelija na lekove na bazi platine pri čemu se može zaključiti da je mehanizam delovanja takvih lekova drugačiji i da transporteri poput P-glikoproteina ne učestvuju u njihovom transportu [127, 128, 129].

4.4.3. Određivanje uticaja L-BSO na aktivnost kompleksa na PANC-1 ćelijskoj liniji

U ranijim naučnim studijama je pokazano da do deaktivacije *cisplatine* i drugih kompleksa prelaznih metala dolazi zbog njihove interakcije sa molekulima koje sadrže tiolske grupe kao što je glutation (GSH). Ovakava pojava se uočava i u tumorskim ćelijama pri čemu dolazi do rezistencije ćelija na odgovarajući antitumorski agens [130, 131, 132]. Işikava u svojoj studiji govori da dolazi do interakcije GSH sa *cisplatinom* nakon čega se takav adukt transportuje van ćelija pri čemu se nivo *cisplatine* u ćelijama smanjuje čime dolazi do rezistencije ćelije na *cisplatinu*. Sa druge strane Kol i saradnici u svojoj studiji ukazuju na važnost VRP koji može pomoći u prevazilaženju rezistencije jer utiče na transportni protein MRP-1 koji transportuje organske molekule poput GSH van ćelije [133, 134].

Krenuvši od pretpostavke da će se kompleks **K1** ponašati kao i kompleksi prelaznih metala opisanih u ranijim studijama, ispitano je da li će doći do inhibicije GSH u ćelijama PANC-1 ćelijske linije uz pomoć L-BSO, inhibitora γ -glutamilcistein sintetaze koji dovodi do usporavanja sinteze GSH u ćelijama [132]. Rezultati ove analize ukazuju da se kombinacijom kompleksa **K1** ili **CDDP** sa L-BSO povećava osetljivost ćelija na dati lek (Slika 37).

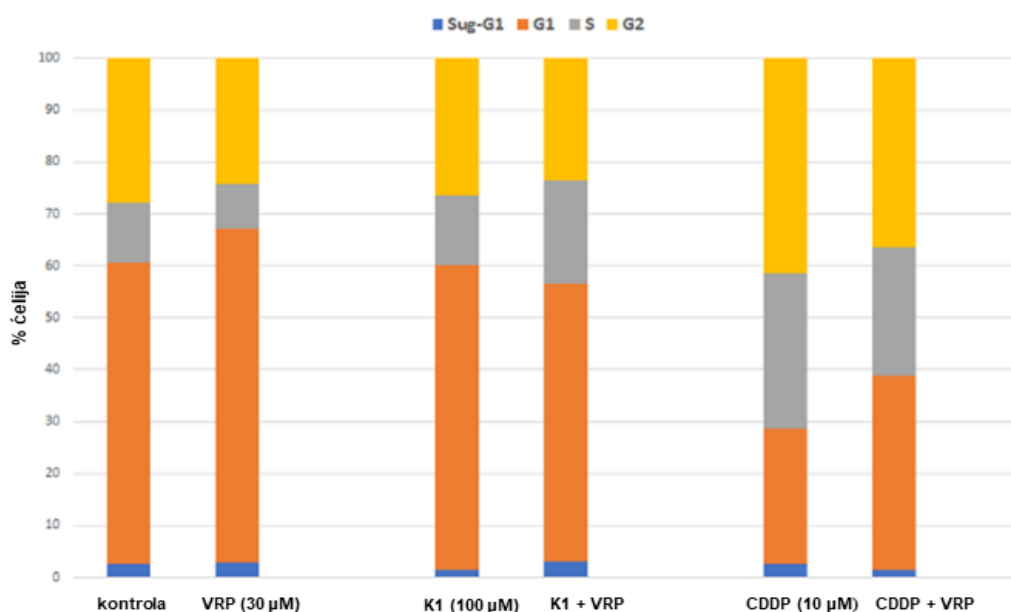


Slika 37. Dijagrami ćelijske vijabilnosti kompleksa K1 i CDDP različitih koncentracija (25, 50, 100 μM) u prisustvu ili odsustvu L-BSO (100 μM) na PANC-1 ćelijskoj liniji nakon 72 h (Rezultati prikazani zajedno sa standardnom devijacijom dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta)

Ovakvi rezultati neiznenađuju uzimajući u obzir naučne studije u kojima je već opisano da L-BSO u kombinaciji sa **CDDP** dovodi do poboljšanja citotoksičnog potencijala *cisplatin*e na datoj ćelijskoj liniji [113, 131]. Najbolji efekat uočen je pri kombinaciji **L-BSO** i kompleksa **K1** koncentracije 100 μM , pri čemu dolazi do snižavanja IC_{50} vrednosti datog kompleksa na PANC-1 ćelijskoj liniji čija vrednost iznosi $\text{IC}_{50} = 57,67 \pm 6,51 \mu\text{M}$, međutim procenat živih ćelija u ovakvim uslovima bio je veoma nizak i iznosio je 4,28% (Tabela 9).

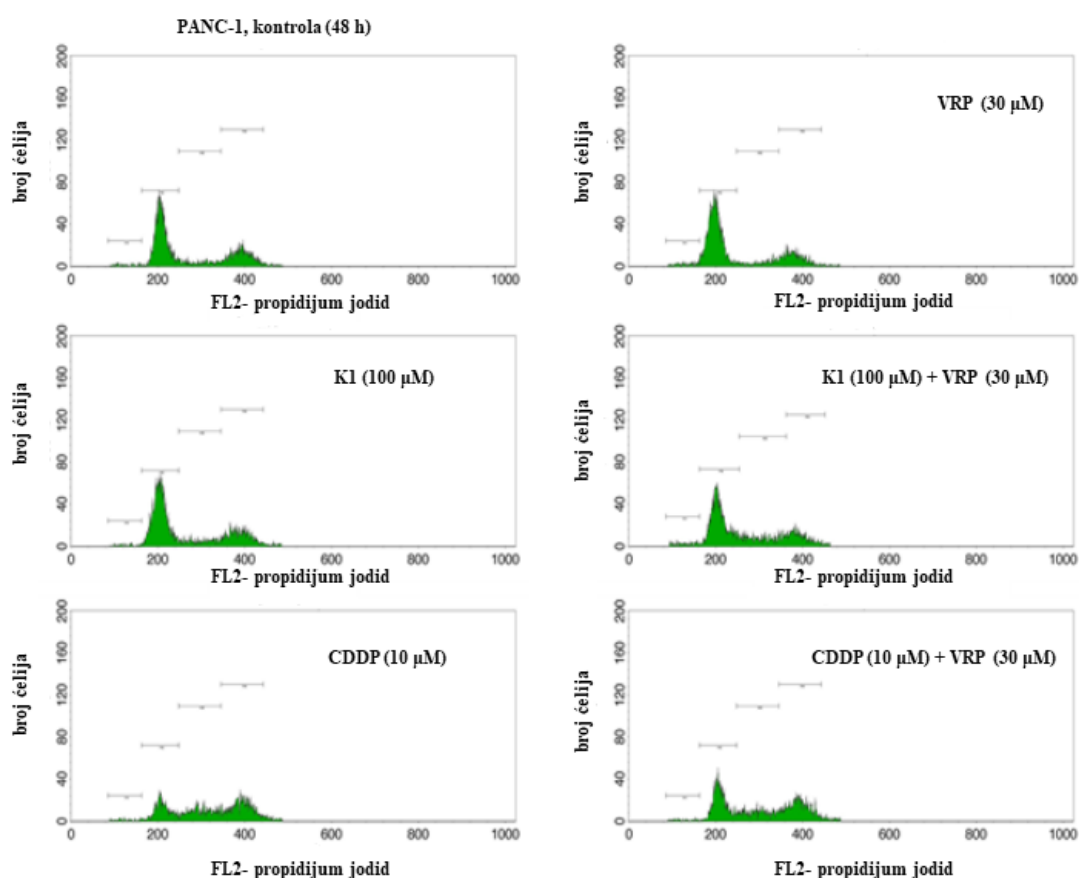
4.4.4. Analiza ćelijskog ciklusa na PANC-1 ćelijskoj liniji pomoću protočne citometrije

Uticaj kompleksa **K1** i *cisplatin*e (**CDDP**) na ćelijski ciklus na PANC-1 ćelijama u kombinovanom dejstvu sa verapamil hidrohloridom – **VRP** praćen je primenom protočne citometrije (Flow cytometry) PANC-1 ćelije inkubirane 48 h i to u kombinacijama prikazanim na dijagramu: kao kontrole korišćene su netretirane ćelije, kao i ćelije koje su tretirane samo sa VRP koncentracije 30 μM , ćelije tretirane kompleksom **K1** (100 μM) kao i ćelije tretirane kombinacijom **K1** (100 μM) + **VRP** (30 μM), odnosno ćelije tretirane sa **CDDP** (10 μM), kao i ćelije tretirane kombinacijom **CDDP** (10 μM) + **VRP** (30 μM) obojene pomoću propidijum jodida (PI), (Slike 38 i 39).



Slika 38. Efekat kompleksa **K1** (100 μM) i **CDDP** (10 μM) na raspodelu faza ćelijskog ciklusa na PANC-1 ćelijskoj liniji nakon 48 h upotrebljenih pojedinačno ili u kombinaciji sa VRP (30 μM). (Rezultati prikazani zajedno sa standardnom devijacijom dobijeni iz dva nezavisna eksperimenta)

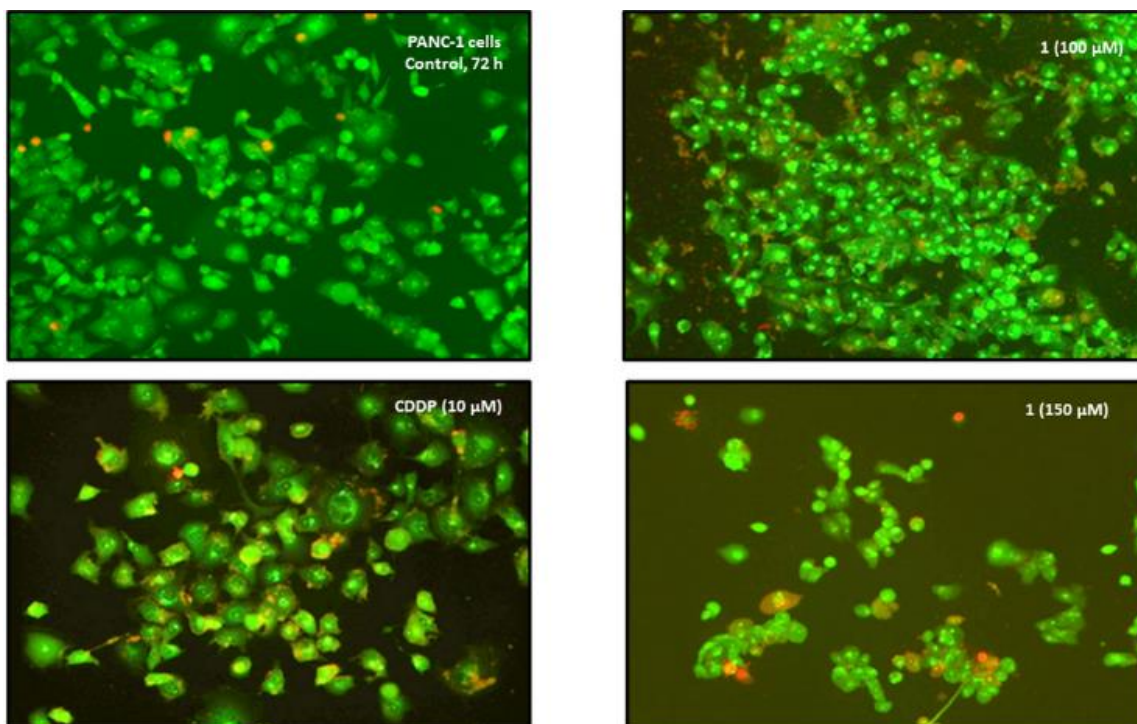
Rezultati ukazuju da samo **CDDP** dovodi do nagomilavanja ćelija i zaustavljanja ćelijskog ciklusa u S fazi (29, 96% u odnosu na kontrolu 11, 41%), kao i G2 faze (41, - 46% u odnosu na kontrolu 27,94%). Upotrebljen samostalno kompleks **K1** ne dovodi do promena ćelijskog ciklusa dok je u kombinaciji sa **VRP** izazvao zaustavljanje ćelijskog ciklusa u S fazi. Sub-G1 faza, za koju je karakteristična fragmentacija jedra, bila je na istom procentu kao i kod ćelija koje su tretirane samo sa **VRP**. Ono što se može zaključiti analizom rezultata dobijenih protočnom citometrijom je da kombinacija kompleksa **K1** sa **VRP** ima suprotan efekat na ćelijski ciklus u odnosu na **CDDP**.



Slika 39. Efekat kompleksa **K1** (100 μ M) i **CDDP** (10 μ M) na progresiju ćelijskog ciklusa na PANC-1 ćelijskoj liniji nakon 48 h upotrebljenih pojedinačno ili u kombinaciji sa **VRP** (30 μ M). (Histogrami ćelijskog ciklusa dobijeni su pomoću fluorescentnog aktiviranog sortera ćelija - FACS analizom protoka i predstavljaju rezultat dva nezavisna eksperimenta)

4.4.5. Morfološka analiza ćelijske smrti pomoću fluorescentne mikroskopije

Morfološka analiza ćelijske smrti praćena je pomoću fluorescentne mikroskopije na PANC-1 ćelijam koje su bile tretirane kompleksom **K1** i *cisplatinom* (**CDDP**). Reagensi korišćeni za dualno bojenje i praćenje promena morfologije ćelija su akridin oranž i etidijum bromid [33,36 113, 116]. Ćelije su tretirane kompleksom **K1**, koncentracije 100 μM u trajanju od 72 h, pri čemu je uočeno da je većina ćelija ostala prilepljena za podlogu kao i da je većina ćelija i dalje u kontaktu jedna sa drugom pri čemu im je morfologija izgledala isto kao i u netretiranoj, kontrolnoj grupi. Na slikama dobijenim pomoću fluorescentne mikroskopije zelena fluorescencija, koja nastaje usled intraćelijski usvojenog akridin oranža zbog očuvane plazmina membrane, primećena je samo u sredini ćelije, dok fragmentacija hromatina i jedra kod mrtvih ćelija ukazuje da je mehanizam ćelijske smrti apoptoza. Međutim, kada su ćelije tretirane većom koncentracijom kompleksa **K1** od 150 μM dolazi do značajnog odvajanja ćelija od podloge pri čemu ćelije počinju da se smanjuju i poprimaju zaobljeni oblik. Takođe, hromatin postaje narandžasto ka crveno obojen što ukazuje da se mehanizam ćelijske smrti menja ka sekundarnoj apoptozi, dok takođe poprma karakteristike nekroze. S druge strane kod **CDDP** primećeno je prisustvo i zelene i crvene fluorescencije koje potiču od akridin oranža, odnosno etidijum bromida. Nakon inkubacije ćelija 72h sa **CDDP** koncentracije 10 μM , većina ćelija se odlepila od podloge i došlo je do redukcije međućelijskih kontakata. S morfološke strane gledano sva jedra ćelija su obojena, dok se primećuju i uvećane interćelijskih komponenti što znači da dolazi do promena na ćelijskoj membrani i pokreću se nekroza i apoptoza kao oblici ćelijske smrti. Razlike koje su uočene u morfologiji ćelija tretiranih kompleksom **K1** i ćelija tretiranih sa **CDDP** kao i kinetika ćelijske smrti ukazuju da je mehanizam delovanja ova dva jedinjenja potpuno različit (Slika 40).



Slika 40. Fotografije sa mikroskopa predstavljaju PANC-1 ćelije nakon tretmana kompleksom K1 (100 i 150 μM) ili sa CDDP (10 μM). Slike su dobijene fluorescentnim mikroskopom Axio Observer Z1, koristeći AxioVision softver za obradu slika (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Akridin oranž (zelena fluorescencija) je boja koja obeležava i žive i mrtve ćelije. Etidijum bromid (crvena fluorescencija) ulazi samo u ćelije sa oštećenom ćelijskom membranom. Netretirane PANC-1 ćelije su korišćene kao kontrola.

5. ZAKLJUČCI

U ovoj doktorskoj disertaciji opisana je sinteza šest novih kompleksnih jedinjenja (**K1** - **K6**) renijuma(V) sa derivatima pikolinske kiseline (**L1** - **L6**). Svi kompleksi su okarakterisani standardnim spektroskopskim metodama: infracrvenom spektroskopijom - IC, NMR spektroskopijom (^1H NMR, ^{13}C NMR), masenom spektrometrijom kao i elementalnom analizom. Račinskim DFT proračunima pretpostavljena je najstabilnija moguća geometrija kompleksa renijuma(V). Takođe za komplekse **K1** - **K3** struktura je potvrđena rendgenskom strukturnom analizom jer su dati kompleksi bili izolovani u formi kristala. Svi kompleksi su ispitani MTT metodom u cilju ispitivanja citotoksičnog potencijala u *in vitro* uslovima, nakon čega su najaktivnija jedinjenja bila podvrgnuta daljim biološkim testovima. Nakon obrade svih dobijenih rezultata zaključci su sledeći:

Infracrvenom spektroskopijom potvrđena je bidentatna N,O koordinacija za metalni jon kod svih šest kompleksa. Najveću promenu predstavlja odsustvo O-H istežuće vibracione trake što je direktan dokaz da kiseonik iz karboksilne grupe liganda učestvuje u koordinaciji za metalni centar. Takođe, da azot iz piridinskog dela liganda učestvuje u koordinaciji uočava se prisustvom Re-N apsorpcione trake u spektrima svih kompleksa. Čistoća datih jedinjenja potvrđena je elementalnom analizom pri čemu sastav novosintetisanih jedinjenja odgovara pretpostavljenim molekulskim formulama, dok je masenom spektrometrijom potvrđeno prisustvo očekivanih fragmentacionih jona sintetisanih jedinjenja renijuma(V).

U NMR spektrima uočene su promene u vrednostima hemijskog pomeranja kako vodonika tako i ugljenika u odnosu na slobodne ligande čime je potvrđena struktura kompleksa renijuma(V) sa derivatima pikolinske kiseline. U protonskim spektrima se uočava odsustvo protona iz karboksilne grupe liganda što predstavlja potvrdu koordinacije atoma kiseonika za renijum(V). Takođe svi protoni iz piridinskog dela u spektrima kompleksa pomereni su ka većim hemijskim pomeranjima u odnosu na slobodne ligande što predstavlja još jednu potvrdu hemijske strukture novosintetisanih kompleksa. U ^{13}C NMR spektrima najveća promena uočena je kod ugljenika iz karboksilne grupe liganda i to naročito kod kompleksa sa dipikolinskim kiselinama **K4** - **K6** čiji se signal ugljenika slobodne karboksilne grupe nalazi na višem hemijskom pomeranju u odnosu na signal ugljenika karboksilne grupe koja učestvuje u koordinaciji.

Takođe, rendgenskom strukturnom analizom kompleksa **K1** - **K3** utvrđena je njihova struktura, dužina veza i uglovi veze. Iz ORTEP prikaza molekulske strukture uočava se da su hlorido ligandi u *trans* položaju u odnosu na metalni centar, što nije slučaj kod kompleksa **K4** - **K6**. Kod ovih kompleksa DFT proračunima urađena je optimizacija geometrije i potvrđeno je da se hlorido ligandi

nalaze u *cis* položaju u odnosu na metalni centar. Da se pomenuti kompleksi mogu ispitivati kao potencijalni biološki agensi govori i činjenica da rezultati dijagrama izračunatih nekovalentnih interakcija potvrđuju prisustvo π - π interakcija između aromatičnih prstenova, što omogućava povezivanje novosintetisanih renijum(V) kompleksa sa njihovom biološkom aktivnošću.

Da bi se utvrdilo da li su novosintetisana jedinjenja stabilna i da li se mogu koristiti za biološke eksperimente u *in vitro* uslovima praćena je stabilnost kompleksnih jedinjenja u DMSO-u u toku 72 h pomoću ^1H NMR spektroskopije. S obzirom da u ovom vremenskom periodu nije došlo do promena u strukturi kompleksnih jedinjenja zaključeno da su jedinjenja stabilna i pogodna za dalja biološka ispitivanja.

Svih šest kompleksa je testirano MTT metodom u *in vitro* uslovima i potvrđeno je da svi kompleksi ispoljavaju umereni citotoksični potencijal prema humanim tumorskim ćelijskim linijama PANC-1 (ćelije adenokarcinoma pankreasa), i MDA-MB-231 (ćelije adenokarcinoma dojke), pri čemu se su se kao najbolji kandidati izdvojili kompleks renijuma(V) sa pikolinskom kiselinom (**K1**) i kompleks renijuma(V) sa 2,6-dipikolinskom kiselinom (**K6**).

Stoga da bi se poboljšao citotoksični potencijal datih jedinjenja ispitan je efekat kombinovanog delovanja kompleksnih jedinjenja i verapamil hidrohlorida. Analizom rezultata zaključeno je sledeće: u kombinaciji kompleksnih jedinjenja renijuma(V) sa verapamil hidrohloridom - **VRP** na PANC-1 ćelijskoj liniji uočava se efekat kombinovanog dejstva pri čemu dolazi do poboljšanja citotoksičnog potencijala datih kompleksa naročito kombinacije kompleksa **K6** + **VRP** čija je IC_{50} vrednost uporediva sa kombinacijom **cisplatin** + **VRP**.

Da bi se proučio mehanizam delovanja kompleksa u ćelijama u *in vitro* uslovima kao pogodan kandidat izabran je kompleks **K1** i urađeno je nekoliko bioloških analiza iz kojih proizilaze sledeći zaključci: primećeno je da kombinacija **L-BSO** + **K1** utiče na sniženje IC_{50} vrednosti datog kompleksa na PANC-1 ćelijskoj liniji; analizom rezultata ćelijskog ciklusa zaključeno je da kombinacija **K1** + **VRP** na PANC-1 ćelijskoj liniji dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u S fazi; morfološka analiza ćelijske smrti pomoću fluorescentne mikroskopije pokazala je da je mehanizam delovanja kompleksa **K1** potpuno drugačiji od **cisplatin**.

Rezultati proistekli iz ove doktorske disertacije doprinose razvitku polja koordinacione hemije s obzirom na to da je sintetisano šest novih potpuno okarakterisanih kompleksa renijuma(V) sa derivatima pikolinske kiseline koji do sada nisu opisani u hemijskoj literaturi. Analizom citotoksičnog potencijala kompleksa renijuma(V) u *in vitro* uslovima dva kandidata su se izdvojila kao potencijalni citotoksični agensi na PANC-1 ćelijama i to su: kompleks renijuma(V) sa pikolinskom kiselinom (**K1**) i kompleks renijuma(V) sa 2,6-dipikolinskom kiselinom (**K6**). Da se njihov citotoksični potencijal može pospešiti uočava se pri efektu kombinovanog delovanja sa verapamil hidrohloridom što može poslužiti za dalja biološka ispitivanja u *in vivo* uslovima, radi što boljeg razumevanja mehanizma delovanja datih kompleksa, a sve s ciljem postizanja veće aktivnosti i bolje selektivnosti prema humanim tumorskim ćelijama.

6. LITERATURA

- [1] S. Ghosh, *Bioorg. Chem.* **88** (2019) 102925.
- [2] M. M. Gonzalez-Ballesteros, C. Mejia, L. Ruiz-Azuara, *FEBS Open Bio* **12** (2022) 880.
- [3] https://joint-research-centre.ec.europa.eu/jrc-news-and-updates/cancer-cases-and-deaths-rise-eu-2023-10-02_en
- [4] <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/688-serbia-fact-sheet.pdf>
- [5] <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/900-world-fact-sheet.pdf>
- [6] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>
- [7] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- [8] R. Paprockaa, M. Wiese-Szadkowska, S. Janciauskiene, T. Kosmalskia, M. Kulik, A. Helmin-Basa, *Coord. Chem. Rev.* **452** (2022) 214307.
- [9] J. Bhosle, G. Hall, *Surgery (Oxf)* **27** (2009) 173.
- [10] N. Behranvand, F. Nasri, R. Z. Emameh, P. Khani, A. Hosseini, J. Garssen, R. Falak, *Cancer Immunol. Immunother.* **71** (2022) 507.
- [11] Q. Li, X. Lei, J. Zhu, Y. Zhong, J. Yang, J. Wang, H. Tan, *Oxid Med Cell Longev* **2023** (2023) 1.
- [12] M. Arruebo, N. Vilaboa, B. Sáez-Gutierrez, J. Lambea, A. Tres, M. Valladares, Á. González-Fernández, *Cancers* **3** (2011) 3279.
- [13] U. Ndagi, N. Mhlongo, M. E. Soliman, *Drug Des Devel Ther* **16** (2017) 599.
- [14] M. Frezza, S. Hindo, D. Chen, A. Davenport, S. Schmitt, D. Tomco, Q. P. Dou, *Curr. Pharm. Des.* **16** (2010) 1813.
- [15] G. V. Suárez-Morenoa, D. Hernández-Romero, Ó. García-Barradasc, Ó. Vázquez-Veraa, S. Rosete-Lunab, C. A. Cruz-Cruzb, A. López-Monteonb, J. Carrillo-Ahumadad, D. Morales-Moralese, R. Colorado-Peralta, *Coord. Chem. Rev.* **472** (2022) 214790.
- [16] Y. Goua, G. Huangb, J. Lic, F. Yanga, H. Liang, *Coord. Chem. Rev.* **441** (2021) 213975.
- [17] T. Makovec, *Radiat. Oncol. J.* **53(2)** (2019) 148.

- [18] T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **116** (2016) 3436.
- [19] S. Abdolmaleki, A. Aliabadi, S. Khaksar, *Coord. Chem. Rev.* **501** (2024) 215579.
- [20] C. C. Konkankit, S. C. Marker, K. M. Knopf, J. J. Wilson, *Dalton Trans* **47** (2018) 9934.
- [21] Y. Lu, D. Zhu, Q. Le, Y. Wang, W. Wang, *Nanoscale* **14** (2022) 16327.
- [22] E. Alessio, L. Messori, *Molecules* **24** (2019) 1995.
- [23] D. Pluim, R. C. A. M. van Waardenburg, J. H. Beijnen, J. H. M. Schellens, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **54** (2004) 71.
- [24] K. Lin, Z. Zhao, H. Bo1, X. Hao, J. Wang, *Front. pharmacol.* **9** (2018) 1323.
- [25] S. Monro, K. L. Colon, H. Yin, J. Roque, P. Konda, S. Gujar, R. P. Thummel, L. Lilge, C. G. Cameron, S. A. McFarland, *Chem. Rev.* **119** (2019) 797.
- [26] S. Y. Lee, C. Y. Kim, T. Nam, *Drug Des Devel Ther* **14** (2020) 5375.
- [27] P. J. Dyson, *Chimia* **61** (2007) 698.
- [28] P. Kumar, R. K. Gupta, D. S. Pandey, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014) 707.
- [29] M. Rausch, P. J. Dyson, P. Nowak-Sliwinska, *Adv. Therap.* **2** (2019) 1900042.
- [30] T. Nabiyeve, C. Marschner, B. Blom, *Eur. J. Med. Chem.* **201** (2020) 112483.
- [31] M. Hanif, M. V. Babak, C. G. Hartinger, *Drug Discov. Today* **19** (2014) 1640.
- [32] P. Zhang, H. Huang, *Dalton Trans* **47** (2018) 14841.
- [33] S. D. Shnyder, Y. Fu, A. Habtemariam, S. H. van Rijt, P. A. Cooper, P. M. Loadmana, P. J. Sadler, *Med. Chem. Commun.* **2** (2011) 666.
- [34] A. Mani, T. Feng, A. Gandioso, R. Vinck, A. Notaro, L. Gourdon, P. Burckel, B. Saubaméa, O. Blacque, K. Cariou, J. Belgaied, H. Chao, G. Gasser, *Angew. Chem. Int.* **62** (2023) e202218347.
- [35] A. S. Sharma, P. Sudhindra, N. Roy, P. Paira, *Inorg. Chim. Acta* **513** (2020) 119925.
- [36] H. Huang, S. Banerjee, P. J. Sadler, *ChemBioChem* **19** (2018) 1574.
- [37] A. Prieto-Castaneda, A. Lerida-Viso, E. Avellanal-Zaballa, R. Sola-Llano, J. Banuelos, A. R. Agarrabeitia, R. Martínez-Manez, M. J. Ortiz, *Dyes Pigm.* **197** (2021) 109886.
- [38] R. Cao, J. Jia, X. Ma, M. Zhou, H. Fei, *J. Med. Chem.* **56** (2013) 3636.

- [39] W. Y. Zhang, Y. J. Wang, F. Du, M. He, Y. Y. Gu, L. Bai, L. L. Yang, Y. J. Liu, *Eur. J. Med. Chem.* **178** (2019) 401.
- [40] H. Shi, O. W. L. Carter, F. Ponte, C. Imberti, M. A. Gomez-Gonzalez, F. Cacho-Nerin, P. D. Quinn, J. E. Parker, E. Sicilia, H. Huang, P. J. Sadler, *Angew. Chem. Int.* **63** (2024) e202400476.
- [41] L. Shen, F. Tesfaye, X. Li, D. Lindberg, P. Taskinen, *Miner. Eng.* **161** (2021) 106719.
- [42] A.D. Dobrzańska-Danikiewicz, W. Wolany, *Int. Sci. J.* **82** (2016) 70.
- [43] G. Rouschias, *Chem. Rev.* **74** (1974) 531.
- [44] A. Olding, M. Tang, C. C. Ho, R. O. Fuller, A. C. Bissember, *Dalton Trans.* **51** (2022) 3004.
- [45] D. C. Bebout, *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, (2006), Editor in Chief R. B. King 324.
- [46] Ch. C. Konkankit, A. P. King, K. M. Knopf, T. L. Southard, J. J. Wilson, *ACS Med. Chem. Lett.* **10** (2019) 822.
- [47] E. B. Bauera, A. A. Haaseb, R. M. Reicha, D. C. Cransb, F. E. Kühn, *Coord. Chem. Rev.* **393** (2019) 79.
- [48] J. Yang, J. Zhao, Q. Cao, L. Hao, D. Zhou, Z. Gan, L. Ji, Z. Mao, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9** (2017) 13900.
- [49] A. Leonidova, G. Gasser, *ACS Chem. Biol.* **9** (2014) 2180.
- [50] M. Kaplanis, G. Stamatakisb, V. D. Papakonstantinou, M. Paravatou-Petsotas, C. A. Demopoulosb, Ch. A. Mitsopoulou, *J. Inorg. Biochem.* **135** (2014) 1.
- [51] G. Balakrishnana, Th. Rajendrana, K. S. Murugana, M. S. Kumarc, V. K. Sivasubramaniana, M. Ganesana, A. Maheshe, Th. Thirunalasundarif, S. Rajagopal, *Inorg. Chim. Acta* **434** (2015) 51.
- [52] P. T. Wilder, D. J. Weber, A. Winstead, S. Parnell, T. V. Hinton, M. Stevenson, D. Giri, S. Azemati, P. Olczak, B. V. Powell, T. Odebode, S. Tadesse, Y. Zhang, S. K. Pramanik, J. M. Wachira, S. Ghimire, P. McCarthy, A. Barfield, H. N. Banerjee, Ch. Chen, J. A. Golen, A. L. Rheingold, J. A. Krause, D. M. Ho, P. Y. Zavalij, R. Shaw, S. K. Mandal, *Mol Cell Biochem* **441** (2018) 151.
- [53] R. Ye, C. Tan, M. Chen, L. Hao, L. Ji, Z. Mao, *Chem. Eur. J.* **22** (2016) 7800.
- [54] S. Hanson, A. Dharan, P. V. Jinsha, S. Pal1, B. G. Nair, R. Kar, N. Mishra, *Front. Pharmacol.* **14** (2023) 01.

- [55] C. V. Garcia, G. L. Parrilha, B. L. Rodrigues, S. F. Teixeira, R. A. de Azevedo, A. K. Ferreirab, H. Beraldo, *New J. Chem.* **40** (2016) 7379.
- [56] S. Imstepf, V. Pierroz, R. Rubbiani, M. Felber, Th. Fox, G. Gasser, R. Alberto, *Angew. Chem.* **128** (2016) 2842.
- [57] A. Kermagoreta, G. Morganta, J. d'Angeloa, A. Tomasb, P. Rousselc, G. Bastiand, Ph. Collerye, D. Desmaële, *Polyhedron* **30** (2011) 347.
- [58] M. S.Capper, H. Packman, M. Rehkämper, *ChemBioChem* **21** (2020) 2111.
- [59] K. M. Knopf, B. L. Murphy, S. N. MacMillan, J. M. Baskin, M. P. Barr, E. Boros, J. J. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **139** (2017) 14302.
- [60] L. He, Z. Pan, W. Qin, Y. Li, C. Tan, Z. Mao, *Dalton Trans.* **48** (2019) 4398.
- [61] F. Wang, J. Liang, H. Zhang, Z. Wang, Q. Wan, C. Tan, L. Ji, Z. Mao, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11** (2019) 13123.
- [62] S. C. Marker, A. P. King, S. Granja, B. Vaughn, J. J. Woods, E. Boros, J. J. Wilson, *Inorg. Chem.* **59** (2020) 10285.
- [63] J. R. Dilworth, *Coord. Chem. Rev.* **436** (2021) 213822.
- [64] B. Machura, M. Wolff, D. Tabak, J. A. Schachner, N. C. Mösch-Zanetti, *Eur. J. Inorg. Chem.* **23** (2012) 11.
- [65] B. Machura, M. Wolff, E. Benoist, J. A. Schachnerd, N. C. Mösch-Zanetti, *Dalton Trans* **42(24)** (2013) 8827.
- [66] N. Zwettler, J. A. Schachner, F. Belaj, N. C. Mosch-Zanetti, *Inorg. Chem.* **55** (2016) 5973.
- [67] J. A. Schachner, B. Berner, F. Belaj, N. C. Mösch-Zanetti, *Dalton Trans.* **48** (2019) 8106.
- [68] C. F. Ramogidaab, Ch. Orvig, *Chem. Commun.* **49** (2013) 4720.
- [69] N. H. Álvarez, D. Bauer, J. Hernández-Gil, J. S. Lewis, *ChemMedChem* **16** (2021) 2909.
- [70] L. Uccelli, P. Martini, L. Urso, T. Ghirardi, L. Marvelli, C. Cittanti, A. Carnevale, M. Giganti, M. Bartolomei, A. Boschi, *Molecules* **27** (2022) 5283.
- [71] B. Pagano, S. Baldari, *Clinical Applications of Nuclear Medicine Targeted Therapy*, Springer International Publishing AG, part of Springer Nature, (2018), E. Bombardieri et al. (eds.), 345.

- [72] I. G. Finlay, M. D. Mason, M. Shelley, *Lancet Oncol.* **6** (2005) 392.
- [73] W. T. Phillips, B. Goins, A. Bao, D. Vargas, J. E. Gutierrez, A. Trevino, J. R. Miller, J. Henry, R. Zuniga, G. Vecil, A. J. Brenner, *Neuro-Oncol.* **14(4)** (2012) 416.
- [74] C. Chargari, E. Deutsch, P. Blanchard, S. Gouy, H. Martelli, F. Guérin, I. Dumas, A. Bossi, P. Morice, A. N. Viswanathan, C. Haie-Meder, *CA Cancer J. Clin.* **69** (2019) 386.
- [75] M. J. Edelman, G. Clamon, D. Kahn, M. Magram, J. Lister-James, B. R. Line, *J Thorac Oncol.* **4** (2009) 1550.
- [76] C. A. Nelson, M. T. Azure, C. T. Adams, K. R. Zinn, *J. Nucl. Med.* **55(12)** (2014) 2020.
- [77] H. H. Nguyen, J. J. Jegathesh, P. I. da S. Maia, V. M. Deflon, R. Gust, S. Bergemann, U. Abram, *Inorg. Chem.* **48** (2009) 9356.
- [78] P. I. da S. Maia, H. H. Nguyen, A. Hagenbach, S. Bergemann, R. Gust, V. M. Deflona, U. Abram, *Dalton Trans.* **42** (2013) 5111.
- [79] K. Suntharalingam, S. G. Awuah, P. M. Bruno, T. C. Johnstone, F. Wang, W. Lin, Y. R. Zheng, J. E. Page, M. T. Hemann, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **137** (2015) 2967.
- [80] P. Golstein, G. Kroemer, *Trends Biochem. Sci.* **32** (2006) 37.
- [81] Sh. Das, P. Joshi, M. Patra, *Inorg. Chem.* **62** (2023) 19720.
- [82] Sh. P. Vaidya, M. Manikandan, S. Chhatar, S. Dey, C. Patra, M. Patra, *Inorg. Chem. Front.* **10** (2023) 6711.
- [83] Ljiljana E. Mihajlović-Lalić, Jelena Poljarević, Sanja Grgurić-Šipka, *Inorganica Chim. Acta* **527** (2021) 120582.
- [84] F. A. Al-Saif, J. Y. Al-Humaidi, D. N. Binjawhar, M. S. Refat, *J. Mol. Struct.* **1218** (2020) 128547.
- [85] S. Nikolić, Lj. E. Mihajlović-Lalić, M. Vidosavljević, S. Arandelović, S. Radulović, S. Grgurić-Šipka, *J. Organomet. Chem.* **902** (2019) 120966.
- [86] Sh. M. Shohayeb, R. G. Mohamed, H. Moustafa, S. M. El-Medani, *J. Mol. Struct.* **1119** (2016) 442.
- [87] A. Aliabadi, M. Zangeneh, Z. Izadi, M. Badzohre, M. Ghadermazi, D. Marabello, F. Bagheria, A. Farokhif, E. Motieian, S. Abdolmaleki, *J. Mol. Struct.* **1247** (2022) 131327.

- [88] M. J. Celestine, J. L. Bullock, Sh. Boodram, V. H. Rambaran, A. A. Holder, *Rev. Inorg. Chem.* **35** (2014) 0004.
- [89] S. Khana, Sh. A.A. Namia, K.S. Siddiqia, E. Husainb, I. Naseem, *Spectrochim. Acta .A. Mol. Biomol. Spectrosc. Part A* **72** (2009) 421.
- [90] A. T. Colaka, P. Oztopcu-Vatan, F. Colak, D. Akduman, S. Kabadere, R. Uyar, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **27** (2013) 295.
- [91] S. Grgurić-Šipka, I. Ivanović, G. Rakić, N. Todorović, N. Gligorijević, S. Radulović, V.B. Arion, B.K. Keppler, Ž.Lj. Tešić, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 1051.
- [92] N. Gligorijević, S. Arandelović, L. Filipović, K. Jakovljević, R. Janković, S. Grgurić- Šipka, I. Ivanović, S. Radulović, Ž.Lj. Tešić, *J. Inorg. Biochem.* **108** (2012) 53.
- [93] I. Ivanović, K.K. Jovanović, N. Gligorijević, S. Radulović, V.B. Arion, K.S.A. M. Sheweshein, Ž. Lj. Tešić, S. Grgurić-Šipka, *J. Organomet. Chem.* **749** (2014) 343.
- [94] R.A. De Grandis, M.S. de Camargo, M.M. da Silva, E.O. Lopes, E.C. Padilha, F. A. Resende, R.G. Peccinini, F.R. Pavan, A. Desideri, A.A. Batista, E.A. Varanda, *Biometals* **30** (2017) 321.
- [95] S. Abdolmaleki, A. Aslani, A. Aliabadi, S. Khazayel, S. Mojtaba Amininasab, Z. Izadi, M. Ghadermazi, E. Motieian, D. Marabello, V. Hugo, N. Rodrigues, *J. Coord. Chem.* **75** (2022) 147.
- [96] J. Drzeżdżon, A. Piotrowska-Kirschling, J. Malinowski, A. Kloska, B. Gawdzik, L. Chmurzyński, D. Jacewicz, *J. Mol. Liq.* **282** (2019) 441.
- [97] A. García-García, M. Medina-O'donnell, S. Rojas, M. Cano-Morenilla, J. Morales, M. Mar Quesada-Moreno, J. Sainz, I. J. Vitorica-Yrezabal, A. Rodríguez-Diéguez, A. Navarro, F. J. Reyes-Zurita, *Dalton Trans.* **53** (2024) 8988.
- [98] M. Buczkowska, A. Bodtke, U. Lindequist, M. Gdaniec, P. J. Bednarski, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **344** (2011) 605.
- [99] M. L. Matlou, F. P. Malan, S. Nkadimeng, L. McGaw, V. J. Tembu, A. L. E. Manicum, *J. Biol. Inorg. Chem.* **28** (2023) 29.
- [100] N. Alvarez, A. Rocha, V. Collazo, J. Ellena, A. J. Costa-Filho, A. A. Batista, G. Facchin, *Pharmaceutics* **15** (2023) 15051345.
- [101] S. H. van Rijt, A. F. A. Peacock, R. D. L. Johnstone, S. Parsons, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* **48** (2009) 1753.

- [102] H. Haoa, X. Liu, X. Ge, Y. Zhao, X. Tian, T. Ren, Y. Wang, C. Zhao, Z. Liu, *J. Inorg. Biochem.* **192** (2019) 52.
- [103] N. P. Johnson, C. J. L. Lock, G. Wilkinson, *Inorganic Syntheses*, McGraw-Hill Book Company, Inc, 1967, in: S. Young Tyree Jr. (Ed.), 145.
- [104] A. M. Kirillov, M. Haukka, M. V. Kirillova, A. J. L. Pombeiro, *Adv. Synth. Catal.* **347** (2005) 1435.
- [105] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, D. J. Fox, *Gaussian 09, Revision A.02*, Gaussian, Inc., Wallingford CT 2016.
- [106] C. R. Groom, I. J. Bruno, M. P. Lightfoot, S. C. Ward, *Acta Crystallogr. Sect. B: Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **B72** (2016) 171.
- [107] T. Lu, F. Chen, *J. Comput. Chem.* **33** (2012) 580.
- [108] G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* **A64** (2008) 112.
- [109] G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* **C71** (2015) 3.
- [110] R. Supino, *Methods in molecular biology*, in: S. O'Hare, C.K. Atterwill (Eds.), *In Vitro Toxicity Testing Protocols*, Humana Press, New Jersey, 1995, 137.
- [111] M. Pavlović, S. Nikolić, N. Gligorijević, B. Dojčinović, S. Arandjelović, S. Grgurić-Šipka, S. Radulović, *J. Biol. Inorg. Chem.* **24** (2019) 297.
- [112] R. Krishna, L.D. Mayer, *Eur. J. Pharm. Sci.* **11** (2000) 265.
- [113] L. Filipović, S. Arandjelović, A. Krivokuća, R. Janković, B. Dojčinović, S. Radulović, *Anti Cancer Agents Med. Chem.* **16** (2016) 1628.

- [114] M. G. Ormerod, Analysis of DNA-general methods, in: M.G. Ormerod (Ed.), *Flow Cytometry, a Practical Approach*, Oxford University Press, New York, 1994, 119.
- [115] K. K. Jovanović, N. Gligorijević, R. Gaur, L. Mishra, S. Radulović, *JBUON* **21** (2016) 482.
- [116] A. Savić, N. Gligorijević, S. Arandelović, B. Dojčinović, A.M. Kaczmarek, S. Radulović, R. Van Deun, K. Van Hecke, *J. Inorg. Biochem.* **202** (2020) 110869.
- [117] Z. Dauter, *Acta Cryst.* **D59** (2003) 2004.
- [118] M. Patra, T. Joshi, V. Pierroz, K. Ingram, M. Kaiser, S. Ferrari, B. Spingler, J. Keiser, G. Gasser, *Chem. Eur. J.* **19** (2013) 14768.
- [119] J. Konig, A.T. Nies, Y. Cui, I. Leier, D. Keppler, *Biochim. Biophys. Acta* **1461** (1999) 377.
- [120] H.-L. Qin, J. Leng, C.-P. Zhang, I. Jantan, M.W. Amjad, M. Sher, M.N. Ul-Hassan, M. A. Hussain, S.N.A. Bukhari, *J. Med. Chem.* **59** (2016) 3549.
- [121] I.W. Wainer, C.P. Granvil, *Ther. Drug Monit.* **15** (1993) 570.
- [122] S.C. Marker, A.P. King, R.V. Swanda, B. Vaughn, E. Boros, S.B. Qian, J.J. Wilson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **59** (2020) 13391.
- [123] R. Krishna, L. D. Mayer, *Eur. J. Pharm. Sci.* **11** (2000) 265.
- [124] S. Nobili, I. Landini, B. Giglioni, E. Mini, *Curr. Drug Targets* **7**(7) 2006 861.
- [125] S.F. Zhou, L.L. Wang, Y.M. Di, C.C. Xue, W. Duan, C.G. Li, Y. Li, *Curr. Med. Chem.* **15** (2008) 1981.
- [126] A. Savić, L. Filipović, S. Arandelović, B. Dojčinović, S. Radulović, T.J. Sabo, S. Grgurić-Šipka, *Eur. J. Med. Chem.* **82** (2014) 372.
- [127] S.Y. Sharp, V. Smith, S. Hobbs, L.R. Kelland, *Br. J. Cancer* **78** (1998) 175.
- [128] S.B. Howell, R. Safaei, C.A. Larson, M.J. Sailor, *Mol. Pharmacol.* **77** (2010) 887.
- [129] M.D. Hall, M. Okabe, D.W. Shen, X.J. Liang, M.M. Gottesman, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **48** (2008) 495.
- [130] H.H.W. Chen, M.T. Kuo, *Metal-Based Drugs* **2010** (2010) 430939.
- [131] M. Müller, C. Meijer, G.J. Zaman, P. Borst, R.J. Scheper, N.H. Mulder, E.G. de Vries, P.L. Jansen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91** (26) (1994) 13033.

- [132] P. Mistry, S.Y. Loh, L.R. Kelland, K.R. Harrap, *Int. J. Cancer* **55** (1993) 848.
- [133] T. Ishikawa, F. Ali-Osman, *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 20116.
- [134] D.W. Loe, R.G. Deeley, S.P. Cole, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293** (2000) 530.

7. PRILOG

Slika P1. IC spektar kompleksa **K1**

Slika P2. IC spektar kompleksa **K2**

Slika P3. IC spektar kompleksa **K3**

Slika P4. IC spektar kompleksa **K4**

Slika P5. IC spektar kompleksa **K5**

Slika P6. IC spektar kompleksa **K6**

Slika P7. ^1H NMR spektar kompleksa **K1**, sniman u CDCl_3

Slika P8. ^1H - ^{13}C HSQC NMR spektar kompleksa **K1**, sniman u CDCl_3

Slika P9. ^1H NMR spektar kompleksa **K2**, sniman u CDCl_3

Slika P10. ^1H NMR spektar kompleksa **K3**, sniman u CDCl_3

Slika P11. ^1H NMR spektar kompleksa **K4**, sniman u DMSO

Slika P12. ^1H NMR spektar kompleksa **K5**, sniman u DMSO

Slika P13. ^1H NMR spektar kompleksa **K6**, sniman u DMSO

Slika P14. ^1H NMR spektar uporedni prikaz liganda **L1 (plava boja)** i kompleksa **K1 (crvena boja)**, sniman u CDCl_3

Slika P15. ^1H NMR spektar uporedni prikaz liganda **L2 (plava boja)** i kompleksa **K2 (crvena boja)**, sniman u CDCl_3

Slika P16. ^1H NMR spektar uporedni prikaz liganda **L3 (plava boja)** i kompleksa **K3 (crvena boja)**, sniman u CDCl_3

Slika P17. ^1H NMR spektar uporedni prikaz liganda **L4 (plava boja)** i kompleksa **K4 (crvena boja)**, sniman u DMSO

Slika P18. ^1H NMR spektar uporedni prikaz liganda **L5 (plava boja)** i kompleksa **K5 (crvena boja)**, sniman u DMSO

Slika P19. ^1H NMR spektar uporedni prikaz liganda **L6 (plava boja)** i kompleksa **K6 (crvena boja)**, sniman u DMSO

Slika P20. ^{13}C NMR spektar kompleksa **K1**, sniman u CDCl_3

Slika P21. ^{13}C NMR spektar kompleksa **K2**, sniman u CDCl_3

Slika P22. ^{13}C NMR spektar kompleksa **K3**, sniman u CDCl_3

Slika P23. ^{13}C NMR spektar kompleksa **K4**, sniman u DMSO

Slika P24. ^{13}C NMR spektar kompleksa **K5**, sniman u DMSO

Slika P25. ^{13}C NMR spektar kompleksa **K6**, sniman u DMSO

Slika P26. Maseni spektar kompleksa **K1** sniman u CH_3CN

Slika P27. Maseni spektar kompleksa **K1** dobijen predikcijom pomoću Isotope Distribution Calculator

Slika P28. Maseni spektar kompleksa **K2** sniman u CH_3OH

Slika P29. Maseni spektar kompleksa **K2** dobijen predikcijom pomoću Isotope Distribution Calculator

Slika P30. Maseni spektar kompleksa **K3** sniman u CH_3OH

Slika P31. Maseni spektar kompleksa **K3** dobijen predikcijom pomoću Isotope Distribution Calculator

Slika P32. Maseni spektar kompleksa **K4** sniman u CH_3OH

Slika P33. Maseni spektar kompleksa **K4** dobijen predikcijom pomoću Isotope Distribution Calculator

Slika P34. Maseni spektar kompleksa **K5** sniman u CH_3OH

Slika P35. Maseni spektar kompleksa **K5** dobijen predikcijom pomoću Isotope Distribution Calculator

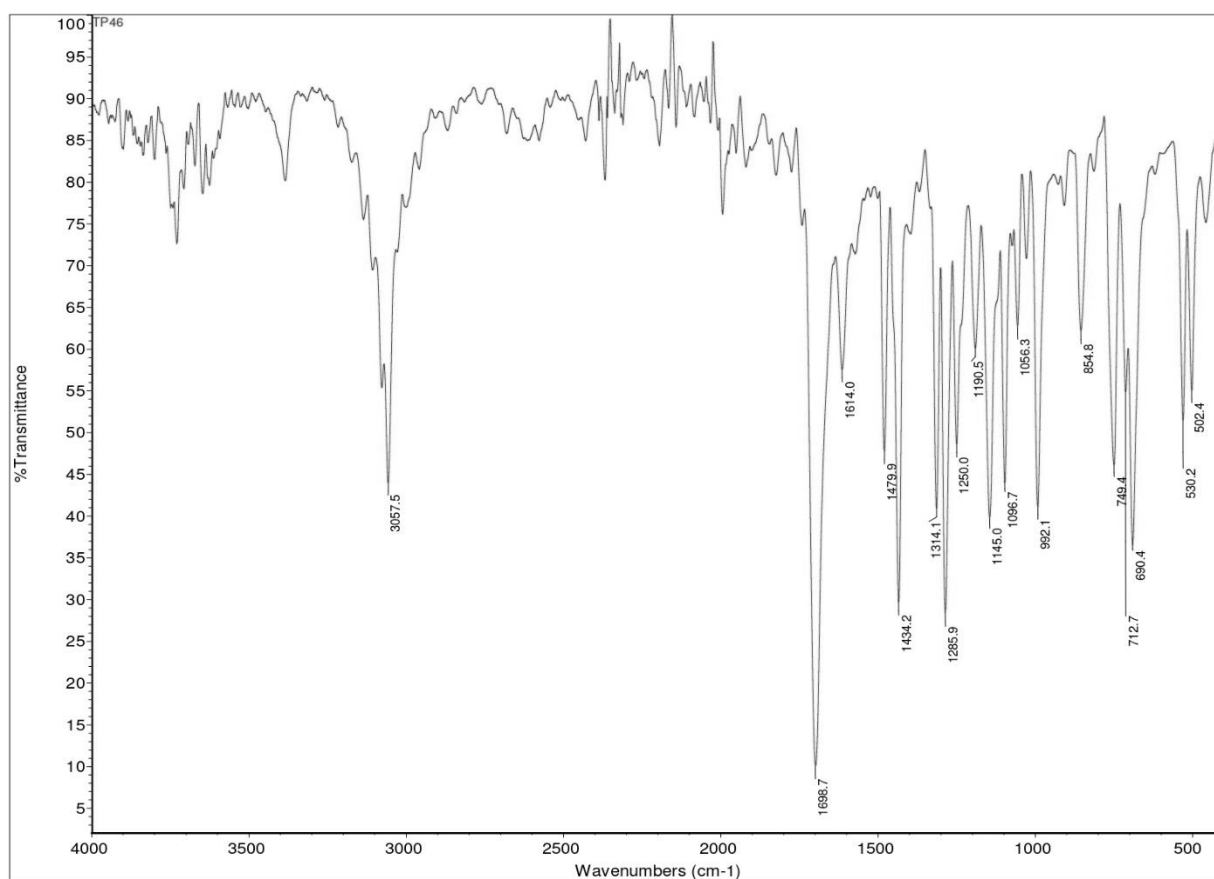
Slika P36. Maseni spektar kompleksa **K6** sniman u CH_3OH

Slika P37. Maseni spektar kompleksa **K6** dobijen predikcijom pomoću Isotope Distribution Calculator

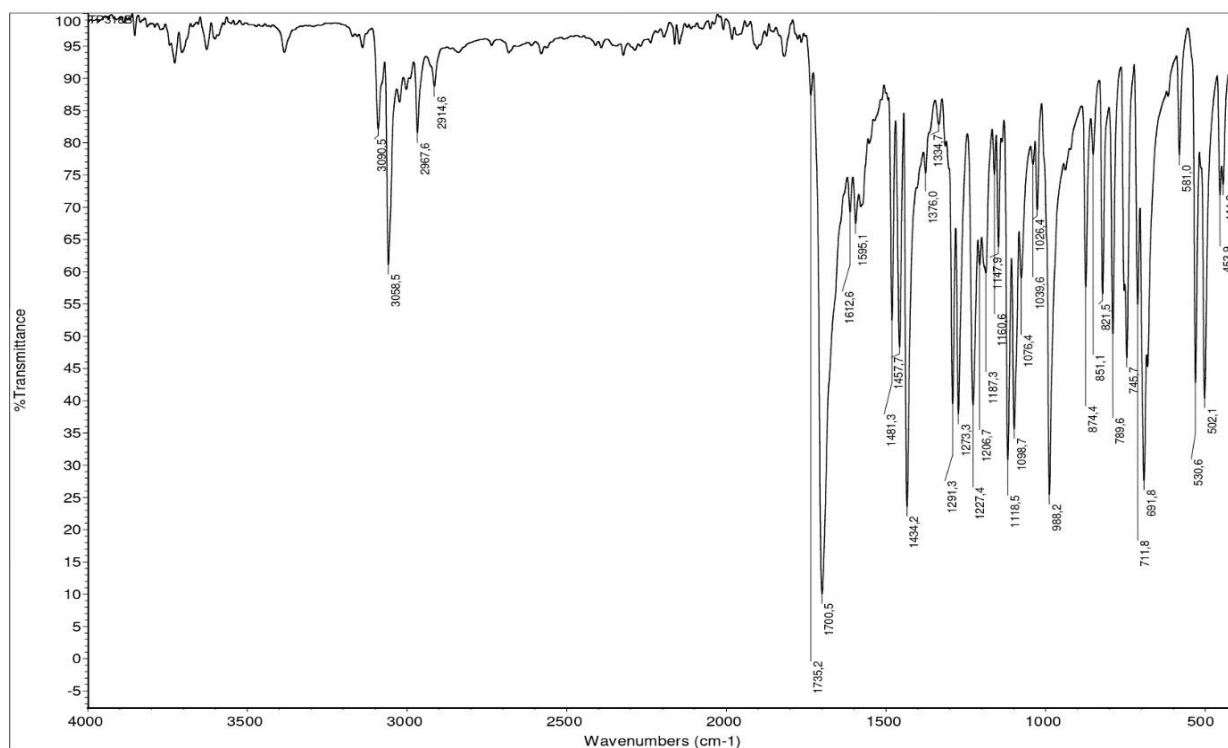
Slika P38. Maseni spektar visoke rezolucije kompleksa **K6** sniman u CH₃OH

Slika P39. ¹H NMR spektar stabilnosti kompleksa **K2** u DMSO u toku 72 h

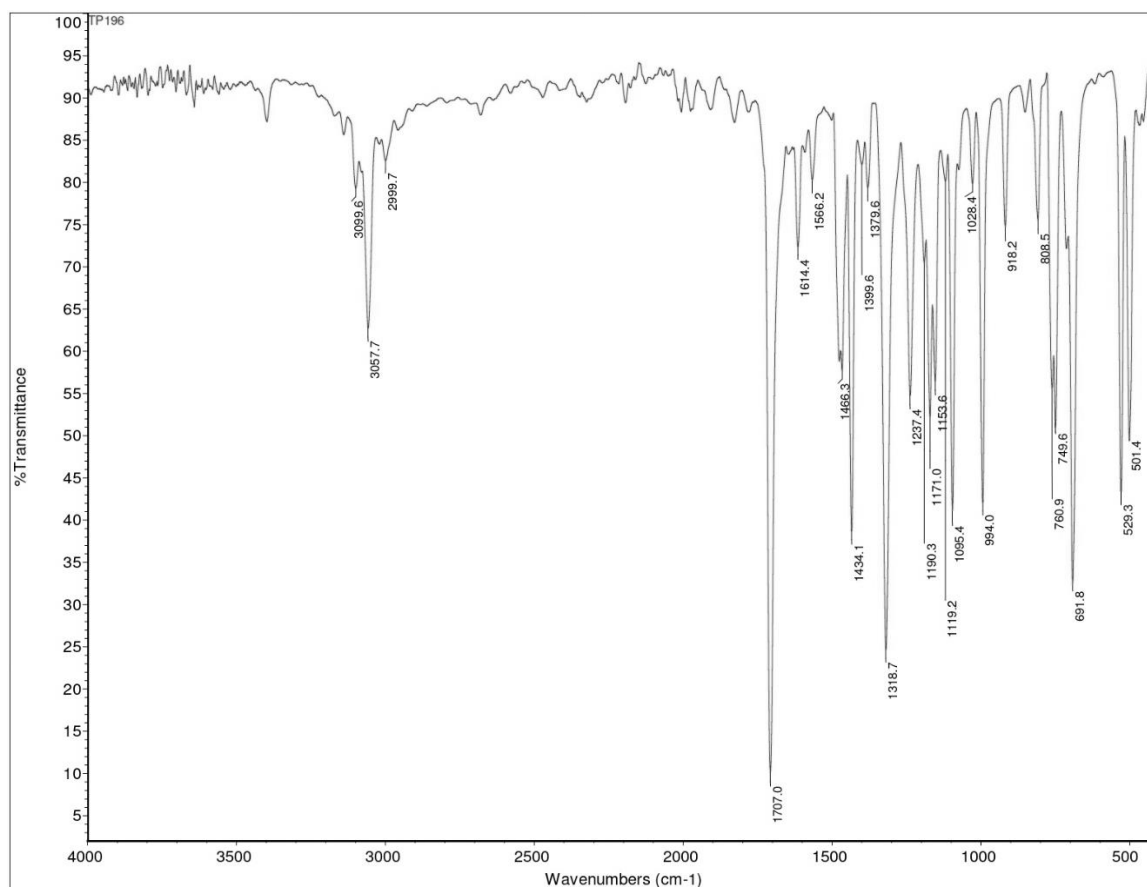
Slika P40. ¹H NMR spektar stabilnosti kompleksa **K5** u DMSO u toku 72 h



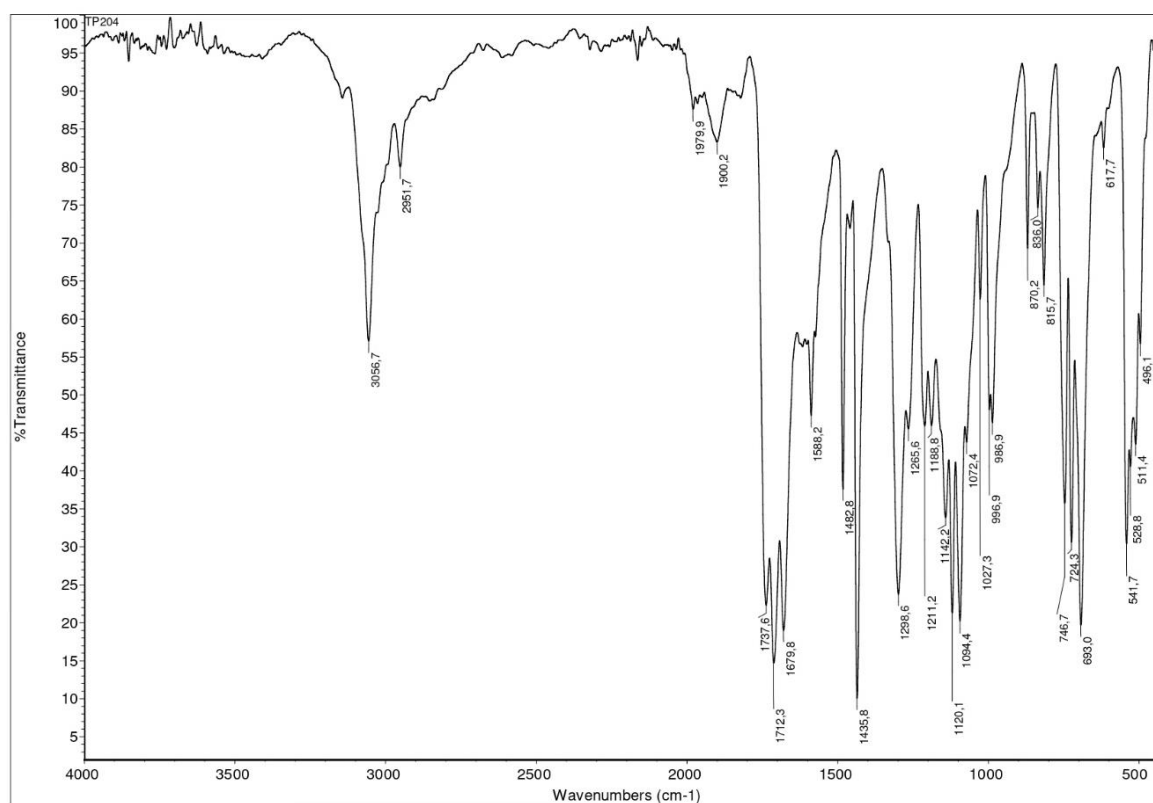
Slika P1. IC spektar kompleksa K1



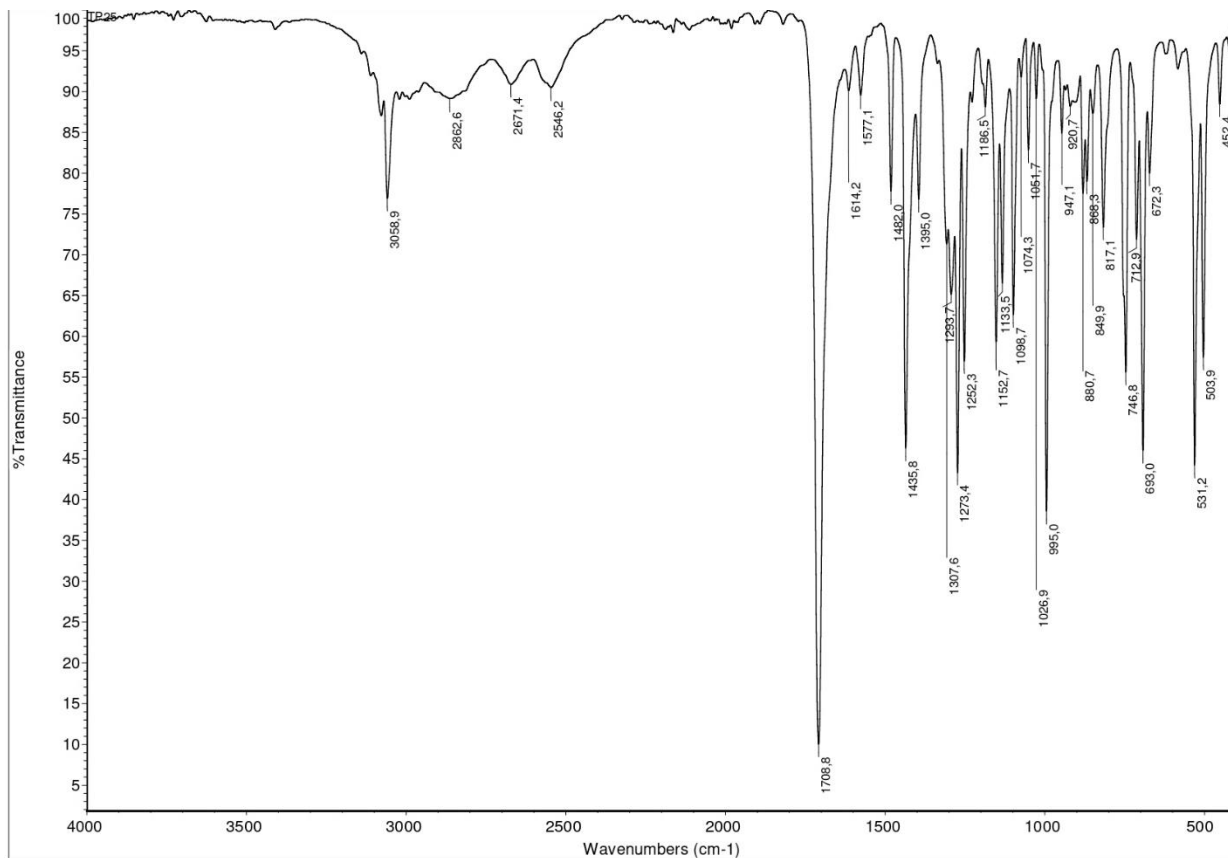
Slika P2. IC spektar kompleksa K2



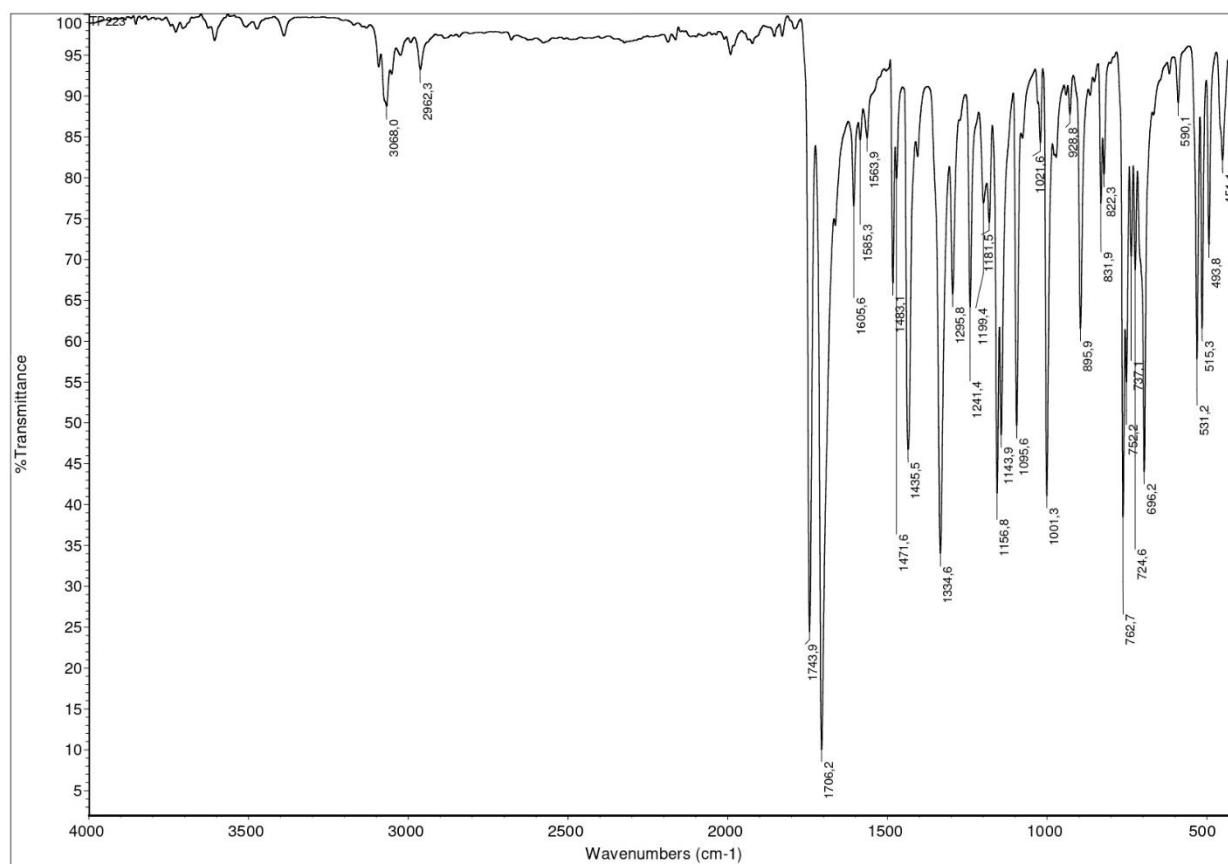
Slika P3. IC spektar kompleksa K3



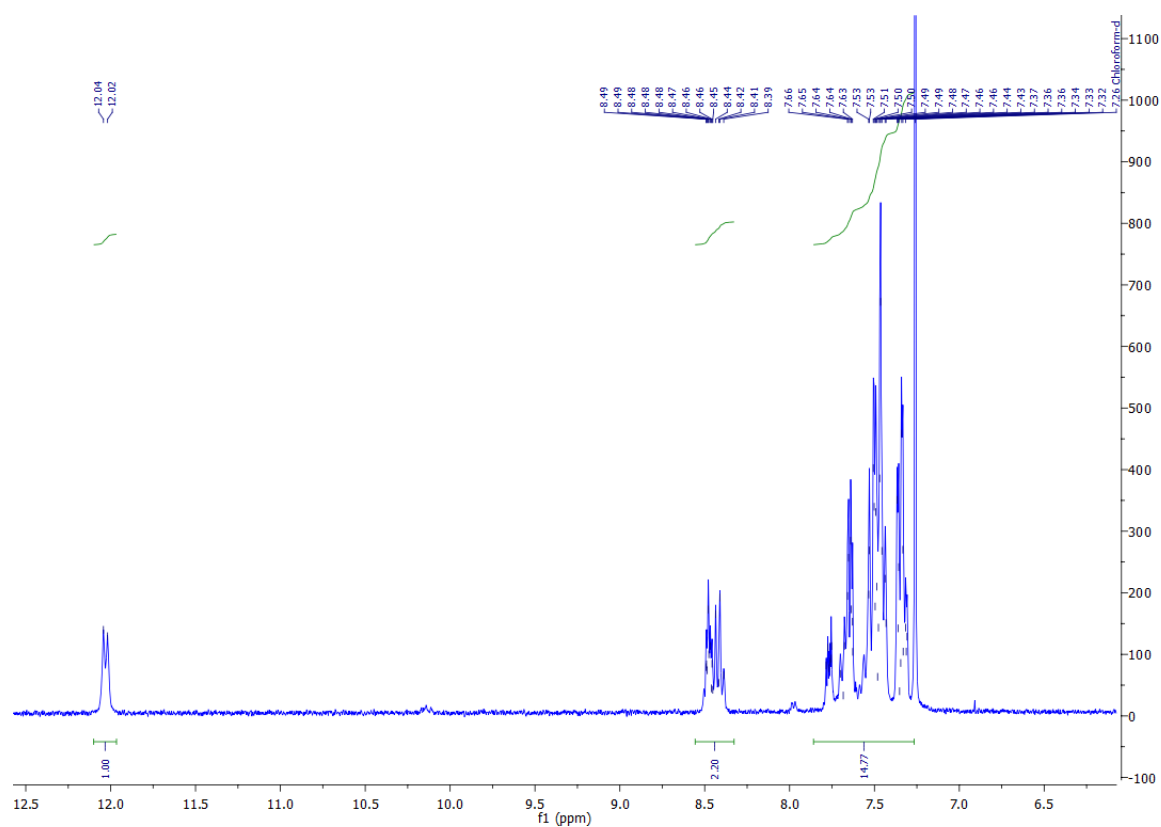
Slika P4. IC spektar kompleksa K4



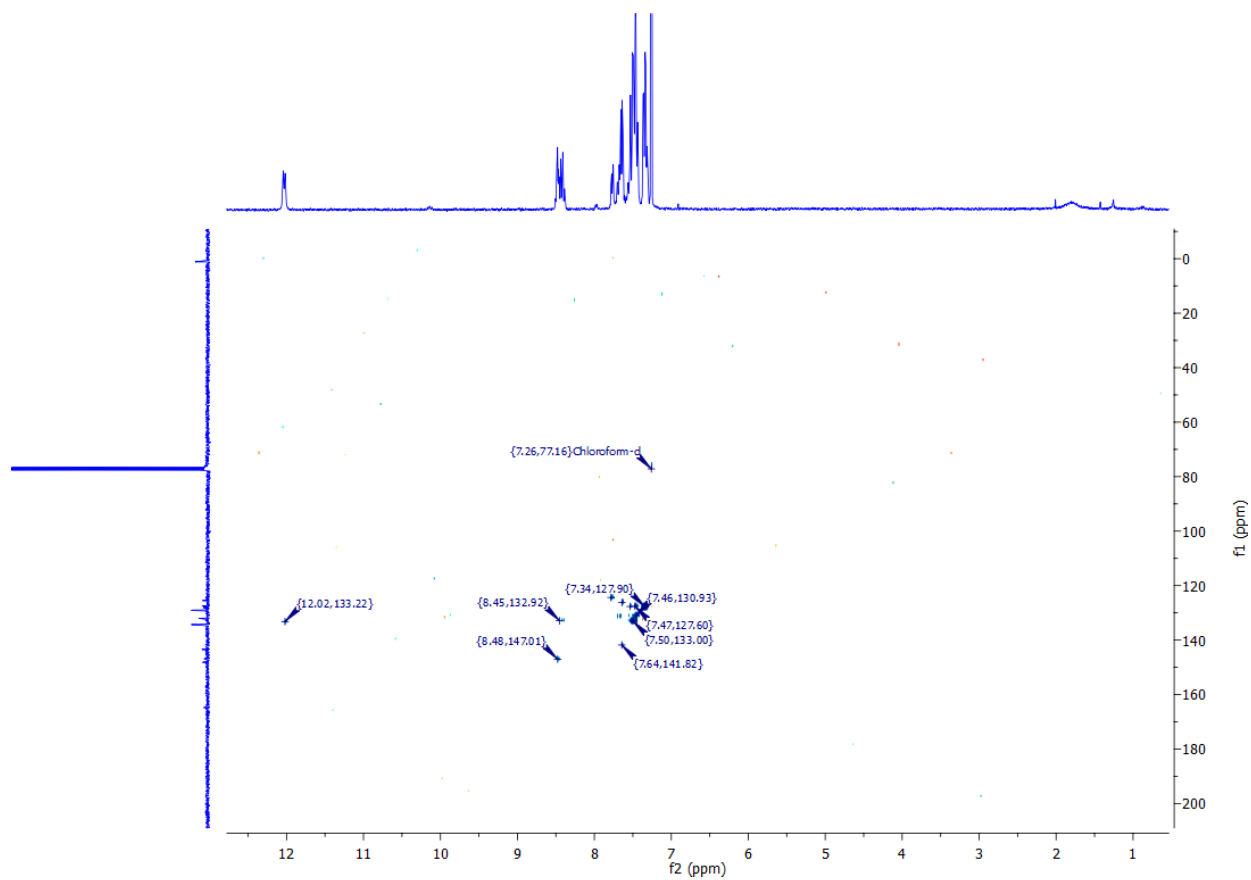
Slika P5. IC spektar kompleksa K5



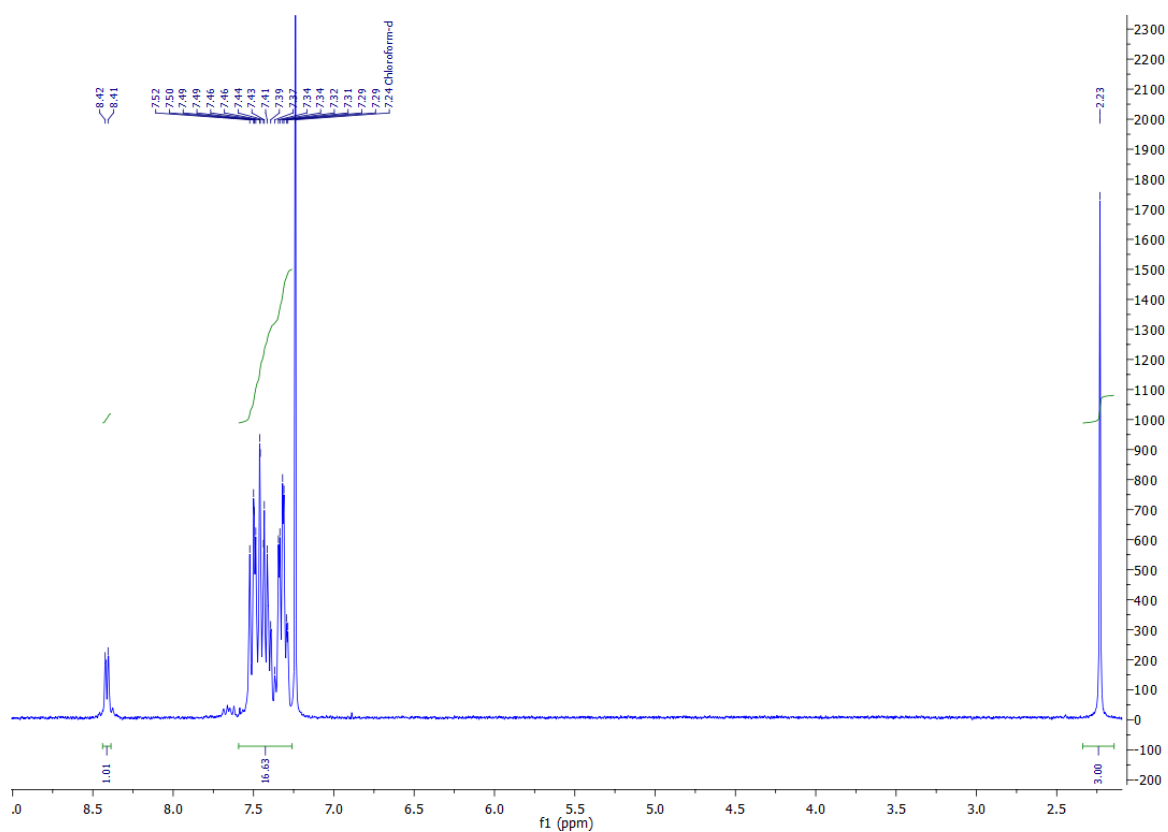
Slika P6. IC spektar kompleksa K6



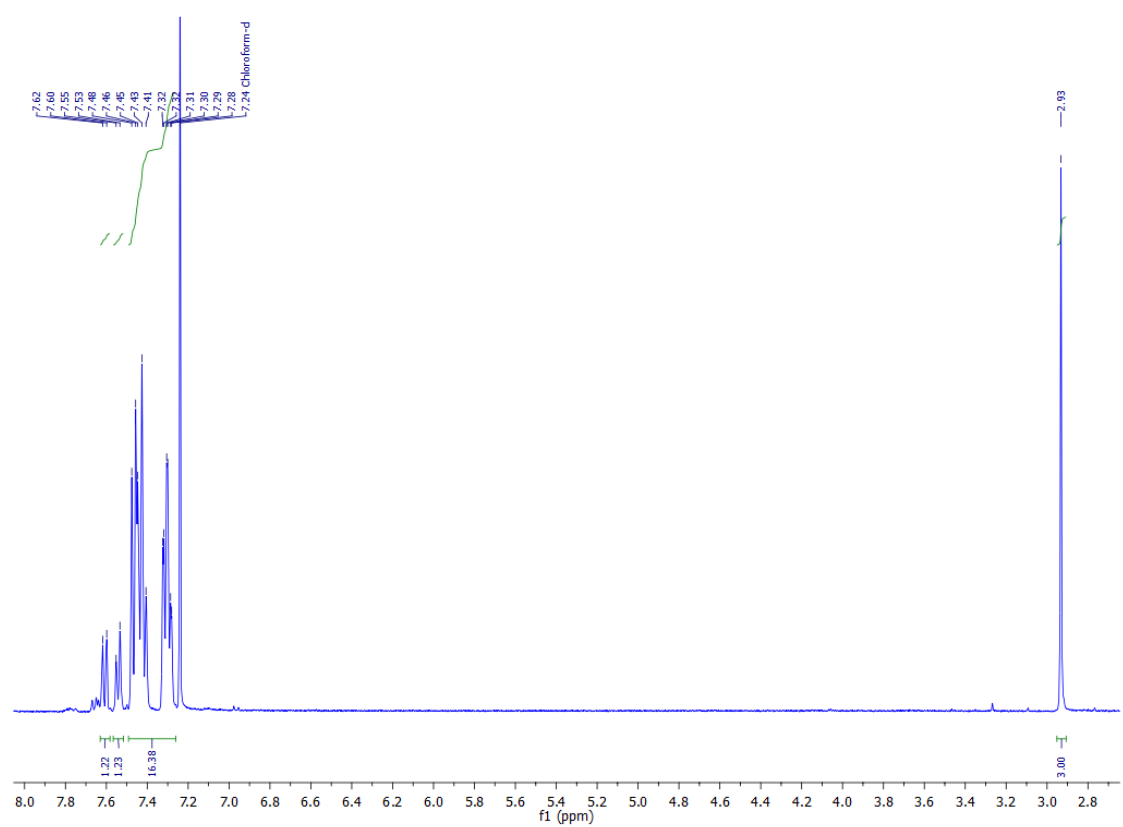
Slika P7. ^1H NMR spektar kompleksa **K1**, sniman u CDCl_3



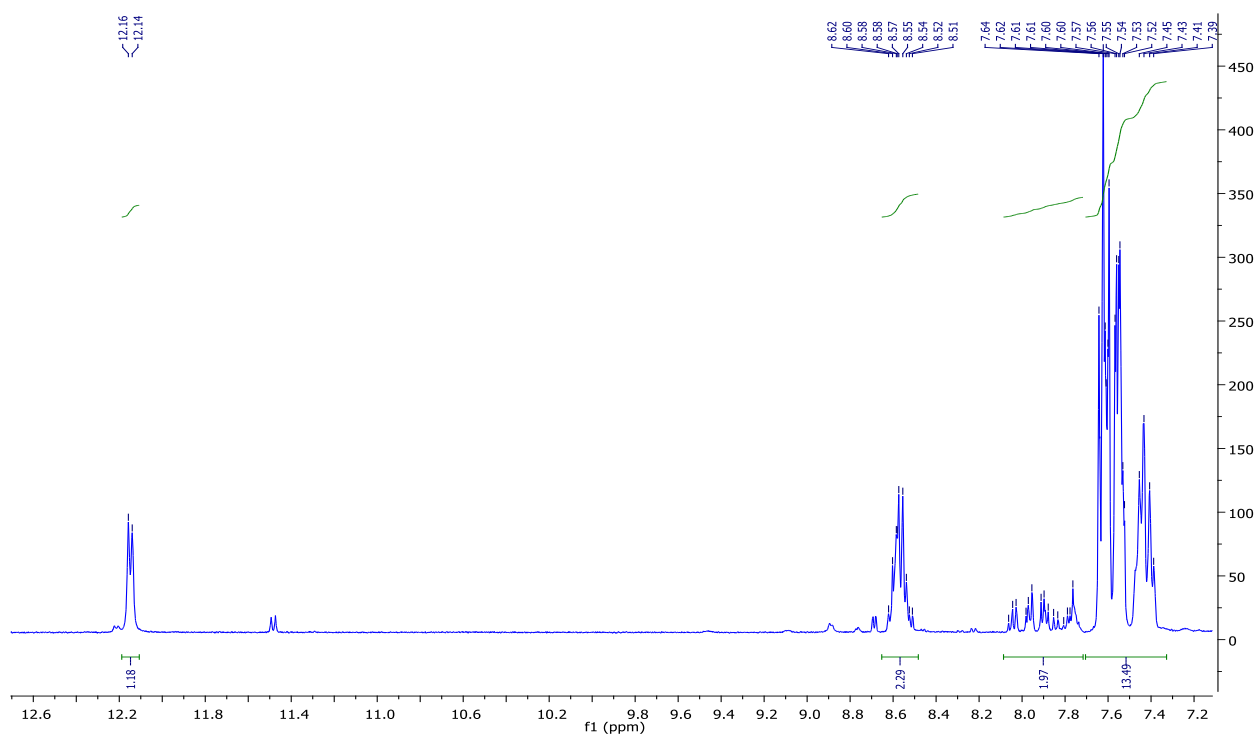
Slika P8. ^1H - ^{13}C HSQC NMR spektar kompleksa **K1**, sniman u CDCl_3



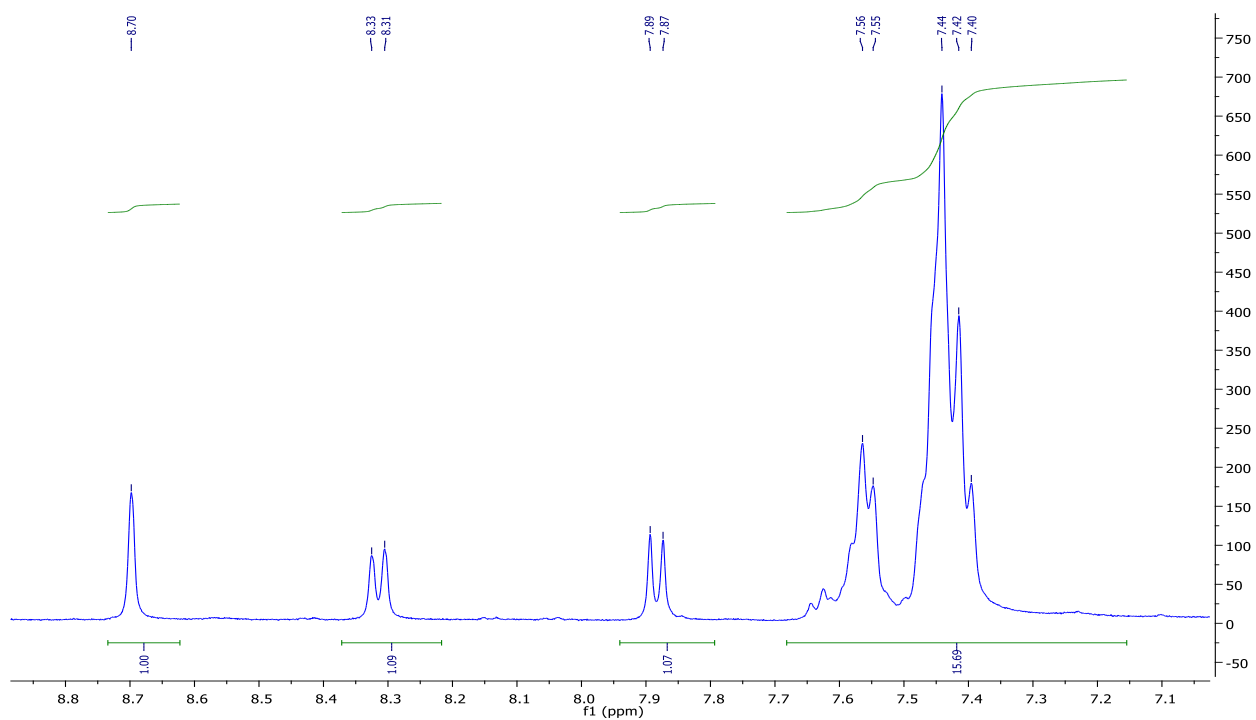
Slika P9. ¹H NMR spektar kompleksa **K2**, sniman u CDCl₃



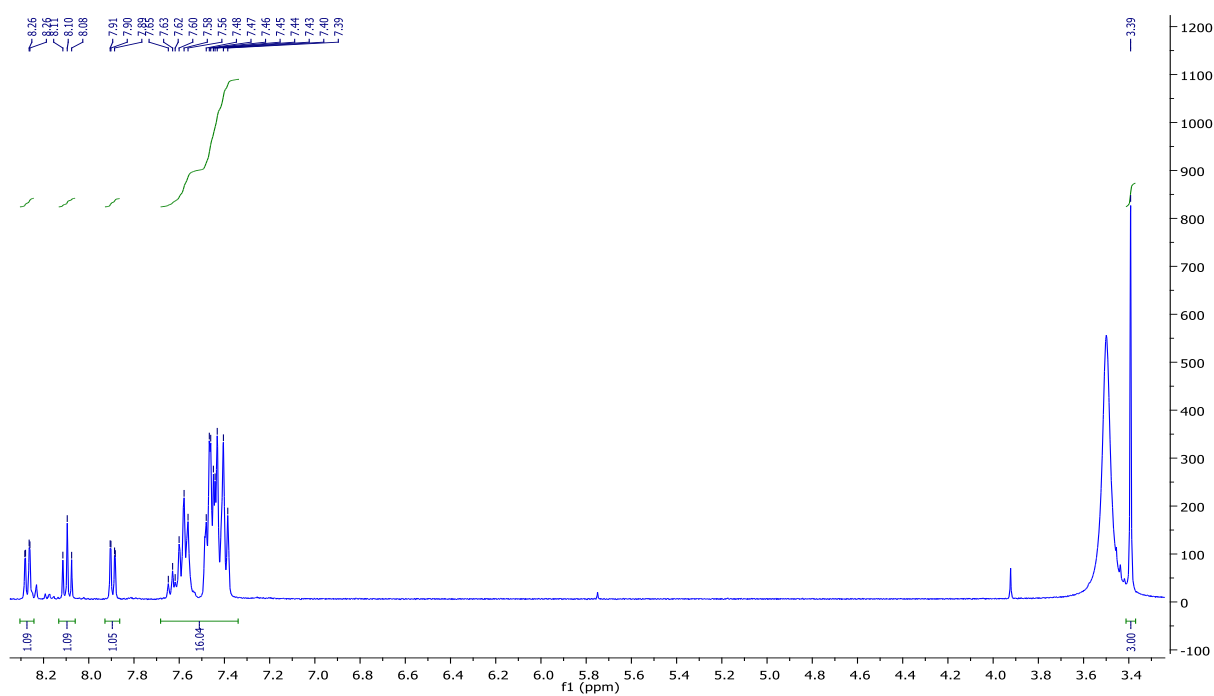
Slika P10. ¹H NMR spektar kompleksa **K3**, sniman u CDCl₃



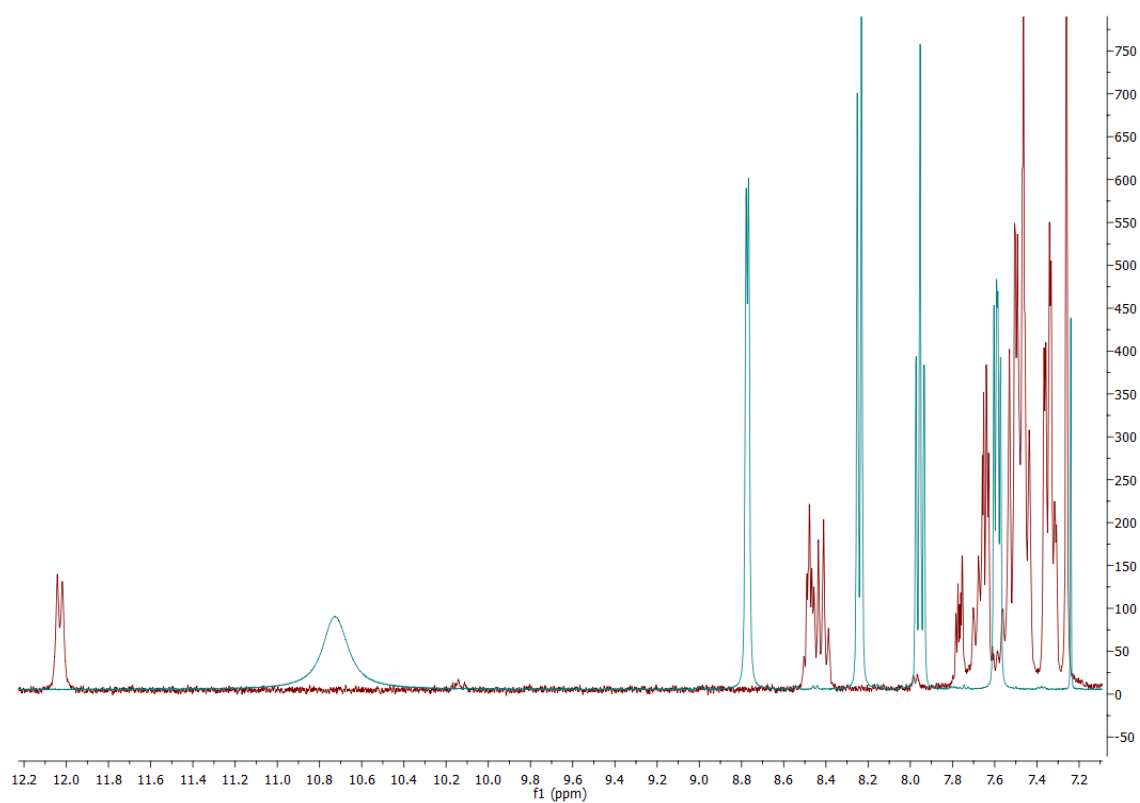
Slika P11. ¹H NMR spektar kompleksa **K4**, sniman u DMSO



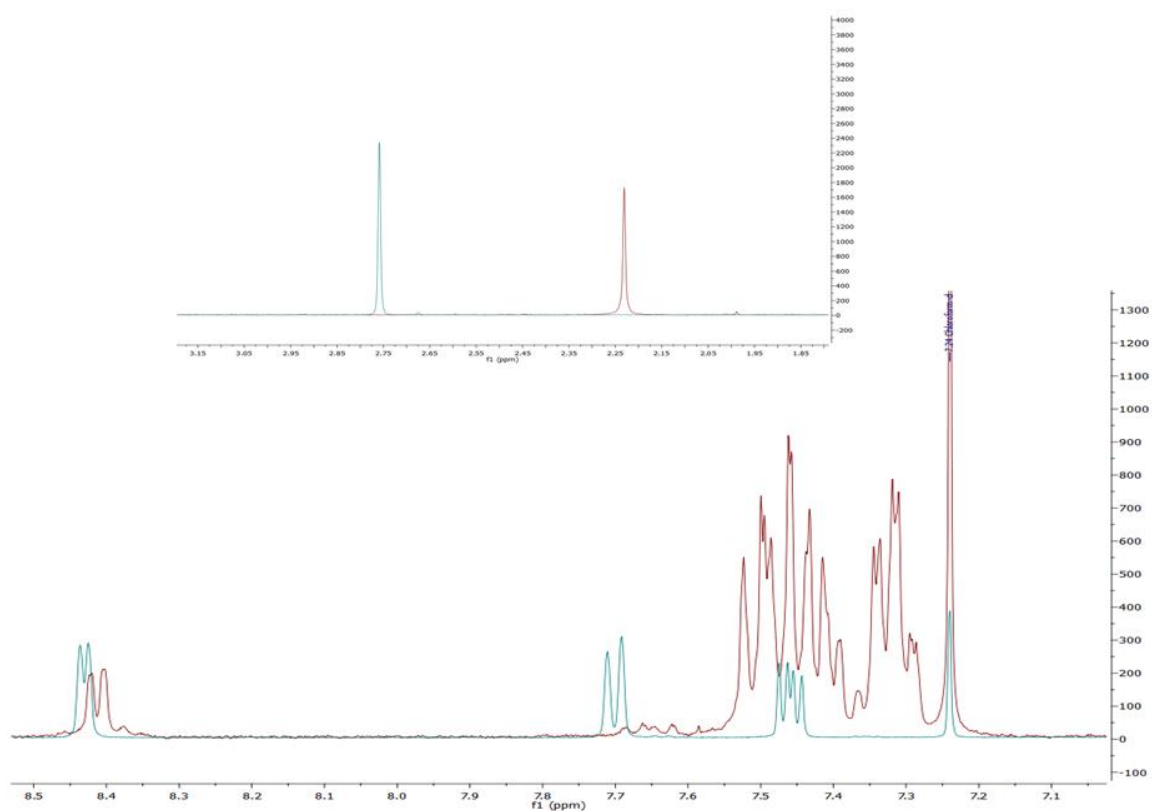
Slika P12. ¹H NMR spektar kompleksa **K5**, sniman u DMSO



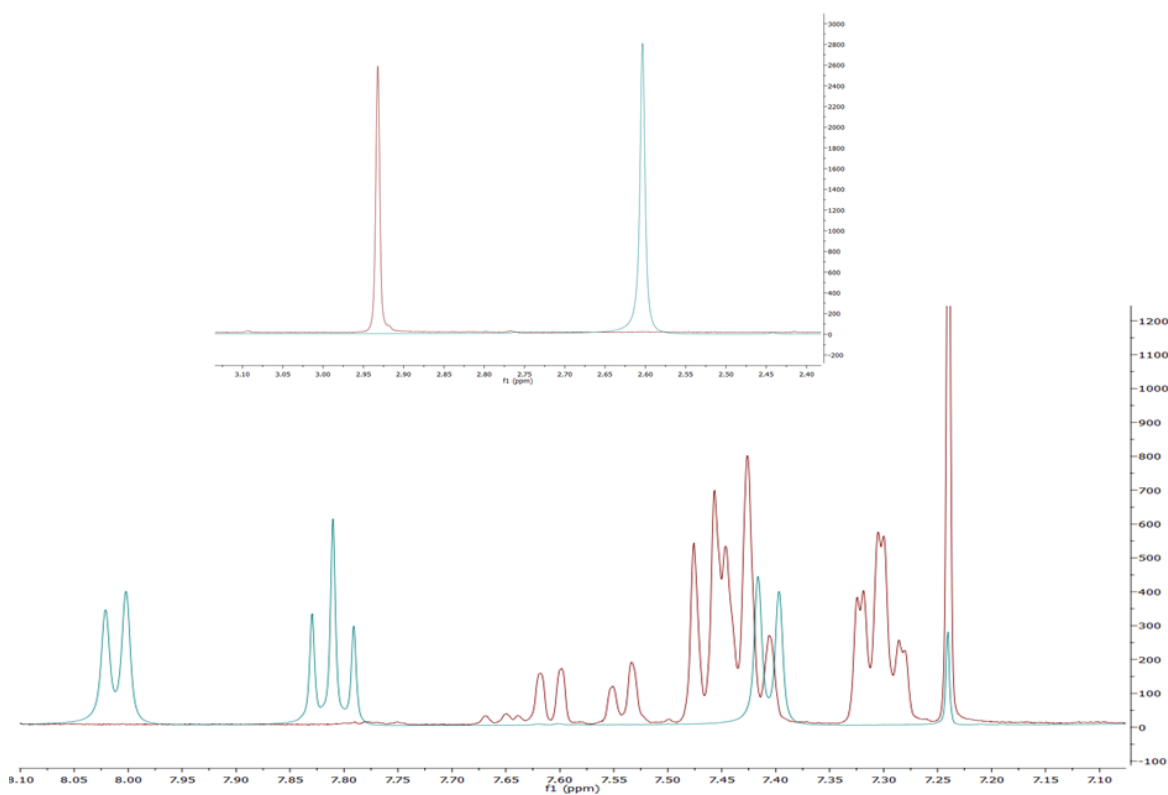
Slika P13. ^1H NMR spektar kompleksa **K6**, sniman u DMSO



Slika P14. ^1H NMR spektar uporedni prikaz liganda **L1** (plava boja) i kompleksa **K1** (crvena boja), sniman u CDCl_3



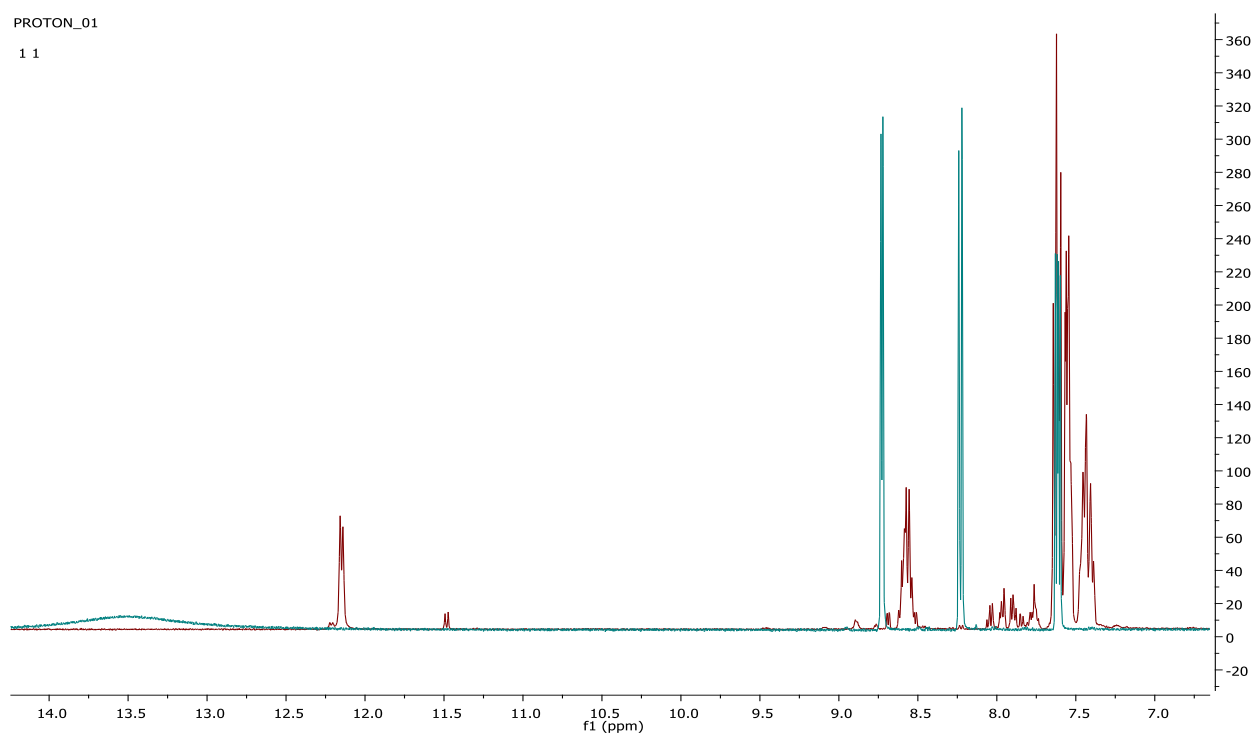
Slika P15. ^1H NMR spektar uporedni prikaz liganda **L2** (plava boja) i kompleksa **K2** (crvena boja), sniman u CDCl_3



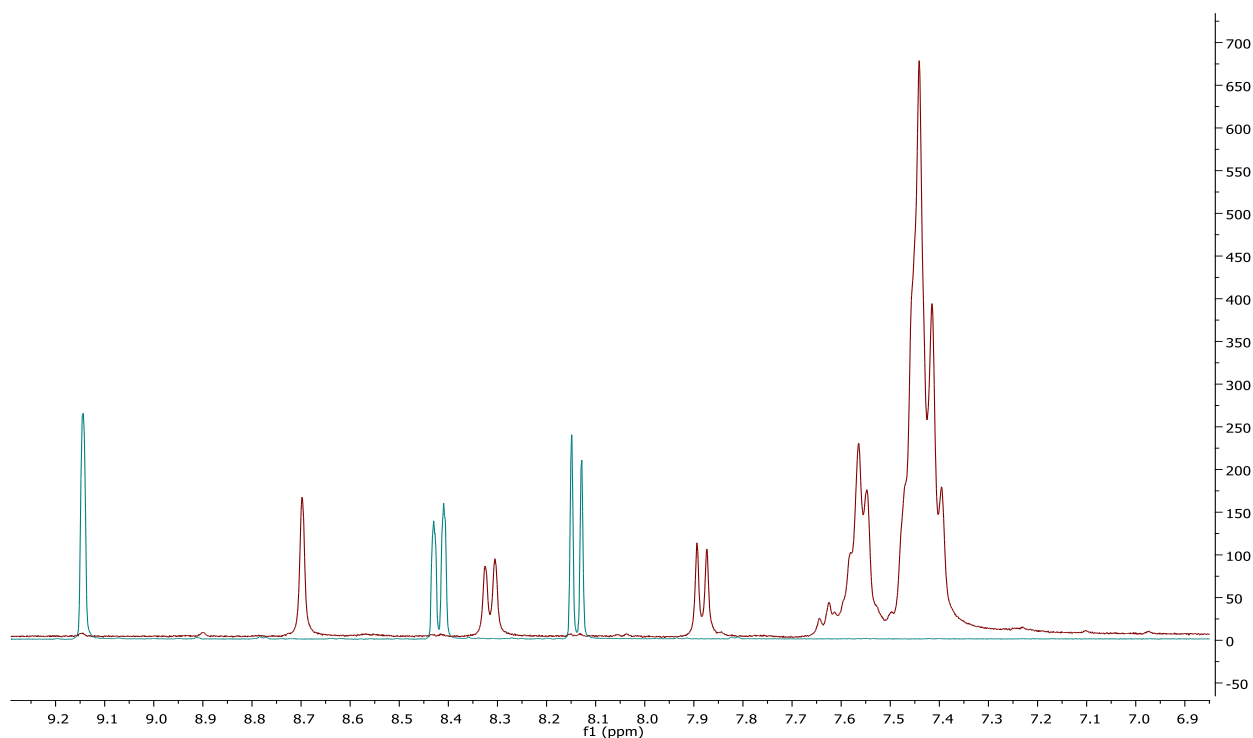
Slika P16. ^1H NMR spektar uporedni prikaz liganda **L3** (plava boja) i kompleksa **K3** (crvena boja), sniman u CDCl_3

PROTON_01

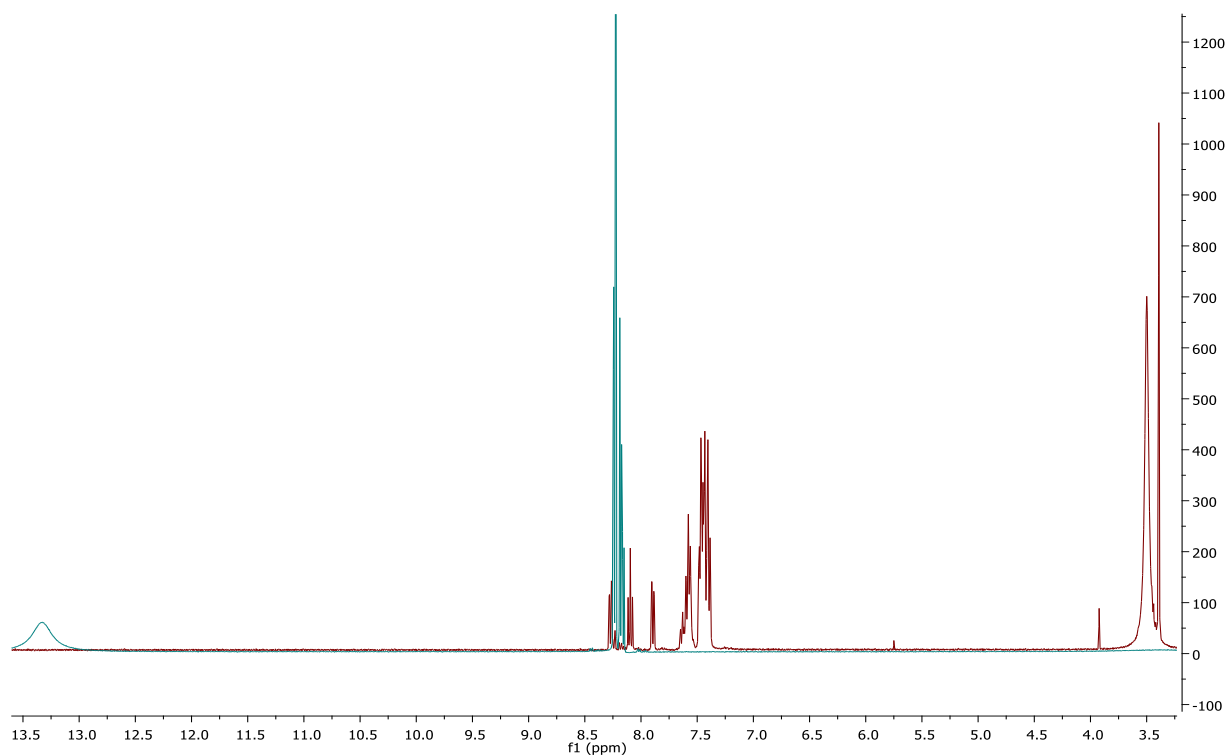
1 1



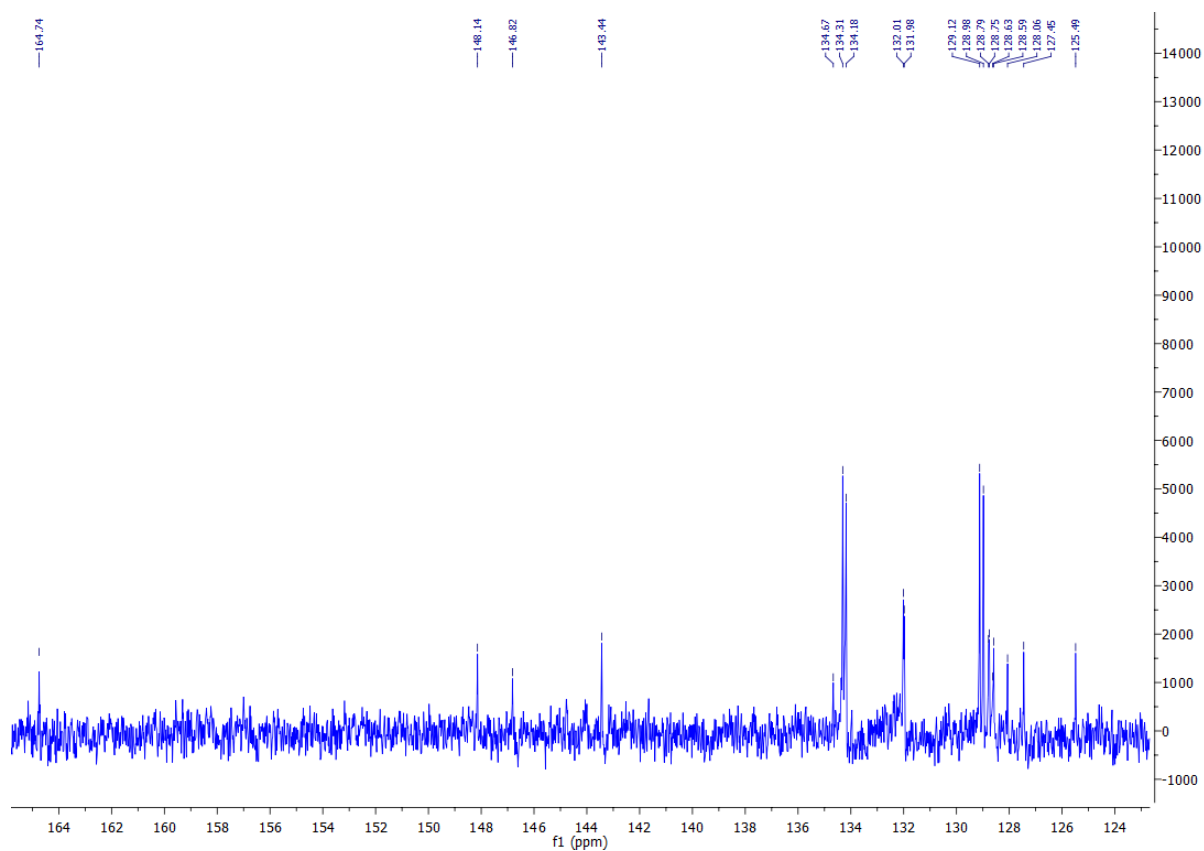
Slika P17. ^1H NMR spektar uporedni prikaz liganda **L4** (plava boja) i kompleksa **K4** (crvena boja), sniman u DMSO



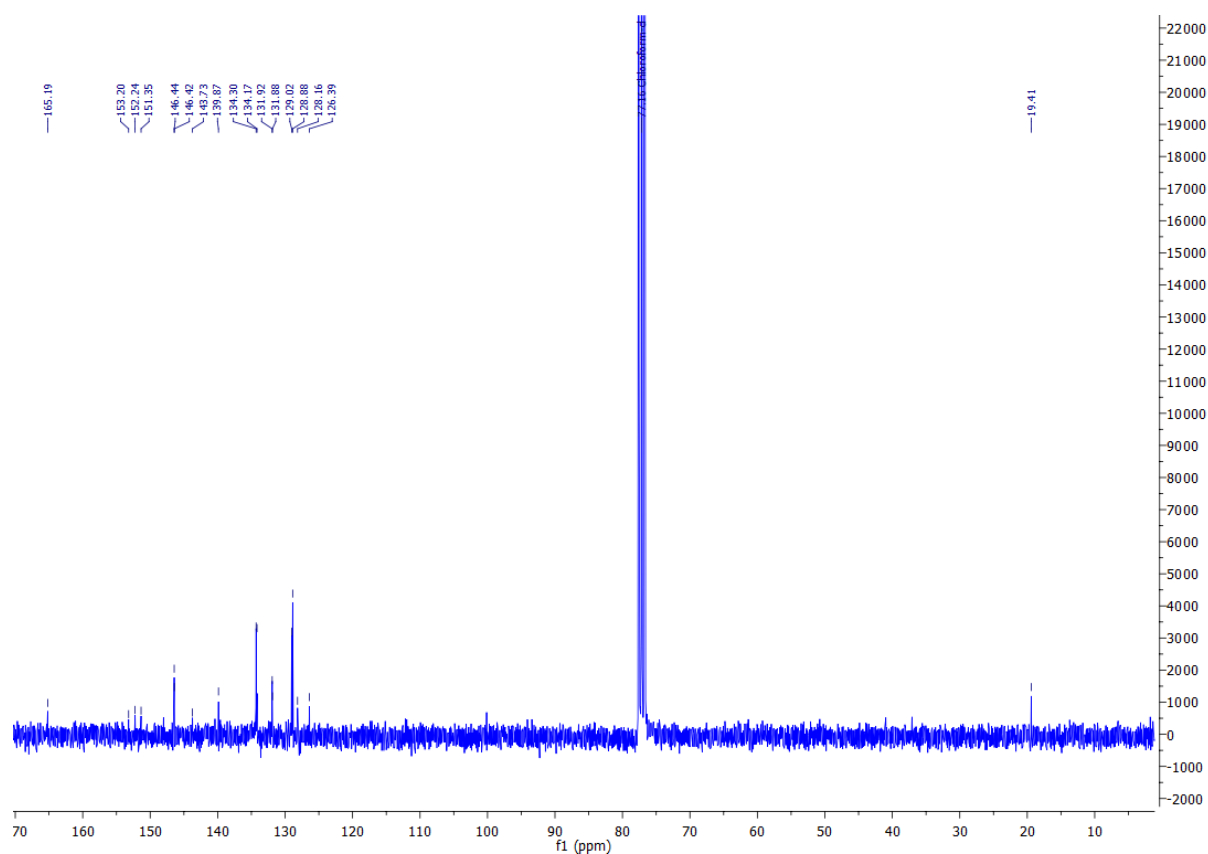
Slika P18. ^1H NMR spektar uporedni prikaz liganda **L5** (plava boja) i kompleksa **K5** (crvena boja), sniman u DMSO



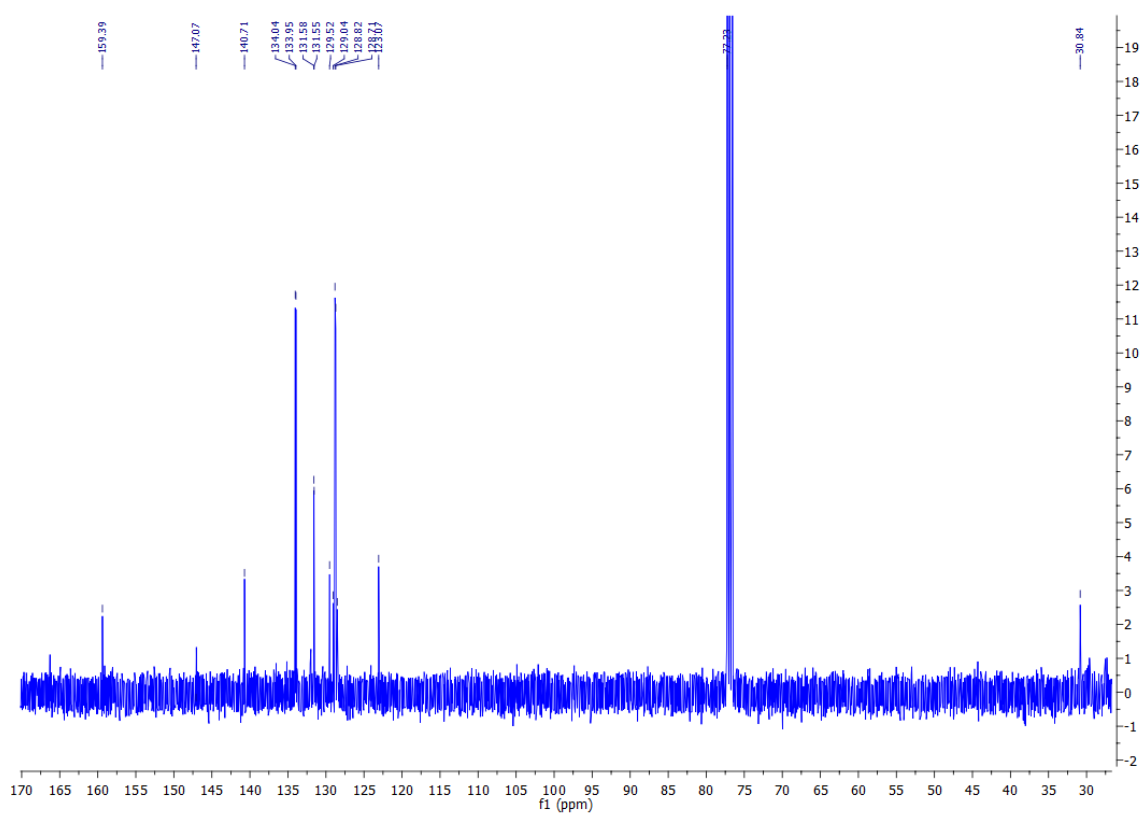
Slika P19. ^1H NMR spektar uporedni prikaz liganda **L6** (plava boja) i kompleksa **K6** (crvena boja), sniman u DMSO



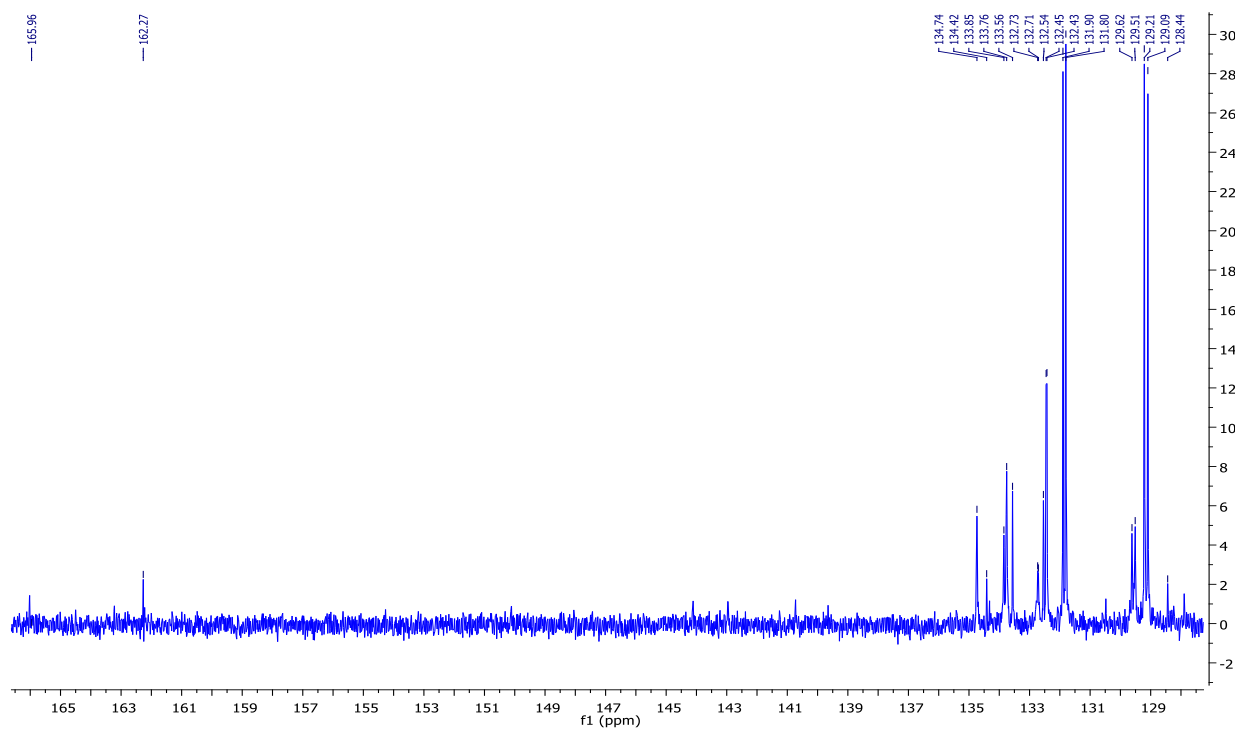
Slika P20. ^{13}C NMR spektar kompleksa **K1**, sniman u CDCl_3



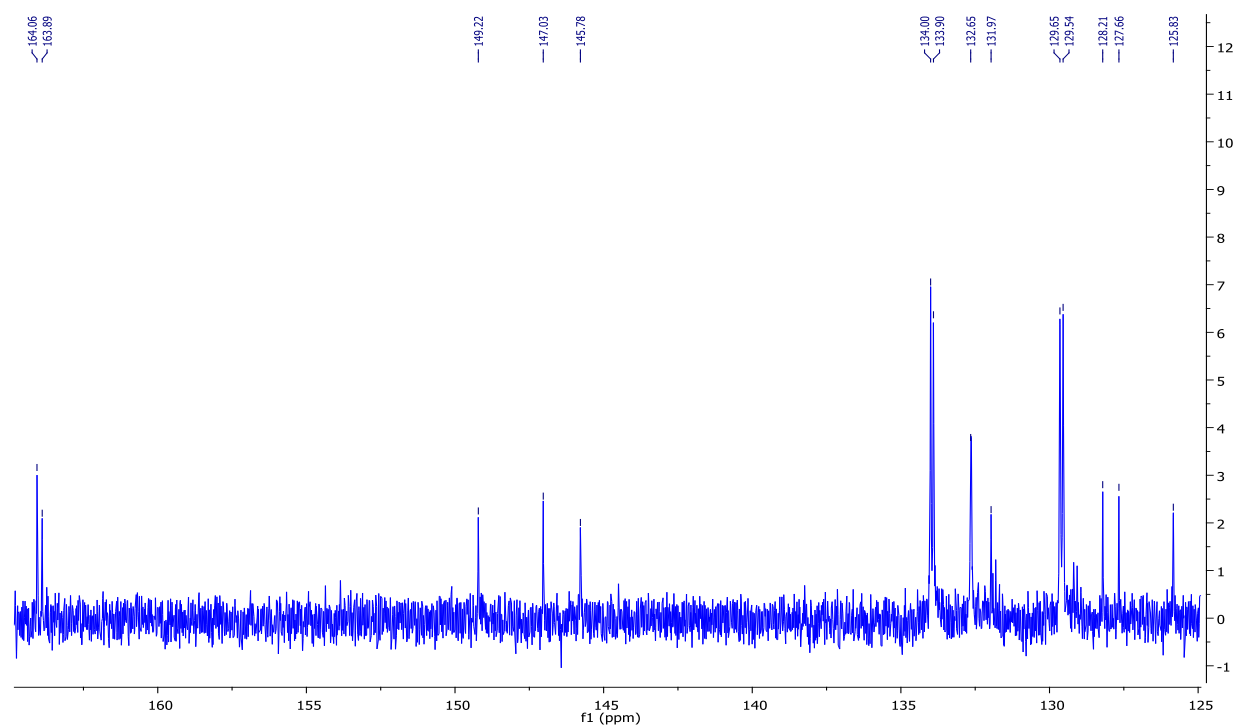
Slika P21. ^{13}C NMR spektar kompleksa **K2**, sniman u CDCl_3



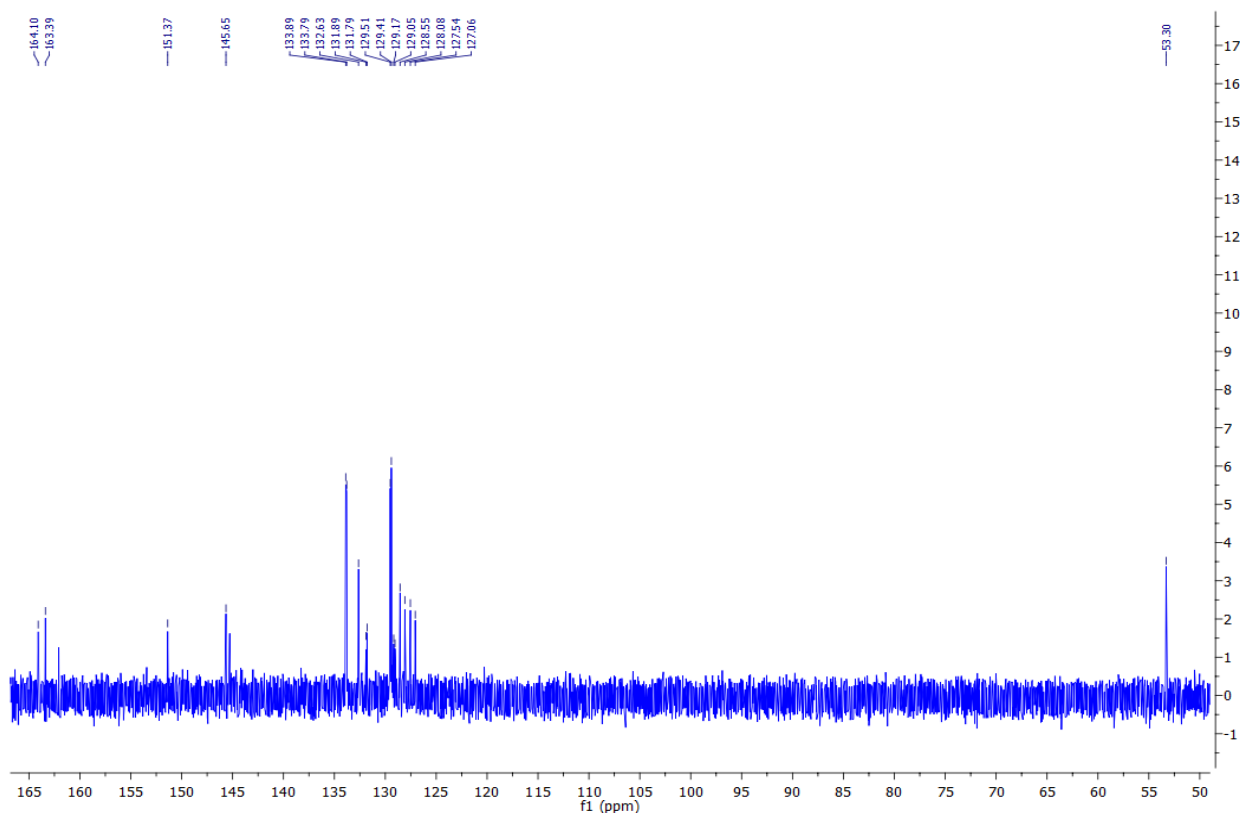
Slika P22. ^{13}C NMR spektar kompleksa **K3**, sniman u CDCl_3



Slika P23. ^{13}C NMR spektar kompleksa **K4**, sniman u DMSO



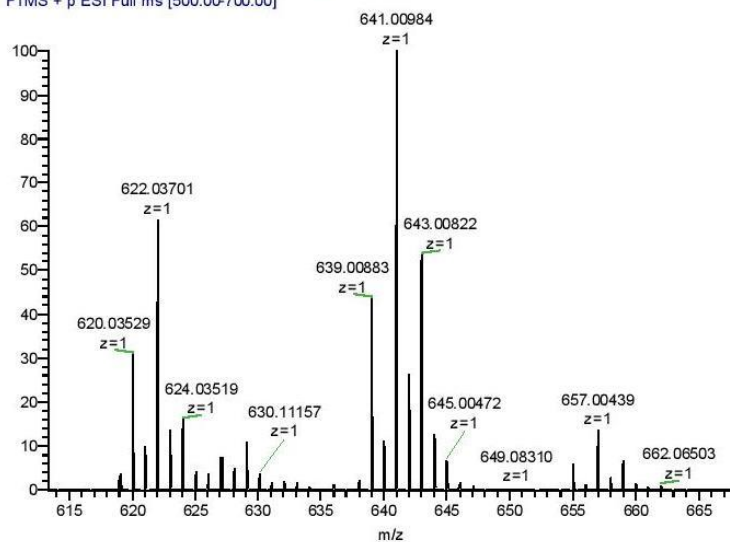
Slika P24. ^{13}C NMR spektar kompleksa **K5**, sniman u DMSO



Slika P25. ^{13}C NMR spektar kompleksa **K6**, sniman u DMSO

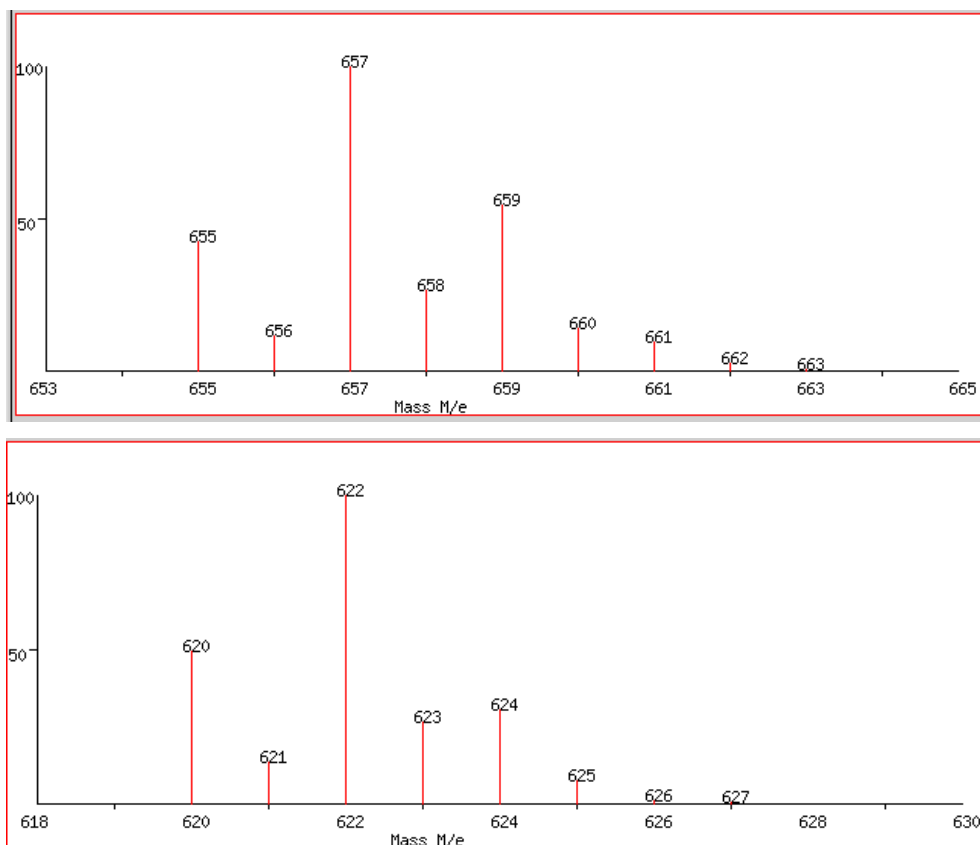
Zoomed spectra

OB7008 #1-22 RT: 0.01-0.50 AV: 22 NL: 2.58E5
T: FTMS + p ESI Full ms [500.00-700.00]



Exact mass	Observed mass	Observed ion type	Error (ppm)
657.00371	657.00439	$[\text{M}]^+$	1.04
622.03486	622.03701	$[\text{M-Cl}]^+$	3.46

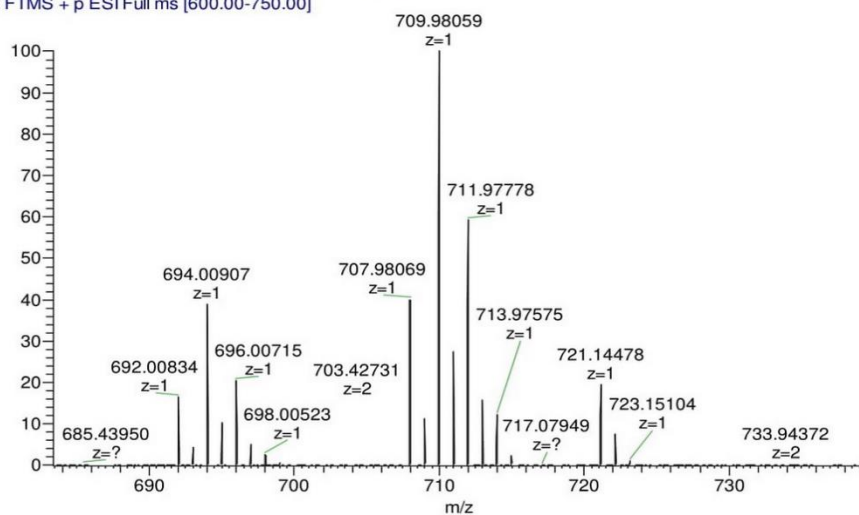
Slika P26. Maseni spektar kompleksa **K1** sniman u CH_3CN



Slika P27. Maseni spektar kompleksa **K1** dobijen predikcijom pomoću Isotope Distribution Calculator

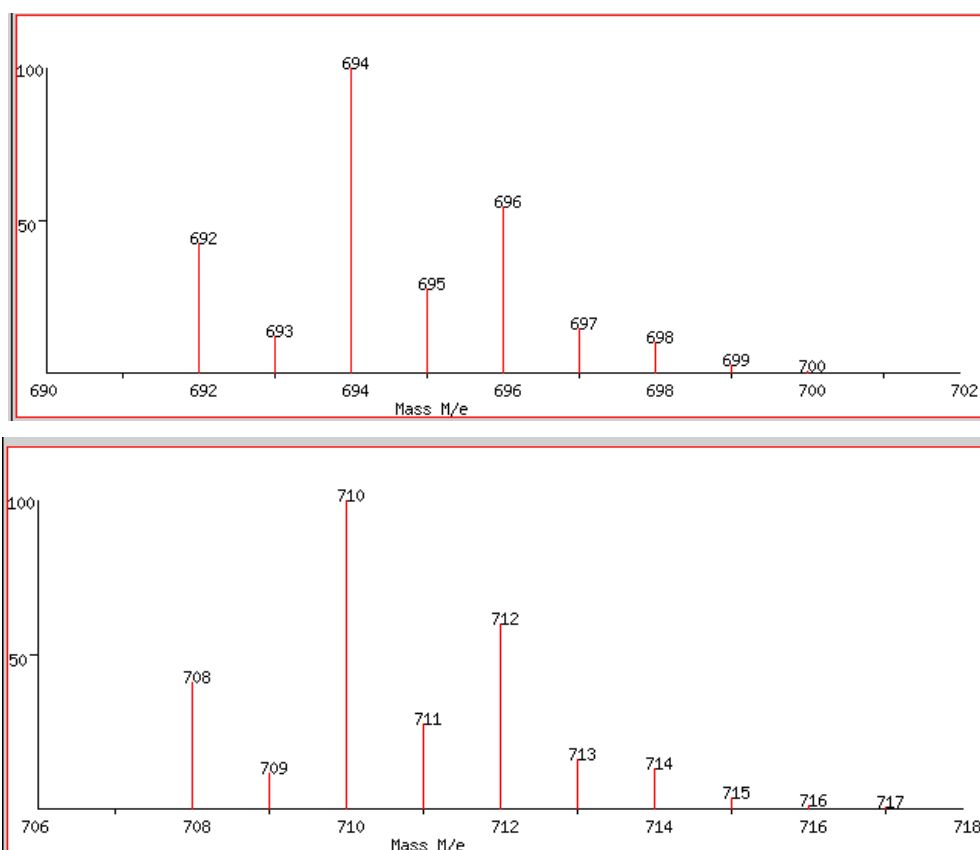
Zoomed spectra

OB7304 #1-27 RT: 0.00-0.50 AV: 27 NL: 1.56E6
T: FTMS + p ESI Full ms [600.00-750.00]



Exact mass	Observed mass	Observed ion type	Error (ppm)
694.00858	694.00907	[M+Na] ⁺	0.71
709.98252	709.98059	[M+K] ⁺	2.72

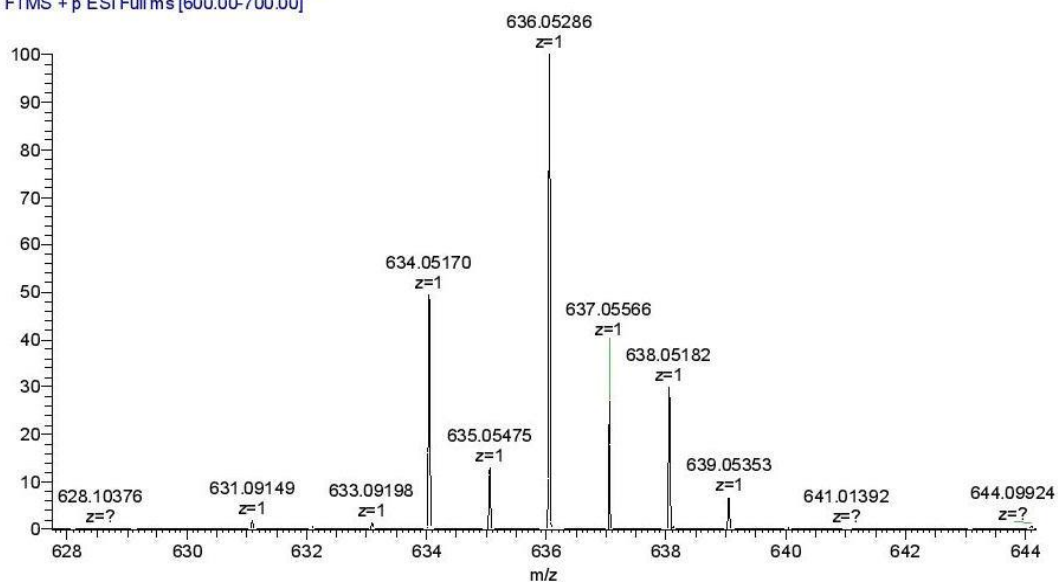
Slika P28. Maseni spektar kompleksa **K2** sniman u CH₃OH



Slika P29. Maseni spektar kompleksa **K2** dobijen predikcijom pomoću Isotope Distribution Calculator

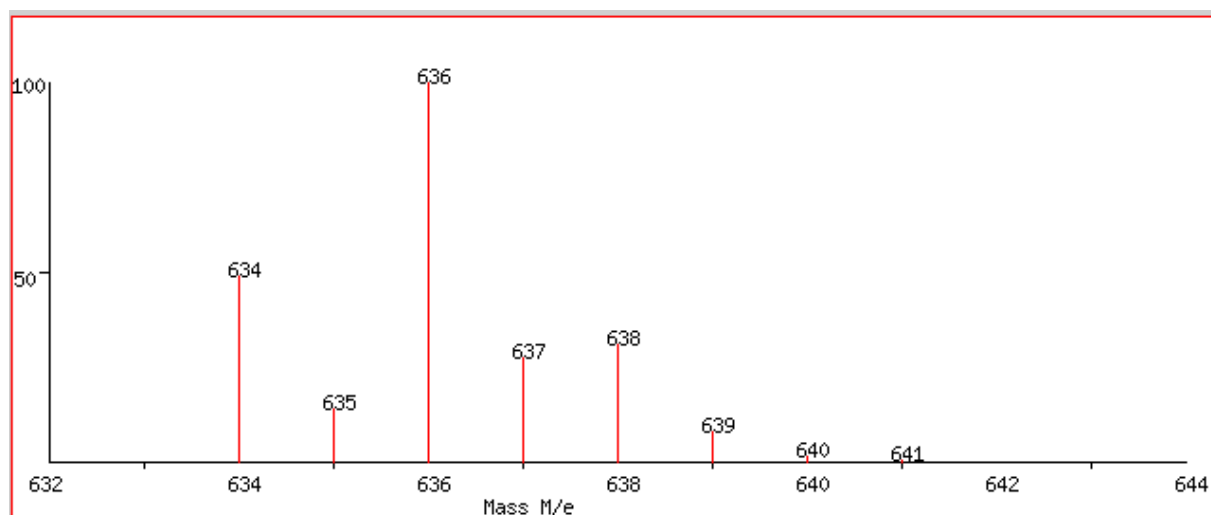
Zoomed spectra

OB7080 #10 RT: 0.23 AV: 1 NL: 4.45E5
T: FTMS + p ESI Full ms [600.00-700.00]



Exact mass	Observed mass	Observed ion type	Error (ppm)
636.05051	636.05286	$[C_{25}H_{21}RePO_3CIN]^+$	3.69

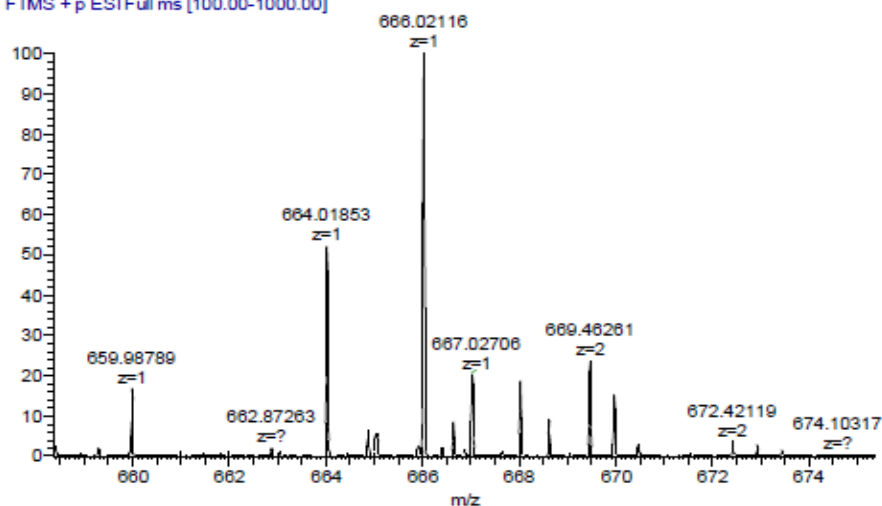
Slika P30. Maseni spektar kompleksa **K3** sniman u CH₃OH



Slika P31. Maseni spektar kompleksa **K3** dobijen predikcijom pomoću Isotope Distribution Calculator

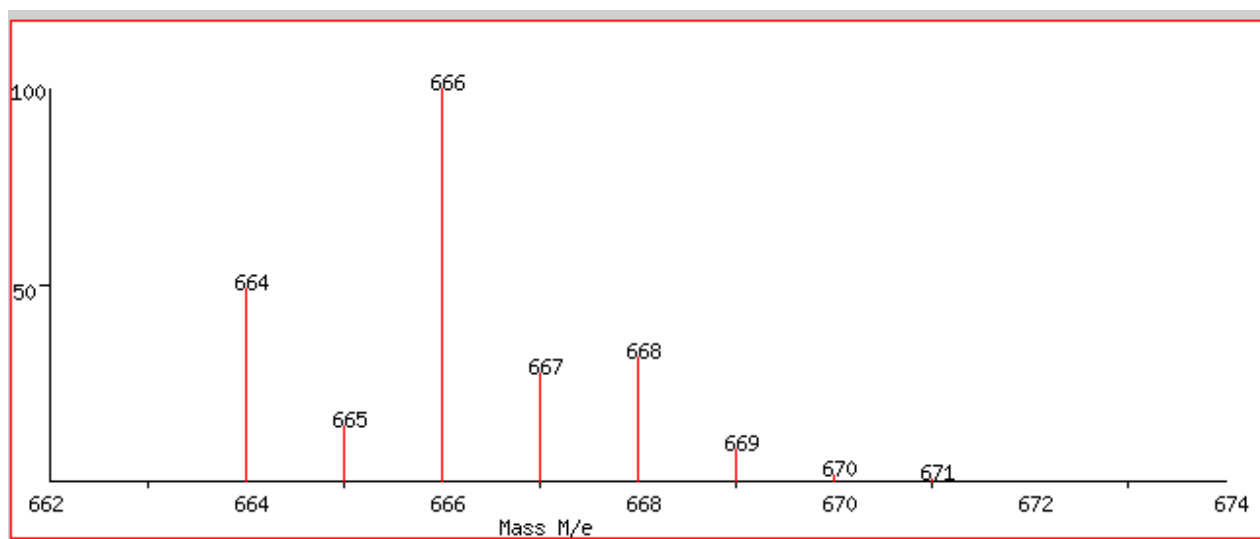
Zoomed spectra

OB7303 #1-53 RT: 0.00-0.50 AV: 53 NL: 1.93E4
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1000.00]



Exact mass	Observed mass	Observed ion type	Error (ppm)
666.02414	666.02116	$[M-Cl]^+$	4.47

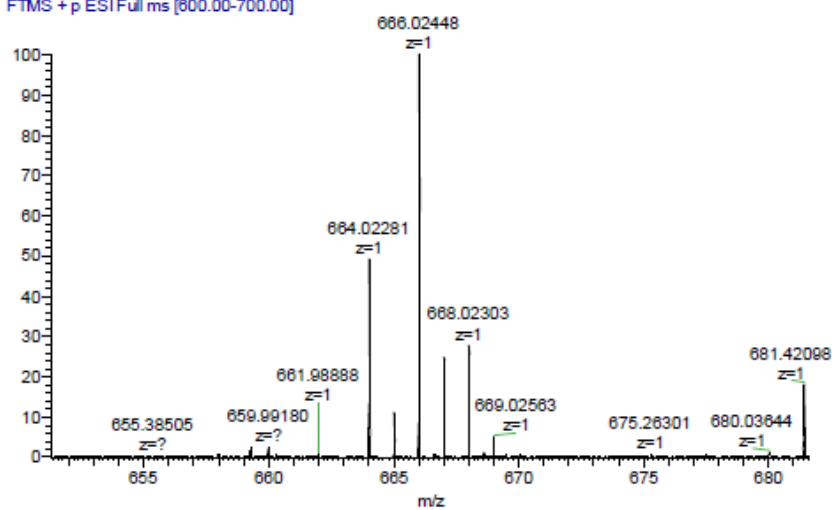
Slika P32. Maseni spektar kompleksa **K4** sniman u CH_3OH



Slika P33. Maseni spektar kompleksa **K4** dobijen predikcijom pomoću Isotope Distribution Calculator

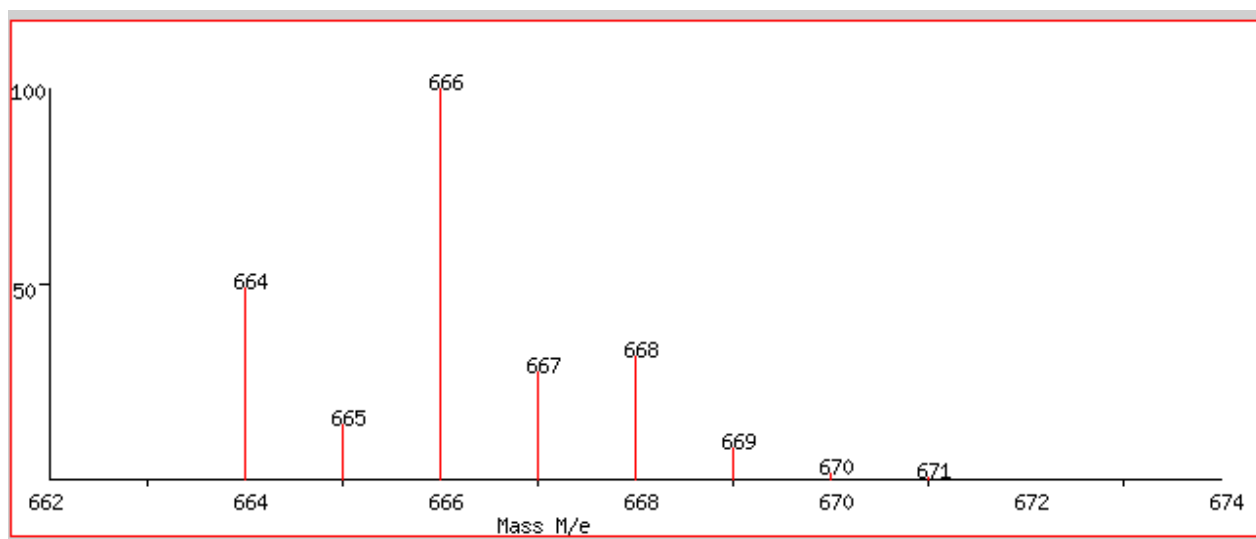
Zoomed spectra

OB7302 #1-24 RT: 0.01-0.50 AV: 24 NL: 2.00E5
T: FTMS + p ESI Full ms [600.00-700.00]

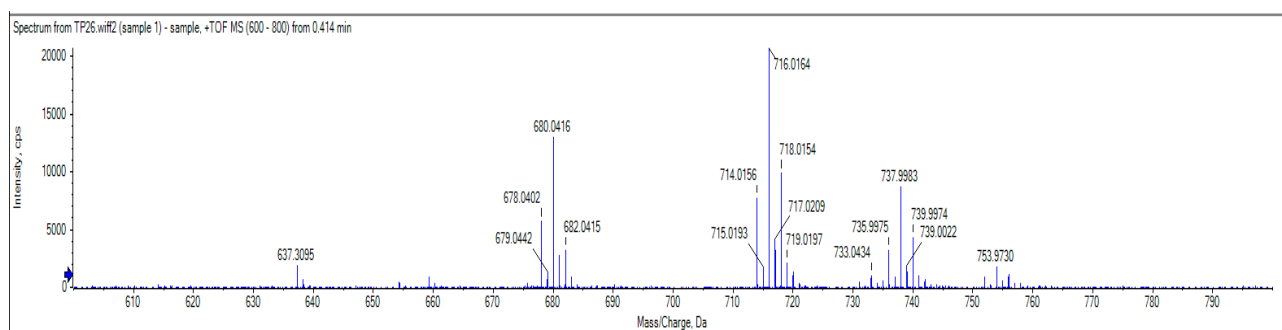


Exact mass	Observed mass	Observed ion type	Error (ppm)
666.02414	666.02448	$[M-Cl]^+$	0.51

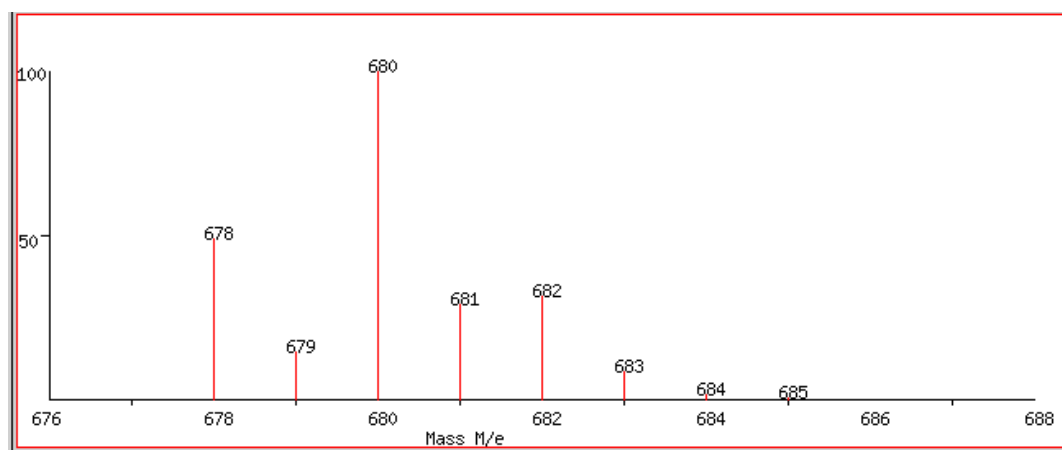
Slika P34. Maseni spektar kompleksa **K5** sniman u CH_3OH



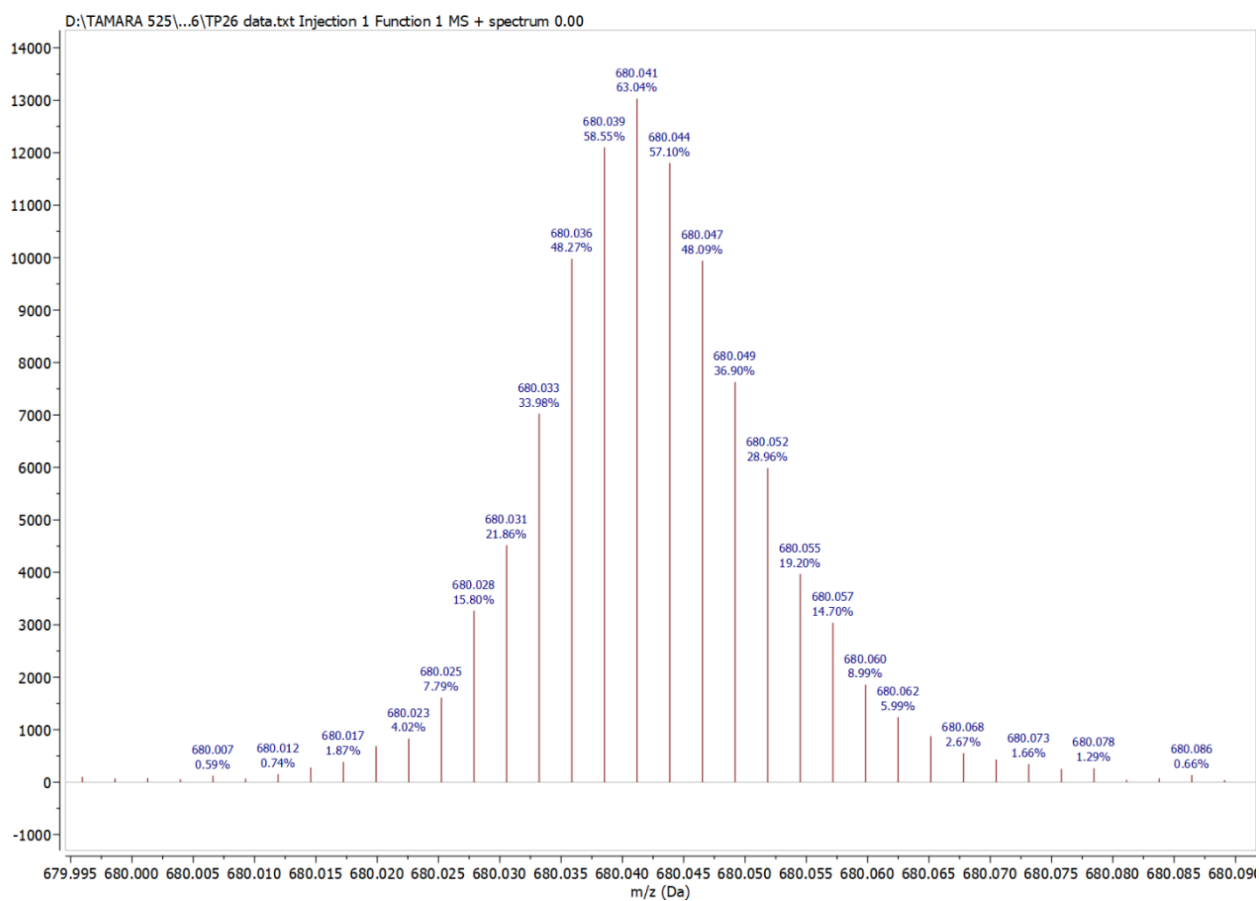
Slika P35. Maseni spektar kompleksa **K5** dobijen predikcijom pomoću Isotope Distribution Calculator



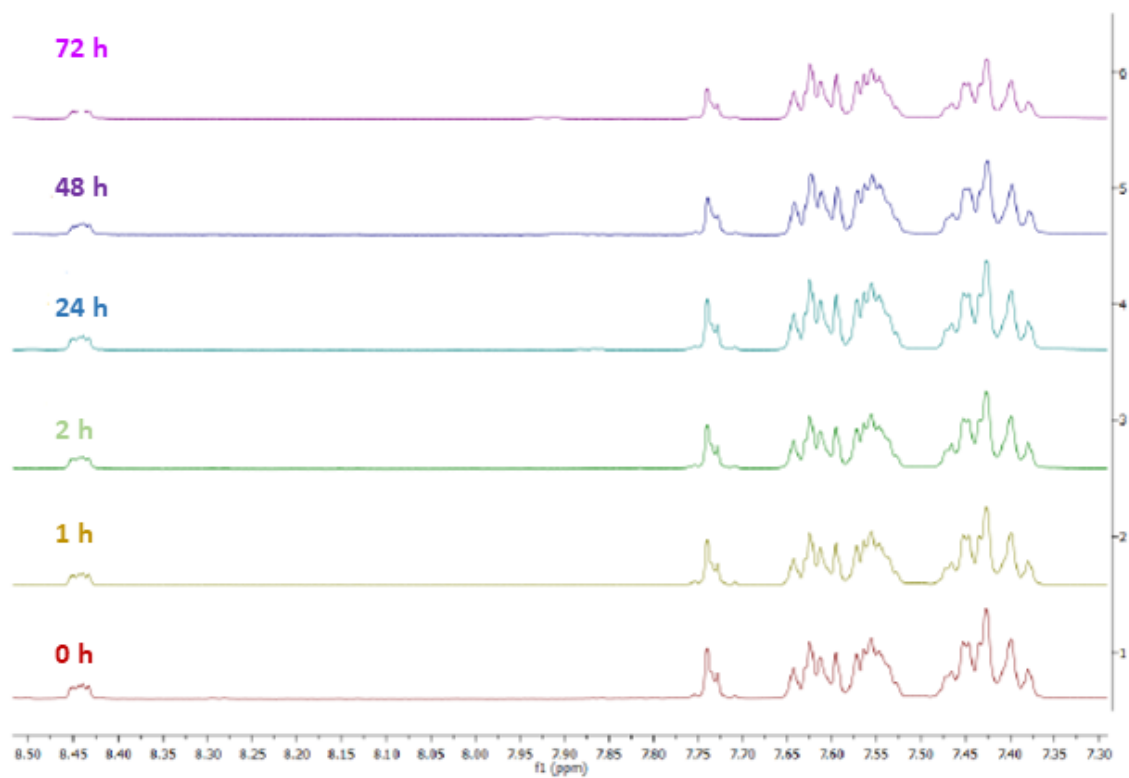
Slika P36. Maseni spektar kompleksa **K6** sniman u CH₃OH



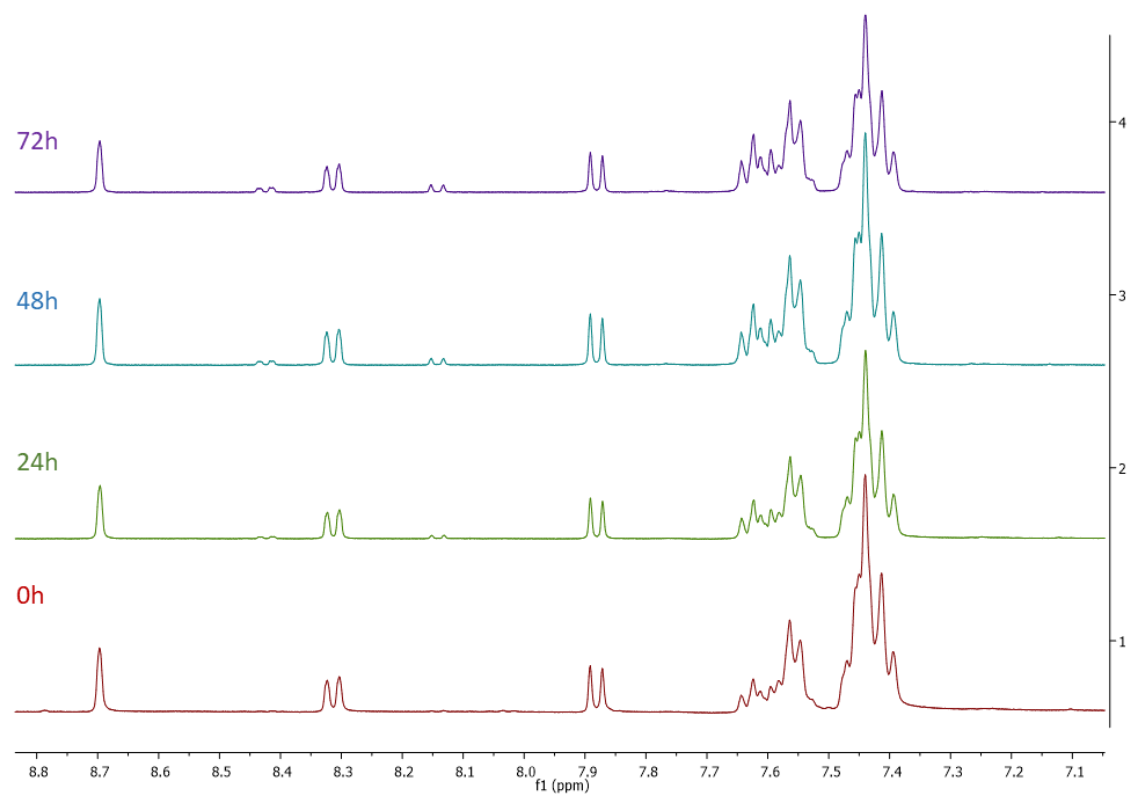
Slika P37. Maseni spektar kompleksa **K6** dobijen predikcijom pomoću Isotope Distribution Calculator



Slika P38. Maseni spektar visoke rezolucije kompleksa **K6** sniman u CH₃OH



Slika P39. ^1H NMR spektar stabilnosti kompleksa **K2** u DMSO u toku 72 h



Slika P40. ^1H NMR spektar stabilnosti kompleksa **K5** u DMSO u toku 72 h

BIOGRAFIJA

Tamara A. Petrović rođena 28. februara 1994. godine u Gornjem Milanovcu. Osnovne akademske studije Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta, studijski program Hemija upisala je 2013. godine. i završila ih 2018. godine sa prosečnom ocenom 8,51. Završni rad odbranila je pri Katedri za opštu i neorgansku hemiju pod mentorstvom dr Sanje Grgurić-Šipka, redovnog profesora i dr Aleksandra Savića, docenta, sa ocenom 10. Iste godine upisala je master akademske studije na Univerziteta u Beogradu - Hemijskom fakultetu, studijski program Hemija koje je završila 2019. godine sa prosečnom ocenom 10 i odbranila završni rad pod mentorstvom dr Sanje Grgurić-Šipka sa ocenom 10. Doktorske akademske studije Univerziteta u Beogradu – Hemijskog fakulteta, studijski program Hemija, je upisala 2019. Od oktobra 2021. do oktobra 2022. boravi na Univerzitetu Julius Maximilianis u Virzburgu, Nemačka, kao stipendista organizacije BAYHOST. Od decembra 2019. do kraja 2020. godine je bila zaposlena kao istraživač-pripravnik na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu na programu finansiranom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, (evidencioni broj 451-03-68/2022-14/200168). Tokom 2020/21. godine Tamara A. Petrović je bila učesnik projekta „Vlažne maramice za bebe pionirska inovacija: koncept održivosti za kožu i životnu sredinu”, projekat Dokaz koncepta Zapadnog Balkana (IPA/2019/412-593) koji finansira Evropska unija u okviru višedržavnog IPA programa za 2018. U toku 2021/22. godine bila je učesnik je projekta „Preparation of the new innovative non-toxic product for destruction virus COVID-19”- međunarodni projekat finansiran od strane Francuske vlade u sklopu poziva za projekte: Projets AUF-COVID-19.2, vezan za istraživanje na polju virusa COVID 19. Od septembra 2022. godine zaposlena je kao istraživač-saradnik u okviru programa finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od februara do avgusta 2024. godine bila je na studijskom boravku na Univerzitetu u Hong Kongu u naučnoj grupi prof. dr Marije Babak.

Objavljeni naučni radovi koji su direktno proistekli iz teze:

M21 – Radovi objavljeni u vrhunskim međunarodnim časopisima

1. **T. Petrović**, N. Gligorijević, F. Belaj, S. Arandžević, Lj. E. Mihajlović-Lalić, S. Grgurić-Šipka, J. Poljarević, J. Inorg. Biochem. (2022), 231, 111807, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.111807>
2. **T. Petrović**, N. Gligorijević, V. Medaković, D. Veljković, S. Arandžević, S. Grgurić - Šipka, J. Poljarević, Appl. Organomet. Chem. (2024), 38(9), e7623, <https://doi.org/10.1002/aoc.7623>

M34 – Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu

T. Petrović, N. Gligorijević, F. Belaj, S. Grgurić-Šipka, S. Nikolić, M. Krstić, J. Poljarević, Lj. E. Mihajlović-Lalić, Oxorhenium(V) complexes in the drug combination study, Österreichische Chemietage, September 20 - 22, 2022, Vienna, Austria, Book of abstracts, p. 90.

T. Petrović, N. Gligorijević, F. Belaj, J. Poljarević, Lj. E. Mihajlović-Lalić, S. Arandžević, S. Nikolić, S. Grgurić-Šipka, Oxorhenium(V) complexes with N,O ligands - synthesis and biological studies, 16th ISABC, June 11 – 14, Ioannina, Greece, Book of abstracts, p. 241.

S. Arandžević, N. Gligorijević, G. Rakić, I. Ćirić, **T. Petrović**, J. Poljarević, S. Grgurić-Šipka Comparison of the antiproliferative activity of Platinum, Ruthenium, and Rhenium Complexes with Pyridine Derivatives , EuroBIC-17, August 25 – 29, Münster, Germany, Book of abstracts, p. 34.

M64 – Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu

T. Petrović, N. Gligorijević, F. Belaj, S. Grgurić-Šipka, S. Nikolić, M. Krstić, J. Poljarević, Lj. E. Mihajlović-Lalić, Oxorhenium(V) complexes in the drug combination study, 8th Conference of Young Chemists of Serbia, Belgrade, 29th October 2022, Book of abstracts, p. 81.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Тамара А. Петровић

број индекса ДХ03/2019

Изјављујем

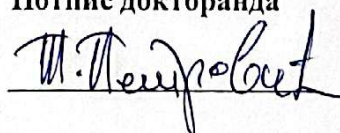
да је докторска дисертација под насловом

Синтеза, карактеризација и цитотоксична активност комплекса ренијума(V) са N,O-
лигандима

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду,
13.05.2025.

Потпис докторанда



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Тамара А. Петровић

Број индекса ДХ03/2019

Студијски програм Хемија

Наслов рада Синтеза, карактеризација и цитотоксична активност комплекса ренијума(V) са N,O-лигандима

Ментор др Јелена Пољаревић

Потписана Тамара А. Петровић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду,
13.05.2025.

Потпис докторанда



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Синтеза, карактеризација и цитотоксична активност комплекса ренијума(V) са N,O-
лигандима

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

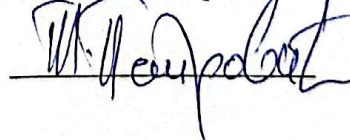
1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду,

13. 05. 2025.

Потпис докторанда



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.