

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Nebojša Pantelić

**SINTEZA, KARAKTERIZACIJA I
CITOTOKSIČNOST KOMPLEKSA ZLATA(III)
SA ESTRIMA R₂edda-TIPA**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY**

Nebojša Pantelić

**SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND
CYTOTOXICITY OF GOLD(III) COMPLEXES
WITH R₂edda-TYPE ESTERS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

Mentori:

dr Tibor J. Sabo,
redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Bojana B. Zmejkovski,
naučni saradnik Centra za hemiju, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju
Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr habil. Goran N. Kaluđerović,
privat dozent, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Department of Bioorganic
Chemistry, Halle (Saale), Germany

dr Maja Gruden-Pavlović,
vanredni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Tatjana Stanojković,
naučni saradnik Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

dr Evica Ivanović,
vanredni profesor Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____ 2015. godine.

Zahvalnica

Ova disertacija urađena je na Katedri za neorgansku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Racionalni dizajn i sinteza biološki aktivnih i koordinacionih jedinjenja i funkcionalnih materijala, relevantnih u (bio)nanotehnologiji“.

Temu za doktorsku disertaciju predložili su mentori prof. dr Tíbor Sabo, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i dr Bojana Zmejkovski, naučni saradnik Centra za hemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se profesoru dr Tíboru Sabou na ukazanom poverenju, pokretačkoj snazi i velikoj podršci.

Posebno se zahvaljujem dr Bojani Zmejkovski na nesebičnoj pomoći, na prijateljstvu, kolegijalnosti i velikoj podršci u trenucima kada je bilo teško.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Goranu Kaluđeroviću na neverovatnim idejama koje je svesrdno delio sa mnom. On je umnogome zaslužan što sam postao bolji i kvalitetniji hemičar.

Srdačno se zahvaljujem i dr Tatjani Stanojković na izuzetnoj profesionalnosti i velikodušnoj pomoći iz oblasti biološke aktivnosti.

Takođe, veliko hvala i dr Maji Gruden-Pavlović i dr Evici Ivanović na korisnim savetima tokom pisanja ove doktorske disertacije.

Svim članovima laboratorije 525 kao i kolegi Aleksandru Kostiću iskreno sam zahvalan na podršci tokom svih ovih godina.

Puno hvala dobrim prijateljima Jeleni Andrić, Nikoli Staniću i Nedeljku Đorđeviću koji su svoje znanje nesebično prenosili na mene i tako doprineli da lakše i kvalitetnije pišem ovaj rad.

Na kraju, beskrajno se zahvaljujem svojim roditeljima Miri i Đoletu, zatim ostalim članovima porodice Dejanu, Milani i Jani, kao i mojoj Tijani i prijateljima Boletu, Samiru, Ivoni, Mariji, Alejandru, Đoletu i Malom na strpljenju i podršci koju mi nesebično pružaju u svim aspektima života.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	7
2. OPŠTI DEO	8
2.1. Antitumorska aktivnost kompleksa platine.....	8
2.1.1. Istorijat otkrića cisplatine.....	8
2.1.2. Ligandi R ₂ edda-tipa	11
2.1.3. Kompleksi platine sa ligandima R ₂ edda-tipa.....	14
2.1.4. Citotoksičnost kompleksa platine(IV) sa ligandima R ₂ edda-tipa	17
2.1.5. <i>In vivo</i> ispitivanja sa kompleksom [PtCl ₄ (<i>n</i> Bu ₂ eddp)]	20
2.2. Drugi biološki aktivni neplatinski kompleksi.....	21
2.3. Biološki aktivna jedinjenja zlata.....	22
2.3.1. Zlato kroz istoriju.....	22
2.3.2. Opšte karakteristike zlata.....	25
2.3.3. Kompleksi zlata(I) kao antitumorski agensi	26
2.3.4. Kompleksi zlata(III) kao antitumorski agensi.....	29
2.3.5. Primena kompleksa zlata u terapiji nekih oboljenja	38
2.4. Cilj rada.....	40
3. EKSPERIMENTALNI DEO	41
3.1. Hemikalije i reagensi	41
3.2. Sinteza liganda.....	41
3.2.1. Sinteza <i>O, O'</i> -diizoamil-(<i>S, S</i>)-etilendiamin- <i>N, N'</i> -di-2-propanoat dihlorhid, [(<i>S, S</i>)-H ₂ <i>i</i> Am ₂ eddp]Cl ₂	41
3.3. Sinteza kompleksa	42
3.3.1. Sinteza kompleksa zlata(III) sa (<i>S, S</i>)-R ₂ eddip ligandima: dihlrido(<i>O, O'</i> - dibutil-(<i>S, S</i>)-etilendiamin- <i>N, N'</i> -di-2-propanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S, S</i>)- <i>n</i> Bu ₂ eddp}]PF ₆ , dihlrido(<i>O, O'</i> - dipentil-(<i>S, S</i>)-etilendiamin- <i>N, N'</i> -di-2-propanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S, S</i>)- <i>n</i> Pe ₂ eddp}]PF ₆ , dihlrido(<i>O, O'</i> - diizobutil-(<i>S, S</i>)-etilendiamin- <i>N, N'</i> -di-2-propanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S, S</i>)- <i>i</i> Bu ₂ eddp}]PF ₆ , dihlrido(<i>O, O'</i> -	

diizoamil- (<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-propanoat)zlato(III)	
heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)- <i>i</i> Am ₂ eddip}]PF ₆ , dihlorido(<i>O,O'</i> -	
diciklopentil-(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-propanoat)zlato(III)	
heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)- <i>c</i> Pe ₂ eddip}]PF ₆	42
3.3.2. Sinteza kompleksa zlata(III) sa (<i>S,S</i>)-R ₂ eddl ligandima: dihlorido(<i>O,O'</i> -	
dipropil-(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(4-metil)-pentanoat)zlato(III)	
heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)- <i>n</i> Pr ₂ eddl}]PF ₆ , dihlorido(<i>O,O'</i> -dibutil-	
(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(4-metil)-pentanoat)zlato(III)	
heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)- <i>n</i> Bu ₂ eddl}]PF ₆ , dihlorido(<i>O,O'</i> -	
dipentil-(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(4-metil)-pentanoat)zlato(III)	
heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)- <i>n</i> Pe ₂ eddl}]PF ₆ , dihlorido(<i>O,O'</i> -	
diizobutil -(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(4-metil)-pentanoat)zlato(III)	
heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)- <i>i</i> Bu ₂ eddl}]PF ₆	45
3.3.3. Sinteza kompleksa zlata(III) sa (<i>S,S</i>)-R ₂ eddch ligandima: dihlorido(<i>O,O'</i> -	
dimetil-(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)-propanoat)zlato(III)	
heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Me ₂ eddch}]PF ₆ , dihlorido(<i>O,O'</i> -dietil-	
(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)-propanoat)zlato(III)	
heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)-Et ₂ eddch}]PF ₆ , dihlorido(<i>O,O'</i> -dipropil-	
(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)-propanoat)zlato(III)	
heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)- <i>n</i> Pr ₂ eddch}]PF ₆ , dihlorido(<i>O,O'</i> -dibutil-	
(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)-propanoat)zlato(III)	
heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)- <i>n</i> Bu ₂ eddch}]PF ₆ , dihlorido(<i>O,O'</i> -	
diizobutil-(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)-propanoat)zlato(III)	
heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)- <i>i</i> Bu ₂ eddch}]PF ₆ , dihlorido(<i>O,O'</i> -	
diizoamil-(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)-propanoat)zlato(III)	
heksafluorofosfat, ([AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)- <i>i</i> Am ₂ eddch}]PF ₆	47
3.4. Eksperimentalne tehnike i instrumenti.....	50
3.4.1. Elementalna analiza	50
3.4.2. Nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija, NMR.....	51
3.4.3. Infracrvena spektroskopija, IR.....	51
3.4.4. Ultraljubičasta–vidljiva spektroskopija, UV/Vis.....	51
3.4.5. Tečna hromatografija–masena spektroskopija, LC/MS	52
3.4.6. Polarimentija.....	52
3.4.7. Elektrohemijska merenja	52

3.5. DFT proračuni.....	53
3.6. Biološka ispitivanja.....	53
3.6.1. <i>In vitro</i> antitumorska aktivnost	53
3.6.1.1. Materijal i metode.....	53
3.6.1.2. HeLa, Fem-x i K562 ćelijske linije i humane PBMC i MRC-5	54
3.6.2. Morfološke odlike smrti HeLa indukovane ispitivanim supstancama.....	56
3.6.3. Analiza ćelijskog ciklusa	56
3.6.3.1. Tretman ćelija ispitivanim kompleksima	56
3.6.3.2. Priprema uzorka za analizu ćelijskog ciklusa na protočnom citometru.....	57
3.6.4. Bojenje akridin-oranžom	57
3.6.5. Statistička obrada podataka.....	58
4. REZULTATI I DISKUSIJA	59
4.1. Sinteza estra <i>O,O'</i> -diizoamil-(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-propanoat dihlorida, [(<i>S,S</i>)-H ₂ iAm ₂ eddip]Cl ₂ ·2H ₂ O.....	59
4.1.1. Spektroskopska studija [(<i>S,S</i>)-H ₂ iAm ₂ eddip]Cl ₂ estra.....	60
4.2. Sinteza kompleksa zlata(III) sa <i>O,O'</i> -dialkil-(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2- propanoat ligandima, [AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)-R ₂ eddip}]PF ₆	61
4.2.1. Spektroskopske studije [AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)-R ₂ eddip}]PF ₆ kompleksa.....	61
4.3. Sinteza kompleksa zlata(III) sa <i>O,O'</i> -dialkil-(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2- (4-metil)-pentanoat ligandima, [AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)-R ₂ eddl}]PF ₆	63
4.3.1. Spektroskopske studije [AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)-R ₂ eddl}]PF ₆ kompleksa.....	64
4.4. Sinteza kompleksa zlata(III) sa <i>O,O'</i> -dialkil-(<i>S,S</i>)-etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2- (3-cikloheksil)-propanoat ligandima, [AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)-R ₂ eddch}]PF ₆	65
4.4.1. Spektroskopske studije [AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)-R ₂ eddch}]PF ₆ kompleksa	66
4.5. Elektrohemijsko ponašanje zlato(III) kompleksa	67
4.6. DFT proračuni.....	72
4.7. <i>In vitro</i> antitumorska aktivnost	75
4.7.1. Aktivnost kompleksa [AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)-R ₂ eddip}]PF ₆	76
4.7.2. Aktivnost kompleksa [AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)-R ₂ eddl}]PF ₆	77
4.7.3. Aktivnost kompleksa [AuCl ₂ {(<i>S,S</i>)-R ₂ eddch}]PF ₆	79
4.7.4. Selektivnost ispitivanih jedinjenja	81
4.7.5. Morfologija smrti HeLa ćelija	83

4.7.6. Čelijski ciklus.....	87
4.8. Stabilnost i reaktivnost kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$	89
4.8.1. Stabilnost kompleksa u DMSO-u i PBS-u.....	89
4.8.2. Redukcija kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$ sa askorbinskom kiselinom.....	91
4.8.3. Interakcija kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$ sa goveđim serum albuminom (BSA).....	93
5. ZAKLJUČAK.....	95
6. LITERATURA.....	98
7. PRILOG.....	108
8. BIOGRAFIJA AUTORA.....	145

Lista skraćenica

DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
RNK	ribonukleinska kiselina
en	etilendiamin
edda	etilendiamin- <i>N,N'</i> -diacetat
eddp	etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-3-propanoat
eddip	etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-propanoat
eddch	etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-cikloheksil)propanoat
eddv	etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-2-(3-metil)butanoat
eddl	etilendiamin- <i>N,N'</i> -di-(4-metil)pentanoat
pdda	propilendiamin- <i>N,N'</i> -diacetat
pddch	propilendiamin- <i>N,N'</i> -2-(3-cikloheksil)propanoat
R	alkil
Me	metil
Et	etil
<i>n</i> -	normalni
<i>i</i> -	izo
Pr	propil
Bu	butil
Pe	pentil
Am	amil
<i>c</i> Pe	ciklopentil
Cy	cikloheksil
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolijum-bromid
SD	standardna devijacija
AO	akridin-oranž
PI	propidijum-jodid
AK	askorbinska kiselina
BSA	goveđi serum albumin
PBS	fosfatni puferski rastvor

PBMC	mononuklearne ćelije periferne krvi (engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PHA	fitohemaglutinin
MRC-5	humana ćelijska linija normalnih fibroblasta pluća
HeLa	humana ćelijska linija adenokarcinoma grlića materice
Fem-x	humana ćelijska linija malignog melanoma
K562	humana ćelijska linija mijeloidne leukemije
L929	ćelijska linija mišijeg fibrosarkoma
U251	humana ćelijska linija glioma
CLL	humana ćelijska linija hronične limfocitne leukemije
B16	ćelijska linija mišjeg melanoma
C6	ćelijska linija glioma pacova
A549	humana ćelijska linija epitalnog plućnog adenokarcinoma
HL-60	humana ćelijska linija promijelocitne leukemije
REH	humana ćelijska linija leukemije
A2780/S	senzitivna humana ćelijska linija karcinoma jajnika
A2780/R	rezistentna humana ćelijska linija karcinoma jajnika
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
RA	reumatoidni artritis
HIV	humani virus imunodeficijencije
AIDS	sindrom stečene imunodeficijencije
DFT	teorija funkcionalne gustine (engl. Density Functional Theory)
NMR	nuklearno-magnetna rezonancija
IR	infracrvena spektroskopija
UV/Vis	ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija
LC/MC	tečna hromatografija-masena spektroskopija (engl. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)

IZVOD

Sinteza, karakterizacija i citotoksičnost kompleksa zlata(III) sa estrima R₂edda-tipa

U ovom radu opisane su sinteze, karakterizacija i antiproliferativna aktivnost kompleksa zlata(III) sa dialkil estrima (S,S)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-propanske kiseline, (S,S)-H₂eddip, (S,S)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(4-metil)-pentanske kiseline, (S,S)-H₂eddl, (S,S)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)-propanske kiseline, (S,S)-H₂eddch.

Sintetisan je novi diizoamil estar sa (S,S)-H₂eddip. Ovaj ligand prekursor je dobijen refluktovanjem suspenzije kiseline i apsolutnog izoamil alkohola, kome je prethodno ukapan tionil-hlorid. Estar je dobijen u obliku dihidrohlorida, [(S,S)-H₂iAm₂eddip]Cl₂. Okarakterisan je elementalnom analizom, infracrvenom i NMR spektroskopijom, masenom spektrometrijom i polarimetrijskom analizom.

Kompleksi zlata(III) dobijeni su u reakciji natrijum-tetrahloradoaurata(III) dihidrata, Na[AuCl₄]·2H₂O, sa *O,O'*-dialkil-(S,S)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-propanoatom, (R = *n*Bu, *n*Pe, *i*Bu, *i*Am, *c*Pe) ili *O,O'*-dialkil-(S,S)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(4-metil)-pentanoatom, (R = *n*Pr, *n*Bu, *n*Pe, *i*Bu) ili *O,O'*-dialkil-(S,S)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)-propanoatom, (R = Me, Et, *n*Pr, *n*Bu, *i*Bu, *i*Am) u metanolu i litijum-hidroksida u molskom odnosu 1:1:2, a kompleksi su dobijeni nakon dodavanja čvrstog amonijum-heksafluorofosfata. Kompleksi su opšte formule [AuCl₂{(S,S)-R₂eddip}]PF₆ (R = *n*Bu, *n*Pe, *i*Bu, *i*Am, *c*Pe) i [AuCl₂{(S,S)-R₂eddl}]PF₆ (R = *n*Pr, *n*Bu, *n*Pe, *i*Bu), [AuCl₂{(S,S)-R₂eddch}]PF₆ (R = Me, Et, *n*Pr, *n*Bu, *i*Bu, *i*Am). Okarakterisani su elementalnom analizom, UV/Vis, infracrvenom i NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom. Za sve sintetisane komplekse urađeni su DFT proračuni.

Da bi se bolje razumeo mehanizam delovanja kompleksa zlata(III) kao antitumorskih agenasa, urađeno je elektrohemijsko ispitivanje svih kompleksa iz serije $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ i $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}}]\text{PF}_6$. Cikličnom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom utvrđeno je da se redukcija zlato(III) kompleksa vrši do zlato(I) vrste, u vidu dva ireverzibilna elektronska koraka, praćena gubitkom hlorido liganda. Pojava redukcionog koraka $\text{Au}^{\text{III}}/\text{Au}^0$ se isključuje zbog izostanka elementalnog zlata na platinskoj elektrodi što je potvrđeno nakon redukcije pri konstantnom potencijalu od $-0,8$ V (vs. Ag/AgCl) u trajanju od 15 minuta.

Antiproliferativna aktivnost sintetisanih kompleksa određena je prema tumorskim ćelijama: humanog adenokarcinoma materice (HeLa), humanog malignog melanoma (Fem-x), humane mijeloidne leukemije (K562), kao i na zdravim humanim mononuklearnim ćelijama, izolovanim iz periferne krvi (PBMC), kao i na stimulisanim na proliferaciju PBMC ćelijama (PBMC + PHA) ili ćelijama fetalnog plućnog fibroblasta (MRC-5). Svi kompleksi iz serije $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ pokazuju visoku citotoksičnu aktivnost prema svim ćelijskim linijama, a najveću prema Fem-x ćelijama. Najnižu IC_{50} vrednost prema Fem-x ćelijama pokazuje kompleks $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iAm}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$, ali istovremeno i najvišu prema HeLa i K562 ćelijskim linijama. Indeks selektivnosti ovih kompleksa pokazuje da su manje toksični i znatno selektivniji od cisplatine. Posebno treba istaći da je kompleks $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iAm}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ 4 puta aktivniji u 28 puta selektivniji od cisplatine. Kompleksi iz serije $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddl}}]\text{PF}_6$ pokazuju najveću aktivnost prema K562 ćelijama koja je uporediva sa referentnom supstancom, cisplatinom. Iz serije $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}}]\text{PF}_6$, najaktivniji je kompleks kada je R = iAm prema K562 ćelijama koji je aktivniji i od cisplatine, ali je umereno aktivan prema HeLa ćelijskoj liniji. Ovaj kompleks je ujedno i najselektivniji. Svi ispitivani kompleksi indukuju apoptozu.

Ispitivanje stabilnosti kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iBu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ u DMSO-u i fiziološkom medijumu (PBS, pH 7,4) praćeno je pomoću UV/Vis i ^{13}C NMR spektroskopije. Ispitivani kompleks je stabilan u DMSO-u tokom 24-časovnog praćenja UV/Vis spektroskopijom. Snimljeni ^{13}C NMR spektri kompleksa u PBS-u tokom vremena (0, 2, 24 i 48 h) pokazuju koordinacione promene u kompleksu tako da verovatno dolazi do supstitucije hlorido liganada molekulima vode pri čemu nastaju $[\text{AuCl}(\text{H}_2\text{O})\{(S,S)\text{-iBu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6^{2+}$ ili $[\text{Au}(\text{H}_2\text{O})_2\{(S,S)\text{-iBu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6^{3+}$.

U cilju ispitivanja mogućnosti da se kompleksi zlata(III) redukuju u ćeliji sa biološki relevantnim reducentom, praćena je reakcija kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}}\}]\text{PF}_6$ sa askorbinskom kiselinom, snimanjem ^{13}C NMR spektara. Ispitivanja su pokazala da askorbinska kiselina trenutno redukuje kompleks, što ukazuje na visoku mogućnost istog ishoda u živim ćelijama.

Takođe, praćena je interakcija kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}}\}]\text{PF}_6$ sa goveđim serum albuminom (BSA) pomoću UV/Vis spektroskopije. Pretpostavlja se da se kompleks zlata(III), redukuje cisteinom iz albumina do zlato(I) vrste, što se može videti na spektrima nakon 2 sata reakcije. Nakon 24 i 48 h, UV/Vis spektri ukazuju da dolazi do disproporcionisanja zlata(I) do odgovarajućih zlato(III) jedinjenja i elementalnog zlata.

Ključne reći: zlato(III) kompleksi, ligandi $R_2\text{edda}$ -tipa, oksido-redukciona svojstva, DFT proraćuni, antiproliferativna aktivnost, apoptoza, ćelijski ciklus.

Naućna oblast: Hemija

Uža naućna oblast: Opšta i neorganska hemija

UDK broj: 546.59

S U M M A R Y

Synthesis, characterization and cytotoxicity of gold(III) complexes with R₂edda-type esters

This thesis describes synthesis, characterization and antiproliferative activity of gold(III) complexes with dialkyl esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid, (*S,S*)-H₂eddip, (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoic acid, (*S,S*)-H₂eddl and (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)-propanoic acid, (*S,S*)-H₂eddch.

A novel diisoamyl ester of (*S,S*)-H₂eddip is synthesized. Thionyl chloride was introduced into a flask containing absolute isoamyl alcohol. (*S,S*)-H₂eddip·HCl was added forming a suspension which was refluxed. The ester was obtained as a dihydrochloride, [(*S,S*)-H₂iAm₂eddip]Cl₂. This compound was characterized by elemental analysis, IR and NMR spectroscopy, mass spectrometry and polarimeter analysis.

Gold(III) complexes are synthesized in a reaction of sodium-tetrachloroaurate(III) dihydrate, Na[AuCl₄]·2H₂O, with *O,O'*-dialkyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate, (R = *n*Bu, *n*Pe, *i*Bu, *i*Am, *c*Pe) or *O,O'*-dialkyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(4-methyl)-pentanoate, (R = *n*Pr, *n*Bu, *n*Pe, *i*Bu) or *O,O'*-dialkyl-(*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-(3-cyclohexyl)-propanoate, (R = Me, Et, *n*Pr, *n*Bu, *i*Bu, *i*Am) in methanol and lithium hydroxide in molar ratio 1:1:2. Desired complexes were obtained after addition of ammonium hexafluorophosphate to the reaction mixture. Complexes general formulae are: [AuCl₂{(*S,S*)-R₂eddip}]PF₆ (R = *n*Bu, *n*Pe, *i*Bu, *i*Am, *c*Pe), [AuCl₂{(*S,S*)-R₂eddl}]PF₆ (R = *n*Pr, *n*Bu, *n*Pe, *i*Bu) and [AuCl₂{(*S,S*)-R₂eddch}]PF₆ (R = Me, Et, *n*Pr, *n*Bu, *i*Bu, *i*Am). These compounds are characterized by elemental analysis, UV/Vis, IR and

NMR spectroscopy and mass spectrometry. DFT calculations were done for all synthesized complexes.

In order to explain the mechanism of action of gold(III) complexes as antitumor agents, redox chemistry was studied by cyclic and differential pulse voltammetry of $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ and $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}}]\text{PF}_6$ complexes. The investigation confirmed two successive irreversible reduction steps followed by loss of chlorido ligands where Au^{I} species were the final reduction product. The occurrence of the $\text{Au}^{\text{III}}/\text{Au}^0$ reduction is rejected due to the lack of metallic gold at platinum electrode. This observation was also confirmed by potentiostatic reduction at -0.8 V (vs. Ag/AgCl) electrode for 15 min.

In vitro antiproliferative activity of gold(III) complexes was determined against several tumor cell lines: human adenocarcinoma (HeLa), human myelogenous leukemia (K562), human malignant melanoma (Fem-x) as well as against normal and stimulated for proliferation human peripheral blood mononuclear cells (PBMC, PBMC + PHA) or human embryonic lung fibroblast (MRC-5). All complexes from series $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ exhibit high activity against all three cancer lines, the highest against Fem-x cells. The lowest IC_{50} value is observed against Fem-x cells by complex $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iAm}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ and at the same time the highest against HeLa and K562. This complex is 4 times more active and 28 times more selective than cisplatin. Generally, selectivities of these complexes are significantly greater than cisplatin. Complexes from series $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddll}}]\text{PF}_6$ show the highest activity against K562 cells comparable to the reference compound cisplatin. Complex $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iAm}_2\text{eddch}}]\text{PF}_6$ was found to be the most effective against K562 cell line as well as to have higher activity in relation to cisplatin, but it was found moderately active against HeLa cell line. This complex also expressed the highest selectivity. All tested complexes induce apoptosis.

The stability of $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iBu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ was investigated in DMSO and physiological medium (PBS, pH 7.4) and experiments have been monitored by UV/Vis and ^{13}C spectroscopy. Complex $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iBu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ is stable in DMSO during 24 h monitoring by UV/Vis spectra. Stability study of $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iBu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ in PBS, examined by ^{13}C NMR spectroscopy at different time intervals (0, 2, 24 and 48 h), immediately showed coordination

changes in the complex which presumably indicates instant coordination of water by displacement of the chlorido ligands to provide $[\text{AuCl}(\text{H}_2\text{O})\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}\}]^{2+}$ or $[\text{Au}(\text{H}_2\text{O})_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}\}]^{3+}$ species.

In order to investigate the possibility of $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$ being reduced in cells with a biologically relevant reductant, time-depending ^{13}C NMR spectroscopy was performed for the reaction of $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$ with ascorbic acid. It was found that ascorbic acid reduces the complex readily and instantly, indicating a high possibility of the same outcome in living cells.

Also, interaction of $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$ with bovine serum albumin (BSA) was examined by UV/Vis spectrometry. It is assumed that $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}\}]^+$ might be reduced with cysteine leading to gold(I) species which can be seen in spectra after 2 h of reaction. After 24 and 48 h, UV/Vis spectra indicate that gold(I) species disproportionate to corresponding gold(III) species and elemental gold.

Keywords: gold(III) complexes, R_2edda -type ligands, oxidoreductive properties, DFT calculations, antiproliferative activity, apoptosis, cell cycle.

Scientific area: Chemistry

Scientific Sub-area: General and Inorganic Chemistry

UDC number: 546.59

1. UVOD

Dosadašnja izučavanja u oblasti antitumorske aktivnosti kompleksnih jedinjenja elemenata prelaznih metala i njihova primena u medicini započeli su nakon otkrića citotoksičnosti kvadratno-planarnog kompleksa platine, *cis*-diammindihloridoplatina(II), *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], poznatog pod imenom cisplatina, od strane američkog naučnika B. Rozenberga 1965. godine. Nakon primene cisplatine u lečenju tumora, sintetisano je jako mnogo kompleksa prelaznih metala u cilju pronalaženja boljeg citostatika.

Kompleksi zlata(III) imaju dugu tradiciju primene u medicini kao lekovi (reumatoidni artritis, parazitske bolesti, u terapiji HIVa). Tokom ranih 90-tih godina, bilo je od velikog interesa raditi na poboljšanju stabilnosti i farmakoloških osobina ovih kompleksa. Zlato(III) kompleksi su izostrukturalni i izoelektronski platina(II) kompleksima (kvadratno-planarni, *d*⁸-sistem) pa predstavljaju potencijalne antitumorske agense. Usled primene kompleksa zlata(III) u lečenju tumora, u toku poslednjih nekoliko decenija, intenzivno su izučavane reakcije zlato(III) jona sa biološki važnim ligandima, kao što su aminokiseline, peptidi, proteini i DNK. Mehanizam antitumorskog delovanja kompleksa zlata(III) još uvek nije u potpunosti razjašnjen i predstavlja predmet proučavanja.

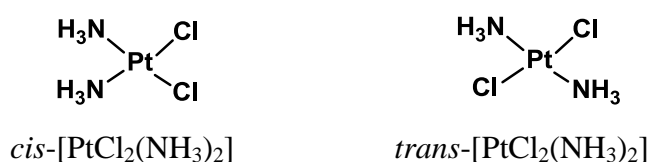
Estri R₂edda-tipa su interesantni kao ligandi zbog različitih mogućnosti koordinacije za jone metala. S obzirom da do sada nisu opisana kompleksna jedinjenja zlata(III) sa *NV* bidentatnim R₂edda-tipom liganada (dialkil estri H₂edda-tipa kiselina), od interesa je ispitati mogućnost dobijanja ovih jedinjenja, utvrditi njihovu izomeriju, oksido-redukционе osobine, *in vitro* antitumorsku aktivnost, kao i mehanizam uništavanja tumorskih ćelija.

2. OPŠTI DEO

2.1. Antitumorska aktivnost kompleksa platine

2.1.1. Istorijat otkrića cisplatine

Michele Peyrone, doktor medicine iz Torina (Italija) je 1845. godine prvi sintetisao cisplatinu u jednoj od Liebig-ovih laboratorija. Sintetisano platinsko jedinjenje sadržalo je dva ammin i dva hlorido liganda ukazujući na isti hemijski sastav kao kod Reysel-ove soli, $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, međutim sa različitim fizičko-hemijskim karakteristikama [1,2]. U to vreme nije bilo moguće razumeti postojanje dva različita jedinjenja sa pretpostavljenom tetraedarskom geometrijom uobičajenom za četvorovalentna jedinjenja. Alfred Werner je 50 godina kasnije predložio kvadratno-planarnu geometriju čime su usvojeni *cis* (Peyrone-ova) i *trans* (Reysel-ova so) izomeri ovih jedinjenja (Slika 1) [3].



Slika 1. Geometrijski izomeri kvadratno-planarnog diammindihloridoplatina(II) kompleksa.

Biološka aktivnost otkrivena je slučajno 1965. godine [4]. Biofizičar B. Rosenberg i njegovi saradnici sa Univerziteta u Mičigenu izučavali su efekat električnog polja na deobu i rast bakterije *Escherichia coli* i pri tome ustanovili da je deoba bakterija zaustavljena, dok se njen rast normalno odvijao. Smatralo se da su ovi efekti posledica električnog polja, međutim, nakon dužeg razmatranja ustanovljeno je

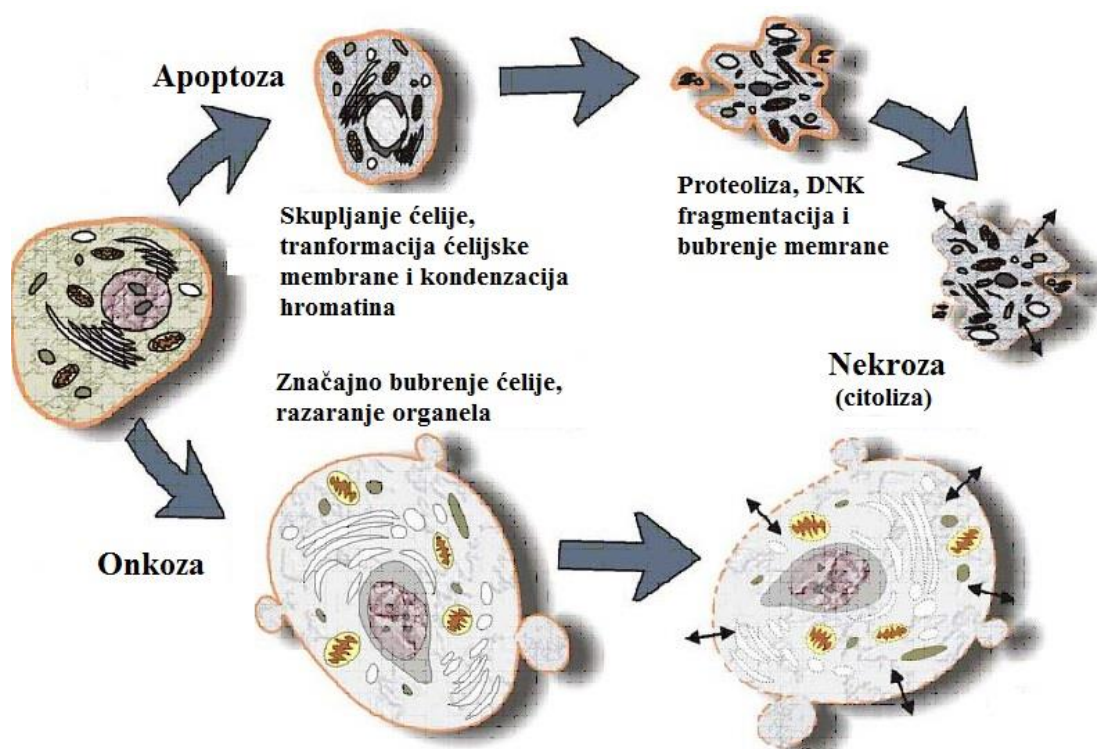
da je do blokiranja deobe bakterija došlo pod uticajem *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] kompleksa, koji je nastao u toku eksperimenta u reakciji između platinske elektrode i amonijačnog pufera [4–6].

Rosenberg je dokazao da doziranje cisplatine u abdomen miša sa implantiranim tumorom sakroma-180 dovodi do smanjenja, čak i nestajanja tumora [7,8]. Zbog spektakularnih rezultata cisplatina je 1971. godine klinički testirana da bi 1979. godine, kao lek platinol, uvedena u hemioterapiju kao citostatik u lečenju raznih vrsta tumora [9,10].

Cisplatina je vrlo efikasna u terapiji tumora testisa, jajnika, glave i vrata, bešike, grlića materice, ezofagusa i pluća [11–14]. Uprkos velikom uspehu pri lečenju tumora, cisplatina pokazuje neželjene efekte poput velike nefrotoksičnosti, neurotoksičnosti, izaziva povraćanje, brzo izaziva rezistenciju [15–18].

Dokazano je da se jedan od antitumorskih mehanizama dejstva cisplatine ispoljava preko interakcije sa DNK zaustavljajući transkripciju, odnosno replikaciju [19–25]. Ovakve lezije DNK aktiviraju proces citotoksičnosti i dovode do smrti ćelije tumora apoptozom. Apoptoza izostaje tj. nastaje rezistencija, ako dolazi do povećanja popravke DNK-adukta, i sposobnosti tolerancije oštećenja DNK. Zbog visoke koncentracije hlorida u krvi, cisplatina dolazi do ćelije tumora neizmenjena, a kad uđe u ćeliju formiraju se [PtCl(H₂O)(NH₃)₂]⁺, [Pt(H₂O)₂(NH₃)₂]²⁺, [Pt(OH)(H₂O)(NH₃)₂]⁺, katjoni [26–28] koji su aktivniji jer je voda bolja odlazeća grupa [29].

Procenjeno je da manje od 1% cisplatine koja uđe u ćeliju dođe do jedra pa samim tim i DNK, dok se ostala količina vezuje za proteine i druge biomolekule [30]. Nespecifični toksični efekti proizvedeni vezivanjem za molekule koji nisu DNK meta mogu doprineti mehanizmu citotoksičnosti cisplatine u tumorskim ćelijama i pokrenuti apoptozu (Shema 1).

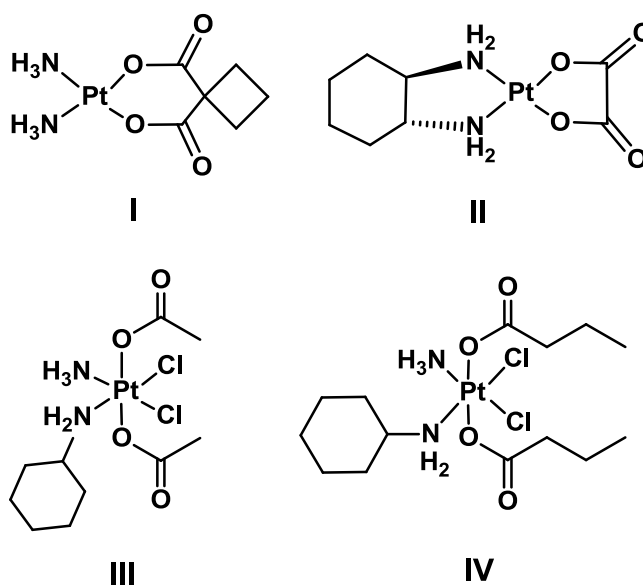


Shema 1. Shematski prikaz smrti ćelije apoptozom i nekrozom.

Apoptoza je poželjna jer predstavlja programiranu ćelijsku smrt, niz događaja gde dolazi do eliminacije ćelija bez ispuštanja ćelijskog sadržaja u okolna tkiva. Nekroza je nepoželjna jer je to pasivan oblik ćelijske smrti pri čemu dolazi do „kvarenja“ ćelijske membrane i isticanja ćelijskog sadržaja u okolno tkivo (Shema 1.).

Bitno je napomenuti da transplatina, izomer cisplatine, $trans\text{-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ ne pokazuje antitumorsku aktivnost.

Iako ima mnogo pozitivnih rezultata u lečenju tumora do danas se u svetu od kompleksa platine, osim cisplatine, još upotrebljavaju karboplatina (*cis*-diammin-(1,1-ciklobutandikarboksilato)platina(II)), oksaliplatina, (*trans*-1,2-diaminocikloheksanoksalatoplatina(II)) i nedaplatina (*cis*-diamminglukolatoplatina(II)) dok je satraplatina (*bis*-acetoammindihloridocikloheksilamminplatina(IV)) u kliničkoj fazi ispitivanja [12,31–33] (Slika 2).

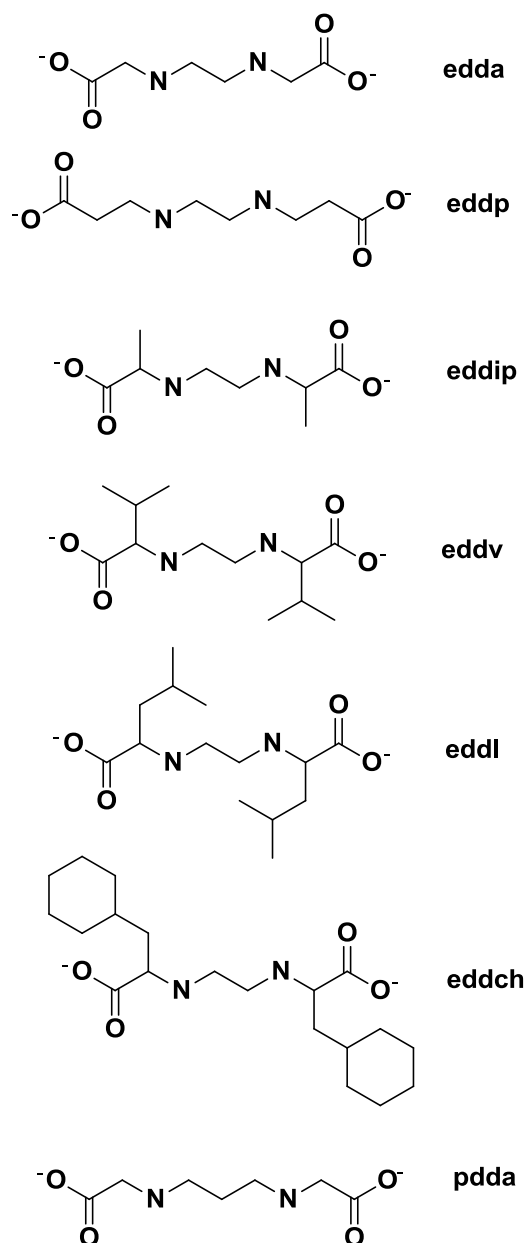


Slika 2. Strukturna jedinjenja poznata u medicini kao karboplatina (**I**), oksaliplatin (**II**), satraplatina (**III**) i nedaplatina (**IV**).

Uspeh metalnih kompleksa kao antitumorskih agensa je usko povezan sa pravilnim izborom liganada koji igraju glavnu ulogu u modifikovanju reaktivnosti i lipofilnosti, u stabilizaciji oksidacionog stanja i kontrolisanju supstitucionih reakcija.

2.1.2. Ligandi R_2 edda-tipa

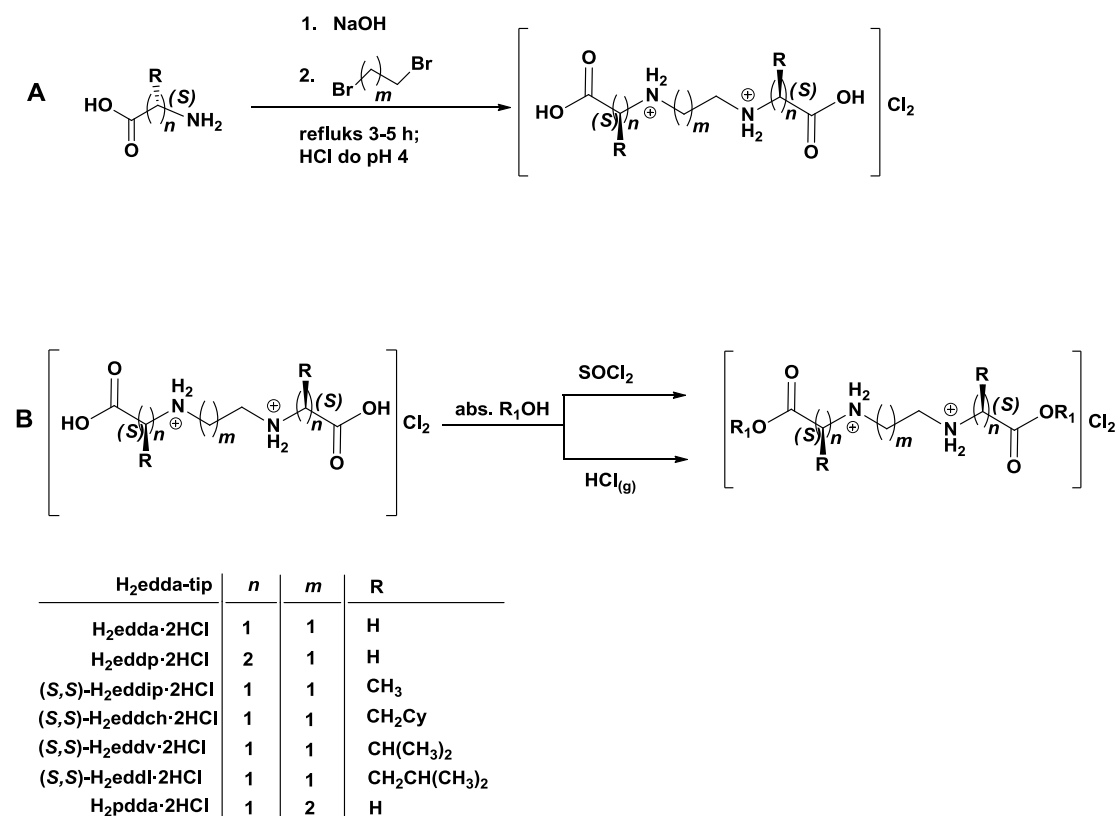
R_2 edda-tip ligandi pripadaju grupi O,O' -dialkil estara etilendiamin- N,N' -disirćetne (H_2 edda), di(izo)propanske (H_2 eddp, H_2 eddip), di-2-(3-cikloheksil)-propanske (H_2 eddch), di-2-(3-metil)-butanske (H_2 eddv), di-2-(4-metil)-pentanske (H_2 eddl) kao i propilendiamin- N,N' -disirćetne kiseline (H_2 pdda) (Slika 3). Zbog prethodnih istraživanja na ovu temu u literaturi se često za sve ove ligande koristi skraćenica R_2 edda-tip liganada [34].



Слика 3. Osnovne kiseline edda-tipa (anjonski oblik).

Kiseline se koordinuju tetradentatno preko atoma azota i kiseonika, κ^2N,N' , κ^2O,O' , a esterifikovani derivati uglavnom bidentatno preko atoma azota, κ^2N,N' .

Kiseline se mogu dobiti po metodi koju je patentirao Bersworth, 1955. godine (Shema 2, **A**) [35]. Diestri ovih kiselina se mogu sintetisati po proceduri koja je prikazana na Shemi 2, **B** [36].

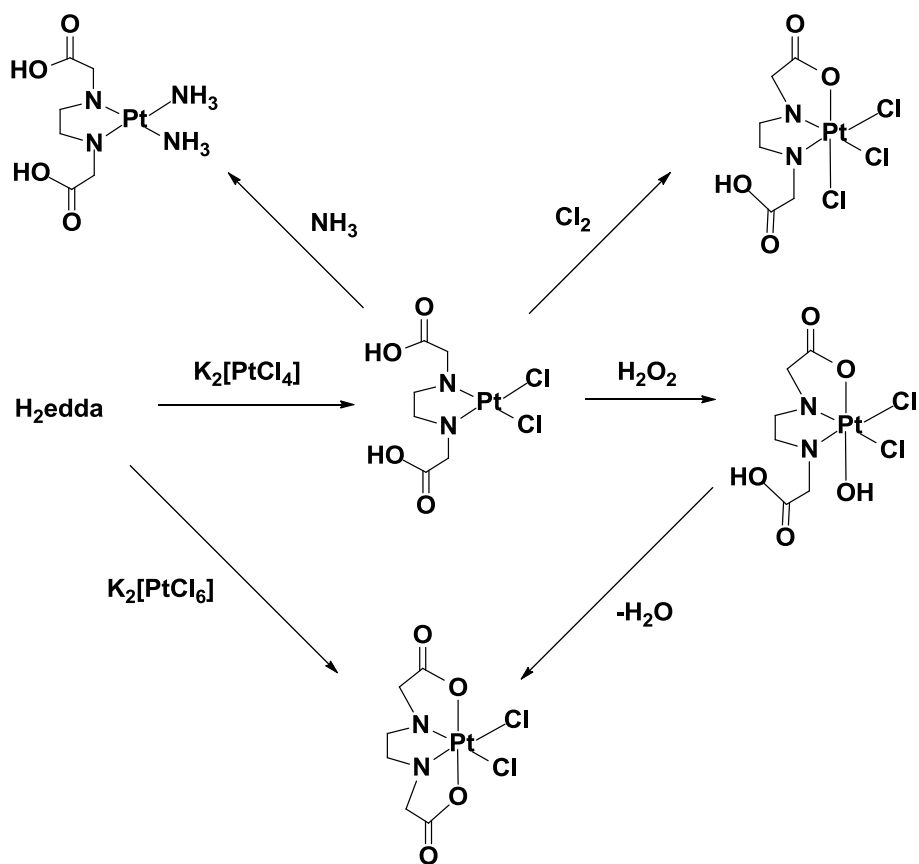


Shema 2. Uobičajene metode sinteze H₂edda kiselina (**A**) i R₂edda-tipova estara (**B**).

Koordinovanje ovih liganada za centralni metalni jon zavisi od raznih eksperimentalnih faktora pri čemu, u nekim slučajevima, esterifikovani derivati mogu hidrolizovati delimično ili potpuno.

2.1.3. Kompleksi platine sa ligandima R₂edda-tipa

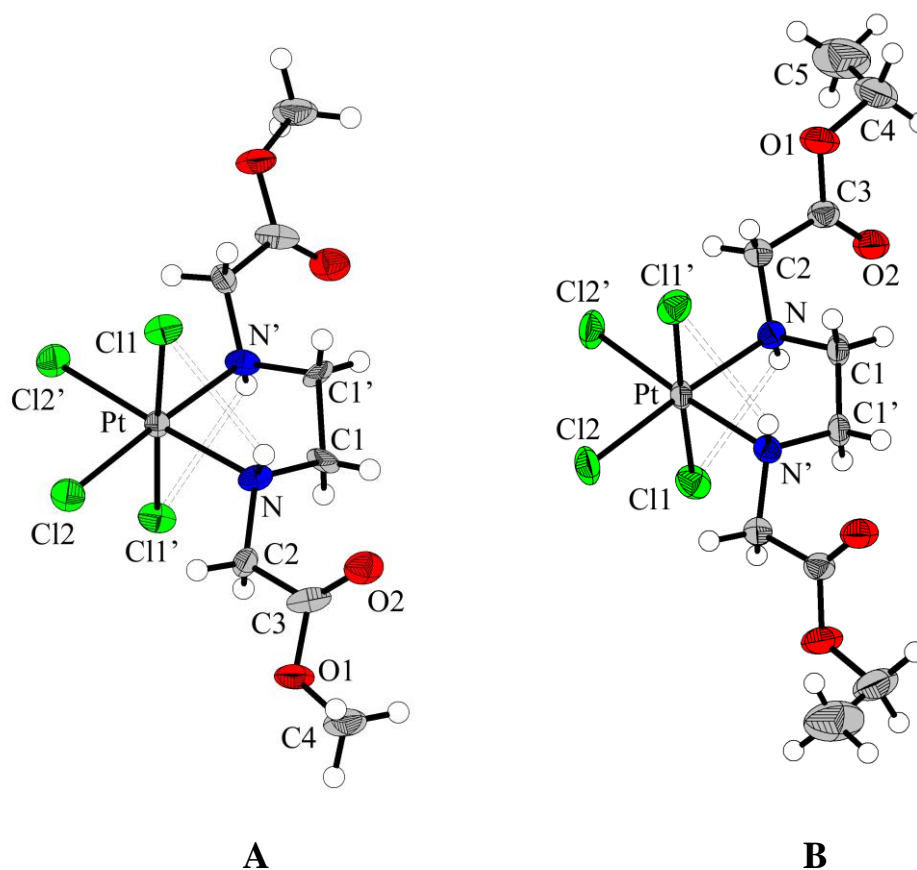
Lui je 1963. godine prvi sintetisao komplekse platine(II) i platine(IV) sa H₂edda ligandom (Shema 3) [37]. Nađeno je da se edda može koordinovati bidentatno i tetradentatno za planinu(II), a tridentatno ili tetradentatno za platinu(IV).



Shema 3. Sinteza Pt(II) i Pt(IV) edda kompleksa.

Sabo/Kaluđerović i saradnici su u periodu od 2002–2014. godine prvi na našim prostorima objavili sinteze, spektroskopske karakteristike kao i biološku aktivnost kompleksa platine sa ligandima edda-tipa, a pored toga i komplekse kobalta i paladijuma sa ligandima istog tipa [15,17,18,38–48].

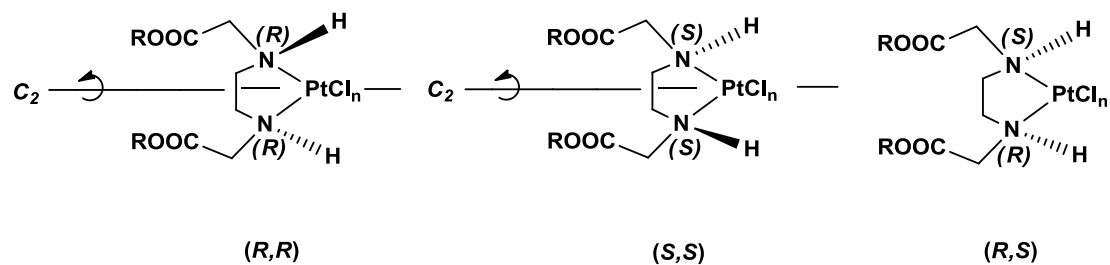
Platina(IV) kompleksi sa bidentatnim κ^2N,N' R₂edda estrema (R = Me, Et, *n*Pr) su sintetisani i okarakterisani [39,48,49]. Strukturna analiza urađena je za sva tri kompleksa platine(IV) (Slika 4), pri čemu je nađeno da je kristalna rešetka stabilizovana intramolekulskim vodoničnim vezama, što je u saglasnosti sa prethodnim rezultatima dobijenim za analogne strukture sa tetradentatnim edda ligandima [50,51].



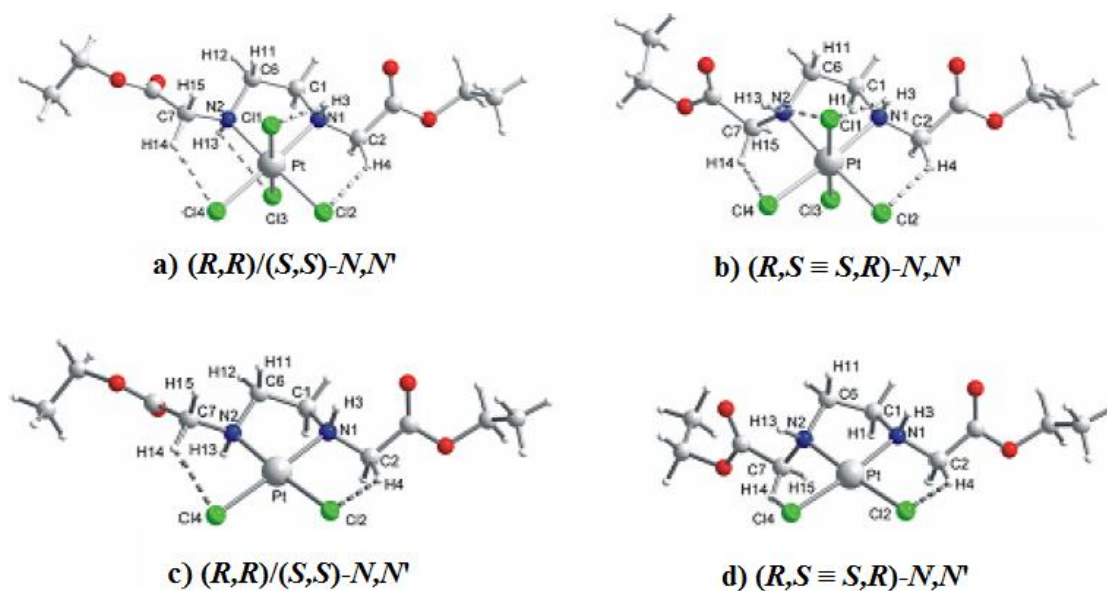
Slika 4. Diamond prezentacija Pt(IV) kompleksa sa Me₂edda (A) i Et₂edda (B).

Koordinovanjem R₂edda za platinu(IV) formiraju se stereocentri na azotovim atomima, što teorijski daje mogućnost za nastajanje tri geometrijska izomera: dva enantiomera (*R,R*) i (*S,S*) i diastereoizomer (*(R,S)≡(S,R)*) (Slika 5). Prilikom sinteze platina(IV) kompleksa sa Et₂edda dobijeni su samo enantiomeri (*(R,R)* i (*S,S*) racemska smeša) u čvrstom stanju, kao i u rastvoru, što je potvrđeno strukturnom analizom i NMR spektroskopijom. Da bi se objasnio razlog diastereoselektivnosti, rađeni su DFT proračuni za *R,R* i *R,S* izomere korišćenjem funkcionala MPW1PW91

(Slika 6). Nađeno je da je u slučaju anti izomera N–H⋯Cl elektrostatička interakcija nešto jača, što može biti dovoljan razlog za diastereoselektivnost [48].



Slika 5. Mogući izomeri $[\text{PtCl}_n(\text{R}_2\text{edda-tipa})]$, ($n = 2, 4$), kompleksa.

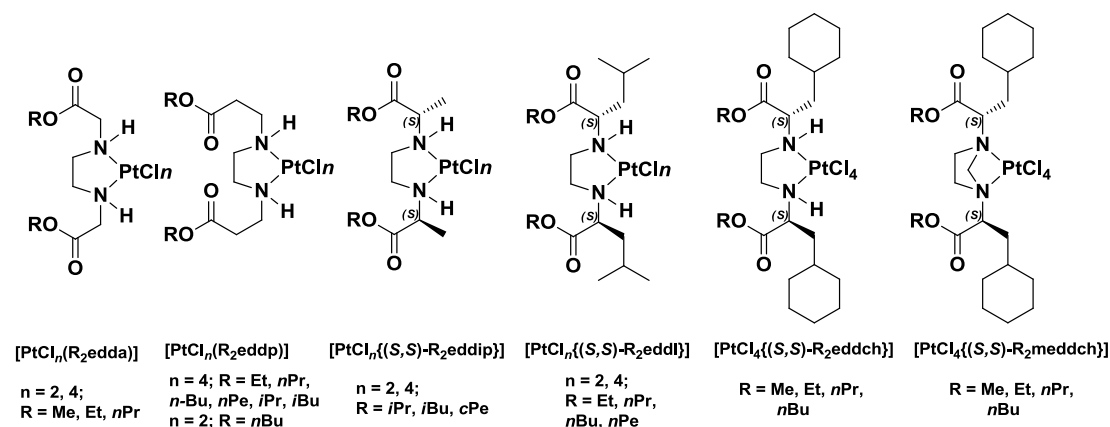


Slika 6. Izračunate strukture $[\text{PtCl}_n(\text{Et}_2\text{edda})]$ (a, b: $n = 4$; c, d: $n = 2$).

2.1.4. Citotoksičnost kompleksa platine(IV) sa ligandima R₂edda-tipa

Kompleksi platine(IV) imaju ogroman potencijal kao sredstva protiv raka u smislu visoke aktivnosti i niske toksičnosti. Glavna prednost kompleksa platine(IV) ogleda se u činjenici da mogu da prežive uslove prisutne u želucu (pH ≈ 2), da su stabilni u višem oksidacionom stanju u krvotoku, čime se smanjuje njihova reaktivnost, a samim tim se smanjuju i neželjene reakcije koje dovode do sporednih toksičnih efekata.

Dva platina(IV) kompleksa sa R₂eddp ligandima, [PtCl₄(nBu₂eddp)] i [PtCl₄(nPe₂eddp)] (Tabela 1, Slika 7), pokazala su visoku *in vitro* aktivnost na tumorskim ćelijskim linijama L929 fibrosarkoma i U251 astrocitoma [41]. Kompleksi [PtCl₄(R₂edda)] (Slika 7) pokazuju umerenu antitumorsku aktivnost na ćelijskoj liniji 1411HP, rezistentnoj na cisplatinu [48]. Pronađeno je da su platina(IV) kompleksi znatno aktivniji od odgovarajućih platina(II) kompleksa sa izuzetkom platina(II) kompleksa sa (S,S)-R₂eddl ligandima, [PtCl₂{(S,S)-R₂eddl}], na CLL primarnim ćelijama hronične leukemije (Slika 7), pri čemu imaju veću antitumorsku aktivnost od cisplatine [52]. Znatnu antitumorsku aktivnost pokazali su i kompleksi platine(IV) sa (S,S)-R₂eddch ligandima, [PtCl₄{(S,S)-R₂eddch}], na U251, C6, L929 i B16 tumorskim ćelijskim linijama (Tabela 2, Slika 7) [53]. Međutim, platina(IV) kompleksi sa (S,S)-R₂eddip ligandima, [PtCl₄{(S,S)-R₂eddip}], su 2–5 puta manje aktivni na HeLa, Fem-x i K562 tumorskim ćelijskim linijama u odnosu na cisplatinu (Tabela 1, Slika 7) [43].



Slika 7. Kompleksi platine(IV) i platine(II) sa R₂edda-tip ligandima

Tabela 1. IC₅₀ [μM]^a na HeLa, Fem-x, K562 ćelijama, PBMC i PBMC stimulisanih sa PHA, određene MTT testom (72 h).

Jedinjenje \ ćelijska linija	IC ₅₀ ± SD				
	HeLa	Fem-x	K562	PBMC	PBMC+PHA
[PtCl ₄ (<i>n</i> Bu ₂ eddp)]	14,9 ± 2,4	5,8 ± 2,1	7,1 ± 2,0	14,5 ± 5,8	10,6 ± 4,4
[PtCl ₄ (<i>n</i> Pe ₂ eddp)]	16,4 ± 3,0	5,9 ± 2,0	n.o.	17,5 ± 6,8	11,1 ± 5,2
[PtCl ₄ {(<i>S,S</i>)- <i>i</i> Pr ₂ eddp}]	30,5 ± 2,5	13,7 ± 3,2	12,3 ± 2,6	80,2 ± 24,1	71,3 ± 21,7
[PtCl ₄ {(<i>S,S</i>)- <i>i</i> Bu ₂ eddp}]	51,8 ± 9,9	36,0 ± 5,4	26,4 ± 1,0	91,0 ± 6,2	100,6 ± 6,8
cisplatina	4,5 ± 0,3	5,8 ± 0,3	4,7 ± 0,3	33,6	26,5 ± 5,7

^a Srednja vrednost ± SD iz tri do četiri eksperimenta [41,43]

n.o. – nije određeno

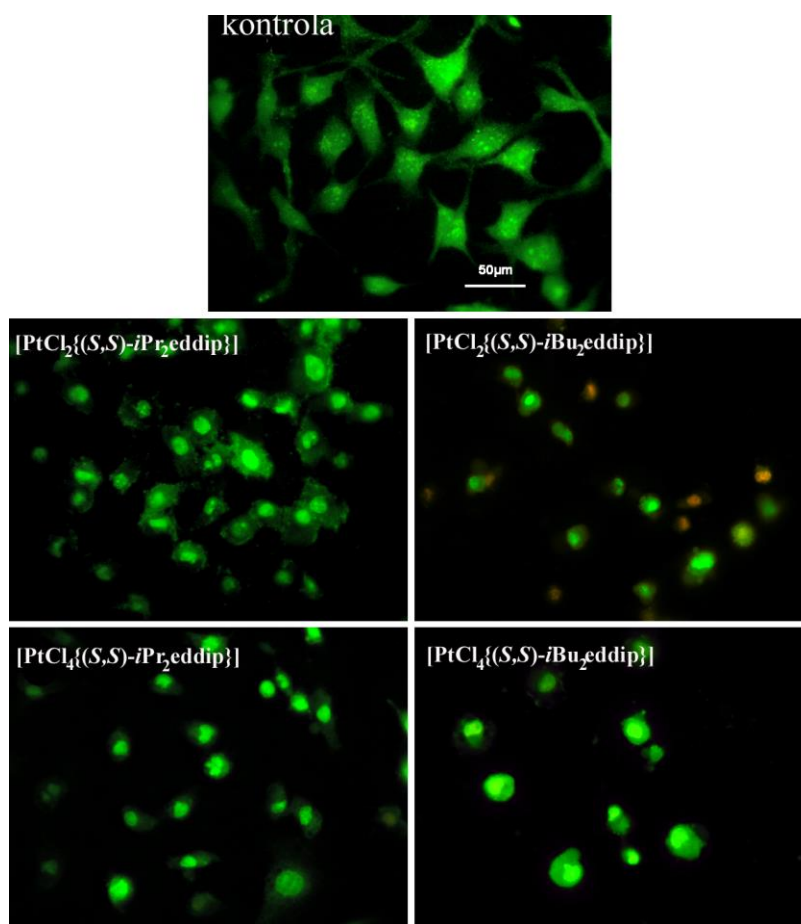
Tabela 2. IC₅₀ [μM]^a na U21, C6, L929 i B16 ćelijama, određene MTT testom (72 h).

Jedinjenje \ ćelijska linija	IC ₅₀ ± SD			
	U251	C6	L929	B16
[PtCl ₄ {(<i>S,S</i>)-Me ₂ eddch}]	2,5 ± 1,1	2,9 ± 1,0	4,5 ± 0,7	4,5 ± 0,3
[PtCl ₄ {(<i>S,S</i>)-Et ₂ eddch}]	1,9 ± 0,8	2,3 ± 0,2	3,6 ± 1,1	3,4 ± 0,1
[PtCl ₄ {(<i>S,S</i>)- <i>n</i> Pr ₂ eddch}]	2,2 ± 0,4	2,8 ± 0,3	2,7 ± 0,9	3,1 ± 0,4
[PtCl ₄ {(<i>S,S</i>)- <i>n</i> Bu ₂ eddch}]	7,4 ± 1,7	6,8 ± 1,9	6,7 ± 0,4	8,3 ± 1,7
cisplatina	11,5 ± 3,3	10,9 ± 3,1	11,2 ± 3,4	67,0 ± 4,9

^a Srednja vrednost ± SD iz tri do četiri eksperimenta [53]

U literaturi se mogu naći morfološke odlike smrti HeLa ćelija indukovane kompleksima platine(II) i platine(IV) sa R₂eddp ligandima, R = *i*Pr, *i*Bu, (Slika 8) [43]. Kompleksi [PtCl₂{(*S,S*)-*i*Bu₂eddp}], [PtCl₄{(*S,S*)-*i*Pr₂eddp}] i [PtCl₄{(*S,S*)-*i*Bu₂eddp}] indukuju apoptozu koja se može prepoznati kondenzacijom hromatina i/ili fragmentacijom ćelije. Kompleks [PtCl₂{(*S,S*)-*i*Pr₂eddp}] indukuje kondenzaciju hromatina u HeLa ćelijama, ali u suprotnosti sa akcijom kompleksa [PtCl₂{(*S,S*)-*i*Bu₂eddp}], [PtCl₄{(*S,S*)-*i*Pr₂eddp}] i [PtCl₄{(*S,S*)-*i*Bu₂eddp}] koji izazivaju zaokrugljivanje ćelija, kompleks [PtCl₂{(*S,S*)-*i*Pr₂eddp}] je uticao na promenu morfologije HeLa ćelija, koje su postale nepravilnijeg oblika, što sugerise razaranje ćelija (Slika 8) [43].

Sabo i saradnici takođe opisuju morfologiju smrti za slična jedinjenja platine(IV) sa četiri hlorido liganda i *NV* bidentatno vezanim R₂edda-tipom estra - [PtCl₄(*n*Bu₂eddp)] i [PtCl₄(*n*Pe₂eddp)] [40]. Nađeno je da [PtCl₄(*n*Bu₂eddp)] indukuje apoptozu u vidu kondenzovanja ili fragmentisanja HeLa i K562 ćelija. Za [PtCl₄(*n*Pe₂eddp)] je takođe primećeno da indukuje kondenzaciju hromatina kod HeLa ćelija, dok je posle dejstva na ćelije K562, mogla da se zapazi fragmentacija ćelija u tri skoro jednaka dela.



Slika 8. Etidijum bromidom i akridin oranžom obojene ćelije prethodno tretirane kompleksima platine(II/IV) 24 h, HeLa ćelije: kontrola; posle delovanja kompleksa platine(II) [PtCl₂{(S,S)-iPr₂eddp}] i [PtCl₂{(S,S)-iBu₂eddp}] i kompleksa platine(IV) [PtCl₄{(S,S)-iPr₂eddp}] i [PtCl₄{(S,S)-iBu₂eddp}].

Kompleksi platine(IV) sa R_2eddp ($R = Me, Et, nPr$) ispitivani su na raznim ćelijskim linijama da bi se otkrio uticaj supstituenta R na *in vitro* antiproliferativnu aktivnost. Aktivnost kompleksa zavisi od broja ugljenikovih atoma u estarskom lancu R – što je duži lanac, veća je aktivnost [48]. Takođe, rađen je test interakcije kompleksa $[PtCl_4(Et_2eddp)]$ i $[PtCl_4(nPr_2eddp)]$ sa pBR322 plazmidom DNK u odsustvu, kao i u prisustvu askorbinske kiseline (može da redukuje komplekse platine(IV) do odgovarajućih kompleksa platine(II)) i nađeno je da i platina(II) i platina(IV) kompleksi interaguju sa DNK [45]. To znači da mogu da se koriste kao „prolekovi“ i kao lekovi protiv raka.

Vrlo interesantnu seriju kompleksa platine(IV) sa cikloheksil funkcionalizovanim ligandima edda-tipa, pri čemu je etilendiaminski deo molekula premošćen metilenskom grupom, sintetisali su i okarakterisali Sabo i saradnici [54] (Slika 7). Za ove komplekse ($R = Me, Et, nPr, nBu$) ispitivana je *in vitro* antitumorska aktivnost na raznim tumorskim ćelijama raka (A375, B16, CT26CL25, HCT116, PC3, U251) i aktivnost je uporediva sa cisplatinom na ovim ćelijskim linijama. Takođe, za ovu seriju kompleksa izvršena su elektrohemijska ispitivanja cikličnom voltametrijom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom [55]. Ova studija ukazuje da se redukcija ovih kompleksa vrši kao dvoelektronski proces praćen gubitkom aksijalnih hlorido liganada i da dužina lanca C-atoma u estraskom delu utiče na redukcionu potencijal.

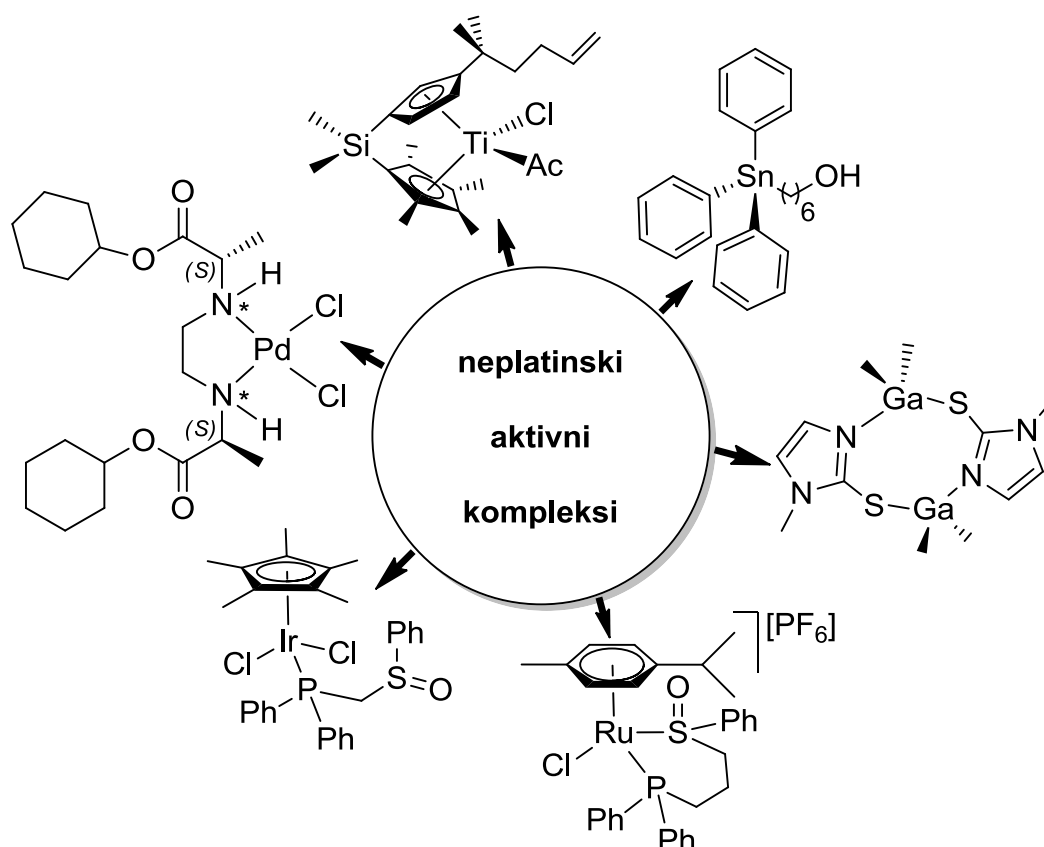
2.1.5. In vivo ispitivanja sa kompleksom $[PtCl_4(nBu_2eddp)]$

Od svih opisanih platinskih kompleksa sa ligandima R_2edda -tipa, jedino je kompleks $[PtCl_4(nBu_2eddp)]$ ispitivan *in vivo* što ga čini relativno interesantnim [56]. Rezultati su jasno pokazali da je kompleks efikasniji od cisplatine, da smanjuje rast tumorskih ćelija singenih miševa (C57BL/6), u dozama od 4 mg/kg i 2 mg/kg, u odnosu na netretirane životinje. Osim toga, značajna razlika je primećena kod oštećenja bubrega, ispitivani platina(IV) kompleks nije pokazao znake nefrotoksičnosti što ga čini relevantnim za dalja istraživanja u cilju pronalaženja boljeg leka protiv raka.

2.2. Drugi biološki aktivni neplatinski kompleksi

Većina lekova koji se koriste u hemioterapiji baziraju se na kompleksima platine (cisplatina i analozi). Razvoj neplatinskih kompleksa kao antitumorskih agenasa imaju za cilj da se prevaziđu glavna ograničenja platinskih lekova: uzak opseg delovanja, rezistentnost i značajna toksičnost. Neplatinska aktivna jedinjenja bazirana na zlatu(I/III), rutenijumu(II/III), paladijumu(II), galijumu(III), titanijumu(IV), kalaju(IV) i iridijumu(III) pokazuju da imaju različit mehanizam akcije, biodistribuciju i toksičnost od platinskih lekova. Literaturni podaci govore o tome da su neki kompleksi ovih metala znatno selektivniji prema raznim tumorskim ćelijskim linijama, pokazuju manju toksičnost, drugačije hemijske karakteristike, brzinu hidrolize i mehanizam delovanja od cisplatine [57,58]. Na Slici 9 prikazani su neki biološki aktivni neplatinski kompleksi.

U poslednje vreme se veoma aktivno radi na uvođenju nanostrukturnih materijala poput SBA-15 ili MCM-41, nosača metalnih kompleksa, koji oslobađaju antitumorsko jedinjenje u obolelu ćeliju, što predstavlja poseban pomak u razvoju antitumorske terapije [59,60]. Posebno interesovanje za nanomaterijale proističe od toga da mnoga *in vitro* aktivna jedinjenja imaju slabu rastvorljivost u vodi, nisu stabilna pri fiziološkim uslovima a samim tim se slabo apsorbuju i nisu biodostupni. Zbog svoje male veličine, nanočestice nude značajnu prednost tako što menjaju farmakokinetičko ponašanje supstance i poboljšavaju transport iste do ciljnog mesta.



Slika 9. Neki biološki aktivni neplatinski kompleksi.

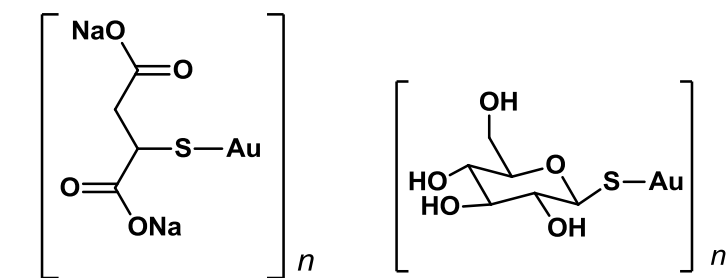
2.3. Biološki aktivna jedinjenja zlata

2.3.1. Zlato kroz istoriju

Upotreba zlata u medicini datira još od 2500 godina pre nove ere, gde se u terapeutske svrhe primenjivala u Kini [61]. U srednjovekovnoj Evropi alhemičari su imali veliki broj recepata za eliksir poznat kao *aurum potabile*, od kojih su mnogi sadržali malo zlata [62]. U farmakopejama 17. veka Nicholas Culpepper opisuje da zlato može da se koristi u tretmanu oboljenja koje prouzrokuju duševne bolesti, kao što su melanholija, nesvestica, groznica i epilepsija. Kasnije, u 19. veku, smeša zlato(I)-hlorida i natrijum-hlorida, $\text{Na}[\text{AuCl}_4]$ se koristila u terapiji sifilisa [63].

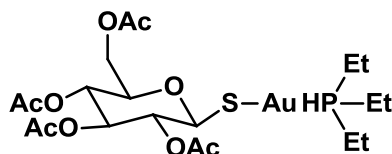
U moderno doba interesovanje za primenu jedinjenja zlata u medicini raste otkrićem Roberta Koch-a 1890. godine da kalijum-dicijanidoaurat(I), $K[Au(CN)_2]$, inhibira rast *Tubercle bacillus*. Posle prvobitne primene ovog kompleksa zlata(I) u lečenju tuberkuloze sa ohrabrujućim rezultatima, otkriveno je njegovo toksično delovanje. Uprkos toksičnosti ovog jedinjenja „zlatna dekada“ (1925-1935) je nastavljena, u kojoj je zlato(I)-tiolat primenjivan intravenski u terapiji lečenja tuberkuloze [64]. Terapija jedinjenjima zlata je pokazala da značajno smanjuje bol kod pacijenata koji nisu oboleli od tuberkuloze, što je navelo francuskog fizičara Forestier-a da ispituje uticaj jedinjenja zlata u lečenju reumatoidnog artritisa [65]. Međutim, Svetsko udruženje reumatologa je priznalo pozitivno dejstvo ovih kompleksa u lečenju reumatoidnog artritisa tek nakon višegodišnjih ispitivanja, 1960. godine [66]. Od tada se kompleksi zlata(I) primenjuju za lečenje i drugih reumatskih bolesti uključujući psorijazni, juvenilni i palihdromski artritis, kao i sistemski eritemski lupus [67] (Slika 10). Pojedini zlato(I)-tiolat lekovi, koji su prvo predstavljani 1920. godine, su i danas u kliničkoj upotrebi i uključeni su u klasu antireumatskih lekova, što je rezultiralo značajnim smanjenjem progresije bolesti. Metoda lečenja reumatoidnog artritisa pomoću kompleksa zlata(I) naziva se *hrizoterapija* i predstavlja sastavni deo moderne medicine.

U periodu 70-tih i ranih 80-tih, Sutton i saradnici razvili su fosfinsko jedinjenje zlata(I), auranofin, u lečenju reumatoidnog artritisa oralnim putem, što je za kliničku upotrebu odobreno 1985. godine [68,69]. U odnosu na tradicionalnu injektivnu primenu zlato(I)-tiolata, auranofin je ponudio značajne prednosti u efikasnosti lečenja bolesti, uz blaže sporedne efekte. Međutim, pokazalo se da je auranofin manje efikasan od drugih lekova na bazi zlata što je dovelo do toga da se ređe klinički upotrebljava [70].

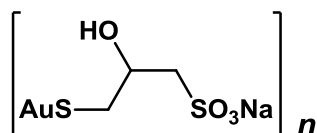


natrijum-aurotiomalat
(Myocrisin)

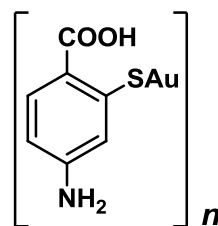
aurotioglukoza
(Solganol)



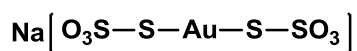
tetraacetil- β -D-tioglukoza-zlato(I)-tioetilfosfin
(Auranofin)



natrijum-aurotiopropanolsulfonat
(Allocrysin)



zlato(I) kompleks sa 4-amino-
2-merkaptobenzoevom kiselinom
(Krysoldal)



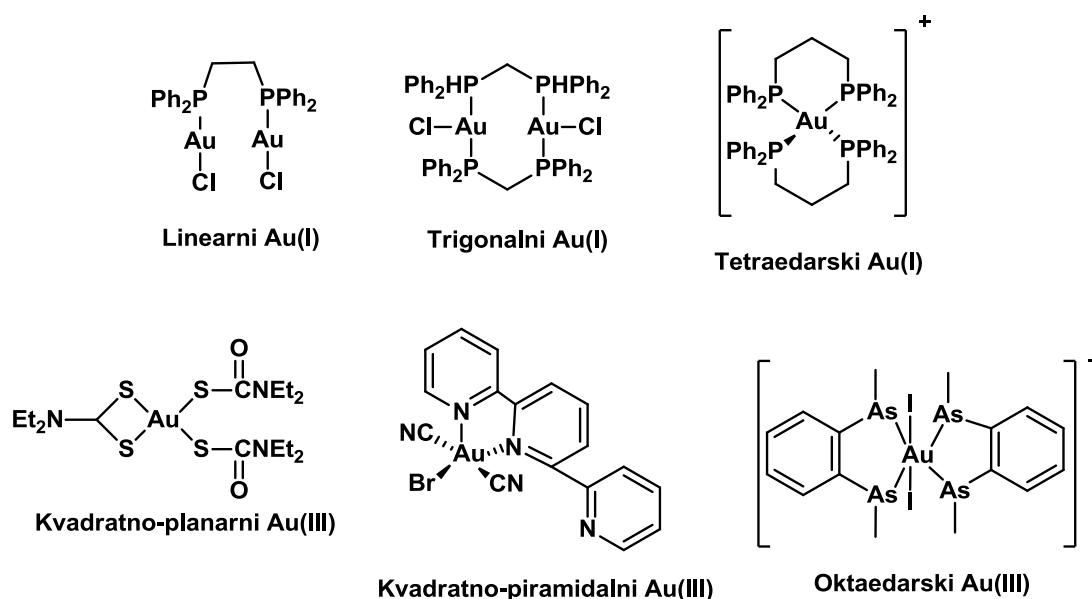
natrijum-aurotiosulfat
(Sanocrysin)

Slika 10. Strukture kompleksa zlata koji se klinički upotrebljavaju

2.3.2. Opšte karakteristike zlata

Zlato (hemijski simbol Au, latinski-*aurum* što znači sjaj kore) je prelazni metal koji se nalazi u 11. grupi Periodnog sistema elemenata, na kraju treće serije prelaznih metala. Elektronska konfiguracija zlata (redni broj 79) je $[\text{Xe}]4f^{14}5d^{10}6s^1$. Zlato je zastupljeno u Zemljinoj kori u količini od $1,1 \cdot 10^{-3}$ ppm. Gotovo redovno je u čistom elementarnom stanju u vidu zrnaca ili listića unutar kvarcnih stena ili kvarcnog peska koji nastaje trošenjem stena. Zlato je mek, plemenit metal žute boje koji je za razliku od ostalih metala otporan na hemijske supstance, rastvara se jedino u carskoj vodi (smeša koncentrovane azotne i hlorovodonične kiseline,) i u alkalnom rastvoru cijanida, pri čemu se obrazuje stabilni $[\text{AuCl}_4]^-$, odnosno $[\text{Au}(\text{CN})_4]^-$ kompleks [71–74]. Odlikuje se visokim sjajem, toplotnom i električnom provodljivošću i rastegljivošću.

Zlato može da se javi u oksidacionom stanju od -1 do $+5$, dok se u kompleksnim jedinjenjima najčešće javlja u obliku $+1$ i $+3$ koja su i najstabilnija oksidaciona stanja zlata. Takođe, u literaturi se pominju i kompleksi sa oksidacionim stanjem $+2$ i $+5$ [75]. Kompleks zlata sa fluorida ligandom, $[\text{AuF}_6]^-$ [76], ima oksidacioni broj $+5$ za koji se veruje da nema biološki značaj. Dinuklearni kompleksi zlata(II) sa difenilmetilentiofosfato ligandom, $[\text{CH}_2\text{P}(\text{S})\text{Ph}_2]^{2-}$, imaju važnu ulogu kao intermedijerni proizvodi u toku biološkog delovanja kompleksa zlata(I) [77,78]. Kompleksi zlata(I), d^{10} sistem, imaju najčešće koordinacioni broj 2 i linearnu geometrijsku strukturu, ali mogu imati i koordinacioni broj 3 i 4 (trigonalna, odnosno tetraedarska geometrijska struktura), dok kompleksi zlata(III), d^8 sistem, imaju koordinacioni broj 4 i kvadratno-planarnu geometrijsku strukturu, ali su mogući i kompleksi sa kvadratno-piramidalnom i oktaedarskom strukturom (Slika 11).



Slika 11. Moguće strukture zlato(I) i zlato(III) kompleksa

Pod određenim eksperimentalnim uslovima rastvor zlato(III) kompleksa se redukuje do koloidnog zlata, koje u zavisnosti od načina dobijanja, veličine koloidne čestice i oblika može biti crvene, plave ili ljubičaste boje. Na površini koloidne čestice nalazi se negativno naelektrisanje preko koga se ova čestica veže za protein. Zahvaljujući tome koloidno zlato se koristi kod izučavanja reakcija proteina kao citohemijski marker u elektronskoj mikroskopiji [79]. Tako se antitela obeležena koloidnim zlatom mogu upotrebiti za ispitivanje receptora za antigene (antigen je strano telo koje je dospelo u ćeliju) na ćelijskoj membrani. Pored toga, ubrizgavanjem koloidnog radioaktivnog izotopa ¹⁹⁸Au može se dobiti jasniji snimak jetre.

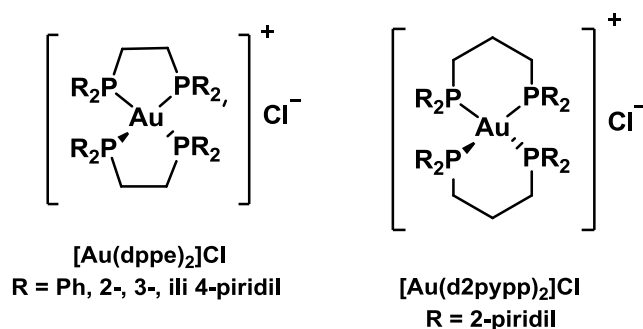
2.3.3. Kompleksi zlata(I) kao antitumorski agensi

Zlato(I) kompleksi generalno imaju formu [LAuX] (L = neutralni ligand, X = anjonski ligand). Takođe, primećene su i jonske vrste [LAuL]⁺ i [XAuX]⁻ [73]. Ove linearne komplekse karakteriše da sadrže velike polarizibilne donorske atome kao što su sumpor u tiolima (RSH) i tioetrima (R₂S), kao i fosfor u tercijarnim

fosfinima (R_3P). Takođe, cijanido i izocijanido ligandi se koordinuju za zlato(I) jon [72]. To je u skladu sa percepcijom da je zlato(I) jon meka Lewis-ova kiselina pa pokazuje veliki afinitet prema ligandima koji su meke Lewis-ove baze. Zlato(I) kompleksi se obično pripremaju tretiranjem tetrahloridoaurat(III) jona, $[AuCl_4]^-$, ligandima tipa R_2S , R_3P ili RNC. Reakcija se uglavnom odvija putem redukcione eliminacije neutralnog $[LAuCl_3]$ intermedijera. Kompleksi zlata(I) su stabilni u nevodenim aprotičnim rastvaračima, kao što su acetonitril, dok su izuzetno nestabilni u vodenom rastvoru, pri čemu se lako disproporcionišu na komplekse zlata(III) i koloidno zlato [80]. Nastajanje kompleksa zlata(III) u organizmu, nakon tretmana sa kompleksima zlata(I), je proces koji izaziva toksične efekte [81–83].

Nađeno je da kompleksi zlata(I) pokazuju aktivnost prema različitim ćelijskim tumorskim linijama [84,85]. Sredinom 1980. godine utvrđeno je da auranofin inhibira rast tumorski ćelija *in vitro* prema HeLa tumorskim ćelijama, dok postoje ograničenja u *in vivo* antitumorskoj aktivnosti na jednom tumorskom modelu miša [85]. Od tada se pokazalo da veliki broj drugih linearnih, dvo-koordinovanih, zlato(I) fosfinskih kompleksa smanjuju rast tumorskih ćelija *in vitro*. Ovi kompleksi uglavnom sadrže i S-ligande kao što su tiošećeri [86], tionukleobaze i ditiokarbamati [87], a u skorašnjim studijama čak i vitamin K_3 [88], azakoumarinske [89] i naftalimidske derivate [90].

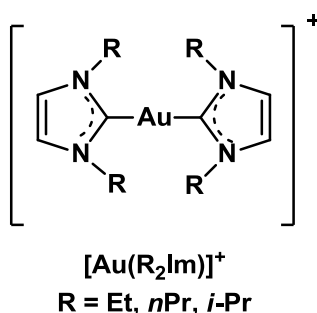
Antitumorsku aktivnost pokazuju i tetraedarski kompleksi zlata(I) sa difosfinskim ligandima [91,92]. Predstavnik tetraedarskog kompleksa je zlato(I)-*bis*(difenilfosfino)etan), $[Au(dppe)_2]$, koji je aktivan prema raznim tumorskim ćelijama. Međutim, ovaj kompleks nije našao primenu u lečenju tumora jer sprečava normalno funkcionisanje mitohondrija i izaziva oboljenja srca, jetre i pluća. Kompleksi opšte formule $[Au(R_2P(CH_2)_nPR_2)]$ su pokazali najveću antitumorsku aktivnost kada je $R = \text{fenil}$, 2-, 3-, 4-piridil i $n = 2, 3$ [91,92] (Slika 12). Generalno, antitumorska aktivnost ovih kompleksa se znatno smanjuje, ili čak potpuno gubi, zamenom fenil grupa na atomu fosfora nekim drugim grupama [92].



Slika 12. Primeri tetraedarskih kompleksa zlata(I) sa difosfinskim ligandima

Pretpostavljalo se da auranofin i Et_3PAuCl utiču na funkciju mitohondrija, a kasniji rezultati pokazali su da je njihov mehanizam delovanja takav da utiče na mitohondrije dovodeći do postepene apoptoze [93]. Takođe, smatralo se da je za antitumorsku aktivnost zlato(I) kompleksa neophodno prisustvo liganada koji sadrže fosfor, ali poslednjih nekoliko godina sintetisano je više linearnih zlato(I) kompleksa sa *N*-heterocikličnim karbenskim (NHC) ligandima [94], ciklodifospazenskim [95] i *N,N'*-disuptituisanim ciklotioureatskim ligandima [96].

Ponašanje ovih i sličnih kompleksa se slaže sa ponašanjem antitumorskih kompleksa poznatih kao DLC (delokalizovani lipofilni katjoni) [97] koji se akumuliraju u mitohondrijama ćelija tumora pod uticajem povišenog membranskog potencijala koji je karakterističan za ćelije raka [98]. Međutim, visoka lipofilnost ovih jedinjenja rezultuje visokom citotoksičnošću, koja je posledica neselektivne koncentracije jedinjenja u mitohondijama bilo tumorskih ili netumorskih ćelija, izazivajući veću propustljivost membrane [99,100]. Na Slici 13 prikazana je strukturna formula predstavnika DLC kompleksa, opšte formule $[\text{Au}(\text{R}_2\text{Im})]^+$, gde je R = Et, *n*Pr, *i*Pr, a Im imidazol [94]. Najveću antitumorsku aktivnost u ovoj seriji pokazuje kompleks sa izopropil grupama na atomu azota imidazolskog prstena [94].



Slika 13. Primer lipofilnog katjona zlato(I) kompleksa

2.3.4. Kompleksi zlata(III) kao antitumorski agensi

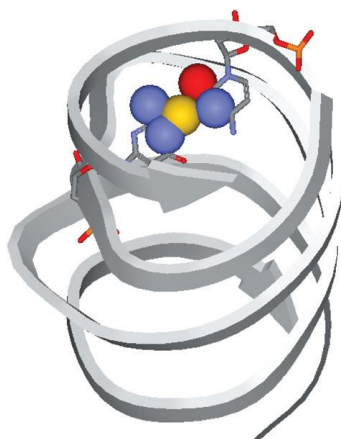
Pored zlato(I) kompleksa, zlato(III) jedinjenja predstavljaju potencijalne antitumorske agense [101]. Zlato(III) kompleksi su izostrukturalni i izoelektronski platina(II) kompleksima (kvadratno-planarni, d^8 -sistem). Prema tome, očekuje se da imaju sličnu aktivnost kao cisplatinu, odnosno da je DNK njihov ciljani molekul čijom interakcijom se sprovodi antitumorski efekat [102,103]. Međutim, u poređenju sa kompleksima platine(II), kompleksi zlata(III) su manje stabilni pri fiziološkim uslovima (pH = 7,4; 37 °C). Kompleksi zlata(III) imaju visoke vrednosti redoks potencijala, što govori o njihovim izrazitim oksidacionim osobinama, lako se redukuju do elementarnog zlata, a to za posledicu ima da su manje antitumorski efikasni i toksičniji. Poslednjih decenija sintetisan je veliki broj zlato(III) kompleksa koji pokazuju visoku antitumorsku aktivnost prema raznim tumorskim ćelijama [104,105], a neki od njih pokazuju efikasnost prema ćelijskim linijama koje su rezistentne na cisplatinu [106–108]. Da bi se povećala stabilnost zlato(III) jona, u sintezama novih kompleksa korišćeni su različiti polidentatni ligandi kao što su poliamini, terpiridin, fenantrolin, derivati fenilpiridina, biperidina i porfirina, peptidi koji sadrže aminokiselinu L-histidin i ditiokarbamati [92].

Rezultati ispitivanja kompleksa zlata(III) su pokazali da se njihova antitumorska aktivnost, u većini slučajeva, može pripisati prisustvu formiranog zlato(III) kompleksa, jer većina liganada upotrebljenih za sintezu kompleksa ne pokazuje značajnu antitumorsku aktivnost. Na primer, $[\text{Au}(\text{Gly-L-His-N,N',N''})\text{Cl}]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ kompleks pokazuje značajnu antitumorsku aktivnost prema A2780/S ćelijskoj liniji (karcinom jajnika), dok su kompleksi

Gly-L-His dipeptida sa cink(II), kobalt(II), paladijum(II) i platina(II), praktično neaktivni kada se vrše testovi na istoj ćelijskoj liniji [92,109]. Bitno je napomenuti da Gly- L-His dipeptid ne pokazuje antitumorsku aktivnost.

I dok se verovalo da je DNK primarna meta zlato(III) kompleksima, eksperimentalni podaci su davali vrlo zbunjujuću sliku. U nekim slučajevima postoje jasni dokazi o narušavanju DNK lanca i apoptoze, dok se u drugim slučajevima interakcije zlato(III) kompleksa sa DNK znatno razlikuju i slabije su od platinskih analoga. Međutim, ne postoje direktni dokazi za formiranje Au(III)-DNK adukta u živim ćelijama. Nedoslednost podataka ukazuje da intracelularni DNK možda ne predstavlja primarnu ili jedinu biološku metu za zlato(III) komplekse.

Kristalografska studija je pokazala da se zlato(III) jon vezuje za RNK dupleks tačno između Watson-Crick strane guanin-citozin para nakon deprotonovanja N1 atoma azota guanina [102]. Koordinovanje zlato(III) jona i RNK preko jednog atoma kiseonika i tri atoma azota guanin-citozin para ne narušava strukturu RNK dupleksa [110,111] (Slika 14).



Slika 14. Struktura RNK dupleksa sa zlato(III) jonom.
(preuzeto iz reference [102])

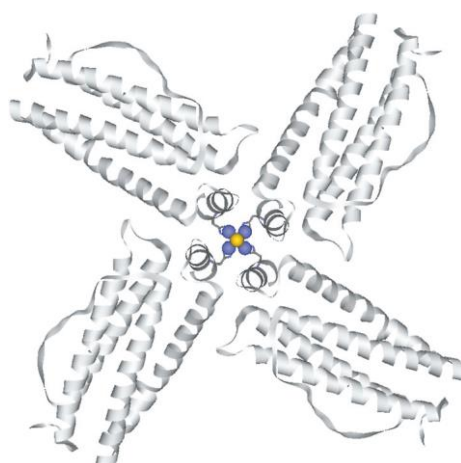
Nedavna istraživanja od strane Messori-a i saradnika pokazala su da citotoksični zlato(III) kompleksi imaju visoki afinitet prema raznim modelima proteina [102]. Stoga bi zlato-protein interakcije mogle da budu odgovorne za citotoksičnost ovih jedinjenja. Do danas je objavljen veliki broj proteina koji su biološka meta za komplekse zlata, uključujući tioredoksin reduktazu (TrxR) [108], cistein proteazu kao i humani serum album, humanu glutation reduktazu i protein

tirozin fosfatazu. Takođe, histon diacetilaza, protein kinaza C i ciklin-zavisna kinaza se smatraju mogućim biološkim metama za komplekse zlata [102]. Štaviše, zlato(III) kompleksi pokazuju da efikasno reaguju sa enzimom PARP (poli-(adenozin difosfat riboza) polimeraza) koji sadrži jone cinka(II) u proteinskom domenu pri čemu dolazi do supstitucije cink(II) jona sa jonima zlata(III) i stvaranje takozvanog zlatnog „fingera“ [102] (Slika 15).

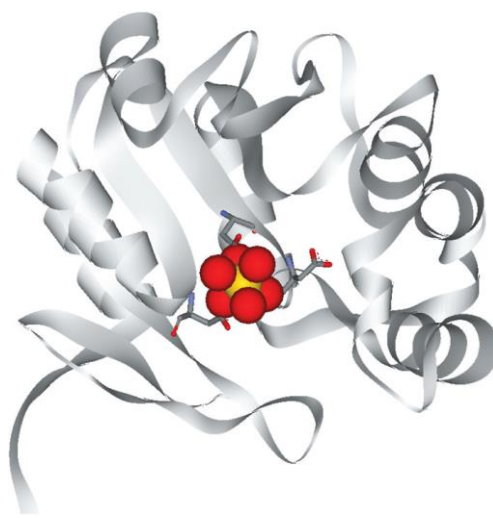


Slika 15. Struktura C2H2 zlato „fingera“
(C, Cistein; H, Histidin)
(preuzeto sa www.wikipedija.org)

Kristalografski podaci [111] ilustruju da je zlato(III) jon sa mutiranim humanim H feritinom (H9X), vezan za Cys140 i histidin, His57 i His60, His118 i His173 (Slika 16) [102]. U cilju prilagođavanja koordinaciji sa zlato(III) jonom bočni lanci His60 i His57 trpe konformacione promene u odnosu na nativni protein. Suprotno ovom vezivanju je vezivanje zlato(III) jona u *Escherichia coli* AphA enzimu (phA je periplazmična kisela fosfataza) [102]. Aktivno mesto ovog enzima sadrži Mg(II) jon. U prisustvu zlato(III) jona dolazi do njihove supstitucije bez značajnog narušavanja konformacije enzima. Stoga je zlato(III) jon u ovom enzimu isključivo okružen donorima kiseonika i poseduje oktaedarsku koordinaciju [102] (Slika 17).



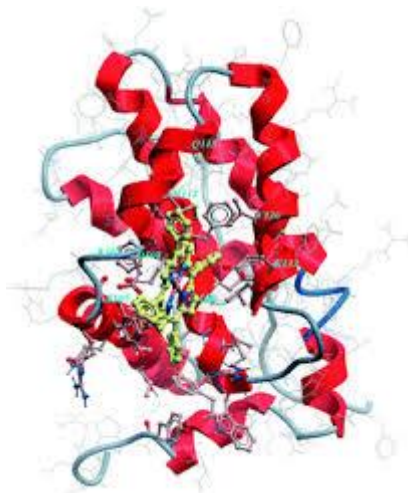
Slika 16. Struktura kompleksa zlata(III) sa mutiranim H feritinom. Au734 se nalazi na osi simetrije četvrtog reda i okružen je sa četiri His173 jedinice. (preuzeto iz reference [102])



Slika 17. Struktura kompleksa zlata(III) sa AphA enzimom *Escherichia coli* bakterije. (preuzeto iz reference [102])

Najnovija istraživanja u oblasti interakcije zlato(III) jedinjenja sa proteinima pokazala su da je selenoenzim tioredoksin reduktaza (TrxR) vrlo specifična meta za citotoksične komplekse zlata [102] (Slika 18). Ovaj enzim sadrži cistein-selenocistein redoks par koji je uključen u regulaciju intracelularnog redoks balansa. Ispitivanje mehanizma TrxR inhibicije serijom zlato(III) kompleksa pokazuje da ova jedinjenja

proizvode snažnu inhibiciju enzima tek nakon prethodne redukcije sa NADPH, što ukazuje da je inhibicija enzima rezultat strukturnih promena usled kofaktorskog vezivanja [110].

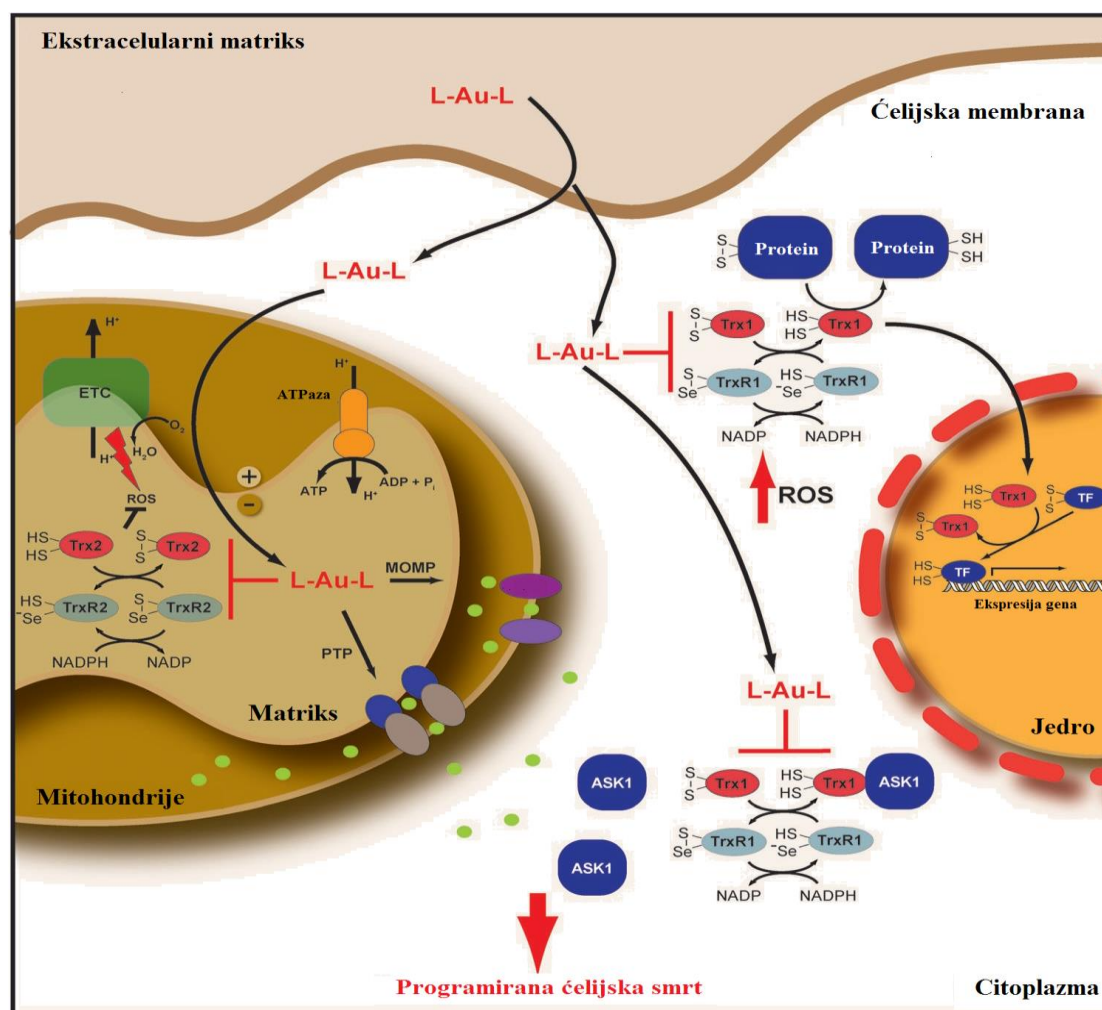


Slika 18. Interakcija zlato(III) jona sa TrxR.
(preuzeto iz reference [134])

Mitohondrije imaju veoma važnu ulogu u obezbeđivanju energije, regulaciji apoptoze i unutarćelijskim redoks procesima i skoro sva proučavanja antitumorskog delovanja kompleksa zlata ukazuju da su mitohondrije najčešće meta ovih kompleksa [108,111]. Bindoli i saradnici su prvi uočili povezanost inhibicije TrxR2 sa promenom propustljivosti membrane mitohondrija i početkom apoptoze [112]. Različita jedinjenja zlata(III), uključujući i zlato(III) ditiokarbamat, su se pokazala kao moćni inhibitori bilo mitohondrijalnog ili citosolnog TrxR, koji izazivaju apoptozu [113,114]. Skorašnja proučavanja inhibicije izolovanog TrxR pomoću zlato(III) kompleksa sugerišu da je oksidacija enzima putem oksidacije tiola ili selenola možda značajnija nego koordinovanje metala za enzim [108]. Takođe, važno je napomenuti da bi za skoro sve poznate aktivne zlato(III) komplekse, aktivni metaboliti mogli biti zlato(I) joni, dobijeni redukcijom zlato(III) vrste *in vivo* [110].

Bindoli i saradnici su predložili opšti mehanizam delovanja zlato(I) i zlato(III) jedinjenja [108] na ćelijsku smrt, koji uključuje inhibiciju TrxR1 i TrxR2, zasnovan na činjenicama da (i) apoptoza koja je indukovana od strane auranofina uključuje oksidaciju redoksiredoxin 3 i regulisana je Bcl-2 familijom proteina [115] i (ii) auranofin [116] i zlato(III) tiokarbamat [113] su pokazali da stimulišu MAP

(mitogen-aktivirana protein kinaza), što dovodi do sigurne ćelijske smrti. Iako je predloženi mehanizam veoma privlačan, važno je uzeti u obzir da mnogi transkripcioni proteini sadrže cistein (Cys) i selenocistein (Sec) ostatke koji mogu da budu meta za jedinjenja zlata, stoga su oba mehanizma verovatnija (Shema 4).



Shema 4. Predloženi mehanizam citotoksičnog dejstva jona zlata *in vivo* (Jedinjenja zlata mogu indukovati smrt ćelija raka „nišaneći“ proteine u različitim delovima ćelije).

Usled potencijalne primene zlato(III) kompleksa u terapiji lečenja tumora, u poslednje vreme, pored proteina, intenzivno su izučavane reakcije zlato(III) jona sa drugim biološki važnim ligandima kao što su aminokiseline i peptidi. Poznato je da su aminokiseline i peptidi dobri helatni ligandi sposobni da se koordinuju za razne metalne jone [102]. Prirodne aminokiseline poseduju dva potencijalna mesta za vezivanje, azot iz amino grupe i karboksilatni kiseonik i sklone su formiranju

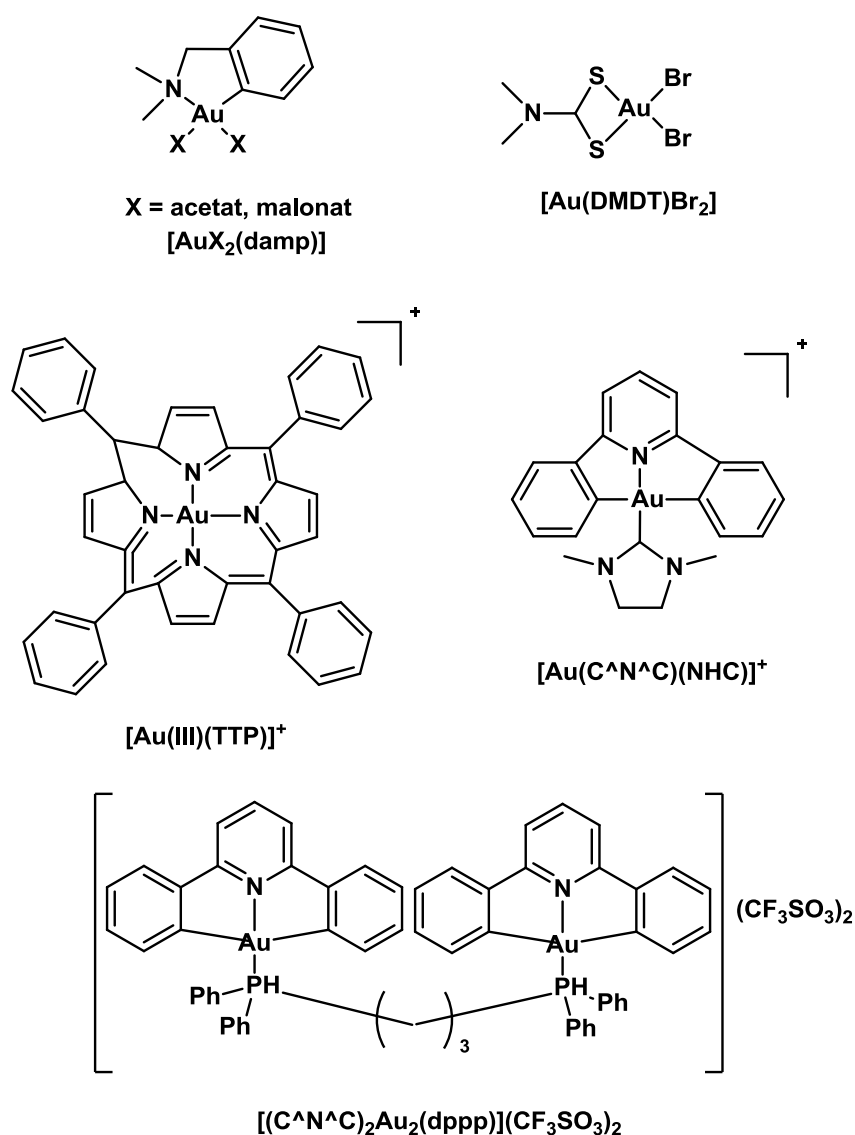
petočlanih helatnih prstenova sa zlato(III) jonima. Takođe, zlato(III) joni se mogu vezati i za bočne ostatke aminokiselina kao što su imidozalni atom azota iz L-Histidina ili tiolatni i tioetarski atom sumpora iz L-cisteina i L-metionina. Sa druge strane, terminalni azot iz amino grupe i karboksilatni kiseonik su previše udaljeni jedan od drugog kod proteina da bi se koordinovali za isti metalni jon u formi da se nagrade helatni prstenovi [102]. U reakciji između zlato(III) jona i peptida, formiranje stabilnog kompleksa se obično odvija preko azotovog atoma iz amidne veze, a to zahteva prethodno deprotonovanje NH grupe iz amidne veze [102].

Generalno, zlato(III) kompleksi nisu stabilni pod fiziološkim uslovima zbog njihovog visokog redoks potencijala i velike brzine hidrolize. U poslednje vreme strategija sinteze zlato(III) kompleksa zasniva se na stabilizaciji zlato(III) oksidacionog stanja. Velika stabilizacija zlato(III) jona ima za posledicu njegovu smanjenu reaktivnost, a samim tim i slabije antitumorsko delovanje odgovarajućih kompleksa. Na primer, $[\text{Au}(\text{cyclam})](\text{ClO}_4)_2\text{Cl}$ kompleks, (cyclam = 1,4,8,11-tetraazaciklotetradekan), usled velike stabilnosti zlato(III) jona ne pokazuje značajnu antitumorsku aktivnost [117].

Od mnogobrojnih sintetisanih zlato(III) kompleksa samo nekoliko je ispitivano *in vivo* [118] (Slika 19). Prvi u nizu je $[\text{AuX}_2(\text{damp})]$ (damp = 2-[(dimetilamino)metil]-fenil, X = malonat i acetat) [101], zatim zlato(III) ditiokarbamatski kompleksi, sintetisani od strane Fregona i saradnika [119]. Kompleksi $[\text{Au}(\text{DMDT})\text{X}_2]$ i $[\text{Au}(\text{ESDT})\text{X}_2]$ (DMDT = N,N-dimetiltiokarbamat; ESDT = etilsarkozinditiokarbamat; X = Cl, Br) su više toksični *in vitro* od cisplatine i pokazuju efikasnost na pojedinim tumorskim ćelijskim linijama na kojima je cisplatina rezistentna [119]. Predstavnik iz ove serije, $[\text{Au}(\text{DMDT})\text{Br}_2]$, pokazuje da značajno inhibira rast ksenograftova raka dojke u miševima [120].

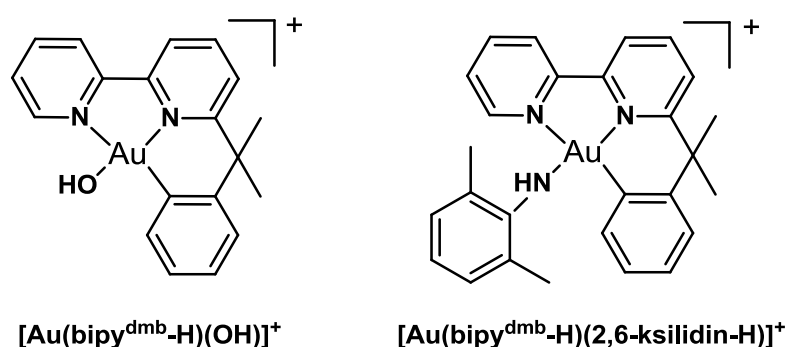
Sledeća serija zlato(III) kompleksa su porfirinski kompleksi, sintetisani od strane Che-a i saradnika, među kojima je najviše testiran $[\text{Au}(\text{III})(\text{TPP})]\text{Cl}$ (gde je TPP porfirinato ligand) koji pokazuje značajnu *in vivo* antitumorsku aktivnost prema nekoliko tumorskih modela kod pacova i miševa [121,122]. Porfirinski ligand značajno stabilizuje zlato(III) jon pa je sprečena redukcija od strane bioloških reducenata kao što su glutation (GSH) i askorbinska kiselina [123]. Ista grupa istraživača je nedavno objavila rezultate zlato(III) NHC kompleksa, $[\text{Au}(\text{C}^{\wedge}\text{N}^{\wedge}\text{C})(\text{NHC})]^+$, koji suzbija rast tumora kod miševa [124].

Najnovija *in vivo* istraživanja istih autora pokazuju da kompleks zlato(III)-fosfin, $[(C^{\wedge}N^{\wedge}C)_2Au_2(dppp)](CF_3SO_3)_2$ ($C^{\wedge}N^{\wedge}C$ je 2,6-difenilpiridin; dppp je bis(difenilfosfino)propan), ispoljava citotoksičnost na tumorskim ćelijama tako što inhibira tioredoksin reduktazu, izazivajući smrt ćelije uzrokovane stresom endoplazmatičnog retikuluma. Ovo istraživanje ukazuje na mogućnost da će se kompleks zlato(III)-fosfin potencijalno primenjivati u terapiji lečenja tumora [125].



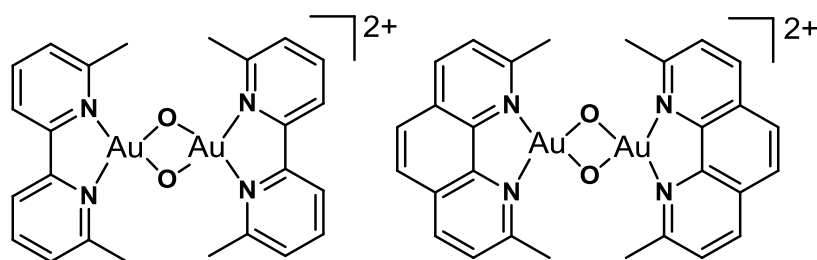
Slika 19. Primeri zlato(III) kompleksa koji su pokazali antitumorsku aktivnost *in vivo*.

Messori i saradnici nedavno su objavili razne lipofilne zlato(III) komplekse sa tridentatnim ligandima koji pokazuju značajnu antitumorsku aktivnost [126,127]. Dva kompleksa iz ove serije, $[\text{Au}(\text{bipy}^{\text{dmb}}\text{-H})(\text{OH})]^+$ i $[\text{Au}(\text{bipy}^{\text{dmb}}\text{-H})(2,6\text{-ksilidin-H})]^+$ (pri čemu je bipy^{dmb} 6-(1,1-dimetilbenzil)-2,2'-bipiridin) (Slika 20), pokazuju snažnu antitumorsku aktivnost prema ćelijama karcinoma jajnika kod žena (senzitivna (A2708/S) i rezistentna (A2708/R) ćelijska linija na cisplatinu) sa IC_{50} vrednostima u intervalu od 1,0 do 9,0 μM . Ovi kompleksi indukuju apoptozu u većem obimu od cisplatine i oksaliplatine sa skromnim promenama ćelijskog ciklusa.



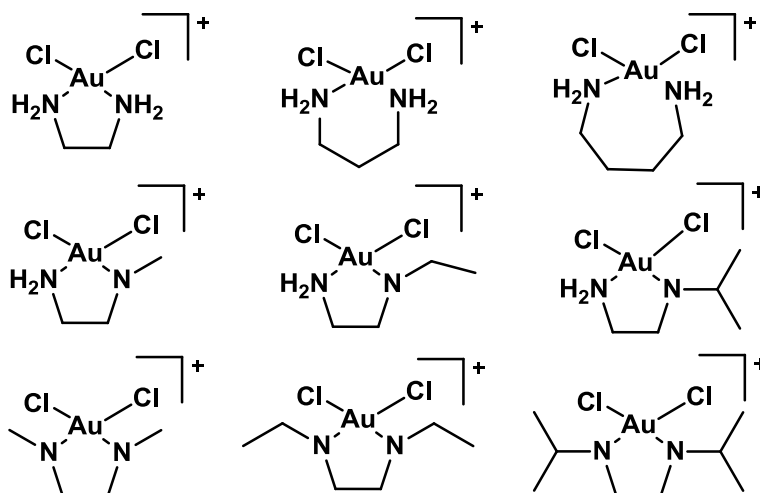
Slika 20. Strukturne formule antitumorski aktivnih kompleksa zlata(III) sa derivatima 2,2'-bipiridina

Messori, Cinellu i saradnici su prikazali antitumorske osobine kiseonično premošćenih binuklearnih kompleksa zlata(III), $[\text{Au}_2(\mu\text{-O})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})_2]^{2+}$, (pri čemu je $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ = 2,2'-bipiridin ili supstituisani 2,2'-bipiridin) [104,128] (Slika 21). Ovi kompleksi pokazuju 5–15 puta veću antitumorsku aktivnost prema A2708/S i A2708/R ćelijskim linijama u odnosu na ostale binuklearne komplekse zlata(III).



Slika 21. Strukturne formule nekih antitumorski aktivnih dinuklearnih kompleksa zlata(III)

Al-Maythaly i saradnici sintetisali su seriju zlato(III) kompleksa sa nesupstituisanim etilendiaminskim (etilendiamin (en), propilendiamin (pn), butilendiamin (bn)), *N*-mono-supstituisanim (*N*-Me-en, *N*-Et-en, *N*-*i*Pr-en) i *N,N'*-disupstituisanim etilendiaminskim ligandima (*N,N'*-Me₂-en, *N,N'*-Et₂-en, *N,N'*-(*i*Pr)₂-en) (Slika 22). Opšta formula ovih jedinjenja može se prikazati kao [Au(alkildiamin)Cl₂]Cl. *In vitro* ispitivanja ovih kompleksa na tumorskim ćelijskim linijama prostate (PC-3) i želuca (CGC-791) pokazala su zavidnu antitumorsku aktivnost [129,130].



Slika 22. Formule zlato(III) kompleksa sa *en*-tip ligandima

2.3.5. Primena kompleksa zlata u terapiji nekih oboljenja

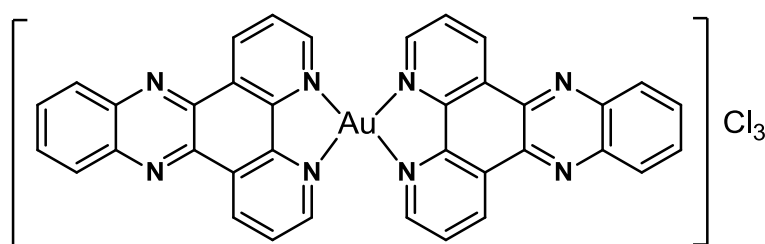
Reumatoidni artritis (RA) je hronično inflamatorno oboljenje koga karakteriše migracija aktiviranih fagocita i leukocita u sinovijalno tkivo, što uzrokuje progresivno uništavanje hrskavice, kostiju i otok zglobova. Postoje dokazi da jedinjenja zlata imaju nekoliko različitih načina kojima deluju u ovoj kompleksnoj bolesti a generalno, prema načinu primene u medicini za lečenje reumatoidnog artritisa danas se kompleksi zlata mogu podeliti u dve grupe:

- 1) Tiolato-zlato(I/III) kompleksi koji se daju intravenozno,
- 2) Fosfinski kompleksi zlata(I) koji se u organizam unose oralnim putem (auranofin).

Ono što se pouzdano zna jeste da se u organizmu kompleks zlata veže za albumin preko amino kiseline cistein-34 [131]. Albumin se veže za auranofin supstituišući tetraacetiltioglucozidni ligand u kompleksu. Preko albumina, kompleks dospeva u eritrocite gde se dalje veže za tripeptid glutation (γ -glutamilcisteilglicin) i hemoglobin [132].

Različita jedinjenja zlata(I) i zlata(III) se istražuju kao antihiv agensi [133,134]. Aurotiomalat se pokazao kao stimulator imuno sistema domaćina. Usporava napredovanje AIDS-a kod miševa i daje mogućnost primene ovakve terapije u lečenju AIDS-a kod ljudi [135]. Najnovijim istraživanjima serije fosfornih jedinjenja zlata(I) [133] i zlato(III) porfirin kompleksa [134] je ustanovljeno da postoji direktniji efekat na HIV tako što ova jedinjenja inhibiraju aktivnost njegove reverzne transkriptaze bez prouzrokovanja toksičnih efekata na ćelije imuno sistema.

Takođe, različite parazitske bolesti su glavni zdravstveni problem u siromašnim područjima i posledično tome postoji hitna potreba za priuštivim antiparazitskim lekovima [136]. Jedinjenja na bazi zlata nude ogroman potencijal na ovom polju jer mogu vezivati tiol i seleno proteine. U nedavnim istraživanjima zlato(III) kompleks $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$ (gde je dppz = 2,5-bis(2-piridil)pirazin (Slika 23) je uključen među nekoliko metalnih jedinjenja testiranih na parazitskoj cistein proteazi, kruzainu iz *Trypanosoma cruzi* i cpB-u iz *Leishmania major* [137]. Iako ovo jedinjenje nije imalo nikakvog efekta na rast *T. cruzi*, otvorilo je vrata za ispitivanje drugih zlato(I) jedinjenja kao što su auranofin, koji se pokazao kao inhibitor cisten proteaze.



Slika 23. Strukturna formula antiparazitskog kompleksa zlata(III), $\text{Au}(\text{dppz})_2\text{Cl}_3$
dppz: 2,5-bis(2-piridil)pirazin.

2.4. Cilj rada

Pojačan interes za komplekse prelaznih metala sa ligandima edda-tipa i njihovim derivatima javio se u prošloj deceniji zbog jakog *in vitro*, a pogotovo nedavno kada je uočen visok *in vivo* potencijal kompleksa $[\text{PtCl}_4(n\text{Bu}_2\text{eddp})]$, a manji neželjeni efekti, odnosno toksičnost na pojedine organe, u odnosu na cisplatinu koja se već primenjuje u medicini kao citostatik.

Zbog svih rezultata nađenih u literaturi, kao i zbog rezultata dobijenih našim istraživanjima, bilo je interesantno proširiti strukturna i antitumorska istraživanja na komplekse zlata(III) sa ligandima R_2edda -tipa.

U okviru ove *doktorske disertacije*, predviđeni su sledeći zadaci:

– Sinteze kompleksa, opšte formule $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{edda-tip}\}]\text{PF}_6$, sa ligandima:

- *O,O'*-dialkil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-propanoatom, (*S,S*)- R_2eddip , R = butil, (*nBu*); pentil, (*nPe*); izobutil, (*iBu*); izoamil, (*iAm*); ciklopentil, (*cPe*).
- *O,O'*-dialkil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(4-metil)-pentanoatom, (*S,S*)- R_2eddl , R = propil, (*nPr*); butil, (*nBu*); pentil, (*nPe*); izobutil, (*iBu*).
- *O,O'*-dialkil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil) propanoatom, (*S,S*)- R_2eddch , R = metil, (*Me*); etil, (*Et*); propil, (*nPr*); butil, (*nBu*); izobutil, (*iBu*); izoamil, (*iAm*).

- Sastav i strukture kompleksa utvrditi na bazi elementalne analize.
- Strukturnu kompleksa utvrditi na bazi njihovih elekton-apsorpcionih, infracrvenih, nuklearno-magnetnih i masenih spektara.
- Ispitati elektrohemijsko ponašanje dobijenih kompleksa.
- Ispitati antitumorsku aktivnost nagrađenih kompleksa.
- Ispitati mehanizam izumiranje ćelija tretiranim kompleksima.
- Ispitati stabilnost izabranog kompleksa pri fiziološkim uslovima.
- Ispitati ponašanje izabranog kompleksa sa prirodnim reducentom, askorbinskom kiselinom (AK).
- Ispitati interakciju izabranog kompleksa sa proteinom, goveđim serum-albuminom.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Hemikalije i reagensi

Polazni kompleks zlata, natrijum-tetrahlridoaurat(III) dihidrat, $\text{Na}[\text{AuCl}_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, je dobijen standardnom procedurom polazeći od elementarnog zlata (99,9%) [138]. Hemikalije i reagensi CDCl_3 (99,8%), $\text{DMSO-}d_7$ (99,8%), acetone- d_6 (99,8%), amonijum-heksafluorofosfat i goveđi serum-album (BSA) su nabavljeni od Sigma-Aldrich Chemical Co. Ostale supstance korišćene u ovom radu (rastvarači, elektroliti) su dobijene od različitih proizvođača i upotrebljene bez dodatnog prečišćavanja.

3.2. Sinteza liganda

3.2.1. Sinteza *O,O'*-diizoamil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-propanoat dihidrohlorid, [(*S,S*)-*H*₂*iAm*₂*eddip*]*Cl*₂

Tionil-hlorid ($4,0 \text{ cm}^3$, 55 mmol) je tokom jednog sata ukapavan u balon koji sadrži $40,0 \text{ cm}^3$ apsolutnog izoamil alkohola (3-metil-1-butanol) ohlađenog na $0 \text{ }^\circ\text{C}$ u ledenom kupatilu. Nakon toga u balon je dodato 1,50 g (5,41 mmol) (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-propanske kiseline hidrohlorida, [(*S,S*)-*H*₃*eddip*]*Cl*, i suspenzija je refluktovana 16 sati na temperaturi ključanja alkohola, $\approx 130 \text{ }^\circ\text{C}$. Smeša je procedena, a filtrat ostavljen u frižideru na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ nekoliko dana. Dobijen je beli praškasti proizvod koji je ispran više puta hladnim izoamil alkoholom.

[(S,S)-H₂iAm₂eddip]Cl₂·0,75H₂O: Prinos 1,22 g; 54%. Elementalna analiza: izračunato za C₁₈H₃₈N₂O₄Cl₂·0.75H₂O: C, 50,17; H, 9,23; N, 6,50%. Nađeno: C, 50,07; H, 8,77; N, 6,44%. ¹H NMR [200 MHz, DMSO-*d*₆]: δ 0,90 (CH₃-*i*Am, 12H), 1,48–1,55 (m, CH₂-*i*Am, CH₃, 10H), 1,68 (CH-*i*Am, 2H), 3,31–3,47 (m, CH₂-(en), 4H), 4,03 (CH, 2H), 4,16–4,28 (m, CH₂O-*i*Am, 4H), 10,09 (s, NH₂⁺, 4H). ¹³C NMR [50 MHz, DMSO-*d*₆]: δ 14,4 (CH₃), 22,4 (CH₃-*i*Am), 24,5 (CH-*i*Am), 36,7 (CH₂-*i*Am), 54,5 (CH₂-(en)), 64,6 (CH), 70,2 (CH₂O-*i*Am), 169,4 (COO-*i*Am). IR (ATR, cm⁻¹): ν_{max} = 2961, 2862, 2636, 2598, 2416, 1733, 1236, 1160, 803. ESI-MS (CH₃OH), *m/z*: 345,27449 [M-2Cl-H]⁺; ²⁰[α]_D = -15° (CH₃OH, 1,1 mg/cm³).

3.3. Sinteza kompleksa

3.3.1. Sinteza kompleksa zlata(III) sa (S,S)-R₂eddip ligandima: dihlorido(O,O'-dibutil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-propanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-*n*Bu₂eddip}]PF₆, dihlorido(O,O'-dipentil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-propanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-*n*Pe₂eddip}]PF₆, dihlorido(O,O'-diizobutil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-propanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-*i*Bu₂eddip}]PF₆, dihlorido(O,O'-diizoamil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-propanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-*i*Am₂eddip}]PF₆, dihlorido(O,O'-diciklopentil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-propanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-*c*Pe₂eddip}]PF₆

Ligand prekursori, O,O'-dibutil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-propanoat dihidrohlorid, [(S,S)-H₂*n*Bu₂eddip]Cl₂, (0,049 g, 0,126 mmol) ili O,O'-dipentil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-propanoat dihidrohlorid, [(S,S)-H₂*n*Pe₂eddip]Cl₂, (0,053 g, 0,126 mmol) ili O,O'-diizobutil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-propanoat dihidrohlorid, [(S,S)-H₂*i*Bu₂eddip]Cl₂, (0,049 g, 0,126 mmol) ili O,O'-diizoamil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-propanoat dihidrohlorid, [(S,S)-H₂*i*Am₂eddip]Cl₂, (0,053 g, 0,126 mmol) ili O,O'-diciklopentil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-propanoat dihidrohlorid, [(S,S)-H₂*c*Pe₂eddip]Cl₂, (0,052 g, 0,126 mmol), koji su sintetisani kako je to opisano u literaturi [43,139], su rastvoreni u 4,0 cm³ metanola. Rastvoru je dodat LiOH·H₂O (0,011 g, 0,252 mmol) radi dehidrohlorovanja liganada i nakon 1h

mešanja na magnetnoj mešalici u mraku i na sobnoj temperaturi doda se $\text{Na}[\text{AuCl}_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,050 g, 0,126 mmol) koji je prethodno rastvoren u $4,0 \text{ cm}^3$ metanola. Dobijenom crvenom rastvoru doda se čvrst NH_4PF_6 (0,062 g, 0,378 mmol), rastvor se upari do suva na *vakuumu* pri čemu se dobijaju kompleksi $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}c\text{Pe}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$, kao talozi žute boje. Višak NH_4PF_6 se uklanja ispiranjem dobijenih kompleksa sa viškom hladne vode. Čisti kompleksi se dobijaju rastvaranjem taloga u minimalnoj količini metanola, rastvori se procede i ostave da metanol ispari na vazduhu.

Numeracija C-atoma prikazana je na Shemi 6.

$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$: Prinos 50 mg, 55%. Elementalna analiza: izračunato za $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4\text{AuCl}_2\text{PF}_6$: C, 26,35; H, 4,42; N, 3,84%. Nađeno: C, 26,24; H, 4,64; N, 3,76%. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 0,95 (t, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$, 6H), 1,39 (q, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$, 4H), 1,71 (m, C^4H_3 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$, 10H), 3,60–4,00 (m, C^1H_2 , 4H), 4,26 (m, C^2H , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$, 6H), 7,75 (s, NH, 2H). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 13,6 (C^4), 14,8 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$), 18,9 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$), 30,2 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$), 42,9 (C^1), 56,3 (C^2), 67,4 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$), 169,4 (C^3). IR (ATR, cm^{-1}): $\nu_{\text{max}} = 2963, 2874, 1738, 1455, 1236, 847$. UV/Vis (CHCl_3): $\lambda_{\text{max}} = 318,00 \text{ nm}$. ESI-MS(CH_3CN), m/z : 583,1405 [M] $^+$. $E_{p1} = 124 \text{ mV}$, $E_{p2} = -544 \text{ mV}$.

$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$: Prinos 50 mg, 52%. Elementalna analiza: izračunato za $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4\text{AuCl}_2\text{PF}_6\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 27,88; H, 4,94; N, 3,61%. Nađeno: C, 27,43; H, 4,90; N, 3,89%. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 0,91 (t, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$, 6H), 1,35 (m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$, 8H), 1,70 (m, C^4H_3 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$, 10H), 3,60–4,00 (m, C^1H_2 , 4H), 4,25 (m, C^2H , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$, 6H), 7,88 (s, NH, 2H). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 13,9 (C^4), 14,8 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$), 22,2 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$), 27,8 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$), 27,9 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$), 42,8 (C^1), 56,1 (C^2), 67,7 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$), 169,6 (C^3). IR (ATR, cm^{-1}): $\nu_{\text{max}} = 2960, 2867, 1737, 1455, 1232, 849$. UV/Vis (CHCl_3): $\lambda_{\text{max}} = 318,0 \text{ nm}$. ESI-MS (CH_3CN), m/z :

611,1718 $[M]^+$. $E_{p1} = 128$ mV, $E_{p2} = -568$ mV.

$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$: Prinos 55 mg, 60%. Elementalna analiza: izračunato za $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4\text{AuCl}_2\text{PF}_6$: C, 26,35; H, 4,42; N, 3,84%. Nađeno: C, 26,80; H, 4,60; N, 4,13%. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 0,95 (d, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{-OOC-}$, 12H), 1,74 (d, C^4H_3 , 6H), 2,00 (m, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{-OOC-}$, 2H), 3,40–3,90 (m, C^1H_2 , 4H), 4,30 (m, C^2H , 2H), 4,79 (m, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{-OOC-}$, 4H), 7,60 (s, NH, 2H). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 15,0 (C^4), 19,0 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{-OOC-}$), 27,5 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{-OOC-}$), 42,9 (C^1), 56,3 (C^2), 73,2 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{-OOC-}$), 169,4 (C^3). IR (ATR, cm^{-1}): $\nu_{\text{max}} = 2968, 2879, 1735, 1464, 1231, 847$. UV/Vis (CHCl_3): $\lambda_{\text{max}} = 326,00$ nm. ESI-MS (CH_3CN), m/z : 583,1417 $[M]^+$. $E_{p1} = 156$ mV, $E_{p2} = -520$ mV.

$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$: Prinos 55 mg, 57%. Elementalna analiza: izračunato za $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4\text{AuCl}_2\text{PF}_6\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 27,88; H, 4,94; N, 3,61%. Nađeno: C, 27,44; H, 4,84; N, 3,43%. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 0,93 (d, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$, 12H), 1,40–1,70 (m, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$, 6H), 1,73 (d, C^4H_3 , 6H), 3,60–4,00 (m, C^1H_2 , 4H), 4,11 (m, C^2H , 2H), 4,29 (m, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$, 4H), 7,79 (s, NH, 2H). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 14,9 (C^4), 16,2 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$), 22,3 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$), 33,9 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$), 42,9 (C^1), 56,1 (C^2), 71,9 ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{-OOC-}$), 169,5 (C^3). IR (ATR, cm^{-1}): $\nu_{\text{max}} = 2961, 2873, 1739, 1461, 1227, 849$. UV/Vis (CHCl_3): $\lambda_{\text{max}} = 322,00$ nm. ESI-MS (CH_3CN), m/z : 611,1714 $[M]^+$. $E_{p1} = 116$ mV, $E_{p2} = -572$ mV.

$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}c\text{Pe}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$: Prinos 59 mg, 62%. Elementalna analiza: izračunato za $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4\text{AuCl}_2\text{PF}_6\cdot\text{H}_2\text{O}$: C, 28,03; H, 4,44; N, 3,63%. Nađeno: C, 28,10; H, 4,31; N, 3,67%. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 1,50–2,00 (m, $\text{CH}_2\text{-}c\text{Pe}$, C^4H_3 , 22H), 3,30–3,90 (m, C^1H_2 , 4H), 4,19 (q, C^2H , 2H), 5,34 (m, $\text{CH-}c\text{Pe}$, 2H), 7,30–7,80 (s, NH, 2H). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 14,8 (C^4), 23,6 ($\text{CH}_2\text{-}c\text{Pe}$), 32,5 ($\text{CH}_2\text{-}c\text{Pe}$), 43,5 (C^1), 57,1 (C^2), 81,3 ($\text{CH-}c\text{Pe}$), 169,3 (C^3). IR (ATR, cm^{-1}): $\nu_{\text{max}} = 2966, 2875, 1732, 1452, 1242, 845$. UV/Vis (CHCl_3): $\lambda_{\text{max}} = 332,00$ nm. ESI-MS (CH_3OH), m/z : 607,1405 $[M]^+$. $E_{p1} = 127$ mV, $E_{p2} = -570$ mV.

3.3.2. *Sinteza kompleksa zlata(III) sa (S,S)-R₂eddl ligandima: dihlorido(O,O'-dipropil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(4-metil)-pentanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-nPr₂eddl}]PF₆, dihlorido(O,O'-dibutil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(4-metil)-pentanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-nBu₂eddl}]PF₆, dihlorido(O,O'-dipentil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(4-metil)-pentanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-nPe₂eddl}]PF₆, dihlorido(O,O'-diizobutil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(4-metil)-pentanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-iBu₂eddl}]PF₆*

Ligand prekursori, *O,O'*-dipropil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(4-metil)-pentanoat dihidrohlorid, [(*S,S*)-H₂nPr₂eddl]Cl₂, (0,056 g, 0,126 mmol) ili *O,O'*-dibutil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(4-metil)-pentanoat dihidrohlorid, [(*S,S*)-H₂nBu₂eddl]Cl₂, (0,060 g, 0,126 mmol) ili *O,O'*-dipentil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(4-metil)-pentanoat dihidrohlorid, [(*S,S*)-H₂nPe₂eddl]Cl₂, (0,063 g, 0,126 mmol) ili *O,O'*-diizobutil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(4-metil)-pentanoat dihidrohlorid, [(*S,S*)-H₂iBu₂eddl]Cl₂, (0,060 g, 0,126 mmol), koji su sintetisani kako je to opisano u literaturi [52], su rastvoreni u 4,0 cm³ metanola. Rastvoru je dodat LiOH·H₂O (0,011 g, 0,252 mmol) radi dehidrochlorovanja liganada i nakon 1h mešanja na magnetnoj mešalici u mraku i na sobnoj temperaturi dodat je Na[AuCl₄]·2H₂O (0,050 g, 0,126 mmol) koji je prethodno rastvoren u 4,0 cm³ metanola. Dobijenom crvenom rastvoru doda se čvrst NH₄PF₆ (0,062 g, 0,378 mmol), rastvor se upari do suva na *vakuumu* pri čemu se dobijaju kompleksi [AuCl₂{(S,S)-nPr₂eddl}]PF₆, [AuCl₂{(S,S)-nBu₂eddl}]PF₆, [AuCl₂{(S,S)-nPe₂eddl}]PF₆, [AuCl₂{(S,S)-iBu₂eddl}]PF₆, kao talozi žute boje. Višak NH₄PF₆ se uklanja ispiranjem dobijenih kompleksa sa viškom hladne vode. Čisti kompleksi se dobijaju rastvaranjem taloga u minimalnoj količini metanola, rastvori se procede i ostave da metanol ispari na vazduhu.

Numeracija C-atoma prikazana je na Shemi 7.

[AuCl₂{(S,S)-nPr₂eddl}]PF₆: Prinos 55 mg, 56%. Elementalna analiza: izračunato za C₂₀H₄₀N₂O₄AuCl₂PF₆: C, 30,58; H, 5,13; N, 3,57%. Nađeno: C, 30,98; H, 5,23; N, 3,65%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): Izomeri A i B: 0,90–1,10 (m, CH₃CH₂CH₂–OOC–, C^{6,7}H₃, 18H), 1,73–1,95 (m, C⁴H₂, C⁵H, 6H), 1,77 (m, CH₃CH₂CH₂–OOC–, 4H), 3,81 (s, C¹H₂, 4H), 4,17 (m, C²H, 2H), 4,26 (m,

CH₃CH₂CH₂-OOC-, 4H), 4,60 (s, NH, 2H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): Izomer A: 10,3 (CH₃CH₂CH₂-OOC-), 21,5 (C^{6,7}), 23,0 (CH₃CH₂CH₂-OOC-), 24,9 (C⁵), 38,8 (C⁴), 43,3 (C¹), 59,1 (C²), 69,0 (CH₃CH₂CH₂-OOC-), 169,3 (C³); Izomer B: 10,3 (CH₃CH₂CH₂-OOC-), 22,6 (C^{6,7}), 24,5 (C⁵), 39,5 (C⁴), 52,1 (C¹), 59,1 (C²), 68,5 (CH₃CH₂CH₂-OOC-), 170,1 (C³). IR (ATR, cm⁻¹): ν_{max} = 2966, 2878, 1733, 1467, 1243, 845, 559. ESI-MS (CH₃OH), *m/z*: 639,2001 [M]⁺.

[AuCl₂{(S,S)-*n*Bu₂eddl}]PF₆: Prinos 50 mg, 49%. Elementalna analiza: izračunato za C₂₂H₄₄N₂O₄AuCl₂PF₆: C, 32,48; H, 5,45; N, 3,44%. Nađeno: C, 32,25; H, 5,76; N, 3,96%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): Izomeri A i B: 0,90–1,10 (m, CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-, C^{6,7}H₃, 18H), 1,40 (m, CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-, 4H), 1,60–1,87 (m, C⁴H₂, C⁵H, 6H), 1,68 (m, CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-, 4H), 3,30–3,70 (m, C¹H₂, 4H), 3,98 (m, C²H, 2H), 4,28 (t, CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-, 4H), 4,65 (s, NH, 2H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): Izomer A: 13,5 (CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-), 18,9 (CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-), 21,5 (C^{6,7}), 24,8 (C⁵), 30,2 (CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-), 39,2 (C⁴), 44,2 (C¹), 59,8 (C²), 67,3 (CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-), 170,3 (C³); Izomer B: 13,5 (CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-), 18,9 (CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-), 22,4 (C^{6,7}), 25,6 (C⁵), 30,2 (CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-), 38,3 (C⁴), 47,9 i 52,5 (C¹), 62,7 (C²), 66,3 (CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-), 169,8 (C³). IR (ATR, cm⁻¹): ν_{max} = 3279, 2963, 2874, 1736, 1463, 1246, 848, 560. ESI-MS (CH₃OH), *m/z*: 667,2318 [M]⁺.

[AuCl₂{(S,S)-*n*Pe₂eddl}]PF₆: Prinos 55 mg, 52 %. Elementalna analiza: izračunato za C₂₄H₄₈N₂O₄AuCl₂PF₆: C, 34,26; H, 5,75; N, 3,33%. Nađeno: C, 34,46; H, 5,84; N, 3,76%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): Izomeri A i B: 0,93 (t, CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-OOC-, 6H), 0,99 (d, C^{6,7}H₃, 12H), 1,35 (m, CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-OOC-, 8H), 1,71–1,90 (m, C⁴H₂, C⁵H, 6H), 1,74 (m, CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-OOC-, 4H), 3,40–3,90 (m, C¹H₂, 4H), 4,10 (m, C²H, 2H), 4,26 (t, CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-OOC-, 4H), 4,68 (s, NH, 2H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): Izomer A: 13,8 (CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-OOC-), 21,4 (C^{6,7}), 22,1 (CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-OOC-), 24,9 (C⁵), 27,8 (CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-OOC-), 38,8 (C⁴), 43,6 (C¹), 59,5 (C²), 67,7 (CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-OOC-), 169,7 (C³); Izomer B: 13,8 (CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-OOC-), 22,4 (C^{6,7}), 22,9 (CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-OOC-), 24,5 (C⁵), 47,9 i 52,4 (C¹), 59,5 (C²), 66,5

(CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-OOC-), 169,2 i 169,9 (C³). IR (ATR, cm⁻¹): ν_{\max} = 2960, 2934, 2871, 1735, 1466, 1248, 847, 559. ESI-MS (CH₃OH), m/z : 695,26239 [M]⁺.

[AuCl₂{(S,S)-iBu₂edd}]PF₆: Prinos 55 mg, 54 %. Elementalna analiza: izračunato za C₂₂H₄₄N₂O₄AuCl₂PF₆: C, 32,48; H, 5,45; N, 3,44%. Nađeno: C, 32,31; H, 5,44; N, 3,53%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): Izomeri A i B: 0,88–1,02 (m, (CH₃)₂CHCH₂-OOC-, C^{6,7}H₃, 24H), 1,79–2,10 (m, (CH₃)₂CHCH₂-OOC-, C⁴H₂, C⁵H, 8H), 3,70–3,90 (m, C¹H₂, 4H), 4,10 (m, C²H, 2H), 4,19 (m, (CH₃)₂CHCH₂-OOC-, 4H), / (NH, 2H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): Izomer A: 18,9 (CH₃)₂CHCH₂-OOC-, 21,4 (C^{6,7}), 24,9 (C⁵), 27,4 ((CH₃)₂CHCH₂-OOC-), 38,7 (C⁴), 43,7 (C¹), 59,8 (C²), 73,8 (CH₃)₂CHCH₂-OOC-, 169,4 (C³); Izomer B: 18,9 (CH₃)₂CHCH₂-OOC-, 22,9 (C^{6,7}), 24,9 (C⁵), 27,4 ((CH₃)₂CHCH₂-OOC-), 39,4 (C⁴), 52,6 (C¹), 59,8 (C²), 73,3 (CH₃)₂CHCH₂-OOC-, 169,7 (C³). IR (ATR, cm⁻¹): ν_{\max} = 3189, 2965, 2877, 1729, 1467, 1244, 846, 559. ESI-MS (CH₃OH), m/z : 667,2407 [M]⁺.

3.3.3. Sinteza kompleksa zlata(III) sa (S,S)-R₂eddch ligandima: dihlorido(O,O'-dimetil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)-propanoat)zlato(III)

heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-Me₂eddch}]PF₆, dihlorido(O,O'-dietil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)-propanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-Et₂eddch}]PF₆, dihlorido(O,O'-dipropil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)-propanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-nPr₂eddch}]PF₆, dihlorido(O,O'-dibutil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)-propanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-nBu₂eddch}]PF₆, dihlorido(O,O'-diizobutil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)-propanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-iBu₂eddch}]PF₆, dihlorido(O,O'-diizoamil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)-propanoat)zlato(III) heksafluorofosfat, ([AuCl₂{(S,S)-iAm₂eddch}]PF₆

Ligand prekursori, O,O'-dimetil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)-propanoat dihidrohlorid, [(S,S)-H₂Me₂eddch]Cl₂, (0,059 g, 0,126 mmol) ili O,O'-dietil-(S,S)-etilendiamin-N,N'-di-2-(3-cikloheksil)-propanoat dihidrohlorid, [(S,S)-H₂Et₂eddch]Cl₂, (0,063 g, 0,126 mmol) ili O,O'-dipropil-(S,S)-etilendiamin-

N,N'-di-2-(3-cikloheksil)-propanoat dihidrohlorid, [(*S,S*)-H₂*n*Pr₂eddch]Cl₂, (0,067 g, 0,126 mmol) ili *O,O'*-dibutil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)-propanoat dihidrohlorid, [(*S,S*)-H₂*n*Bu₂eddch]Cl₂, (0,070 g, 0,126 mmol) ili *O,O'*-diizobutil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)-propanoat dihidrohlorid, [(*S,S*)-H₂*i*Bu₂eddch]Cl₂, (0,070 g, 0,126 mmol) ili *O,O'*-diizoamil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)-propanoat dihidrohlorid, [(*S,S*)-H₂*i*Am₂eddch]Cl₂, (0,073 g, 0,126 mmol), koji su sintetisani kako je to opisano u literaturi [53,140], su rastvoreni u 4,0 cm³ metanola. U ovu suspenziju je dodat LiOH·H₂O (0,011 g, 0,252 mmol) radi dehidrohlorovanja liganada pri čemu dolazi do potpunog obezbojavanja rastvora. Nakon 1h mešanja na magnetnoj mešalici u mraku i na sobnoj temperaturi doda se Na[AuCl₄]·2H₂O (0,050 g, 0,126 mmol) koji je prethodno rastvoren u 4,0 cm³ metanola. Dobijenom crvenom rastvoru doda se čvrst NH₄PF₆ (0,062 g, 0,378 mmol), rastvor se upari do suva na *vakuumu* pri čemu se dobijaju kompleksi [AuCl₂{(*S,S*)-Me₂eddch}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-Et₂eddch}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*n*Pr₂eddch}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*n*Bu₂eddch}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*i*Bu₂eddch}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*i*Am₂eddch}]PF₆ kao talozi žute boje. Višak NH₄PF₆ se uklanja ispiranjem dobijenih kompleksa sa viškom hladne vode. Čisti kompleksi se dobijaju ceđenjem i sušenjem na vazduhu.

Numeracija C-atoma prikazana je na Shemi 8.

[AuCl₂{(*S,S*)-Me₂eddch}]PF₆: Prinos 56 mg, 55%. Elementalna analiza: izračunato za C₂₂H₄₀N₂O₄AuCl₂PF₆: C, 32,65; H, 4,98; N, 3,46%. Nađeno: C, 32,70; H, 4,94; N, 3,38%. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,98 (m, C⁸H₂, 4H), 1,21 (m, C^{6,7}H₂, 8H), 1,80 (m, C⁴H₂, C⁵H i C^{6,7}H₂, 14H), 3,57 (m, C¹H₂, 4H), 3,89 (s, CH₃-OOC-, 6H), 4,06 (m, C²H, 2H), 4,69 (s, NH, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 25,9 (C⁷), 32,3 (C⁵), 33,0 (C⁸), 33,8 (C⁶), 37,8 (C⁴), 44,3 (C¹), 54,0 (CH₃-OOC-), 59,2 (C²), 170,6 (C³). IR (ATR, cm⁻¹): ν_{max} = 2927, 2852, 1732, 1447, 1261, 1227, 848. UV/Vis (CHCl₃): λ_{max} (ε, 8120 M⁻¹ cm⁻¹, 7780 M⁻¹ cm⁻¹) 315,00 nm, 323,50nm; ESI-MS (CH₃CN), *m/z*: 663,20 [M]⁺, 664,20 [M + H]⁺. E_{p1} = 218 mV, E_{p2} = - 595 mV.

[AuCl₂{(*S,S*)-Et₂eddch}]PF₆: Prinos 66 mg, 62%. Elementalna analiza: izračunato za C₂₄H₄₄N₂O₄AuCl₂PF₆: C, 34,42; H, 5,29; N, 3,34%. Nađeno: C, 34,76; H, 5,58; N, 3,46%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 1,00 (m, C⁸H₂, 4H), 1,23 (m, C^{6,7}H₂, 8H), 1,35 (t, CH₃CH₂-OOC-, 6H), 1,80 (m, C⁴H₂, C⁵H i C^{6,7}H₂, 14H), 3,55 (m, C¹H₂,

4H), 4,02 (t, C²H, 2H), 4,34 (m, CH₃CH₂-OOC-, 4H), 4,71 (s, NH, 2H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 13,9 (CH₃CH₂-OOC-), 25,9 (C⁷), 32,2 (C⁵), 32,8 (C⁸), 33,1, 33,9 (C⁶), 37,8 (C⁴), 44,1 (C¹), 59,2 (C²) 63,5 (CH₃CH₂-OOC-), 170,1 (C³); IR (ATR, cm⁻¹): ν_{\max} = 2929, 2854, 1734, 1449, 1283, 1229, 850. UV/Vis (CHCl₃): λ_{\max} (ϵ , 11520 M⁻¹ cm⁻¹) 317,55 nm; ESI-MS (CH₃CN), m/z : 691,23 [M]⁺, 692,24 [M + H]⁺. E_{p1} = 198 mV, E_{p2} = - 569 mV.

[AuCl₂{(S,S)-*n*Pr₂eddch}]PF₆: Prinos 62 mg, 57%. Elementalna analiza: izračunato za C₂₆H₄₈N₂O₄AuCl₂PF₆·2H₂O: C, 34,64; H, 5,81; N, 3,11%. Nađeno: C, 34,44; H, 5,50; N, 3,12%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 0,98 (t, CH₃CH₂CH₂-OOC-, 6H; m, C⁸H₂, 4H), 1,24 (m, C^{6,7}H₂, 8H), 1,80 (m, C⁴H₂, C⁵H, C^{6,7}H₂, CH₃CH₂CH₂-OOC-, 18H), 3,48 (m, C¹H₂, 4H), 3,98 (t, C²H, 2H), 4,23 (t, CH₃CH₂CH₂-OOC-, 4H), 4,70 (s, NH, 2H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 10,3 (CH₃CH₂CH₂-OOC-), 21,7 (CH₃CH₂CH₂-OOC-), 25,9 (C⁷), 32,3 (C⁵), 33,1 (C⁸), 33,9 (C⁶), 38,1 (C⁴), 44,4 (C¹), 59,2 (C²) 68,7 (CH₃CH₂CH₂-OOC-), 170,7 (C³). IR (ATR, cm⁻¹): ν_{\max} = 2929, 2853, 1734, 1451, 1277, 1224, 849. UV/Vis (CHCl₃): λ_{\max} (ϵ , 9010 M⁻¹ cm⁻¹) 315,84 nm; ESI-MS (CH₃CN), m/z : 719,27 [M]⁺, 720,27 [M + H]⁺. E_{p1} = 191 mV, E_{p2} = - 569 mV.

[AuCl₂{(S,S)-*n*Bu₂eddch}]PF₆: Prinos 62 mg, 55%. Elementalna analiza: izračunato za C₂₈H₅₂N₂O₄AuCl₂PF₆: C, 37,64; H, 5,86; N, 3,13%. Nađeno: C, 37,90; H, 6,00; N, 3,36%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 0,96 (t, CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-, 6H; m, C⁸H₂, 4H), 1,21 (m, C^{6,7}H₂, 8H), 1,41 (q, CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-, 4H), 1,80 (m, C⁴H₂, C⁵H, C^{6,7}H₂, CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-, 18H), 3,57 (m, C¹H₂, 4H), 4,04 (t, C²H, 2H), 4,30 (m, CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-, 4H), 4,71 (s, NH, 2H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 13,5 (CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-), 18,9 (CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-), 25,9 (C⁷), 30,2 (CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-), 32,2 (C⁵), 33,2 (C⁸), 33,8 (C⁶), 37,8 (C⁴), 44,2 (C¹), 59,3 (C²), 67,3 (CH₃CH₂CH₂CH₂-OOC-), 170,3 (C³). IR (ATR, cm⁻¹): ν_{\max} = 2929, 2853, 1729, 1451, 1260, 1210, 845. UV/Vis (CHCl₃): λ_{\max} (ϵ , 8310 M⁻¹ cm⁻¹) 319,25 nm; ESI-MS (CH₃CN), m/z : 747,29 [M]⁺, 748,29 [M + H]⁺. E_{p1} = 187 mV, E_{p2} = - 638 mV.

[AuCl₂{(S,S)-iBu₂eddch}]PF₆: Prinos 58 mg, 52%. Elementalna analiza: izračunato za C₂₈H₅₂N₂O₄AuCl₂PF₆: C, 37,64; H, 5,86; N, 3,13%. Nađeno: C, 37,96; H, 6,15; N, 3,35%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 0,97 (d, (CH₃)₂CHCH₂-OOC-, 12H; m, C⁸H₂, 4H), 1,22 (m, C^{6,7}H₂, 8H), 1,80 (m, C⁴H₂, C⁵H, C^{6,7}H₂, 14H), 2,01 (hept, (CH₃)₂CHCH₂-OOC-, 2H) 3,53 (m, C¹H₂, 4H), 4,06 (m, C²H, 2H), 4,06 (d, (CH₃)₂CHCH₂-OOC-, 4H), 4,69 (s, NH, 2H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 18,9 ((CH₃)₂CHCH₂-OOC-), 25,9 (C⁷), 27,5 ((CH₃)₂CHCH₂-OOC-), 32,2 (C⁵), 33,2 (C⁸), 33,9 (C⁶), 38,0 (C⁴), 44,3 (C¹), 59,3 (C²), 73,3 ((CH₃)₂CHCH₂-OOC-), 170,5 (C³). IR (ATR, cm⁻¹): ν_{max} = 2929, 2853, 1730, 1450, 1266, 1216, 848. UV/Vis (CHCl₃): λ_{max} (ε, 8470 M⁻¹ cm⁻¹) 324,36 nm; ESI-MS (CH₃CN), m/z: 747,29 [M]⁺, 748,30 [M + H]⁺. Ep₁ = 228 mV, Ep₂ = - 608 mV.

[AuCl₂{(S,S)-iAm₂eddch}]PF₆: Prinos 66 mg, 57%. Elementalna analiza: izračunato za C₃₀H₅₆N₂O₄AuCl₂PF₆: C, 39,09; H, 6,12; N, 3,04%. Nađeno: C, 38,98; H, 6,13; N, 3,11%. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): 0,95 (d, (CH₃)₂CHCH₂CH₂-OOC-, 12H; m, C⁸H₂, 4H), 1,24 (m, C^{6,7}H₂, 8H), 1,50-1,90 (m, C⁴H₂, C⁵H, C^{6,7}H₂, (CH₃)₂CHCH₂CH₂-OOC-, (CH₃)₂CHCH₂CH₂-OOC-, 20H), 3,43 (m, C¹H₂, 4H), 3,92 (m, C²H, 2H), 4,30 (m, (CH₃)₂CHCH₂CH₂-OOC-, 4H), 4,71 (s, NH, 2H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 11,1 ((CH₃)₂CHCH₂CH₂-OOC-), 16,3 ((CH₃)₂CHCH₂CH₂-OOC-), 22,3 ((CH₃)₂CHCH₂CH₂-OOC-), 25,9 (C⁷), 32,4 (C⁵), 33,1 (C⁸), 33,8 (C⁶), 36,9 (C⁴), 44,5 (C¹), 59,2 (C²), 65,8 ((CH₃)₂CHCH₂-OOC-), 171,0 (C³). IR (ATR, cm⁻¹): ν_{max} = 2929, 2854, 1731, 1453, 1260, 1212, 851. UV/Vis (CHCl₃): λ_{max} (ε, 6630 M⁻¹ cm⁻¹) 320,95 nm; ESI-MS (CH₃CN), m/z: 775,33 [M]⁺, 776,33 [M + H]⁺. Ep₁ = 148 mV, Ep₂ = - 578 mV.

3.4. Eksperimentalne tehnike i instrumenti

3.4.1. Elementalna analiza

Rezultati elementalnih analiza (C, H, N) su dobijeni uz pomoć *Elemental Vario EL III microanalyzer*.

3.4.2. Nuklearno-magnetna rezonantna spektroskopija, NMR

Svi NMR spektri dobijeni su rastvaranjem odgovarajuće količine uzorka (15–20 mg) u CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_7$ ili acetonu- d_6 u prisustvu tetrametil-silana (TMS) kao internog standarda. NMR spektri su snimljeni na *Varian Gemini 200* (200 MHz za ^1H i 50 MHz za ^{13}C) i *Bruker 500 Avance III* (500 MHz za ^1H i 125 MHz za ^{13}C) NMR spektrometrima. Položaji signala izraženi su u δ -jedinicama (ppm).

3.4.3. Infracrvena spektroskopija, IR

Infracrveni spektri snimljeni su pomoću spektrometra *Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR* (ATR tehnika) ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$). Daleki infracrveni spektri ($600\text{--}150\text{ cm}^{-1}$) snimljeni su na istom spektrofotometru, ATR tehnikom na sobnoj temperaturi.

3.4.4. Ultraljubičasta–vidljiva spektroskopija, UV/Vis

Sintetisani kompleksi rastvoreni su u hloformu, CHCl_3 , koncentracije $1 \times 10^{-4}\text{ mol/dm}^3$, i UV/Vis spektri dobijeni pomoću *GBC Cintra 6 UV/Vis* spektrofotometra. Ispitivanje stabilnosti kompleksa u dimetilsulfoksidu (DMSO) kao i interakcija sa goveđim serum-albominom (BSA) u metanolu izvršeno je pomoću *GBC Cintra 40 UV/Vis* spektrofotometra. Sveže pripremljen rastvor ispitivanog kompleksa u DMSO-u, koncentracije $1 \times 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$, je sniman nakon 0, 5, 15 min, 2 i 24h. Za interakciju kompleksa sa BSA, ispitivani uzorak je napravljen uzimanjem iste koncentracije BSA ($4 \times 10^{-6}\text{ mol/dm}^3$ u PBS-u, pH 7,4) i različite koncentracije ispitivanog kompleksa ($1 \times 10^{-4}\text{ M}$, $2 \times 10^{-4}\text{ M}$, $3 \times 10^{-4}\text{ M}$, $4 \times 10^{-4}\text{ M}$, $5 \times 10^{-4}\text{ M}$). Alikvoti ispitivanog kompleksa (0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5) su dodavani u 5 cm^3 BSA, koncentracije $8 \times 10^{-6}\text{ mol/dm}^3$ i normalni sud dopunjen PBS-om do 10 cm^3 . Ovako sveže pripremljeni rastvori su snimani nakon 0, 2, 24 i 48 h.

3.4.5. *Tečna hromatografija–masena spektroskopija, LC/MS*

Korišćen je tečni hromatograf Agilent Technologies 1200 Series opremljen autosamplerom, DAD detektorom i Zorbax Eclipse Plus C18 kolonom (150 × 4,6 mm i. d.; 1,8 μm) povezan sa Agilent Technologies 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom; LC uslovi: temperatura kolone 40 °C, mobilna faza (1,00 cm³/min): A (5 mM amonijum–formijat u MilliQ vodi) i B (acetonitril) u gradijentnom modu, 55–90% B (0–25 min), 90–95 B (25–26 min), 55% B (26–30 min), spektralni opseg $\lambda = 190–450$ nm; MS uslovi: pozitivni mod, napon kapilare 4000 V, temperatura nebulizacionog gasa 350 °C, brzina gasa za sušenje 12 dm³/min, pritisak nebulajzera 45 psig, napon na fragmentoru 140 V, napon na skimeru 60 V, radiofrekventni napon oktapola 250 V, opseg m/z 100–2000), za snimanje ESI masenih spektara visoke rezolucije.

3.4.6. *Polarimentija*

Specifična rotacija je utvrđena na automatskom polarimetru AUTOPOI IV, Rudolf Research Analytical, opremljen natrijumovom lampom (589 nm) i kivetom dužine 1 dm. Ispitivana supstanca je rastvorena u CH₃OH, koncentracije 1,1 mg/cm³.

3.4.7. *Elektrohemijska merenja*

Elektrohemijsko ponašanje kompleksa je ispitano pomoću CHI-760B instrumenta za cikličnu i diferencijalnu pulsnu voltametriju (CHI Instruments, USA) na sobnoj temperaturi. Napravljeni su rastvori kompleksa u dimetilsulfoksidu (DMSO), koncentracije 1×10^{-3} mol/dm³, uz dodatak LiClO₄ kao pomoćnog elektrolita. Merenja su izvršena korišćenjem troelektrodnog sistema koji obuhvata radnu platinsku elektrodu (Model 6.1204.120), Ag/AgCl referentnu elektrodu (Model CHI 112) i kontra elektrodu platinsku žicu (Model CHI 115).

3.5. DFT proračuni

Geometrije svih struktura su potpuno optimizovane DFT metodom, pri čemu se elektronska energija optimizuje u odnosu na elektronsku gustinu. Izračunavanja su izvedena korišćenjem programa Gaussian 03 [141] i Gaussian 09 [142]. Sve strukture su optimizovane koristeći MPW1PW91 funkcional [143]. U proračunima je upotrebljen SDD bazis set za sve atome [144,145].

3.6. Biološka ispitivanja

3.6.1. *In vitro* antitumorska aktivnost

3.6.1.1. Materijal i metode

Štok rastvori ispitivanih supstanci ($[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-Me}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-Et}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}i\text{Am}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}i\text{Am}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}c\text{Pe}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddil}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddil}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddil}\}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddil}\}]\text{PF}_6$) su napravljene rastvaranjem u dimetilsulfoksidu (DMSO) do koncentracije 20 mM, a pre korišćenja su filtrirani kroz *Millipore* filter 0,22 μm , i razblaženi hranljivim medijumom do različitih radnih koncentracija. DMSO je korišćen usled jako slabe rastvorljivosti kompleksa u vodi, a zamenom DMSO-a hloroformom kao rastvaračem je pokazano da DMSO nema značajnog efekta na aktivnost kompleksa zlata. U ovoj grupi eksperimenata korišćena je hranljiva podloga: *RPMI 1640*, bez fenol crvenog, uz dodatak L-glutamina (3 mM), streptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$), penicilina (100 IU/ cm^3), 10% termalno (na 56 °C), inaktiviranog seruma govečeta (FBS) i 25 mM Hepes, a pH je podešen na 7,2 bikarbonatnim rastvorom. MTT, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolijum-bromid je rastvoren (5 mg/cm^3) u fosfatnom puferu pH 7,2 i pre korišćenja filtriran kroz *Millipore* filter 0,22 μm . Za ove eksperimente su upotrebljeni *Sigma* reagensi.

3.6.1.2. HeLa, Fem-x i K562 ćelijske linije i humane PBMC i MRC-5

Humane HeLa ćelije adenokarcinoma grlića materice, Fem-x ćelije malignog melanoma i normalne MRC-5 ćelije fibroblasta pluća su održavane u hranljivoj podlozi kao monoslojna kultura, dok su humane K562 ćelije mijeloidne leukemije održavane kao ćelijska suspenzija. Ćelije su rasle na 37 °C u atmosferi vazduha zasićenog parom, sa 5% CO₂.

Mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC) su odvojene od cele heparinizirane krvi zdravih volontera centrifugiranjem na gradijentu *Lymphoprep*TM. Ćelije su prane tri puta *Haemaccel*-om (vodeni rastvor koji sadrži 145 mM Na⁺, 5,1 mM K⁺, 6,2 mM Ca²⁺, 145 mM Cl⁻ i 35 g/dm³ polimera želatina, pH = 7,4), zatim su brojane i resuspendovane u hranljivom medijumu.

HeLa ćelije (2000 ćelija po bunariću) i Fem-x ćelije (5000 ćelija po bunariću) su posejane u pločama sa po 96 posudica, a dvadeset časova kasnije, nakon prijavanja ćelija za podlogu posudica, po pet različitih koncentracija ispitivanih supstanci je dodato u posudice. Krajnje koncentracije iznosile su od 1–100 µM. Kontrolnim posudicama dodat je samo hranljivi medijum. Rastvori ispitivanih supstanci su dodati K562 i MRC-5 ćelijama (5000 ćelija po bunariću) dva sata nakon njihovog zasejavanja u istim koncentracijama primenjenim kod HeLa i Fem-x ćelija. Svi uzorci su postavljeni u triplikatu. Hranljivi medijum sa odgovarajućim koncentracijama supstanci, ali bez ćelija, je korišćen kao slepa proba.

PBMC su zasejane (150000 ćelija po bunariću) u hranljivom medijumu i obogaćenim fitohemaglutininom (5 µg/cm³), PHA (*Welcome*), i u hranljivom medijumu bez PHA u pločama sa po 96 bunarića, a nakon dva časa dodate su u triplikatu ispitivane supstance u bunariće, u po pet različitih krajnjih koncentracija, izuzev u kontrolni uzorak, gde je ćelijama dodata samo podloga.

Hranljivi medijum sa odgovarajućim koncentracijama ispitivanih supstanci, ali bez PBMC, je korišćen kao slepa proba. Preživljavanje tretiranih ćelija je određeno MTT testom [146,147], 72 h nakon kontinuiranog dejstva ispitivanih supstanci. 20 µL MTT rastvora (5 mg/cm³ PBS) je dodato u svaki bunarčić. Uzorci su inkubirani naredna četiri časa na 37 °C u atmosferi vazduha sa 5% CO₂, zasićenog vodenom

parom. Nakon toga, u bunariće je dodato po 100 μ L 10% SDS (natrijum-dodecilsulfat). Apsorbanca (A) na 570 nm je izmerena sledećeg dana.

Toksično dejstvo ispitivanih supstanci je procenjeno određivanjem koncentracije agenasa koja izaziva smanjenje u preživljavanju ćelija za 50%. Dobije se sa grafika – preživljavanje u funkciji koncentracije.

Preživljavanje ćelija (S) se definiše kao količnik broja živih ćelija u tretiranom uzorku (n_a) i broja živih ćelija u kontrolnom uzorku koji nije tretiran agensima (n_k):

$$S = n_a/n_k$$

S obzirom da se MTT test zasniva na tome da je apsorbanca MTT bojenih ćelija na kraju testa srazmerna broju metabolički aktivnih, živih ćelija u uzorcima, da bi se dobila procentualna vrednost u preživljavanju ćelija (S% engl. survival), vrednost apsorbance MTT bojenih uzoraka sa ćelijama raslih u prisustvu različitih koncentracija ispitivanih supstanci (A) podeljena je apsorbancom kontrolnog uzorka (A_k , koja predstavlja apsorbancu uzorka ćelija koje su rasle samo u hranljivom medijumu) x 100. (Podrazumeva se da su pri dobijanju A i A_k , apsorbance slepe probe uvek oduzimate od apsorbance odgovarajućeg uzorka sa ciljnim ćelijama).

$$\% \text{ preživelih ćelija} = (A/A_k) \times 100$$

A- apsorbanca uzorka sa ćelijama raslih u prisustvu različitih koncentracija ispitivanih supstanci

A_k - apsorbanca kontrolnog uzorka

Koncentracija IC₅₀_{72h} definisana je kao koncentracija pri kojoj se smanjuje preživljavanje tretiranih ćelija na 50%, u odnosu na kontrolni uzorak.

3.6.2. Morfološke odlike smrti HeLa indukovane ispitivanim supstancama

Morfološke odlike smrti HeLa ćelija indukovane ispitivanim supstancama su analizirane nakon bojenja tretiranih ćelija smešom akridin-oranža (AO) i etidijum-bromida (EtBr) [148]. Kada AO dospe u ćeliju javlja se zelena fluorescencija. EtBr može da dospe jedino u nekrotičnu ćeliju sa oštećenom ćelijskom membranom i koristi se za određivanje nekrotičnih morfoloških promena, posebno za morfologiju nukleusa. Postupak se sastojao u sledećem: 5×10^4 HeLa ćelija je zasejano na pokrovnoj pločici postavljenoj u Petrijevoj šolji. Nakon 20 h, ispitivane supstance (u finalnim koncentracijama jednakim njihovim dvostrukim IC_{50} nakon 72 h dejstva) su dodate ćelijama, a 24 h kasnije, ćelije su isprane PBS-om, obojene sa 10 μ l smeše AO (0,01 μ g/cm³) i EtBr (0,02 μ g/cm³). Nakon 10 minuta ćelije su ispitane fluorescentnom mikroskopijom i fotografisane. U 5×10^4 K562 ćelija u Petrijevim šoljama, dodate su nakon 2 h ispitivane supstance pri koncentracijama jednakim dvostrukim $IC_{50_{72h}}$, zatim su nakon 24 h, ćelije prikupljene centrifugiranjem, isprane PBS-om i obojene sa 10 μ l smeše AO (0,01 μ g/cm³) i EtBr (0,02 μ g/cm³).

3.6.3. Analiza ćelijskog ciklusa

Ciljne ćelije su analizirane korišćenjem protočnog citometra nakon bojenja propidijm-jodidom [149] (Becton Dickinson FAC-Scan flow cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) za merenje efekta tiosemikarbazona i njihovih cink(II) kompleksa na ćelijski ciklus.

3.6.3.1. Tretman ćelija ispitivanim kompleksima

Ciljne ćelije (3×10^5 ćelija) su gajene u hranljivom medijumu u six-well plejtu tokom 24 h inkubacije u CO₂ inkubatoru. Nakon toga, adherentne ćelije su u eksponencijalnoj fazi rasta izložene dejstvu ispitivanih jedinjenja u koncentraciji IC_{50} i $2 \times IC_{50}$ pri čemu je IC_{50} određena korišćenjem MTT testa. Kod ćelija koje rastu

u suspenziji (K562 ćelije) ispitivana jedinjenja su dodavana 2 časa nakon sađenja u plejtove sa šest otvora. Ćelije su inkubirane u CO₂ inkubatoru na 37 °C, u hranljivom medijumu sa ili bez ispitivanih jedinjenja, kontinuirano 24, 48 i 72 h. Nakon svake tačke inkubacije, ćelije su posmatrane pod svetlosnim mikroskopom, prikupljene u epruvetu i po potrebi tripsinizirane, a zatim centrifugirane na 2000 rpm, 10 min. Talog ćelija je resuspendovan i ispran u fosfatnom puferu (PBS).

3.6.3.2. Priprema uzorka za analizu ćelijskog ciklusa na protočnom citometru

Talog analiziranih ćelija (dobijen iz prethodnog ispitivanja) resuspendovan je u 200 µl PBSa i fiksiran sa 2 cm³ ledenog 70 % etanola uz mešanje na vorteksu. Ćelije se inkubiraju u etanolu i na ledu minimalno 30 min, a tako pripremljeni uzorci mogu se čuvati nedelju dana pre bojenja i analize na protočnom citometru. Nakon fiksacije, ćelije se još jednom ispiraju u PBSu, supernatant se odlije, a talog resuspenduje u 800 µl PBSa. Zatim se uzorci inkubiraju 30 min na 37 °C u prisustvu 100 µl rastvora RNaze A (koncentracije 1 mg/cm³). Na kraju, nakon tretmana Rnazom A, u uzorak se dodaje 100 cm³ rastvora propidijum-jodida (PI) koncentracije 400 µg/cm³. Obojena suspenzija ćelija, prethodno promućkana na vorteksu, analizira se na protočnom citometru. Analiza ćelijskog ciklusa i DNK sadržaja urađena je na Becton Dickinson citometru, a DNK histogram je analiziran korišćenjem CellQuestR softvera, za minimum 10000 ćelija po uzorku.

3.6.4. Bojenje akridin-oranžom

Autofagiju karakteriše stvaranje kiselih vezikularnih organela (AVO). Da bi se detektovale AVO, primenjeno je bojenje uživo akridin-oranžom. Ukratko, 3 x 10⁵ ćelija/ posudici je zasađeno u pločama sa 6 posudica i omogućeno je vezivanje. Ćelije su tretirane jedinjenjima u toku 24 h i 48 h. Ćelije su zatim sakupljene tripsinizacijom, a potom inkubirane sa 1 mg/dm³ akridin-oranža na 37 °C tokom 15 min. Nakon toga, ćelije su isprane dvaput u PBS-u. Obojene ćelije su analizirane pomoću Becton

Dickinson FACSCalibur protočnog-citometra i CellQuestR (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) softvera na minimum 10000 ćelija po uzorku.

3.6.5. Statistička obrada podataka

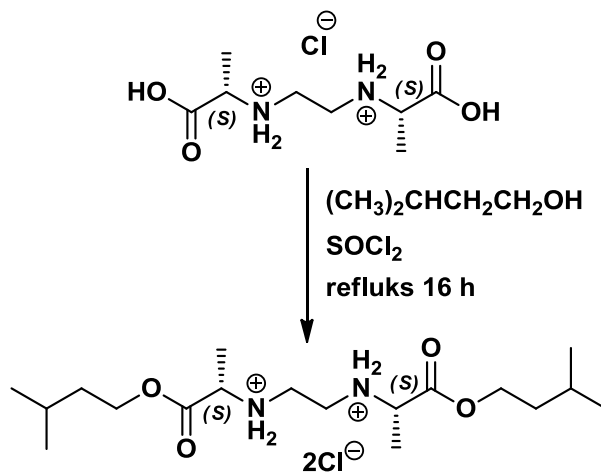
Dobijeni rezultati su dati u vidu $SV + SD$ triplikata kultura reprezentativnog eksperimenta od najmanje tri izvedena, ili $SV + SD$ više istih eksperimenata. Analiza varijanse (ANOVA) uz Student-Newman-Keuls-ovim test za višestruka poređenja je korišćena za analizu statistički značajne razlike između rezultata dobijenih različitim tretmanima triplikata kultura. Vrednost parametra p manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U ovom radu su korišćeni prethodno sintetisani [(*S,S*)-H₂R₂eddip]Cl₂, [(*S,S*)-H₂R₂eddl]Cl₂ i [(*S,S*)-H₂R₂eddch]Cl₂ ligandi koji su dobijeni po postupcima opisanim u literaturi [43,44,52,53,139,140,150].

4.1. Sinteza estra *O,O'*-diizoamil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-propanoat dihidrohlorida, [(*S,S*)-H₂*i*Am₂eddip]Cl₂·2H₂O

O,O'-diizoamil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-propanoat dihidrohlorid, [(*S,S*)-H₂*i*Am₂eddip]Cl₂, je dobijen u reakciji (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-propanske kiseline, (*S,S*)-H₂eddip·HCl, apsolutnog izoamil alkohola i tionil-hlorida (Shema 5).



Shema 5. Sinteza [(*S,S*)-H₂*i*Am₂eddip]Cl₂

4.1.1. Spektroskopska studija [(*S,S*)-*H*₂*iAm*₂*eddip*]*Cl*₂ estra

U infracrvenom spektru izolovanog estra uočena je snažna apsorpciona traka na 1733 cm⁻¹ koja pripada karbonilnoj grupi $\nu(\text{C}=\text{O})$, dok traka koja potiče od $\nu(\text{C}-\text{O})$ javlja se na 1236 cm⁻¹. Asimetrične vibracione $\nu(\text{CH}_3)$ trake su srednjeg intenziteta i nalaze se na 2961 i 2862 cm⁻¹. Dalje, asimetrična vibraciona $\nu(\text{C}-\text{N})$ traka je pronađena na 803 cm⁻¹.

U ¹H NMR spektru signal koji potiče od vodonikovih atoma metil grupe iz izoamil estarskog ostatka javlja se na 0,90 ppm kao dublet. Hemijska pomeranja vodonikovih atoma iz izoamil-CH₂ grupa, preklapaju se sa CH₃ protonima (L-alanin ostatka) i nalaze se u intervalu 1,48–1,55 ppm kao multiplet, dok se signal koji potiče od izoamil-CH₂ grupe vezane za estarski kiseonik javlja na 4,21 ppm. Signali od vodonikovih atoma sa tercijarnog C atoma (izoamil grupe) se nalaze na 1,69 ppm kao septet. Protoni od CH iz L-alaninskog ostatka su detektovani na 4,03 ppm dok se hemijska pomeranja etilendiamiskih protona nalaze u intervalu 3,31–3,47 ppm. Rezonancija vodonikovih atoma sekundarnih amonijum grupa nađena je na 10,09 ppm kao široki singlet.

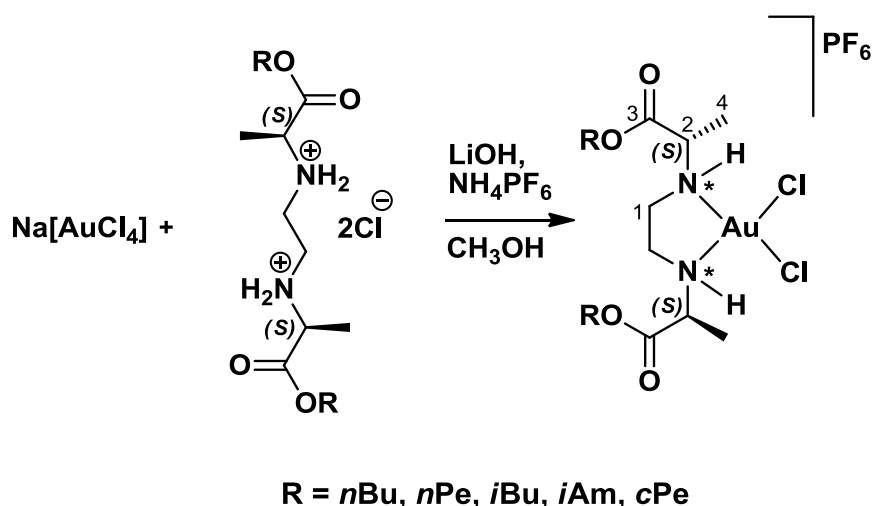
U ¹³C NMR spektru, karbonilni ugljenikov atom nalazi se na 169,4 ppm što je i očekivano na ovu klasu jedinjenja [43,44]. Etilendiamiski ugljenikov atom može se uočiti na 54,5 ppm, dok je ugljenikov atom vezan za kiseonik estarskog ostatka detektovan na 70,2 ppm.

Meseni spektar (pozitivni mod) visoke rezolucije (ESI-MS) pokazuje signal koji pripada $[\text{M}-2\text{Cl}-\text{H}]^+$ vrsti. Takođe, urađena je i optička rotacija za izolovani estar koja pokazuje specifičnu rotaciju rastvora od -15° što dokazuje da se stereocentri nalaze u *S* konfiguraciji.

Rezultat elementalne analize je u saglasnosti sa pretpostavljenom stehiometrijskom formulom.

4.2. Sinteza kompleksa zlata(III) sa *O,O'*-dialkil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-propanoat ligandima, $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-R}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$

U reakciji natrijum-tetrahloridoaurata(III), *O,O'*-dialkil-(*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-propanoat estara, (*nBu*, *nPe*, *iBu*, *iAm*, *cPe*), u metanolu i litijum-hidroksida u molskom odnosu 1:1:2, kompleksi su dobijeni nakon dodavanja čvrstog amonijum-heksafluorofosfata (Shema 6). Pripremljeni kompleksi su rastvorni u metanolu, etanolu, acetonu, dihlormetanu, hloroformu, dimetilsulfoksidu i acetonitrilu. Estri se koordinuju preko oba atoma azota za metalni jon.



Shema 6. Sinteza kompleksa zlata(III) sa (*S,S*)- R_2eddip ligandima

4.2.1. Spektroskopske studije $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-R}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$ kompleksa

U infracrvenom spektru ovih kompleksa javlja se snažna vibraciona traka u intervalu od 1732 do 1738 cm^{-1} koja odgovara karbonilnoj grupi, $\nu(\text{C}=\text{O})$, slično kao i u IC spektrima slobodnih liganada [43,44,139,151,152], što ukazuje da je prilikom koordinacije izostavljen karboksilatni kiseonik. U Tabeli 3 date su karakteristične trake iz IC spektara. Asimetrične vibracione trake, $\nu(-\text{CH}_3/-\text{CH}_2)$, su umerenog intenziteta i nalaze se u regionu od 2867 do 2968 cm^{-1} . Vibracione $\nu(\text{C}-\text{N})$ trake koje se nalaze u regionu od 845 do 849 cm^{-1} sugerišu da se koordinacija vrši preko atoma

azota [160]. Kod svih sintetisanih kompleksa primećena je i traka od 558–560 cm^{-1} koja se može prepisati $\nu(\text{Au-N})$ prelazima. U dalekoj infracrvenoj oblasti za komplekse $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}\}\text{PF}_6$ mogu se uočiti $\nu(\text{Au-Cl})$ trake na 355 ($\text{R} = n\text{Bu}$), 357 ($\text{R} = n\text{Pe}$) i 360 cm^{-1} ($\text{R} = i\text{Bu}$).

Tabela 3. Karakteristične IC apsorpcione trake za ligande i $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}\}\text{PF}_6$ komplekse.

Ligandi i kompleksi	$\nu(-\text{CH}_3/-\text{CH}_2)$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C-O})$	$\nu(\text{C-N})$
$[(S,S)\text{-H}_2n\text{Bu}_2\text{eddip}]\text{Cl}_2$ [139]	2976; 2746	1745	1235	792
$[(S,S)\text{-H}_2n\text{Pe}_2\text{eddip}]\text{Cl}_2$ [139]	2958; 2746	1744	1229	791
$[(S,S)\text{-H}_2i\text{Bu}_2\text{eddip}]\text{Cl}_2$ [43]	2962; 2730	1743	1224	804
$[(S,S)\text{-H}_2i\text{Am}_2\text{eddip}]\text{Cl}_2$ [152]	2961; 2862	1733	1236	803
$[(S,S)\text{-H}_2c\text{Pe}_2\text{eddip}]\text{Cl}_2$ [44]	2965; 2871	1741	1233	805
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddip}}\}]\text{PF}_6$	2963; 2874	1738	1236	847
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddip}}\}]\text{PF}_6$	2960; 2867	1737	1232	849
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}}\}]\text{PF}_6$	2968; 2879	1735	1231	847
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddip}}\}]\text{PF}_6$	2961; 2873	1739	1227	849
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}c\text{Pe}_2\text{eddip}}\}]\text{PF}_6$	2966; 2875	1732	1242	845

Rezultati dobijeni UV/Vis spektroskopijom pokazuju apsorpcionu traku na oko 320 nm ($\epsilon = 31\,250\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) koja može biti pripisana $\text{Cl} \rightarrow \text{Au}$ prenosu naelektrisanja [153,154]. Prema teoriji kristalnog polja, za komplekse d^8 sistema, najniža popunjena orbitala (LUMO) je $d_{x^2-y^2}$ pa prenos naelektrisanja sa liganda na metal (LMCT) mogao bi da bude zbog $p^\sigma \rightarrow d_{x^2-y^2}$ prelaza.

U ^1H NMR spektrima široki signal koji pripada vodonikovim atomima iz sekundarne amino grupe nalazi se između 7,30–7,80 ppm [niže vrednosti u poređenju sa ligand prekursorima (10 ppm)]. Hemijska pomeranja od CH_2 protona iz etilendiaminskog dela pomerena su ka nižem magnetnom polju (za oko 0,4 ppm) u odnosu na slobodne ligande i jasno ukazuje da se koordinacija izvršila preko azotovog atoma. Metil vodonikovi atomi iz α -alaninato dela pronađeni su na oko 1,70 ppm.

U ^{13}C NMR spektrima rezonancija karbonilnog C atoma nalazi se na oko 170 ppm što ukazuje da karboksilatni kiseonik nije učestvovao u koordinaciji za centralni metalni jon i da nije došlo do hidrolize estarskog ostatka. Karakteristični NMR signali dati su u Tabeli 4.

Maseni spektri svih kompleksa iz ove serije pokazuju prisustvo $[\text{M}]^+$ jona.

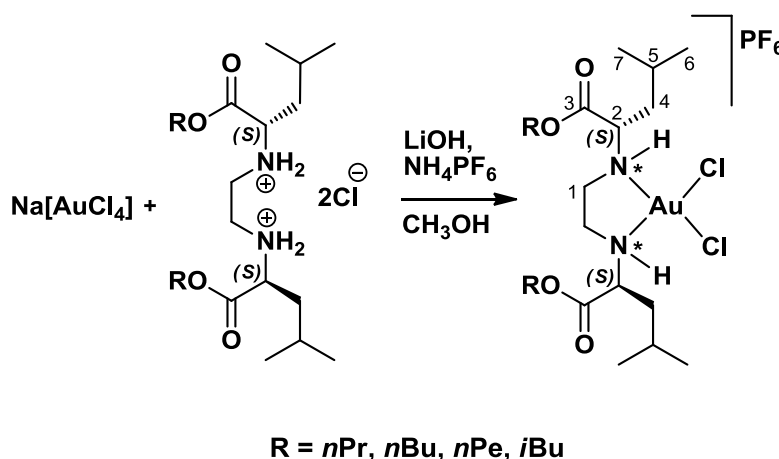
Potvrdu o pretpostavljenoj molekularnoj formuli ovih kompleksa dala je i elementalna analiza.

Tabela 4. Karakteristični signali liganada i kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ u ^1H i ^{13}C NMR spektrima.

Ligandi i kompleksi	^1H			^{13}C			
	C^1H_2	C^2H	$\text{CH}_2\text{O}/\text{CHO}$	C^1	C^2	C^3OO	$\text{CH}_2\text{O}/\text{CHO}$
$[(S,S)\text{-H}_2n\text{Bu}_2\text{eddip}]\text{Cl}_2$ [139]	3,34	4,26	4,32	44,6	59,1	173,0	70,4
$[(S,S)\text{-H}_2n\text{Pe}_2\text{eddip}]\text{Cl}_2$ [139]	3,42	4,14	4,28	45,1	59,0	173,9	70,5
$[(S,S)\text{-H}_2i\text{Bu}_2\text{eddip}]\text{Cl}_2$ [43]	3,42	4,25	3,79	40,9	54,2	168,7	71,3
$[(S,S)\text{-H}_2i\text{Am}_2\text{eddip}]\text{Cl}_2$ [152]	3,31–3,47	4,03	4,16–4,28	54,5	64,6	169,4	70,2
$[(S,S)\text{-H}_2c\text{Pe}_2\text{eddip}]\text{Cl}_2$ [44]	3,42	4,16	5,17	40,8	54,3	168,7	79,0
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$	3,60–4,00	3,93	4,26	42,9	56,3	169,4	67,4
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$	3,60–4,00	3,89	4,26	42,8	56,1	169,6	67,7
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$	3,70–4,10	4,36	4,62	42,9	56,1	169,4	73,2
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$	3,60–4,00	4,11	4,29	42,9	56,1	169,5	71,9
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}c\text{Pe}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$	3,30–3,90	4,17	5,34	43,5	57,1	169,3	81,3

4.3. Sinteza kompleksa zlata(III) sa O,O' -dialkil- (S,S) -etilendiamin- N,N' -di-2-(4-metil)-pentanoat ligandima, $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddl}}]\text{PF}_6$

U reakciji natrijum-tetrahloridoaurata(III), O,O' -dialkil- (S,S) -etilendiamin- N,N' -di-2-(4-metil)-pentanoat estara, ($n\text{Pr}$, $n\text{Bu}$, $n\text{Pe}$, $i\text{Bu}$), u metanolu i litijum hidroksida u molskom odnosu 1:1:2, kompleksi su dobijeni nakon dodavanja čvrstog amonijum-heksafluorofosfata (Shema 7). Pripremljeni kompleksi su rastvorni u metanolu, etanolu, acetonu, dihlormetanu, hloroformu, dimetilsulfoksidu i acetonitrilu. Do koordinacije estara za centralni jon dolazi bidentatno κ^2N,N' .



Shema 7. Sinteza kompleksa zlata(III) sa $(S,S)\text{-R}_2\text{eddl}$ ligandima

4.3.1. Spektroskopske studije $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$ kompleksa

Kompleksi zlata(III) sa (S,S) - R_2eddl ligandima [139,150] pokazuju apsorpcionu traku u infracrvenom spektru karakterističnu za ovu klasu jedinjenja u intervalu od $1726\text{--}1736\text{ cm}^{-1}$. Koordinacija preko azotovih atoma može da se zaključi na osnovu promena vrednosti asimetričnih C–N traka u odnosu na slobodne ligande [139,150]. U Tabeli 5 dati su položaji karakterističnih traka za sintetisane komplekse zlata(III) sa (S,S) - R_2eddl ligandima.

Tabela 5. Karakteristične IC apsorpcione trake za ligande i $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$ komplekse.

Ligandi i Kompleksi	$\nu(-\text{CH}_3/-\text{CH}_2)$	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}-\text{O})$	$\nu(\text{C}-\text{N})$
$[(S,S)\text{-H}_2n\text{Pr}_2\text{eddl}]\text{Cl}_2$ [139]	2963; 2721	1735	1236	802
$[(S,S)\text{-H}_2n\text{Bu}_2\text{eddl}]\text{Cl}_2$ [139]	2963; 2716	1736	1235	803
$[(S,S)\text{-H}_2n\text{Pe}_2\text{eddl}]\text{Cl}_2$ [139]	2960; 2726	1736	1239	798
$[(S,S)\text{-H}_2i\text{Bu}_2\text{eddl}]\text{Cl}_2$ [150]	2962; 2730	1743	1234	802
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$	2966; 2878	1733	1243	845
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$	2963; 2874	1736	1246	848
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$	2934; 2871	1735	1248	847
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$	2965; 2877	1729	1244	846

U ^1H NMR spektrima ovih kompleksa signali za metilenske protone etilendiaminskog dela molekula su pomereni ka nižem magnetnom polju u odnosu na slobodne ligande (po 0,1–0,5 ppm), što ukazuje na koordinaciju azotovih atoma za centralni metalni jon. Po dva seta signala u ^1H NMR spektrima ove serije kompleksa zlata(III) ukazuje na postojanje diastereoizomera. Takođe, dva seta signala mogu se primetiti i u ^{13}C NMR spektrima, najviše izraženih za ugljenikove atome etilendiaminskog dela i za karboksilni C atom što potvrđuje postojanje izomera. Karakteristični NMR signali dati su u Tabeli 6.

Konačno, u masenom spektru (pozitivni mod) se mogu naći molekulske joni sintetisanih kompleksa.

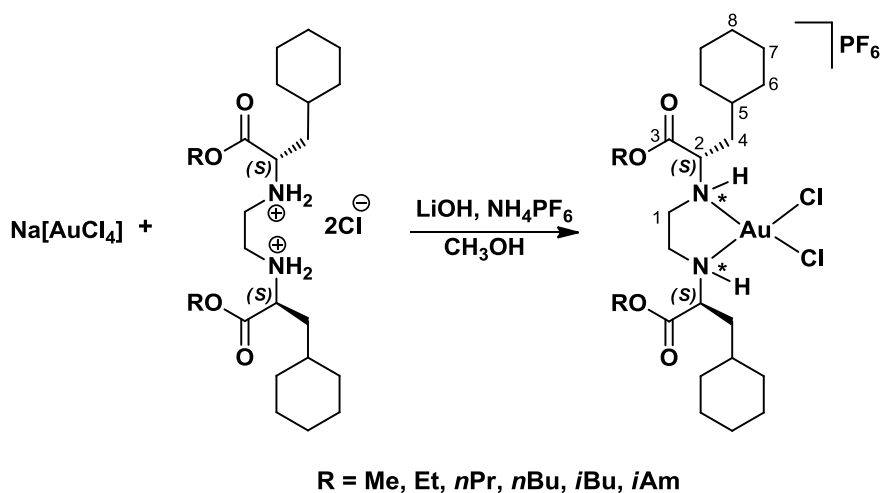
Rezultati elementalne analize su u saglasnosti pretpostavljenom molekulskom formulom.

Tabela 6. Karakteristični signali liganada i kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$ u ^1H i ^{13}C NMR spektrima.

Ligandi i kompleksi	^1H			^{13}C			
	C^1H_2	CH_2O	C^2H	C^1	C^2	C^3OO	CH_2O
$[(S,S)\text{-H}_2n\text{Pr}_2\text{eddl}]\text{Cl}_2$ [139]	3,51	4,25	4,15	46,6	63,7	174,3	73,6
$[(S,S)\text{-H}_2n\text{Bu}_2\text{eddl}]\text{Cl}_2$ [139]	3,47	4,30	4,15	45,4	62,2	173,3	70,4
$[(S,S)\text{-H}_2n\text{Pe}_2\text{eddl}]\text{Cl}_2$ [139]	3,53	4,32	4,22	45,4	62,2	173,4	70,6
$[(S,S)\text{-H}_2i\text{Bu}_2\text{eddl}]\text{Cl}_2$ [150]	3,42	3,98	4,13	41,7	57,9	169,2	71,8
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$	3,81	4,26	4,17	43,3-52,1	59,1	169,3/170,1	69,0/68,5
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$	3,30-3,70	4,28	3,98	44,2-52,5	59,8-62,7	170,3/169,8	67,3/66,3
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$	3,40-3,90	4,26	4,10	43,6-52,4	59,5	169,7/169,9	67,7/66,5
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$	3,70-3,90	4,19	4,10	43,7-52,6	59,8	169,4/169,7	73,8/73,3

4.4. Sinteza kompleksa zlata(III) sa O,O' -dialkil- (S,S) -etilendiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)-propanoat ligandima, $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$

U reakciji natrijum-tetrahloridoaurata(III), O,O' -dialkil- (S,S) -etilendiamin- N,N' -di-2-(3-cikloheksil)-propanoat estara, ($\text{R} = \text{Me}, \text{Et}, n\text{Pr}, n\text{Bu}, i\text{Bu}, i\text{Am}$), u metanolu i litijum-hidroksida u molskom odnosu 1:1:2, kompleksi su dobijeni nakon dodavanja čvrstog amonijum-heksafluorofosfata (Shema 8). Pripremljeni kompleksi su rastvorni u metanolu, etanolu, acetonu, dihlormetanu, hloroformu, dimetilsulfoksidu i acetonitrilu. Pri građenju kompleksa estri se koordinuju bidentatno κ^2N,N' za metalni jon.

**Shema 8.** Sinteza kompleksa zlata(III) sa $(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}$ ligandima

4.4.1. Spektroskopske studije $[AuCl_2\{(S,S)-R_2eddch\}]PF_6$ kompleksa

Kao i kod prethodno sintetisanih kompleksa zlata(III) sa ligandima R_2edda -tipa, i zlato(III) kompleksi sa (S,S) - R_2eddch ligandima pokazuju snažnu apsorpcionu traku koja pripada karbonilnoj grupi $\nu(C=O)$ u intervalu od 1729 do 1734 cm^{-1} , slično kao i kod slobodnih liganada [53,140], što potvrđuje pretpostavku da nije došlo do koordinacije preko karboksilatnog atoma kiseonika. Asimetrične $\nu(-CH_3/-CH_2)$ vibracione trake srednjeg intenziteta nalaze se u opsegu od 2851 do 2930 cm^{-1} . Zatim, promena vrednosti talasnog broja asimetričnih C–N traka od 803–823 cm^{-1} (slobodni ligandi) do 847–850 cm^{-1} (dobijeni kompleksi) ukazuje da se ligandi koordinuju za metalni jon preko atoma azota [151]. U Tabeli 7 dati su položaji traka za izolovane komplekse.

Tabela 7. Karakteristične IC apsorpcione trake za ligande i $[AuCl_2\{(S,S)-R_2eddch\}]PF_6$ komplekse.

Ligandi i kompleksi	$\nu(-CH_3/-CH_2)$	$\nu(C=O)$	$\nu(C-O)$	$\nu(C-N)$
$[(S,S)-H_2Me_2ddch]Cl_2$ [53]	2900–2500	1739	1270	802
$[(S,S)-H_2Et_2ddch]Cl_2$ [53]	2900–2500	1739	1277	802
$[(S,S)-H_2nPr_2ddch]Cl_2$ [53]	2900–2500	1735	1277	829
$[(S,S)-H_2nBu_2ddch]Cl_2$ [53]	2900–2500	1738	1259	810
$[(S,S)-H_2iBu_2ddch]Cl_2$ [140]	2929;2845	1742	1260	807
$[(S,S)-H_2iAm_2ddch]Cl_2$ [140]	2928;2850	1746	1259	805
$[AuCl_2\{(S,S)-Me_2eddch\}]PF_6$	2927; 2852	1732	1261	848
$[AuCl_2\{(S,S)-Et_2eddch\}]PF_6$	2929; 2854	1734	1283	850
$[AuCl_2\{(S,S)-nPr_2eddch\}]PF_6$	2929; 2853	1734	1277	849
$[AuCl_2\{(S,S)-nBu_2eddch\}]PF_6$	2929; 2853	1729	1260	845
$[AuCl_2\{(S,S)-iBu_2eddch\}]PF_6$	2929; 2853	1730	1266	848
$[AuCl_2\{(S,S)-iAm_2eddch\}]PF_6$	2929; 2854	1731	1260	851

Analogno $[AuCl_2\{(S,S)-R_2eddip\}]PF_6$ kompleksima, u UV/Vis spektrima $[AuCl_2\{(S,S)-R_2eddch\}]PF_6$ javlja se apsorpcioni maksimum na oko 320 nm ($\epsilon = 31\,250\,M^{-1}\,cm^{-1}$) koja na osnovu LMCT prelaza može odgovarati $Cl \rightarrow Au$ prenosu naelektrisanja analogno apsorpcionom spektru auratne kiseline [153,155]. 1H i ^{13}C NMR spektri dobijenih kompleksa su analogni spektrima platinskih kompleksa sa R_2edda -tip ligandima [45,47,48,53]. Karakteristični NMR signali dati

su u Tabeli 8. Hemijska pomeranja cikloheksil-vodonikovih atoma, (C^5H , $C^{6-8}H_2$), nalaze se između 0,95 i 1,90 ppm. Vodonikovi atomi koji pripadaju sekundarnoj amino grupi nalaze se aproksimativno na 4,70 ppm. Signali za metilenske protone etilendiaminskog dela molekula pomeneni su ka višem magnetnom polju u odnosu na slobodne ligande (za oko 0,6 ppm), što ukazuje na koordinaciju azotovih atoma za centralni metalni jon. U ^{13}C NMR spektrima kompleksa signali za estarske ugljenikove atome nalaze se na približno istim položajima kao u spektrima liganada (na oko 170 ppm), što ukazuje na to da nije došlo do koordinacije kiseonikovih atoma za centralni metalni jon.

I kod ove serije kompleksa maseni spektri (pozitivni mod) pokazuju prisustvo $[M]^+$ jona.

Stehiometrijska formula sintetisanih kompleksa je u saglasnosti sa elementalnom analizom.

Tabela 8. Karakteristični signali liganada i kompleksa $[AuCl_2\{(S,S)\text{-}R_2\text{eddch}\}]PF_6$ u 1H i ^{13}C NMR spektrima.

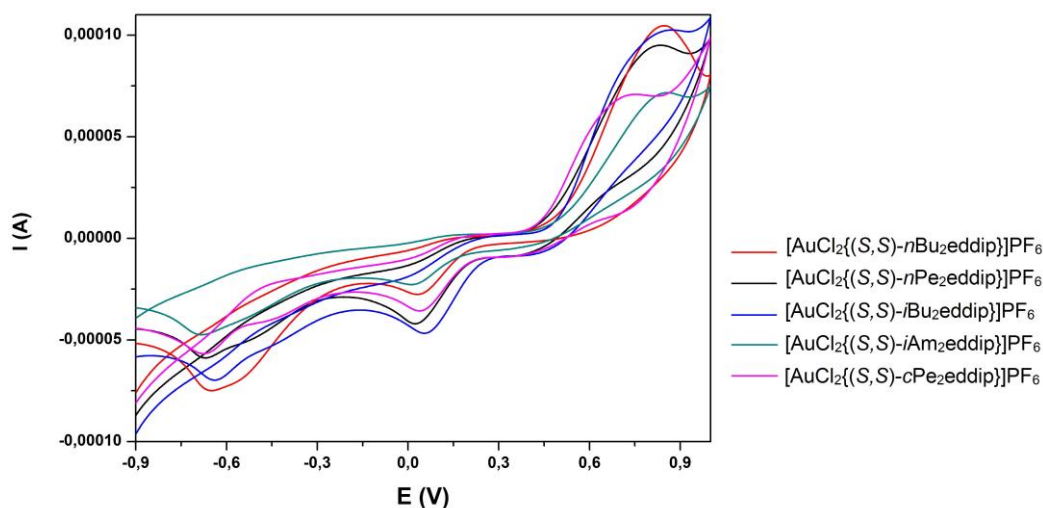
Ligandi i kompleksi	1H			^{13}C			
	C^1H_2	CH_2O/CH_3O	C^2H	C^1	C^2	C^3OO	CH_2O/CH_3O
$[(S,S)\text{-}H_2Me_2ddch]Cl_2$ [53]	3,41	3,78	4,15	53,3	57,5	170,2	42,0
$[(S,S)\text{-}H_2Et_2ddch]Cl_2$ [53]	4,05	3,96	4,25	57,3	62,3	169,3	62,3
$[(S,S)\text{-}H_2nPr_2ddch]Cl_2$ [53]	4,16	3,58	4,16	57,5	57,5	169,9	67,7
$[(S,S)\text{-}H_2nBu_2ddch]Cl_2$ [53]	4,20	3,50	4,20	57,6	57,6	169,9	65,9
$[(S,S)\text{-}H_2iBu_2ddch]Cl_2$ [140]	4,12	4,32	4,53	46,7	62,8	172,9	77,2
$[(S,S)\text{-}H_2iAm_2ddch]Cl_2$ [140]	4,14	4,67	4,67	46,6	62,8	172,8	70,0
$[AuCl_2\{(S,S)\text{-}Me_2eddch\}]PF_6$	3,57	3,89	4,06	44,3	59,2	170,6	54,0
$[AuCl_2\{(S,S)\text{-}Et_2eddch\}]PF_6$	3,55	4,34	4,02	44,1	59,2	170,1	63,5
$[AuCl_2\{(S,S)\text{-}nPr_2eddch\}]PF_6$	3,48	4,23	3,98	44,4	59,2	170,7	68,7
$[AuCl_2\{(S,S)\text{-}nBu_2eddch\}]PF_6$	3,57	4,30	4,04	44,2	59,3	170,3	67,3
$[AuCl_2\{(S,S)\text{-}iBu_2eddch\}]PF_6$	3,53	4,06	4,06	44,3	59,3	170,5	73,3
$[AuCl_2\{(S,S)\text{-}iAm_2eddch\}]PF_6$	3,43	4,30	3,92	44,5	59,2	171,0	65,8

4.5. Elektrohemijsko ponašanje zlato(III) kompleksa

Da bi se bolje razumeo mehanizam delovanja kompleksa zlata(III) kao antitumorskih agenasa, urađeno je elektrohemijsko ispitivanje serija kompleksa $[AuCl_2\{(S,S)\text{-}R_2\text{eddip}\}]PF_6$ i $[AuCl_2\{(S,S)\text{-}R_2\text{eddch}\}]PF_6$. Literaturni podaci govore

da za skoro sve poznate komplekse zlata(III), aktivni metaboliti bi mogle biti odgovarajuće zlato(I) vrste dobijene redukcijom zlato(III) kompleksa *in vivo* [110]. Stoga, vrednosti redukcionih potencijala su nezaobilazni parametar za utvrđivanje načina delovanja zlato(III) kompleksa jer većina metalofarmaceutskih lekova se aktivira *in vivo* kao rezultat elektronskog transfera.

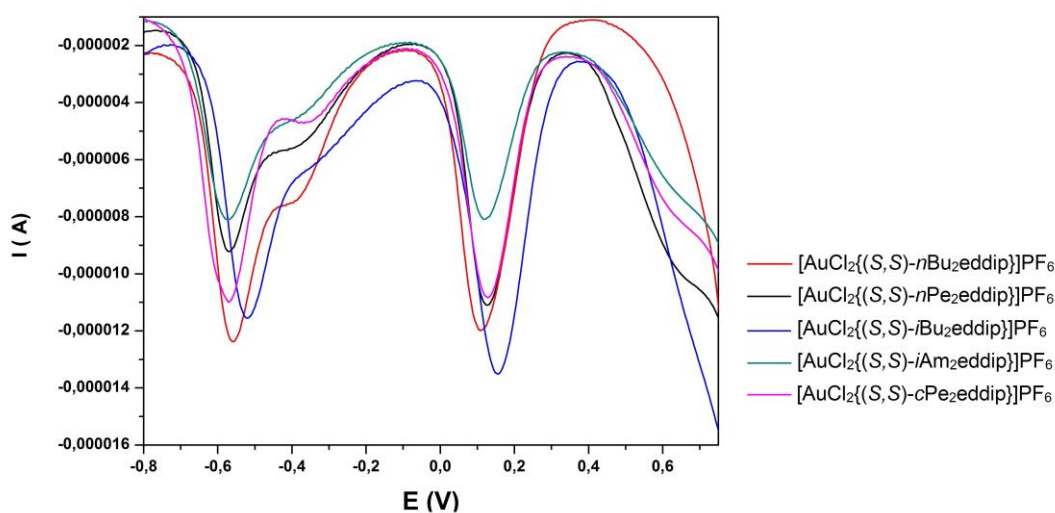
Za rastvore kompleksa zlata(III) sa (S,S)-R₂eddip ligandima u DMSO-u snimljeni su ciklični voltamogrami koji pokazuju da se redukcija zlata(III) kompleksa vrši dvoelektronski u vidu dva pika (Slika 24). Vrednosti redukcionog potencijala nalaze se u intervalu od 116–156 mV (E_{p1}) i od –520 do –572 mV (E_{p2}). Prvi korak redukcije je jednoelektronski transfer proces, $[NN^2-AuCl_2]^+ + e^- \rightarrow [NN^2-AuCl]^+ + Cl^-$, dok drugi je dalja redukcija $[NN^2-AuCl]^+$ u vidu $[NN^2-AuCl]^+ + e^- \rightarrow [NN^2-Au]^+ + Cl^-$. Dva redukciona pika u svim slučajevima ukazuju na pojavu kratko-postojeće Au^{II} vrste kao intermedijera, čiji tačan hemijski sastav (bilo kao $[NN^2-AuCl]^+$ kako je gore prikazano ili u obliku nekog dimera) u ovoj fazi nije potpuno jasan [156]. Izostanak metalnog zlata na platinskoj elektrodi ukazuje da se redukcija zlato(III) kompleksa ne vrši do elementalnog zlata što je potvrđeno nakon redukcije pri konstantnom potencijalu od –0,8 V (*vs.* Ag/AgCl) u trajanju od 15 minuta.



Slika 24. Ciklični voltamogrami rastvora ($c = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$) kompleksa $[AuCl_2\{(S,S)\text{-}R_2\text{eddip}\}]PF_6$ u DMSO-u, pomoćni elektrolit LiClO₄.

Ne postoji stroga korelacija između redukcionog potencijala i dužine alkil lanca u estarskom delu kompleksa. Sa druge strane, razlika između prvog i drugog redukcionog potencijala ostaje približno konstantna. Rastvori kompleksa zlata(III) sa (*S,S*)-R₂eddip ligandima u hloroformu (CHCl₃) ne pokazuju elektrohemijску aktivnost. Ovo bi moglo da se objasni razlikom u polarnosti rastvarača.

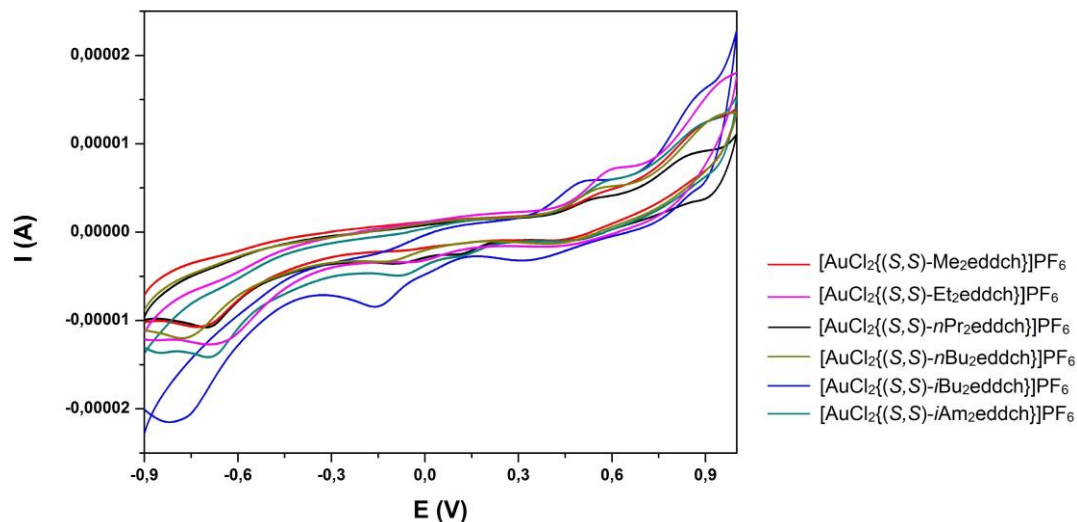
U cilju preciznijeg određivanja elektrodnih potencijala zlato(III) kompleksa snimljeni su diferencijalno-pulsni (DP) voltamogrami koji su potvrdili mehanizam dvoelektronske redukcije u vidu dva pika (Slika 25). Kao što se može primetiti na Slici 29, visine pikova u prvom i drugom redukcionom koraku ostaju približno iste za svaki kompleks. Međutim, kao i kod ciklične voltametrije, i ovde se pokazalo da redukciono potencijal ne zavisi od dužine lanca C-atoma u estarskom delu kompleksa.



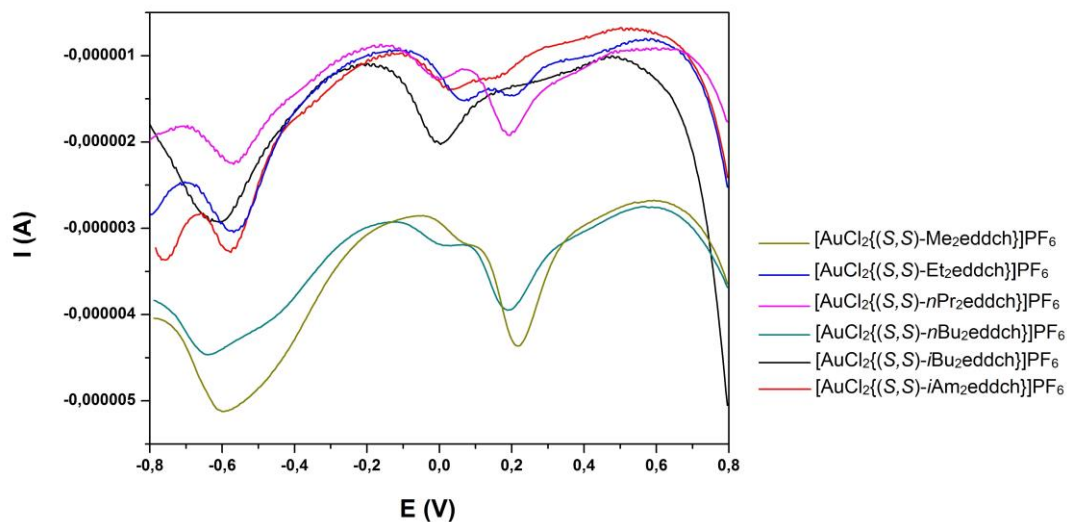
Slika 25. DP voltamogrami rastvora 0,1 mmol/dm³ kompleksa [AuCl₂{(S,S)-R₂eddip}]PF₆ u DMSO-u, pomoćni elektrolit LiClO₄.

Redukcija kompleksa zlata(III) sa (*S,S*)-R₂eddch ligandima je takođe dvoelektronski proces (Slika 26). Rastvori kompleksa [AuCl₂{(S,S)-R₂eddch}]PF₆ u DMSO-u na platinskoj elektrodi pokazuju redukujući pik u intervalu od 148–228 mV (*E*_{p1}) i od –569 do –638 mV (*E*_{p2}). Ovo je takođe ireverzibilan proces praćen gubitkom hlorido liganda ali u ovom slučaju proces redukcije se odvija teže nego kod kompleksa zlata(III) sa (*S,S*)-R₂eddip ligandima (Slika 27). Glavni razlog ovakvog ponašanja moglo bi da bude prostorno okruženje oko centralnog metalnog jona. Jasno je da redukciono potencijal zavisi od tipa izabranih liganada. Pojava redukcionog

procesa $\text{Au}^{\text{III}}/\text{Au}^0$ se isključuje zbog izostanka elementarnog zlata na platinskoj elektrodi. Kao i kod kompleksa zlata(III) sa (S,S) - R_2eddip ligandima, i rastvori kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$ u CHCl_3 su elektrohemijski neaktivni.

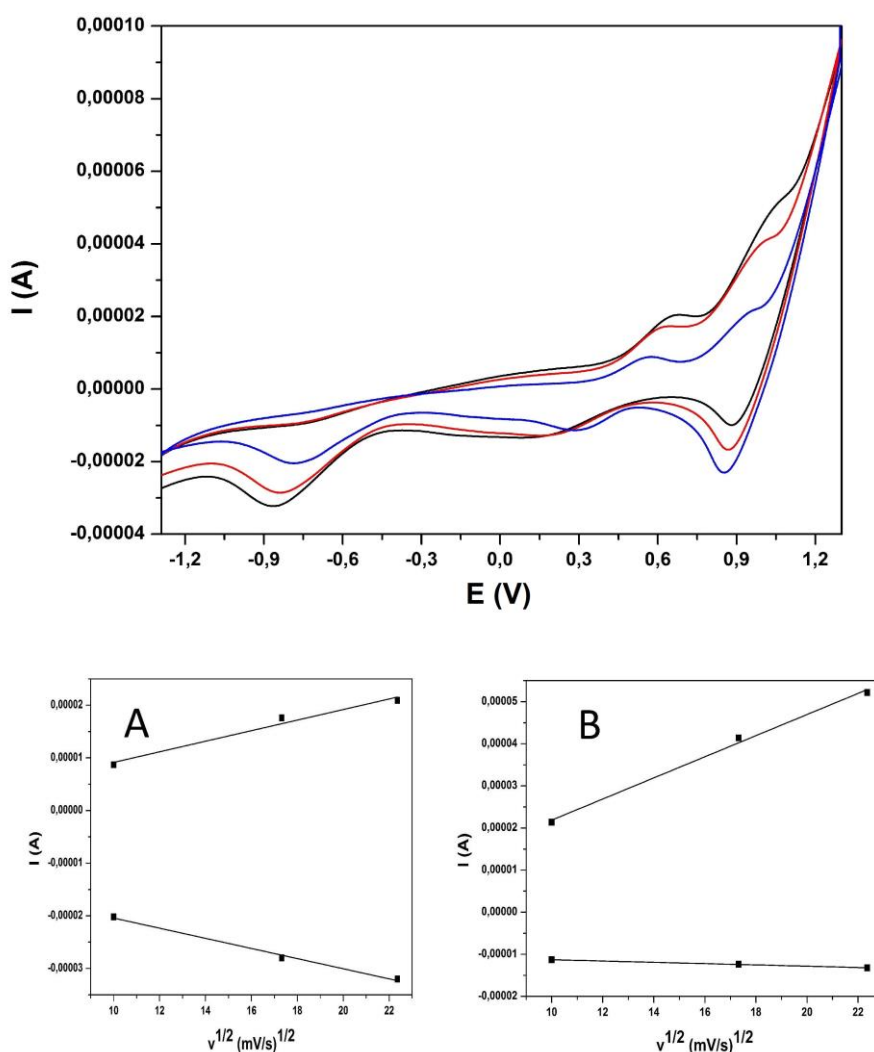


Slika 26. Ciklični voltamogrami rastvora $0,1 \text{ mmol/dm}^3$ kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$ u DMSO-u, pomoćni elektrolit LiClO_4 .



Slika 27. DP voltamogrami rastvora $0,1 \text{ mmol/dm}^3$ kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$ u DMSO-u, pomoćni elektrolit LiClO_4 .

Naredni korak je oduhvatio ispitivanje elektrohemijuskog ponašanja kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-iBu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$ pri različitim brzinama polarizacije, (Slika 28). Na Slici 28 je, takođe, prikazana zavisnost struje oksidacionog i redukujućeg pika od kvadratnog korena brzine snimanja. Pod eksperimentalnim uslovima, ispitivani kompleks pokazuje tri redukciona i dva oksidaciona pika i vidimo da je zavisnost jačine struje od kvadratnog korena brzine polarizacije linearna što ukazuje da je proces difuziono kontrolisan u datom opsegu brzina polarizacije [157,158].

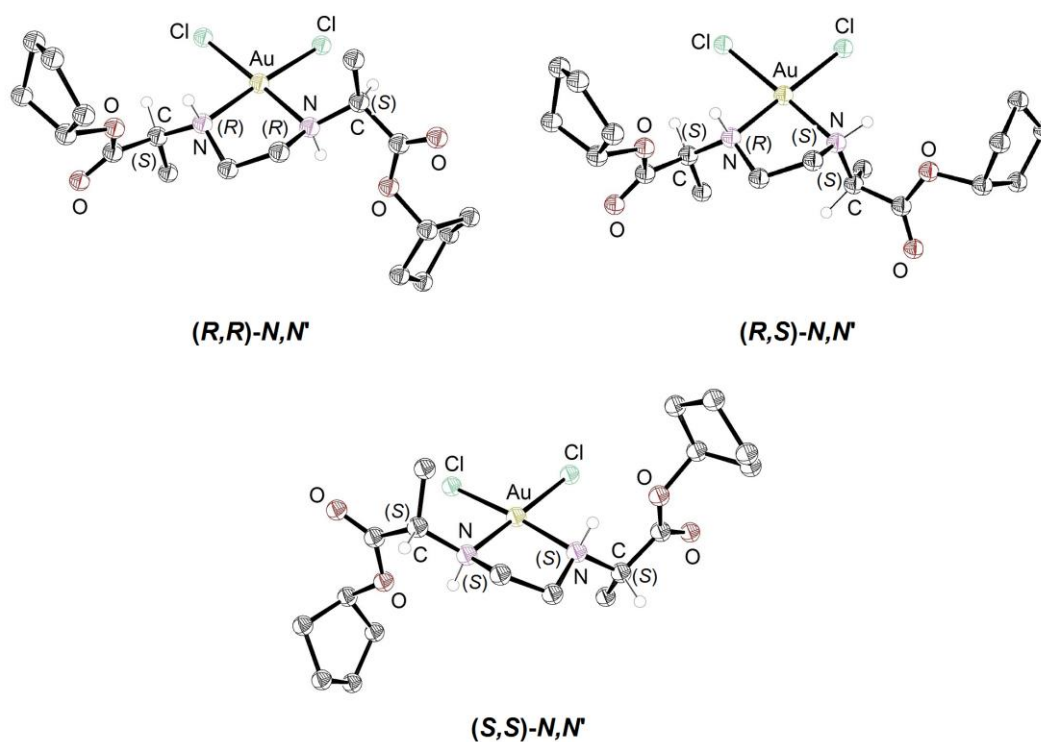


Slika 28. Ciklični voltamogrami $0,1 \text{ mmol/dm}^3$ rastvora kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-iBu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$ u DMSO-u pri različitim vrednostima brzina polarizacije (100, 300 i 500 mV/s).

4.6. DFT proračuni

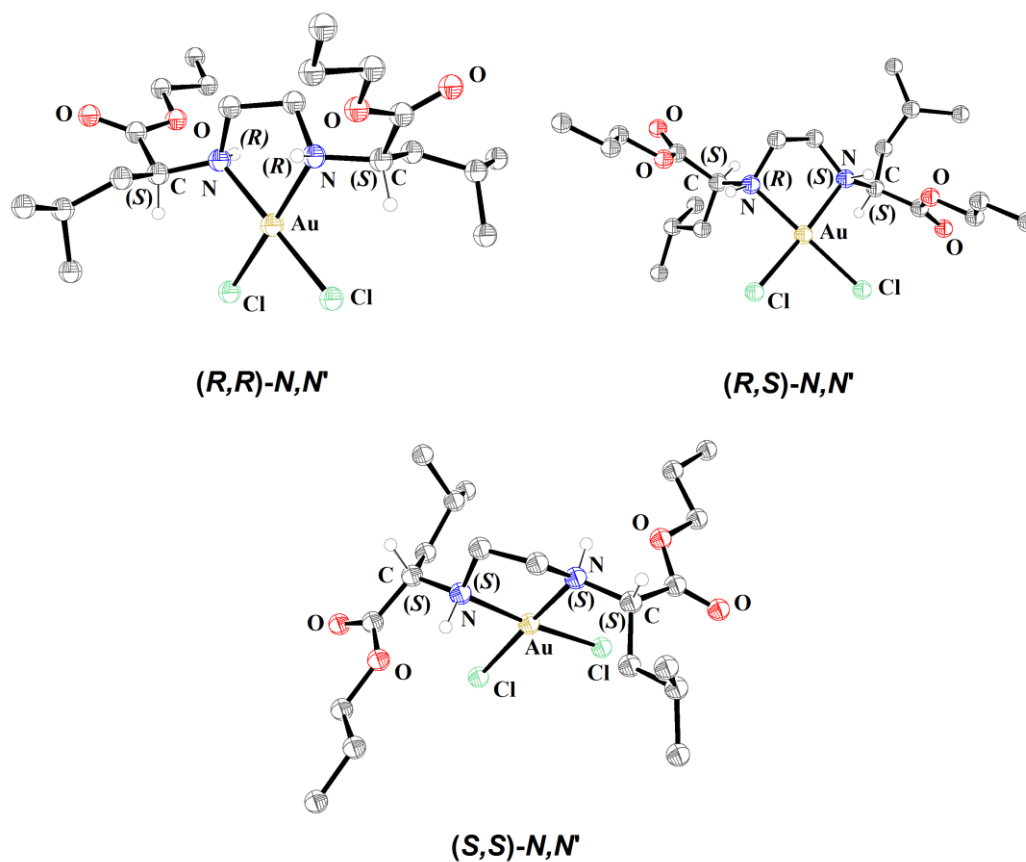
Koordinacijom hiranlih (*S,S*)-R₂edda-tip liganada za zlato(III) formiraju se novi stereocentri na azotovim atomima, a teorijski se mogu dobiti tri dijastereoizomera (*R,R*), (*S,S*) i (*R,S* ≡ *S,R*). Da bi se istražila selektivnost građenja isključivo po jednog izomera (nađeno u NMR spektrima) u slučaju serije kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-R₂eddip}]PF₆ i [AuCl₂{(*S,S*)-R₂eddch}]PF₆ i da bi se ustanovilo koja dva izomera nastaju kod kompleksa iz serije [AuCl₂{(*S,S*)-R₂eddl}]PF₆, rađeni su DFT proračuni. Optimizovane strukture odabranih kompleksa iz svake grupe prikazane su na Slikama 29–31. Strukture su u potpunosti optimizovane bez ikakvih simetrijskih ograničenja.

Izračunate strukture za seriju kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-R₂eddip}]PF₆ pokazuju da je (*R,R*) konfiguracija N atoma energetski najpovoljnija za sve komplekse iz ove serije (Slika 29). DFT proračuni su pokazali da je energetska razlika između (*R,R*)- i (*R,S*)- κ²*N,N'* diastereoizomera oko 1 kcal/mol što je u okviru greške DFT izračunavanja. Energija trećeg izomera, (*S,S*)- κ²*N,N'* je za 3,2–4,1 kcal/mol viša od energije (*R,R*)-*N,N'* konfiguracije. Kako se u NMR spektru vidi postojanje samo jednog izomera, najverovatnije se radi o najstabilnijem, što bi dalji proračuni na različitim nivoima teorije trebalo da potvrde.



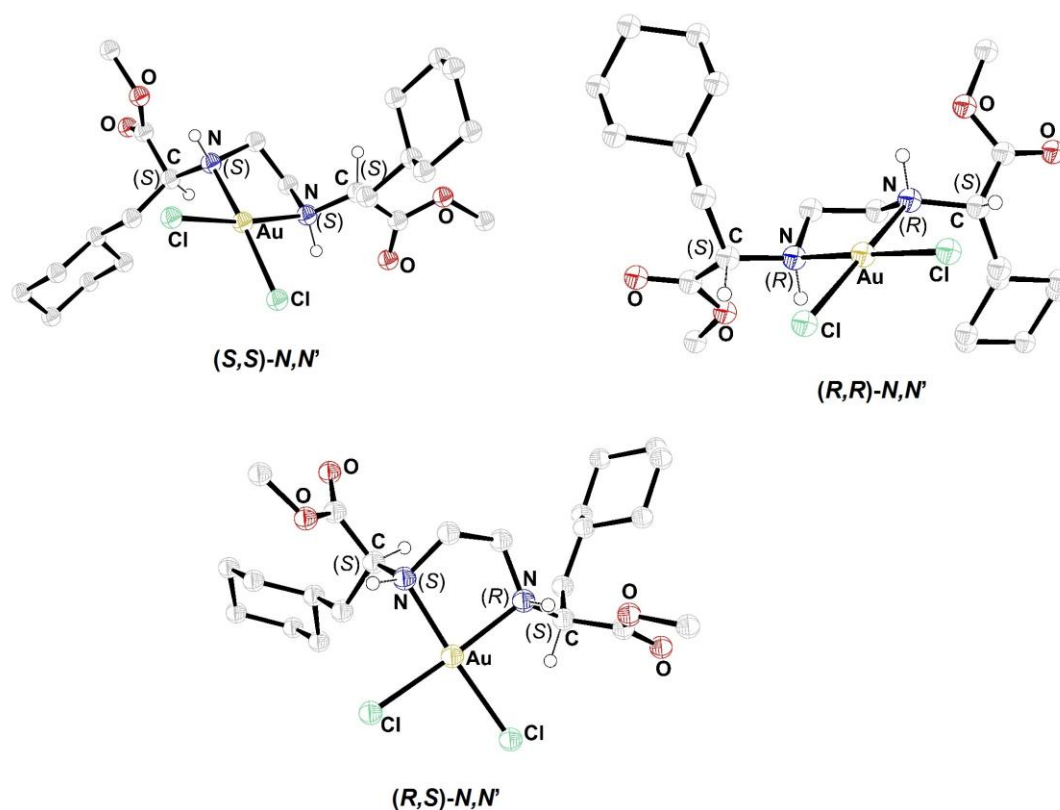
Slika 29. Izračunate strukture $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-cPe}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$ kompleksa.

DFT proračuni su pokazali da kod kompleksa zlata(III) sa (*S,S*)- R_2eddl ligandima je energetska najpovoljnija (*R,R*) konfiguracija, Slika 30. Energetska razlika između (*R,R*) i (*R,S*) izomera je oko 3,3 kcal/mol. Treći diastereoizomer (*S,S*) ima za oko 6,0 kcal/mol višu energiju nego (*R,R*)- $\kappa^2\text{N,N'}$ konfiguracioni izomer. S obzirom na malu energetska razliku moguće je da NMR spektri pokazuju (*R,R*) i (*R,S*) diastereoizomere (dva seta signala).



Slika 30. Izračunate strukture $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$ kompleksa.

U slučaju kompleksa zlata(III) sa $(\text{S,S})\text{-R}_2\text{eddch}$ ligandima pronađeno je da je $(\text{S,S})\text{-}\kappa^2\text{N,N}'$ konfiguracioni izomer najstabilniji u odnosu na (R,S) i (R,R) izomere, Slika 31. Razlika u energiji između $(\text{S,S})\text{-}\kappa^2\text{N,N}'$ i $(\text{R,R})\text{-}$ i $(\text{R,S})\text{-}\kappa^2\text{N,N}'$ izomera, $\Delta E_{(\text{S,S})\text{-}(\text{R,R})} = 4,2\text{--}5,4$; $\Delta E_{(\text{S,S})\text{-}(\text{R,S})} = 2,9\text{--}5,4$ kcal/mol, ukazuje da se najverovatnije radi o (S,S) izomeru koji se pojavljuje u NMR spektrima.



Slika 31. Izračunate strukture za $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-Me}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$ kompleks.

4.7. *In vitro* antitumorska aktivnost

Ispitana je aktivnost kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$ ($\text{R} = n\text{Pr}, n\text{Bu}, i\text{Bu}, i\text{Am}$ i $c\text{Pe}$), $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$ ($\text{R} = n\text{Pr}, n\text{Bu}, n\text{Pe}$ i $i\text{Bu}$) i $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$ ($\text{R} = \text{Me}, \text{Et}, n\text{Pr}, n\text{Bu}, i\text{Bu}$ i $i\text{Am}$) prema tumorskim ćelijama humanog adenokarcinoma materice HeLa, humanog malignog melanoma Fem-x, humane mijeloidne leukemije K562, kao i na zdravim humanim nestimulisanim (PBMC) i stimulisanim mononuklearnim ćelijama (PBMC + PHA), izolovanim iz periferne krvi i/ili ćelijama fetalnog plućnog fibroblasta (MRC-5).

4.7.1. Aktivnost kompleksa $[AuCl_2\{(S,S)-R_2eddip\}]PF_6$

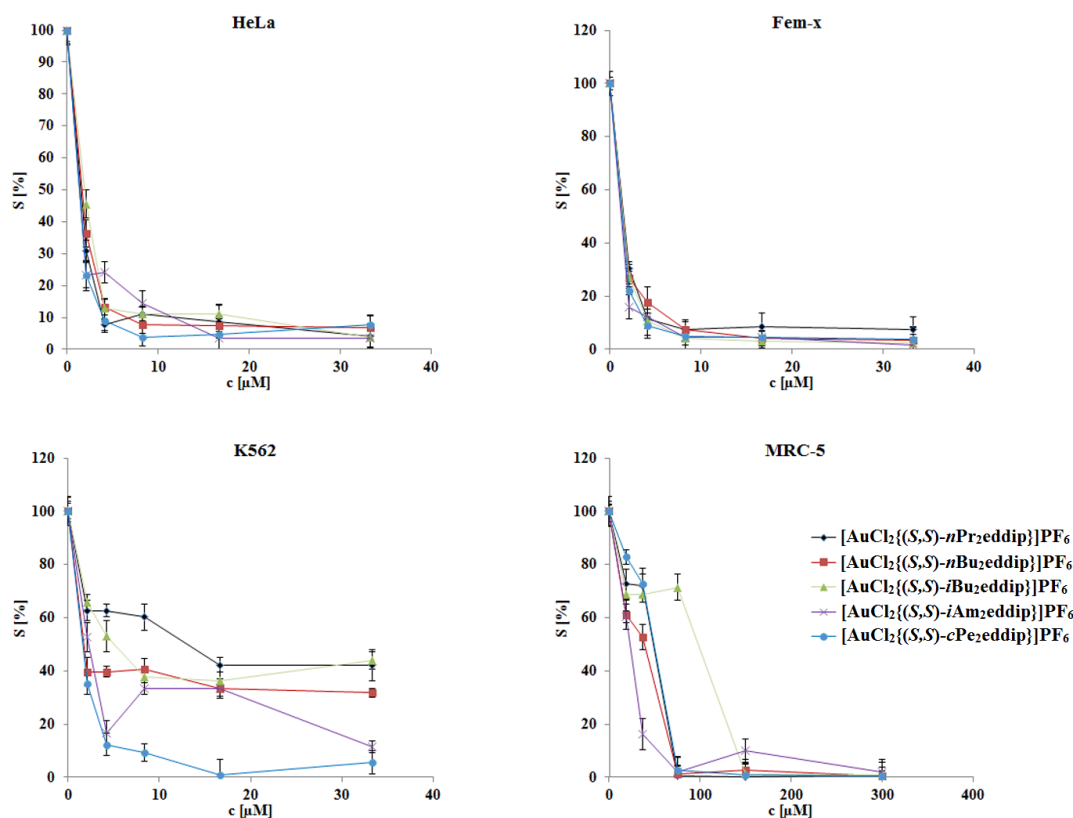
Za komplekse $[AuCl_2\{(S,S)-R_2eddip\}]PF_6$ ($R = nPr, nBu, iBu, iPe, cPe$), ispitivana je *in vitro* antitumorska aktivnost prema tumorskim ćelijama: HeLa, Fem-x i K562 kao i normalnim MRC-5 ćelijama. Rezultati ovog ispitivanja prikazani su u Tabeli 9. Takođe, na Slici 32 prikazani su grafici preživljavanja HeLa, Fem-x, K562 ćelija, kao i normalnih MRC-5 ćelija nakon 72 h ćelijskog rasta u zavisnosti od koncentracije ispitivanih zlato(III) kompleksa.

Tabela 9. $IC_{50}[\mu M]^a$ za 72 h dejstva ispitivanih supstanci i cisplatine prema HeLa, K562, Fem-x tumorskim ćelijama i prema normalnoj MRC-5 ćelijskoj liniji određenih MTT testom.

Kompleks	$IC_{50} [\mu M]$			
	HeLa	Fem-x	K562	MRC-5
$[AuCl_2\{(S,S)-nPr_2eddip\}]PF_6$	$2,07 \pm 0,15$	$2,01 \pm 0,31$	$2,97 \pm 0,35$	$23,15 \pm 0,85$
$[AuCl_2\{(S,S)-nBu_2eddip\}]PF_6$	$1,61 \pm 0,11$	$1,39 \pm 0,08$	$1,45 \pm 0,83$	$84,46 \pm 0,24$
$[AuCl_2\{(S,S)-iBu_2eddip\}]PF_6$	$1,99 \pm 0,81$	$1,78 \pm 0,35$	$4,41 \pm 0,42$	$56,77 \pm 1,26$
$[AuCl_2\{(S,S)-iAm_2eddip\}]PF_6$	$2,14 \pm 0,76$	$1,35 \pm 0,23$	$5,01 \pm 0,15$	$97,88 \pm 1,75$
$[AuCl_2\{(S,S)-cPe_2eddip\}]PF_6$	$1,72 \pm 0,67$	$1,57 \pm 0,24$	$2,69 \pm 0,33$	$61,55 \pm 2,35$
cisplatina	$2,10 \pm 0,20$	$5,51 \pm 0,31$	$5,54 \pm 1,03$	$14,21 \pm 1,54$

^aSrednja vrednost \pm SD za tri eksperimenta.

Svi kompleksi iz ove serije pokazuju visoku citotoksičnu aktivnost prema svim ispitivanim ćelijskim linijama, a najveću prema Fem-x ćelijama. Najnižu IC_{50} vrednost prema Fem-x ćelijama pokazuje kompleks $[AuCl_2\{(S,S)-iAm_2eddip\}]PF_6$, ali istovremeno i najvišu prema HeLa i K562 ćelijskim linijama. Kompleks $[AuCl_2\{(S,S)-nBu_2eddip\}]PF_6$ pokazuje najbolju aktivnost prema svim tumorskim ćelijskim linijama. Kao što se može videti iz Tabele 9, kompleksi $[AuCl_2\{(S,S)-R_2eddip\}]PF_6$ su uglavnom efikasniji od cisplatine prema Fem-x i K562 ćelijama, a slične aktivnosti prema HeLa ćelijskoj liniji. Uvođenjem zlato(III) jona, kao metalnog centra, sa (S,S)- R_2eddip ligandima ima pozitivan uticaj na antiproliferativnu aktivnost u odnosu na komplekse platine(IV) i platine(II) sa istim tipom liganada koji pokazuju manju antitumorsku aktivnost [43,46].



Slika 32. Reprezentativni grafici preživljavanja HeLa, Fem-x, K562 ćelija, kao i normalnih MRC-5 ćelija nakon 72h ćelijskog rasta u prisustvu ispitivanih supstanci.

4.7.2. Aktivnost kompleksa $[AuCl_2\{(S,S)-R_2eddl\}]PF_6$

Kompleksima zlata(III) sa (S,S) - R_2eddl ligandima određena je citotoksična aktivnost prema HeLa, Fem-x i K562 tumorskim ćelijama, kao i prema zdravim MRC-5 ćelijama. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su u Tabeli 10. Grafici preživljavanja HeLa, Fem-x, K562 ćelija, kao i normalnih MRC-5 ćelija nakon 72 h ćelijskog rasta u zavisnosti od koncentracije ispitivanih supstanci prikazani su na Slici 33. U Tabeli 10 takođe su prikazane i referentne vrednosti cisplatine i kompleksa $[PtCl_4(nBu_2eddp)]$ koji je do danas od svih sintetisanih kompleksa sa ligandima R_2edda -tipa jedini ispitivan *in vivo*.

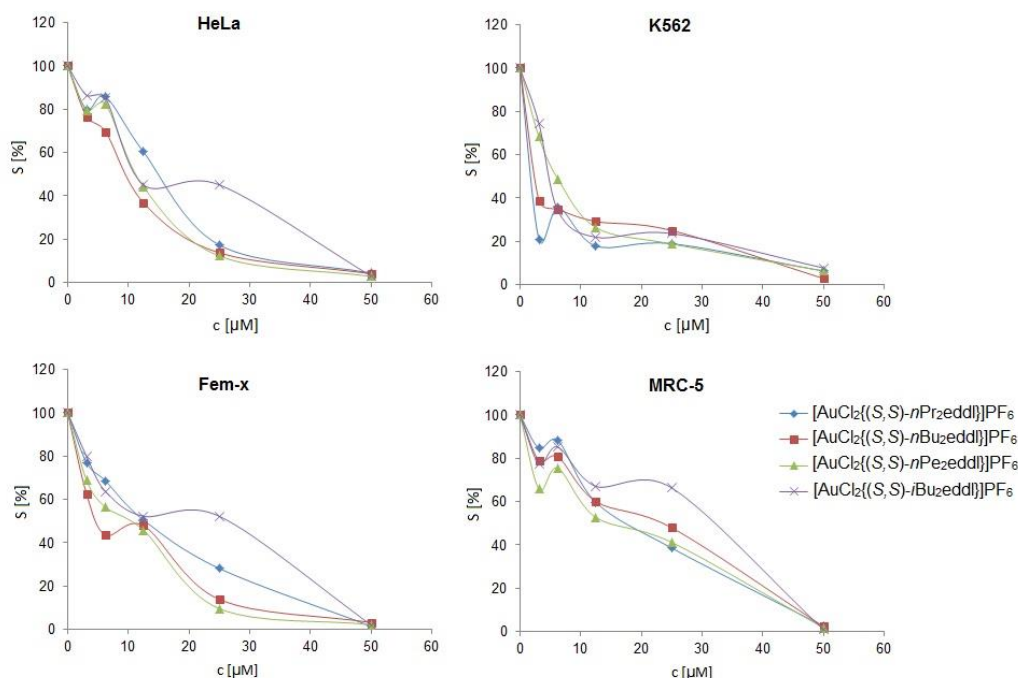
Tabela 10. $IC_{50}[\mu M]^a$ za 72 h dejstva ispitivanih supstanci, kao i $[PtCl_4(nBu_2eddp)]$ i cisplatine prema HeLa, K562, Fem-x tumorskim ćelijama i prema normalnoj MRC-5 ćelijskoj liniji određenih MTT testom.

Kompleks	$IC_{50} [\mu M]$			
	HeLa	Fem-x	K562	MRC-5
$[AuCl_2\{(S,S)-nPr_2eddl\}]PF_6$	$13,61 \pm 1,79$	$15,06 \pm 2,78$	$4,86 \pm 4,06$	$18,58 \pm 0,47$
$[AuCl_2\{(S,S)-nBu_2eddl\}]PF_6$	$12,47 \pm 2,22$	$12,50 \pm 5,67$	$6,18 \pm 3,44$	$26,11 \pm 4,06$
$[AuCl_2\{(S,S)-nPe_2eddl\}]PF_6$	$12,06 \pm 1,53$	$11,89 \pm 5,62$	$5,81 \pm 1,23$	$19,08 \pm 2,74$
$[AuCl_2\{(S,S)-iBu_2eddl\}]PF_6$	$10,65 \pm 0,83$	$14,62 \pm 1,94$	$5,69 \pm 2,51$	$19,44 \pm 1,99$
$[PtCl_4(nBu_2eddp)]$ [47]	$14,88 \pm 2,36$	n.o.	$7,08 \pm 2,00$	n.o.
cisplatina	$2,10 \pm 0,20$	$5,51 \pm 0,31$	$5,77 \pm 0,35$	$14,21 \pm 1,54$

^aSrednja vrednost \pm SD za tri eksperimenta.

n.o. - nije određeno

Svi kompleksi iz ove serije pokazuju najveću aktivnost prema K562 ćelijama koja je uporediva sa referentnom supstancom, cisplatinom. Najnižu IC_{50} vrednost prema K562 ćelijama pokazuje kompleks $[AuCl_2\{(S,S)-nPr_2eddl\}]PF_6$ koji je istovremeno i najmanje aktivan prema HeLa i Fem-x ćelijskim linijama (Tabela 10). Ispitivani kompleksi pokazuju veću aktivnost prema HeLa ćelijama od kompleksa platine(IV), $[PtCl_4(nBu_2eddp)]$ [47].



Slika 33. Reprezentativni grafici preživljavanja HeLa, Fem-x, K562 ćelija, kao i normalnih MRC-5 ćelija nakon 72h ćelijskog rasta u prisustvu ispitivanih supstanci.

4.7.3. Aktivnost kompleksa $[AuCl_2\{(S,S)-R_2eddch\}]PF_6$

Sintetisanim kompleksima iz serije $[AuCl_2\{(S,S)-R_2eddch\}]PF_6$, određivana je antiproliferativna aktivnost prema HeLa, Fem-x i K562 tumorskim ćelijama, prema zdravim humanim mononuklearnim ćelijama eriferne krvi (nestimulisanim PMBC i stimulisanim PMBC + PHA).

Kao što se može videti iz Tabele 11, citotoksična aktivnost ispitivanih supstanci je najizraženija prema K562 tumorskim ćelijama. Stepent aktivnosti se smanjuje kada su kao ciljne ćelije korišćene HeLa, Fem-x, PMBC i stimulisane PMBC. Na Slici 34 su prikazani grafici preživljavanja HeLa, Fem-x, K562 ćelija, kao i normalnih i stimulisanih PMBC ćelija nakon 72 h ćelijskog rasta u prisustvu ispitivanih supstanci.

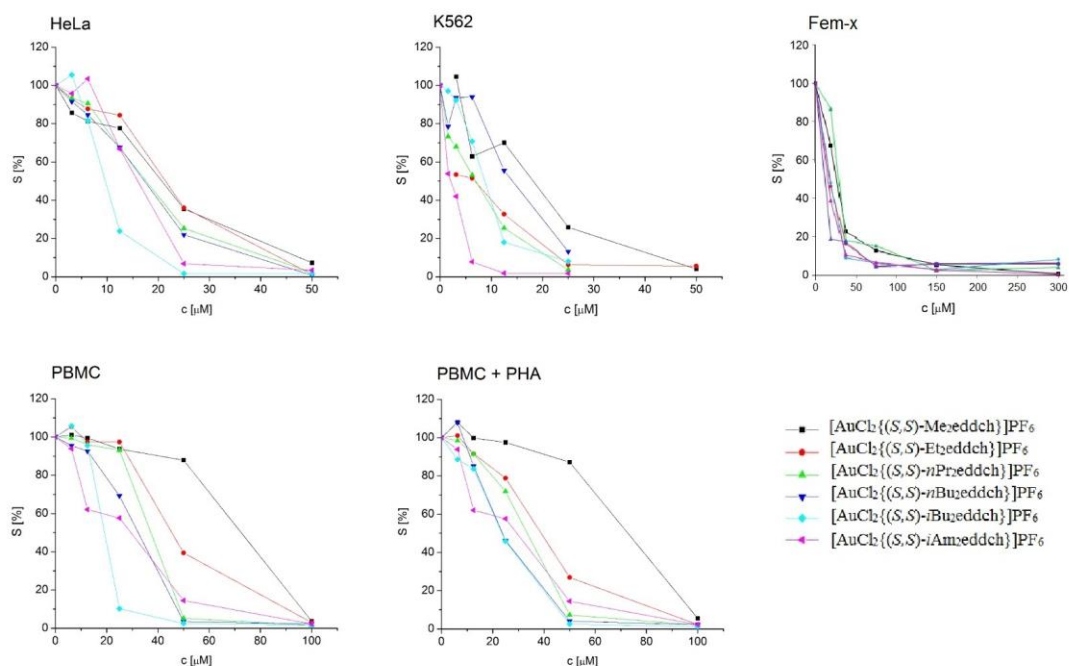
Kada se metil grupa zameni etil grupom u estarskom ostatku, dolazi do povećanja citotoksične aktivnosti kompleksa prema svim ćelijskim linijama. Supstitucija etil grupe sa *n*-propil grupom ne dovodi do značajnog povećanja aktivnosti kompleksa prema sve tri maligne ćelijske linije, kao ni kod PMBC i stimulisanih PMBC ćelija. Zamena *n*-propil grupa *n*-butil ili *i*-butil grupom dovodi do slične citotoksične akcije. Kompleksi $[AuCl_2\{(S,S)-Et_2eddch\}]PF_6$, $[AuCl_2\{(S,S)-nBu_2eddch\}]PF_6$ i $[AuCl_2\{(S,S)-iBu_2eddch\}]PF_6$ pokazuju najveću aktivnost prema HeLa ćelijskoj liniji koja je uporediva sa aktivnošću kompleksa platine(IV), $[PtCl_4(nBu_2eddp)]$ [47]. Sa druge strane isti kompleksi pokazuju veću antiproliferativnu aktivnost prema K562 ćelijama u odnosu na HeLa ćelijsku liniju. I u ovom slučaju citotoksična aktivnost ovih kompleksa je uporediva sa $[PtCl_4(nBu_2eddp)]$. Najslabiju aktivnost kompleksi pokazuju prema Fem-x ćelijskoj liniji. Ono što je interesantno, kompleks $[AuCl_2\{(S,S)-iAm_2eddch\}]PF_6$ je neaktivan prema HeLa ćelijama ali se pokazalo da ima najveću aktivnost prema K562 i Fem-x ćelijskim linijama od svih kompleksa zlata(III) iz ove serije. Ovaj kompleks je, prema K562 ćelijama, aktivniji i od referentne supstance, cisplatine.

Tabela 11. $IC_{50}[\mu M]^a$ za 72 h dejstva ispitivanih supstanci, kao i $[PtCl_4(nBu_2eddp)]$ i cisplatinu prema HeLa, K562, Fem-x tumorskim ćelijama i prema normalnim PBMC i PBMC + PHA ćelijskim linijama određenih MTT testom.

Kompleks	$IC_{50}[\mu M]$				
	HeLa	K562	Fem-x	PBMC	PBMC+PHA
$[AuCl_2\{(S,S)\text{-}Me_2eddc\}]PF_6$	$29,03 \pm 4,22$	$15,03 \pm 4,44$	$23,67 \pm 2,44$	$76,07 \pm 5,16$	$61,40 \pm 10,76$
$[AuCl_2\{(S,S)\text{-}Et_2eddc\}]PF_6$	$16,76 \pm 4,31$	$8,35 \pm 2,27$	$25,16 \pm 2,75$	$42,47 \pm 4,18$	$24,39 \pm 3,46$
$[AuCl_2\{(S,S)\text{-}nPr_2eddc\}]PF_6$	$20,34 \pm 4,02$	$7,77 \pm 2,04$	$28,28 \pm 1,24$	$37,77 \pm 2,26$	$31,04 \pm 2,18$
$[AuCl_2\{(S,S)\text{-}nBu_2eddc\}]PF_6$	$16,97 \pm 1,09$	$12,05 \pm 1,92$	$19,77 \pm 1,95$	$23,42 \pm 1,96$	$21,30 \pm 3,49$
$[AuCl_2\{(S,S)\text{-}iBu_2eddc\}]PF_6$	$17,74 \pm 2,79$	$10,73 \pm 2,07$	$21,36 \pm 1,62$	$31,00 \pm 8,78$	$21,94 \pm 2,73$
$[AuCl_2\{(S,S)\text{-}iAm_2eddc\}]PF_6$	$26,35 \pm 3,88$	$3,76 \pm 0,55$	$14,18 \pm 0,34$	$29,35 \pm 13,17$	$21,31 \pm 9,34$
$[PtCl_4(nBu_2eddp)]$ [47]	$14,88 \pm 2,36$	$7,08 \pm 2,00$	n.o.	$14,49 \pm 5,84$	$10,56 \pm 4,45$
cisplatina	$4,47 \pm 0,30$	$5,77 \pm 0,35$	$5,51 \pm 0,31$	33,60	$26,51 \pm 5,74$

^aSrednja vrednost \pm SD za tri eksperimenta.

n.o. - nije određeno



Slika 34. Reprezentativni grafici preživljavanja HeLa, Fem-x, K562 ćelija, kao i normalnih PBMC i stimuliranih PBMC+PHA ćelija nakon 72h ćelijskog rasta u prisustvu ispitivanih supstanci.

4.7.4. Selektivnost ispitivanih jedinjenja

Indeks selektivnosti svih ispitivanih kompleksa iz serije $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}\}]\text{PF}_6$ prema humanim MRC-5 ćelijama pokazuje da su kompleksi manje toksični od cisplatine i da nemaju značajnu citotoksičnu aktivnost na normale ćelije MRC-5 (Tabela 12). Selektivnost ovih kompleksa je znatno veća od cisplatine i sličnih platina(II/IV) kompleksa [43]. Najaktivniji kompleks, $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iAm}_2\text{eddch}}\}]\text{PF}_6$, prema Fem-x tumorskoj ćelijskoj liniji je ujedno i najselektivniji. Ovaj kompleks je 4 puta aktivniji i ima 28 puta bolju selektivnost u odnosu na cisplatinu. Izuzetni rezultati ukazuju da je ovaj kompleks obećavajući kandidat za dalje faze ispitivanja *in vitro* i/ili *in vivo*.

Tabela 12. Indeks selektivnost kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}\}]\text{PF}_6$

Kompleks	IC ₅₀ (MRC-5)/IC ₅₀ (ćelijska linija)		
	HeLa	Fem-x	K562
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-nPr}_2\text{eddip}}\}]\text{PF}_6$	11,18 ± 0,91	11,52 ± 1,83	7,79 ± 0,96
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-nBu}_2\text{eddip}}\}]\text{PF}_6$	52,46 ± 3,59	60,76 ± 3,50	58,25 ± 33,34
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iBu}_2\text{eddip}}\}]\text{PF}_6$	28,53 ± 11,63	31,89 ± 6,31	12,87 ± 1,26
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iAm}_2\text{eddip}}\}]\text{PF}_6$	45,74 ± 16,26	72,50 ± 12,42	19,54 ± 0,68
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-cPe}_2\text{eddip}}\}]\text{PF}_6$	35,78 ± 14,01	39,20 ± 6,18	22,88 ± 2,94
Cisplatina	6,77 ± 0,98	2,58 ± 0,31	2,56 ± 0,55

Svi sintetisani kompleksi iz serije $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddl}}\}]\text{PF}_6$ pokazuju veću selektivnost prema K562 ćelijama od cisplatine (Tabela 13). Kompleks $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-nBu}_2\text{eddl}}\}]\text{PF}_6$ je najselektivniji iz ove serije zlato(III) kompleksa, prema svim ispitivanim tumorskim ćelijama. Međutim, ovi kompleksi pokazuju znatno veću toksičnost u odnosu na komplekse zlata(III) sa (S,S)-R₂eddip ligandima.

Tabela 13. Indeks selektivnosti kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$

Kompleks	$\text{IC}_{50}(\text{MRC-5})/\text{IC}_{50}(\text{ćelijska linija})$		
	HeLa	Fem-x	K562
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$	$1,37 \pm 0,18$	$1,23 \pm 0,23$	$3,82 \pm 3,20$
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$	$2,09 \pm 0,49$	$2,09 \pm 1,00$	$4,22 \pm 2,44$
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$	$1,58 \pm 0,30$	$1,60 \pm 0,79$	$3,28 \pm 0,84$
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$	$1,83 \pm 0,23$	$1,33 \pm 0,22$	$3,42 \pm 1,54$
cisplatina	$6,77 \pm 0,98$	$2,58 \pm 0,31$	$2,56 \pm 0,55$

Kompleksi zlata(III) sa $(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}$ ligandima su pokazali približno sličnu selektivnost prema PBMC i stimulisanim PBMC ćelijama (Tabela 14). Veću selektivnost kompleksi su pokazali u odnosu na K562 ćelije. Najaktivnije jedinjenje $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$ na K562 je ujedno i najselektivnije. Takođe, primećeno je da i kompleksi $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-Me}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$ i $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-Et}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$ sa kraćim estarskim lancem ($R = \text{Me}, \text{Et}$), pokazuju znatnu selektivnost prema K562 ćelijskoj liniji.

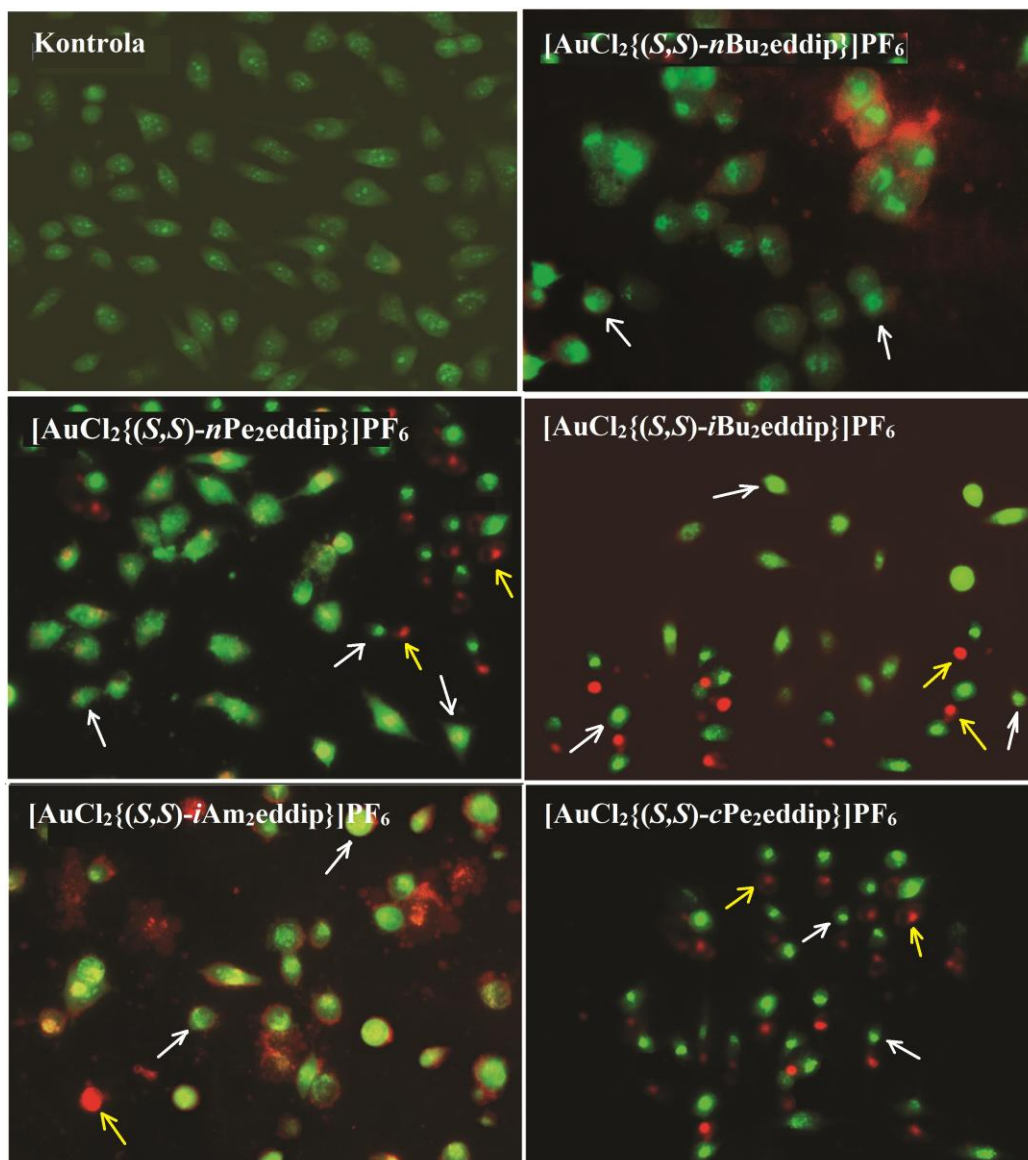
Tabela 14. Indeks selektivnost kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.

Kompleks	$\text{IC}_{50}(\text{PBMC})/\text{IC}_{50}(\text{ćelijska linija})$			$\text{IC}_{50}(\text{PBMC+PHA})/\text{IC}_{50}(\text{ćelijska linija})$		
	HeLa	K562	Fem-x	HeLa	K562	Fem-x
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-Me}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$	$2,62 \pm 0,42$	$5,06 \pm 1,53$	$3,21 \pm 0,40$	$2,11 \pm 0,48$	$4,09 \pm 1,41$	$2,59 \pm 0,65$
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-Et}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$	$2,53 \pm 0,70$	$5,09 \pm 0,29$	$1,69 \pm 0,26$	$1,46 \pm 0,43$	$2,92 \pm 0,89$	$0,97 \pm 0,31$
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$	$1,86 \pm 0,83$	$4,86 \pm 1,31$	$1,34 \pm 0,10$	$1,53 \pm 0,32$	$3,99 \pm 1,08$	$1,09 \pm 0,11$
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$	$1,38 \pm 0,14$	$1,94 \pm 0,35$	$1,18 \pm 0,15$	$1,26 \pm 0,22$	$1,77 \pm 0,40$	$1,08 \pm 0,23$
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$	$1,75 \pm 1,83$	$2,89 \pm 0,99$	$1,45 \pm 0,43$	$1,24 \pm 0,25$	$2,04 \pm 0,47$	$1,03 \pm 0,21$
$[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$	$1,11 \pm 0,23$	$7,81 \pm 3,68$	$2,07 \pm 0,93$	$0,81 \pm 0,37$	$5,67 \pm 2,62$	$1,50 \pm 0,91$
$[\text{PtCl}_4(n\text{Bu}_2\text{eddp})]$	$0,97 \pm 0,39$	$2,05 \pm 0,96$	–	$0,71 \pm 0,32$	$1,49 \pm 0,76$	–
cisplatina	7,52	5,82	6,09	$5,93 \pm 1,35$	$4,59 \pm 1,03$	$4,81 \pm 1,08$

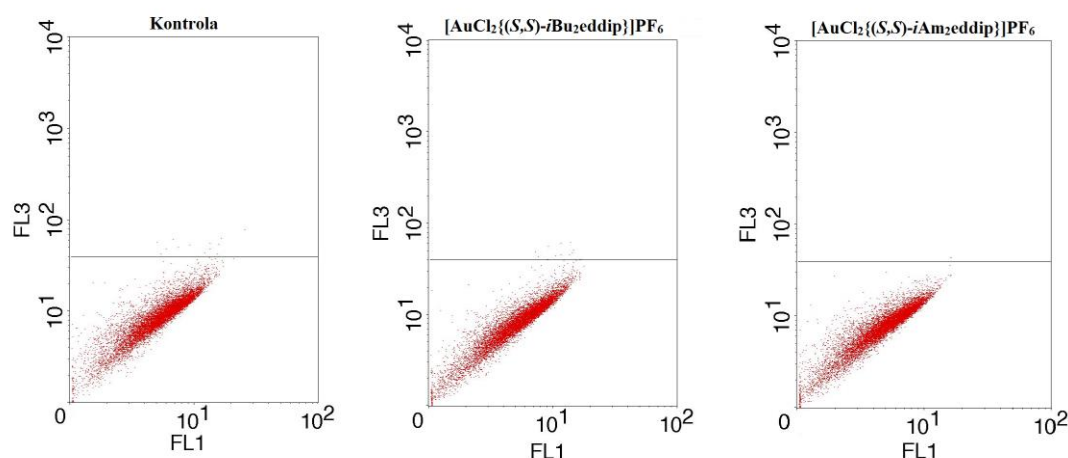
4.7.5. Morfologija smrti HeLa ćelija

Rezultati fluorescentnog mikroskopa AO-EB obojenih HeLa tumorskih ćelija, koje su prethodno tretirane ispitivanim kompleksima $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ ($\text{R} = n\text{Pr}, n\text{Bu}, i\text{Bu}, i\text{Pe}, c\text{Pe}$) i $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}}]\text{PF}_6$ ($\text{R} = \text{Me}, \text{Et}, n\text{Pr}, n\text{Bu}, i\text{Bu}, i\text{Am}$), tokom 24 h u koncentracijama dvostruko većim od IC_{50} vrednosti za 72 h dejstva su date na Slikama 35 i 37.

Kod prve serije kompleksa zlata(III) sa $(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}$ ligandima mikrofotografije AO-EB obojenih ćelija ukazuju na mogućnost apoptoze tokom tretiranja HeLa ćelija (Slika 35). Nakon 24-časovnog tretmana ćelija sa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ ($\text{R} = n\text{Bu}, n\text{Pe}, i\text{Bu}, i\text{Am}, c\text{Pe}$), primećuje se zaokrugljivanje ćelija i kondenzacija hromatina. Kasna apoptoza je uočena pojavom crvenkasto-narandžaste boje zbog vezivanja AO za denaturisani DNK (Slika 35). S obzirom da ćelije, nakon tretmana sa kompleksima $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$, $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ ili $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$, pokazuju znake koji mogu biti povezani sa autofagijom, urađeni su dodatni testovi da bi se utvrdilo da li se proces autofagije aktivira nakon tretiranja HeLa ćelija kompleksima. Protočna citometrijska analiza je pokazala da nije došlo do izazivanja autofagije nakon tretmana ćelija kompleksima $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ i $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ (Slika 36).

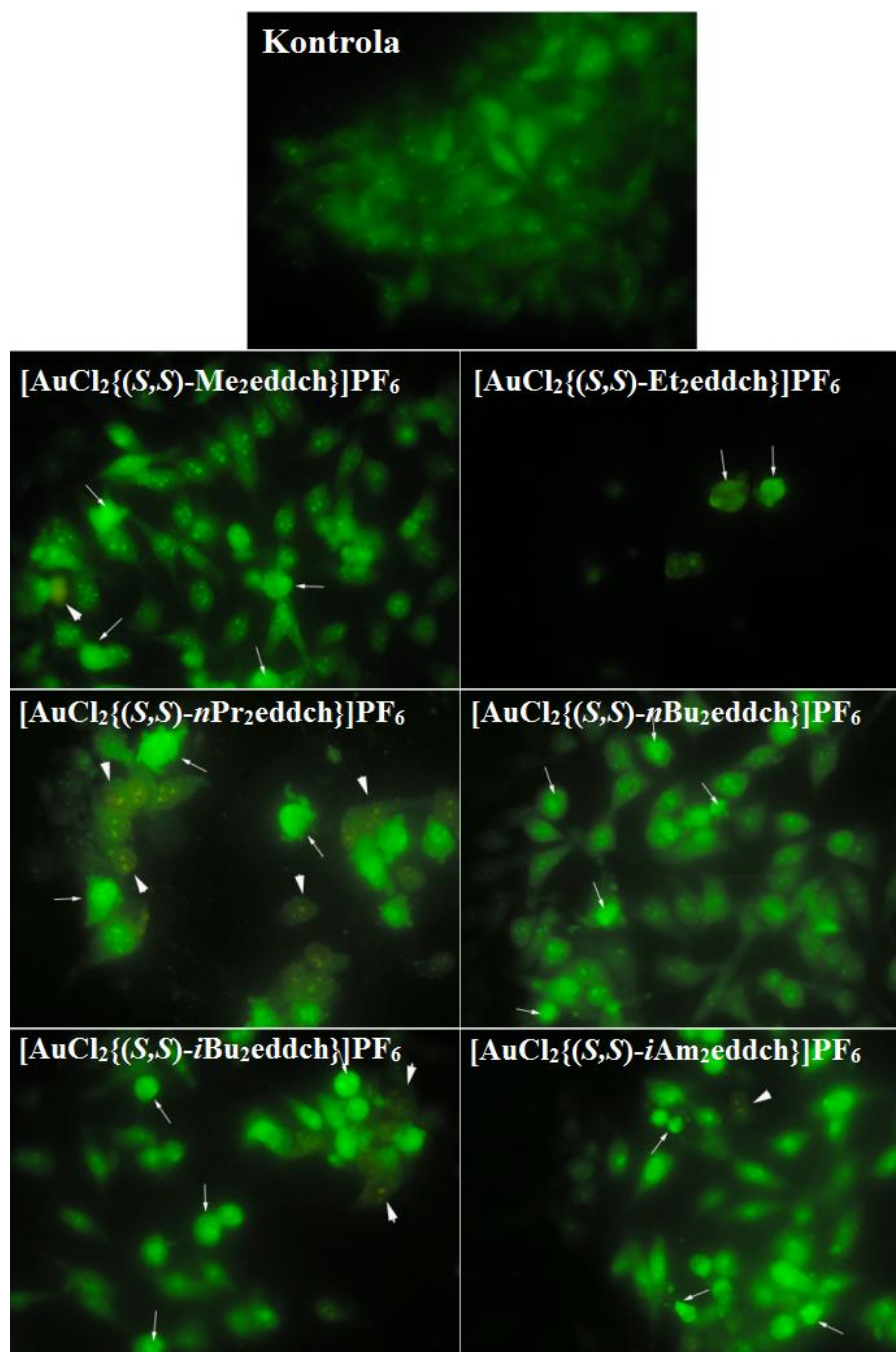


Slika 35. Mikrofotografije AO-EB obojene HeLa ćelije tretirane kompleksima $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ 24 h.



Slika 36. Ispitivanje prisustva autofagije izlaganjem HeLa ćelija kompleksima $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ ($R = i\text{Bu}, i\text{Am}$) tokom 48 h.

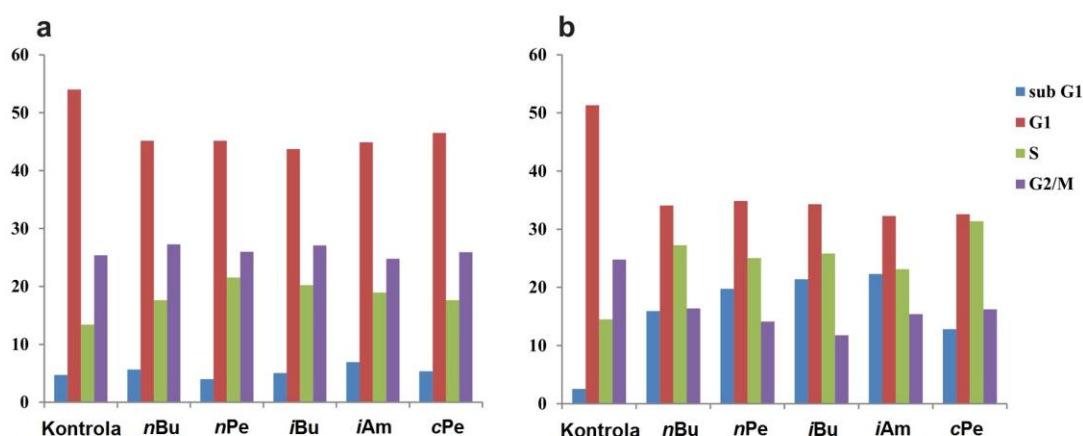
Kod kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}}]\text{PF}_6$, kada je $R = \text{Me}$, kompleks ne pokazuje značajnu promenu morfologije HeLa ćelija. Mikrofotografije HeLa ćelija nakon tretmana zlato(III) kompleksa sa R_2eddch ($R = \text{Et}, n\text{Pr}, n\text{Bu}, i\text{Bu}, i\text{Am}$) pokazuju apoptozu koja se može prepoznati kondenzacijom hromatina (Slika 37). U slučaju kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-Et}_2\text{eddch}}]\text{PF}_6$ postoje znaci rane apoptoze koji se manifestuju zaokrugljivanjem ćelija. Bubrenje ćelijske membrane, isto karakteristično za ranu apoptozu, može se videti na HeLa ćelijama nakon tretmana kompleksom $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddch}}]\text{PF}_6$.



Slika 37. Mikrofotografije EB-AO obojene HeLa ćelije nakon tretmana kompleksima $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$ 24 h.

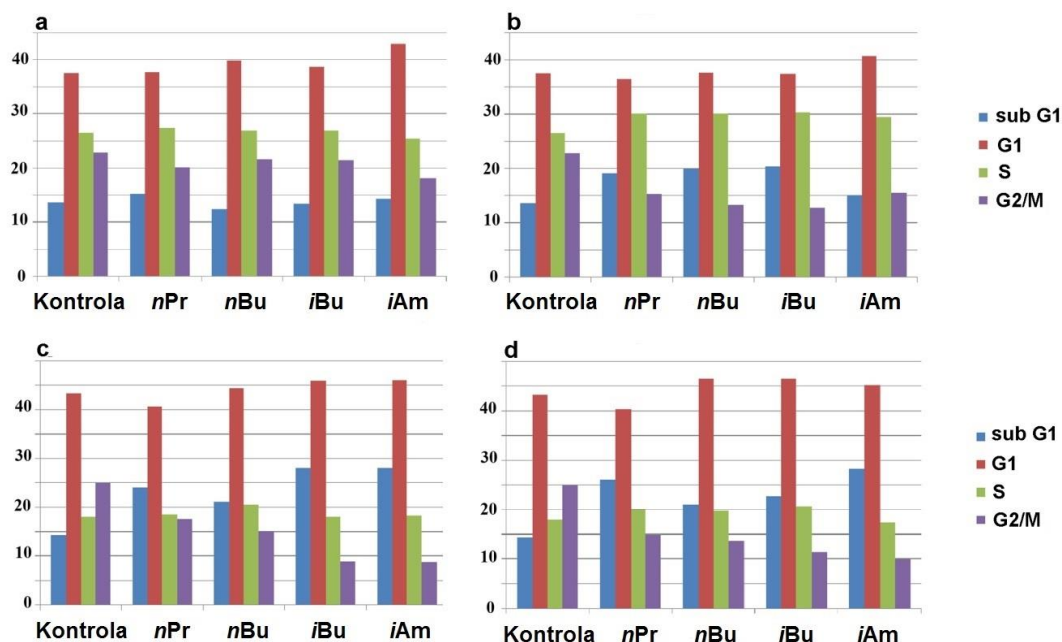
4.7.6. Ćelijski ciklus

Da bi se dalje ispitao mehanizam delovanja $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ ($\text{R} = n\text{Pr}, n\text{Bu}, i\text{Bu}, i\text{Am}, c\text{Pe}$), analiziran je efekat ovih jedinjenja na distribuciju ćelijskog ciklusa na HeLa ćelijama. Ćelijski ciklus je procenjivan citofluorometrijskom analizom, koristeći propidijum-jodid (PI) za obeležavanje DNK (Slika 38). Analiza nije pokazala značajno povećanje broja ćelija u Sub-G1 fazi i shodno tome, ne postoji značajna razlika u distribuciji ćelijskog ciklusa nakon 24-časovnog neprekidnog delovanja. Inkubacija HeLa ćelija sa kompleksima ($\text{R} = n\text{Pr}, n\text{Bu}, i\text{Bu}, i\text{Am}, c\text{Pe}$) (Slika 38), indukuje veoma blagu akumulaciju ćelija u S fazi. Sa druge strane, 48-časovni tretman dovodi do nagomilavanja značajnog broja ćelija u Sub-G1 i S fazi. Ovi rezultati ukazuju da posmatrani rast inhibirajućeg efekta ispitivanih jedinjenja može biti posledica zaustavljanja ćelijskog ciklusa i da je praćen smanjenjem ćelija u G2/M fazi tokom ispitivanog vremenskog intervala (Slika 38). Takođe, rezultati jasno pokazuju da bi ispitivani kompleksi mogli da deluju kao inhibitori ulaska ćelija u mitozu.



Slika 38. Distribucija ćelijskog ciklusa na HeLa ćelijama nakon 24 (a) i 48 h (b) kontinuiranog delovanja $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-R}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ ($\text{R} = n\text{Bu}, n\text{Pe}, i\text{Bu}, i\text{Am}, c\text{Pe}$). Koncentracije kompleksa odgovaraju IC_{50} (a) i $2 \times \text{IC}_{50}$ (b) vrednostima.

Efekat kompleksa zlata(III) sa (*S,S*)-R₂eddch ligandima (R = *nPr*, *nBu*, *iBu*, *iAm*) na progresiju ćelijskog ciklusa je ispitivan na K562 ćelijama. Kompleksi iz ove serije gde je R = Me i Et su izostavljeni jer ne pokazuju značajnu aktivnost na ovoj ćelijskoj liniji. Kao što se vidi na Slici 39, broj ćelija K562 u G1 fazi se ne menja značajno nakon izlaganja pomenutim kompleksima zlata(III) tokom 24 i 48 h. Takođe, ovi kompleksi nisu značajno uticali na ćelije pri koncentraciji koja odgovara IC₅₀ i dvostruko većim vrednostima, u S fazi, u bilo kom ispitivanom periodu. Sličan efekat ovih supstanci je posmatran u Sub-G1 frakciji nakon 24 h pri koncentraciji koje odgovaraju IC₅₀ vrednostima. Sa druge strane, nakon 24-časovnog izlaganja ćelija K562 pri koncentraciji 2×IC₅₀ vrednostima, broj ćelija u Sub-G1 frakciji se povećao. Veći efekat na Sub-G1 frakciju je primećen nakon 48-časovnog tretiranja ovim jedinjenjima. Shodno tome, smanjivanje populacije ćelija u G2/M fazi ćelijskog ciklusa je primećeno u poređenju sa kontrolnim ćelijama. Ovi rezultati pokazuju da ispitivani kompleksi inhibiraju ulazak ćelija u mitozu i prouzrokuju ćelijsku smrt.



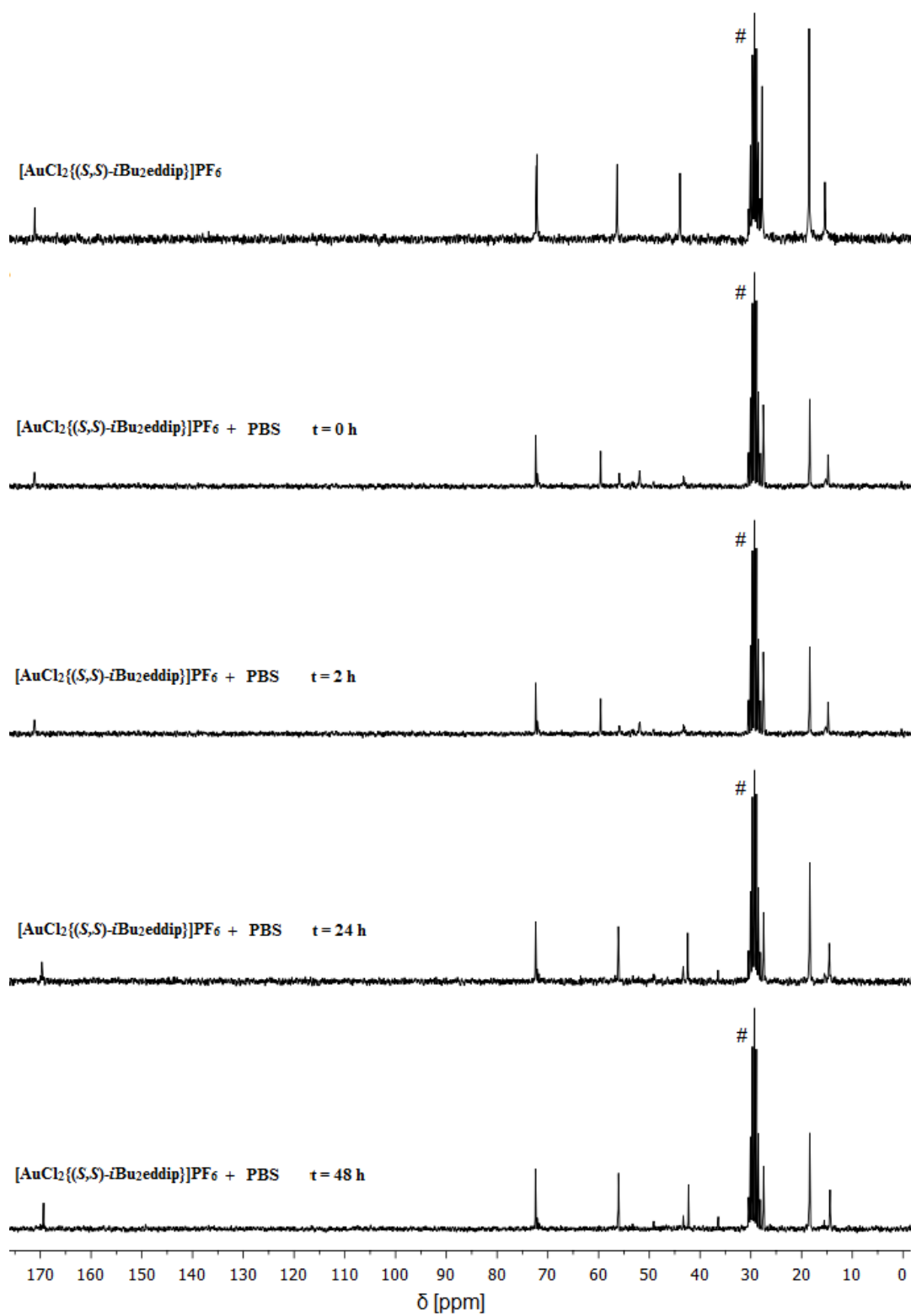
Slika 39. Distribucija ćelijskog ciklusa na K562 ćelijama nakon 24 (a, b) i 48 h (c, d) kontinuiranog delovanja [AuCl₂{(*S,S*)-R₂eddch}]PF₆ (R = *nPr*, *nBu*, *iBu*, *iAm*). Koncentracije kompleksa odgovaraju IC₅₀ (a, c) i 2×IC₅₀ (b, d) vrednostima.

4.8. Stabilnost i reaktivnost kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$

4.8.1. Stabilnost kompleksa u DMSO-u i PBS-u

Stabilnost kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ praćena je pomoću UV/Vis i NMR spektroskopije [159–161]. Kompleks je ispitan u DMSO-u i fiziološkom medijumu (PBS, pH 7,4). UV/Vis spektar kompleksa u DMSO-u odgovara spektru kompleksa snimljenog u CHCl_3 i nema značajne promene apsorpcionog maksimuma u toku 24h.

Određivanje stabilnosti kompleksa u fiziološkim uslovima obuhvatalo je snimanje ^{13}C NMR spektara tokom vremena od 0 do 48 h, ^1H NMR nije razmatran zbog velikog i širokog signala vode koji potice od PBS-a i koji pokriva deo ^1H NMR spektra sa karakterističnim hemijskim pomeranjima za ovu klasu zlato(III) kompleksa. Kao što se može videti na Slici 40, dodavanje PBS-a (0 h), prouzrokuje koordinacione promene kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ tako da verovatno dolazi do koordinacije vode zamenom mesta sa hlorido ligandima, pri čemu nastaju vrste $[\text{AuCl}(\text{H}_2\text{O})\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}}]^{2+}$ ili $[\text{Au}(\text{H}_2\text{O})_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}}]^{3+}$ [162].

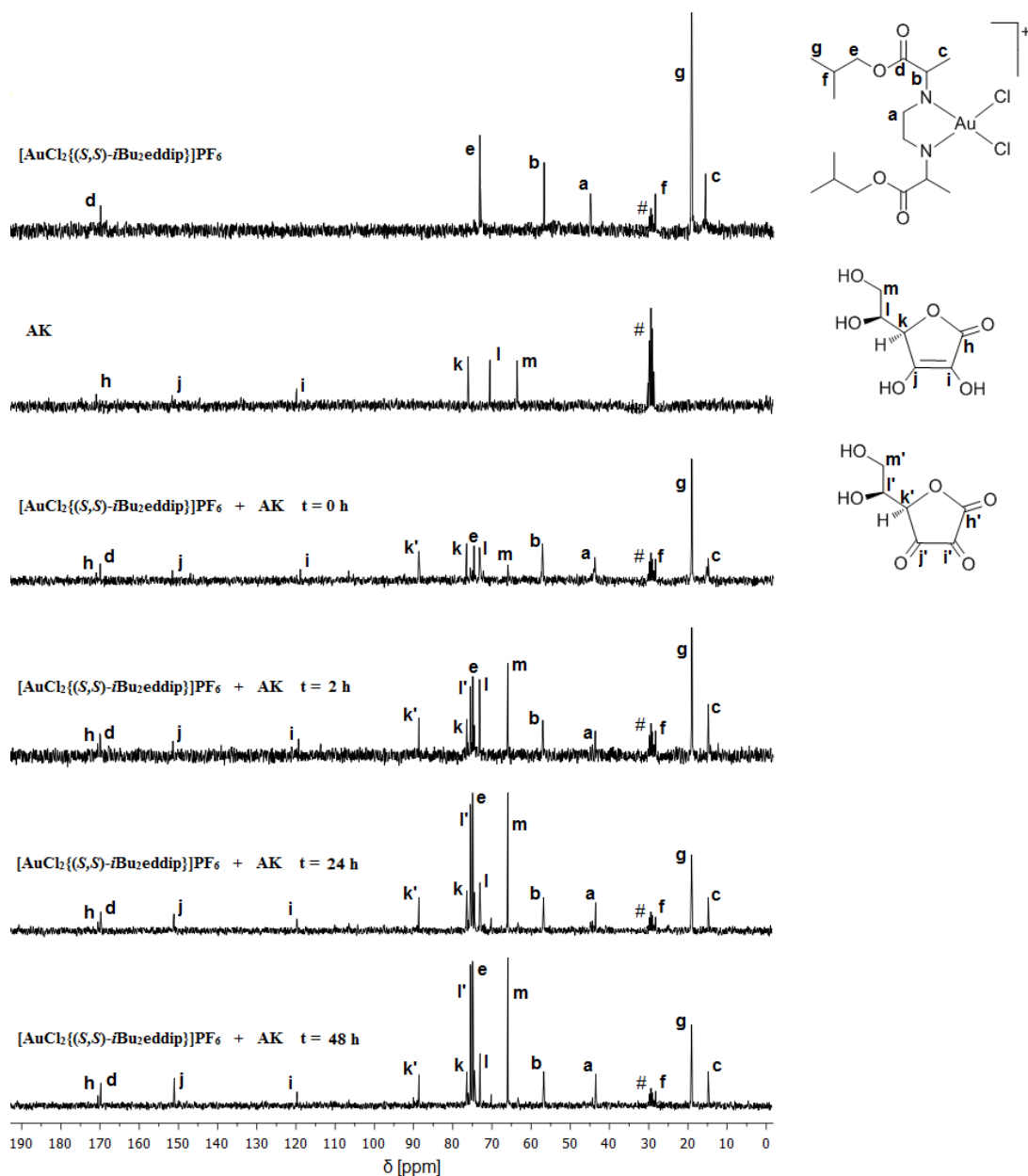


Slika 40. Stabilnost $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$ u PBS-u praćeno ^{13}C NMR spektroskopijom tokom vremena ($\#$ - rastvarač).

4.8.2. Redukcija kompleksa $[AuCl_2\{(S,S)\text{-}iBu_2\text{eddip}\}]PF_6$ sa askorbinskom kiselinom

Ćelijske redukujuće supstance kao što su askorbinska kiselina i supstance koje sadrže tiol grupe (metalotionini i glutation) mogu se smatrati aktivatorima zlato(III) prolekova [122,123,163]. Glutation (γ -glutamil-cisteil-glicin) je tripeptid koji se u skoro svim ćelijama nalazi u visokim koncentracijama. U prisustvu oksidansa redukovani oblik glutaciona (GHS) prelazi u oksidovani oblik (GSSG).

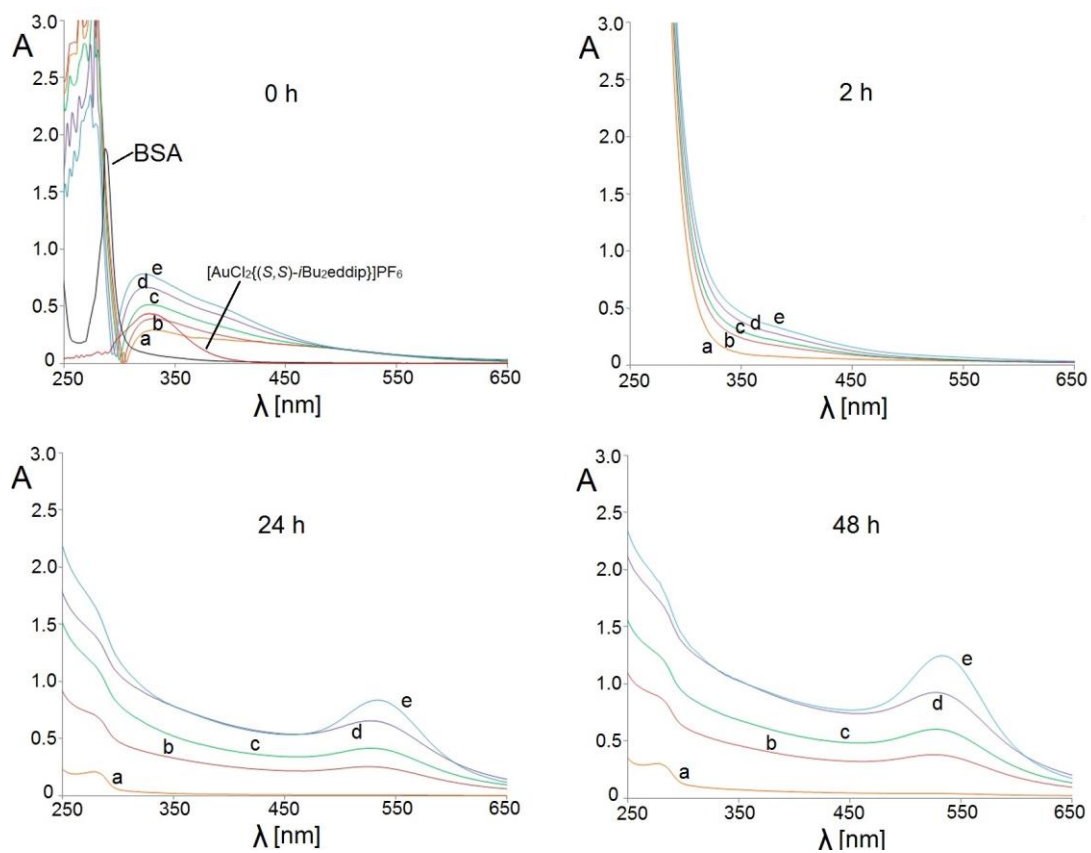
U cilju ispitivanja mogućnosti da se kompleks zlata(III) redukuje u ćeliji sa biološki relevantnim reducentom, praćena je reakcija kompleksa $[AuCl_2\{(S,S)\text{-}iBu_2\text{eddip}\}]PF_6$ sa askorbinskom kiselinom uz pomoć ^{13}C NMR spektroskopije. Kompleks $[AuCl_2\{(S,S)\text{-}iBu_2\text{eddip}\}]PF_6$ je rastvoren u acetonu- d_6 i ^{13}C NMR spektri snimljeni su pre i nakon dodavanja (0, 2, 24 i 48 h) askorbinske kiseline u molskom odnosu 1:12. Askorbinska kiselina je vrlo jako redukciono sredstvo tako da u prisustvu zlata(III) vrste prelazi iz redukovanog u oksidovani oblik pri čemu se zlato(III) redukuje do zlata(I) vrste. Kao što se može videti na Slici 41, askorbinska kiselina redukuje kompleks zlata(III) trenutno što ukazuje na visoku mogućnost istog ishoda u živim ćelijama.



Slika 41. Reakcija kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-iBu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$ sa askorbinskom kiselinom (AK) praćeno ^{13}C NMR spektroskopijom ($\#$ rastvarač).

4.8.3. Interakcija kompleksa $[AuCl_2\{(S,S)\text{-}iBu_2eddip\}]PF_6$ sa goveđim serum albuminom (BSA)

Literaturni podaci govore da zlato(III) kompleksi imaju veliki afinitet prema proteinima i da bi zlato-protein interakcije mogle da budu odgovorne za citotoksični efekat ovih jedinjenja. Joni metala se vezuju za albumin preko histidinskih i/ili cisteinskih ostataka formirajući metal-BSA adukt [164,165]. Pronađeno je i da jedinjenja zlata(III) reaguju sa S donorima iz metionina i Cys34 ostacima albumina [166]. Interakcija kompleksa $[AuCl_2\{(S,S)\text{-}iBu_2eddip\}]PF_6$ sa goveđim serum albuminom (BSA) praćena je UV/Vis spektrometrijom (Slika 42) da bi se ispitalo da li i kompleksi zlata(III) iz ove klase jedinjenja imaju očekivani afinitet prema proteinima. Albumin je izabran jer se nalazi u visokoj koncentraciji u krvnoj plazmi. Prema Espósito-u i saradnicima, na osnovu ispitivanja kompleksa $[AuCl_3(Hpm)]$ i $[AuCl_2(pm)]$ ($pm = 2\text{-}piridilmetanol$) [166], pretpostavlja se da se $[AuCl_2\{(S,S)\text{-}iBu_2eddip\}]^+$ redukuje cisteinom do odgovarajućeg zlato(I) kompleksa, što nakon 2 sata reakcije dovodi do nestanka apsorpcionog maksimuma na oko 320 nm, koji je po LMCT karakterističan za ispitivani kompleks zlata(III) (Slika 42). Nakon 24 i 48 h, UV/Vis spektri ukazuju da se nastali zlato(I) kompleks verovatno disproportionise do odgovarajućeg zlato(III) kompleksa i elementalnog zlata [176]. U skladu sa dosadašnjim istraživanjima opisanim u literaturi, ispitivani kompleks reaguje na sličan način kao $[Au(en)Cl_2]^+$. Pojava apsorpcione trake na 540 nm ukazuje na formiranje koloidnog zlata [168], što potvrđuje pretpostavljeni mehanizam.



Slika 42. Interakcija kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-iBu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$ sa BSA praćena UV/Vis spektrometrijom tokom vremena. Koncentracije kompleksa: 1×10^{-3} mol/dm³; a–e: 1×10^{-4} , 2×10^{-4} , 3×10^{-4} , 4×10^{-4} , 5×10^{-4} mol/dm³, redom; BSA: 4×10^{-4} mol/dm³.

5. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji opisane su sinteze, karakterizacija i antiproliferativna aktivnost kompleksa zlata(III) sa estrima (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-propanske kiseline, (*S,S*)-H₂eddip, (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(4-metil)-pentanske kiseline, (*S,S*)-H₂eddl, i (*S,S*)-etilendiamin-*N,N'*-di-2-(3-cikloheksil)-propanske kiseline, (*S,S*)-H₂eddch.

Sintetisan je novi diizoamil ester sa (*S,S*)-H₂eddip kao i pet kompleksa sa (*S,S*)-R₂eddip ligandima: [AuCl₂{(*S,S*)-*n*Pr₂eddip}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*n*Bu₂eddip}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*i*Bu₂eddip}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*i*Am₂eddip}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*c*Pe₂eddip}]PF₆, četiri kompleksa zlata(III) sa (*S,S*)-R₂eddl ligandima: [AuCl₂{(*S,S*)-*n*Pr₂eddl}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*n*Bu₂eddl}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*n*Pe₂eddl}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*i*Bu₂eddl}]PF₆ i šest kompleksa zlata(III) sa (*S,S*)-R₂eddch ligandima: [AuCl₂{(*S,S*)-Me₂eddch}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-Et₂eddch}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*n*Pr₂eddch}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*n*Bu₂eddch}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*i*Bu₂eddch}]PF₆, [AuCl₂{(*S,S*)-*i*Am₂eddch}]PF₆.

Sintetisana jedinjenja okarakterisana su elementalnom analizom, UV/Vis, infracrvenom i NMR spektroskopijom i masenom spektrometrijom. Za komplekse iz serije [AuCl₂{(*S,S*)-R₂eddch}]PF₆ i [AuCl₂{(*S,S*)-R₂eddip}]PF₆ izvršena su elektrohemijska ispitivanja cikličnom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom, a za sve sintetisane komplekse urađeni su DFT proračuni.

Na osnovu ovih analiza potvrđeno je sledeće:

1. Rezultati elementalnih analiza su u saglasnosti sa pretpostavljenom stehiometrijom jedinjenja.
2. Infracrveni spektri upućuju na bidentatnu koordinaciju preko azotovih atoma za centralni metalni jon.
3. Apsorpcioni maksimumi u elektronskim spektrima sintetisanih kompleksa potiču od Cl→Au prelaza.
4. NMR spektri su takođe u saglasnosti sa strukturama svih jedinjenja. Na svim spektrima kompleksa primećuje se pomeranje signala metilenskih protona etilendiamiskog dela molekula prema nižem magnetnom polju

(u odnosu na hemijska pomeranja liganad prekursora), što ukazuje na bidentatnu koordinaciju preko azotovih atoma. U slučaju kompleksa zlata(III) sa (S,S)-R₂eddl ligandima mogu se primetiti po dva seta signala, što ukazuje na formiranje diastereoizomera usled nastajanja novih stereocentara na azotovim atomima. Kod svih ostalih kompleksa zlata(III) primećen je jedan set signala.

5. Molekulski joni detektovani u masenim spektrima dodatno ukazuju na pretpostavljene strukture sintetisanih jedinjenja.
6. Cikličnom i diferencijalnom pulsnom voltametrijom utvrđeno je da se redukcija zlato(III) kompleksa vrši do zlato(I) vrste, u vidu dva ireverzibilna elektronska koraka, praćena gubitkom hlorido liganda. Pojava redukcionog koraka Au^{III}/Au⁰ se isključuje zbog izostanka elementalnog zlata na platinskoj elektrodi što je potvrđeno nakon redukcije pri konstantnom potencijalu od -0,8 V (vs. Ag/AgCl) u trajanju od 15 minuta.

In vitro antitumorska aktivnost određena je za sve sintetisane komplekse prema tumorskim ćelijama humanog adenokarcinoma materice HeLa, humanog malignog melanoma Fem-x, humane mijeloidne leukemije K562, kao i na zdravim humanim mononuklearnim ćelijama, izolovanim iz periferne krvi (PBMC), kao i na stimulisanim na proliferaciju PBMC ćelijama (PBMC + PHA) ili ćelijama fetalnog plućnog fibroblasta (MRC-5). Svi kompleksi iz serije [AuCl₂{(S,S)-R₂eddl}]PF₆ pokazuju visoku citotoksičnu aktivnost prema svim ispitivanim ćelijskim linijama, a najveću prema Fem-x ćelijama. Najnižu IC₅₀ vrednost prema Fem-x ćelijama pokazuje kompleks [AuCl₂{(S,S)-iAm₂eddl}]PF₆, ali istovremeno i najvišu prema HeLa i K562 ćelijskim linijama. Indeks selektivnosti ovih kompleksa pokazuje da su manje toksični i znatno selektivniji od cisplatine. Posebno treba istaći da je kompleks [AuCl₂{(S,S)-iAm₂eddl}]PF₆ 4 puta aktivniji i 28 puta selektivniji od cisplatine. Kompleksi iz serije [AuCl₂{(S,S)-R₂eddl}]PF₆ pokazuju najveću aktivnost prema K562 ćelijama koja je uporediva sa cisplatinom. Iz serije [AuCl₂{(S,S)-R₂eddl}]PF₆, najaktivniji je kompleks kada je R = iAm prema K562 ćelijama koji je aktivniji i od referentne supstance, cisplatine, ali je umereno aktivan prema HeLa ćelijskoj liniji. Ovaj kompleks je ujedno i najselektivniji.

Kod kompleksa zlata(III) sa (*S,S*)-R₂eddip ligandima mikrofotografije AO/EB obojenih ćelija ukazuju na mogućnost apoptoze tokom tretiranja HeLa ćelija. Protočna citometrijska analiza je pokazala da nije došlo do izazivanja autofagije nakon tretiranja ćelija kompleksima. Sumnja da [AuCl₂{(*S,S*)-*i*Am₂eddip}]PF₆ kompleks uzrokuje autofagiju isključena je na osnovu protočne citometrijske analize. Kompleksi [AuCl₂{(*S,S*)-R₂eddch}]PF₆ ne utiču značajno na promenu morfologije HeLa ćelija. Mikrofotografije HeLa ćelija nakon tretiranja ovim kompleksa pokazuju apoptozu koja se može prepoznati kondenzacijom hromatina. Takođe, rezultati ćelijskog ciklusa pokazuju da ispitivani kompleksi inhibiraju ulazak ćelija u mitozu i prouzrokuju ćelijsku smrt.

Ispitivanje stabilnosti kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*i*Bu₂eddip}]PF₆ u DMSO-u i fiziološkom medijumu (PBS, pH 7,4) pomoću UV/Vis i ¹³C NMR spektroskopije pokazuje da je kompleks stabilan u DMSO-u tokom 24-časovnog (UV/Vis spektroskopija), dok ispitivanja u prisustvu PBS-a (¹³C NMR spektroskopija) pokazuju koordinacione promene koji ukazuju na vrlo verovatnu supstituciju hlorido liganada molekulima vode pri čemu nastaju [AuCl(H₂O){(*S,S*)-*i*Bu₂eddip}]²⁺ ili [Au(H₂O)₂{(*S,S*)-*i*Bu₂eddip}]³⁺ kompleksni joni.

Takođe, ispitivanja su pokazala da askorbinska kiselina trenutno redukuje [AuCl₂{(*S,S*)-*i*Bu₂eddip}]PF₆ kompleks, što ukazuje na visoku mogućnost istog ishoda u živim ćelijama.

Ispitivanjem interakcije kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*i*Bu₂eddip}]PF₆ sa goveđim serum albuminom (BSA), pomoću UV/Vis spektroskopije, nađeno je da se kompleks zlata(III) verovatno redukuje cisteinom iz albumina do zlata(I) nakon svega 2 sata reakcije. Nakon 24 i 48 h dolazi do disproporcionisanja zlata(I) do odgovarajućih zlato(III) jedinjenja i elementarnog zlata.

6. LITERATURA

1. S. Doldi, *Chim. Ind.* **77** (1995) 989.
2. M. Peyrone, *Liebigs Ann. Chem.* **51** (1844) 1.
3. A. Werner, *Z. Anorg. Chem.* **3** (1893) 267.
4. B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature* **205** (1965) 698.
5. B. Rosenberg, L. Van Camp, E.B. Grimley, A.J. Tomson, *J. Biol. Chem.* **242** (1967) 1347.
6. B. Rosenberg, E. Renshaw, L. Van Camp, J. Hartwick, J. Drobnik, J. *Bacteriol.* **93** (1967) 716.
7. B. Rosenberg, L. Van Camp, *Cancer Res.* **30** (1970) 1799.
8. B. Rosenberg, L. Van Camp, J.E. Trosko, V.H. Mansour, *Nature* **222** (1969) 385.
9. D.J. Higby, H.J. Wallace, D.J. Albert, J.F. Holland, *Cancer* **33** (1974) 1219.
10. T.W. Hambley, *Dalton Trans.* **43** (2007) 4929.
11. T. Boulikas, M. Vougiouka, *Oncol. Rep.* **10** (2003) 1663.
12. L. Kelland, *Nat. Rev.* **7** (2007) 573.
13. R.A. Alderden, H.R. Mellor, S. Modok, T.W. Hambley, R. Callaghan, *Biochem. Pharmacol.* **71** (2006) 1136.
14. B. Lippert, *Coord. Chem. Rev.* **182** (1999) 263.
15. D. Wang, S. J. Lippard, *Nature Rev. Drug. Discov.* **4** (2005) 307.
16. M.A. Jakupec, M. Galanski, B.K. Keppler, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **146** (2003) 1.
17. G.N. Kaluđerović, R. Paschke, *Curr. Med. Chem.* **48** (2011) 4738.
18. S. Gómez, D. Maksimović-Ivanić, S. Mijatović, G.N. Kaluđerović, *Bioinorg. Chem. Appl.* Article ID 140284 (2012) 1.
19. D. Lebowitz, R. Canetta, *Eur. J. Cancer* **33** (1998) 1522.
20. D.P. Gately, S.B. Howell, *Br. J. Cancer* **67** (1993) 1171.
21. G. Chu, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 787.
22. K. Wang, J. Lu, R. Li, *Coord. Chem. Rev.* **151** (1996) 53.
23. T. Hambley, *Coord. Chem. Rev.* **166** (1997) 181.

24. E.R. Jamieson, S.J. Lippard, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2467.
25. P. Jordan, M. Carmo-Fonseca, *Cell. Mol. Life Sci.* **57** (2000) 1299.
26. S.E. Miller, D.A. House, *Inorg. Chim. Acta* **166** (1989) 189.
27. T.G. Appleton, J.R. Hall, S.F. Ralph, C.S.M. Thompson, *Inorg. Chem.* **28** (1989) 1989.
28. S.J. Berners-Price, T.A. Frenkiel. U. Frey, J.D. Ranford, P.J. Sadler, *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* (1992) 789.
29. S.E. Miller, D.A. House, *Inorg. Chim. Acta* **187** (1991) 125.
30. R.P. Pérez, *Eur. J. Cancer* **34** (1998) 1535.
31. F. Arnesano, G. Natile, *Coord. Chem. Rev.* **253** (2009) 2070.
32. J.T. Hartmann, H-P. Lipp, *Expert. Opin. Pharmaco.* **4** (2003) 889.
33. H. Choy, C. Park, M. Yao, *Clin. Cancer Res.* **14** (2008) 1633.
34. T.J. Sabo, S.R.Grgurić-Šipka, S.R. Trifunović, *Synth. React. Inorg. Met.-org. Chem.* **32** (2002) 1661.
35. F.C. Bersworth, *British Patent* **723** (1955) 316
36. D.B. Haydock, T.P.C. Mulholland, *J. Chem. Soc. C* (1971) 2389.
37. C.F. Liu, *Inorg. Chem.* **3** (1964) 680.
38. G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, *Polyhedron* **21** (2002) 2277.
39. T.J. Sabo, G.N. Kaluđerović, S.R.Grgurić-Šipka, F.W. Heinemann, S.R. Trifunović, *Inorg. Chem. Comm.* **7** (2004) 241.
40. G.N. Kaluđerović, V.M. Đinović, Z.D. Juranić, T.P. Stanojković, T.J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 488.
41. G.N. Kaluđerović, Dj. Miljković, M. Momčilović, V.M. Đinović, M. Mostarica Stojković, T.J. Sabo, V. Trajković, *Int. J. Cancer.* **116** (2005) 479.
42. S. Mijatović, D. Maksimović-Ivanović, J. Radović, Dj. Miljković, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, V. Trajković, *Cell. Mol. Life Sci.* **62** (2005) 1275.
43. B.B. Krajčinović, G.N. Kaluđerović, D. Steinborn, H. Schmidt, Ch. Wagner, Ž. Žižak, Z. D. Juranić, S.R. Trifunović, T.J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* **102** (2008) 892.
44. B.B. Zmejkovski, G.N. Kaluđerović, S. Gómez -Ruiz, Ž. Žižak, D. Steinborn, H. Schmidt, R. Paschke, Z.D. Juranić, T.J. Sabo, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 3452.
45. G.N. Kaluđerović, H. Kommera, S. Schwieger, H. Schmidt, A. Paethanom, M. Kunze, R. Paschke, D. Steinborn, *Dalton Trans.* (2009) 10720.
46. G.N. Kaluđerović, S.A. Mijatović, B.B. Zmejkovski, M.Z. Bulatović, S. Gómez-Ruiz, M.K. Mojić, D. Steinborn, Dj.M. Miljković, H. Schmidt, S.D.

- Stošić-Grujičić, T.J. Sabo, D.D. Maksimović-Ivanić, *Metallomics* **4** (2012) 979.
47. G.N. Kaluđerović, H. Schmidt, D. Steinborn, T.J. Sabo, in: J. G. Hughes, A. J. Robinson, (Eds.), *Inorganic Biochemistry: Research Progress*, Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge, New York, 2008, pp. 305.
48. G.N. Kaluđerović, H. Schmidt, S. Schwieger, Ch. Wagner, R. Paschke, A. Dietrich, T. Müller, D. Steinborn, *Inorg. Chim. Acta* **361** (2008) 1395.
49. G.N. Kaluđerović, N. Pantelić, T. Eichorn, M. Bette, C. Wagner, B.B. Zmejkovski, H. Schmidt, *Polyhedron* **80** (2014) 106.
50. V.M. Đinović, G.A. Bogdanović, S. Novaković, T.J. Sabo, *J. Coord. Chem.* **57** (2004) 535.
51. T.J. Sabo, G.N. Kaluđerović, D. Poleti, Lj. Karanović, A. Boccarelli, F. Cannito, G. Natile, *J. Inorg. Biochem.* **98** (2004) 1378.
52. J. Vujić, G.N. Kaluđerović, M. Milovanović, B.B. Zmejkovski, V. Volarević, N. Arsenijević, S.R. Trifunović, *Europ. J. Med. Chem.* **45** (2010) 4559.
53. J.M. Lazić, L. Vučićević, S. Grgurić-Šipka, K. Janjetović, G.N. Kaluđerović, M. Misirkić, M. Gruden-Pavlović, D. Popadić, R. Paschke, V. Trajković, T.J. Sabo, *ChemMedChem* **5** (2010) 881.
54. Lj.E. Mihajlović, A. Savić, J. Poljarević, I. Vučković, M. Mojić, M. Bulatović, D. Maksimović-Ivanić, S. Mijatović, G.N. Kaluđerović, S. Stošić-Grujičić, Đ. Miljković, S. Grgurić-Šipka, T.J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* **109** (2012) 40.
55. Lj.E. Mihajlović, D. Stanković, J. Poljarević, D. Manojlović, T.J. Sabo, S. Grgurić-Šipka, *Int. J. Electrochem. Sci.* **8** (2013) 8433.
56. D. Maksimović-Ivanić, S. Mijatović, I. Mirkov, S. Stošić-Grujičić, Đ. Miljković, T.J. Sabo, V. Trajković, G.N. Kaluđerović, *Metallomics* **4** (2012) 1155.
57. C.-H. Zhou, Y.-Y. Zhang, C.-Y. Yan, K. Wan, L.-L. Gan, Y. Shi, *Anti-Cancer Agent. Me.* **10** (2010) 371.
58. I. Ott, R. Gust, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **340** (2007) 117.
59. M.Z. Bulatović, D. Maksimović-Ivanić, C. Bensing, S. Gómez-Ruiz, D. Steinborn, H. Schmidt, M. Mojić, A. Korać, I. Golić, D. Pérez-Quintanilla, M. Momčilović, S. Mijatović, G.N. Kaluđerović, *Angew. Chem. Int. Ed.* **53** (2014) 1.
60. D. Pérez-Quintanilla, S. Gómez-Ruiz, Ž. Žižak, I. Seirra, S. Prashar, I. Heirro, M. Fajardo, Z.D. Juranić, G.N. Kaluđerović, *Chem. Eur. J.* **15** (2009) 5588.

61. H. Zhao, Y. Ning, *Gold Bull.* **34** (2001) 24.
62. G.J. Higby, *Gold Bull.* **15** (1982) 130.
63. R.V. Parish, *Interdisc. Sci. Rev.* **17** (1992) 221.
64. T.G. Benedek, *J. Hist. Med. All. Sci.* **59** (2004) 50.
65. W.F. Kean, F. Forestier, Y. Kassam, W. Buchanan, P.J. Rooney, *Semin. Arthritis Rheum.* **14** (1985) 180.
66. Research Sub-committee of the Empire Rheumatism Council, *Ann. Rheum. Dis.* **19** (1960) 95.
67. G.D. Champion, G.G. Graham, J.B. Ziegler, *Baillière's Clin. Rheumatol.* **4** (1990) 491.
68. B.M. Sutton, E. McGusty, D.T. Walz, M.J. DiMartino, *J. Med. Chem.* **15** (1972) 1095.
69. B.M. Sutton, *Gold Bull.* **19** (1986) 15.
70. D.T. Felson, J.J. Anderson, R.F. Meenam, *Arthritis Rheum.* **33** (1990) 1449.
71. C.E. Housecroft, A.G. Sharpe, *Inorganic Chemistry*, 3rd edn. Prentice Hall, Harlow, 2008.
72. M.L. Williams, *Inflammopharmacology* **16** (2008) 110.
73. H. Schmidbaur, A. Grohmann, M.E. Olmos, In: *Gold: Progress in Chemistry, Biochemistry and Technology*, Ed. H. Schmidbaur, John Wiley & Sons, Chichester, 1999.
74. H. Schmidbaur, S. Cronje, B. Djorrdjevic, O. Schuster, *Chem. Phys.* **311** (2005) 151.
75. R.J. Puddephatt, *The Chemistry of Gold*, Elsevier, Amsterdam, 1978.
76. N. Bartlett, *Gold Bull.* **31** (1998) 22.
77. H. Schmidbaur, *Acc. Chem. Res.* **8** (1975) 62.
78. J.P. Fackler Jr., *Inorg. Chem.* **41** (2002) 6959.
79. J.E. Beesley, *Colloidal Gold: A New Perspective For Cytochemical Marking*, Oxford University Press, Oxford, 1989.
80. M.I. Đuran, *Primena Kompleksnih Jedinjenja U Medicini*, Univerzitet u Kragujevcu, 1990.
81. S.L. Best, P.J. Sadler, *Gold Bull.* **29** (1996) 87.
82. C.F. Shaw III, *Chem. Rev.* **99** (1999) 2589.
83. C.F. Shaw III, *Inorg. Perspect. Biol. Med.* **2** (1979) 287.
84. T.M. Simon, D.H. Kunishima, G.J. Vibert, A. Lord, *Cancer* **44** (1990) 1965.

85. C.K. Mirabelli, R.K. Johnson, C.M. Sung, L. Faucette, K. Muirhead, S.T. Crooke, *Cancer Res.* **45** (1985) 32.
86. C.K. Mirabelli, R.K. Johnson, D.T. Hill, L.F. Faucette, G.R. Girard, G.Y. Kuo, C.M. Sung, S.T. Crooke, *J. Med. Chem.* **29** (1986) 218.
87. E.R.T. Tiekink, *Inflammopharmacology* **16** (2008) 138.
88. J.S. Casas, E.F. Castellano, M.D. Couce, J. Ellena, A. Sanchez, J. Sordo, C. Taboada, *J. Inorg. Biochem.* **100** (2006) 1858.
89. J.S. Casas, E.E. Castellano, M.D. Couce, O. Crespo, J. Ellena, A. Laguna, A. Sanchez, J. Sordo, C. Taboada, *J. Inorg. Biochem.* **46** (2007) 6236.
90. I. Ott, X. Qian, Y. Xu, D.H.W. Vlecken, I.J. Marques, D. Kubutat, J. Will, W.S. Sheldrick, P. Jesse, A. Prokop, C.B. Bagowski, *J. Med. Chem.* **52** (2009) 763.
91. S.J. Berners-Price, S.J. Girard, D.T. Hill, B.M. Sutton, P.S. Jarrett, L.F. Faucette, R.K. Johnson, C.K. Mirabelli, P.J. Sadler, *J. Med. Chem.* **33** (1990) 1386.
92. B.Đ. Glišić, Doktorska disertacija, Univerzitet u Kragujevcu, 2012.
93. M.J. McKeage, L. Maharaj, S.J. Berners-Price, *Coord. Chem. Rev.* **232** (2002) 127.
94. J.L. Hickey, R.A. Ruhayel, P.J. Barnard, M.V. Baker, S.J. Berners-Price, A. Filipovska, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 127.
95. D. Suresh, M.S. Balakrishna, K. Rathinasamy, D. Panda, S.M. Mobin, *Dalton, Trans.* (2008) 2812.
96. K. Yan, C.-N. Lok, K. Bierla, C.-M. Che, *Chem. Commun.* **46** (2010) 7691.
97. J.S. Modica-Napolitano, J.R. Aprile, *Adv. Drug. Delivery Rev.* **49** (2001) 63.
98. L.B. Chen, *Ann. Rev. Cell Biol.* **4** (1988) 155.
99. G.D. Hoke, G.F. Rush, G.E. Bossard, J.V. McArdle, B.D. Jensen, C.K. Mirabelli, *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 11203.
100. G.F. Rush, D.W. Alberts, P. Meunier, K. Leffler, P.F. Smith, *Toxicologist* **7** (1987) 59.
101. R.G. Buckley, A.M. Elsome, S.P. Fricker, G.P. Henderson, B.R.C. Theobald, R.V. Parish, B.P. Howe, L.R. Kelland, *J. Med. Chem.* **39** (1996) 5208.
102. B.Đ. Glišić, U. Rychlewska, M.I. Djuran, *Dalton Trans.* **41** (2012) 6887.
103. S.T. Crooke, C. K. Mirabelli, *Am. J. Med.* **75** (1983) 109.
104. A. Casini, M.A. Cinellu, G. Minghetti, C. Gabbiani, M. Coronello, E. Mini, L. Messori, *J. Med. Chem.* **49** (2006) 5524.
105. D. Aldinucci, D. Lorenzon, L. Stefani, L. Giovagnini, A. Colombatti, D. Fregona, *Anti-Cancer Drug* **18** (2007) 323.

106. M. Coronello, G. Marcon, S. Carotti, B. Caciagli, E. Mini, T. Mazzei, P. Orioli, L. Messori, *Oncol. Res.* **12** (2001) 361.
107. L. Roncoli, L. Giovagnini, C. Marzano, F. Bettio, R. Graziani, G. Pilloni, D. Fregona, *Inorg. Chem.* **44** (2005) 1867.
108. A. Bindoli, M.P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Coord. Chem. Rev.* **253** (2009) 1692.
109. S. Carotti, G. Marcon, M. Marussich, T. Mazzei, L. Messori, E. Mini, P. Orioli, *Chem. Biol. Interact.* **125** (2000) 29.
110. S.J. Berners-Price, A. Filipovska, *Metallomics* **3** (2011) 863.
111. P.J. Barnard, S.J. Berners-Price, *Coord. Chem. Rev.* **251** (2007) 1889.
112. M.P. Rigobello, M.T. Callegaro, E. Barzon, M. Benetti, A. Bindoli, *Free Radical. Biol. Med.* **24** (1998) 370.
113. D. Saggiaro, M.P. Rigobello, L. Paloschi, A. Folda, S.A. Moggach, S. Parsons, L. Ronconi, D. Fregona, A. Bindoli, *Chem. Biol.* **14** (2007) 1128.
114. Y. Omata, M. Folan, M. Shaw, R.L. Messer, P.E. Lockwood, D. Hobbs, S. Bouilagues, H. Sano, J.B. Lewis, J.C. Wataha, *Toxicol. In Vitro* **20** (2006) 882.
115. A.G. Cox, K.K. Brown, E.S.J. Arner, M.B. Hampton, *Biochem. Pharmacol.* **76** (2008) 1097.
116. S.-J. Park, I.-S. Kim, *Br. J. Pharmacol.* **146** (2005) 506.
117. L. Messori, F. Abbate, G. Marconi, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O'Connell, P. Zanello, *J. Med. Chem.* **43** (2000) 3541.
118. S. Nobili, E. Mini, I. Landini, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Med. Res. Rev.* **30** (2010) 550.
119. L. Ronconi, L. Giovagnini, C. Marzano, F. Bettio, R. Graziani, G. Pilloni, D. Fregoni, *Inorg. Chem.* **44** (2005) 1867.
120. V. Milacic, D. Chen, L. Ronconi, K.R. Landis-Piwowar, D. Fregona, Q.P. Dou, *Cancer Res.* **66** (2006) 10478.
121. Y.F. To, R.W.-Y. Sun, Y. Chen, V.S.-F. Chan, W.-Y. Yu, P.K.-H. Tam, C.-M. Che, C.-L.S. Lin, *Int. J. Cancer* **124** (2009) 1971.
122. R.W.-Y. Sun, C.-M. Che, *Coord. Chem. Rev.* **253** (2009) 1682.
123. C.-M. Che, R.W.-Y. Sun, W.-Y. Yu, C.-B. Ko, N. Zhu, H. Sun, *Chem. Commun.* (2003) 1718.
124. J.J. Yan, A.L.-F. Chow, C.-H. Leung, R.W.-Y. Sun, D.-L. Ma, C.-M. Che, *Chem. Commun.* **46** (2010) 3893.

125. R.W.-Y. Sun, C.-N. Lok, T.T.-H. Fong, C.K.-L. Li, Z.F. Yang, T. Zoi, A.F.-M. Siu, C.-M. Che, *Chem. Sci.* **4** (2013) 1979.
126. A. Casini, G. Kelter, C. Gabbiani, M.A. Cinellu, G. Minghetti, D. Fragona, H.-H. Fiebig, L. Messori, *J. Biol. Inorg. Chem.* **14** (2009) 1139.
127. M. Coronello, E. Mini, B. Caciagli, M.A. Cinellu, A. Bindoli, C. Gabbiani, L. Messori, *J. Med. Chem.* **48** (2005) 6761.
128. A. Casini, M.A. Cinellu, G. Minghetti, C. Gabbiani, M. Coronello, E. Mini, L. Messori, *J. Med. Chem.* **49** (2006) 5524.
129. B.A. Al-Maythaly, M.I.M. Wazeer, A.A. Isab, *Inorg. Chim. Acta* **362** (2009) 3109.
130. A.A. Isab, M.N. Shaikh, M. Monium-ul-Mehboob, B.A. Al-Maythaly, M.I.M. Wazeer, S. Altuwaijri, *Spectrochim. Acta A* **79** (2011) 1196.
131. C.F. Shaw III, N.A. Schaeffer, R.C. Elder, M.K. Eidsness, J.M. Trooster, G.H.M. Calis, *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984) 3511.
132. C.F. Shaw III, A.A. Isab, M.T. Coffey, C.K. Mirabelli, *Biochem. Pharmacol.* **40** (1990) 1227.
133. P. Fonteh, D. Meyer, *Metallomics* **1** (2009) 427.
134. R.W.-Y. Sun, W.-Y. Yu, H. Sun, C.-M. Che, *ChemBioChem* **5** (2004) 1293.
135. K. Yamaguchi, H. Ushijima, M. Hisano, Y. Inoue, T. Shimamura, T. Hirano, W.E. Muller, *Microbiol. Immunol.* **45** (2001) 549.
136. M. Navaro, C. Gabbiani, L. Messori, D. Gambino, *Drug Discovery Today* **15** (2010) 1070.
137. S.P. Fricker, R.M. Mosi, B.R. Cameron, I. Baird, Y. Zhu, V. Anastassov, J. Cox, P.S. Doyle, E. Hansell, G. Lau, J. Langille, M. Olsen, I. Qin, R. Skelj, R.S.Y. Wong, Z. Santucci, J.H. McKerrow, *J. Inorg. Biochem.* **102** (2008) 1839.
138. G. Brauer, *Handbook of Preparative Inorganic Chemistry*. Vol. 1, Academic Press, New York, 1963.
139. G.P. Vasić, V.V. Glodjevic, I.D. Radojević, O.D. Stefanović, L.R. Comić, V.M. Djinović, S.R. Trifunović, *Inorg. Chim. Acta* **363** (2010) 3606.
140. M. Mojić, A. Savić, V.B. Arion, M. Bulatović, J.M. Poljarević, Đ. Miljković, T.J. Sabo, S. Mijatović, D. Maksimović-Ivanić, S. Grgurić-Sipka, *J. Organomet. Chem.* **749** (2014) 142.
141. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, Jr. T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M.

- Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, GAUSSIAN 03, Revision C.02, Gaussian, J.A. Pople, Inc., Wallingford, CT, (2004).
142. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, Ö. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, (2009).
143. C. Adamo, V. Barone, *Chem. Phys. Lett.* **274** (1997) 242.
144. T.H. Dunning Jr., P.J. Hay, in: *Modern Theoretical Chemistry*, 3rd ed., Vol. 3, Plenum, New York, 1976, pp. 1.
145. D. Andrae, U. Häußermann, M. Dolg, H. Stoll, H. Preuß, *Theor. Chem. Acc.* **77** (1990) 123.
146. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **65** (1983) 55.

147. M. Ohno, T. Abe, *J. Immunol. Methods* **145** (1991) 199.
148. N.K. Banada, W.C. Satterfield, A. Dunalp, K.S. Steimer, R. Kurrle, T.H. Finkel, *Apoptosis* **1** (1996) 69.
149. M.G. Ormerod, *Flow Cytometry: A Practical Approach*, 2nd editon, CA, 1997.
150. B.B. Zmejkovski, G.N. Kaluđerović, S. Gómez-Ruiz, T.J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* **74** (2009) 1171.
151. K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Willey Interscience, New York, 1986.
152. N. Pantelić, B.B. Zmejkovski, T.P. Stanojković, V.V. Jeftić, G.P. Radić, S.R. Trifunović, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, *J. Serb. Chem. Soc.* **79** (2014) 649.
153. K. Esumi, M. Nawa, N. Aihara, K. Usui, *New J. Chem.* **22** (1998) 719.
154. N. Pantelić, B.B. Zmejkovski, J. Trifunović-Macedoljan, A. Savić, D. Stanković, A. Damjanović, Z. Juranić, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, *J. Inorg. Biochem.* **128** (2013) 146.
155. N. Pantelić, T. Stanojković, B.B. Zmejkovski, T.J. Sabo, G.N. Kaluđerović, *Eur. J. Med. Chem.* **90** (2015) 766.
156. U. Koelle, A. Laguna, *Inorg. Chim. Acta* **290** (1999) 44.
157. A.J. Bard and L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, Wiley, New York (1980) p. 443.
158. J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 2nd editon, John Wiley and Sons, Inc. New York (2000).
159. B.Đ. Glišić, Z.D. Stanić, S. Rajković, V. Kojić, G. Bogdanović, M.I. Đuran, *J. Serb. Chem. Soc.* **78** (2013) 1911.
160. R. Gust, B. Schnurr, R. Krauser, G. Bernhardt, M. Koch, B. Schmid, E. Hummel, H. Schoenenberger, *J. Cancer Res. Clin.* **124** (1998) 585.
161. A.N. Wein, A.T. Stockhausen, K.I. Hardcastle, M.R. Saadein, S. Peng, D. Wang, D.M. Shin, Z. Chen, J.F. Eichler, *J. Inorg. Biochem.* **105** (2011) 663.
162. Z.D. Hudson, C.D. Sanghvi, M.A. Rhine, J.J. Ng, S.D. Bunge, K.I. Hardcastle, M.R. Saadein, C.E. MacBeth, J.F. Eichler, *Dalton Trans.*, 28 (2009) 7473–7480.
163. K. Palanichamy, A.C. Ontko, *Inorg. Chim. Acta* **359** (2006) 44.
164. G. Marcon, L. Messori, P. Orioli, M.A. Cinellu, G. Minghetti, *Eur. J. Biochem.* **270** (2003) 4655.
165. W. Bal, J. Christodoulou, P.J. Sadler, A. Tucker, *J. Inorg. Biochem.* **70** (1998) 33.

166. B.P. Espósito, R. Najjar, *Coordin. Chem. Rev.* **232** (2002) 137.
167. B.Đ. Glišić, M.I. Djuran, Z.D. Stanić, S. Rajković, *Gold Bull.* **47** (2014) 33.
168. X. Shi, D. Li, J. Xie, S. Wang, Z. Wu, H. Chen, *Chinese Sci. Bull.* **57** (2012) 1109.

7. PRILOG

Slika P1. Infracrveni spektar liganda [(*S,S*)-H₂*iAm*₂eddip]Cl₂.

Slika P2. ¹H NMR spektar liganda [(*S,S*)-H₂*iAm*₂eddip]Cl₂.

Slika P3. ¹³C NMR spektar liganda [(*S,S*)-H₂*iAm*₂eddip]Cl₂.

Slika P4. Maseni spektar liganda [(*S,S*)-H₂*iAm*₂eddip]Cl₂.

Slika P5. Infracrveni spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*nBu*₂eddip}]PF₆.

Slika P6. Daleki infracrveni spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*nBu*₂eddip}]PF₆.

Slika P7. ¹H NMR spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*nBu*₂eddip}]PF₆.

Slika P8. ¹³C NMR spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*nBu*₂eddip}]PF₆.

Slika P9. Maseni spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*nBu*₂eddip}]PF₆.

Slika P10. Infracrveni spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*nPe*₂eddip}]PF₆.

Slika P11. Daleki infracrveni spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*nPe*₂eddip}]PF₆.

Slika P12. ¹H NMR spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*nPe*₂eddip}]PF₆.

Slika P13. ¹³C NMR spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*nPe*₂eddip}]PF₆.

Slika P14. Maseni spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*nPe*₂eddip}]PF₆.

Slika P15. Infracrveni spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*iBu*₂eddip}]PF₆.

Slika P16. Daleki infracrveni spektar [AuCl₂{(*S,S*)-*iBu*₂eddip}]PF₆.

Slika P17. ¹H NMR spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*iBu*₂eddip}]PF₆.

Slika P18. ¹³C NMR spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*iBu*₂eddip}]PF₆.

Slika P19. Maseni spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*iBu*₂eddip}]PF₆.

Slika P20. Infracrveni spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*iAm*₂eddip}]PF₆.

Slika P21. ¹H NMR spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*iAm*₂eddip}]PF₆.

Slika P22. ¹³C NMR spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*iAm*₂eddip}]PF₆.

Slika P23. Maseni spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*iAm*₂eddip}]PF₆.

Slika P24. Infracrveni spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*cPe*₂eddip}]PF₆.

Slika P25. ¹H NMR spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*cPe*₂eddip}]PF₆.

Slika P26. ¹³C NMR spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*cPe*₂eddip}]PF₆.

Slika P27. Maseni spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*cPe*₂eddip}]PF₆.

Slika P28. Infracrveni spektar kompleksa [AuCl₂{(*S,S*)-*nPr*₂eddl}]PF₆.

- Slika P29.** ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P30.** ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P31.** Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P32.** Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P33.** ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P34.** ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P35.** Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P36.** Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P37.** ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P38.** ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P39.** Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P40.** Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P41.** ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P42.** ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P43.** Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P44.** Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}\text{Me}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P45.** ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}\text{Me}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P46.** ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}\text{Me}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P47.** Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}\text{Me}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P48.** Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}\text{Et}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P49.** ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}\text{Et}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P50.** ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}\text{Et}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P51.** Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}\text{Et}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P52.** Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P53.** ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P54.** ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P55.** Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P56.** Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P57.** ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P58.** ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P59.** Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P60.** Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P61.** ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.
- Slika P62.** ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.

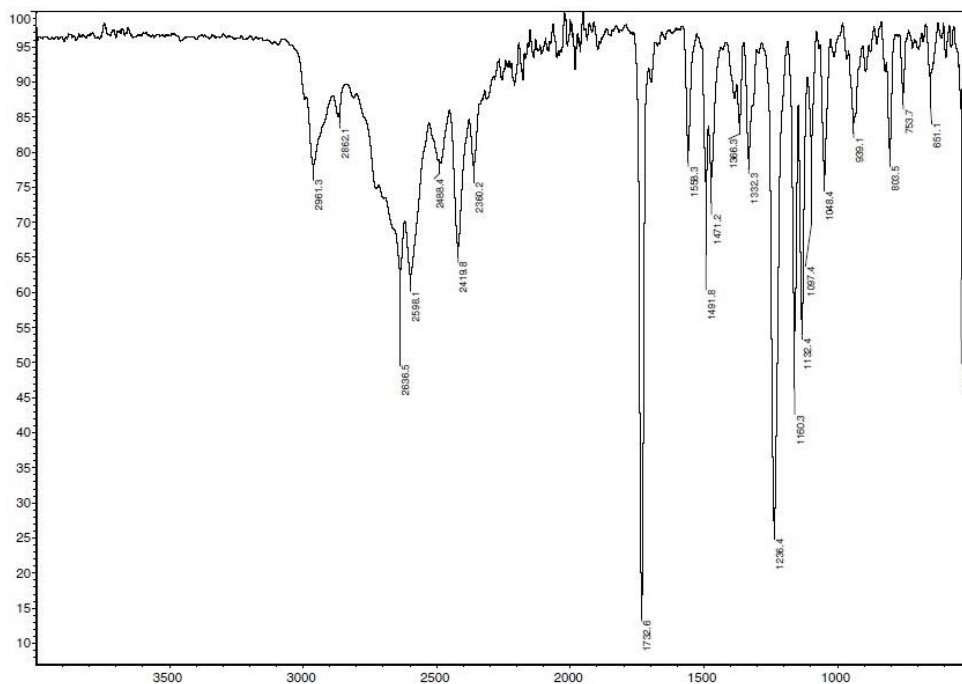
Slika P63. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.

Slika P64. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.

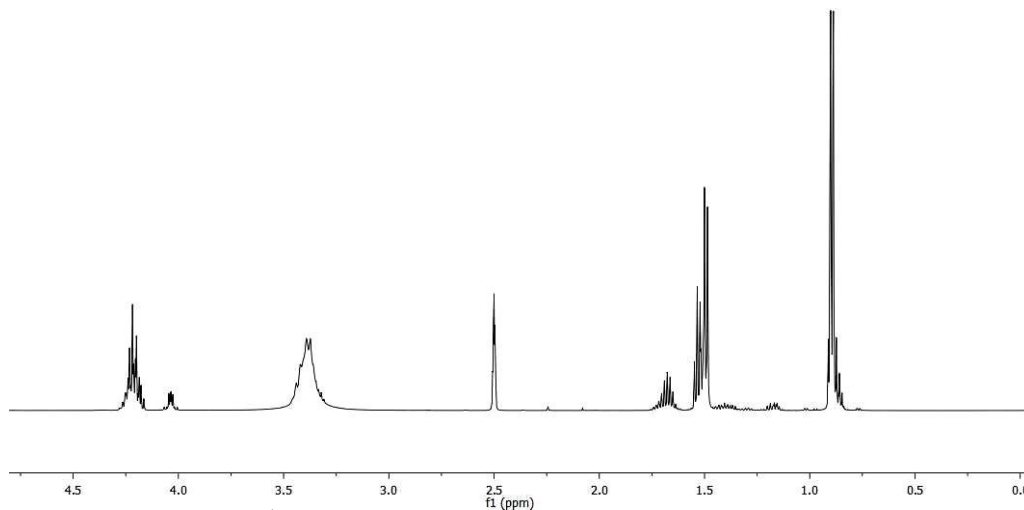
Slika P65. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.

Slika P66. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.

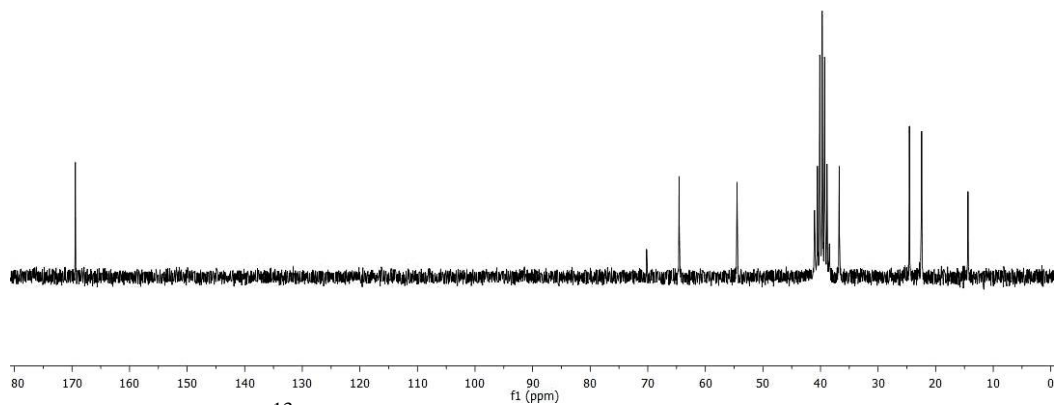
Slika P67. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



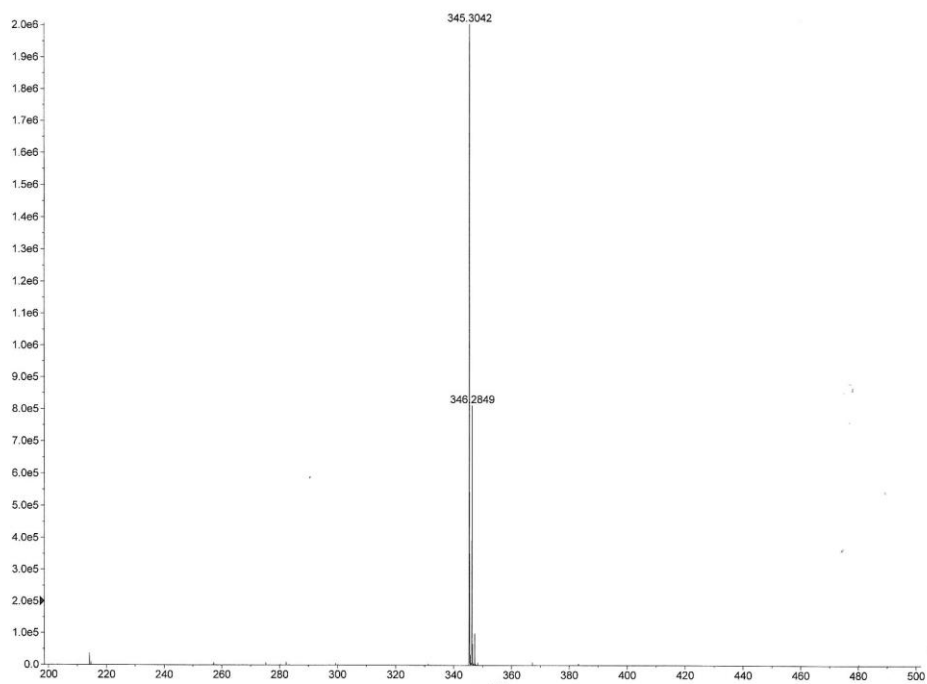
Slika P1. Infracrveni spektar liganda [(*S,S*)-H₂iAm₂eddip]Cl₂.



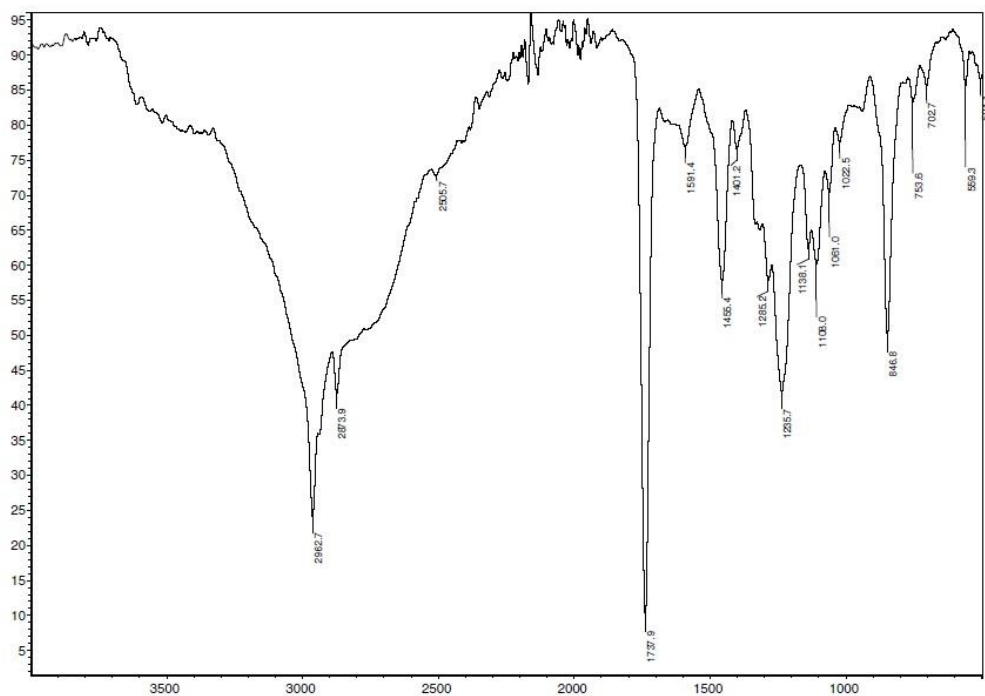
Slika P2. ¹H NMR spektar liganda [(*S,S*)-H₂iAm₂eddip]Cl₂.



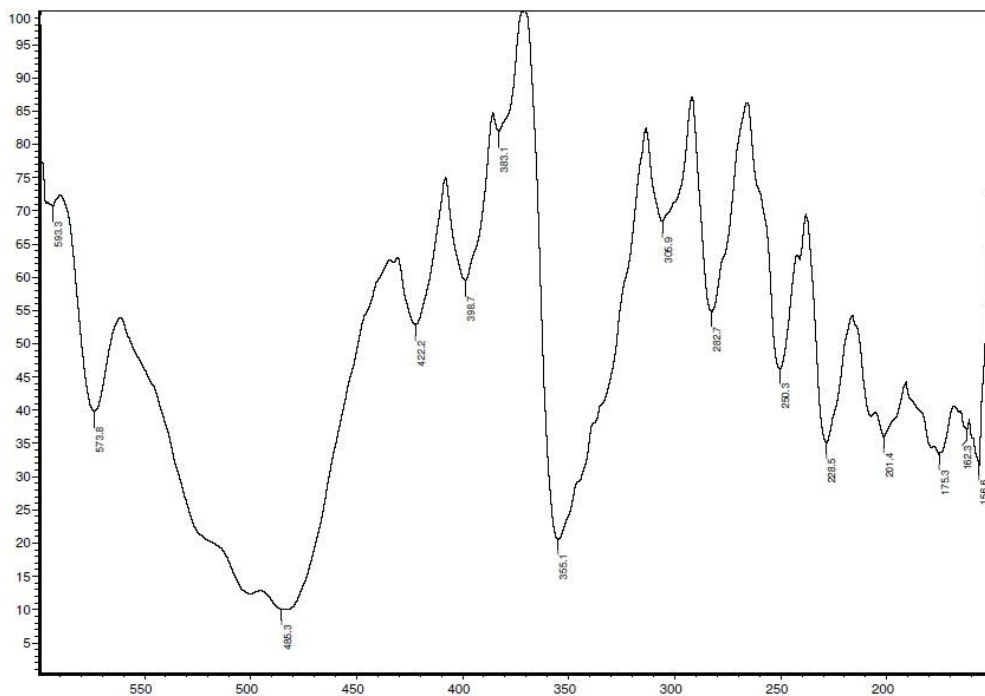
Slika P3. ^{13}C NMR spektar liganda $[(S,S)\text{-H}_2i\text{Am}_2\text{eddip}]\text{Cl}_2$.



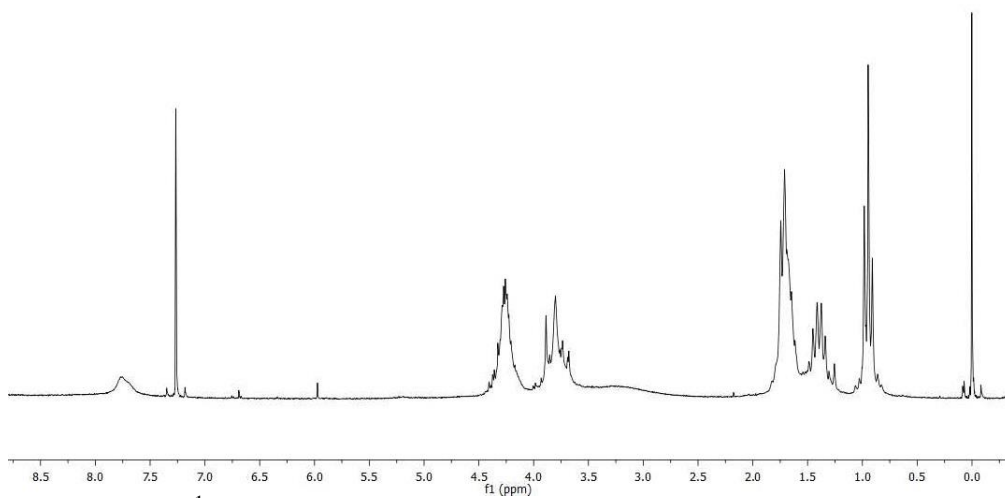
Slika P4. Maseni spektar liganda $[(S,S)\text{-H}_2i\text{Am}_2\text{eddip}]\text{Cl}_2$.



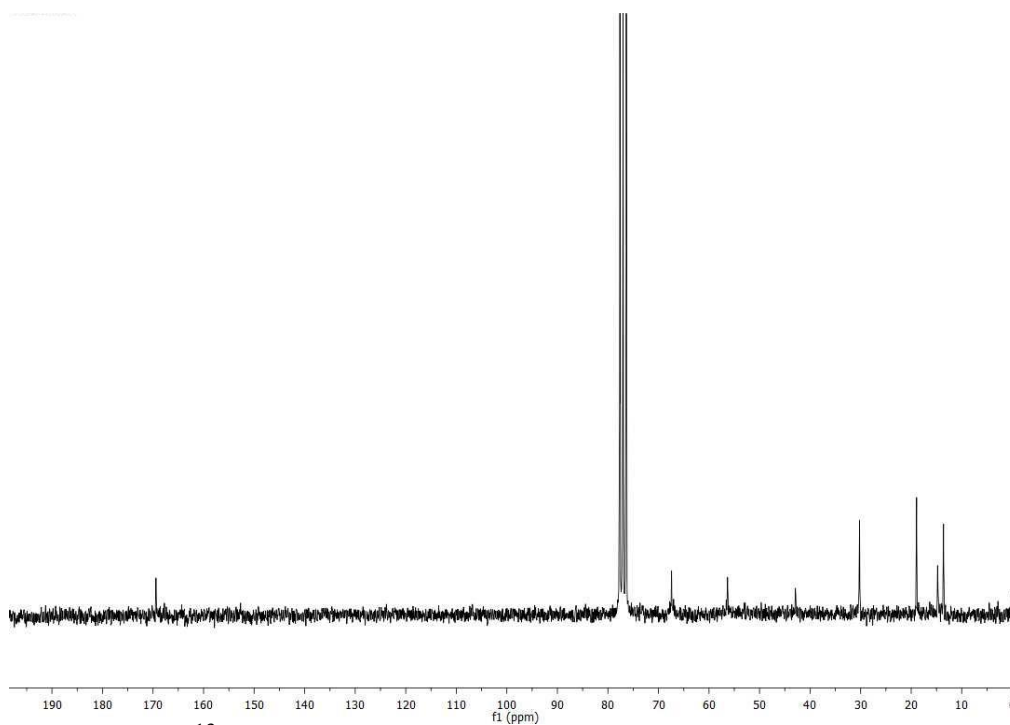
Slika P5. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$.



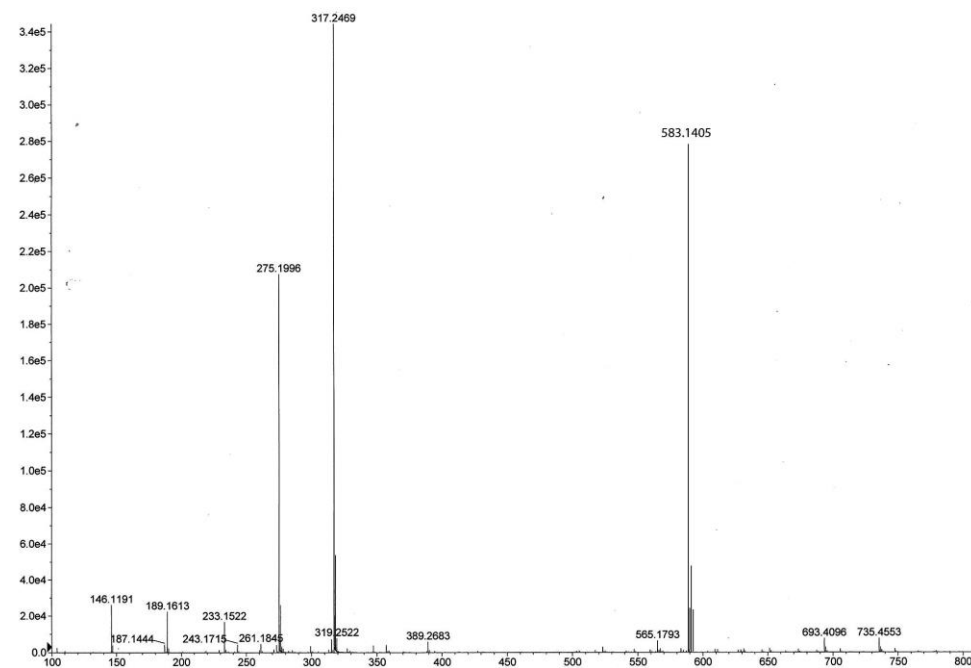
Slika P6. Daleki infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$.



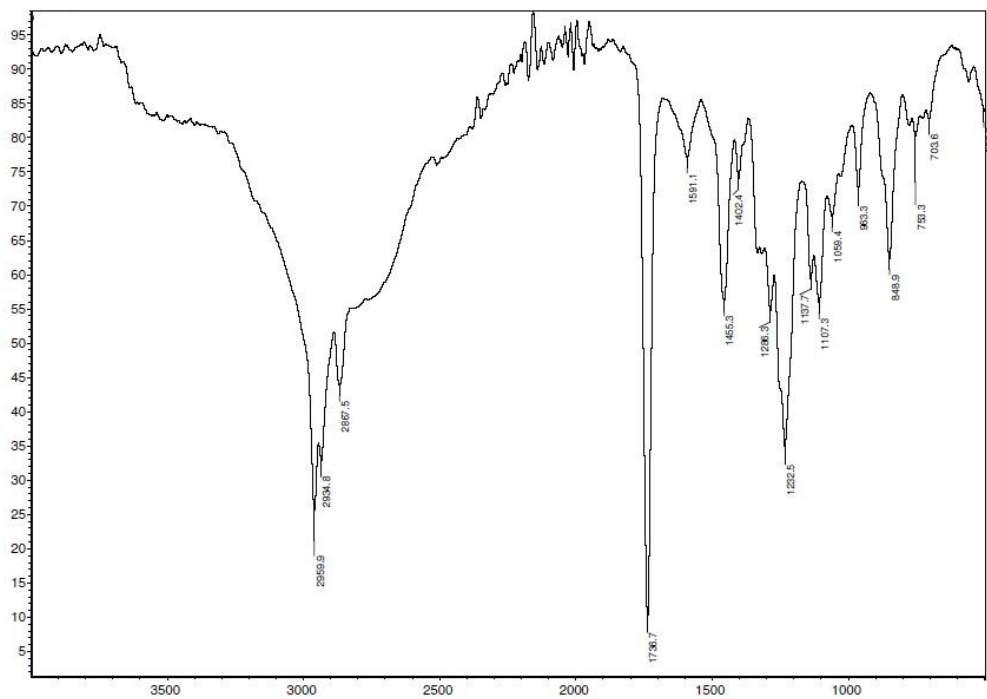
Slika P7. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



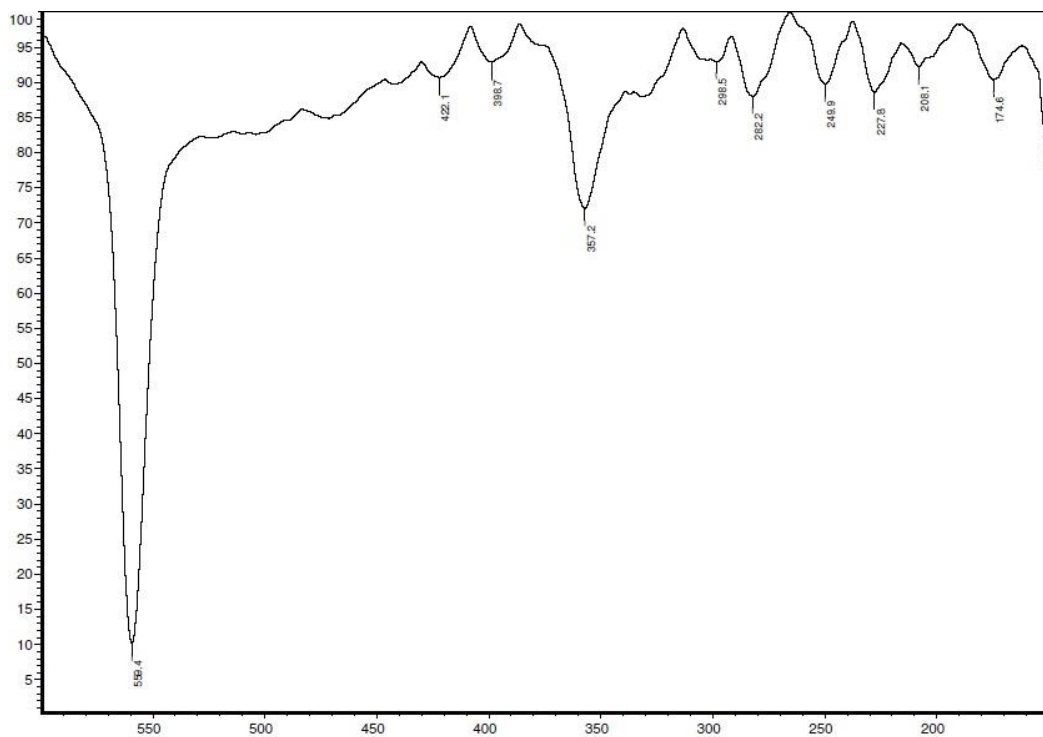
Slika P8. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



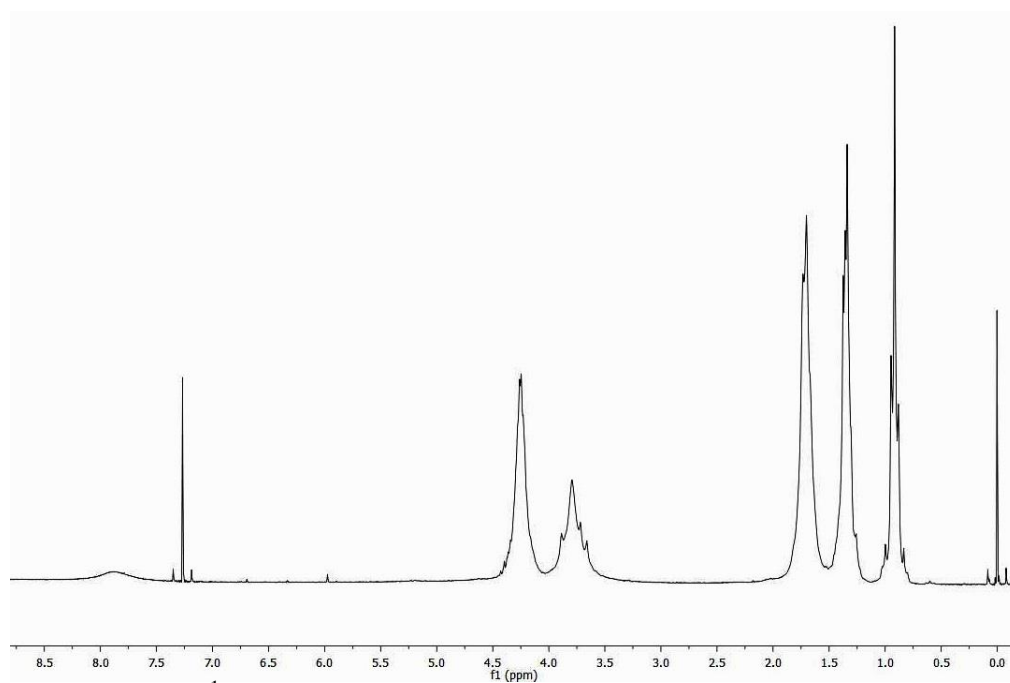
Slika P9. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



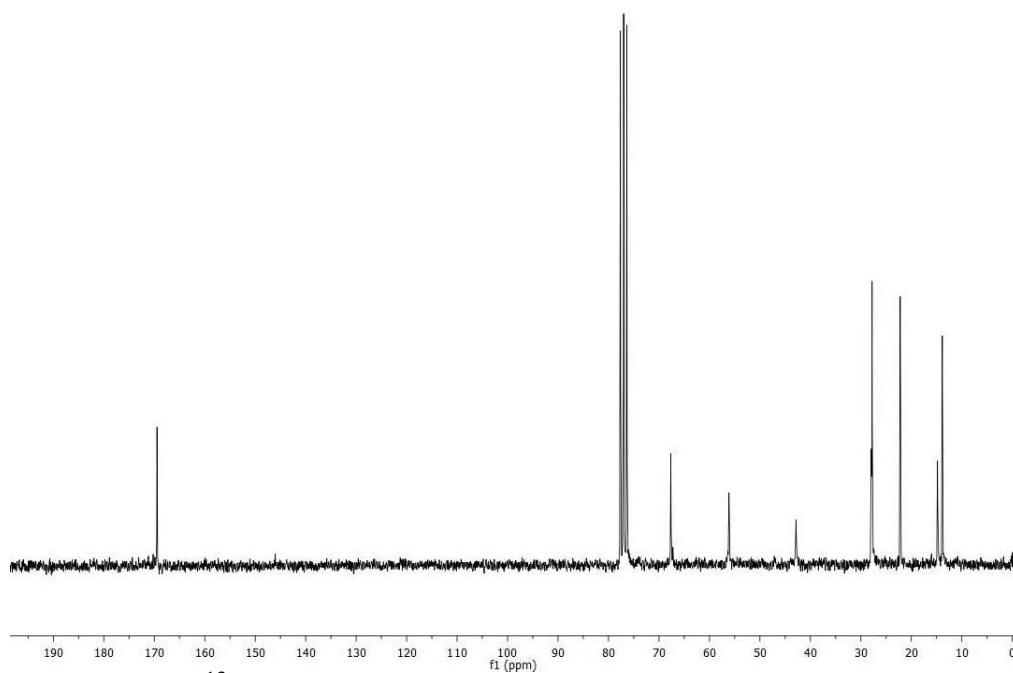
Slika P10. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



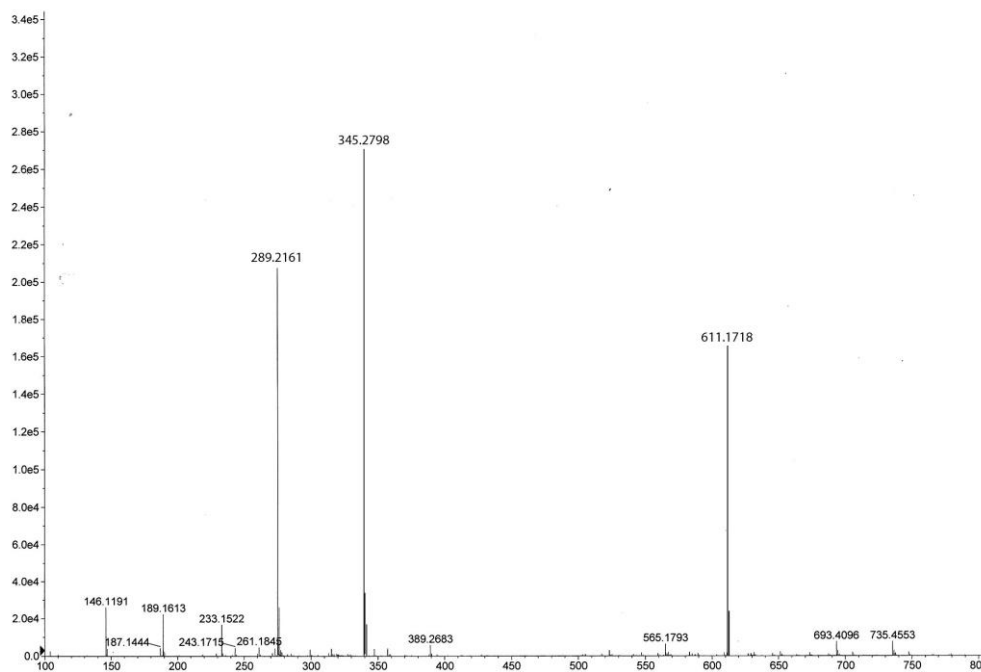
Slika P11. Daleki infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S},\text{S})\text{-nPe}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



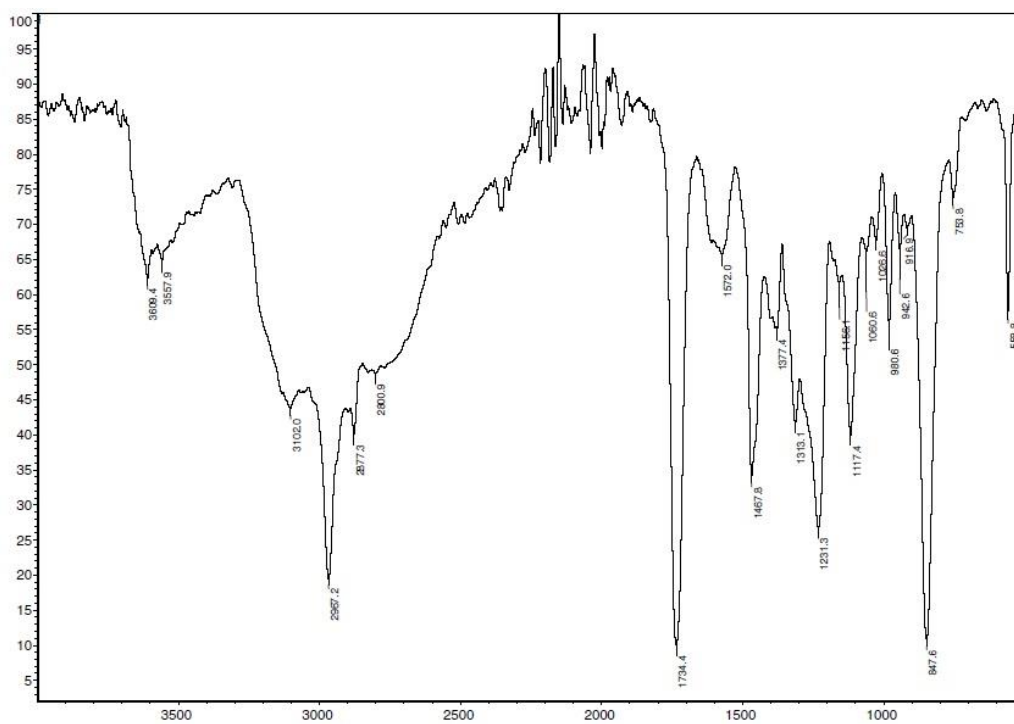
Slika P12. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S},\text{S})\text{-nPe}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



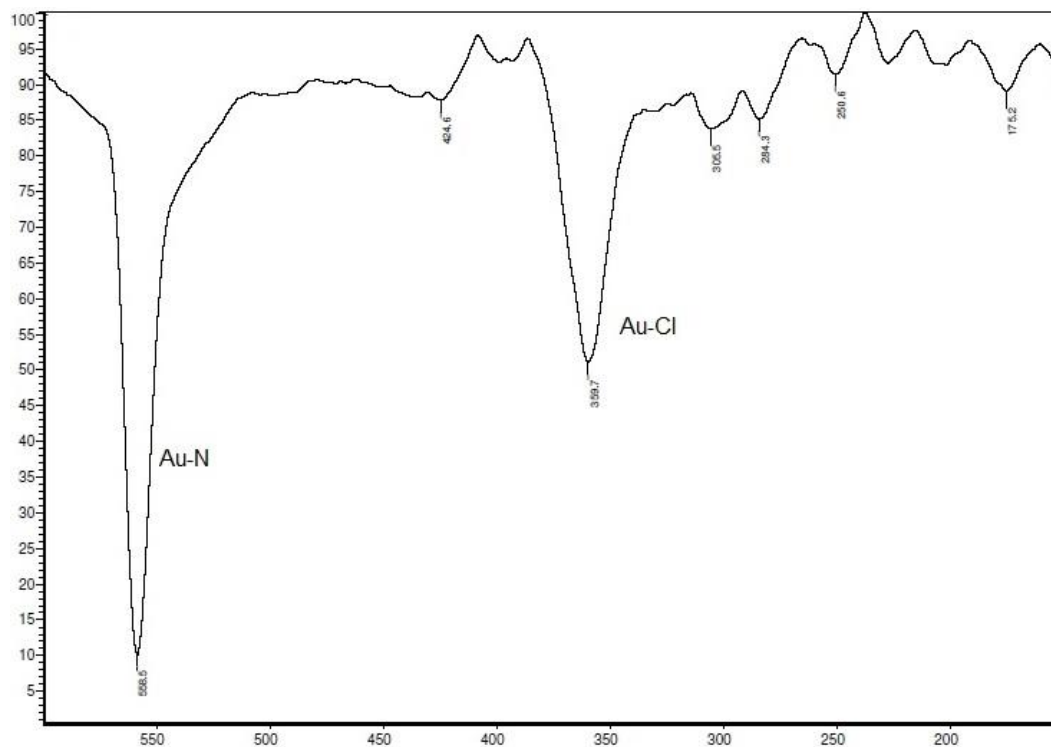
Slika P13. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



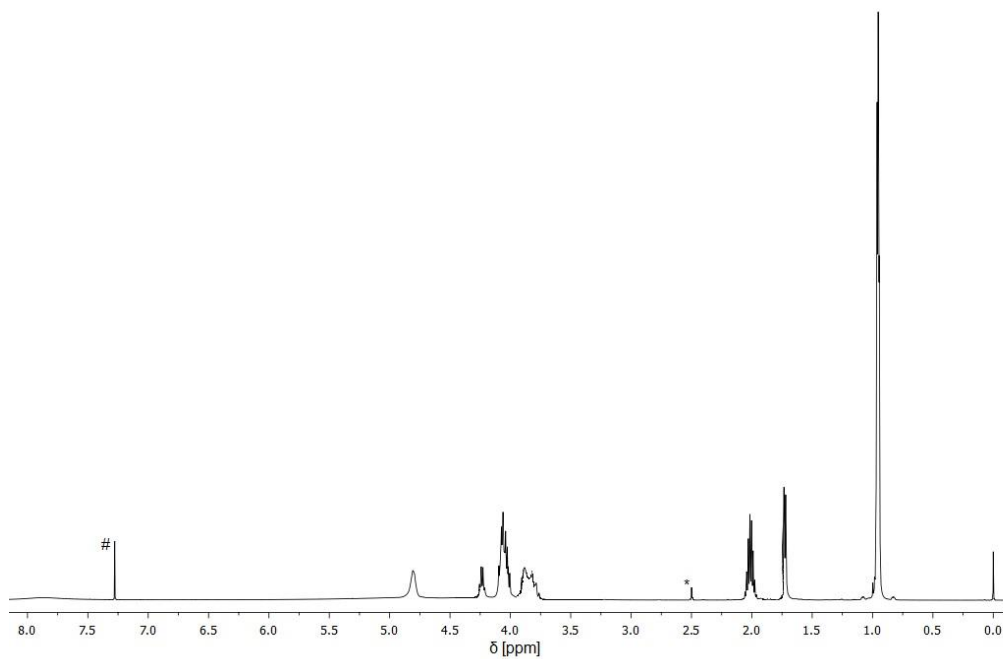
Slika P14. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



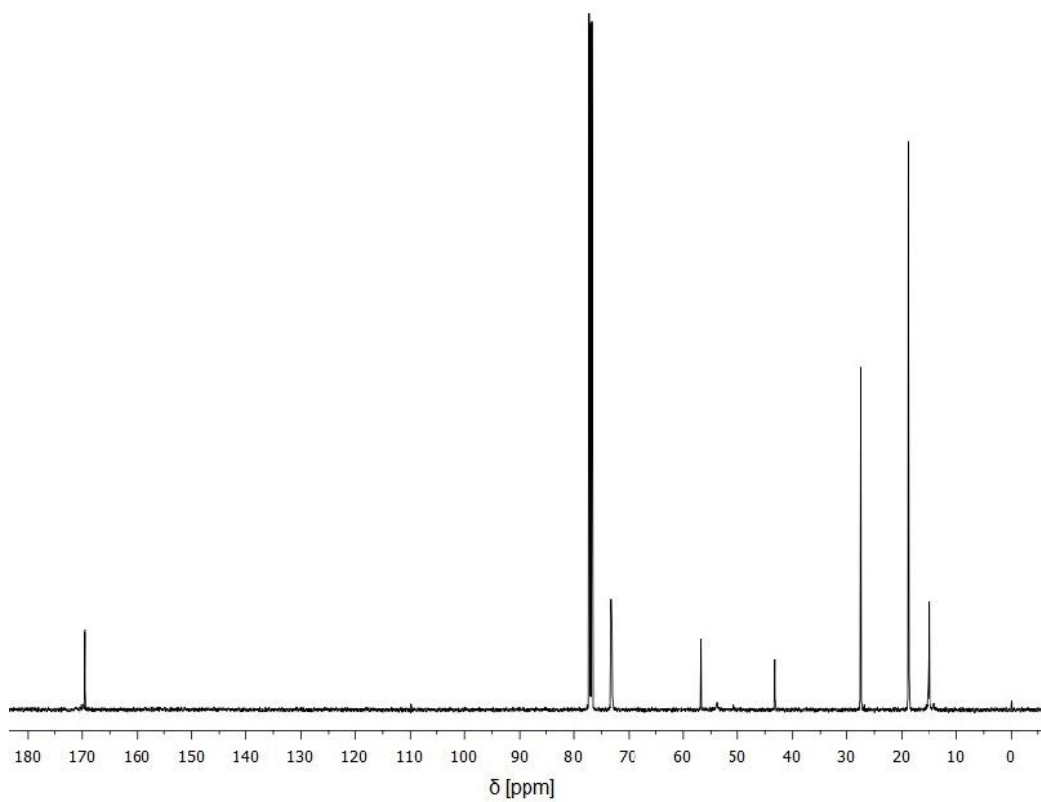
Slika P15. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-iBu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



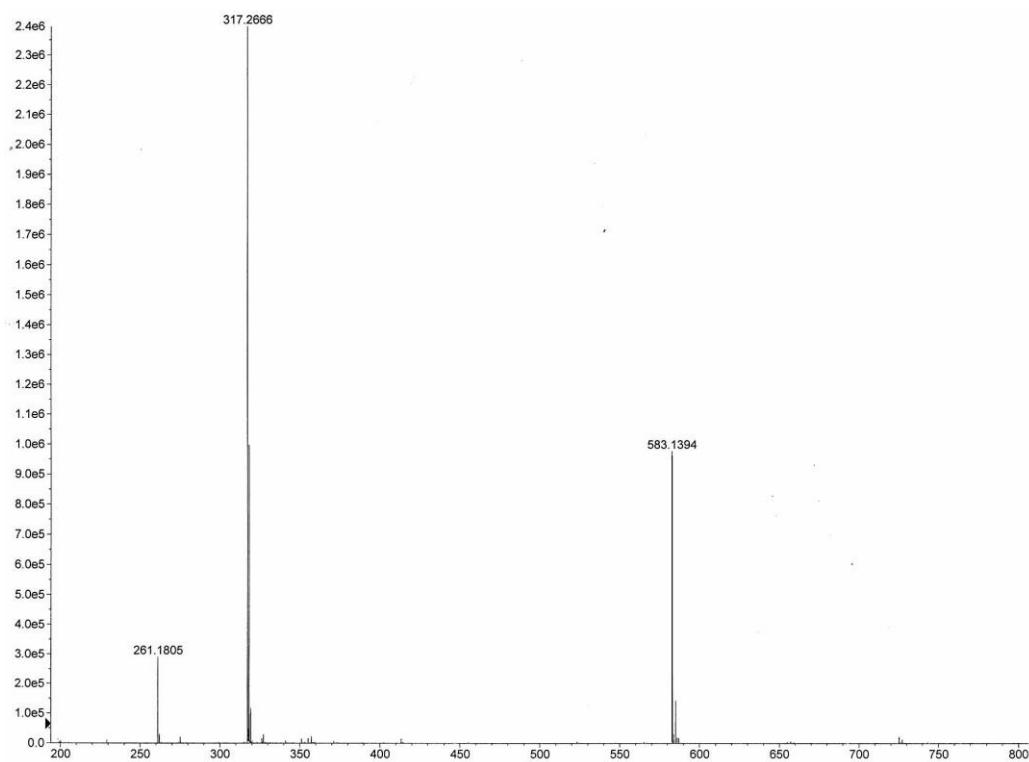
Slika P16. Daleki infracrveni spektar $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-iBu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



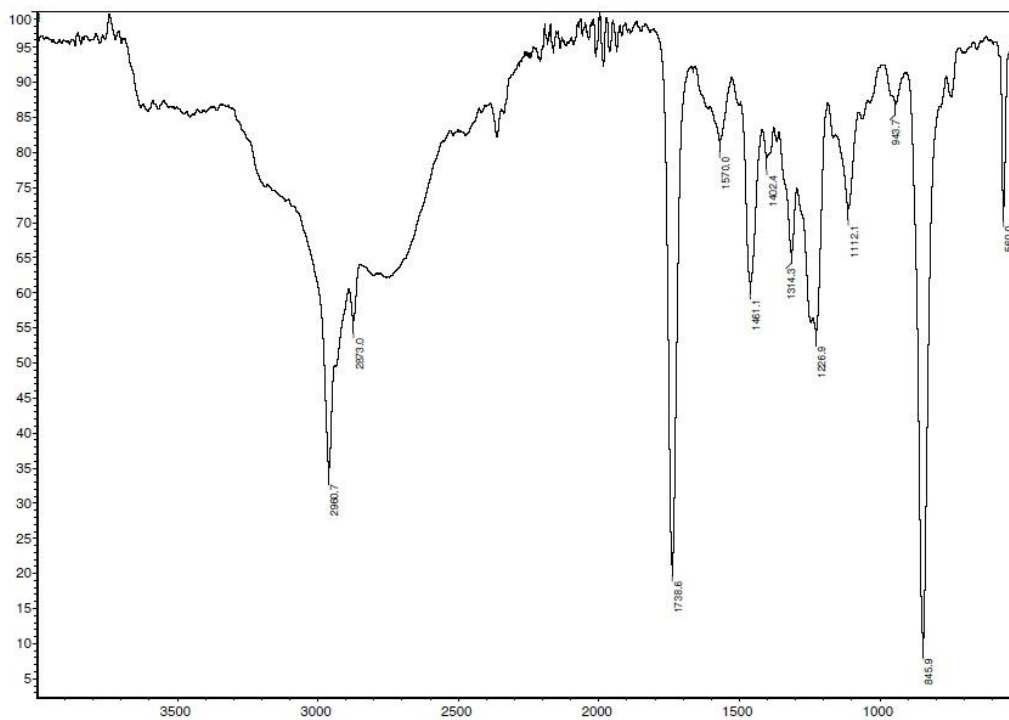
Slika P17. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



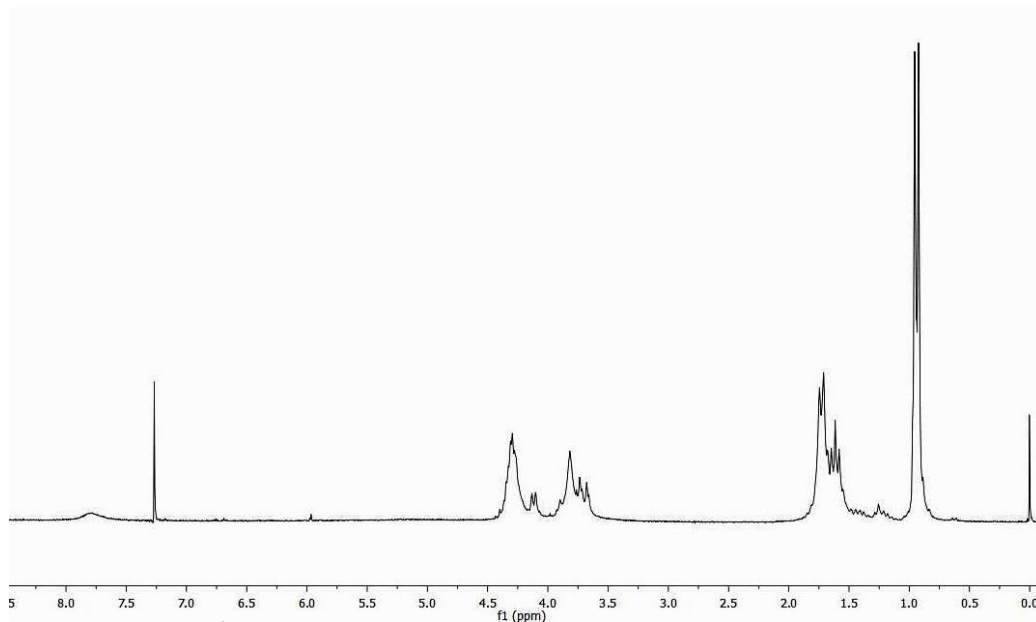
Slika P18. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



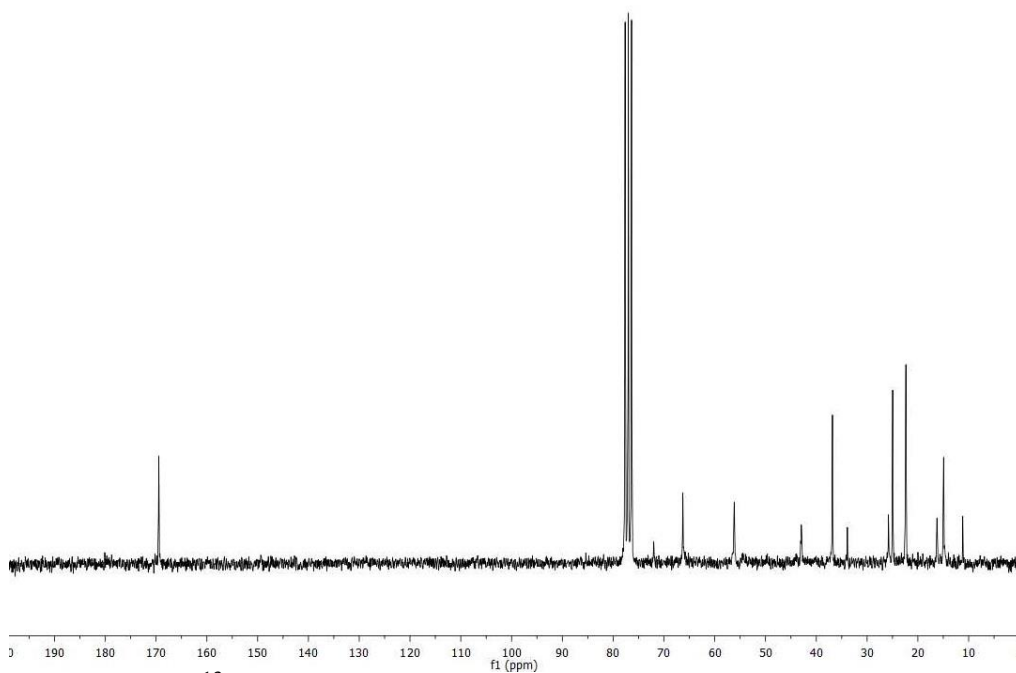
Slika P19. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-iBu}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



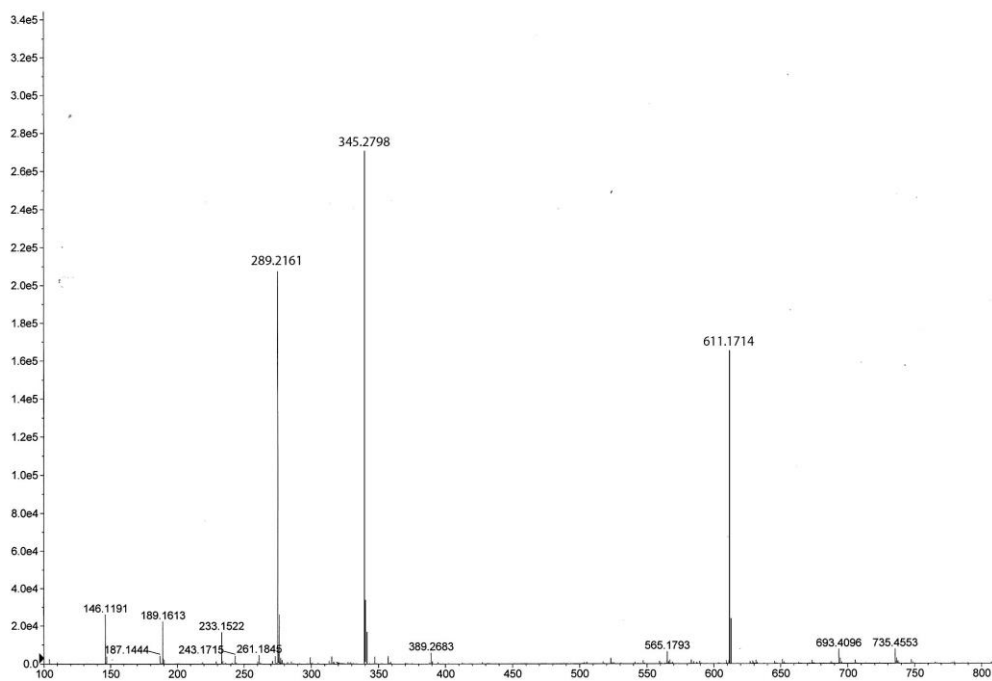
Slika P20. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-iAm}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



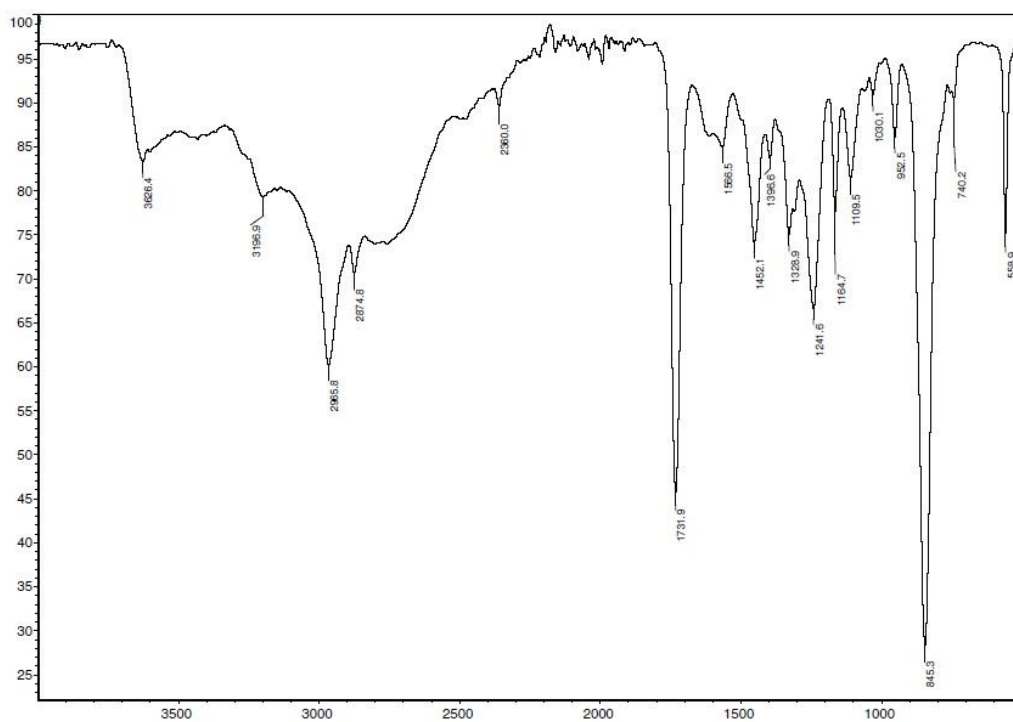
Slika P21. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



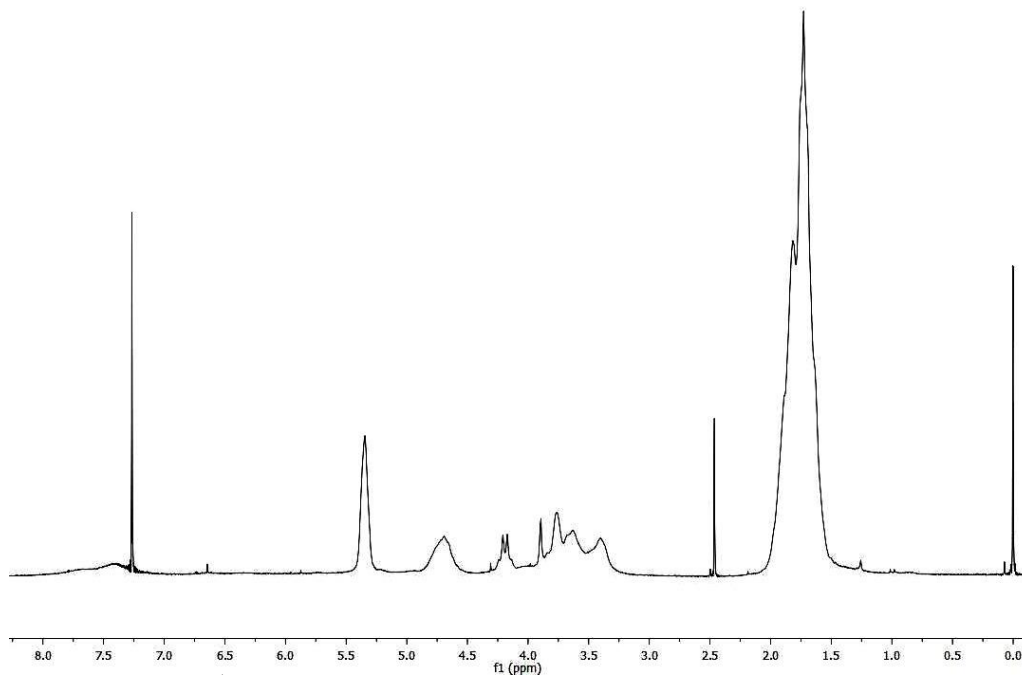
Slika P22. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



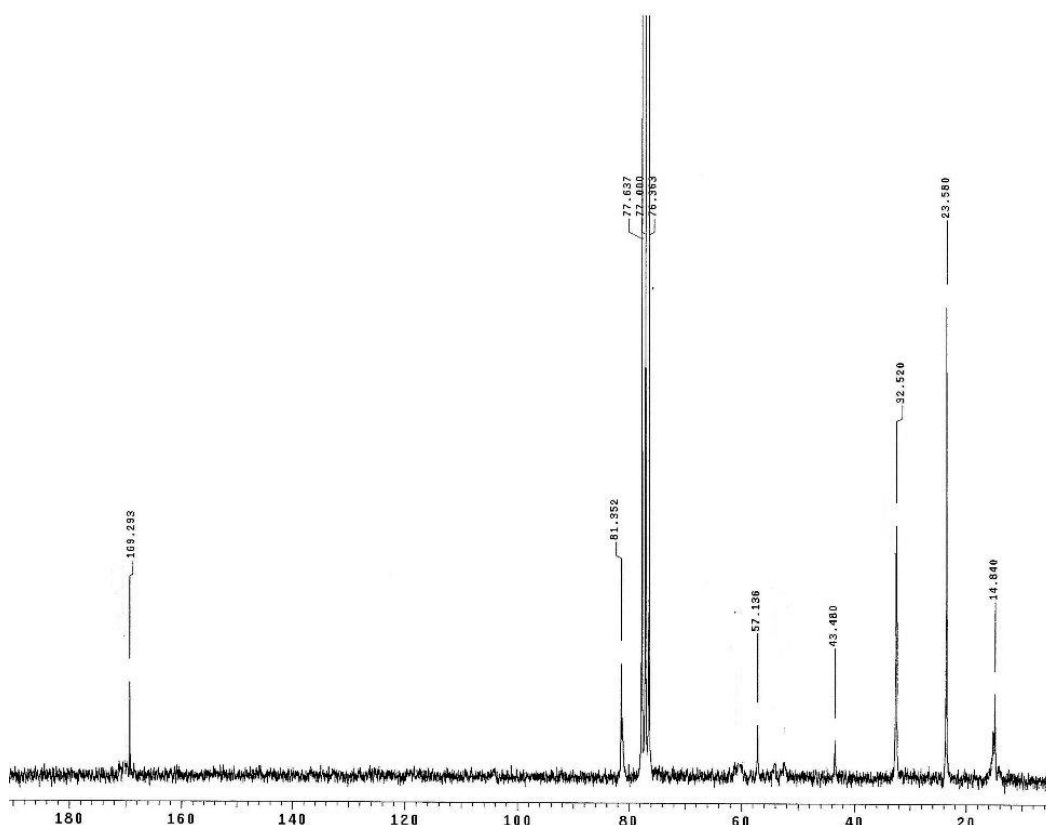
Slika P23. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$.



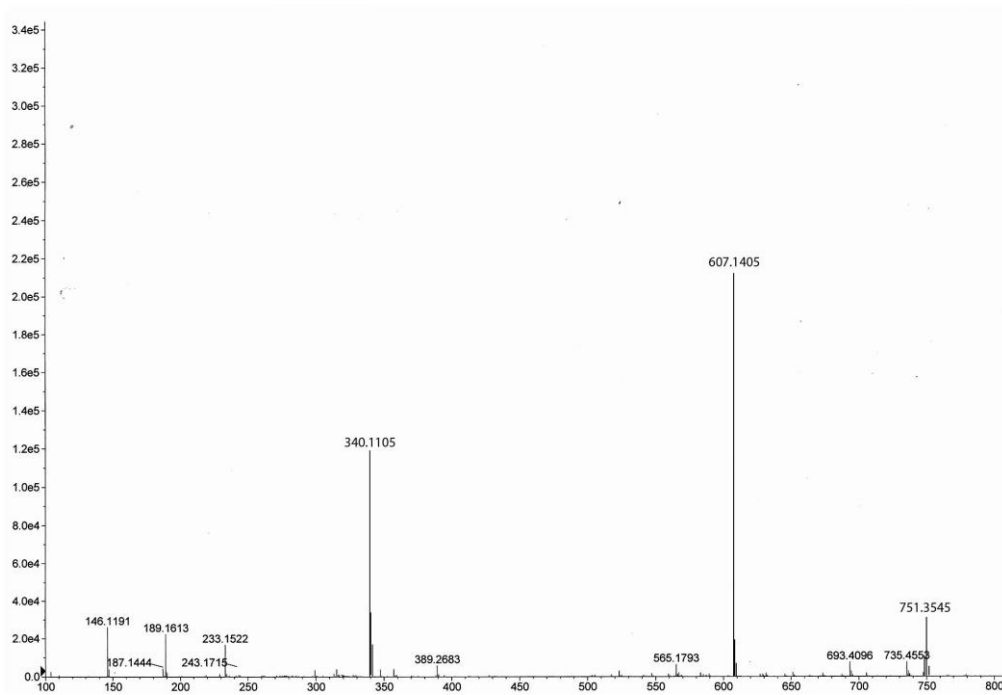
Slika P24. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}c\text{Pe}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$.



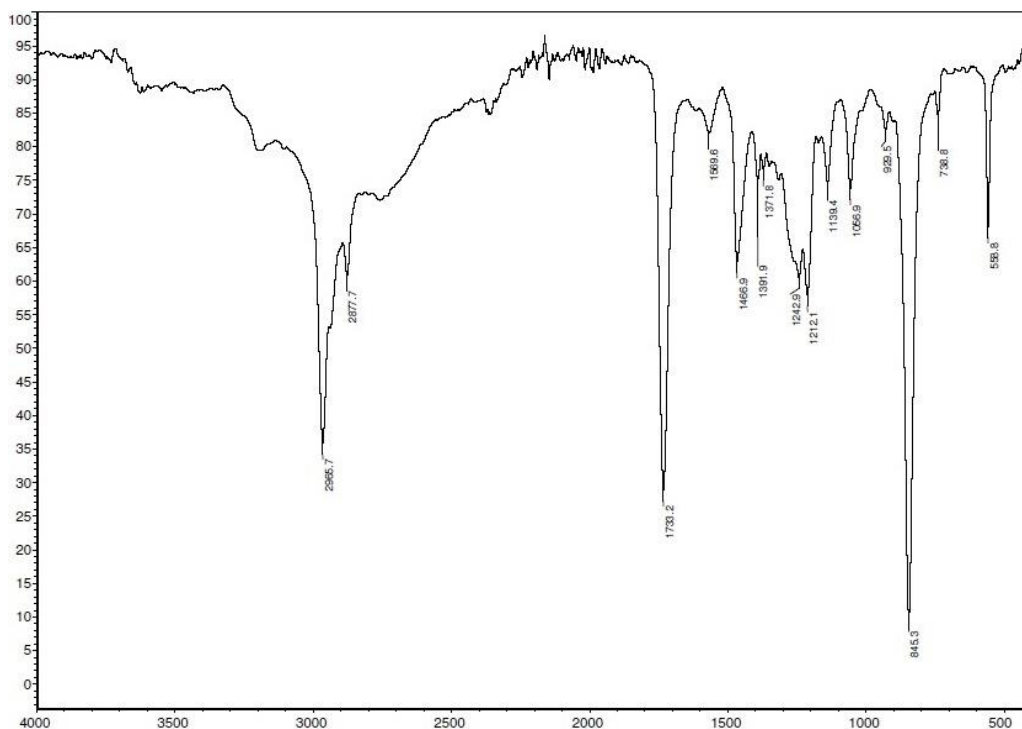
Slika P25. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-cPe}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$.



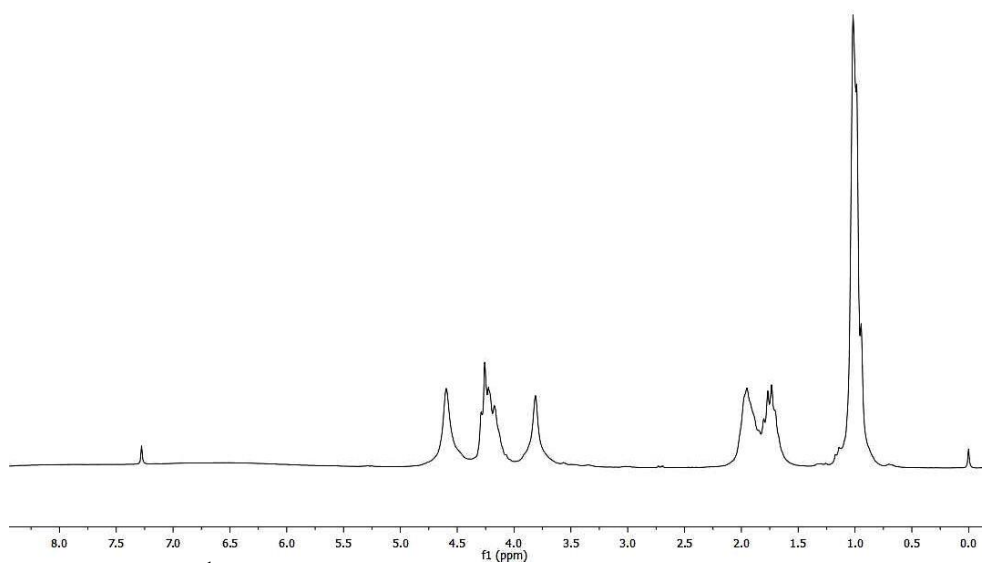
Slika P26. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-cPe}_2\text{eddip}}]\text{PF}_6$.



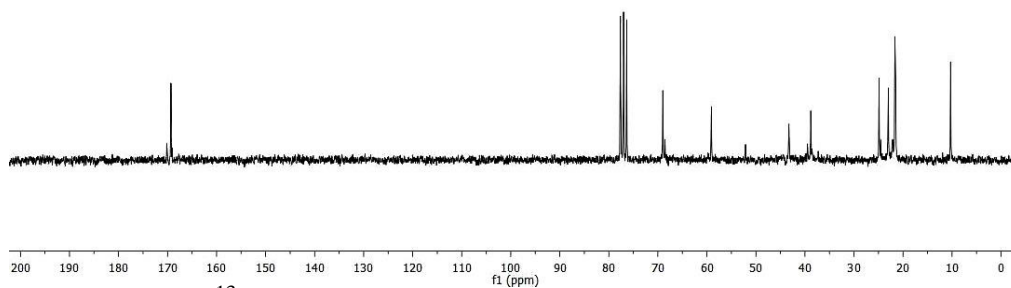
Slika P27. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-cPe}_2\text{eddip}\}]\text{PF}_6$.



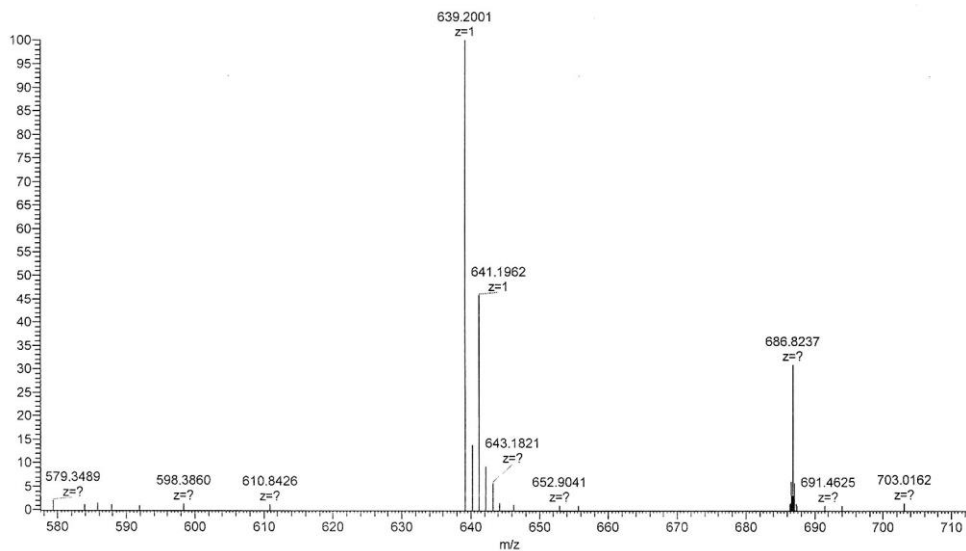
Slika P28. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-nPr}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



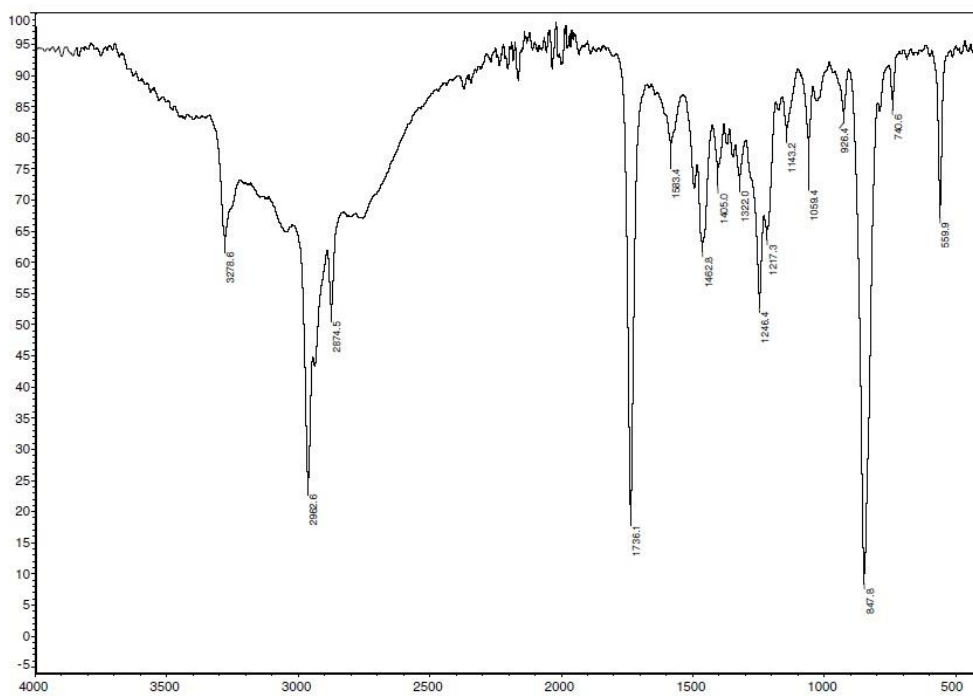
Slika P29. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



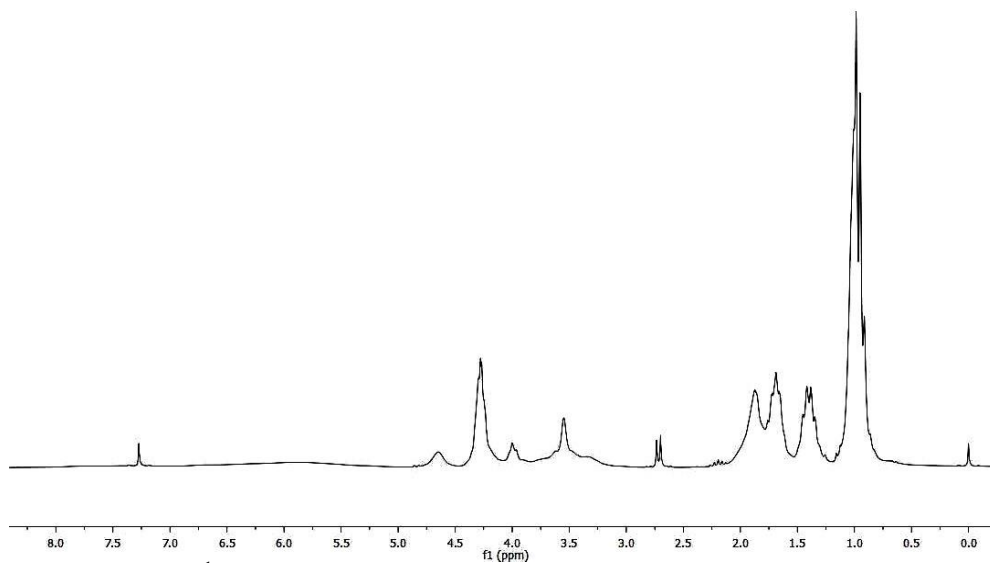
Slika P30. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



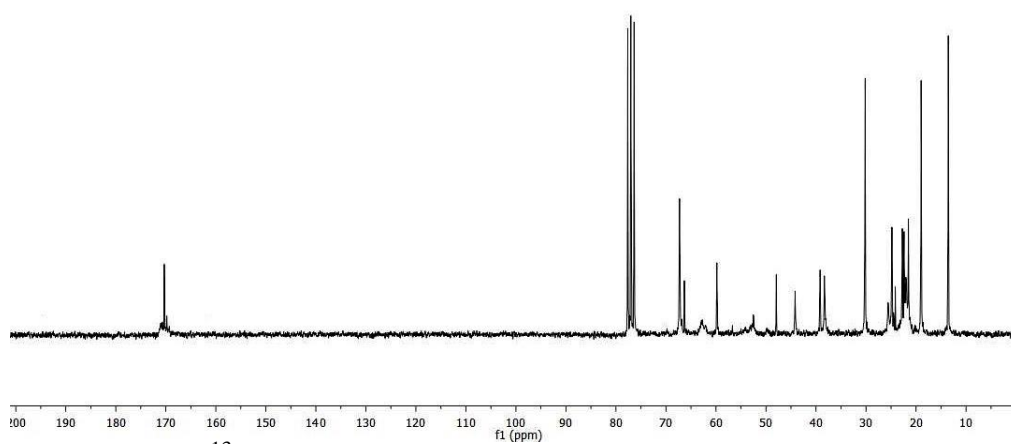
Slika P31. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-nPr}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



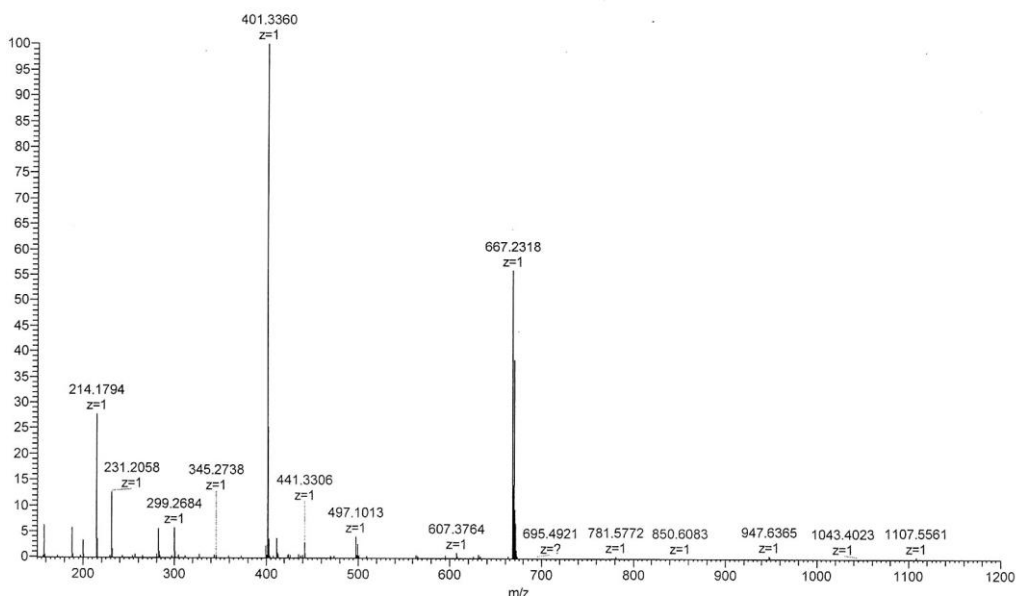
Slika P32. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-nBu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



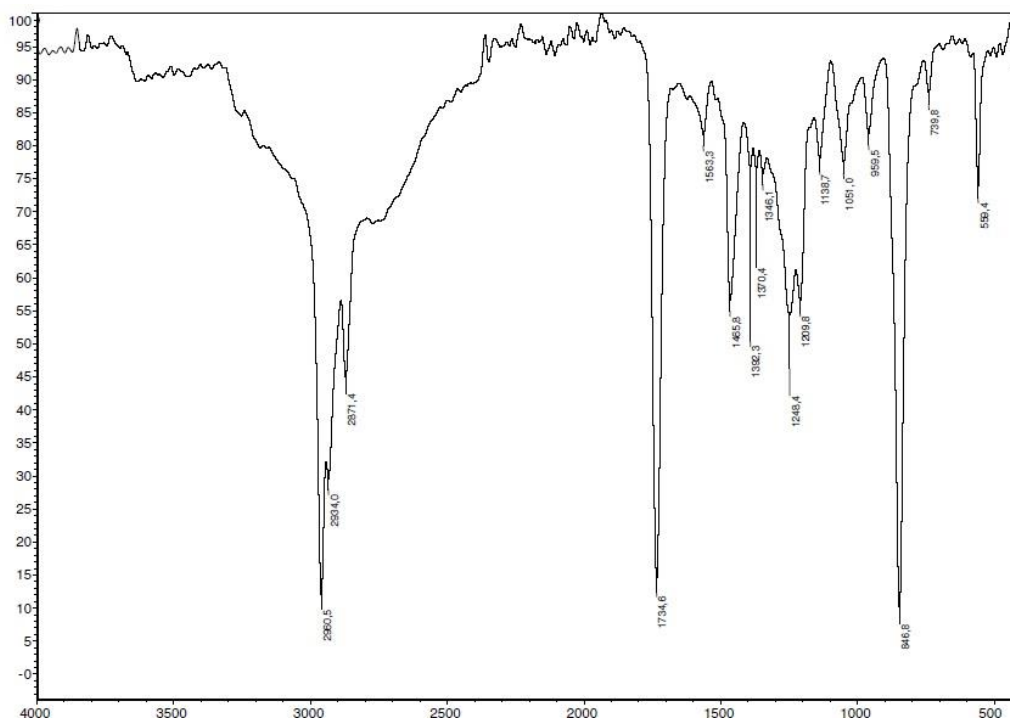
Slika P33. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



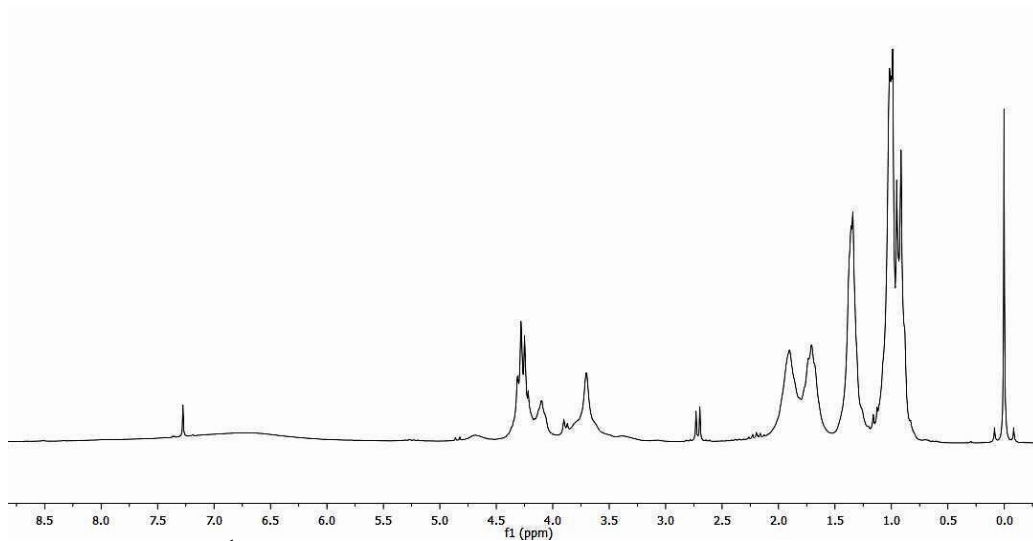
Slika P34. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



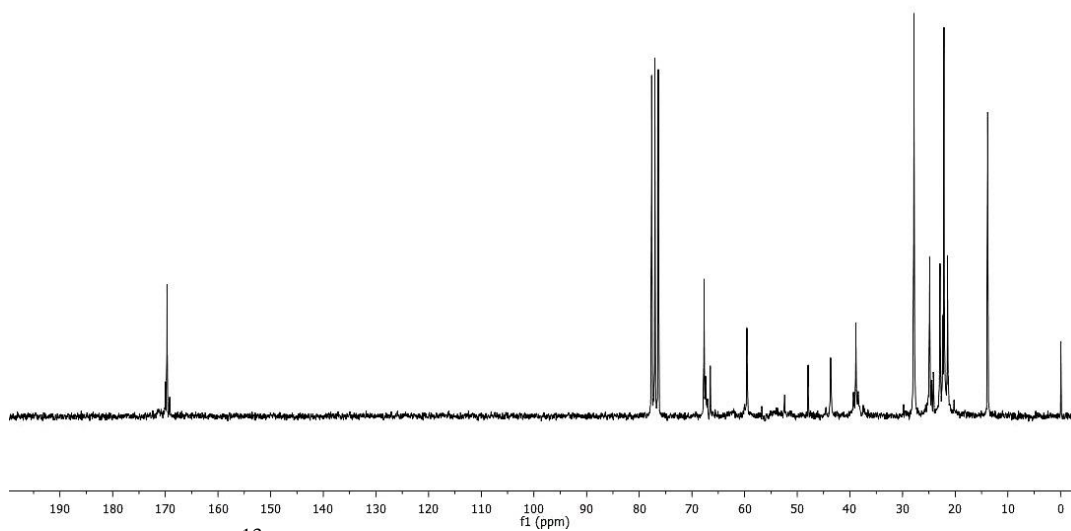
Slika P35. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-nBu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



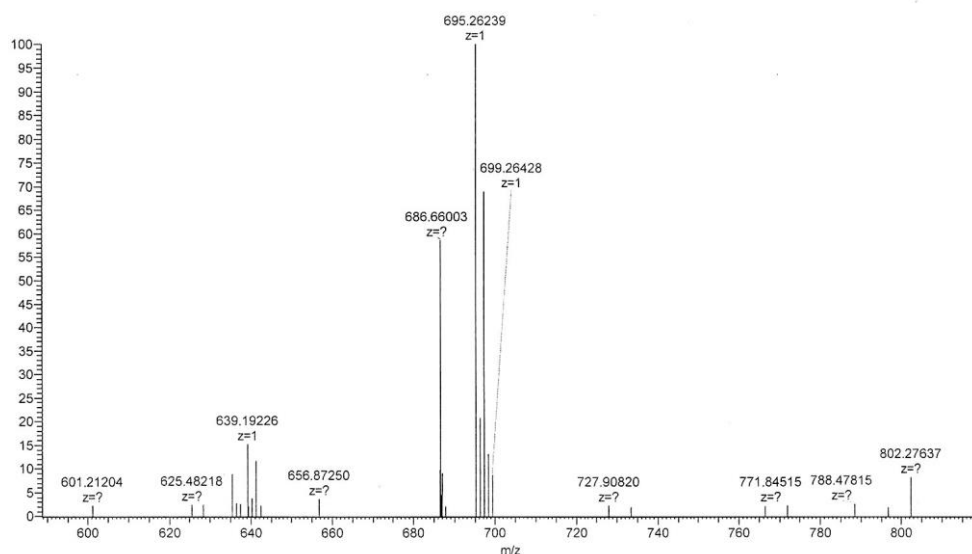
Slika P36. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-nPe}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



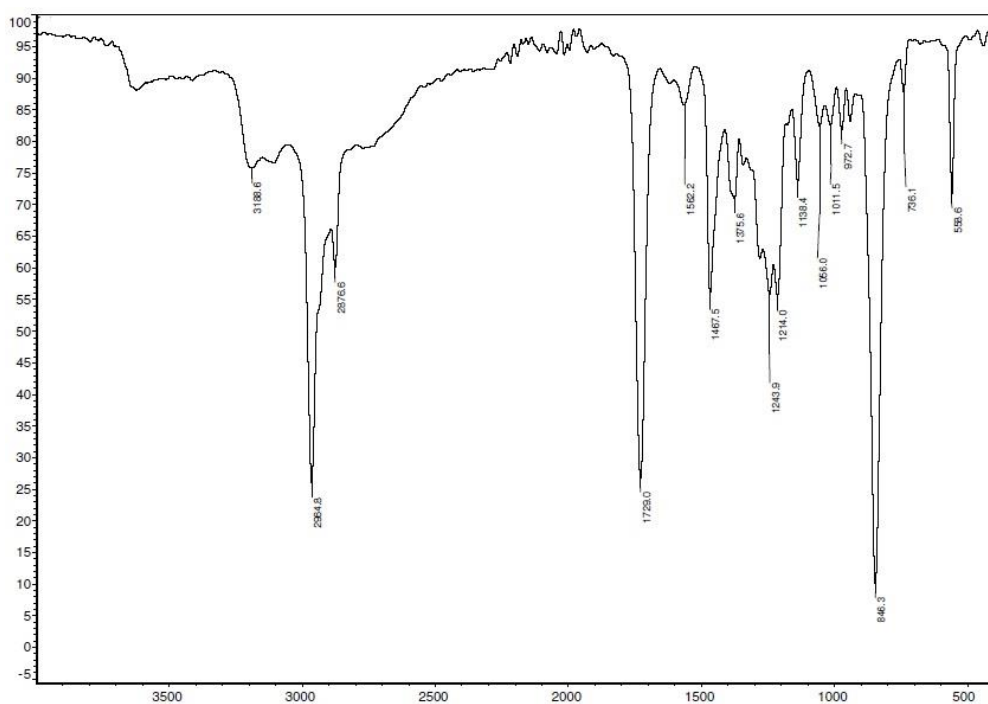
Slika P37. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S},\text{S})\text{-nPe}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



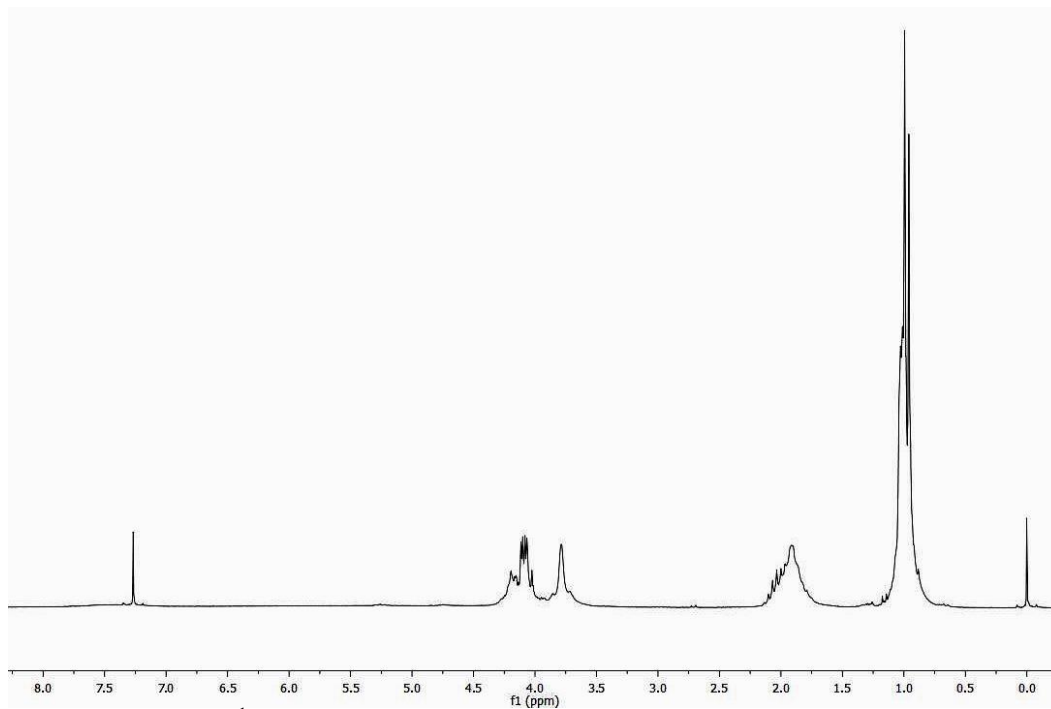
Slika P38. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S},\text{S})\text{-nPe}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



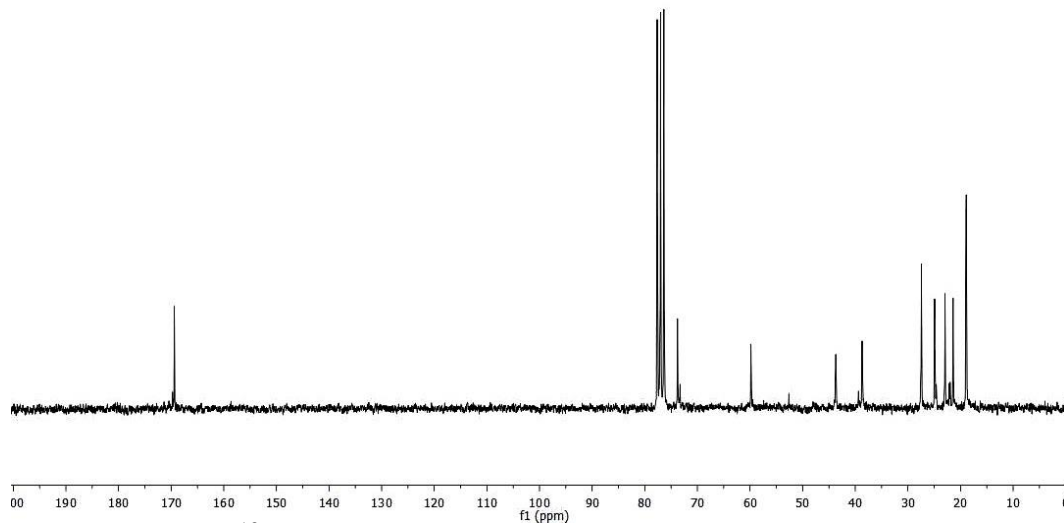
Slika P39. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pe}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



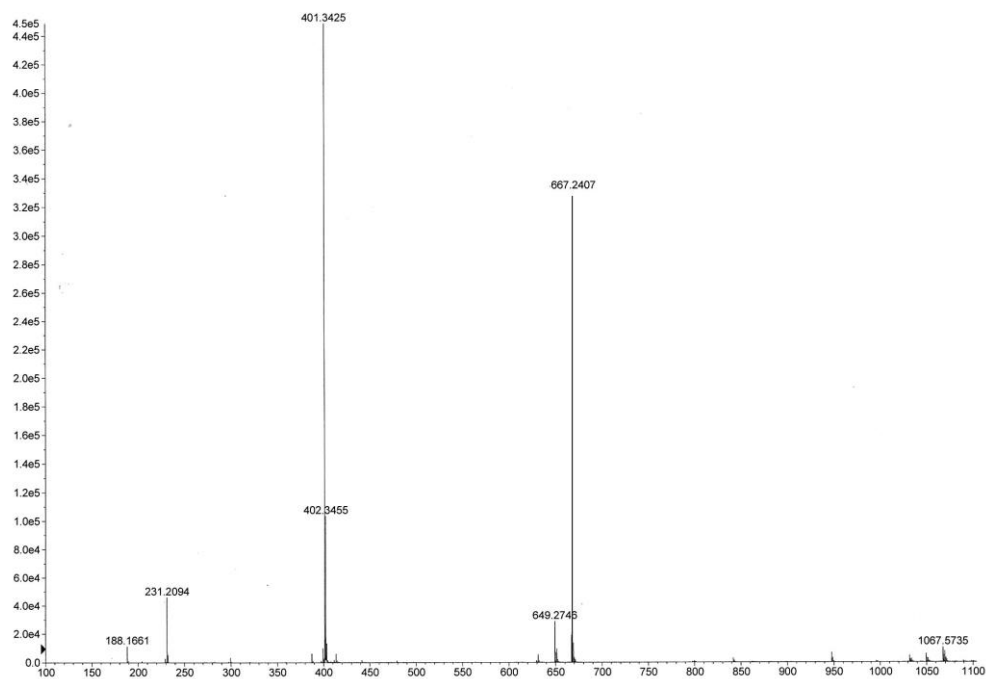
Slika P40. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



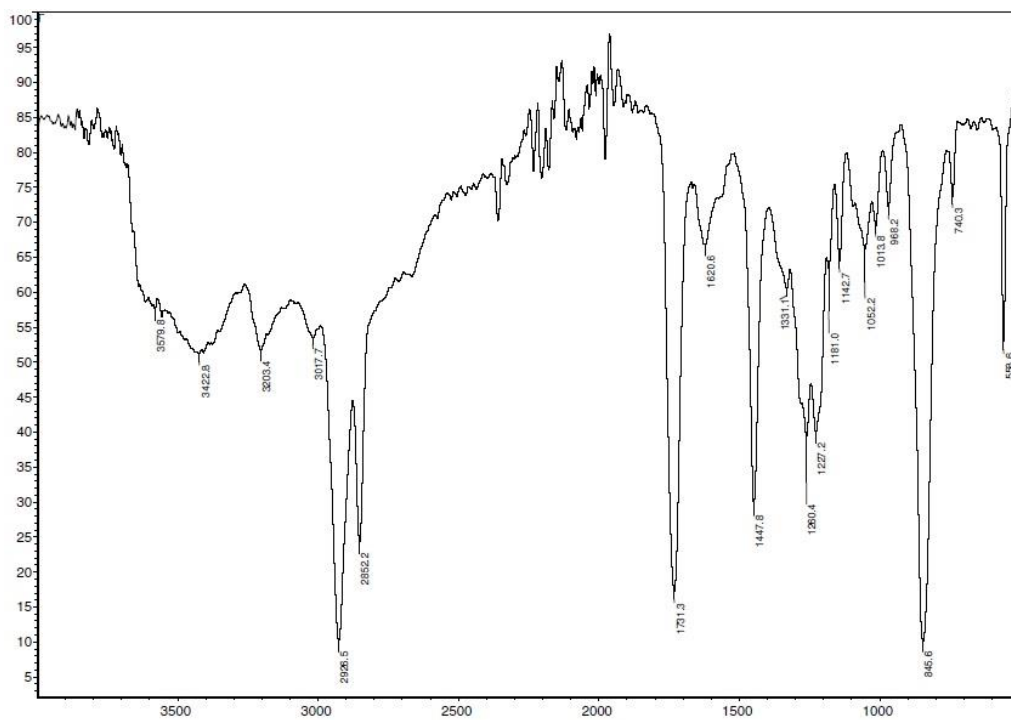
Slika P41. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



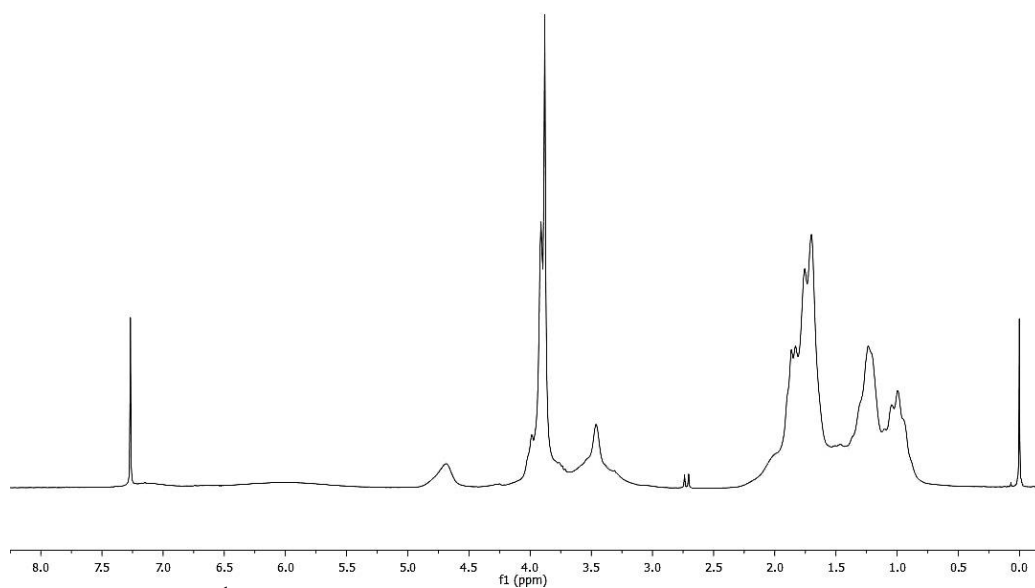
Slika P42. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



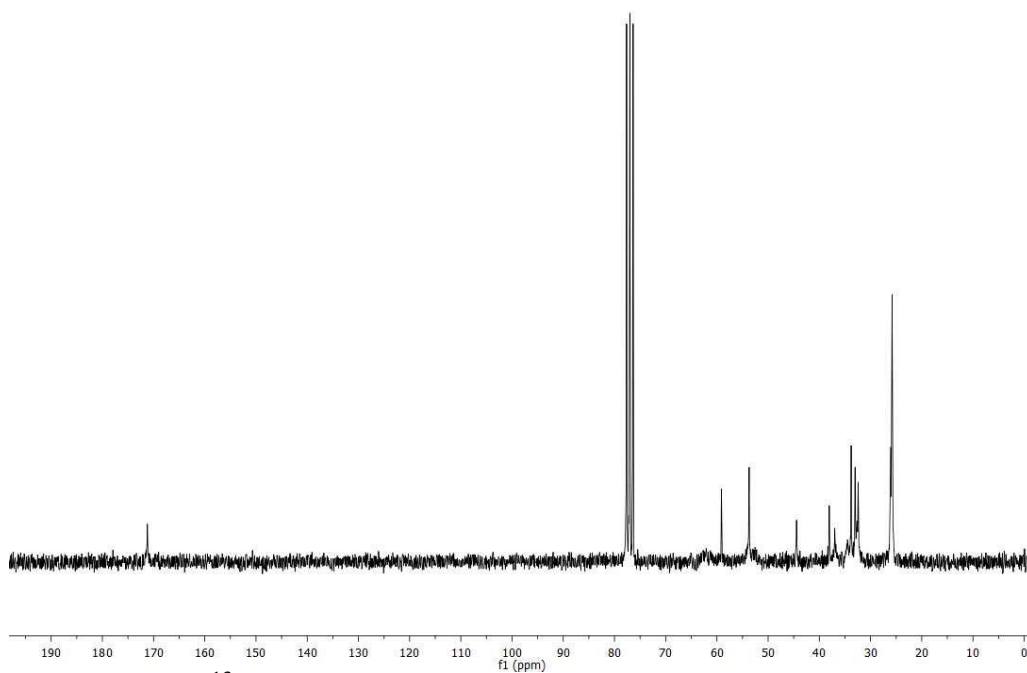
Slika P43. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddl}\}]\text{PF}_6$.



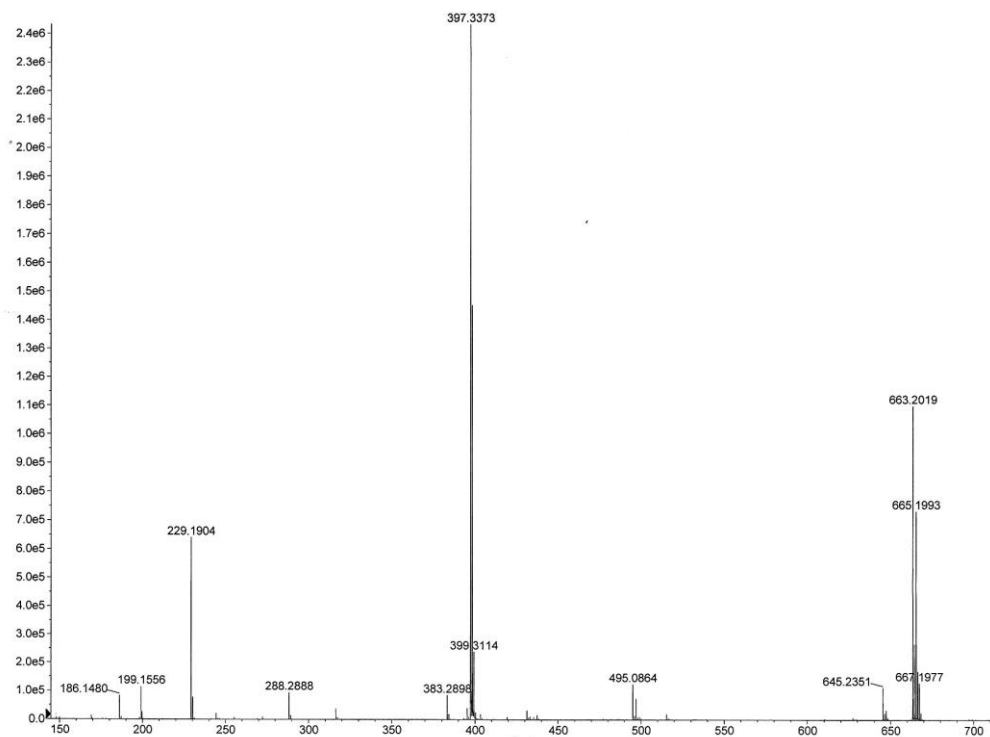
Slika P44. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-Me}_2\text{edch}\}]\text{PF}_6$.



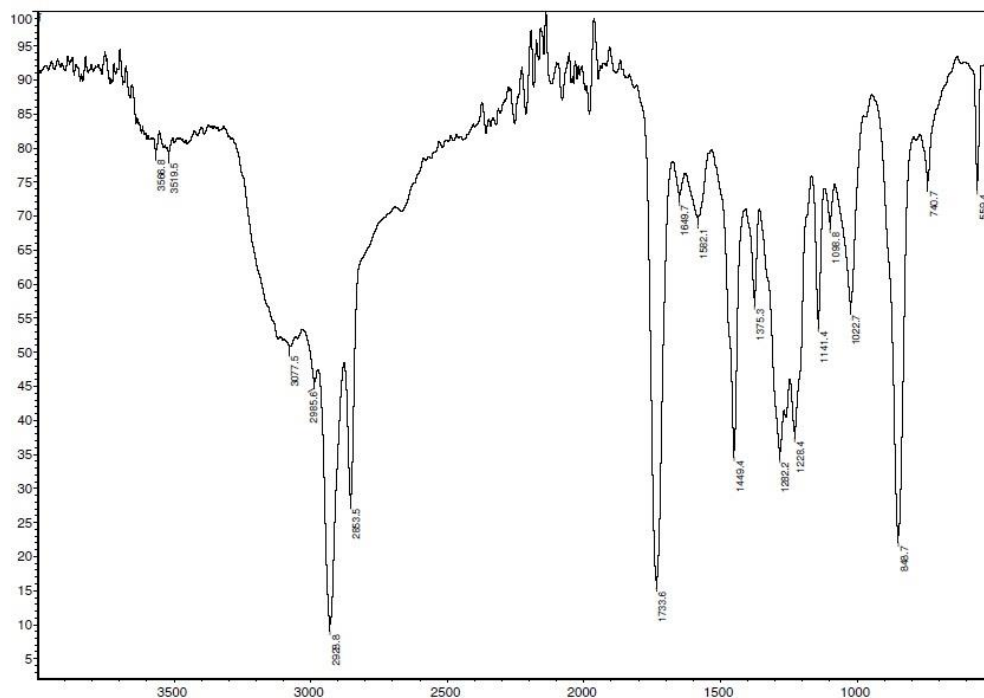
Slika P45. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-Me}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



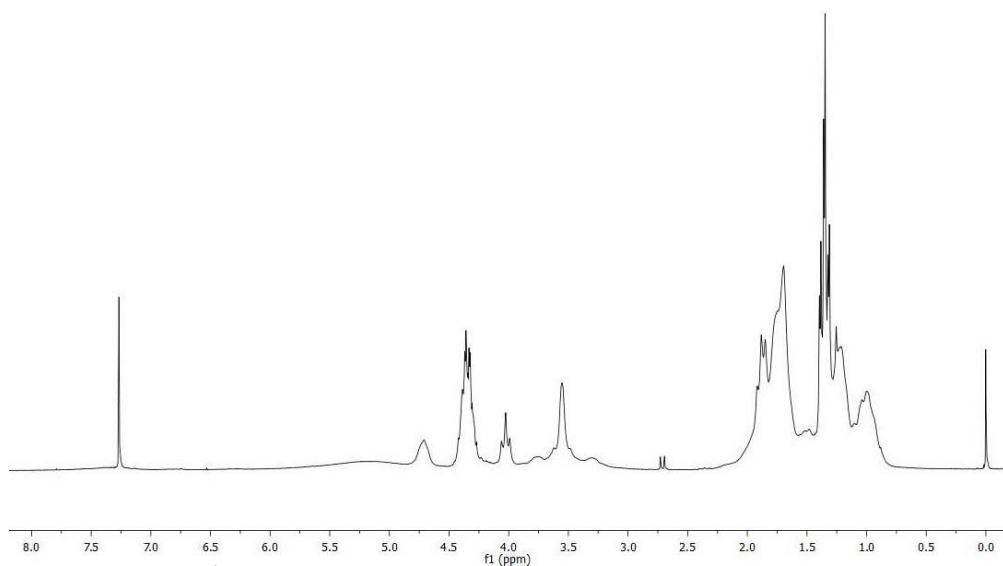
Slika P46. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-Me}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



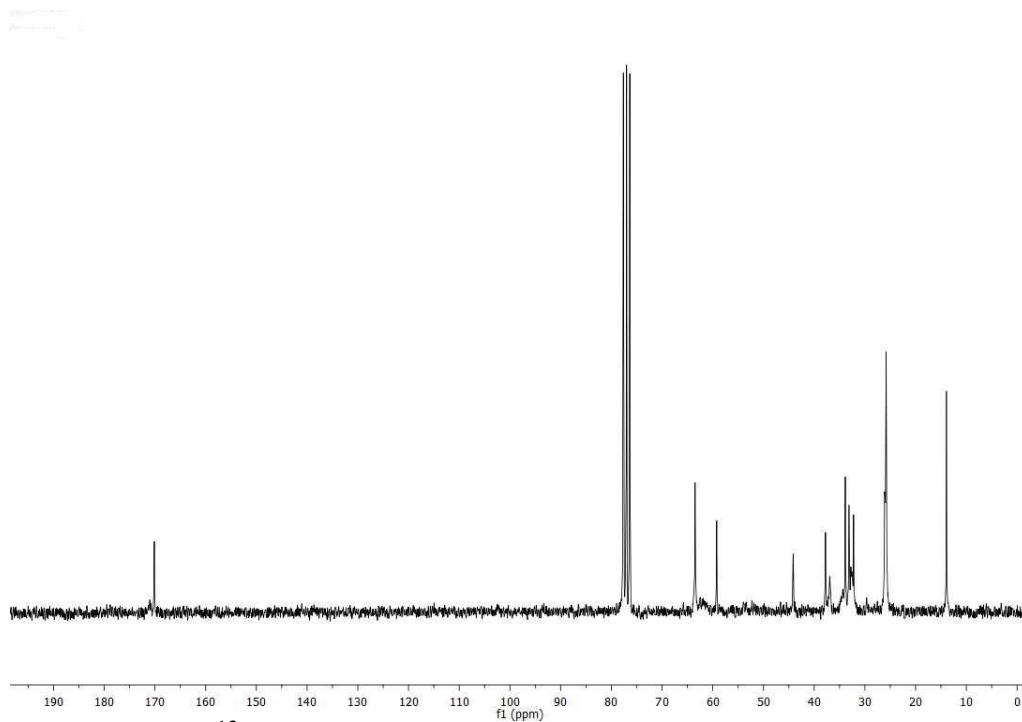
Slika P47. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-Me}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



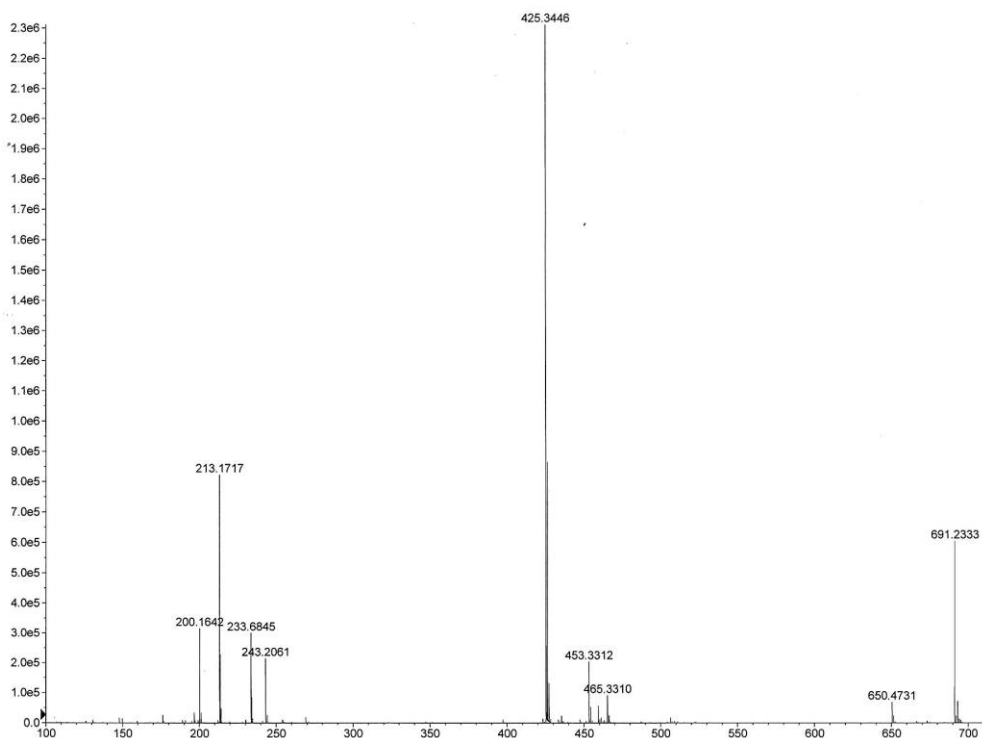
Slika P48. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-Et}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



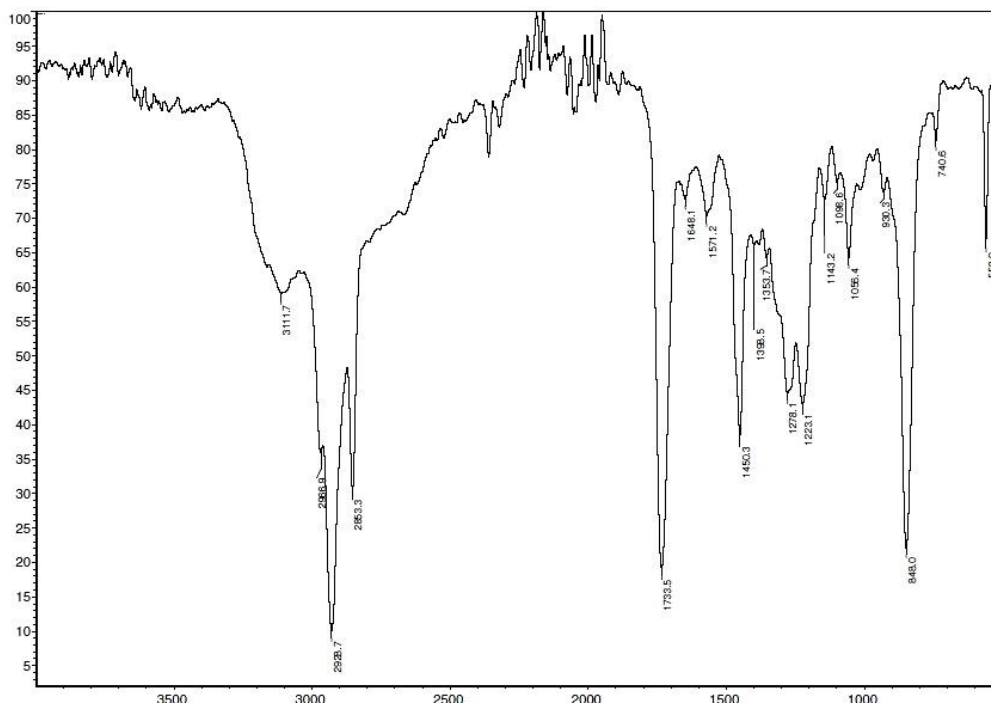
Slika P49. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-Et}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



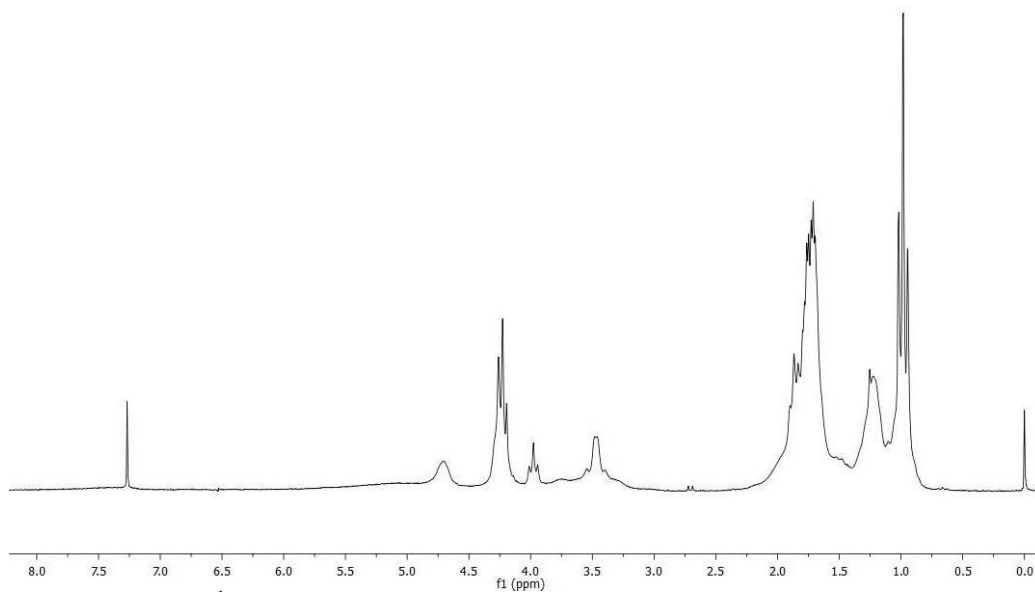
Slika P50. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-Et}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



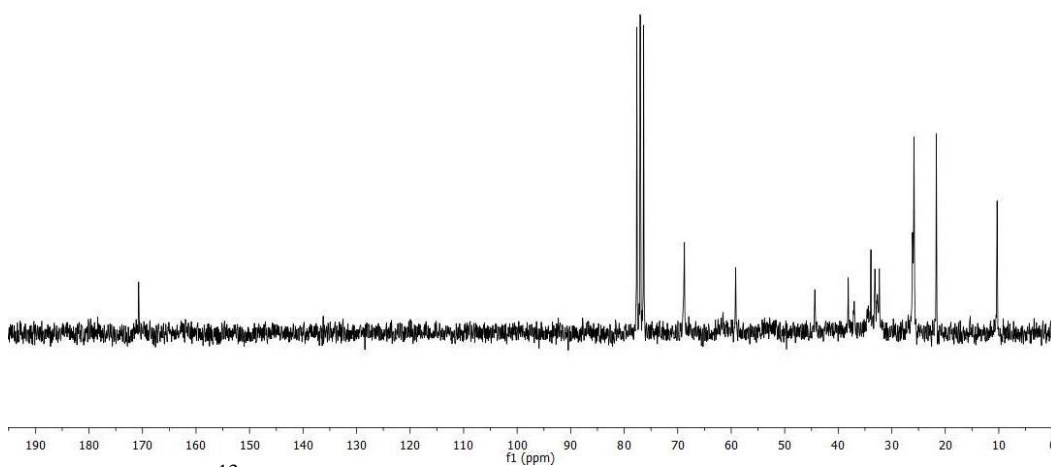
Slika P51. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-Et}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



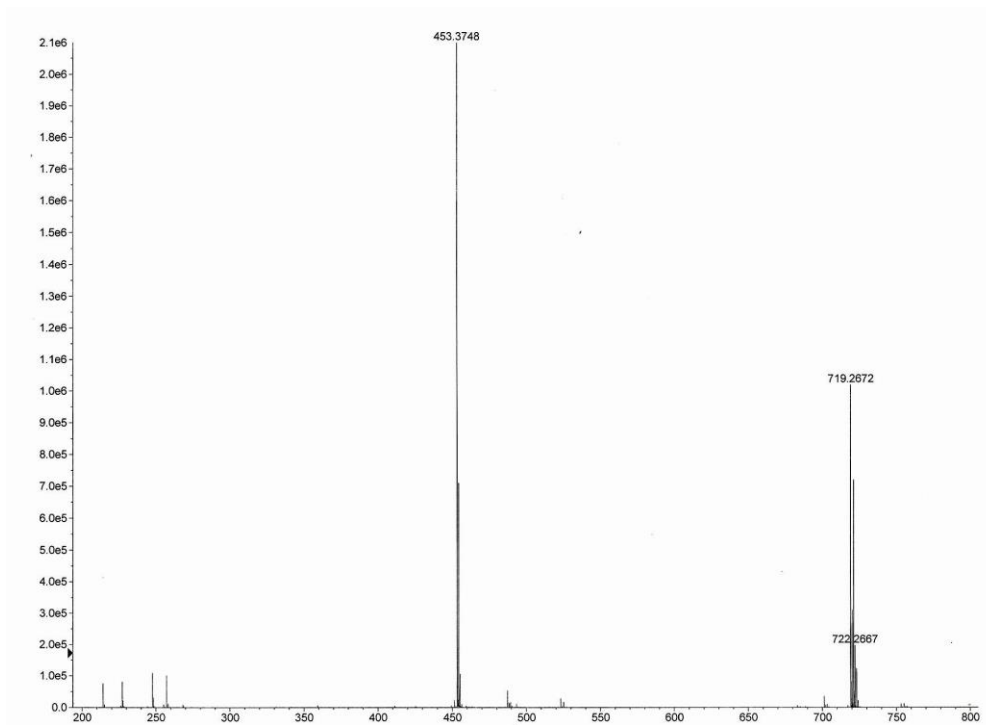
Slika P52. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-nPr}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



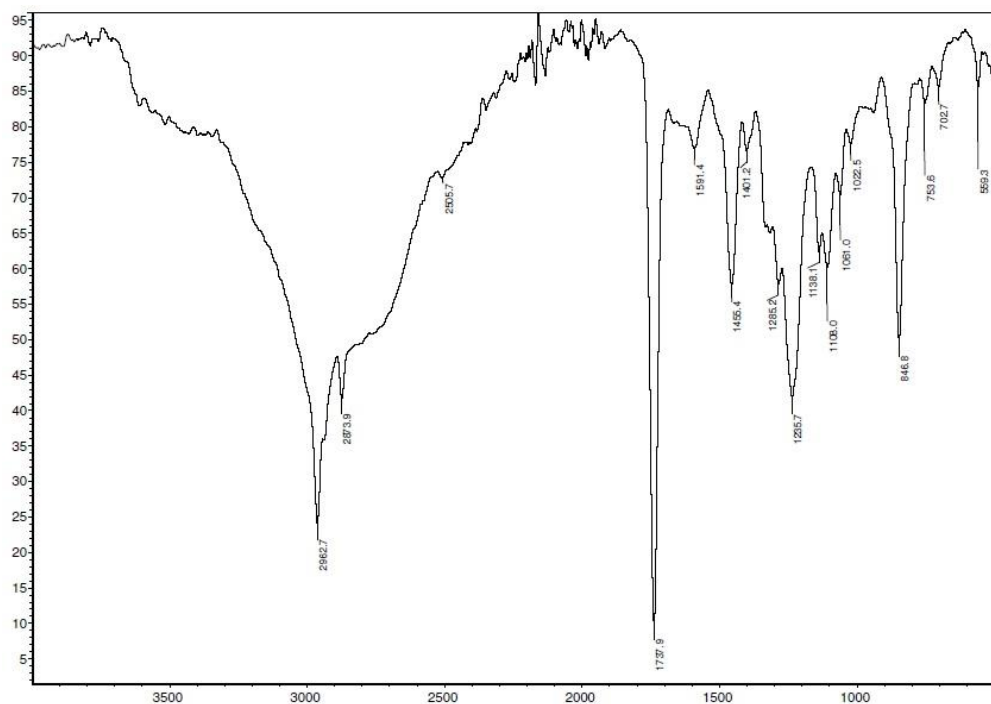
Slika P53. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



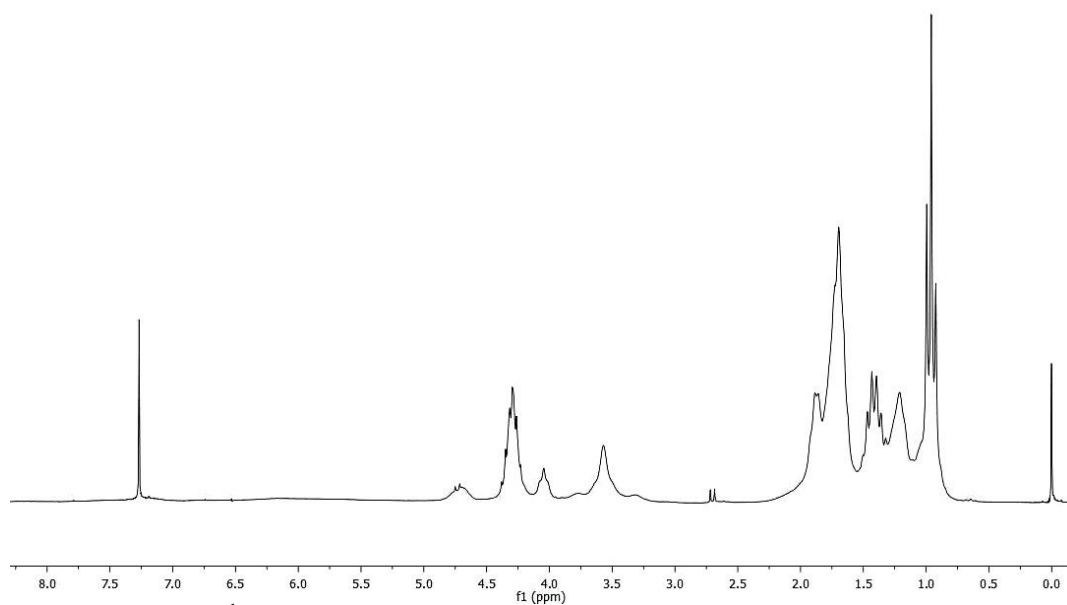
Slika P54. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



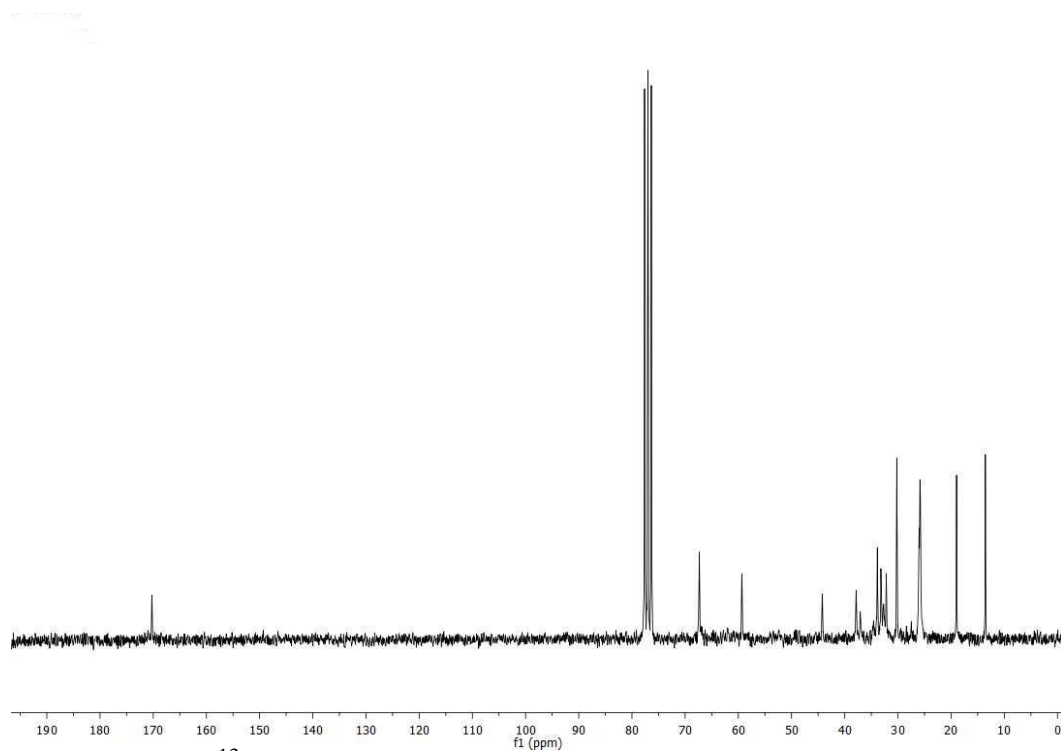
Slika P55. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Pr}_2\text{eddch}}]\text{PF}_6$.



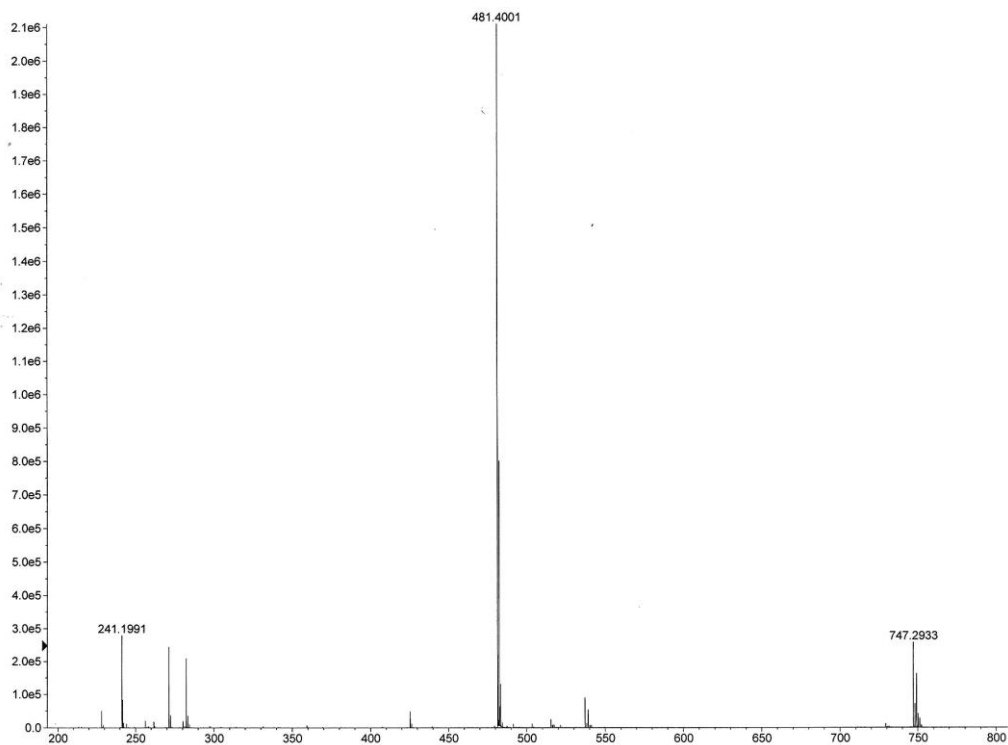
Slika P56. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddch}}]\text{PF}_6$.



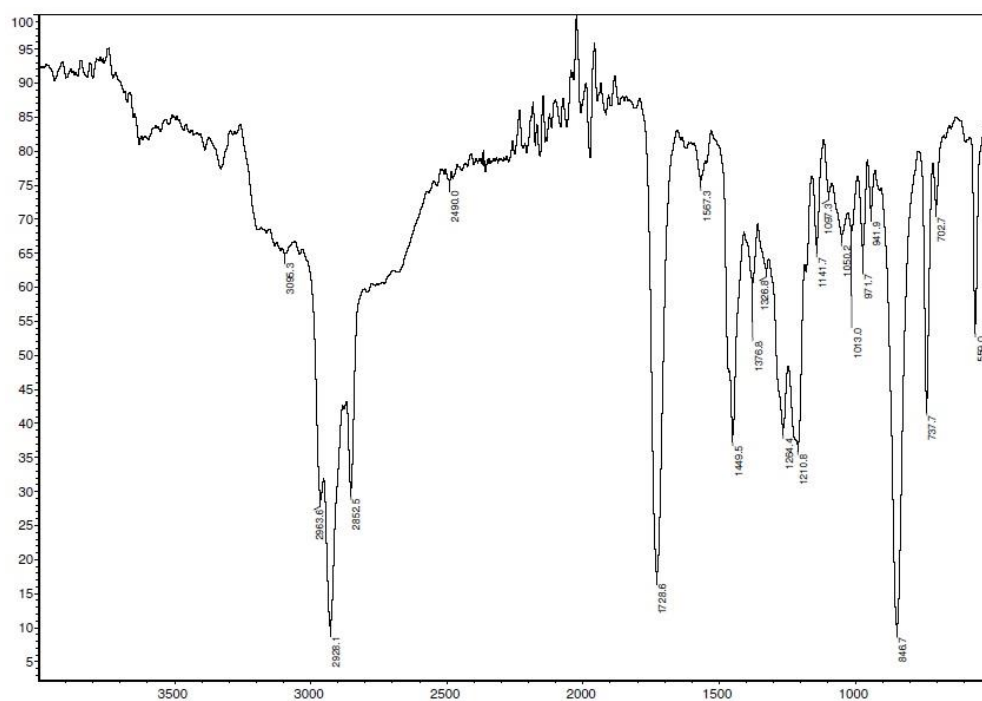
Slika P57. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



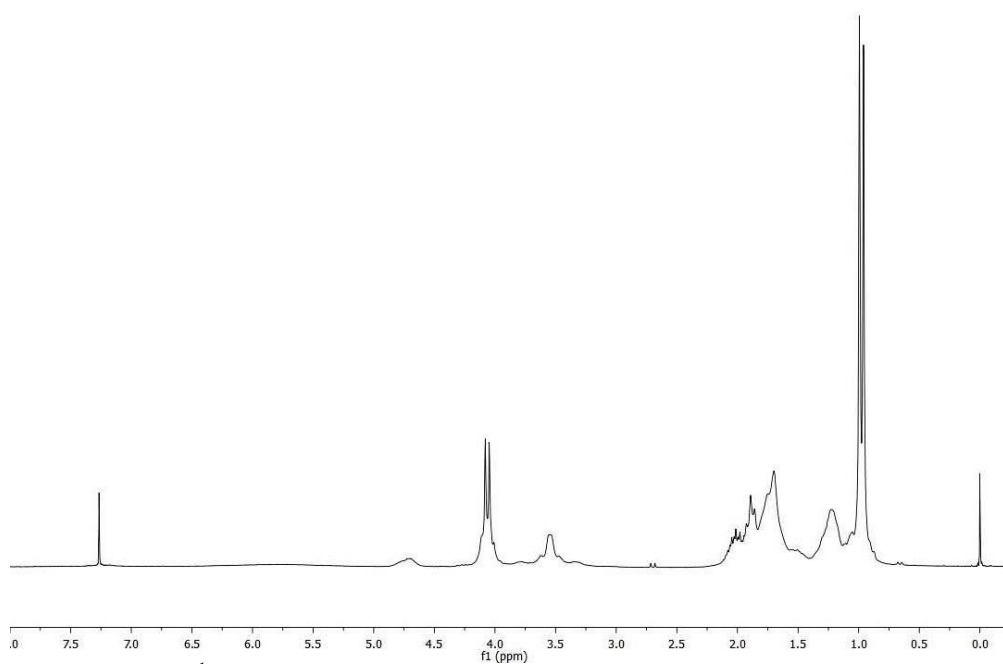
Slika P58. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



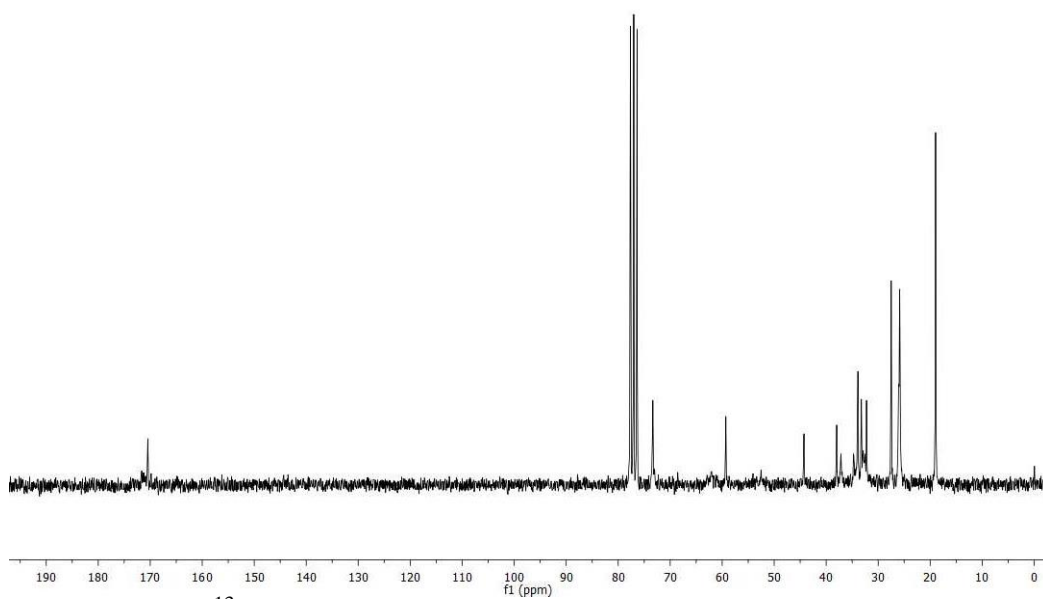
Slika P59. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}n\text{Bu}_2\text{eddch}}]\text{PF}_6$.



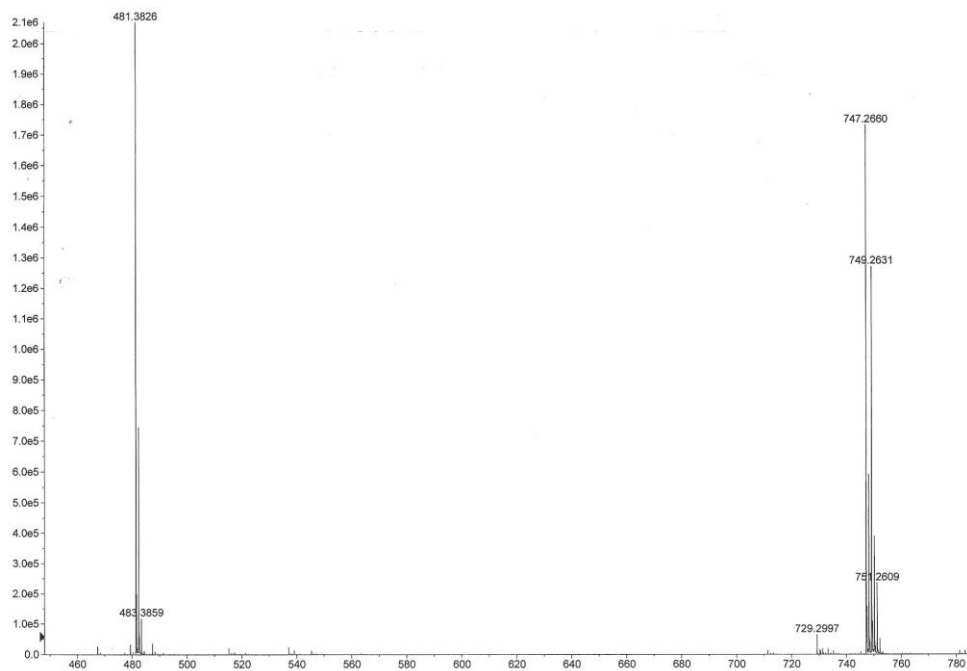
Slika P60. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddch}}]\text{PF}_6$.



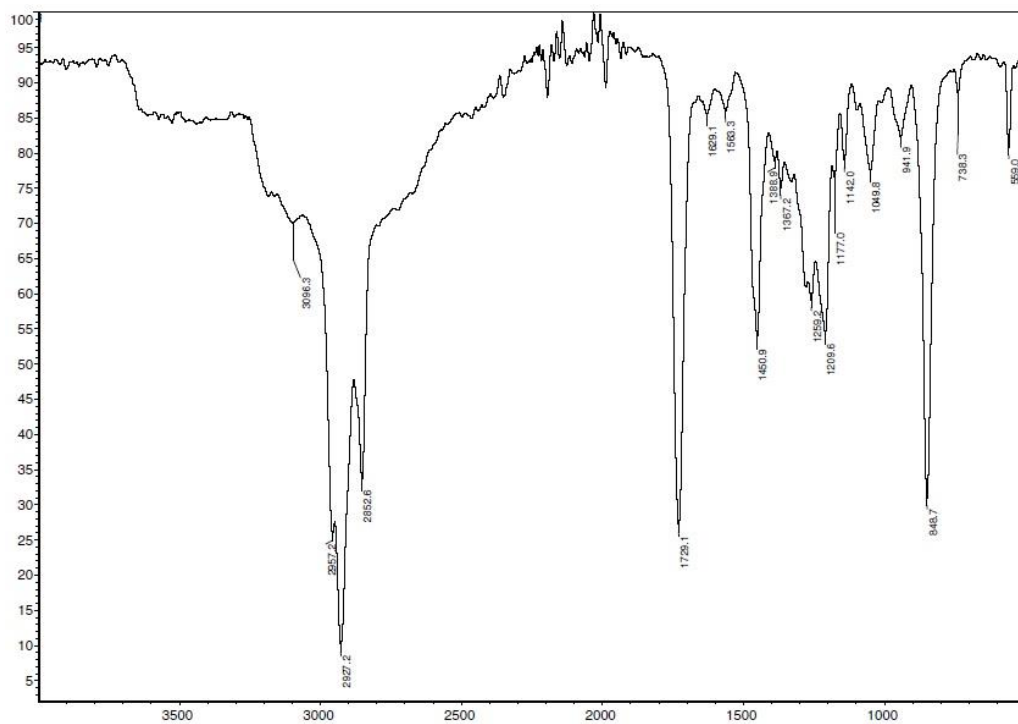
Slika P61. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



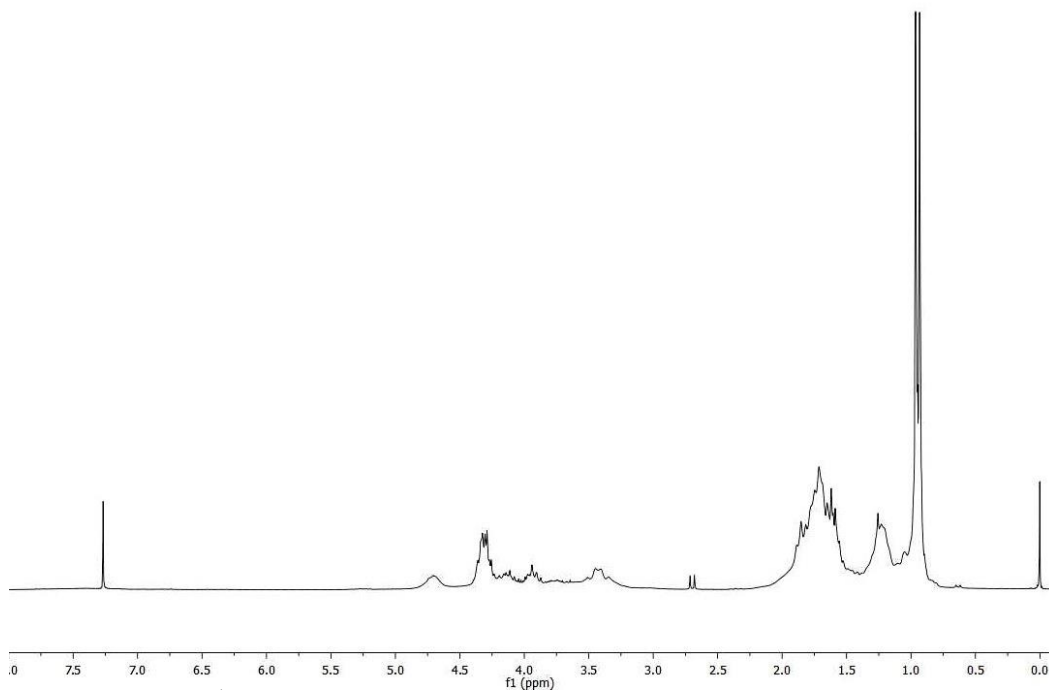
Slika P62. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Bu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



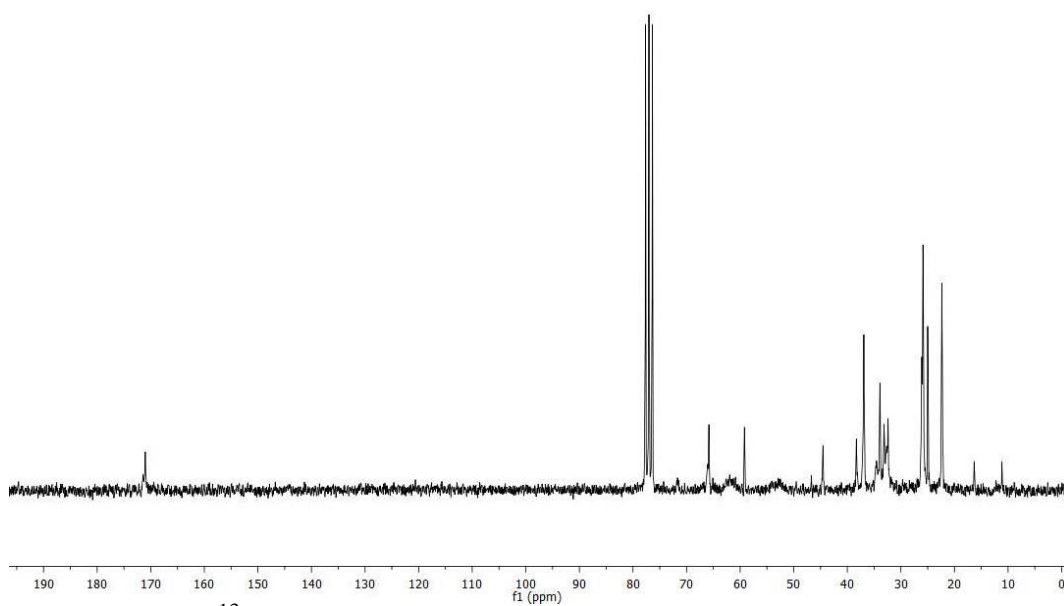
Slika P63. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-iBu}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



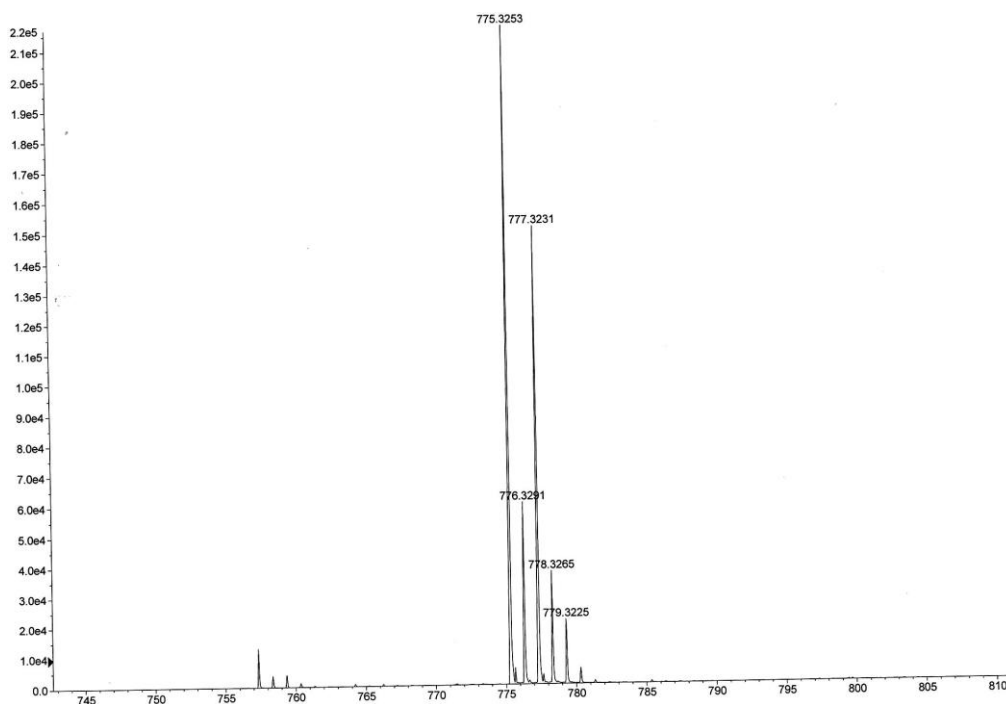
Slika P64. Infracrveni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(\text{S,S})\text{-iAm}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



Slika P65. ^1H NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



Slika P66. ^{13}C NMR spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.



Slika P67. Maseni spektar kompleksa $[\text{AuCl}_2\{(S,S)\text{-}i\text{Am}_2\text{eddch}\}]\text{PF}_6$.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Nebojša Đ. Pantelić, rođen je 20. 06. 1982. godine u Kruševcu, gde je i završio osnovu i srednju Hemijsko-tehnološku školu. Na Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao se 2001. godine. Diplomirao je na istom 2007. godine sa prosečnom ocenom 8,57. Diplomski rad pod nazivom „Primena programskog paketa HYPERQUAD 2006 za izračunavanje nekih ravnotežnih konstanti“ uradio je na Katedri za analitičku hemiju pod rukovodstvom dr Dušanke Milojković-Opsenice i mr Tatjane Verbić i odbranio ga ocenom 10. Doktorske studije, na Katedri za neorgansku hemiju, upisao je školske 2007/2008. god. pod rukovodstvom dr Tibora Saboa, redovnog profesora Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i dr Bojane Zmejkovski, naučnog saradnika Centra za hemiju na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu.

Od marta 2008. godine zaposlen je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu u zvanju saradnika u nastavi na Katedri za hemiju i biohemiju, a oktobra 2010. god. izabran je u zvanje asistenta. Angažovan je na predmetima Hemija, Opšta hemija, Opšta i neorganska hemija, Organska hemija i Osnovi organske hemije na osnovnim akademskim studijama, kao i na predmetu Hemijska analiza vode na specijalističkim studijama.

Objavljeni naučni radovi koji su direktno proistekli iz doktorske disertacije:

1. **N. Pantelić**, T. Stanojković, B.B. Zmejkovski, T.J. Sabo, G.N. Kaluđerović, *In vitro* activity of gold(III) complexes with some esters of (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoic acid, Eur. J. Med. Chem. 90 (2015) 766–774.
2. **N. Pantelić**, B.B. Zmejkovski, T.P. Stanojković, V.V. Jeftić, G.P. Radić, S.R. Trifunović, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, Synthesis and high *in vitro* cytotoxicity of some (*S,S*)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propanoate dihydrochloride esters, J. Serb. Chem. Soc., 79 (2014) 649–658.
3. **N. Pantelić**, B.B. Zmejkovski, J. Trifunović-Macedoljan, A. Savić, D. Stanković, A. Damjanović, Z. Juranić, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, Gold(III) complexes with esters of cyclohexyl-functionalized ethylenediamine-*N,N'*-diacetate, J. Inorg. Biochem. 128 (2013) 146–153.

Rad proistekao iz doktorske disertacije u procesu recenzije:

1. **N. Pantelić**, D. Stanković, B.B. Zmejkovski, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, Electrochemical properties of some gold(III) complexes with (*S,S*)-R₂edda-type ligands.

Ostali naučni radovi:

1. G.N. Kaluđerović, **N. Pantelić**, T. Eichorn, M. Bette, C. Wagner, B.B. Zmejkovski, H. Schmidt, Platinum(II) complexes with R₂edda ligands (R = Me, Et, *n*-Pr; edda = ethylenediamine-*N,N'*-diacetate): Synthesis and characterization, Polyhedron, 80 (2014) 53–59.
2. B.B. Zmejkovski, A. Savić, J. Poljarević, **N. Pantelić**, S. Arandjelović, S. Radulvić, S. Grgurić-Šipka, G.N. Kaluđerović, T.J. Sabo, Synthesis, characterization and *in vitro* antitumor activity of new palladium(II) complexes with (*S,S*)-R₂edda-type esters, Polyhedron, 80 (2014) 106–111.

Rad koji je u procesu recenzije:

1. J. Trifunović-Macedoljan, M. Jadranin, **N. Pantelić**, A. Damjanović Veličković, S. Rašković, M. Nikolić-Đurović, G. Pudar, I. Juranić, Z. Juranić, LD/DAD determination of biogenic amines in serum of patients with *diabetes mellitus*; chronic *urticaria*, or Hashimoto's thyroiditis.

Saopštenja:

1. A. Kostić, T. Petrović, Ž. Tešić, D. Milojković-Opsenica, M. Barać, S. Stanojević, **N. Pantelić**, M. Pešić, The presence of moulds in honey bee pollen collected in Serbia. 2nd International Congress Food Technology, Quality and Safety; October 28-30, Novi Sad, Serbia, 2014. Program i zbornik radova, P95.
2. **N. Pantelić**, B.B. Zmejovski, A. Kostić, G.N. Kaluđerović, T. Sabo, Synthesis and characterization of a gold(III) complex with isoamyl ester of (S,S)-ethylenediamine-*N,N'*-di-2-propionic acid. 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries; June 27-29, Belgrade, Serbia, 2013. Program i zbornik radova, BS-Cy P03.
3. A. Kostić, M. Pešić, S. Žilić, Ž. Tešić, D. Milojković – Opsenica, M. Barać, S. Stanojević, Č. Lačnjevac, **N. Pantelić**, Total antioxidative capacity of some honey bee pollen collected in Serbia. 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries; June 27-29, Belgrade, Serbia, 2013. Program i zbornik radova, F P19.
4. A.Z. Kostić, M.B. Pešić, M.B. Barać, **N. Pantelić**, O.D. Maćej, Partial concentration of whey and milk protein concentrate solutions by polyacrylic hidrogels. 24th International Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry; September 25-28, Sarajevo, 2013. Program i zbornik radova, P103.
5. J. Trifunović-Macedoljan, **N. Pantelić**, A. Damjanović, B. Kolundžija, I. Matić, M. Đorđić, S. Grgurić-Šipka, T. Sabo, Z. Juranić, Anticancer activity

of newly synthesized Au(III) complexes. 49. Kancerološka nedelja, 29. novembar-1. decembar, Beograd, 2012. Program i zbornik radova, P9.

6. **N. Pantelić**, Sythesis and characterization of a gold(III) complex with R₂edda type ligand, Prva konferencija mladih hemičara, 19-20. Oktobar, Beograd, 2012. Program i zbornik radova, P11.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Небојша Ђ. Пантелић
број индекса ДХ 24/2007

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Синтеза, карактеризација и цитотоксичност комплекса
злата(III) са естрима R₂edda-типа

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

Потпис докторанда

У Београду, 04.03.2015.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Небојша Ћ. Пантелић

Број индекса ДХ 24/2007

Студијски програм Доктор хемијских наука

Наслов рада Синтеза, карактеризација и цитотоксичност комплекса злата(III) са естрима R₂edda-типа

Ментори др Тибор Сабо

др Бојана Змејковски

Потписани Небојша Ћ. Пантелић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 04.03.2015.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Синтеза, карактеризација и цитотоксичност комплекса
злата(III) са естрима R₂edda-типа

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 04.03.2015.
