

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Марија С. Јеремић

СИНТЕЗА И БИОЛОШКА АКТИВНОСТ Rh(III) КОМПЛЕКСА СА ЛИГАНДИМА ПОЛИАМИНОПОЛИКАРБОКСИЛАТНОГ ТИПА

Докторска дисертација

Ментор: др Зоран Д. Матовић, редовни професор

Крагујевац, 2019

	І. Аутор		
Име и презиме:	Марија Јеремић		
Датум и место рођења:	15.09.1984., Крагујевац		
Садашње запослење:	Истраживач-сарадник		
Наслов:	Синтеза и биолошка активност Rh(III) комплекса		
	са лигандима полиаминополикарбоксилатног типа		
П. До	кторска дисертација		
Број страница:	122		
Број слика:	49		
Број библиографских података:	233		
Установа и место где је рад	Природно-математички факултет, Крагујевац		
израђен:			
Научна област (УДК):	Хемија(54) – Неорганска хемија(546)		
Ментор:	Проф. др Зоран Д. Матовић		
II	I. Оцена и одбрана		
Датум и пријава теме:	11. 10. 2017. године.		
Број одлуке и датум прихватања	Наставно-научно веће Природно-математичког		
докторске дисертације:	факултета:		
	Веће за природно-математичке науке		
	Универзитета у Крагујевцу:		
Varia da avere da activativ	1 Ja Zoney I Meropyte never unchasen		
комисија за оцену подобности	Г. др зоран д. Матовин, редовни професор		
теме и кандидата.	Природно-математички факултет		
	Ука научна област: Неорганска хемија		
	2 Пр Верина Јертић, поцент		
	Природно-математицки факултет		
	Универзитет у цригујевцу Ужа научна област: Неорганска хемија		
	3 Лр Матија Зпатар, научни саралник		
	Институт за хемију технологију и металургију		
	Универзитет у Београду		
	Научна област: Хемија		
Комисија за оцену и одбрану	1. Лр Ратомир Јелић, редовни професор –		
докторске дисертаније:	председник комисије		
Construction description	Факултет мелицинских наука		
	Универзитет у Крагујевцу		
	Ужа научна област: Неорганска хемија		

	2. Др Биљана Глишић, доцент
	Природно-математички факултет
	Универзитет у Крагујевцу
	Ужа научна област: Неорганска хемија
	3. Др Матија Златар, виши научни сарадник
	Институт за хемију, технологију и металургију
	Универзитет у Београду
	Научна област: Хемија
Датум одбране дисертације:	2019. године

Посвећено

тати и мами

ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација рађена је у Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу (део је пројекта који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Пројекат: III41010)) под менторским руководством др Зорана Д. Матовића, редовног професора, који је и предложио тему за овај рад. Искрено се захваљујем ментору на позиву да постанем део његове истраживачке групе, као и на идејама, саветима, указаној помоћи и подрици током писања свих радова, а напослетку и ове докторске дисертације.

Захваљујем се члановима комисије др Биљани Глишић, др Ратомиру Јелићу и др Матији Златару на доприносу који су дали својим сугестијама и саветима приликом писања ове дисертације.

Захваљујем сарадницама проф. Матовића, а мојим "ратним" друговима: др Емини Мркалић, др Марини Ћендић Серафимовић, Маји Ђукић и др Светлани Белошевић, које су својим присуством улепшале и олакшале мој рад у лабораторији. Хвала вам на помоћи, подршци, разговорима, јутарњим кафама и непрестаном смејању. Желим да знате да бих вас опет бирала за своје "цимерке". Такође, новим члановима "екипе" Марку Радовановићу и Игњату Филиповићу на другарству током ових неколико месеци.

Захваљујем се свим колегама Института за хемију на подршци и пријатељству.

Хвала мом пријатељу Слободану Николићу на искреном пријатељству, разговорима, заједничким журкама, кафанама и "рамену за плакање" када је било тешко.

Напослетку, највећу захвалност дугујем својој породици. Родитељима, јер су ми омогућили образовање, пружили неизмерну љубав, на васпитању које су ми усадили, на подршци и стрпљењу током свих ових година мог постојања и јер су ме научили да будем самостална и следим свој пут; извините ако сам некад била својеглава. Брату Миљану, мом највећем богатству, кога волим највише на свету. Мојим малим братанцима Вуку и Вањи, који су употпунили мој живот. Снајки, као неизоставном члану овог "клана". И наравно, мојим теткама, ујацима, браћи и сестрама који су оплеменили мој живот.

Ваша Марија

САДРЖАЈ

СКРАЋЕНИЦЕ

СПИСАК СЛИКА

СПИСАК ШЕМА

СПИСАК ТАБЕЛА

ИЗВОД

SUMMARY

1.	ОПШТИ ДЕО	1
1.1	Аминополикарбоксилатне киселине као лиганди	1
1.1.1	Аминополикарбоксилатне киселине у координационој хемији и медицини	1
1.1.2	Добијање аминополикарбоксилатних лиганада	2
1.1.3	Структурне варијације аминополикарбоксилатних лиганада	4
1.1.4	Геометријска изомерија хексадентатних аминополикарбоксилатних комплекса	5
1.1.5	Геометријска изомерија пентадентатних аминополикарбоксилатних комплекса	7
1.2	Стереохемија родијум(III) комплекса	9
1.3	Примена метала у медицини и лечењу туморских болести	11
1.4	Биолошка активност родијум(III) комплекса	15
1.5	Компјутерска хемија	21
1.5.1	Молекулска механика (ММ)	21
1.5.2	Квантна механика (QM)	24
1.5.2.1	Ab-initio	24

1.5.2.2	Теорија функционала густине (DFT = Density Functional Theory)	25
1.5.2.3	Семи-емпиријске методе	26
1.5.2.4	Мелер-Плесетове методе	27
1.5.3	Teopuja природних везивних орбитала (Natural Bond Orbital Analysis - NBO)	27
2.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	29
2.1	Хемикалије и реагенси	29
2.2	Синтезе комплекса	29
2.2.1	Добијање <i>cis</i> -equatorial-[аква(етилендиамин- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> '-триацетато)	
	родијум(III)] хидрата, [Rh(ed3a)(H ₂ O)]·H ₂ O (1)	30
2.2.2.	Добијање <i>cis</i> -equatorial-натријум[(етилендиамин-N,N,N'-триацетато)	
	хлоридо родат(III)] хидрата, Na[Rh(ed3a)Cl]·H ₂ O (2)	30
2.2.3	Добијање <i>cis</i> -polar-[аква(1,3-пропандиамин- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> '-триацетато)	
	родијум(III)] дихидрата, [Rh(1,3-pd3a)(H ₂ O)]·2H ₂ O (3)	31
2.2.4	Добијање <i>cis</i> -polar-натријум[(етилендиамин- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> '-триацетато)	
	хлоридородат(III)] дихидрата, Na[Rh(1,3-pd3a)Cl]·2H ₂ O (4)	31
2.2.5	Добијање <i>trans</i> (O ₅ O ₆)-натријум[(етилендиамин-N,N'-диацетато-N,N'-	
	ди-3-пропионато)родат(III)] тетрахидрата, Na[Rh(eddadp)]·4H ₂ O (5)	32
2.3	Елементална микроанализа	32
2.4	Тачка топљења	32
2.5	Инфрацрвени спектри	33
2.6	Електронски апсорпциони спектри	33
2.7	NMR спектри (¹ Н и ¹³ С)	33
2.8	Мерења у растворима	33

2.8.1	Потенциометријске титрације	33
2.8.2	Спектрофотометријска мерења	35
2.9	Рендгенске структурне анализе	36
2.9.1	Рендгенска структурна анализа за <i>cis</i> -equatorial-[Rh(ed3a)(H ₂ O)]·H ₂ O комплекс (1)	36
2.9.2	Рендгенска структурна анализа за <i>cis</i> -equatorial-Na[Rh(ed3a)Cl]·H ₂ O комплекс (2)	37
2.9.3	Рендгенска структурна анализа за <i>cis</i> -polar-Na[Rh(1,3-pd3a)Cl]·2H ₂ O комплекс (4)	38
2.9.4	Рендгенска структурна анализа за <i>trans</i> (O ₅ O ₆)-Na[Rh(eddadp)]·4H ₂ O (5)	38
2.10	Однос изомера хексадентатних комплекса у воденом раствору	39
2.11	Биолошки тестови	40
2.11.1	МТТ тест	40
2.11.2	Ћелијски третман за студију апоптозе	41
2.11.2.1	Annexin V-FITC/7-AAD и Annexin-V-FLUOS (Annexin V-FITC/PI) тестови проточне цитометрије	42
2.11.2.2	Акридин-оранж/етидијум-бромид (АО/ЕВ) тест флуоресцентне микроскопије	43
2.11.2.3	Western blot анализа	43
2.11.2.4	Анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом	44
2.12	Компјутерске методе	44
2.12.1	DFT прорачуни	44
2.12.2	NBO анализа	45

2.12.3	Докинг метода	46
3.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	49
3.1	Синтеза и молекулске структуре синтетисаних једињења	49
3.1.1	Добијање полиаминополикарбоксилатних лиганада и одговарајућих комплекса родијума(III)	49
3.1.2	Молекулска структура <i>cis</i> -equatorial-[Rh(ed3a)(H ₂ O)]·H ₂ O комплекса (1)	52
3.1.3	Молекулска структура <i>cis</i> -equatorial-Na[Rh(ed3a)Cl]·H ₂ O комплекса (2)	54
3.1.4	Молекулска структура <i>cis</i> -polar-Na[Rh(1,3-pd3a)Cl]·2H ₂ O комплекса (4)	56
3.1.5	Молекулска структура <i>trans</i> (O ₅ O ₆)-Na[Rh(eddadp)]·4H ₂ O комплекса (5)	57
3.2	Спектрална анализа синтетисаних комплекса	59
3.3	Структурни параметри и анализа напона комплекса родијума(III) у односу на њихову геометрију	65
3.3.1	Анализа напона пентадентатних Rh(III) комплекса	66
3.3.2	Анализа напона хексадентатних Rh(III) комплекса	67
3.4	Испитивања у растворима	69
3.4.1	Константе протоновања лиганада	69
3.4.2	Константе формирања комплекса Rh ³⁺ са ed3a ³⁻ и 1,3-pd3a ³⁻ лигандима	71
3.4.2.1	Потенциометријске титрације	71
3.4.2.2	Спектрофотометријске титрације	72
3.5	In vitro антитуморска активност комплекса и лиганада	77

3.5.1	МТТ тест	77
3.5.2	Типови ћелијске смрти и начини одређивања	79
3.5.2.1	Детекција апоптозе Annexin-V тестовима проточне цитометрије	80
3.5.2.2	Акридин-оранж/етидијум-бромид (АО/ЕВ) тест флуоресцентне микроскопије	82
3.5.2.3	Western blot анализа	84
3.5.2.4	Анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом	86
3.6	Компјутерске методе	88
3.6.1	Квантна механика (QM)	88
3.6.2	NBO анализа	94
3.6.3	Докинг молекулска симулација	100
4.	ЗАКЉУЧАК	103
5.	ЛИТЕРАТУРА	107
БИОГРАС	БИОГРАФИЈА	
СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА		

СКРАЋЕНИЦЕ

Å	ангстрем
ALA	аланин
AM1	Austin Model 1
AO	акридин-оранж
GLN	глутамин
GLU	глутаминска киселина
G	хелатни прстенови у октаедарској равни
D_{4h}	тетрагонално лигандно поље
DMEM	Дулбеков модификовани игл медијум
DMPE	bis(1,2-диметил-фосфино)етан
днк	дезоксирибонуклеинска киселина
DOX	Доксорубицин
DFT	Density Functional Theory (Теорија функционала густине)
EB	етидијум-бромид
IR	инфрацрвена спектроскопија
IC ₅₀	концентрацију једињења која је неопходна за 50% инхибиције <i>in vitro</i>
К	Келвин
КБ	координациони број
LCAO	Linear Combination of Atomic Orbitals (линеарна комбинација атомских
	орбитала)
LYS	лизин
MM	молекулска механика
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум бромид
NBO	Natural Bond Orbital (природна везивна орбитала)
NCE	Natural Coulomb Electrostatics (природна Кулонова енергетска анализа)
NLMO	Natural Localized Molecular Orbital (природна локализована молекулска
	орбитала)
NPA	Natural Population Analysis (Природна популациона анализа)
Oh	октаедарско кристално поље
PBS	phosphate-buffered saline (фосфатни пуфер)

PVDF	поливинилиден-дифлуорид
PDB	Protein Data Bank (Протеинска банка података)
PM6	параметријски метод б
PI	пропидијум-јодид
PNBO	pre-orthogonal Natural Bond Orbital
PS	фосфатидил-серин
R	хелатни прстенови ван октаедарске равни
ROS	Reactive Oxygen Species
Spy	square pyramidal (квадратно-пирамидална геометрија)
TSP	триметил-силил пропанска киселина
UV-Vis	ултраљубичаста видљива спектроскопија
FBS	фетални говеђи серум
FITC	флуоресцеин-изотиоцијанат
HIV	Human Immunodeficiency Virus (вирус хумане имунодефицијенције)
HSA	хумани серум албумина
H ₂ edda	етилендиамин- <i>N</i> , <i>N</i> '-дисирћетна киселина
H ₂ edap	етилендиамин-N-ацетато-N'-3-пропионска киселина
H ₂ eddp	етилендиамин-N,N'-ди-3-пропионска киселина
H ₂ 1,3-pdda	1,3-пропандиамин- <i>N</i> , <i>N</i> '-дисирћетна киселина
H ₃ ed3a	етилендиамин- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> '-трисирћетна киселина
H ₃ eddap	етилендиамин-N,N'-диацетато-N-3-пропионска киселина
H ₃ edadp	етилендиамин-N-ацетато-N,N'-ди-3-пропионска киселина
H ₃ ed3p	етилендиамин-N,N,N'-три-3-пропионска киселина
H ₃ 1,3-pd3a	1,3-пропандиамин- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> '-трисирћетна киселина
H ₄ edta	етилендиамин- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> ', <i>N</i> '-тетрасирћетна киселина
H ₄ ed3ap	етилендиамин-N,N,N'-триацетато-N'-3-пропионска киселина
H ₄ eddadp	етилендиамин-N,N'-диацетато-N,N'-ди-3-пропионска киселина
H ₄ - <i>u</i> -eddadp	несиметрична етилендиамин- <i>N</i> , <i>N</i> '-диацетато- <i>N</i> , <i>N</i> '-ди-3-пропионска
	киселина
H ₄ eda3p	етилендиамин-N-ацетато- N,N',N'-три-3-пропионска киселина
H ₄ edtp	етилендиамин- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> ', <i>N</i> '-тетрапропионска киселина

H41,3-pdta	1,3-пропандиамин- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> ', <i>N</i> '-тетрасирћетна киселина
H41,3-pd3ap	1,3-пропандиамин- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> '-триацетато- <i>N</i> '-3-пропионска киселина
H ₄ 1,3-pddadp	1,3-пропандиамин- <i>N</i> , <i>N</i> '-диацетато- <i>N</i> , <i>N</i> '-ди-3-пропионска киселина
H ₄ - <i>u</i> -1,3-pddadp	несиметрична 1,3-пропандиамин- <i>N</i> , <i>N</i> '-диацетато- <i>N</i> , <i>N</i> '-ди-3-пропионска
	киселина
H41,3-pda3p	1,3-пропандиамин- <i>N</i> -ацетато- <i>N</i> , <i>N</i> ', <i>N</i> '-три-3-пропионска киселина
H ₄ 1,3-pdtp	1,3-пропандиамин- <i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> ', <i>N</i> '-тетрапропионска киселина
QM	квантна механика
¹ HNMR	протонска нуклеарна магнетна резонанца
¹³ CNMR	згљеник-13 нуклеарна магнетна резонаца
7-AAD	7-аминоактиномицин D
3	молски коефицијент апсорптивности (dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹)
λ	таласна дужина
v	таласни број
Ĥ	Хамилтонијанов оператор
Ψ	таласна функција
∇	Laplas-ов оператор

СЛИКЕ

Слика 1.	Општа формула аминополикарбоксилатних киселина са датим могућим комбинацијама прстенова	2
Слика 2.	Приказ могућих хромофора аминополикарбоксилатних лиганада	5
Слика 3.	Геометријски изомеризам хексадентатних [M(edta-тип)] ⁿ⁻ комплекса.	6
Слика 4.	Могући геометријски изомери пентадентатних [M(edta-тип)X] комплекса	7
Слика 5.	Молекулске структуре H ₃ ed3a (a) и H ₃ 1,3-pd3a (б) киселина	8
Слика 6.	Вилијам Хајд Воластон и његово откриће изотоп родијума ¹⁰³ Rh	10
Слика 7.	Структуре комплекса платине са применом у медицини	13
Слика 8.	Структуре Ru(III) комплекса који су у фази клиничког испитивања	14
Слика 9.	Структуре димерних комплекса Rh(II)-карбоксилата и амидата	16
Слика 10.	Структура [Rh(I)(COD)X] комплекса: X = Cl, NH ₃ , acac, PMI, PEI, PIP	17
Слика 11.	Структуре антитуморских Rh(III) комплекса: <i>mer</i> , <i>cis</i> - [RhCl ₃ (DMSO) ₂ (NH ₃)] (a) и <i>mer</i> , <i>cis</i> -[RhCl ₃ (DMSO) ₂ (Im)] (б)	18
Слика 12.	Пиридински и терпиридински Rh(III) комплекси: <i>mer</i> , <i>cis</i> - [RhCl ₃ (DMSO)(py) ₂] (a) и <i>mer</i> -[RhCl ₃ (tpy)] (б)	19
Слика 13.	Структуре дихлоридородијум(III) комплексних катјона <i>cis</i> - [RhCl ₂ (3,4,7,8-Me ₄ Phen) ₂] ⁺ (a) и <i>cis</i> -[RhCl ₂ (dppz)(phen)] ⁺ (б)	20
Слика 14.	Молекулско-механичка презентација молекула (force field метода)	22
Слика 15.	Приказ доприноса везивних и невезивних интеракција у молекулској механици поља силе: истезање веза, савијање углова, торзије и невезивне интеракције	23
Слика 16.	Апаратура за потенциометријске титрације	34
Слика 17.	Валидација AutoDock доковања на примеру 109Х	47

Слика 18.	Валидација AutoDock доковања на примеру 1НК1	48
Слика 19.	Синтеза родијум(III) комплекса (1)-(5)	50
Слика 20.	UV-Vis спектри и двоструки хроматограми термодинамичких смеша [M(eddadp)] ⁻ изомера (M = Rh(III), Co(III))	51
Слика 21.	Кристална структура <i>cis</i> -equatorial-[Rh(ed3a)(H ₂ O)] комплекса и кристално паковање дуж <i>a</i> осе	53
Слика 22.	Кристална структура <i>cis</i> -equatorial-[Rh(ed3a)Cl] ⁻ комплексног анјона и кристално паковање дуж <i>b</i> осе	55
Слика 23.	Кристална структура <i>cis</i> -polar-[Rh(1,3-pd3a)Cl] ⁻ комплексног анјона и кристално паковање дуж <i>b</i> осе	57
Слика 24.	Кристална структура <i>trans</i> (O ₅ O ₆)-[Rh(eddadp)] ⁻ комплексног анјона и кристално паковање дуж <i>а</i> осе	58
Слика 25.	Инфрацрвени спектри пентадентатних Rh(III) комплекса: [Rh(ed3a)(H ₂ O)] (1) (a), [Rh(ed3a)Cl] ⁻ (2) (6), [Rh(1,3-pd3a)(H ₂ O)] (3) (b) и [Rh(1,3-pd3a)Cl] ⁻ (4) (г)	59
Слика 26.	Инфрацрвени спектар <i>trans</i> (O ₅ O ₆)-[Rh(eddadp)] ⁻ комплекса	60
Слика 27.	Електронски апсорпциони спектри пентадентатних Rh(III) комплекса: [Rh(ed3a)(H ₂ O)]·H ₂ O (1), Na[Rh(ed3a)Cl]·H ₂ O (2) , [Rh(1,3-pd3a)(H ₂ O)]·2H ₂ O (3), Na[Rh(1,3-pd3a)Cl]·2H ₂ O (4)	61
Слика 28.	Електронски апсорпциони спектри хексадентатних Rh(III) комплекса: $trans(O_5O_6)$ -Na[Rh(eddadp)]·4H ₂ O (5), $trans(O_5)$ -Na[Rh(eddadp)]·2H ₂ O, $trans(O_5O_6)$ -Na[Rh(1,3-pddadp)]·3H ₂ O	63
Слика 29.	¹ Н и ¹³ C NMR спектри комплекса [Rh(ed3a)(H ₂ O)] (1) (a), [Rh(ed3a)Cl] ⁻ (2) (б), [Rh(1,3-pd3a)(H ₂ O)] (3) (b) и [Rh(1,3-pd3a)Cl] ⁻ (4) (г)	64

Дистрибуциони дијаграми протонованих облика лиганада: ed3a ³⁻ (лево) и 1,3-pd3a ³⁻ (десно). Концентрација оба лиганда је 2,0 mM Криве потенциометријских титрација испитиваних система: Rh ³⁺ - ed3a ³⁻ (лево), Rh ³⁺ - 1,3-pd3a ³⁻ (десно) Дистрибуциони дијаграми Rh ³⁺ - ed3a ³⁻ врста у односу концентрација [Rh ³⁺]:[ed3a ³⁻] = 1:3 и са укупном концентрацијом родијума(III) од 2,0 mM добијени потенциометријски (лево) и спектрофотометријски (десно)
Криве потенциометријских титрација испитиваних система: Rh^{3+} - ed3a ³⁻ (лево), Rh^{3+} - 1,3-pd3a ³⁻ (десно) Дистрибуциони дијаграми Rh^{3+} - ed3a ³⁻ врста у односу концентрација [Rh^{3+}]:[ed3a ³⁻] = 1:3 и са укупном концентрацијом родијума(III) од 2,0 mM добијени потенциометријски (лево) и спектрофотометријски (десно)
Дистрибуциони дијаграми Rh^{3+} - ed3a ³⁻ врста у односу концентрација $[Rh^{3+}]:[ed3a^{3-}] = 1:3$ и са укупном концентрацијом родијума(III) од 2,0 mM добијени потенциометријски (лево) и спектрофотометријски (десно)
Листрибущиони лијаграми Rh ³⁺ - 13-рd3а ³⁻ врста у односу
концентрација [Rh]:[1,3-рd3a] = 1:2 и са укупном концентрацијом родијума(III) од 2,0 mM добијени потенциометријски (лево) и спектрофотометријски (десно)
Анализа Annexin V-FITC/7-AAD бојеног теста проточне цитометрије [Rh(ed3a)(H ₂ O)]·H ₂ O (1) и Na[Rh(ed3a)Cl]·H ₂ O (2). Тачкице на дијаграму представљају проценат вијабилних Annexin V ⁻ 7-AAD ⁻ (доњи леви квадрант), рано апоптотичних Annexin V ⁺ 7-AAD ⁻ (доњи десни квадрант), касно апоптотичних Annexin V ⁺ 7-AAD ⁺ (горњи десни квадрант) и некротичних ћелија Annexin V ⁻ 7-AAD ⁺ у нетретираним HeLa ћелијама (контрола) и HeLa ћелијама третираним [Rh(ed3a)(H ₂ O)]·H ₂ O (1) и Na[Rh(ed3a)Cl]·H ₂ O (2)
Проценат специфичне апоптозе HeLa ћелија изазване цисплатином (<i>cis</i> Pt) и тестираним супстанцама после 48 h терапије. Ћелије су обојене са Annexin-V-FLUOS и пропидиум јодидом и анализиране проточном цитометријом. Проценат специфичне апоптозе цисплатине и тестираних једињења израчунава се према референци

- Слика 37. Промене у морфологији НеLa ћелија након третмана визуализоване помоћу AO/EB бојења. Оба комплекса (1) и (2) индуковали су промене типичне за апоптозу. Једра вијабилних ћелија су зелена са организованом структуром, док су једра рано апоптотичних ћелија светло зелена, а једра касно апоптотичних ћелија светло наранџаста до црвена са кондензованим хроматином. Некротичне ћелије имају нормалне морфологије и наранџаста до црвена једра са организованом структуром.....
- Слика 39. Графичка представа дензитометријских података експресије протеина који су добијени Western blot анализом и обрађени помоћу ImageJ <u>http://imagej.nih.gov</u> [184]. Ескпресија протеина који припадају апоптотичком сигналном путу у узорцима упоређена је са нетретираним узорцима и представљена је као проценат контроле. Дензитометрија експресије актина, који служи као унутрашња контрола, приказана је као мерена: 1. Контролни узорак; 2. Доксорубицин; 3. Na[Rh(ed3a)Cl]·H₂O (**2**); 4. [Rh(ed3a)(H₂O)]·H₂O (**1**).
- Слика 40. Анализа ћелијског циклуса. Хистограми представљају дистрибуцију ћелијског циклуса у нетретираним HeLa ћелијама (A) и ћелијама третираним 48 h са комплексима (1) (Б) и (2) (В)

85

86

87

83

Слика 43.	Поређење $\Sigma\Delta(O_h)$ вредности у зависности од метода на основу	
	којих су добијене 3D структуре	92
Слика 44.	Корелациони дијаграм између DFT енергија (B3LYP/SDD)	
	Геометријских изомера [м(eddadp)] комплекса (M = Rn(III), Со(III)) и њихових основних структурних параметара напона	93
Слика 45.	Корелациони дијаграм између DFT енергија (B3LYP/SDD) геометријских изомера [M(1,3-pddadp)] ⁻ комплекса (M = Rh(III), Со(III)) и њихових основних структурних параметара напона	94
Слика 46.	Најбоље рангиране резонантне структуре добијене NRT анализом на различитим изомерима: I-VI [M(eddadp)] ⁻ ; VII-XII [M(1,3-pddadp)] ⁻ комплексних анјона (M = Rh(III), Co(III))	96
Слика 47.	PNBO (PNBO = pre-orthogonal Natural Bond Orbital) донор/акцептор орбитале које се односе на резонантну хибридну стабилизацију $trans(O_5O_6)$ -[Rh(eddadp)] ⁻ комплексног анјона	98
Слика 48.	Најстабилнији конформери докованих <i>cis</i> -equatorial-[Rh(ed3a)(H ₂ O)] (1) (a) и <i>cis</i> -polar-[Rh(1,3-pd3a)(H ₂ O)] (3) (б) комплекса на HSA макромолекулу	101
Слика 49.	2D дијаграм главних интеракција <i>cis</i> -polar-[Rh(1,3-pd3a)(H ₂ O)] комплекса (3) и HSA макромолекула	102

ШЕМЕ

Шема 1.	Кондензациона	метода	добијања	аминополикарбоксилатних	
	киселина из монохлоркарбоксилне киселине				
Шема 2.	Кондензациона	метода	добијања	аминополикарбоксилатних	
	киселина из амин	окиселин	e		3
Шема 3.	Кондензациона	метода	добијања	аминополикарбоксилатних	
	киселина из акрилне киселине				4
Шема 4.	Трансформација МТТ соли у формазан				40
Шема 5.	Дисоцијација [Rh(Hed3a)X ₃] ⁺ ; X = H ₂ O, Cl ⁻				75
Шема 6.	Дисоцијација [Rh	n(H1,3-pd3	a)X ₃] ⁺ ; X = H	I ₂ O, Cl ⁻	77

ТАБЕЛЕ

Табела 1	Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања	
	структуре <i>cis</i> -equatorial-[Rh(ed3a)(H ₂ O)]·H ₂ O комплекса (1)	36
Табела 2	Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања	
	структуре <i>cis</i> -equatorial-Na[Rh(ed3a)Cl]·H ₂ O комплекса (2)	37
Табела З	Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања	
	структуре <i>cis</i> -polar-Na[Rh(1,3-pd3a)Cl]·2H ₂ O комплекса (4)	38
Табела 4	Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања	
	структуре $trans(O_5O_6)$ -Na[Rh(eddadp)]·4H ₂ O комплекса (5)	39
Табела 5	Однос изомера за [M(edta-тип)] ⁻ комплексе	52
Табела б	Дужине (Å) и углови (°) веза cis -equatorial-[Rh(ed3a)(H ₂ O)]·H ₂ O	
	комплекса (1)	54
Табела 7	Дужине (Å) и углови (°) веза <i>cis</i> -equatorial-Na[Rh(ed3a)Cl]·H ₂ O	
	комплекса (2)	55
Табела 8	Дужине (Å) и углови (°) веза <i>cis</i> -polar-Na[Rh(1,3-pd3a)Cl]·2H ₂ O	
	комплекса (4)	56
Табела 9	Дужине (Å) и углови (°) веза $trans(O_5O_6)$ -Na[Rh(eddadp)]·4H ₂ O	
	комплекса (5)	58
Табела 10	Анализа напона пентадентатних родијум(III) комплекса са edta-	
	типом лиганада	66
Табела 11	Анализа напона хексадентатних [M(edta-тип)] ⁻ комплекса	68
Табела 12	Константе протоновања (log <i>K</i> _i ^H) ed3a ³⁻ и 1,3-pd3a ³⁻ лиганада	70
Табела 13	Условне константе стабилности Rh^{3+} -ed $3a^{3-}$ и Rh^{3+} -1,3-pd $3a^{3-}$	
	комплекса формираних у 0.1 М NaCl јонском медијуму ^а	73
Табела 14	IC ₅₀ вредности (µМ) тестираних лиганада и комплекса ^а	78

Табела 15	Поређење X-ray и DFT структурних параметара за [Rh(edta-тип)]	
	комплексе са израчунатим енергијама ^а	89
Табела 16	Релативне енергије (kcal mol ⁻¹) за [M(edta-тип)] ⁻ комплексе a, δ	91
Табела 17	NBO донорско-акцепторске енергије ^а 3-СНВ веза, стерно- измењиве интеракције спаривања Е _{І,Ј} ^{рwx а} и природна Кулонова	
	електростатичка анализа (NCE) комплекса [M(edta-тип)] ⁻	99
Табела 18	HSA-[Rh(L)(H ₂ O)] (L = ed3a и 1,3-pd3a) слободне енергије везивања	
	најбољих AutoDock конформера ^а	101

ИЗВОД

У оквиру ове докторске дисертације синтетисани су и окарактерисани комплекси родијума(III) са хелатним полиаминополикарбоксилатним лигандима edta типа, међу којима су два неутрална: *cis*-equatorial-[Rh(ed3a)H₂O] и *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)H₂O], као и три анјонска *cis*-equatorial-[Rh(ed3a)Cl]⁻, *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)Cl]⁻ и *trans*(O₅O₆)-[Rh(eddadp)]⁻. Сва добијена једињења окарактерисана су применом стандардних метода (елементална микроанализа, тачка топљења), као и савременим спектроскопским методама анализе (¹H и ¹³C NMR, IR и UV-Vis). Структуре синтетисаних комплекса су одређене применом рендгенске структурне анализе, осим у случају *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)H₂O]·2H₂O комплекса где није изолован кристал погодан за дифрактометријску анализу. Његова геометрија је претпостављена на основу спектралне анализе, DFT прорачуна, као и поређењем са сличним комплексима који су структурно окарактерисани.

Константе протоновања лиганада H_3ed3a и $H_31,3$ -pd3a, константе стабилности комплекса и стехиометрија комплекса са овим лигандима проучаване су у воденом раствору, при чему је потврђено је постојање само мононуклеарних комплекса као што су [MHL] ([Rh(Hed3a)]⁺, [Rh(H1,3-pd3a)]⁺), [ML] ([Rh(ed3a)], [Rh(1,3-pd3a)]) и [MLH₋₁] ([RhOH(ed3a)]⁻, [RhOH(1,3-pd3a)]⁻).

Биолошка активност ових једињења *in vitro* је испитана применом МТТ теста цитотоксичности, као и методама за детекцију апоптозе. Највећу цитотоксичност је показао комплекс [Rh(ed3a)(H₂O)]·H₂O, док је најнеактивнији [Rh(1,3-pd3a)(H₂O)]·2H₂O комплекс, а HeLa ћелијска линија је најсензитивнија. Резултати проточне цитометрије и Вестерн блот анализе указују на апоптозу као примаран начин ћелијске смрти и то на каспаза-завистан начин.

На крају, компјутерске методе су коришћене за интерпретацију структурних параметара експериментално добијених комплекса Rh(III), као и њихових могућих изомера. Утврђено је да је B3LYP метода и бројчано и визуелно најприближнија експерименталним резултатима добијеним из X-ray структура. Детаљна анализа енергетске зависности геометријских изомера и уобичајених параметара деформације (ΣΔ(O_h), Δ(M-O-C), ΣΔ(N)) указује на немогућност формирања *trans*(O₆) изомера у случају [M(eddadp)]⁻ система. У случају [M(1,3-pddadp)]⁻ система низак енергетски профил омогућава формирање *trans*(O₆) изомера у случају комплекса родијума(III), док висока енергија у случају *trans*(O₅)-[Co(1,3-pddadp)]⁻ искључује могућност формирања овог комплекса. Гранична енергија, иза које је немогуће очекивати формирање геометријских изомера, могла би имати вредност око 6 kcal mol⁻ за [Rh(eddadp)]⁻ и [Rh(1,3-pddadp)]⁻ системе. NBO и NRT анализе система [M(eddadp)]⁻ и [M(1,3-pddadp)]⁻ (M = Rh(III), Co(III)) показују да сви изомери представљају снажно делокализоване структуре, а све добијене резонантне структуре показују да је јон метала три-координован преко N2O или NO2 хромофоре, осим Co(III) у *trans*(O₆)-[Co(eddadp)]⁻ комплексу који је ди-координован. Такође, ковалентност је више изражена у родијум(III) комплексима него у случају Co(III) комплекса.

Резултати компјутерски симулираног докинга између HSA и *cis*-equatorial-[Rh(ed3a)(H₂O)] и *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)(H₂O)] комплекса указују да четири водоничне везе чине родијумов комплекс чврсто везаним за HSA и сасвим безбедним за његов транспорт до циљних ћелија.

SUMMARY

Within this PhD dissertation, the complexes of rhodium(III) with chelate polyaminopolycarboxylate edta-type of ligands have been synthesized and characterized, among which are two neutral *cis*-equatorial-[Rh(ed3a)(H₂O)] and *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)(H₂O)], as well as three anionic *cis*-equatorial-[Rh(ed3a)Cl]⁻, *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)Cl]⁻ and *trans*(O₅O₆)-[Rh(eddadp)]⁻.

The synthesized rhodium(III) complexes were characterized by the use of standard methods (elemental microanalysis, melting point), as well as by modern spectroscopic analysis techniques (¹H and ¹³C NMR, IR and UV-Vis). Structures of the synthesized complexes were determined by X-ray structural analysis, except in the case of *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)(H₂O)]·2H₂O complex. Its geometry is assumed based on spectral analysis, DFT calculations, as well as by comparison with similar complexes that are structurally characterized.

The protonation constants of H₃ed3a и H₃1,3-pd3a ligands, the stability constants of the complexes and the stoichiometry of the complexes with these ligands were studied in aqueous solution, whereby only mononuclear complexes have been confirmed: [MHL] ([Rh(Hed3a)]⁺, [Rh(H1,3-pd3a)]⁺), [ML] ([Rh(ed3a)], [Rh(1,3-pd3a)]) и [MLH₋₁] ([RhOH(ed3a)]⁻, [RhOH(1,3-pd3a)]⁻).

The biological activity of these compounds *in vitro* was investigated using the MTT cytotoxicity test, as well as methods for the detection of apoptosis. The greatest cytotoxicity was demonstrated by the complex $[Rh(ed3a)(H_2O)] \cdot H_2O$, while the most inactive was $[Rh(1,3-pd3a)(H_2O)] \cdot 2H_2O$, and the HeLa cell line is the most sensitive. The results of flow cytometry and Western blot analysis suggest apoptosis as the primary mode of cell death, in a caspase-dependent manner.

Finally, computer methods were used to interpret the structural parameters of the experimentally obtained Rh(III) complexes, as well as their possible isomers. It was found that the B3LYP method is both numerically and visually most similar to experimental results obtained from X-ray structures. A detailed analysis of the energy dependence of geometric isomers on the usual deformation parameters ($\Sigma\Delta(O_h)$, $\Delta(M-O-C)$, $\Sigma\Delta(N)$) indicates the inability of the

formation of *trans*(O₆) isomer in the case of $[M(eddadp)]^{-}$ system. In the case of $[M(1,3-pddadp)]^{-}$ system low energy profile allows the formation of *trans*(O₆) isomer for rhodium(III) complexes, while high energy of *trans*(O₅)-[Co(1,3-pddadp)]^{-} exclude the possibility for these complex to be formed. The boundary energy, beyond which it is impossible to expect the formation of geometric isomers, could have a value of about 6 kcal mol⁻¹ for [Rh(eddadp)]^{-} and [Rh (1,3-pddadp)]^{-} systems. NBO and NRT analyzes of the [M(eddadp)]^{-} and [M(1,3-pddadp)]^{-} (M = Rh(III), Co(III)) systems show that all isomers are strongly delocalized structures, and all resulting resonant structures show that the metal ions are tri-coordinated through N2O or NO2 chromophores, except Co(III) in *trans*(O₆)-[Co(eddadp)]^{-} complex ion which adopts di-coordination in an octahedral surrounding. Also, covalency is more pronounced in the complexes of rhodium(III) than in the case of cobalt(III) complexes.

The results of a computer simulated docking between the HSA and *cis*-equatorial- $[Rh(ed3a)(H_2O)]$ and *cis*-polar- $[Rh(1,3-pd3a)(H_2O)]$ complexes indicate that four hydrogen bonds make rhodium complex tightly bounded to HSA and quite safe for his transport to the target cells.

1. ОПШТИ ДЕО

1.1 Аминополикарбоксилатне киселине као лиганди

1.1.1 Аминополикарбоксилатне киселине у координационој хемији и медицини

Аминополикарбоксилатие киселине су посебна група киселина која у свом саставу има два или више атома азота, као и две или више карбоксилних група (Слика 1). Атоми азота су угљоводоничним ланцима везани за карбоксилне групе, градећи на тај начин сложени молекул киселине. Оваква структура аминополикарбоксилатних киселина омогућава њихово врло лако координовање за јоне различитих метала, при чему настају стабилни хелатни комплекси, а поменуте киселине називамо хелатима. врло Аминополикарбоксилатни лиганди имају широку примену у координационој хемији. Комплекси метала са овим лигандима се користе у области заштите животне средине [1-3], лабораторијама [4,5], индустријским процесима [6-8], биолошким системима [9-12] и у медицини [13-20]. Најпознатија и највише коришћена киселина из ове класе једињења је H4edta (етилендиамин-N,N,N',N'-тетрасирћетна киселина). Ову киселину је први синтетисао Фердинанд Мунз (Ferdinand Münz) 1935. године [21]. Н₄edta је најпре примењивана у текстилној индустрији за спречавање нечистоћа које потичу од јона метала које мењају боју обојених производа, али врло брзо је пронашла ширу примену. Тако се, H₄edta и слични лиганди користе за уклањање тешких метала из воде [22-25], као и из људског тела [26]. Комплекс Fe(II) са H4edta има значајну улогу у процесу фотохемијског уклањања NO и процесима ослобађања NOx [27]. Поред тога, Fe(II)-edta комплекс се користи за уништавање органских загађивача [28-30], као и за редукцију молекулског кисеоника у реактивне врсте кисеоника (ROS = Reactive oxygen species) [31-33].

Ови лиганди су нашли примену у медицини и фармакологији у лечењу тровања оловом [34] и живом [34], као и за уклањање других тешких метала, арсена, кадмијума, никла и гвожђа из организма [35]. Хелатна терапија се користи и за лечење таласемије, односно компликација које се јављају услед поновљених трансфузија крви. Комплекс хрома(III) (радиоактивни ⁵¹Cr) [Cr(edta)]⁻ се користи за процену функције бубрега, када се интравенски уноси у организам, при чему се прати брзина гломеруларне филтрације [36]. Н₄еdta се интензивно користи у анализи крви као антикоагулант при чему координативно везује калцијум (Ca²⁺) који је присутан у узорку крви, зауставља процес коагулације и чува морфологију крвних ћелија [37]. Болести крвотока, атеросклерозе [38], као и појава сенилности [39] у великој мери су лечене хелатним лигандима овог типа. Треба поменути значај ових киселина у лечењу Вилсонове (Wilson), Паркинсонове (Parkins) и Алцхајмерове (Alzheimer) болести, при чему је примећено значајно побољшање стања оболелих након терапије различитим хелатима [40], јер је узрок ових обољења нагомилавање јона метала са којима ове киселине граде врло стабилне комплексе. DMPE (*bis*-(1,2-диметил-фосфино)-етан комплексиран са изотопом технецијума ^{99m}Tc у облику [Tc(DMPE)₃]⁺ се употребљава као замена за телур ²⁰¹Tl, који се користи као миокардијални агенс [41]. Међутим, подаци о антитуморском дејству ових киселина слободних или комплексираних са металима су врло оскудни.



Слика 1. Општа формула аминополикарбоксилатних киселина са датим могућим комбинацијама прстенова.

1.1.2 Добијање аминополикарбоксилатних лиганада

Аминополикарбоксилатне лиганде је могуће синтетисати на неколико начина, а најчешће коришћена метода је кондензација, било да се ради о кондензацији α - или β монохалогенкарбоксилне киселине са одговарајућим алкилдиамином (Шема 1) или је у питању кондензација дихалоген деривата алкилдиамина са различитим аминокиселинама (Шема 2). Синтеза ових лиганада је процес који се одвија у више фаза, а колико ће фаза бити потребно зависи од сложености саме киселине, тј. од броја карбоксилатних ланаца
који се кондензују на диамин. Монохлоркарбоксилну киселину треба неутралисати у контролисаним условима (ниска температура), па додати диамин уз загревање и рефлуктовање у трајању од неколико h (Шема 1):



Шема 1. Кондензациона метода добијања аминополикарбоксилатних киселина из монохлоркарбоксилне киселине.

При томе, треба водити рачуна о температури, јер се на вишим температурама добијају симетрични хомолози, а на нижим несиметрични. Приноси су незавидни јер се добијају смеше киселина, а додатно су смањени у случају синтезе несиметричних киселина, као што су H₃ed3a (етилендиамин-N,N,N'-трисирћетна киселина) и H₃1,3-pd3a (1,3-пропандиамин-N,N,N'-трисирћетна киселина). Међутим, коришћењем Ca(OH)₂ у процесу неутрализације, долази до повећања приноса и до 90%, јер се гради калцијумова со лиганда, при чему се калцијум, након тога, врло успешно и лако одстрањује. Кондензација аминокиселина са етилендибромидом у присуству Na₂CO₃ се одвија коришћењем рефлукса пар сати, а коначан производ се добија хлађењем и подешавањем pH уз врло мали принос (**Шема 2**):



Шема 2. Кондензациона метода добијања аминополикарбоксилатних киселина из аминокиселине.

ОПШТИ ДЕО

Реакција акрилне киселине и диамина уз загревање и рефлукс у трајању од 24 h још једна је метода синтезе која је показала добре резултате (Шема 3):



Шема 3. Кондензациона метода добијања аминополикарбоксилатних киселина из акрилне киселине.

1.1.3 Структурне варијације аминополикарбоксилатних лиганада

Аминополикарбоксилатни лиганди, као хелатни агенси, могу да граде комплексе са скоро свим јонима метала захваљујући присуству два атома азота и два атома кисеоника $(N_2O_2 \text{ хромофора})$, три атома кисеоника $(N_2O_3 \text{ хромофора})$ или четири атома кисеоника карбоксилних група $(N_2O_4 \text{ хромофора})$ (Слика 2). У зависности од врсте хромофоре, аминополикарбоксилатни лиганди заузимају четири, пет или шест координационих места и могу се класификовати као тетрадентатни, пентадентатни и хексадентатни. Неки од ових лиганада су симетрични (H₂edda, H₂1,3-pdda, H₄edta, H₄1,3-pdta, H₄eddadp...), док је много већи број несиметричних лиганада које је теже и синтетисати, као што су H₃ed3a, H₃1,3-pd3a... Комбиновање карбоксилатних ланаца различитих дужина омогућава добијање великог броја различитих киселина са различитим распоредом и бројем група у оквиру једног молекула, па је због једноставнијег проучавања стереохемије хексадентатних комплекса аминополикарбоксилатнот типа, извршена класификација лиганада у три велике групе:

1) H4edta-H4edtp група коју чине лиганди са структурним варијацијама у карбоксилатним ланцима и који при координацији за јон метала граде петочлани етилендиамински прстен: H4edta, H4ed3ap, H4eddadp, H4-*u*-eddadp, H4eda3p, H4edtp;

2) H₄1,3-pdta-H₄1,3-pdtp група коју чине лиганди са структурним варијацијама у карбоксилатним ланцима и који приликом координацији за јон метала граде шесточлани 1,3-пропандиамински прстен: H₄1,3-pdta, H₄1,3-pd3ap, H₄1,3-pddadp, H₄-*u*-1,3-pddadp, H₄1,3-pda3p, H₄1,3-pdta;

3) Група лиганада аминополикарбоксилатног типа са структурним варијацијама у диаминским или карбоксилатним ланцима, где се убрајају H₂edda, H₂edap, H₂eddp, H₃ed3a, H₃eddap, H₃eddap, H₃ed3p, као и њихови 1,3-пропандиамински аналози.



Слика 2. Приказ могућих хромофора аминополикарбоксилатних лиганада.

1.1.4 Геометријска изомерија хексадентатних аминополикарбоксилатних комплекса

Појам "хексадентатни комплекс" односи се на комплекс који садржи хексакоординоване лиганде edta-типа, јер ови лиганди показују и друге могућности приликом координовања [42,43].

Различит просторни распоред лиганада, тј. његових донорских атома у односу на централни јон метала узрокује различиту геометријску изомерију комплекса. Код најпознатијег хексадентатног лиганда, H4edta, могуће је формирање *trans*(O₅) изомера, јер овај лиганд поседује само ацетатне групе и када се координује за метал може да награди искључиво петочлане прстенове. Међутим, када дође до замене карбоксилатних група тако да уместо свих ацетатних буду присутне и 3-пропионске групе, долази до формирања неједнаких петочланих и шесточланих прстенова па је могуће формирање три изомера: $trans(O_5), trans(O_5O_6)$ и $trans(O_6)$ (Слика 3).



Слика 3. Геометријски изомеризам хексадентатних [М(edta-тип)]ⁿ⁻ комплекса.

H₄eddadp (етилендиамин-N,N'-диацетато-N,N'-ди-3-пропионска киселина) представља симетричан, хексадентатни лиганд из групе аминополикарбоксилатних лиганада. Добијена је 1972. године кондензацијом етилендиамин-N, N'-дисирћетне киселине и два пута веће количине 3-хлорпропионске киселине у воденом раствору КОН (Бајерсова метода (Byers) [43]). Изолована је у чистом стању. У односу на H₄edta, ова киселина има два дужа карбоксилатна 3-пропионска ланца и при свом координовању за јон метала формира три петочлана и два шесточлана хелатна прстена. Као што је већ наведено, очекивано је постојање три изомера који се међусобно разликују у распореду и броју прстенова у октаедарској равни (Слика 3). Литературни подаци показују да је фаворизован мање напет $trans(O_5)$ изомер у односу на преостала два [45-52], што је последица повољног распореда прстенова у равни 6-5-6. Фаворизована trans(O₅) конфигурација захтева структуру у којој се флексибилнији 3-пропионски прстенови налазе у октаедарској равни. Прво су изоловани trans(O5) изомери комплекса Cr(III) [45] и Rh(III) [46], а врло брзо и комплекса Fe(III) [47]. Нешто касније су синтетисани комплекси Co(III) [48], Ni(II) [50], као и V(III) [51,52] чије су структуре потврђене Х-гау анализом. Кристални облик *trans*(O₅O₆) изомера комплекса који у свом саставу садржи овај лиганд изолован је у облику праха код Rh(III) [53] и Co(III) [54], док је X-ray структура $trans(O_6)$ изомера потврђена само у случају Ti(III) са присутном хексадентатном координацијом H4eddadp лиганда и водом у седмом координационом месту [55].

1.1.5 Геометријска изомерија пентадентатних аминополикарбоксилатних комплекса

Пентадентатни комплекси у свом саставу имају пентадентатне лиганде edta-типа, а шесто координационо место код октаедарских комплекса заузима неки монодентатни лиганд, најчешће хлорид или вода. Могући број изомера је три: *cis*-equatorial, *cis*-polar и *trans*-equatorial (Слика 4).

Пентадентатни лиганди су несиметрични јер не поседују ниједан елемент симетрије, немају центар симетрије, нису симетрични у односу на осу ротације за одређени угао, а немају ни раван која дели молекул на два једнака дела која се односе као предмет и лик у огледалу. Несиметричност код пентадентатних лиганада је последица структурних промена у диаминском или карбоксилатним ланцима.



Слика 4. Могући геометријски изомери пентадентатних [М(edta-тип)Х] комплекса.

Од свих пентадентатних лиганада аминополикарбоксилатног типа, највише је проучаван H₃ed3a (Слика 5а). Киселина је добијена у облику соли Ca₃(ed3a)₂ кондензацијом етилендиамина и хлорсирћетне киселине у воденом раствору Ca(OH)₂ [56]. Поседује три карбоксилатне групе и приликом координације за јон метала гради четири хелатна петочлана прстена и то један етилендиамински и три ацетатна карбоксилатна. Сва три могућа геометријска изомера (Слика 4) имају C_1 молекулску симетрију. Прве комплексе, који су у свом саставу имали ed3a³⁻ лиганд, синтетисали су Лег (Legg) и сарадници 1969. године у облику серије комплекса кобалта(III) типа [Co(ed3a)X] (X= H₂O, Cl⁻, NO₂⁻, ONO⁻) [57]. Уједно, први пут је кристална структура овог типа комплекса потврђена за [Co(ed3a)(NO₂)]⁻ 1973. године, при чему је овај комплекс означен као *cis*equatorial изомер [58]. Након тога, наступа експанзија у синтезама ових комплекса па су врло брзо синтетисани комплекси хрома(III), [Cr(ed3a)(OAc)]⁻, [Cr(ed3a)(H₂O)]⁻ [59] и [Cr(ed3a)(NCS)]⁻ [60], али њихова структура тада није потврђена X-гау анализом. Сви поменути комплекси су означени као *cis*-equatorial изомери на основу анализе њихових NMR, IR и UV-Vis спектара, док су синтетисани комплекси кобалта(III) [61], бакра(II) [56], хрома(III) [62] и никла(II) [63] означени као *cis*-equatorial изомери са структурама потврђеним X-гау анализом. Једини *trans*-equatorial изомер је утврђен за K[Co(ed3a)(CN)] комплекс [64] на основу анализе спектара. Такође, синтетисани су и окарактерисани црвени и љубичасти облици [Co(*R*-1,2-pd3a)(NO₂)]⁻ комплекса означени као *cis*-equatorial и *trans*equatorial изомери [65]. У овом случају се H₃1,2-pd3a (1,2-пропандиамин-*N*,*N*,*N*'трисирћетна киселина) приликом координовања понаша аналогно H₃ed3a киселини. Треба напоменути да су јако бројни комплекси типа [M(Hedta)X] који садрже хексадентатни H₄edta лиганд [42,66], али је координован пентадентатно па, на неки начин, ове комплексе можемо поистоветити.



Слика 5. Молекулске структуре H₃ed3a (а) и H₃1,3-pd3a (б) киселина.

 $H_31,3$ -рdЗа киселина припада истој серији као H_3 edЗа, а разлика је само у диаминском ланцу који је овде продужен за један угљеников атом (Слика 56). Добијена је кондензационом методом, али не као чиста, већ у облику кондензационе смеше која садржи 50% $H_31,3$ -рdЗa, 23% $H_21,3$ -pdda и 18% $H_41,3$ -pdta [56]. Поседује три карбоксилатне групе и приликом координације за јон метала гради четири хелатна прстена и то један 1,3-пропандиамински и три ацетатна карбоксилатна. Сва три могућа геометријска изомера (Слика 4) имају C_1 молекулску симетрију. За разлику од H_3 edЗa, овај лиганд није довољно проучен и коришћен у синтезама. Први комплекси ове врсте су синтетисани 1976. године од стране Фујите (Fujita) и сарадника [67] и то сва три изомера [Co(1,3-pdЗa)(H_2O)], [Co(1,3-

рd3a)(NH₃)] и [Co(1,3-pd3a)Cl]⁻ комплекса, док је у случају [Co(1,3-pd3a)(CN)]⁻ синтетисан само *cis*-polar изомер. Кристалне структуре нису добијене, већ само претпостављене на основу разлика у апсорпционим спектрима. Нешто касније је Даглас (Douglas) синтетисао прашкасти облик комплекса [Co(1,3-pd3a)(NO₂)]⁻ претпостављене *cis*-equatorial reometpuje [68]. Ипак, неке структуре су потврђене X-ray анализом и то *cis*-polar изомер комплекса [Ni(1,3-pd3a)(H₂O)]⁻ [69], док је једино у случају комплекса бакра(II) са овим лигандом изолован кристал [Cu(1,3-pd3a)]⁻ комплекса квадратно-пирамидалне геометрије (Spy, Square pyramidal) [56].

1.2 Стереохемија родијум(III) комплекса

Родијум је прелазни метал и један је од шест елемената платинске групе метала. Поред тога, племенити је метал, што значи да је отпоран према корозији и оксидацији, има високу тачку топљења (1964 °C), нетоксичан је и отпоран на хабање. Сматра се најређим металом на свету, па је скупљи од сребра, злата и платине. У Периодном систему лоциран је у 9. групи са $4d^85s^1$ конфигурацијом. Открио га је енглески хемичар и физичар Вилијам Хајд Воластон (William Hyde Wollaston) 1803. године, врло брзо по открићу паладијума. Због боје својих соли, добио је име по грчком називу за ружу "rhodon". Откривена су 24 изотопа чије су масе у опсегу 94-117, али је постојан само изотоп ¹⁰³Rh који представља 100% природног састава изотопа родијума [70] (Слика 6). Око 80% светске производње родијума усмерена је на употребу у три-системским катализаторима у аутомобилима. Због своје велике отпорности према корозији и најагресивнијим хемикалијама, као и због своје реткости, обично се легира са платином или паладијумом и примењује у високотемпературним премазима који су отпорни на корозију.



Слика 6. Вилијам Хајд Воластон и његово откриће изотоп родијума ¹⁰³Rh.

Могућа оксидациона стања родијума су од -1 до +6 [71]. Комплекси родијума са оксидационим стањима -1 и 0 су врло ретки и то су карбонилни комплекси, као што је $[Rh(CO)_4]^-$ [72] и кластерна једињења $[Rh_4(CO)_{12}]$, $[Rh_6(CO)_{16}]$ [73]. У овим комплексима координациони број износи 4, док је њихова геометрија тетраедарска и кластерна. Оксидационо стање +1 са конфигурацијом d⁸ и координационим бројем 4 или 5 се јавља у комплексима родијума са терцијарним фосфинима (PPh₃), H⁻ јоном или са карбонилним лигандима (CO). То су комплекси квадратно-планарне геометрије (KБ = 4), $[Rh(CO)_2Cl_2]^-$ [74] и тригонално-бипирамидалне геометрије (KБ = 5), $[Rh(PPh_3)_3]^+$ [75]. Rh(I) јон је значајан за процес оксидативне адиције до Rh(III). Комплекси родијума(II) су бројни, показују значајну биолошку активност и као такви су предмет интензивних проучавања. Геометрија комплекса, код којих је КБ = 4 је квадратно-планарна, а врло често су ти комплекси динуклеарни [76]. Геометрија комплекса у којима родијум има оксидациона стања +4, +5 и +6 је октаедарска (KБ = 6). Ипак, најдоминантије стање родијума је +3 (d⁶ конфигурација последњег енергетског нивоа). Ова конфигурација је одговорна за формирање октаедарских

комплекса, у којима родијум(III) има координациони број 6. У воденом раствору родијум постоји као хексааква комплексни јон, $[Rh(H_2O)_6]^{3+}$. Rh(III) јон је окарактерисан као тврдомека (прелазна) Луисова (Lewis) киселина и може градити стабилне комплексе са кисеоники азот-донорским лигандима (тврде Луисове базе), као што је случај са лигандима edta-типа. Први комплекс родијума са овим типом лиганада, [Rh(Hedta)(H₂O)], синтетисали су Двајер и Гарван (Dwyer и Garvan) 1960. године [77], а његова структура је кристалографски потврђена 1973. године и указује на пентадентатну координацију лиганда [42]. Сем неутралног облика комплекса, његове амонијумове $NH_4[Rh(edta)(H_2O)]$ [77], калијумове K[Rh(edta)(H₂O)] [77] и натријумове Na[Rh(edta)(H₂O)] [78] соли су синтетисане и инфрацрвеним, спектрофотометријским, проучаване поларографским И потенциометријским техникама, као и Х-гау анализом. Након ових комплекса, синтетисани су слични комплекси родијума са овим типом лиганда који имају структурне варијације у диаминском и карбоксилатним ланцима [37,42,43,46,53]. Пентадентатна координација лиганда примећена је само још код *cis*-polar,*trans*(Cl,O₅)-Na₂[Rh(1,3-pddadp)Cl] комплекса [43]. Комплекси родијума са пентадентатним лигандима edta типа нису проучавани.

1.3 Примена метала у медицини и лечењу туморских болести

Лековита својства метала примећена су неколико хиљада година пре нове ере. Тако је суспензија рђе, тј. оксида гвожђа, коришћена за лечење импотенције још пре 3500 година, а друга једињења гвожђа као лек за анемију. Лековита својства злата и сребра су примећена још пре 2500 година за лечење инфекција, док су се за лечење сифилиса користила једињења арсена. Међутим, медицинска примена једињења метала дуго је била "под лупом" због њихових токсичних својстава. С друге стране, велики број јона метала је нормално присутан у организму и неопходан је за нормално функционисање организма (биоесенцијални метали), па поремећај њихових концентрација доводи до појаве разних болести. Ова чињеница сугерише да је неопходно успоставити равнотежу између терапијских бенефита и потенцијалних контраиндикација.

У савременом добу, ситуација је драстично промењена у корист једињења метала јер медицина данас подразумева примену великог броја агенаса на бази метала за лечење широког спектра обољења. Тако се једињења волфрама користе у терапији оболелих од

HIV-а [79], комплекси бакра са хелатима у лечењу Вилсонове болести [80], а цинк(II)једињења у лечењу херпеса [81]. У лечењу реуматоидног артритиса се користе једињења злата(I) [82], код гастроинтестиналних поремећаја једињења бизмута(III), комплекси ванадијума за лечење дијабетеса, док се за успостављање равнотеже у организму користе додаци исхрани базирани на мангану, селену и калцијуму. Осим поменуте примене, једињења метала су важна и у дијагностици где се користе као контрастни реагенси, па се тако гадолинијум(III), гвожђе(II) и манган(II) комплекси примењују у спектроскопији магнетном резонанцом [83], док се једињења на бази радиоактивних изотопа ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁵⁷Co, ⁶⁷Ga, ⁹⁷Ru и ¹⁰³Ru детектују у γ-сцинтилационим камерама [84].

Примена једињења метала у терапеутске сврхе доживела је експанзију након случајног Розенберговог (Barnett Rosenberg) открића антитуморске активности цисплатине 1969. године [85]. Наиме, Розенберг је разматрао ефекте електричног поља на раст бактерије Escherichia coli, при чему је приметио да бактерије престају да се деле када се поставе у електрично поље. За OBV појаву било je одговорно једињење cisдиамминдихлоридоплатина(II) (Слика 7) које је настало у реакцији између платинске електроде и амонијум-хлорида из пуфера. Механизам дејства се огледа у блокирању репликације ДНК, што за последицу има заустављање деобе ћелија. Цисплатина је откривена још 1845. године [85], али је њено антитуморско дејство објашњено тек 1970. године [85,86], а за медицинску употребу одобрена 1978/1979. Након 50 година од открића хемотерапеутског дејства, цисплатина је још увек један од најкомерцијалнијих антитуморских агенаса.



Слика 7. Структуре комплекса платине са применом у медицини.

Спектар деловања цисплатине је веома широк, користи се у лечењу тумора тестиса, главе и врата, јајника, бешике, грлића материце, лимфома, једњака, плућа, мозга и неуробластома [87]. Међутим, примена цисплатине је ограничена, јер многи тумори показују резистенцију која може бити унутрашња или стечена. Поред тога, цисплатина је веома токсична, изазива мучнину, супресију коштане сржи, проблеме са слухом и са бубрезима [88,89]. Друге озбиљне нуспојаве укључују укоченост, потешкоће у ходу, алергијске реакције, проблеме са електролитима и срчане болести. Ове нуспојаве су навеле научнике широм света да раде на проналажењу новог агенса који би показао мању токсичност, а већу ефикасност деловања. До сада је синтетисан велики број комплекса платине који су испитивани различитим ћелијским линијама и који су показали антитуморску активност, али је само њих неколико дошло до фазе клиничког испитивања, а поред цисплатине неколико њених аналога је одобрено за клиничку примену, карбоплатина (carboplatin), оксалиплатина (oxaliplatin) [90], недаплатина (nedaplatin) [91], хептаплатина (heptaplatin) [92] и лобаплатина (lobaplatin) [93] (Слика 7).

Сем лекова на бази платине, рађено је на синтези нових антитуморских агенаса, базираних на другим прелазним јонима метала, као што су осмијум(II), рутенијум(II), злато(I/III), родијум(II/III), паладијум(II) и многи други. Значајне резултате су показали комплекси рутенијума(III) са имидазолским лигандима: [HIm]{*trans*-[RuCl₄(Im)(DMSO)]} (NAMI-A, Im = имидазол) [94] и [HInd]{*trans*-[RuCl₄(Ind)₂]} (KP1019, Ind = индазол) [95] који су у фази клиничког испитивања (Слика 8).





Иако су комплекси злата(I) углавном применљиви као агенси за лечење реуматоидног артритиса, они се испитују и као потенцијални антитуморски агенси [96]. Тако су неки тетраедарски злато(I) комплекси са фосфор-донорским лигандима показали значајну антитуморску активност *in vivo* и *in vitro*, а посебно на неким ћелијским линијама које су резистентне на цисплатину [96]. Чињеница да су комплекси злата(III) изоелектронски и изоструктурни са платина(II) комплексима, довела је до експанзије у синтези ових једињења и до њиховог биолошког испитивања. Нестабилност и лака редукција ових комплекса у физиолошким условима представља ограничавајући фактор њихове примене [97]. Међутим, последњих година синтетисани су комплекси Au(III) са тетраарилпорфиринским лигандима који стабилизују Au(III) центар [98,99].

Комплекси паладијума(II) су посебно интересантни због своје сличности са комплексима платине(II) у погледу геометрије и процеса формирања. Комплекси паладијума са моноетилфосфонатним и диетилфосфонатним лигандима међу првима су показали су значајну активност када су комплекси овог метала у питању [100]. Значајни су и комплекси Рd(II) са пиридинским, анилинским, аминским лигандима, затим природним

производима [100], као и 1,10-фенантролином [101] показујући цитотоксичност која се може поредити са цисплатином. Комплекси паладијума са Шифовим базама и дитиокарбаматима [102], тиосемикарбазонима [102] и карбоксамидима (деривати диамида оксалне и малонске киселине) [103,104] показали су значајне резултате антитуморских испитивања, а неки од њих чак и бољу селективност у односу на цисплатину.

Откриће цисплатине и њене активности довело је до развоја гране хемије која се зове медицинска неорганска хемија. Ова област данас привлачи велику пажњу с обзиром на све већи број људи оболелих од различитих врсти тумора [105]. Истраживања се заснивају на следећим принципима:

a) синтеза комплекса метала у сврху заштите лека од деградације коју могу изазвати ензими нормално присутни у организму;

б) синтеза комплекса метала који ће показивати боље хидрофобне или хидрофилне особине у поређењу са слободним лигандом у циљу поспешивања транспорта кроз ткива;

в) синтеза потенцијалних лекова на бази комплекса метала који ослобађају активну супстанцу у циљаним органима, при чему се тежи да активност буде појачана комбиновањем особина лиганда и јона метала.

На овим принципима заснивају се вишедеценијски напори истраживачких група широм света да дизајнирају и синтетишу потенцијалне терапеутске и дијагностичке агенсе на бази јона метала [106].

1.4 Биолошка активност родијум(III) комплекса

Успех цисплатине као антитуморског агенса подстакао је многе истраживачке групе широм света да своје напоре усмере на синтезу других клинички важних комплекса метала [89,107,108]. Велика пажња је посвећена металима из платинске групе, тј. њиховим комплексима, укључујући и комплексе родијума. Електронске конфигурације родијум(I), родијум(II) и родијум(III) јона (d^8 , d^7 и d^6) говоре у прилог чињеници да су изоелектронски са рутенијум(II), платина(II) и платина(IV) јонима, чији комплекси показују значајну антитуморску активност [109,110]. Динуклеарни комплекси родијума(II) детаљно су испитивани, а њихова физичко-хемијска својства и реактивност су такви да припадају најперспективнијим антитуморским комплексима (Слика 9) [111-113].



Слика 9. Структуре димерних комплекса Rh(II)-карбоксилата и амидата.

Бер (Bear) и сарадници први су показали да комплекси родијума(II) показују значајну цитостатичку активност против саркома и лимфоцитне леукемије у многим *in vitro* и *in vivo* испитивањима [114-119]. Системска анализа односа структура-активност серије динуклеарних родијум(II)-тетракарбоксилата сугерише да се антиканцерогена активност генерално повећава са липофилношћу као резултат продужавања кабоксилатног ланца, али се смањује када карбоксилат има више од 5 С атома [112]. Липофилнији молекули лакше пролазе кроз ћелијску мембрану и на тај начин лакше долазе до циља. Нешто касније су динуклеарни родијум(II)-тетракарбоксилатни комплекси (Слика 9) коришћени за даљу синтезу комплекса који би били растворни у води и то тако што је нови лиганд координован у *para* положају у односу на карбоксилат. Тако су добијени адукти са изоникотинском киселином, у којима је координован азот из пиридина у супротном положају у односу на једну карбоксилну групу [120]. Растворљивост родијум(II)-карбоксилата у води проистиче из интеракција између растварача и врста на аксијалним положајима. Ови комплекси и даље показују антитуморску активност, а изоникотинска киселина служи као транспортер комплекса метала до ћелије у случају присуства липида у крви. Касније је синтетисан велики број антитуморски активних деривата динуклеарних комплекса родијума(II) који у свом саставу имају додатне различите лиганде као што су нитроимидазоли [121] и фенантролини [122]... Карбоксилатни комплекси са лигандима који су деривати шећера, Rh(II) кето-глуконат ($C_6H_{10}O_7$) и глукуронат ($C_6H_9O_7$), као и њихови адукти циклофосфамида су показали активност на К-562 ћелијама (хронична мијелоидна леукемија) [123]. Поред тога, синтетисани су и испитивани Rh(II)-амидати [Rh₂(CF₃CONH)₄)] [124] и аденозински комплекси [Rh₂(CH₃COO)₄(1-метиладенозин)₂] [125]...

Родијум(I) комплекси су мање заступљени, али неки од њих показују значајну антитуморску активност. Треба поменути органометалне неутралне квадратно-планарне циклооктадиенске комплексе [RhCl(COD)(NH₃)] и [RhCl(COD)-пиперидин] (COD = cis-1,5циклооктадиен) [126], квадратно-планарни ацетилацетонатни дериват [Rh(acac)(COD)] [127], квадратно-планарни [Rh(COD)(PMI)]Cl (PMI = 2-пиридиналметилимин), [Rh(COD)(PEI)]Cl (PEI = 2-пиридиналетилимин), и [Rh(COD)(PIP)]Cl (PIP = 2пиридинализопропилимин) [128] (Слика 10), [Rh(CO)₂L] (L = сулфонамидни деривати) [129] и [Rh(CO)₂(DPA-dtc)] (dtc = дитиокарбамат и DPA = дифениламин) [130]...



Слика 10. Структура [Rh(COD)X] комплекса: X = Cl, NH₃, acac, PMI, PEI, PIP...

Родијум(III) координациона једињења су изоелектронска са Ru(II) и Pt(IV) комплексима. Генерално, ови комплекси су октаедарски и инертни, али многи Rh(III) комплекси показују значајну антитуморску и антимикробну активност. Ранији недостатак интересовања за антитуморску активност родијум(III) комплекса често се приписује кинетичкој инертности нискоспинског $4d^6$ јона метала, али и високој општој токсичности и малој растворљивости [113]. Први подаци о антитуморској активности Rh(III) једињења појавили су се пре Розенберговог открића цисплатине и односили су се на со, RhCl₃· 3H₂O [131]. Оксалил хомоцистеин тиолактон, један од *N*-супституисаних деривата хомоцистеин тиолактона, формира комплекс са родијум(III)-хлоридом (ROHT) који, такође, показује антинеопластичну активност код мишева са трансплантираним рабдомиосаркомом (тумор скелетних мишића) [132]. Комплекси типа [RhL₄Cl₂]Cl (L = сулфа-хиноксалин) се потенцијално могу применити у лечењу хиперпластичне нодулигенезе јетре [133]. Бројни

родијум(III) аналози антитуморских комплекса рутенијума(III), такође, показују антинеопластичну активност. Сматра се да се рутенијум(III) комплекси активирају њиховом редукцијом до рутенијума(II), што је мало вероватно када су у питању родијум(III) комплекси, што може објаснити њихову генерално мању активност [113]. Као и *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃], *mer*-[RhCl₃(NH₃)₃] је такође активан, али нерастворан у води [134]. Комплекси *mer*, *cis*-[RhCl₃(DMSO)₂(NH₃)] и *mer*, *cis*-[RhCl₃(DMSO)₂(Im)] (Im = имидазол) [135] су антитуморски активни (Слика 11), док *mer*, *cis*-[RhCl₃(DMSO)(Im)₂], Na{[*trans*-[RhCl₄(DMSO)(Im)]} и [HIm]{*trans*-[RhCl₄(Im)₂]} не показују активност [135].



Слика 11. Структуре антитуморских Rh(III) комплекса: *mer*, *cis*-[RhCl₃(DMSO)₂(NH₃)] (**a**) и *mer*, *cis*-[RhCl₃(DMSO)₂(Im)] (**б**).

Комплекси Na{*trans*-[RhCl₄(DMSO)(Im)]} и Na{*trans*-[RhCl₄(DMSO)(Im)]}·2DMSO незнатно инхибирају раст примарног тумора дојке имплантираног код мишева при чему други комплекс може инхибирати метастазе овог тумора у плућима [135,136]. Значајна инхибиција раста ћелијске линије P388 леукемије код мишева постигнута је применом структурно аналогног пиридинског комплекса *mer*, *cis*-[RhCl₃(DMSO)(py)₂] [137] (Слика 12а), док меридионални комплекс *mer*-[RhCl₃(tpy)] (tpy = 2,2':6',2''-терпиридин) показује изражену цитотоксичност према ћелијама карцинома дојке и леукемије [138] (Слика 126).





Слика 12. Пиридински и терпиридински Rh(III) комплекси: *mer*, *cis*-[RhCl₃(DMSO)(py)₂] (**a**) и *mer*-[RhCl₃(tpy)] (**б**).

Међутим, на примеру комплекса *fac*-[RhCl₃([9]aneNS₂)] ([9]aneNS₂ = 1-aza-4,7дитиациклононан) који је показао сличну активност као цисплатина на ћелијској линији тумора јајника NuTu-19, доказано је да меридионални распоред хлоридо лиганда није предуслов за антитуморску активност [139]. Тако је незанемарљива активност примећена код *fac*-[RhCl₃(DMSO)(bpy)] и *mer*-[RhCl₃(DMSO)(phen)] комплекса (bpy = 2,2'-бипиридин и phen = 1,10-фенантролин) на канцеру дебелог црева и канцеру плућа [140].

Віs(бипиридил)родијум(III) комплекси као што су *cis*-[RhCl₂(dppz)(phen)]Cl (dppz = дипиридофеназин) [141] и *cis*-[RhCl₂(3,4,7,8-Me4phen)₂]Cl [142] детаљно су испитивани као потенцијални агенси у фототерапији туморских обољења (Слика 13). Фотоактивирани агенси нуде атрактивну терапеутску стратегију која смањује оштећење нормалног околног ткива омогућавањем временске и просторне контроле над токсичношћу. Дајсон (Dyson) је испитивао активност Rh(III) полу-сендвич комплекса [Rh(η^5 -C₅Me₅)Cl₂(PTA)] (PTA = 1,3,5-триаза-7-фосфатрицикло-[3.3.1.1]декан) [143] који су аналогни антиметастатским једињењима Ru(II) [Ru(η^6 -сутепе)Cl₂(PTA)](RAPTA-C) [144], али који нису показали активност. Неактивност је утврђена и за монохлоридо комплекс [Rh(η^5 -C₅Me₅)Cl(PTA)]⁺. Комплекси родијума(III) са 8-хидроксихинолином и његовим дериватом, 5-бромо-8-хидроксихинолином, показали су завидну активност на T-24 ћелијској линији (рак мокраћне бешике) [145].



Слика 13. Структуре дихлоридородијум(III) комплексних катјона *cis*-[RhCl₂(3,4,7,8-Me₄phen)₂]⁺ (**a**) и *cis*-[RhCl₂(dppz)(phen)]⁺(**б**).

Међутим, када су у питању комплекси родијума(III) са лигандима edta-типа, испитивања антитуморске активности практично и не постоје.

Иако су тек недавно добили значајну пажњу, комплекси Rh(III) показују различита својства која их чине занимљивим као потенцијалним антиканцерогеним агенсима. Њихова реактивност, преференције везивања и понашање према ћелијама, у великој мери, зависе од комбинације лиганда и координационе геометрије, што омогућава значајан опсег у дизајну лекова и развоју водећих супстанци. Понашање неких комплекса сугерише да интеркалација ДНК не мора нужно бити предуслов за изванредну цитотоксичност [146]. Коначно, већина досадашњих резултата иде "на руку" потенцијалној примени комплексних једињења родијума(III) у терапији туморских обољења. С тим у вези, највећи задатак је унапређење дизајнирања самих система. Комплекси би требали да буду добро растворни, стабилни, да буду веома липофилни у биолошким системима, али да, у исто време, изазивају што мање споредних ефеката. На крају, треба посебну пажњу посветити избору лиганада који представљају главне елементе који утичу на постизање наведених циљева.

1.5 Компјутерска хемија

Компјутерска хемија је грана науке која нам може дати податке који су у сагласности са подацима добијеним експерименталним путем, а који се односе на структурне карактеристике, особине супстанци, а могуће је добити информације о реакционом механизму саме реакције. Молекулским моделирањем могуће је креирати молекуле, манипулисати њима, израчунавати и предвиђати њихове реалне структуре, а на вишем нивоу могуће је симулирати различите биолошке процесе. Рачунарске методе хемије се могу поделити у две велике групе: молекулска механика [147] и квантна механика [148], а даље се квантна механика грана на: *аb initio*, семи-емпиријске методе и DFT (Density Functional Theory - Теорија функционала густине).

1.5.1 Молекулска механика (ММ)

У основи, молекулска механика се базира на законима класичне физике, па се може рећи да она занемарује утицај електрона. Молекулско-механичке методе спадају у емпиријске методе. ММ молекул третира као скуп кугли. Кугле представљају атоме различите величине у зависности од врсте атома (врста хемијског елемента). Атоми се међу собом држе заједно опругама, тј. везама (Слика 14) [149]. У оваквим системима везе се противе процесу истезања или савијања у односу на њихове природне дужине и углове у самим молекулима, што се манифестује променом енергије у односу на промену геометрије. Поједностављено, ММ тежи да открије геометрију молекула који има минималну енергију (конформер у случају флексибилних молекула) и у ту сврху користи механички модел (Слика 14). Молекулска механика се врло често назива и force field метода или метода поља силе јер су и параметри и само математичко изражавање енергије одређени јачином поља.



Слика 14. Молекулско-механичка презентација молекула (force field метода)

Укупна енергија система у молекулској механици се може приказати кроз прост математички израз (поље силе):

$$E(\mathbf{r}^{\mathbf{N}}) = \sum_{bonds} \frac{k_{li}}{2} \left(l_i - l_{i,0} \right)^2 + \sum_{angles} \frac{k_{\theta i}}{2} \left(\theta_i - \theta_{i,0} \right)^2 + \sum_{torsions} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left(4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \right) + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}}$$
(1)

Из израза се може видети да је потенцијална енергија система једнака збиру различитих доприноса који се односе на везивне и невезивне интеракције. Истезање или сабијање веза, савијање углова веза, увијање углова веза, тј. торзије (диедарски углови) спадају у везивне интеракције, док у невезивне спадају Кулонове (Coulomb) и Ван дер Валсове (van der Waals) интеракције. Сви наведени доприноси приказани су на Слици 15.



Слика 15. Приказ доприноса везивних и невезивних интеракција у молекулској механици поља силе: истезање веза, савијање углова, торзије и невезивне интеракције.

Моделирање везе међу атомима диктира први члан једначине (1) и то тако што користи хармонијски потенцијал. Хармонијски потенцијал повећава енергију у зависности од одступања дужине везе l_i у односу на референтну вредност $l_{i,0}$. Други члан једначине је добијен простом хармонијском апроксимацијом и представља суму над сваким образованим валентним углом који граде три атома у случају да су два атома у молекулу међусобно повезана неким трећим (Слика 15). Следећи члан једначине се односи на диедарски, односно торзиони угао, где се промена енергије дешава у зависности од ротације везе. Ротација око просте везе може мењати торзиони угао од 0 - 360° , што за последицу има промену геометрије и енергије молекула. И на крају, последњи или четврти члан ове једначине је невезујући и односи се на интеракције атомских паровова (*i* и *j*) који нису директно везани нити су везани заједничким атомом (раздвојени са најмање три везе). Овај

члан користи Кулонов потенцијал за електростатичке интеракције, а за Ван дер Валсове интеракције користи Ленард-Џонсов (Lennard-Jones) потенцијал. Напреднија и финија поља силе могу имати додатне чланове, али и они сами у основи морају имати претходно наведена четири члана.

ММ се може применити за израчунавања геометрија, али и енергија малих и средњих молекула, затим за израчунавање полазних геометрија за даља израчунавања, ретко за израчунавање геометрија и енергија прелазних стања, за извођење функције потенцијалне енергије у случају кретања молекула у пољу молекулске динамике, за израчунавање геометрија и енергија полимера... Предности ММ су у томе што је брза метода, а у хардверском смислу могуће је извршити израчунавања и на средње опремљеним рачунарима, где се добијају задовољавајући резултати. Основна мана ММ-а је што не узима у обзир електроне, па не може дати информацију о облику и енергијама молекулских орбитала, нити о изгледу електронског спектра. Исто тако, параметризација поља која је урађена за једну врсту једињења не може бити примењена на неке друге класе, а то може довести до добијања погрешних геометрија и енергија. Овај проблем се може превазићи додатком молекула или јона растварача у систем који се испитује.

1.5.2 Квантна механика (QM)

1.5.2.1 Ab-initio

Ab-initio је метода која се заснива на есенцијалним квантно-механичким принципима (*Ab-initio* = *први принцип*). Шредингерова (Schrödinger) једначина представља базу квантно-механичких прорачуна:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \tag{2}$$

где је Ĥ - Хамилтонијанов оператор, Е - енергија атома или молекула, а Ψ - таласна функција.

За било који молекул који садржи М нуклеуса и N електрона без присуства електричног и магнетног поља, Хамилтонијан се може изразити као:

$$\hat{\mathbf{H}} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{N} \nabla_{i}^{2} - \frac{1}{2} \sum_{A=1}^{M} \nabla_{A}^{2} - \sum_{i=1}^{N} \sum_{A=1}^{M} \frac{Z_{A}}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^{N} \sum_{j>i}^{N} \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^{M} \sum_{B>A}^{M} \frac{Z_{A}Z_{B}}{R_{AB}}$$
(3)

У претходном изразу (3) први и други члан се односе на кинетичку енергију језгара и електрона, а преостала три на потенцијалну енергију електростатичких интеракција међу језгрима и електронима. Лапласов (Laplas) оператор ∇^2 (nabla) изражен је као збир других извода функције (у координатама картезијана) (4):

$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$$
(4)

Међутим, када се ради о системима који се сложенији од водоника, неопходно је увести додатне апроксимације како би Шредингерова једначина била решена и то, Борн-Опенхајмерова (Born-Oppenheimer), Хартри-Фокова (Hartree-Fock) и Линеарна комбинација атомских орбитала (LCAO).

1.5.2.2 Теорија функционала густине (DFT = Density Functional Theory)

Почеци развоја DFT теорије везују се за радове Томаса и Фермија (Thomas и Fermi) из 1920. године [150]. У основи њихове теорије стоји да енергија основног стања система у коме се крећу електрони може бити директно изражена и то само у односу на густину електрона. Много касније су Хохенберг и Кон (Hohenberg и Kohn) [151] дошли до своје теореме (прва Хохенберг-Конова теорема) из које се може видети да се енергија основног стања може одредити само одговарајућом густином електрона р(r):

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}[\boldsymbol{\rho}(\mathbf{r})] \tag{5}$$

Друга теорема Хохенберга и Кона израчунава енергију покоравајући се варијационом DFT принципу: густина која минимизира укупну енергију [р_{trial}] виша је или једнака густини основног стања:

$$\mathbf{E}[\rho_{\text{trial}}] \ge \mathbf{E}[\rho] \tag{6}$$

Из наведеног се може закључити да енергија електрона заједно са густином основног стања могу бити израчунате без примене Шредингерове једначине.

Међутим, у практичној употреби DFT-а користи се Кон-Шамов приступ (Kohn и Sham) [152]. DFT је егзактна теорија, али не даје практичан рецепт како се добија густина ако не знамо таласну функцију, а ни како се од густине добија енергија. То је због тога што се не зна форма универзалног функционала. Зато се уводе апроксимације за форму функционала, тзв. функционали измене и корелације, који су, нажалост, апроксимативни. У приступу Кона и Шама једначине које се решавају су јако сличне Хартри-Фок методи, али се уместо егзактног интеграла измене уводе апроксимативни функционали. Предност DFT методе је што, иако измена није егзактна, DFT укључује велики део првенствено динамичке корелације, који је у потпуности одсутан у Хартри-Фок теорији. Генерално, измењиво-корелациони функционали могу се поделити у три групе: 1) функционали засновани на апроксимацији локалне густине (LDA = Local Density Approximation) и локалне спинске густине (LSDA = Local Spin Density Approximation), 2) функционали засновани на апроксимацији генерализованог градијента (GGA = Generalized Gradient Арргохimation) и 3) хибридни функционали. У изради ове докторске дисертације коришћени су хибридни функционали M06 [153] и B3LYP [154].

1.5.2.3 Семи-емпиријске методе

Харти-Фокова (HF) теорија је полазна тачка за два типа прорачуна. Први је *ab initio*, укључујући HF прорачуне и пост-HF прорачуне. Они израчунавају све интеграле који се појављују у HF формулацији. Други је семи-емпиријски приступ који уводи додатне апроксимације. У семи-емпиријским методама неки од интеграла су постављени на нулу, а остали се третирају као параметри прилагођени неким експерименталним подацима, као што су геометрије или енергије. Ове методе су веома ефикасне у израчунавању, али очигледно имају ограничену применљивост, посебно за једињења прелазних метала. Могу се користити само за системе за које постоје параметри.

Централно место код семи-емпиријских модела заузима NDDO апроксимација (Neglect of Diatomic Differential Overlap). По овој апроксимацији нема преклапања међу орбиталама које припадају различитим атомима. Квантно-механички двоелектронски интеграли J_{µv} и K_{µv} се могу занемарити или заменити емпиријским параметрима. Емпиријски параметри служе за подешавање ових модела тако да добијени резултати показују што веће слагање са експерименталним, а понекад и са *ab initio* резултатима.

Употреба емпиријских параметара уводи ефекте корелације електрона у семи-емпиријске моделе (до одређене мере).

Семи-емпиријске методе које су највише коришћене су AM1 (Austin Model 1) и PM3 (Parametric Method 3), а у новије време RM1 (Recife Model 1) и PM6 (Parametric Method 6). Овим моделима могуће је израчунати термодинамичке особине, IR спектре, диполне моменте, паријална наелектрисања, молекулске орбитале, електростатичке потенцијале, прелазна стања, геометрије и енергије побуђених стања, као и различите особине кристала. Такође, могућа је и оптимизација гигантских система са преко 15000 атома. У изради ове дисертације коришћен је PM6 метод.

1.5.2.4 Мелер-Плесетове методе

Све пост-НF методе имају за циљ да исправе нетачност HF формулације тиме што уводе енергију која произилази из корелације електрона која није урачуната у оригиналној HF методи [155]. Мелер-Плесетова (Møller–Plesset) метода се заснива на коришћењу пертубационе теорије зарад апроксимације ефеката које корелација електрона има на укупну енергију. Мелер-Плесетова метода која се заснива на конфигурацијама дублова зове се корекција другог реда (MP2) [156]. Овај модел је заснован на промоцији електрона који води до побољшања у односу на HF теорију. Први извод енергије се добија аналитички, па се оптимизација геометрије изводи ругински. Формулисани су и Мелер-Плесетови модели вишег реда, као што су MP3, MP4, MP5 и MP6. Сви ови модели, сем MP3, укључују конфигурације које су настале промоцијом већег броја електрона, док се MP3 модел заснива на конфигурацији дублова. Предност Мелер-Плесетових метода је у томе што су мање захтевне од метода интеракције конфигурација и сагласне су величини. С друге стране, ове методе се не покоравају варијационом принципу, а такође код MP метода вишег реда се не може гарантовати конвергенција система. У овој дисертацији коришћена је MP2 метода.

1.5.3 Теорија природних везивних орбитала (Natural Bond Orbital Analysis -NBO)

Природне орбитале (natural orbitals) добијају се дијагонализацијом матрица густине првог реда, а окупациони бројеви природних орбитала представљају својствене вредности.

NBO орбитале (Natural Bond Orbitals = природна везивна орбитала) омогућавају прецизно описивање електронске густине представљајући ортонормирани скуп локализованих природних орбитала [157]. Простим језиком, "природне орибитале" представљају јединствене орбитале којима је оптимално описана таласна функција, па се може рећи да таласна функција "сама бира" природне орбитале. Природне орбитале су по карактеру максимално окупиране орбитале и локализоване су у областима, са једним или два центра молекула [158]. Начин на који се орбитале приказују је сличан стандардном хемијском, односно Луисовом (Lewis) моделу слободних и везивних парова. Приликом цртања орбитала код ове анализе тражи се што оптималнији начин приказа двоцентричних веза и усамљених парова електрона (варијациона метода), а основни услов је да N природних везивних орбитала буде окупирано. Процедура генерисања NBO орбитала је врло важна, јер се много тачније могу добити наелектрисања атома и добијене вредности не зависе од избора базног сета. NBO анализом се могу испитати све могуће интеракције међу орбиталама, а квантификовање тих интеракција врши се применом пертубационе теорије другог реда. Квантификовањем донорско-акцепторских интеракција (D/A) између NBO орбитала могу се добити информације о значају одређених веза и интеракција за стабилност молекула.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

2.1 Хемикалије и реагенси

Све коришћене хемикалије су комерцијално доступне, аналитичког степена чистоће и нису пречишћаване пре употребе. Монохлорсирћетна киселина, етилендиамин, 1,3пропандиамин, 3-хлорпропионска киселина, Ca(OH)₂, CaO, NaOH, NaCl, HCl, D₂O и RhCl₃·3H₂O, набављени су од истог произвођача Sigma-Aldrich. Киселине H₃ed3a, H₃1,3pd3a и H₄eddadp, које су коришћене у синтезама комплекса, синтетисане су раније и за потребе ове дисертације, њихова синтеза је поновљена коришћењем постојеће литературе [44,56].

Све ћелијске линије набављене су од American Type Culture Collection-ATCC. У овој дисертацији коришћено је пет ћелијских линија и то једна здрава и четири малигне: A-549 (хумани карцином плућа, ATCC CCL 185), MCF-7 (хумани аденокарцином дојке, ATCC HTB22), HT-29 (хумани аденокарцином дебелог црева, ATCC HTB38), HeLa (хумани аденокарцином грлића материце, ATCC CCL2) и MRC-5 (нормални хумани фетални фибробласти плућа, ATCC CCL 171). Ћелије су гајене у Dulbecco-вом модификованом Eagle-овом медијуму (DMEM, Sigma-Aldrich) са 4,5% глукозе, додато је 10% феталног говеђег серума (FBS, Sigma Aldrich), а медијум је обогаћен антибиотиком и антимикотиком (Sigma-Aldrich). Ћелије су гајене на 37 °C у атмосфери ваздуха који садржи 5% CO₂ и засићен је воденом паром (100%).

2.2 Синтезе комплекса

Све синтезе комплекса су рађене према раније описаном поступку Радановића и сарадника [159].

2.2.1 Добијање cis-equatorial-[аква(етилендиамин-N,N,N'-триацетато) родијум(III)] хидрата, [Rh(ed3a)(H₂O)]·H₂O (**1**)

Ca₃(ed3a)₂·12H₂O (1,99 g; 2,5 mmol) растворен је у 15,0 mL воде и овом раствору је додат раствор NaOH који је добијен растварањем 0,6 g (15,0 mmol) у 5,0 mL воде у циљу одвајања калцијума у облику Ca(OH)₂. Бели талог Ca(OH)₂ је процећен на вакууму и одбачен, а преостали филтрат је коришћен за синтезу жељеног комплекса. У филтрат је додат раствор RhCl₃·3H₂O који је добијен растварањем 1,14 g (5,0 mmol) ове соли у 5,0 mL воде. Добијена смеша је мешана на 145 °C око 7 h у затвореном тјубу од Ругех стакла. Након хлађења до собне температуре, жути раствор је процеђен, а филтрат нанет на колону напуњену смолом типа Sephadex QAE A-25 у Cl⁻ облику. Колона је елуирана помоћу 0,1 М раствора NaCl, при чему су се издвојиле три траке различитог наелектрисања. Прва трака је упарена до мале запремине, а затим обесољена гел-филтрационом техником на Sephadex G-10 смоли. Трака је опет упарена до запремине од ~ 1.0 mL, додат је етанол (око 1,0 mL) и након три дана стајања у фрижидеру појавили су се кристали жуте боје, који су процеђени, испрани етанолом и осушени на ваздуху. Принос: 0,4 g (21,69%). Тачка топљења: > 305 °C (из EtOH). Израчунато за RhC₈H₁₅N₂O₈ (M=370,13 g mol⁻¹): C, 25,96; H, 4,08; N, 7,57 %; нађено: С, 25,37; H, 4,22; N, 7,36 %. IR (KBr, v_{max} cm⁻¹): 1631 v(COO⁻), 3435 v(N-H). UV-Vis (H₂O, c = 10^{-3} M): λ_{max}/nm (ε/dm^3 mol⁻¹ cm⁻¹): 294 (327), 353 (406). $\delta^{-1}H$ NMR (200 MHz, D₂O, TSP): 4,09 (AB nap, G прстен), 4,05 (s, R₁ прстен), 3,30 (AB nap, R₂ прстен); δ^{13} C NMR (50 MHz, D₂O/CD₃OD, TSP): 184,26, 182,84, 18,.26 (C=O), 67,30, 64,59, 62,70, 56,53, 56,17 (CH₂).

2.2.2 Добијање cis-equatorial-натријум[(етилендиамин-N,N,N'-триацетато) хлоридо родат(III)] хидрата, Na[Rh(ed3a)Cl]·H₂O (**2**)

Комплекс је добијен у истој синтези као и комплекс (1) и то као друга трака на хроматографској колони. Елуат је упарен на малу запремину, обесољен на исти начин као и претходни комплекс, затим упарен до ~ 3,0 mL, додата еквивалентна запремина етанола и остављен преко ноћи у фрижидеру. Кристали жуте боје су процеђени, испрани етанолом и осушени на ваздуху. Принос: 0,8 g (39,10%). Тачка топљења: > 305 °C (из EtOH). Израчунато за NaRhC₈H₁₃N₂O₇Cl (M=410,55 g mol⁻¹): C, 23,40; H, 3,19; N, 6,82%; нађено: C, 23,55; H, 3,39; N, 6,99 %. IR (KBr, v_{max} cm⁻¹): 1630 и 1680 v(COO⁻), 3426 v(N-H). UV-Vis (H₂O,

c = 10⁻³ M): λ_{max}/nm (ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹): 307 (448), 373 (512). δ ¹H NMR (200 MHz, D₂O, TSP): 4,05 (AB пар, G прстен), 3,99 (s, R₁ прстен), 3,34 (AB пар, R₂ прстен); δ ¹³C NMR (50 MHz, D₂O/CD₃OD, TSP): 184,67, 183,71, 182,10 (C=O), 66,60, 63,72, 61,84, 57,37, 57,04 (CH₂).

Трећа трака, која се налазила на врху колоне, елуирана је концентрованим NaCl и сматрамо да је она смеша различитих хидроксо врста са наелектрисањем већим од -2. Трака није карактерисана.

2.2.3 Добијање cis-polar-[аква(1,3-пропандиамин-N,N,N'-триацетато) родијум(III)] дихидрата, [Rh(1,3-pd3a)(H₂O)]·2H₂O (**3**)

Раствору 1,24 g H₃1,3-pd3a (5,0 mmol) y 10,0 mL воде додато је 0,6 g (15,0 mmol) NaOH. У овај раствор додат је раствор добијен растварањем 1,14 g (5,0 mmol) RhCl₃·3H₂O y 5,0 mL воде. Добијена смеша је даље третирана као у случају комплекса (1). На хроматографској колони уочено је пет трака. Прва трака је упарена на малу запремину, затим обесољена коришћењем Sephadex G-10 смоле, а затим упарена до ~ 5,0 mL и остављена у ексикатору изнад ацетона 2-3 дана. Прах жуте боје је филтриран, испран ацетоном и осушен на ваздуху. Принос: 0,25 g (12,43%). Тачка топљења: > 305 °C (из ацетона). Израчунато за RhC₉H₁₉N₂O₉ (M=402,16 g mol⁻¹): C, 26,88; H, 4,76; N, 6,97%; нађено: C, 26,99; H, 4,55; N, 7,07%. IR (KBr, v_{max} cm⁻¹): 1632 v(COO⁻), 3429 v(N-H). UV-Vis (H₂O, c = 10⁻³ M): λ_{max} /nm (ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹) = 336 (167), 402 (203). ¹H NMR δ (200 MHz, D₂O, TSP): 4,05 (AB пар, R прстен), 3,96 (AB пар, G прстенови); ¹³C NMR δ (50 MHz, D₂O, TSP): 183,60, 179,87, 175,06 (C=O), 74,59, 69,97, 65,58, 58,03, 47,37, 22,39 (CH₂).

2.2.4 Добијање cis-polar-натријум[(етилендиамин-N,N,N'-триацетато) хлоридородат(III)] дихидрата, Na[Rh(1,3-pd3a)Cl]·2H₂O (**4**)

Комплекс је добијен у истој синтези као и комплекс (**3**) у облику треће траке на хроматографској колони. Трака је упарена на малу запремину, обесољена на исти начин као и претходни комплекси, затим упарена до ~ 5,0 mL, остављена у ексикатору изнад ацетона 2-3 дана. Кристали жуте боје су филтрирани, испрани ацетоном и осушени на ваздуху. Принос: 0,45 g (20,36%). Тачка топљења: > 305 °C (из ацетона). Израчунато за NaRhC₉H₁₇N₂O₈Cl (M=442,59 g mol⁻¹): C, 24,42; H, 3,87; N, 6,33%; нађено: C, 24,22; H, 3,95; N, 6,47 %. IR (KBr, v_{max} cm⁻¹): 1631 v(COO⁻), 3497 v(N-H). UV-Vis (H₂O, c = 10⁻³ M): λ_{max} /nm (ϵ /dm³ mol⁻¹ cm⁻¹) = 308 (217), 397 (159). ¹H NMR δ (200 MHz, D₂O, TSP): 3,99 (AB пар, R прстен), 3,93 (AB пар, G прстенови); ¹³C NMR δ (50 MHz, D₂O, TSP): 186,07, 185,09, 183,45 (C=O), 72,94, 67,51, 64,23, 59,57, 52,56, 28,75 (CH₂).

2.2.5 Добијање trans(O₅O₆)-натријум[(етилендиамин-N,N'-диацетато-N,N'-ди-3-пропионато)родат(III)] тетрахидрата, Na[Rh(eddadp)]·4H₂O (**5**)

Синтеза је потпуно поновљена по пропису из референце [159] где је комплекс раније синтетисан у облику праха. Након додатка етанола и стајања у фрижидеру пар дана, кристали жуте боје су процеђени, испрани етанолом и осушени на ваздуху. Принос: 0,4 g (11,68%). Тачка топљења: > 305 °C (из етанола). Израчунато за NaRhC₁₂H₂₄N₂O₁₂ (M=514,23 g mol⁻¹): C, 28,03; H, 4,70; N, 5,45%; нађено: C, 28,30; H, 4,55; N, 5,60%. IR (KBr, v_{max} cm⁻¹): 1573, 1625, 1641_(п), 1667 v(COO⁻). UV-Vis (H₂O, c = 10⁻³ M): λ_{max} /nm (ϵ /dm³ mol⁻¹ cm⁻¹) = 298_(п) (291), 344 (519), 380_(п) (319). ¹H NMR δ (200 MHz, D₂O, TSP): 3,92 (AB пар, R прстен), 3,92 (AB пар, G прстен); ¹³C NMR δ (50 MHz, D₂O, TSP): 186,64, 185,96, 183,45, 180,90 (C=O), 67,88, 66,20, 64,02, 62,83, 59,55, 58,79, 36,07 (CH₂).

2.3 Елементална микроанализа

За комплексе (1) и (2) микроанализе за С, Н и N рађене су у Микроаналитичкој лабораторији Хемијског института Универзитета у Хајделбергу, а за комплексе (3-5) у Микроаналитичком одељењу Хемијског факултета, Универзитета у Београду.

2.4 Тачка топљења

Тачке топљење су мерене на Stuart апарату са тачношћу $\pm 1^{\circ}$ C.

2.5 Инфрацрвени спектри

Инфрацрвени спектри комплекса (1) и (2) су снимљени на спектрофотометру Perkin– Elmer 16 PC FTIR (KBr-техника) у области 400-4000 сm⁻¹, а за комплексе (**3-5**) је коришћен Perkin-Elmer FTIR спектрофотометар Spectrum One (KBr-техника).

2.6 Електронски апсорпциони спектри

Електронски апсорпциони спектри комплекса (1) и (2) су снимљени на помоћу Tidas II J&M спектрофотометру, док је за сва остала мерења коришћен UV-Vis спектрофотометар Cary 300 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Сви спектри су снимљени у води као растварачу у концентрацији $1 \cdot 10^{-3}$ М.

2.7 NMR спектри (${}^{1}H u {}^{13}C$)

NMR спектри комплекса (1) и (2) добијени су помоћу Bruker Advance I 200 апарата, док је за снимање спектара комплекса (3-5) коришћен Varian Gemini 200 MHz NMR спектрометар. Као растварач коришћен је D_2O у присуству TSP као референтног стандарда, а положаји сигнала су изражени као δ (ppm).

2.8 Мерења у растворима

2.8.1 Потенциометријске титрације

Потенциометријска мерења су вршена помоћу Methrom 827 pH-метра са Titronic универзалном Piston биретом и комбинованом стакленом електродом (Слика 16). Калибрација електроде је извршена употребом стандардних пуферских раствора pH 4,0 и 7,0. У апаратуру за потенциометријска мерења спада pH-метар, комбинована стаклена електрода, титрациони суд, магнетна мешалица и систем за увођење гаса. Све титрације су вршене у титрационом суду са дуплим зидовима између којих протиче термостатирана вода у циљу одржавања константне температуре ($25,0\pm0,1$ °C). У суд су биле уроњене електрода и цевчица за довод азота како би се мерења извршила у инертној атмосфери без присуства

 O_2 и CO₂. Почетна запремина раствора за титрацију била је 20,0 mL, у којима је јонска јачина раствора била константна и одржавана додатком 0,10 M NaCl. Као средство за титрацију коришћен је бескарбонатни раствор NaOH (с = 0,0733 M). У сваки испитивани раствор додавана је тачно одређена количина хлороводоничне киселине да би се одмах на почетку избегло комплексирање или хидролиза. Сви раствори су припремљени у бидестилованој води. За ова проучавања направљена је серија раствора Rh³⁺ и лиганада у којима је однос концентрација Rh³⁺/L следећи: 1:1,5 и 1:3 (L = H₃ed3a) и 1:0,9 и 1:2,4 (L = H₃1,3-pd3a). Концентрација Rh³⁺ била је 2,0 mM. Титрације су изведене у опсегу pH 1,9-8,0. Потенцијал је мерен након сваког додатка титрационог средства по постизању константе вредности. Обично су стабилни потенцијали за очитавање добијани након 5-10 min на почетку титрације (pH < 4,0), 10-15 min на pH = 4,0-6,0, 20-30 min на pH = 6,0-7,0 и након 30 min на pH > 7,0. Титрације су завршаване након замућења раствора (pH > 8,0). Све титрације су изведене у дупликату.



Слика 16. Апаратура за потенциометријске титрације.

Добијени експериментални резултати су приказани као зависност pH од титрационог параметра, а.

$$a = \frac{c_{NaOH}V_{NaOH} - V_0 c_{HCl}}{V_0 L} \tag{7}$$

где су с_{NaOH} и V_{NaOH} концентрација, односно запремина додате јаке базе (NaOH), а V_0 и L почетна запремина и концентрација титрованог раствора (H₃ed3a или H₃1,3-pd3a).

Образовање комплекса у испитиваном раствору се може приказати следећом реакцијом (због једноставности наелектрисања нису дата):

$$p \mathbf{M} + q \mathbf{H} + r \mathbf{L} \leftrightarrow \mathbf{M}_{p} \mathbf{H}_{q} \mathbf{L}_{r,} \quad \beta_{p,q,r}$$

$$\tag{8}$$

где су: $M = Rh^{3+}$, $L = H_3ed3a$ или, $H_31,3$ -pd3a, док су одговарајуће константе дате изразом:

$$\beta_{p,q,r} = \frac{[\mathsf{M}_p \mathsf{H}_q \mathsf{L}_r]}{[\mathsf{M}]^p [\mathsf{H}]^q [\mathsf{L}]^r} \tag{9}$$

где су: $\beta_{p,q,r}$ константа стабилности комплекса, L је депротоновани облик лиганда (ed3a³⁻ или, 1,3-pd3a³⁻).

За израчунавање константи протоновања лиганда и константи стабилности комплекса коришћени су програми HYPERQUAD2006 [160] и HypSpec2014 [160,161]. Концентрациони дистрибуциони дијаграми врста присутних у раствору су добијени коришћењем програма HYSS2006 [162].

2.8.2 Спектрофотометријска мерења

Спектрофотометријска мерења су рађена у циљу одређивања условних константи стабилности комплекса и стехиометрије комплекса. У ову сврху коришћен је Cary 300 UV/Vis dual beam спектрофотометар. За припрему раствора RhCl₃· 3H₂O, H₃ed3a, H₃1,3-pd3a и NaCl коришћена је бидестилована вода. Мерења су вршена у растворима узорака запремине 10,0 mL у којима је концентрација Rh³⁺, NaCl и лиганада била константна, тј. [Rh³⁺] = 2,0 mM, 100,0 mM NaCl (за одржавање јонске јачине), [ed3a³⁻] = 3,1 mM и 6,2 mM или [1,3-pd3a³⁻] = 3,6 mM. pH вредност испитиваних раствора је мерена помоћу Methrom 827 pH-метра и варирала је од 2,5-7,8 за H₃ed3a лиганд, а за H₃1,3-pd3a лиганд pH вредности су биле у опсегу од 2,9-9,6. За подешавања потребних pH вредности коришћени су

Табела 1

стандардни раствори NaOH и HCl. Стабилне вредности pH од 0,02 јединице су постигнуте после 3 h загревања на 145 °C (затворена епрувета као и приликом синтезе) и остале су стабилне након 3 h. Uv-Vis спектри су снимани у опсегу од 250 до 600 nm.

2.9 Рендгенске структурне анализе

2.9.1 Рендгенска структурна анализа за cis-equatorial-[Rh(ed3a)(H₂O)]·H₂O комплекс (1)

Рендгенска структурна анализа комплекса рађена је на Agilent Technologies Supernova-E CCD дифрактометру Мо- $K\alpha$ зрачењем ($\lambda = 0,71073$ Å) на 110 К. Подаци су кориговани за апсорпцију ваздуха и детектора, Лоренцове (Lorentz) и поларизационе ефекте [163], а апсорпција кристала је третирана нумерички (Гаусијанова (Gaussian) решетка) [163,164]. Структура је решена интринзично-фазном методом [165-167] и утачњавана full-matrix методом најмањих квадрата заснованом на F^2 према свим јединичним рефлексијама [168-170]. Атоми различити од водоника су утачњавани анизотропно. Позиције водоникових атома су израчунате на стандардним растојањима и утачњаване употребом "riding" модела. Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања су дати у **Табели 1**.

Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре cis-equatorial-[Rh(ed3a)(H ₂ O)]·H ₂ O						
комплекса (1).						
Емпиријска формула	$RhC_8H_{15}N_2O_8$	Запремина јединичне ћелије (Å ³)	1201,22(2)			
Молекулска маса	370,13	Z	4			
Температура (К)	110(1)	Густина (Mg·m ⁻³)	2,047			
λ (Å)	Μο-Κα, 0,71073	μ (mm ⁻¹)	1,462			
Кристални систем	моноклинични	F_{000}	744			
Димензије кристала (mm ³)	0,1918 x 0,0712 x 0,0460	Број сакупљених рефлексија	66435			
Просторна група	$P2_{1}/n$	Број независних рефлексија	3126			
a (Å)	6,94313(8)	R _{int}	0,0598			
b (Å)	15,71268(18)	Број употребљених рефлексија	2965			
c (Å)	11,09315(11)	$R(F), wR(F^2)$	0,0358, 0,0527			
eta(°)	96,9886(10)	GooF on F^2	1,276			

Табела 2

2.9.2 Рендгенска структурна анализа за cis-equatorial-Na[Rh(ed3a)Cl]· H_2O комплекс (2)

Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања су дати у **Табели 2**. Рендгенска структурна анализа комплекса је рађена на Agilent Technologies Supernova-E CCD дифрактометру Cu-*K*α зрачењем (λ = 1,5418 Å) на 110 K.

Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре <i>cis</i> -equatorial-Na[Rh(ed3a)Cl]·H ₂ O					
комплекса (2).					
Емпиријска формула	NaRhC ₈ H ₁₃ N ₂ O ₇ Cl	Запремина јединичне ћелије (Å ³)	1257,62(12)		
Молекулска маса	410,55	Z	4		
Температура (К)	110(1)	Густина (Mg·m ⁻³)	2,168		
λ (Å)	Cu- <i>K</i> a, 1,5418	μ (mm ⁻¹)	13,639		
Кристални систем	моноклинични	F_{000}	816		
Димензије кристала (mm ³)	0,1895 x 0,0717 x 0,0192	Број сакупљених рефлексија	24110		
Просторна група	$P2_{1}/c$	Број независних рефлексија	2410		
a (Å)	13,4003(6)	R _{int}	0,0938		
b (Å)	6,9326(3)	Број употребљених рефлексија	1861		
c (Å)	14,9772(8)	$R(F), wR(F^2)$	0,0511, 0,0810		
β(°)	115,328(6)	GooF on F^2	1,035		

Подаци су кориговани за апсорпцију ваздуха и детектора, Лоренцове (Lorentz) и поларизационе ефекте [163], а апсорпција кристала је третирана нумерички (Гаусијанова (Gaussian) решетка) [163,164]. Структура је решена методом тешког атома у комбинацији са структурном експанзијом помоћу директних метода које се примењују на различите структурне факторе [171,172], а утачњавана је full-matrix методом најмањих квадрата заснованом на F^2 према свим јединичним рефлексијама [168-170]. Атоми различити од водоника су утачњавани анизотропно. Позиције водоникових атома су израчунате на стандардним растојањима и утачњаване употребом "riding" модела.

2.9.3 Рендгенска структурна анализа за cis-polar-Na[Rh(1,3-pd3a)Cl]·2H₂O комплекс (**4**)

Жуто обојени кристали су анализирани на Bruker SMART APEX2 дифрактометру Мо-Ка зрачењем ($\lambda = 0,71069$ Å). Структура је решена директним методама SIR97 [173] и утачњавана применом SHELXL97 [174] програма имплементираног у WinGX [175]. За графичку презентацију добијених структура употребљен је програм ORTEPIII [176]. Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања су дати у **Табели 3**.

Табела З

Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре *cis*-polar-Na[Rh(1,3-pd3a)Cl]·2H₂O комплекса (**4**).

Емпиријска формула	NaRhC9H17N2O8Cl	Запремина јединичне ћелије (Å ³)	1469,6(7)
Молекулска маса	442,59	Z	4
Температура (К)	298,15	Густина (Мg·m ⁻³)	2.00
λ (Å)	Μο- Κα, 0,71073	$\mu (mm^{-1})$	1,415
Кристални систем	моноклинични	F_{000}	888
Димензије кристала (mm ³)	0,20 x 0,20 x 0,70	h, k, l	16, 8, 16
Просторна група	$P2_{1}/c$	Број сакупљених рефлексија	15632
a (Å)	14,175(4)	Број независних рефлексија	2572
b (Å)	7,354(2)	$R(F), wR(F^2)$	0,0389, 0,0846
c (Å)	14,308(4)	GooF on F^2	1,044
eta (°)	99,850(4)	Анализа рез. густине: max, min ($e \cdot Å^{-3}$)	0,60, -0,82

2.9.4 Рендгенска структурна анализа за $trans(O_5O_6)$ -Na[Rh(eddadp)]·4H₂O комплекс (5)

Рендгенска структурна анализа је рађена на дифрактометру типа Bruker-Nonius Карра ССD Мо-Ка зрачењем ($\lambda = 0,71069$ Å). Подаци су кориговани за Лоренцове (Lorentz) и поларизационе ефекте, а семиемпиријске корекције апсорпције урађене су на основу вишеструких скенирања помоћу SADABS V2.06 [177]. Структура је решена директним методама на бази SHELXTL NT 6.12 програма [169], а за утачњавање структуре коришћен је SHELXL2016/6 [170]. Атоми различити од водоника су утачњавани
Табела 4

анизотропно. Положаји свих атома водоника изведени су из разлике Fourier-ове мапе и њихови позициони параметри су утачњавани. Изотропни параметри померања свих атома водоника везани су за оне који одговарају њиховим атомима носачима за фактор 1.2 или 1.5. Фиксна ограничења дужине примењена су на О-Н везе молекула воде који су координовани на катјон натријума. Основни кристалографкси подаци су дати у **Табели 4**.

Основни кристалографски подаци и параметри утачњавања структуре trans(O ₅ O ₆)-Na[Rh(eddadp)]·4H ₂ O						
комплекса (5).						
Емпиријска формула	$NaRhC_{12}H_{24}N_2O_{12}$	γ (°)	84,116 (7)			
Молекулска маса	514,23	Запремина јединичне ћелије (Å ³)	894,62 (11)			
Температура (К)	200	Z	2			
λ (Å)	Μο- Κα, 0,71073	Густина (Мg·m⁻³)	1.909			
Кристални систем	триклинични	$\mu ({\rm mm}^{-1})$	1.05			
Димензије кристала (mm ³)	0,23 x 0,06 x 0,04	F_{000}	524			
Просторна група	<i>P</i> -1	h, k, l	8, 11, 21			
a (Å)	6,3075 (3)	Број сакупљених рефлексија	23968			
b (Å)	8,7637 (8)	Број независних рефлексија	4446			
c (Å)	16,2724 (12)	$R(F), wR(F^2)$	0,018, 0,042			
α (°)	89,236 (8)	GooF on F^2	1,05			
β(°)	89,299 (6)	Анализа рез. густине: max, min (e·Å ⁻³)	0,43, -0,51			

2.10 Однос изомера хексадентатних комплекса у воденом раствору

Процедура је у складу са раније објављеним радом Кина и Серла (Keene и Searle) [178]. Овај експеримент је рађен за Na[Rh(eddadp)] и K[Co(eddadp)] комплексе у циљу одређивања термодинамичке равнотеже реакционих смеша како би се одредио процентуални допринос сваког изомера. Комплекси су синтетисани по раније описаним процедурама [54,159]. Након завршених синтеза реакционе смеше оба комплекса су разблажене тако да концентрације комплексних анјона (-1 наелектрисања) буду мање од 0,1 М. Аликвоти су нанесени на по две колоне величине 20 x 1 cm. Колоне су биле напуњене смолом Sephadex QAE A-25 у Cl⁻ облику (у случају Rh) и Dowex 1-X8 (200-400 mesh) у NO3⁻ облику (у случају Co). Комплекси су елуирани одговарајућим растворима и то 0,1 M NaCl (у случају Rh) и 0,1 M KNO3 (у случају Co) у циљу одвајања *trans*(O5) (први на колони) и *trans*(O_5O_6) (други на колони) геометријских изомера. Одвојене траке изомера комплекса су сакупљене, квантитативно пренете у нормалне судове и разблажене до стандардних запремина (50,0 или 100,0 mL). Раствори су испитивани спектрофотометријски у кварцним киветама пречника 1 ст. Апсорбанце елуираних трака изомера мерене су и на првом и другом апсорпционом максимуму (за Rh на 296 и 344 nm и за Co на 389 и 539 nm) на UV-Vis спектрофотометру Cary 300 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) са водом као референтним стандардом.

2.11 Биолошки тестови

2.11.1MTT mecm

Инхибиција раста ћелија је процењена помоћу колориметријског МТТ теста [179]. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум бромид) (Sigma Aldrich) је жута со тетразолијума која се редукује до нерастворног формазана љубичасте боје (Шема 4). Жута боја се везује за митохондрије, при чему проценат везивања служи за процену активности испитиваног једињења, односно као мера вијабилитета. Механизам дејства се огледа у дејству митохондријалног ензима сукцинат дехидрогеназе.



Шема 4. Трансформација МТТ соли у формазан.

Експоненцијално растуће туморске ћелије су засејане у микротитар плоче са 96 бунарића (Costar) са оптималном густином засејавања од 5 · 10³ (или 10 · 10³) по бунарићу да би се осигурала логаритамска стопа раста током периода тестирања. Вијабилне ћелије су

пренете у запремини од 90.0 µL по бунарићу и пре-инкубиране у комплетном медијуму на 37 °C у времену од 24 h како би се омогућила стабилизација пре додавања тестираних супстанци. Тестиране ћелије и референтна једињења доксорубицин (DOX) и цисплатина (cis-Pt) су додати (10,0 µL/бунарић) у све бунариће осим у контролне у концентрацијама које су 10 пута веће од финалних, а затим су микротитар плоче инкубиране 48 h. Као контрола коришћени су бунарићи који садрже ћелије без тестираних узорака. Три h пре завршетка инкубације у бунариће је додато 10,0 µL раствора МТТ-а. МТТ је растворен у медијуму у концентрацији 5,0 mg/mL и филтриран да би се стерилисао и да би се уклониле мале количине заосталих нерастворних остатака МТТ-а. После завршетка инкубације, у све бунариће је додат кисели изопропанол (100.0 µL 0.04 N HCl у изопропанолу) и смеше су добро промешане како би се потпуно растворио љубичасти формазан. Количина формазана који се наградио је директно пропорционална броју вијабилних ћелија. Након неколико min стајања на собној температури мерена је апсорбанца на спектрофотометру на 540/690 nm (Multiscan MCC340, Labsystems). Слепе пробе су представљали бунарићи који нису садржавали ћелије већ само комплетан медијум и МТТ. Инхибиција раста изражена је као проценат контроле и цитотоксичност је израчуната помоћу формуле (10):

где А представља измерену апсорбанцу.

Активност супстанце изражена је као IC₅₀ вредност (50% инхибиторна концентрација). Ове вредности су добијене "Median effect" анализом [179]. Два независна експеримента су постављена у квадрипликату (у по 4 бунарића) за сваку концентрацију једињења.

2.11.2 Ћелијски третман за студију апоптозе

Ћелије су засејане у плочама са 6 бунарића у концентрацији од 5·10⁵ ћелија у сваком бунарићу. Вијабилност је одређена помоћу trypan blue dye-exclusion теста [180]. Нетретиране ћелије су коришћене као контрола. Остале ћелије су третиране са доксорубицином и цисплатином као референтним једињењима и тестираним комплексима и лигандима током 48 h. Третиране вијабилне ћелије, као и контролни узорци коришћени су за детекцију апоптозе методама проточне цитометрије, флуоресцентне микроскопије и Western blot анализе.

2.11.2.1 Annexin V-FITC/7-AAD и Annexin-V-FLUOS (Annexin V-FITC/PI) тестови проточне цитометрије

Тип ћелијске смрти, индуковане тестираним комплексима (1) и (2), одрећен је помоћу Annexin V-FITC/7-AAD Kit према инструкцијама произвођача (Beckman Coulter, USA). У основи, HeLa ћелије су третиране контролним узорцима (само медијум) и комплексима у концентрацијама које су еквивалентне IC₅₀ вредностима. Након инкубације у времену од 48 h (37 °C, 5% CO₂ и апсолутна влажност) све ћелије су скупљене, испране са PBS пуфером (PBS = Phosphate-buffered saline, фосфатни пуфер) и суспендоване у леденом пуферу ($1 \cdot 10^5$ ћелија у 100,0 µL везујућег пуфера). Ћелије су обојене са 10,0 µL Annexin V-FITC и 20,0 µL 7-AAD и после 15 min инкубирања у мраку додато је 400,0 µL пуфера у сваку епрувету. Анализа узорака је вршена употребом проточног цитометра Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA), а проценат вијабилних, апоптотичних и некротичних ћелија израчунат je помоћу Flowing Software (http://www.flowingsoftware.com/). Резултати су приказани као dot plot-ови.

За анализу комплекса (4), као и лиганде H₃ed3a и 1,3-H₃pd3a коришћен је Annexin-V-FLUOS тест. Третиране ћелије из сваког узорка су сакупљене (800 грт/5 min, Megafuge 1.0R, Heraeus, Thermo Fisher Scientific), испране два пута хладним PBS пуфером, а затим ресуспендоване у везујућем пуферу да би се постигла концентрација $1 \cdot 10^6$ ћелија/mL. Ћелијска суспензија (100,0 µL) је пребачена у епрувете за културе и помешана са Annexin V-FITC (5,0 µL) и пропидијум-јодидом (5,0 µL). Ћелије су лагано вортексоване и инкубиране 15 min на 25 °C. Након инкубације, додато је 400,0 µL везујућег пуфера у сваку епрувету и суспензије су анализиране након 1 h помоћу проточног цитометра FACS Calibur E440 (Becton Dickinson). Резултати су представљени као проценат Annexin-V позитивних затворених ћелија. Проценат специфичне апоптозе је израчунат према Бендер-у (Bender) [181].

Марија С. Јеремић

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

2.11.2.2 Акридин-оранж/етидијум-бромид (АО/ЕВ) тест флуоресцентне микроскопије

Двоструко бојење флуоресцентним бојама АО/ЕВ [182] је метода која се користи за одређивање типа ћелијске смрти изазване тестираним супстанцама. Нетретиране, контролне HeLa ћелије, као и ћелије третиране комплексима (1) и (2) (у концентрацијама које су аналогне IC₅₀ вредностима) обојене су са 1,0 µL смеше боја АО/ЕВ (100,0 mg/mL етидијум бромида и 100,0 mg/mL акридин оранжа). Морфологија ћелија је анализирана флуоресцентним микроскопом (Leica DM1000, Germany) са увећањем од 400х. Фотографије су си имљене са Canon PC 1089 дигиталним апаратом.

2.11.2.3 Western blot анализа

Western blot анализа је аналитичка техника која служи за детекцију присуства специфичних протеина, као и за квантификацију њихових експресија у испитиваном узорку ткива или ћелија. Ово је гел-електрофоретска метода где се раздвајају нативни протеини у електричном пољу, а након тога детекцију је могуће извршити применом специфичних антитела. Визуелизација се врши додавањем супстрата при чему долази до хемилуминисценције.

Концентрација протеина у ћелијском лизату је одређена Брадфордовим (Bradford) протеинским тестом [183] на микротитарској плочи са 96 бунарића (ThermoLab Systems, Multiscan Accent spectrophotometer). Као стандард је коришћен говеђи серум албумин. Маркери молекулске масе за протеине су добијени од Amersham Biosciences. За Western blot коришћено је 50,0 µg протеина по узорку и одвојено електрофорезом у електричном пољу и електро-трансферовано на поливинилиден-дифлуорид (PVDF) мембрану Hybond-P (Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL), а потом инкубирани са примарним антителима (Bcl-2, PARP, Caspase-3 и Actin). Моноклонска антитела Bcl-2 и Caspase-3 су набављени од R&D Systems (Minneapolis, MN). Анти-поли (ADP-ribose) полимераза (PARP) набављена је од Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), док су антитела α -, β - или γ -Actin купљена од Sigma Chemical (St. Louis, MO). Детекција протеина је вршена применом побољшаног хемилуминисцентог (ECL Plus) kit-a (Amersham Biosciences), који садржи магарећа анти-зечија и овчија анти-мишја секундарна антитела обележена пероксидазом. Блотови су визуелизовани помођу ECL Plus детекционог kit-a. Хемилуминисцентни сигнали су забележени на филмовима (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences). Филмови су развијани са Kodak EX-OMAT II развијачем и фотографисани на негатоскопу са Canon 1100D камером која се налазила на мини-троношцу. Слике експресије протеина су анализиране дензитометријски помоћу ImageJ компјутерског програма (NIH Image, <u>http://imagej.nih.gov</u>) [184] са малим нивоом подешавања. Експресија апоптотичких протеина у третираним узорцима је упоређивана са контролним узорком. Резултати дензитометријског мерења су статистички обрађени у програму Microsoft Office Excel.

2.11.2.4 Анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом

НеLa ћелије су третиране тестираним једињењима у концентрацијама које одговарају IC₅₀ вредностима или само у медијуму (контрола) током 48 h на 37 °C у атмосфери од 5% CO₂ и апсолутној влажности. После инкубационог периода, ћелије су сакупљене, испране у PBS пуферу и, на крају, суспендоване у 1,0 mL леденог хладног 70% етанола. Након инкубације на +4 °C преко ноћи, ћелије су испране у PBS-у и третиране са RNAseA (500,0 µg/mL PBS) током 30 min на 37 °C. У сваку епрувету је додато 5,0 µL пропидијум јодида за бојење (10,0 mg/mL PBS) и након 15 min инкубирања у мрачној средини ћелије су анализиране употребом проточног цитометра Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA) и Flowing софтвер за комплексе (1) и (2), а за комплекс (4) и лиганде коришћен је FACS Calibur E440 (Becton Dickinson) и Cell Quest [185] софтвер.

2.12 Компјутерске методе

2.12.1DFT прорачуни

Геометрије испитиваних родијум(III) комплекса су оптимизоване помоћу Gaussian 09 D.01 програмског пакета [186]. Полазне геометрије су преузете из експерименталних 3D структура (CSD база података водећи се њиховим CSD референтним ознакама) или су моделиране помоћу Hyperchem MM+ [187], док је конформација најниже енергије добијена конформационом претрагом додатно оптимизована коришћењем молекулско-механичких и семи-емпиријских метода (МОРАС РМ6 [188а] користећи РМ6-D3H4 Хамилтонијан [1886]). Добијене геометрије су потпуно оптимизоване користећи различите квантно-

механичке методе (QM): Молер-Плесет (Møller-Plesset) пертубациона теорија другог реда (MP2) [155], М06 хибридни мета-измењиво-корелациони функционал [153], као и Бекеов (Becke) измењиви трифункционални параметар у комбинацији са Ли-Јанг-Пар (Lee-Yang-Parr) корелационим хибридним функционалом (B3LYP) [154]. Као базни сетови коришћени су Алриков (Ahlrich) def2-TZVP [189] и SDD [190]. Сви прорачуни су изведени са H₂O као растварачем коришћењем PCM (Polarizable Continuum Model) солватационог модела који је имплементиран у Gaussian 09. Оптимизације су вршене у спин-ограниченом формализму без ограничења симетрије. Прорачуни фреквенци на истом нивоу теорије потврђују да оптимизоване структуре одговарају стварном локалном минимуму на површини потенцијалне енергије, тј. није било имагинарних фреквенција.

2.12.2NBO анализа

Природна орбитална анализа везе (NBO = Natural Bond Orbital Analysis) извршена је помоћу NBO 7.0 [191] софтверског пакета применом пертурбационе теорије другог реда. Овом методом се омогућава увид у донорско-акцепторски (D/A) механизам (флуктуација наелектрисања везивне орбитале у антивезивну орбиталу). NBO излазни .47 документи су добијени из Gaussian 09 D.01 програмског пакета. За ова израчунавања коришћен је M06 хибридни мета-измењиво-корелациони функционал и SDD базни сет. Ова анализа је рађена за сва три могућа геометријска изомера хексадентатних комплекса [M(eddadp)]⁻ и [M(1,3pddadp)]⁻ (M = Rh(III) и Co(III)). NBO потрага за најбољим Луисовим (Lewis) структурама дала је само један резонантни облик. Међутим, да би се могло да дискутовати о енергетским детаљима (орбиталне и донорско/акцепторске енергије) ових јако делокализованих структура, било је неопходно урадити анализу природне резонантне теорије (NRT = Natural Resonance Theory). Према томе, користећи \$NRT кључну реч, израчунат је сет различитих резонантних структура за сваку CHOOSE структуру предложену NBO претрагом (слике се налазе у прилогу ове дисертације). Такође, природна Кулонова електростатичка потенцијална енергија (NCE_{total}) је израчуната за наведене системе.

2.12.3Докинг метода

Молекулски докинг *cis*-equatorial-[Rh(ed3a)(H₂O)] (1) and *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)(H₂O)] (2) комплекса је симулиран на тродимензионалним рендгенским структурама албумина човечијег серума (HSA = Human serum albumin,), PDB (Protein data bank) код 1HK1 [192]. Процеси доковања су извршени помоћу AudoDock 4.2 софтвера опремљеним графичким интерфејсом (GUI) Auto-DockTools (ADT 1.5.6rc3) [193].

Процена докинга је потврђена преко две X-ray структуре, PDB код 1HK1 и 109X [194]. Први представља четири молекула тироксина ко-кристалисаног са HSA, а касније укључује HSA-хемин молекул који садржи гвожђе унутар хем центра. Докинг тироксина ограниченог унутар места везивања лека 1 од 1НК1 и хемина везаног унутар домена DIIIB од 109Х је валидиран, при чему је припрема и докинг процедура за ове системе иста као за родијум(III) комплексе и дата је испод. Добијени резултати су показали да је AutoDock високо репродуктиван дајући најбоље преклапање са матичним Х-гау структурама и то RMS = 0,92 у случају 109Х и 0,969 у случају 1НК1 (Слике 17 и 18). AudoDock је употребљен за подешавање HSA и молекула комплекса, при чему су израчуната Гастајгерова (Gasteiger) наелектрисања, уклоњени су молекули воде и додати су водоникови атоми, док су неполарни водоникови атоми припојени угљениковим атомима. Сви лиганди који су коришћени за процес докинга узети су или из њихових рендгенских структура или из матичних макромолекула и оптимизовани на нивоу B3LYP/def2-TZVP/PCM (вода) прорачуна. Коначно, .mol2 3D лиганд фајле узете су из Гаусијанових излазних фајли (output), заједно са одговарајућим NPA наелектрисањима које су коришћене у сврху доковања. Будући да се атом родијума налази унутар хелатног оквира ed3a и 1,3рdЗа и да је додатно заштићен координованим молекулом воде, нема директног утицаја централног јона метала на процес доковања, осим његовог парцијалног наелектрисања које је већ инкорпорирано у молекуле лиганда. Из тог разлога, родијум је замењен гвожђем задржавајући оригинална парцијална наелектрисања родијума, јер је гвожђе параметризовано у AutoDock програму. У докинг експериментима коришћена је кутија величине 60 x 60 x 60 тачака (размак решетке 0,375 Å) са центром мапе у кокристализованим лигандима. Параметри генетског алгоритма су узети из подразумеваних вредности, осим вредности максималног броја евалуација од 2,5·10⁵, док је 20 најбољих конформација докованих за ригидни макромолекул HSA добијено коришћењем свих

стандардних вредности доковања. Рецептор-лиганд интеракције су израчунате и визуализоване помоћу Discovery Studio Visualizer v17.2.0.16349 програма [195].



Слика 17. Валидација AutoDock доковања на примеру 109X.



Слика 18. Валидација AutoDock доковања на примеру 1HK1.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

3.1 Синтеза и молекулске структуре синтетисаних једињења

3.1.1 Добијање полиаминополикарбоксилатних лиганада и одговарајућих комплекса родијума(III)

Синтеза комплекса тровалентних метала (Cr(III), Co(III), Rh(III)...) са хелатним лигандима edta типа почиње од чисте киселине или смеше различитих киселина. Такође, у реакцију се могу укључити соли метала (CrCl₃, RhCl₃, Co(CH₃COO)₂, Co(NO₃)₂), хидроксиди (Co(OH)₃, Rh(OH)₃) или комплексне врсте ([Co(NO₂)₆]³⁻). Дистрибуција геометријских изомера зависи како од електронске конфигурације централног металног јона, тако и од конфигурације лиганда edta типа. Геометрија комплекса и његови структурни параметри и октаедарска дисторзија су обично међусобно зависни. Свакако, хемичар може да промени уобичајене експерименталне услове да допринесе различитој дистрибуцији изомера [178].

У овој дисертацији синтетисано је пет комплекса родијума(III) са лигандима полиаминополикарбоксилатног типа који у свом саставу имају петочлане и/или шесточлане карбоксилатне прстенове. За комплексирање су коришћена два пентадентатна лиганда у облику киселина (H₃ed3a, H₃1,3-pd3a) и један хексадентатни - H₄eddadp. Поменуте киселине нису нова једињења већ су синтетисане по раније описаним поступцима (видети Експериментални део). Киселине су припремљене кондензационом методом преко неутралисаних α -монохалогенкарбоксилних киселина и одговарајућег диамина и добијене су у облику кондензационе смеше (H₃1,3-pd3a) или као чисте (H₃ed3a у облику Ca₃(ed3a)₂ и H₄eddadp). Сви комплекси су синтетисани по поступку описаном у Експерименталном делу и добијени у облику смеше изомера за чије је раздвајање коришћена хроматографија на Sephadex колони (Слика 19). Без обзира на врсту киселине, Rh(III) јон је хексакоординован код свих синтетисаних комплекса где, у случају пентадентатних лиганда, шесто координационо место заузимају вода (1 и 3) или хлор (2 и 4). Изоловани су неутрални и анјонски облици комплекса пентадентатних лиганда, [Rh(ed3a)(H₂O)] (1), [Rh(ed3a)Cl]⁻ (2), [Rh(1,3-pd3a)(H₂O)] (3), [Rh(1,3-pd3a)Cl]⁻ (4), као и анјонски [Rh(eddadp)]⁻ (5) комплекс.



Слика 19. Синтеза родијум(III) комплекса (1)-(5).

Код свих комплекса установљена је очекивана геометријска изомерија. У молекулима комплекса (1) и (2) формирани су само петочлани прстенови и то по један леђни етилендиамински и још три ацетатна са очекиваним *cis*-equatorial распоредом у простору, док је код комплекса (3) и (4) ситуација слична, осим што је леђни прстен шесточлани 1,3-пропандиамински и распоред прстенова диктира *cis*-polar геометрију. Код сва четири комплекса присутна је N₂O₃ хромофора. Комплекс (5) има присутну N₂O₄ хромофору са два петочлана ацетатна, два шесточлана 3-пропионска и једним леђним петочланим етилендиаминским прстеном, који својим распоредом у простору дају *trans*(O₅O₆) изомер.

Све супстанце су окарактерисане спектроскопским методама (NMR, IR, UV-Vis), елементалном микроанализом, док су рендгенском структурном анализом потврђене структуре свих комплекса осим [Rh(1,3-pd3a)(H₂O)] (**3**).

Поред тога, процедуром Кина и Серла [178] утврђена је термодинамичка равнотежа реакционих смеша комплекса Na[Rh(eddadp)] и K[Co(eddadp)], на основу које је одређен процентуални допринос сваког изомера (видети Експериментални део). UV-Vis спектри термодинамичких смеша и слике њихових хроматографија на колони дати су на Слици 20, док су процентуални доприноси добијених изомера поменутих термодинамичких смеша испитиваних комплекса дати у Табели 5. Добијене вредности су у сагласности са моларним односима који су добијени овде и у претходним истраживањима. Уочљиво је одсуство *trans*(O₆) изомера у случају [M(eddadp)]⁻ комплекса и релативна заступљеност свих изомера [M(1,3-pddadp)]⁻ комплекса у зависности од метала.



Слика 20. UV-Vis спектри и двоструки хроматограми термодинамичких смеша [M(eddadp)]⁻ изомера (M = Rh(III), Co(III)).

Ако је *trans*(O₅) изомер стабилизован мањим екваторијалним напоном са мањим Co(III) катјоном (Co(III) < Fe(III) < Cr(III)< Rh(III) < Ni(II) < Cu(II)) у извесној мери одређеног $\Delta G^{0}_{(trans(O5))}$, онда је jacho да је *trans*(O₅O₆) изомер додатно стабилизован већим Rh(III) катјоном и већом реакционом температуром (145 °C у случају Rh(III) где се његов удео повећава у односу на *trans*(O₅) облик, Табела 5). Ова додатна стабилизација *trans*(O₅O₆) изомера може се проценити из дистрибуције изомера: $\Delta G^{0}_{(Rh_cMeIIIa)} - \Delta G^{0}_{(Co_cMeIIIa)} = - RTln(60/40) - RTln(79/21) = -1 kcal mol⁻¹.$

Табела 5														
Однос изомера	а за [М	(edta-	гип)] ⁻ к	сомпле	ксе.									
Лиганд			ed	dadp						1,3-p	ddadp			
Метал/изомер	trans(O ₅)	trans((O_5O_6)	trans	(O_6)		trans	(O_5)	trans((O_5O_6)	tran	$s(O_6)$	
	mol ^a	%б	mol	%	mol	%	peф.	mol	% в	mol	%	mol	%	реф.
Rh(III)	1.5		1		-		[159]	1	40	1.5	60	-	0	[196]
	2	60	1	<i>40</i>	-	0	овај							
							рад							
Co(III)	6		1		-		[54]	-	0	1	29	2.5	71	[197]
	5	79	1	21	-	0	овај							
							рад							

^а Моларни однос изолованих изомера;

⁶ Равнотежни проценти геометријских изомера добијени у синтезама $[M(eddadp)]^-$ комплекса на 85°C (M = Co) и 145°C (M = Rh);

^в Проценти геометријских изомера добијени у синтезама [M(1,3-pddadp)]⁻ комплекса и израчунати из раније објављених података.

3.1.2 Молекулска структура cis-equatorial- $[Rh(ed3a)(H_2O)] \cdot H_2O$ комплекса (1)

Структурни дијаграм *cis*-equatorial-[Rh(ed3a)(H₂O)]·H₂O са нумеричком шемом атома и кристалним паковањем је дат на Слици 21, док су дужине и углови веза дате у **Табели 6**. Моноклинична јединична ћелија садржи 8 јединица: 4 неутрална молекула [Rh(ed3a)(H₂O)] комплекса и 4 молекула воде. Свака асиметрична јединица се састоји од комплексне јединице и једног молекула воде. Лиганд ed3a³⁻ се понаша као пентадентат остварујући координацију преко два атома азота и три атома карбоксилатних кисеоника, док шесто координационо место заузима молекул воде, чиме се остварује октаедарска геометрија (Слика 21). У кристалима комплекса је формирана мрежа водоничних веза која укључује карбоксилатне и амино групе ed3a³⁻ лиганда, као и молекуле координоване и солватне воде. Положаји карбоксилатних група говоре о *cis*-equatorial геометрији: два

ацетатна R прстена се налазе у аксијалном положају, док екваторијална раван укључује један ацетатни G прстен, петочлани етилендиамински E прстен и један молекул воде (Слика 21). Комплекс поседује једну дужу екваторијалну везу Rh-O(7) (2.072(2) Å, веза Rh-O из молекула воде). Све остале метал-лиганд везе налазе се у очекиваном распону 1,996(2) - 2,050(2) Å (Табела 6) и поредбене су са сличним комплексима Rh(III) [42,61,62]. Екваторијални E прстен је у конформацији коверте, док три петочлана ацетатна прстена имају увијену конформацију.



Слика 21. Кристална структура *cis*-equatorial-[Rh(ed3a)(H₂O)] комплекса и кристално паковање дуж *a* осе.

Табела б

Дужине (А	Дужине (Å) и углови (°) веза <i>cis</i> -equatorial-[Rh(ed3a)(H ₂ O)]·H ₂ O комплекса (1).										
Дужине веза		cis-углови		trans-углови							
Rh-O(7)	2,072(2)	O(2)-Rh-O(4)	92,01(7)	O(6)-Rh-N(1)	98,21(8)	O(6)-Rh-O(2)	178,62(7)				
Rh-O(2)	2,018(2)	O(2)-Rh-O(7)	89,03(7)	N(1)-Rh-O(7)	91,14(8)	N(2)-Rh-O(7)	176,77(8)				
Rh-O(4)	2,050(2)	O(2)-Rh-N(1)	83,06(7)	N(2)-Rh-O(2)	93,66(7)	N(1)-Rh-O(4)	169,01(8)				
Rh-O(6)	2,010(2)	O(4)-Rh-O(7)	98,62(7)	N(2)-Rh-O(4)	83,09(7)						
Rh-N(1)	2,027(2)	O(6)-Rh-O(4)	86,64(7)	N(2)-Rh-O(6)	85,90(7)						
Rh-N(2)	1,996(2)	O(6)-Rh-O(7)	91,45(7)	N(2)-Rh-N(1)	87,42(8)						

3.1.3 Молекулска структура cis-equatorial-Na[Rh(ed3a)Cl] \cdot H₂O комплекса (2)

Структурни дијаграм cis-equatorial-Na[Rh(ed3a)Cl]·H₂O са нумеричком шемом атома и кристалним паковањем дат је на Слици 22, док су дужине и углови веза дате у Табели 7. Моноклинична јединична ћелија садржи 12 јединица: 4 катјона, 4 анјона и 4 молекула воде. Свака асиметрична јединица састоји се од Na⁺ катјона, комплексног анјона [Rh(ed3a)Cl]⁻ и једног молекула воде. Јон Rh(III) је хексакоординован и остварује две везе са атомима азота, три везе са атомима кисеоника из карбоксилатних прстенова, док шесто координационо место заузима хлоридо лиганд. Комплекс има октаедарску геометрију, док положај прстенова говори о cis-equatorial изомеру (Слика 22). Код комплекса је формирана полимерна структура са две карбоксилатне групе које мостно спајају Rh(III) јон са Na⁺ јоном. Молекули воде су примарно укључени у Na-O-Na премошћавање преко својих кисеоникових атома, али се даље формирају водонични мостови са координованим хлоридним и карбоксилатним лигандима. Na⁺ joh je хептакоординован; интермолекулски водонични мостови се, такође, формирају између амино (Н донор) и карбоксилатних група (Н акцептор). Све Rh-L везе се налазе у опсегу 2,008(3) - 2,074(3) Å, сем једне дуже Rh-Cl везе (2,353(1) Å) (Табела 7). Етилендиамински прстен E, екваторијални ацетатни прстен G и један аксијални R прстен налазе се у конформацији коверте, док је други аксијални прстен скоро планаран.



Слика 22. Кристална структура *cis*-equatorial-[Rh(ed3a)Cl]⁻ комплексног анјона и кристално паковање дуж *b* осе.

Табела	7
--------	---

Дужине (Å) и углови (°) веза *cis*-equatorial-Na[Rh(ed3a)Cl]·H₂O комплекса (2).

Дужине в	еза	cis-углови				trans-углови	
Rh-Cl	2,353(1)	O(2)-Rh-Cl	91,11(10)	O(6)-Rh-O(4)	91,05(12)	O(2)-Rh-O(6)	178,33(13)
Rh-O(2)	2,008(3)	O(2)-Rh-O(4)	90,05(12)	O(6)-Rh-N(2)	83,30(14)	N(1)-Rh-Cl	176,63(10)
Rh-O(4)	2,074(3)	O(2)-Rh-N(1)	85,55(14)	N(1)-Rh-O(4)	82,97(14)	N(2)-Rh-O(4)	168,09(14)
Rh-O(6)	2,013(3)	O(2)-Rh-N(2)	95,39(13)	N(1)-Rh-O(6)	93,34(14)		
Rh-N(1)	2,011(4)	O(4)-Rh-Cl	97,46(10)	N(1)-Rh-N(2)	86,90(16)		
Rh-N(2)	2,031(4)	O(6)-Rh-Cl	89,99(10)	N(2)-Rh-Cl	93,02(12)		

Табела 8

3.1.4 Молекулска структура cis-polar-Na[Rh(1,3-pd3a)Cl] \cdot 2H₂O комплекса (4)

Дужине веза и углови између веза за *cis*-polar- $[Rh(1,3-pd3a)Cl]^{-}$ комплекс су дати у Табели 8, док је његов структурни приказан на Слици 23. Моноклинична јединична ћелија садржи 16 јединица: 4 катјона, 4 анјона и 8 молекула воде. Асиметрична јединица кристала састоји се од Na⁺ катјона, комплексног [Rh(1.3-pd3a)Cl]⁻ анјона и два молекула воде (Слика 23). Комплекс садржи Rh(III) центар у октаедарској геометрији, окружен лигандом који се понаша као пентадентат, а шесту позицију заузима хлор. Положаји карбоксилатних група дефинишу cis-polar геометрију (Слика 23). Екваторијалне позиције октаедра заузимају два депротонована карбоксилатна кисеоника (Rh-O2 2,044(4) Å, Rh-O5 2,054(4) Å) и два атома азота 1,3-рd3а лиганда (Rh-N1 2,020(5) Å, Rh-N2 2,030(4) Å). Аксијалне позиције заузимају хлоридни јон и један кисеоник трећег карбоксилата (Rh-Cl1 2,328(2) Å, Rh-O3 2,018(4) Å; O3-Rh-Cl1 178,8(2)°). Други атом кисеоника ове последње карбоксилне групе интерагује са натријумовим јоном (O4-Na1 2,360(5) Å). Комплекс укључује једну дужу аксијалну Rh-Cl везу (2,328(2) Å). Остале M-L везе су у очекиваном опсегу (2,018(4) Å - 2,054(4) Å; Табела 8) [42,61,62]. 1,3-Пропандиамински прстен има конформацију столице, два екваторијална ацетатна прстена су у конформацији коверте, док је аксијални ацетатни прстен скоро планаран. Јон натријума је окружен са два молекула воде и 4 карбоксилатна кисеоника у врло дисторгованој октаедарској геометрији. Један карбоксилатни кисеоник и један молекул воде заузимају аксијалне положаје, док је други молекул воде заједно са три карбоксилатна кисеоника (O1' и O2' у x, 1/2-у, -1/2+z и O1'' у 2-х, -у, 1-z положају) лоциран у екваторијалној равни.

Дужине (Å) и углови (°) веза <i>cis</i> -polar-Na[Rh(1,3-pd3a)Cl]·2H ₂ O комплекса (4).									
Дужине во	еза	cis-углови		trans-углови					
Rh-Cl(1)	2,328(2)	O(2)-Rh-O(3)	91,2(2)	O(3)-Rh-O(5)	89,0(1)	O(2)-Rh-N(2)	176,2(2)		
Rh-O(2)	2,044(4)	O(2)-Rh-O(5)	98,6(1)	O(5)-Rh-Cl(1)	91,5(3)	O(3)-Rh-Cl(1)	178,8(2)		
Rh-O(3)	2,018(4)	O(2)-Rh-N(1)	81,7(2)	O(5)-Rh-N(2)	81,0(1)	O(5)-Rh-N(1)	176,2(2)		
Rh-O(5)	2,054(4)	O(2)-Rh-Cl(1)	89,8(2)	N(1)-Rh-Cl(1)	92,2(2)				
Rh-N(2)	2,030(4)	O(3)-Rh-N(1)	87,2(2)	N(2)-Rh-Cl(1)	94,0(2)				
Rh-N(1)	2,020(5)	O(3)-Rh-N(2)	85,0(2)	N(1)-Rh-N(2)	98,4(2)				



Слика 23. Кристална структура cis-polar-[Rh(1,3-pd3a)Cl]⁻ комплексног анјона и кристално паковање дуж b осе.

3.1.5 Молекулска структура trans (O_5O_6) -Na[Rh(eddadp)]·4H₂O комплекса (5)

Молекулска структура $trans(O_5O_6)$ -[Rh(eddadp)]⁻ комплекса са нумеричком шемом атома и кристалним паковањем приказан је на Слици 24, док су дужине и углови веза дати у Табели 9. Триклинична јединична ћелија се састоји од шест јединица: два катјона, два анјона и два молекула воде. Свака асиметрична јединица садржи једну јединицу формуле која се састоји од: Na⁺ катјона који координује три молекула воде, комплексног [Rh(eddadp)]⁻ анјона и једног молекула кристалне воде. Родијум(III) јон координује шест донорских атома лиганда: четири депротонована карбоксилатна кисеоника и два амино атома азота. Екваторијалну раван октаедра заузимају два депротонована карбоксилатна кисеоника (Rh-O3 2,053(1) Å, Rh-O7 2,053(2) Å) и два азота лиганда (Rh-N1 2,015(2) Å, Rh-N2 2,026(2) Å). Аксијални положај заузимају два кисеоника треће и четврте карбоксилне групе (Rh-O5 2.017(2) Å, Rh-O1 2.032(2) Å). Овакав распоред карбоксилатних група говори о $trans(O_5O_6)$ геометрији комплексног [Rh(eddadp)]⁻ анјона. Други кисеоников атом пропионске аксијалне карбоксилне групе интерагује са натријумовим јоном (O2-Na1 2.374(2) Å) (Слика 24). Дужине веза Rh-L и углови (Табела 9) су упоредиви са одговарајућим везама аналогних комплекса [42,43,46,53,196,198-201]. Етилендиамински (Е) и два петочлана прстена (R и G) имају увијену конформацију, док су два шесточлана

прстена у конформацији увијене лађе. Два симетрична натријумова јона међусобно су повезана преко O2 мостног карбоксилатног кисеониковог атома две суседне комплексне јединице (које су, такође, повезане са кристалографским инверзионим центром). Заједно са O4 карбоксилатним атомом и три молекула воде, реализована је апроксимативна октаедарска координациона геометрија око јона натријума. Два молекула воде заузимају аксијалне положаје, док се у екваторијалној равни налазе један молекул воде и три карбоксилатна кисеоника.



Слика 24. Кристална структура $trans(O_5O_6)$ -[Rh(eddadp)]⁻ комплексног анјона и кристално паковање дуж *a* осе.

Табела	9
--------	---

Дужине (Å) и уг.	лови (°) в	веза <i>trans</i> (O_5O_6)-N	a[Rh(edda	dp)]·4H ₂ O	комплекса ((5).
----------	----------	------------	---------------------	--------------	-----------	------------------------	-------------	------

Дужине в	еза	cis-углови				trans-углови	
Rh-O(1)	2,032(2)	O(1)-Rh-O(3)	90,43(4)	N(1)-Rh-O(1)	93,61(5)	N(2)-Rh-O(3)	169,30(5)
Rh-O(3)	2,053(1)	O(1)-Rh-O(7)	86,48(4)	N(1)-Rh-O(3)	82,74(5)	O(5)-Rh-O(1)	177,73(4)
Rh-O(5)	2,017(2)	O(5)-Rh-O(3)	89,55(4)	N(1)-Rh-O(5)	88,64(5)	N(1)-Rh-O(7)	178,93(5)
Rh-O(7)	2,053(2)	O(5)-Rh-O(7)	91,27(4)	N(1)-Rh-N(2)	89,16(5)		
Rh-N(1)	2,015(2)	O(5)-Rh-N(2)	83,25(5)	N(2)-Rh-O(1)	97,08(5)		
Rh-N(2)	2,026(2)	O(7)-Rh-O(3)	96,19(4)	N(2)-Rh-O(7)	91,89(5)		

3.2 Спектрална анализа синтетисаних комплекса

Синтетисани комплекси су додатно анализирани инфрацрвеном спектроскопијом. Карбоксилатна област спектара анализираних комплекса је у сагласности са молекулском структуром и симетријом комплекса. Комплекси са пентадентатним лигандима [Rh(ed3a)H₂O] (**1**), [Rh(ed3a)Cl]⁻ (**2**), [Rh(1,3-pd3a)H₂O] (**3**) и [Rh(1,3-pd3a)Cl]⁻ (**4**) показују врло интензивне, оштре траке у опсегу 1631-1680 сm⁻¹ (Слика **25**) које одговарају асиметричним валенционим вибрацијама петочланих ацетатних прстенова [63,69].



Слика 25. Инфрацрвени спектри пентадентатних Rh(III) комплекса: [Rh(ed3a)(H₂O)] (1) (a), [Rh(ed3a)Cl]⁻(2) (б), [Rh(1,3-pd3a)(H₂O)] (3) (в) и [Rh(1,3-pd3a)Cl]⁻(4) (г).

Комплекс (2) показује и мали превој на 1680 cm⁻¹, што указује на *cis*-eqatorial изомер. Сви наведени комплекси су C_1 симетрије. [Rh(eddadp)]⁻ (5) комплекс у свом саставу има четири нееквивалентна прстена због чега карбоксилатна област његовог IR спектра показује четири траке и то две на вишим фреквенцама (1641 и 1667 cm⁻¹) које потичу од вибрација

карбоксилатних група петочланих прстенова и две на нижим фрекфенцијама (1573 и 1625 cm⁻¹) које потичу од вибрација карбоксилатних група шесточланих прстенова (Слика 26). Овакав изглед спектра указује на *trans*(O_5O_6) геометрију. Одсуство сигнала у области 1700-1750 cm⁻¹ говори да су све карбоксилатне групе депротоноване, тј. координоване. Оваква интерпретација се базира на општеприхваћеном правилу да се фреквенце карбоксилних група за петочланих хелатних прстенова [203]. Асиметричне валенционе вибрације некоординованих карбоксилатних прстенова [203]. Асиметричне валенционе вибрације некоординованих карбоксилатних група се налазе у области 1700-1750 cm⁻¹, док су координоване групе у нижој области енергије (1560-1650 cm⁻¹) [204-206].



Слика 26. Инфрацрвени спектар $trans(O_5O_6)$ -[Rh(eddadp)]⁻ комплекса.

Електронски апсорпциони спектри структурно сличних комплекса су дати у референцама [207,208]. Сви синтетисани комплекси су жуте боје, дијамагнетични и октаедарске геометрије. Спектри комплекса (1)-(4), који у свом саставу имају пентадентатне лиганде, по облику су мало другачији од свих до сада испитиваних. Наиме, иако су комплекси C_1 симетрије, спектри показују две скоро симетричне траке које потичу од спин

дозвољених d-d прелаза (Слика 27), тј. имају само једну компоненту у области ниже енергије (${}^{1}A_{1g} \rightarrow {}^{1}T_{1g}$) и једну компоненту у области више енергије (${}^{1}A_{1g} \rightarrow {}^{1}T_{2g}$). Нема додатног цепања у области ниже енергије спински дозвољених d-d прелаза, што је било уобичајено код свих осталих до сад испитиваних комплекса родијума [207,208], па је интерпетација ових спектара у складу са O_h моделом. Комплекси (3) и (4) показују ниже моларне апсорптивности (ϵ) у поређењу са комплексима (1) и (2), због присуства флексибилнијег (мање ригидног) леђног 1,3-пропандиаминског прстена.



Слика 27. Електронски апсорпциони спектри пентадентатних Rh(III) комплекса: [Rh(ed3a)(H₂O)]·H₂O (1) ____, Na[Rh(ed3a)Cl]·H₂O (2) ____, [Rh(1,3-pd3a)(H₂O)]·2H₂O (3) ____, Na[Rh(1,3-pd3a)Cl]·2H₂O (4) ____.

Међутим, комплекс (5) показује нешто другачији изглед спектра који је у сагласности са раније испитиваним комплексима (Слика 28). Спектри сличних комплекса $trans(O_5)$ -Na[Rh(eddadp)]·2H₂O [46] и $trans(O_5O_6)$ -Na[Rh(1,3-pddadp)]·3H₂O [196] дати су ради поређења. У октаедарском (O_h) пољу нискоспинског d⁶ система, можемо очекивати два спински дозвољена прелаза и то:

 ${}^{1}A_{1g} \longrightarrow {}^{1}T_{1g}$ (I трака ниже енергије) и ${}^{1}A_{1g} \longrightarrow {}^{1}T_{2g}$ (II трака више енергије) У тетрагоналном D_{4h} пољу октаедарска стања ${}^{1}T_{1g}$ и ${}^{1}T_{2g}$ се даље могу разложити на по још две компоненте:

$${}^{1}T_{1g} = {}^{1}A_{2g} + {}^{1}E_{g}^{a} \quad \varkappa \quad {}^{1}T_{2g} = {}^{1}B_{2g} + {}^{1}E_{g}^{b}$$

Ако би се метал-диаминска раван испитиваног родијум(III) комплекса дефинисала као ху раван, онда би дуж х и у оса донорски атоми били N и O. Даље, ако бисмо N и O атоме у овој равни заменили са хипотетичким Х атомима, онда би добијени комплекс припадао trans-[MX₄O₂]-типу комплекса где су Х екваторијални донорски атоми, а јачина лигандног поља у октаедарској равни је таква да се налази између N и O атома. Имајући у виду да су екваторијални Х атоми виши у спектрохемијској серији од аксијалних О атома, а следећи разматрања Вентворта (Wentworth) и Пипера (Piper) у случају Со(III) комплекса [209], стање ${}^{1}E_{g}^{a}$ које деривира из ${}^{1}T_{1g}$ ће бити ниже енергије у односу на стање ${}^{1}A_{2g}$ које је истог порекла. Такође, стање ${}^{1}B_{2g}$ ће енергетски бити ниже од ${}^{1}E_{g}^{b}$ стања, иако деривирају из истог стања $(^{1}T_{2g})$. Комплекс (5) је C_{1} симетрије и показује две компоненте у области ниже енергије $^{1}T_{1g}$ (O_h) прелаза и само једну компоненту у области више енергије ${}^{1}T_{2g}(O_h)$, па би интерпетација овог спектра била у сагласности са D_{4h} моделом. Очекиване су четири траке, али се јављају само три као последица лошег разлагања у области више енергије. I трака потиче од ${}^{1}A_{1g} \rightarrow$ ${}^{1}\mathrm{E}_{\mathrm{g}}^{\mathrm{a}}$ прелаза и лоцирана је на 380 nm (26310 cm $^{-1}$) у облику превоја, II трака потиче од ${}^{1}\mathrm{A}_{1\mathrm{g}}$ → ¹A_{2g} прелаза и лоцирана је на 344 nm (29070 cm⁻¹) у облику добро дефинисане најинтезивније траке, а III трака потиче од енергетски блиских ${}^{1}A_{1g} \rightarrow {}^{1}B_{2g}$ и ${}^{1}A_{1g} \rightarrow {}^{1}E_{g}^{b}$ прелаза, па је уочљива у виду слабо дефинисаног превоја на 298 nm (33550 cm⁻¹). Вредности моларних екстинционих коефицијената (ε) опадају са опадањем напона у хелатним системима. Тако, моларне апсорптивности комплекса (5) су ниже у односу на поредбени $trans(O_5)$ изомер истог комплекса, али су више у односу на исти $trans(O_5O_6)$ изомер

Марија С. Јеремић

комплекса Na[Rh(1,3-pddadp)]·3H₂O (Слика 28). Ова појава се приписује присуству мање ригидног (флексибилнијег) 1,3-пропандиаминског прстена у поредбеном комплексу.



Слика 28. Електронски апсорпциони спектри хексадентатних Rh(III) комплекса: $trans(O_5O_6)$ -Na[Rh(eddadp)]·4H₂O (5) _____, $trans(O_5)$ -Na[Rh(eddadp)]·2H₂O _____, $trans(O_5O_6)$ -Na[Rh(1,3-pddadp)]·3H₂O _____.

¹Н и ¹³С NMR спектри дају поврду структура комплекса (1)-(4) (Слика 29). Сигнали (видети Експериментални део дисертације) су у сагласности са претходно испитиваним комплексима [207-211]. ¹HNMR спектри показују присуство АБ парова насталих купловањем метиленских протона глицинских прстенова. У случају комплекса (1) и (2), јавља се један синглет на 4,05 (1) и 3,99 ppm (2) који се приписује петочланим прстеновима ван октаедарске равни, као и два АБ пара на 4,09 и 3,30 ppm (1) и 4,05 и 3,34 ppm (2), који



указују на присуство два глицинска прстена и то једног у равни и другог ван октаедарске равни.

Слика 29. ¹Н и ¹³С NMR спектри комплекса [Rh(ed3a)(H₂O)] (1) (a), [Rh(ed3a)Cl]⁻ (2) (б), [Rh(1,3-pd3a)(H₂O)] (3) (в) и [Rh(1,3-pd3a)Cl]⁻ (4) (г).

У случају 1,3-пропандиаминских комплекса (**3**) и (**4**), јављају се два АБ пара на 4,05 и 3,96 ррт (**3**) и 3,99 и 3,93 ррт (**4**) који се приписују глицинским прстеновима у равни и ван равни. ¹HNMR спектар комплекса (**5**) показује два АБ пара лоцирана на 3,89 ррт (R прстен) и 3,92 ррт (G прстен) (Слика 30). Детаљна нтерпретација NMR спектара за прах комплекса (**5**) је дата у дисертацији Милоша И. Ђурана [207]. ¹³CNMR спектри свих комплекса дају очекивани број сигнала који одговарају броју угљеникових атома у одговарајућим положајима. Сигнали на вишим енергијама приписани су карбоксилним угљеницима, док су сигнали на нижим енергијама приписани метиленским угљеницима [207].



Слика **30.** ¹Н и ¹³С NMR спектри *trans*(O₅O₆)-Na[Rh(eddadp)]·4H₂O комплекса (**5**).

3.3 Структурни параметри и анализа напона комплекса родијума(III) у односу на њихову геометрију

Да би смо анализирали напон у комплексима, а на основу напона и њихову геометрију, морали смо узети у обзир неколико параметара:

a) cis и trans углове лоциране око јона метала,

- б) збир углова веза различитих прстенова,
- в) Rh-O-С углови веза и
- г) углови веза око атома азота.

3.3.1 Анализа напона пентадентатних Rh(III) комплекса

У овој дисертацији извршена је анализа напона пентадентатних Rh(III) комплекса који садрже ed3a³⁻ и 1,3-pd3a³⁻ лиганде. Структурни подаци који корелирају са стереохемијом комплекса родијума(III) су дати у **Табели 10**. Анализа напона је дискутована за комплексе (1)-(4), као и за структурно слични [Rh(1,3-pddadp)Cl]²⁻ комплекс. Такође, структура комплекса (3) није потврђена Х-гау анализом, па је употребљена DFT израчуната структура.

Табела 10

Анализа напона пентадентатних родијум(III) комплекса са edta-типом лиганада.

	$\Sigma\Delta(O_h)^{\mathbf{a}}$	$\Delta\Sigma(\Pi pcT)$	ген) ^б		Δ(Rh-O-	-С) в	ΣΔ(N) ^Γ	Реф.
Комплекс		E(T)	R	G	R	G	_	
cis-eq-[Rh(ed3a)(H ₂ O)]	(1) 50	-10	-2	-13	+4	+1	17	Овај рад
cis-eq-[Rh(ed3a)Cl] ⁻	(2) 42	-12	-2	-12	+4	+1	14	Овај рад
cis-pol-[Rh(1,3-pd3a)H2O] д	(3) 61	+32	+1	-7	+7	+6	18	Овај рад
cis-pol-[Rh(1,3-pd3a)Cl] ⁻	(4) 52	+44	+1	-7	+5	+5	11(46)	Овај рад
cis-pol,trans(Cl,O5)-[Rh(1,3-pddadp)C	21] ²⁻ 51	+29	0	-11(+38)	+6	+3(+20)	15	[43]

а $\Sigma \Delta(O_h)$: збир апсолутних вредности одступања дванаест октаедарских углова од 90°;

⁶ΔΣ(прстен): одступање суме углова веза појединачних прстенова (E, T, R, G) од идеалне вредности (идеалне вредности: $E = 528^{\circ}$, $T = 637,5^{\circ}$, R и G петочлани = 538,5°, R и G шесточлани = 648°), вредност у загради се односи на 3-пропионски прстен;

^в Δ (Rh-O-C): одступање углова Rh-O-C од идеалне вредности 109,5° (дата је средња вредност за R и G прстенове, сем код *cis*-pol,*trans*(Cl,O₅)-[Rh(1,3-pddadp)Cl]²⁻ где се вредност у загради односи на 3-пропионски прстен);

^г ΣΔ(N) збир апсолутних девијација шест углова око азота у односу на идеалну вредност 109,5°. Дата је средња вредност добијена за оба азота, осим у случају када се вредности драстично разликују;

^д DFT израчуната структура.

Код свих испитиваних комплекса (**Табела 10**) видимо да је јон родијума(III) хексакоординован са октаедарском геометријом, при чему је степен дисторзије ($\Sigma \Delta(O_h)$ вредност) различит. Комплекси (**1**), (**2**), (**4**) и поредбени [Rh(1,3-pddadp)Cl]²⁻ показују умерену дисторзију (42-52°). Већа октаедарска дисторзија је примећена код до сада неизолованог комплекса (**3**) и износи 61°. Што се тиче ($\Delta\Sigma$ (прстен) вредности, етилендиамински (Е) прстенови показују очекивано негативне вредности (-10 и -12°) за разлику од 1,3-пропандиаминских прстенова који су мање напети (+29 и +44°). Петочлани ацетатни прстенови у екваторијалној равни (G) су мањи од идеалних (538,5°) па им је девијација негативна. Изузетак је поредбени комплекс [Rh(1,3-pddadp)Cl]²⁻ који у екваторијалној равни има шесточлани 3-пропионски прстен, па му је девијација позитивна и износи +38°. Примећене су нешто мање девијације R и G прстенова код комплекса (3) и (4) у односу на комплексе (1) и (2) што се може приписати присуству флексибилнијег 1,3пропандиаминског прстена. Углови Rh-O-C веза одступају минимално од идеалне вредности која износи 109,5° и варирају у опсегу +1 до +7, осим када је у питању шесточлани 3-пропионски прстен, чије је одступање веће (+20). У случају тетраедарске дисторзије око аминског азота ($\Sigma\Delta(N)$ вредност), највише одступа комплекс (4) са вредностима 11° (азот без протона) и 46° (азот који садржи протон). Поред тога, у овом комплексу, девијација 1,3-пропандиаминског прстена је велика и износи +44°, па се може закључити да је нестабилан и да лако подлеже хидролизи у супституционим реакцијама.

3.3.2 Анализа напона хексадентатних Rh(III) комплекса

Када су у питању хексадентатни комплекси родијума(III), структурни подаци корелирани са њиховом стереохемијом су дати у **Табели 11**. Анализа напона дискутована је за комплекс (**5**), као и за структурно сличне комплексе родијума(III) и кобалта(III) (**6**)-(**16**), од којих су неки са потврђеном Х-гау структуром, а за неке су употребљене DFT израчунате структуре.

Код свих испитиваних комплекса (**Табела 11**) видимо да је јон метала хексакоординован са октаедарском геометријом, при чему је степен дисторзије ($\Sigma\Delta(O_h)$ вредност) различит и зависи од распореда карбоксилатних прстенова у екваторијалној равни. Као што је и очекивано, девијација октаедарских углова је већа код Rh(III) комплекса у односу на групу поредбених Co(III) комплекса (**Табела 11**). Комплекс *trans*(O₅O₆)-[Rh(eddadp)]⁻ (**5**), показује умерену дисторзију (41°), што је у сагласности са његовом *trans*(O₅O₆) геометријом и распоредом прстенова у екваторијалној равни (5-5-6), док сличан Co(III) комплекс (**9**) са истим распоредом прстенова показује мање одступање (31°), што се може приписати величини централног јона метала (Co(III) < Rh(III)). Раније синтетисани комплекси (**6**) и (**8**) показују мању дисторзију у односу на комплекс (**5**) (34 и 31°) због повољнијег распореда прстенова у равни (6-5-6) [46,48]. Узимајући у обзир само етилендиаминске комплексе, може се видети да (**7**) и (**10**) показују највеће одступање од октаедра, јер је распоред прстенова у равни веома неповољан (5-5-5). Ова

два комплекса нису изолована. 1,3-Пропандиамински комплекси (11-16) показују очекивану дисторзију у опсегу 36-55°. Ако поредимо исте изомере који се разликују само у величини диаминског прстена ((5 и 12); (6 и 11); (8 и 14); (9 и 15); (10 и 16)), може се приметити веће одступање код 1,3-пропандиаминских комплекса. Осим тога, вредност екваторијалног *cis* угла O-M-O опада са повећањем броја шесточланих прстенова у екваторијалној равни (108,2 ° за 7 (5-5-5), 97,9 ° за 13 (5-6-5), 96,2 ° за 5 (6-5-5), 87,5 ° за 6 (6-5-6), 87,5 ° за 12 (5-6-6), 83,4 ° за 11 (6-6-6)). Исти тренд је примећен и код Co(III) комплекса.

Табела 11

Анализа напона хексадентатних [M(edta-тип)]⁻ комплекса.

	$\Sigma\Delta(O_h)^{\mathbf{a}}$	ΔΣ(прет	сен) б		Δ(M-O-C	() ^B	ΣΔ(N) ^Γ	Реф.
Комплекс		E(T)	R	G	R	G	_	
<i>trans</i> (O ₅)-[Rh(eddadp)] ⁻	(6) 34	-12	-1	+41	+5	+18	12	[46]
$trans(O_5O_6)$ -[Rh(eddadp)] ^{- h}	5) 41	-13	-4(+32)	-14(+43)	+6(+14)	+1(+17)	13/24	Овај рад
$trans(O_6)$ -[Rh(eddadp)] ^{- π}	(7) 64	-10	+37	-19	+20	+1	30	Овај рад
$trans(O_5)$ -[Co(eddadp)] ⁻ (8) 31	-11	-1	+38	+6	+18	13	[48]
$trans(O_5O_6)$ -[Co(eddadp)] ^{- a, b}	9) 31	-10	-5(+33)	-12(+33)	+7(+17)	+4(+18)	12	Овај рад
$trans(O_6)$ -[Co(eddadp)] ^{- μ} (1	0) 45	-15	+31	-17	+18	+2	33	Овај рад
$trans(O_5)-[Rh(1,3-pddadp)]^- $ (1	1) 55	+37	-6	+27	+5	+14	17	[196]
$trans(O_5O_6)$ -[Rh1,3-pddadp] ⁻ ^h (1	2) 42	+33	+1(+32)	-10(+41)	+5(+14)	+4(+21)	13	[196]
$trans(O_6)$ -[Rh1,3-pddadp] ^{- π} (1	3) 53	+35	+40	-15	+20	+4	16	Овај рад
$trans(O_5)$ -[Co(1,3-pddadp)] ^{- μ} (1	4) 42	+39	-6	+27	+7	+17	18	Овај рад
$trans(O_5O_6)$ -[Co(1,3-pddadp)] ^{- h} (1	5) 36	+34	0(+36)	-9(+44)	+6(+19)	+5(+24)	16	[1976]
$trans(O_6)-[Co(1,3-pddadp)]^- $ (1	6) 38	+28	+33	-11	+17	+4	16	[197a]

^а $\Sigma \Delta(O_h)$: збир апсолутних вредности одступања дванаест октаедарских углова од 90°;

⁶ΔΣ(прстен): одступање суме углова веза појединачних прстенова (E, T, R, G) од идеалне вредности (идеалне вредности: E = 528°, T = 637.5°, R и G петочлани = 538.5°, R и G шесточлани = 648°);

^в∆(М-О-С): средња вредност одступања углова М-О-С од идеалне вредности 109.5°;

^г ΣΔ(N) збир апсолутних девијација шест углова око азота у односу на идеалну вредност 109.5°, дата је средња вредност добијена за оба азота, осим у случају када се вредности драстично разликују;

^д DFT израчуната структура;

^в вредности у загради се односе на 3-пропионске прстенове.

Етилендиамински (Е) прстенови показују очекивано негативне вредности одступања, насупрот 1,3-пропандиаминским (Т) прстеновима, који су флексибилнији.

Вредности $\Delta\Sigma$ (прстен R) код свих комплекса су ниже у поређењу са вредностима за G прстенове, што говори о томе да су мање напети због мањег присуства других прстенова у свом окружењу. Петочлани ацетатни прстенови у екваторијалној равни (G) су мањи од идеалних (538,5°), па им је девијација негативна што није случај код шесточланих 3-пропионских прстенова у окружењу чије су девијације позитивне. Сви комплекси показују позитивне вредности одступања углова M-O-C(R, G) веза. Комплекси (7) и (10), који никада нису изоловани, показују највећу тетраедарску дисторзију око аминског азота ($\Sigma\Delta$ (N) вредност) (30 и 33°).

Из свега наведеног, може се закључити да су комплекси (7) и (10) најнестабилнији од свих испитиваних комплекса са нестабилним распоредом прстенова у равни (5-5-5).

3.4 Испитивања у растворима

Константе протоновања лиганада добијене су анализом резултата потенциометријских титрација. Комплексирање Rh(III) јона са ed3a³⁻ и 1,3-pd3a³⁻ проучавано је потенциометријским и спектрофотометријским мерењима у 0,1 М натријумхлоридној средини на 25 °C. Обрадом добијених резултата одређене су врсте насталих комплекса у раствору, као и њихове константе стабилности.

3.4.1 Константе протоновања лиганада

Константе протоновања лиганада ed3a³⁻ и 1,3-pd3a³⁻ су добијене из резултата добијених потенциометријским титрацијама. Оба лиганда су изолована у неутралним облицима H₃ed3a и H₃1,3-pd3a, док њихове потпуно протоноване форме садрже пет одлазећих протона: H₅ed3a²⁺ и H₅1,3-pd3a²⁺. Експериментално добијене константе протоновања (log $K_i^{\rm H}$) приказане су у **Табели 12** заједно са раније добијеним вредностима за структурно сличне лиганде edta⁴⁻ и 1,3-pdta⁴⁻. Вредности стандардних девијација су дате у заградама. Константе протоновања су дефинисане једначином (11):

$$K_{i}^{H} = \frac{[H_{i}L]}{[LH_{i-1}][H^{+}]}; i = 1, 2, 3...$$
 (11)

69

Константе протоновања (log $K_i^{(1)}$) ed3a ^{3*} и 1,3-рd3a ^{3*} лиганада.									
лиганд	ed3a ³⁻	1,3-pd3a ³⁻	edta ^{4- a}	1,3-pdta ^{4- 6}					
јонска јачина	0,1 M NaCl	0,1 M NaCl	0,1 M KCl	0,1 M KCl					
$\log K_1^{\mathrm{H}}$	9,72(2)	9,82(3)	10,19	10,29					
$\log K_2^{\mathrm{H}}$	5,81(3)	7,70(4)	6,16	7,94					
$\log K_3^{\mathrm{H}}$	2,89(3)	2,63(6)	2,69	2,70					
^a [212]; ⁶ [213].									

Табела 12

(H) = 12 = 3 = 1 = 1 = 12 = 3

Анализом израчунатих константи протоновања за оба лиганда утврђено је да се прве две константе односе на протоновање атома азота, где су вредности $\log K_1^{\rm H}$ и $\log K_2^{\rm H}$ за ed3a³⁻ лиганд 9,72 и 5,81, а за лиганд 1,3-рd $3a^{3-}$ 9,82 и 7,70. Вредност log K_3^{H} је за оба лиганда ниска, одговара протоновању једног карбоксилата и износи 2,89 за ed3a³⁻ и 2,63 за 1,3-pd3a³⁻ . Вредности за log $K_4^{\rm H}$ и log $K_5^{\rm H}$ се приписују протоновању преостале две карбоксилне групе, њихове вредности су ниже од 2, па нису могле бити одређене потенциометријски. Ови резултати су у сагласности са константама протоновања добијеним за њихове аналоге дате у Табели 12.

Поређење константи протоновања наших трикарбоксилних (ed3a³⁻ и 1,3-pd3a³⁻) и поредбених тетракарбоксилних ($edta^{4-}$ и 1,3-pdta⁴⁻) лиганада, које су добијене у сличним условима, открива да су вредности log $K_3^{\rm H}$ међусобно сличне (разлика ≤ 0.20). Међутим, прва и друга константа log $K_1^{\rm H}$ и log $K_2^{\rm H}$ показују ниже вредности код испитиваних трикарбоксилних лиганада у односу на тетракарбоксилне и то за 0,47 и 0,35 log K јединица код ed3a³⁻ лиганда и 0,47 и 0,24 log K јединице код 1,3-рd3a³⁻ лиганда (**Табела 12**) што се може објаснити присуством једне додатне ацетатне групе. Ацетатна група са својим позитивним индуктивним ефектом смањује киселост протона на атому аминског азота. Такође, друга константа протоновања 1,3-рd $3a^{3-}$ лиганда је за 1,89 log *K* јединица већа него код ed3a³⁻, што може бити последица електростатичког одбијања између два протонована атома азота.

Дистрибуциони дијаграми $ed3a^{3-}$ и 1,3-р $d3a^{3-}$ лиганада дати су на Слици 31. Анализа дистрибуционих дијаграма показује да потпуно депротоноване врсте ed3a³⁻ и 1,3-pd3a³⁻



постоје у раствору у pH области већој од 8,0. Протоноване врсте Hed3a²⁻, H₂ed3a⁻, H₃ed3a, H1,3-pd3a²⁻, H₂1,3-pd3a⁻ и H₃1,3-pd3a присутне су у области pH = 2,0-12,0.

Слика 31. Дистрибуциони дијаграми протонованих облика лиганада: ed3a³⁻ (лево) и 1,3-pd3a³⁻ (десно). Концентрација оба лиганда је 2,0 mM.

3.4.2 Константе формирања комплекса Rh³⁺ са еd3a³⁻ и 1,3-рd3a³⁻ лигандима

Способност комплексирања ed3a³⁻ и 1,3-pd3a³⁻ лиганада са Rh³⁺ јоном проучавана је у раствору одређивањем константи стабилности комплекса, што омогућава процену дистрибуције врста на различитим pH вредностима. Ове студије укључују комбинацију pH потенциометријских титрација и UV-Vis спектроскопије са накнадном анализом експерименталних података употребом Hyperquad2006 и HypSpec2014 програма.

3.4.2.1 Потенциометријске титрације

Комплексирање јона родијума(III) урађено је пратећи процедуру описану у Експерименталном делу. Експериментални подаци приказани су на **Слици 32**. Титрационе криве ed3a³⁻ и 1,3-pd3a³⁻ у присуству Rh³⁺ су померене удесно у односу на титрациону криву самог лиганда указујући на формирање комплекса у систему. Титрационе криве се преклапају на ниским pH вредностима, што указује да нема реакција комплексирања на pH вредностима које су ниже од 6,0.



Слика 32. Криве потенциометријских титрација испитиваних система: Rh³⁺ - ed3a³⁻ (лево), Rh³⁺ - 1,3-pd3a³⁻ (десно).

Компјутерски програм Нурегquad2006 је коришћен за одређивање стехиометрије комплекса и израчунавање условних константи стабилности. Стандардна девијација узорка, *s* и Пирсонов χ^2 -тест коришћени су као критеријум за избор одговарајућих комплекса. Добијени резултати приказани су у **Табели 13**. Потврђено је постојање само мононуклеарних комплекса као што су [MHL] ([Rh(Hed3a)]⁺, [Rh(H1,3-pd3a)]⁺), [ML] ([Rh(ed3a)], [Rh(1,3-pd3a)]) и [MLH₋₁] ([RhOH(ed3a)]⁻, [RhOH(1,3-pd3a)]⁻).

3.4.2.2 Спектрофотометријске титрације

Спектрофотометријски подаци су добијени из раствора Rh^{3+} - $ed3a^{3-}$ и Rh^{3+} - 1,3pd3a³⁻ који су кувани, затим охлађени на 25 °C, при чему су концентрације Rh^{3+} и лиганда одржаване константним, а pH вредности варирале додавањем стандардних раствора NaOH и HCl (по потреби). Спектроскопски подаци су обрађени HypSpec2014 програмом, а као почетни модел при израчунавању узети су комплекси који су добијени обрадом потенциометријских резултата и њихове одговарајуће условне константе стабилности су оптимизоване. Добијени резултати прорачуна су дати у **Табели 13**. Дистрибуциони дијаграми испитиваних система су приказани на **Сликама 33** и **34** (концентрациони односи: $[Rh^{3+}]:[ed3a^{3-}] = 1:3, [Rh^{3+}]:[1,3-pd3a^{3-}] = 1:2, [Rh^{3+}] = 2,0$ mM).

Табела 13

Условне константе стабилности Rh^{3+} -ed3a³⁻ и Rh^{3+} -1,3-pd3a³⁻ комплекса формираних у 0.1 M NaCl јонском медијуму ^a.

	$\log eta_{p,q,r} \pm \sigma$	
Комплекси	Потенциометрија	Спректофотометрија
-	25 °C	145 °C
[Rh(Hed3a)] ⁺	12,16(4)	12,54(9)
[Rh(ed3a)]	5,18(3) ⁶	7,26(3)
$[Rh(ed3a)_2]^{3-}$	8,87(8)	-
[RhOH(ed3a)] ⁻	-2,93(5)	-
[Rh(H1,3-pd3a)]+	13,45(4)	13,51(8)
[Rh(1,3-pd3a)]	5,59(5) ⁶	7,38(2)
[Rh(1,3-pd3a) ₂] ³⁻	-	11,45(8)
[RhOH(1,3-pd3a)] ⁻	-2,29(4)	-
Статистика	$\chi^2 = 11,28, s = 1,50$	<i>s</i> = 0,024
	$\chi^2 = 12,88, s = 1,56$	<i>s</i> = 0,034

^а Могућа је измена H₂O/Cl⁻ у Rh(III) комплексу [214,215], па су монодентатни лиганди H₂O и Cl⁻ изостављени;

⁶ Вредности се односе на комплексе где је једна карбоксилна група депротонована и слободна, тј. лиганд је тетрадентат.



Слика 33. Дистрибуциони дијаграми Rh³⁺ - ed3a³⁻ врста у односу концентрација [Rh³⁺]:[ed3a³⁻] = 1:3 и са укупном концентрацијом родијума(III) од 2,0 mM, добијени потенциометријски (лево) и спектрофотометријски (десно).

У систему Rh^{3+} - ed3a³⁻, види се (Слика 33) да је на нижим pH вредностима доминантна врста $[Rh(Hed3a)]^+$ са максимумом концентрације од 45% на pH = 6,3. Ако се претпостави да се комплекс $[Rh(Hed3a)]^+$ формира по реакцији:

Rh³⁺ + H₂ed3a⁻
$$\Rightarrow$$
 [Rh(Hed3a)]⁺ + H⁺; β (12)
log β = log $\beta_{1,1,1}$ - log K_1^{H} = 12,16 - 9,72 = 2,44

мала вредност појединачне условне константе стабилности (log $\beta = 2,44$) указује да није дошло до потпуне координације јона метала са лигандом, и да један азот и један карбоксилни кисеоник, највероватније, нису координовани за родијум у комплексу [Rh(Hed3a)]⁺ (Шема 5, комплекс 1). На Шеми 5 су предложена два могућа пута за формирање комплекса у раствору: 1 \rightleftharpoons 2 \rightleftharpoons 4 и 1 \rightleftharpoons 2 \rightleftharpoons 3. Први пут проистиче из резултата потенциометријске титрације, док други пут описује резултате спектрофотометријских титрација након грејања у затвореном систему на 145 °C.

Са порастом pH вредности, [Rh(Hed3a)]⁺ губи протон (равнотежа 1 \neq 2 \neq 4) и формира се [Rh(ed3a)] комплекс у коме је ed3a³⁻ потпуно депротонован са максимумом концентрације 52% при pH вредности 7,6 (Слика 33 и Шема 5). Равнотежна константа за ову реакцију, *K*₁, може се израчунати из укупних условних константи стабилности комплекса [Rh(Hed3a)]⁺ и [Rh(ed3a)]:

$$[Rh(Hed3a)]^{+} \rightleftharpoons [Rh(ed3a)] + H^{+}; K_{1}$$

$$\log K_{1} = \log \beta_{1,1,1} - \log \beta_{1,0,1} = 12,16 - 5,18 = 6,98.$$
(13)

Ова вредност је слична константи протоновања азота у лиганду, log $K_2^{\rm H}$, па се може закључити да амино азот губи протон и да се координује за родијум(III). С обзиром да је стабилност [Rh(ed3a)] комплекса мала (log $\beta_{1,0,1} = 5.18$), преостала слободна карбоксилна група лиганда ed3a³⁻ је врло лабаво координована за родијум(III). Равнотежна константа, log K, за равнотежу 1 \rightleftharpoons 3 износи 5,28, што је слично вредности константе log $K_2^{\rm H}$ (**Табела 12**). Након загревања раствора комплекса 2 (**Шема 5**), монодентатни донор X замењује се СОО⁻ групом и долази до формирања пентадентатног комплекса родијума(III) и лиганда. Константа равнотеже log $K_{\rm eq} = 2,08$ (равнотежа 2 \rightleftharpoons 3) може се упоредити са константом формирања хексакоординованог комплекса између родијума(III) и edta⁴⁻ [216].


Шема 5. Дисоцијација [Rh(Hed3a)X₃]⁺; $X = H_2O$, Cl⁻.

Након пораста рН вредности (модел 1≓2≓4), комплекс [Rh(ed3a)(H₂O)X] губи протон и формира хидролитички комплекс [RhOH(ed3a)X], чије формирање почиње на рН = 6,2 и његова концентрација расте са даљим порастом рН. Комплекс [Rh(ed3a)(H₂O)X], након пораста рН, везује још један Hed3a²⁻лиганд и формира [Rh(ed3a)₂]³⁻ (Слике 31 и 33):

$$[RhOH(ed3a)X] + Hed3a^{2-} \rightleftharpoons [Rh(ed3a)_2]^{3-} + H_2O + X$$
(14)

Формирање комплекса $[Rh(ed3a)_2]^{3-}$ почиње на pH = 6,5 при чему комплекс достиже своју максималну концентрацију на pH = 9.

Врло слична ситуација је у случају система Rh^{3+} - 1,3-рd $3a^{3-}$ (Слика 34). Формирање $[Rh(H1,3-pd3a)]^+$ комплекса се јасно види у киселом опсегу рН и преовладава у области рН = 4,0-8,0. Овај комплекс се може формирати у реакцији између Rh^{3+} аква јона и H_2 1,3-рd $3a^-$ јона, имајући у виду да ове врсте преовладавају у области рН = 3,0-7,0, као што се може видети на Слици 31.

Rh³⁺ + H₂1,3-pd3a⁻
$$\Rightarrow$$
 [Rh(H1,3-pd3a)]⁺ + H⁺; β (15)
log β = log $\beta_{1,1,1}$ - log $K_1^{\rm H}$ = 3,63



Слика 34. Дистрибуциони дијаграми Rh³⁺ - 1,3-рd3а³⁻ врста у односу концентрација [Rh³⁺]:[1,3pd3a³⁻] = 1:2 и са укупном концентрацијом родијума(III) од 2,0 mM, добијени потенциометријски (лево) и спектрофотометријски (десно).

Условна константа стабилности (log β = 3,63) указује да азот и карбоксилни кисеоник нису координовани за родијум(III) у комплексу [Rh(H1,3-pd3a)]⁺ (Шема 6, комплекс 1). Са порастом pH (на 25 °C), комплекс [Rh(H1,3-pd3a)]⁺ (монодентатни лиганд је изостављен) губи протон и формира [Rh(1,3-pd3a)] (Шема 6, комплекс 2) где је 1,3pd3a³⁻ потпуно депротонован. Константа равнотеже за ову реакцију, *K*, може се израчунати из укупних условних константи стабилности комплекса [Rh(H1,3-pd3a)]⁺ и [Rh(1,3-pd3a)]:

$$[Rh(H1,3-pd3a)]^{+} \leftrightarrows [Rh(1,3-pd3a)] + H^{+}; K$$

$$\log K = \log \beta_{1,1,1} - \log \beta_{1,0,1} = 13,45 - 5,59 = 7,86$$
(16)

Израчуната вредност за [Rh(1,3-pd3a)] (log K = 7,86) прилично је блиска одговарајућој вредности за константу протоновања log $K_2^{\rm H} = 7,70$ (**Табела 12**), што указује на то да азот амино групе губи протон и координује се за родијум(III). Слободна карбоксилна група није координована за родијум (**Шема 6**, комплекс 2) што се може закључити на основу мале стабилности комплекса [Rh(1,3-pd3a)] (log $\beta_{1,0,1} = 5,59$).

Марија С. Јеремић

Након загревања раствора комплекса 2 (Шема 6), монодентатни донорски лиганд X се замењује карбоксилном групом, где долази до формирања пентадентатног комплекса Rh(III) са 1,3-рd3a³⁻. Равнотежна константа комплекса log $K_1 = 1,79$ може се упоредити са константом формирања комплекса (log $K_{eq} = 2,08$) између родијума(III) и ed3a³⁻ лиганда (видети изнад).



Шема 6. Дисоцијација [Rh(H1,3-pd3a)X₃]⁺; X = H₂O, Cl⁻.

Након пораста pH, на 25 °C, [Rh(1,3-pd3a)(H₂O)X] (Шема 6, комплекс 2) губи протон и формира хидролитички комплекс, [RhOH(1,3-pd3a)X]. Формирање овог комплекса почиње на pH = 6,5 при чему његова концентрација расте са даљим порастом pH. Комплекс [Rh(1,3-pd3a)X₂] (Шема 6, комплекс 2) на температури 145 °C, а након пораста pH, везује други H1,3-pd3a лиганд и формира [Rh(1,3-pd3a)₂]³⁻ (Слике 31 и 34). Формирање овог комплекса почиње на pH = 6,5 при чему његова концентрација расте са порастом pH (Слика 34, десно).

3.5 In vitro антитуморска активност комплекса и лиганада

3.5.1 MTT mecm

Овај део је дисертације посвећен испитивању антипролиферативне активности (цитотоксичности) синтетисаних једињења. Цитотоксичност је испитивана *in vitro* применом колориметријског МТТ теста. Испитивање је вршено на четири туморске ћелијске линије, као и на једној здравој ћелији како би се утврдило да ли једињења показују селективну цитотоксичност. У тесту су коришћене следеће ћелијске линије: хумани карцином плућа (А-549), хумани аденокарцином дојке (MCF-7), хумани аденокарцином дебелог црева (HT-29), хумани аденокарцином грлића материце (HeLa) и нормални хумани фетални фибробласти плућа (MRC-5). Измерена цитотоксичност испитиваних једињења је поређена са контролним узорцима нетретираних ћелија. Као референтна једињења коришћени су цисплатина (*cis*-Pt) и доксорубицин (DOX). Лиганди су преведени у своје натријумове соли. Резултати испитивања су приказани у **Табели 14** као IC₅₀ вредности.

Табела 14							
IC ₅₀ вредности (µМ) тестираних лиганада и комплекса ^а .							
		ћелијске линије					
једињење	MRC-5	A-549	MCF-7	HeLa	HT-29		
$[Rh(ed3a)(H_2O)] \cdot H_2O$	(1)	>100	16,83	>100	1,10	1,96	
Na[Rh(ed3a)Cl]·H ₂ O	(2)	>100	24,28	>100	20,54	37,64	
$[Rh(1,3-pd3a)(H_2O)] \cdot 2H_2O$	(3)	>100	37,55	10,7	38,48	>100	
Na[Rh(1,3-pd3a)Cl]·2H ₂ O	(4)	>100	>100	51,71	12,15	>100	
Na ₂ Hed3a		>100	18,01	>100	13,86	>100	
Na ₂ H1,3-pd3a		>100	26,44	>100	4,97	>100	
доксорубицин (DOX)		0,12	0,75	7,86	0,32	1,17	
цисплатина (cis-Pt)		1,48	6,75	11,6	1,77	15,9	

^а IC₅₀ концентрација једињења која спречава раст ћелије за 50% у поређењу са нетретираном контролом. Вредности су одређене "median effect" анализом и потичу од 2 независна експеримента.

Испитивана једињења су показала различиту цитотоксичност према третираним ћелијама (**Табела 14**). Антипролиферативни ефекти су били линеарно зависни од концентрације. НеLa ћелијска линија показала је највећу сензитивност према свим једињењима сем према [Rh(1,3-pd3a)(H₂O)]·2H₂O (**3**) комплексу, док је линија MCF-7 показала осетљивост само на [Rh(1,3-pd3a)(H₂O)]·2H₂O (**3**) и референтна једињења. Комплекс [Rh(ed3a)(H₂O)]·H₂O (**1**) је показао снажно дејство према HT-29 и HeLa ћелијама (8 пута активнији од цисплатине када је у питању HT-29 и 1,5 пута активнији у случају HeLa), мада се његова активност ни према A-549 не може занемарити, док је потпуно неактиван на MCF-7 и MRC-5 ћелијским линијама. Комплекс [Rh(1,3-pd3a)(H₂O)]·2H₂O (**3**) је показао добру активност према MCF-7 ћелијама слично референтним једињењима и умерену активност према HeLa и A-549. Оба испитивана лиганда показују завидну активност према HeLa ћелијама, а H₃ed3a и према A-549. Треба истаћи да су сва испитивана једињења показала селективност између туморских и здравих ћелија јер ни комплекси ни лиганди не показују дејство према здравим ћелијама па их можемо сматрати добрим кандидатима за потенцијалне антитуморске лекове. Највећу цитотоксичност је показао комплекс [Rh(ed3a)(H₂O)]·H₂O, док је најосетљивија ћелијска линија била HeLa. За даље тестове коришћена су једињења која су показала добру активност на HeLa ћелијама, а то су [Rh(ed3a)(H₂O)]·H₂O (**1**), Na[Rh(ed3a)CI]·H₂O (**2**), Na[Rh(1,3-pd3a)CI]·2H₂O (**4**), Na₂Hed3a и Na₂H1,3-pd3a.

3.5.2 Типови ћелијске смрти и начини одређивања

ћелијска смрт може настати дејством различитих чинилаца, као што су микроорганизми, физички и хемијски агенси или услед недостатка есенцијалних животних материја, где долази до неповратног оштећења ћелије. На основу морфолошких карактеристика, разликује се неколико типова ћелијске смрти: апоптоза, некроза, аутофагија, корнификација, аноикис, митотичка катастрофа и друге [217-221]. Карактеристично за некрозу је то да се јавља у екстремно нефизиолошким условима, док се апоптоза јавља и у патолошким и физиолошким условима. Некроза је пасиван тип ћелијске смрти за коју није потребна енергија, а карактерише се бубрењем ћелије, руптуром мембране, разарањем цитоплазме и једра, а на крају долази и до запаљенске реакције услед доспевања интрацелуларног садржаја у ванћелијски простор. Насупрот свему наведеном, апоптоза је "програмирана ћелијска смрт", где ћелија користи енергију и активно учествује у самом процесу. Другим речима, у питању је ћелијско самоубиство, које је уређено и генетски регулисано, где ћелија пролази кроз низ морфолошких промена по чему се и разликује од некрозе: кондензација хроматина у једру, смањење запремине целе ћелије, мембрана остаје целовита па нема ни запаљенског одговора услед изливања интрацелуларног садржаја. Такође, долази до фрагментације ћелије резултујући стварање апоптотских тела која су оивичена мембраном и која се брзо фагоцитују од стране околних ћелија и макрофага. Целовитост и функционалност мембране је врло значајна, јер је

праћење могуће на основу морфолошких промена. Породица протеина Bcl-2 је кључна у регулацији апоптотских процеса. Апоптоза зависи од равнотеже између про- и антиапоптотских Bcl-2 протеина. Анти-апоптотски протеин Bcl-2 игра кључну улогу у апоптози. Његова супресивна активност у апоптотском процесу може допринети отпорности туморских ћелија на лекове [222-226]. Имајући у виду све наведено, ми смо за детекцију апоптозе користили методе проточне цитометрије, флуоресцентне микроскопије и Western blot анализу.

3.5.2.1 Детекција anonmose Annexin-V тестовима проточне цитометрије

Анализа типа ћелијске смрти је вршена на основу резултата добијених применом Annexin-V бојеног теста. Рана фаза апоптозе је карактерисана променама на површини ћелије, односно на нивоу мембране. Једна од првих промена која се дешава је прелазак фосфатидил-серина (PS) са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране. Због чињенице да Annexin-V (Ca^{2+} -зависни фосфолипид-везујући протеин) показује афинитет да се веже на ћелијску мембрану, овај молекул је коришћен за детекцију апоптотских ћелија [227]. У случају комплекса (1) и (2), примењено је истовремено бојење ћелија Annexin-ом V конјугованим са флуоресцеин-изотиоцијанатом (FITC) и 7-аминоактиномицин D (7-AAD) (двоструко бојење). Наиме, PS излази на спољашњу страну мембране и код апоптотичних и некротичних ћелија, па је комбинација бојења неопходна јер 7-AAD боји само касно-апоптотичне и некротичне ћелије. Зато се сматра да је проточна цитометрија Annexin V-FITC/7-AAD бојених ћелија златни стандард у детекцији апоптозе. Наши резултати показују да комплекси (1) и (2) индукују апоптозу HeLa ћелија са занемарљивим процентом некротичних ћелија (Слика 35). Већина ћелија је била рано апоптотична (39,38 и 28,71%), мали проценат ћелија је био у касној апоптози (2,1 и 1,88%), док је најмањи проценат ћелија некротичан (0,17 и 0,19%).

Када су у питању комплекс Na[Rh(1,3-pd3a)Cl]·2H₂O (**4**) и оба лиганда, такође је коришћена метода двоструког бојења Annexin-V, али овог пута је уместо 7-AAD коришћен пропидијум-јодид (PI) који боји само некротичне ћелије. Апоптотички одговор, представљен као проценат специфичне апоптозе (Слика **35**) показује да цисплатина (*cis*-Pt) умножава проценат Annexin-V позитивних HeLa ћелија у односу на тестирана једињења. Комплекс (**4**) и лиганд Na₂H1,3-pd3a повећавају проценат специфичне апоптозе у поређењу

са Na₂Hed3a. Ови резултати су у корелацији са резултатима анализе ћелијског циклуса (видети ниже). Проценат специфичне некрозе након 48 h био је 9,13% за Na₂Hed3a док је за друга два једињења нижи (0,3 - 1,2%) (Слика 36).

Анализом резултата можемо закључити да је апоптоза примарни начин смрти HeLa ћелија код свих тестираних супстанци, док је занемарљив проценат некрозе, осим у случају лиганда Na₂Hed3a који показује не баш занемарљиво учешће некрозе у ћелијској смрти. У поређењу са контролом, сва једињења су увећала удео апоптозе, пре свега ране, при чему је опет овај проценат најмањи код лиганда Na₂Hed3a.



Слика 35. Анализа Annexin V-FITC/7-AAD бојеног теста проточне цитометрије $[Rh(ed3a)(H_2O)]\cdot H_2O$ (1) и Na $[Rh(ed3a)Cl]\cdot H_2O$ (2). Тачкице на дијаграму представљају проценат вијабилних Annexin V⁻⁷-AAD⁻ (доњи леви квадрант), рано апоптотичних Annexin V⁺⁷-AAD⁻ (доњи десни квадрант), касно апоптотичних Annexin V⁺⁷-AAD⁺ (горњи десни квадрант) и некротичних ћелија Annexin V⁻⁷-AAD⁺ у нетретираним HeLa ћелијама (контрола) и HeLa ћелијама третираним [Rh(ed3a)(H₂O)]·H₂O (1) и Na[Rh(ed3a)Cl]·H₂O (2).



Слика 36. Проценат специфичне апоптозе HeLa ћелија изазване цисплатином (*cis* Pt) и тестираним супстанцама после 48 h терапије. Ћелије су обојене са Annexin-V-FLUOS и пропидијумјодидом и анализиране проточном цитометријом. Проценат специфичне апоптозе цисплатине и тестираних једињења израчунава се према референци [181].

3.5.2.2 Акридин-оранж/етидијум-бромид (АО/ЕВ) тест флуоресцентне микроскопије

Иако се транслокација фосфатидил-серина (PS) са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране сматра обележјем апоптозе, може се јавити и код других типова ћелијске смрти [228]. Због тога се мора користити више од једне методе за верификацију апоптозе. Процена морфологије ћелија може бити најпоузданија метода за потврду апоптозе [182]. Метода двоструког бојења флуоресцентним бојама акридин-оранж и етидијум-бромид се заснива на особини акридин-оранжа да улази и у вијабилне и невијабилне ћелије, при чему се интеркалира у дволанчану ДНК и флуоресцира зелено. Етидијум-бромид је ДНКинтеркалирајућа боја која флуоресцира наранџасто, не може да прође кроз интактну ћелијску мембрану и акумулира се само у невијабилне, некротичне ћелије [229]. На основу флуоресценције која се емитује, ћелијске морфологије и изгледа једра, разликују се четири врсте ћелија: вијабилне (ћелије са нормалном морфологијом и зеленим једром које имају

Марија С. Јеремић

организовану структуру), рано апоптотичне ћелије (мале, округле ћелије, где је хроматин скупљен па је једро светло-зелено), касно апоптотичне ћелије (једро је светло-наранџасте до црвене боје са кондензованим хроматином) и некротичне ћелије са нормалном морфологијом и наранџастим до црвеним једром које има организовану структуру.

Користећи АО/ЕВ бојење, потврдили смо да HeLa ћелије третиране тестираним комплексима (1) и (2) показују све морфолошке промене типичне за апоптозу (Слика 37). АО/ЕБ бојење је омогућило уочавање разлике између одрживих, рано апоптотичних, касно апоптотичних и некротичних ћелија након 24 h третмана са испитиваним једињењима. Напомињемо да за остала једињења није рађен овај тест.



Слика 37. Промене у морфологији HeLa ћелија након третмана визуализоване помоћу AO/EB бојења. Оба комплекса (1) и (2) су индуковала промене типичне за апоптозу. Једра вијабилних ћелија су зелена са организованом структуром, док су једра рано апоптотичних ћелија светло-зелена, а једра касно апоптотичних ћелија светлонаранџаста до црвена са кондензованим хроматином. Некротичне ћелије имају нормалне морфологије и наранџаста до црвена једра са организованом структуром.

3.5.2.3 Western blot анализа

Семи-квантитативна Western blot анализа је коришћена за испитивање механизама апоптозе. Испитивање се заснива на праћењу промене нивоа про-апоптотских и антиапоптотских протеина (Bcl-2, Bax, каспаза-3 и поли-(ADP-рибоза) полимераза, PARP) у третираним ћелијама.

Резултати Western blot анализе су показали да тестирана једињења (1) и (2) утичу на експресију протеина (Слике 37 и 38). Ескпресија Bcl-2 протеина је мања у испитиваним узорцима, као и у случају доксорубицина. Експресија Вах протеина расте само у случају ћелија третираним комплексом (1). Оба испитивана комплекса повећавају експресију каспазе-3 (Слике 38 и 39), што указује на укључивање каспазе-3 у апоптотске процесе исптиване ћелијске линије. Такође, Western blot показује протеолитичко цепање поли-(ADP-рибоза) полимеразе (PARP) у HeLa ћелијама након третмана испитиваним комплексима (Слике 37 и 38). Актин је коришћен као интерни стандард и показује униформну експресију протеина код свих узорака. Варијације су биле у распону \pm 5% у поређењу са контролом. Образац експресије испитиваних протеина, који припадају апоптотском сигналном путу најугроженије туморске ћелијске линије HeLa, открива да је спроведена апоптоза. Ово је потврђено детекцијом цепања PARP протеина у узорцима третираним са оба комплекса (1) и (2), смањењем експресије Bcl-2 и повећањем експресије Вах протеина. ВсІ-2 и Вах протеини су важни чланови породице ВсІ протеина и налазе се на почетку апоптотског сигналног пута [230,231]. Фактори који могу утицати на њихову равнотежу могу иницирати преживљавање или смрт. Анти-апоптотски Bcl-2 протеини блокирају интринзични пут апоптозе. Њихова концентрација је повећана у ћелијама карцинома ћелија и она су важна мета за нове терапије [230,231]. Стога, опажено смањење експресије Bcl-2 као резултат дејства оба комплекса (1) и (2), као и повећање експресије Вах протеина од фармаколошке су важности. Анализа протеинских експресија, такође, даје слику о повећању активности каспазе-3, што указује на то да је апоптоза зависна од каспазе-3, односно да је дошло до ћелијске смрти на каспаза-завистан начин.



Слика 38. Експресија апоптотских протеина испитивана Western blot анализом: 1. Контролни узорак; 2. Доксорубицин; 3. Na[Rh(ed3a)Cl]·H₂O (2); 4. [Rh(ed3a)(H₂O)]·H₂O (1).



Слика 39. Графичка представа дензитометријских података експресије протеина који су добијени Western blot анализом и обрађени помоћу ImageJ <u>http://imagej.nih.gov</u> [184]. Ескпресија протеина који припадају апоптотичком сигналном путу у узорцима упоређена је са нетретираним узорцима и представљена је као проценат контроле. Дензитометрија експресије актина, који служи као унутрашња контрола, приказана је као мерена: 1. Контролни узорак; 2. Доксорубицин; 3. Na[Rh(ed3a)Cl]·H₂O (**2**); 4. [Rh(ed3a)(H₂O)]·H₂O (**1**).

3.5.2.4 Анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом

Прогресија ћелијског циклуса и апоптоза су кључни за одржавање хомеостазе ткива. Ова два процеса су спојена и деле одређене регулаторске молекуле. Ћелијска оштећења и стресни сигнали резултирају завршетком ћелијског циклуса који обезбеђује ћелији време за поправку оштећења. Ако се ћелија не може опоравити онда то значи да је активиран апоптотички програм.

Анализа ћелијског циклуса у HeLa ћелијама које су третиране комплексима (1) и (2) (Слика 40) показује да обе супстанце индукују G0/G1 застој ћелијског циклуса (од 74,97%

у нетретираним ћелијама до 81,70% у ћелијама третираним комплексом (1) и 81,52% у случају коришћења комплекса (2)). Истовремено, проценат ћелија у S фази смањен је са 5,04% на 0,65% и 0,85%, респективно. Промене у G2/М фази нису биле много значајне. Ови резултати указују на то да је блокада синтезе ДНК, која је изазвана испитиваним супстанцама, могући покретач апоптозе.



Слика 40. Анализа ћелијског циклуса. Хистограми представљају дистрибуцију ћелијског циклуса у нетретираним HeLa ћелијама (А) и ћелијама третираним 48 h са комплексима (1) (Б) и (2) (В).

Комплекс (4) и цисплатина (*cis*-Pt) као референтно једињење, након 48 h третмана, смањили су проценат ћелија у G2/M фази за 50 и 15% у поређењу са контролом, респективно. Лиганд Na₂H1,3-pd3a и референтно једињење су смањили проценат ћелија у G0/G1 фази. Само цисплатина је повећала проценат ћелија у S фази у поређењу са контролним узорком. Након излагања HeLa ћелија комплексу (4) и лигандима током 48 h, утврђено је да (4), Na₂H1,3-pd3a и цисплатина повећавају проценат апоптотских ћелија (subG1 пик, Слика 41).

Ови резултати указују да су испитивана једињења селективнија од референтних, тако да могу бити кандидати за развој антитуморских лекова.



Слика 41. Дистрибуција ћелијског циклуса дата као проценат [%] третираних HeLa ћелија кроз различите фазе ћелијског циклуса након 48 h изложености еквитоксичним дозама (IC₅₀ концентрације) тестираних једињења (4), Na₂H1,3-pd3a, Na₂Hed3a и цисплатине (*cis*-Pt) заједно са нетретираним контролним узорком (контрола).

3.6 Компјутерске методе

3.6.1 Квантна механика (QM)

Компјутерске методе су коришћене за интерпретацију структурних параметара експериментално добијених комплекса Rh(III), као и њихових могућих изомера. Стога, извршена је оптимизација геометрија експериментално потврђених и потенцијалних изомера комплекса користећи DFT (имплементиран у Gaussian 09) употребом различитих теоријских модела: B3LYP/def2-TZVP за комплексе (1)-(4), док су за комплекс (5) коришћене MP2, M06 и B3LYP методе у комбинацији са SDD базним сетом. Добијени подаци налазе се у Табели 15.

Табела	15
--------	----

Поређење X-ray и DFT структурних параметара за [Rh(edta-тип)] комплексе са израчунатим енергијама ^а.

X-ray:DFT							
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)		
Rh-N (Å)	1,996 : 2,015	2,011 : 2,055	/: 2,068	2,020 : 2,064	2,015 : 2,074		
екваторијално	2,027 : 2,084	2,033 : 2,075	/: 2,084	2,030 : 2,084	2,026 : 2,075		
Rh-O (Å)	2,050 : 2,043	2,074 : 2,063	/: 2,041	2,044 : 2,054	2,053 : 2,077		
екваторијално	2,072 : 2,143 ⁶	/	/: 2,048	2,054 : 2,062	2,053 : 2,058		
Rh-O (Å)	2,018 : 2,039	2,008 : 2,046	/: 1,983	2,018 : 2,031	2,032 : 2,051		
аксијално	2,010 : 2,020	2,013 : 2,035	/: 2,1506		2,017 : 2,050		
Rh-Cl (Å)	/	2,353 : 2,399	/	2,328 : 2,397	/		
Rh-O-C (°) ^в	112,7 : 114,3	112,8 : 114,5	/: 115,8	114,3 : 115,3	119,1 : 119,9		
<i>cis</i> -углови (°) ^в	90,0 : 90,0	90,0:90,0	/: 90,0	90.0 : 90,0	90,0 : 90,0		
<i>trans</i> -углови (°)	178,6 : 178,0	178,3 : 176,2	/: 178,7	178,8 : 178,7	178,9 : 179,5		
	176,8 : 177,4	176,6 : 176,9	/: 176,9	176,2 : 175,0	177,7 : 177,0		
	169,0 : 168,1	168,2 : 166,8	/: 176,9	176,2 : 177,1	169,3 : 168,4		
RMSD (Å) ^r	0,1098	0,1009	/	0,0770	0,1384		
		Израчунате ен	ергије д				
Геометријски изомери	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)		
cis-equatorial	0	0	1,9	5,4	/		
cis-polar	8	5,2	0	0	/		
trans-equatorial	3,2	3,5	6,1	9,8	/		
$trans(O_5)$	/	/	/	/	0		
$trans(O_5O_6)$	/	/	/	/	2,28		
$trans(O_6)$	/	/	/	/	10,44		

^а B3LYP/def2-TZVP за комплексе (1-4), B3LYP/SDD за комплекс (5);

⁶ Молекул воде;

в Средња вредност;

^г Вредности израчунате на тешким атомима из преклопљених X-ray и DFT оптимизованих геометрија;

^дИзомер који је показао глобални минимум означен је са 0 kcal mol⁻¹.

Добијени резултати говоре о поклапању експерименталних са израчунатим подацима, тј. у случају комплекса (1) и (2) потврђена је *cis*-equatorial геометрија која је DFT прорачунима показала највећу енергетску стабилност у односу на друга два изомера где су разлике у енергијама у опсегу 3,2-8 kcal mol⁻¹ (**Табела 15**); комплекс (3) је изолован у облику праха, али његова X-ray структура није потврђена, а теоријски прорачуни показују да је *cis*-polar најстабилнији изомер, што је у сагласности са аналогним комплексом (4) где се

експериментални и теоријски подаци поклапају. Никаквих несугласица нема ни у случају комплекса (**5**), где је *trans*(O₅) означен као изомер најниже енергије и његова кристална структура раније је и потврђена, а у овој дисертацији и кристална структура *trans*(O₅O₆) изомера који представља поменути комплекс (**5**). По енергији је он други по реду, док енергетски најнестабилнији *trans*(O₆) изомер никада није синтетисан.

Поред тога, упоредили смо основне структурне параметре комплекса (дужине веза, *cis* и *trans* углови, углови Rh-O-C) са онима добијеним помоћу DFT прорачуна. Уочљиво је да се посматрани параметри добро слажу са рендгенском структуром. Нажалост, за комплекс (**3**) нисмо успели да изолујемо кристал прикладан за рендгенску анализу како бисмо потврдили предложену геометрију, тако да нисмо могли направити поређење између експерименталне и израчунате структуре (Слика **42**). Међутим, добијени параметри су у сагласности са параметрима добијеним за остале комплексе.



Слика 42. DFT оптимизована структура *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)(H₂O)] (3) комплекса.

Да би се интерпретирала стабилност различитих геометријских изомера хексадентатних [M(edta-тип)]⁻ комплекса (M = Co(III), Rh(III)), спроведена су израчунавања њихових енергија различитим DFT теоријским моделима (B3LYP/SDD, M06/SDD, MP2/SDD). Почетне геометрије су узете из рендгенских структура или су урађене конформационе анализе за различите изомере чије структуре нису одређене рендгенском анализом (**Табела 16**). У циљу избора највалидније DFT методе, направљено је поређење укупног одступања октаедарских углова $\Sigma \Delta(O_h)$ која су израчуната из 3D и DFT оптимизованих структура (Слика 43). На слици се види да је B3LYP метода и бројчано и визуелно најприближнија експерименталним резултатима добијеним из X-гау структура. Сходно томе, у даљој дискусији коришћени су резултати добијени овом методом.

Табела 16								
Релативне енергије (kcal mol ⁻¹) за $[M(edta-тип)]^{-}$ комплексе ^{а, б} .								
лиганд		eddadp		1,3-pddadp				
метод /изомер	$trans(O_5)$ $trans(O_5O_6)$ $trans(O_6)$ $trans(O_5)$ $trans(O_5O_6)$ $trans$							
			Rh(III)					
B3LYP	0	2.28	10.44	5.75	0	2.14		
M06	0	1.07	8.66	5.94	0	1.46		
MP2	0	0.05	7.45	4.74	0	0.70		
Co(III)								
B3LYP	0	1.12	7.56	7.94	2.81	0		
M06	0	0.45	6.54	10.44	3.67	0		
MP2	0	0.25	5.77	12.59	6.17	0		
^а Изомер који је показао глобални минимум означен је са 0 kcal mol ⁻¹ ;								

⁶ SDD базни сет је коришћен у свим израчунавањима.

Увидом у **Табелу 16**, примарно се може утврдити енергетска зависност од структуре геометријског изомера. Добијени резултати показују да је *trans*(O₅) изомер [M(eddadp)]⁻ комплекса најстабилнији без обзира на то који је модел израчунавања коришћен: *trans*(O₅) $< trans(O_5O_6) < trans(O_6)$. Мала енергетска разлика између прва два изомера [M(eddadp)]⁻ комплекса (**Табела 16**) указује на истовремено постојање *trans*(O₅) и *trans*(O₅O₆) изомера у реакционој смеши. Такође, исти прорачуни су извршени за структурно сличне [M(1,3pddadp)]⁻ комплексе, где је ситуација мало другачија. У случају израчунавања родијум(III) комплекса, сви модели су показали исте резултате: најстабилнији изомер је *trans*(O₅O₆) са малом разликом у односу на *trans*(O₆) (никад изолован). Сасвим неуобичајено, нађено је да *trans*(O₅) изомер (изолован и X-гау потврђен [196]) заузима енергетски најнеповољнији положај: $trans(O_5O_6) < trans(O_6) < trans(O_5)$. Када се узму у обзир резултати добијени за комплексе кобалта(III), добијен је логичнији редослед: $trans(O_6) < trans(O_5O_6) < trans(O_5)$. Овом резултату иде у прилог чињеница да су оба енергетски повољнија изомера $trans(O_6)$ и $trans(O_5O_6)$ изолована са X-гау потврђеном структуром [197]. Нађено је да је енергетски најнеповољнији изомер $trans(O_5)$, који се од најстабилнијег $trans(O_6)$ изомера разликује за око 8 kcal mol⁻¹ (**Табела 16**). Енергетска анализа (**Табела 16**) дала је очекиване резултате који се слажу са стабилношћу ових комплекса интерпретираних са аспекта анализе напона (**Табела 11**). Сви DFT модели коришћени за израчунавања су у међусобној сагласности и дају исти редослед енергетске стабилности изомера [M(eddadp)]⁻ и [M(1,3-pddadp)]⁻ комплекса.



Слика 43. Поређење $\Sigma \Delta(O_h)$ вредности у зависности од метода на основу којих су добијене 3D структуре.

Основни корелациони дијаграми између израчунатих енергија изомера и вредности параметара напона (**Табела 11**) (укупна девијација октаедарских углова, $\Sigma\Delta(O_h)$, средња вредност девијације М-О-С углова веза одговарајућег прстена, $\Delta(M-O-C)$ и сума апсолутних вредности девијација шест октаедарских углова око азота, $\Sigma\Delta(N)$) дати су на Сликама 44 и 45. Ова поређења су извршена и за [M(eddadp)]⁻ и [M(1,3-pddadp)]⁻ системе.

Пажљивим проучавањем компонената дијаграма, може се закључити да не постоји очигледна зависност М-О-С углова од енергија изомера. Изомери варирају у опсегу од неколико степени без обзира на енергетску вредност (Слике 44 и 45,

Марија С. Јеремић

десно). Слично понашање примећено је код енергетске зависности од $\Sigma\Delta(N)$ девијације [M(1,3-pddadp)]⁻ комплекса. У случају [M(eddadp)]⁻ комплекса, девијација *trans*(O₆) изомера корелира са порастом енергије и достиже вредности 10-20°. Чини се да је детерминациони параметар напона, заправо, октаедарска девијација $\Sigma\Delta(O_h)$, која, према дијаграму (лева страна), указује на добру корелацију са енергетским вредностима. Ова појава је израженија код [M(eddadp)]⁻ у односу на [M(1,3-pddadp)]⁻ комплексе где се уочава варирање (Слике 44 и 45). [M(eddadp)]⁻ комплекси показују растућу линеарну зависност $\Sigma\Delta(O_h)$ од енергије система. У случају [M(1,3-pddadp)]⁻ комплекса није било могуће утврдити потпуну корелацију ове две вредности. Вредности су скоро у корелацији за Rh(III) комплексе са 1,3-pddadp⁴⁻ лигандом, што се не може рећи за сличне комплексе Co(III), [Co(1,3-pddadp)]⁻ (Слика 45).



Слика 44. Корелациони дијаграм између DFT енергија (B3LYP/SDD) геометријских изомера [M(eddadp)]⁻ комплекса (M = Rh(III), Co(III)) и њихових основних структурних параметара напона.

Разматрањем [M(eddadp)]⁻ система, односно вредности сва три њихова параметра, енергетски (**Табела 16**), $\Sigma\Delta(O_h)$ и $\Sigma\Delta(N)$ (**Табела 11**), недвосмислено се може закључити да је формирање *trans*(O₆) изомера овог система практично немогуће. Поред тога, низак енергетски профил у случају *trans*(O₆)-[Rh(1,3-pddadp)]⁻ комплекса (E = 2,14 kcal mol⁻¹) (**Табела 16**) омогућава његово формирање, за разлику од високоенергетског *trans*(O₅)-[Co(1,3-pddadp)]⁻ комплекса (E = 7,94 kcal mol⁻¹) чије формирање није могуће у уобичајеним реакционим условима. Можда је највеће изненађење одсуство *trans*(O₆)-[Rh(1,3-pddadp)]⁻ комплекса у експерименталним условима (хроматографија на колони). Постоји могућност да се овај изомер може наћи у четвртој траци хроматографије (која се даље дели на две траке) како су навели Радановић и сарадници [196].



Слика 45. Корелациони дијаграм између DFT енергија (B3LYP/SDD) геометријских изомера [M(1,3-pddadp)]⁻ комплекса (M = Rh(III), Co(III)) и њихових основних структурних параметара напона.

Из свега наведеног, укључујући пажљиву анализу дијаграма (Слике 43-45), може се закључити да би гранична енергија, иза које је немогуће очекивати формирање геометријских изомера, могла имати вредност око 6 kcal mol⁻ за [Rh(eddadp)]⁻ и [Rh(1,3-pddadp)]⁻ системе.

3.6.2 NBO анализа

Природна орбитална анализа везе (NBO = Natural Bond Orbital Analysis) извршена је помоћу NBO 7.0 [191] софтверског пакета применом пертурбационе теорије другог реда. Овом методом се омогућава увид у донорско-акцепторски (D/A) механизам (флуктуација наелектрисања везивне орбитале у антивезивну орбиталу).

Ова анализа је рађена за сва три могућа геометријска изомера хексадентатног комплекса [Rh(eddadp)]⁻, као и за изомере структурно сличних комплекса Co(III) и 1,3пропандиаминских комплекса Rh(III) и Co(III). Генерално, сви изомери представљају снажно делокализоване структуре. NBO потрага за најбољим Луисовим (Lewis) структурама, добијена из Gaussian-ових излазних докумената (file.47), дала је само један резонантни облик. Међутим, да би се могло дискутовати о енергетским детаљима (орбиталне и донорско/акцепторске енергије) ових јако делокализованих структура, било је неопходно урадити анализу природне резонантне теорије (NRT = Natural Resonance Theory). Према томе, користећи \$NRT кључну реч, израчунат је сет различитих резонантних структура (за сваку CHOOSE структуру предложену NBO претрагом), а анализа резонантних структура рангираних по њиховој тежини урађена је коришћењем NBO 7.0 (слике се налазе у прилогу ове дисертације). 3D структуре најбоље рангираних резонанција за сваки изомер приказане су на Слици 46. Све приказане резонантне структуре показују да су оба јона метала три-координована осим Co(III) у *trans*(O₆)-[Co(eddadp)]⁻ комплексу (резонантна структура III), Слика 46) који је ди-координован преко два азота у октаедарском окружењу. Све остале резонантне структуре показују три-координацију преко N2O или NO2 хромофоре.

Генерално, природни ред везе комплекса, који садрже Co(III)-јон, креће се у опсегу 2,5-3. На пример, резултати за $trans(O_6)$ -[Co(1,3-pddadp)]⁻ комплекс показују да је у Co—N вези удео ковалентног карактера 27%, а удео јонског карактера износи 73%, док је Co—O веза укључује око 20% ковалентног и 80% јонског карактера. У другу руку, ред везе комплекса који садрже родијум(III) је око 3,1 и одговарајући комплекс $trans(O_6)$ -[Rh(1,3-pddadp)]⁻ показује 10% више ковалентног карактера у везама Rh—O и Rh—N, па је ковалентност више изражена у родијум(III) комплексима него у случају Co(III) комплекса.

Сви изомери показују око 98,1% окупираности Лусиових (L = Lewis) орбитала и 1,7% валентних не-Луисових (NL = non-Lewis) орбитала. Остатак од ~0,2% окупираности припада Ридберговим (Rydberg) и орбиталама језгра (Core). Постоје три М—N или М—O везе (M = Co(III) или Rh(III)) које су описане са три L везујуће орбитале (BD = bond, twocenter) праћене са три високоенергетске валентне NL антивезујуће (BD*) орбитале. Даље, NBO претрага је нашла две, три или четири 3-центричне 4-електронске A:—M—:B (A, B = $N_{\text{амин}}$ или $O_{\text{карбоксилат}}$) хипервезе (ω везе) заједно са O:-C-:O карбоксилат), М и B($N_{\text{амин}}$ или $O_{\text{карбоксилат}}$) атома, са снажним интеракционим валентним хибридима h_A , h_M , h_B описане су као јаки резонанциони хибриди две локализоване L структуре:

А—М :В ↔ А: М—В (А, В = Nамин или Окарбоксилат)

Ове тријадне резонанце рачунају на интеракције између LP $n_{B(A)}$ (LP = Lone Pair, усамљени пар) и BD $\sigma_{MA(B)}$ орбитала (BD = везивне).



Слика 46. Најбоље рангиране резонантне структуре добијене NRT анализом на различитим изомерима: I-VI [M(eddadp)]⁻; VII-XII [M(1,3-pddadp)]⁻ комплексних анјона (M = Rh(III), Co(III)).

Свака А:—М—:В тријада одговара снажној $n_B \rightarrow \sigma_{MA*}$ делокализацији у А—М :В Луисовој структури, или еквивалентно, снажној $n_A \rightarrow \sigma_{MB*}$ делокализацији у алтернативној А: М—В Луисовој структури, што доводи до скоро једнаких NRT тежина ових структура ($w_{A-M:B} \approx w_{A:M-B}$) [232]. Антивезивне BD* (NL орбитале валентне љуске) обично играју примарну улогу у одласцима (делокализација) из идеалне Луисове структуре. У основи NBO теорије су пертурбативне процене другог реда, донорско(D)-акцепторска (A) (везаантивеза) теорија, анализа Фокове матрице, интеракције. Испитивања обухватају све могуће интеракције између "попуњених" (донор, L) природних везивних орбитала и "непопуњених" (акцептор, NL) природних везивних орбитала и процену њихове енергетске важности помођу пертурбационе теорије другог реда. Већ је поменуто да стабилизација молекула долази од делокализације узроковане $n_A \rightarrow \sigma_{MB^*}$ или $n_B \rightarrow \sigma_{MA^*}$ преносом наелектрисања. NBO је заиста нашао три (или две у случају *trans*(O₆)-[Co(eddadp)]⁻, **Слика 46**, структура **III**) високо енергетске валентне NL BD* орбитале, које садрже метал, за сваку изомерну структуру. У случају *trans*(O₅O₆)-[Rh(eddadp)]⁻ комплекса, ове валентне NL BD* орбитале су 93. (0.33044) BD*Rh1-N2, 94. (0.32594) BD*Rh1-N3 и 95. (0.35539) BD*Rh1-O4 (**Слика 47**-Акцептор). Може се видети (бројеви у заградама) значајно велика NL окупираност (око 0,33 електрона) за сваку антивезивну орбиталу. Свака од ових орбитала очекује донацију електронске густине од симетричних Луисових невезујућих усамљених парова (LP)-*spⁿ* орбитале. Ове орбитале су приказане на **Слици 47** (Донор): *sp^{5,71}* (O6), *sp^{3,40}* (O8) and *sp^{7,01}* (O10). Према томе, према D/А механизму процењена су три трансфера електронске густине (**Слика 47**):

3. LP (O8) \rightarrow BD* (Rh1)^{*sd*1.73}- (O4)^{*sp*8.65} аксијална донација

Тако, поређењем енергија које потичу од трансфера електронске густине различитих изомера (**Табела 17**), утврђен је следећи ред:

$$trans(O_5)$$
: $trans(O_5O_6)$: $trans(O_6) = 379,11$: 362,40 : 355,09 kcal mol⁻¹

Такав однос енергије говори да је стабилизација хибридне структуре највећа у случају *trans*(O₅) изомера и износи ~ 12 kcal mol⁻¹. Ово би могло бити рационално објашњење зашто су *trans*(O₅) и *trans*(O₅O₆) изомери нађени у реакционој смеши, што је у потпуној сагласности са успостављеним редоследом њихових електронских енергија (**Табела 17**). Слично томе, донорско-акцепторске енергије изомера [Rh(eddadp)]⁻ комплекса прате редослед QM електронских стања (**Табела 16**). Донорско-акцепторске енергије изомера [Rh(1,3-pddadp)]⁻ комплекса, такође, сугеришу постојање *trans*(O₆) геометрије (**Табеле 16** и **17**). Једино одступање се може видети за изомере [Co(1,3-pddadp)]⁻ комплекса (**Табела 17**). Наиме, оба симетрична изомера $trans(O_5)$ и $trans(O_6)$ показују интензивније донорскоакцепторске интеракције него $trans(O_5O_6)$ изомер.



Слика 47. PNBO (PNBO = pre-orthogonal Natural Bond Orbital) донор/акцептор орбитале које се односе на резонантну хибридну стабилизацију *trans*(O₅O₆)-[Rh(eddadp)]⁻ комплексног анјона.

Будући да је у оквиру [Co(1,3-pddadp)]⁻ јединице установљен нешто већи карактер јонске везе, урађена је природна Кулонова енергетска анализа (NCE = Natural Coulomb Electrostatics) за све испитиване изомере Rh(III) и Co(III) комплекса (**Табела 17**). Може се видети да не постоји промена у укупној природној Кулоновој електростатичкој потенцијалној енергији (NCE_{total}) за све комплексе сем за [Co(1,3-pddadp)]⁻ комплекс (**Табела 17**). Овде се укупна NCE потенцијална енергија мења према следећем распореду:

$$trans(O_6)$$
: $trans(O_5O_6)$: $trans(O_5) = -2,99415 < -2,97840 < -2,96305$ a.u.

Ово значи да карактер јонског везивања унутар [Co(1,3-pddadp)]⁻ доминира над ковалентним (или полу-ковалентним - какве би, иначе, координационе везе требале бити). Ово је у складу са изомерима који су до сада били фаворизовани у реакцији између Co³⁺ и 1,3-pddadp⁴⁻ под уобичајеним реакционим условима.

Табела 17

NBO донорско-акцепторске енергије а 3-СНВ веза, стерно-измењиве интеракције спаривања Е _{І, Ј} ри	vx a
и природна Кулонова електростатичка анализа (NCE) комплекса [M(edta-тип)] ⁻ .	

		eddadp	Донор		1,3-pddadp	
Акцептор	$trans(O_5)$	$trans(O_5O_6)$	$trans(O_6)$	$trans(O_5)$	$trans(O_5O_6)$	$trans(O_6)$
Rh(III)	379.11	362.40	355.09	335.19	346.77	358.30
Co(III)	341.29	327.03	277.50	365.99	328.36	382.70
$Rh(III)_E_{I,J}^{pwx}$	1026.48	1057.80	1072.23	1151.44	1096.85	1103.96
$Co(III)_E_{I,J}^{pwx}$	1079.54	1149.04	1177.37	1171.51	1144.48	1151.16
NCE потенцијална						
енергија 6		[Rh(eddadp)] ⁻		[Rł	n(1,3-pddadp)]	-
_	$trans(O_5)$	$trans(O_5O_6)$	$trans(O_6)$	$trans(O_5)$	$trans(O_5O_6)$	$trans(O_6)$
Луис (Lewis)	-4.87451	-4.91143	-4.88222	-5.03605	-5.05614	-5.00669
не-Луис (Non-Lewis)	2.18730	2.22420	2.18872	2.28615	2.29314	2.24761
укупно	-2.68721	-2.68723	-2.69351	-2.74990	-2.76300	-2.75908
		[Co(eddadp)] ⁻		[Co	o(1,3-pddadp)]	-
	$trans(O_5)$	$trans(O_5O_6)$	$trans(O_6)$	$trans(O_5)$	$trans(O_5O_6)$	$trans(O_6)$
Луис (Lewis)	-5.61248	-5.32442	-5.52337	-5.61861	-5.63819	-5.37922
ne-Луис (Non-Lewis)	2.70975	2.41792	2.62078	2.65556	2.65979	2.38507
укупно	-2.90273	-2.90650	-2.90258	-2.96305	-2.97840	-2.99415
^a kcal mol ⁻¹ ;						
⁶ a.u.						

Природна стерна анализа изражава стерне измењиве репулзије као енергетске разлике услед орбиталне ортогонализације. Замена природних везујућих орбитала (NBO) са природним локализованим молекулским орбиталама (NLMO = Natural Localized Molecular Orbital) значајно побољшава опис стерних ефеката у снажно локализованим врстама, као што су комплекси прелазних метала. Такође, природна стерна анализа апроксимира важну стерно-измењиву интеракцију спаривања Е_L^{рwx} између две полулокализоване *I* и *J* NLMO орбитале [232]. Ове интеракције сумирају парно-адитивну процену Е_І^{рwx} унутар различитих геометријских изомера [M(eddadp)]⁻ и [M(1,3-pddadp)]⁻ комплексних јона (Табела 17). Ова процена је заснована на парцијалној ортогоналности, која укључује само два пара истовремено. Овај параметар је мање прецизан, али је у блиској вези са концептом стерног "контакта" узмеђу индивидуалних електронских парова. Е_Ш^{рwx} резултати, који су добијени за најбоље рангиране резонанце различитих изомера, у одличном су слагању са фаворизованим геометријама које су до сада проучавали различити аутори. То значи да изомери $trans(O_5)$ и $trans(O_5O_6)$, у случају [M(eddadp)] комплексног анјона, показују ниже стерно-измењиве репулзије у односу на *trans*(O_6) изомер. Главна разлика у стерним интеракцијама унутар $trans(O_5)$ и $trans(O_6)$ изомера огледа се у одбијању NLMO орбитала које укључују атоме кисеоника координоване у екваторијалној равни. Суме E_{LJ}^{pwx} енергија које укључују екваторијалне кисеоникове атоме стоје у односу $trans(O_5) : trans(O_6) = 117,38$ $: 186.14 \text{ kcal mol}^{-1}.$

Када је у питању $[M(1,3-pddadp)]^{-}$ јон, опет ниске стерне измењиве интеракције за усамљене парове (**disjoint** парови = усамљени парови који не деле суседни атом међусобно) NLMO орбитала *trans*(O₆) и *trans*(O₅O₆) изомера указују на већу стабилност и релативну лакоћу њихове синтезе.

3.6.3 Докинг молекулска симулација

Компјутерски симулирани докинг коришћен је да би се испитале интеракције између HSA (Human Serum Albumin - албумин човечијег серума) и *cis*-equatorial-[Rh(ed3a)(H₂O)] (1) и *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)(H₂O)] (3) комплекса. Због тога је урађен докинг у случају ова два комплекса за свих пет заједничких места везивања који су до сада утврђени [233]. Резултати најбољих конформера дати су у **Табели 18**, а на **Слици 48** приказани су најбољи конформери докованих комплекса на HSA макромолекулу.

Табела 18

HSA-[Rh(L)(H₂O)] (L = ed3a и 1,3-pd3a) слободне енергије везивања најбољих AutoDock конформера^а.

	Место	Место	Тироксин 1	Тироксин 2	Место	
Комплекс	везивања	везивања			везивања	
	лека 1	лека 2			лека 3	
<i>cis</i> -equatorial-[$Rh(ed3a)(H_2O)$] (1)	-4,73	-1,73	-4,01	-1,17	-4,02	
<i>cis</i> -polar-[Rh(1,3-pd3a)(H ₂ O)] (3)	-6,25	-4,97	-4,19	-3,99	-4,64	
^а Слободне енергије везивања ΔG (kcal mol ⁻¹).						



Слика 48. Најстабилнији конформери докованих *cis*-equatorial-[Rh(ed3a)(H₂O)] (**1**) (**a**) и *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)(H₂O)] (**3**) (**б**) комплекса на HSA макромолекулу.

Комплекс *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)(H₂O)] (**3**) који је докован унутар места везивања лека 1 има најбољу вредност слободне енергије везивања од -6,25 kcal mol⁻¹ (Ki = 26,19 μ mol L⁻¹, T = 298 K) дајући нам разумну претпоставку да се овај комплекс може лако транспортовати до циљних ћелија кроз крвоток. Главне интеракције Rh(1,3-pd3a)-HSA су процењене и дате на Слици **49**.



Слика 49. 2D дијаграм главних интеракција *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)(H₂O)] комплекса (3) и HSA макромолекула.

Електростатичко привлачење између комплекса родијума(III) и HSA подразумева водоничне везе на OH₂—GLU292, OH₂—ALA291, CO (карбонил, прстен R)—GLN196 и COO(R прстен)—LYS199. Остатак интеракција укључује Ван дер Валсове (Van der Walls) интеракције између комплекса метала и остатака макромолекула HSA (Слика 49). Према томе, четири водоничне везе чине родијум(III) комплекс чврсто везаним за HSA и сасвим безбедним за његов транспорт до циљних ћелија.

4. ЗАКЉУЧАК

У оквиру ове дисертације синтетисано је пет нових комплекса родијума(III) са лигандима полиаминополикарбоксилатног типа који у свом саставу имају петочлане и/или шесточлане карбоксилатне прстенове: $[Rh(ed3a)(H_2O)]$ (1), $[Rh(ed3a)Cl]^-$ (2), [Rh(1,3pd3a)(H₂O)] (**3**), [Rh(1,3-pd3a)Cl]⁻ (**4**), као и [Rh(eddadp)]⁻ (**5**). За комплексирање су коришћена два пентадентатна лиганда у облику киселина (H₃ed3a, H₃1,3-pd3a) и један хексадентатни - H4eddadp. Добијени пентадентатни комплекси представљају прве синтетисане родијум(III) комплексе ове врсте, будући да су досадашња истраживања била усмерена на хексадентате. Сва добијена једињења окарактерисана су применом стандардних метода (елементална микроанализа, тачка топљења), као и савременим спектроскопским методама анализе (¹Н и ¹³С NMR, IR и UV-Vis). Резултати елементалних микроанализа су у сагласности са претпостављеним саставом комплекса. Број, положај и изглед сигнала у 1 Н и 13 С NMR спектрима потврђују структуру добијених родијум(III) комплекса. Анализом IR спектара утврђено је да се лиганди координују пентадентатно (у случају ed3a и 1,3-pd3a) и хексадентатно у случају eddadp лиганда. UV-Vis спектри синтетисаних комплекса потврђују њихову октаедарску геометрију. Структуре синтетисаних комплекса су одређене применом рендгенске структурне анализе, осим у случају *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)H₂O] \cdot 2H₂O (**3**) комплекса где није изолован кристал погодан за дифрактометријску анализу. Његова геометрија је претпостављена на основу спектралне анализе, као и поређењем са сличним комплексима који су структурно окарактерисани. У случају комплекса (1) и (2) потврђена је *cis*-equatorial геометрија, а комплекс (4) својим распоредом прстенова у простору показује *cis*-polar геометрију, што је у сагласности са сличним комплексима који у свом саставу имају неки други метални јон (Cu(II), Ni(II), Cr(III), Co(III)). Комплекс (5), као једини хексадентатни комплекс, има присутну N₂O₄ хромофору са два петочлана ацетатна, два шесточлана 3-пропионска и једним леђним петочланим етилендиаминским прстеном, који својим распоредом у простору дају $trans(O_5O_6)$ изомер.

Детаљна анализа напона синтетисаних и сличних поредбених комплекса показала је да највећу октаедарску дисторзију $\Sigma\Delta(O_h)$ показује комплекс (**3**) чија структура није потврђена, а највећу тетраедарску дисторзију око аминског азота ($\Sigma\Delta(N)$ вредност) показује комплекс (4) са вредностима 11° (азот без протона) и 46° (азот који садржи протон). Поред тога, девијација његовог 1,3-пропандиаминског прстена је велика и износи +44°, па се може закључити да је нестабилан и да лако подлеже хидролизи у супституционим реакцијама. Када су у питаљу хексадентатни комплекс, комплекс (5) показује умерену дисторзију због погодног распореда прстенова у екваторијалној равни 5-5-6. Анализа напона недвосмислено показује везу између стабилности комплекса и природе окружења у екваторијалној равни, односно распореда прстенова.

Константе протоновања лиганада H₃ed3a и H₃1,3-pd3a, константе стабилности комплекса и стехиометрија комплекса са овим лигандима проучаване су у воденом раствору са акцентом на најпоузданије врсте које су се појавиле на физиолошком pH ([Rh(Hed3a)]⁺, [Rh(ed3a)], [Rh(H1,3-pd3a)]⁺, [Rh(1,3-pd3a)]). Стехиометрија ових врста, као и њихова стабилност, од великог је значаја за разумевање њихове антипролиферативне улоге у малигним ћелијама.

У циљу одрећивања терапеутског потенцијала ових комплекса, испитивана је њихова антипролиферативна активност према нормалној ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5), као и према четири туморске ћелијске линије: хумани карцином плућа (А-549), хумани аденокарцином дојке (MCF-7), хумани аденокарцином дебелог црева (HT-29), хумани аденокарцином грлића материце (HeLa). Такође, испитивани су и H₃ed3a и H₃1,3pd3a лиганди. Тестирана једињења су показала различиту цитотоксичност према третираним ћелијама. Највећу цитотоксичност је показао комплекс [Rh(ed3a)(H₂O)]·H₂O, док је најнеактивнији [Rh(1,3-pd3a)(H₂O)]·2H₂O комплекс. Битно је истаћи да ниједно тестирано једињење није показало цитотоксичност према здравим ћелијама MRC-5, чиме је показана њихова селективност у односу на туморске и здраве ћелије, за разлику од референтних једињења (цисплатина, доксорубицин), па их можемо сматрати потенцијално добрим антитуморским лековима. Од свих испитиваних ћелијских линија, HeLa је показала највећу сензитивност, па је анализа ћелијског циклуса методом проточне цитометрије и Вестерн блот анализе рађена управо на овој ћелији. Анализа резултата показала је да је апоптоза примарни начин смрти HeLa ћелија код свих тестираних супстанци, док је занемарљив проценат некрозе, осим у случају лиганда H₃ed3a који показује значајно учешће некрозе у ћелијској смрти.

Компјутерске методе су коришћене за интерпретацију структурних параметара експериментално добијених комплекса Rh(III), као и њихових могућих изомера. Добијени резултати говоре о поклапању експерименталних са израчунатим подацима, тј. у случају комплекса (1) и (2) потврђена је cis-equatorial геометрија која је DFT прорачунима показала највећу енергетску стабилност у односу на друга два. Комплекс (3) је изолован у облику праха, али његова X-ray структура није потврђена, а теоријски прорачуни показују да је *cis*polar најстабилнији изомер, што је у сагласности са аналогним комплексом (4) где се експериментални и теоријски подаци поклапају. Поклапање је евидентно и код изомера комплекса [Rh(eddadp)], где је $trans(O_5)$ означен као изомер најниже енергије и његова кристална структура раније је и потврђена, а у овој дисертацији и кристална структура $trans(O_5O_6)$ изомера који представља поменути комплекс (5). По енергији је он други по реду, док енергетски најнестабилнији $trans(O_6)$ изомер никада није синтетисан. Такође, извршена је детаљна анализа енергетске зависности геометријских изомера и уобичајених параметара деформације ($\Sigma\Delta(O_h)$, $\Delta(M-O-C)$, $\Sigma\Delta(N)$). Ова испитивања су извршена за системе $[M(eddadp)]^{-}$ и $[M(1,3-pddadp)]^{-}$ (M = Rh(III), Co(III)). Уочено је да је детерминациони параметар напона, заправо, октаедарска девијација $\Sigma\Delta(O_h)$, која, према дијаграму указује на добру корелацију са енергетским вредностима. Ова појава је израженија код $[M(eddadp)]^{-}$ у односу $[M(1,3-pddadp)]^{-}$ комплексе. У случају $[M(eddadp)]^{-}$ система, недвосмислено је потврђена немогућност формирања *trans*(O₆) изомера, док у случају [M(1,3-pddadp)]⁻ система низак енергетски профил омогућава формирање $trans(O_6)$ изомера у случају комплекса родијума(III). Висока енергија у случају *trans*(O₅)-[Co(1,3-pddadp)]⁻ искључује могућност формирања овог комплекса. Из свега наведеног се може закључити да би гранична енергија, иза које је немогуће очекивати формирање геометријских изомера, могла имати вредност око 6 kcal mol⁻ за [Rh(eddadp)]⁻ и [Rh(1,3-pddadp)]⁻ системе.

Природна орбитална анализа везе (NBO = Natural Bond Orbital Analysis) извршена је у за све могуће изомере комплекса [M(eddadp)]⁻ и [M(1,3-pddadp)]⁻ (M = Rh(III), Co(III)) циљу испитивања донорско-акцепторског (D/A) механизма. Међутим, да би се могло да дискутовати о енергетским детаљима (орбиталне и донорско/акцепторске енергије) ових јако делокализованих структура, урађена је анализа природне резонантне теорије (NRT). Све добијене резонантне структуре показују да је јон метала три-координован преко N2O или NO2 хромофоре, осим Co(III) у $trans(O_6)$ -[Co(eddadp)]⁻ комплексу који је дикоординован. Природни ред везе комплекса, који садрже Co(III)-јон, креће се у опсегу 2,5-3. Резултати за $trans(O_6)$ -[Co(1,3-pddadp)]⁻ комплекс показују да је у Co—N вези удео ковалентног карактера 27%, а удео јонског карактера износи 73%, док је Со-О веза укључује око 20% ковалентног и 80% јонског карактера. Насупрот томе, ред везе комплекса који садрже родијум(III) је око 3,1 и одговарајући комплекс *trans*(O₆)-[Rh(1,3-pddadp)]⁻ показује 10% више ковалентног карактера у везама Rh-O и Rh-N, па је ковалентност више изражена у родијум(III) комплексима него у случају Co(III) комплекса. Поређењем енергија које потичу од трансфера електронске густине различитих изомера, у случају [Rh(eddadp)]⁻ комплекса, утврћено је да је стабилизација хибридне структуре највећа у случају trans(O₅) изомера, што је у сагласности са QM енергијама. Такоће, донорскоакцепторске енергије изомера $[Rh(1,3-pddadp)]^{-}$ комплекса сугеришу постојање *trans*(O₆) геометрије. Једино одступање се може видети за изомере [Co(1,3-pddadp)]⁻ комплекса где оба симетрична изомера $trans(O_5)$ и $trans(O_6)$ показују интензивније донор-акцепторске интеракције него $trans(O_5O_6)$ изомер. Природна стерна анализа говори да изомери $trans(O_5)$ и $trans(O_5O_6)$, у случају [M(eddadp)] комплексног анјона, показују ниже стерне измењиве репулзије у односу на *trans*(O₆) изомер, а када је у питању $[M(1,3-pddadp)]^{-}$ јон, опет ниске стерне измењиве интеракције за усамљене (disjoint) парове NLMO орбитала $trans(O_6)$ и $trans(O_5O_6)$ изомера указују на већу стабилност и релативну лакоћу њихове синтезе.

Компјутерски симулирани докинг коришћен је да би се откриле интеракције између HSA и *cis*-equatorial-[Rh(ed3a)(H₂O)] и *cis*-polar-[Rh(1,3-pd3a)(H₂O)] комплекса, а резултати су показали да четири водоничне везе чине родијумов комплекс чврсто везаним за HSA и сасвим безбедним за његов транспорт до циљних ћелија.

Добијени резултати у оквиру ове докторске дисертације могу допринети синтези нових комплекса, који ће показати бољу активност и мању токсичност у односу на клинички коришћене агенсе. Посебно треба истаћи да су у овој дисертацији први пут испитивани родијум(III) комплекси са лигандима edta типа са антитуморског аспекта, па дисертација представља значајан допринос овој области.

5. ЛИТЕРАТУРА

- [1] G. Chauhan, K.K. Pant, K. D. P. Nigam, Ind. Eng. Chem. Res. 52 (2013) 16724-16736.
- [2] F. G. Kari, W. Giger, Environ. Sci. Technol. 29 (1995) 2814-2827.
- [3] H. Xue, L. Sigg, F. G. Kari, Environ. Sci. Technol. 29 (1995) 59-68.
- [4] C. Drouza, M. Vlasiou, A. D. Keramidas, *Dalton Trans.* 42 (2013) 11831-11840.
- [5] M. Vlasiou, C. Drouza, T. A. Kabanos, A. D. Keramidas, J. Inorg. Biochem. 147 (2015) 39-43.
- [6] E. Repo, J. K. Warchoł, A. Bhatnagar, M. Sillanpää, J. Colloid Interf. Sci. 358 (2011) 261-267.
- [7] A. Naeem, P. Westerhoff, S. Mustafa, *Water Res.* **41** (2007) 1596-1602.
- [8] J. D. Ostergen, G. E. Brown, G. A. Parks, T. N. Tingle, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 1627-1636.
- [9] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature* 258 (1975) 598-599.
- [10] J. Carrasco-Castilla, A. J. Hernández-Álvarez, C. Jiménez-Martínez, C. Jacinto-Hernández, M. Alaiz, J. Girón-Calle, J. Vioque, G. Dávila-Ortiz, *Food Chem.* 135 (2012) 1789-1795.
- [11] C. C. Mclauchlan, B. J. Peters, G. R. Willsky, D. C. Crans, Coord. Chem. Rev. 163 (2015) 301-302.
- [12] T. Jakusch, J. Costa Pessoa, T. Kiss, Coord. Chem. Rev. 255 (2011) 2218-2226.
- [13] V. Prachayasittikul, S. Prachayasittikul, S. Ruchirawat, V. Prachayasittikul, *Drug Des. Dev. Ther.* 7 (2013) 1157-1178.
- [14] H. Faneca, V. A. Figueiredo, I. Tomaz, G. Gonçalves, F. Avecilla, M. C. Pedroso de Lima, F. G. C. Geraldes Carlos, J. C. Pessoa, M. M. C. A. Castro, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 601-608.
- [15] D. C. Crans, J. Org. Chem. 80 (2015) 11899-11915.
- [16] K. H. Thompson, J. Lichter, C. LeBel, M. C. Scaife, J. H. McNeill, C. Orvig, J. Inorg. Biochem. 103 (2009) 554-558.

- [17] J. C. Pessoa, S. Etcheverry, D. Gambino, Coord. Chem. Rev. 24 (2015) 301-302.
- [18] A. Zorzano, M. Palacín, L. Marti, S. García-Vicente, J. Inorg. Biochem. 103 (2009) 559-566.
- [19] D. Rehder, G. Santoni, G. M. Licini, C. Schulzke, B. Meier, *Coord. Chem. Rev.* 237 (2003) 53-63.
- [20] C. C. McLauchlan, J. D. Hooker, M. A. Jones, Z. Dymon, E. A. Backhus, B. A. Greiner, N. A. Dorner, M. A. Youkhana, L. M. Manus, J. Inorg. Biochem. 104 (2010) 274-281.
- [21] M. Paolieri, "Ferdinand Münz: EDTA and 40 years of inventions", *Bulletin for the History of Chemistry* **42** (2017) 133-140
- [22] E. Repo, T. A. Kurniawan, J. K. Warchol, M. E. Sillanpää, J. Hazard. Mater. 171 (2009) 1071-1080.
- [23] J. C. Friedly, D. B. Kent, J. A. Davis, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 355-363.
- [24] W. Zhang, D. C. W. Tsang, I. M. C. Lo, Chemosphere 66 (2007) 2025-2034.
- [25] F. Balaska, M. Bencheikh-Lehocine, M. Chikhi, A.-H. Meniai, A. Bouledjouidja, *Energy Procedia* 19 (2012) 249-258.
- [26] R. A. Yokel, Coord. Chem. Rev. 228 (2002) 97-113.
- [27] M. Jaworska, G. Stopa, Z. Stasicka, Nitric Oxide 23 (2010) 227-233.
- [28] C. Noradoun, M. D. Engelmann, M. McLaughlin, R. Hutcheson, K. Breen, A. Paszczynski, I. F. Cheng, *Ind. Eng. Chem. Res.* 42 (2003) 5024-5030.
- [29] C. Noradoun, C. S. Mekmaysy, R. M. Hutcheson, I. F. Cheng, Green Chem. 7 (2005) 426-430.
- [30] C. E. Noradoun, I. F. Cheng, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 7158-7163.
- [31] V. Zang, R. van Eldik, Inorg. Chem. 29 (1990) 1705-1711.
- [32] S. Piche, F. Larachi, Chem. Eng. Sci. 61 (2006) 3452-3463.
- [33] D. F. Laine, S. D. McAllister, I. Francis Cheng, J. Electroanal. Chem. 608 (2007) 111-116.
- [34] R. De Busk, et al. "Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)". University of Maryland Medical Center (2002).
- [35] J. Swaran, S. Flora, V. Pachauri, Int. J. Environ. Res. Public Health 7 (2010) 2745-2788.

- [36] I. Soveri, U. B. Berg, J. Björk, C.-G. Elinder, A. Grubb, I. Mejare, G. Sterner, S.-E. Bäck, *Am. J. Kidney Dis.* **64** (2014) 411-424.
- [37] G. Banfi, G. L. Salvagno, G. Lippi, Clin. Chem. Lab. Med. 45 (2007) 565-576.
- [38] G. A. Lamas, R. Boineau, C. Goertz, D. B. Mark, Y. Rosenberg, M. Stylianou, T. Rozema, R. L. Nahin, L. T. Chappell, L. Lindblad, E. F. Lewis, J. Drisko, K. L. Lee, *Amer. Heart J.* 168 (2014) 37-44.
- [39] Z. Cui, W. Bu, W. Fan, J. Zhang, D. Ni, Y. Liu, J. Wang, J. Liu, Z. Yao, J. Shi, *Biomaterials* 104 (2016) 158-167.
- [40] Z. Cui, P. R. Lockman, C. S. Atwood, C. Hsu, A. Gupte, D. D. Allen, R. J. Mumper, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **59** (2005) 263-272.
- [41] P. Angelberger, M. Wagner-Löffler, E. Hruby, R. Dudczak, J. Radioanal. Nucl. Chem. 89 (1985) 409-421.
- [42] G. H. Y. Lin, J. D. Leggett, R. M. Wing, Acta Crystallogr. Sect. B 29 (1973) 1023-1030.
- [43] U. Rychlewska, M. I. Djuran, B. Warżajtis, D. D. Radanović, M. M. Vasojević, D. J. Radanović, *Polyhedron* 22 (2003) 3265-3276.
- [44] W. Byers, B. E. Douglas, Inorg. Chem. 11 (1972) 1470-1473.
- [45] F. T. Helm, W. H. Watson, D. J. Radanović, B. E. Douglas, *Inorg. Chem.* 16 (1977) 2351-2354.
- [46] R. Herak, Lj. Manojlović-Muir, M. I. Djuran, D. J. Radanović, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1985) 861-864.
- [47] T. Yamamoto, K. Mikata, K. Miyoshi, H. Yoneda, Inorg. Chim. Acta 150 (1988) 237-244.
- [48] T. Mizuta, T. Yamamoto, N. Shibata, K. Miyoshi, Inorg. Chim. Acta 169 (1990) 257-263.
- [49] A. S. Antsyshkina, G. G. Sadikov, L. M. Shkol'nikova, A. L. Poznyak, V. S. Sergienko, Zh. Neorg. Khim. 41 (1996) 1463-1469.
- [50] D. J. Radanović, S. lanelli, G. Pelosi, Z. D. Matović, S. Tasić-Stojanović, B. E. Douglas, *Inorg. Chim. Acta* 278 (1998) 66-75.
- [51] K. Kanamori, J. Kumada, M. Yamamoto, T. Okayasu, K. Okamoto, Bull. Chem. Soc. Jpn. 68 (1995) 3445-3451.
- [52] R. Meier, S. Mitzenheim, H. Pritzkow, R. van Eldik, Inorg. Chem. 50 (2011) 1005-1013.
- [53] K. D. Gailey, D. J. Radanović, M. Djuran, B. E. Douglas, J. Coord. Chem. 8 (1978) 161-167.

- [54] D. J. Radanović, B. E. Douglas, Inorg. Chem. 14 (1975) 6-10.
- [55] K. Miyoshi, J. Wang, T. Mizuta, Chem. Lett. (1995) 721-722.
- [56] Z. D. Matović, A. Meetsma, V. D. Miletić, P. J. van Koningsbruggen, *Inorg. Chim. Acta* 360 (2007) 2420-2431.
- [57] G. L. Blackmer, R. E. Hamm, J. I. Legg, J. Am. Chem. Soc. 91 (1969) 6632-6637.
- [58] J. D. Bell, G. L. Blackmer, Inorg. Chem. 12 (1973) 836-840.
- [59] a) H. Ogino, T. Watanabe, N. Tanaka, *Chem. Lett.* (1974) 91-94;
 6) H. Ogino, T. Watanabe, N. Tanaka, *Inorg. Chem.* 14 (1975) 2093-2097;
 B) H. Ogino, M. Shimura, A. Masuko, N. Tanaka, *Chem. Lett.* (1979) 71-72.
- [60] H. Ogino, M. Shimura, N. Tanaka, Inorg. Chem. 18 (1979) 2497-2501.
- [61] C. Maricondi, S. Utsuno, D. J. Radanović, S. R. Trifunović, J. E. Abola, B. Douglas, *Inorg. Chim. Acta* 142 (1988) 135-149.
- [62] S. Grubišić, M. Gruden-Pavlović, S. R. Niketić, S. Kaizaki, N. Sakagami-Yoshida, *Inorg. Chem. Commun.* 6 (2003) 1180-1184.
- [63] S. Belošević, M. Ćendić, A. Meetsma, Z. D. Matović, Polyhedron 50 (2013) 473-480.
- [64] D. J. Radanović, S. R. Trifunović, D. E. Bause, C. Maricondi, J. E. Abóla, B. E. Douglas, *Inorg. Chem.* 26 (1987) 3994-3999.
- [65] C. W. Maricondi, C. Maricondi, Inor. Chem. 13 (1974) 1110-1114.
- [66] a) S. J. Lippard, H. Schugar, C. Walling, *Inorg. Chem.* 6 (1967) 1825-1831;
 6) L. E. Gerdom, N. A. Baenziger, H. M. Goff, *Inorg. Chem.* 20 (1981) 1606-1609;
 в) H. Okazaki, K. Tomioka, H. Yoneda, *Inorg. Chim. Acta* 74 (1983) 169-178;
 г) T. Mizuta, T. Yamamoto, K. Miyoshi, Y. Kushi, *Inorg. Chim. Acta* 175 (1990) 121-126.
- [67] M.-K. Doh, H. Ogino, J. Fujita, K. Saito, Bull. Chem. Soc. Jap. 49 (1976) 469-471.
- [68] C. A. Chang, B. E. Douglas, J. Coord Chem. 10 (1980) 131-134.
- [69] S. Belošević, M. Cendić, M. Djukić, M. Vasojević, A. Meetsma, Z. D. Matovic, *Inorg. Chim. Acta* 399 (2013) 146-153.
- [70] С. Е. Housecroft, A. G. Sharpe, Inorg. Chem. (2008) (З. изд.). Prentice Hall.
- [71] A. F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg, (1985). Lehrbuch der Anorganischen Chemie (91-100 изд), Walter de Gruyter. pp. 1056–1057.
- [72] L. Garlaschelli, R. della Pergola, S. Martinengo, Inorg. Synth. 28 (1989) 211-215.
- [73] B. F. G. Johnson, Dalton Trans. 44 (2015) 16602-16610.
- [74] L. M. Vallarino, Inorg. Chem. 4 (1965) 161-165.
- [75] J. A. Osbom, F. H. Jordine, J. F. Young, G. Wilkinson, J. Chem. Soc. A 0 (1966) 1711-1732.
- [76] a) D. G. DeWit, *Coord. Chem. Rev.* 147 (1996) 209-246;
 6) C. E. Housecroft, *Coord. Chem. Rev.* 15 (1996) 107-139;
 B) B. Pannia Espósito, R. Najjar, *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 137-149.
- [77] F. P. Dwyer, F. L. Garvan, J. Amer. Chem. Soc. 82 (1960) 4823-4826.
- [78] a) K. Sugiura, K. Yamasaki, *Naturwissenschaften* 48 (1961) 552-553;
 6) K. Sugiura, K. Yamasaki, *Nippon Kagaku Zasshi* 88 (1967) 948-952.
- [79] G. -S. Kim, D. A. Judd, C. L. Hill, R. F. Schinazi, J. Med. Chem. 37 (1994) 816-820.
- [80] S. Lutsenko, Curr. Opin. In Chem. Biol. 14 (2010) 211-217.
- [81] D. W. Hutchinson, Antivir. Res. 5 (1985) 193-205.
- [82] The research sub-committe of the Empire Rheumatism Council, *Ann. Rheum. Dis.* **19** (1960) 95-117.
- [83] R. C. Gamble, P. G. Schmidt, Contrast agents for NMR imaging, U. S. Patent 4728575 (1988).
- [84] C. -Y. Ke, C. J. Mathias, M. A. Green, Adv. Drug Deliv. Rev. 56 (2004) 1143-1160.
- [85] a) B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature* 205 (1965) 698-699;
 6) B. Rosenberg, L. Van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature* 222 (1969) 385-386.
- [86] R. J. Kociba, S. D. Sleight, B. Rosenberg, Cancer Chemoter. Rep. 54 (1970) 325-328.
- [87] a) P. J. Loehrer, L. H. Einhorn, *Ann. Intern. Med.* 100 (1984) 704-713;
 6) M. Morris, P. J. Eifel, J. Lu, P. W. Grigsby, C. Levenback, R. E. Stevens, M. Rotman, D. M. Gershenson, D. G. Mutch, *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 1137-1143;

B) P. G. Rose, B. N. Bundy, E. B. Watkins, J. T. Thigpen, G. Deppe, M. A. Maiman, D. L. Clarke-Pearson, S. Insalaco, *N. Engl. J. Med.* **340** (1999) 1144-1153;

r) H. M. Keys, B. N. Bundy, F. B. Stehman, L. I. Muderspach, W. E. Chafe, C. L. Suggs, J. L. Walker, D. Gersell, *N. Engl. J. Med.* **340** (1999) 1154-1161.

- [88] R. Oun, Y. E. Moussa, N. J. Wheate, Dalton Transactions. 47 (2018) 6645-6653.
- [89] E. Wong, C. M. Giandomenico, Chem. Rev. 99 (1999) 2451-2466.
- [90] L. Kelland, Nat. Rev. Cancer 7 (2007) 573-584.
- [91] S. Mabuchi, T. Kimura, Chemother. Res. Pract. 2011 (2011) 1-10.
- [92] C. -H. Choi, Y. -J. Cha, C. -S. An, K. -J. Kim, K. -C. Kim, S. -P. Moon, Z. H. Lee, Y. -D. Min, *Cancer Cell. Int.* 4 (2004) 6-17.
- [93] M. J. McKegae, Exp. Opin. Invest. Drugs, 10 (2001) 119-128.
- [94] J. M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen, J. H. M. Schellens, *Clin. Cancer Res.* **10** (2004) 3717-3727.
- [95] M. A. Jakupec, V. B. Arion, S. Kapitza, E. Reisner, A. Eichinger, M. Pongratz, B. Marian, N. Graf v. Keyserlingk, B. K. Keppler, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 43 (2005) 595-596.
- [96] P. J. Barndard, S. J. Berners-Price, Coord. Chem. Rev. 251 (2007) 1889-1902.
- [97] C. F. Shaw, Chem. Rev. 99 (1999) 2589-2600.
- [98] C.-M. Che, R. W.-Y. Sun, W.-Y. Yu, C.-B. Ko, N. Zhu, H. Sun, *Chem. Commun.* (2003) 1718-1719.
- [99] C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, A. Guerri, M. A. Cinellu, G. Minghetti, M. Corsini, C. Rosani, P. Zanello, M. Arca, *Inorg. Chem.* 47 (2008) 2368-2379.
- [100] A. R. Kapdi, I. J. S. Fairlamb, Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 4751-4777.
- [101] E. Gao, C. Liu, M. Zhu, H. Lin, Q. Wu, L. Liu, Anti-Cancer Agents Med. Chem. 9 (2009) 356-368.
- [102] A. Garoufis, S. K. Hadjikakou, H. Hadjiliadis, Coord. Chem. Rev. 253 (2009) 1384-1397.
- [103] Z. D. Matović, E. Mrkalić, G. Bogdanović, V. Kojić, A. Meetsma, R. Jelić, J. Inorg, Biochem. 121 (2013) 134-144.
- [104] E. M. Mrkalić, R. M. Jelić, O. R. Klisurić, Z. D. Matović, *Dalton Trans.* 43 (2014) 15126-15137.

- [105] N. P. Farell, "Uses of Inorganic Chemistry in Medicine", The Royal Society of Chemistry, London, Uk (1999).
- [106] a) Q. Zhou, T. W. Hambley, B. J. Kennedy, P. A. Lay, P. Turner, B. Warwick, J. R. Biffin, H. L. Regtop, *Inorg. Chem.* **39** (2000) 3742-3748;

6) E. Weder, T. W. Hambley, B. J. Kennedy, P. A. Lay, G. J. Foran, A. M. Rich, *Inorg. Chem.* **40** (2001) 1295-1302.

[107] a) R. B. Weiss, M. C. Christian, Drugs 46 (1993) 360-377;

б) G. Giaccone, Drugs 59 (2000) 9-17.

[108] Y. P. Ho, S. C. F. Au-Yeung, K. K. W. To, Med. Res. Rev. 23 (2003) 633-655.

[109] L. Ronconi, P. J. Sadler, Coord. Chem. Rev. 251 (2007) 1633-1648.

- [110] K. D. Mjos, C. Orvig, Chem. Rev. 114 (2014) 4540-4563.
- [111] F. A. Cotton, R. A. Walton, Multiple Bonds Between Metal Atoms, Clarendon Press, Oxford, (1993).
- [112] R. A. Howard, E. Sherwood, A. Erck, A. P. Kimball, J. L. Bear, J. Med. Chem. 20 (1977) 943-946.
- [113] N. Katsaros, A. Anagnostopoulou, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 42 (2002) 297-308.
- [114] A. Erck, L. Rainen, J. Whileyman, I. M. Chang, A. P. Kimball, J. Bear, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145 (1974) 1278-1283.
- [115] A. Erck, E. Sherwood, J. L. Bear, A. P. Kimball, *Cancer Res.* 36 (1976) 2404–2409.
- [116] R. A. Howard, A. P. Kimball, J. L. Bear, Cancer Res. 39 (1979) 2568–2573.
- [117] P. N. Rao, M. L. Smith, S. Pathak, R. A. Howard, J. L. Bear, J. Natl. Cancer Inst. 64 (1980) 905-912.
- [118] J. L. Bear, H. B. Gray, Jr., L. Rainen, I. M. Chang, R. Howard, G. Serio, A. P. Kimball, *Cancer Chemother. Rep.* **59** (1975) 611-620.
- [119] R. A. Howard, T. G. Spring, J. L. Bear, Cancer Res. 36 (1976) 4402-4405.
- [120] A. R. de Souza, R. Najjar, S. Glikmanas, S. B. Zyngier, J. Inorg. Biochem. 64 (1996) 1-5.
- [121] M. S. Nothenberg, G. Kazuko Funayama, Renato Najjar, J. Inorg. Biochem. 42 (1991) 217-229.

- [122] F. P. Pruchnik, G. Kluczewska, A. Wilczok, U. Mazurek, T. Wilczok, J. Inorg. Biochem. 65 (1997) 25-34.
- [123] E. de Souza Gil, M. I. de Almeida Gonçalves, E. I. Ferreira, S. B. Zyngier, R. Najjar, Met. Based Drugs 6 (1999) 19-24.
- [124] a) B. P. Espósito, S. B. Zyngier, R. Najjar, R. P. Paes, S. M. Ykko Ueda, J. C. A. Barros, *Met. Based Drugs* 6 (1999) 17-18;

6) B. P. Espósito, S. B. Zyngier, A. R. De Souza, R. Najjar, *Met. Based Drugs* **4** (1997) 333-338.

- [125] J. R. Rubin, T. P. Haromy, M. Sundaralingam, Acta Crystallogr. C 47 (1991) 1712-1714.
- [126] T. Giraldi, G. Zassinovich, G. Mestroni, Chem. Biol. Interact. 9 (1974) 389-394.
- [127] a) T. Giraldi, G. Sava, G. Bertoli, G. Mestroni, G. Zassinovich, *Cancer Res.* 37 (1977) 2662-2666;

6) T. Giraldi, G. Sava, G. Mestroni, G. Zassinovich, D. Stolfa, *Chem. Biol. Interact.* 22 (1978) 231-238.

- [128] G. Sava, S. Zorzet, S. Pacor, G. Mestroni, G. Zassinovich, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 24 (1989) 302-306.
- [129] G. Craciunescu, V. Scarcia, A. Furlani, E. P. Inglesias, C. Ghirvu, A. Papaioannou, Anticancer Res. 9 (1989) 781-785.
- [130] D. G. Craciunescu, V. Scarcia, A. Furlani, A. Papaioannou, E. Parrondo Iglesias, M. P. Alonso, *In Vivo* 5 (1991) 329-332.
- [131] A. Taylor, N. Carmichael, *Cancer Studies* 2 (1953) 36-79.
- [132] K. S. McCully, M. P. Vezeridis, Cancer Invest. 5 (1987) 25-30.
- [133] a) P. Martin-Sanz, C. Cascales, A. Gomez, D. N. Brindley, M. Cascales, *Carcinogenesis* 8 (1987) 1685-1690;

6) C. Cascales, P. Martin-Sanz, R. A. Pittner, R. Hopewell, D. N. Brindley, M. Cascales, *Biochem. Pharmacol.* **35** (1986) 2655-2661.

- [134] M. J. Cleare, P.C. Hydes, Met. Ions Biol. Syst. 11 (1980) 1-62.
- [135] G. Mestroni, E. Alessio, A. Sessanta o Santi, S. Geremia, A. Bergamo, G. Sava, A. Boccarelli, A. Schettino, M. Coluccia, *Inorg. Chim. Acta* 273 (1998) 62-71.
- [136] S. Pacor, G. Sava, G. Mestroni, E. Alessio, Pharmacol. Res. 25 (1992) 73-74.

- [137] P. Colamarino, P. Sliwinska Orioli, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1976) 845-848.
- [138] F. P. Pruchnik, P. Jakimowicz, Z. Ciunik, J. Zakrewska-Czerwinska, A. Oplolski, J. Wietrzyk, E. Wojdat, *Inorg. Chim. Acta* 334 (2002) 59-66.
- [139] D. A. Medvetz, K. D. Satkleff, T. Schreiber, P. D. Custer, K. Hindi, M. D. Panzner, D. D. Blanco, M. J. Taschner, C. A. Tessier, W. J. Youngs, J. Med. Chem. 50 (2007) 1703-1706.
- [140] U. Sliwinska, F.P. Pruchnik, I. Pelinska, S. Ulaszewski, A. Wilczok, A. Zajdel, J. Inorg. Biochem. 102 (2008) 347-358.
- [141] E. L. Menon, R. Perera, M. Navarro, R. J. Kuhn, H. Morrison, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 5373-5381.
- [142] a) D. Loganathan, H. Morrison, *Photochem. Photobiol.* 82 (2006) 237–247;

6) M. R. Kim, H. Morrison, S. I. Mohammed, Anti-Cancer Drugs 22 (2011) 896-904.

[143] a) A. Dorcier, W. H. Ang, S. Bolano, L. Gonsalvi, L. Juillerat-Jeannerat, G. Laurenczy, M. Peruzzini, A. D. Phillips, F. Zanobini, P. J. Dyson, *Organometallics* 25 (2006) 4090-4096;

6) A. Casini, F. Edafe, M. Erlandsson, L. Gonsalvi, A. Ciancetta, N. Re, A. Ienco, L. Messori, M. Peruzzini, P. J. Dyson, *Dalton Trans.* **39** (2010) 5556-5563.

- [144] C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurenczy, T. J. Geldbach, G. Sava, P. J. Dyson, J. Med. Chem. 48 (2005) 4161-4171.
- [145] H.-R. Zhang, Y.-C. Liu, Z.-F. Chen, T. Meng, B.-Q. Zou, Y.-N. Liu, H. Liang, New J.Chem. 40 (2016) 6005-6014.
- [146] Y. Geldmacher, M. Oleszak, W. S. Sheldrick, Inorg. Chim. Acta 393 (2012) 84-102.
- [147] U. Berkert, N. L. Allinger, Amer. Chem. Soc. (1982) 339.
- [148] W. J. Hehre, L. Radom, R. Schleyer, J. A. Pople, "Ab initio molecular orbital theory", Wiley, New York (1986).
- [149] a) A. K. Rappe, C. L. Casewit, "Molecular mechanics across chemistry", University Science Books, Sausalito, CA (1997), website <u>http://www.chm.colostate.edu/mmac</u>;

6) A. R. Leach, "Molecular Modelling, Principles and Applications", Addison Wesley Longman, Essex (UK) (1996), chapter 3;

B) U. Burkert, N. L. Allinger, "Molecular Mechanics", *ACS Monograph* 177, American Chemical Society, Washington, DC (1982);

r) N. L. Allinger, "Calculation of Molecular Structures and Energy by Force Methods", in *Advances in Physical Organic Chemistry*, 13, V. Gold, D Bethell, Eds., Academic Press, New York (1976);

д) T. Clark, "A Handbook of Computational Chemistry", Wiley, New York (1985);

ħ) I. N. Levine, "Quantum Chemistry", 4th edn, Prentice Hall, Engelwood Cliffs, New Jersey (1991), pp. 583-587;

e) Conformational energies: I. Pettersson, T. Liljefors, in *Reviews in Computational Chemistry* (1996) 9;

ж) Inorganic and organometallic compounds; C. R. Landis, D. M. Root, T. Cleveland, in Reviews in *Computational Chemistry* (1995) 6;

3) Parameterization: J. P. Bowen, N. L. Allinger, *Reviews in Computational Chemistry* (1991) 2.

[150] a) L. H. Thomas, Proc. Camb. Phil. Soc. 23 (1927) 542-548;

6) E. Y. Fermi, Y. Phys. 48 (1928) 73-79.

[151] P. Hohenberg, W. Kohn, Phys. Rev. B 136 (1964) 864-871.

[152] W. Kohn, L. J. Sham, Phys. Rev. 140 (1965) A1133-A1138.

[153] Y. Zhao, D.G. Truhlar, Theor. Chem. Acc. 120 (2008) 215-241.

[154] a) A. D. Becke, J. Chem. Phys. 98 (1993) 5648-5652;

6) C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, Phys. Rev. B 37 (1988) 785-789;

B) B. Miehlich, A. Savin, H. Stoll, H. Preuss, Chem. Phys. Lett. 157 (1989) 200-206.

[155] a) J. S. Griffith, The Theory of Transition-Metal Ions; Cambridge University Press (1964);

6) I. N. Levine, Quantum Chemistry; Pearson Education (2013);

B) R. G. Parr, Y. Weitao, Density-Functional Theory of Atoms and Molecules (International Series of Monographs on Chemistry); Oxford University Press (1994).

[156] C. Møller, M. S. Plesset, Phys. Rev. 46 (1934) 618-622.

[157] M. Milovanović, Teorijska istraživanja geometrije, stabilnosti i hemijskih veza u malim klasterima litijuma sa halogenima, doktorska teza, Univerzitet u Beogradu (2015).

[158] F. Weinhold, C. R. Landis, Chem. Educ. Res. Pract. 2 (2001) 91-104.

- [159]D. J. Radanović, K. D. Gailey, M. I. Djuran, B. E. Douglas, J. Coord. Chem. 10 (1980) 115-123.
- [160] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Talanta* **43** (1996) 1739-1753.
- [161] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, Ann. Chim. 89 (1999) 45-49.
- [162]L. Alderighi, P. Gans, A. Lenco, D. Peters, A. Sabatini, A.Vacca, *Coord. Chem. Rev.* 184 (1999) 311-318.
- [163] CrysAlisPro, Agilent Technologies UK Ltd., Oxford, UK (2011-2014).
- [164] W. R. Busing, H. A. Levy, Acta Cryst. 10 (1957) 180-182.
- [165]G. M. Sheldrick, SHELXT, University of Göttingen and Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany (2012-2014).
- [166]M. Ruf, B. C. Noll, Application Note SC-XRD 503, Bruker AXS GmbH Karlsruhe, Germany (2014).
- [167] G. M. Sheldrick, Acta Cryst. A 71 (2015) 3-8.
- [168]G. M. Sheldrick, SHELXL-20xx, University of Göttingen and Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany (2012-2014).
- [169] G. M. Sheldrick, Acta Cryst. A 64 (2008) 112-122.
- [170] G.M. Sheldrick, Acta Cryst. C 71 (2015) 3-8.
- [171]P. T Beurskens, G. Beurskens, R. de Gelder, J. M. M. Smits, S. Garcia-Granda, R. O. Gould, DIRDIF-(2008), Radboud University Nijmegen, The Netherlands (2008).
- [172]P. T Beurskens in Crystallographic Computing 3, (Eds.: G. M. Sheldrick, C. Krüger, R. Goddard), Clarendon Press, Oxford, UK (1985) pp. 216-266.
- [173]A. Altomare, M. C. Burla, M. Camalli, G. L. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. G. G. Moliterni, G. Polidori, R. Spagna, J. Appl. Crystallogr. 32 (1999) 115-119.
- [174]G. Sheldrick, SHELXL97 A Program for Structure Refinement, University of Göttingen, Göttingen (1997).
- [175] L. J. Farrugia, J. Appl. Crystallogr. 32 (1999) 837-838.
- [176] L. J. Farrugia, J. Appl. Crystallogr. 45 (2012) 849-854.
- [177] SADABS v. 2.06 (2002) Bruker AXS, Inc., Madison, WI.

- [178] F. R. Keene, G. H. Searle, Inorg. Chem. 13 (1974) 2173-2180.
- [179] T. Mosmann, J. Immunol. Methods 65 (1983) 55-63.
- [180] A. Doyle, J. B. Griffiths, D. G. Newell, *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*, Ed. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, England (1995).
- [181]A. Bender, D. Opel, I. Naumann, R. Kappler, L. Friedman, D. Von Schweinitz, K.-M. Debatin, S. Fulda, *Oncogene* **30** (2011) 494-503.
- [182] D. Baskić, S. Popović, P. Ristić, N. N. Arsenijević, Cell Biol. Int. 30(11) (2006) 924-932.
- [183] M. M. Bradford, Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254.
- [184] ImageJ, компјутерски програм. NIH Image, <u>http://imagej.nih.gov</u>
- [185] BD CellQuest Pro Software; Becton, Dickinson and Company: San Hose, USA (2002).
- [186] 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. Bearmark, 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, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian 09, Revision D.01; Gaussian, Inc., Wallingford CT (2013).
- [187] HyperChem(TM), Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA.
- [188] a) MOPAC2016, J. J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, HTTP://OpenMOPAC.net (2016);

b) J. Řezáč, P.Hobza, J. Chem. Theory Comput. 8 (2012) 141-151.

- [189] F. Weigend, R. Ahlrichs, Phys. Chem. Chem. Phys. 7 (2005) 3297-3305.
- [190] a) A. Bergner, M. Dolg, W. Kuechle, H. Stoll, H. Preuss, Mol. Phys. 80 (1993) 1431-1441;
 - 6) M. Kaupp, P. V. R. Schleyer, H. Stoll, H. Preuss, J. Chem. Phys. 94 (1991) 1360-1366;
 - B) M. Dolg, H. Stoll, H. Preuss, R.M. Pitzer, J. Phys. Chem. 97 (1993) 5852-5859.

- [191] NBO 7.0. E. D. Glendening, J.K. Badenhoop, A.E. Reed, J.E. Carpenter, J.A. Bohmann, C.M. Morales, P. Karafiloglou, C.R. Landis, F. Weinhold, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison, WI (2018); <u>http://nbo7.chem.wisc.edu/</u>
- [192] I. Petitpas, C. E. Petersen, C.-E. Ha, A. A. Bhattacharya, P. A. Zunszain, J. Ghuman, N. V. Bhagavan, S. Curry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 6440-6445.
- [193] a) G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, J. Comput. Chem. 30 (2009) 2785-2791;

б) М. F. Sanner, J. Mol. Graph. Model. 17 (1999) 57-61.

- [194] P. A Zunszain, J. Ghuman, T. Komatsu, E. Tsuchida, S. Curry, BMC Struct. Biol. 3 (2003) 6-14.
- [195] Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio, v.17.2.0 (2016).
- [196] U. Rychlewska, M. I. Djuran, M. M. Vasojević, D. D. Radanović, V. M. Ristanović, D. J. Radanović, *Inorg. Chim. Acta* 328 (2002) 218-228.
- [197] a) M. Parvez, C. Maricondi, D. J. Radanović, S. R. Trifunović, V. D. Miletić, B. E. Douglas, *Inorg. Chim. Acta* 248 (1996) 89-92;

6) S. Grubišić, S. R. Niketić, D. D. Radanović, U. Rychlewska, B. Warżajtis, *Polyhedron* **24** (2005) 1701-1709.

- [198] D. J. Radanović, M. I. Djuran, J. Coord. Chem. 11 (1982) 247-250.
- [199] R. Herak, G. Srdanov, M. I. Djuran, D. J. Radanović, M. Bruvo, *Inorg. Chim. Acta* 83 (1984) 55-64.
- [200] D. J. Radanović, M. I. Djuran, B. E. Douglas, Inorg. Chem. 24 (1985) 4239-4241.
- [201] D. J. Radanović, M. I. Djuran, R. S. Kostić, B. E. Douglas, *Inorg. Chim. Acta* 211 (1993) 149-154.
- [202] K. Nakamoto, Y. Morimoto, A. E. Martell, J. Am. Chem. Soc. 83 (1961) 4528-4532.
- [203] M. B. Ćelap, S. R. Niketić, T. J. Janjić, V. N. Nikolić, Inorg. Chem. 6 (1967) 2063-2065.
- [204] D. H. Busch, J. C. Bailar Jr., J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 4574-4575.
- [205] M. L. Morris, D. H. Busch, J. Am. Chem. Soc. 78 (1956) 5178-5181.
- [206] K. Nakamoto, *Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Wiley, New York, (1963).

- [207] Докторска дисертација Милош И. Ђуран "Циркуларни дихроизам родијум(III)комплекса едта-типа", Крагујевац (1985).
- [208] Докторска дисертација Миорад М. Васојевић "Структура родијум(III) комплекса са неким аминополикарбоксилатним лигандима", Крагујевац (2005).
- [209] R. A. D. Wentworth, T. S. Piper, Inorg. Chem. 4 (1965) 709-714.
- [210] D. J. Radanović, Coord. Chem. Rev. 54 (1984) 159-261.
- [211] B. E. Douglas, D. J. Radanović, Coord. Chem. Rev. 128 (1993) 139-165.
- [212] A. E. Martell, R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, vol. 1-4, Plenum Press, New York (1974).
- [213] A. Forgács, G. B. Giovenzana, M. Botta, E. Brücher, I. Tóth, Z. Baranyai, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2012) 2074-2086.
- [214] É.A. Enyedy, O. Dömötör, C. M. Hackl, A. Roller, M. S. Novak, M. A. Jakupec, B. K. Keppler, W. Kandioller, J. Coord. Chem. 68(9) (2015) 1583-1601.
- [215] O. Dömötör, S. Aicher, M. Schmidlehner, M. S. Novak, A. Roller, M. A. Jakupec, W. Kandioller, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, É. A. Enyedy, *J. Inorg. Biochem.* 134 (2014) 57-65.
- [216] S. I. Bezzubov, V. D. Dolzhenko, Yu. M. Kiselev, Zh. Anal. Khim. 67(2) (2012) 176-179.
- [217] L. Galluzzi, M. C. Maiuri, I. Vitale, H. Zischka, M. Castedo, L. Zitvogel, G. Kroemer, Cell Death Differ. 14 (2007) 1237-1243.
- [218] G. Kroemer, L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 3-11.
- [219] D. A. Nelson, E. White, Genes & Dev. 18 (2004) 1223-1226.
- [220] M. Leist, M. Jäättelä, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2 (2001) 589-598.
- [221] G. Kroemer, W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M. V. Blagosklonny, W. Malorni, R. A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata, G. Melino, *Cell Death Differ*. **12** (2005) 1463-1467.
- [222] S. Kumar, Cell Death Differ. 14 (2007) 32-43.
- [223] M. Vogler, D. Dinsdale, M. J. S. Dyer, G. M. Cohen, Cell Death Differ. 16 (2009) 360-367.

- [224] C. Adrain, S. J. Martin, Sci. Signal. 2 (2009) Article No. pe62.
- [225] S. E. Logue, S. J. Martin, Biochem. Soc. Trans. 36 (2008) 1-9.
- [226] R. Kim, M. Emi, K. Tanabe, Y. Uchida, K. Arihiro, Eur. J. Surg. Oncol. 32 (2006) 269-277.
- [227] G. Koopman, C. P. Reutelingsperger, G. A. Kuijten, R. M. Keehnen, S. T. Pals, M. H. van Oers, *Blood* 84 (1994) 1415-1420.
- [228] H. Lecoeur, M. C. Prévost, M. L. Gougeon, Cytometry 44 (2001) 65-72.
- [229] G. Sava, S. Pacor, A. Bergamo, M. Cocchietto, G. Mestroni, E. Alessio, Chem. Biol. Interact. 95 (1995) 109-126.
- [230] L. Galluzzi, I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nuñez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H. -U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, G. Kroemer, *Cell Death Differ*. **19** (2012) 107-120.
- [231] S. Fulda, K. M. Debatin, Oncogene 25 (2006) 4798-4811.
- [232] F. Weinhold, C. R. Landis, Valency and Bonding: A Natural Bond Orbital Donor-Acceptor Perspective, Cambridge University Press (2005).
- [233] K. M. Knudsen Sand, M. Bern, J. Nilsen, H. T. Noordzij, I. Sandlie, J. T. Andersen, Front. Immunol. 5 (2015) Article 682.

БИОГРАФИЈА

Марија С. Јеремић



БИОГРАФИЈА

Марија С. Јеремић је рођена 15.09.1984. године у Крагујевцу. Основну школу и средњу медицинску школу са домом ученика "Сестре Нинковић" завршила је у Крагујевцу. На Природно-математички факултет у Крагујевцу, група Хемија, смер заштита животне средине, уписала се школске 2004/2005. године, где је и дипломирала 2010. године са просечном оценом 9,09. Дипломски рад под називом "Синтеза и карактеризација Ni(II) комплекса са несиметричним пентадентатним 1,3-пропандиамин-N,N,N'-триацетато лигандом" одбранила је 2010. године код професора др Зорана Матовића са оценом 10. Докторске академске студије, модул Неорганска хемија, уписала је школске 2010/2011. године. Од 1. јануара 2011. године учествује као истраживач-приправник, а од маја 2013. као истраживачсарадник на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије "Преклиничка испитивања биоактивних супстанци". У периоду од октобра 2013. до априла 2014. боравила је на Универзитету у Хајделбергу у Немачкој у групи професора Петера Комбе.

СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

1. Списак научних радова из докторске дисертације објављених у часописима са SCI-листе:

1.1 Marija S. Jeremić, Hubert Wadepohl, Vesna V. Kojić, Dimitar S. Jakimov, Ratomir Jelić, Suzana Popović, Zoran D. Matović, Peter Comba, "Synthesis, structural analysis, solution equilibria and biological activity of rhodium(III) complexes with a quinquedentate polyaminopolycarboxylate", *RSC Advances* **7** (2017) 5282-5296.

DOI: 10.1039/с6га26199j; **ISSN:** 2046-2069 (IF = 2,936 за 2017. годину; 71/171; категорија: **M22**; област: Chemistry, Multidisciplinary).

1.2 Marija S. Jeremić, Marko D. Radovanović, Franco Bisceglie, Vesna V. Kojić, Ratomir Jelić, Zoran D. Matović, "Rhodium(III) in a cage of the 1,3-propanediamine-*N*,*N*,*N'*-triacetate chelate: X-ray structure, solution equilibria, computational study and biological behavior" *Polyhedron* **156** (2018) 19-30.

DOI: 10.1016/j.poly.2018.08.075; **ISSN:** 0277-5387 (IF = 2,067 за 2017. годину; 18/45; категорија: **M22**; област: Chemistry, Inorganic & Nuclear).

1.3 Marija S. Jeremić, Marko D. Radovanović, Frank W. Heinemann, Miorad M. Vasojević, Zoran D. Matović, "Structural and theoretical investigations of the Rh(III) and Co(III) complexes containing symmetrical edta-type ligands with mixed carboxylate and diamine rings: Quantum-mechanical/NBO insight into stability of geometrical isomers", *Polyhedron* 169 (2019) 89-101.

DOI: 10.1016/j.poly.2019.04.053; **ISSN:** 0277-5387 (IF = 2,067 за 2017. годину; 18/45; категорија: **M22**; област: Chemistry, Inorganic & Nuclear).

- 2. Списак саопштења на националним (М64) конференцијама објављени у оквиру ове докторске дисертације:
- 2.1. Marija S. Jeremić, Peter Comba, Hubert Wadepohl, "Synthesis and crystal structure of *cis*-equatorial-sodium (ethylenediamine-*N*,*N*,*N*'-triacetato)chloridorhodate(III) monohydrate, Na[RhCl(ed3a)]·H₂O", XXI Конференција СКД 21st CONFERENCE OF THE SERBIAN CRYSTALLOGRAPHIC SOCIETY, 2014. Užice, Serbia, p76-77.

2.2. Marija Jeremić, Zoran Matović, Emina Mrkalić, Peter Comba, Hubert Wadepohl, "Synthesis and crystal structure of *cis*-equatorial-aquaethylenediamine-N,N,N'triacetatorhodium(III) monohydrate, [Rh(ed3a)H₂O]xH₂O", *XXII Конференција СКД -22nd CONFERENCE OF THE SERBIAN CRYSTALLOGRAPHIC SOCIETY, 2015. Smederevo, Serbia*, p52-53.

3. Списак осталих радова објављених у међународним часописима са SCI-листе:

3.1. Zoran D. Matović, **Marija S. Jeremić**, Ratomir M. Jelić, Matija Zlatar, Ivan Ž. Jakovljević "Configurational, LFDFT and NBO analysis of chromium(III) complexes of edta-type ligands" *Polyhedron* **55** (2013) 131-143.

DOI: 10.1016/j.poly.2013.02.079; **ISSN:** 0277-5387 (IF = 2,047 за 2013. годину; 19/45; категорија: **M22**; област: Chemistry, Inorganic & Nuclear).

3.2. Svetlana Belošević, Miorad M. Vasojević, **Marija S. Jeremić**, Auke Meetsma, Zoran D. Matović, "Preparation, configurational and DFT-NBO analysis of nickel(II) complexes with edta-type ligands containing six-membered backbone ring: Crystal structure of [Ni(H₂O)₆][Ni(1,3-pdta)]·2H₂O" *Journal of Coordination Chemistry* **66** (2013) 1730-1745.

DOI: 10.1080/00958972.2013.789104;

ISSN: 0095-8972

(IF = 2,212 за 2013. годину; 15/45; категорија: **M22**; област: Chemistry, Inorganic & Nuclear).

3.3. Maja Djukić, **Marija S. Jeremić**, Ratomir Jelić, Olivera Klisurić, Vesna Kojić, Dimitar Jakimov, Predrag Djurdjević, Zoran D. Matović "Further insights into ruthenium(II) pianostool complexes with *N*-alkyl imidazoles", *Inorganica Chimica Acta* **483** (2018) 359-370.

DOI: 10.1016/j.ica.2018.08.031;

ISSN: 0020-1693

(IF = 2,264 за 2017. годину; 16/45; категорија: **M22;** област: Chemistry, Inorganic & Nuclear).

4. Списак осталих саопштења на међународним (М34) конференцијама штампаним у изводу:

 4.1. Marina Ćendić, Maja B. Đukić, Emina M. Mrkalić, Marija S. Jeremić, Zoran D. Matović, "Upravljanje komunalnim i industrijskim otpadom na teritoriji grada Kragujevca" THE 6TH SYMPOSIUM CHEMISTRY AND ENVIRONMENTAL PROTECTION – ENVIROCHEM 2013 Vršac, Serbia, p154-155.













D











l Q ×



Q ×

l

RSC Advances



PAPER



Cite this: RSC Adv., 2017, 7, 5282

Synthesis, structural analysis, solution equilibria and biological activity of rhodium(III) complexes with a quinquedentate polyaminopolycarboxylate⁺

Marija S. Jeremić,^a Hubert Wadepohl,^b Vesna V. Kojić,^c Dimitar S. Jakimov,^c Ratomir Jelić,^d Suzana Popović,^d Zoran D. Matović^{*a} and Peter Comba^{*b}

Two rhodium(iii) complexes [Rh(ed3a)(OH₂)]·H₂O (1) and Na[Rh(ed3a)Cl]·H₂O (2) with ethylenediamine-N,N,N'-triacetate (ed3a) have been synthesized and characterized by elemental, spectroscopic and structural analyses. The crystal structure of (1) and (2) and the spectroscopic analysis of the two rhodium(m)-ed3a complexes are discussed in detail. The protonation constants of H₃ed3a and the conditional stability constants of its Rh^{III} complexes have been determined in aqueous solution by pH potentiometry and UV-Vis spectrophotometry. Molecular mechanics (MM) and density functional theory (DFT) have been used to model all possible geometric isomers, determine the global energy minimum and compare the computed with the experimentally observed structures. The cytotoxic activity of the new Rh^{III} complexes was evaluated by an MTT assay against four human cancer lines (MCF-7, A549, HT-29 and HeLa) and a normal human cell line (MRC-5). A549, HT-29 and HeLa cells were sensitive to all compounds tested, while the breast carcinoma cell line MCF-7 was only sensitive to the reference compounds (doxorubicin and cisplatin). Western blot (WB) analysis of the effects of the tested compounds indicates that both complexes increase the expression of caspase 3 and consequently the involvement of this enzyme in apoptotic processes of the treated cells. WB also demonstrates proteolytic cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) in HeLa cells after treatment with both tested substances. Flow cytometry confirmed apoptotic cell death and showed the induction of cell cycle termination as a possible promoter of apoptosis.

Received 2nd November 2016 Accepted 23rd December 2016

DOI: 10.1039/c6ra26199j

www.rsc.org/advances

Introduction

For a multitude of reasons, transition metal complexes with edta-type aminopolycarboxylate ligands have attracted considerable attention and have been extensively investigated and reviewed.^{1,2} The best studied quinquedentate ligand system is ethylenediamine-N,N,N'-triacetate (ed3a) and its derivatives. For octahedral metal complexes with pentadentate coordinated symmetrical edta- (ethylenediamine-N,N,N'-tetraacetate) or ed3a-type ligands three possible geometric isomers, *cis*-equatorial, *trans*-equatorial and *cis*-polar are possible

(Fig. 1). Most of the reported [M(ed3a-type)X] complexes (M = Co^{III} , Cr^{III} , Cu^{II} , Ni^{II} and X = monodentate ligand) have the *cis*-equatorial configuration.³⁻⁵

The success of cisplatin as antitumor agent has stimulated enormous efforts to designing and preparing other clinically useful metal complexes.⁶⁻¹⁰ Rh^{III} coordination compounds are isoelectronic with Ru^{II} and Pt^{IV} complexes, which provide a range of active antitumor agents.^{11,12} Generally, they are octahedral and inert but many Rh^{III} complexes show considerable antitumor and antimicrobial activities.^{11,12} The first report of an antitumor active Rh^{III} complex, RhCl₃·3H₂O,¹³ appeared before Rosenberg's discovery of cisplatin.^{6,7} Simple complexes



Fig. 1 Geometrical isomerism of six-coordinate [M(ed3a-type)Xn] complexes: n = 1.

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

^bUniversität Heidelberg, Anorganisch-Chemisches Institut and Interdisciplinary Center for Scientific Computing (IWR), Im Neuenheimer Feld 270, D-69120, Heidelberg, Germany. E-mail: Peter.Comba@aci.uni-heidelberg.de

^cOncology Institute of Vojvodina, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Dr Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, Serbia

^dUniversity of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, S. Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

[†] Electronic supplementary information (ESI) available: Further solution study details, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR data. CCDC 1412103 and 1412104 for the new compounds are included. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c6ra26199j

Polyhedron 156 (2018) 19-30



Contents lists available at ScienceDirect

Polyhedron

journal homepage: www.elsevier.com/locate/poly

Rhodium(III) in a cage of the 1,3-propanediamine-*N*,*N*,*N*'-triacetate chelate: X-ray structure, solution equilibria, computational study and biological behavior



POLYHEDRON



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

^b Department of Chemistry, Life Sciences and Environmental Sustainability, University of Parma, Parco Area delle Scienze 17A, 43124 Parma, Italy

^c Oncology Institute of Vojvodina, Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Put Doktora Goldmana 4, 21204 Sremska Kamenica, Serbia

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

ARTICLE INFO

Article history: Received 25 June 2018 Accepted 31 August 2018 Available online 13 September 2018

Keywords: Rhodium(III) complexes Aminopolycarboxylates Stability constants Docking Antiproliferation

ABSTRACT

Two new octahedral Rh(III) complexes that are potential chemotherapeutic agents have been synthesized from the 1,3-propanediamine-*N*,*N*,*N'*-triacetate ligand (1,3-pd3a): $[Rh(1,3-pd3a)(H_2O)]\cdot 2H_2O$ (1) and Na $[Rh(1,3-pd3a)Cl]\cdot 2H_2O$ (2). Both complexes were characterized by IR, UV–Vis and NMR spectroscopy, as well as elemental analysis. Only the structure of **2** was determined by a single crystal X-ray diffraction study. The asymmetric unit contains the negatively charged rhodium complex, a sodium ion and two water molecules. The positions of the carboxylate groups define the *cis*-polar geometry. DFT calculations on **1** and **2** have also been done to confirm experimental results. In order to determine the protonation constants of 1,3-H₃pd3a, stability constants and the stoichiometry of the complexes in aqueous solution, pH-potentiometry and UV–Vis spectrophotometry were used. Docking of **1** to human serum albumin (HSA) gives the reasonable assumption that this complex can be easily transported to the target cells. The complexes, as well as the 1,3-pd3a and ed3a ligands, were tested against various cancer and one normal human cell lines. Complex **2** and both ligands display significant cytotoxicity against the HeLa cancer cell line, while **1** shows good antitumor activity against MCF-7. Flow cytometry analysis showed the apoptotic death of the cells with cell cycle arrest in the G2/M phase (Na[Rh(1,3-pd3a)Cl]·2H₂O) and G0/G1 phase (1,3-pd3a).

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The sensational success of cisplatin in the treatment of cancer has prompted the design and production of many clinically useful metal complexes [1–4]. Cisplatin, as well as a series of platinumbased drugs (oxaliplatin, carboplatin) continue to be used to treat various malignancies, such as ovarian, bladder, lung, testicular, head and neck cancers [5,6]. However, the undesirable effect of these drugs, such as neurotoxicity, nephrotoxicity and hepatotoxicity, has become a motivation for continuing the research and synthesis of new drugs that will demonstrate maximum antitumor properties along with minimal undesired effects. As an alternative to platinum-based drugs, other compounds with new mechanisms of action have been synthesized [7]. A large number of non-plat-

* Corresponding author. E-mail address: zmatovic@kg.ac.rs (Z.D. Matović). inum-based complexes have been investigated in the search for new drugs with improved cytotoxicity: Ru(II) [8], Ru(III) [9], Cu (II) [10], Ni(II) [11], Zn(II) [10,11], Co(III) [12], Pd(II) [13], Rh(III) [14]. Rhodium complexes are recognized as an important alternative to platinum-based complexes. Even the simple rhodium salt RhCl₃·3H₂O [15] showed antitumor activity long before Rosenberg's serendipitous discovery of cisplatin [1]. Nevertheless, the cellular effects of biological active Rh(III) complexes have been systematically investigated only in the last few years. In the past decade, numerous half-sandwich complexes of Rh have been reported with promising results [16], as well as octahedral rhodium complexes [17].

However, there is insufficient data on the antitumor activity of rhodium complexes containing the edta type of ligand (edta = ethylenediamine-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetraacetate) [18]. Polyaminopolycarboxylate ligands have long been used in medicine and pharmacology to remove toxic metals from the body

Polyhedron 169 (2019) 89-101



Contents lists available at ScienceDirect

Polyhedron

journal homepage: www.elsevier.com/locate/poly



Structural and theoretical investigations of the Rh(III) and Co(III) complexes containing symmetrical edta-type ligands with mixed carboxylate and diamine rings: Quantum-mechanical/NBO insight into stability of geometrical isomers



Marija S. Jeremić^a, Marko D. Radovanović^a, Frank W. Heinemann^b, Miorad M. Vasojević^a, Zoran D. Matović^{a,*}

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia ^b Department of Chemistry and Pharmacy, Inorganic Chemistry, Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg (FAU), Egerlandstraße 1, 91058 Erlangen, Germany

ARTICLE INFO

Article history: Received 11 April 2019 Accepted 28 April 2019 Available online 9 May 2019

Keywords: Rhodium(III) Polyaminopolycarboxylates X-ray DFT NBO

ABSTRACT

The $trans(O_5O_6)$ isomer of the Na[Rh(eddadp)]·4H₂O and the K[Co(eddadp)]·3H₂O (eddadp = ethylenediamine-N,N'-diacetate-N,N'-di-3-propionate) were synthesized and Na[Rh(eddadp)]-4H₂O structure was confirmed by X-ray diffraction analysis. The percentage of particular isomers found in reaction equilibrium mixtures of [M(eddadp)]⁻ complex has been reported. Single crystal X-ray diffraction of the complex revealed an octahedral geometry of the Rh(III) centre. Improved structural distortion analysis of M(III) (M = Rh, Co) complexes with symmetric edta-type of ligands containing mixed carboxylate and diamine rings was made. Structural distortion analysis has determined high values of total deviation of the octahedral angles ($\Delta(O_h)$) for both existing $trans(O_5)$ (34°) and $trans(O_5O_6)$ (41°) isomers of [Rh (eddadp)]⁻ complex, while in the case of a similar Co(III) complex, relatively low value (31°) for *trans* (O₅) has been established. Extensive QM/NBO calculations were made for both systems [M(eddadp)]⁻ and [M(1,3-pddadp)]⁻ using different DFT methods (B3LYP/SDD, M06/SDD, MP2/SDD). By correlating the structural parameters obtained from X-ray and DFT optimized 3D structures, the B3LYP/SDD method was used as the method of choice. Based on the correlation between the energies of the optimized systems and the strain parameters, the existence of the trans(O₆) isomer of the [Rh(1,3-pddadp)]⁻ complex was predicted. NRT (Natural Resonance Theory) analysis gave the best resonances for each isomer. Here the stability of particular isomer has been described in terms of 3-CHB bonds involving metal ions and Second Order Perturbation Theory analysis using Donor/Acceptor energies. Further, to explain the bonding nature of M-edta-type complexes the Natural Coulomb Electrostatics (NCE) analysis has been done as well. The pairwise steric exchange interaction E_{L}^{WX} results obtained for the best-ranked resonances of different isomers are in excellent agreement with favored isomers reported so far. For the energy limit of the possibility of forming geometric isomers, a value of about 6 kcal mol⁻¹ is proposed.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The cobalt(III) and rhodium(III) and their coordination chemistry have been extensively investigated for many decades. Special attention is devoted to its complexes with edta-type ligands (edta = ethylenediamine-N,N,N'N'-tetraacetate) which are largely studied [1–11]. Polyaminopolycarboxylate chelate ligands have a wide application in coordination chemistry. Metal complexes with

* Corresponding author. *E-mail address:* zmatovic@kg.ac.rs (Z.D. Matović). these ligands are used in environmental field [12–14], laboratory settings [15,16], industrial processes [17–19], biological systems [20–23], in medicine [24–31]. Of all known chelators, edta is the most commonly used [32–38]. Edta and similar ligands are used to remove heavy metals from the soil and water [39,40], as well as from the human body [41], as antioxidants for food preservation [42]. [M(edta-type)] complexes usually exist as biological redox reagents and there is a series of such complexes (M = Al, Sc, V-Co) [43].

In the case of edta-type ligands with variations in the length of the carboxylate chains, the eddadp (ethylenediamine-N,N'-diac-etate-N,N'-di-3-propionate) is one of the most distinguished [2,6].

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Марија С. Јеремић	, изјављујем да докторска
лисертација пол насловом:	

"Синтеза и биолошка активност Rh(III) комплекса са лигандима полиаминополикарбоксилатног типа"

која је одбрањена на Природно-математичком факултету

Универзитета у Крагујевцу представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

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

У Крагујевцу , 20.5.2019. године,

Mapuja C. Jepenut
ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Марија С. Јеремић



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

"Синтеза и биолошка активност Rh(III) комплекса са лигандима полиаминополикарбоксилатног типа"

која је одбрањена на Природно-математичком факултету

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

Овом Изјавом такође



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

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

1) Ауторство

2) Ауторство - делити под истим условима

3) Ауторство - без прерада

4) Ауторство - некомерцијално

5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима

6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 20.5.2019. године,

Марија С. Ерешић

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