



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

Марина Ж. Мијајловић

**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И ПОТЕНЦИЈАЛНА**  
**БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА**  
**ПАЛАДИЈУМА(II) И ПЛАТИНЕ(IV) СА S-АЛКИЛ**  
**ДЕРИВАТИМА ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2016. године

## Садржај

<b>1. УВОД</b> .....	5
1.1. Тиосалицилна киселина и њени деривати.....	6
1.2. Структурне карактеристике комплекса паладијума(II) са тиосалицилном киселином и другим мешовитим лигандима.....	11
1.3. Структурне карактеристике комплекса платине(II) и платине(IV) са тиосалицилном киселином и другим мешовитим лигандима.....	14
1.4. Биолошка активност комплекса неких прелазних метала.....	20
1.4.1. Антитуморска активност комплекса платине(II).....	20
1.4.2. Механизам дејства комплекса платине(II).....	22
1.4.3. Антитуморска активност комплекса паладијума(II).....	26
1.4.4. Антитуморска активност комплекса платине(IV).....	30
1.4.5. Отпорност микроорганизама, механизам деловања антимикробних лекова.....	34
1.4.6. Формирање биофилма.....	36
1.4.7. Антимикробна активност комплекса платине(IV).....	37
1.4.8. Антибиофилм активност комплекса платине(IV).....	39
<b>2. ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА</b> .....	40
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	42
3.1. Синтезе лиганда.....	43
3.1.1. Синтезе S-алкил деривата тиосалицилне киселине.....	43
3.2. Синтезе комплекса.....	44
3.2.1. Синтеза комплекса паладијума(II).....	44
3.2.1.1. Синтеза комплекса паладијума(II) са S-бензил дериватом тиосалицилне киселине, [Pd(S-bz-thiosal) <sub>2</sub> ].....	44
3.2.1.2. Синтеза комплекса паладијума(II) са S-метил дериватом тиосалицилне киселине, [Pd(S-met-thiosal) <sub>2</sub> ].....	45
3.2.1.3. Синтеза комплекса паладијума(II) са S-етил дериватом тиосалицилне киселине, [Pd(S-et-thiosal) <sub>2</sub> ].....	45
3.2.1.4. Синтеза комплекса паладијума(II) са S-пропил дериватом тиосалицилне киселине, [Pd(S-pr-thiosal) <sub>2</sub> ].....	46
3.2.1.5. Синтеза комплекса паладијума(II) са S-бутил дериватом тиосалицилне киселине, [Pd(S-bu-thiosal) <sub>2</sub> ].....	46

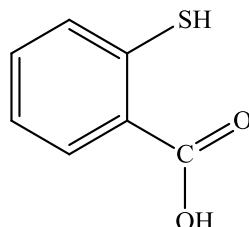
3.2.2. Синтезе комплекса платине(IV).....	47
3.2.2.1. Синтеза комплекса платине(IV) са S-бензил дериватом тиосалицилне киселине, [PtCl <sub>2</sub> (S-bz-thiosal) <sub>2</sub> ].....	47
3.2.2.2. Синтеза комплекса платине(IV) са S-метил дериватом тиосалицилне киселине, [PtCl <sub>2</sub> (S-met-thiosal) <sub>2</sub> ].....	47
3.2.2.3. Синтеза комплекса платине(IV) са S-етил дериватом тиосалицилне киселине, [PtCl <sub>2</sub> (S-et-thiosal) <sub>2</sub> ].....	48
3.2.2.4. Синтеза комплекса платине(IV) са S-пропил дериватом тиосалицилне киселине, [PtCl <sub>2</sub> (S-pr-thiosal) <sub>2</sub> ].....	48
3.2.2.5. Синтеза комплекса платине(IV) са S-бутил дериватом тиосалицилне киселине, [PtCl <sub>2</sub> (S-bu-thiosal) <sub>2</sub> ].....	49
<b>3.3. Мерења.....</b>	<b>50</b>
3.3.1. Елементална микроанализа.....	50
3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија.....	50
3.3.3. <sup>1</sup> H и <sup>13</sup> C нуклеарно-магнетно-резонанциона спектроскопија.....	50
3.3.4. Рендгенска структурна анализа.....	51
3.3.4.1. Рендгенска структурна анализа S-бутил деривата тиосалицилне киселине.....	51
3.3.4.2. Рендгенска структурна анализа [Pd(S-bu-thiosal) <sub>2</sub> ], bis(S-бутил-тиосалицилато)паладијум(II)-комплекса.....	52
<b>3.4. Биолошка мерења.....</b>	<b>53</b>
3.4.1. <i>In vitro</i> антитуморска активност.....	53
3.4.1.1. Испитиване ћелијске линије.....	53
3.4.1.2. МТТ колориметријски тест.....	54
3.4.2. <i>In vitro</i> антимицробна активност.....	55
3.4.2.1. Тестирани микроорганизми.....	55
3.4.2.2. Микродилуциона метода.....	57
3.4.3. <i>In vitro</i> антибиофилм активност.....	58
3.4.3.1. Тестирани микроорганизми.....	58
3.4.3.2. <i>Tissue culture plate</i> (TCP) тест.....	59
<b>4. РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>60</b>
4.1. Синтеза и карактеризација S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II).....	61
4.1.1. Синтеза лиганата и комплекса.....	61

4.1.2. Елементалне микроанализе комплекса паладијума(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине.....	62
4.1.3. Инфрацрвени спектри S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II).....	63
4.1.4. Нуклеарно-магнетно-резонанциони ( $^1\text{H}$ и $^{13}\text{C}$ ) спектри S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II).....	64
4.1.5. Кристална структура S-бутил деривата тиосалицилне киселине.....	65
4.1.6. Кристална структура <i>bis</i> (S-бутил-тиосалицилато)паладијум(II)-комплекса, $[\text{Pd}(\text{S-bu-thiosal})_2]$ .....	67
4.2. Биолошка активност комплекса паладијума(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине.....	69
4.2.1. <i>In vitro</i> антитуморска активност.....	69
4.3. Синтеза и карактеризација комплекса платине(IV) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине.....	75
4.3.1. Синтезе комплекса.....	75
4.3.2. Елементалне микроанализе комплекса платине(IV) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине.....	76
4.3.3. Инфрацрвени спектри комплекса платине(IV) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине.....	77
4.3.4. Нуклеарно-магнетно-резонанциони ( $^1\text{H}$ и $^{13}\text{C}$ ) спектри комплекса платине(IV) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине.....	78
4.4. Биолошка активност комплекса платине(IV) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине.....	79
4.4.1. <i>In vitro</i> антитуморска активност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса платине(IV).....	79
4.4.2. <i>In vitro</i> антимикуробна активност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса платине(IV).....	81
4.4.3. <i>In vitro</i> антибиофилм активност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса платине(IV).....	85
<b>5. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>86</b>
<b>6. ЗАКЉУЧАК.....</b>	<b>95</b>
<b>7. ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>97</b>

# **1. Увод**

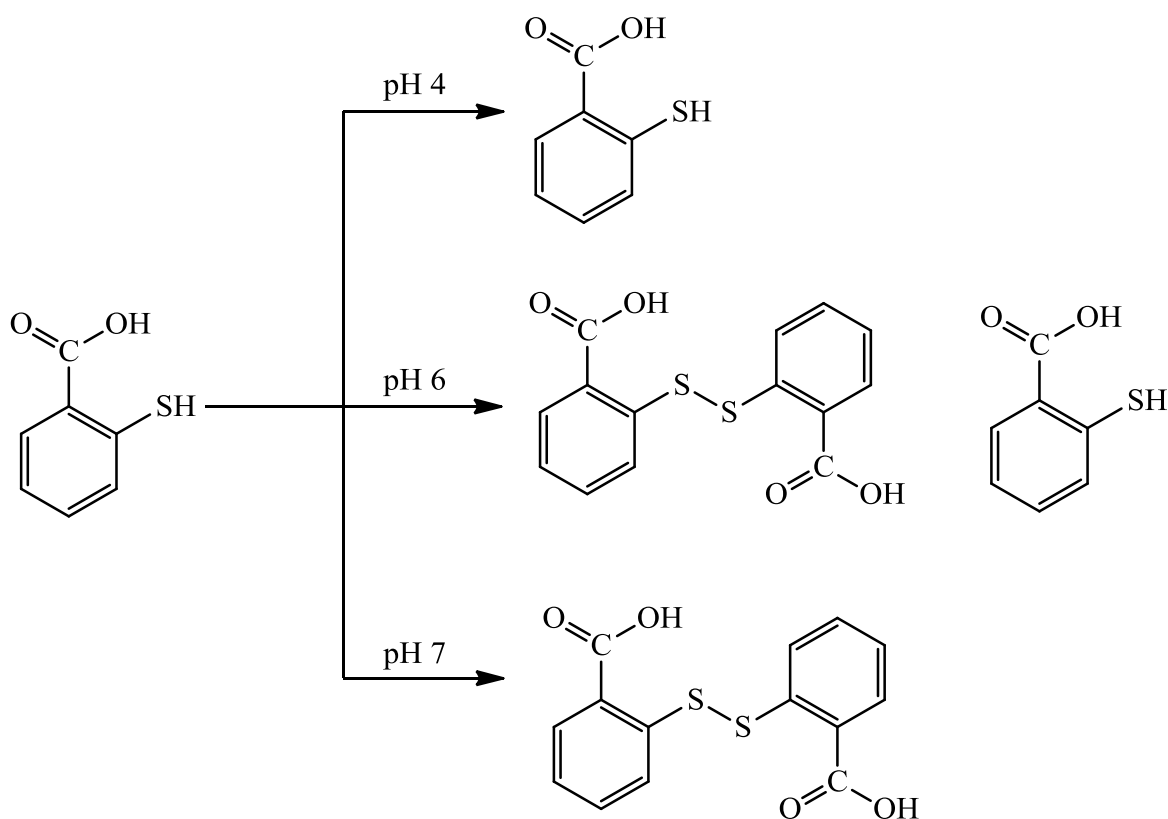
## 1.1. ТИОСАЛИЦИЛНА КИСЕЛИНА И ЊЕНИ ДЕРИВАТИ

Тиосалицилна киселина (Слика 1) је бела чврста супстанца, растворљива у етру, ацетону и кључалој води, позната још и по називу 2-меркаптобензоева киселина или *o*-меркаптобензоева киселина. Представља двопротонску киселину са рКа вредностима 4,92 и 9,96 [1].



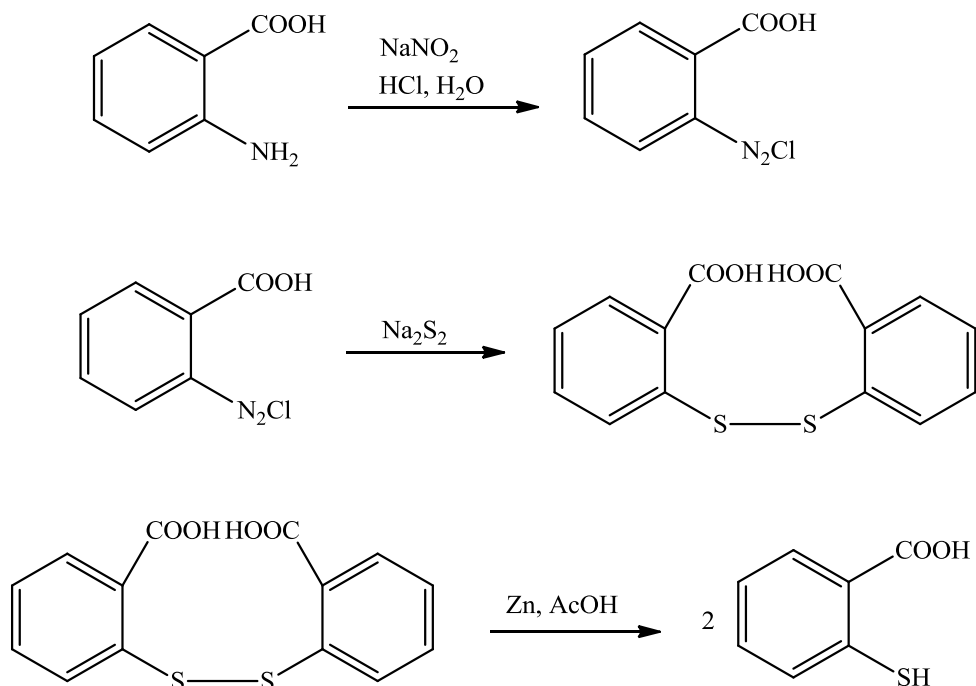
Слика 1. Тиосалицилна киселина

У киселим условима (рН 4) ова киселина је стабилна и непромењена, али приликом повећања рН вредности јавља се могућност формирања дисулфидних веза тако да при рН 7 не постоји у самосталном облику већ само у облику дисулфида (Слика 2) [2].



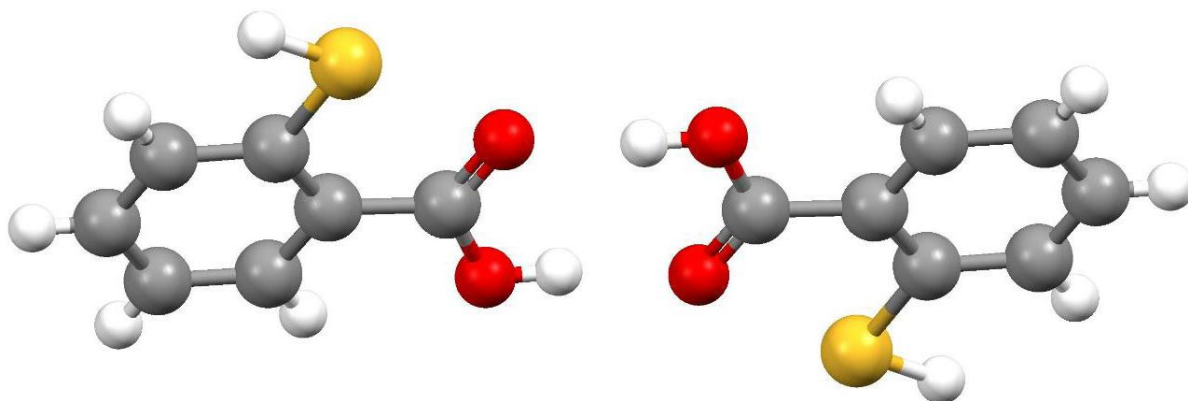
Слика 2. Понашање тиосалицилне киселине при различитим рН вредностима

Тиосалицилна киселина је одређена реакцијом фотохемијске размене, коришћењем натријум-нитропрусида као спектроскопског стандарда [3], док се поступак синтезе ове киселине може срести у раду Алена и сарадника (Шема 1) [4].



Шема 1. Поступак синтезе тиосалицилне киселине

Рендгенском структурном анализом је утврђена кристална структура тиосалицилне киселине (Слика 3), а због постојања карбоксилних група и могућности стварања водоничних веза јављају се димерни облици [5].

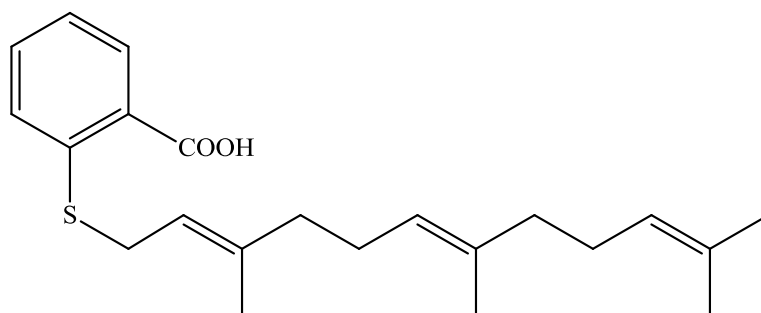


Слика 3. Кристална структура тиосалицилне киселине

Тиосалицилна киселина и њени деривати имају разноврсну примену. Користе се као реагенси за одређивање метала [6,7], модификатори графитних електрода [8] и као фотоиницијатори за слободно-радикалске полимеризације [9].

Поред наведених, ова једињења имају примену и у козметичке сврхе и то као инхибитори раста косе. Наиме једињења са активним сулфхидрилним групама апликована локално продиру у фоликул длаке и доводе до формирања дисулфидних веза са слободним цистеином. На тај начин резултују смањење уградње цистеина у комплекс са протеинима косе и доводе до инхибиције њеног раста [10]. Користе се и при лечењу разних специфичних запаљенских и алергијских процеса респираторног низа као и за инхибицију раста туморских ћелија [11].

Способност фарнезилтиосалицилне киселине (Слика 4) да блокира раст ћелија меланома примећена је на хуманим ћелијским линијама А375, Bel-1 и Colo 853 као и на В16 ћелијској линији мишијег меланома. Своје деловање може да испољи и тако што инхибира RAS (Rat sarcoma proteins) зависне сигналне путеве чиме долази до уклањања RAS протеина са ћелијске мембране а потом долази до протеолитичке деградације. Сматра се да је абнормална активација RAS-зависних сигналних путева присутна код око једне трећине хуманих карцинома панкреаса, дебелог црева и плућа. Истраживања су показала да ово једињење такође може да супримира развој атеросклеротског плака код мишева дефицитарних аполипопротеином Е [12-16].

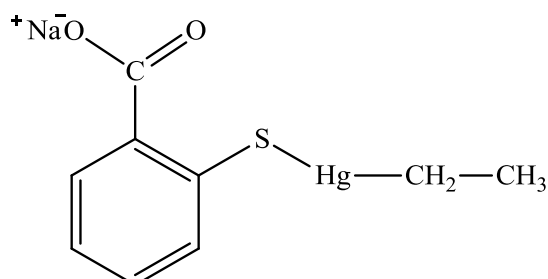


Слика 4. Фарнезилтиосалицилна киселина

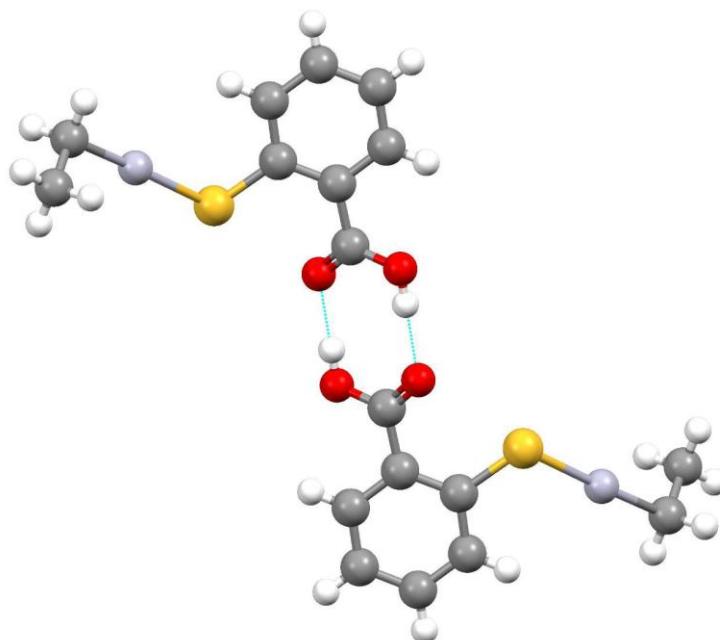
Дериват тиосалицилне киселине који има широку примену у фармацеутској индустрији је тимеросал (натријум-етилмеркури-тиосалицилат) (Слика 5). Тимеросал (Слика 6) је хемијски конзерванс, користи се у вакцинама и лековима како би спречио њихову контаминацију. Асади и сарадници су у својој студији утврдили да тиосалицилат може повољно утицати тако што испољава инхибиторно дејство на ослобађање васкуларног ендотелијалног фактора раста, па се стога може користити у



превенцији токсичности узроковане жива(II)-хлоридом у вакцинама и другим формулацијама [17]. Тимеросал такође повећава концентрацију јона калцијума вршећи тиме активацију фосфолипазе A<sub>2</sub>, ензима који од фосфолипида ћелијске мембране ствара арахидонску киселину [18].

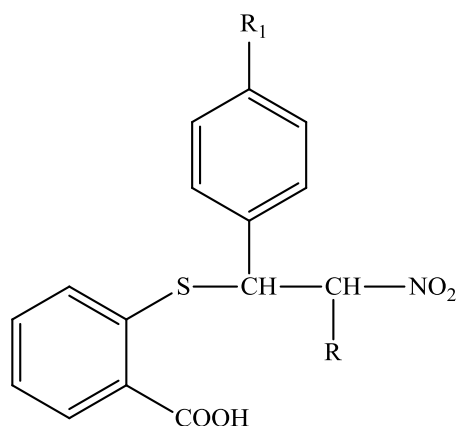


Слика 5. Структура тимеросала



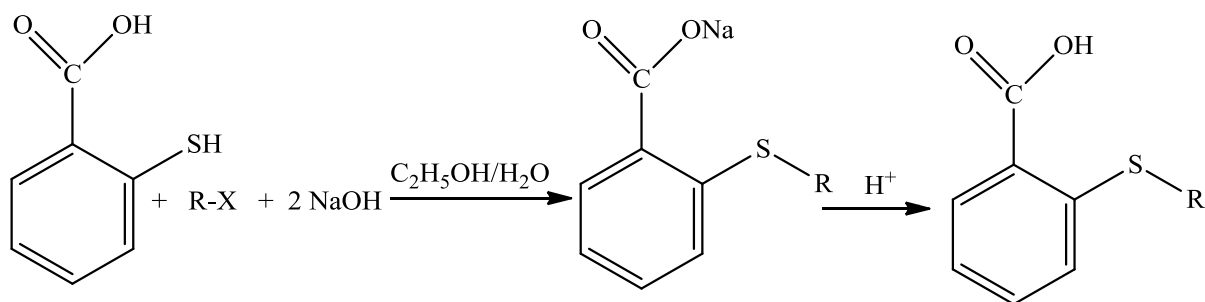
Слика 6. Кристална структура тимеросала  
(формирање димера грађењем водоничних веза)

Поред наведених деривата тиосалицилне киселине синтетисани су и нитро-фенил-алкил деривати. Забележена је значајна антибактеријска активност деривата 2-[(2-нитро-1-фенил-етил)тио]бензојеве киселине (Слика 7) према *Staphylococcus aureus*-у, док је антифунгална активност овог деривата премашила активност кетоконазола као референтног једињења [19].



Слика 7. Дериват 2-[(2-нитро-1-фенил-алкил)тио]бензоеве киселине

S-алкил деривати тиосалицилне киселине (алкил = бензил-, метил-, етил-, пропил- и бутил-) се могу синтетисати на основу претходно описаног поступка [20-22] чију шему добијања можемо срести у раду Смита и сарадника, а може се приказати на следећи начин (Шема 2).



(R = бензил-, метил-, етил-, пропил-, бутил-)

Шема 2. Метода синтезе S-алкил деривата тиосалицилне киселине

## 1.2. СТРУКТУРНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) СА ТИОСАЛИЦИЛНОМ КИСЕЛИНОМ И ДРУГИМ МЕШОВИТИМ ЛИГАНДИМА

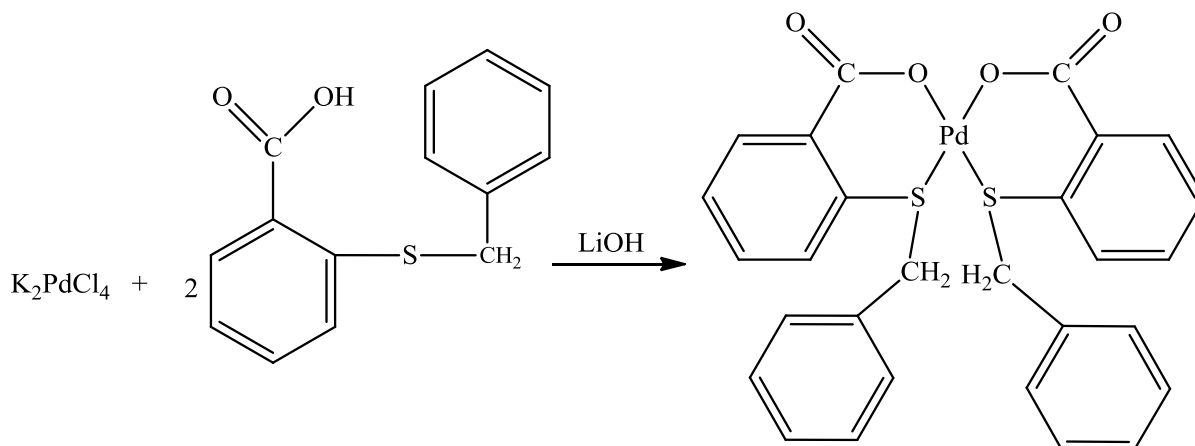
Као и јони осталих прелазних метала и јон паладијума(II) гради комплексна једињења. Комплекси платине и паладијума поседују велику примену у медицини и индустрији. Због тога се ова једињења интензивно изучавају већ дужи низ година. Платина се у комплексима јавља у оксидационим стањима +2 и +4, док се паладијум најчешће јавља у оксидационом стању +2. Ретко се јавља у оксидационом стању +4, јер су једињења са овим оксидационим стањем паладијума врло нестабилна. Хемијске особине платине(II) и паладијума(II) су јако сличне, првенствено због њихове  $d^8$  електронске конфигурације. Због тога они граде и слична комплексна једињења. Комплекси паладијума(II) су квадратно-планарне структуре и дијамагнетични су. Такође поседују као и комплекси платине(II) исту  $dsp^2$  хибридизацију [23,24].

За разлику од веома инертних комплекса платине, комплекси паладијума су знатно реактивнији и реагују скоро  $10^5$  пута брже. Паладијум спада у групу меких Луисових киселина. Има врло изражену тежњу да гради стабилне комплексе са меким Луисовим базама, као што су лиганди са сумпором као доворским атомом [24].

Тиолато лиганди ( $RS^-$ ) због сумпора као доворског атома показују велики афинитет везивања за меке Луисове киселине (јоне метала као што су платина(II) и паладијум(II)), тако да постоји велики број комплекса који су синтетисани управо са лигандима овог типа [25-27]. Стога је и тиосалицилна киселина предмет изучавања, јер је са својим доворским атомима (кисеоник и сумпор) јако погодан бидентатни лиганд за координовање са прелазним металима [28]. Луис и сарадници су у свом раду описали синтезу и карактеризацију нових комплекса платине(II), паладијума(II) и никла(II) који садрже тиосалицилну киселину као лиганд. Структуре ових комплекса су потврђене рендгенском структурном анализом и у складу су са литературним подацима [28,29].

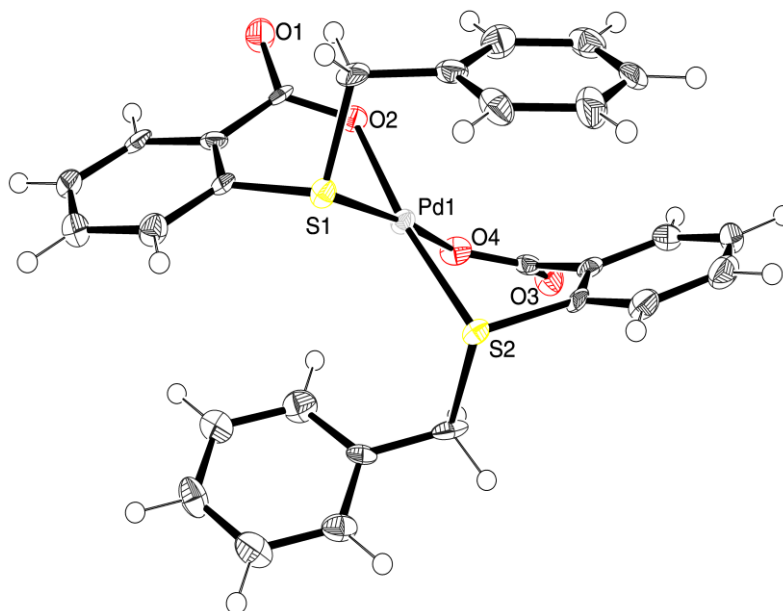
Радић и сарадници су приказали синтезу серије комплекса паладијум(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине. Потврђена је рендгенска структурна анализа комплекса паладијума(II) са S-бензил дериватом тиосалицилне киселине. Овај комплекс је добијен директном реакцијом калијум-тетрахлоридопаладата(II) и

S-бензил деривата тиосалицилне киселине у молском односу 1:2 и уз додатак воденог раствора литијум-хидроксида (Шема 3) [30].



**Шема 3.** Синтеза комплекса паладијума(II) са S-бензил-дериватом тиосалицилне киселине [ $Pd(S\text{-bz-thiosal})_2$ ]

Рендгенска структурна анализа комплекса [ $Pd(S\text{-bz-thiosal})_2$ ], потврђује квадратно-планарну геометрију комплекса као што је приказано на Слици 8.

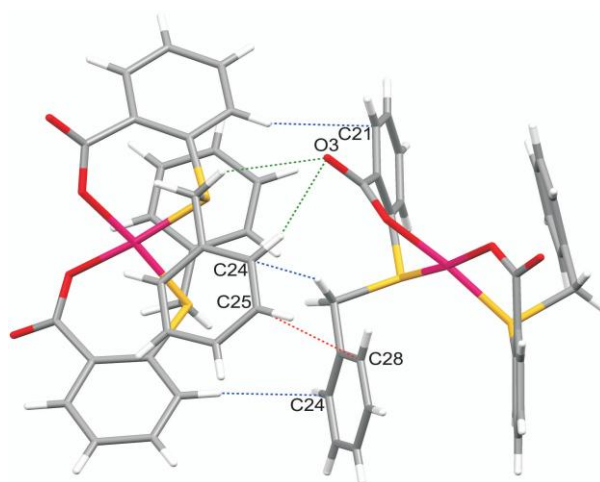


**Слика 8.** Кристална структура комплекса [ $Pd(S\text{-bz-thiosal})_2$ ]

Као што се са Сlike 8 може видети два молекула S-бензил деривата тиосалицилне киселине координована су бидентатно за јон паладијума(II) преко

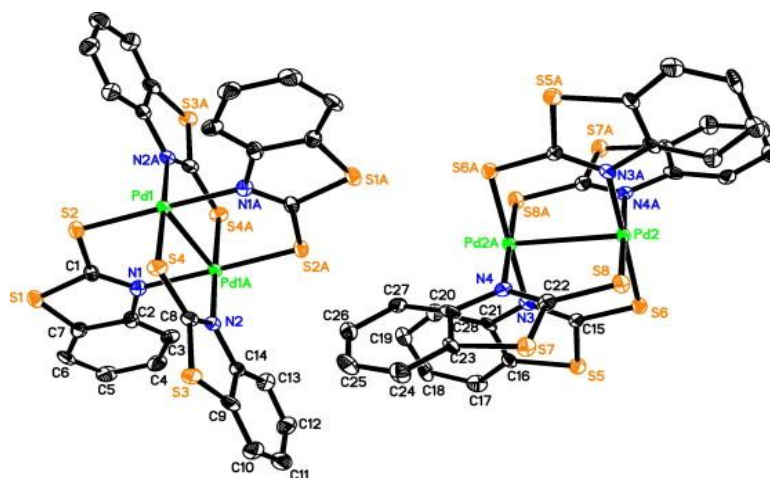
донорских атома сумпора и кисеоника. Резултати рендгенске структурне анализе указује да они поседују *cis-S-cis-O* геометрију.

Шесточлани прстенови укључујући јон паладијума(II) заузимају полустоличасту конформацију. Такође, бензил и фенил групе нису паралелно оријентисане што условљава да молекул у целини није симетричан. Просторна оријентација бензил група није идентична, што се може закључити на основу вредности диедарских углова. Рендгенска структурна анализа такође указује на слабе  $C-H \cdots O$  интеракције и три  $C-H \cdots \pi$  интеракције (Слика 9).



Слика 9. Два молекула комплекса  $[Pd(S\text{-}bz\text{-}thiosal)_2]$  са интермолекулским интеракцијама

Поред наведеног комплекса рендгенском структурном анализом је потврђена и структура бинуклеарног комплекса паладијума(II) са лигандима који садрже азот и кисеоник као донорске атоме (Слика 10) [31].



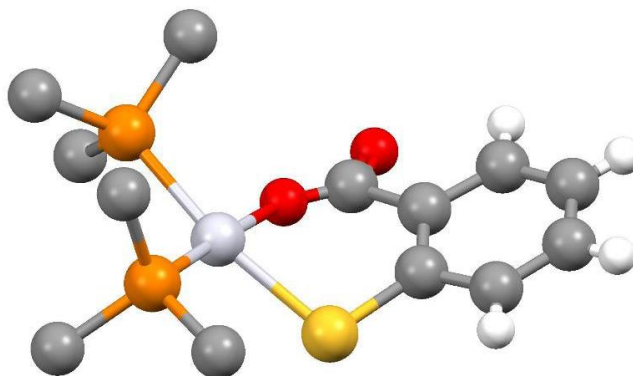
Слика 10. Кристална структура бинуклеарног комплекса паладијума

### 1.3. СТРУКТУРНЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(II) И ПЛАТИНЕ(IV) СА ТИОСАЛИЦИЛНОМ КИСЕЛИНОМ И ДРУГИМ МЕШОВИТИМ ЛИГАНДИМА

Након открића комплекса платине(II) који су испољили значајну биолошку активност настављена су истраживања у правцу синтезе нових комплекса платине(IV). Платина(IV) спада у категорију меких Луисових киселина па показује велики афинитет према лигандима који садрже сумпор као донорски атом.

Комплексирање платине(IV) са тиосалицилном киселином је описано још давне 1973. године [32] а потом су комплекси платине(IV), паладијума(II) и никла(II) са овим лигандом изоловани и окарактерисани елементалном микроанализом, IR спектроскопијом и магнетним мерењима [33].

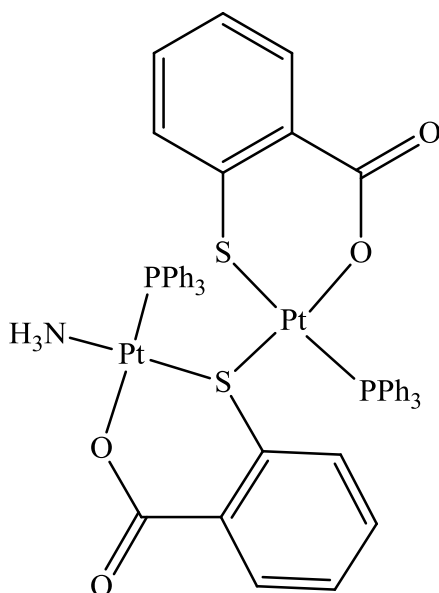
Реакцијом  $[PtCl_2(bipy)]$  ( $bipy$  = бипиридин) у диметилсулфоксиду са воденим раствором династријумове соли тиосалицилне киселине добијен је  $[Pt(SC_6H_4CO_2)(bipy)]$ , један од првих комплекса платине(II) са тиосалицилном киселином који је окарактерисан [34]. Рендгенском структурном анализом је потврђена структура комплекса  $[Pt(SC_6H_4CO_2)(PPh_3)_2]$  ( $PPh_3$  = трифенилфосфин) што је приказано на Слици 11 [28].



Слика 11. Кристална структура комплекса  $[Pt(SC_6H_4CO_2)(PPh_3)_2]$

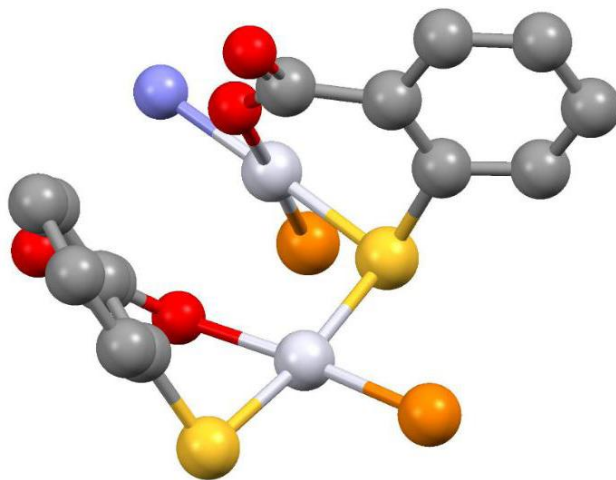
Поред претходно наведених синтетисани су комплекси платине са мешовитим лигандима, опште формуле  $[Pt(SC_6H_4CO_2)(PPh_3)L]$  где се као лиганд L могу наћи неутрална азот донорска једињења као што су пиридин, 4-метилпиридин, имидазол.

Реакцијом  $[\text{PtCl}_2(\text{cod})]$  ( $\text{cod}$  = циклоокта-1,5-диен) са трифенилфосфином, тиосалицилном киселином и амонијаком синтетисан је бинуклеаран комплекс  $[\text{Pt}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)(\text{NH}_3)(\text{PPh}_3) \rightarrow \text{Pt}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)(\text{PPh}_3)]$  (Слика 12).



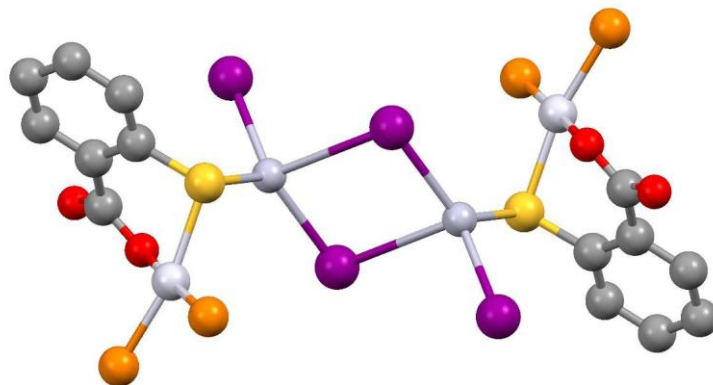
Слика 12. Структура бинуклеарног комплекса  $[\text{Pt}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)(\text{NH}_3)(\text{PPh}_3) \rightarrow \text{Pt}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)(\text{PPh}_3)]$

Кристална структура овог комплекса приказана на Слици 13 показује да се  $[\text{Pt}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)(\text{NH}_3)(\text{PPh}_3)]$  подјединица понаша као металолиганд те да се преко сумпора повезује за  $[\text{Pt}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)(\text{PPh}_3)]$  подјединицу и попуњава четврто координационо место [29].



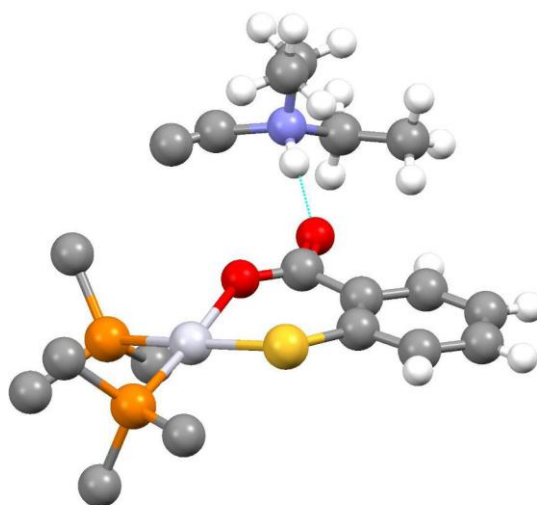
Слика 13. Кристална структура бинуклеарног комплекса  $[\text{Pt}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)(\text{NH}_3)(\text{PPh}_3) \rightarrow \text{Pt}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)(\text{PPh}_3)]$

Комплекс  $[\text{Pt}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)(\text{PPh}_3)]$  се у реакцији са жива(II)-јодидом слично понаша, односно представља металолиганд чиме се синтетише тетраметални комплекс  $[\text{Pt}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)(\text{PPh}_3)_2\cdot\text{HgI}_2]_2$  [35]. У централном језгру се налази  $\text{Hg}(\mu\text{-I})_2\text{HgI}$  при чему је сваки атом живе координован за атом сумпора из  $[\text{Pt}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)(\text{PPh}_3)_2]$  молекула. Кристална структура језгра поменутог комплекса је представљена на Слици 14.



Слика 14. Кристална структура језгра комплекса  $[\text{Pt}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)(\text{PPh}_3)_2\cdot\text{HgI}_2]_2$

Карбоксилна група комплекса  $[\text{Pt}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)(\text{EPh}_3)_2]$  ( $\text{E} = \text{P}, \text{As}$ ) је у могућности да формира водоничну везу па стога у реакцији  $[\text{PtCl}_2(\text{cod})]$  са трифенилфосфином, тиосалицилном киселином, триметиламином уз додавање вишка  $\text{Na}[\text{BPh}_4]$  (натријум-тетрафенилбората) долази до формирања комплекса  $[(\text{Ph}_3\text{E})_2\text{M}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)\cdots\text{HNEt}_3]^+[\text{BPh}_4]^-$  ( $\text{E}=\text{P},\text{As}$ ). Кристална структура  $[(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{Pt}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)\cdots\text{HNEt}_3]^+[\text{BPh}_4]^-$  комплекса приказана на Слици 15 потврђује постојање  $\text{N}\cdots\text{O}=\text{C}$  интеракција [36].

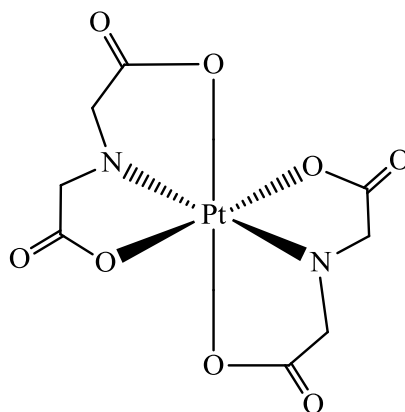


Слика 15. Кристална структура комплекса  $[(\text{Ph}_3\text{E})_2\text{M}(\text{SC}_6\text{H}_4\text{CO}_2)\cdots\text{HNEt}_3]^+[\text{BPh}_4]^-$



Поред наведених комплекса платине(IV) са тиосалицилном киселином и њеним дериватима, синтетисан је и окарактерисан велики број комплекса који поред сумпора садрже и кисеоник и азот као донорске атоме.

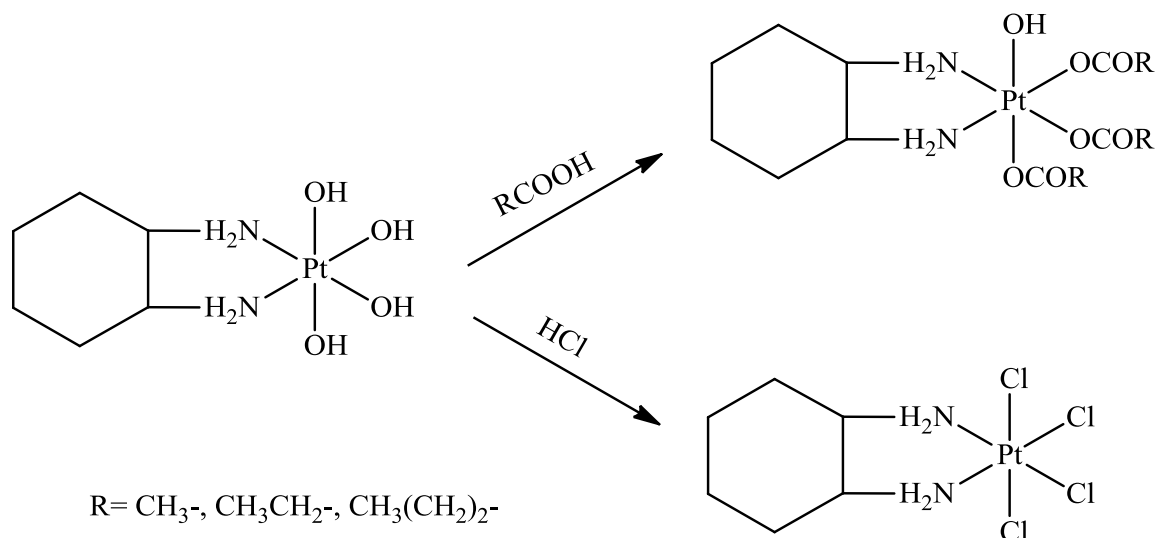
Комплекси платине(IV) са дианјоном (*N*-карбоксиметил)глицина (иминодисирћетне киселине, *ida*) добијени су директном реакцијом лиганда са калијум-хексахлоридоплатинатом(IV) у воденом раствору (Слика 16) [37,38].



Слика 16. *fac*-[Pt(*ida*)<sub>2</sub>]

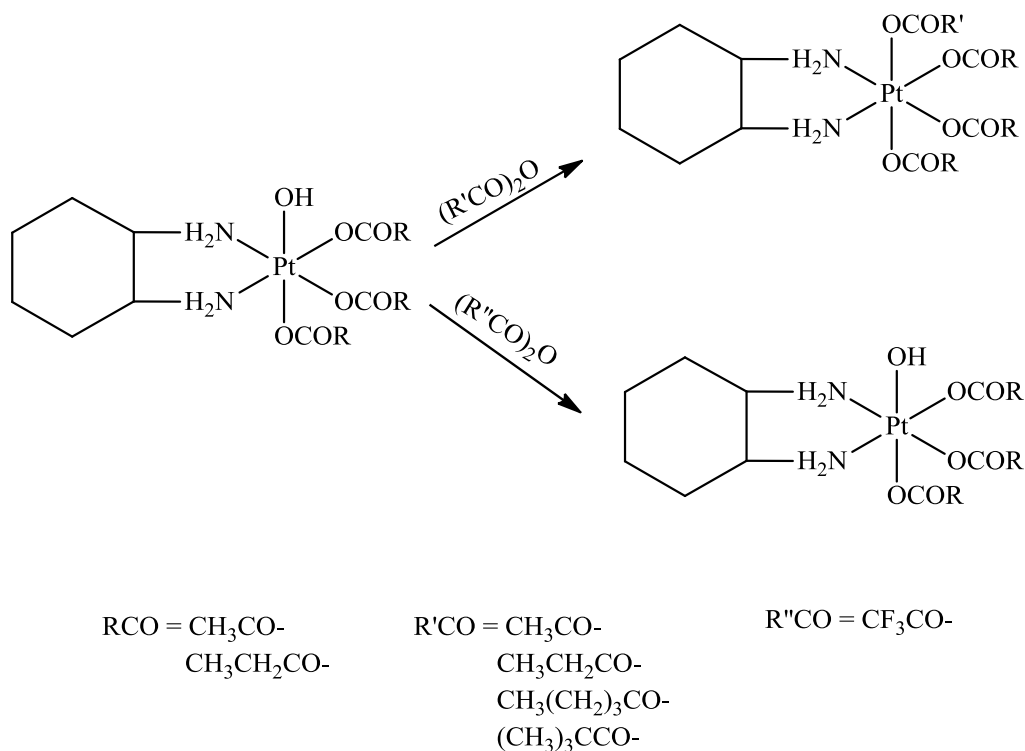
Ким и сарадници су синтетисали (диамин)тетракарбоксилатоплатина(IV) комплексе, [Pt(ROO)<sub>4</sub>A<sub>2</sub>] (A<sub>2</sub> = *trans*-(±)-1,2-диаминоциклохексан (*dach*), 2,2-диметил-1,3-пропандиамин, етилендиамин, два молекула NH<sub>3</sub>, два молекула циклопропил амина; R = CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) реакцијом комплекса (диамин)тетрахидрохлоридоплатина(IV) и анхидрида карбоксилних киселина у дихлорметану. Структура комплекса [Pt(CH<sub>3</sub>COO)<sub>4</sub>(*dach*)] потврђена је на основу резултата рендгенске структурне анализе [39].

Ким и сарадници су пар година касније показали да се реакцијом [Pt(OH)<sub>4</sub>(*dach*)] са вишком карбоксилне киселине на собној температури формирају трикарбоксилатоплатина(IV)-комплекси, [Pt(L<sub>3</sub>)(OH)(*dach*)] (L= ацетато, пропанато, валерато). Неочекивано, један од два хидроксо лиганда остаје непромењен, за разлику од реакције карбоксилације са вишком карбоксилних анхидрида, који дају само тетракарбоксилатоплатина(IV)-комплексе као главни производ. Реакцијом полазног комплекса [Pt(OH)<sub>4</sub>(*dach*)] са 0,1 М раствором хлороводоничне киселине настаје [PtCl<sub>4</sub>(*dach*)] комплекс (Шема 4) [40].



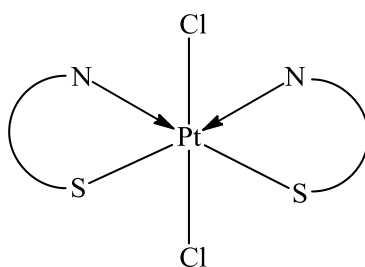
**Шема 4.** Нуклеофилна супституција (диамин)тетрахидроксоплатина(IV)-комплекса карбоксилним киселинама

Примећено је да електрофилном супституцијом на собној температури *tris*(карбоксилато)платина(IV)-комплекса [Pt(L<sub>3</sub>)(OH)(dach)] анхидридима различитих карбоксилних киселина (L'<sub>2</sub>O) настају моносупституисани мешовити карбоксилатни комплекси (Шема 5) [41].



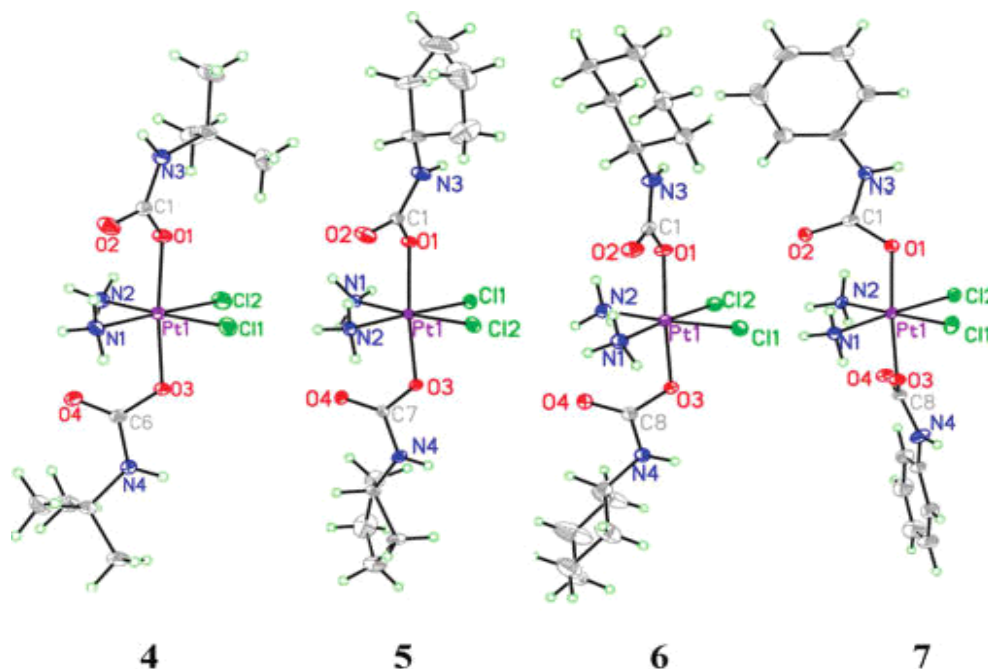
**Шема 5.** Синтеза неких мешовитих карбоксилатних комплекса платине(IV)

Такође нови комплекси платине(IV) су синтетисани и са тиодиаминима. Тиодиамини се координују као бидентатни лиганди, преко азота и сумпора као донорских атома. На бази спектроскопских података, уочених трака у IR спектру и хемијских померања у NMR спектру претпостављена је структура награђених комплекса, која ће са сигурношћу бити потврђена на основу резултата рендгенске структурне анализе (Слика 17) [42].

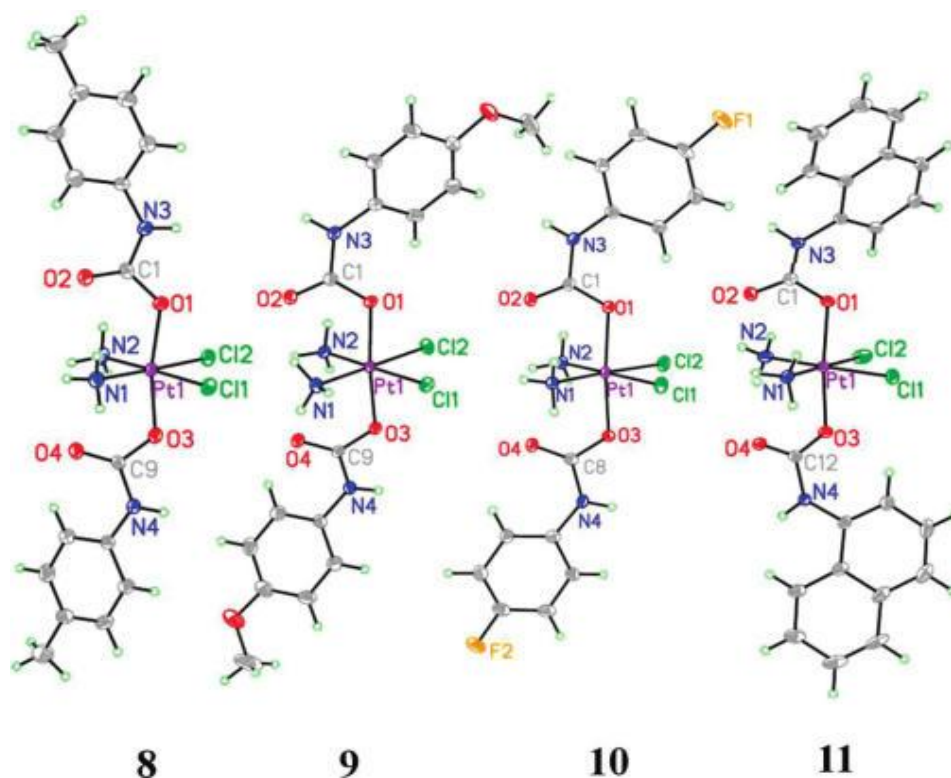


Слика 17. Претпостављена структура награђеног комплекса

Вилсон и сарадници су синтетисали и окарактерисали комплексе опште формуле  $cis,cis,trans$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>CNHR)<sub>2</sub>] при чему је R остатак *tert*-бутил (4), циклопентил (5), циклохексил (6), фенил (7), *p*-толуоил (8), *p*-анизол, 4-флуорофенил (10) и нафтил (11) група [43]. Сви наведени комплекси су окарактерисани и рендгенском структурном анализом, што се може видети на Сликама 18 и 19.



Слика 18. Кристалне структуре комплекса опште формуле  $cis,cis,trans$ -[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>CNHR)<sub>2</sub>]



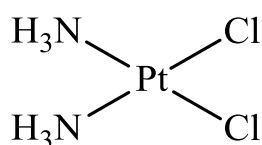
Слика 19. Кристалне структуре комплекса опште формуле  
 $cis,cis,trans-[Pt(NH_3)_2Cl_2(O_2CNHR)_2]$

## 1.4. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА НЕКИХ ПРЕЛАЗНИХ МЕТАЛА

### 1.4.1. Антитуморска активност комплекса платине(II)

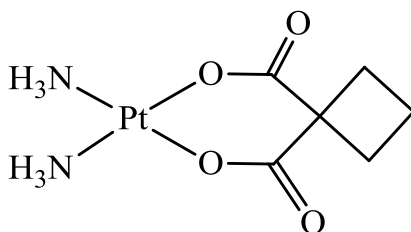
Откриће квадратно-планарног  $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$  (цисплатина) (Слика 20) комплекса 1845. године било је од великог значаја у развоју бионеорганске хемије [44-46]. Међутим, биолошка активност овог једињења је откривена случајно, скоро двадесет година касније. Розенберг и његови сарадници су 1964. године испитивали утицај електричног поља на деобу и раст бактерије *Escherichia coli*, и при томе су утврдили да је деоба бактерије заустављена, док се њен раст нормално одвијао. Сматрали су у почетку да је овај ефекат настао као последица утицаја електричног поља, међутим, након дужег разматрања установили су да је до блокирања деобе

*Escherichia coli* дошло под утицајем комплекса који се наградио у току експеримента у реакцији између платинске електроде и хранљивог медијума са амонијачним пуфером [47,48]. Синтетисани комплекс односно цисплатина је показала најбољи ефекат у медицини у лечењу генитоуринарних тумора. Ефикасна је и у терапији тумора главе и врата као и при лечењу неких малигних болести крви и неких облика карцинома плућа [49-53]. Клиничка употреба цисплатине у лечењу рака одобрена је 1978. године и до данас је водећи цитостатик. Међутим поред жељених ефеката цисплатина је токсична и за здраво ткиво, има бројна нежељена дејства као што су нефротоксичност, неуротоксичност, мучнине, губитак слуха и косе као и резистенцију код неких врста тумора [54-59].

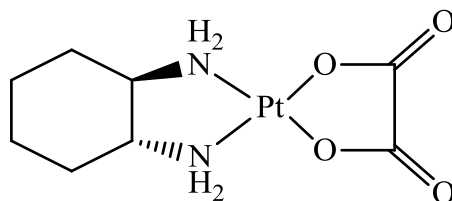


Слика 20. Структура цисплатине

Управо из тих разлога истраживања су настављена у правцу синтезе нових комплекса у тежњи да се синтетише једињење са већом антитуморском активношћу и мањим нежељеним дејствима. Иако има много позитивних резултата до данас се у свету од металних комплекса, осим цисплатине у лечењу тумора једино употребљавају карбоплатина(диаммин[1,1-циклобутандикарбоксилато(2)]-*O,O'*-платина(II) комплекс), (Слика 21) и оксалиплатина (*cis-L*-диаминциклохексан)оксалатоплатина(II), (Слика 22). Наведени комплекси су структурни аналози цисплатине. Код карбоплатине је урађена замена хлоридних анјона другим анјонским лигандима, док је код оксалиплатине  $\text{NH}_3$  лиганд замењен другим аминским лигандом [60].



Слика 21. Структура диаммин[1,1-циклобутандикарбоксилато(2)]-*O,O'*-платина(II)-комплекса, карбоплатине



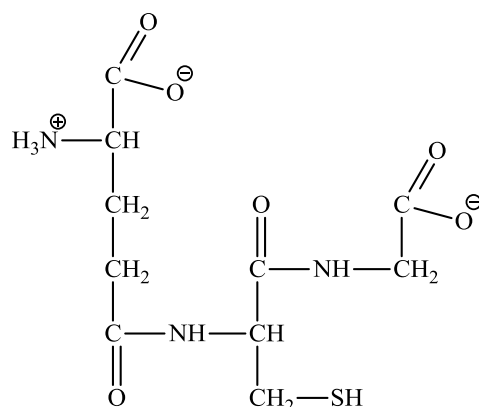
Слика 22. Структура (*cis*-L-диаминциклохексан)оксалатоплатина(II)-комплекса, оксалиплатине

### 1.4.2. Механизам дејства комплекса платине(II)

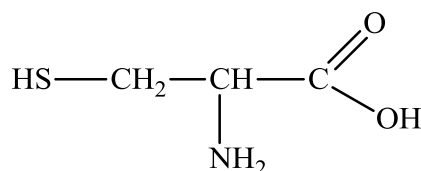
Сматрало се да цисплатина испољава антитуморску активност везујући се за ДНК и тако заустављајући транскрипцију, односно репликацију ДНК молекула. Ови поремећаји активирају процес цитотоксичности и доводе до смрти ћелије тумора апоптозом. Апоптоза изостаје тј. настаје резистенција ако долази до повећања поправке ДНК-адукта и способности толеранције оштећења ДНК молекула. Због високе концентрације хлорида у крви цисплатина долази до ћелије тумора неизмењена, а кад уђе у ћелију формира се  $[PtCl(H_2O)NH_3]^+$  катјон који је најактивнији јер је вода боља одлазећа група [61-65].

Процењено је да се мање од 1% цисплатине која уђе у ћелију везује за ДНК из једра, док се остала количина везује за протеине и друге биомолекуле. Посебно велики афинитет комплекси платине показују према биомолекулима који садрже сумпор, како у тиолном тако и у тиоетарском облику. Наиме, платина(II) као „мека” Луисова киселина гради јако стабилна једињења са сумпор донорима („меким” Луисовим базама). Настала једињења су одговорна за појаву токсичних ефеката. Пошто је концентрација тиола, укључујући глутатион (Слика 23) и L-цистеин (Слика 24), у интрацелуларној течности око 10 mM, претпоставља се да је већи део комплекса платине инактивиран везивањем за сумпор из биомолекула, пре него што дође до молекула ДНК. Везивање комплекса платине(II) за сумпор из тиоетра је кинетички фаворизован процес. Настала Pt-S (тиоетар) веза може се раскинути у присуству молекула ДНК, тј. N7 атом гуанозин-5'-монофосфата може да супституише молекул тиоетра из насталог једињења. Из тих разлога се једињења типа Pt-S (тиоетар) сматрају „резервоаром” комплекса платине у организму, тј. погодним интермедијером у реакцији комплекса платине(II) и ДНК. Веза Pt-S (тиоетар) може се раскинути и у

присуству молекула тиола, тј. сумпор из тиола супституише сумпор из тиоетра, при чему је настала Pt-S (тиол) веза термодинамички стабилнија. Такође може доћи и до директног везивања платине(II) за сумпор из молекула тиола, а настала Pt-S веза је јако стабилна и тешко раскидива. Сматра се да је грађење једињења типа Pt-S (тиол) одговорно за појаву токсичних ефеката током коришћења комплекса платине као антитуморских реагенаса. За раскидање Pt-S (тиол) везе данас се користе једињења позната као „заштитни агенси”, а то су једињења која садрже сумпор и која су врло јаки нуклеофили (диетилдитиокарбамат, тиоуреа, тиосулфат, глутатион, L-цистеин, биотин итд.) [66-70].

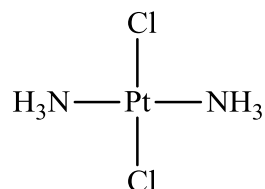


Слика 23. Структура глутатиона



Слика 24. Структура цистеина

Како је ДНК молекул главна мета цитотоксичног дејства платинских комплекса, разлика у биолошкој активности два изомера, цисплатине и трансплатине (Слика 25) је последица различитих лезија које формирају на ДНК тј. различитих ДНК-адуката. Наиме, оба изомера се везују за ДНК у два корака, формирајући прво везу са N-7 положајем гуанина а затим следи затварање адукта формирањем везе са суседном базом на истом ланцу или наспрамном ланцу ДНК. Кинетика ове реакције зависи од природе статичног и одлазећег лиганда комплекса платине, као и од присуства молекула који улазе у конкуренцију за интеракцију са N-7 положајем гуанина (нпр. унутарћелијски глутатион) [71-73].

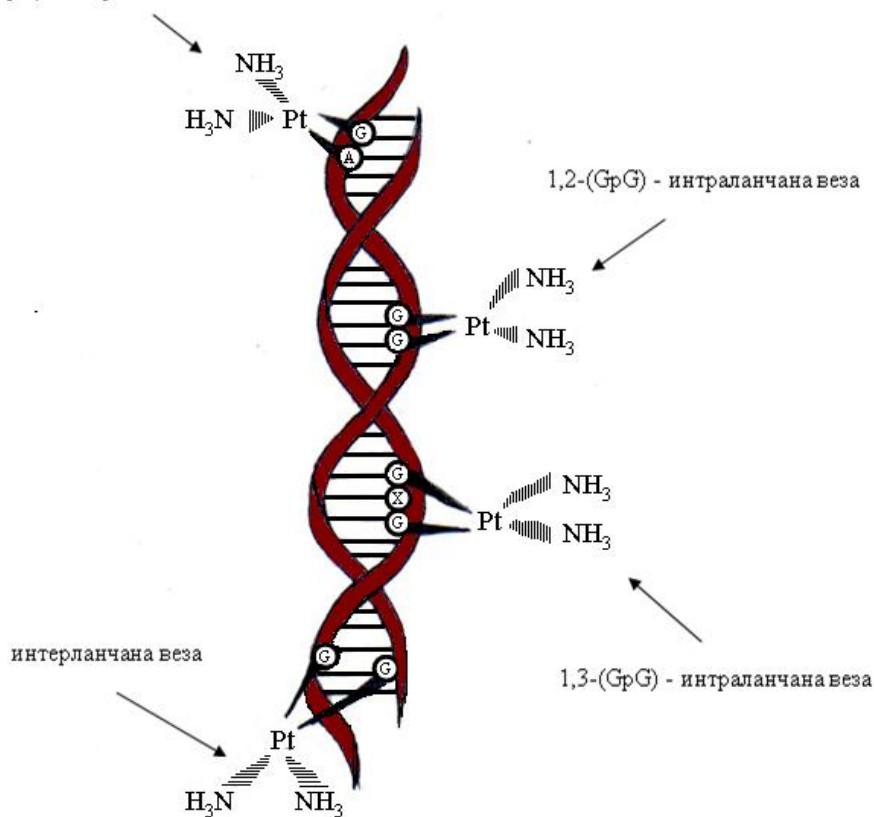


Слика 25. Структура трансплатине

Најбројнији ДНК-адукти које формира цисплатина су 1,2-интраланчани адукти између суседних база гуанина 1,2-d(GpG), који чине 70% свих лезија на ДНК индукованих цисплатином; 20% чине интраланчани адукти d(ApG), а свега 5% чине интерланчани адукти (Слика 26). *Trans*-изомер међутим не може да формира 1,2-интраланчане адукте због стерних сметњи услед геометрије комплекса. Учесталост *trans*-Pt-ДНК-адукта је следећа:

- 50% *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(GMP)}-d(CMP)}],
- 40% *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(GMP)}<sub>2</sub>]
- 10% *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(GMP)}-d(AMP)}] [74-76].

1,2-d (ApG) - интраланчана веза

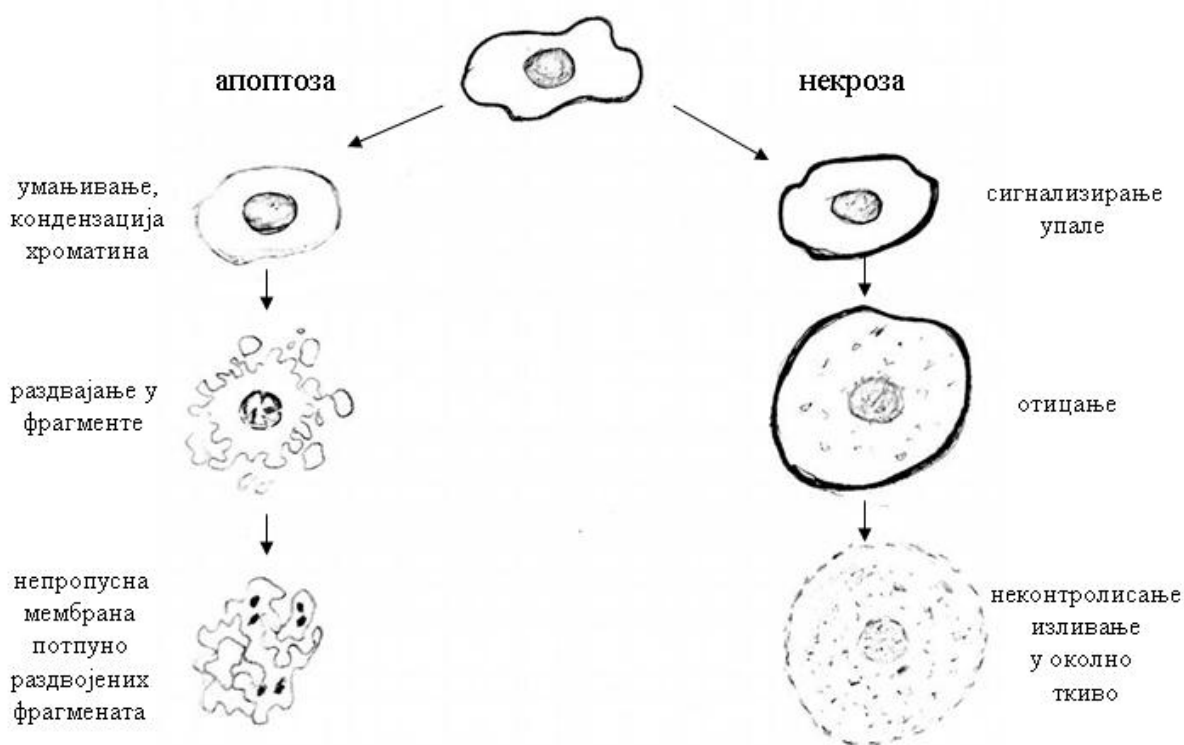


Слика 26. Цисплатина-ДНК адукти



Као последица формирања адуката јавља се конформациони поремећај ДНК хеликса, при чему *cis*- и *trans*- изомери индукују различите промене конформације. Адукти које формира цисплатина индукују закривљење двоструког хеликса за  $60^\circ$ , док адукти које формира трансплатина индукују веома слабо закривљење двоструког хеликса, за свега  $20\text{-}24^\circ$ . Те значајне разлике између адуката које формирају два стереоизомера имају за последицу различиту биолошку активност *cis*- и *trans*-платине [76,77].

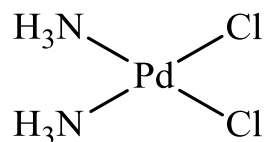
Туморске ћелије, услед дејства цитотоксичних комплекса, могу да изумиру на два начина: некрозом и апоптозом. Некроза представља неконтролисан и пасиван процес који обично захвата велики број ћелија, док је апоптоза контролисан и енергетски-завистан процес који захвата једну или неколико ћелија. Некроза настаје као последица знатног оштећења ћелије најчешће узрокованог физичко-хемијским агенсима, док је апоптоза програмирана ћелијска смрт, вид ћелијске аутодеструкције, односно ћелијског самоубиства (Слика 27) [78-82].



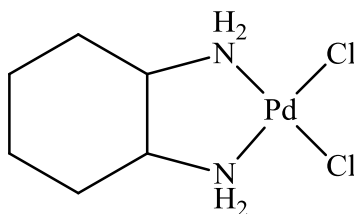
Слика 27. Шематски приказ смрти ћелије апоптозом и некрозом

### 1.4.3. Антитуморска активност комплекса паладијума(II)

Након открића биолошке активности цисплатине од стране Розенберга 1964. године наставило се са тежњом да се синтетишу комплекси веће биолошке активности а мање резистенције. Почетна идеја је била замена металног јона, па је на тај начин настала серија комплекса паладијума(II) који су били структурни аналози комплекса платине(II). Први који су коришћени у клиничким испитивањима против тумора били су *cis*-диаминдихлоридопаладијум(II),  $cis-[PdCl_2(NH_3)_2]$  (Слика 28) и *cis*-1,2-диаминциклохександихлоридопаладијум(II),  $cis-[PdCl_2(dach)]$  комплекси (Слика 29) [83,84].



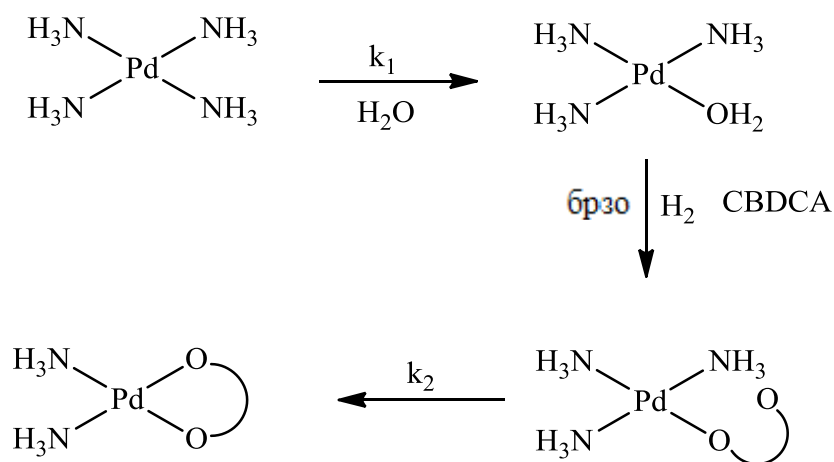
Слика 28. Структура комплекса *cis*-диаминдихлоридопаладијум(II),  $cis-[PdCl_2(NH_3)_2]$ ;



Слика 29. Структура комплекса *cis*-1,2-диаминциклохександихлоридопаладијум(II),  $cis-[PdCl_2(dach)]$

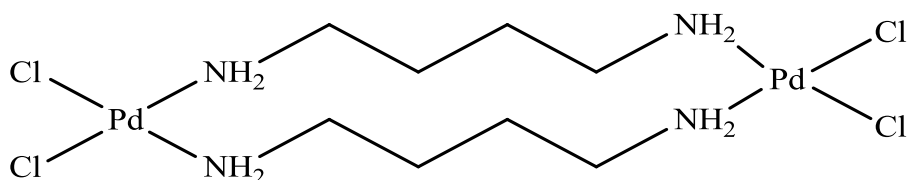
Комплекси платине(II) су термодинамички и кинетички стабилнији од паладијум(II) аналога. Комплекси паладијума(II) подлежу хидролизи и измени лиганда  $10^5$  пута брже него одговарајући платина(II)-комплекси, што објашњава нижу антитуморску активност комплекса у поређењу са аналозима платине(II), а такође и њихову велику токсичност. Да комплекси паладијума(II) у воденим растворима веома брзо подлежу хидролитичким реакцијама и трансформишу се у различите хидроксо-комплексе показано је код  $[Pd(CBDCA-O,O')(NH_3)_2]$  комплекса који је аналоган комплексу платине(II), познатом као карбоплатина. Овај паладијум(II)

комплекс, који су први пут синтетисали Садлер и сарадници (Шема 6) у воденом раствору врло брзо губи координовани амин и CBDCA лиганд и прелази у слабо реактивни хидроксо-комплекс [85].

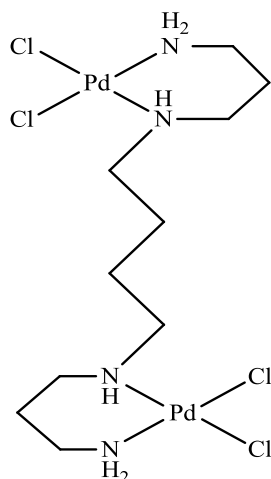


**Шема 6.**  $[Pd(CBDCA-O,O')(NH_3)_2]$  комплекс у воденом раствору

Наваро и сарадници су синтетисали квадратно-планарне дихлоро комплексе паладијума(II) са путресцином (Put, Слика 30) и спермином (Sperm, Слика 31) као лигандима користећи као полазну со паладијум(II)-хлорид. Овај тип хелатних лиганата је коришћен због њихове биолошке активности, наиме они учествују у пролиферацији и диференцијацији ћелија делујући на репликацију молекула ДНК и стабилизацију ћелијске мембране. На основу раније публикованих резултата може се закључити да комплекс са путресцином показује изузетну антипролиферативну активност показујући IC<sub>50</sub> вредности сличне цисплатини [86].

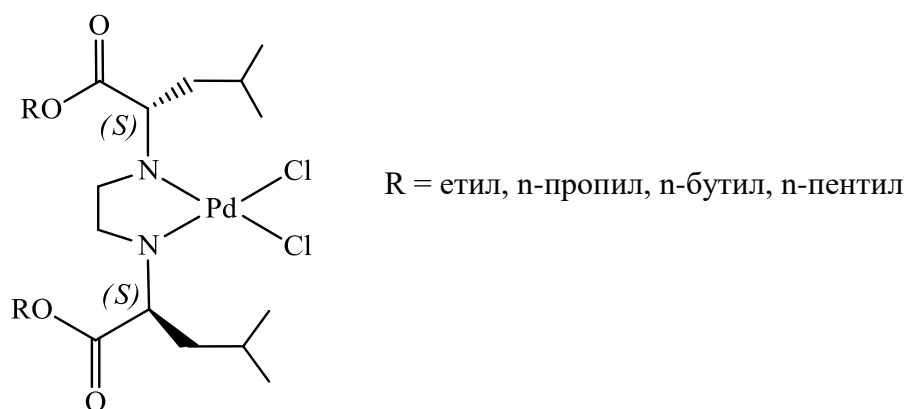


**Слика 30.** Структура  $[PdCl_4(Put)_2]$  комплекса



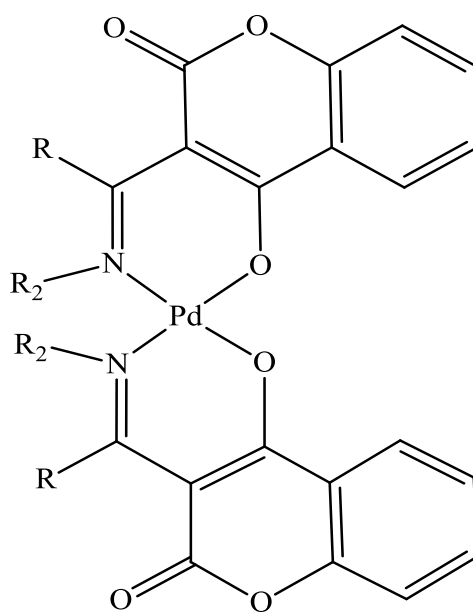
Слика 31. Структура  $[Pd_2Cl_4(Sperm)]$  комплекса

У раду Вујић и сарадници описана је синтеза комплекса паладијума(II) са лигандима  $R_2edda$  типа (Слика 32). Лиганди коришћени у синтезама су:  $O,O'$ -диетил- $(L1 \cdot 2HCl)$ ;  $O,O'$ -дипропил- $(L2 \cdot 2HCl)$ ;  $O,O'$ -дибутил- $(L3 \cdot 2HCl)$ ;  $O,O'$ -дипентил- $(S,S)$ -етилендиамин- $N,N'$ -ди-2-(4-метил)-пентаноат дихидрохлорид  $(L4 \cdot 2HCl)$ . Цитотоксична активност синтетисаних једињења одређена је на ћелијама хроничне лимфоцитне леукемије (CLL). Што се тиче лиганада прекурсора, чини се да је повећање липофилности естарске групе (етил <  $n$ -пропил <  $n$ -бутил <  $n$ -пентил) резултирало вишом цитотоксичношћу. Комплекси паладијума(II) са етил и  $n$ -бутил групама у естарским ланцима показују 2,8 - 4,8 пута нижу активност него комплекси са  $n$ -пропил или  $n$ -пентил групама. Резултати указују да сва испитивана једињења имају знатно јачу цитотоксичну активност у поређењу са активношћу цисплатине ( $IC_{50} = 263,7 \mu M$ ). Такође, показано је да одговарајући паладијум(II)-комплекси показују знатно већу цитотоксичну активност према испитиваним ССЛ ћелијама ( $32,1 \pm 7,8 - 92,1 \pm 11,7 \mu M$ ) од активности комплекса платине(IV) [87].



Слика 32. Паладијум(II)-комплекси са лигандима  $R_2edda$  типа

Један од изучаваних комплекса паладијума(II) је и са лигандима који су деривати кумарина. Овај комплекс (Слика 33) показује изузетну цитотоксичну активност према А549 и HeLa ћелијама (IC<sub>50</sub> вредности овог комплекса износе 0,0097 и 0,0078 μМ, док су IC<sub>50</sub> вредности карбоплатине 105,98 и 73,49 μМ), а сам лиганд не индукује токсичне ефекте на наведене ћелијске линије [88,89].



Слика 33. Комплекс паладијума(II) са дериватом кумарина

Такође је испитиван велики број паладијум(II)-комплекса са лигандима као што су деривати оксадиазола [90], фосфатни деривати хинолина [91], деривати имидазола [92] као и неки антибиотици [93] и тиме је доказана њихова значајна антитуморска активност.

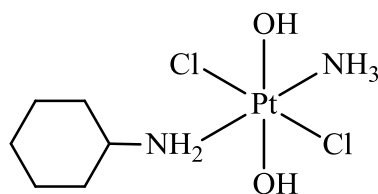
До сада једина примена паладијума у медицини је у лечењу брзорастућег канцера простате и то користећи радиоактивни изотоп <sup>103</sup>Pd [94,95].

#### 1.4.4. Антитуморска активност комплекса платине(IV)

Верује се да је редукција до комплекса платине(II) кључна за антитуморско дејство платина(IV)-комплекса, па би биолошка активност могла да зависи од лакоће којом се комплекс платине(IV) редукује. Постоје бројни фактори који се разматрају када се процењују могући ефекти примене комплекса платине(IV), аналога комплекса платине(II). Кинетичка инертност комплекса платине(IV) указује да за ове комплексе постоји повећана могућност да дођу непромењени до места деловања. Модификовањем аксијалних лиганата платина(IV)-комплекса мења се растворљивост комплекса и његова способност да уђу у туморске ћелије, пре него што се редукују и дају активни платина(II)-комплекс као лек. Спречавањем споредних реакција комплекса платине(IV) могли би се добити лекови мање токсичности и веће активности [96, 97].

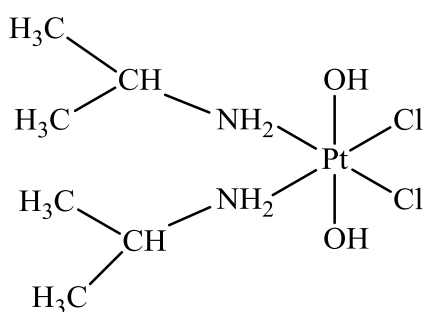
Хамблеј и сарадници су показали да редукциони потенцијали (диаммин)платина(IV)-комплекса зависе од природе аксијалних и екваторијалних лиганата, при чему аксијални лиганди имају већи утицај. Редукција је најлакша када су аксијални лиганди хлоро лиганди, тежа када се ради о карбоксилато лигандима и најтежа када су хидроксо лиганди у аксијалном положају. Пошто структурне промене екваторијалних амино лиганата имају мали ефекат на редукциони потенцијал, слично ефекту промене дужине ланца аксијалних карбоксилато лиганата, претпоставља се да при дизајнирању доброг платина(II) лека не треба разматрати промену екваторијалних лиганата, а креирањем аксијалних лиганата треба обезбедити да лек непромењен дође до места деловања [98].

*Trans*[аммин(циклохексиламиндихлородихидроксо)платина(IV)]-комплекс (Слика 34) је први комплекс платине, *trans* геометријски изомер, који је показао значајну антитуморску активност *in vivo*, мада мању од цисплатине што је објашњено дезактивацијом овог једињења у ћелији у реакцији са глутатионом, па тако клиничке студије овог комплекса нису спроведене [99].

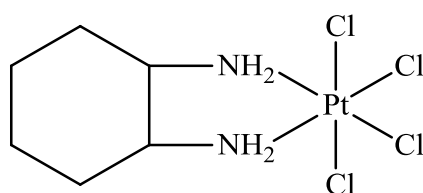


**Слика 34.** Структура *trans*-[аммин(циклохексиламиндихлородихидрокси)платина(IV)] комплекса

Тобе и сарадници су синтетисали *cis,trans,cis*-[PtCl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(NH<sub>2</sub>iPr)<sub>2</sub>] комплекс (ипроплатину, Слика 35) који је ушао у клиничка испитивања због своје велике растворљивости. Током клиничких студија је откривено да је знатно мање активан од карбоплатине, па из тог разлога није регистрован за клиничку употребу. Такође и [PtCl<sub>4</sub>(dach)] комплекс (ормаплатина, Слика 36) је показао велику активност у предклиничким испитивањима, али је касније напуштен због озбиљних периферних неуропатија [100,101].

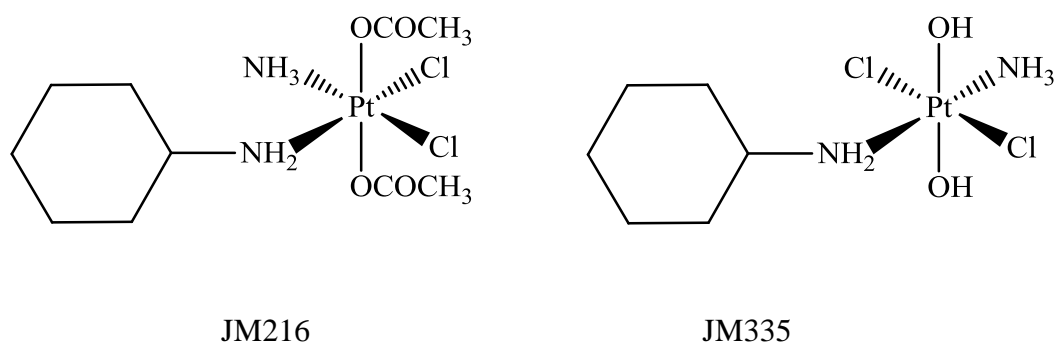


**Слика 35.** Структура ипроплатине



**Слика 36.** Структура ормаплатине

*Cis,trans*-[PtCl<sub>2</sub>(OAc)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(cikloheksilamin)] (JM216) је унапред дизајниран лек који је у трећој фази клиничког испитивања (Слика 37). Келанд је за неке аналоге комплекса JM216 утврдио да су у *in vitro* условима око 840 пута активнији од цисплатине. Висока активност приписана је доброј ћелијској пропустљивости лека [102,103].



**Слика 37.** Структуре комплекса платине(IV) укључених у клиничка испитивања

Закључено је, из експерименталних података, да не постоји једноставна и општа веза између редукционог потенцијала платина(IV)-комплекса и његове активности. Постоје комплекси као што је тетраплатина, који се лако редукују дајући јако активне платина(II)-комплексе, али постоје и комплекси као што је ипроплатина који се далеко теже редукују али такође имају велику активност [104].

Са аксијалним хлоро лигандима и високим редукционим потенцијалом, тетраплатина се редукује врло брзо *in vivo* и сви биотрансформисани производи су платина(II) врсте. Врло брзо се редукује и JM216, са аксијалним ацетато лигандима и средњом вредношћу потенцијала. Ипроплатина има хидроксо лиганде у аксијалном положају и негативнији редукциони потенцијал, па се већа количина овог лека не мења *in vitro* и *in vivo*, што је у складу са токсичношћу комплекса. Претпоставља се да се део ипроплатине лакше редукује у интрацелуларној течности него у крвној плазми [105,106].

Чои и сарадници су утврдили да ако се само аксијални лиганди у комплексу мењају, а екваторијални комплекси остају непромењени, цитотоксичност комплекса расте са повећањем њиховог редукционог потенцијала [104].

Резултати указују да фармакологија платина(IV)-комплекса зависи од тога колико се они лако редукују, а да лакоћа редукције зависи од природе аксијалних лиганата у комплексу. Међутим, активност платина(IV)-комплекса зависи од активности аналога платине(II) који настају редукцијом.

Бројни молекули, као и протеини и ензими, могу да реагују са комплексима платине(IV), пре свега редукујући јоне платине(IV) до јона платине(II). Глутатион (GSH) је претежно интраћелијски тиол који брани организам од токсина и оксиданата присутних у ћелији и може деактивирати електрофилне лекове укључујући и лекове



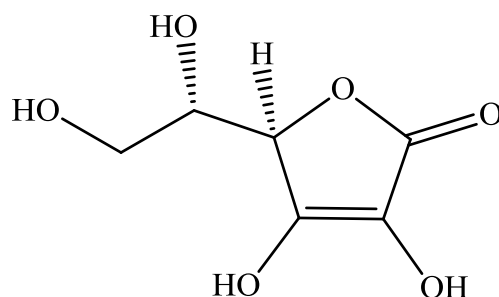
хемиотерапеутског типа. Реакција тетраплатине са ДНК је спора, али реакција постаје бржа након додатка две стехиометријске количине GSH што указује на редукцију платине(IV)-комплекса до аналога платине(II) [37]:



Нађено је да везивање комплекса платине(IV) за ДНК опада при концентрацијама већим од оне која је стехиометријски потребна за редукцију комплекса. Ово је објашњено деактивацијом добијених аналога платине(II) везивањем вишка глутатиона за њих [107]. Кидо и сарадници су показали да додаток GSH са тетраплатином повећава њену цитотоксичност до вредности које одговарају цитотоксичности њеног платина(II) аналога [108].

Пендијала и сарадници су показали да постоји веза између интраћелијске концентрације глутатиона и цитотоксичности лекова платине(IV) (ипроплатине и тетраплатине), али не и лекова платине(II) (цисплатине и карбоплатине) [109]. Ово опажање иде у прилог теорији да *in vivo* редукцијом платина(IV)-комплекса настају активни аналози платине(II).

Витамин Ц или аскорбинска киселина (Слика 38) је мали молекул присутан у крви, који је одличан редуктант и он може да редукује јоне метала [110]. Блатер и сарадници су показали да редукцијом ипроплатине и оксоплатине (*cis,trans,cis*-[PtCl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]) витамином Ц настају њихови платина(II) аналози, *cis*-дихлоридо-*bis*(изопропиламин)платина(II) и цисплатина [111].



Слика 38. Структура аскорбинске киселине

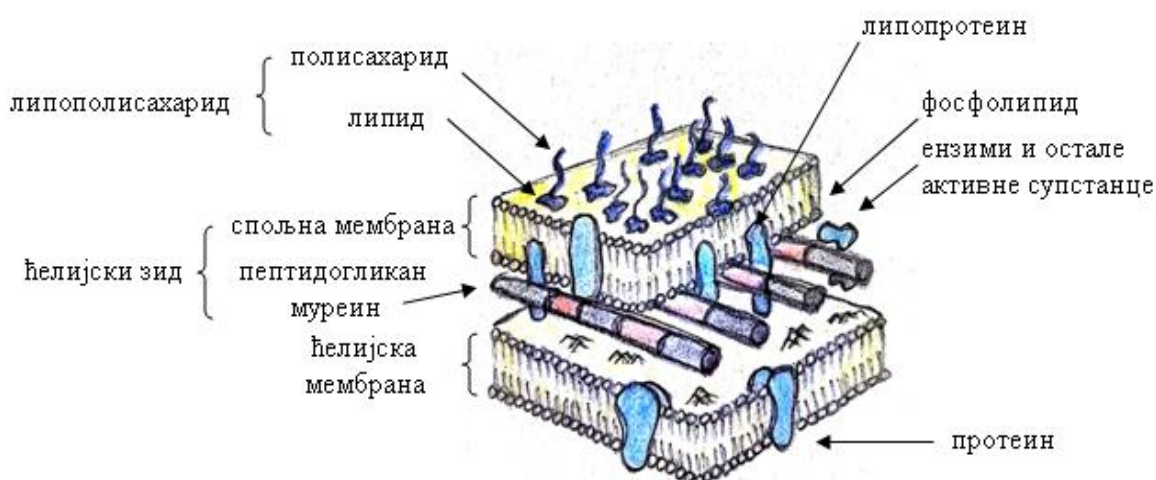
### 1.4.5. Отпорност микроорганизама, механизам деловања антимикробних лекова

Резистенција бактерија на антибиотике представља озбиљан проблем широм света. Последњих година је све већи број истраживања базираних на испитивању антимикробне активности новосинтетисаних једињења која садрже одређени метални јон, а све у циљу добијања нових једињења која ће спречити раст и развој патогених бактерија. Резистенција бактерија је посебно учестала после масовне и неконтролисане потрошње антибиотика [112,113].

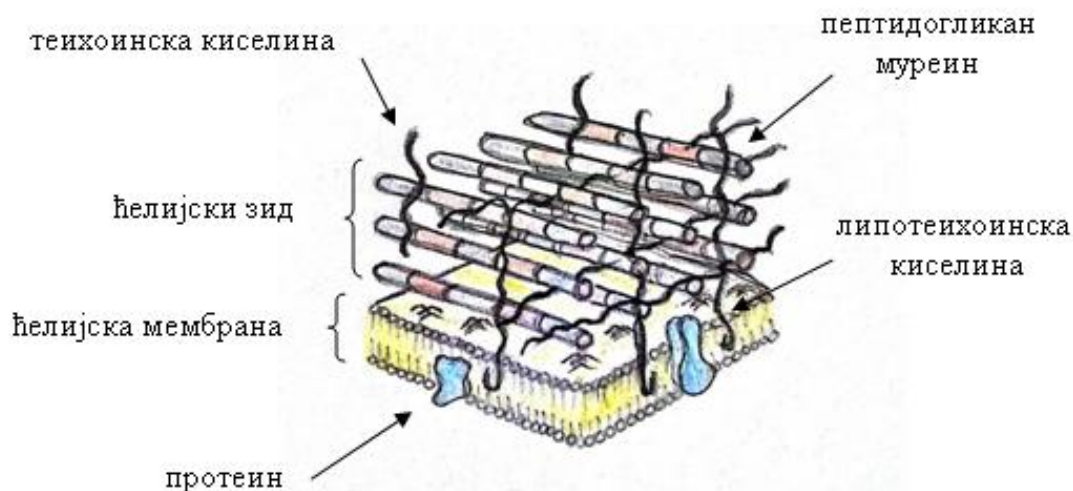
Деловање антибиотика је најчешће усмерено на тачно одређена циљна места, као и на поједине структуре бактеријске ћелије и на ензимске активности микроорганизама. Основни механизми деловања антибактеријских лекова су: инхибиција синтезе ћелијског зида бактерија, инхибиција функције цитоплазматске мембране, инхибиција синтезе протеина, инхибиција синтезе нуклеинских киселина, инхибиција метаболизма фолата [114].

Механизам антибактеријског дејства зависи и од карактеристика циљних микроорганизама, а суштинска разлика је у различитости грађе ћелијског омотача која постоји између Грам-негативних и Грам-позитивних бактерија као што је приказано на Сликама 39 и 40 [114,115].

Грам-позитивне бактерије имају дебео ћелијски зид који је углавном изграђен од пептидогликана, што представља спољашњи слој око ћелије. Такође, у састав ћелијског зида Грам-позитивних бактерија улази и теихоинска киселина, липотеихоинска киселина, полисахариди и протеини [116]. Ћелијски зид Грам-негативних бактерија је тањи, мање компактан, али сложенијег хемијског састава. Осим слоја пептидогликана, који је код ових бактерија много тањи, ћелијски зид садржи и спољашњи слој који се састоји се од фосфолипидног двослоја, липопротеина и липополисахарида. Функције овог слоја су вишеструке: његово негативно наелектрисање спречава деловање одбрамбеног система домаћина, као и антимикробних супстанци, лизозима, детерџената, тешких метала и одређених боја [117]. Због сложеније структуре, Грам-негативне бактерије поседују генерално већу отпорност на дејство различитих антимикробних супстанци у односу на Грам-позитивне бактерије [118].



Слика 39. Грађа ћелијског зида Грам-негативне бактерије



Слика 40. Грађа ћелијског зида Грам-позитивне бактерије

Гљиве су еукариотски организми. Велика група гљива, укључујући и гљиве из рода *Aspergillus*, су вишећелијски организми чије је вегетативно тело (мицелија) изграђено од гранатих нити (хифа), док једна мања група представља једноћелијске организме, овалног облика којој припадају квасци. Ћелијски зид гљива је углавном изграђен од аминополисахарида хитина који је у ћелијском зиду квасаца присутан у нешто мањем проценту.

Будући да су гљиве еукариотски организми, механизми антифунгалног деловања су самим тим и сложенији. Врло често, због велике сличности између еукариотске ћелије гљива и анималне или хумане ћелије, антифунгални агенси токсично делују и на њих, па је и то један од разлога за откривањем нових, безбедних антифунгалних агенаса. Механизам њиховог деловања се огледа у нарушавању интегритета ћелијске мембране повећавајући њену пропустљивост, инхибицији синтезе ћелијског зида, инхибицији синтезе нуклеинских киселина, инхибицији ћелијске деобе [119].

#### 1.4.6. Формирање биофилма

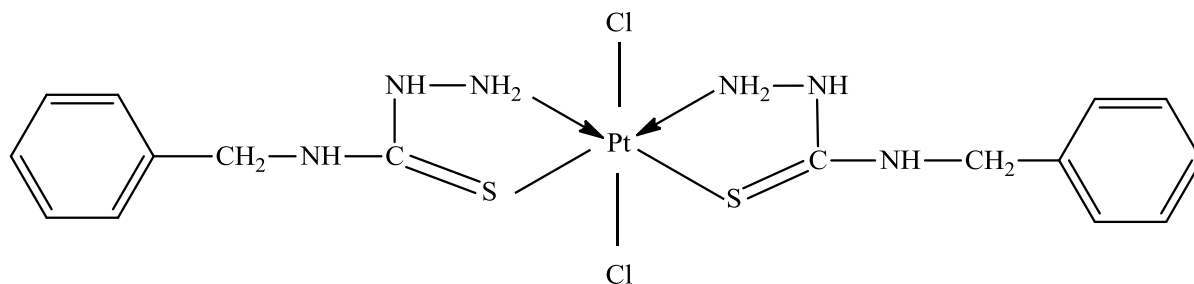
Током последње две деценије прихваћена је хипотеза о значају микроорганизама који формирају биофилм у етиологији неких хроничних инфекција. Биофилм је дефинисан као сесилна заједница микроорганизама чије су ћелије иреверзибилно међусобно повезане са супстратом и уклопљене у екстрацелуларни гликокаликс полисахаридних полимера који су саме створиле [120,121].

Биофилм може да се формира на свим биотским и абиотским површинама које су у контакту са течностима, на површини меких ткива у организму, биљкама, минералним површинама. Формирање биофилма је сложен процес који се одиграва у неколико фаза [120].

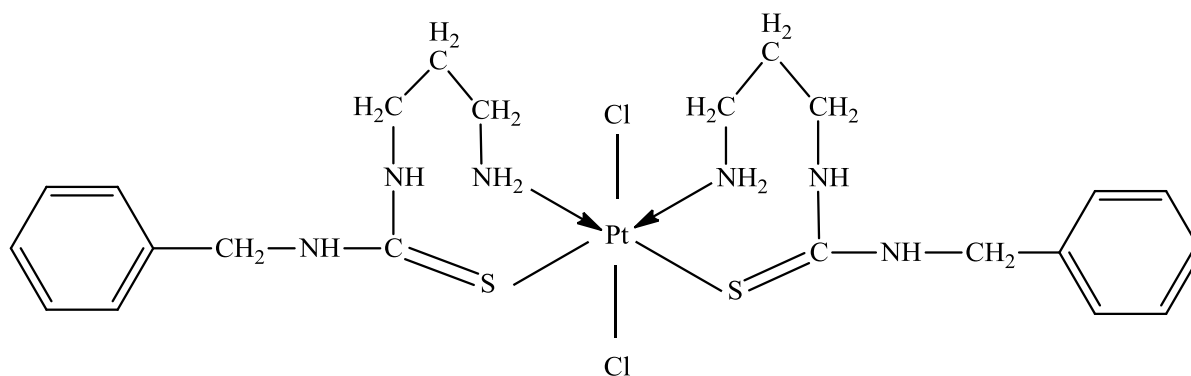
1. Иницијална адхезија представља причвршћивање ћелија. То је реверзибилан процес депоновања макромолекула. Почетак формирања биофилма подразумева климатизацију површине како би се неутралисао површински напон, за који се претпоставља да тако одбија приближене бактерије спречавајући везивање.
2. Иреверзибилна адхезија се остварује процесом продукције егзополисахарида. Причвршћене ћелије луче егзополимерне супстанце које олакшавају њихово везивање на површину.
3. Формирање биофилма - након друге фазе почиње раст ћелија и долази до формирања микроколонија, а накнадним слепљивањем ћелија и до формирања биофилма.
4. Одвајање бактерија у овој фази се одиграва одвајање и ширење зрелих биофилмова на нове области. Ослобођене бактерије могу остати у течности као контаминати или се пренети до других локација где ће отпочети поново формирање биофилма [122-127].

### 1.4.7. Антимикробна активност комплекса платине(IV)

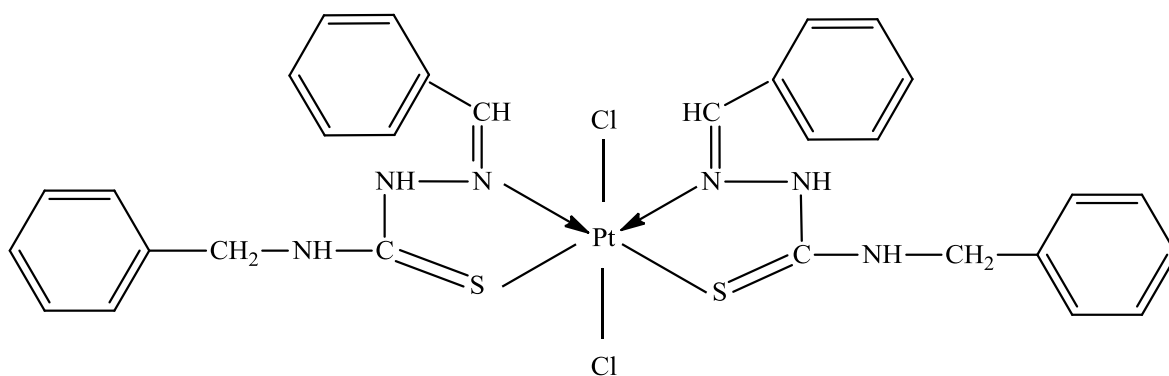
Након што је откривено да је значајно увећан антимикробни потенцијал једињења која су добијена координовањем антибиотика са јоном платине(II) и платине(IV) [128-131], група истраживача са Универзитета Делхи је синтетисала четири нова комплекса опште формуле  $[Pt(L)_2Cl_2]$  (Слике 41-44). Лиганди који су коришћени су бидентатно координовани преко азота и сумпора као доворских атома (L1 = бензил-*N*-тиохиразид; L2 = (бензил-*N*-тио)-1,3-пропандиамин; L3 = бензалдехид-бензил-*N*-тиохиразон и L4 = салицилалдехид-бензил-*N*-тиохиразон). Ови новосинтетисани комплекси су тестирани на патогеним бактеријским сојевима *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* коришћењем диск дифузионе и микродилуционе методе док је као стандард коришћен антибиотик гентамицин. Резултати су указали на значајну активност на испитиваним бактеријским сојевима [132].



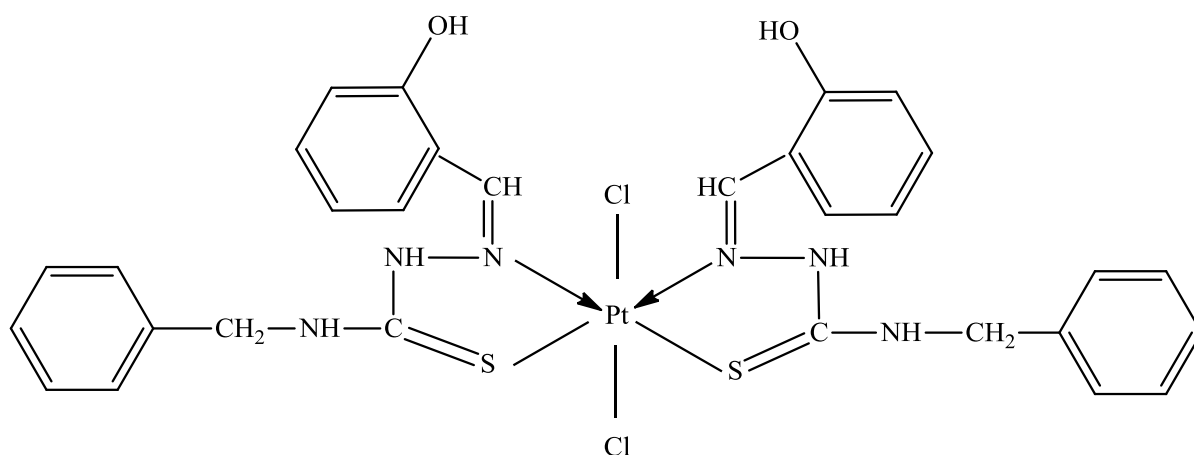
Слика 41. Структура комплекса  $[Pt(L1)_2Cl_2]$



Слика 42. Структура комплекса  $[Pt(L2)_2Cl_2]$



Слика 43. Структура комплекса  $[Pt(L3)_2Cl_2]$



Слика 44. Структуре комплекса  $[Pt(L4)_2Cl_2]$

Литературни подаци показују да су синтетисани и комплекси платине(IV) са дериватима тиодиамина, тиохидразона и тиохидразида као лигандима. Они су диск дифузионом и микродилуционом методом испитивани на бактеријском соју *Streptomyces epidermidis* и показали су се као ефикасни инхибитори у примењеним концентрацијама [133].

Акбар и сарадници су испитивали антимикуробну активност комплекса са различитим прелазним металима на разноврсним бактеријским сојевима. Као лиганди су коришћени дифенолна киселина и хетероциклична база. Резултати су указали да

комплекс платине(IV) показује значајну антимикуробну активност у поређењу са комплексима који садрже металне јоне Co(II), Cu(II) и Rh(III) [134].

У литератури постоје и други бројни радови са синтетисаним комплексима платине(IV) који су показали значајну активност на различите врсте бактерија и гљива [42,135-142].

#### **1.4.8. Антибиофилм активност комплекса платине(IV)**

Јевтић и сарадници су у свом раду представили антибиофилм активност комплекса платине(IV) са *O,O'*-диалкил естрима (*S,S*)-етилендиамин-*N,N'*-ди-2-(3-метил)бутанске киселине и бромидо лиганадима. Испитивање је рађено на шест бактеријских врста (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus mirabilis*, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Грам-позитивне бактерије које формирају биофилм су показале већу осетљивост од Грам-негативних [143].

## **2. Хипотеза и циљеви истраживања**



## Хипотеза истраживања

S-алкил деривати тиосалицилне киселине (алкил = бензил-(L1), метил-(L2), етил-(L3), пропил-(L4) и бутил-(L5)) и одговарајући паладијум(II) и платина(IV) комплекси окарактерисани елементалном микроанализом, инфрацрвеном и  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  нуклеарно-магнетно-резонанционом спектроскопијом и рендгенском структурном анализом показују одређену биолошку активност.

Ради провере хипотезе у оквиру ове докторске дисертације предвиђени су следећи циљеви:

- Синтетисати S-алкил деривате тиосалицилне киселине (алкил = бензил-(L1), метил-(L2), етил-(L3), пропил-(L4) и бутил-(L5))
- Синтетисати одговарајуће комплексе паладијума(II) и платине(IV) са наведеним S-алкил дериватима тиосалицилне киселине
- Састав добијених једињења утврдити на основу резултата елементалне микроанализе
- Структуру награђених једињења претпоставити на основу њихових инфрацрвених и нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра
- Структуру награђених једињења потврдити на основу резултата рендгенске структурне анализе где год је то могуће
- Испитати потенцијалну биолошку активност (антитуморску, антимикуробну и антибиофилм) S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II) и платине(IV).

## **3. Материјал и методе**

### 3.1. СИНТЕЗЕ ЛИГАНАДА

#### 3.1.1. Синтеза S-алкил деривата тиосалицилне киселине

S-алкил деривати тиосалицилне киселине су синтетисани на основу претходно описаног поступка [20], реакцијом алкиловања тиосалицилне киселине одговарајућим алкил-халогенидима у базној средини и смеси вода-етанол као растварачу. У раствор добијен растварањем (1 mmol) тиосалицилне киселине у 50,00 mL 30% етанола додаје се раствор натријум-хидроксида (2,00 mmol у 5,00 mL дестиловане воде). Одговарајући алкил-халогенид (бензил-, метил-, етил-, пропил-, бутил-) (2,00 mmol) се раствори у 5,00 mL етанола и постепено додаје у малим порцијама у претходно припремљену бистру реакциону смешу. Тако добијена реакциона смеша остави се током ноћи на 60°C. Након тога раствор се пренесе у кристализациону шољу и упари на воденом купатилу ради удаљавања етанола. У добијени водени раствор додаје се (2,00 mM) раствор хлороводоничне киселине услед чега се ствара бели талог одговарајућег S-алкил деривата тиосалицилне киселине (бензил-(**L1**), метил-(**L2**), етил-(**L3**), пропил-(**L4**), бутил-(**L5**)). Тако добијени производ се одвоји цеђењем, испере великом количином дестиловане воде и суши преко ноћи на вакууму. S-алкил деривати тиосалицилне киселине су добијени у приносу 85-95%.

S-бензил дериват тиосалицилне киселине (**L1**): IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3414, 3061, 2920, 2648, 2559, 1674, 1584, 1562, 1463, 1412, 1317, 1272, 1255, 1154, 1062, 1046, 897, 743, 711, 652, 551.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 4,17 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,21-8,14 (m, 9H, Ar и bz).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ,  $\delta$  ppm): 35,9 ( $\text{CH}_2$ ), 124,1; 125,9; 126,7; 127,3; 127,9; 128,3; 128,6; 129,3; 131,0; 132,4; 136,8; 141,3 (Ar и bz), 167,5 ( $\text{COOH}$ ).

S-метил дериват тиосалицилне киселине (**L2**): IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3446, 3068, 2916, 2652, 2560, 1674, 1586, 1561, 1466, 1412, 1308, 1291, 1270, 1255, 1151, 1062, 1048, 892, 743, 699, 652, 556.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 2,48 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7,16-8,18 (m, 4H, Ar).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 15,6 ( $\text{CH}_3$ ), 123,5; 124,4; 125,4; 132,5; 133,6; 144,4 (Ar), 171,6 ( $\text{COOH}$ ).

S-етил дериват тиосалицилне киселине (**L3**): IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3435, 3066, 2972, 2652, 2562, 1682, 1588, 1563, 1466, 1414, 1315, 1275, 1252, 1152, 1063, 1049, 884, 740, 704, 690, 651, 550.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 1,42 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,97 (q, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,16-8,17 (m, 4H, Ar).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 13,1 ( $\text{CH}_3$ ), 26,2 ( $\text{CH}_2$ ), 124,0; 125,9; 126,4; 132,6; 133,2; 142,9 (Ar), 171,4 ( $\text{COOH}$ ).

S-пропил дериват тиосалицилне киселине (**L4**): IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3414, 3056, 2979, 2641, 2555, 1678, 1588, 1562, 1462, 1405, 1310, 1271, 1257, 1150, 1062, 1053, 811, 740, 704, 691, 653, 554.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 1,1 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,74 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,92 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,15-8,15 (m, 4H, Ar).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 13,8 ( $\text{CH}_3$ ), 21,6 ( $\text{CH}_2$ ), 34,1 ( $\text{CH}_2$ ), 123,8; 125,6; 126,2; 132,5; 133,1; 143,1 (Ar), 171,6 ( $\text{COOH}$ ).

S-бутил дериват тиосалицилне киселине (**L5**): IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3420, 2955, 2869, 2641, 2556, 1674, 1586, 1560, 1462, 1408, 1320, 1270, 1250, 1153, 1060, 1048, 924, 810, 738, 704, 651, 553.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 0,96 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,46 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,78 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,94 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7,15-8,16 (m, 4H, Ar).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 13,7 ( $\text{CH}_3$ ), 22,3 ( $\text{CH}_2$ ), 30,2 ( $\text{CH}_2$ ), 31,9 ( $\text{CH}_2$ ), 123,8; 125,7; 126,3; 132,5; 133,1; 143,1 (Ar), 171,4 ( $\text{COOH}$ ).

## 3.2. СИНТЕЗЕ КОМПЛЕКСА

### 3.2.1. Синтеза комплекса паладијума(II)

Комплекси паладијума(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине (алкил = бензил-, метил-, етил-, пропил- и бутил-) су синтетисани на основу претходно описаног поступка [30].

### 3.2.1.1. Синтеза комплекса паладијума(II) са S-бензил дериватом тиосалицилне киселине, [Pd(S-bz-thiosal)<sub>2</sub>]

Раствору добијеном растварањем 0,10 g (0,31 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) у 10,00 mL дестиловане воде лагано се додаје 0,15 g (0,61 mmol) S-бензил деривата тиосалицилне киселине. Реакциона смеша се загрева на воденом купатилу уз мешање 2 сата. Током овог периода у малим порцијама се додаје раствор литијум-хидроксида (0,03 g, 0,61 mmol у 10,00 mL дестиловане воде). Настали жути талог комплекса, [Pd(S-bz-thiosal)<sub>2</sub>] (C1) одвоји се цеђењем, испере дестилованом водом и суши на ваздуху. Принос: 0,11 g (58,70%).

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3420, 3057, 1634, 1616, 1562, 1327, 1146, 753, 708, 698. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 4,05 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 7,08-8,10 (m, 9H, Ar и bz). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 25,9 (CH<sub>2</sub>), 124,1; 125,6; 125,7; 126,2; 126,3; 126,8; 127,3; 127,8; 129,5; 133,2; 136,2; 139,7 (Ar и bz), 171,5 (COO<sup>-</sup>).

### 3.2.1.2. Синтеза комплекса паладијума(II) са S-метил дериватом тиосалицилне киселине, [Pd(S-met-thiosal)<sub>2</sub>]

Полазећи од 0,10 g (0,31 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) и 0,10 g (0,61 mmol) S-метил деривата тиосалицилне киселине на начин описан у одељку 3.2.1.1. синтетисан је [Pd(S-met-thiosal)<sub>2</sub>] (C2), комплекс жуте боје. Принос: 0,08 g (59,80%).

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3419, 1619, 1597, 1399, 1385, 1332, 1306, 1142, 960, 865, 741, 693, 654. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 2,35 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 7,19-8,08 (m, 8H, Ar). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 14,6 (CH<sub>3</sub>), 123,6; 125,1; 125,2; 129,0; 132,7; 135,7 (Ar), 171,8 (COO<sup>-</sup>).

### 3.2.1.3. Синтеза комплекса паладијума(II) са S-етил дериватом тиосалицилне киселине, [Pd(S-et-thiosal)<sub>2</sub>]

Полазећи од 0,10 g (0,31 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) и 0,11 g (0,61 mmol) S-етил деривата тиосалицилне киселине на начин описан у одељку

3.2.1.1. синтетисан је  $[\text{Pd}(\text{S-et-thiosal})_2]$  (**C3**), комплекс жуте боје. Принос: 0,08 g (57,90%).

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3436, 1587, 1518, 1393, 752.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 1,27 (t, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 2,83 (q, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 7,11-8,08 (m, 8H, Ar).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 14,4 ( $\text{CH}_3$ ), 13,8 ( $\text{CH}_2$ ), 124,8; 125,3; 126,1; 128,7; 133,2; 135,9 (Ar), 172,0 ( $\text{COO}^-$ ).

#### 3.2.1.4. Синтеза комплекса паладијума(II) са S-пропил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Pd}(\text{S-pr-thiosal})_2]$

Полазећи од 0,10 g (0,31 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) и 0,12 g (0,61 mmol) S-пропил деривата тиосалицилне киселине на начин описан у одељку 3.2.1.1. синтетисан је  $[\text{Pd}(\text{S-pr-thiosal})_2]$  (**C4**), комплекс жуте боје. Принос: 0,09 g (58,40%).

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3421, 1589, 1541, 1520, 1397, 752.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 0,98 (t, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1,76 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2,84 (t, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 7,20-8,25 (m, 8H, Ar).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 13,2 ( $\text{CH}_3$ ), 22,0 ( $\text{CH}_2$ ), 27,6 ( $\text{CH}_2$ ), 125,1; 126,6; 126,7; 130,5; 134,2; 137,2 (Ar); 172,5 ( $\text{COO}^-$ ).

#### 3.2.1.5. Синтеза комплекса паладијума(II) са S-бутил дериватом тиосалицилне киселине, $[\text{Pd}(\text{S-bu-thiosal})_2]$

Полазећи од 0,10 g (0,31 mmol) калијум-тетрахлоридопаладата(II) и 0,13 g (0,61 mmol) S-бутил деривата тиосалицилне киселине на начин описан у одељку 3.2.1.1. синтетисан је  $[\text{Pd}(\text{S-bu-thiosal})_2]$  (**C5**), комплекс жуте боје. Кристали погодни за рендгенску структурну анализу добијени су прекристалисавањем из система диметилсулфоксид-вода. Принос: 0,09 g (58,43%).

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3419, 1619, 1597, 1399, 1385, 1332, 1306, 1142, 960, 865, 741, 693, 654.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 2,35 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 7,19-8,08 (m, 8H, Ar).  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 14,6 ( $\text{CH}_3$ ), 123,6; 125,1; 125,2; 129,0; 132,7; 135,7 (Ar); 171,8 ( $\text{COO}^-$ ).

### 3.2.2. Синтезе комплекса платине(IV)

#### 3.2.2.1. Синтеза комплекса платине(IV) са S-бензил дериватом тиосалицилне киселине, [PtCl<sub>2</sub>(S-bz-thiosal)<sub>2</sub>]

Раствору добијеном растварањем 0,10 g (0,20 mmol) калијум-хексахлоридоплатината(IV) у 10 mL дестиловане воде лагано се додаје 0,10 g (0,40 mmol) S-бензил деривата тиосалицилне киселине (S-bz-thiosal). Реакциона смеша се загрева на воденом купатилу уз мешање 3 сата. Током овог периода у малим порцијама додаје се раствор LiOH (0,01 g, 0,40 mmol у 10,00 mL дестиловане воде). Настали жути талог комплекса, [PtCl<sub>2</sub>(S-bz-thiosal)<sub>2</sub>] (**C6**) се одвоји цеђењем, испере дестилованом водом и суши на ваздуху. Принос: 0,15 g (58,80%).

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3437, 3062, 3028, 2924, 1629, 1561, 1493, 1463, 1412, 1318, 1254, 1142, 1046, 868, 799, 750, 697, 667, 652, 552. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 4,01 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 7,23-8,24 (m, 18H, Ar и bz). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 17 (CH<sub>2</sub>), 124; 125,5; 127,1; 127,4; 127,7; 133,1; 133,9; 136,2 (Ar и bz); 169,1 (COO<sup>-</sup>).

#### 3.2.2.2. Синтеза комплекса платине(IV) са S-метил дериватом тиосалицилне киселине, [PtCl<sub>2</sub>(S-met-thiosal)<sub>2</sub>]

Раствору добијеном растварањем 0,10 g (0,20 mmol) калијум-хексахлоридоплатината(IV) у 10,00 mL дестиловане воде лагано се додаје 0,07 g (0,40 mmol) S-метил деривата тиосалицилне киселине (S-met-thiosal) и на начин описан у одељку 3.2.2.1. синтетише се комплекс [PtCl<sub>2</sub>(S-met-thiosal)<sub>2</sub>]. Добијени жути талог комплекса [PtCl<sub>2</sub>(S-met-thiosal)<sub>2</sub>] (**C7**) се одвоји цеђењем, испере дестилованом водом и суши на ваздуху. Принос: 0,12 g (56,40%).

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3436, 2923, 2794, 2439, 1634, 1581, 1552, 1469, 1423, 1361, 1290, 1274, 1149, 1116, 1056, 970, 858, 798, 754, 697, 653, 568. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 2,47 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 7,41-8,30 (m, 8H, Ar). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 15,6 (CH<sub>3</sub>), 125; 125,5; 126,4; 129,9; 134,1; 137,2 (Ar), 169,3 (COO<sup>-</sup>).

### 3.2.2.3. Синтеза комплекса платине(IV) са S-етил дериватом тиосалицилне киселине, [PtCl<sub>2</sub>(S-et-thiosal)<sub>2</sub>]

Раствору добијеном растварањем 0,10 g (0,20 mmol) калијум-хексахлоридоплатината(IV) у 10,00 mL дестиловане воде лагано се додаје 0,07 g (0,40 mmol) S-етил деривата тиосалицилне киселине (S-et-thiosal) и на начин описан у одељку 3.2.2.1. синтетише се комплекс [PtCl<sub>2</sub>(S-et-thiosal)<sub>2</sub>]. Добијени жути талог комплекса [PtCl<sub>2</sub>(S-et-thiosal)<sub>2</sub>] (**C8**) се одвоји цеђењем, испере дестилованом водом и суши на ваздуху. Принос: 0,13 g (58,10%).

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3436, 2521, 1692, 1634, 1563, 1437, 1404, 1274, 1143, 1122, 1050, 997, 872, 794, 749, 693, 643, 568. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 1,27 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), 2,81 (q, 4H, CH<sub>2</sub>), 7,42–8,28 (m, 8H, Ar). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 12,9 (CH<sub>3</sub>), 13,8 (CH<sub>2</sub>), 125,1; 126,4; 126,6; 133,3; 133,8; 137,1 (Ar), 169,2 (COO<sup>-</sup>).

### 3.2.2.4. Синтеза комплекса платине(IV) са S-пропил дериватом тиосалицилне киселине, [PtCl<sub>2</sub>(S-pr-thiosal)<sub>2</sub>]

Раствору добијеном растварањем 0,10 g (0,20 mmol) калијум-хексахлоридоплатината(IV) у 10,00 mL дестиловане воде лагано се додаје 0,08 g (0,40 mmol) S-пропил деривата тиосалицилне киселине (S-pr-thiosal) и на начин описан у одељку 3.2.2.1. синтетише се комплекс [PtCl<sub>2</sub>(S-pr-thiosal)<sub>2</sub>]. Настали жути талог комплекса, [PtCl<sub>2</sub>(S-pr-thiosal)<sub>2</sub>] (**C9**) се одвоји цеђењем, испере дестилованом водом и суши на ваздуху. Принос: 0,13 g (56,90%).

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3444, 3061, 2963, 2930, 2873, 2600, 1706, 1639, 1586, 1562, 1461, 1436, 1416, 1293, 1253, 1138, 1091, 1052, 863, 798, 753, 691, 652. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 0,90 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,34 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2,75 (t, 4H, CH<sub>2</sub>), 7,40-8,31 (m, 8H, Ar). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 13,0 (CH<sub>3</sub>), 23,2 (CH<sub>2</sub>), 12 (CH<sub>2</sub>), 125,3; 126,1; 126,4; 133,2; 133,9; 136,9 (Ar), 169,1 (COO<sup>-</sup>).



### 3.2.2.5. Синтеза комплекса платине(IV) са S-бутил дериватом тиосалицилне киселине, [PtCl<sub>2</sub>(S-bu-thiosal)<sub>2</sub>]

Раствору добијеном растварањем 0,10 g (0,20 mmol) калијум-хексахлоридоплатината(IV) у 10,00 mL дестиловане воде лагано се додаје 0,09 g (0,40 mmol) S-бутил деривата тиосалицилне киселине (S-bu-thiosal) и на начин описан у одељку 3.2.2.1. синтетише се комплекс [PtCl<sub>2</sub>(S-bu-thiosal)<sub>2</sub>]. Настали жути талог комплекса, [PtCl<sub>2</sub>(S-bu-thiosal)<sub>2</sub>] (**C10**) се одвоји цеђењем испере дестилованом водом и суши на ваздуху. Принос: 0,14 g (59,30%).

IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3437, 3054, 2956, 2931, 2869, 2629, 1673, 1644, 1635, 1583, 1561, 1462, 1433, 1410, 1318, 1286, 1250, 1137, 1100, 1060, 1049, 916, 863, 754, 738, 698, 652, 551. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 0,89 (t, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,43 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1,60 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 2,73 (t, 4H, CH<sub>2</sub>), 7,41-8,28 (m, 8H, Ar). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 13,4 (CH<sub>3</sub>), 21,5 (CH<sub>2</sub>), 31(CH<sub>2</sub>), 10 (CH<sub>2</sub>), 124,9; 125,9; 126,5; 133,1; 134,2; 136,9 (Ar), 168,9 (COO<sup>-</sup>).

### **3.3. МЕРЕЊА**

#### **3.3.1. Елементална микроанализа**

Елементалне микроанализе (C, H, S) су урађене на апарату Vario III CHNOS Elemental Analyzer на Хемијском факултету Универзитета у Београду.

#### **3.3.2. Инфрацрвена спектроскопија**

Инфрацрвени спектри синтетисаних лиганата и одговарајућих паладијум(II) и платина(IV)-комплекса су снимљени помоћу спектрофотометра Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу.

#### **3.3.3. $^1\text{H}$ и $^{13}\text{C}$ нуклеарно-магнетно-резонанционна спектроскопија**

Снимање нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра синтетисаних једињења извршено је помоћу спектрофотометра Varian Gemini-200 NMR на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу користећи  $\text{D}_2\text{O}$  (за синтетисане лиганде) и  $\text{CDCl}_3$  и  $\text{DMSO-}d_6$  (за одговарајуће комплексе паладијума(II) и платине(IV)) као раствараче. Хемијска померања су дата у односу на триметилсилан (TMS), употребом DDS као инертног стандарда.

### 3.3.4. Рендгенска структурна анализа

#### 3.3.4.1. Рендгенска структурна анализа S-бутил деривата тиосалицилне киселине

Монокристали S-бутил деривата тиосалицилне киселине погодни за рендгенску структурну анализу добијени су спором кристализацијом из система DMSO-вода. Резултати су сакупљени на собној температури помоћу дифрактометра Oxford Diffraction Gemini S опремљен CuK $\alpha$  зрачењем на таласној дужини  $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$  [144]. Подаци су обрађени помоћу CrysAlisPro софтвера. Структура награђеног једињења је решена директном методом применом Sir 97 програма [145] и побољшана full-matrix, least-square процедуром коришћењем SHELXL-97 програма [146]. Лоренцови и поларизациони ефекти су кориговани. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре лиганда дате су у Табели 1.

*Табела 1. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре S-бутил деривата тиосалицилне киселине (S-bu-thiosal)*

Формула	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S	Температура (К)	293
М	210,28	$\Theta$ (°)	4,5-72,2
Кристални систем	Моноклиничан	Сакупљене рефлексije	6832
Просторна група	P2 <sub>1</sub> /c	Независне рефлексije	2038
Величина кристала (mm)	0,33 · 0,28 · 0,21	Посматране рефлексije	1898
a (Å)	8,0732 (3)	R <sub>int</sub>	0,020
b (Å)	19,6769 (4)	(sin $\theta/\lambda$ ) <sub>max</sub> (Å <sup>-1</sup> )	0,597
c (Å)	8,2291 (3)	R[F <sup>2</sup> > 2 $\sigma$ (F <sup>2</sup> )]	0,035
$\beta$ (°)	119,084 (5)	wR(F <sup>2</sup> )	0,100
V (Å <sup>3</sup> )	1142,40 (7)	S	1,06
Z	4	$\rho_{\text{max}}$ (e Å <sup>-3</sup> )	0,20
$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	2,30	$\rho_{\text{min}}$ (e Å <sup>-3</sup> )	-0,16

### 3.3.4.2. Рендгенска структурна анализа *bis*(S-бутил-тиосалицилато)паладијум(II)-комплекса, [Pd(S-bu-thiosal)<sub>2</sub>]

Монокристали *bis*(S-бутил-тиосалицилато)паладијум(II)-комплекса, погодни за рендгенску структурну анализу добијени су спором кристализацијом из система DMSO-вода. Резултати су сакупљени на собној температури помоћу дифрактометра Oxford Diffraction Xcalibur Gemini S користећи MoK $\alpha$  ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ) зрачење [147]. Кристална структура је решена применом директне методе, SIR2002 [148], а утачњена коришћењем програма SHELXL [149]. Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре комплекса дате су у Табели 2.

**Табела 2.** Основни кристалографски подаци и подаци у вези са решавањем и утачњавањем структуре комплекса [Pd(S-bu-thiosal)<sub>2</sub>]

Формула	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub> PdS <sub>2</sub>	V (Å <sup>3</sup> )	4425,7(2)
М	524,95	Z	8
Кристални систем	Орторомбичан	$\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	1,053
Просторна група	Pbca	D <sub>calc</sub> (mg·m <sup>3</sup> )	1,576
Величина кристала (mm)	0,18 · 0,15 · 0,14	$\Theta$ (°)	2,95-29,10
Температура (К)	293(2)	Сакупљене рефлексije	16 607
a (Å)	10,3458(3)	Независне рефлексije	5 257
b (Å)	20,5915(6)	$\rho_{\max}$ (e Å <sup>-3</sup> )	0,682
c (Å)	20,7746(6)	$\rho_{\min}$ (e Å <sup>-3</sup> )	-0,560

## 3.4. БИОЛОШКА МЕРЕЊА

### 3.4.1. *In vitro* антитуморска активност

#### 3.4.1.1. Испитиване ћелијске линије

Цитотоксичност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II) је испитивана на хуманим ћелијским линијама канцера колона (CaCo-2 и HCT-116), хуманим ћелијским линијама карцинома плућа (A549) и фибробластима. CaCo-2 и HCT-116 ћелијске линије су култивисане у медијуму RPMI 1640 (Sigma Aldrich, Munich, Germany), обогаћеним са феталним бовиним серумом (10%), пеницилином (100 IU/mL) и стрептомицином (100 µg/mL). Фибробласти и туморске ћелије A549 су култивисане у комплетном DMEM медијуму (Dulbecco`s Modified Eagles Medium) који садржи: 10% феталног бовиног серума (FBS), 100 IU/mL пеницилина и 100 µg/mL стрептомицина. Ћелије су култивисане у флашковима-T25 (BD Falcon) у стерилним условима у инкубатору са стандардним условима (температура 37°C и процентуални удео угљен-диоксида у ваздуху 5%). Једнослојне субконфлуенте ћелијске културе су пасажирани сваког трећег дана. Укратко, ћелије су након прања у PBS (енгл. Phosphate Buffered Saline-Сони фосфатни пуфер, PAA Laboratories GmbH) прикупљене из флашка третирањем трипсином (0,25% трипсин са хелатором 0,02% EDTA који су растворени у PBS) 2 до 5 минута у инкубатору, како би се одлепиле. Ћелије су после одлепљивања покупљене и пребачене у епрувету која садржи 14 mL комплетног медијума, затим су ресуспендоване и пребачене у 3 нова T25 флашка (по 5 mL у сваки).

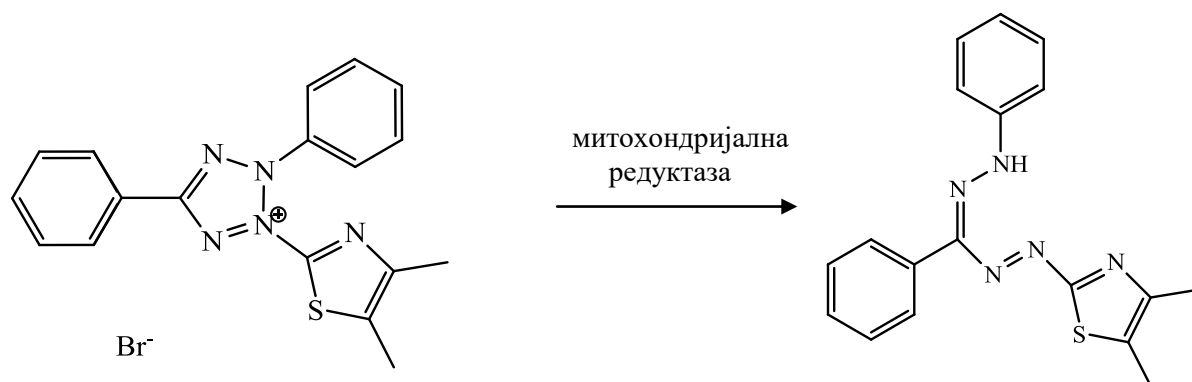
Цитотоксичност комплекса платине је испитивана на мишјим ћелијским линијама хроничне лимфоцитне леукемије (BCL1) и лимфома В ћелија (2PK-3). Туморске ћелије су култивисане у DMEM медијуму са додатком 15% феталног бовиног серума (FBS), 100 IU/mL пеницилина и 100 µg/mL стрептомицина, 2-меркаптоетанола у финалној концентрацији 0,05 mM у инкубатору при стандардним условима (температура 37°C и процентуални удео угљен-диоксида у ваздуху 5%). Ћелије у суспензији су прикупљане и испиране три пута у соном фосфатном пуферу без серума.

Број вијабилних ћелија је одређен искључењем ћелија обојених трипан плавим. Трипан плаво је боја која може да прође само кроз оштећену ћелијску мембрану невијабилних ћелија и боји цитоплазму, док је код вијабилних ћелија ова могућност искључена.

### 3.4.1.2. МТТ колориметријски тест

Ефекат испитиване супстанце одређује се поређењем интензитета боје који дају ћелије излагане само медијуму и интензитета који дају ћелије излагане испитиваној супстанци. Продуковани формазан се раствара у органским растварачима и интензитет боје се одређује спектрофотометријски на таласној дужини од 570 nm.

Цитотоксичност комплекса је одређивана МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум-бромид) тестом [150]. МТТ је кристал жуте боје, растворљив у води, који због позитивног наелектрисања лако пролази кроз ћелијску мембрану. У метаболички активним ћелијама се редукује до несолубилних љубичастих кристала формазана (Слика 45). Митохондријална редуктаза (сукцинат дехидрогеназа), активна само у живим ћелијама, катализује ову реакцију, па је редукција првобитног једињења до формазана директно пропорционална броју живих ћелија.



Слика 45. Понашање МТТ-а у метаболички активним ћелијама

Ћелије у експоненцијалној фази раста прикупљене су из флашка на претходно описани начин. Број ћелија је одређен уз искључење мртвих ћелија тј. ћелија обојених трипан плавим. Трипан плаво је боја која може да прође само кроз оштећену ћелијску мембрану невијабилних ћелија и боји цитоплазму, док је код вијабилних ћелија ова могућност искључена. Ћелије су разблажене до густине  $3 \cdot 10^4$  ћелија/mL. У микротитар плоче са 96 отвора је сипано 100  $\mu$ L (3.000 ћелија) суспензије по отвору. У

посебне отворе је сипан медијум без ћелија како би се одредила оптичка густина самог медијума, бленк. Плоча је преко ноћи инкубирана на температури од 37°C и у присуству 5% CO<sub>2</sub>. За 24 сата су се ћелије полепиле па је медијум одливен и замењен са 100 µL синтетисаног једињења раствореног у комплетном медијуму у концентрацијама 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 7,8; 3,9 µmol/L. Тестирана једињења су растварана у диметилсулфоксиду. За свако разблажење рађен је трипликат. У контролне отворе је поново сипан чист медијум. Плоча је инкубирана 72 сата под истим условима. По истеку 72 сата, из свих отвора је уклоњена течност и додато је по 100 µL чистог DMEM-а са 15% МТТ раствора (5 mg/mL у PBS, Phosphate buffer saline-сони фосфатни пуфер). Плоче су инкубирани још 2 до 4 сата. По истеку инкубације медијум је одливен и у сваки отвор је сипано по 150 µL диметилсулфоксида (Sigma Aldrich, Немачка) и 20 µL глицинског пуфера (pH = 10,5). Плоче су вортексоване до растварања кристала формазана и оптичка густина узорака је мерена мултифункционалним читачем микротитар плоча, Zenyth 3100.

Процент мртвих ћелија је израчунат на основу формуле:

$$\% \text{ цитотоксичности} = 100 - ((E - B) / (K - B) \cdot 100);$$

Е - означава отвор са испитиваним супстанцама;

Б - бленк;

К - отвор са нетретираним ћелијама.

### **3.4.2. *In vitro* антимицробна активност**

#### **3.4.2.1. Тестирани микроорганизми**

Антимицробна активност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и њихових одговарајућих платина(IV)-комплекса је одређена тестирањем на 16 врста бактерија (Табела 3) и 7 врста гљива (Табела 4). Сви клинички изолати патогених бактерија добијени су на поклон од Института за јавно здравље, Крагујевац. Остале врсте су из колекције микроорганизма Лабораторије за микробиологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Бактеријске суспензије и суспензије гљива су припремљене тако што су колоније узимане директно са подлоге и суспендоване у 5 mL стерилног физиолошког раствора. Густина почетне суспензије је подешавана коришћењем дензитометра (DEN-1, BioSan), при чему је вршено упоређивање са 0,5 McFarland стандардом [151]. Почетне суспензије су додатно разблажене у 0,85% стерилном физиолошком раствору у односу 1:100 за бактерије и односу 1:1000 за гљиве.

**Табела 3. Тестиране бактерије**

Тестиране бактерије
Пробиотици
<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832
Грам-позитивне бактерије
<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i>
Грам-негативне бактерије
<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Salmonella enterica</i>
<i>Salmonella typhimurium</i>

**Табела 4. Тестиране гљиве**

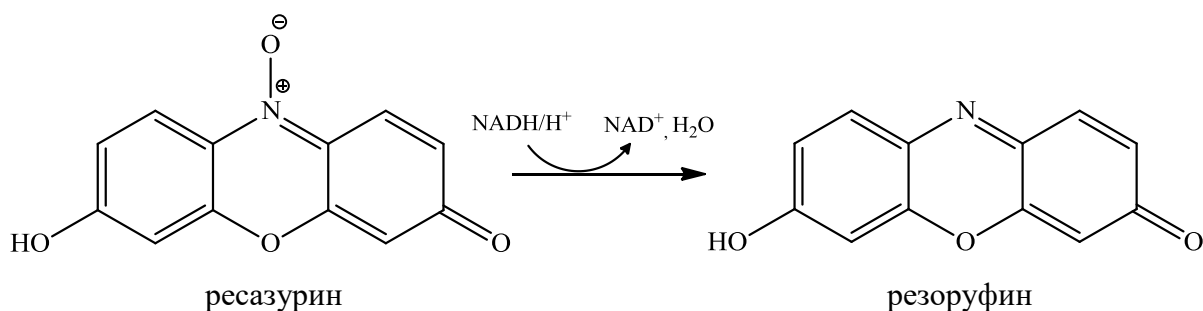
Тестиране гљиве
<i>Candida albicans</i>
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404
<i>Botrytis cinerea</i>



### 3.4.2.2. Микродилуциона метода

Антимикробна активност је тестирана одређивањем минималне инхибиторне концентрације (МИК) и минималне бактерицидне концентрације (МБК) односно фунгицидне концентрације (МФК) употребом микродилуционе методе уз помоћ ресазурина [152].

Коришћена је плоча са 96 отвора у које је стављено по 100  $\mu\text{L}$  хранљиве подлоге, Mueller-Hinton бујон за бактерије и Sabouraud dextrose бујон за гљиве. По 100  $\mu\text{L}$  раствора испитиваних једињења почетне концентрације 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  је додато у први ред микротитрационе плоче. Двоструким разблажењем коришћењем мултиканалне пипете добијени су раствори концентрација ранга од 1000 до 7,81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Затим је додавано по 10  $\mu\text{L}$  суспензија бактерија или гљива. Тестирана једињења су испитана при концентрацији бактерија од  $10^5$  CFU/mL, и концентрацији спора гљива од  $10^3$  CFU/mL. Коначно, у сваки бунарић додат је ресазурин. Ресазурин је индикатор ћелијског раста. У периоду инкубације, ресазурин плаво-љубичасте боје под утицајем оксидоредуктаза живе ћелије прелази у резорурфин розе флуоросцентне боје (Слика 46) [153]. Тако припремљене плоче су инкубиране на  $37^\circ\text{C}$  24 сата. МИК је дефинисана као најнижа концентрација испитиваних супстанци на којој није дошло до промене боје ресазурина из плаве у ружичасту. Резултати су читавани визуелно.



Слика 46. Прелазак ресазурина у резорурфин

Минимална бактерицидна (МБК) односно фунгицидна концентрација (МФК) је одређена пресејавањем 10  $\mu\text{L}$  узорка из бунарића у којима није уочен раст на плочаст агар. Концентрација на којој после периода инкубације није уочен раст дефинисана је као минимална бактерицидна (МБК) односно фунгицидна концентрација (МФК).

Доксициклин и флуконазол су коришћени као позитивна контрола. Концентровани диметилсулфоксид је бактерицидан, па је зато постављена контрола растварача којом је потврђено да 10% диметилсулфоксид нема утицаја на раст микроорганизама. Такође концентрација диметилсулфоксида у експерименту се додатно смањује због серије двоструких разблажења, тако да је концентрација растварача била 5% и нижа. Сваки експеримент садржи контролу раста која подразумева присуство и раст бактерија без тестиране супстанце, контролу стерилности која подразумева одсуство живих бактерија и позитивну контролу која подразумева присуство комерцијалног антибиотика. Сви тестови спроведени су у дупликату антимикробне активности и минимална инхибиторна концентрација је била константна.

### 3.4.3. *In vitro* антибиофилм активност

#### 3.4.3.1. Тестирани микроорганизми

Антибиофилм активност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и њихових одговарајућих платина(IV)-комплекса је одређена тестирањем на 4 врсте бактерија (Табела 5). Клинички изолати патогених бактерија добијени су на поклон од Института за јавно здравље, Крагујевац. Остале врсте микроорганизама су из колекције микроорганизама Лабораторије за микробиологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Хемијске супстанце, бактеријске суспензије и хранљива подлога су припремљене на већ описан начин у поглављима 4.4.2.1. и 4.4.2.2. Једина разлика је коришћење McFarland стандарда број 1. Користе се серијске технике разблажења како би се одредила БИК (биофилм инхибиторна концентрација).

Табела 5. Тестиране бактерије

Тестиране бактерије
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

### 3.4.3.2. *Tissue culture plate* (TCP) тест

TCP тест је најчешће коришћен тест за детекцију формирања биофилма [154]. Свим сојевима испитана је способност формирања биофилма коришћењем TCP методе са неким модификацијама. Сваки тест је укључивао контролу формирања биофилма. Карактеристике формирања бактеријског биофилма су добро описане од стране О'Тооле и сарадника [155].

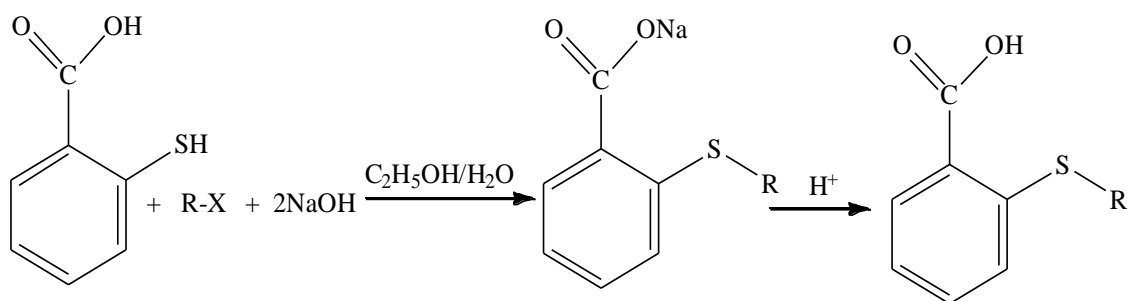
Коришћена је плоча са 96 отвора у које је стављено по 100  $\mu\text{L}$  хранљиве подлоге, Mueller-Hinton бујона за бактерије у сваки отвор. Затим је 10  $\mu\text{L}$  свеже бактеријске суспензије додато у сваки отвор. Инокулисане плоче су инкубирани на 37°C 24 сата за Грам-негативне и 48 сати за Грам-позитивне бактерије. По 100  $\mu\text{L}$  из раствора испитиваних комплекса (концентрације 2000  $\mu\text{g/mL}$ ) је додато у први ред плоче. Затим су направљена серијска двострука разблажења за сваки следећи ред која су додавана одвојено коришћењем муктиканалне пипете. Након 24 сата инкубације садржај сваке од плоча се одбаци, а затим се отвори испирају са 200  $\mu\text{L}$  раствора пуфера (0,15 М амонијум-сулфат, 0,1 М калијум-дихидрогенфосфат, 0,001 М магнезијум-сулфат и 0,034 М натријум-дихидрогенцитрат) због уклањања слободних бактерија. Биофилмови обојене су са кристал виолетом (0,1% w/v) и инкубирани на собној температури 20 минута. Вишак боје је испран са дејонизованом водом, а плоче су фиксиране са 200  $\mu\text{L}$  раствора етанол-ацетон (4:1). Оптичке густине обојених ћелија бактерија одређене су са микро ELISA читачем плоча на таласној дужини од 630 nm. Биофилм инхибиторна концентрација (БИК) је дефинисана као најнижа концентрација сваког комплекса на којој је инхибирано формирање биофилма. Само бујон или бујон са растворима комплекса служили су као контрола због провере стерилности и неспецифичног везивања медијума. Сви тестови спроведени су у дупликату антимикуробне активности и биофилм инхибиторна концентрација је била константна.

## **4. Резултати**

## 4.1. СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА S-АЛКИЛ ДЕРИВАТА ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ И ОДГОВАРАЈУЋИХ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II)

### 4.1.1. Синтеза лиганда и комплекса

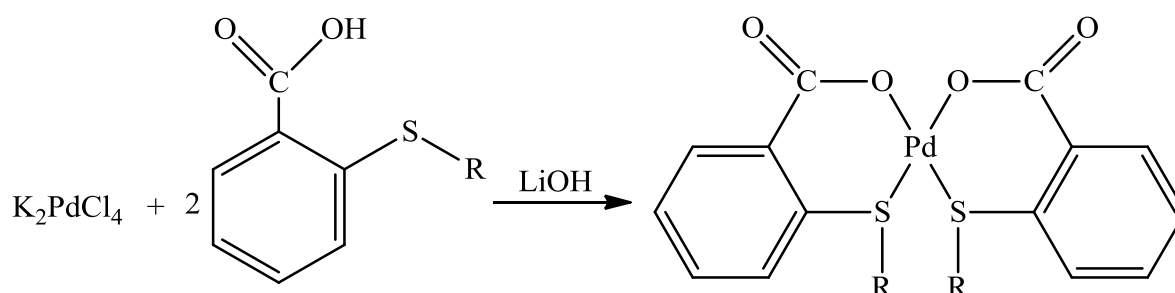
S-алкил деривати тиосалицилне киселине су синтетисани на основу поступка претходно описаног у одељку 4.1.1. реакцијом алкиловања тиосалицилне киселине одговарајућим алкил-халогенидима у базној средини и смеси вода-етанол као растварачу (Шема 7).



R = бензил-(L1), метил-(L2), етил-(L3), пропил-(L4), бутил-(L5)

**Шема 7.** Синтеза S-алкил деривата тиосалицилне киселине

Одговарајући комплекси паладијума(II),  $[Pd(S-R-thiosal)_2]$  добијени су реакцијом калијум-тетрахлоридопаладата(II) и S-алкил деривата тиосалицилне киселине (R = бензил-(L1), метил-(L2), етил-(L3), пропил-(L4), бутил-(L5)) у молском односу 1:2 уз додатак воденог раствора литијум-хидроксида (Шема 8).



R= бензил-(C1), метил-(C2), етил-(C3), пропил-(C4), бутил-(C5)

*Шема 8. Синтеза комплекса паладијума(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине*

#### 4.1.2. Елементалне микроанализе комплекса паладијума(II) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине

Резултати елементалне микроанализе за  $[\text{Pd}(\text{S-bz-thiosal})_2]$ ,

$$M(\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{S}_2\text{Pd}) = 592,98 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	56,71	10,82	3,74
Нађено:	56,43	10,75	3,85

Резултати елементалне микроанализе за  $[\text{Pd}(\text{S-met-thiosal})_2]$ ,

$$M(\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{S}_2\text{Pd}) = 440,67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	43,61	14,52	3,20
Нађено:	43,41	14,21	3,39

Резултати елементалне микроанализе за [Pd(S-et-thiosal)<sub>2</sub>],

$$M(C_{18}H_{18}O_4S_2Pd) = 468,86 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	46,11	13,68	3,87
Нађено:	45,97	13,54	3,93

Резултати елементалне микроанализе за [Pd(S-pr-thiosal)<sub>2</sub>],

$$M(C_{20}H_{22}O_4S_2Pd) = 496,91 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	48,34	12,91	4,46
Нађено:	48,52	12,73	4,11

Резултати елементалне микроанализе за [Pd(S-bu-thiosal)<sub>2</sub>],

$$M(C_{22}H_{26}O_4S_2Pd) = 524,96 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	S (%)	H (%)
Израчунато:	50,33	12,22	4,99
Нађено:	50,52	12,56	4,51

### 4.1.3. Инфрацрвени спектри S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II)

Бидентатно координовање (S-O) лиганада (**L1-L5**) за јон паладијума(II) је очекивана као што је већ документовано у раду Радић и сарадници [30]. Асиметричне валенционе вибрације карбоксилних група изолованих лиганада су уочене на нижим вредностима од очекиваних (1700-1750 cm<sup>-1</sup>), док се положаји ових трака у одговарајућим комплексима (**C1-C5**) налазе се у очекиваној области (1600-1650 cm<sup>-1</sup>) што потврђује њихово депротоновање и координовање за метал. Присуство по две

апсорпционе траке за  $\text{COO}^-$  групе у инфрацрвеним спектрима комплекса **C1** и **C5** указује на мале разлике у енергијама, које су последица присутних великих алкил група (бензил- и бутил-) и њихов стерни утицај на фенил групе из тиосалицилне киселине.

#### **4.1.4. Нуклеарно-магнетно-резонанциони ( $^1\text{H}$ и $^{13}\text{C}$ ) спектри S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II)**

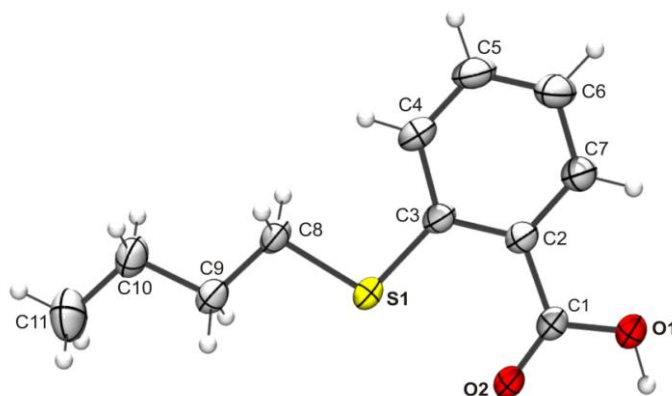
Хемијска померања водоникових и угљеникових атома добијених S-алкил деривата тиосалицилне киселине, као и одговарајућих комплекса паладијума(II), нађена су на очекиваним и скоро истим хемијским померањима што потврђују литературни подаци [30]. Уочене незнатне разлике у хемијским померањима угљеникових атома карбоксилних група S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II) указују на координовање лиганата преко кисеониковог атома из карбоксилне група за паладијум(II)-јон.

На основу инфрацрвених и нуклеарно-магнетно резонанционих спектра добијених алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II) може се закључити да је дошло до бидентатног координовања S-алкил деривата за метални јон. На овај начин није се могла предвидети геометрија награђених паладијум(II)-комплекса.



### 4.1.5. Кристална структура S-бутил деривата тиосалицилне киселине

Рендгенском структурном анализом је потврђена структура S-бутил деривата тиосалицилне киселине (**L5**), као што је приказано на Слици 47.



Слика 47. Структура S-бутил деривата тиосалицилне киселине

Одабране дужине и углови веза у молекулу S-бутил деривата тиосалицилне киселине дати су у Табели 6.

Табела 6. Дужине веза (Å) и углови веза (°) у молекулу S-бутил деривата тиосалицилне киселине

Дужине веза		Углови веза	
S1- C3	1,7593 (18)	C3- S1- C8	103,82 (7)
S1- C8	1,8169 (15)	O2- C1- O1	122,10 (13)
O2- C1	1,216 (2)	O2- C1- C2	123,63 (13)
O1- C1	1,3088 (18)	O1- C1- C2	114,26 (13)
C1- C2	1,479 (2)	C7- C2- C3	120,33 (13)
C2- C7	1,399 (2)	C7- C2- C1	117,66 (14)
C2- C3	1,411 (2)	C3- C2- C1	122,01 (13)
C3- C4	1,404 (2)	C9- C8- S1	107,70 (10)
C4- C5	1,370 (3)	C6- C7- C2	121,00 (17)
C6- C5	1,364 (3)	C11- C10- C9	113,4 (2)
C8- C9	1,513 (3)	C4- C3- C2	116,58 (15)
C7- C6	1,376 (2)	C4- C3- S1	121,52 (13)
C10- C9	1,515 (2)	C2- C3- S1	121,89 (10)
C10- C11	1,507 (4)	C8- C9- C10	112,42 (14)
		C5- C6- C7	118,81 (18)
		C5- C4- C3	121,56 (17)
		C6- C5- C4	121,68 (16)

У табели 7 су представљени торзиони углови у молекулу S-бутил деривата тиосалицилне киселине.

**Табела 7.** Торзиони углови ( $^{\circ}$ ) у молекулу S-бутил деривата тиосалицилне киселине

Торзиони углови	
O2- C1- C2- C7	-179,10 (16)
O1- C1- C2- C7	0,8 (2)
O2- C1- C2- C3	0,8 (2)
O1- C1- C2- C3	-179,33 (14)
C3- S1- C8- C9	-179,50 (11)
C3- C2- C7- C6	1,0 (3)
C1- C2- C7- C6	-179,14 (17)
C7- C2- C3- C4	-1,8 (2)
C1- C2- C3- C4	178,29 (14)
C7- C2- C3- S1	177,09 (12)
C1- C2- C3- S1	-2,8 (2)
C8- S1- C3- C4	-0,56 (15)
C8- S1- C3- C2	-179,45 (12)
S1- C8- C9- C10	176,41 (13)
C11- C10- C9- C8	-177,3 (2)
C2- C7- C6- C5	0,4 (3)
C2- C3- C4- C5	1,4 (3)
S1- C3- C4- C5	-177,57 (15)
C7- C6- C5- C4	-1,0 (3)
C3- C4- C5- C6	0,0 (3)

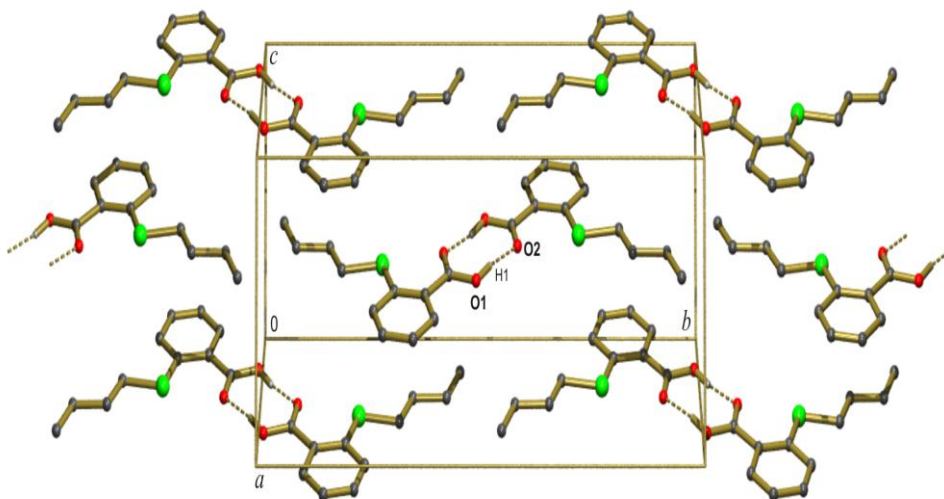
У Табели 8 дате су дужине и углови водоничних веза које стабилизују систем и утичу на начин паковања комплексних јединица у кристалу.

**Табела 8.** Дужине ( $\text{Å}$ ), углови ( $^{\circ}$ ) водоничних веза у молекулу S-бутил деривата тиосалицилне киселине

D-H...A	D-H ( $\text{Å}$ )	H...A ( $\text{Å}$ )	D .....A ( $\text{Å}$ )	$\theta$ ( $^{\circ}$ )
O1-H1....O2 <sup>a</sup>	0,90(3)	1,75(3)	2,634(3)	172(2)

<sup>a</sup>1-x,1-y,1-z

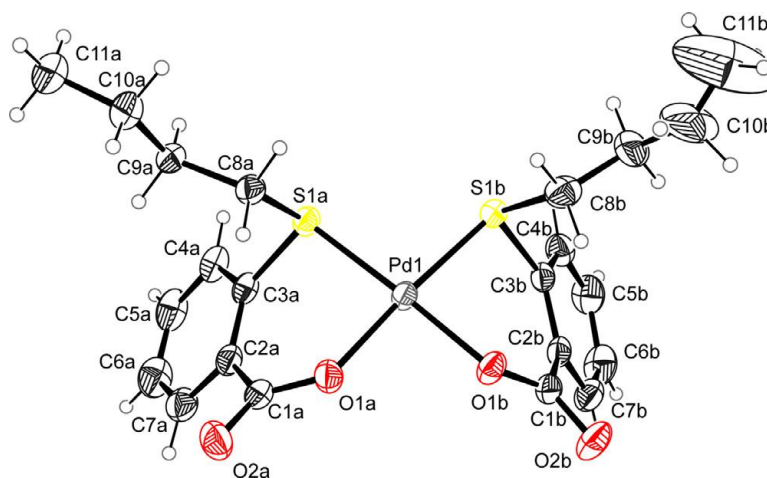
Распоред молекула у јединичној ћелији је приказан на Слици 48 где испрекидане линије представљају водоничне везе које повезују молекуле сваког димера.



Слика 48. Формирање димера *S*-бутил деривата тиосалицилне киселине

#### 4.1.6. Кристална структура *bis*(*S*-бутил-тиосалицилато)паладијум(II)- -комплекса, [Pd(*S*-*bu*-thiosal)<sub>2</sub>]

Кристална структура [Pd(*S*-*bu*-thiosal)<sub>2</sub>] комплекса са обележеним атомима је представљена на Слици 49.



Слика 49. Структура комплекса [Pd(*S*-*bu*-thiosal)<sub>2</sub>]

Одабране дужине и углови веза у  $[Pd(S\text{-}bu\text{-}thiosal)_2]$  комплексу дати су у Табели 9.

**Табела 9.** Дужине веза ( $\text{\AA}$ ) и углови веза ( $^\circ$ ) у молекулу  $[Pd(S\text{-}bu\text{-}thiosal)_2]$

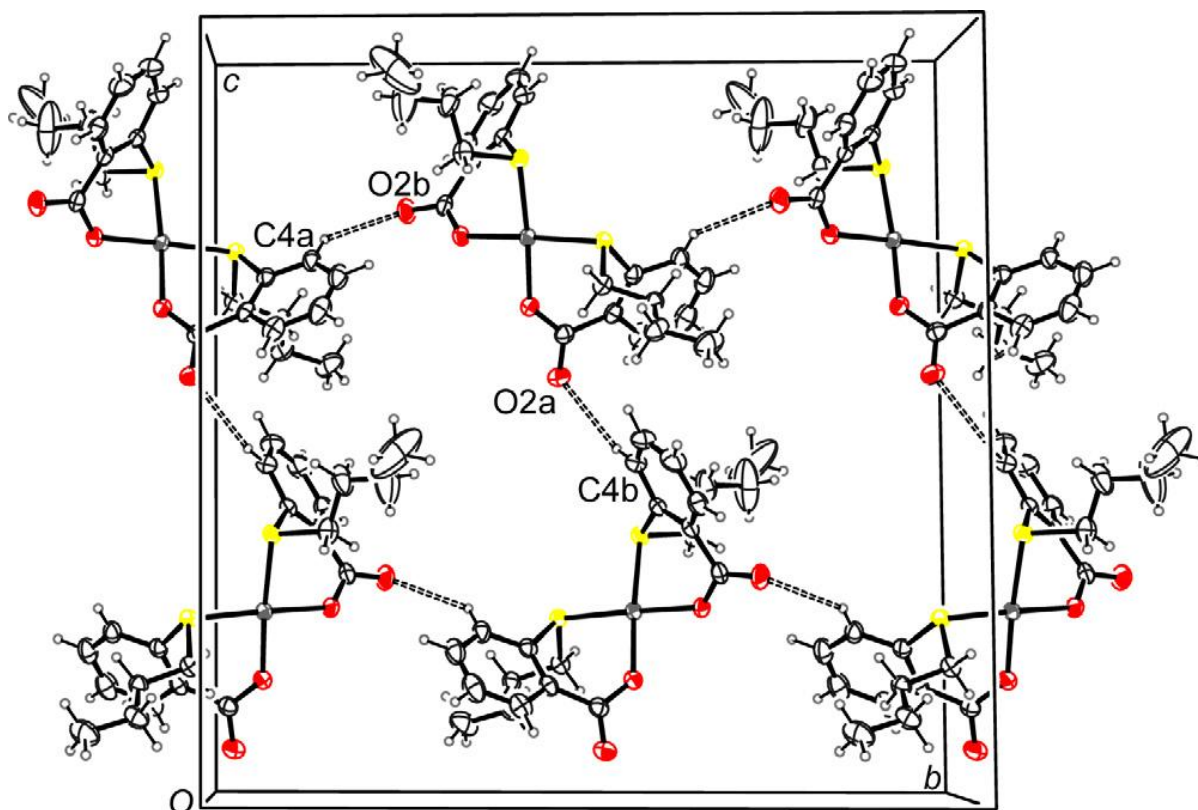
Дужине веза	А	В
Pd1- O1	2,013(3)	2,013(3)
Pd1- S1	2,2526(11)	2,2572(11)
S1- C3	1,784(4)	1,777(4)
S1- C8	1,818(4)	1,822(5)
O1- C1	1,284(5)	1,292(5)
O2- C1	1,216(5)	1,216(5)
C1- C2	1,517(6)	1,503(6)
C2- C3	1,392(6)	1,401(6)
Углови веза	А	В
O1- Pd1- S1	90,75(8)	88,76(9)
Pd1- O1- C1	132,1(3)	126,5(3)
Pd1- S1- C3	102,62(14)	98,88(14)
O1- C1- C2	119,7(4)	118,4(4)
O1- C1- O2	121,9(4)	121,3(4)
C1- C2- C3	125,4(4)	124,7(4)
C2- C3- S1	123,3(3)	123,5(3)
O1a- Pd1- O1b	86,92(11)	
S1a- Pd1- S1b	93,58(4)	
O1a- Pd1- S1b	175,59(8)	
O1b- Pd1- S1a	177,65(9)	

У кристалном паковању, молекули  $[Pd(S\text{-}bu\text{-}thiosal)_2]$  повезани су slabим С-Н...О везама и С-Н... $\pi$  интеракцијама као што се може видети на Слици 50, док су у Табели 10 су приказани важни геометријски параметри водоничних веза и С-Н... $\pi$  интеракција.

**Табела 10.** Геометријски параметри ( $\text{\AA}$ ,  $^\circ$ ) водоничних веза и С-Н... $\pi$  интеракција

D-Н...А	D-Н	D...А	Н...А	D-Н...А
C4a-H4a...O2b <sup>i</sup>	0,93	3,345(6)	2,59	139
C4b-H4b...O2a <sup>ii</sup>	0,93	3,324(6)	2,58	137
C8b-H8b1...O1b <sup>iii</sup>	0,97	3,422(6)	2,47	168
С-Н... $\pi$	С-Н	Н...Cg	Н-Perp	С-Н...Cg
C8a-H8a1...Cg1 <sup>iii</sup>	0,97	2,82	2,78	124
C8a-H8a2...Cg1 <sup>iii</sup>	0,97	3,20	3,02	98
C9a-H9a2...Cg2 <sup>iii</sup>	0,97	3,21	2,68	137

(i)  $-x + 1, y + 1/2, -z + 3/2$ ; (ii)  $-x + 1/2, -y, z + 1/2$ ; (iii)  $x - 1/2, y, -z + 3/2$ .

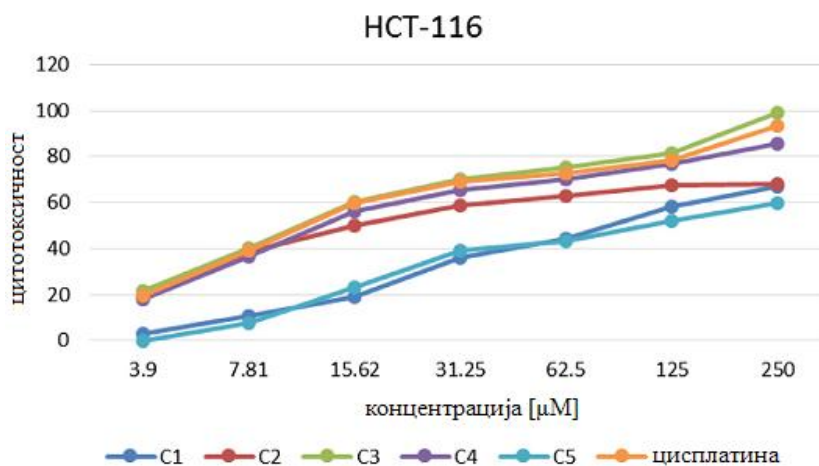


Слика 50. Начин паковања комплекса  $[Pd(S-bu-thiosal)_2]$

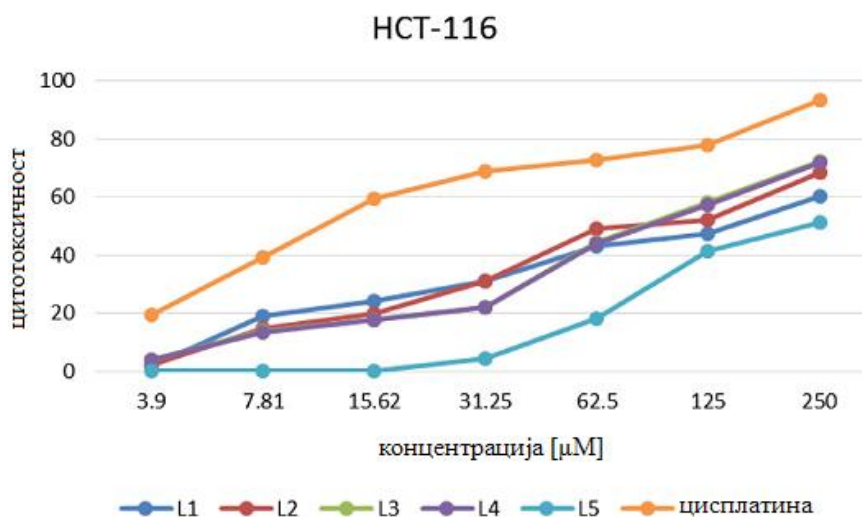
## 4.2. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА ПАЛАДИЈУМА(II) СА S-АЛКИЛ ДЕРИВАТИМА ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ

### 4.2.1. *In vitro* антитуморска активност

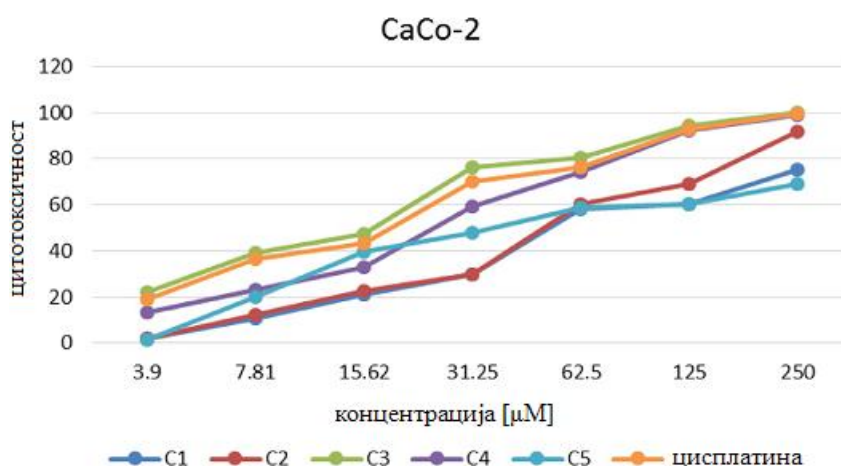
*In vitro* антитуморска активност синтетисаних лиганата и одговарајућих комплекса паладијума(II) испитивана је на ћелијским линијама хуманог тумора колона (HCT-116 и CaCo-2, Сlike 51-56) и тумора плућа (A549, Сlike 57 и 58).



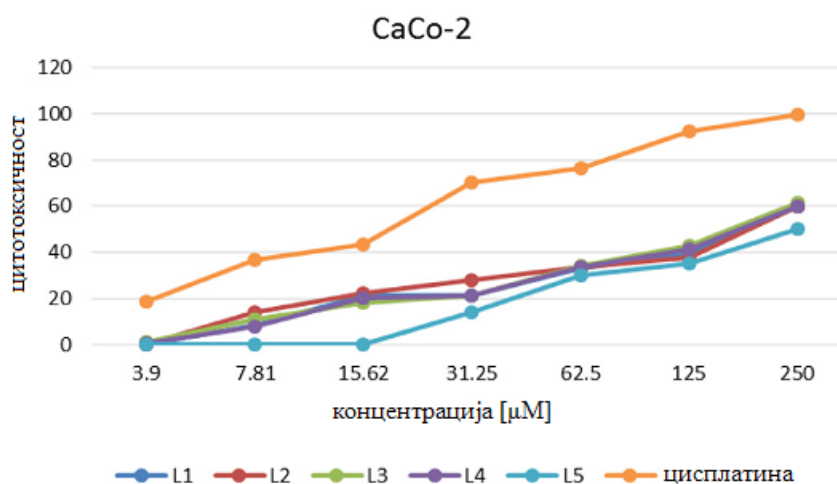
Слика 51. *In vitro* антитуморска активност паладијум(II) комплекса у односу на цисплатину



Слика 52. *In vitro* антитуморска активност лиганда у односу на цисплатину

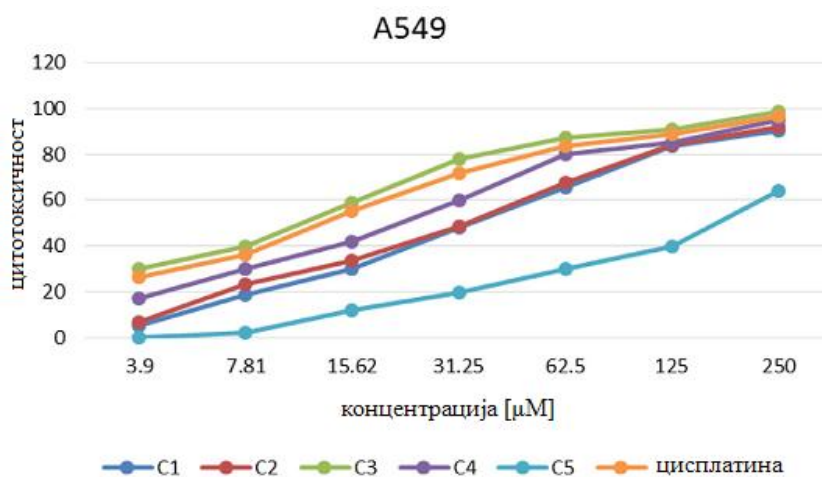


Слика 53. *In vitro* антитуморска активност паладијум(II) комплекса у односу на цисплатину

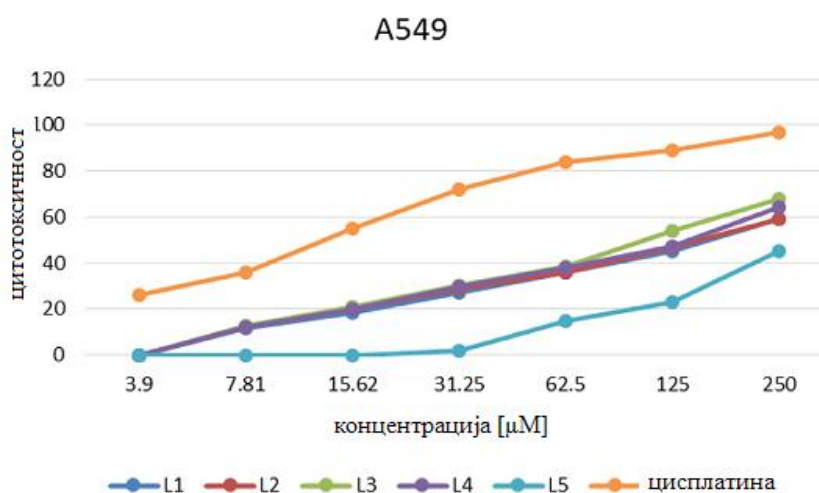


Слика 54. *In vitro* антитуморска активност лиганда у односу на цисплатину

Тестирани комплекси паладијума(II) показују умерену и високу цитотоксичност на ћелијским линијама хуманог тумора колона и плућа док показују ниску активност на фибробластима.

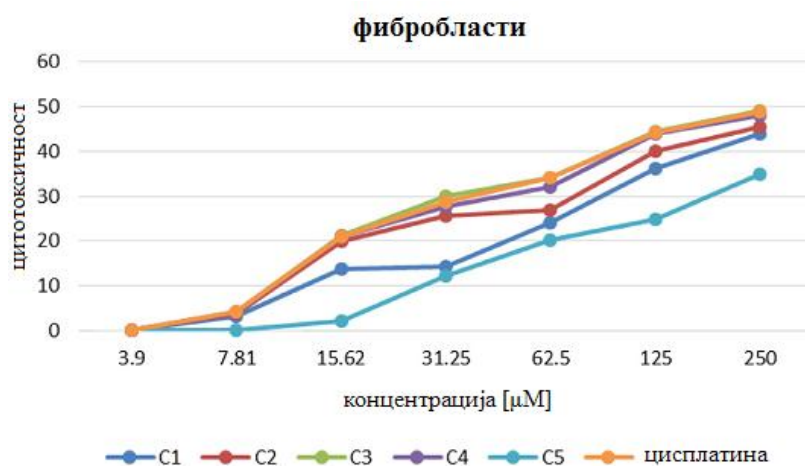


Слика 55. *In vitro* антитуморска активност паладијум(II) комплекса у односу на цисплатину

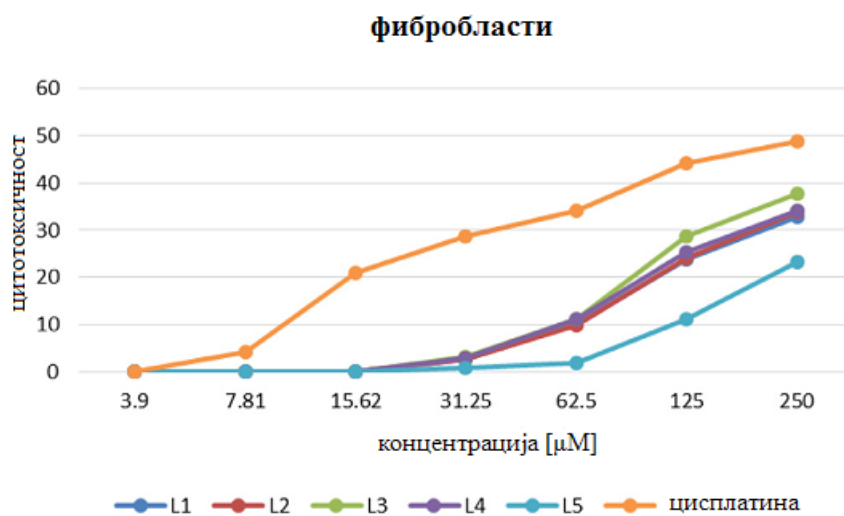


Слика 56. *In vitro* антитуморска активност лиганда у односу на цисплатину





Слика 57. *In vitro* антитуморска активност паладијум(II) комплекса у односу на цисплатину



Слика 58. *In vitro* антитуморска активност лиганда у односу на цисплатину

Резултати  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) вредности испитиваних комплекса, цисплатине и одговарајућих лиганда приказане су у Табели 11.

Цитотоксичност једињења је одређивана МТТ тестом. Анализа вијабилности туморских ћелија указује је да су сви тестирани комплекси (C1-C5) показали цитотоксични ефекат на ћелијским линијама хуманог тумора колона (HCT-116 и CaCo-2) и ћелијским линијама хуманог тумора плућа (A549).

Цитотоксични ефекат је дозно завистан, односно, смањење концентрације тестираних комплекса је праћено значајним повећањем вијабилности туморских ћелија. Тестирани комплекси паладијума(II) показују умерену и високу цитотоксичност на ћелијским линијама хуманог тумора колона и плућа док показују ниску активност на фибробластима.

У поређењу са осталим тестираним комплексима паладијума(II) и цисплатином као стандардом, комплекс C3 је показао највећу активност у свим тестираним концентрацијама и на свим тестираним ћелијским линијама. Вредност IC<sub>50</sub> C3 комплекса је 3-4 пута нижа од IC<sub>50</sub> вредности C4 комплекса паладијума, и чак преко 10-15 пута нижа у поређењу са истим вредностима осталих тестираних комплекса паладијума(II) (Табела 11).

Као што се може видети и у Табели 11 IC<sub>50</sub> вредности C3 комплекса су ниже чак и од стандарда (цисплатине) на свим тестираним ћелијским линијама. Важно је напоменути да је комплекс C3 у концентрацији од 250 µM показао цитотоксичност изнад 98% на свим ћелијским линијама, док је цитотоксичност цисплатине исте концентрације изнад 98% једино на ћелијској линији хуманог тумора колона CaCo-2. Поред тога, проценат мртвих ћелија (HCT-116, CaCo-2 и A549) који износи преко 20% након 72 сата излагања најмањим тестираним концентрацијама (3,9 µM) указује да C3 комплекс поседује потенцијалну антитуморску активност. Редослед цитотоксичне активности испитиваних комплекса паладијума(II) је исти према свим ћелијским линијама и то: C3 > цисплатина > C4 > C2 > C1 > C5.

Важно је напоменути да су сви тестирани лиганди (L1-L5) и сви тестирани комплекси (C1-C5) као и цисплатина показали низак ниво цитотоксичности према фибробластима. Са највишим тестираним концентрацијама (250 µM) поменутих једињења проценат уинулих фибробласта је испод 50, док најмање концентрације (3,9 µM) нису показале цитотоксични ефекат на испитиваној ћелијској линији.

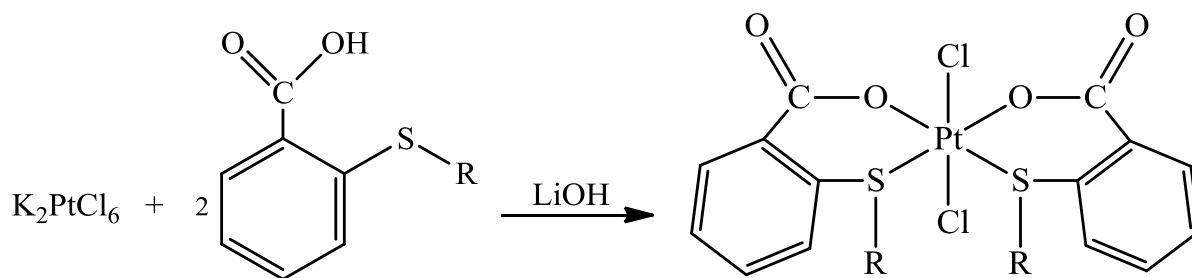
Табела 11.  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) вредности испитиваних комплекса, цисплатине и одговарајућих лиганата одређене МТТ тестом

Једињења	Ћелијске линије			
	НСТ-116	СаСо2	A549	Фибробласти
<b>C1</b>	105,71 ± 18,2	116,48 ± 20,4	77,12 ± 14,7	301,85 ± 39,1
<b>C2</b>	30,31 ± 6,2	91,42 ± 15,8	66,07 ± 12,4	277,69 ± 28,7
<b>C3</b>	2,24 ± 0,3	19,69 ± 3,8	2,14 ± 0,6	217,12 ± 24,8
<b>C4</b>	9,65 ± 1,4	38,47 ± 10,1	43,07 ± 11,9	230,12 ± 31,5
<b>C5</b>	128,16 ± 21,4	110,62 ± 19,8	171,95 ± 25,4	343,37 ± 48,2
<b>Цисплатина</b>	3,06 ± 0,25	21,11 ± 3,28	3,12 ± 0,26	218,25 ± 28,12
<b>L1</b>	184,97 ± 28,4	182,68 ± 27,7	204,58 ± 29,9	415,75 ± 50,7
<b>L2</b>	158,51 ± 23,1	186,21 ± 26,5	198,39 ± 27,4	400,26 ± 51,8
<b>L3</b>	144,31 ± 20,4	180,61 ± 28,4	157,34 ± 22,1	324,19 ± 45,2
<b>L4</b>	147,99 ± 20,5	182,12 ± 27,1	181,74 ± 26,5	384,75 ± 55,7
<b>L5</b>	224,81 ± 32,3	236,6 ± 30,3	288,94 ± 41,1	579,94 ± 65,9

### 4.3. СИНТЕЗА И КАРАКТЕРИЗАЦИЈА КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(IV) СА S-АЛКИЛ ДЕРИВАТИМА ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ

#### 4.3.1. Синтезе комплекса

Комплекси платине(IV) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине  $[PtCl_2(S-R-thiosal)_2]$  добијени су реакцијом калијум-хексахлоридоплатината(IV) и S-алкил деривата тиосалицилне киселине (R = бензил-(L1), метил-(L2), етил-(L3), пропил-(L4), бутил-(L5)) у молском односу 1:2 уз додатак воденог раствора литијум-хидроксида (Шема 9).



R= бензил-(C6), метил-(C7), етил-(C8), пропил-(C9), бутил-(C10)

**Шема 9.** Синтеза комплекса платине(IV) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине

#### 4.3.2. Елементалне микроанализе комплекса платине(IV) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине

Резултати елементалне микроанализе за  $[\text{PtCl}_2(\text{S-bz-thiosal})_2]$ ,

$$M(\text{PtC}_{28}\text{H}_{22}\text{S}_2\text{O}_4\text{Cl}_2) = 752,588 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	H (%)	S (%)
Израчунато:	44,68	2,95	8,52
Нађено:	44,26	2,88	8,60

Резултати елементалне микроанализе за  $[\text{PtCl}_2(\text{S-met-thiosal})_2]$ ,

$$M(\text{PtC}_{16}\text{H}_{14}\text{S}_2\text{O}_4\text{Cl}_2) = 600,404 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	H (%)	S (%)
Израчунато:	32,00	2,35	10,68
Нађено:	31,54	2,59	10,22

Резултати елементалне микроанализе за  $[\text{PtCl}_2(\text{S-et-thiosal})_2]$ ,

$$M(\text{PtC}_{18}\text{H}_{18}\text{S}_2\text{O}_4\text{Cl}_2) = 628,456 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	H (%)	S (%)
Израчунато:	34,40	2,89	10,20
Нађено:	34,14	2,71	10,11

Резултати елементалне микроанализе за  $[\text{PtCl}_2(\text{S-pr-thiosal})_2]$ ,

$$M(\text{PtC}_{20}\text{H}_{22}\text{S}_2\text{O}_4\text{Cl}_2) = 656,508 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	H (%)	S (%)
Израчунато:	36,59	3,38	9,77
Нађено:	36,17	3,30	9,61

Резултати елементалне микроанализе за  $[\text{PtCl}_2(\text{S-bu-thiosal})_2]$ ,

$$M(\text{PtC}_{22}\text{H}_{26}\text{S}_2\text{O}_4\text{Cl}_2) = 684,560 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$$

	C (%)	H (%)	S (%)
Израчунато:	38,60	3,83	9,37
Нађено:	38,35	3,71	9,28

### 4.3.3. Инфрацрвени спектри комплекса платине(IV) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине

Бидентатна координација (S-O) лиганада S-алкил деривата тиосалицилне киселине за платина(IV)-јон је очекивана. Асиметричне валенционе вибрације карбоксилних група изолованих лиганада ( $1674 \text{ cm}^{-1}$  за **L1** и **L2**,  $1682 \text{ cm}^{-1}$  за **L3**,  $1678 \text{ cm}^{-1}$  за **L4** и  $1674 \text{ cm}^{-1}$  за **L5**) су уочене на нижим вредностима од очекиваних ( $1700\text{-}1750 \text{ cm}^{-1}$ ) што би се могло објаснити присуством велике R-S групе у *orto* положају. Положаји ових трака у одговарајућим комплексима (**C6-C10**) налазе се у очекиваној области ( $1600\text{-}1650 \text{ cm}^{-1}$ ) ( $1629 \text{ cm}^{-1}$  за **C6**,  $1634 \text{ cm}^{-1}$  за **C7**,  $1634 \text{ cm}^{-1}$  за **C8**,

1639  $\text{cm}^{-1}$  за **C9** и 1644 и 1635  $\text{cm}^{-1}$  за **C10**) што потврђује њихово депротонавање и координовање за јон метала.

#### 4.3.4. Нуклеарно-магнетно-резонанциони ( $^1\text{H}$ и $^{13}\text{C}$ ) спектри комплекса платине(IV) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине

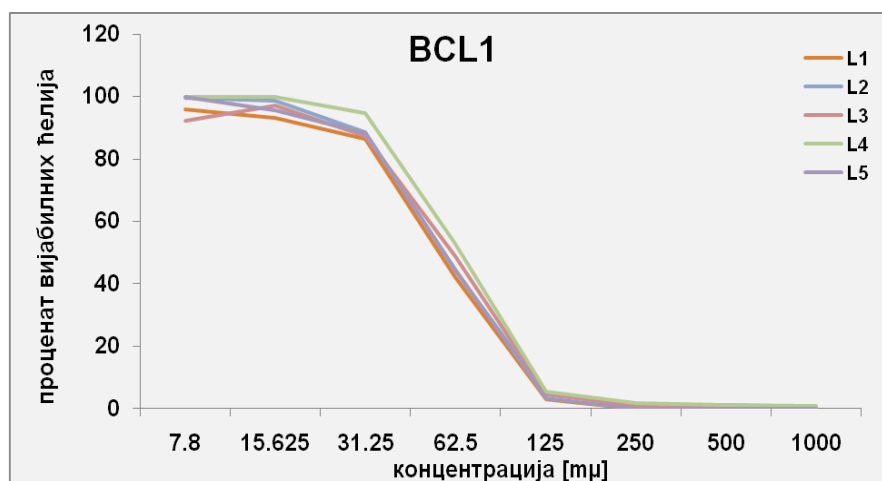
Хемијска померања водоникових и угљеникових атома добијених S-алкил деривата тиосалицилне киселине, као и одговарајућих комплекса платине(IV) нађена су на очекиваним и скоро истим хемијским померањима. Уочене су само незнатне разлике у хемијским померањима угљеникових атома карбоксилних група S-алкил деривата тиосалицилне киселине (167,5 (**L1**); 171,6 (**L2**); 171,4 (**L3**); 171,6 (**L4**); 171,4 ppm (**L5**)) и одговарајућих комплекса платине(IV) (169,1; 169,3; 169,2; 169,1; 168,9 ppm). Овакве разлике у хемијским померањима карбоксилне групе могу се објаснити координовањем лиганада преко кисеониковог атома из карбоксилне група за платина(IV)-јон.

На основу инфрацрвених и нуклеарно-магнетно резонанционих спектра добијених алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса платине(IV) може се закључити да је дошло до бидентатног координовања S-алкил деривата за јон метала. На овај начин није се могла потпуно предвидети геометрија награђених платина(IV)-комплекса. Претпоставља се да је настао најстабилнији и стерно најповољнији геометријски *trans* изомер, али ће потпуно потврђивање оваквих претпоставки уследити тек након решавања кристалне стурктуре награђеног комплекса.

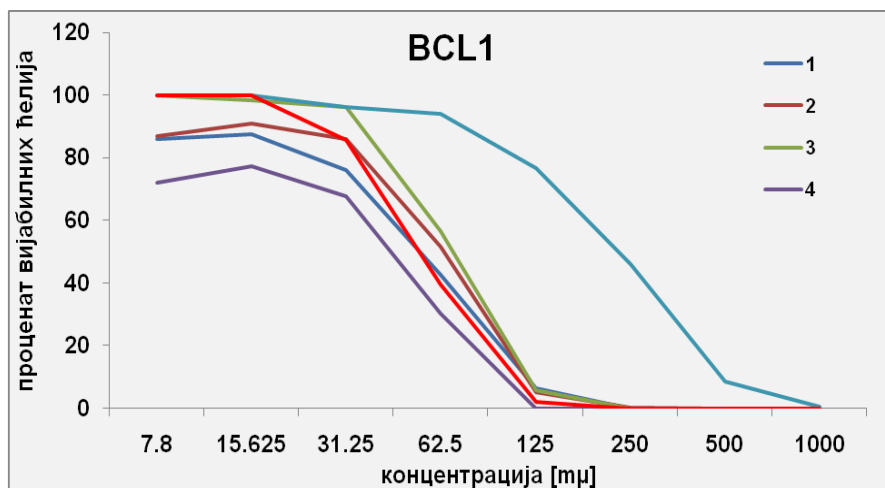
#### 4.4. БИОЛОШКА АКТИВНОСТ КОМПЛЕКСА ПЛАТИНЕ(IV) СА S-АЛКИЛ ДЕРИВАТИМА ТИОСАЛИЦИЛНЕ КИСЕЛИНЕ

##### 4.4.1. *In vitro* антитуморска активност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса платине(IV)

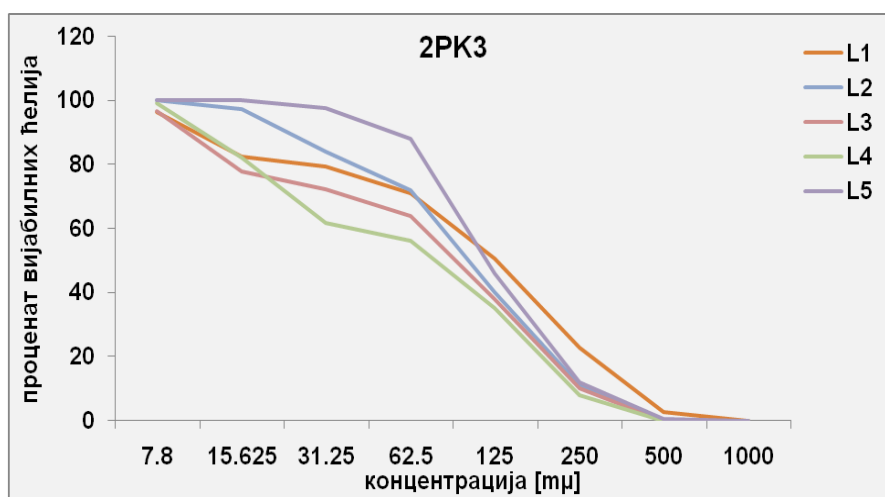
*In vitro* антитуморска активност синтетисаних лиганата и одговарајућих комплекса платине(IV) је испитивана на мишјим ћелијским линијама хроничне лимфоцитне леукемије BCL1 и лимфома В ћелија 2РК-3. Коришћени лиганди су испољили цитотоксични ефекат и на BCL1 и 2РК-3 ћелије. Израженији цитотоксични ефекат лиганди су испољили на BCL1 ћелијској линији (концентрације од 62,5 до 1000  $\mu\text{M}$ ) у поређењу са 2РК-3 ћелијском линијом на којој изазивају значајнију цитотоксичност тек од концентрације 125  $\mu\text{M}$ . Испитивани комплекси платине испољавају значајнији цитотоксични ефекат у поређењу са лигандима. Цитотоксичност комплекса након 72 сата је као и у случају лиганата израженија на BCL1 ћелијској линији. Цитотоксични ефекат је дозно-зависан, смањење концентрације испитиваних једињења праћено је повећањем вијабилности туморских ћелија. Цитотоксични ефекат свих испитиваних комплекса је био сличан цитотоксичном ефекту цисплатине на 2РК-3 ћелијској линији. Комплекси C6-C9 су такође имали сличан цитотоксички ефекат на BCL1 ћелијама као и цисплатина, али је комплекс C10 испољио видно израженију цитотоксичност него цисплатина и то у концентрацијама већим од 15, 625  $\mu\text{M}$ .



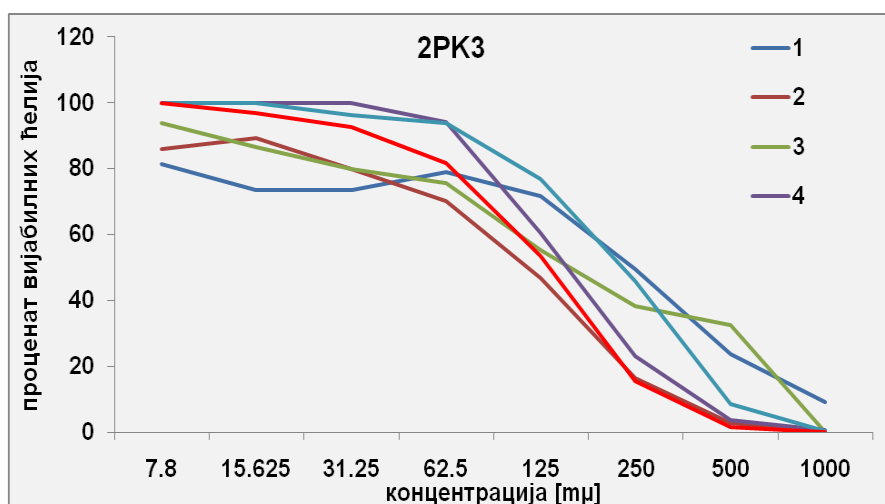
Слика 59. Процент вијабилних ћелија након 72 сата раста у присуству лиганата



Слика 60. Процент вијабилних ћелија након 72 сата раста у присуству одговарајућих комплекса платине(IV)



Слика 61. Процент вијабилних ћелија након 72 сата раста у присуству лигананда



Слика 62. Процент вијабилних ћелија након 72 сата раста у присуству одговарајућих комплекса платине(IV)



#### 4.4.2. *In vitro* антимикуробна активност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса платине(IV)

*In vitro* антимикуробна активност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса платине(IV) испитивана је микродилуционом методом. Резултати показују да су уочене вредности у рангу <7,81 и >1000 µg/mL. Такође је утврђено да су Грам-позитивне бактерије осетљивије од Грам-негативних, док су најмању осетљивост показале гљиве. Када су у питању Грам-позитивне бактерије значајну осетљивост су показале *B. animalis subsp. lactis*, *B. subtilis*, *S. aureus* и *S. aureus* ATCC 25923. Најбољи резултат је уочен код комплекса платине(IV) са S-бензил дериватом тиосалицилне киселине где је МИК вредност на *S. aureus* ATCC 25923 <7,81 µg/mL. Претходно поменут комплекс показује јако деловање и на *B. animalis subsp. lactis* (МИК је 62,5 µg/mL). Минималне инхибиторне концентрације Грам-негативних бактерија се налазе у распону од 250 до >1000 µg/mL. Највећу осетљивост од Грам-негативних бактерија су показале *E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* ATCC 12453 и *P. aeruginosa* (МИК за комплексе платине(IV) са S-метил, S-етил и S-бутил дериватом тиосалицилне киселине износи 250 µg/mL).

Новосинтетисани комплекси платине(IV) са S-алкил дериватима тиосалицилне киселине су показали слабо деловање на испитиваним гљивама. Неки од резултата су у складу са контролом (флуконазол) када се упореде МФК вредности. Резултати показују да су уочене вредности у распону од 500 до 1000 µg/mL.

Резултати *in vitro* испитивања антибактеријске активности S-алкил деривата тиосалицилне киселине (L1-L5) и одговарајућих комплекса платине(IV) (C6-C10) приказани су у Табели 12.

Табела 12. Резултати антибактеријске активности бидентатних лиганада S-алкил деривата тиосалицилне киселине [30] и одговарајућих комплекса платине(IV)

Species	L1[30]		C6		L2[30]		C7		L3[30]		C8	
	МИК <sup>1</sup>	МБК <sup>2</sup>	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК
<i>Lactobacillus plantarum</i>	500	1000	500	1000	500	500	500	1000	500	>1000	500	1000
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	500	500	62,5	125	500	500	125	250	1000	1000	125	250
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	500	500	500	500	500	500	500	>1000	1000	>1000	1000	1000
<i>Bacillus subtilis</i>	500	500	62,5	500	125	500	250	500	1000	>1000	31,25	500
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	500	500	1000	1000	1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	1000
<i>Staphylococcus aureus</i>	250	500	62,5	125	500	>1000	62,5	500	1000	>1000	250	500
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	1000	<7,81	62,5	1000	1000	125	250	1000	1000	125	500
<i>Enterococcus faecalis</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	>1000	>1000	100	1000
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	1000	>1000	500	1000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1000	>1000	250	500	1000	>1000	250	500	>1000	>1000	250	500
<i>Proteus mirabilis</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	1000	1000
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	НТ	НТ	250	500	НТ	НТ	500	500	НТ	НТ	500	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	>1000	500	>1000	500	>1000	250	1000	1000	>1000	250	1000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	500	>1000	1000	1000	500	>1000	1000	1000	500	>1000	1000	>1000
<i>Salmonella enterica</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	1000	>1000	500	1000
<i>Salmonella typhimurium</i>	1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	500	500	1000	1000	500	1000

Табела 12. Резултати антибактеријске активности бидентатних лиганада S-алкил деривата тиосалицилне киселине [30], одговарајућих комплекса платине(IV) и позитивне контроле (доксциклин)(наставка)

Species	L4[30]		C9		L5[30]		C10		Доксициклин	
	МИК <sup>1</sup>	МБК <sup>2</sup>	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК	МИК	МБК
<i>Lactobacillus plantarum</i>	250	>1000	500	1000	1000	>1000	500	500	0,45	7,81
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	500	1000	250	250	1000	1000	250	250	31,25	62,5
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	500	500	1000	1000	1000	>1000	500	1000	1,95	15,63
<i>Bacillus subtilis</i>	500	1000	62,5	500	1000	>1000	62,5	500	0,11	1,95
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1000	>1000	1000	>1000	1000	>1000	1000	>1000	1,95	31,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	250	1000	250	500	1000	>1000	125	500	0,45	7,81
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	1000	125	250	>1000	>1000	125	250	0,22	3,75
<i>Enterococcus faecalis</i>	1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	1000	7,81	62,5
<i>Escherichia coli</i>	1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	7,81	15,63
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1000	>1000	250	500	>1000	>1000	500	500	15,63	31,25
<i>Proteus mirabilis</i>	1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	1000	1000	250	500
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	нт	нт	1000	1000	нт	нт	500	1000	15,63	62,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500	>1000	500	>1000	1000	>1000	250	1000	250	1000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	500	>1000	1000	>1000	500	>1000	1000	>1000	62,5	125
<i>Salmonella enterica</i>	1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000	15,63	31,25
<i>Salmonella typhimurium</i>	1000	>1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000	15,63	125

МИК-минимална инхибиторна концентрација (µg/mL);  
 МБК- минимална бактерицидна концентрација (µg/mL);  
 Антибиотик-доксциклин;  
 нт-нису тестирани

Резултати *in vitro* испитивања антифунгалне активности S-алкил деривата тиосалицилне киселине (L1-L5) и одговарајућих платина(IV)-комплекса (C6-C10) приказани су у Табели 13.

Табела 13. Резултати антифунгалне активности бидентатних лиганата S-алкил деривата тиосалицилне киселине [30] и одговарајућих комплекса платине(IV)

Species	L1[30]		C6		L2[30]		C7		L3[30]		C8	
	МИК <sup>1</sup>	МФК <sup>2</sup>	МИК	МФК	МИК	МФК	МИК	МФК	МИК	МФК	МИК	МФК
<i>Candida albicans</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	нт	нт	>1000	>1000	нт	нт	1000	1000	нт	нт	1000	1000
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	500	1000	500	1000	500	1000	1000	1000
<i>Saccharomyces boulardii</i>	1000	>1000	500	1000	1000	>1000	1000	1000	1000	1000	500	1000
<i>Aspergillus flavus</i>	31,25	250	>1000	>1000	1000	1000	1000	>1000	125	125	>1000	>1000
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	нт	нт	1000	>1000	>1000	>1000
<i>Botrytis cinerea</i>	нт	нт	>1000	>1000	нт	нт	нт	нт	нт	нт	500	500

Табела 13. Резултати антифунгалне активности бидентатних лиганата S-алкил деривата тиосалицилне киселине [30], одговарајућих комплекса платине(IV) и позитивне контроле (флуконазол) (наставак)

Species	L4[30]		C9		L5[30]		C10		Флуконазол	
	МИК <sup>1</sup>	МФК <sup>2</sup>	МИК	МФК	МИК	МФК	МИК	МФК	МИК	МФК
<i>Candida albicans</i>	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	62,5	1000
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	нт	нт	1000	1000	нт	нт	>1000	>1000	нт	нт
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1000	1000	500	1000	500	1000	1000	>1000	62,5	1000
<i>Saccharomyces boulardii</i>	1000	1000	500	1000	500	1000	500	1000	31,25	1000
<i>Aspergillus flavus</i>	125	500	>1000	>1000	125	1000	>1000	>1000	1000	1000
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000	62,5	62,5
<i>Botrytis cinerea</i>	нт	нт	1000	1000	нт	нт	>1000	>1000	нт	нт

МИК-минимална инхибиторна концентрација (µg/mL);

МФК- минимална фунгицидна концентрација (µg/mL);

Антимикотик-флуконазол;

нт-нису тестирани.

### 4.4.3. *In vitro* антибиофилм активност комплекса платине(IV)

Резултати испитивања антибиофилм активности комплекса платине(IV) (C6-C10) приказани су у Табели 14.

**Табела 14.** Резултати антибиофилм активности комплекса платине(IV) и позитивне контроле (доксциклин)

Species	C6	C7	C8	C9	C10	Доксициклин
	БИК					
<i>Staphylococcus aureus</i>	250	62,5	125	500	125	250
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	62,5	1000	250	1000	250
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	1000	>1000	1000	нт	1000	нт
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	1000	1000	1000	1000	2000

БИК-биофилм инхибиторна концентрација ( $\mu\text{g/mL}$ );  
 Антибиотик-доксциклин;  
 нт-нису тестирани.

## **5. Дискусија**

Откриће антитуморских особина цисплатине и сличних комплекса платине је повећало интерес према добијању још ефикаснијих комплекса других јона метала и лиганата. Комплекси метала показали су се значајним у овој области као добра основа за дизајн нових лекова. Велики број геометријских изомера и различити коордионациони бројеви јона метала омогућавају да се подесе како кинетички (брзина измене лиганата) тако и термодинамички (јачина метал-лиганд везе, електродни потенцијал) параметри приликом синтезе нових комплекса.

У циљу добијања што активнијих комплекса избор лиганата игра пресудну улогу, како због препознавања места за које треба комплекс да се веже у циљној ћелији, тако и због редокс процеса у којима учествује лиганд који се евентуално ослободи у ћелији [156, 157].

Тиосалицилна киселина представља лиганд који је изузетно погодан за координовање са различитим јонима метала. Наиме, тиосалицилна киселина посматрајући Луисову теорију поседује, како тврд (кисеоник) тако и мек (сумпор) донорски атом тако да не изненађује чињеница да се може координовати на различите начине са јонима метала. Овај лиганд због сумпора као донорског атома показују велики афинитет везивања за меке Луисове киселине (јоне метала као што су платина(II) и паладијум(II)). Због свега наведеног у овој Докторској дисертацији описане су синтезе S-алкил деривата тиосалицилне киселине (алкил = бензил-(L1), метил-(L2), етил-(L3), пропил-(L4) и бутил-(L5)) и одговарајућих комплекса паладијума(II) (C1-C5) и платине(IV) (C6-C10). Састав награђених једињења потврђен је на основу резултата елементарне микроанализе, као и инфрацрвених и нуклеарно-магнетно-резонанционих спектра. Рендгенском структурном анализом су потврђене претпостављене структуре како лиганата тако и паладијум(II)-комплекса.

Уочено је да S-бутил дериват тиосалицилне киселине кристалише у истом, очекиваном моноклиничком кристалном систему и  $P2_1/c$  просторној групи као и претходно утврђен кристал бензоеве киселине [158]. Разлике између C-C веза у бензеновом прстену налазе се у опсегу 0-0,035 Å, али померање атома угљеника не указује да се прстен може представити искључиво као планаран. Диедарски угао између тиосалицилне- и бутил- групе износи  $-179,50 (11)^\circ$  и указује на ко-планарну геометрију молекула. Димерни облик настао услед интермолекулских водоничних веза између карбоксилних група је такође очекиван. Дужина водоничне везе од 2,634(3) у

кристалној структури S-бутил деривата тиосалицилне киселине је веома слична дужини на пример бензоеве киселине (2,64 Å), сирћетне киселине (2,62(2) Å), никотинске киселине (2,66 Å) или *o*-фталне киселине (2,67(0,05) Å) [158-161]. Разлика између дужина веза O2—C1 и O1—C1 је скоро 0,093 Å, што је знатно више у односу на бензоеву киселину (0,046 Å) али врло слично салицилној киселини (0,1 Å) [162].

Одговарајући комплекси паладијума(II) [Pd(S-R-thiosal)<sub>2</sub>] добијени су реакцијом калијум-тетрахлоридопаладата(II) и S-алкил деривата тиосалицилне киселине у молском односу 1:2 уз додатак воденог раствора литијум-хидроксида. Монокристали *bis*(S-бутил-тиосалицилато)паладијум(II)-комплекса, [Pd(S-bu-thiosal)<sub>2</sub>], погодни за рендгенску структурну анализу добијени су спором кристализацијом из система DMSO-вода. Рендгенска структурна анализа потврђује квадратно-планарну геометрију комплекса. Два молекула S-бутил деривата тиосалицилне киселине координована су бидентатно за паладијум(II)-јон преко сумпора и кисеоника као донорских атома. Координација за јон паладијума је у основи планарна, са максималним одступањем за O1а донорски атом од - 0, 013(1) Å.

Радић и сарадници су у свом раду представили рендгенску структурну анализу комплекса паладијума(II) са S-бензил дериватом тиосалицилне киселине. Уколико упоредимо ова два комплекса ([Pd(S-bz-thiosal)<sub>2</sub>] и [Pd(S-bu-thiosal)<sub>2</sub>]) евидентно је да оба поседују *cis*-квадратно-планарну геометрију, међутим значајно се разликују у просторној оријентацији фенил група и одговарајућих S-алкил супституената. Наиме код комплекса паладијума(II) са S-бутил дериватом тиосалицилне киселине исте врсте бочних остатака заузимају оријентацију са исте стране у односу на PdO<sub>2</sub>S<sub>2</sub> раван, док код комплекса паладијума(II) са S-бензил дериватом тиосалицилне киселине бочни остаци заузимају супротне стране координационе равни. Осим ове структурне разлике остале карактеристике координационих сфера ова два комплекса су јако сличне.

Разлика између *trans*-O-Pd-S углова је много очигледнија у [Pd(S-bu-thiosal)<sub>2</sub>] комплексу, они су нешто ближи линеарности (175,59(8) и 177,65(9)°) него у [Pd(S-bz-thiosal)<sub>2</sub>] комплексу (172,52(15) и 172,77(14)°). Сходно претходно наведеном, комплекс окарактерисан у раду Радић и сарадници ([Pd(S-bz-thiosal)<sub>2</sub>]) поседује веће одступање конститутивних атома у односу на PdO<sub>2</sub>S<sub>2</sub> раван у поређењу са *bis*(S-бутил-тиосалицилато)паладијум(II)-комплексом. Угао C3-S1-C8, који повезује S-супституент са ароматичним делом лиганда, је незнатно мањи у комплексу са S-бутил дериватом (средња вредност 103(1)°) него код комплекса са S-бензил



дериватом (средња вредност  $106(1)^\circ$ ) што указује на мању стерну напетост бочног остатка у првом комплексу [30].

Након дефинитивне потврде структура новосинтетисаних једињења рендгенском структурном анализом следећи корак је обухватио испитивање биолошке активности. Након открића цисплатине и одобрења за њено коришћење у терапији рака, дуго се веровало да *trans*-геометријски изомери комплекса платине генерално не могу имати биолошку активност. Дакле *cis* геометрија одлазећих лиганата сматрала се неопходним предусловом за антитуморску активност. Фарел и сарадници су 1980. године први показали да *trans*-изомери комплекса платине опште формуле  $trans-[PtCl_2L_2]$ , где је L планарни аминокиселински лиганд:  $\gamma$ -пиколин или пиридин (Py) поседују знатно већу цитотоксичну активност у поређењу са својим *cis*-изомерима, у студијама на ћелијама леукемије L1210 [163-165]. У испитивањима на HeLa ћелијама, *trans*-дипиридиндихлороплатина(II)-комплекс је показао четири пута већу цитотоксичност и већи потенцијал индукције апоптозе у поређењу са својим *cis*-изомером [166]. Затим су уследили резултати Колучијине групе којим је потврђена антитуморска активност *trans*-изомера платине са статичним имуностарским лигандом [167]. Заједничка структурна карактеристика за испитиване комплексе платине(II) који су показали одговарајућу антитуморску активност је присуство два монодентатна анјонска лиганда или један бидентатни анјонски лиганд, који су слабо везом координовани за платину. Ови лиганди се у ћелији супституишу са доносним атомима из ДНК молекула. Комплекси код којих су анјонски лиганди јаком везом везани за платину(II) не показују антитуморску активност, док су комплекси са слабо везаним анјонима као што су:  $NO_3^-$  и  $ClO_4^-$  обично изузетно токсични. Платина(II)-аква комплекс испољава антитуморска својства једино у случају када се дозира заједно са засићеним раствором натријум-хлорида, што се објашњава чињеницом да при томе долази до образовања одговарајућег хлоро-комплекса [168].

Међу првим комплексима коришћеним у клиничким испитивањима против тумора били су паладијум(II) аналози цисплатине. Иако првобитни резултати нису били охрабрујући, комплекси паладијума ипак су много шире проучавани. Паладијум(II) деривати су скоро увек показивали нижу антитуморску активност него цисплатина, због њихове велике лабилности [169,76]. Стога је циљ овог истраживања испитивање *in vitro* антитуморске активности синтетисаних лиганата (S-алкил деривата тиосалицилне киселине) и одговарајућих комплекса паладијума(II). Цитотоксичност једињења је одређивана МТТ тестом на ћелијским линијама хуманог тумора колона и

тумора плућа. Анализа вијабилности туморских ћелија указује је да су сви тестирани комплекси паладијума(II) показали цитотоксични ефекат на ћелијским линијама хуманог тумора колона (HCT-116 и CaCo-2) и ћелијским линијама хуманог тумора плућа (A549). Резултати су показали изузетну активност комплекса паладијума(II) са S-етил дериватом тиосалицилне киселине тако да су IC<sub>50</sub> вредности ниже и од цисплатине на свим претходно наведеним ћелијским линијама. Николић и сарадници су у свом раду испитивали *in vitro* антитуморску активност комплекса бакра(II) са претходно наведеним лигандима (S-алкил дериватима тиосалицилне киселине) на ћелијској линији хуманог тумора колона (HCT-116) [170]. Уколико упоредимо резултате можемо приметити да комплекс паладијума(II) са S-етил дериватом тиосалицилне показује знатно бољу активност од комплекса који садржи исти лиганд али бакар(II) као јон метала и то на истој ћелијској линији односно ћелијској линији хуманог тумора колона HCT-116. Наши резултати такође указују да је цитотоксичност комплекса знатно већа у односу на одговарајуће лиганде, чиме је показано да је координовање паладијума(II) са лигандима управо утицало на побољшање активности синтетисаних једињења. На основу резултата рендгенске кристалне анализе примећује се да је јон паладијума "блокиран" координацијом са два лиганда, при чему је молекул више отворен са Pd-S стране него Pd-O, што може бити разлог лакше интеракције са ДНК молекулом, односно, кидање Pd-S везе и финално везивање за ДНК молекул. Анализом наших резултата се може приметити такође да комплекси C1 (комплекс паладијума(II) са S-бензил дериватом тиосалицилне киселине) и C5 (комплекс паладијума(II) са S-бутил дериватом тиосалицилне киселине) показују најнижу цитотоксичност на испитиваним ћелијским линијама. Узевши у обзир њихове структурне карактеристике може се закључити да волуминозне групе као што су у овом случају бензил- и бутил- неповољно утичу на испољавање цитотоксичне активности. У прилог томе иде и чињеница да је најбољи ефекат показао комплекс који као лиганд садржи S-етил дериват тиосалицилне киселине.

Сматрало се да брза измена лиганада онемогућава да паладијум(II)-комплекс стигне до биолошке мете непромењен и да се повећава ризик од неповољних ефеката на биохемијске процесе који се нормално одвијају у ћелијама. Да би се ови проблеми превазишли, неки аутори [86] су предлагали да би употреба хелатних лиганада могла умањити реактивност паладијумовог центра. Успех лекова на бази комплекса метала веома је повезан са избором лиганада, јер од њих зависи реактивност и липофилност,

као и стабилизовање одређених оксидационих стања метала, или могућност супституције [171,172].

Узевши у обзир све претходно поменуто, група аутора са Универзитета у Сиднеју је синтетисала комплексе опште формуле *trans*-Pd(L)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> где L представља планарни амински лиганд. Сврха истраживања је била испитивање активности ових комплекса на ћелијским линијама хуманог карцинома јајника. Увођење волуминозних лиганата је значајно смањило реактивност комплекса, самим тим и узроковало повећање биолошке активности. Међутим и даље је та активност била занемарива у односу на првобитни комплекс цисплатине [173].

У раду Змејковски и сарадника, испитивани су комплекси паладијума(II), платине(II) и платине(IV) са естрима R<sub>2</sub>edda-типа. Одређивана је цитотоксичност на туморској ћелијској линији хумане мијелоидне леукемије K562. Испитивани комплекси паладијума(II) су показали знатно нижу антипролиферативну активност него одговарајући комплекси платине(II) и платине(IV), а то је у складу са већином објављених резултата у литератури. На основу IC<sub>50</sub> вредности може се закључити да је најактивније једињење платине(IV) - [PtCl<sub>4</sub>{(S,S)-iPr<sub>2</sub>eddiP}] око пет пута активнији према K562 ћелијској линији него најактивнији комплекс паладијума(II) [PdCl<sub>2</sub>{(S,S)-Cy<sub>2</sub>eddiP}] према истој ћелијској линији. Комплекс платине(II) који је показао највећу активност према K562 ћелијској линији - [PtCl<sub>2</sub>{(S,S)-iBu<sub>2</sub>eddiP}], је око три пута активнији од истог комплекса паладијума(II) [PdCl<sub>2</sub>{(S,S)-Cy<sub>2</sub>eddiP}], према истој ћелијској линији. Ови резултати управо показују да због лабилности комплекси паладијума(II) испољавају умерену до слабу антитуморску активност у односу на комплексе платине(II) и платине(IV) [174].

*In vitro* антитуморска активност наших синтетисаних лиганата и одговарајућих комплекса платине(IV) је испитивана на мишјим ћелијским линијама хроничне лимфоцитне леукемије BCL1 и лимфома В ћелија 2РК-3. Цитотоксичност једињења је одређивана МТТ тестом. Анализа вијабилности туморских ћелија указује је да су израженији ефекат лиганди испољили на ћелијској линији хроничне лимфоцитне леукемије BCL1 и то у концентрацији од 62,5 μМ, за разлику од ћелијске линије лимфома В 2РК-3 где је ефекат примећен на концентрацији од 125 μМ. Резултати такође указују да су одговарајући новосинтетисани комплекси платине(IV) показали значајнији цитотоксични ефекат у односу на лиганде. Сви лиганди и комплекси су показали израженији ефекат на ћелијској линији хроничне лимфоцитне леукемије BCL1 при чему је комплекс платине(IV) са S-бутил дериватом тиосалицилне киселине

испољио изузетну активност, бољу од стандарда (цисплатине) и то у концентрацијама већим од 15, 625  $\mu\text{M}$ .

Комплекси платине(IV) са лигандима који су деривати етилендиамина су испитани на пет ћелијских линија хуманог карцинома јајника: CN1, A2780, Skov-3, CN1cisR и A2780cisR, од којих су последње две резистентне на цисплатину (6 и 12 пута резистентне). Неки од ових комплекса показују умерену антитуморску активност, али је та активност и даље знатно мања него она коју има цисплатина [175].

Неколико платина(IV) комплекса је испитивано на ћелијским линијама тумора мишијег фибросаркома L929 и хуманог астроцитома U251 [63]. *In vitro* антитуморска активност платина(IV) комплекса са  $R_2\text{eddp}$  лигандима, ( $R = n$ -бутил и  $n$ -пентил),  $[\text{PtCl}_4(\text{R}_2\text{eddp})]$ , је такође испитивана на обе ћелијске линије. Нађено је да је процес ћелијске смрти изазван овим комплексима знатно бржи у односу на онај који је изазван активношћу цисплатине. Истраживања су показала да  $[\text{PtCl}_4(\text{Bu}_2\text{eddp})]$  и  $[\text{PtCl}_4(\text{Pe}_2\text{eddp})]$  изазивају некрозу, посредством кисеоничних радикала, независно од ERK, за разлику од цисплатине која изазива ERK-зависну ћелијску смрт апоптозом без оксидативног стреса [176].

Након што је откривено да је значајно увећан антимикуробни потенцијал једињења која су добијена координовањем антибиотика са јоном платине(II) [166-169], даља истраживања су била усмерена ка платини(IV). Платина(IV)-комплекси имају огроман потенцијал као антиканцерогени агенси, како због високе активности тако и због ниске токсичности, међутим у малој мери се примењују као лекови због брзе редукције којој подлежу у крвотоку. Данас је целокупна пажња усмерена ка комплексима платине(IV) са биоактивним лигандима због могућности оралне примене, као и чињенице да се такви лиганди могу координовати за молекулу ДНК, чак и могућности инхибиције раста бактеријских ћелија [177, 178].

*In vitro* антимикуробна активност S-алкил дериватима тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса платине(IV) испитивана је микродилуционом методом. На основу резултата је утврђено да су Грам-позитивне бактерије осетљивије од Грам-негативних, док су најмању осетљивост показале гљиве. Најбољи резултат је уочен код комплекса са најволуминознијим лигандом (комплекс платине(IV) са S-бензил дериватом тиосалицилне киселине) и то на *Staphylococcus aureus*. Уколико упоредимо резултате комплекса платине(IV) са резултатима одговарајућих лиганата [30] јасно се може приметити да синтетисани комплекси показују бољу антибактеријску активност.

Поред наведених деривата тиосалицилне киселине који су испитивани у овом раду, Gokse и сарадници су синтетисали нитро-фенил-алкил деривате. Антибактеријска активност ових једињења је испитивана на Грам-позитивним бактеријама *S. aureus*, *B. subtilise* и Грам-негативним бактеријама *P. aeruginosa*, *E. coli*, док је антифунгална активност испитивана на *C. albicans*, *C. krusei*. Као контрола антибактеријске активности коришћен је ампицилин, а за антифунгалну активност флуконазол и кетоконазол. Коришћена је микродилуциона метода а резултати су представљени кроз МИК вредности. Забележена је значајна антибактеријска активност деривата 2-[(2-нитро-1-фенил-етил)тио]бензоове киселине према *S. aureus*-у, док је антифунгална активност овог деривата премашила активност кетоконазола као референтног једињења [19].

Остала истраживања ове врсте показују различите ефекте, како због разлике у методи која се користи (диск дифузиона) тако и због велике разноврсности новосинтетисаних молекула који се користе као лиганди. Једно од истраживања је управо било усмерено ка испитивању комплекса који поред платине(IV) садрже и јоне кадмијума(II), при чему је утврђено да МИК вредност за *S. aureus* износи 0,02 µg/mL [136]. Испитивања антибактеријске активности различитих комплекса платине(IV) су спроведена и на бактеријама *Staphylococcus epidermidis* [133], *E. coli* и *S. aureus* [132]. Al-Nasr је показао у свом раду да тестирани комплекси платине(IV) показују бољу активност од лиганада на бактеријским сојевима *E. coli* и *S. aureus*, а такође показују и антигљивичну активност [137]. На истим микроорганизмима новосинтетисани лиганди [138] нису показали антимикуробно дејство, али комплекси са платином у виду полимерних наночестица су показали умерену активност, посебно на микроорганизмима *E. coli* и *A. flavus*. Синтетисани полимери са платином(IV) показују умерену активност, са највећим антибактеријским дејством на *Brucella abortus* и снажан антимикуробни ефекат на *C. albicans* [139]. Поред наведених испитивана је антимикуробна активност и комплекса платине(IV) са асиметричним фероценима као лигандима [140]. Negazy и Gaafar су у свом истраживању тестирали новосинтетисане комплексе платине(IV) на десет патогених бактерија при чему су показали високу ефикасност на свим сојевима укључујући и бактерије *S. aureus* и *B. subtilis* [141], док су комплекси платине(IV) са дитиокарбаматима мање активни на сојевима *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* [135]. Комплекси платине(IV) са тиодиаминима су показали значајну активност и на сојевима *A. flavus* и *E. coli* [42]. Akbor и сарадници су тестирали антибактеријски потенцијал синтетисаних комплекса платине(IV) са

лигандима који садрже дифенолну киселину и указали на значајну антимикуробну активност у поређењу са комплексима који садрже друге јоне метала [134]. Иако се висок антибактеријски потенцијал може понекад објаснити присуством -SH групе у одговарајућем лиганду [142], што може бити случај за комплексе бакра(II) и платине(IV), не може се користити као одговарајуће објашњење за већу антибактеријску активност појединачних комплекса. Када је у питању антибиофилм активност наших комплекса платине(IV) бољи ефекат је показан на Грам-позитивним бактеријама. Најбољи резултат је уочен код комплекса платине(IV) са S-метил дериватом тиосалицилне киселине и то на соју *S. aureus*.

## **6. Закључак**

У овој Докторској дисертацији описане су синтезе S-алкил деривата тиосалицилне киселине (алкил = бензил-(L1), метил-(L2), етил-(L3), пропил-(L4) и бутил-(L5)), као и одговарајућих паладијум(II) и платина(IV) комплекса.

Састав добијених једињења је потврђен на основу резултата елементалне микроанализе, при чему је показано да су експериментално добијене вредности заступљености угљеника, водоника и сумпора у сагласности са теоријски израчунатим вредностима.

На основу инфрацрвених и нуклеарно-магнетно резонанционих спектра добијених алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса паладијума(II) као и комплекса платине(IV) може се закључити да је дошло до бидентатног координовања S-алкил деривата за јон метала. Структура награђених комплекса паладијума(II) је потврђена на основу резултата рендгенске структурне анализе, решавањем кристалне структуре комплекса паладијума(II) са S-бутил дериватом тиосалицилне киселине, који је добијен прекристалисавањем из система диметилсулфоксид-вода.

Испитивањем *in vitro* антитуморске активности награђених једињења показано је да тестирани комплекси паладијума(II) показују умерену и високу цитотоксичност на ћелијским линијама хуманог тумора колона и плућа док показују ниску активност на фибробластима. Цитотоксични ефекат свих лиганата и испитиваних комплекса платине(IV) је био сличан цитотоксичном ефекту цисплатине на 2РК-3 ћелијској линији. Израженији цитотоксични ефекат како лиганди тако и комплекси платине(IV) су испољили на ВСL1 ћелијској линији при чему је комплекс са S-бутил дериватом тиосалицилне киселине испољио изузетну активност, бољу од цисплатине и то у концентрацијама већим од 15, 625  $\mu\text{M}$ .

*In vitro* антимикробна активност S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса платине(IV) испитивана је микродилуционом методом. Утврђено је да су Грам-позитивне бактерије осетљивије од Грам-негативних, док су најмању осетљивост показале гљиве. Најбољи резултат је уочен код комплекса платине(IV) са S-бензил дериватом тиосалицилне киселине где је МИК вредност на *S. aureus* ATCC 25923 <7,81  $\mu\text{g/mL}$ .

Испитивањем *in vitro* антибиофилм активности S-алкил деривата тиосалицилне киселине и одговарајућих комплекса платине(IV) уочен је бољи ефекат на Грам-позитивним бактеријама. Најбољи резултат је показао комплекс платине(IV) са S-метил дериватом тиосалицилне киселине и то на соју *S. aureus*.



## **7. Литература**

1. Vlassopoulos D, Wood SA, Mucci A. Gold speciation in natural waters: II. The importance of organic complexing-Experiments with some simple model ligands. *Geochim Cosmochim Acta*. 1990; 54(6): 1575-86.
2. Rowland CE, Cantos PM, Toby BH, Frisch M, Deschamps JR, Cahill CL. Controlling Disulfide Bond Formation and Crystal Growth from 2-Mercaptobenzoic Acid. *Cryst Growth Des*. 2011; 11(4): 1370-4.
3. Sharma GK, Prasad G, Thapak TR, Bhardwaj A, Raghuwanshi DS. Estimation of thiosalicylic acid using photochemical exchange reaction of sodium nitroprusside. *J Chem Bio Phy Sci Sec*. 2012; 2(4): 1701-16.
4. Allen CFG, MacKay DD. Organic synthesis. *Org Synth*. 1932; 12: 76.
5. Fuks L, Gniazdowska E, Koźmiński P. Tricarbonylrhenium(I) complexes with anionic ligands containing S and O donor atoms-potential radiopharmaceutical precursors. *Polyhedron*. 2010; 29(1): 634-8.
6. Chhakkar AK, Kakkar LR. Extractive-spectrophotometric method for the determination of palladium using thiosalicylic acid and hexylamine. *Fresenius J Anal Chem*. 1993; 347(12): 483-5.
7. Gregory GREC, Jeffery PG. Salicylideneamino-2-thiophenol-a new reagent for the photometric determination of tin: application to the analysis of ores, rocks and minerals. *Analyst*. 1967; 92: 293-9.
8. Gissera MJ, Procopio JR, Sevilla MT, Hernandez L. Copper(II) ion-selective electrodes based on dithiosalicylic and thiosalicylic acids. *Electroanalysis*. 2003; 15(2): 126-32.
9. Aydin M, Arsu N, Yagci Y. One-Component Bimolecular Photoinitiating Systems. *Macromol Rapid Commun*. 2003; 24(12): 718-23.
10. Shader D, Ahluwalia GS, Grosso D. Method of reducing hair growth employing sulfhydryl active compounds. *Unated States Patent*. 1995.
11. Wiener JH, Kloog Y, Wacheck V, Burkhard J. Farnesyl thiosalicylic acid chemosensitizes human melanoma invivo. *J Invest Dermatol*. 2003; 120(1): 1-7.
12. Smalley KSM, Eisen TG. Farnesyl thiosalicylic acid inhibits the growth of melanoma cells through a combination of cytostatic and pro-apoptotic effects. *Int J Cancer*. 2002; 98: 514-22.
13. Haklai R, Weisz MG, Elad G, Paz A, Marciano D, Egozi Y, et al. Dislodgment and accelerated degradation of Ras. *Biochemistry*. 1998; 37(5): 1306-14.

14. Marciano D, Ben-Baruch G, Marom M, Egozi Y, Haklai R, Kloog Y. Farnesyl derivatives of rigid carboxylic acids-inhibitors of ras-dependent cell growth. *J. Med. Chem.* 1995; 38(8): 1267-72.
15. Marom M, Haklai R, Ben-Baruch G, Marciano D, Egozi Y, Kloog Y. Selective inhibition of Ras-dependent cell growth by farnesylthiosalicylic acid. *J Biol Chem.* 1995; 270(38): 22263-70.
16. George J, Afek A, Keren P, Herz I, Goldberg I, Haklai R, et al. Functional inhibition of Ras by S-trans, trans-farnesyl thiosalicylic acid attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation.* 2002; 105(20): 2416-22.
17. Asadi S, Zhang B, Weng Z, Angelidou A, Kempuraj D, Alysandratos KD, et al. Luteolin and thiosalicylate inhibit HgCl<sub>2</sub> and thimerosal- induced VEGF release from human mast cells. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010; 23(4): 1015-20.
18. Elferink JG. Thimerosal: a versatile sulfhydryl reagent, calcium mobilizer, and cell function-modulating agent. *Gen Pharmacol.* 1999; 33(1): 1-6.
19. Gokce M, Utku S, Brrcin E, Ozcelik B, Karaoglu T, Noyanalpan N. Synthesis and in Vitro Antimicrobial and Cytotoxicity Activities of 2-[(2-nitro-1-phenylalkyl)thio]benzoic Acid Derivatives. *Turk J Chem.* 2005; 29: 207-17.
20. Smith DJ, Yap GP, Kelley JA, Schneider JP. Enhanced stereoselectivity of a Cu(II) complex chiral auxiliary in the synthesis of Fmoc-L-γ-carboxyglutamic acid. *J Org Chem.* 2011; 76(6): 1513-20.
21. Huynh HV, Yeo CH, Chew YX. Syntheses, structures, and catalytic activities of hemilabile thioether-functionalized NHC complexes. *Organometallics.* 2010; 29(6): 1479-86.
22. Donleavy JJ, English JJ. The synthesis of some alkamine esters of alkylthiobenzoic acids. *J Am Chem Soc.* 1940; 62(1): 220-1.
23. Shimada S, Li YH, Choe YK, Tanaka M, Bao M, Uchimaru T. Multinuclear palladium compounds containing palladium centers ligated by five silicon atoms. *Proc Natl Acad Sci.* 2007; 104(19): 7758-63.
24. Vasić GP, Glodjović VV, Radojević ID, Stefanović OD, Čomić LjR, Djinović VM, et al. Stereospecific ligands and their complexes. V. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic acid. *Inorganica Chim Acta.* 2010; 363: 3606-10.

25. Ashby MT, Enemark JH. Control of the reactivity and coordination number of a 16-electron complex by  $\pi$ -donating thiolate ligands. *J Am Chem Soc.* 1986; 108(4): 730-3.
26. Karet GB, Kostić NM. Rapid, catalytic hydrolysis of methionine-containing dipeptides by a dinuclear palladium(II) complex having thiolate bridging ligands. *Inorg Chem.* 1998; 37(5): 1021-7.
27. Tzeng BC, Fu FuW, Che CM, Chao HY, Cheung KK, Peng SM. Structures and photoluminescence of dinuclear platinum(II) and palladium(II) complexes with bridging thiolates and 2,2'-bipyridine or 2,2': 6',2" terpyridine ligands. *J Chem Soc Dalton Trans.* 1999; 1017-24.
28. McCaffrey LJ, Henderson W, Nicholson BK, Mackay JE, Dinger MB. Platinum(II), palladium(II), and nickel(II) thiosalicylate complexes. *J Chem Soc Dalton Trans.* 1997; 2577-86.
29. Henderson W, McCaffrey LJ, Nicholson BK. Synthesis and biological activity of platinum(II) and palladium(II) thiosalicylate complexes with mixed ancillary donor ligands. *J Chem Soc Dalton Trans.* 2000; 2753-60.
30. Radić GP, Glođović VV, Radojević ID, Stefanović OD, Čomić LjR, Ratković ZR, et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl derivatives of thiosalicylic acids. Crystal structure of bis(S-benzil-thiosalicylate)-palladium(II) complex, [Pd(S-bz-thiosal)<sub>2</sub>]. *Polyhedron.* 2012; 31:69-76.
31. Gao EJ, Wang KH, Gu XF, Yu Y, Sun YG, Zhang WZ, et al. A novel binuclear palladium complex with benzothiazole-2-thiolate: Synthesis, crystal structure and interaction with DNA. *J Inorg Biochem.* 2007; 101: 1404-9.
32. Nair C, Nigam HL. Some platinum metal complexes of thiosalicylic acid. *Curr Sci.* 1973; 42(14): 495-7.
33. Nair C, Nigam HL. Spectral and magnetic studies on Ni(II), Cu(II), Rh(III), Pd(II), and Pt(II) complexes of thiosalicylic acid. 1974; 12: 769-70.
34. Kumar L, Puthraya KH, Srivastava TS. Neutral mixed-ligand complexes of 2,2'-bipyridinedichloroplatinum(II) with dianionic aromatic chelating ligands as potential photosensitizers. *Inorg Chim Acta.* 1984; 86(3):173-8.
35. Beisheng K, Zhongning C, Hanrong G, Zhongyuan Z, Bomu W, Thomas MCW, et al. Transition metal thiolato complexes as synthons II. Syntheses and structural

- characteristics of bidentate phosphine and bidentate thiolato complexes of cobalt and nickel. *Acta Chim Sinica*.1998; 56(1): 58-67.
36. Henderson W, Nicholson BK. Neutral mixed-ligand complexes of 2,2'-bipyridinedichloroplatinum(II) with dianionic aromatic chelating ligands as potential photosensitizers. *Inorg Chim Acta*. 2003; 346: 7-11.
  37. Iakovidis A, Hadjiliadis N. Complex compounds of platinum(II) and (IV) with amino acids, peptides and their derivatives. *Coord Chem Rev*. 1994; 135-136: 17-63.
  38. Chaloner PA. Palladium and platinum. *Coord Chem Rev*. 1990; 101: 1-250.
  39. Kim KM, Lee YA, Lee SS, Sohn YS. Facile synthesis and structural properties of (diamine)tetracarboxylatoplatinum(IV) complexes. *Inorg Chim Acta*. 1999; 292: 52-6.
  40. Song R, Kim KM, Sohn YS. Synthesis and characterization of novel tricarboxylatoplatinum(IV) complexes. Nucleophilic substitution of (diamine)-tetrahydroxoplatinum(IV) with carboxylic acid. *Inorg Chim Acta*. 2002; 338: 89-93.
  41. Song R, Park SY, Kim YS, Kim Y, Kim SJ, Ahn BT, et al. Synthesis and cytotoxicity of new platinum(IV) complexes of mixed carboxylates. *J Inorg Biochem*. 2003; 96: 339-45.
  42. Mishra AK, Kaushik NK. Synthesis, characterization, cytotoxicity, antibacterial and antifungal evaluation of some new platinum(IV) and palladium(II) complexes of thiodiamines. *Eur J Med Chem*. 2007; 42: 1239-46.
  43. Wilson JJ, Lippard SJ. Synthesis, characterization, and cytotoxicity of platinum(IV) carbamate complexes. *Inorg Chem*. 2011; 50(7): 3103-15.
  44. Rosenberg B, VanCamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 1965; 205: 698.
  45. Pinto AL, Lippard SJ. Binding of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II)(cisplatin) to DNA. *Biochim Biophys Acta*. 1985; 780: 167-80.
  46. Prestayko AW, D'Aoust JC, Issell BF, Crooke ST. Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat Rev*. 1979; 6: 17-39.
  47. Rosenberg B. Some biological effects of platinum compounds. *Platinum Metals Rev*. 1971; 15(2): 42-51.
  48. Alderden RA, Hall MD, Hambley TW. The Discovery and Development of Cisplatin. *J Chem Educ*. 2006; 83(5): 728-33.

49. Sako K, Razack MS, Kalnins I. Chemotherapy for advanced and recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck with high and low dose *cis*-diamminedichloroplatinum. *Am J Surg.* 1978; 136: 529-33.
50. Osieka R, Schmidt CG. *Cis*-diamino-dichloro-platin(II). *Klin. Wochenschr.* 1979; 57: 1249-58.
51. Stoter G, Sleijfer DT, Vendrik CPJ, Schraffordt Koops H, Struyvenberg A, Van Oosterom AT, et al. Combination chemotherapy with *cis*-diammine-dichloro-platinum, vinblastine and bleomycin in advanced testicular non-seminoma. *The Lancet.* 1979; 941-5.
52. Soloway MS, Morris CR, Sudderth B. Radiation therapy and *cis*-diammine-dichloroplatinum(II) in transplantable and primary murine bladder cancer. *Int J Radiation Oncology Biol Phys.* 1979; 5: 1355-60.
53. Soloway MS, Martino C. Prophylaxis of bladder tumor implantation. *Urology.* 1976; 7(1): 29-33.
54. Rajeswarana A, Trojanb A, Burnanda B, Giannelli M. Efficacy and side effects of cisplatin- and carboplatin-based doublet chemotherapeutic regimens versus non-platinum-based doublet chemotherapeutic regimens as first line treatment of metastatic non-small cell lung carcinoma: A systematic review of randomized controlled trials. *Lung Cancer.* 2008; 59: 1-11.
55. Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers.* 2011; 3(1): 1351-1371.
56. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin Nephrotoxicity. *Semin Nephrol.* 2003; 23(5):460-4.
57. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney International.* 2008; 73: 994-1007.
58. Russell JW, Windebank AJ, McNiven MA, Brat DJ, Brimijoin WS. Effect of cisplatin and ACTH<sub>4-9</sub> on neural transport in cisplatin induced neurotoxicity. *Brain Res.* 1995; 676: 258-67.
59. Perez. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer.* 1998; 34 (10): 1535-42.
60. Jakupec MA, Galanski M, Arion VB, Hartinger CG, Keppler BK. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Trans.* 2008; 183-94.
61. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003; 22: 7265-79.

62. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev.* 2007; 33: 9-23.
63. Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Biochemical modulation of cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev.* 2003; 103(3): 645-56.
64. Jordana P, Fonsecab MC. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57: 1229-35.
65. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene.* 2012; 31: 1869-83.
66. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res.* 2001; 478: 23-43.
67. Sherman SE, Gibson D, Wang AHJ, Lippard SJ. X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{d(pGpG)}]. *Science.* 1985; 230: 412-6.
68. Zamble DB, Lippard SJ. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci.* 1995; 20(10): 435-9.
69. Ohndorf UM, Rould MA, He Q, Pabo CO, Lippard SJ. Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature.* 1999; 399: 708-11.
70. Hung JC, Zamble DB, Reardon JT, Lippard SJ, Sancar A. HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91: 10394-8.
71. Eastman A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmac Ther.* 1987; 34: 155-66.
72. Douple EB. *Cis*-diamminedichloroplatinum(II): effects of a representative metal coordination complex on mammalian cells. *Pharmac Ther.* 1984; 25: 297-326.
73. Eastman A, Barry MA. Interaction of *trans*-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation of monofunctional adducts and their reaction with glutathione. *Biochemistry.* 1987; 26(12): 3303-7.
74. Kenneth MC, Costello C, Lippard SJ. Identification and characterization of a novel linkage isomerization in the reaction of *trans*-diamminedichloroplatinum(II) with 5'-d(TCTACGCGTTCT). *Biochemistry.* 1990; 29(8): 2102-10.

75. Walters MJP, Braakhuis BJM, Jacobs-Bergmans AJ, Kegel A, Baan RA, van der Vijgh WJF, et al. The potential of platinum-DNA adduct determination in *ex vivo* treated tumor fragments for the prediction of sensitivity to cisplatin chemotherapy. *Ann Oncol.* 1999; 10: 97-103.
76. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev.* 1999; 99: 2467-98.
77. Hofr C, Brabec V. Thermal and thermodynamic properties of duplex DNA containing site-specific interstrand cross-link of antitumor cisplatin or its clinically ineffective trans isomer. *J Biol Chem.* 2001; 276(13): 9655-61.
78. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol.* 1998; 60(1): 619-42.
79. Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med.* 1993; 117(12): 1208-14.
80. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol.* 2003; 171: 4672-9.
81. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *Brit Med Journal.* 2001; 322: 1536-8.
82. Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci.* 2000; 23(1): 73-87.
83. Butour JL, Wimmer S, Wimmer F, Castan P. Palladium(II) compounds with potential antitumour properties and their platinum analogues: a comparative study of the reaction of some orotic acid derivatives with DNA in vitro. *Chem Biol Interact.* 1997; 104: 165-78.
84. Zhao G, Lin H, Yu P, Sun H, Zhu S, Su X, et al. Ethylenediamine palladium(II) complexes with pyridine and its derivatives: synthesis, molecular structure and initial antitumor studies. *J Inorg Biochem.* 1999; 73: 145-9.
85. Barnham KJ, Djuran MI, Frey U, Mazid MA, Sadler PJ. [Pd(CBDCA-*O,O'*)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]: the Pd<sup>II</sup> analogue of a platinum anticancer drug (CBDCA = cyclobutane-1,1 - dicarboxylate). *J Chem Soc Chem Commun.* 1994; 65.
86. Navarro-Ranninger C, Perez JM, Zamora F, Gonzalez VM, Masaguer JR, Alonso C. Palladium(II) compounds of putrescine and spermine. Synthesis, characterization, and DNA-binding and antitumor properties. *J Inorg Biochem.* 1993; 52: 37-49.
87. Vujić JM, Cvijović M, Kaluđerović GN, Milovanović M, Zmejovski BB, Volarević V, et al. Palladium(II) complexes with R<sub>2</sub>edda derived ligands. Part IV. *O,O'*-dialkyl



- esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid dihydrochloride and their palladium(II) complexes: Synthesis, characterization and *in vitro* antitumoral activity against chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Eur J Med Chem.* 2010; 45(9): 3601-6.
88. Alberto ME, Cosentino C, Russo N. Hydrolysis mechanism of anticancer Pd(II) complexes with coumarin derivatives: a theoretical investigation. *Struct Chem.* 2012; 23: 831-9.
89. Gikas E, Parissi-Poulou M, Kazanis M, Vavagiannis A. Properties of a new fluorescent coumarin derivatization reagent employing molecular modelling techniques. *J Mol Struct.* 2005; 724: 135-42.
90. Amin OH, Al-Hayaly LJ, Al-Jibori SA, Al-Allaf TA. Heterobimetallic complexes of palladium(II) and platinum(II) bridged by the ligand 5-phenyl-1, 3, 4-oxadiazole-2-thione. *Polyhedron.* 2004; 23(11): 2013-20.
91. Tušek-Božić L, Matijašić I, Bocelli G, Calestani G, Furlani A, Scarcia V, et al. Preparation, characterization and activity of palladium(II) halide complexes with diethyl 2-quinolylmethylphosphonate (2-dqmp). X-ray crystal structures of *trans*-[Pd(2-dqmp)<sub>2</sub>X<sub>2</sub>](X= Cl or Br). *J Chem Soc Dalton Trans.* 1991; 2: 195-201.
92. Šmit B, Pavlović RZ, Radosavljević- Mihailović A, Došen A, Ćurčić MG, Šeklić DS, et al. Synthesis, characterization and cytotoxicity of a palladium(II) complex of 3-[(2-hydroxybenzylidene)amino]-2-thioxoimidazolidin-4-one. *J Serb Chem Soc.* 2013; 78(2): 217–27.
93. Nikolis N, Methenitis C, Pneumatikakis G, Fiallo MM. Interactions of the anticancer antibiotic altromycin B with copper(II), palladium(II) and platinum(II) ions and *in vitro* activity of the formed complexes. *J Inorg Biochem.* 2002; 89(1): 131-41.
94. Gomez-Ruiz S, GN Kaluderović, Prashar S, Polo-Ceron D, Fajardo M, Žižak Ž, et al. Cytotoxic studies of substituted titanocene and ansa-titanocene anticancer drugs. *J Inorg Biochem.* 2008; 102: 1558-70.
95. Gomez-Ruiz S, GN Kaluderović, Prashar S, Hey-Hawkins E, Erić A, Žižak Ž, et al. Study of the cytotoxic activity of di and triphenyltin(IV) carboxylate complexes. *J Inorg Biochem.* 2008; 102: 2087-96.
96. Talman EG, Kidani Y, Mohrmann L, Reedijk J. Can Pt(IV)-amine complexes act as 'prodrugs'? *Inorganica Chim Acta.* 1998; 283(1): 251-5.
97. Wong E, Giandomenico CM. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev.* 1999; 99(9): 2451-66.

98. Ellis LT, Er HM, Hambley TW. The influence of the axial ligands of a series of platinum(IV) anti-cancer complexes on their reduction to platinum(II) and reaction with DNA. *Aust J Chem.* 1995; 48(4): 793-806.
99. Kelland LR, Barnard CFJ, Evans IG, Murrer BA, Theobald BRC, Wyer SB, et al. Synthesis and *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of a series of *trans* platinum antitumor complexes. *J Med Chem.* 1995; 38: 3016.
100. Braddock PD, Connors TA, Jones M, Khokhar AR, Melzack DH, Tobe ML. Structure and activity relationships of platinum complexes with anti-tumor activity. *Chem-Biol Interact.* 1975; 11: 145.
101. O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW, In: *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*; Kelland LR, Farrell NP, Ed.; *Cancer Drug Discovery and Development*; Humana Press: New Jersey, USA, 2000, 231.
102. McKeage MJ, Mistry P, Ward J, Boxall FE, Loh S, O'Neill C, et al. A phase I and pharmacology study of an oral platinum complex, JM216: dose-dependent pharmacokinetics with single-dose administration. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995; 36: 451-8.
103. Judson I, Cerny T, Epelbaum R, Dunlop D, Smyth J, Schaefer B, et al. A Phase II trial of the oral platinum complex JM216 in non-small-cell lung cancer: An EORTC early clinical studies group investigation. *Ann Oncol.* 1997; 8: 604-6.
104. Choi S, Filotto C, Bisanzo M, Delaney S, Lagasee D, Whitworth JL, et al. Reduction and anticancer activity of platinum(IV) complexes. *Inorg Chem.* 1998; 37(10): 2500-4.
105. Chaney SG, Wyrick S, Till GK. *In vitro* biotransformations of tetrachloro (d,l-*trans*)-1,2-diaminocyclohexaneplatinum(IV)(tetraplatin) in rat plasma. *Cancer Res.* 1990; 50(15): 4539-45.
106. Pendyala L, Cowens JW, Chheda GB, Dutta SP, Creaven PJ. Identification of cis-dichloro-bis-isopropylamine platinum (II) as a major metabolite of iproplatin in humans. *Cancer Res.* 1988; 48(12): 3533-6.
107. Eastman A. Glutathione-mediated activation of anticancer platinum(IV) complexes. *Biochem Pharmacol.* 1987; 36(23): 4177-8.
108. Kido Y, Khokhar AR, Siddik ZH. Glutathione-mediated modulation of tetraplatin activity against sensitive and resistant tumor cells. *Biochem Pharmacol.* 1994; 47(9): 1635-42.

109. Pendyala L, Creaven PJ, Perez R, Zdanowicz JR, Raghavan D. Intracellular glutathione and cytotoxicity of platinum complexes. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995; 36(4): 271-8.
110. Kagayama N, Sekiguchi M, Inada Y, Takagi HD, Fanahashi S. Mechanistic study of the reaction of L-ascorbic acid with hexacyanometalate(III) ions of iron(III), ruthenium(III), and osmium(III) in aqueous acidic solution at elevated pressures. *Inorg Chem.* 1994; 33(9): 1881-5.
111. Blatter EE, Vollano JF, Krishnan BS, Dabrowiak JC. Interaction of the antitumor agents *cis*, *cis*, *trans*-Pt<sup>IV</sup>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub> and *cis*, *cis*, *trans*-Pt<sup>IV</sup>[(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHNH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub> and their reduction products with PM2 DNA. *Biochemistry.* 1984; 23(21): 4817-20.
112. Švabić-Vlahović M, Savić B, Ranin L, Đukić S, Berger-Jekić O, Nedeljković M, Stepanović S. *Medicinska bakteriologija.* 2008, drugo izdanje, Savremena administracija a.d., Beograd.
113. Simić D. *Mikrobiologija I.* 1988. Beograd: Naučna knjiga
114. Sikkema J, De Bont JA, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.* 1995; 59(2): 201-22.
115. Denyer SP, Stewart GSAB. Mechanisms of action of disinfectants. *Int Biodeterior Biodegradation.* 1998; 41(3): 261-8.
116. Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(15): 6300-8.
117. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology: an introduction.* 7th ed. Pearson Education, San Francisco, CA 2002
118. Nevas M, Korhonen AR, Lindström M, Turkki P, Korkeala H. Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *J Food Prot.* 2004; 67(1): 199-202.
119. Madigan MT, Clark DP, Stahl D, Martinko JM. *Brock Biology of Microorganisms* 13th edition. Benjamin Cummings. 2010.
120. Milanov D, Ašanin R, Vidić B, Krnjajić D, Petrović J. Biofilm - organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima. *Arhiv veterinarske medicine* 2008; 1(2): 5-15.
121. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2):167-93.

122. Lappin-Scott HM, Claude E, Zobell – his life and contributions to biofilm microbiology in proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. 1999.
123. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56: 187-209.
124. Flemming H-C, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *J Bacteriol.* 2007; 189(22): 7945-7.
125. Dreeszen, PH. Biofilm: The Key to Understanding and Controlling Bacterial Growth in Automated Drinking Water Systems. Edstrom Industries, Waterford, 2003.
126. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol.* 1993; 75(6): 499-511.
127. Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol.* 1998; 42(1): 9-27.
128. Vieira LMM, de Almeida MV, Lourenço MCS, Bezerra FAF, Fontes APS. Synthesis and antitubercular activity of palladium and platinum complexes with fluoroquinolones. *Eur J Med Chem.* 2009; 44(10): 4107-11.
129. Vieira LMM, de Almeida MV, de Abreu HA, Duarte HA, Grazul RM, Fontes APS. Platinum(II) complexes with fluoroquinolones: Synthesis and characterization of unusual metal–piperazine chelates. *Inorg Chim Acta.* 2009; 362(6): 2060-4.
130. Chartone-Souza E, Loyola TL, Bucciarelli-Rodriguez M, de BC Menezes M ã, Rey NA, Pereira-Maia EC. Synthesis and characterization of a tetracycline–platinum (II) complex active against resistant bacteria. *J Inorg Biochem.* 2005; 99(5): 1001-8.
131. Guerra W, Silva IR, Azevedo EA, Monteiro ARDS, Bucciarelli-Rodriguez M, Chartone-Souza E, et al. Three new complexes of platinum(II) with doxycycline, oxytetracycline and chlortetracycline and their antimicrobial activity. *J Braz Chem Soc.* 2006; 17(8): 1627-33.
132. Mishra AK, Mishra SB, Manav N, Saluja D, Chandra R, Kaushik NK. Synthesis, characterization, antibacterial and cytotoxic study of platinum(IV) complexes. *Bioorg Med Chem.* 2006; 14(18): 6333-40.
133. Mishra AK, Mishra SB, Manav N, Kumar R, Chandra R, Saluja D, et al. Platinum(IV) thiohydrazide, thiodiamine and thiohydrazone complexes: A spectral, antibacterial and cytotoxic study. *Spectrochim Acta A.* 2007; 66(4): 1042-7.
134. Akbor MA, Islam MS, Akhter N, Ahmed S, Siraj S. Studies on antibacterial and antifungal activities and minimum inhibitory concentrations of mixed ligand

- transition metal complexes of dibasic acids as primary and heterocyclic bases as secondary ligands. *Bangladesh J of Sci and Ind Res.* 2011; 46(3): 365-8.
135. Manav N, Mishra AK, Kaushik NK. *In vitro* antitumour and antibacterial studies of some Pt(IV) dithiocarbamate complexes. *Spectrochim Acta A.* 2006; 65(1): 32-5.
136. Al-Hasani AMR. Preparation, structural and antimicrobial studies of a new bimetallic complexes involving a new schiff and mannich bases. *Journal of Al-Nahrain University.* 2007; 10(2): 39-49.
137. Al-Nasr AKA, Ramadan RM. Spectroscopic studies and biological activity of some transition metal complexes of unusual Schiff base. *Spectrochim Acta A.* 2013; 105: 14-9.
138. Elhusseiny AF, Hassan HHAM. Antimicrobial and antitumor activity of platinum and palladium complexes of novel spherical aramides nanoparticles containing flexibilizing linkages: Structure–property relationship. *Spectrochim Acta A.* 2013; 103: 232-45.
139. Nartop D, Sari N, Ögütçü H. Pt(IV) Complexes with polystyrene-bound schiff bases as antimicrobial agent: synthesis and characterization. *Proceedings of world academy of science, engineering and technology.* No. 78. World Academy of Science, Engineering and Technology (WASET), 2013.
140. Hegazy WH. Synthesis of organometallic-based biologically active compounds: *In vitro* antibacterial and antifungal of asymmetric ferrocene-derived schiff-bases chelates. *Int Res J Pure Appl Chem.* 2012; 2(3): 170.
141. Hegazy WH, Gaafar M. Synthesis, characterization and antibacterial activities of new Pd(II) and Pt(IV) complexes of some unsymmetrical tetradentate schiff bases. *J Am Chem Soc.* 2012; 2(3): 86.
142. Reddy PM, Shanker K, Rohini R, Ravinder V. Antibacterial active tetraaza macrocyclic complexes of chromium (III) with their spectroscopic approach. *Int J Chem Tech Res.* 2009; 1: 367-72.
143. Jevtic VV, Radic GP, Stefanovic OD, Radojevic ID, Vasic S, Comic LjR, et al. Part XXIII. Synthesis and characterization of platinum(IV) complexes with *O,O'*-dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-methyl)butanoic acid and bromido ligands. Antimicrobial, antibiofilm and antioxidant screening. *Inorg Chim Acta.* 2016; 442: 105-10.
144. Agilent, CrysAlis PRO, Agilent Technologies, Yarnton, Oxfordshire, England (2010).

145. Altomare A, Burla MC, Cavalli M, Cascarano G, Giacovazzo C, Gagliardi A, et al. SIR97: a new tool for crystal structure determination and refinement. *J Appl Cryst.* 1999; 32: 115-9.
146. Sheldrick GM. SHELXS-97 and SHELXL-97. Programs for solution and refinement of crystal structures from diffraction data, University of Göttingen, Germany, 1997. *Acta Crystallogr.* 2008; 64: 112-22.
147. CrysAlisPro, Oxford Diffraction, Ltd., Abington, England, Version 1.171.36.24.
148. Burla MC, Camalli M, Carrozzini B, Cascarano GL, Giacovazzo C, Polidori G, et al. *J Appl Crystallogr.* 2003; 36: 1103.
149. Sheldrick GM. *Acta Crystallogr.* 2008; 64: 112.
150. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
151. Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method. *J. Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 60-76.
152. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 2007; 42(4): 321-4.
153. Banfi E, Scialino G, Monti-Bragadin C. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52(5): 796-800.
154. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985; 22: 996-1006.
155. O'Toole G, Kaplan HB and Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54: 49-79.
156. Kostova I. Platinum complexes as anticancer agents. Recent patents on anti-cancer drug discovery. 2006; 1(1): 1-22.
157. Romero-Canelón I, Sadler PJ. Next-generation metal anticancer complexes: multitargeting via redox modulation. *Inorg Chem.* 2013; 52(21): 12276-91.
158. Sim GA, Robertson JM, Goodwin TH. The crystal and molecule structure of benzoic acid. *Acta Cryst.* 1955; 8: 157-64.
159. Jones RE, Templeton DH. The crystal structure of acetic acid. *Acta Cryst.* 1958; 11: 484-8.

160. Wright WB, King GSD. The crystal structure of nicotinic acid. *Acta Cryst.* 1953; 6: 305-17.
161. Van Schalkwyk TGD. The crystal structure of phthalic acid. *Acta Cryst.* 1954; 7: 775.
162. Cohran W. The Crystal and Molecular Structure of Salicylic Acid, *Acta Cryst.* 1953; 6: 260.
163. Lippert B. Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug. *Helv Chim Acta.* 1999; 4-27.
164. Farrell N, Ha TTB, Souchard JP, Wimmer FL, Cros S, Johnson NP. Cytostatic *trans*-platinum(II) complexes. *J Med Chem.* 1989; 32: 2240-1.
165. Farrell N, Kelland LR, Roberts JO, Van Beusichem M. Activation of the *trans* geometry in platinum antitumor complexes: a survey of the cytotoxicity of *trans* complexes containing planar ligands in murine L1210 and human tumor panels and studies on their mechanism of action. *Cancer Res.* 1992; 52: 5065.
166. Arandjelovic S, Tesic Z, Juranic Z, Radulovic S, Vrvic M, Potkonjak B, et al. Antiproliferative activity of some *cis*-/*trans*-platinum(II) complexes on HeLa cells. *J Exp Clin Canc Res.* 2002; 21(4): 519-26.
167. Leng M, Locker O, Giraud-Panis MJ, Schwart A, Intini FP, Natile G, et al. Replacement of an NH<sub>3</sub> by an iminoether in transplatin makes an antitumor drug from an inactive compound. *Mol Pharmacol.* 2000; 58: 1525.
168. Reedijk J. The relevance of hydrogen bonding in the mechanism of action of platinum antitumor compounds. *Inorg Chim Acta.* 1992; 198-200: 873-81.
169. Ruiz J, Lorenzo J, Sanglas L, Cutillas N, Vicente C, Villa MD, et al. Palladium(II) and platinum(II)organometallic complexes with the model nucleobase anions of thymine, uracil, and cytosine: antitumor activity and interactions with DNA of the platinum compounds. *Inorg Chem.* 2006; 45(16): 6347-60.
170. Nikolić MV, Mijajlović MŽ, Jevtić VV, Ratković ZR, Novaković SB, Bogdanović GA, et al. Cytotoxicity of copper(II)-complexes with some S-alkyl derivatives of thiosalicylic acid. Crystal structure of the binuclear copper(II)-complex with S-ethyl derivative of thiosalicylic acid. *J Mol Struct.* 2016; 1116: 264-71.
171. Ray S, Mohan R, Singh JK, Samantaray MK, Shaikh MM, Panda D, et al. Anticancer and antimicrobial metallopharmaceutical agents based on palladium,

- gold, and silver N-heterocyclic carbene complexes. *J Am Chem Soc.* 2007; 129: 15042-53.
172. Gomez-Ruiz S, Kaluđerović GN, Polo-Ceron D, Prashar S, Fajardo M, Žižak Ž, et al. Study of the cytotoxic activity of alkenyl-substituted ansa-titanocene complexes. *Inorg Chem Commun.* 2007; 10: 748-52.
173. Huq F, Tayyem H, Beale P, Yu JQ. Studies on the activity of three palladium(II) compounds of the form: *Trans*-PdL<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> where L = 2-hydroxypyridine, 3-hydroxypyridine, and 4-hydroxypyridine. *J Inorg Biochem.* 2007; 101: 30-5.
174. Zmejkovski BB. Sinteza, karakterizacija i citotoksičnost kompleksa Pd(II), Pt(II) i Pt(IV) sa estrima R<sub>2</sub>edda-tipa [disertacija]. Hemijski fakultet, Univerziteta u Beogradu; 2010.
175. Jolley JN, Yanovsky AI, Kelland LR, Nolan KB. Synthesis and antitumour activity of platinum(II) and platinum(IV) complexes containing ethylenediamine-derived ligands having alcohol, carboxylic acid and acetate substituents: Crystal and molecular structure of [PtL<sup>4</sup>Cl<sub>2</sub>]·H<sub>2</sub>O where L<sup>4</sup> is ethylenediamine-N, N'-diacetate. *J Inorg Biochem.* 2001; 83(2): 91-100.
176. Kaludjerović GN, Miljković D, Momcilović M, Djinović VM, Stojković MM, Sabo TJ, et al. Novel platinum(IV) complexes induce rapid tumor cell death in vitro. *Int J Cancer.* 2005; 116(3): 479-86.
177. Hall MD, Mellor HR, Callaghan R, Hambley TW. Basis for design and development of platinum(IV) anticancer complexes. *J Med Chem.* 2007; 50(15): 3403-11.
178. Hambley TW, Battle AR, Deacon GB, Lawrenz ET, Fallon GD, Gatehouse BM, Rainone S. Modifying the properties of platinum (IV) complexes in order to increase biological effectiveness. *J Inorg Biochem.* 1999; 77(1): 3-12.