



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Снежана Р. Радисављевић

**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И БИОЛОШКА
АКТИВНОСТ МОНОНУКЛЕАРНИХ И
ПОЛИНУКЛЕАРНИХ КОМПЛЕКСА ЗЛАТА(III)
СА АЗОТ-ДОНОРСКИМ ЛИГАНДИМА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2022.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Snežana R. Radisavljević

**SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND
BIOLOGICAL ACTIVITY OF MONONUCLEAR
AND POLINUCLEAR GOLD(III) COMPLEXES
WITH NITROGEN-DONOR LIGANDS**

Doctoral dissertation

Kragujevac, 2022.

Аутор
Име и презиме: Снежана Р. Радисављевић
Датум и место рођења: <i>06.10.1992., Туприја, Република Србија</i>
Садашње запослење: <i>Истраживач-сарадник (научна област: хемија), Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>
Докторска дисертација
Наслов: Синтеза, карактеризација и биолошка активност мононуклеарних и полинуклеарних комплекса злата(III) са азот-донорским лигандима.
Број страница: <i>171</i>
Број слика: <i>103</i>
Број библиографских података: <i>234</i>
Установа и место где је рад израђен: <i>Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>
Научна област (УДК): <i>546, Хемија – Неорганска хемија</i>
Ментор: др Биљана Петровић , редовни професор, <i>Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу</i>
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: <i>10.07.2019.</i>
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: <i>IV-01-804/4, 09.10.2019. године</i>
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<i>др Биљана Петровић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: неорганска хемија, ментор</i> <i>др Сања Гргурић Шипка, редовни професор, Хемијски факултет, Универзитет у Београду, ужа научна област: неорганска хемија, председник комисије</i> <i>др Биљана Глишић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: неорганска хемија, члан комисије</i>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
<i>др Зоран Матовић, редовни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: неорганска хемија, члан комисије</i> <i>др Сања Гргурић Шипка, редовни професор, Хемијски факултет, Универзитет у Београду, ужа научна област: неорганска хемија, председник комисије</i> <i>др Јована Богојески, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: неорганска хемија, члан комисије</i> <i>др Биљана Глишић, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: неорганска хемија, члан комисије</i> <i>др Ана Рилак Симовић, виши научни сарадник, Институт за информационе технологије, Универзитет у Крагујевцу, научна област: хемија, члан комисије</i>
Датум одбране дисертације:

ПОСВЕЋЕНО МАМИ

Ова докторска дисертација урађена је у Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу и део је пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Пројекат бр. 172011), чији је руководилац др Зорица Бугарчић, редовни професор. Такође, део ове докторске дисертације рађен је на Универзитету у Ерлангену, Нинберг, Немачка, у оквиру DAAD стипендије (број 9169673) у групи професора Андреаса Шојрера.

Првенствено бих желела да се захвалим проф. Живадину Бугарчићу, који нажалост није више са нама, а који ме је позвао да се прикључим истраживачкој групи која се бави неорганском хемијом и који је прве године мојих докторских студија имао праве савете, идеје и допринео развоју мене као хемичара. Искрено се захваљујем ментору, проф. Биљани Петровић, што је прихватила да постанем њен докторанд, што је увек била доступна за свако питање и што је својим коментарима, идејама, сугестијама и подршци допринела том истраживању, а на крају и финализацији ове докторске дисертације. Истакла бих и велику захвалност проф. Ралфу Пухти и проф. Андреасу Шојреру из Немачке, који су ми током мог боравка у Немачкој омогућили извођење експеримената, помогли да напредујем у мом пољу истраживања, били пријатељски расположени и доступни за сарадњу.

Захвалност дугујем и члановима комисије др Зорану Матовићу, редовном професору Природно-математичког факултета у Крагујевцу, др Сањи-Гргурић Шипки, редовном професору Хемијског факултета Универзитета у Београду, др Јовани Богојески, доценту Природно-математичког факултета у Крагујевцу, др Биљани Глишић, доценту Природно-математичког факултета у Крагујевцу, и др Ани Рилак Симовић, вишем-научном сараднику Института за информационе технологије у Крагујевцу за време које су издвојили и све коментаре које су дали приликом прегледа и оцене ове докторске дисертације.

Захваљујем се свим колегама из групе проф. Биљане Петровић, а посебну захвалност дугујем Милицы Међедовић на свим сугестијама и предлозима везаним за ову докторску дисертацију. Захвалила бих се и Слађани Ђорђевић, као и Ненаду Јоксимовићу, за пријатељске савете, подршку и помоћ приликом финализације ове дисертације.

Захвалност такође дугујем својој породици која је увек била уз мене, и за оне лепе и оне мање лепе тренутке, која ме је увек бодрила да могу даље и више. Посебно бих се захвалила сестри, Сузани Јовановић, и зету, Бојану Јовановићу, на техничкој подршци. Истакла бих да ипак највећу захвалност дугујем једној жени, коју ја зовем „жена змај“, Надици Радисављевић, жени без које све ово не би било могуће. Мама, хвала ти. Тата, жао ми је што ниси доживео да се заједно радујемо мом успеху, али надам се да би био изузетно поносан на мене.

На крају, али не најмање битно, огромну захвалност дугујем и свом партнеру, Милошу Костићу, што је био уз мене, бодрио ме и терао да устанем сваки пут када сам пала.

Снежана Радисављевић

АПСТРАКТ

У оквиру ове дисертације описана је синтеза и карактеризација нових мононуклеарних Au(III) комплекса, и то: три комплекса са дериватима *bis*-пиразолилпиридина као инертним лигандима, пет комплекса са дериватима пиразола и два комплекса са дериватима 1,10-фенантролина као инертним лигандима, као и шест полинуклеарних комплекса са алифатичним диаминима (1,4-диаминобутан, 1,6-диаминохексан и 1,8-диаминооктан) као мостним лигандима. Структуре комплекса потврђене су различитим аналитичким методама (UV-Vis, IR, ^1H NMR, MS, елементална микроанализа), док је структура лиганда **L2**, (3-((2-((5-фенил-1*H*-пиразол-3-ил)метокси)фенокси)метил)-5-фенил-1*H*-пиразол, потврђена рендгенском структурном анализом. Сви комплекси су показали добру стабилност у физиолошким условима, што је омогућило даља испитивања интеракција са различитим биомолекулима. Већина комплекса је показала бољу реактивност према сумпор-донорским нуклеофилима (метионин (L-Met), глутатион (GSH), тиоуреа (Tu)), у односу на азот-донорске (гуанозин-5'-монофосфат (5'-GMP), гуанозин (Guo)), док је у свим случајевима потврђен асоцијативни механизам супституције. Резултати испитивања интеракција са DNA показали су да се комплекси са дериватима пиразола везују ковалентно, док се остали комплекси везују интеркалацијом, што је потврђено и молекулским докингом. Испитивањем интеракција са серум албуминима (говеђи серум албумин (BSA), хумани серум албумин (HSA)) добијене су високе вредности константи везивања за протеине (реда величине $10^4 - 10^5$), док је молекулским докингом потврђено да се комплекси првенствено везују за домен I испитиваних албумина. Резултати биолошких испитивања су показали да комплекси показују значајну цитотоксичну активност у поређењу са цисплатином на HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама, али и малу селективност према здравим ћелијама.

КЉУЧНЕ РЕЧИ

- Au(III) комплекси
- Азот-донорски лиганди
- Кинетика
- Механизам
- Биомолекули
- DNA
- HSA
- BSA
- Молекулски докинг
- Цитотоксичност

ABSTRACT

This dissertation describes the synthesis and characterization of new mononuclear Au(III) complexes, exactly: three complexes with *bis*-pyrazolylpyridine derivatives, five complexes with pyrazole derivatives and two complexes with 1,10-phenanthroline derivatives as inert ligands, as well as six polynuclear complexes with aliphatic diamines (1,4-diaminobutane, 1,6-diaminohexane or 1,8-diaminooctane) as bridging ligands. The structures of these complexes were confirmed by various analytical methods (UV-Vis, IR, ^1H NMR, MS, elemental microanalysis), while the structure of **L2**, (3-((2-((5-phenyl-1*H*-pyrazole-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-5-phenyl-1*H*-pyrazole, was confirmed by X-ray analysis. All complexes showed good stability under the physiological conditions, which enable further studies of their interactions with different biomolecules. Most of the complexes showed better reactivity toward sulfur-donor nucleophiles (L-Methionine (L-Met), Glutathione (GSH), Thiourea (Tu)), compared to nitrogen-donors (Guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP), Guanosine (Guo)). In all cases the associative mechanism of the substitution was confirmed. The results of DNA interaction studies showed that complexes with pyrazole derivatives bind via "*groove binding*", while the other complexes bind via intercalation, which was confirmed by molecular docking as well. The results of the study of the interactions between complexes and serum albumins (bovine serum albumin (BSA), human serum albumin (HSA)) indicated the high values of the binding constants (in the range $10^4 - 10^5$). Additionally, molecular docking confirmed that complexes primarily bind to site I of the proteins. The results of the biological studies confirmed a significant cytotoxic activity of complexes toward HCT-116 and MDA-MB-231 cell lines, compared to cisplatin, as well as poor selectivity for healthy cells.

KEY WORDS

- Au(III) complexes
- Nitrogen-donor ligands
- Kinetics
- Mechanism
- Biomolecules
- DNA
- HSA
- BSA
- Molecular docking
- Cytotoxicity

САДРЖАЈ

1. ОПШТИ ДЕО	
1.1 Опште карактеристике злата	2
1.2 Оксидациона стања злата	2
1.3 Au(I) комплекси	4
1.4 Аурофилне интеракције	6
1.5 Au(III) комплекси	11
1.5.1 Комплекси са азот-донорским лигандима	11
1.5.2 Комплекси са порфиринама	13
1.5.3 Органометални комплекси	15
1.5.4 Комплекси са халкогеним лигандима	17
1.5.5 Комплекси који поседују антибактеријско и антивирусно дејство	21
1.5.6. Комплекси изотопа злата	22
1.6 Интеракције комплекса са DNA и SA	23
1.7 Молекулски докинг	28
1.8 Супституционе реакције комплексних једињења	29
1.8.1 Одређивање механизма нуклеофилних супституционих реакција	30
1.8.2 Супституционе реакције квадратно-планарних комплекса	31
1.8.3 Утицај различитих фактора на брзину реакција супституције	32
ЗАДАТАК РАДА	34
2. ЕКПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	
2.1 Реагенси и раствори	37
2.2 Инструменталне методе	38
2.3 Синтезе комплекса и лиганада	39
2.3.1 Синтеза комплекса 1 – 3	39
2.3.2 Синтеза лиганада L1 – L3	40
2.3.3 Синтеза комплекса 4 – 8	42
2.3.4 Синтеза комплекса 9 – 10	43
2.3.5 Синтеза комплекса 11 – 13	43
2.3.6 Синтеза комплекса 14 – 19	44
2.4 Испитивање стабилности комплекса у воденом раствору	47
2.5 Кинетичка испитивања	47
2.6 Апсорпциона спектроскопска испитивања	47
2.7 Флуоресцентна мерења	48
2.8 Мерење вискозности	48
2.9 HPLC мерења	49
2.10 Квантни хемијски прорачуни	49
2.11 Молекулски докинг	49
2.12 Ћелијске културе	50
2.13 Цитотоксична анализа и биолошка испитивања	50
3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	
3.1 Мононуклеарни Au(III) комплекси	54
3.1.1 Резултати испитивања мононуклеарних Au(III) комплекса са ароматичним bis-пиразолилпиридинским лигандима	54
3.1.1.1 Испитивање реакција супституције комплекса 1-3	58

3.1.1.2 Испитивање интеракција комплекса 1-3 са DNA	61
3.1.1.3 Молекулски докинг	66
3.1.1.4 Биолошка испитивања	68
3.1.2 Резултати испитивања мононуклеарних бифункционалних Au(III) комплекса са дериватима пиразола као инертним лигандима	73
3.1.2.1 Испитивање реакција супституције комплекса 4-6	78
3.1.2.2 Испитивање интеракција комплекса 4-8 са DNA	86
3.1.2.3 Испитивање интеракција комплекса 4-8 са BSA и HSA	94
3.1.2.4 Молекулски докинг	101
3.1.3 Резултати испитивања мононуклеарних Au(III) комплекса са дериватима 1,10-фенантролина као инертним лигандима	106
3.1.3.1 Испитивање реакција супституције комплекса 9 и 10	109
3.1.3.2 Испитивање интеракција комплекса 9 и 10 са DNA	115
3.1.3.3 Испитивање интеракција са BSA	118
3.1.3.4 Молекулски докинг	120
3.1.3.5 Испитивање цитотоксичности	122
3.1.4 Резултати испитивања супституционих реакција монофункционалних Au(III) комплекса са сумпор-донорским нуклеофилима	124
3.2 Полинуклеарни Au(III) комплекси	131
3.2.1 Резултати испитивања динуклеарних 14-16 и тринуклеарних 17-19 Au(III) комплекса	131
3.2.1.1 Испитивање интеракција са DNA	138
3.2.1.2 Испитивање интеракција са BSA	143
3.2.1.3 Молекулски докинг	147
3.2.1.4 Испитивање цитотоксичности	150
4. ЗАКЉУЧАК	152
5. ЛИТЕРАТУРА	154
6. ПРИЛОГ	164
7. БИОГРАФИЈА	170

СКРАЋЕНИЦЕ

4,4'-bipy	- 4,4'-бипиридин
5'-IMP	- инозин-5'-монофосфат
5'-GMP	- гуанозин-5'-монофосфат
A	- апсорпција раствора
A ∞	- апсорпција раствора након „бесконечно“ дуго времена
A2780	- хумане ћелијске линије карцинома јајника
A2780/S	- хумане ћелијске линије карцинома јајника осетљиве на цисплатину
A2780/R	- хумане ћелијске линије карцинома јајника резистентне на цисплатину
A375	- хумане ћелијске линије меланома
A549	- ћелијске линије карцинома плућа
Bel-7402	- хумана ћелијска линија хепатоцелуларног карцинома
BGC-823	- хумана ћелијска линија карцинома желуца
BSA	- говеђи серум албумин
2,2'-bipy	- 2,2'-бипиридин
bpe	- 1,2-bis(4-пиридил)етан
bpma	- bis(2-пиридилметил)амин
CD	- циркуларни дихроизам
CDDC	- цисплатина
CV	- циклична волтаметрија
cyclam	- 1,4,8,11-тетраазациклотетрадекан
dab	- 1,4-диаминобутан
dach	- 1,2-диаминоциклохексан
dadtc	- N-дитиокарбоксииминодиацетат
dah	- 1,6-диаминохексан
damp	- N,N – диметиламинометилфенил
dao	- 1,8-диаминооктан
DCFH-DA	- 2',7'-дихлородихидрофлуоресцеин диацетат
DFT	- теорија функционала густине
dien	- диетилентриамин
DMDT	- N,N – диметилдитиокарбамат
DMF	- N,N – диметилформамид
dmphen	- 2,9-диметил-1,10-фенантролин
DMSO	- диметилсулфоксид
dpe	- 1,2-bis(4-пиридил)етен
dppf	- 1,1'-bis(дифенилфосфино)фероцен
dppm	- 1,1'-bis(дифенилфосфино)метан
DNA	- дезоксирибонуклеинска киселина
dpphen	- 4,7-дифенил-1,10-фенантролин
dtc	- дитиокарбамат
E ⁰	- редокс потенцијал
EB	- етидијум-бромид
en	- етилендиамин
ESDT	- етилсаркозиндитиокарбамат
ESI-MS	- електроспреј јонизациона масена спектрометрија

FACS	- флуоресцентна активација ћелијских сорти
FCS	- деактивирани фетални серум телета
FDA	- управа за храну и лекове
GC	- стаклена угљенична електрода
GSH	- глутатион
Guo	- гуанозин
H ₂ L ^{t-Bu}	- 2,6-bis(5- <i>terc</i> -бутил-1H-пиразол-3-ил)пиридин
HaCaT	- ћелијске линије нормалних хуманих кератиноцита
HCT-116	- ћелијске линије колоректалног канцера
Hepes	- N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етансулфонска киселина
HIV	- вирус хумане имунодефицијенције
HL-60	- хумана ћелијска линија леукемије
HOE	- 2-(4-хидроксифенил)-5-[5-(4-метилпиперазин-1-ил)-бензимидазо-2-ил]-бензимидазол
HOMO	- највиша попуњена молекулска орбитала
HPLC	- течна хроматографија високих перформанси
HSA	- хумани серум албумин
HT-29	- ћелијске линије карцинома црева
IC ₅₀	- половина максималне инхибиторне концентрације
ILT	- трансфер наелектрисања унутар лиганда
Ino	- инозин
IR	- инфрацрвена спектроскопија
K[AuCl ₄]	- калијум-тетрахлоридоаурат(III)
K	- константа везивања за BSA/HSA
K _b	- константа везивања за DNA
K _i	- докинг константа инхибиције
k _{obs}	- константа брзине реакције <i>pseudo</i> -првог реда
K _{sv}	- Stern-Volmer-ова константа
k _q	- константа гашења
L1	- (3-((2-((5-фенил-1H-пиразол-3-ил)метокси)нафтален-3-илокси)метил)-5-фенил-1H-пиразол
L2	- (3-((2-((5-фенил-1H-пиразол-3-ил)метокси)фенокси)метил)-5-фенил-1H-пиразол
L3	- (3-((2-((5-нафтален-2-ил)-1H-пиразол-3-ил)метокси)фенокси)метил)-5-(нафтален-3-ил)-1H-пиразол
L-Cys	- L-цистеин
L-His	- L-хистидин
LMCT	- трансфер наелектрисања са лиганда на јон метала
L-Met	- L-метионин
LS-174	- хумане ћелијске линије карцинома црева
LUMO	- најнижа непопуњена молекулска орбитала
MALDI-TOF MS	- ласерска десорпциона/јонизациона масена спектрометрија
MCF-7	- ћелијске линије карцинома дојке
MCT	- трансфер наелектрисања унутар јона метала
MDA-MB 231	- епителне ћелијске линије карцинома дојке
Me ₂ L ^{t-Bu}	- 2,6-bis(5- <i>terc</i> -бутил-1-метил-1H-пиразол-3-ил)пиридин

Me ₂ *L	- 2,6- <i>bis</i> ((4S,7R)-1,7,8,8-тетраметил-4,5,6,7-тетрахидро-1H-4,7-метаноиндазол-3-ил)пиридин
MLCT	- трансфер наелектрисања са јона метала на лиганд
MRC-5	- ћелијске линије нормалног хуманог фибробласта плућа
MTT	- 3(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид
n	- број везивних места за албумин
NAC	- <i>N</i> -ацетил-L-цистеин
NHC	- <i>N</i> -хетероциклични карбени
NMR	- нуклеарна магнетна резонанца
PBS	- фосфатни пуфер
phen	- 1,10-фенантролин
PI	- пропиридијум јодид
PNH ₂	- 2-(дифенилфосфино)анилин
ROS	- реактивне кисеоничне врсте
SA	- серум албумини
sal ₂ en	- <i>N,N'</i> -етилен- <i>bis</i> (салицилиденамин)
sal ₂ pn	- <i>N,N'</i> -пропилен- <i>bis</i> (салицилиденамин)
S _E	- електрофилне реакције супституције комплексних једињења
S _N	- нуклеофилне реакције супституције комплексних једињења
T-98	- ћелијске линије глиома
terpy	- терпиридин
TgSH	- тиоглукоза
tht	- тетрахидротиофен
TmSH	- тиомалат
Tris	- <i>tris</i> (хидроксиметил)аминометан
Tu	- тиоуреа
UV-Vis	- спектроскопија у ултраљубичастом и видљивом делу спектра
X-ray	- рендгенска структурна анализа
ΔH [‡]	- промена енталпије активирања
ΔS [‡]	- промена ентропије активирања
ΔG	- промена слободне енергије
ΔV [‡]	- запремина активирања
λ _m	- моларна проводљивост



1. ОПШТИ ДЕО

1.1. Опште карактеристике злата

Злато је племенит метал жуте боје. Симбол злата потиче од латинске речи *aurum*, што означава богињу зоре, Аурору. Злато има атомски број 79 у Периодном систему елемената са релативном атомском масом од 196,96654. У основном стању његова електронска конфигурација је $[\text{Xe}]4f^{14}5d^{10}6s^1$. Лако се добија у елементарном стању, а ова форма има кубичну затворену структуру у којој је сваки атом злата окружен са дванаест атома злата. Злато је савитљиво, растегљиво и резистентно на утицај светла, а реагенси попут цијанида или царске воде могу да га растворе. Оксидациона стања злата у једињењима најчешће су +1 и +3.

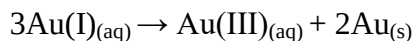
У контролисаним условима раствори Au(III) јона могу се лако редуковати дајући колоидно злато. Колоидно злато може бити црвено, плаво или љубичасто у зависности од методе настајања, величине и облика честица. Површина колоидног злата је негативно наелектрисана, што има за последицу могућност апсорпције метала на површини протеина. Ова карактеристика довела је до употребе колоидног злата као цитохемијског маркера и за испитивање начина везивања протеина помоћу електронског микроскопа.¹ На пример, колоидно злато се може користити за испитивање антигених места на ћелијским површинама, а снимак јетре може се добити коришћењем радиоактивног ^{198}Au као контраста.

Почетком 1980-тих истраживања у области хемије злата нагло су добила на значају, због широког спектра примене било у елементарном стању или у облику једињења. Злато поседује карактеристике које га чине јединственим, као што су хемијска и топлотна стабилност, механичка мекоћа и висока електрична проводљивост. Поседује добру каталитичку активност на ниској температури (200 – 350 K у поређењу са паладијумом и платином који захтевају температуру од 400 – 800 K), а добро је познато да се нека једињења злата(I) успешно користе у лечењу реуматоидног артритиса.²⁻⁴

1.2. Оксидациона стања злата

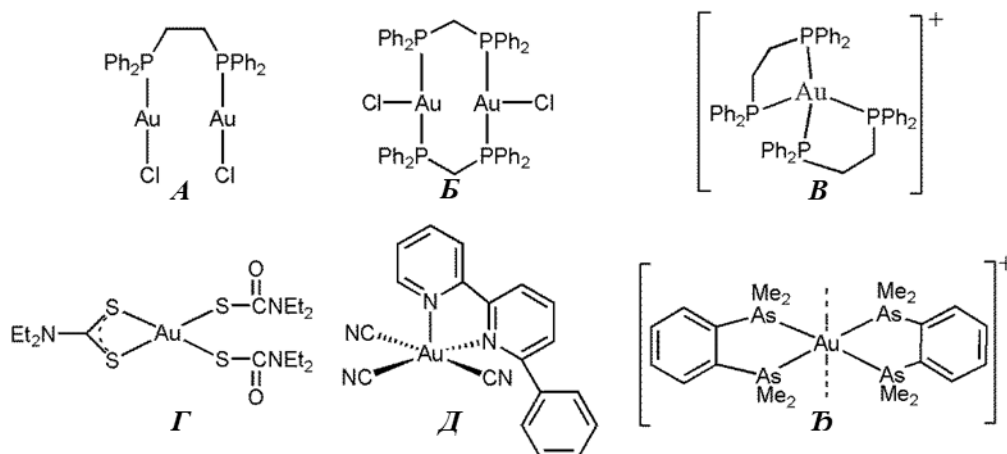
Богата редокс хемија злата повезана је са три главна оксидациона стања: Au(0) , Au(I) и Au(III) . Елементарно злато (метално или колоидно злато) је стабилно, али у присуству одређених супстанци лако подлеже оксидацији. Једињења у којима је оксидационо стање злата +1 или +3 су, такође, интензивно испитивана, укључујући њихово понашање у растворима и реактивност према различитим биомолекулима.⁵⁻⁷ Доказано је да у физиолошким условима може доћи и до преласка из једног у друго оксидационо стање.⁸

Au(I) јон, електронске конфигурације последњег нивоа $5d^{10}$, веома је значајан за биолошку примену, јер као „мека” киселина поседује велики афинитет везивања за лиганде из групе „меких” база. Цијаниди, тиолати и неки халогени елементи (на пример јод) имају тенденцију да формирају стабилне AuX_2^- јоне, док фосфини и арсини формирају различите катјонске комплексе AuL_2^+ и AuL_4^+ типа. Au(I) јон може градити комплексе са координационим бројем 2, 3 или 4, формирајући једињења линеарне, тригоналне или тетраедарске геометрије (слика 1 – једињења **A** – **B**). Ипак, од поменутих комплекса најчешћи су они са линеарном геометријом. Поред наведеног, за Au(I) јон карактеристично је да лако подлеже реакцији диспропорционисања:



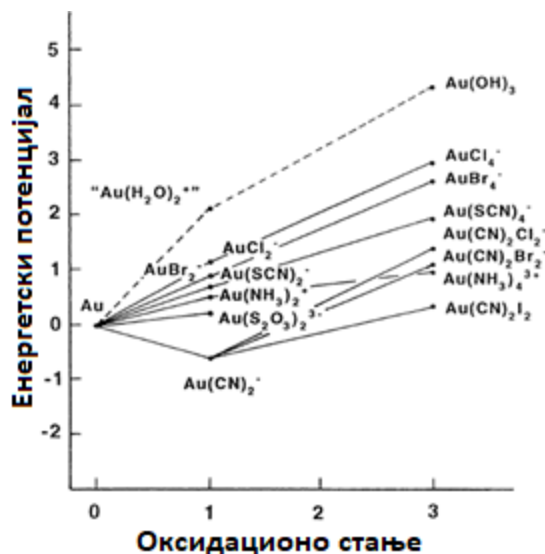
Au(III) јон, електронске конфигурације последњег нивоа $5d^8$, гради комплексе који су изоелектронски и изоструктурни комплексима Pt(II). Доминантна координациона геометрија за Au(III) комплексе је квадратно-планарна, док су познати и комплекси са квадратно-пирамидалном или октаедарском геометријом (слика 1 – једињења Г – Ђ). Реактивност Au(III) јона је велика према „меким” базама. Важно је напоменути да у неким случајевима оксидационо стање +3 може бити додатно стабилизовано избором одговарајућих лиганата, најчешће из групе хелатних азот-донорских једињења.⁹

Au(II) јон је обично интермедијер у различитим биолошким процесима, док Au(V) јон није присутан *in vivo*.



Слика 1. Различите структуре Au(I) комплекса (линеарна А, тригонална Б, тетраедарска В) и Au(III) комплекса (квадратно-планарна Г, квадратно-пирамидална Д, октаедарска Ђ)

На основу дијаграма редокс потенцијала (слика 2) за комплексе злата у различитим оксидационим стањима, може се видети значајна стабилност елементарног злата. Такође, Au(III) комплекси имају високи потенцијал индукован њиховим оксидационим карактеристикама. Многи Au(I) комплекси имају E^0 вредности између потенцијала који одговарају Au(III) комплексима и елементарном злату, што указује на њихову нестабилност и способност за диспропорционисање, док ниже вредности потенцијала за $[Au(CN)_2]^-$ и $[Au(S_2O_3)_2]^{3-}$ доказују стабилизацију јона злата(I) помоћу одговарајућих лиганата.¹⁰

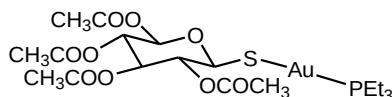


Слика 2. Зависност редокс потенцијала од оксидационог стања злата¹⁰

1.3. Au(I) комплекси

Још 2500 година пре нове ере злато је коришћено у кинеској и арапској медицини, а у осмом веку добило је епитет „еликсир младости“.¹¹ Крајем 19. века Кох (*R. Koh*) је открио да комплекс $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ показује антитуберкулозну активност.^{12,13} У потрази за новим нетоксичним Au(I) комплексима, комплекси са тиолатима заузели су значајно место. „Златна деценија“, која је трајала у периоду од 1925. до 1935. године, заснивала се управо на употреби Au(I) тиолатних комплекса у лечењу туберкулозе.^{14,15}

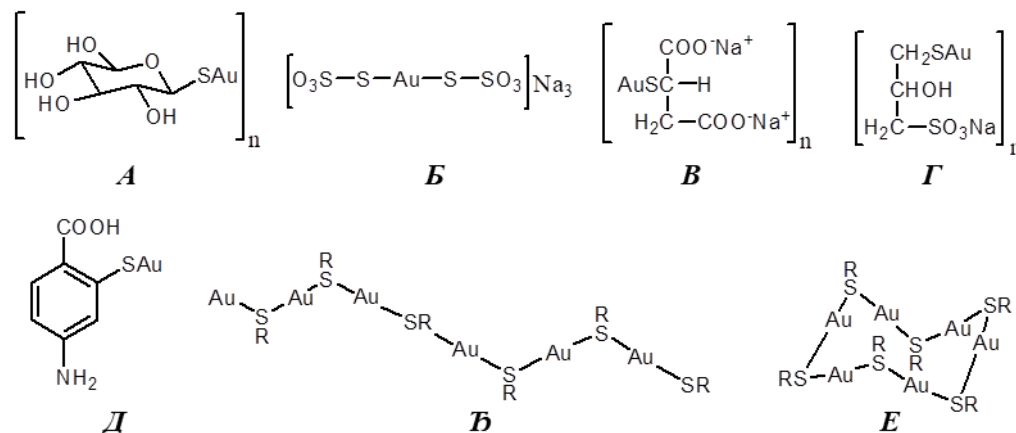
Форестиер (*J. Forestier*) је приметио ефикасност комплекса злата у третману реуматоидног артритиса 1929. године,¹⁶ али су се тек након тридесет година појавили први докази о ефикасности ове терапије. Данас се у лечењу реуматоидног артритиса, поред Au(I) тиолата, користи и Au(I)–фосфински комплекс, ауранофин. Наиме, ауранофин (слика 3), одобрен од стране управе за храну и лекове (FDA) 1985. године, представља липофилни комплекс који се користи у лечењу псоријатичног и реуматоидног артритиса код деце, а тренутно се налази у фази испитивања за употребу као антиасматик.⁴ Потврђено је да се апсорбује 20 – 25 % када се користи у чврстом агрегатном стању, док је ефективна доза много нижа. Међутим, када се користи као раствор (на пример у етанолу) апсорпција је скоро комплетна.¹⁷



Слика 3. Структурна формула ауранофина

Најважнија једињења Au(I) јона која се користе у медицини су тиолатни и фосфински комплекси. Од како је Ланде (*K. Landé*) предложио употребу ауротиоглукозе (солганол –

слика 4, једињење **A**), велики број Au(I) тиолато комплекса се користи мускулатурно за лечење реуматоидног артритиса. Ту спадају ауротиосулфат (санохризин – слика 4, једињење **B**), натријум-ауротиомалат (миохризин – слика 4, једињење **B**), натријум-ауротиопропанол сулфонат (алохризин – слика 4 једињење **Г**) и Au(I) комплекс са 4-амино-2-меркаптобензоевом киселином (крисолган – слика 4, једињење **Д**). Од свих наведених комплекса структуре санохризина и натријум-ауротиомалата су потврђене кристалографском анализом.^{9,18} Остала једињења су изолована у чврстом стању као полимерне форме са могућношћу грађења прстенова или ланаца (слика 4, једињења **Б – Е**).⁹



Слика 4. Au(I)-тиолатни комплекси који се користе за лечење реуматоидног артритиса

Нека једињења, попут Au(I) тиолата (укључујући ауротиомалат и ауротиоглукозу), не улазе у ћелију, већ се радије везују за ћелијску мембрану преко тиола који се налазе на површини. Као последица наведеног, ова једињења могу утицати на ћелијски метаболизам преко ометања нормалних ћелијских путева или „гладовањем” ћелије, због инхибиције уноса хранљивих састојака.^{5,19,20}

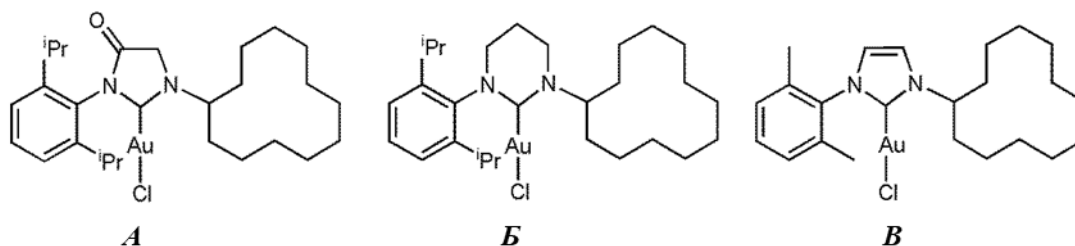
Хемија водених раствора комплекса Au(I) интензивно је проучавана.^{21,22} Добијени резултати су указали да су тиолато лиганди лабилнији од фосфинских. Код ауротиомалата супституција тиолата се одвија преко асоцијативног механизма и повезана је са интермедијером тригоналне геометрије, док се полимерни комплекси разлажу на мономерне комплексе типа $[Au(SR)_2]^-$. Такође, утврђено је да тиоли који поседују најнижу pK_a вредност граде најстабилније комплексе. Тако, стабилност миохризина или 1-ауротиоглукозе, са биолошки важним лигандима опада у низу: метил естар цистеина, D -пеницилинамин $> \beta$ - D -тиоглукоза $> N$ -ацетилцистеин $>$ глутатион $\approx$ тиомалат $\approx$ меркаптоацетат.²³ Из тог разлога се D -пеницилинамин и 2,3-димеркаптопропанол користе као агенси за уклањање злата из организма у случају појаве токсичности.^{24,25}

Поред наведеног, доказано је да Au(I) комплекси који садрже фосфинске лиганде инхибирају пролиферацију туморских ћелија *in vitro*, али нажалост недовољна *in vivo* ефикасност, значајна нефротоксичност и хемијска нестабилност ограничавају њихову употребу.²⁶

Комплекс који садржи Au(I) јон, $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$, представља метаболит нормално присутан у крви и урину пацијената који су користили лекове на бази злата.⁵ $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ може настати преко два процеса који укључују формирање хипотиоцијанита или хипохлорне киселине.⁹ Наиме, велики број студија (извођене на животињама и на људима) показују да су Au(I) једињења, која се користе у клиничке сврхе као агенси против артритиса, уствари про-лекови, јер подлежу различитим хемијским реакцијама да би наградили фармаколошки активне врсте.^{5,27} Ове трансформације заправо подразумевају брзе реакције измене лиганата. С тим у вези, резултати испитивања супституционих реакција комплекса $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ са тиолима (тиомалат – TmSH, тиоглукоза – TgSH, L-цистеин – L-Cys, глутатион – GSH) показали су да поменути молекули могу да замене цијанидни лиганд формирајући комплексе $[\text{Au}(\text{SR})\text{CN}]^-$ или $[\text{Au}(\text{SR})_2]^-$ типа.²⁸

Пошто $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ (дицијанидоаурат(I)), злато(I)–глутатионски комплекси и злато(I)–протеин производи играју важну улогу у *in vivo* метаболизму једињења злата(I),⁵ испитиване су њихове интеракције са хуманим серум албумином (HSA), у циљу дефинисања термодинамички стабилних једињења која се могу транспортовати путем крви.⁷ У случају комплекса $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ реакциони механизам укључује примарно нековалентно везивање за HSA, које је праћено супституцијом цијанидног лиганда и директном координацијом јона метала за албумин.^{29,30}

Недавно је испитивана стабилност и реактивност неких Au(I) карбенских комплекса (слика 5, комплекси **A** – **B**).³¹ У присуству сумпор–донорских нуклеофила и јодида испитивани комплекси показали су задовољавајућу стабилност у процесу супституције. За поменута испитивања коришћени су тиоуреа (Tu), L-цистеин (L-Cys), глутатион (GSH) и L-метионин (L-Met). Међутим, у присуству азот–донорског нуклеофила L-хистидина (L-His) детектована су два реакциона корака у процесу супституције.³¹



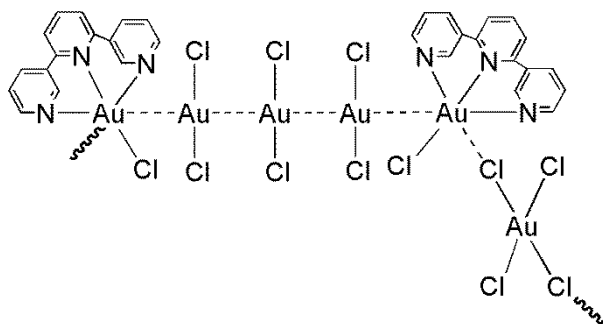
Слика 5. Au(I) карбенски комплекси³¹

1.4. Аурофилне интеракције

Аурофилне интеракције, које се заснивају на формирању злато-злато хемијске везе, постају предмет детаљних испитивања последњих деценија. Нека једињења код којих постоје ове врсте интеракција синтетисана су здруживањем мононуклеарних Au(I) комплекса са координационим бројем 2 истог наелектрисања или коришћењем хипервалентних врста у којима један централни јон злата везује различити број других јона злата.³²

Најјаче аурофилне интеракције се јављају код једињења са Au(I)–Au(I) везом, али су примећене и код једињења која поседују Au(I)–Au(III) и Au(III)–Au(III) везе.³²

$[\text{AuCl}(\text{terpy})]_2[\text{AuCl}_2]_3[\text{AuCl}_4]$ добијен је као нерастворан секундарни производ у реакцији $[\text{HAuCl}_4]$ са терпиридином (terpy). Структура овог комплекса (слика 6) састоји се од три линеарна $[\text{AuCl}_2]^-$ ањона, који су повезани са два $[\text{AuCl}(\text{terpy})]^{2+}$ катјона преко аксијалне $\text{Au(I)}-\text{Au(III)}$ везе. Истовремено, $[\text{AuCl}(\text{terpy})]^{2+}$ катјони се даље везују за хлорид из квадратно-планарног $[\text{AuCl}_4]^-$ јона, што доводи до формирања бесконачног ланца.³³



Слика 6. Структурна формула комплекса $[\text{AuCl}(\text{terpy})]_2[\text{AuCl}_2]_3[\text{AuCl}_4]^{33}$

$\text{Au(I)}-\text{Au(I)}$ комплекс са метилентиофосфином као мостним лигандом (схема 1, једињење А),³⁴ оксидационом адицијом може формирати $\text{Au(I)}-\text{Au(III)}$ једињење (схема 1, једињење Б). На основу резултата кристалографске анализе, закључено је да је растојање између јона метала у случају $\text{Au(I)}-\text{Au(III)}$ комплекса веће.

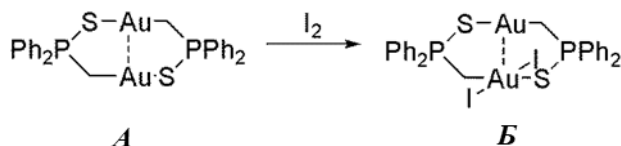
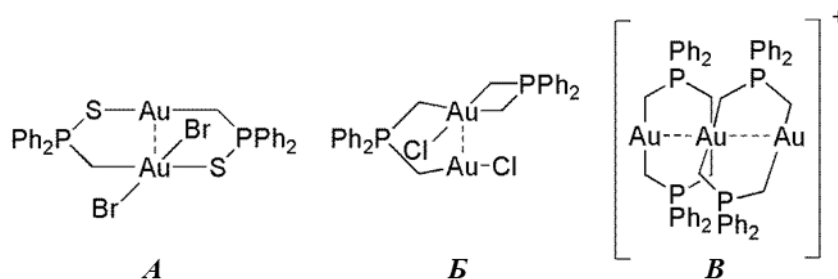
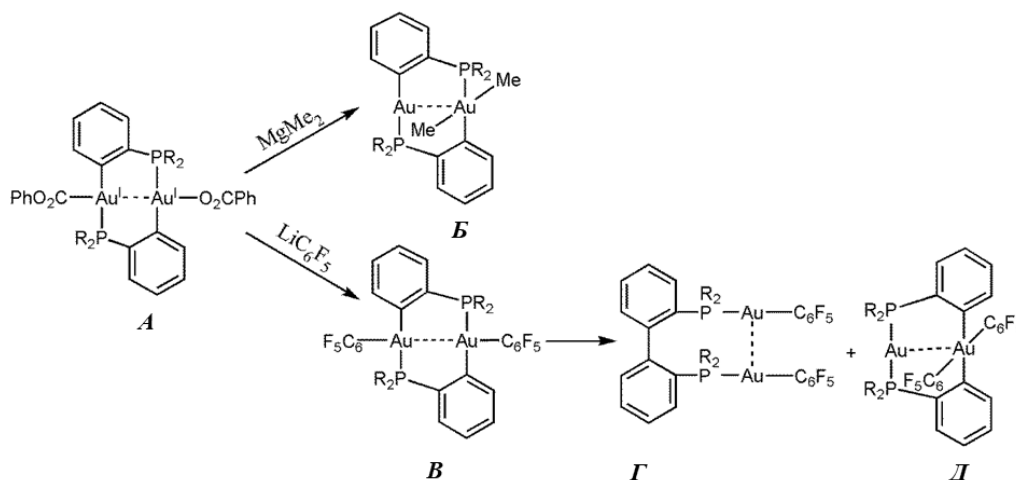


Схема 1. $\text{Au(I)}-\text{Au(I)}$ и $\text{Au(I)}-\text{Au(III)}$ комплекси са метилентиофосфином као мостним лигандом³⁴

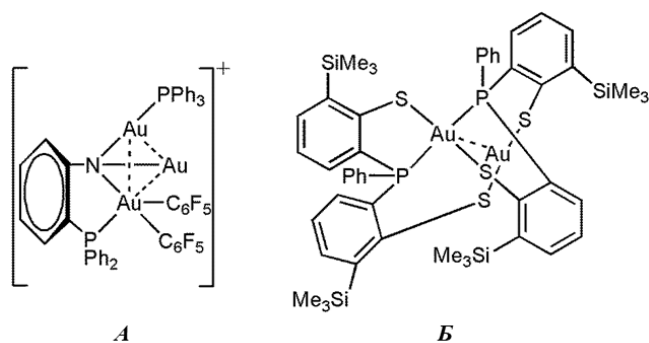
Различита оксидациона стања јона злата су потрђена и у случају једињења чије су структуре приказане на слици 7.³⁵ Комплекс $[\text{Au}_2\text{Br}_2\{(\text{CH}_2)_2\text{PPh}_2\}_2]$ (слика 7 – једињење А) је анализиран применом фотоелектронске спектроскопије и кристалографске анализе. Такође, изомеризацијом комплекса $[\text{Au}_2\text{Cl}_2\{(\text{CH}_2)_2\text{PPh}_2\}_2]$ (слика 7 – једињење Б) настаје једињење В (слика 7), код кога је растојање између јона метала веће.

Слика 7. Примери једињења са Au(I)–Au(III) везом³⁵

Комплекс $[\text{Au}_2(\text{O}_2\text{CPh})\{2-(\text{PR}_2)\text{C}_6\text{H}_4\}_2]$ ($\text{R} = \text{Et}, \text{Ph}$) (једињење **A**) може да награди једињења **B** – **D** на основу реакција које су приказане на схеми 2. Комплекс **B** (схема 2) се након дужег загревања разлаже на производ са Au(I)–Au(I) везом (схема 2, једињење **Г**) и производ са Au(I)–Au(III) везом (схема 2, једињење **Д**). На основу кристалографских података, нађено је да су везе између јона злата у комплексима **B** и **B** (схема 2) исте дужине.³²

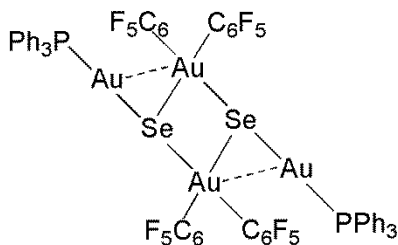
Схема 2. Реакције разлагања комплекса $[\text{Au}_2(\text{O}_2\text{CPh})\{2-(\text{PR}_2)\text{C}_6\text{H}_4\}_2]$ (**A**) ($\text{R} = \text{Et}, \text{Ph}$) на производ са Au(I)–Au(I) везом (**Г**) или са Au(I)–Au(III) везом (**Д**)³²

У комплексу $[\text{Au}_3(\text{C}_6\text{F}_5)_2(\text{PNH}_2)(\text{PPh}_3)_2]$ ($\text{PNH}_2 = 2-(\text{дифенилфосфино})\text{анилин}$) атом азота повезује два Au(I) и један Au(III) јон (слика 8 – једињење **A**),³⁶ а у комплексу $[\text{Au}_2\{\text{PhP}(\text{C}_6\text{H}_3-2-\text{S}-3-\text{SiMe}_3)_2\}_2]$ (слика 8 – једињење **B**) тридентатни лиганд повезује два јона метала.³⁷ Публиковани резултати потврђују да су Au(I)–Au(III) везе у комплексу **A** (слика 8) нешто дуже.³⁶



Слика 8. Структурне формуле комплекса $[\text{Au}_3(\text{C}_6\text{F}_5)_2(\text{PNH}_2)(\text{PPh}_3)_2]^+$ (**A**) и $[\text{Au}_2\{\text{PhP}(\text{C}_6\text{H}_3\text{-}2\text{-S-}3\text{-SiMe}_3)_2\}_2]$ (**B**)^{36,37}

Једињење са $\text{Au(I)}\text{--}\text{Au(III)}$ везом које садржи селен као мостни лиганд приказано је на слици 9. Теоријски прорачуни за комплексе злата са халкогеним лигандима подржавају присуство $\text{Au(I)}\text{--}\text{Au(III)}$ интеракција, које су слабије од $\text{Au(I)}\text{--}\text{Au(I)}$ интеракција за 21 – 25 kJ/mol.^{37,38}



Слика 9. Структурна формула комплекса $[\text{Au}_4(\mu\text{-Se})_2(\text{C}_6\text{F}_5)_4(\text{PPh}_3)_2]^{32}$

Међутим, уколико се атом селена замени атомом сумпора долази до скраћивања $\text{Au(I)}\text{--}\text{Au(III)}$ везе. Једињење $[(\text{C}_6\text{F}_5)_3\text{Au}(\text{SHC}_6\text{H}_4\text{NH}_2)(\text{Au}(\text{dppm})\text{Au})(\text{SHC}_6\text{H}_4\text{NH}_2)\text{Au}(\text{C}_6\text{F}_5)_3]$ ($\text{dppm} = 1,1'\text{-bis(дифенилфосфино)метан}$) (**B**) добијено је реакцијом која је приказана на схеми 3.

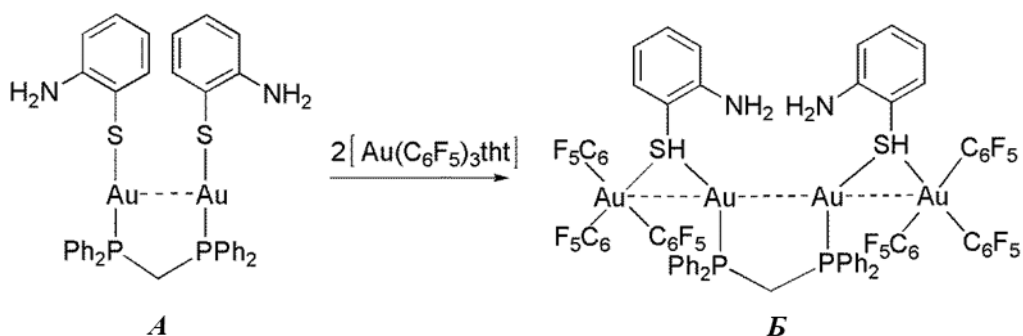
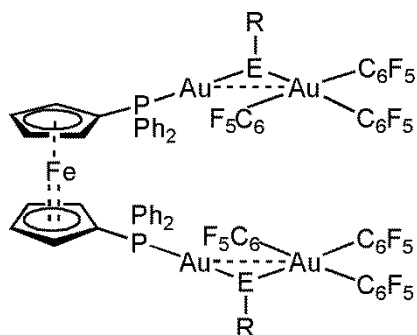


Схема 3. Синтеза комплекса
 $[(C_6F_5)_3Au(SHC_6H_4NH_2)(Au(dppm)Au)(SHC_6H_4NH_2)Au(C_6F_5)_3]^{32}$

Ово једињење садржи два Au(I) и два Au(III) јона. Au(I)–Au(I) растојање у прекурору је знатно дуже него у тетрануклеарном производу.

У комплексу $[Au_4(C_6F_5)_6(ER)_2(dppf)]$ ($E = S, R = C_6F_5$; $E = Se, R = Ph$, dppf = 1,1'-bis(дифенилфосфино)фероцен) (слика 10), који садржи сумпор, Au(I)–Au(III) везе су по дужини између вредности које су добијене за комплекс са селеном.³⁹



Слика 10. Комплекс $[Au_4(C_6F_5)_6(ER)_2(dppf)]^{32}$

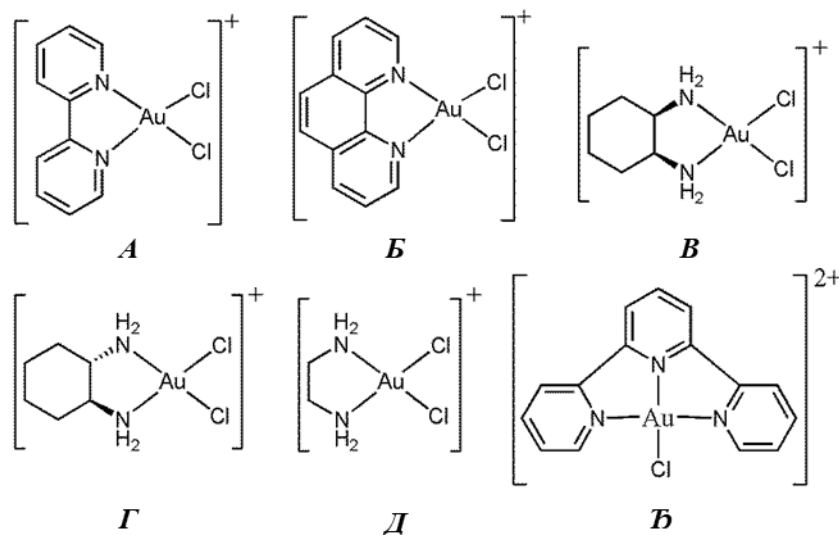
Нека од поменутих једињења имају способност луминесценције.³² Иако се луминисценција комплекса може приписати различитим факторима, као што су трансфер наелектрисања унутар лиганда (ILT – intraligand transitions), трансфер наелектрисања са лиганда на јон метала и обрнуто (LMCT; MLCT – ligand to metal or metal to ligand charge transfer transitions), трансфер наелектрисања унутар јона метала (MCT – metal centered transitions), за многе комплексе злата су управо аурофилне интеракције одговорне за ову појаву.³²

1.5. Au(III) комплекси

Иако су Au(III) комплекси мање испитивани у односу на Au(I) комплексе, добро је познато да Au(III) јон гради стабилна једињења са лигандима који као донорске атоме садрже азот, фосфор, сумпор, а у неким случајевима и кисеоник. Такође, органометална хемија злата је веома значајна, јер су многи биолошки активни комплекси синтетисани полазећи управо од органометалних Au(III) прекурсора.¹³

1.5.1. Комплекси са азот-донорским лигандима

Азот-донорски лиганди су често коришћени за синтезу различитих Au(III) комплекса. Наиме, публиковани резултати су показали да увођење лиганда који садрже азот као донорски атом може значајно да утиче на додатну стабилизацију Au(III) јона.¹³ Структурне формуле неких комплекса су приказане на слици 11.



Слика 11. Au(III) комплекси са азот-донорским лигандима¹³

Супституционе реакције комплекса А, Б и Д (слика 11) са нуклеофилима, као што су инозин (Ino), инозин-5'-монофосфат (5'-IMP), гуанозин-5'-монофосфат (5'-GMP) и L-хистидин (L-His), испитиване су применом “stopped-flow” технике.⁴⁰ У случају L-His, координација се врши преко N(3) атома имидазоловог прстена, док се у случају осталих нуклеофила координација врши преко N(7) атома пуринске базе. Такође, L-His, као најмање волуминозан нуклеофил, показао је највећу реактивност. На основу података кинетичких испитивања доказано је да се ове реакције одвијају преко асоцијативног механизма,⁴⁰ док су резултати испитивања интеракција комплекса Б и Д (слика 11) са DNA потврдили чињеницу да је електростатичко везивање доминантно.⁴¹

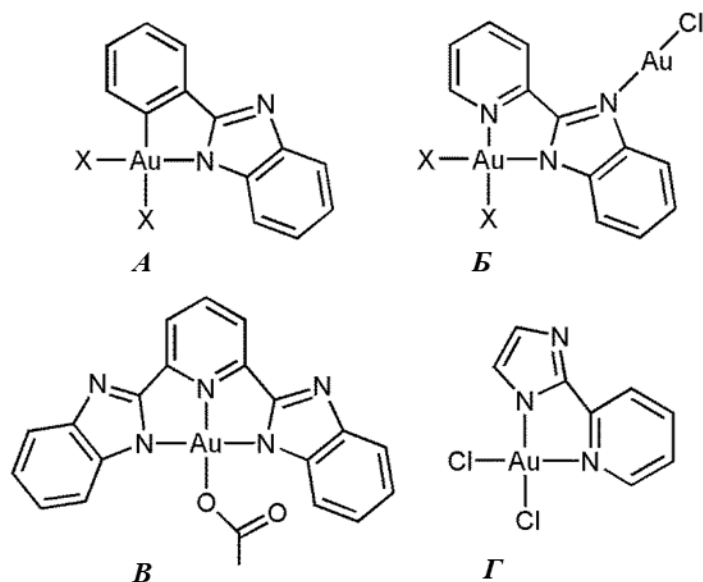
Резултати испитивања комплекса Б (слика 11) показали су да је он стабилан у воденом раствору неколико сати, чак и у физиолошким условима.⁴² Такође, поред значајног утицаја на повећање стабилности, крути бидентатни лиганд фенантролин омогућава

формирање пентакоординованог Au(III) деривата, као што је комплекс $[\text{Au}(\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NMe}_2)(\text{phen})(\text{PPh}_3)]^{2+}$.⁴³ Наиме, пентакоординовани Au(III) комплекс који садржи 2,9-диметил-1,10-фенантролин, као и квадратно-планарни Au(III) комплекс који садржи 4,7-дифенил-1,10-фенантролин су изучавани у оквиру ове дисертације.

Au(III) јон, такође, гради комплексе квадратно-планарне геометрије са полипиридинским лигандима, као што је терпиридин (terpy), и дериватима пиразола $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$,⁴⁴ $[\text{Au}(\text{py}_2\text{CHpy})\text{Me}_2]^+$,⁴⁵ $[\text{AuCl}_2(\mu\text{-pz})]_2$ и $[\text{Au}\{\text{N,N}'\text{-(pz)}_3\text{BH}\}_2](\text{ClO}_4)^{46}$. Структура комплекса са терпиридином приказана је на слици 11 – једињење **Ђ**. Испитивање супституционих реакција овог комплекса са Ino, 5'-IMP, 5'-GMP и L-His потврдило је исти редослед реактивности нуклеофила као у случају комплекса **А**, **В**, **Г** и **Д** (слика 11). Поред тога, резултати испитивања интеракција са DNA указали су да комплекс **Ђ** (слика 11) показује већу вредност константе везивања у поређењу са комплексом **Б** (слика 11).³¹

Мононуклеарни комплекси $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ (слика 11, једињење **А**) и $[\text{Au}(\text{phen})\text{Cl}_2]^+$ (слика 11, једињење **Б**) показали су јако добре *in vitro* антипролиферативне карактеристике на различитим канцерогеним ћелијским линијама.^{47,48} Поред тога, испитивана је цитотоксичност комплекса $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ (слика 11, једињење **А**), $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ (слика 11, једињења **В** и **Г**) и $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ (слика 11, једињење **Д**) према епителним ћелијама хуманог карцинома плућа. Комплекс $[\text{Au}(\text{bipy})\text{Cl}_2]^+$ (слика 11, једињење **А**) је показао највећу цитотоксичност, са активношћу која је јако блиска цисплатини.⁴⁹ Исаб (*A. A. Isab*) и сарадници испитивали су цитотоксичност два изомера комплекса $[\text{Au}(\text{dach})\text{Cl}_2]^+$ (слика 11 – једињења **В** и **Г**) и дошли до закључка да *cis*-изомер показује већу активност у поређењу са *trans*-изомером.⁵⁰ Даља испитивања су утврдила минималну цитотоксичност комплекса $[\text{Au}(\text{en})\text{Cl}_2]^+$ (слика 11 – једињење **Д**) на ћелијским линијама карцинома бубрега и јетре. Комплекс $[\text{Au}(\text{phen})\text{Cl}_2]^+$ (слика 11 – једињење **Б**) је показао значајну цитотоксичност на A2780 ћелијским линијама тумора, које су осетљиве и резистентне на цисплатину.^{47,48}

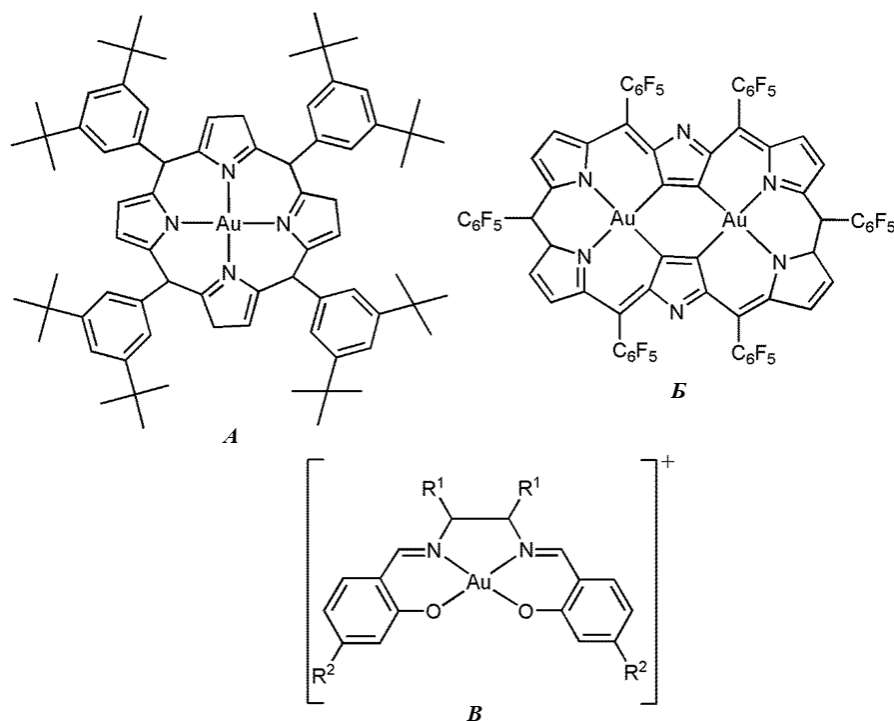
Au(III) комплекс са 2-(2'-пиридил)бензимидазолом (слика 12, једињење **А**) изазива инхибицију раста две репрезентативне ћелијске линије карцинома јајника, од којих је једна осетљива на цисплатину (A2780/S), а друга резистентна на цисплатину (A2780/R). Сличне цитотоксичне карактеристике показује и комплекс типа **Б** – слика 12, док је најбоља антипролиферативна активност добијена у случају деривата са фосфинима.⁵¹ Слични лиганди, који укључују тридентатни 2,6-*bis*(2'-бензимидазол)пиридин, коришћени су за синтезу Au(III) комплекса, а добијена једињења су показала значајну цитотоксичну активност према A2780 и MCF-7 ћелијским линијама (слика 12 – једињења **В** и **Г**).⁵²



Слика 12. Au(III) комплекси са супституисаним бензимидазолима

1.5.2. Комплекси са порфиринима

Au(III) порфирински комплекси коришћени су као акцептори у порфиринским дијадама и тријадама, због њихове способности да се лако редукују, хемијски или фотохемијски.¹³ Нови начин координовања Au(III) јона за порфирине (слика 13 – једињење А) описан је као диспропорционисање [Au(tht)₂](BF₄) (tht = тетрахидротиофен) у реакцији са порфиринима при благим експерименталним условима.⁵³ Такође, металација [16]–хексапирина са Na[AuCl₄] резултује настајањем ароматичног Au(III) комплекса (слика 13 – једињење Б), док двоелектронска редукција поменутог хексапирина доводи до губитка ароматичности.⁵⁴



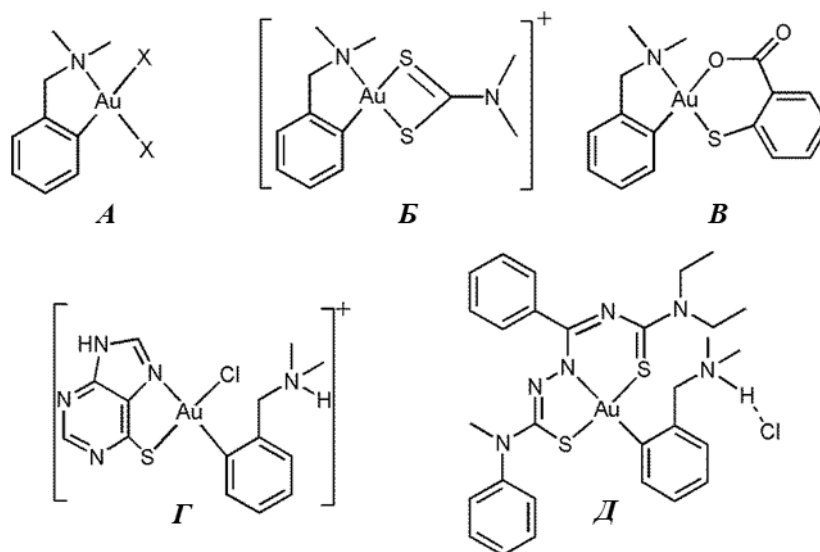
Слика 13. Au(III)-порфирински (А и Б) и комплекс са Шифовом базом као лигандом (В)¹³

Порфирински лиганди додатно стабилизују Au(III) јон и утичу на смањење њихове редокс реактивности.¹⁹ Ови комплекси су, такође, стабилни и у присуству природних редуктаната, као што је глутатион.⁵⁵ Пошто је редукција Au(III) до Au(I) или Au(0) онемогућена, биолошка активност Au(III)–порфиринских комплекса одиграва се без промене у структури. У односу на ове резултате постављена је хипотеза да је главна мета ових комплекса DNA, везивање преко интеркалације, док новије студије показују да поменути комплекси могу имати утицај и на митохондријалну функцију.⁵⁶

Порфирински Au(III) комплекси (слика 13 – једињење А) показују антипролиферативни ефекат према различитим канцерогеним ћелијским линијама (као што су карцином носа и карцином дебелог црева), укључујући цисплатина-осетљиве и цисплатина-резистентне ћелијске линије *in vitro* и *in vivo*.⁵⁷ Присуство различитих супституената на порфиринском лиганду може да промени физичко–хемијске карактеристике комплекса, повећавајући њихову растворљивост у води, растворљивост у органским растварачима, цитотоксичну активност итд.⁵⁸ Инкапсулација цитотоксичних порфиринских комплекса или Au(III) комплекса са Шифовим базама (слика 13 – једињење В) у желатинским микрокапсулама повећава њихову стабилност у раствору и повећава *in vivo* ефикасност у односу на некапсулиране комплексе.⁵⁹

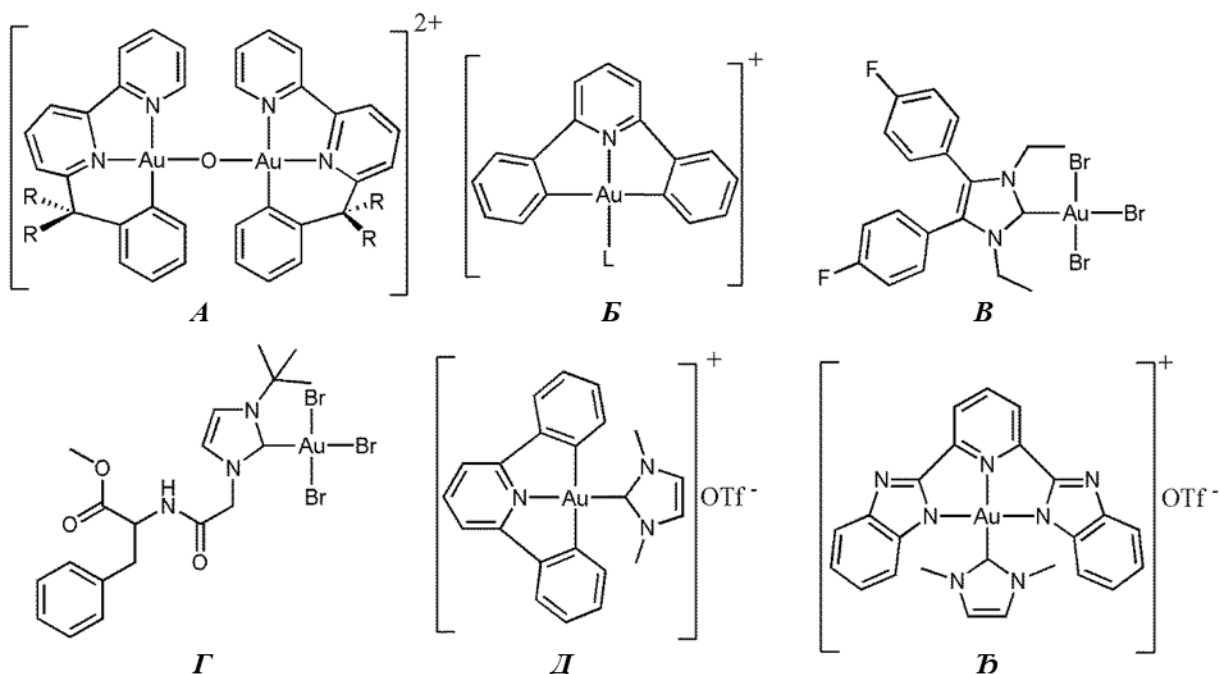
1.5.3. Органометални комплекси

Типични представници прве генерације органометалних Au(III) комплекса приказани су на сликама 14 и 15. Ови комплекси садрже *N,N*-диметиламинометилфенил (damp⁻) као лиганд, док матични комплекс [Au(damp)X₂] може имати различите структуре (слика 14 – једињење А, X = Cl⁻, SCN⁻, CH₃COO⁻, C₂O₄²⁻, CO₂CH₂CO₂²⁻). Наиме, ови комплекси су показали активност на неколико туморских ћелијских линија, док су ацетатни и малонатни комплекси показали активност сличну цисплатини и *in vivo*.⁶⁰ Засновано на овим резултатима, остали комплекси синтетисани су супституцијом монодентатног лиганда у комплексу [Au(damp)X₂]⁶¹ монодентатним или хелатним тионима, тиолима или меркаптопуринима (слика 14 – једињења Б – Г). Како присуство damp⁻ лиганда ефективно спречава редукцију Au(III) јона тиолима добијен је велики број стабилних тиосемикарбазонских комплекса.¹³ Поред тога, синтетисани су и одговарајући SNS-донорски тиосемикарбазонски хибридни комплекси (слика 14 – једињење Д). Цитотоксичност ових једињења испитивана је на MCF7 ћелијским линијама карцинома дојке. Резултати су показали вредности које се могу поредити са цисплатином.



Слика 14. Структуре органометалних Au(III) комплекса прве генерације¹³

Месори (*L. Messori*) и сарадници су синтетисали два динуклеарна комплекса са оксо-мостним лигандом, изведена из бензил-2,2'-бипиридина (слика 15 – једињење А (за први комплекс R = H, R' = CH₃, док је за други комплекс R = R' = CH₃)). Ова једињења су показала високу редокс стабилност чак и у присуству биолошких редукуюћих агенаса, као што су аскорбинска киселина и глутатион. Упркос доброј стабилности, ова једињења су показала значајну цитотоксичност на различитим туморским ћелијским линијама.⁶²



Слика 15. Структуре неких органометалних Au(III) комплекса¹³

Последњих година често се користе *N*-хетероциклични карбени (NHC) као лиганди.¹³ NHC комплекси Pt(II), Pd(II), Cu(II), Ag(I), Ru(II) и Ni(II) су показали цитотоксични ефекат који може да се пореди са цисплатином, док су комплекси Ag(I), Pt(II) и Ru(II) у *in vivo* испитивањима показали значајну ефикасност.⁶³

Неки органометални Au(III) комплекси добијени су оксидацијом одговарајућих Au(I) једињења, једињења Б – Г – слика 15.^{64,65} Комплекс Б (слика 15) показао је цитотоксичност која је у рангу резултата добијених за одговарајући Au(I) комплекс на неколико туморских ћелијских линија. Једино је у случају HT-29 ћелијских линија карцинома црева Au(III) комплекс био мање активан.⁶⁴ Сличан ефекат добијен је и за једињења типа $[\text{Au}(\text{NHC})_2\text{X}_2]^+$ (NHC = *N*-хетероциклични карбен; X = Br⁻, I⁻), која су показала високе инхибиторске ефекте према MCF-7 (ћелијске линије карцинома дојке), MDA-MB 231 (епителне ћелијске линије карцинома дојке) и HT-29 (ћелијске линије карцинома црева) ћелијским линијама у односу на цисплатину.

Група редокс-инертних Au(III) комплекса са 2,6-дифенилпиридил лигандом, који јако стабилизује Au(III) јон, представљена је формулом Б – слика 15 (L = азот–донорски лиганди или фосфин). Ова једињења су показала добру антитуморску активност.¹³ Потом, катјонски комплекс са 1,3-диметилимидазол–2-илиденом, једињење Д – слика 15, је показао добру активност у *in vitro* и *in vivo* условима и способност да индукује поремећај DNA ланца, што за последицу има ћелијску смрт.⁶⁶ Овај комплекс такође поседује фотоиндуковану цитотоксичност.^{67,68}

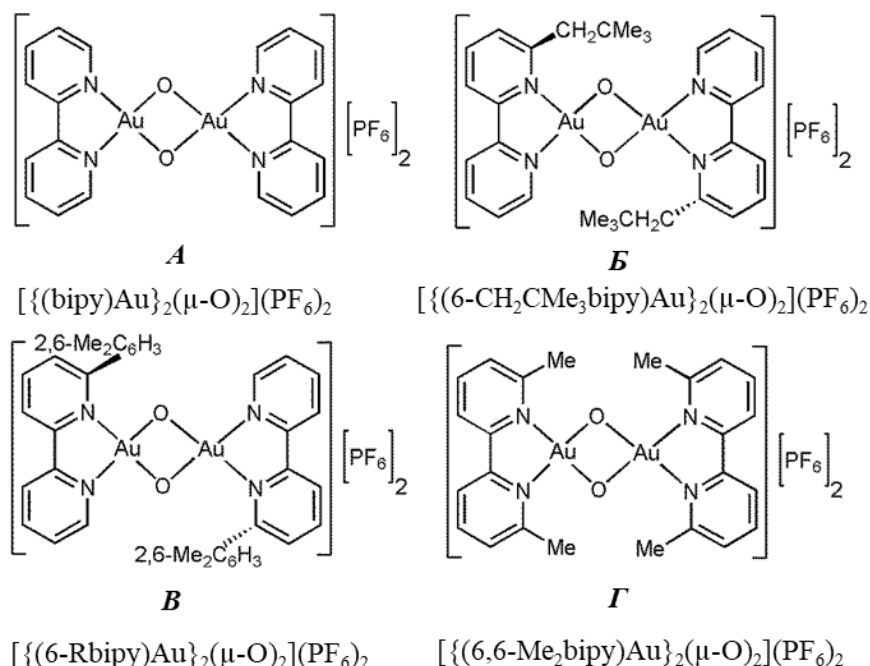
Брза унутарћелијска редукција неких органометалних Au(III) једињења до одговарајућих Au(I) комплекса омогућава њихову употребу и у флуоресцентној микроскопији. Au(III) комплекс Б – слика 15 садржи лиганд чија флуоресцентна способност опада услед координације за Au(III) јон. Међутим, након редукције комплекса

унутар ћелије, која је праћена отпуштањем лиганда, детектована је јака емисија у плавом делу видљивог спектра, што се управо користи за ћелијско снимање.⁶⁹

1.5.4. Комплекси са халкогеним лигандима

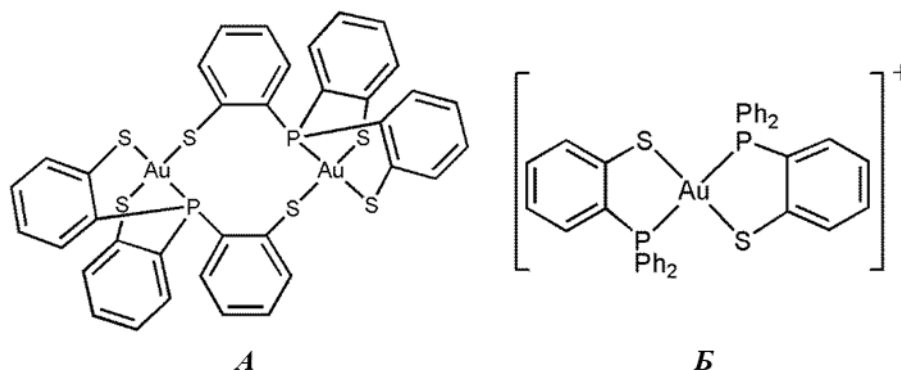
Au(III) јон формира веома стабилне комплексе са халкогеним лигандима, углавном са сумпор–донорским.¹³ Међутим, познати су и комплекси који садрже стабилну Au(III)–O везу, као што су хидроксо– и оксо–комплекси. Хидроксо–комплекси настају од одговарајућег Au(III) прекурсора у реакцији са NaOH или KOH у воденом раствору, док се оксо–комплекси добијају депротонацијом или кондензацијом хидроксидних врста.⁷⁰ Неки оксо–комплекси су показали антипролиферативни ефекат и способност везивања за DNA.⁷¹

Динуклеарни Au(III) комплекси са кисеоничним мостним лигандима, опште формуле $[Au_2(\mu-O)_2(N-N)_2](PF_6)_2$ (где је N-N = 2,2'-бипиридин или супституисани 2,2'-бипиридин), показали су значајну стабилност у физиолошким условима и антипролиферативни ефекат (слика 16, једињења А – Г). Ова једињења садрже заједничку структуру која је сачињена од Au_2O_2 „дијамантског језгра“, повезаног са два бипиридинска лиганда. Доказано је да увођење различитих алкил– или арил–супституената у позицији 6 и 6' на бипиридину јако утиче на реактивност ових комплекса. Једињење које садржи 6,6'-диметил дериват бипиридина (слика 16, једињење Г) показује највећу девијацију структуре, највећу оксидациону моћ, најмању термичку стабилност, али и највећу цитотоксичну активност. Позитивна корелација између оксидационе моћи и антипролиферативне активности била је од великог интереса за даља испитивања.⁷²



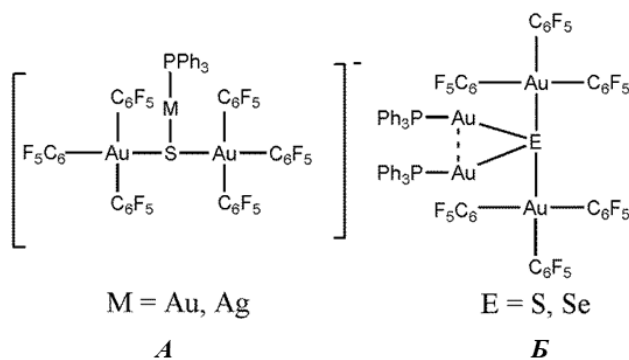
Слика 16. Динуклеарни Au(III) комплекси са кисеоничним мостним лигандима¹³

Неки Au(III) комплекси добијени су употребом мешовитих доворских лиганда, као што су фосфино-тиолати $\text{PhP}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SH})_2$ или $\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SH})_3$. Први лиганд гради динуклеарни Au(III) комплекс $[\text{Au}_2\{\text{P}(\text{C}_6\text{H}_4\text{S})_3\}_2]$ (слика 17 – једињење А), док реакцијом $[\text{AuCl}_4]^-$ са два еквивалента 2–(дифенилфосфино)бензотиола настаје катјон, који је изолован из раствора као тетрафенилборатна со, $[\text{Au}(2\text{-PPh}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{S})_2](\text{BPh}_4)$ (слика 17 – једињење Б).³²



Слика 17. Au(III) комплекси са фосфино-тиолатним лигандима³²

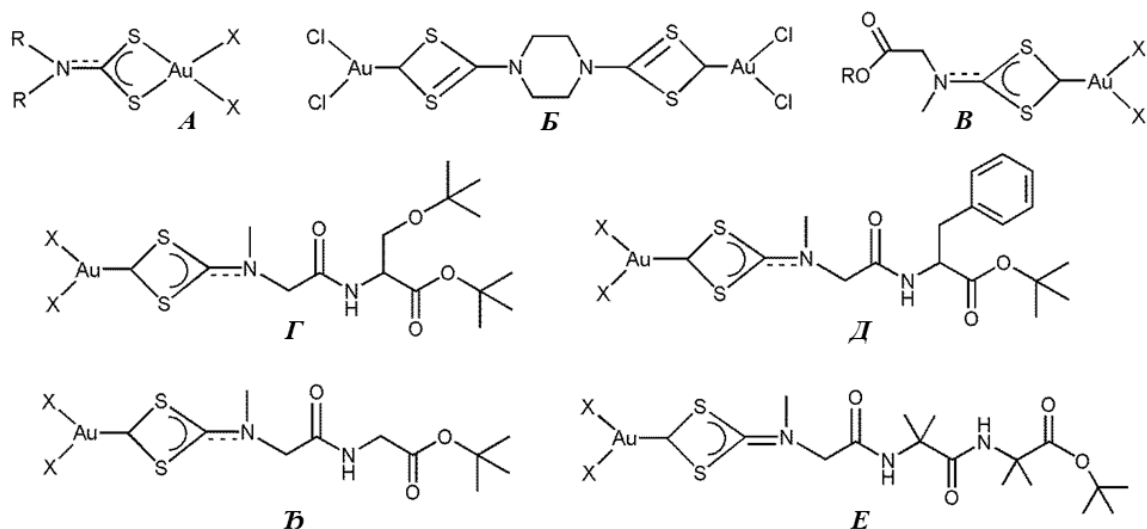
Au(III) комплекси са лигандима који садрже сумпор или селен као доворски атом такође су синтетисани.³² Супституција протона у једињењу $\text{NBu}_4[\text{Au}(\text{C}_6\text{F}_5)_3(\text{SH})]$ помоћу MPPH_3^+ ($\text{M} = \text{Au}, \text{Ag}$) доводи до формирања комплекса $\text{NBu}_4[\text{Au}(\text{C}_6\text{F}_5)_3(\text{SMPPH}_3)]$ (слика 18 – једињење А).⁷³ Комплекс $[\text{E}(\text{AuPPH}_3)_2\{\text{Au}(\text{C}_6\text{F}_5)_3\}_2]$ (у коме је $\text{E} = \text{S}, \text{Se}$) (слика 18 – једињење Б) садржи различите валенце атома злата и поседује тетрадарску структуру.⁷⁴ У случају овог комплекса аурoфилне Au(I)–Au(III) интеракције су слабије од одговарајућих Au(I)–Au(I) интеракција.⁷⁴



Слика 18. Au(I)-Au(III) комплекси са мостним халкогеним лигандима³²

Цитотоксична активност и хемијске карактеристике дитиокарбаматних Au(III) комплекса испитиване су од стране Фрегона (*D. Fregona*) и сарадника.⁷⁵ Комплекси типа $[\text{AuX}_2(\text{dte})]$ (у којима је $\text{X} = \text{Cl}^-, \text{Br}^-$; dte = различити дитиокарбаматни лиганди; формуле А – В на слици 19), синтетисани су у циљу добијања једињења са сличним карактеристикама

у односу на цисплатину. Компаративна *in vitro* цитотоксична испитивања између изоструктурних Pt(II), Pd(II) и Au(III) комплекса показала су највећу активност једињења Au(III), чак и на ћелијским линијама које су суштински резистентне на утицај цисплатине.⁷⁶ Њихове антитуморске карактеристике су потврђене и *in vivo*, заједно са незнатном акутном токсичношћу.⁷⁷ Међутим, покушаји да се повећа активност дитиокарбаматних комплекса дизајнирањем динуклеарног комплекса **Б** на слици 19 нису били успешни.⁷⁸

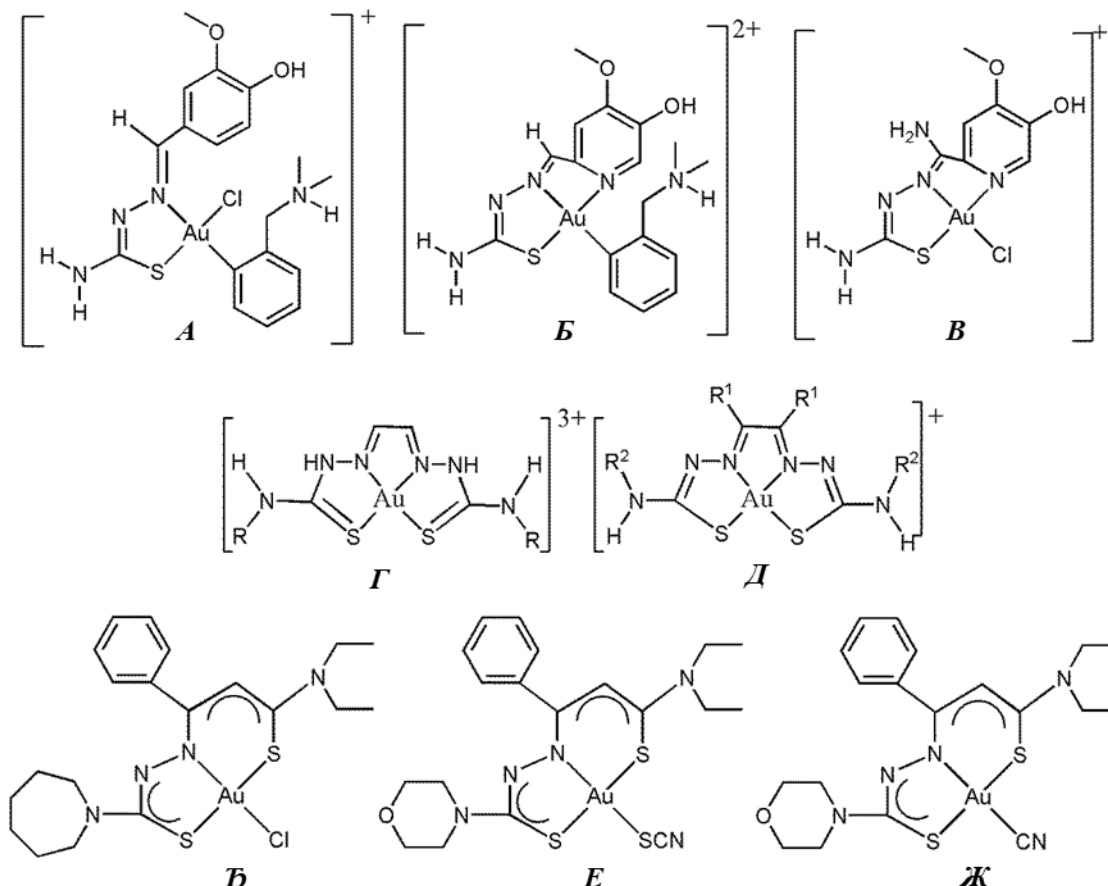


Слика 19. Au(III) комплекси са S-донорским лигандима¹³

Потенцијална примена дитиокарбаматских комплекса злата у медицини подигнута је на виши ниво развојем „друге генерације“ једињења, односно једињења која садрже пептидне конјугате.¹³ Серија Au(III)–дитиокарбаматних деривата са ди– до пента–пептидима, формуле $[Au^{III}X_2(pdtc)]$ ($X = Cl, Br$; $pdtc$ = олигопептиддитиокарбамат) (слика 19 – једињења Г – Е) су синтетисани и испитивани *in vitro*. Биолошка активност поменутих комплекса тестирана је према хуманим ћелијским линијама леукемије (HL-60), хуманим ћелијским линијама рака желуца (BGC-823), хуманим ћелијским линијама хепатоцелуларног карцинома (Bel-7402), као и према ћелијским линијама које садрже секвенце хуманог папилома вируса. Нова класа једињења показала је активност према ћелијама резистентним на цисплатину, уз побољшану селективност према туморским ћелијама.⁷⁹ Једињење које се показало као најефикасније према тестираним ћелијским линијама је једињење **Б**, слика 19.

Тиосемикарбазони су једињења која поседују значајне биолошке и фармаколошке карактеристике.¹³ Такође, многи комплекси различитих јона метала са овим лигандима показују добру антипролиферативну активност и могу бити активни против вируса, бактерија, гљивица и тумора.⁸⁰ Први Au(III) комплекси са тиосемикарбазоном који припадају класи amp^- деривата (2–диметиламинометилфенил) објављени су 1998. године (слика 20 – једињења А и Б).⁸¹ Неки комплекси овог типа показали су значајну активност у поређењу са цисплатином. Наиме, Бералдо (H. Beraldo) и сарадници су показали да је

серија Au(III)–тиосемикарбазонских комплекса активнија на ћелијским линијама глиома U-87 и T-98 у односу на цисплатину, ауранофин и аналогне комплексе Pt(II) и Pt(IV).⁸²

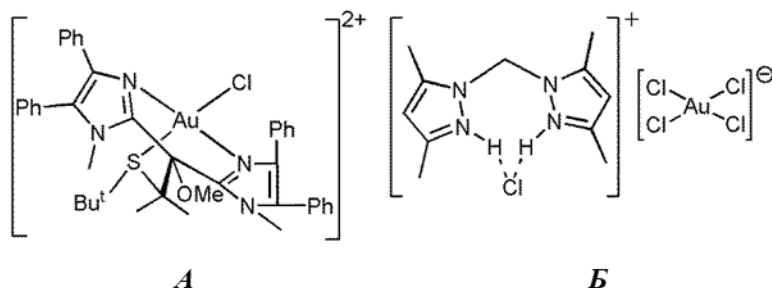


Слика 20. Au(III) комплекси са тиосемикарбазонским лигандима⁸¹

Међутим, стабилност Au(III)-тиосемикарбазонских комплекса који не садрже злато–угљеник везу је јако мала, због чега је велики број производа разлагања или производа редукције изолован и окарактерисан.⁸² Комплекси који садрже damp^- лиганд (једињења В – Д),⁸³ или тридентатни SNS тиосемикарбазонски лиганд (једињење Ђ) приказани су на слици 20. Хлоридо лиганд из комплекса Ђ (слика 20) може бити замењен лигандима као што су SCN^- (слика 20, комплекс Е), када не долази до значајне промене антипролиферативног ефекта, или CN^- (слика 20, комплекс Ж), што доводи до смањења IC_{50} вредности.

1.5.5. Комплекси који поседују антибактеријско и антивирусно дејство

Појава резистентности на антибиотике довела је до развоја нових антибактеријских лекова, нарочито оних који се могу користити против *Mycobacterium tuberculosis*, патогена који је одговоран за туберкулозу. С тим у вези, неки Au(III) комплекси су показали обећавајуће резултате, а њихове структуре приказане су на слици 21.

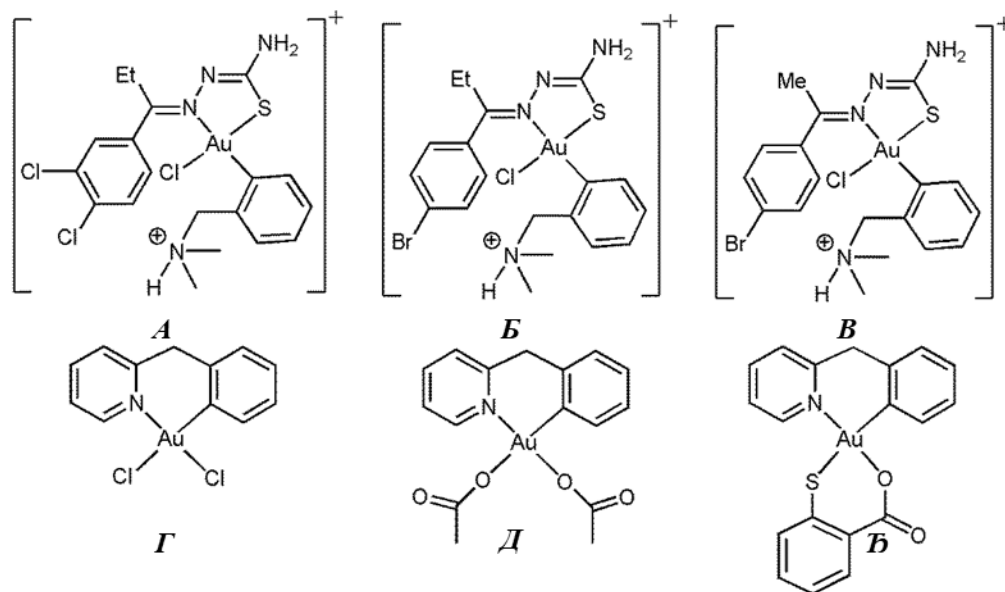


Слика 21. Au(III) комплекси са антибактеријском и антивирусном активношћу¹³

Антимикробна активност комплекса злата добијених употребом триподалног *bis*(имидазол) тиоестра (слика 21 – једињење **A**) испитивана је према Грам–позитивним и Грам–негативним бактеријама. Селективна антимикробна активност примећена је према Грам–позитивним бактеријама (*Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus*). Резултати су, такође, показали да је сам лиганд потпуно неактиван.⁸⁴

Резултати испитивања употребе комплекса Au(III) јона као анти–HIV (HIV – вирус хумане имунодефицијенције) агенаса су оскудни. За комплекс (3,5-Me₂bpzaH₂)Cl[AuCl₄] (слика 21 – једињење **B**) утврђено је да поседује могућност инхибиције два веома важна HIV-1 ензима.⁸⁵ Недавно је публиковано да и неки *bis*(тиосемикарбазонски) Au(III) комплекси (слика 20 – једињење **D**) поседују улогу потенцијалних анти–HIV агенаса. И у случају ових једињења, лиганади нису показали антивирусну активност.⁸⁶

Паразитска обољења, као што су маларија и шистосомијаза, погађају милионе људи који живе у земљама у развоју. Маларија је потенцијално смртоносна болест, узрокована паразитом *Plasmodium falciparum*, који се преноси преко уједа женке комарца,⁸⁶ док је шистосомијаза, позната као „Чагас болест“ („Chagas disease“), узрокована врстом *Trypanosoma cruzi*.⁸⁷ Нека једињења злата са хлорокином су показала активност у лечењу маларије и шистосомијазе.⁸⁸ Наиме, неки комплекси Au(III) јона, **A** – **B**, приказани на слици 22, тестирани су против паразита *Plasmodium falciparum*, а резултати су показали да присуство тиосемикарбазона утиче на повећање њихове ефикасности.

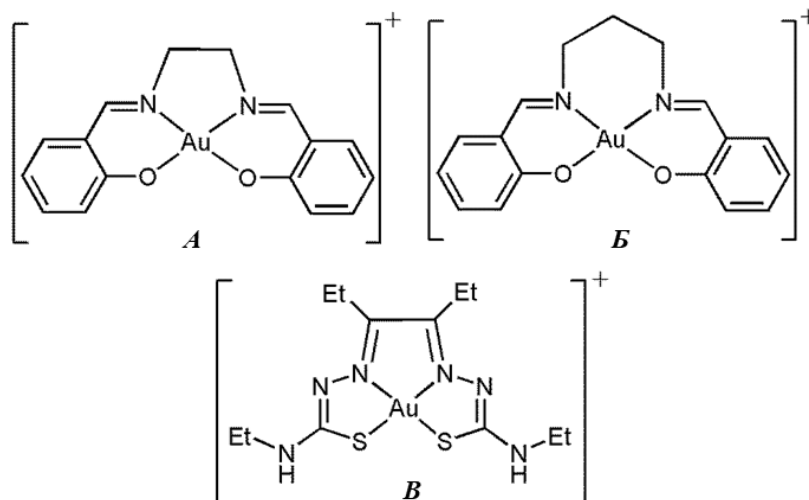


Слика 22. Au(III) комплекси са антипаразитским потенцијалом¹³

Au(III) комплекси слика 14 – једињење **A** ($X = Cl^-$, CH_3COO^- , $CO_2CH_2CO_2^{2-}$), тестирани су на антиканцерогену активност, док су једињења **Г** – **Ђ** (слика 22) тестирана против различитих паразита. Резултати су показали да се комплекси који за мету имају паразит цистеинске протеазе могу користити у третману „Чагас болести“.⁸⁹

1.5.6. Комплекси изотопа злата

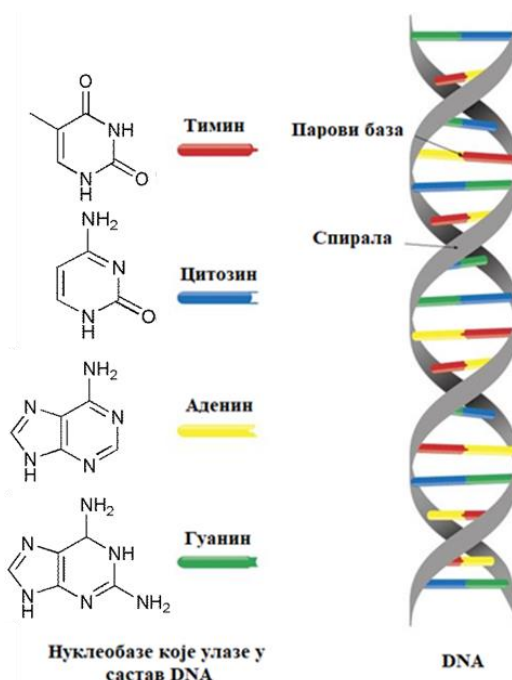
Злато поседује два радиоактивна изотопа, ^{198}Au и ^{199}Au . Радиохемија, која укључује Au(III) изотопска једињења развијена је од стране Јурисона (*S. S. Jurisson*) и сарадника.⁸³ Први $^{198}Au(III)$ комплекси који су синтетисани представљају деривате тетрадентатних Шифових база као лигананда, sal_2en и sal_2pn ($sal_2en = N,N'$ -етилеи-*bis*(салицилиденамин), $sal_2pn = N,N'$ -пропилен-*bis*(салицилиденамин), једињења **A** и **B**, слика 23. Ови комплекси испитивани су *in vitro*, док је једињење **B** на слици 23 коришћено и за *in vivo* испитивање на мишевима. Детектована је брза редукција до колоидног злата, али је потврђена чињеница да мале модификације у структури *bis*(тиосемикарбазона) могу довести до значајног повећања стабилности комплекса за *in vivo* примену.⁸³



Слика 23. $^{198}\text{Au(III)}$ комплекси са дериватима тетрадентатних Шифових база (А и Б) и са тридентатним тиосемикарбазоном (В)¹³

1.6. Интеракције комплекса са DNA и SA

Једињења Au(III) јона показују мањи афинитет везивања према DNA у односу на комплексе Pt(II) .³ Међутим, узимајући у обзир карактеристике једињења злата, неки комплекси поседују велики потенцијал да реагују са азотом из нуклеинских база, формирајући везе најчешће преко $N(1)/N(7)$ атома аденозина, $N(7)$ или $C(6)O$ атома гуанозина, $N(3)$ цитозина и $N(3)$ тимидина.⁹⁰ Ова чињеница указује да DNA може бити погодна мета за различите Au(III) комплексе.²⁶ Наиме, последњих година проучавање механизма интеракције између DNA и различитих молекула, укључујући и комплексе јона метала, је интензивно, а истраживања чине добру везу између хемије, молекуларне биологије и медицине.⁹⁰

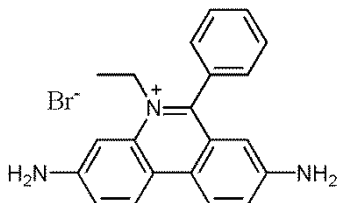


Слика 24. Структуре нуклеобазе које улазе у састав ДНК (слика преузета са сајта www.technologynetworks.com и дорађена)

Везивање комплекса јона прелазних метала за ДНК може се одигравати на два начина, преко ковалентних и нековалентних интеракција.⁹¹ Ковалентно везивање се описује као стварање везе између ДНК, примарно преко $N(7)$ атома гуанина, и јона метала, заменом лабилног лиганда из координационе сфере полазног комплекса. Интеркалација, електростатичко и везивање у жлебовима („*groove binding*“) представљају тзв. нековалентне интеракције. Интеркалацијом се сматра уградња молекула између базних парова ДНК,⁹² док електростатичке интеракције обухватају интеракције са фосфатном групом из нуклеинских киселина, која је негативно наелектрисана. Везивање у мањем жлебу („*minor groove binding*“) подразумева контакт са зидовима жлеба, а везивање у главном жлебу („*major groove binding*“) подразумева стварање водоничних веза са ДНК молекулом.⁹³ Да би се детаљно описао начин везивања малих молекула за ДНК, најчешће се користе методе попут електронске и флуоресцентне спектроскопије.^{94,95}

Електронска спектроскопија представља поуздану методу за откривање могућих интеракција, али се овом методом не може тачно дефинисати на који начин се комплекси јона прелазних метала везују за ДНК.^{94,95} У току испитивања интеракција помоћу спектрофлуориметрије често се користи 3,8-диамино-5-етил-6-фенилфенантридинијум бромид (тзв. етидијум-бромид, ЕВ, слика 25), који поседује могућност да интеркалира између базних парова ДНК преко планарног фенантридинског прстена. Интензитет флуоресценције ЕВ зависи од поларности растварача и расте са опадањем поларности растварача.⁹⁶ Заправо, ЕВ не показује флуоресцентну емисију у води, али након интеркалације за ДНК дуплекс интензитет флуоресцентне емисије на 612 nm расте, када је ексцитован на 527 nm. У присуству једињења које поседује могућност да интерагује са ДНК интеркалацијом, долази до замене већ интеркалираног ЕВ, а ослобађање ЕВ доводи

до смањења интензитета флуоресцентне емисије. Интензитет емисије може да опада и услед грађења DNA–EB–комплекс врсте.^{97,98}



Слика 25. Структурна формула етидијум-бромида (ЕВ)

Додатна потврда интеркалације малих молекула подразумева мерење вискозности раствора DNA. У случају класичне интеркалације DNA базни парови се раздвајају (нпр. продужење DNA хеликса), што доводи до повећања вискозности раствора. Насупрот томе, делимична интеркалација једињења доводи до савијања DNA ланца, што за последицу има смањење вискозитета раствора DNA. Ковалентно везивање једињења за DNA не утиче на промену вискозитета раствора.⁹⁹

Ши (*P. Shi*) и сарадници су испитивали интеракције између DNA и комплекса Au(III) јона са супституисаним терпиридинима као инертним лигандима (као што су 4'-*p*-толил-2,2':6,2''-терпиридин; 4'-*p*-нафтол-метилфенил-2,2':6,2''-терпиридин; 4'-*p*-трифенилфосфин-метилфенил-2,2':6,2''-терпиридин).¹⁰⁰ На основу резултата утврђено је да Au(III) комплекси истог позитивног наелектрисања показују различит афинитет везивања за DNA. Наиме, већа стерна заштићеност доводи до опадања афинитета везивања. Са друге стране, код једињења са различитим позитивним наелектрисањем, веће наелектрисање комплекса повећава афинитет везивања за DNA.¹⁰⁰ Лу (*H. Q. Liu*) и Месори (*L. Messori*) су доказали, применом циркуларног дихроизма (CD), да се Au(III) комплекси који садрже супституисани терпиридин или бипиридин везују за DNA. Заправо, они су доказали да се оба комплекса везују интеркалацијом, док су константе везивања за комплекс који садржи супституисани бипиридин знатно веће.^{101,102}

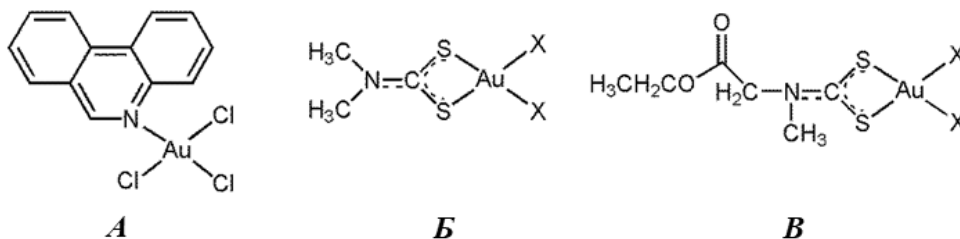
Андрејевић (*Т. Андрејевић*) и сарадници су испитивали интеракције између DNA и Au(III) комплекса који садрже различите азот-донорске лиганде, као што су 4,4'-bipy, bpe или dpe (4,4'-bipy = 4,4'-бипиридин, bpe = 1,2-bis(4-пиридил)етан, dpe = 1,2-bis(4-пиридил)етен). Примећено је опадање интензитета флуоресценције указујући на могућност истискивања EB из EB-DNA адукта и везивање за DNA. Израчунате контанте везивања (10^6) за сва три комплекса су десет пута веће од вредности за EB (10^5), што додатно потврђује интеркалацију.¹⁰³

Пател (*M. N. Patel*) и сарадници су приметили да додатак DNA раствору Au(III) комплекса који садрже деривате пирола, пиридина, пиколинамида или анилина доводи до промене у апсорпционим спектрима.¹⁰⁴ Наиме, јављају се хиперхромизам и црвено померање главног пика. Даљим испитивањем интеракција утврђено је да се поменути комплекси везују за мали или велики жлеб DNA (са константом везивања реда величине 10^5), што је и раније потврђено за неке Ru(II/III) комплексе.^{105,106}

UV-Vis спекtri Au(III) kompleksa koji sadrži derivat pirimidina i morfolina u prisustvu rastuće koncentracije DNA ukazuju na pojavu hipohromizma sa blagim crvenim pomeraњem glavnog apsorpciоног пика.¹⁰⁷ У спектрима поменутог комплекса и

ЕВ-DNA адукта примећено је велико опадање интензитета главног пика, што може указати на интеркалацију. На основу представљених резултата закључено је да Au(III) комплекс интерагује са DNA интеркалацијом.¹⁰⁷

Додатак DNA раствору комплекса који садржи фенантридин и три хлоридо лиганда, $[\text{Au}(\text{phend})\text{Cl}_3]$ (слика 26, једињење **A**), узрокује опадање интензитета пика у емисионом спектру, на 250 nm, али и повећање интензитета пика на 210 nm.¹⁰⁸ Опадање интензитета емисионог пика потврђује интеракцију комплекса са DNA, док повећање интензитета емисионог пика указује на промену у структури DNA молекула. Наиме, овај комплекс се за DNA везује интеркалацијом, што је потврђено применом других експерименталних метода.¹⁰⁸



Слика 26. Структуре комплекса $[\text{Au}(\text{phend})\text{Cl}_3]$ (**A**), $[\text{Au}(\text{dmdt})\text{X}_2]$ (**B**) и $[\text{Au}(\text{esdt})\text{X}_2]$ (**C**) (у којима је $\text{dmdt} = \text{N}, \text{N}$ – диметилдитиокарбамат, esdt = етилсаркозиндитиокарбамат; $\text{X} = \text{Cl}^-$ или Br^-)^{26,108}

Комплекси $[\text{Au}(\text{dmdt})\text{X}_2]$ (слика 26, једињење **B**) и $[\text{Au}(\text{esdt})\text{X}_2]$ (слика 26, једињење **C**) показују значајан афинитет везивања за DNA двоструки хеликс, ефикасно индукују умреженост и успешно убијају ћелије рака.²⁶ Са друге стране, *in vitro* испитивања су показала да неки Au(III) –порфирински комплекси интерагују са DNA, док су *in vivo* експерименти потврдили да ова једињења доводе до фрагментације DNA.¹⁰⁹

За Au(III) комплекс који садржи dadtc (N –дитиокарбоксииминодиацетат) као лиганд доказано је да се за DNA везује интеркалацијом.¹¹⁰ Наиме, додатак растуће концентрације DNA доводи до опадања интензитета апсорпције и црвеног померања, што указује на интеракцију између комплекса и DNA. Даљим испитивањем интеракције комплекса са ЕВ-DNA, на основу добијене константе везивања (10^4), доказано је да је главни начин везивања интеркалација. У поређењу са комплексом који садржи дериват порфирина, поменути комплекс показује нижу вредност константе везивања за DNA.¹¹⁰

Када се DNA инкубира са растућом концентрацијом Au(III) комплекса који као лиганд садржи иминофосфоран,¹¹¹ опадање интензитета негативних и позитивних сигнала уочено је у CD спектрима, указујући на дестабилизујући ефекат.¹¹² Ове промене, које се повезују са променом хеликоидног DNA, директно указују на интеркалацију. Даље, за комплексе који садрже деривате аминоксинолина такође је доказано да реагују интеркалацијом.¹¹³

У случају хетеронуклеарног молибдоцен-злато комплекса, са повећањем концентрације DNA долази до појаве хипохромизма и црвеног померања, што указује на постојање интеракције.¹¹⁴ Са додатком веће концентрације комплекса раствору ЕВ-DNA примећено је значајно опадање емисионог интензитета на 590 nm.¹¹⁵ Код овог комплекса,

интеркалација се објашњава π - π интеркацијама између ароматичних хромофора и базних парова DNA.¹¹⁶

Серум албумини (SA) представљају најзаступљеније протеине у плазми, који имају важну улогу у транспорту јона и лекова до ћелија и ткива.^{117,118} Поред тога, они доприносе регулацији осмотског притиска у крви, али су одговорни и за одржавање рН вредности крви.¹¹⁹ Бројни резултати, такође, указују на значајну антиоксидативну активност серум албумина.¹²⁰ Генерално, најистакнутија карактеристика албумина је њихова способност да реверзибилно везују велики број биолошки важних једињења (масне киселине, хематин, билирубин), као и различите јоне метала.¹²¹

Хумани серум албумин (HSA) представља молекул који се састоји од 609 аминокиселина, укључујући сигнални пептид (1–18), пропептид (19–24) и активни албумин (585 аминокиселина).¹²² Примарна структура HSA састоји се од једног N–терминалног, једног C–терминалног краја и три хомологна домена, који су познати као домени I, II или III. Сваки од ових домена има два спирална под–домена (A или B), док је сваки од под–домена сачињен од 4 до 6 α -хеликса.^{123,124}

Говеђи серум албумин (BSA) највише је испитивани серум албумин због високе структурне хомологије (76%) са хуманим серум албумином (HSA). Једна од главних разлика између ова два протеина је да BSA садржи два триптофанска остатка (W^{135} и W^{214}), док HSA садржи само један (W^{214}). Овај додатни триптофански остатак у молекулу BSA налази се на позицији 135 у хидрофобном цепоу у другој спирали првог домена.¹²⁵ Иначе, раствори оба албумина показују интензивну флуоресцентну емисију на око 360 nm, када су ексцитовани на 295 nm, због присуства триптофанских остатака.¹²⁶ Међутим, услед везивања неког комплекса за серум албумин долази до промене у триптофанском окружењу протеина,^{127,128} што за последицу има опадање интензитета флуоресцентних пикова.

Реакције Au(III) комплекса са серум албуминима примарно се испитују анализом карактеристичних сигнала Au(III) јона у видљивом делу спектра. Раније добијени резултати су указали на то да је афинитет Au(III) комплекса за интеракцију са BSA директно повезан са структуром комплекса.¹¹⁸ Наиме, спектри комплекси $[Au(en)_2](Cl)_3$ и $[Au(cyclam)]((ClO_4)_2Cl)$ (cyclam = 1,4,8,11 – тетраазациклотетрадекан) након додатка BSA остају непромењени, што се приписује великој стабилности Au(III) јона и након додатка албумина. Мале промене у спектрима примећене су у случају комплекса $[Au(dien)Cl](Cl_2)$ (dien = диетилентриамин) и $[Au(bipy^c-H)(OH)](PF_6)$ ($bipy^c-H$ = 2,2'–бипиридин–H). Време потребно за уочавање промена износило је око 2 h за комплекс са dien – лигандом, а само неколико минута за комплекс са дериватом бипиридина. Супротно, у случају комплекса $[Au(terpy)Cl](Cl_2)$ и $[Au(bipy)(OH)_2](PF_6)$ интензитет сигнала се значајно смањује, до потпуног нестајања.¹¹⁸

За Au(III) комплексе који садрже различите азот-донорске лиганде, као што су 4,4'-bipy, bre или dre, такође су испитиване интеракције са BSA. Наиме, са додатком растуће концентрације комплекса раствору BSA долази до опадања интензитета емисионе флуоресценције, јер везивање комплекса за BSA доводи до промене терцијарне структуре протеина.¹⁰³ Сва три комплекса су показала добру могућност везивања за BSA, са константом везивања која је већа од константе за биомолекуле ($2 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$).¹⁰³

Додатак Au(III) комплекса, који садржи dadtc као лиганд, раствору BSA доводи до опадања интензитета пика на 365 nm. На основу вредности константи везивања закључено је да поменути комплекс показује већи афинитет за BSA него за DNA.^{110,129}

У случају Au(III) комплекса који садржи бидентатни дитиокарбамато лиганд и два бромида, Месори (*L. Messori*) и сарадници су доказали да приликом везивања за BSA долази до редукције злата.¹³⁰ Заправо, сигнал на 320 nm, који је карактеристичан за Au(III) јон, током времена нестаје, а појављује се нов сигнал на 380 nm. Кристалографском анализом је потврђено да се Au(I) јон везује за BSA, тачније за Cys34.¹³⁰ Додатак растуће концентрације Au(III) комплекса који као лиганд садржи иминофосфоран раствору HSA доводи до опадања интензитета флуоресцентне емисије, али не долази до промене таласне дужине или облика пика.¹¹¹ Добијени резултати су показали да овај комплекс има већи афинитет везивања у односу на цисплатину, јер подлеже хидролиози.¹¹¹

У случају хетеронуклеарног комплекса молибдоцен-злато, повећање концентрације комплекса доводи до опадања флуоресцентног интензитета HSA, праћено плавим померањем.¹¹⁴ Добијени резултати указују на интеракцију комплекса и HSA, што такође укључује промену микроокружења око Trp-214 остатка.

Бројни резултати добијени употребом флуоресцентне емисије потврђују могућност формирања комплекса између BSA и наночестица злата.¹³¹⁻¹³⁴

1.7. Молекулски докинг

Молекулски докинг је метода за процену и/или дефинисање интеракција између различитих једињења и макромолекулских мета, најчешће протеина.^{135,136} Први корак молекулског докинга подразумева избор циљане мете, а потом одређивање потенцијалних везивних места у циљаним метама.¹³⁷ Процес докинга може да предвиди конформацију једињења, односно позицију и оријентацију у оквиру активних страна протеина (често се ови положаји описују као позе), као и афинитет везивања.¹³⁸ У суштини, циљ молекулског докинга је да се добије комплекс-протеин структура коришћењем компјутерских метода. Доказано је да докинг методе потврђују везивање једињења за одређене мете и често прате и подржавају експерименталне резултате.¹³⁶

Иако постоји велики број радова који описују молекулски докинг између различитих једињења и протеина, број публикованих радова о интеракцијама са нуклеинским киселинама је знатно мањи,¹³⁹⁻¹⁴³ упркос чињеници што је DNA важна молекулска мета за широки спектар антибиотика или антитуморских лекова.¹⁴⁴ Добро је познато да се у структури нуклеинских киселина налази велики број везујућих позиција.¹³⁶ У новије време развијени су различити компјутерски програми који могу да предвиде везујућа места како у молекулу DNA, тако и у структури других биомолекула.¹³⁷

Молекул DNA не поседује круту структуру, већ је у питању флексибилан молекул који има неколико различитих изоформи.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ С тим у вези, важно је дефинисати у току докинга коју олигомерну конформацију DNA користити као мету. Различите структурне карактеристике изабраних олигомерних конформација снажно утичу на квалитет докинга.¹⁴⁸ За процес докинга са DNA најчешће се користе две конформације: канонична B-DNA (PDB 1BNA) или DNA са интеркалационим размаком (PDB 1ZEF). Поређењем вредности које се добијају докингом са различитим конформацијама DNA, може се предвидети или потврдити начин везивања једињења за DNA.¹⁴⁹ Добро је познато да се интеракције молекула са DNA преко мањег жлеба драстично разликују од оних преко већег жлеба, узимајући у обзир електростатички потенцијал и стерне ефекте. Генерално, молекулски докинг је у многим случајевима потврдио да мали молекули углавном реагују преко мањег жлеба, док велики молекули подлежу интеракцијама у већем жлебу.¹²⁸

Молекулски докинг се може применити и на интеракције различитих једињења и SA. Под-домени ПА и ПИА се посматрају као главне стране за везивање малих молекула.¹⁵⁰ Наиме, уколико дође до формирања водоничних веза између једињења (у нашем сличају комплекса) и одговарајућих остатака аминокиселина, долази до додатне стабилизације система SA-комплекс. Управо настанак ових водоничних веза представља један од главних фактора за успешан транспорт једињења кроз организам.¹⁴⁹

1.8. Супституционе реакције комплексних једињења

Реакције супституције комплексних једињења могу се поделити на електрофилне (S_E) и нуклеофилне (S_N).



У реакцијама електрофилне супституције долази до замене централног јона метала другим јоном метала (електрофилом), док у реакцијама нуклеофилне супституције долази до замене лиганда у координационој сфери комплекса другим лигандом (нуклеофилом).

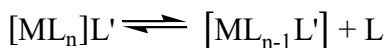
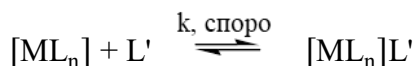
Нуклеофилне супституционе реакције могу се дешавати на три различита начина: преко дисоцијативног механизма (D), преко асоцијативног механизма (A) и преко механизма измене (I).¹⁵¹

Дисоцијативни механизам супституције (D) (схема 4) подразумева два корака различитих брзина:



Први корак обухвата процес раскидања хемијске везе између јона метала и једног од лиганда (L) из координационе сфере полазног комплекса, да би се након тога у оквиру другог корака улазни лиганд (L') везао за јон метала. У току ових реакција настаје интермедијер са смањеним координационим бројем у односу на полазни комплекс. Будући да се за кинетичке прорачуне увек узима у обзир најспорији процес, брзина супституције се у овом случају може изразити као $v = k [ML_n]$.

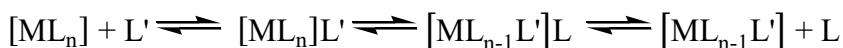
Асоцијативни механизам супституције (A) (схема 4), такође, обухвата два корака различитих брзина:



У првој реакцији долази до везивања улазног лиганда (L') за централни јон метала, док у току друге реакције одлазећи лиганд (L) напушта координациону сферу комплекса. У

оквиру овог механизма настаје интермедијер са повећаним координационим бројем у односу на полазни комплекс. С обзиром да је први корак спорији, брзина реакције се може изразити као $v = k [ML_n] [L']$.

Механизам измене (I) (схема 4) дешава се на тај начин што се у првој фази лиганд L' везује електростатичким силама за спољашњу координациону сферу полазног комплекса, а потом долази до измене лиганда L из унутрашње координационе сфере лигандом L' из спољашње сфере. Последњи корак представља раскидање везе између лиганда L и комплексног јона.



У току механизма измене не долази до грађења интермедијера. Такође, процес измене (I) може да укључи I_a и I_d механизме. Уколико је процес грађења везе између лиганда L' и јона метала спорији у фази измене, механизам се обележава као I_a . Супротно, уколико је процес раскидања везе између јона метала и одлазећег лиганда L спорији у фази измене, механизам се обележава као I_d .

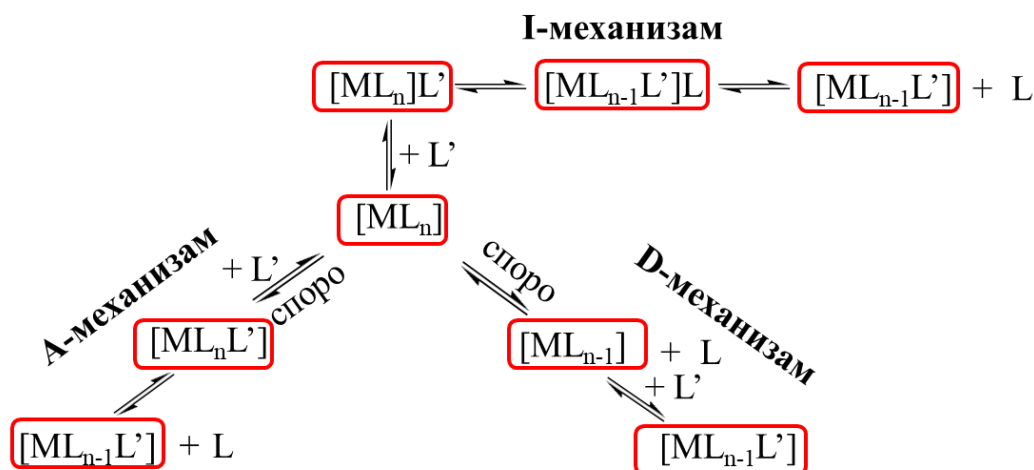


Схема 4. Различити механизми нуклеофилне супституције

1.8.1. Одређивање механизма нуклеофилних супституционих реакција

Да би се дефинисао механизам нуклеофилних супституционих реакција неопходно је да се одреде вредности неких термодинамичких параметара, као што су ентропија активирања ($\Delta S^\ddagger$) и запремина активирања ($\Delta V^\ddagger$).^{152,153} За прелиминарно одређивање механизма довољно је познавање брзине хемијске реакције. Наиме, на основу реакција које описују дисоцијативни, асоцијативни и механизам измене, може се закључити да је реакција супституције по D механизму реакција првог реда, док је супституција по A механизму реакција другог реда. Заправо, уколико брзина хемијске реакције зависи од концентрације полазног комплекса и улазног лиганда може се претпоставити да је у питању процес супституције по A или I_a механизму, а уколико зависи само од

концентрације полазног комплекса, супституција се вероватно одиграва по D или I_d механизму.¹⁵⁴

Промена ентропије активирања $\Delta S^\ddagger$ (чије израчунавање је детаљно описано у делу 3.1.1.1) може поузданије указати на механизам супституције. Како ентропија представља меру неуређености система, а будући да се код различитих механизма формирају различити интермедијери, овај податак може дефинисати механизам супституције. Када говоримо о D механизму, због формирања интермедијера са смањеним координационим бројем, повећање неуређености система директно доводи до тога да је промена ентропије активирања позитивна вредност. Насупрот томе, код А механизма настаје интермедијер са повећаним координационим бројем, што се директно доводи у везу са смањеном неуређености система и негативном вредношћу за $\Delta S^\ddagger$.

Промена запремине активирања, $\Delta V^\ddagger$, која се одређује на основу једначине (1):

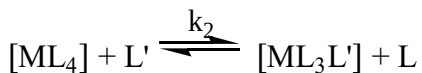
$$\Delta V^\ddagger = -bRT \quad (1)$$

у којој је b нагиб праве, добија се приликом испитивања зависности константе брзине хемијске реакције од притиска и представља најпоузданији параметар за одређивање механизма супституције. У односу на формирање различитих интермедијера, повећање притиска убрзава реакције које се одвијају по А или I_a механизму, док се реакције по D или I_d механизму у том случају успоравају. У складу са тим, негативна вредност за $\Delta V^\ddagger$ се повезује са А или I_a механизмом, док се позитивна вредност за $\Delta V^\ddagger$ повезује са D или I_d механизмом.¹⁵²

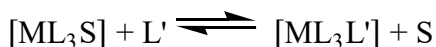
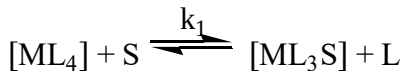
1.8.2. Супституционе реакције квадратно-планарних комплекса

Типичне комплексе квадратно-планарне геометрије формирају јони метала d⁸ електронске конфигурације, као што су Pt(II), Pd(II), Au(III), Rh(I) и Ir(I). Општа формула ових комплекса је [ML₄], указујући на присуство четири лиганда који су директно везани за централни јон метала у једној равни.

Реакције супституције ових комплекса одвијају се на два начина: директном нуклеофилном супституцијом и солволитичким путем. Директна нуклеофилна супституција се може приказати једначином:



док се супституција по солволитичком путу описује као:



Солволитички пут укључује два процеса. Заправо, први корак подразумева замену лиганда L молекулом растварача S, док се у другом кораку молекул растварача супституише улазним лигандом L'. У изразу за брзину супституционе реакције морају се уврстити оба корака супституције, тако да је укупна брзина једнака $v = k_2[ML_4][L'] + k_1[ML_4]$.

Промена геомерије комплекса у току супституције квадратно-планарних комплекса приказана је на схеми 5.

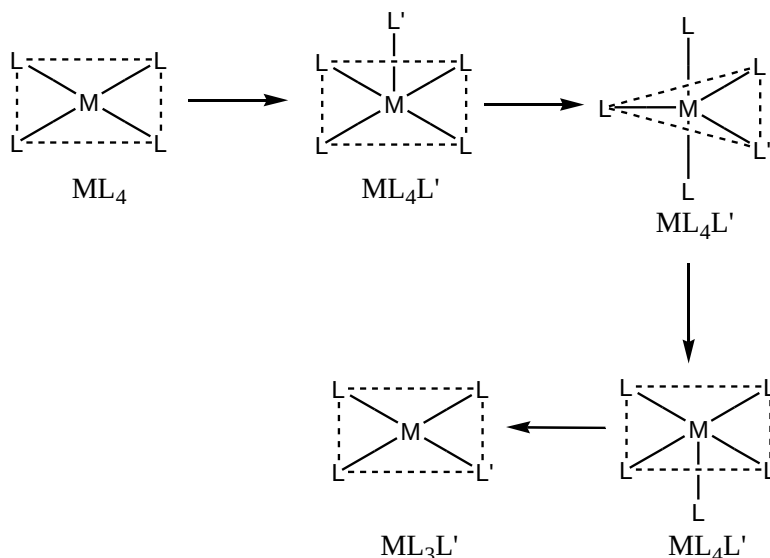


Схема 5. Механизам супституције квадратно-планарних комплекса

У току супституције долази до формирања комплекса различитих геометрија. На почетку долази до аксијалног везивања лиганда L' и настанка квадратно-пирамидалног комплекса. Наредни корак подразумева трансформацију квадратне-пирамиде у тригоналну-бипирамиду, која се потом трансформише поново у квадратну-пирамиду, али са одлазећим лигандом на врху пирамиде. На самом крају процеса долази до раскидања везе између јона метала и одлазећег лиганда L .

1.8.3. Утицај различитих фактора на брзину реакција супституције

На брзину реакција супституције утичу, пре свега, природа централног јона метала, природа улазног лиганда, природа одлазећег лиганда, „*trans* ефекат“ итд.

Природа улазног лиганда повезује се са нуклеофилношћу лиганда. Нуклеофилност улазног лиганда за реакције супституције квадратно-планарних комплекса повећава се са порастом „мекоће“ лиганда. Заправо, што је лиганд „мекша“ база, његова нуклеофилност је већа.¹⁵⁵

Природа одлазећег лиганда повезује се са лабилношћу везе одлазећи лиганд-јон метала. У случају добро одлазећих група, као што су молекули воде или халогени, процес супституције се одиграва јако брзо. Насупрот томе, у случају замене лиганда из групе сумпор-донора, процес супституције се одиграва споро. Наиме, лабилност везе лиганд-метал директно се доводи у везу са њиховим „тврдо-меким“ особинама.

За супституционе реакције квадратно-планарних комплекса карактеристична је и појава под називом „*trans* ефекат“. Наиме, „*trans* ефекат“ је утицај инертног лиганда на брзину супституције лиганда који је њему у *trans* положају. Лиганди који показују јак „*trans* ефекат“ су управо лиганди који граде σ – везе са јоном метала, као што су H^- или

CN_3^- , као и лиганди који имају способност да граде додатну π – везу са јоном метала, као што су CO и C_2H_4 . Последица формирања ових веза је слабљење везе између јона метала и лиганда у *trans* положају. Једна од примена „*trans* ефекта“ огледа се у синтези цисплатине (схема 6), која је заснована на јачем „*trans* ефекту“ хлорида у односу на молекул NH_3 .

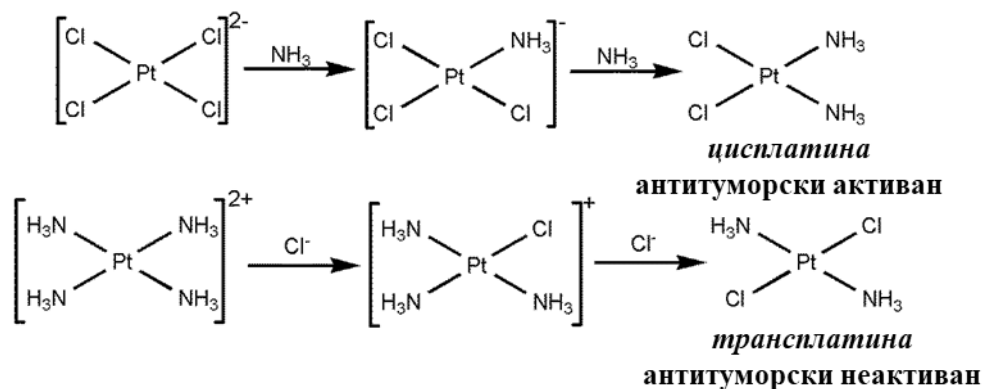


Схема 6. Синтеза цисплатине и одговарајућег *trans* – изомера.

Поред наведеног, на брзину реакција супституције утичу и услови под којима се дата реакција одвија, где спадају рН вредност раствора, додатак инхибитора или катализатора, врста растварача и др.

***ЗАДАТАК
РАДА***

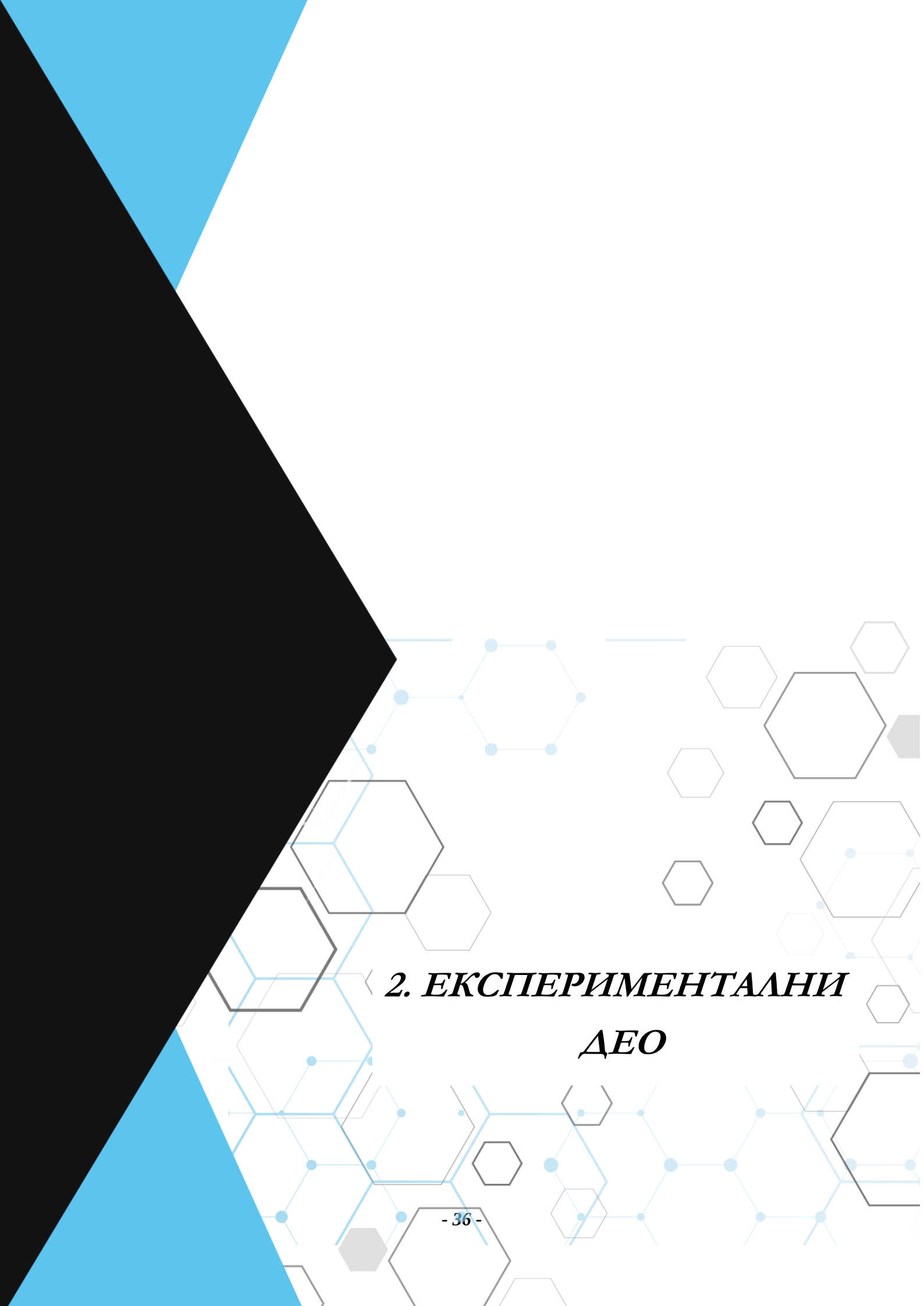
Предмет ове докторске дисертације је синтеза, карактеризација, испитивање супституционих реакција мононуклеарних и полинуклеарних $Au(III)$ комплекса са биолошки значајним лигандима, испитивање интеракција са DNA и серум албуминима (BSA/HSA), укључујући компјутерске прорачуне и биолошка испитивања. Задаци у оквиру ових истраживања подељени су у две групе:

➤ Испитивање мононуклеарних $Au(III)$ комплекса које обухвата:

- синтезу и карактеризацију мононуклеарних $Au(III)$ комплекса са ароматичним *bis*-пиразолилпиридинским лигандима, испитивање реакција супституције ових комплекса са 5'-GMP и Guo (употребом „*stopped flow*“ технике), испитивање интеракција са DNA употребом различитих аналитичких метода (UV-Vis спектрофотометрија, мерење флуоресценције и мерење вискозности), молекулски докинг и испитивање цитотоксичности комплекса на A549, A375 и LS-174 ћелијским линијама.
- синтезу и карактеризацију мононуклеарних $Au(III)$ комплекса са дериватима пиразола, испитивање реакција супституције ових комплекса са GSH, L-Met и 5'-GMP (употребом „*stopped flow*“ методе), испитивање интеракција са DNA коришћењем различитих аналитичких метода (UV-Vis спектрофотометрија, мерење флуоресценције и мерење вискозности), испитивање интеракција са BSA/HSA протеинима (мерењем флуоресценције) и молекулски докинг.
- синтезу и карактеризацију мононуклеарних $Au(III)$ комплекса са дериватима 1,10-фенантролина, испитивање реакција супституције комплекса са Cu, GSH, L-Met и 5'-GMP (употребом „*stopped flow*“ методе), испитивање интеракција са DNA (помоћу UV-Vis спектрофотометрије, мерењем флуоресценције и мерењем вискозности) и BSA (мерењем флуоресценције), молекулски докинг и испитивање цитотоксичности на MDA-MB-231, HCT-116 и HaCaT ћелијским линијама.
- испитивање супституционих реакција монофункционалних $Au(III)$ комплекса са сумпор-донорским нуклеофилима, као што су GSH, L-Met и L-Cys („*stopped flow*“ методом) и испитивање интеракција са L-Met (HPLC методом).

➤ Испитивање полинуклеарних $Au(III)$ комплекса које обухвата:

- синтезу и карактеризацију динуклеарних и тринуклеарних $Au(III)$ комплекса са алифатичним азот-донорским једињењима као мостним лигандима, одговарајућа DFT израчунавања, испитивање интеракција са DNA (помоћу UV-Vis спектрофотометрије, мерењем флуоресценције и мерењем вискозности) и BSA (мерењем флуоресценције), молекулски докинг и испитивање цитотоксичности на MDA-MB-231, HCT-116 и MRC-5 ћелијским линијама.



2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

2.1. Реагенси и раствори

Калијум-тетрахлоридоаурат(III) ($K[AuCl_4]$), гуанозин (Guo), гуанизон-5'-монофосфат (5'-GMP), глутатион (GSH), L-метионин (L-Met), L-цистеин (L-Cys), тиоуреа (Tu), Нерес пуфер (*N*-2-хидроксиетилпиперазин-*N'*-2-етансулфонска киселина), етидијум-бромид (EB), натријумова со дезоксирибонуклеинске киселине говеђег тимуса (DNA), говеђи серум албумин (BSA), 2-(4-хидроксифенил)-5-[5-(4-метилпиперазин-1-ил)-бензимидазо-2-ил]-бензимидазол (НОЕ), хумани серум албумин (HSA), Tris (*tris*(хидроксиметил)аминометан), 2,2':6',2''-терпиридин (terpy), ди-(2-пиколил)амин (bpma), 3-азапентан-1,5-диамин (dien), 1,4-диаминобутан (dab), 1,6-диаминохексан (dah), 1,8-диаминооктан (dao), 4,7-дифенил-1,10-фенантролин (dpphen), 2,9-диметил-1,10-фенантролин (dmphen), фосфатни пуфер (PBS) су комерцијално доступни (Sigma Aldrich, Acros Organics) и коришћени без претходног пречишћавања. Лиганди 2,6-*bis*(5-*terc*-бутил-1*H*-пиразол-3-ил)пиридин (H_2L^{tBu}), 2,6-*bis*(5-*terc*-бутил-1-метил-1*H*-пиразол-3-ил)пиридин (Me_2L^{tBu}) и 2,6-*bis*((4*S*,7*R*)-1,7,8,8-тетраметил-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-4,7-метаноиндазол-3-ил)пиридин (Me_2^*L) синтетисани су према већ објављеној процедури,¹⁵⁶ а лиганди ((3-((2-((5-фенил-1*H*-пиразол-3-ил)метокси)нафтален-3-илокси)метил)-5-фенил-1*H*-пиразол – лиганд **L1**, (3-((2-((5-фенил-1*H*-пиразол-3-ил)метокси)фенокси)метил)-5-фенил-1*H*-пиразол – лиганд **L2** и (3-((2-((5-нафтален-2-ил)-1*H*-пиразол-3-ил)метокси)фенокси)метил)-5-(нафтален-3-ил)-1*H*-пиразол – лиганд **L3**) синтетисани су у оквиру ове дисертације. За припрему свих раствора коришћена је бидестилована вода, а за течну хроматографију вода HPLC чистоће. HCl (Зорка) је коришћена за подешавање рН вредности.

За MALDI TOF анализу припремани су раствори комплекса у диметилсулфоксиду (DMSO) (приближно 2 – 10 mM). Раствор матрикса-дитранола у диметилсулфоксиду припремљен је пре употребе (10 mg mL⁻¹). 0,5 µL раствора комплекса примењено је на 100 отвора и остављено да се осуши на собној температури. Потом је 0,5 µL раствора матрикса додато преко комплекса и остављено на собној температури да кристалише.

Радни раствор DNA је припремљен у одговарајућем пуферу (10 mM Tris-HCl/150 mM NaCl или PBS, рН = 7,4), у зависности од врсте анализе. Концентрација DNA одређена је мерењем апсорбанце на 260 nm након разблаживања 1:20, коришћењем моларног апсорбционог коефицијента $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.¹⁵⁷ Апсорбанца је мерена на 260 nm и 280 nm да би се проверила чистоћа раствора DNA. За испитивани раствор DNA однос апсорбанци на поменути таласним дужинама ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) био је између 1,8 – 1,9, што указује да је DNA ослобођена од протеина и спремна за испитивање интеракција са комплексима прелазних метала.

Радни раствори нуклеофила (Guo, 5'-GMP, GSH, L-Met, L-Cys, Tu) припремани су растварањем супстанце у одговарајућем пуферу (PBS или Нерес пуфер). EB/НОЕ радни раствори су припремани растварањем чврстог EB или НОЕ у одговарајућем пуферу да би се добила коначна концентрација од 1×10^{-3} M. Радни раствори BSA/HSA припремани су растварањем чврстог BSA или HSA у пуферу (10 mM Tris-HCl/150 mM NaCl или PBS, у зависности од испитивања), а концентрација је одржавана константном. Сви радни раствори су чувани на 277 K и коришћени наредних 5 дана.

За цитотоксична испитивања Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) и фосфатни пуфер (PBS) добијени су од GIPCO, Invitrogen, USA, док су DMSO и

3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид (МТТ) добијени од SERVA, Germany.

У циљу спречавања могућих повреда на раду или штетних последица по здравље сви експерименти су рађени уз коришћење заштитне опреме и максималну предострожност.

2.2. Инструменталне методе

^1H и ^{13}C NMR спектри комплекса **1** – **3** су снимљени на Bruker Avance 500 MHz спектрометру. ^1H и ^{13}C хемијска померања у деутерисаном метанолу су приказана у односу на пик растварача ($\delta = 3,31$ и $\delta = 49,00$ ppm) на 298 K. ^1H NMR спектри комплекса **9**, **10**, **14** – **19** су снимљени на Varian Gemini 2000, 200 MHz NMR спектрометру на 295 K. NMR спектри лиганда **L1** – **L3** и комплекса **4** – **8** су снимљени на JEOL ECZs 400 спектрометру (^1H 399,79 MHz) и JEOL ECX 400 спектрометру (^1H 400,18 MHz). Сва хемијска померања су представљена у односу на TSP (триметилсилилпропионску киселину).

Кристалографска анализа лиганда **L2** је урађена на Rigaku XtaLAB Synergy S Single Source дифрактометру опремљеним са PhotonJet Cu-микрофокусом и HyPix-6000HE. Вишеструко скенирање изведено је да би се извршила корекција апсорпције и да би се добили подаци за представљање структуре помоћу програма Gaussian. Структура је решена коришћењем унутрашње фазе SHELXT-2018/2¹⁵⁸, фитована на F^2 коришћењем програма SHELXL-2018/3¹⁵⁹ и коришћењем приступа OLEX2v1.2.¹⁶⁰

UV-Vis спектри комплекса **1** – **10** и **14** – **19** су снимљени помоћу Perkin-Elmer Lambda 35 спектрофотометра, употребом кварцне кивете са дужином пута од 1,0 cm (запремине 3,0 mL), док су спектри за одређивање радне таласне дужине за кинетичка мерења комплекса **11** – **13** снимани на Applied Photophysics SX апарату.

IR спектри комплекса **1** – **3** снимани су на Perkin-Elmer 983G спектрометру, а спектри комплекса **4** – **10** и **14** – **19** на Perkin Elmer Spectrum One спектрометру у области таласних бројева од 450 – 4000 cm^{-1} .

Елементална анализа комплекса **1** – **8**, **11** – **19** извршена је помоћу Carlo Erba Elemental Analyser 1106, а комплекса **9** и **10** коришћењем Varian III CHNOS Elemental Analyzer, Elemental Analysensysteme, GmbH.

MALDI TOF масени спектри комплекса **1** – **3** су снимљени на Voyager-DE Pro инструменту (Sciex, USA) опремљеним са 50 Hz пулсним азотовим ласером на 337 nm. Инструментална подешавања (експитациони напон, напон мреже, време кашњења екстракције и интензитет ласера) била су различита за сваки комплекс, док је детекција мале масе била искључена. Спектри су снимани у позитивној регији. Сваки спектар представља просек најмање 300 удара ласера.

ESI масени спектри су добијени помоћу UHR-TOF Bruker Daltonik (Bremen, Germany) maXis plus an ESI-quadrupole time-of-flight (qToF) са резолуцијом од најмање 60000 FWHM (за комплексе **4** – **8**) и помоћу Synapt G2-Si инструмента (Waters) (за комплексе **9** и **10**). Масена спектрометрија је изведена и помоћу Amazon SL масеног спектрометра Bruker Daltonics (Bremen, Germany) (за комплексе **14** – **19**). Детекција је одрађена у позитивном моду, док је напон површине био 3,5 kV, а брзина протока 180 μL по сату. Суви гас (N_2) одржаван је на 453 K, док је гас у спреју одржаван на 293 K. Апарат је калибрисан пре сваког експеримента директном инфузијом Agilent ESI-TOF смеше у ниској

концентрацији, што је омогућило m/z ранг пикова (који потичу од позитивно и негативно наелектрисаних јона) до 2700 Da.

Моларна проводљивост свеже припремљених $1,0 \times 10^{-3}$ М раствора комплекса **4** – **10** и комплекса **14** – **19** у N,N -диметилформамиду (DMF) испитивана је на 298 К помоћу апарата Crison EC-Meter Basic 30+. Коришћењем релације $\lambda = K/c$, у којој је c моларна концентрација раствора комплекса, израчуната је моларна проводљивост.

Флуоресцентна мерења су вршена на RF-1501 PC спектрофлуориметру (Shimadzu, Japan), а екситација и емисија раствора праћене су на 10 nm.

„Stopped-flow” апарат произвођача Applied Photophysics-a (model SX-20) коришћен је за испитивање кинетике брзих реакција (за комплексе **1** – **13**), док је Pro Data SX програм коришћен за евалуацију кинетичких података. Све реакције изучаване су на константној температури, са грешком од $\pm 0,1$ К.

pH вредност раствора мерена је коришћењем Mettler Delta 350 дигиталног pH-метра са комбинованом стакленом електродом. Електрода је калибрисана растворима стандардних пуфера од pH 4,0, 7,0 и 9,0 (Sigma Aldrich).

HPLC хроматографија за комплекс **11** је испитивана на Shimadzu LC течном хроматографу са SDP-M20A диодним детектором, коришћењем колоне CC 250/4 NUCLEOSIL 100-5 C₁₈.

Циклична волтаметрија (CV) изучавана је помоћу ћелијског сета који садржи три електроде: стаклену угљеничну электроду (GC) као радну, Ag/AgCl као референтну электроду и платинску жицу као помоћну электроду. Мерења су вршена на Autolab PGSTAT 302N на собној температури. Површина радне електроде је полирана алуминијумом на микро-платну и водом. Сви волтамограми су снимљени брзином од $0,1 \text{ Vs}^{-1}$ на собној температури, док је потенцијал електроде био у опсегу од +0,5 V, 0,0 V и +0,5 V за комплексе **4** – **8**, а +0,5 V, -0,2 V и +0,5 V за комплексе **9** и **10**. Додатни електролит за испитиване комплексе био је 0,1 М Et₄NBr у метилен-хлориду. Раствори NaClO₄ и PBS пуфера нису коришћени због редокс реакција које могу да ометају мерења.

2.3. Синтезе комплекса и лиганата

2.3.1. Синтеза комплекса **1** – **3**¹⁶¹

[Au(H₂L^{t-Bu})Cl](Cl₂) (**1**): У раствор који садржи смешу 0,02 mmol 2,6-bis(5-*terc*-бутил-1H-пиразол-3-ил)пиридина (H₂L^{t-Bu}, 67,4 mg) у 5,0 mL ацетона и натријум-ацетата (65,6 mg) раствореног у H₂O, додат је раствор који садржи 0,02 mmol K[AuCl₄] (75,5 mg) у 2,0 mL ацетонитрила. Раствор је загреван на 333 К 20 min. Добијена смеша је филтрирана врућа, а растварач је потом уклоњен упаравањем. Додатак ацетона је узроковао формирање продукта у форми наранцасте чврсте супстанце. Супстанца је одвојена филтрирањем, испрана етром и сушена на вакууму. Принос: 44,2 mg (35,30 %). Комплекс **1** је растворан у метанолу, ацетону, хлороформу, метилен-хлориду, ацетонитрилу и диметилсулфоксиду, делимично растворан у етанолу, а мало растворан у води. Резултати карактеризације комплекса, применом различитих аналитичких метода (NMR, IR, UV-Vis, MALDI-TOF и елементална микроанализа), дати су у Табели 3.

[Au(Me₂L^{t-Bu})Cl](Cl₂) (**2**): Раствор који садржи 0,5 mmol лиганда 2,6-bis(5-*terc*-бутил-1-метил-1H-пиразол-3-ил)пиридина (Me₂L^{t-Bu} 175,7 mg) у 2,0 mL етанола додат је раствору који садржи еквимоларну количину K[AuCl₄] (188,9 mg) у 5,0 mL воде. Светло

жути талог формиран је одмах након додатка лиганда. Након мешања око 4 h на собној температури продукт је одвојен филтрирањем, испран етанолом и етром, а затим сушен на вакууму. Принос: 178,4 mg (54,60 %). Комплекс **2** је растворан у метанолу, ацетону, хлороформу и метилен-хлориду, делимично растворан у етанолу, ацетонитрилу и диметилсулфоксиду, а слабо растворан у води. Комплекс је окарактерисан методама NMR, IR, UV-Vis, MALDI-TOF и елементалном микроанализом. Подаци су приказани у Табели 3.

[Au(Me₂*L)Cl](Cl₂) (**3**): Лиганд 2,6-bis((4*S*,7*R*)-1,7,8,8-тетраметил-4,5,6,7-тетрахидро-1*H*-4,7-метаноиндазол-3-ил)пиридин (Me₂*L, 0,15 mmol, 68,3 mg) и K[AuCl₄] (0,15 mmol, 56,7 mg) помешани су на исти начин као што је описано у оквиру процедуре за синтезу комплекса **2**, формирајући жути талог. Принос: 88,8 mg (78,00 %). Комплекс **3** је растворан у метанолу, ацетону, хлороформу, метилен-хлориду, ацетонитрилу и диметилсулфоксиду, а делимично растворан у води и етанолу. Комплекс је окарактерисан елементалном микроанализом, NMR, IR, UV-Vis и MALDI-TOF методама. Подаци су приказани у Табели 3.

2.3.2. Синтеза лиганада L1 – L3¹⁶²

Лиганди **L1** – **L3** ((3-((2-((5-фенил-1*H*-пиразол-3-ил)метокси)нафтален-3-илокси)метил)-5-фенил-1*H*-пиразол – **L1**; (3-((2-((5-фенил-1*H*-пиразол-3-ил)метокси)фенокси)метил)-5-фенил-1*H*-пиразол – **L2**; (3-((2-((5-нафтален-2-ил)-1*H*-пиразол-3-ил)-метокси)фенокси)метил)-5-(нафтален-3-ил)-1*H*-пиразол – **L3**) синтетисани су мешањем раствора који садржи 2,5 mmol одговарајућег прекурсора (4,4'-(нафтален-2,3-диил bis(окси))bis(1-фенилбутан-1,3-дион-а), 4,4'-(1,2-фениленbis(окси))bis(1-фенилбутан-1,3-дион-а) или 4,4'-(1,2-фенилен-bis(окси))bis(1-(нафтален-2-ил)бутан-1,3-дион-а) са 15 mmol NH₂-NH₂ раствореног у етанолу (25 mL). Након рефлуковања у трајању од 4 h раствори су филтрирани, а формиран талози анализирају.

L1: Принос: 63,49 % (750 mg). Лиганд је добро растворан у ацетону, диметилсулфоксиду, тетрахидрофурану, пиридину, делимично растворан у хлороформу, толуену, метилен-хлориду, а није растворан у метанолу и ацетонитрилу. Резултати карактеризације једињења NMR спектроскопијом приказани су у Табели 1.

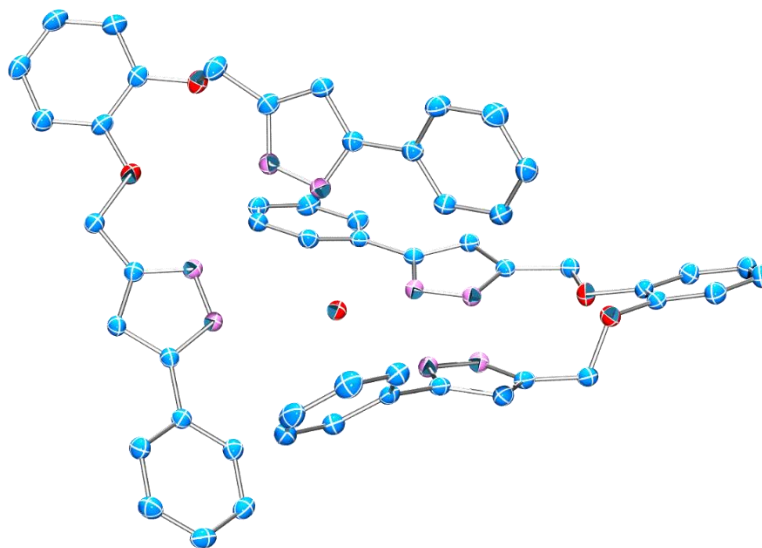
L2: Принос 71,38 % (756 mg). Лиганд је добро растворан у ацетону, диметилсулфоксиду, тетрахидрофурану, пиридину, делимично растворан у хлороформу, толуену, метилен-хлориду, а није растворан у метанолу и ацетонитрилу. Резултати карактеризације једињења NMR спектроскопијом приказани су у Табели 1, док су кристалографски подаци приказани на слици 27 и у Табели 2.

L3: Принос: 68,49 % (900 mg). Лиганд је добро растворан у ацетону, диметилсулфоксиду, тетрахидрофурану, пиридину, делимично растворан у хлороформу, толуену, метилен-хлориду, а није растворан у метанолу и ацетонитрилу. Резултати карактеризације једињења NMR спектроскопијом приказани су у Табели 1.

Табела 1. Резултати карактеризације лиганата **L1** – **L3**¹⁶²

Лиганд	Карактеризација
L1	¹ H NMR (400MHz, CD ₃ OD ₃): 7,74 – 7,85 (m, H ₁ , H ₁ ', H ₅ , H ₅ ', H ₉ , H ₉ '), 7,56 (s, H ₈ , H ₈ '), 7,30 – 7,44 (m, H ₂ , H ₂ ', H ₃ , H ₃ ', H ₄ , H ₄ ', H ₁₀ , H ₁₀ '), 6,85 (s, H ₆ , H ₆ '), 5,20 (s, 2H ₇ , 2H ₇ '), 2,86 (bs, H ₁₁ , H ₁₁ ')
L2	¹ H NMR (400MHz, CD ₃ OD ₃): 7,82 (d, H ₁ , H ₁ ', H ₅ , H ₅ '), 7,41 (t, H ₂ , H ₂ ', H ₄ , H ₄ '), 7,32 (t, H ₃ , H ₃ '), 7,17 (m, H ₉ , H ₉ '), 6,95 (m, H ₈ , H ₈ '), 6,78 (s, H ₆ , H ₆ '), 5,27 (s, H ₇ , H ₇ '), 2,95 (bs, H ₁₀ , H ₁₀ ').
L3	¹ H NMR (400MHz, CD ₃ OD ₃): 8,33 (s, H ₇ , H ₇ '), 7,99 (d, H ₁ , H ₁ '), 7,82 – 7,92 (m, H ₂ , H ₂ ', H ₃ , H ₃ ', H ₆ , H ₆ '), 7,45 – 7,53 (m, H ₄ , H ₄ ', H ₅ , H ₅ '), 7,15 – 7,23 (m, H ₁₁ , H ₁₁ '), 6,95 – 7,00 (m, H ₁₀ , H ₁₀ '), 6,94 (s, H ₈ , H ₈ '), 5,27 (s, H ₉ , H ₉ '), 2,91 (bs, H ₁₂ , H ₁₂ ')

Перспективни приказ структуре лиганда **L2** је дат на слици 27. Детаљан опис који подразумева дужине веза, углове и торзионе углове, атомске координате и еквивалентне изотропске параметре замене приказан је у оквиру публикованих резултата.¹⁶² **L2** кристалише као моноклиничан кристални систем са P2₁/с групом симетрије.



Слика 27. Асиметрична јединица кристалне структуре хидрата **L2**. Атоми водоника су изостављени због јасноће приказа¹⁶²

Табела 2. Кристалографски подаци за лиганд **L2**¹⁶²

Емпиријска формула	C ₂₆ H ₂₃ N ₄ O _{2.50}
Молекулска маса	431,48
Температура	100(2) K
Таласна дужина	1,54184 Å
Кристални систем	Моноклиничан
Просторна група	P2 ₁ /c
Димензије ћелија	a = 15,2760(2) Å α = 90° b = 28,7987(4) Å β = 99,4890(10)° c = 9,90630(10) Å γ = 90°
Запремина	4298,44(9) Å ³
Z	8
Густина (израчуната)	1,333 Mg/m ³
Апсорпциони коефицијент	0,708 mm ⁻¹
F(000)	1816
Опис кристала	Нерегуларни (безбојни)
Величина кристала	0,386 x 0,194 x 0,047 mm ³
Распон за прикупљање података	2,933 до 77,591°
Распон индекса	-19 ≤ h ≤ 19, -36 ≤ k ≤ 35, -12 ≤ l ≤ 9
Прикупљена рефлексија	71,047
Независна рефлексија	8954 [R _{int} = 0,0290]
Потпуност = 67,684°	100,0 %
Корекција апсорпције	Gaussian
Максимална и минимална трансмисија	1,000 и 0,507
Подаци / ограничења / параметри	8954 / 0 / 610
Тачност фитовања на F ²	1,027
Конечни R индекси [I > 2 σ (I)]	R ₁ = 0,0352, wR ₂ = 0,0867
R индекси (сви подаци)	R ₁ = 0,0387, wR ₂ = 0,0890
Највећа разлика, пик и руна	0,229 и -0,216 e ⁻ Å ⁻³

2.3.3. Синтеза комплекса 4 – 8¹⁶²

[Au(N-N)Cl₂](Cl) (N-N = L1 за комплекс **4**, L2 за комплекс **5**, L3 за комплекс **6**): Раствор одговарајућег лиганда количине 0,13 mmol (61,5 mg за **L1**; 55,0 mg за **L2** и 66,5 mg за **L3**) у ацетону (3,0 mL) додат је раствору који садржи 0,13 mmol K[AuCl₄] (50,0 mg) раствореног у 2,0 mL ацетонитрила у циљу добијања комплекса **4 – 6**. Одмах након мешања смеши је додато 0,52 mmol натријум-ацетата (42,5 mg). Смеша припремљена на овај начин остављена је у мраку на собној температури 1 h, а потом загревана на 333 – 343 K у трајању од 30 min. Топао раствор је филтриран и остављен да упарава у мраку на собној температури. Приноси: 92,77 % (95 mg) за комплекс **4**, 88,52 % (84,8 mg) за комплекс **5** и 89,63 % (97,7 mg) за комплекс **6**. Резултати NMR, IR, UV–Vis, ESI MS, моларне проводљивости и елементалне микроанализе дати су у Табели 3.

[Au(N-N)₂](Cl₃) (N-N = L1 за комплекс **7**, L2 за комплекс **8**): Раствор одговарајућег лиганда количине 0,26 mmol (123,0 mg за **L1** и 110,0 mg за **L2**) у ацетону (5,0 mL) додат је

раствору који садржи 0,13 mmol $K[AuCl_4]$ (50,0 mg) раствореног у 2,0 mL ацетонитрила у циљу добијања комплекса **7** – **8**. Одмах након мешања смеши је додато 1,04 mmol натријум-ацетата (85,0 mg). Смеша припремљена на овај начин остављена је у мраку на собној температури 45 min, а потом загревана на 333 – 343 K у трајању од 20 min. Добијени раствор је филтриран топао и остављен да упарава у мраку на собној температури неколико дана. Приноси: 82,15 % (135,8 mg) за комплекс **7** и 92, 16 % (139,8 mg) за комплекс **8**. Резултати NMR, IR, UV–Vis, ESI MS, моларне проводљивости и елементалне микроанализе сумирани су у Табели 3.

2.3.4. Синтеза комплекса **9** – **10**¹⁶³

$[Au(dpphen)Cl_2](Cl)$ (**9**): Комплекс је синтетисан према већ објављеној процедури.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ У раствор $K[AuCl_4]$ (108 mg, 0,28 mmol) у 5,0 mL апсолутног метанола додата је еквивалентна количина 4,7–дифенил–1,10–фенантролина (dpphen, 96 mg, 0,28 mmol). Смеша је мешана 2 h на собној температури. Настали жути талог је филтриран и остављен да се осуши. Резултати карактеризације помоћу елементалне микроанализе, IR, UV–Vis, ESI MS и моларне проводљивости дати су у Табели 3.

$[Au(dmphe)Cl_2](Cl)$ (**10**): Комплекс **10** је синтетисан према сличној процедури. У раствор $K[AuCl_4]$ (92,4 mg, 0,24 mmol) у 5 mL апсолутног етанола додата је еквивалентна количина 2,9–диметил–1,10–фенантролина (dmphe, 59 mg, 0,24 mmol). Смеша је мешана 2 h на собној температури у мраку. Добијен наранџасти раствор остављен је да упарава неколико дана, а настали талог одвојен филтрирањем. Резултати карактеризације помоћу елементалне микроанализе, IR, UV–Vis, ESI MS и моларне проводљивости сумирани су у Табели 3.

2.3.5. Синтеза комплекса **11** – **13**¹⁶⁷

$[Au(NNN)Cl](Cl_2)$ (NNN = terpy за комплекс **11**, dien за комплекс **12**): Комплекси **11** – **13** су припремљени према већ публикованој процедури.^{44,168,169} У основи, за синтезу комплекса **11** и **12** у водени раствор $H[AuCl_4]$ (2,5 mmol, 0,97g за комплекс **11**; 1,8 mmol, 0,7 g за комплекс **12**) додат је одговарајући лиганд (terpy 2,7 mmol, 0,633 g или dien 4,7 mmol, 1 g) растворен у води. pH вредност у опсегу од 3,0 до 5,0 подешена је додатком NaOH. У случају комплекса **11** смеша је рефлуктована неколико сати, док је комплекс **12** добијен мешањем на 273 K. Комплекси су окарактерисани елементалном микроанализом, Табела 3.

$[Au(NNN)Cl](Cl_2)$ (NNN = bpm за комплекс **13**): Раствор лиганда у води (2,5 mmol, 0,49 g) додат је воденом раствору $Na[AuCl_4]$ (2,5 mmol, 0,90 g). Након мешања од неколико сати добијен је црвени талог, који је одвојен филтрирањем. Комплекс је окарактерисан елементалном микроанализом, Табела 3.

2.3.6. Синтеза комплекса **14** – **19**¹⁷⁰

[Au₂(*N-N*)Cl₆] (*N-N* = dab (1,4–диаминобутан) за комплекс **14**, dah (1,6–диаминохексан) за комплекс **15**, dao (1,8–диаминооктан) за комплекс **16**): Раствор који садржи 0,065 mmol одговарајућег лиганда (6,5 μ L ($\rho=0,877$ g mL⁻¹) dab; 9,0 μ L ($\rho = 0,84$ g mL⁻¹) dah и 9,4 mg dao) у 2,0 mL етанола додат је раствору који садржи 0,13 mmol K[AuCl₄] (50,0 mg) у 5,0 mL етанола. Жути талог је формиран одмах након додатка лиганда. Реакциона смеша је мешана у мраку на собној температури 5 h. У случају комплекса **14** талог је одмах филтриран и сушен у мраку на собној температури, док је у случају комплекса **15** и **16** раствор остављен да упарава на собној температури. Комплекси су окарактерисани елементалном микроанализом, NMR, IR, UV–Vis, ESI MS методама и мерењем моларне проводљивости, Табела 3.

[Au₃(*N-N*)₂Cl₈](Cl) (*N-N* = dab за комплекс **17**, dah за комплекс **18**, dao за комплекс **19**): Раствор који садржи 0,17 mmol одговарајућег лиганда (17,1 μ L ($\rho = 0,877$ g mL⁻¹) dab; 23,5 μ L ($\rho = 0,84$ g mL⁻¹) dah и 24,5 mg dao) у 2,0 mL етанола додат је у капима раствору који садржи 0,26 mmol K[AuCl₄] (100 mg) у 5,0 mL етанола. Реакциона смеша је мешана у мраку на собној температури 3 h, а затим остављена да упарава на собној температури. Након упаравања жути талог је одвојен филтрирањем. Комплекси су окарактерисани елементалном микроанализом, NMR, IR, UV–Vis, ESI MS методама и мерењем моларне проводљивости. Подаци су приказани у Табели 3.

Табела 3. Резултати карактеризације Au(III) комплекса **1** – **19**.^{161-163,167,170}

Комплекс	Резултати карактеризације
1	Прорачун за C ₁₉ H ₂₅ Cl ₃ N ₅ Au (1) (626,76): C, 36,41; H, 4,02; N, 11,17. Нађено: C, 36,32; H, 4,10; N, 11,13. ¹ H NMR (500MHz, CD ₃ OD) 8,15 (t, <i>J</i> =7,9, C4H, 1H), 7,66 (d, <i>J</i> =7,9, C3H/C5H, 2H), 6,86 (s, C8H/C8'H, 2H), 1,36 (s, C12(CH ₃) ₃ /C12'(CH ₃) ₃ , 18H). ¹³ C NMR (126 MHz, CD ₃ OD) 163,7 (C9/C9'), 152,5 (C7/C7'), 150,9 (C2/C6), 146,7 (C4H), 117,2 (C3H/C5H), 105,2 (C8H/C8'H), 33,8 (C12/C12'), 30,9 (C12(CH ₃) ₃ /C12'(CH ₃) ₃). IR (KBr, cm ⁻¹): 3376 (s), 2960 (s), 1599 (m), 1567 (m), 1485 (s), 799 (m). UV-Vis спектар (CH ₃ OH; $\lambda_{\max}$, nm (ϵ , M ⁻¹ cm ⁻¹)): 234 (29700), 255 (24920), 303 (15248), 389 (2337). MALDI TOF MS [MH ⁺] 556,27
2	Прорачун за C ₂₁ H ₂₉ Cl ₃ N ₅ Au (2) (654,81): C, 38,52; H, 4,46; N, 10,70. Нађено: C, 38,46; H, 4,35; N, 10,83. ¹ H NMR (500MHz, CD ₃ OD) 8,00 (t, <i>J</i> =7,9, C4H, 1H), 7,88 (d, <i>J</i> =7,8, C3H/C5H, 2H), 6,88 (s, C8H/C8'H, 2H), 4,09 (s, N10CH ₃ /N10'CH ₃ , 6H), 1,47 (s, C12(CH ₃) ₃ /C12'(CH ₃) ₃ , 18H). ¹³ C NMR (126 MHz, CD ₃ OD) 155,1 (C9/C9'), 151,2 (C2/C6), 145,8 (C7/C7'), 141,4 (C4H), 120,5 (C3H/C5H), 104,5 (C8H/C8'H), 40,3 (N10CH ₃ /N10'CH ₃), 32,4 (C12/C12'), 29,9 (C12(CH ₃) ₃ /C12'(CH ₃) ₃). IR (KBr, cm ⁻¹): 2966 (vs), 2909 (m), 1622 (vs), 1572 (s), 1499 (s), 801 (s). UV-Vis спектар (CH ₃ OH; $\lambda_{\max}$, nm (ϵ , M ⁻¹ cm ⁻¹)): 244 (30216), 303 (20250), 358 (2794). MALDI TOF MS [MH ⁺] 582,38.
3	Прорачун за C ₂₉ H ₃₇ Cl ₃ N ₅ Au (3) (758,96): C, 45,89; H, 4,91; N, 9,23. Нађено: C, 45,93; H, 4,82; N, 9,31. ¹ H NMR (500MHz, CD ₃ OD) 8,22 (t, <i>J</i> =7,9, C4H, 1H), 7,86 (d, <i>J</i> =7,9, C3H/C5H, 2H), 4,03 (s, N10CH ₃ /N10'CH ₃ , 6H), 3,33 – 3,27 (m, C12H/C12'H, 2H), 2,28 – 2,20 (m, C13H/C13'H, 2H), 2,03 – 1,96 (m, C14H/C14'H, 2H), 1,47 (s, C15CH ₃ /C15'CH ₃ , 6H), 1,40 – 1,33 (m, C14H/C14'H, 2H), 1,27 – 1,20 (m, C13H/C13'H, 2H), 1,04

- (s, C16CH₃/C16'CH₃, 6H), 0,85 (s, C16CH₃/C16'CH₃, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, CD₃OD) δ 159,0 (C9/C9'), 148,6 (C2/C6), није детектован (C7/C7'), 144,1 (C4H), 130,2 (C8/C8'), 121,5 (C3H/C5H), 64,5 (C15/C15'), 54,2 (C16/C16'), 49,8 (C12H/C12'H), 37,9 (N10CH₃/N10'CH₃), 34,0 (C14H₂/C14'H₂), 27,9 (C13H₂/C13'H₂), 20,7 (C16CH₃/C16'CH₃), 19,7 (C16CH₃/C16'CH₃), 11,0 (C15CH₃/C15'CH₃). IR (KBr, cm⁻¹): 2957 (s), 2874 (m), 1621 (vs), 1525 (m), 1443 (m), 821 (m). UV-Vis спектар (CH₃OH; λ_{max}, nm (ε, M⁻¹ cm⁻¹)): 227 (22464), 266 (10836), 303 (8396), 376 (729). MALDI TOF MS [MH⁺] 688,14.
- 4** Прорачун за C₃₀H₂₄Cl₃N₄O₂Au (**4**) (761,06): C, 46,44; H, 3,12; N, 7,22. Нађено: C, 46,12; H, 3,20; N, 7,13. ¹H NMR (400MHz, CD₃OCD₃) 8,00 – 8,05 (d, *cis*, H₁, H₁', H₅, H₅'), 7,85 – 7,90 (d, *trans*, H₁, H₁', H₅, H₅'), 7,79 – 7,83 (m, H₉, H₉'), 7,62 – 7,73 (m, H₂, H₂', H₄, H₄'), 7,62 (s, H₈, H₈'), 7,15 – 7,40 (m, H₃, H₃', H₁₀, H₁₀'), 6,76 и 6,85 (s, *cis*, H₆, H₆'), 6,65 и 6,70 (s, *trans*, H₆, H₆'), 5,48 (s, *trans*, H₇, H₇'), 5,44 (s, *cis*, H₇, H₇'), 3,36 (bs, H₁₁, H₁₁'). IR (KBr, cm⁻¹): 3432 (s), 3054 (m), 2918 (m), 1574 (m), 1509 (m), 1479 (m), 1253 (s), 1114 (m), 762 (s), 693 (s). UV-Vis спектар (H₂O, λ_{max}, nm): 310, 325. ESI-MS (m/z⁺) 739,0937. Моларна проводљивост (λm, Ω⁻¹cm⁻¹mol⁻¹, DMF) 72.
- 5** Прорачун за C₂₆H₂₂Cl₃N₄O₂Au (**5**) (724,05): C, 43,03; H, 3,06; N, 7,72. Нађено: C, 42,96; H, 3,14; N, 7,58. ¹H NMR (400MHz, CD₃OCD₃) 7,79 – 7,94 (d, H₁, H₁', H₅, H₅'), 7,29 – 7,51 (m, H₂, H₂', H₃, H₃', H₄, H₄'), 7,14 – 7,20 (m, H₈, H₈'), 7,07 – 7,13 (m, H₉, H₉'), 6,78 (s, H₆, H₆'), 5,45 и 5,28 (s, *cis*, H₇, H₇'), 5,40 и 5,22 (s, *trans*, H₇, H₇'), 3,94 (bs, H₁₀, H₁₀'). IR (KBr, cm⁻¹): 3431 (s), ~ 3100 (w), 1567 (m), 1499 (s), 1257 (s), 1120 (m), 762 (s), 692 (s). UV-Vis спектар (H₂O, λ_{max}, nm): 261. ESI-MS (m/z⁺) 689,0780. Моларна проводљивост (λm, Ω⁻¹cm⁻¹mol⁻¹, DMF) 67.
- 6** Прорачун за C₃₄H₂₆Cl₃N₄O₂Au (**6**) (824,08): C, 49,44; H, 3,17; N, 6,78. Нађено: C, 49,36; H, 3,24; N, 6,57. ¹H NMR (400MHz, CD₃OCD₃) 8,41 (s, H₇, H₇'), 8,08 (d, H₁, H₁'), 7,80 – 8,02 (m, H₂, H₂', H₃, H₃', H₆, H₆'), 7,44 – 7,60 (m, H₄, H₄', H₅, H₅'), 7,32 – 7,38 (m, H₁₀, H₁₀'), 7,08 – 7,14 (m, H₁₁, H₁₁'), 6,94 (s, H₈, H₈'), 5,46 (s, H₉, H₉'), 3,80 (bs, H₁₂, H₁₂'). IR (KBr, cm⁻¹): 3432 (s), ~ 3100 (w), 1567 (m), 499 (s), 1257 (s), 1120 (m), 746 (s). UV-Vis спектар (H₂O, λ_{max}, nm): 298. ESI-MS (m/z⁺) 189,1093. Моларна проводљивост (λm, Ω⁻¹cm⁻¹mol⁻¹, DMF) 86.
- 7** Прорачун за C₆₀H₄₈Cl₃N₈O₄Au (**7**) (1246,25): C, 57,73; H, 3,88; N, 8,98. Нађено: C, 57,61; H, 3,96; N, 8,84. ¹H NMR (400MHz, CD₃OCD₃) 7,85 – 7,90 (m, H₁, H₁', H₅, H₅'), 7,68 – 7,83 (m, H₁, H₂', H₄, H₄'), 7,67 (s, H₈, H₈'), 7,10 – 7,45 (m, H₃, H₃', H₉, H₉', H₁₀, H₁₀'), 6,64 и 6,68 (s, H₆, H₆'), 5,47 (s, H₇, H₇'), 3,89 (bs, H₁₁, H₁₁'). IR (KBr, cm⁻¹): 3430 (s), 3053 (m), 2926 (m), 1569 (m), 1508 (m), 1479 (m), 1253 (s), 1114 (m), 762 (s), 692 (s). UV-Vis спектар (H₂O, λ_{max}, nm): 310, 325. ESI-MS (m/z⁺) 1139,3302. Моларна проводљивост (λm, Ω⁻¹cm⁻¹mol⁻¹, DMF) 191.
- 8** Прорачун за C₅₂H₄₄Cl₃N₈O₄Au (**8**) (1146,22): C, 54,39; H, 3,86; N, 9,76. Нађено: C, 54,26; H, 3,97; N, 9,61. ¹H NMR (400MHz, CD₃OCD₃) 7,74 – 7,90 (d, H₁, H₁', H₅, H₅'), 7,20 – 7,44 (m, H₂, H₂', H₃, H₃', H₄, H₄'), 6,98 – 7,20 (m, H₈, H₈', H₉, H₉'), 6,63 (s, H₆, H₆'), 5,29 (s, H₇, H₇'), 3,58 (bs, H₁₀, H₁₀'). IR (KBr, cm⁻¹): 3431 (s), 3062 (w), 3034 (w), 1567 (m), 1498 (s), 1256 (s), 1120 (m), 762 (s), 692 (s). UV-Vis спектар (H₂O, λ_{max}, nm): 261. ESI-MS (m/z⁺) 1039,2989. Моларна проводљивост (λm, Ω⁻¹cm⁻¹mol⁻¹, DMF) 178.
- 9** Прорачун за C₂₄H₁₆Cl₂N₂Au (**9**) (635,7228): C, 30,70; H, 1,72; N, 2,98. Нађено: C, 31,61; H, 1,86; N, 2,86. IR (KBr, cm⁻¹): 3083 (w), 1626 (w), 1598 (s), 1565 (s), 1516 (m), 1425 (s), 1405 (s). UV-Vis спектар (H₂O, λ_{max}, nm): 298. ESI-MS (m/z⁺) 599. Моларна проводљивост (λm, Ω⁻¹cm⁻¹mol⁻¹, DMF) 79.

- 10** Прорачун за $C_{14}H_{12}Cl_3N_2Au$ (**10**) (511,584): C, 32,87; H, 2,36; N, 5,48. Нађено: C, 32,65; H, 2,40; N, 5,36. IR (KBr, cm^{-1}): 3053 (w), 2915 (w), 1591(m), 1509 (s), 1500 (s), 1428 (m). UV-Vis спектар (H_2O , λ_{max} , nm): 270, 326. ESI-MS (m/z^+) 475. Моларна проводљивост (λm , $\Omega^{-1}cm^{-1}mol^{-1}$, DMF) < 20.
- 11** Прорачун за $C_{16}H_{14}Cl_3N_3Au$ (**11**) (534,96): C, 33,57; H, 2,07; N, 7,83. Нађено: C, 33,64; H, 2,21, N, 7,74.
- 12** Прорачун за $C_7H_{21}Cl_3N_3Au$ (**12**) (406,98): C, 11,82; H, 3,22; N, 10,34. Нађено: C, 11,88; H, 3,35, N, 10,31.
- 13** Прорачун за $C_{15}H_{21}ClN_3Au$ (**13**) (500,98): C, 28,68; H, 2,61; N, 8,36. Нађено: C, 28,59; H, 2,70, N, 8,28.
- 14** Прорачун за $C_4H_{12}Cl_6N_2Au_2$ (**14**) (691,85): C, 6,91; H, 1,74; N, 4,03. Нађено: C, 6,86; H, 1,81; N, 3,99. 1H NMR (200 MHz, D_2O): 1,75 (m, 4H, C_2-H , C_3-H), 3,04 (t, 4H, C_1-H , C_4-H). IR (KBr, cm^{-1}): 3526 (s), 3479 (s), 2918 (s), 1575 (s), 1499 (s), 1142 (m). UV-Vis спектар (H_2O , λ_{max} , nm): 285. ESI-MS (m/z^+) 692,87. Моларна проводљивост (λm , $\Omega^{-1}cm^{-1}mol^{-1}$, DMF) < 20.
- 15** Прорачун за $C_6H_{16}Cl_6N_2Au_2$ (**15**) (719,88): C, 9,97; H, 2,23; N, 3,88. Нађено: C, 9,91; H, 2,31; N, 3,84. 1H NMR (200 MHz, D_2O): 1,41 (m, 4H, C_3-H , C_4-H), 1,69 (m, 4H, C_2-H , C_5-H), 2,99 (t, 4H, C_1-H , C_6-H). IR (KBr, cm^{-1}): 3500-3400 (s), 2935 (s), 1560 (s), 1469 (s), 1175 (m). UV-Vis спектар (H_2O , λ_{max} , nm): 286. ESI-MS (m/z^+) 720,94. Моларна проводљивост (λm , $\Omega^{-1}cm^{-1}mol^{-1}$, DMF) < 20.
- 16** Прорачун за $C_8H_{20}Cl_6N_2Au_2$ (**16**) (747,91): C, 12,80; H, 2,68; N, 3,73. Нађено: C, 12,67; H, 2,75; N, 3,68. 1H NMR (200 MHz, D_2O) 1,35 (m, 8H, C_3-H , C_4-H , C_5-H , C_6-H), 1,64 (m, 4H, C_2-H , C_7-H), 2,98 (t, 4H, C_1-H , C_8-H). IR (KBr, cm^{-1}): 3460-3420 (s), 2925 (s), 1648 (s), 1460 (s), 1253 (m). UV-Vis спектар (H_2O , λ_{max} , nm): 293. ESI-MS (m/z^+) 748,97. Моларна проводљивост (λm , $\Omega^{-1}cm^{-1}mol^{-1}$, DMF) < 20.
- 17** Прорачун за $C_8H_{24}Cl_9N_4Au_3$ (**17**) (1081,82): C, 8,85; H, 2,23; N, 5,16. Нађено: C, 8,78; H, 2,27; N, 5,04. 1H NMR (200 MHz, D_2O) 1,75 (m, 4H, C_2-H , C_3-H), 3,04 (t, 4H, C_1-H , C_4-H). IR (KBr, cm^{-1}): 3538 (s), 3486 (s), 2933 (s), 1599 (s), 1499 (s), 1109 (m). UV-Vis спектар (H_2O , λ_{max} , nm): 293. ESI-MS (m/z^+) 1050,04. Моларна проводљивост (λm , $\Omega^{-1}cm^{-1}mol^{-1}$, DMF) 93.
- 18** Прорачун за $C_{12}H_{32}Cl_9N_4Au_3$ (**18**) (1137,88): C, 12,69; H, 2,82; N, 4,90. Нађено: C, 12,57; H, 2,93; N, 4,79. 1H NMR (200 MHz, D_2O ,) 1,41 (m, 4H, C_3-H , C_4-H), 1,67 (m, 4H, C_2-H , C_5-H), 2,99 (t, 4H, C_1-H , C_6-H). IR (KBr, cm^{-1}): 3591 (s), 3518 (s), 2933 (s), 1560 (s), 1468 (s), 1174 (m). UV-Vis спектар (H_2O , λ_{max} , nm): 287. ESI-MS (m/z^+) 1106,91. Моларна проводљивост (λm , $\Omega^{-1}cm^{-1}mol^{-1}$, DMF) 87.
- 19** Прорачун за $C_{16}H_{40}Cl_9N_4Au_3$ (**19**) (1193,94): C, 16,03; H, 3,36; N, 4,67. Нађено: C, 15,97; H, 3,45; N, 4,57. 1H NMR (200 MHz, D_2O) 1,35 (m, 8H, C_3-H , C_4-H , C_5-H , C_6-H), 1,65 (m, 4H, C_2-H , C_7-H), 2,98 (t, 4H, C_1-H , C_8-H). IR (KBr, cm^{-1}): 3450-3400 (s), 2925 (s), 1596 (s), 1498 (s), 1132 (m). UV-Vis спектар (H_2O , λ_{max} , nm): 287. ESI-MS (m/z^+) 1163,24. Моларна проводљивост (λm , $\Omega^{-1}cm^{-1}mol^{-1}$, DMF) 99.
-

2.4. Испитивање стабилности комплекса у воденом раствору

Стабилност комплекса **1 – 10** у води и у одговарајућем пуферу (10 mM Tris–HCl/150 mM NaCl или PBS, pH 7,4) анализирана је применом UV–Vis спектрофотометрије. Концентрација сваког комплекса у коначном узорку била је 5×10^{-5} М. Заправо, комплекси **1 – 3** прво су растворени у пар капи диметилсулфоксида, а затим разблажени водом или пуфером до одговарајуће концентрације. Апсорпциони спектри су снимани у току 24 h на собној температури. Комплекси **4 – 10** су прво растворени у пар капи *N,N*-диметилформамида, а затим разблажени водом или пуфером до жељене концентрације. Апсорпциони спектри комплекса су снимани у току 6 h на собној температури. Комплекси **14 – 19** су растворени у пар капи етанола, а затим разблажени водом или пуфером до концентрације 5×10^{-5} М, након чега су снимљени UV–Vis спектри.

2.5. Кинетичка испитивања

Супституционе реакције комплекса **1 – 13** са различитим нуклеофилима испитиване су употребом „*stopped-flow*” технике, праћењем промене апсорпције на одговарајућој радној таласној дужини. Радна таласна дужина представља таласну дужину на којој се може уочити највећа промена у апсорпцији система у току времена. Свако мерење је подразумевало мешање једнаких запремина раствора нуклеофила и комплекса директно у ћелији. Супституционе реакције су испитиване на три различите температуре (288, 298 и 310 K) како би се омогућило одређивање вредности термодинамичких параметара.

Сва кинетичка мерења су изведена под условима реакција *pseudo*–првог реда, где је концентрација нуклеофила била најмање 10 пута већа у односу на концентрацију полазног комплекса. Добијене константе брзине реакције *pseudo*–првог реда, k_{obs} , представљају средњу вредност најчешће пет до осам независних кинетичких мерења. Вредност за k_{obs} се одређује на основу једначине 2, праћењем промене апсорпције раствора у току времена.

$$\ln(A_t - A_\infty) = \ln(A_0 - A_\infty) - k_{\text{obs}}t \quad (2)$$

Нагиб праве, који се добија из графика $\ln(A_t - A_\infty)$ у функцији од t , представља k_{obs} . Члан A_∞ је апсорпција раствора након „бесконачно“ дугог времена (углавном од 8 до 10 полувремена реакције). Сви кинетички подаци су анализирани коришћењем програма Microsoft Excel 2007 и Origin 8.

2.6. Апсорпциона спектроскопска испитивања

Интеракције комплекса са DNA су испитиване помоћу UV–Vis спектрофотометрије на 310 K. Апсорпциона титрација раствора комплекса константне концентрације ($[\text{Au(III)}] = 13,5 \mu\text{M}$ за комплексе **1 – 10**; $[\text{Au(III)}] = 8 \mu\text{M}$ за комплексе **14 – 19**) у пуферу (10 mM Tris–HCl/150 mM NaCl или PBS, pH 7,4) извршена је додатком радног раствора DNA растуће концентрације ($[\text{DNA}] = (1,35 - 13,5) \times 10^{-5}$ М за комплексе **1 – 8**; $[\text{DNA}] = (1,34 - 12,6) \times 10^{-5}$ М за комплексе **9** и **10**; $[\text{DNA}] = (0,8 - 3,84) \times 10^{-5}$ М за комплексе **14 – 19**). Спектри су снимани у опсегу таласних дужина од 220 – 300 nm (за комплексе

1 – 3), 240 – 300 nm (за комплексе **4 – 8**), 230 – 330 nm (за комплексе **9** и **10**) и 230 – 300 nm (за комплексе **14 – 19**).

2.7. Флуоресцентна мерења

Везивање комплекса за DNA је испитивано и помоћу флуоресцентне спектроскопије. Флуоресцентна емисија за EB и HOE је идентична (612 nm), док су се ексцитационе таласне дужине разликовале (527 nm за EB и 346 nm за HOE). Ексцитационе и емисионе ширине прореа (свака 10 nm) и брзина скенирања биле су константне у току експеримената. Серија раствора припремљена је мешањем раствора EB–DNA са растућом концентрацијом комплекса. У свим растворима концентрације DNA и EB су биле исте (80,0 μM за комплексе **1 – 3**, 5 μM за комплексе **9** и **10**, 21 μM за комплексе **14 – 19**), док је концентрација комплекса варијала (од 8,0 μM до 80,0 μM за комплексе **1 – 3**, од 2,44 μM до 23 μM за комплексе **9** и **10**, од 2,1 μM до 25,7 μM за комплексе **14 – 19**). За комплексе **4 – 8**, DNA–EB и DNA–HOE раствори су припремани мешањем 5 μM EB/5 μM HOE и 5 μM DNA у Hepes пуферу (25 mM Hepes, 30 mM NaCl, pH = 7,2). Пре снимања сваки систем је инкубиран на собној температури у трајању од 5 min. Емисиони опсег је био различит, 550 – 750 nm за EB и 360 – 600 nm за HOE.¹⁶²

Везивање комплекса за протеин албумин је испитивано коришћењем раствора говеђег серум албумина ([BSA] = 2 μM) или хуманог серум албумина ([HSA] = 2 μM) у одговарајућем пуферу (0,01 M PBS–у или 25 mM Hepes–у, 30 mM NaCl, pH = 7,4). Емисиони интензитет раствора константне концентрације серум албумина ([BSA/HSA] = 2 μM) на 365 nm сниман је у присуству растуће концентрације комплекса **4 – 8** ([Au(III)] до 2,91 μM). Такође, емисиони интензитет триптофанских остатака BSA на 361 nm и 363 nm сниман је у случају додатка растуће концентрације комплекса **9** и **10** ([Au(III)] = 0,199 μM – 2,91 μM), а на 365 nm за комплексе **14 – 19** ([Au(III)] до 40 μM). Флуоресцентни спектри снимани су у области од 300 – 500 nm на таласној дужини ексцитације од 295 nm. Иначе, флуоресцентни спектри самих комплекса у раствору пуфера снимани су при истим експерименталним условима, а флуоресцентна емисија није детектована.

2.8. Мерење вискозности

Вискозност DNA раствора мерена је у одсуству (η_0) и у присуству (η) растуће концентрације комплекса. Проток времена мерен је дигиталном штоперицом, а сваки узорак је мерен шест пута, како би се одредило просечно време. Вредност за вискозност је израчуната као зависност посматраног времена протока раствора који садржи DNA (t), коригованог за време протока самог пуфера (t_0), $\eta = (t - t_0)/t_0$. Подаци су представљени као $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ у односу на r , где је r однос концентрације комплекса и концентрације DNA ($r = [\text{Au(III)}]/[\text{DNA}]$).

2.9. HPLC мерења

Реакција између комплекса **11** ($[\text{Au(III)}] = 5 \text{ mM}$) и L-Met ($[\text{L-Met}] = 5 \text{ mM}$) испитивана је помоћу течне хроматографије високих перформанси, применом изократске методе са водом као мобилном фазом. Раствори комплекса и лиганда, припремљени у 0,1 М хлороводоничној киселини, помешани су и термостатирани на 310 К. У одређеним временским интервалима по 20 μL реакционе смеше инјектовано је у систем.

2.10. Квантни хемијски прорачуни

За комплексе **4** – **10** сви прорачуни извршени су коришћењем ωB97XD функционала¹⁷¹ у комбинацији са базним скупом def2-TZVP или def2-SVP,¹⁷² док је за комплексе **14** – **19** коришћен B3LYP¹⁷³ у комбинацији са cc-pVTZ.¹⁷⁴ За атоме злата коришћен је релативистички ефективни основни потенцијал LanL2TZ(f).¹⁷⁴

2.11. Молекулски докинг

Оптимизоване структуре комплекса **14** – **19** добијене су на начин као што је описано у делу 2.10. За докинг испитивања кристална структура B-DNA додекамера d(CGCGAATTCGCG) добијена је из протеинске базе података (PDB код 1BNA),¹⁷⁵ коришћењем Protein Preparation Wizard in the Schrödinger 2015-02 пакета, а тачност структуре проверена је коришћењем Prime.¹⁷⁶ Структурне координате које представљају фрагменте каноничног B-DNA (PDB: 1BNA), DNA са интеркалационом празнином (PDB: 1Z3F) и BSA (PDB: 4F5S) добијене су од Brookhaven Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>). У крутој структури DNA и BSA флексибилна једињења, као што су комплекси злата **4** – **10** и **14** – **19**, доковани су коришћењем Molegro Virtual Docker програма (MVD, version 2013.6.0.1).¹⁷⁷ Код доковања комплекса **1** – **3** молекули воде уклоњени су са активних страна комплекса, као и из DNA фрагмента, ради лакшег презентовања. Сва испитивања су прилагођена тако да одговарају $\text{pH} = 7$, док су водоничне везе упрошћене коришћењем PROPKA.¹⁷⁸ Геометрија рецептора (1BNA) одређена је коришћењем OPLS-2005¹⁷⁹ поља силе.

Докинг параметри за комплексе **1** – **3**: величина популације 50, максималан број понављања 2000 и максималан број корака 500, док су за комплексе **4** – **10** и **14** – **19**: максималан број понављања 1500, величина популације 50, праг енергије 100,00, максималан број корака 300. Број добијених положаја за комплексе **1** – **3** био је 10, док је за комплексе **4** – **10** и **14** – **19** био 5. Van der Waals-ов фактор скалирања од 0,8 и делимично смањење наелектрисања од 0,15 коришћени су за докинг процесе комплекса **1** – **3** са 1BNA.

Флексибилност узорака комплекса је разматрана у процесу докинга. Интеракције између 1BNA и комплекса **1** – **3** израчунате су у односу на вредности геометријских константи и њихових енергија. Сви положаји су подвргнути минимализацији у току докинга и најбоље доковане структуре, засноване на вредностима енергије која се комбинује са енергетском мрежом, афинитетом везивања, енергијом унутрашњег напрезања и Coulomb-van der Waals-овом енергијом интеракције, одређене су за сваки комплекс. Положаји са најнижом енергијом су визуелизовани коришћењем Maestro Pose Viewer-a. Конформер са најнижом везујућом енергијом је изабран између различитих

конформера за сваку докинг симулацију, а један са најбољим вредностима је коришћен за даљу анализу након завршетка докинг процеса минимализације. Процена интеракције Au(III) комплекса **4** – **10** и **14** – **19** и DNA/BSA/HSA је описана помоћу MVD-функција бодовања: MolDock, Docking, Rerank, и Hbond.¹⁷⁷ Максимална популација од 100 и максимални број понављања од 10000 коришћени су за свако испитивање. Пет најбољих положаја за комплексе **9** и **10**, **14** – **19** је представљено, а доковани положаји су визуелизовани помоћу молекулског графичког програма CHIMERA.¹⁸⁰

2.12. Ћелијске културе

Епителне ћелијске линије карцинома дојке (MDA-MB-231), ћелијске линије хуманог карцинома дебелог црева (HCT-116) и ћелијске линије фибробласта плућа човека (MRC-5) добијене су од American Tissue Culture Collection (Manassas, VA, USA). Ћелијске линије нормалних хуманих кератиноцита (HaCaT) добијене су од CLS – Cell Lines Service, Eppelheim, Germany. Ћелијске линије хуманог карцинома плућа (A549), ћелијске линије хуманог меланома (A375) и ћелијске линије рака црева (LS-174) добијене су као монослојне културе у Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 хранљивом медијуму (Sigma Chemicals Co, USA). RPMI 1640 хранљиви медијум је припреман у стерилној дејонизованој води са додатком пеницилина (100 IU mL^{-1}), гентамицина ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), 4-(2-хидроксиетил)-пиперазин-1-етансулфонске киселине (Hepes-a) (25 mM), L-глутамина (3 mM) и 10% топлог деактивiranог феталног серума телета (FCS) (pH 7,2). Ћелије су инкубирани на 310 K у атмосфери од 95% ваздуха и 5% CO₂.

2.13. Цитотоксична анализа и биолошка испитивања

Цитотоксични ефекат комплекса **1** и лиганда (H₂L^{tBu}) испитан је помоћу 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолијум бромида (MTT, Sigma).¹⁸¹ MDA-231, HCT-116 и MRC-5 ћелијске линије су засејане на плочама за ћелијске културе са 96 отвора (Thermo Scientific Nunc™, 10⁴ ћелија по отвору). Након 24 h раста, ћелије су изложене испитиваним једињењима. Au(III) комплекси **9**, **10**, **14** - **19**, као и K[AuCl₄], растворени су у диметилсулфоксиду (100%), а затим разблажени DMEM медијумом за ћелијски третман (коначна концентрација диметилсулфоксида је била мања од 0,5%).

Контролне ћелије су третиране само растварачем. Ћелијске плоче су инкубирани 48 h, а потом је додато 20 μL MTT раствора (5 mg mL^{-1} у фосфатном пуферу, pH 7,2) у сваки отвор. Узорци су инкубирани 4 h на 310 K у влажној атмосфери са 5% CO₂, а затим је додато 100 μL 10% натријум-додецилсулфата. Апсорбанца је мерена у току 24 h на читачу (Thermo Labsystems Multiskan EX 200–240 V) таласне дужине 570 nm, који садржи ензим повезан са имуносорбентним тестом (ELISA). IC₅₀ вредности, дефинисане као концентрација једињења која изазива 50% инхибиције раста ћелија, одређене су из дијаграма ћелијске одрживости. Након 24 h од пре-инкубације, ћелије су третиране са 100 μL Au(III) комплекса **9**, **10**, **14** – **19** различитих концентрација (0,1, 1, 10, 50, 100 и 200 μM) у току 24 и 72 h. Нетретиране ћелије су служиле као контрола. На крају третмана, MTT (коначна концентрације 5 mg mL^{-1} у фосфатном пуферу) додат је сваком отвору и инкубиран на 310 K у 5% CO₂ у трајању од 2 h. Обојени кристали формаза растворени су у диметилсулфоксиду, а апсорбанца је мерена на 550 nm. Ефекат ћелијске одрживости је израчунат као однос апсорбанце третиране групе подељен са апсорбанцом контролне

групе, помножен са 100, да би се добио проценат одрживости ћелија. Подаци су изражени као два независна експеримента, коришћењем тродупле дозе. Јачина корелације између променљивих урађена је помоћу SPSS статистичког софтверског пакета (SPSS за Windows, верзија 17, 2008). Цитотоксични ефекат сваког тестираног комплекса приказан је као IC₅₀ вредност, која је израчуната помоћу компјутерског програма CalcuSyn v. 2.1.¹⁸²

Анализа дистрибуције ћелијског циклуса је изведена проточном цитометријом DNA садржаја у фиксираним A375 ћелијама, након бојења пропидијум-јодидом (PI).¹⁸³ Ћелије су засејане са густином од 2×10^5 ћелија по отвору, унутар плоча ћелијских култура са 6 отвора (Thermo Scientific Nunc™) у 2 mL хранљивог медијума. Ћелије су константно биле изложене деловању комплекса **1** или цисплатине у концентрацији која одговара 0,5IC₅₀ или IC₅₀ вредностима. Контролне ћелије су инкубиране само у хранљивом медијуму. Након 24 h константног третмана, ћелије су сакупљене, испране фосфатним пуфером (PBS) и фиксиране у 70% етанолу. Ћелије су затим инкубиране са RNaseA (1 mg mL^{-1}) 30 min на 310 K. Пре проточне цитометријске анализе, ћелије су бојене пропидијум-јодидом, концентрације $400 \mu\text{g mL}^{-1}$. Процена фазе ћелијског циклуса је извршена флуоресцентном активацијом ћелијских сорти (FACS) помоћу Calibur Becton-Dickinson анализатора и Cell Quest компјутерског софтвера.

Анализа ћелијске смрти проточном цитометријом, изазвана комплексом **1** или цисплатином као референтним једињењем, испитана је Annexin V-FITC апоптозним комплетом, према упутству произвођача (BD Biosciences Cat. No. 65874x, Pharmingen San Diego, CA, USA). Ћелије су засејане на потпуно исти начин као што је претходно описано. Након раста од 24 h, ћелијске линије су третиране комплексом **1** или цисплатином 24 h, у концентрацији која одговара 0,5IC₅₀ вредности. Након третмана, ћелијске линије су испране фосфатним пуфером, а затим поново суспендоване у 200 μL пуфера ($10 \text{ mM Hepes}/140 \text{ mM NaCl}$, pH 7,4, са $2,5 \text{ mM CaCl}_2$). 100 μL ћелијске суспензије (10^5 ћелија) пребачено је у суд од 5 mL и помешано са 5 μL AnnexinV-FITC или 5 μL PI. Након 15 min инкубације на 298 K у мраку, 400 μL везујућег пуфера је додато у сваки суд и анализирано FACS Calibur Becton-Dickinson анализатором и Cell Quest компјутерским софтвером. Минимално је анализирано 10000 ћелијских линија по узорку.

N-ацетил-L-цистеин (NAC, Sigma-Aldrich-a) растворен је у физиолошком пуферу до коначне концентрације од 30 mM и стерилисан филтрацијом кроз филтере са величином пора од 0,2 μM . Радни раствори, обавијени фолијом како би се заштитили од светлости, чувани су на температури од 253 K. A375 ћелије првенствено су третиране субтоксичном концентрацијом NAC (2 mM) у трајању од 1 h. Након испирања, две одређене концентрације (0,5IC₅₀ и IC₅₀) комплекса **1** су примењене на ћелијским линијама. Одрживост A375 ћелијских линија, након 48 h континуираног третмана само комплексом **1** или у комбинацији са NAC, мерена је помоћу MTT теста, као што је претходно описано.

Унутарћелијске реактивне кисеоничне врсте (Reactive Oxygen Species, ROS) мерене су проточном цитометријом и ћелијским бојењем са флуоресцентном бојом 2',7'-дихлородихидрофлуоресцеин диацетатом (DCFH-DA, Sigma-Aldrich Co).¹⁸⁴ A375 ћелијске линије су засејане на плочама за ћелијске културе са 6 отвора и густином од 2×10^6 ћелија по отвору. Након инкубације од 24 h, медијум је замењен медијумом који садржи IC₅₀ концентрацију комплекса **1** или цисплатине. Период инкубације је настављен до 3 h. Затим су ћелије сакупљене, испране два пута леденим фосфатним пуфером, поново суспендоване у 1 mL 25 μM 2',7'-дихлородихидрофлуоресцеин диацетата и инкубиране у

мраку 30 min на 310 K. Након инкубације, ћелије су испране фосфатним пуфером и одмах анализирани на FL1 каналу FACS Calibur Becton-Dickinson проточног цитометра, коришћењем Cell Quest компјутерског софтвера (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Екситациона таласна дужина је била 485 nm, док је емисиони пик мерен на 530 nm. Заправо, средња и гео-средња 2',7'-дихлородихидрофлуоресцеин диацетат зависна флуоресценција је одређена (по узорку је анализирано 15000 ћелија). Хистограми који се добијају на хоризонталној оси садрже унутарћелијски ниво ROS, док се на вертикалној оси налази број ћелија које имају посебан флуоресцентни интензитет. На хистограмима се могу уочити два различито обојена сигнала, од којих се један приписује промени унутарћелијског нивоа, када су ћелије третиране комплексом **1** или цисплатином, док други указује на контролне ћелије.¹⁶¹



3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

3.1. Мононуклеарни Au(III) комплекси

У овом делу описани су резултати добијени приликом синтезе нових мононуклеарних Au(III) комплекса, као и резултати испитивања различитих типова интеракција ових комплекса са биомолекулима, укључујући компјутерске прорачуне и биолошка истраживања. Испитивани комплекси садрже инертне ароматичне азот-донорске лиганде.

3.1.1. Резултати испитивања мононуклеарних Au(III) комплекса са ароматичним *bis*-пиразолилпиридинским лигандима

Три нова Au(III) комплекса опште формуле $[\text{Au}(N-N-N)\text{Cl}](\text{Cl}_2)$, у којој је $N-N-N = 2,6\text{-bis}(5\text{-}i\text{-tert-butyl-1H-pyrazol-3-yl})\text{pyridine}$ ($\text{H}_2\text{L}^{t\text{-Bu}}$, **1**), $2,6\text{-bis}(5\text{-}i\text{-tert-butyl-1-methyl-1H-pyrazol-3-yl})\text{pyridine}$ ($\text{Me}_2\text{L}^{t\text{-Bu}}$, **2**) или $2,6\text{-bis}((4S,7R)\text{-1,7,8,8-tetramethyl-4,5,6,7-tetrahydro-1H-4,7-metaindazole-3-yl})\text{pyridine}$ (Me_2^*L , **3**)), синтетисани су по процедури која је приказана на схеми 7. Комплекси су окарактерисани елементалном анализом и различитим аналитичким методама, као што су UV-Vis, IR, 1D (^1H и ^{13}C) NMR и MALDI TOF MS. Резултати карактеризације су сумирани у Табели 3.

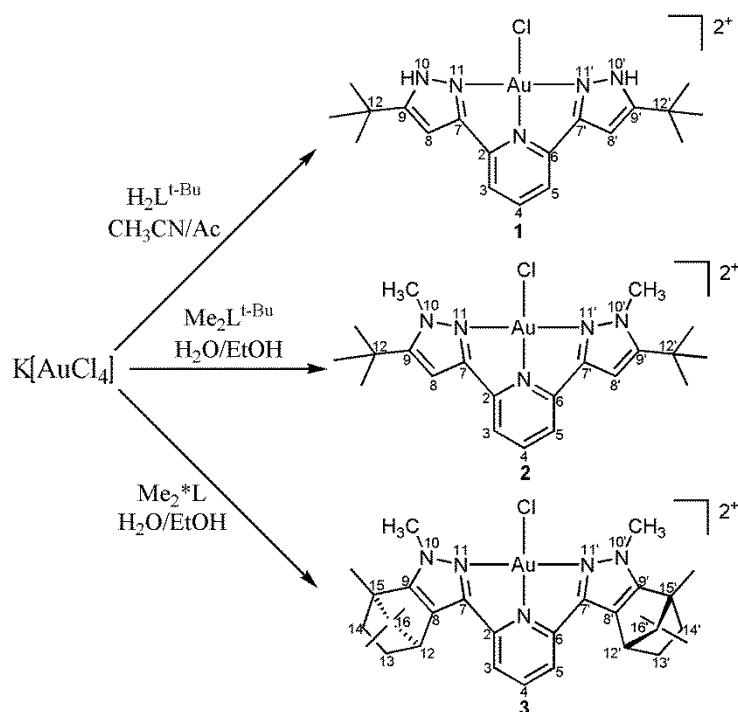


Схема 7. Реакције синтезе комплекса **1** – **3**¹⁶¹

^1H и ^{13}C NMR спектри комплекса **1** – **3** у деутерисаном метанолу показују њихову очекивану симетрију (C_{2v} код комплекса **1** и **2**; C_2 код комплекса **3**). Све резонанце, првенствено ароматичне, значајно су померене у поређењу са одговарајућим сигнаlima слободних (некоординованих) лиганда, Табела 4.¹⁶¹

Табела 4. ^1H NMR хемијско померање (δ , ppm) сигнала слободних и координованих лиганда¹⁶¹

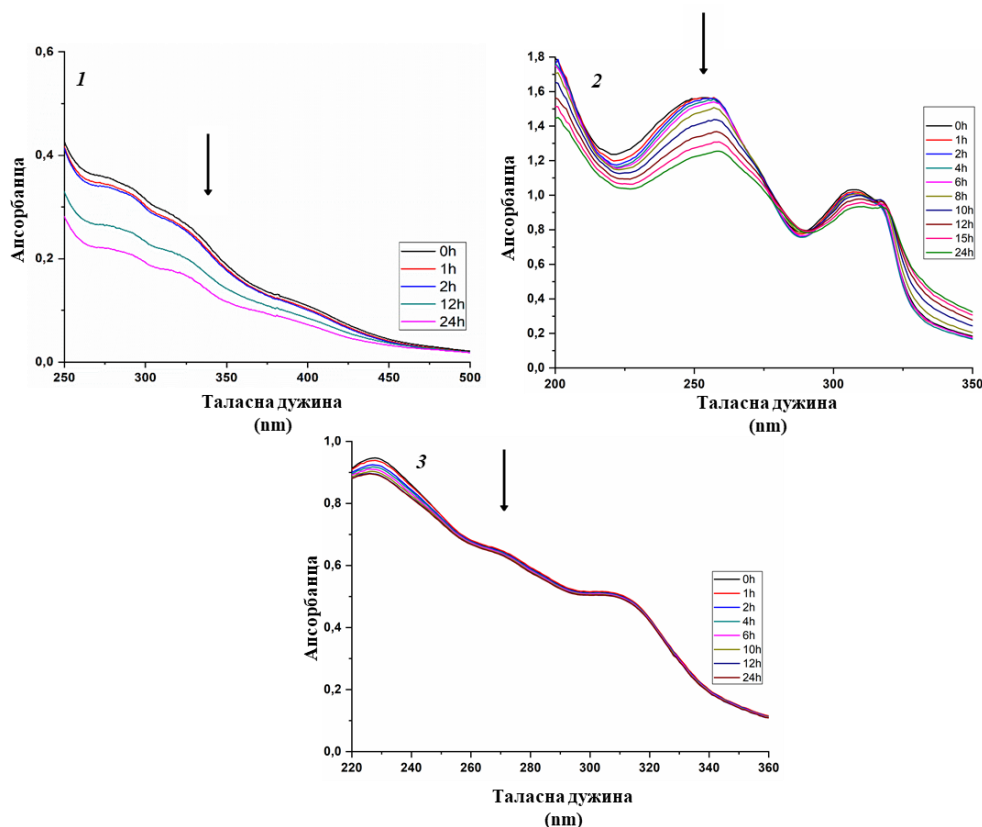
	$\text{H}_2\text{L}^{\text{t-Bu}}$	1	$\text{Me}_2\text{L}^{\text{t-Bu}}$	2	Me_2^*L	3
C3H/C5H	7,71	7,66	7,79	7,88	7,70	7,86
C4H	7,84	8,15	7,81	8,00	7,75	8,22
C8H/C8'H	6,79	6,86	6,84	6,88		
N10CH₃/N10'CH₃			4,07	4,09	3,90	4,03
C12(CH₃)₃/C12'(CH₃)₃	1,40	1,36	1,49	1,47		
C12H/C12'H					3,32 – 3,28	3,33 – 3,27
C13H₂/C13'H₂					2,21 – 2,13	2,28 – 2,20
					1,37 – 1,25	1,27 – 1,20
C14H₂/C14'H₂					1,98 – 1,91	2,03 – 1,96
					1,37 – 1,25	1,40 – 1,33
C15CH₃/C15'CH₃					1,44	1,47
C16(CH₃)₂/C16'(CH₃)₂					0,99	1,04
					0,82	0,85

У IR спектрима комплекса **1** – **3** у чврстом стању присутни су сигнали C–H везе аромата у опсегу $2966 - 2960 \text{ cm}^{-1}$ и сигнали у опсегу $1622 - 1364 \text{ cm}^{-1}$ који потичу од C=N и C=C хемијских веза. Сигнали у опсегу $2930 - 2866 \text{ cm}^{-1}$ одговарају вибрацијама алкил група, док је једино у спектру комплекса **1** присутан јак сигнал на 3376 cm^{-1} , који одговара вибрацијама N–H везе присутне у лиганду $\text{H}_2\text{L}^{\text{t-Bu}}$.

Електронски апсорпциони спектри комплекса **1** – **3** су веома слични. У спектрима су детектовани апсорпциони максимуми на 234 nm и 303 nm за комплекс **1**, 244 nm и 303 nm за комплекс **2** и 227 nm и 303 nm за комплекс **3**, који одговарају трансферу наелектрисања са лиганда на јон метала, LMCT.^{41,71}

Чистоћа синтетисаних комплекса додатно је проверена ласерском десорпционом/јонизационом масеном спектрометријом (MALDI TOF MS). Добијени резултати¹⁶¹ су показали да је у сваком спектру присутан сигнал који одговара маси молекул-јона датог једињења.

Стабилност комплекса **1** – **3** у физиолошким условима испитивана је помоћу UV-Vis спектрофотометрије. Једињења су прво растворена у пар капи диметилсулфооксида, а потом разблажена водом до коначне концентрације од $5 \times 10^{-5} \text{ M}$. Спектри су снимани у току 24 h на 298 K и приказани на слици 28. На основу добијених резултата може се видети да интензитети апсорпционих максимума са временом опадају.



Слика 28. UV-Vis спектри комплекса **1** – **3** у води у току 24 h.
 $[\text{Au(III)}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$ ¹⁶¹

У току испитивања примећено је формирање жутог талога након 24 h, што је последица хидролизе и формирања стабилног $[\text{Au(N-N-N)(OH)}]^{2+}$ комплекса, на основу реакција које су приказане на схеми 8. Такође, рН вредност раствора је опала на 3,8, што додатно потврђује процес хидролизе. Наиме, феномен хидролизе Au(III) комплекса већ је познат и детаљно објашњен.¹⁸⁵

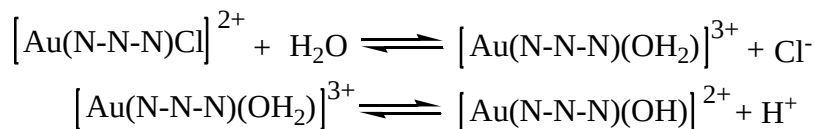
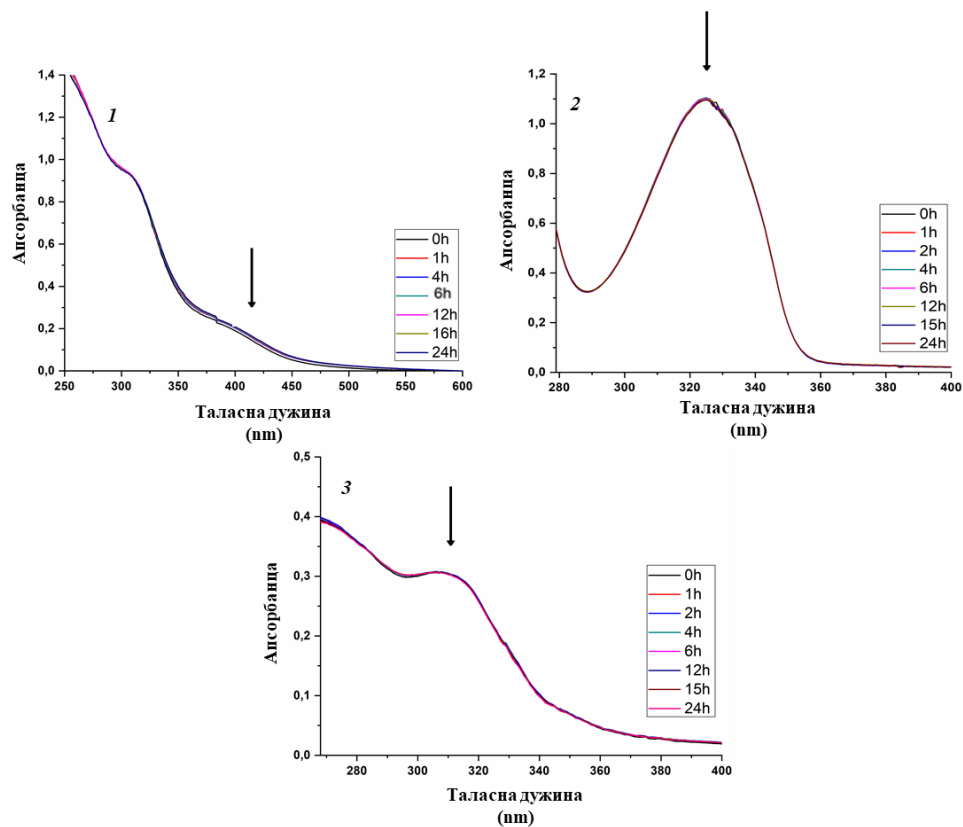


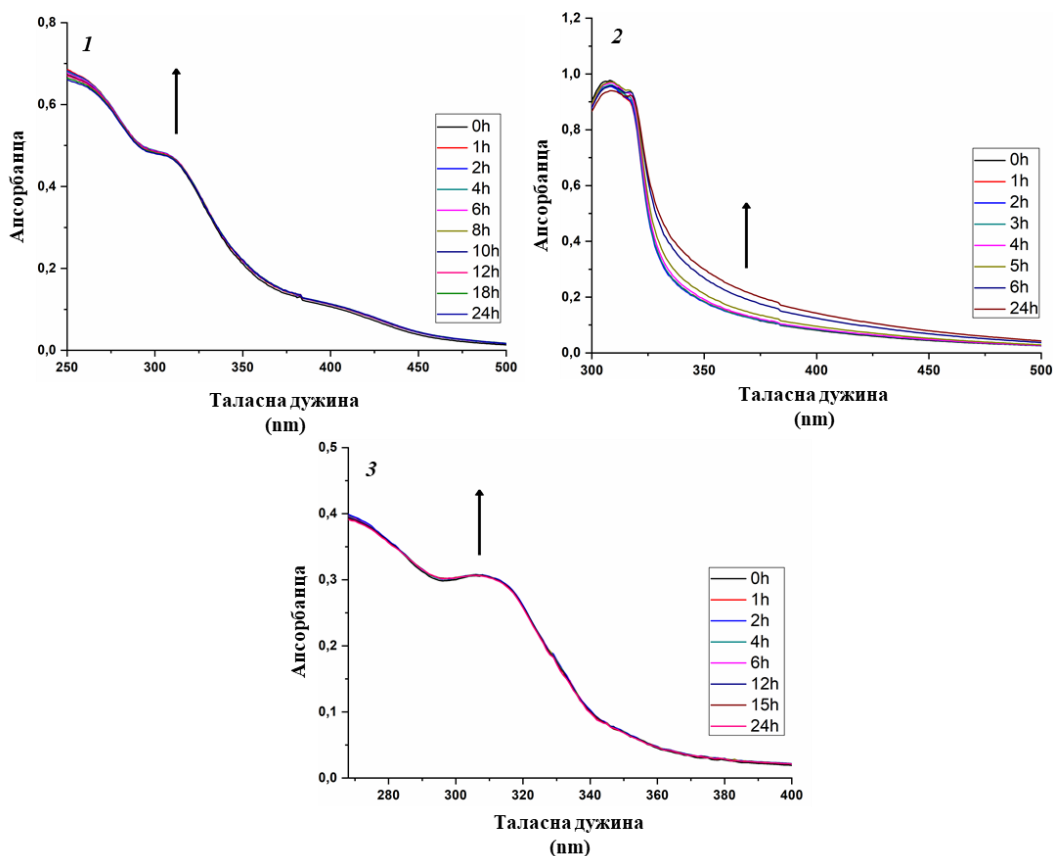
Схема 8. Хидролиза комплекса **1** – **3**¹⁶¹

Стабилност комплекса **1** – **3** испитивана је и у биолошки релевантним условима, (10 mM фосфатни пуфер који садржи 137 mM NaCl, рН = 7,4 и 10 mM Tris пуфер који садржи 150 mM NaCl, рН = 7,4) такође помоћу UV-Vis спектрофотометрије. На основу добијених спектра (слике 29 и 30) може се видети да су комплекси стабилни у периоду од 24 h. Примећује се благо повећање апсорпције у фосфатном пуферу, што се може

приписати спорој хидролизаци комплекса. Генерално, ови резултати потврђују да су комплекси **1** – **3** у физиолошким условима довољно стабилни.



Слика 29. UV-Vis спектри комплекса **1** – **3** у 10 mM Tris-пуферу (150 mM NaCl, pH = 7,4) у току 24 h. $[\text{Au(III)}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$ ¹⁶¹

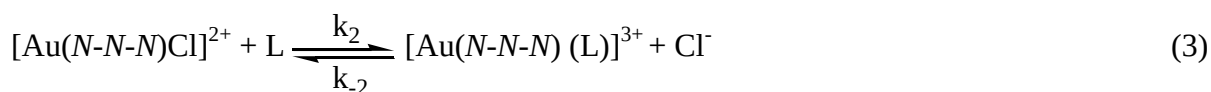


Слика 30. UV-Vis спектри комплекса **1** – **3** у раствору PBS пуфера (pH = 7,4) у току 24 h. $[\text{Au(III)}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$ ¹⁶¹

3.1.1.1. Испитивање реакција супституције комплекса **1** – **3**

Приликом испитивања потенцијалне антитуморске активности комплекса познавање механизма интеракције са различитим биомолекулима је од велике важности. С тим у вези, испитивана је кинетика супституционих реакција комплекса **1** – **3** са нуклеофилима као што су 5'-GMP и Guo. С обзиром да Au(III) комплекси реагују јако брзо, за испитивање је коришћена „stopped-flow” техника. Сви експерименти су извођени под условима реакција *pseudo*-првог реда, што подразумева да је концентрација нуклеофила увек била најмање 10 пута већа у односу на концентрацију комплекса. Реакције су изучаване у физиолошким условима (pH = 7,4) у 10 mM Tris-HCl пуферу уз додатак 150 mM NaCl.

Супституционе реакције комплекса **1** – **3** и деривата гуанина могу бити приказане помоћу једначине (3):



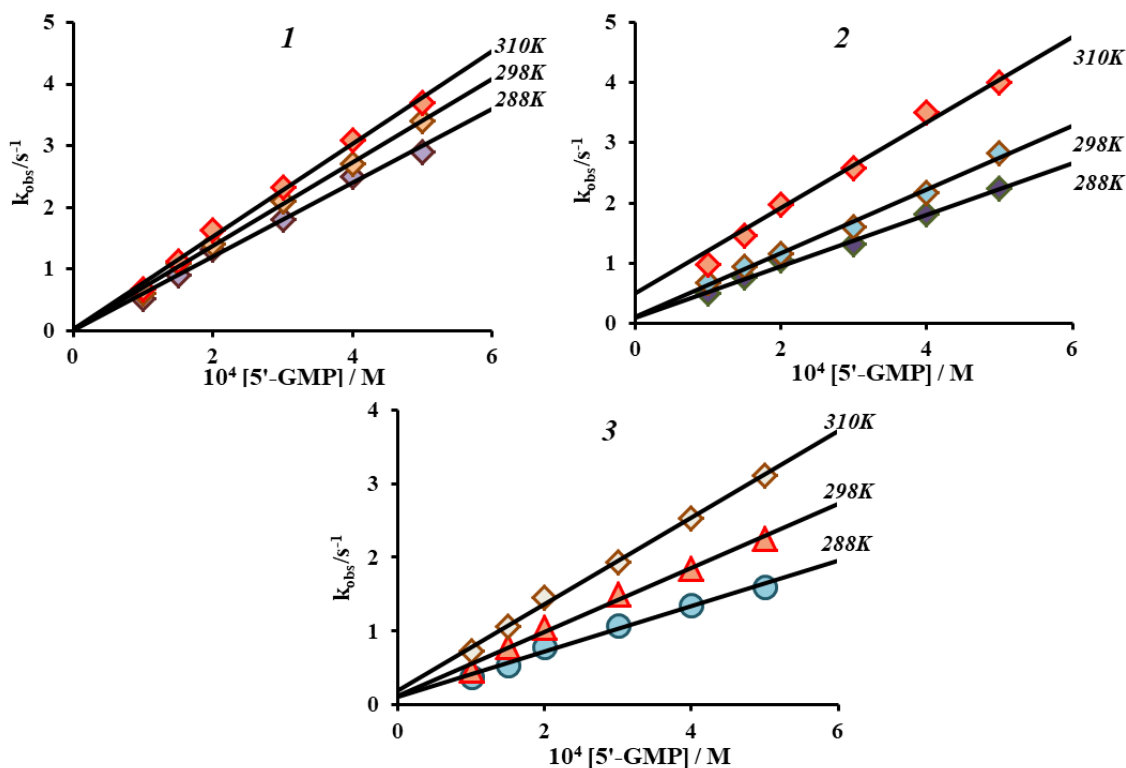
где је $\text{N-N-N} = \text{H}_2\text{L}^{\text{t-Bu}}$, $\text{Me}_2\text{L}^{\text{t-Bu}}$ или Me_2^*L ; $\text{L} = \text{Guo}$ или 5'-GMP.

Генерално, супституционе реакције квадратно-планарних комплекса се одвијају преко два паралелна кинетичка пута.^{154,186} Први, солволитички пут, обухвата процес супституције лиганда молекулом растварача, који је потом праћен брзом заменом молекула растварача нуклеофилом, док други, директна нуклеофилна супституција, подразумева директну замену лиганда нуклеофилом (као што је објашњено у делу 1.8.2). У току ових кинетичких испитивања све реакције су изучаване у присуству 150 mM раствора NaCl ради сузбијања солволитичког пута, тако да процес супституције представља реверзибилан процес (једначина 3).

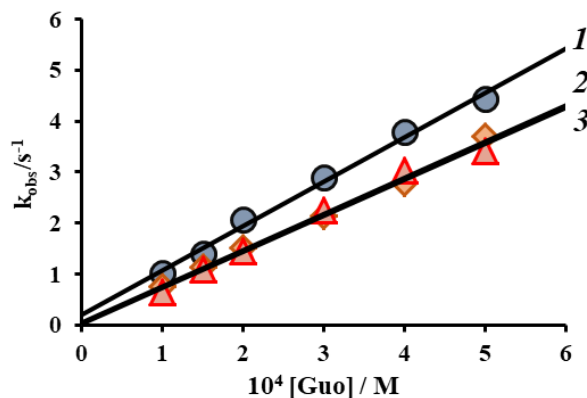
Константе брзине k_2 и k_{-2} (сумиране у Табели 5) одређују се из линеарне зависности константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , у функцији концентрације нуклеофила, према једначини 4. Вредност за k_{obs} се израчунава анализом добијених кинетичких података, као средња вредност седам или осам независних мерења.¹⁶¹

$$k_{obs} = k_2[L] + k_{-2}[Cl^-] \quad (4)$$

Зависност k_{obs} од концентрације 5'-GMP и температуре за супституционе реакције комплекса **1** – **3** приказана је на слици 31, док је на слици 32 приказана зависност k_{obs} од концентрације Guo за сва три комплекса.



Слика 31. Константа брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , у функцији од концентрације нуклеофила и температуре за супституционе реакције комплекса **1** – **3** и 5'-GMP у 10 mM Tris-HCl/150 mM NaCl (pH = 7,4)¹⁶¹



Слика 32. Константа брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , у функцији од концентрације нуклеофила за супституционе реакције комплекса **1** – **3** и Guo у 10 mM Tris-HCl/150 mM NaCl (pH = 7,4)¹⁶¹

Активациони параметри ($\Delta H^\ddagger$ и $\Delta S^\ddagger$), добијени коришћењем Ејвинг–ове једначине (5), такође су представљени у Табели 4.

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{R}{N_h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (5)$$

На основу једначине (5) може се уочити да постоји линеарна зависност члана $\ln(k/T)$ у функцији $1/T$, тако да се на основу Ејвинг–ових дијаграма¹⁶¹ из нагиба праве одређује вредност за $\Delta H^\ddagger$, док се из одсечка израчунава $\Delta S^\ddagger$.

Добијени резултати кинетичких испитивања јасно показују да брзина реакције супституције зависи од природе тридентатног инертног лиганда, јер израчунате вредности за k_2 опадају у низу **1** > **2** > **3**. Овакав редослед реактивности последица је стерних сметњи метил супституената у *bis*–пиразолил лигандима. Наиме, њихово присуство отежава формирање пентакоординованог прелазног стања услед асоцијативног механизма супституције. Такође, природа улазног нуклеофила утиче на вредност константе брзине. У овом случају волуминознији 5'-GMP реагује знатно спорије од Guo.

Израчунате ниске вредности за $\Delta H^\ddagger$ и негативне вредности за $\Delta S^\ddagger$ јасно указују на асоцијативни механизам супституције. Сличан механизам је већ предложен за супституционе реакције монофункционалних комплекса $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ и $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ са биолошки релевантним нуклеофилима, као што су Guo, 5'-GMP, L-His, Ino и 5'-IMP.⁴⁰

Табела 5. Константе брзине и активациони параметри за супституционе реакције комплекса **1** – **3** у 10 mM Tris–HCl/150mM NaCl (pH=7,4)¹⁶¹

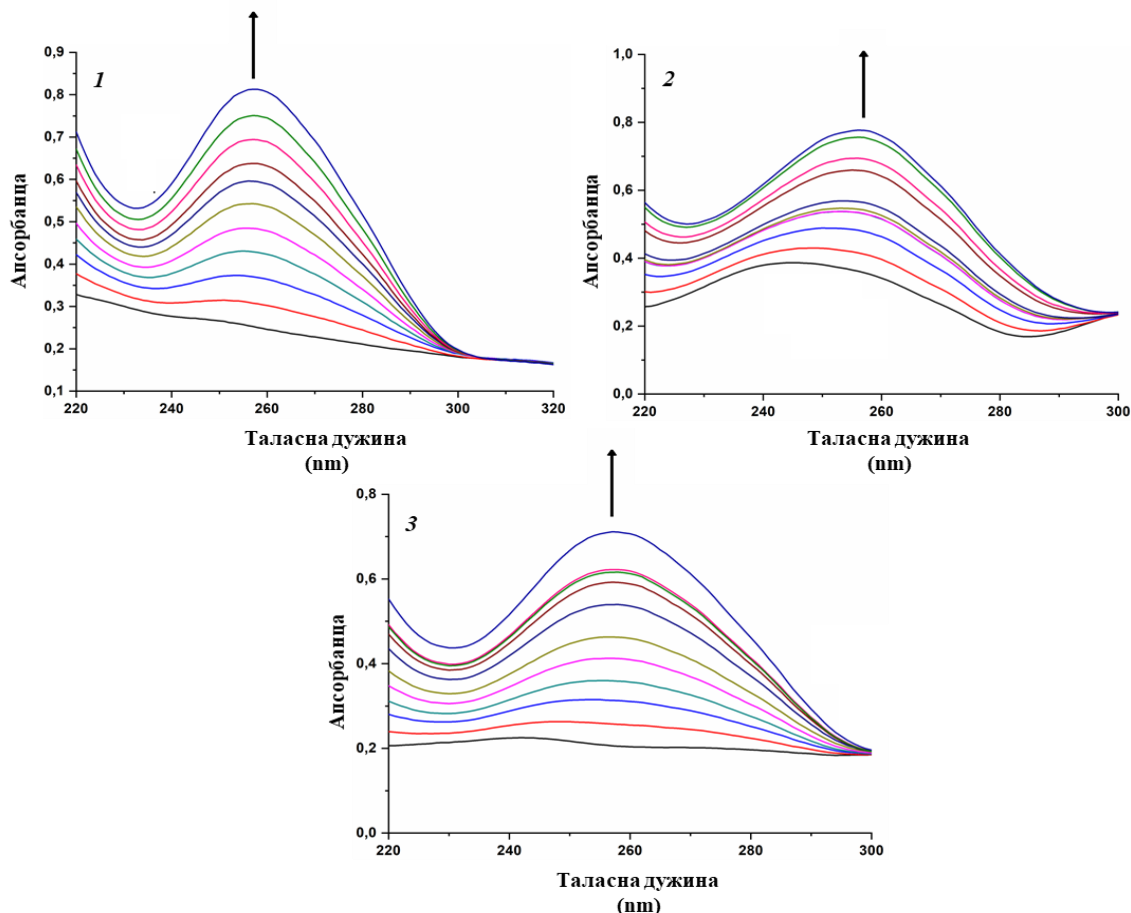
		T [K]	$10^3 \times k_2$ [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_2 [s ⁻¹]	$\Delta H^\ddagger$ [kJmol ⁻¹]	$\Delta S^\ddagger$ [J K ⁻¹ mol ⁻¹]
1	5'-GMP	288	6,0 ± 0,3	0,06 ± 0,01	6,0 ± 0,7	-170 ± 3
		298	6,8 ± 0,2	0,12 ± 0,05		
		310	7,5 ± 0,3	0,16 ± 0,06		
	Guo	298	8,7 ± 0,4	1,4 ± 0,7		
2	5'-GMP	288	4,3 ± 0,2	0,7 ± 0,1	17 ± 3	-132 ± 8
		298	5,3 ± 0,3	0,8 ± 0,2		
		310	7,6 ± 0,8	3,0 ± 0,8		
	Guo	298	7,2 ± 0,3	0,30 ± 0,01		
3	5'-GMP	288	3,1 ± 0,1	0,8 ± 0,3	20 ± 2	-126 ± 6
		298	4,4 ± 0,2	0,9 ± 0,4		
		310	5,9 ± 0,2	1,3 ± 0,4		
	Guo	298	7,0 ± 0,4	0,20 ± 0,02		

3.1.1.2. Испитивање интеракција комплекса **1** – **3** са DNA

Ради бољег разумевања потенцијалне активности комплекса у биолошким системима, испитиване су интеракције комплекса **1** – **3** са DNA помоћу UV-Vis спектрофотометрије, мерењем флуоресценције и мерењем вискозности. Као што је већ напоменуто, дефинисањем типа интеракција са DNA може се одредити афинитет везивања и селективност одабраних монофункционалних Au(III) комплекса.

Интеракције Au(III) комплекса **1** – **3** са DNA испитиване су снимањем апсорпционих спектра система који садрже различит однос концентрација [Au(III)]/[DNA] (г вредност), а настале промене у спектрима могу да укажу на одређени тип интеракција.

UV-Vis спектри комплекса **1** – **3** (у опсегу од 230 – 320 nm) у одсуству и присуству растуће концентрације DNA представљени су на слици 33.

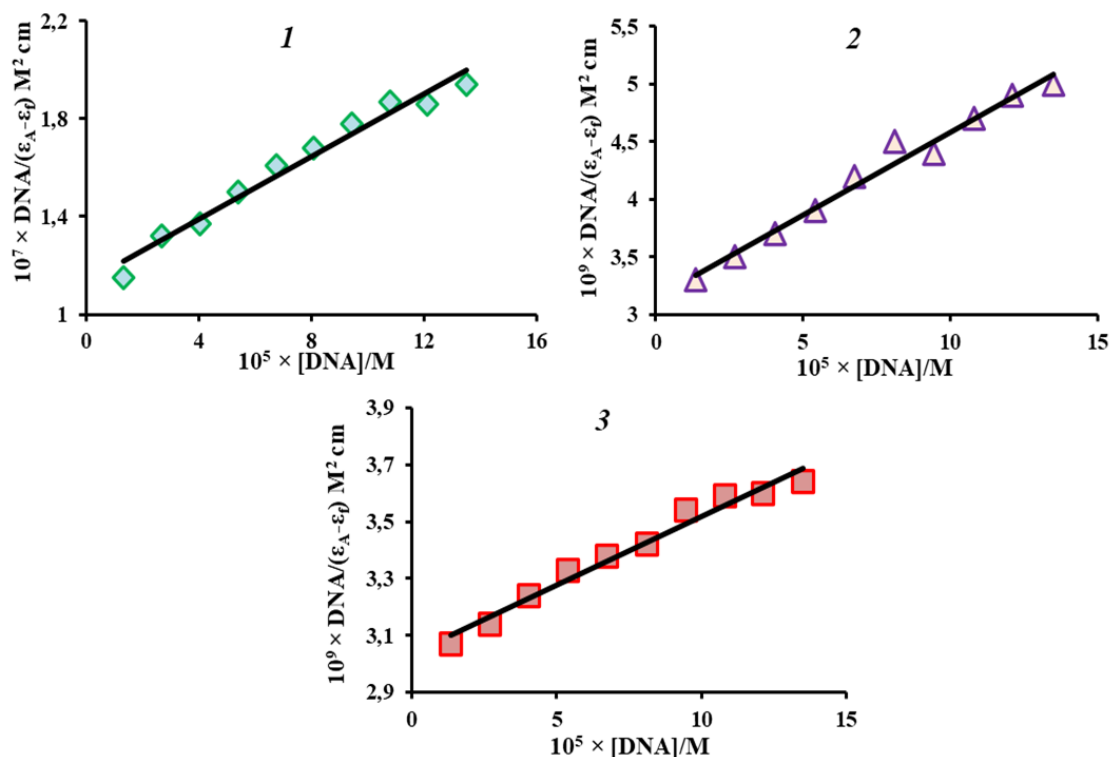


Слика 33. Апсорпциони спектри комплекса **1 – 3** у 10 mM Tris-HCl/150 mM NaCl, pH = 7,4, након додатка DNA. $[Au(III)] = 1,35 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[DNA] = (1,35 - 13,5) \times 10^{-5} \text{ M}$. Стрелице показују промену апсорбанце са повећањем концентрације DNA¹⁶¹

Повећање концентрације DNA изазива хиперхромизам главног апсорпционог пика на 246 nm и то: у спектру комплекса **1** $\Delta\lambda = 11 \text{ nm}$, у спектру комплекса **2** $\Delta\lambda = 13 \text{ nm}$ и у спектру комплекса **3** $\Delta\lambda = 11 \text{ nm}$. Ови резултати указују на присуство интеракција комплекса са DNA и стабилизацију дуплекса. Међутим, овом методом се не може утврдити тачан начин везивања комплекса. Важно је нагласити да комплекси **1 – 3** у својој структури садрже и одлазећу групу и DNA интеркалирајући лиганд, тако да постоји могућност везивања за DNA на два начина, ковалентно (за нуклеобазу) и нековалентно (укључујући интеркалацију).

Константа везивања, K_b , израчунава се коришћењем једначине 6, из дијаграма зависности $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ у функцији од $[DNA]$ за сваки комплекс појединачно (слика 34). Израчунате вредности су дате у Табели 6. Вредности су у рангу $10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1}$, што указује на могућност везивања комплекса **1 – 3** за DNA, док је истовремено комплекс **1** показао највећи афинитет везивања.

$$[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_f) = [DNA]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/[K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)] \quad (6)$$



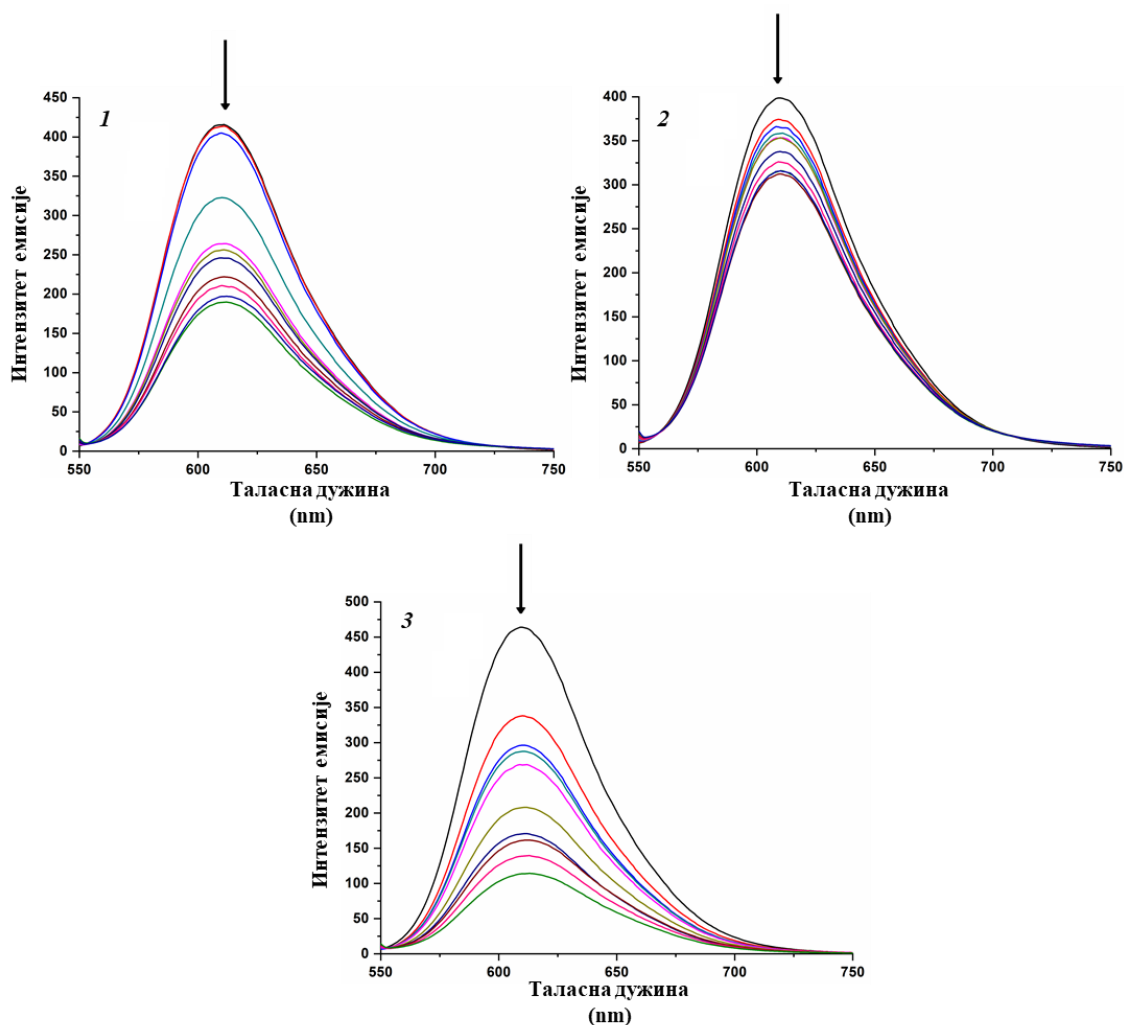
Слика 34. Дијаграм зависности $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ од $[DNA]$ за комплексе **1** – **3**¹⁶¹

Табела 6. Константе везивања, K_b , и Stern–Volmer-ове константе, K_{sv} , за комплексе **1** – **3**¹⁶¹

	$K_b \times 10^3$ [M ⁻¹]	$K_{sv} \times 10^4$ [M ⁻¹]
1	$5,7 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$
2	$4,6 \pm 0,1$	$0,40 \pm 0,01$
3	$1,6 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$

Интеракције комплекса са DNA испитиване су и емисионом методом у присуству ЕВ (3,8-диамино-5-стил-6-фенилфенантридинијум бромид). Комплекси **1** – **3** не показују значајну флуоресцентну емисију након екситације на 527 nm у одсуству и у присуству DNA. Такође, након додатка комплекса **1** – **3** у раствор који садржи само ЕВ није уочено смањење флуоресцентне емисије слободног ЕВ, као ни појава нових пикова у спектру, што додатно доказује да се комплекси не везују за ЕВ.

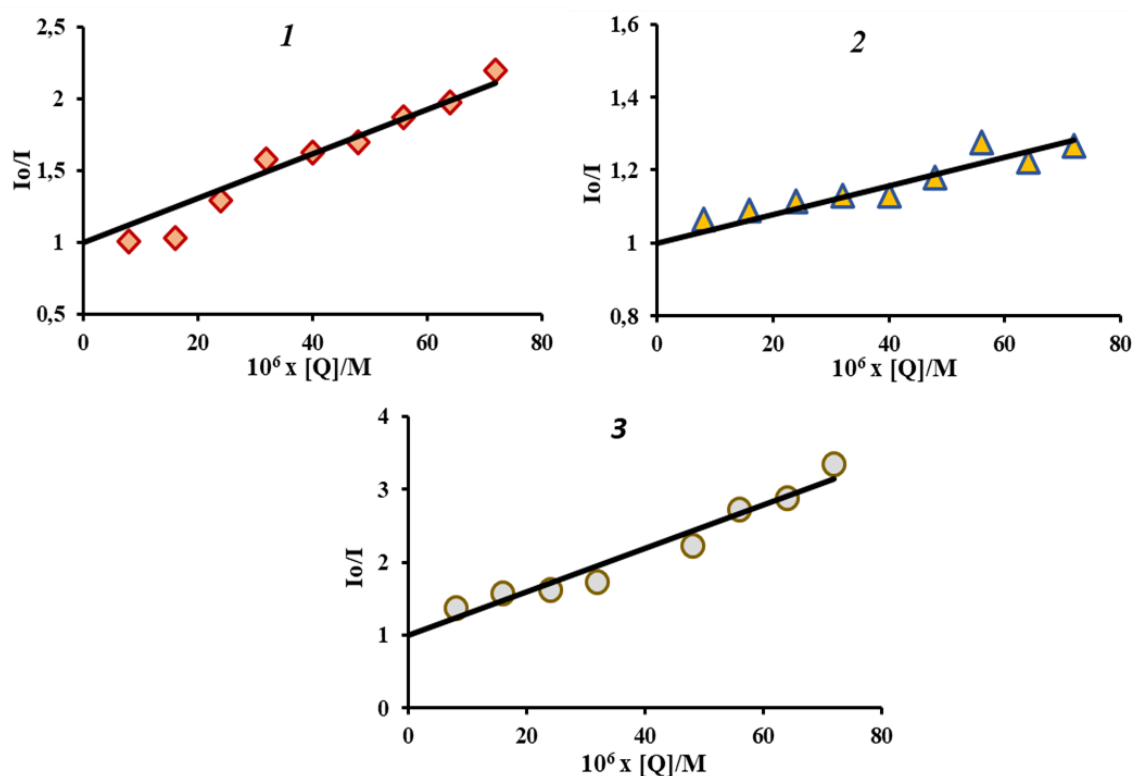
Међутим, повећање концентрације комплекса **1** – **3** у раствору који садржи систем ЕВ–DNA (до односа $r = 1,0$) доводи до значајног опадања интензитета сигнала на 612 nm, што указује да испитивани комплекси могу да замене ЕВ који је везан за DNA. Истовремено долази до опадања флуоресцентне емисије ЕВ за 46, 78 или 30% од максималне вредности за комплексе **1** – **3**. Флуоресцентни спектри ЕВ везаног за DNA у одсуству и присуству комплекса **1** – **3** приказани су на слици 35.



Слика 35. Емисиони спектри ЕВ везаног за DNA у присуству комплекса **1 – 3**.
 $[EB] = 80 \mu M$, $[DNA] = 80 \mu M$; $[Au(III)] = 0 - 80 \mu M$; $\lambda_{ex} = 527 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 612 \text{ nm}$.
 Стрелице показују промену интензитета емисије са повећањем концентрације
 комплекса **1 – 3**¹⁶¹

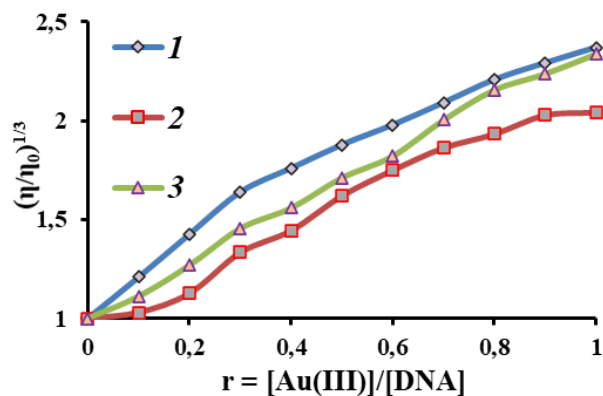
Stern–Volmer-ови дијаграми за EB-DNA (слика 36), добијени на основу Stern–Volmer-ове једначине (7), су линеарни, а израчунате вредности Stern–Volmer-ових константи, K_{SV} , приказане су у Табели 6. Према резултатима приказаним на сликама 35 – 37, и на основу израчунатих вредности Stern–Volmer-ових константи може се претпоставити да комплекси **1 – 3** могу да замене EB из његовог продукта са DNA.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹

$$I_0/I = 1 + K_{SV} [Q] \quad (7)$$



Слика 36. Stern-Volmer-ови дијаграми за комплексе **1** – **3**¹⁶¹

Да би се потврдила интеркалација као начин везивања комплекса за DNA, додатно је урађено мерење вискозности раствора DNA у одсуству и у присуству комплекса. На слици 37 су приказани резултати добијени у оквиру ових испитивања.



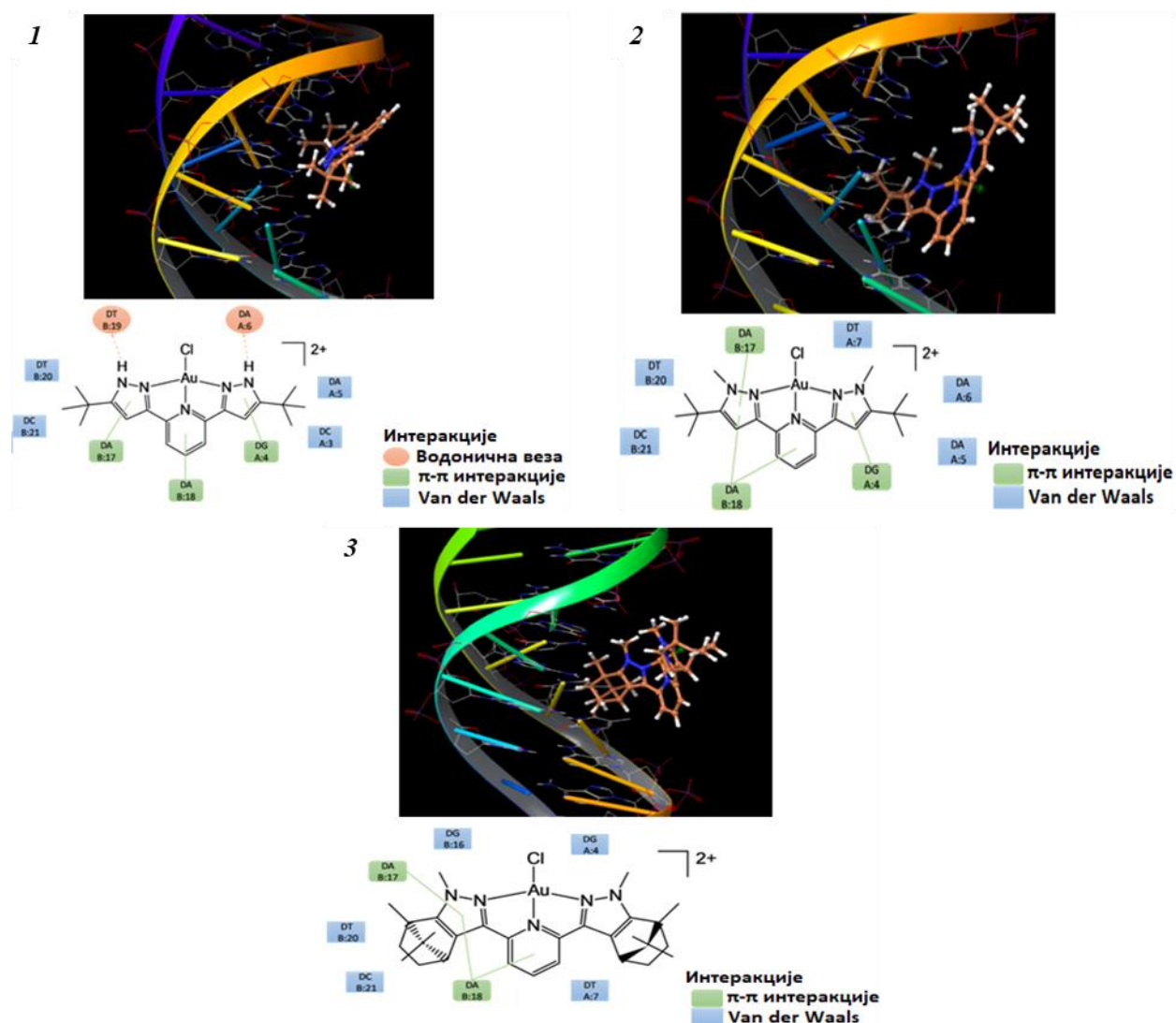
Слика 37. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ DNA ($[DNA] = 0,01 \text{ mM}$ у $10 \text{ mM Tris-HCl}/150 \text{ mM NaCl}$, $\text{pH}=7,4$) са повећањем концентрације комплекса **1** – **3** (r)¹⁶¹

Додатак различите концентрације (до односа 1) комплекса **1** – **3** раствору DNA ($[DNA] = 0,01 \text{ mM}$) доводи до повећања вискозности. У случају комплекса **1** долази до најизраженијег ефекта (повећање вискозности до односа 0,6), док комплекс **2** показује најмањи утицај. Повећање вискозности може се објаснити повећањем дужине DNA ланца након везивања $Au(III)$ комплекса за DNA путем интеркалације. Такође, мањи утицај комплекса **2** и **3** на повећање вискозности може бити последица присуства метил супституената у *bis*-пиразолил лигандима, чиме је отежан прилаз комплекса молекулу DNA, а самим тим и процес интеркалације.

3.1.1.3. Молекулски докинг

Да би се детаљније дефинисао начин везивања једињења за DNA, урађен је молекулски докинг за комплексе **1** – **3**. Синтетичка експериментална DNA структура – додекамер $d(CGCGAATTCGCG)_2$, познат као 1BNA, коришћен је као минимална двоструко хеликоидна структура природног DNA.

Најбољи докинг положаји комплекса **1** – **3** са DNA додекамером су приказани на слици 38, док су израчунате енергије везивања и докинг инхибиционе константе дате у Табели 7. Докинг вредности се могу описати као вредности математичких функција које говоре о јачини везивања комплекса за DNA, док је докинг константа инхибиције индикатор успешности инхибиције и представља концентрацију потребну за постизање половине успешности инхибиције. Докинг анализа је показала да се сва три комплекса везују за DNA додекамер интеркалацијом, док је једино у случају комплекса **1** могуће додатно формирање водоничних веза због присуства два водоникова атома на положајима N10 и N10' (слика 38). Такође, ароматични прстенови из лиганада у случају сва три комплекса ступају у π - π интеракције са DNA додекамером. Комплекс **3** не интеркалира комплетно између базних парова (слика 38), што је у складу са малом вредношћу за константу везивања која је добијена експерименталном методом. Поред наведеног, за комплекс **1** је добијена најнегативнија вредност везивне енергије (ΔG), што додатно потврђује велики афинитет овог једињења за DNA. Генерално, резултати добијени молекулским докингом добро се слажу са експериментално добијеним резултатима (Табела 7).



Слика 38. Визуелна презентација комплекса 1 – 3 везаних за 1BNA додекамер, заједно са шематским приказом интеракција¹⁶¹

Табела 7. Резултати докинга, слободна енергија везивања и докинг константа инхибиције за комплексе 1 – 3¹⁶¹

	Докинг вредност	Слободна енергија везивања (ΔG) [kJ mol ⁻¹]	Докинг константа инхибиције (K_i) [μ M]
DNA			
1	-6,384	-22,26	0,126
2	-5,566	-21,17	0,195
3	-5,143	-18,43	0,589

3.1.1.4. Биолошка испитивања

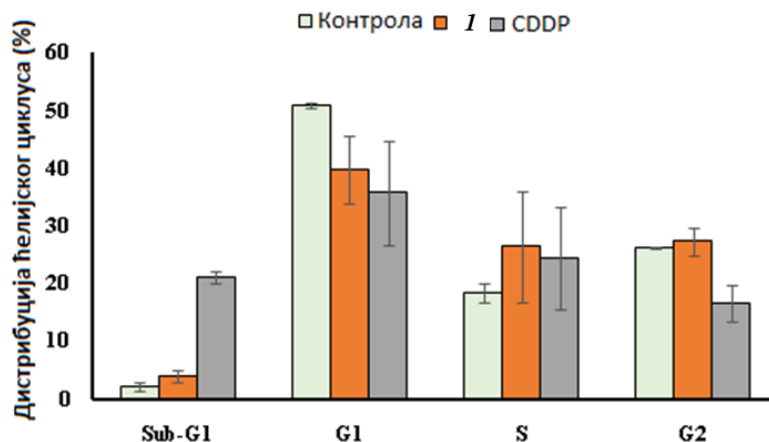
Анализа цитотоксичности је извршена само за комплекс **1**, због слабе растворљивости комплекса **2** и **3** у ћелијском медијуму. Цитотоксична активност комплекса **1** и одговарајућег лиганда ($\text{H}_2\text{L}^{\text{t-Bu}}$) у поређењу са цисплатином (CDDC) тестирана је на три канцерогене ћелијске линије: A549, A375 и LS-174. Резултати, приказани као IC_{50} вредности, дати су у Табели 8.¹⁶¹ IC_{50} вредност израчуната је као просечна вредност два или три независна експеримента. На основу добијених резултата може се закључити да комплекс **1** и лиганд $\text{H}_2\text{L}^{\text{t-Bu}}$ индукују ћелијску смрт у свим испитиваним системима у зависности од дозе.¹⁶¹

Табела 8. Резултати МТТ теста добијени након 48 h од третмана¹⁶¹

	IC_{50} [μM]		
	LS-174	A549	A375
1	$11,2 \pm 1,6$	$20,1 \pm 0,5$	$13,1 \pm 2,0$
$\text{H}_2\text{L}^{\text{tBu}}$	$12,2 \pm 0,3$	$31,1 \pm 3,0$	$23,8 \pm 0,2$
CDDP	$24,4 \pm 0,3$	$24,1 \pm 0,6$	$23,1 \pm 0,1$

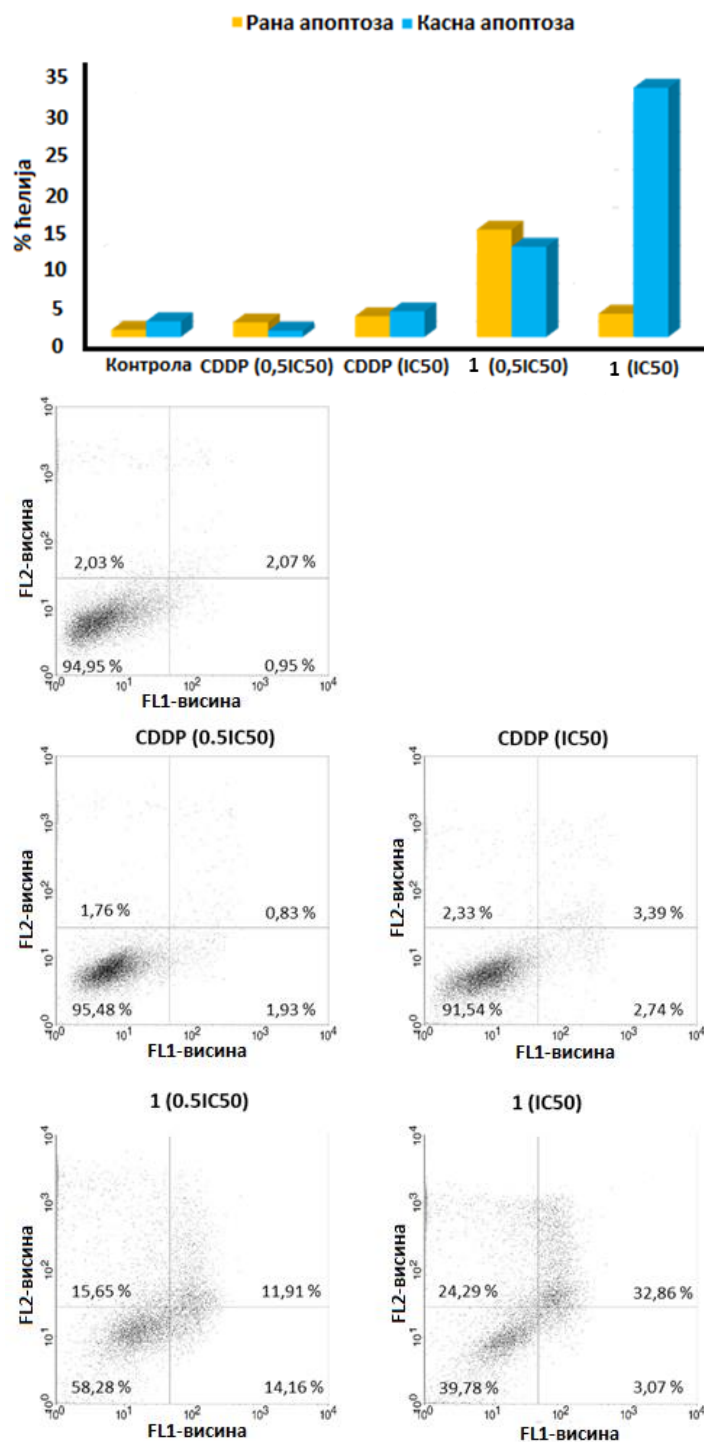
Даља биолошка испитивања су укључила испитивање утицаја на ћелијски циклус, апоптозу и ниво реактивних кисеоничних врста (ROS) на A375 ћелијској линији.

Анализирана је A375 ћелијска линија након третмана комплексом **1** и цисплатином, коришћењем две различите концентрације (IC_{50} или $0,5\text{IC}_{50}$) у току 24 h. Као што је приказано на слици 39, комплекс **1** довео је до опадања процента ћелија у G1 фази, док је примећен пораст процента ћелија у S фази, без утицаја на Sub-G1 (ћелије са фрагментисаном DNA) и G2 фазу. Цисплатина, као референтно једињење, повећава проценат ћелија у Sub-G1 фази и смањује проценат ћелија у G1 и G2 фази. Ови резултати недвосмислено потврђују присуство интеракција комплекса **1** са DNA из A375 ћелијске линије.



Слика 39. Фаза дистрибуције ћелијског циклуса на A375 ћелијској линији након 24 h од третмана комплексом **1** и цисплатином (CDDP) применом њихове IC_{50} концентрације. Подаци су приказани као средња вредност три независна експеримента¹⁶¹

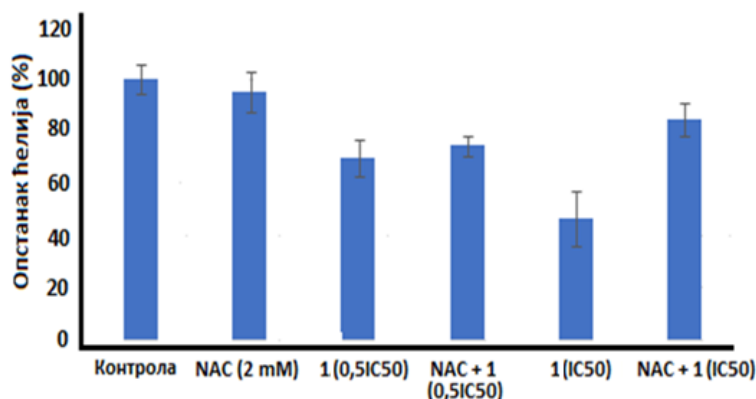
Потенцијал комплекса **1** да индукује апоптозу на A375 ћелијској линији испитиван је помоћу проточне цитометријске анализе након Annexin-V-FITC теста и бојења пропидијум–јодидом (PI). Резултати приказани на слици 40 показују да инкубација A375 ћелија са комплексом **1** у току 24 h, применом $0,5IC_{50}$ и IC_{50} концентрације, индукује смрт једне карактеристичне апоптотичне ћелије. Екстернализација фосфатидилсерина¹⁹⁰ је детектована након Annexin-V-FITC бојења. Нижа концентрација ($0,5IC_{50}$) комплекса **1** индукује повећање процената ћелија у раној апоптози за 14,16 % у поређењу са контролом (0,95 %), и у касној апоптози за 11,91 % у поређењу са контролом (2,07 %). Међутим, већа концентрација комплекса (IC_{50}) након 24 h од третмана укључује 32,86 % ћелија у касној апоптози. Већина ћелија третираних цисплатином након 24 h показује очување интегритета ћелијске мембране, односно преко 91 % ћелија нису обојене помоћу Annexin-V-FITC или PI. Овај ефекат цисплатине је очекиван, јер су ћелије меланома резистентне на цисплатину.¹⁹¹



Слика 40. Испитивање процеса апоптозе проточном цитометријом у плазма мембрани A375 ћелијске линије након третмана комплексом **1** и цисплатином. Графови на првој слици представљају проценат ћелија у раној и касној апоптози. Пет одвојених дуалних параметара приказани су након бојења ћелија са Annexin-V-FITC (x-оса) и PI (y-оса).

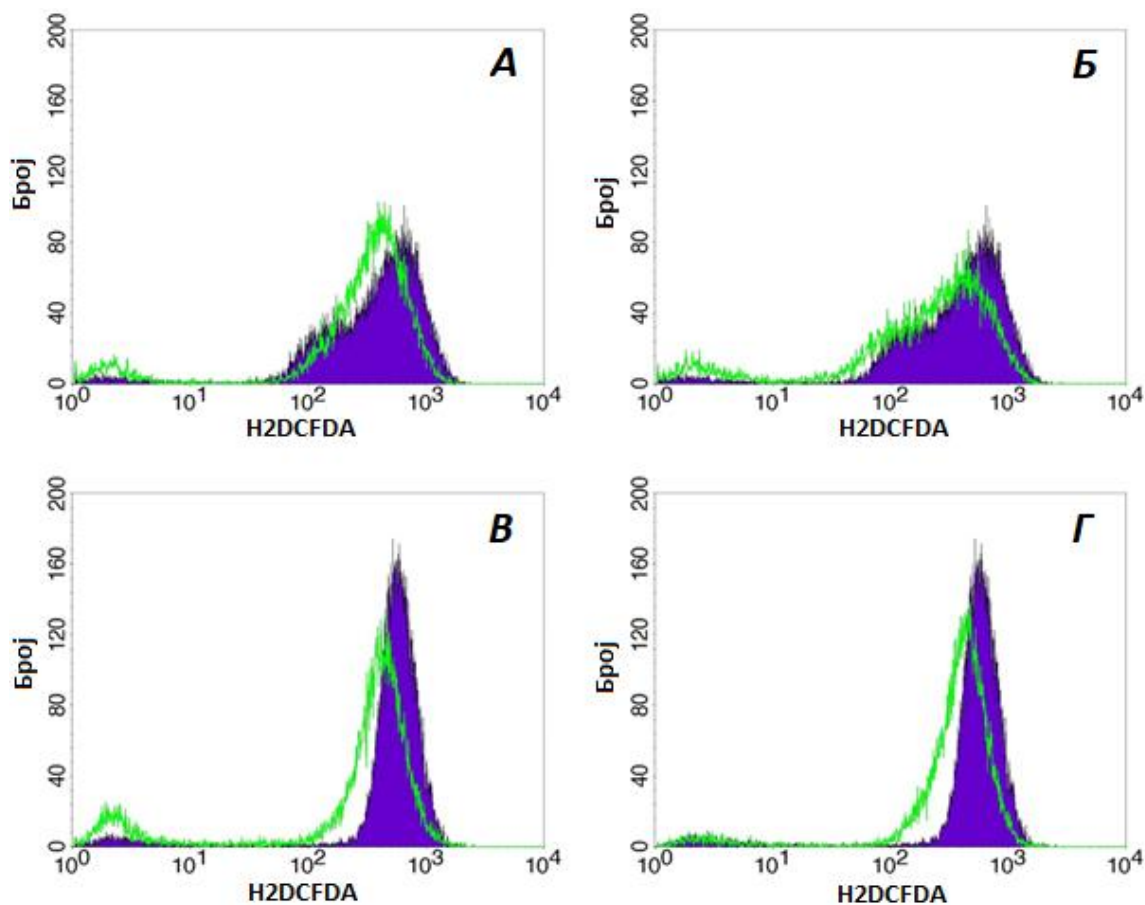
Квадранти: доња лева (LL) – живе ћелије, доња десна (LR) – ћелије ране апоптозе, горња десна (UR) – ћелије касне апоптозе, горња лева (UL) – мртве ћелије¹⁶¹

С обзиром да комплекси метала могу бити укључени у ћелијске редокс процесе директно (преко метал или лиганд редокс центара) или индиректно (везивањем за биомолекуле укључене у ћелијске редокс процесе),¹⁹² испитивана је промена цитотоксичног потенцијала комплекса **1** на А375 ћелијској линији, када се комплекс комбинује са фармаколошким модулатором ћелијске редокс-хомеостазе, као што је *N*-ацетил-*L*-цистеин (NAC).^{193,194} Прво је извршена прелиминарна студија зависности концентрације NAC на А375 ћелијама, а затим је коришћена субтоксична концентрација NAC (2 mM) за даља комбинована испитивања. Комплекс **1** при IC₅₀ концентрацији повећава проценат опстанка А375 ћелија у току 1 h (слика 41), што указује да комплекс **1** утиче на ниво реактивних кисеоничних врста (ROS), док истовремено испољава и антипролиферативни ефекат.



Слика 41. Ефекат *N*-ацетил-*L*-цистеина ([NAC] = 2 mM), у току 1 h, на цитотоксичност А375 ћелија индуковану комплексом **1**. Ћелије су изложене различитим дозама комплекса **1** (0,5IC₅₀ или IC₅₀) са или без NAC у току 48 h. Одрживост ћелија испитивана је помоћу МТТ теста¹⁶¹

Ефекат комплекса **1** на ROS на А375 ћелијској линији испитиван је коришћењем флуоресцентне боје DCFH-DA, а затим и проточном цитометријом. Ћелије су изложене деловању комплекса **1** у периоду од 1 h и 3 h. Као контрола коришћена је цисплатина. Примећено је смањење присутних ROS након 1 h од излагања ћелија комплексом **1** (слика 42А) и цисплатином (слика 42Б) у поређењу са нетретираним ћелијама. Флуоресцентни сигнал (зелена линија) благо је померен у лево уз истовремено опадање интензитета. Након 3 h ћелијског третмана комплексом **1** (слика 42В) и цисплатином (слика 42Г) опадање интензитета флуоресцентног сигнала је значајније. Ови резултати потврђују чињеницу да комплекс **1** може утицати на ниво ROS у А375 ћелијама.



Слика 42. Анализа настајања реактивних кисеоничних врста (ROS) након третмана A375 ћелија комплексом **1** и цисплатином у трајању од 1 h и 3 h. Зелени хистограм показује промену унутар ћелијског нивоа ROS-а (посматрано кроз померање сигнала) у популацији ћелија третираних са: комплексом **1** у току 1 h (А) или 3 h (В) или цисплатином у току 1 h (Б) или 3 h (Г). Контролне ћелије су приказане као попуњена љубичаста линија¹⁶¹

3.1.2. Резултати испитивања мононуклеарних бифункционалних Au(III) комплекса са дериватима пиразола као инертним лигандима

У овом делу приказани су резултати испитивања Au(III) комплекса **4** – **6** опште формуле $[\text{Au}(\text{N-N})\text{Cl}_2]^+$ и комплекса **7** – **8** опште формуле $[\text{Au}(\text{N-N})_2]^{3+}$, у којима је N-N бидентатни лиганд (3-((2-((5-фенил-1H-пиразол-3-ил)метокси)нафтален-3-илокси)метил)-5-фенил-1H-пиразол – лиганд **L1**, (3-((2-((5-фенил-1H-пиразол-3-ил)метокси)фенокси)метил)-5-фенил-1H-пиразол – лиганд **L2** или (3-((2-((5-нафтален-2-ил)-1H-пиразол-3-ил)метокси)фенокси)метил)-5-(нафтален-3-ил)-1H-пиразол – лиганд **L3**. Лиганди **L1** – **L3** синтетисани су према процедури која је приказана на схеми 9, док су комплекси **4** – **8** синтетисани по процедури приказаној на схеми 10. Структуре комплекса потврђене су помоћу различитих аналитичких метода (ESI-MS, ^1H NMR, UV-Vis, IR), елементалном анализом и мерењем моларне проводљивости, док је структура лиганда **L2** потврђена рендгенском структурном анализом (Табеле 1 – 3).

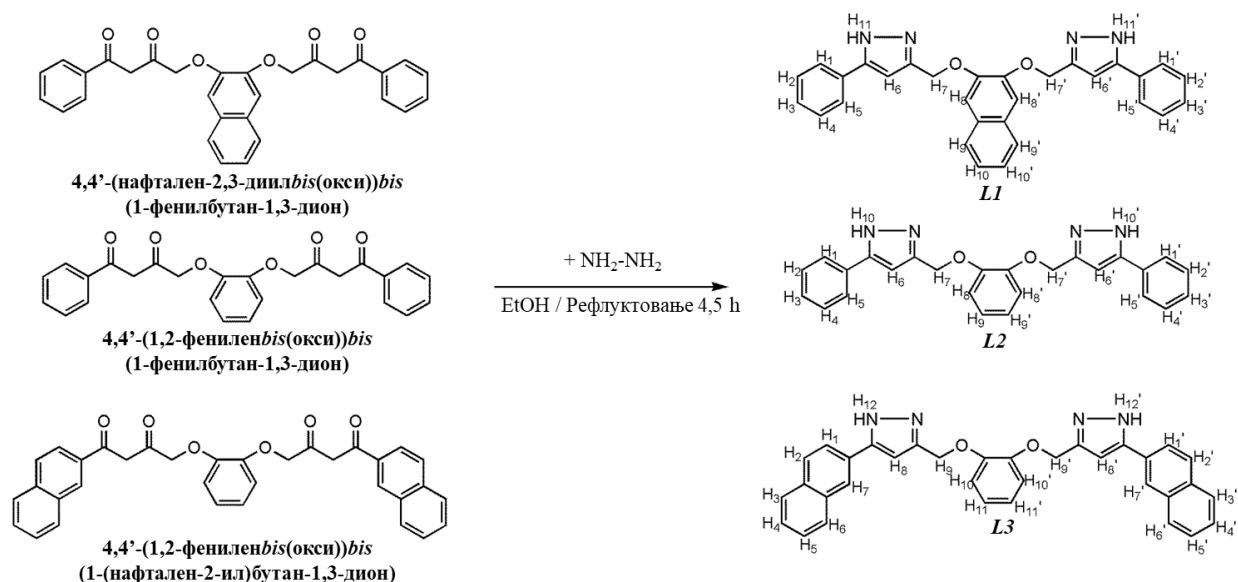


Схема 9. Шематски приказ синтезе лиганда **L1** – **L3**¹⁶²

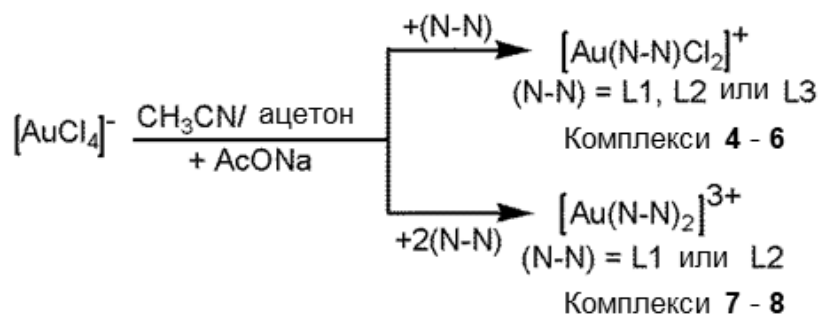
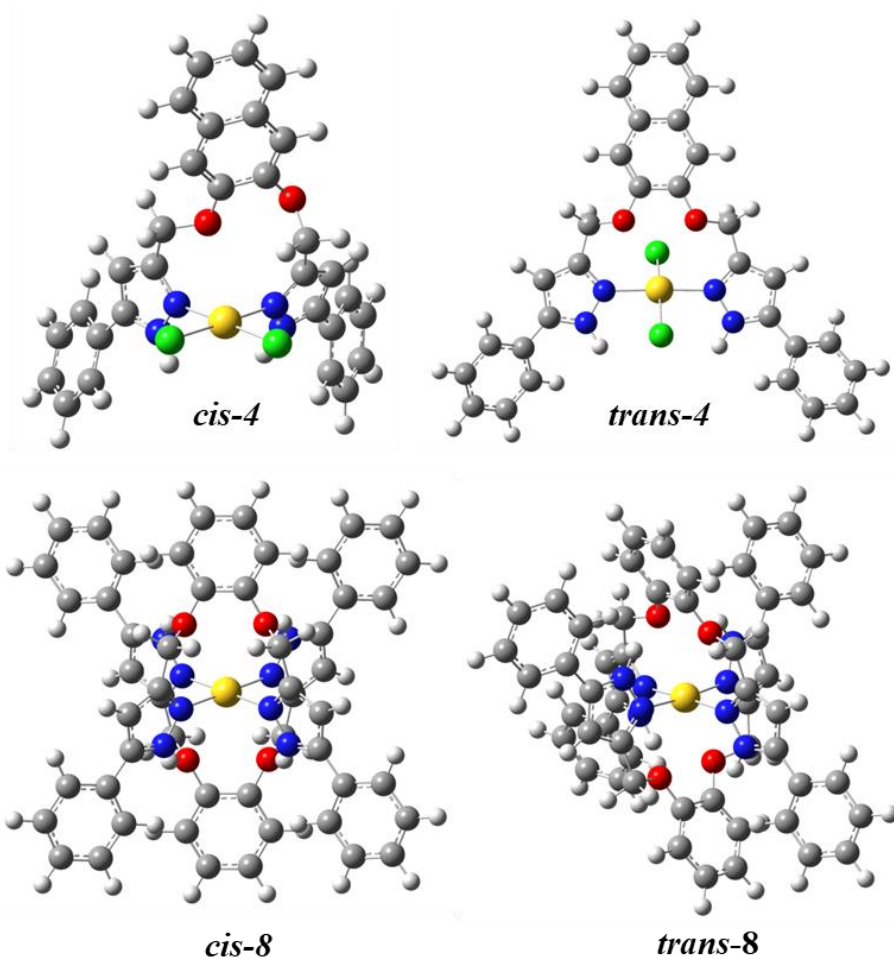


Схема 10. Шематски приказ синтезе Au(III) комплекса **4** – **8**¹⁶²

Због јединствене структуре лиганата коришћених за синтезу комплекса, могућност формирања стабилних једињења са различитом геометријском конфигурацијом испитивана је помоћу DFT прорачуна. Депротоновани азот-донорски лиганди координују се за Au(III) јон уз могућу промену оријентације како би се формирали *cis*- и *trans*- изомери, приказани на слици 43.¹⁶² Добијени резултати стабилности *trans*-изомера у поређењу са *cis*-изомерима дати су у Табели 9.¹⁶² На основу ових резултата може се закључити да су *trans*-изомери комплекса стабилнији, што је последица присуства јако волуминозних инертних лиганата. С тим у вези, у даљим испитивањима подразумеваће се да су изучавани комплекси **4** – **8** геометријски *trans*-изомери.



Слика 43. Израчунате (ω B97XD/def2-SVP) *cis*- и *trans*- геометријске структуре комплекса **4** и **8**¹⁶²

Табела 9. Израчунате (ω B97XD/def2-SVP) релативне стабилности *cis*- и *trans*-геометријских изомера Au(III) комплекса у kcal mol^{-1} ¹⁶²

	E [kcal mol^{-1}]
4	-13,21
5	-13,12
6	-12,80
7	-8,82
8	-6,49

Вредности моларне проводљивости (Табела 10) потврдиле су јонску 1:1 природу комплекса **4** – **6**. Вредности моларне проводљивости за комплексе **7** – **8** веће су него уобичајене вредности за електролите типа 2:1, а мање у поређењу са вредностима за електролите типа 3:1.¹⁹⁵ Наиме, публиковани резултати говоре да делимична супституција анјона молекулима растварача може да проузрокује овакве резултате.¹⁹⁶

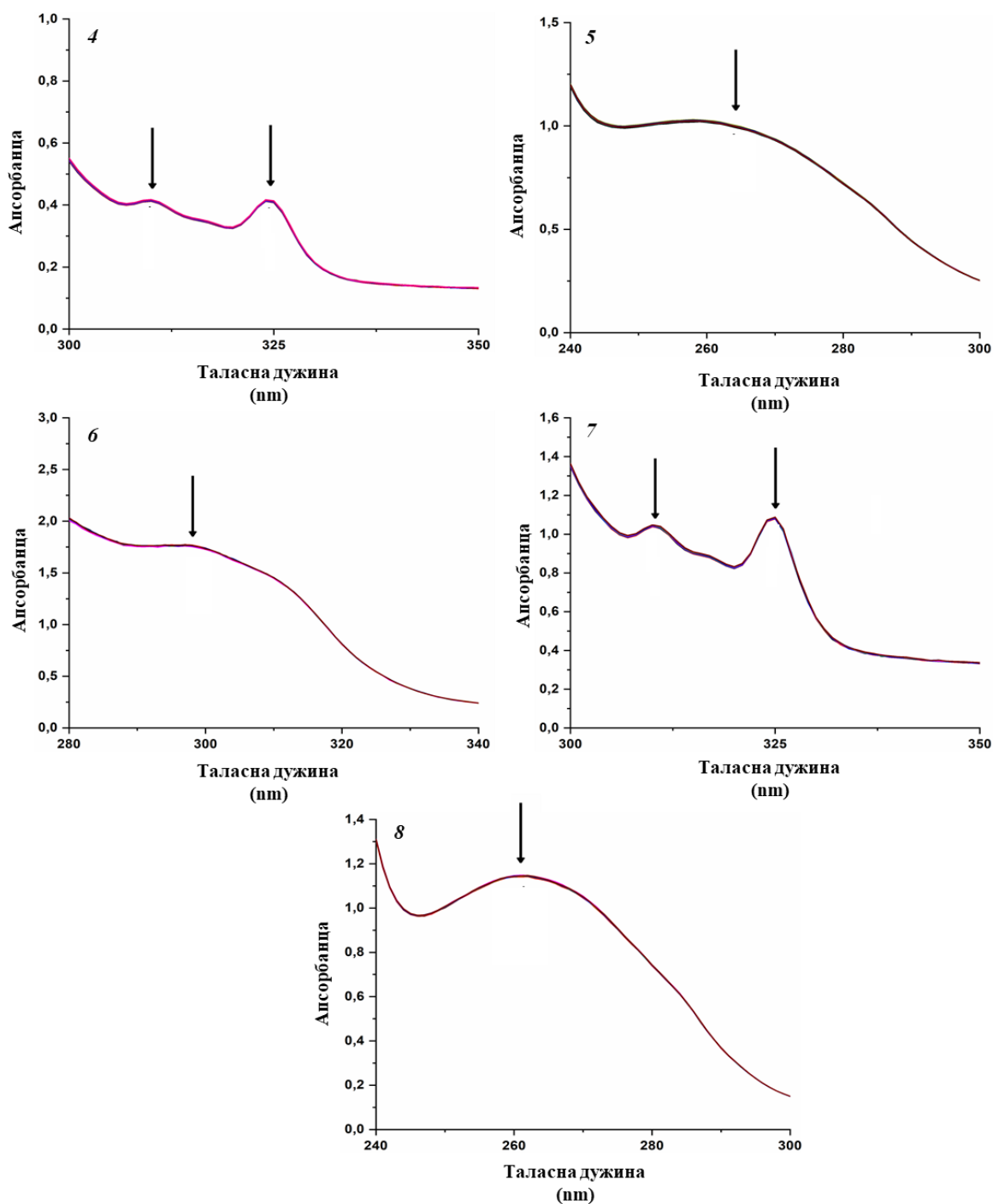
Табела 10. Моларна проводљивост Au(III) комплекса у DMF-у на собној температури¹⁶²

	λ_m [$\Omega^{-1} \text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$]
4	72
5	67
6	86
7	191
8	178

Подаци добијени различитим спектроскопским техникама за потврђивање структуре комплекса **4** – **8** приказани су у Екперименталном делу (Табела 3). У ^1H NMR спектрима комплекса **4** – **8** готово сви сигнали су померени у поређењу са сигнаlima некоординованих лиганата. У IR спектрима комплекса присутни су сигнали N-H везе ($3600 - 3200 \text{ cm}^{-1}$), C-H везе аромата, алифатичне C-H везе ($3100 - 2900 \text{ cm}^{-1}$) и сигнали γ -C-H вибрација у прстену ($800-600 \text{ cm}^{-1}$).¹⁶¹ UV-Vis спектри комплекса **4** – **8** су снимљени у води и у Нерес пуферу. Добијени резултати су показали да се облик сваког спектра, као и одговарајући апсорпциони максимуми, доста разликују ($\lambda_{\text{max}} = 325 \text{ nm}$, 310 nm за **4**; $\lambda_{\text{max}} = 261 \text{ nm}$ за **5**; $\lambda_{\text{max}} = 298 \text{ nm}$ за **6**; $\lambda_{\text{max}} = 325 \text{ nm}$, 310 nm за **7**; $\lambda_{\text{max}} = 261 \text{ nm}$ за **8**),¹⁶² што је повезано са различитим структурама инертних лиганата. ESI-MS спектри комплекса **4** – **8** потврђују присуство одговарајућих молекул-јона.¹⁶²

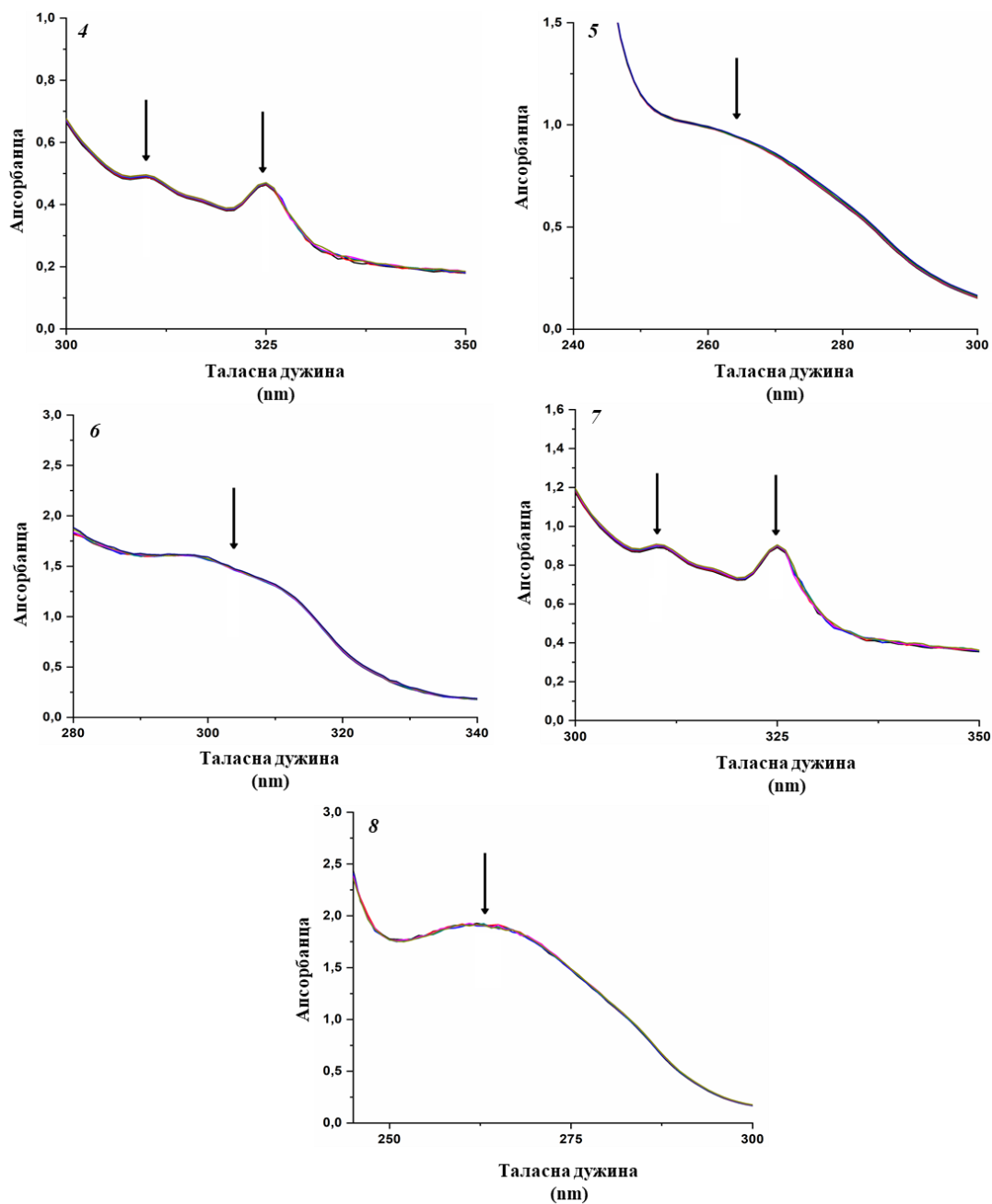
Генерално, комплекси **4** – **8** су слабо растворни у води, али се њихова растворљивост повећава додатком органских растварача. Из тог разлога је за припрему раствора за испитивање стабилности комплекса у води, сваки комплекс прво растворен у пар капи *N,N*-диметилформамида, а затим разблажен водом до коначне концентрације од $5 \times 10^{-5} \text{ M}$. Раствори припремљени на овај начин су анализирани 6 h на собној температури. У UV-Vis спектрима комплекса појављује се интензиван апсорпциони пик у

области између 200 - 350 nm, који је повезан са $N \rightarrow Au(III)$ електронским трансфером (LMCT).¹⁶¹ Положај апсорпционог максимума и облик спектра остају непромењени, али је примећено незнатно опадање интензитета апсорпције (слика 44). Ова врста промене може бити приписана хидролизаци¹⁹⁷ или формирању олигомерних врста.⁷¹ Добијени резултати потврђују да су комплекси **4** – **8**, генерално, стабилни у воденом раствору.¹⁹⁷



Слика 44. UV-Vis спектри комплекса **4** – **8** у води у току 6 h. $[Au(III)] = 5 \times 10^{-5} M$ ¹⁶²

Стабилност Au(III) комплекса у Нерес пуферу (25 mM Нерес, 30 mM NaCl, pH = 7,2) такође је испитивана у периоду од 6 h на 298 K коришћењем UV–Vis спектрофотометрије. Да би се добила концентрација од 5×10^{-5} M, сваки комплекс је пре додатка пуфера растворен у пар капи *N,N*-диметилформамида. У спектрима (слика 45) су детектовани одговарајући апсорпциони максимуми у опсегу од 200 – 350 nm. Нису примећене значајне промене у току времена, што доказује да су комплекси стабилни у испитиваном пуферском систему.



Слика 45. UV–Vis спектри комплекса 4 – 8 у Нерес пуферу у периоду од 6 h.
[Au(III)] = 5×10^{-5} M¹⁶²

3.1.2.1. Испитивање реакције супституције комплекса 4 – 6

Супституционе реакције комплекса 4 – 6 са трипептидом глутатионом (GSH), аминокиселином (L-Met) и DNA конституентом (5'-GMP) изучаване су помоћу „stopped-flow” методе. Различита нуклеофилност, способност везивања, стерна заштићеност и биолошка релевантност¹⁹⁸ чине ове нуклеофиле погодним за испитивање интеракција са Au(III) комплексима.

У току испитивања концентрације нуклеофила увек су биле најмање 10 пута веће од концентрације комплекса, како би се обезбедили услови реакције *pseudo*-првог реда. Добијени кинетички подаци су потврдили да се процес супституције одиграва у два узаастопна реверзибилна корака (схема 11).

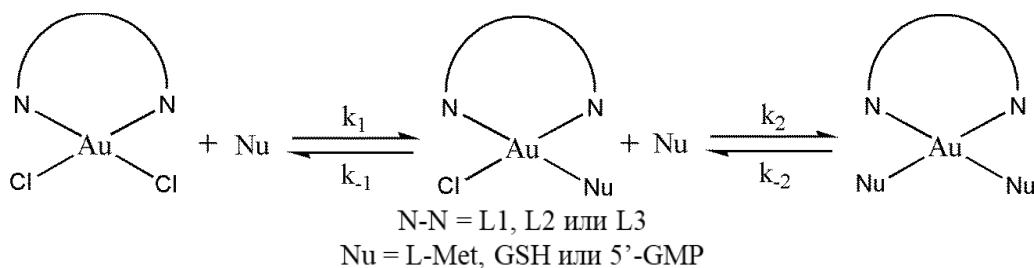


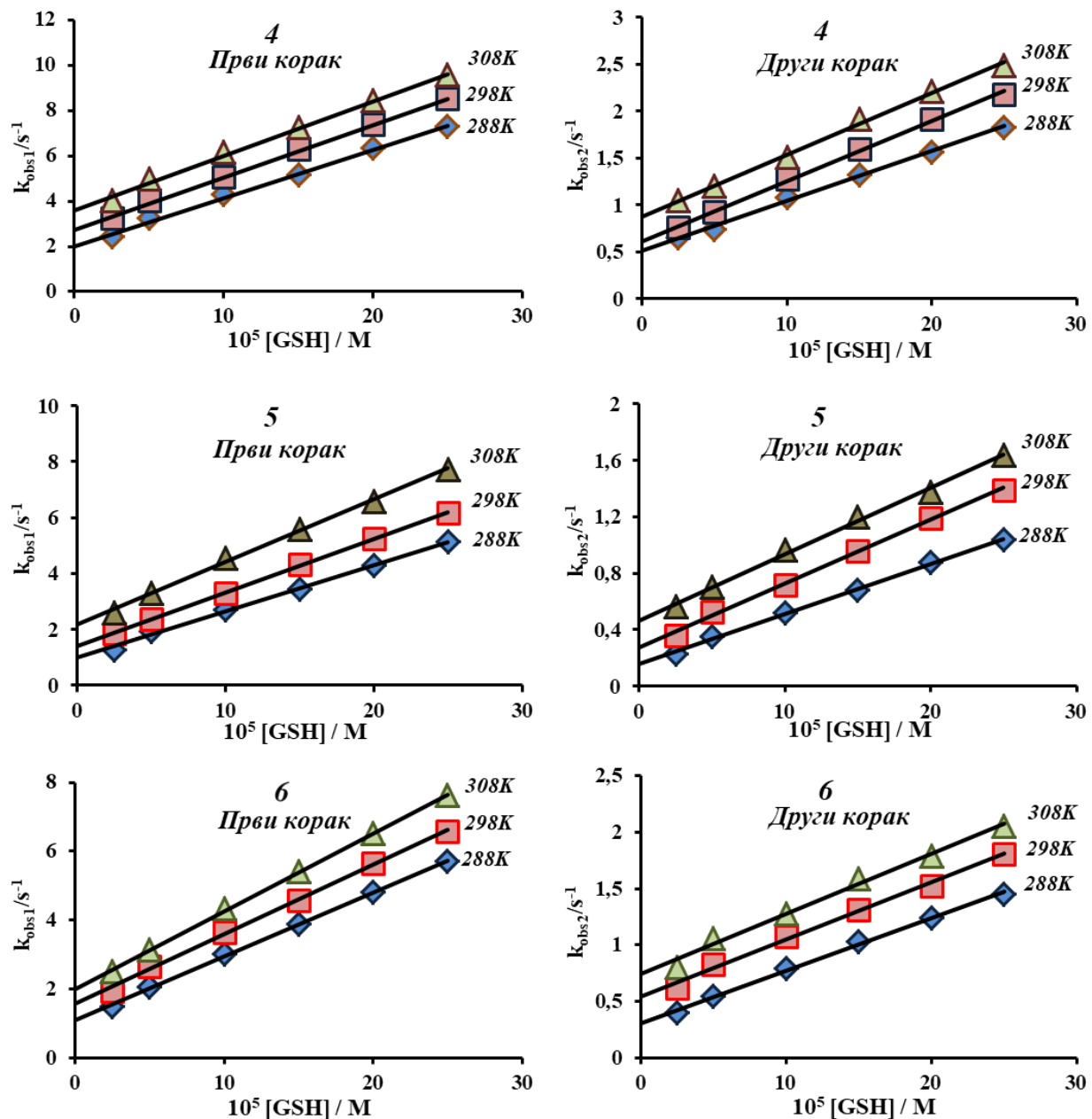
Схема 11. Реакције супституције комплекса 4 – 6 са GSH, L-Met и 5'-GMP¹⁶²

Први корак представља реверзибилну супституцију једног хлоридног јона, док је други корак реверзибилна супституција другог хлоридног јона из координационе сфере. Оба корака су јако брза и завршена у току 5 min. Двострука експоненцијална функција (карактеристична за двостепене реакције) коришћена је за анализу кинетичких података у циљу израчунавања константе брзине реакције *pseudo*-првог реда. Линеарне зависности константе брзине реакције *pseudo*-првог реда за први и за други корак супституције, k_{obs1} и k_{obs2} , у функцији од концентрације нуклеофила (GSH, L-Met, 5'-GMP) (слике 46 – 48) коришћене су да би се израчунале вредности за константе директних и повратних процеса на основу једначина 8 и 9. Свака константа брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs1} и k_{obs2} , израчуната је као средња вредност независних пет или шест мерења.¹⁶²

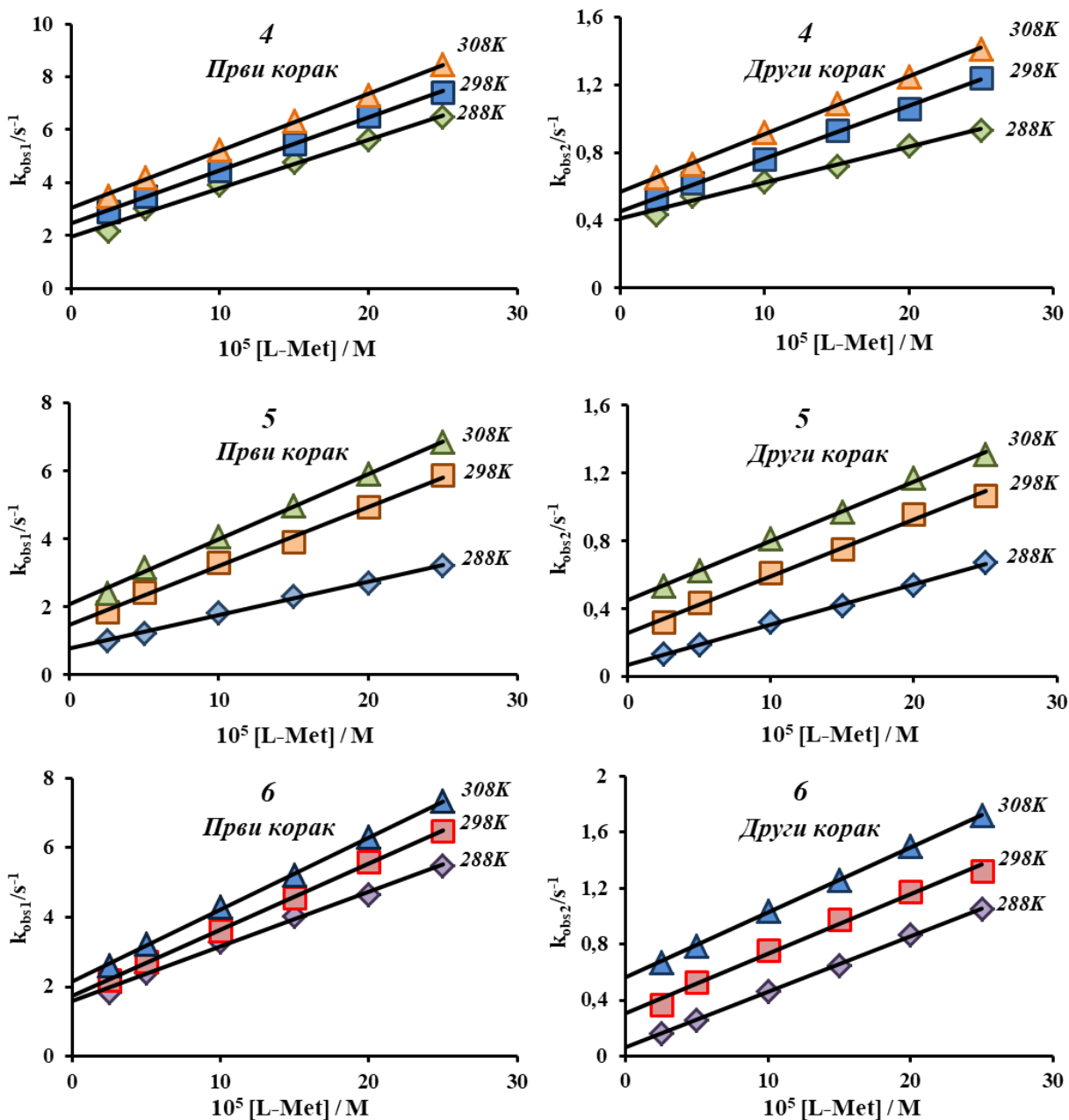
$$k_{\text{obs1}} = k_1 [\text{Nu}] + k_{-1} [\text{Cl}^-] \quad (8)$$

$$k_{\text{obs2}} = k_2 [\text{Nu}] + k_{-2} [\text{Cl}^-] \quad (9)$$

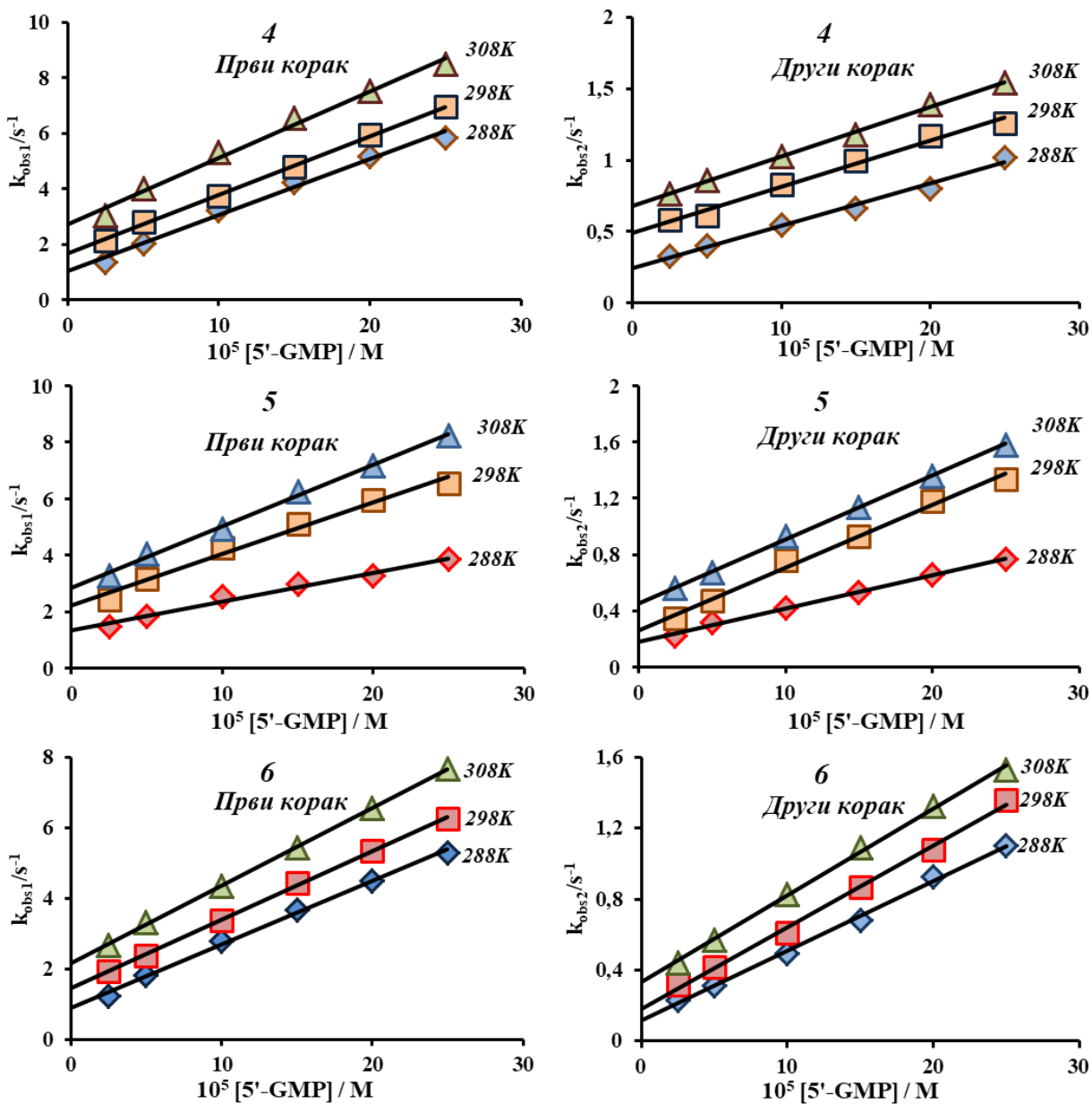
Добијене вредности за константе брзине директних и повратних реакција, као и вредности термодинамичких параметара $\Delta H^\ddagger$ и $\Delta S^\ddagger$ (једначина 5) сумиране су у Табели 11.



Слика 46. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs1} и k_{obs2} , у функцији од концентрације нуклеофила и температуре за супституционе реакције комплекса 4 – 6 и GSH у Hepes пуферу (pH = 7,2, 25 mM Hepes, 30 mM NaCl)¹⁶²



Слика 47. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs1} и k_{obs2} , у функцији од концентрације нуклеофила и температуре за супституционе реакције комплекса 4 – 6 и L-Met у Hepes пуферу (pH = 7,2, 25 mM Hepes, 30 mM NaCl)¹⁶²



Слика 48. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs1} и k_{obs2} , у функцији од концентрације нуклеофила и температуре за супституционе реакције комплекса **4 – 6** и 5'-GMP у Hepes пуферу (pH = 7,2, 25 mM Hepes, 30 mM NaCl)¹⁶²

Табела 11. Константе брзине и активациони параметри за супституционе реакције комплекса **4** – **6** са одговарајућим нуклеофилима на три различите температуре у 25 mM Нерес пуферу и 30 mM NaCl (pH = 7,2)¹⁶²

		λ [nm]	T [K]	$10^4 \times k_1$ [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{-1} [s ⁻¹]	$\Delta H_1^\ddagger$ [kJ mol ⁻¹]	$\Delta S_1^\ddagger$ [J K ⁻¹ mol ⁻¹]	$10^3 \times k_2$ [M ⁻¹ s ⁻¹]	$10^{-1} \times k_{-2}$ [s ⁻¹]	$\Delta H_2^\ddagger$ [kJ mol ⁻¹]	$\Delta S_2^\ddagger$ [J K ⁻¹ mol ⁻¹]
4	<i>GSH</i>	298	288	2,12 ± 0,07	2,02 ± 0,09	40 ± 4	-16 ± 10	5,3 ± 0,1	5,1 ± 0,2	86 ± 3	-150 ± 10
			298	2,32 ± 0,05	2,74 ± 0,07			6,4 ± 0,1	6,2 ± 0,2		
			308	2,61 ± 0,08	4,5 ± 0,1			7,7 ± 0,2	6,8 ± 0,3		
	<i>L-Met</i>	278	288	1,84 ± 0,08	2,0 ± 0,1	34 ± 2	-164 ± 8	5,7 ± 0,1	2,7 ± 0,2	68 ± 1	-160 ± 4
			298	2,00 ± 0,03	2,45 ± 0,04			6,64 ± 0,06	3,0 ± 0,09		
			308	2,22 ± 0,04	3,00 ± 0,06			7,78 ± 0,05	3,5 ± 0,08		
	<i>5'-GMP</i>	273	288	2,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	20,9 ± 0,6	-169 ± 2	3,0 ± 0,2	2,4 ± 0,2	25 ± 2	-183 ± 7
			298	2,12 ± 0,03	1,65 ± 0,05			3,2 ± 0,2	4,9 ± 0,3		
			308	2,3 ± 0,2	2,8 ± 0,2			3,5 ± 0,1	6,8 ± 0,1		
5	<i>GSH</i>	307	288	1,66 ± 0,05	0,99 ± 0,08	73 ± 3	-149 ± 9	2,80 ± 0,09	1,5 ± 0,1	83 ± 3	-159 ± 10
			298	1,92 ± 0,02	1,41 ± 0,03			3,3 ± 0,1	2,6 ± 0,2		
			308	2,30 ± 0,06	2,18 ± 0,08			4,1 ± 0,1	4,7 ± 0,2		
	<i>L-Met</i>	263	288	1,70 ± 0,03	0,70 ± 0,04	62 ± 1	-153 ± 4	6,18 ± 0,05	0,5 ± 0,08	75 ± 3	-156 ± 9
			298	1,99 ± 0,06	1,33 ± 0,09			7,37 ± 0,1	1,6 ± 0,2		
			308	2,27 ± 0,05	1,95 ± 0,08			8,65 ± 0,07	3,6 ± 0,1		
	<i>5'-GMP</i>	273	288	1,01 ± 0,07	1,4 ± 0,1	83 ± 1	-149 ± 3	2,38 ± 0,08	1,8 ± 0,1	74 ± 2	-164 ± 6
			298	1,2 ± 0,1	2,1 ± 0,2			2,75 ± 0,2	2,9 ± 0,3		
			308	2,13 ± 0,06	2,9 ± 0,1			3,3 ± 0,07	4,7 ± 0,1		
6	<i>GSH</i>	307	288	1,85 ± 0,03	1,11 ± 0,04	37 ± 3	-160 ± 10	4,7 ± 0,1	3,1 ± 0,2	32 ± 1	-176 ± 3
			298	2,02 ± 0,05	1,56 ± 0,07			5,1 ± 0,2	5,4 ± 0,3		
			308	2,26 ± 0,03	2,01 ± 0,04			5,6 ± 0,4	7,4 ± 0,4		
	<i>L-Met</i>	265	288	1,58 ± 0,06	1,58 ± 0,09	87 ± 3	-140 ± 10	3,97 ± 0,04	0,63 ± 0,06	23 ± 2	-181 ± 7
			298	1,90 ± 0,02	1,74 ± 0,04			4,3 ± 0,2	3,1 ± 0,3		

		308	$2,30 \pm 0,03$	$2,10 \pm 0,05$			$4,61 \pm 0,05$	$5,6 \pm 0,7$		
<i>5'-GMP</i>	274	288	$1,80 \pm 0,05$	$0,91 \pm 0,08$			$4,0 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,3$		
		298	$1,94 \pm 0,02$	$1,45 \pm 0,04$	39 ± 1	-162 ± 4	$4,6 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	60 ± 2	-166 ± 6
		308	$2,20 \pm 0,02$	$2,17 \pm 0,04$			$5,3 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,2$		

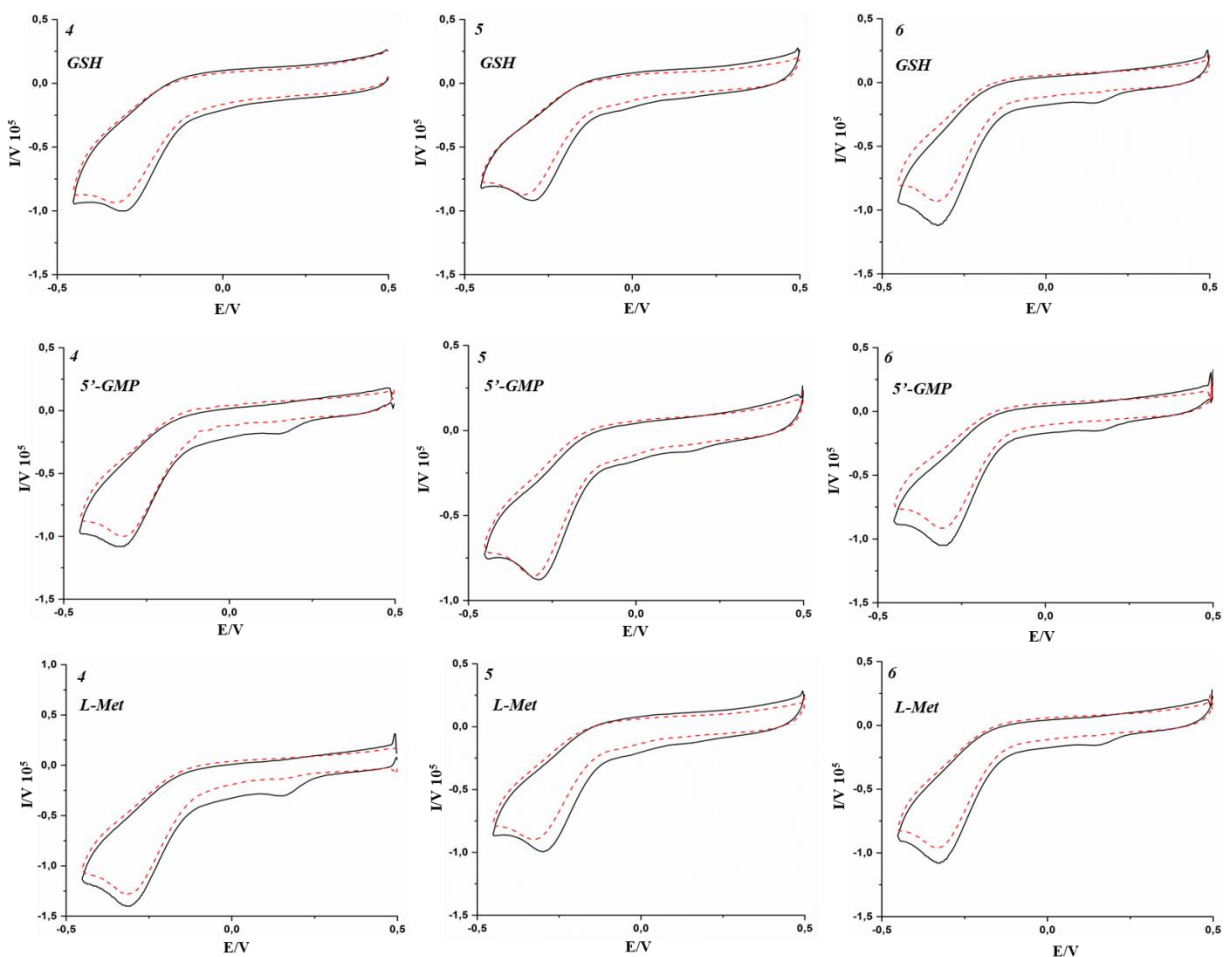
Према резултатима приказаним у Табели 11, коришћени сумпор- и азот-донорски нуклеофили имају велики афинитет везивања за Au(III) комплексе. Ред реактивности Au(III) комплекса према одабраним нуклеофилима опада у низу $4 > 6 > 5$. Разлика у реактивности може бити приписана различитим карактеристикама инертних лиганата с обзиром на њихова структурна и електронска својства. Наиме, комплекс са лигандом који садржи нафтил групу у средини и две терминалне фенил групе (**L1**) показао је најбољу реактивност, док је комплекс који садржи лиганд са фенил групама у средини и на терминалним положајима (**L2**) показао најмању реактивност.

Природа улазног нуклеофила, такође, има велики утицај на брзину супституције. Добро је познато да се Au(III) јон налази на прелазу између „меких” и „тврђих” Луисових киселина и да поседује велики афинитет везивања према сумпор-донорима. Међутим, добијени редослед реактивности коришћених нуклеофила је $\text{GSH} > 5'\text{-GMP} > \text{L-Met}$. Велика реактивност GSH се може објаснити чињеницом да је у физиолошким условима глутатион 95% депротонан, а настали GS^- облик представља веома реактивну врсту.¹⁹⁹ Са друге стране, волуминозна метил-група у структури тиоетра L-Met отежава прилаз нуклеофила у процесу супституције.

Све реакције су изучаване на три различите температуре (288, 298 и 308 K). Активациони параметри ($\Delta H^\ddagger$ и $\Delta S^\ddagger$) израчунати су помоћу Eyring-ове једначине (5). Добијене вредности за ентропију активирања су негативне, што указује да је стварање нове везе доминантно у активационом процесу (Табела 11). Такође, негативне вредности за $\Delta S^\ddagger$ и мале вредности за $\Delta H^\ddagger$ подржавају асоцијативни механизам супституције.¹⁶¹

Да би се додатно испитала редокс стабилност комплекса у присуству нуклеофила (GSH , L-Met и $5'\text{-GMP}$) коришћена је циклична волтаметрија. Јасан редукциони пик (у рангу од -250 до -350 mV) присутан у волтамограмима комплекса **4** – **6** може се повезати са настанком елементарног злата.

Редокс стабилност комплекса **4** – **6** у присуству нуклеофила (GSH , $5'\text{-GMP}$ и L-Met) испитивана је у метилен хлориду уз додатак Et_4NBr . Резултати су приказани на слици 49. Примећено је померања потенцијала по додатку $500 \mu\text{L}$ GSH , $5'\text{-GMP}$ и L-Met од: -26 , $+7$, -3 mV за комплекс **4**, -27 , -19 , -26 mV за комплекс **5** и -7 , -7 , -5 mV за комплекс **6**. Опадање струје у систему након додатка нуклеофила потврђује редокс процес.²⁰⁰

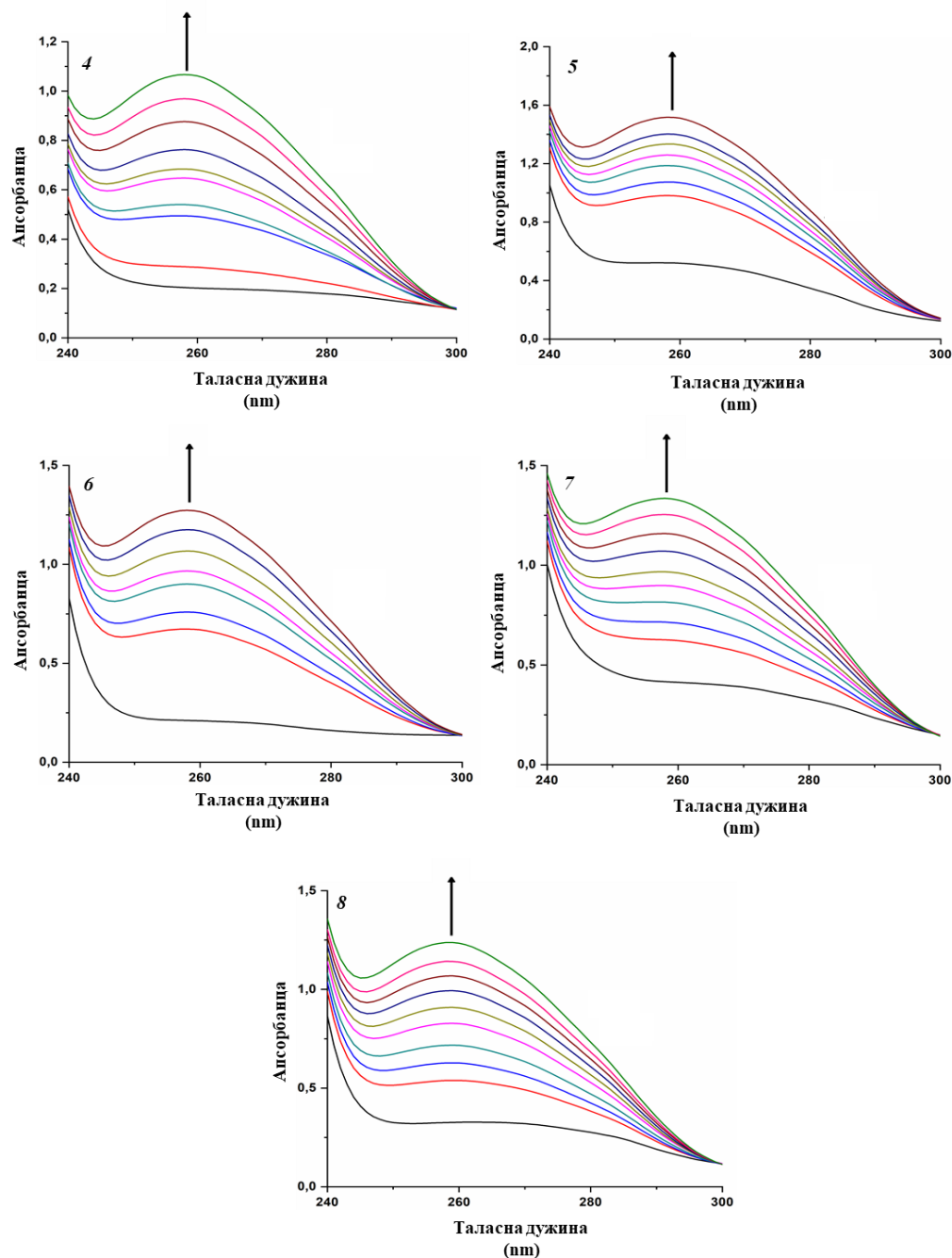


Слика 49. Циклични волтамограми комплекса **4** – **6** пре (црна линија) и након додатка 500 μL нуклеофила (црвена-испрекидана линија). $[\text{нуклеофил}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ¹⁶²

У току испитивања потврђена је редукција Au(III) јона након додатка нуклеофила појавом елементарног злата на радној електроди. Међутим, понашање ових комплекса је различито у поређењу са другим Au(III) комплексима, где се два јасна редукциона пика високог интензитета јављају због постојања два одвојена редокс процеса.⁴² Први процес обухвата систем Au(III)/Au(I) , док други обухвата систем Au(I)/Au(0) .⁴² У случају комплекса **4** – **6** недостатак Au(III)/Au(I) пика може се објаснити чињеницом да је Au(I) врста јако настабилна.⁴² Наиме, бидентатни *N-N* лиганди **L1** – **L3** имају могућност да стабилизују само Au(III) јон, тако да су редукциони пикови померени ка негативнијим потенцијалима. Слични резултати су раније публиковани за Au(III) комплексе са етилендиамином као лигандом.²⁰¹

3.1.2.2. Испитивање интеракција комплекса 4 – 8 са DNA

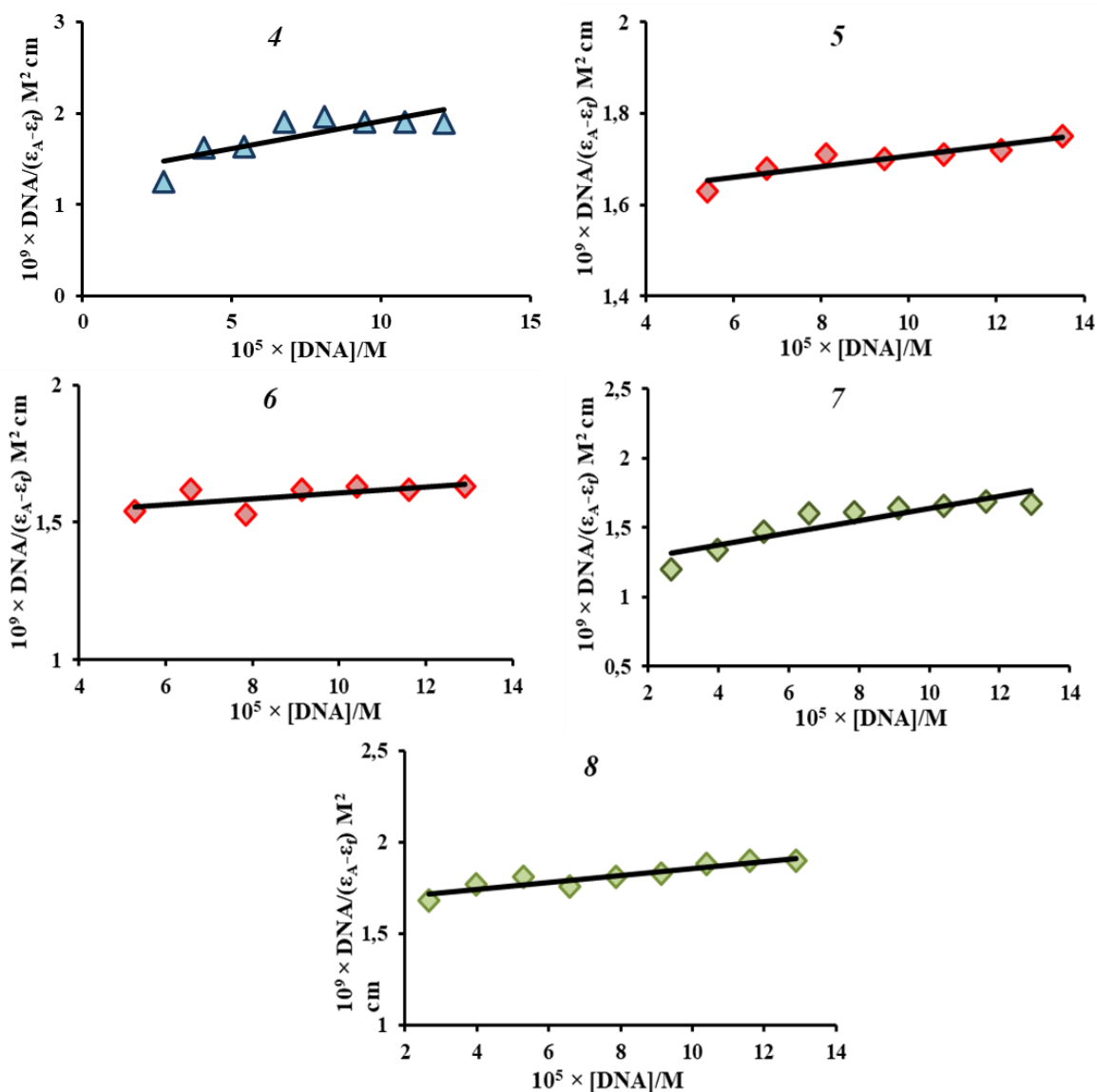
Апсорпциони спектри раствора комплекса **4** – **8** константне концентрације ($[\text{Au(III)}] = 1,35 \times 10^{-5} \text{ M}$) и растуће концентрације DNA ($[\text{DNA}] = (1,35 - 13,5) \times 10^{-5} \text{ M}$) у пуферу (25 mM Hepes, 30 mM NaCl) приказани су на слици 50.



Слика 50. Апсорпциони спектри комплекса **4** – **8** у пуферу (25 mM Hepes, 30 mM NaCl) након додатка DNA, $[\text{Au(III)}] = 1,35 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{DNA}] = (1,35 - 13,5) \times 10^{-5} \text{ M}$. Стрелице показују промену апсорбанце са повећањем концентрације DNA¹⁶²

Након додатка DNA у раствор комплекса **4** – **8**, положај максимума остаје непромењен, што указује на одсуство редукције комплекса до Au(I) јона или елементарног злата. Међутим, додаток DNA до односа $r = 10$ доводи до значајног хиперхромног ефекта.¹⁸⁵ Ово може бити последица нарушавања секундарне структуре DNA, када фосфатна група постаје доступна за координацију са јоном метала.¹⁰⁴ Заправо, овом методом може се потврдити присуство интеракција, али не и тачан начин везивања комплекса.

У циљу одређивања јачине везивања Au(III) комплекса и DNA, константе везивања (K_b) израчунате су помоћу једначине 6, а график зависности $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ од $[DNA]$ приказан је на слици 51. Израчунате вредности потврђују да комплекс **4** показује највећу способност везивања за DNA.

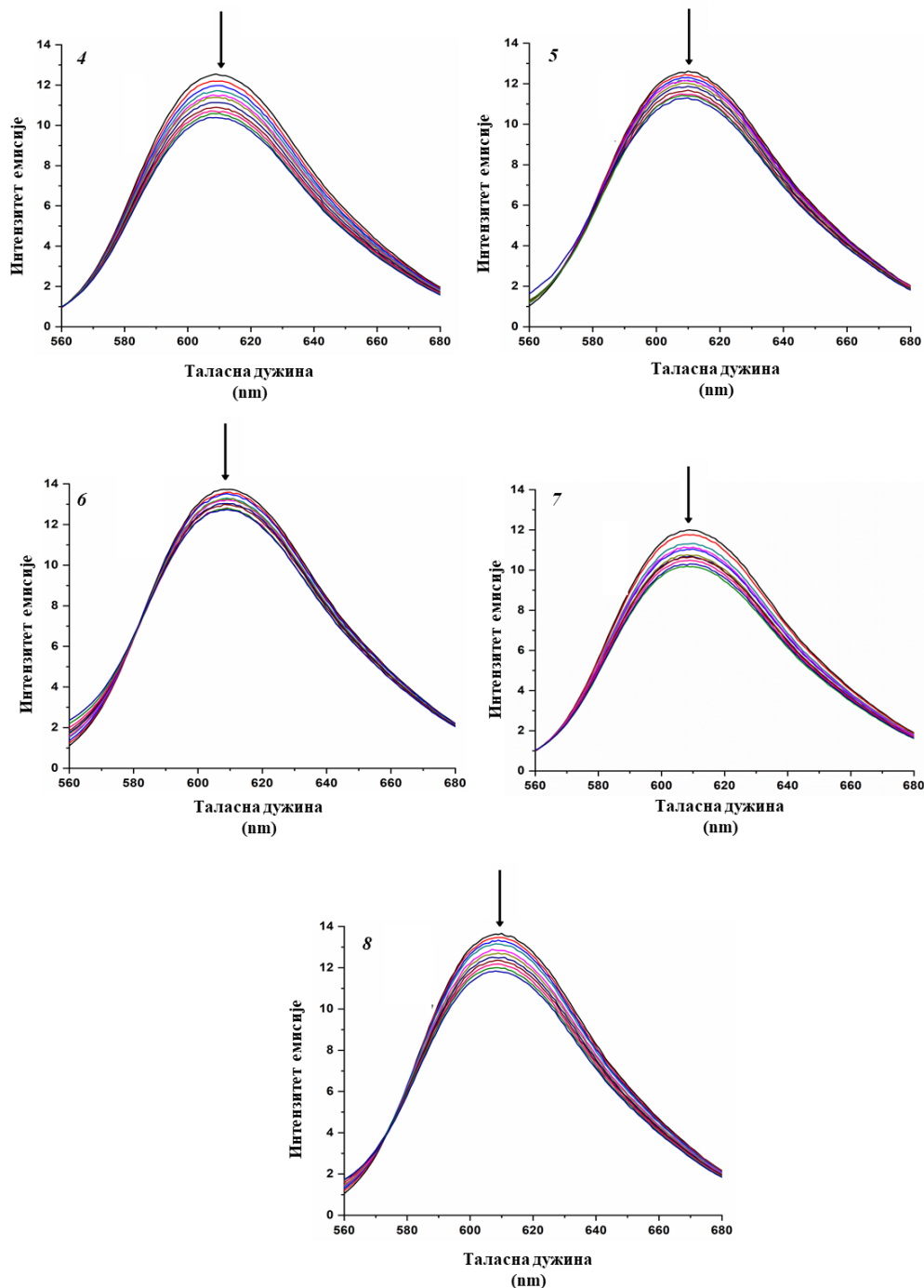


Слика 51. $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ у функцији од $[DNA]$ за комплексе **4** – **8**¹⁶²

Табела 12. Константе везивања (K_b) и Stern–Volmer–ове константе (K_{sv}) за EB–DNA и HOE–DNA реакције измене¹⁶²

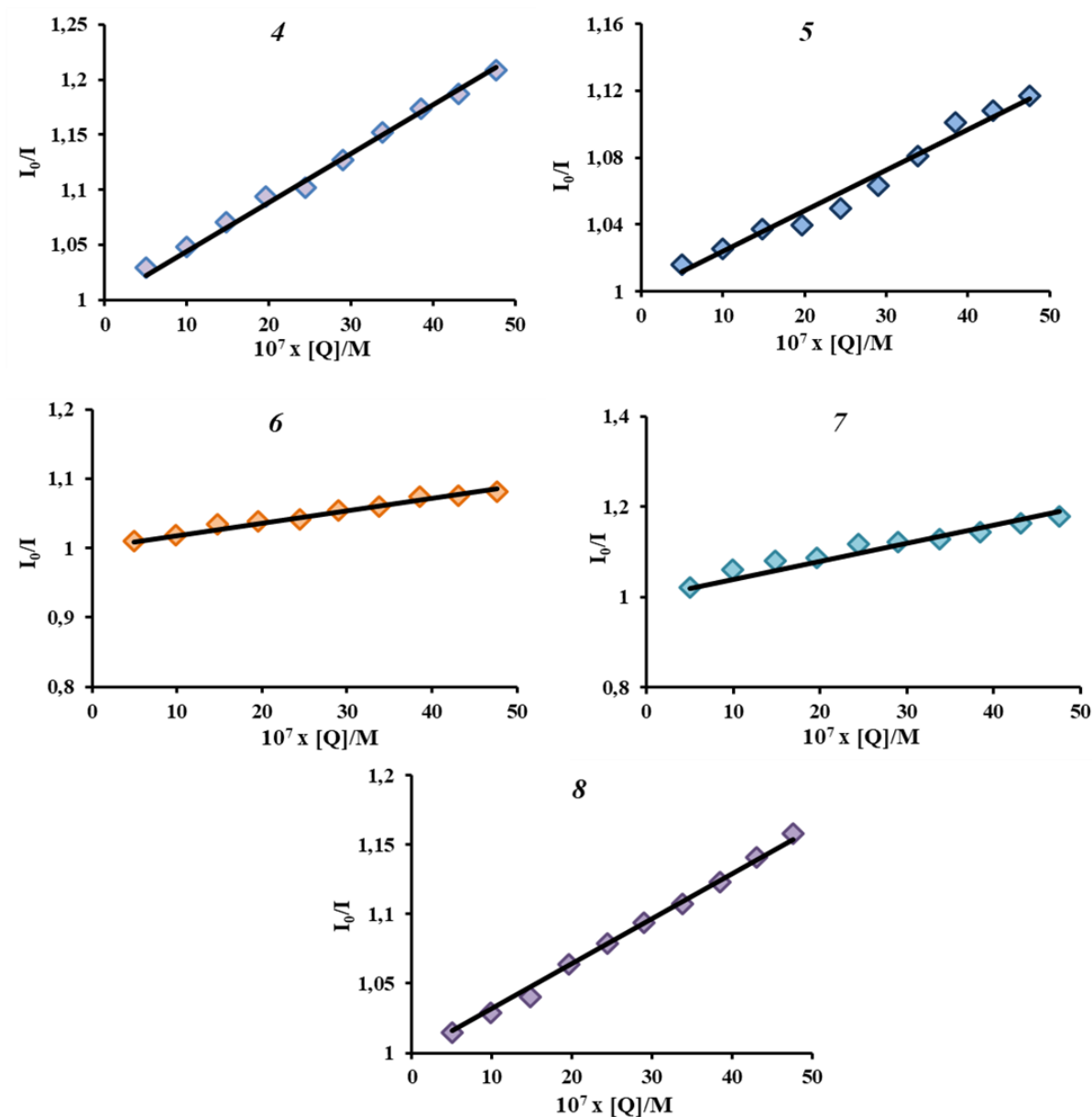
	$K_b \times 10^3$ [M ⁻¹]	$K_{sv(EB)} \times 10^4$ [M ⁻¹]	$K_{sv(HOE)} \times 10^5$ [M ⁻¹]
4	4,5 ± 0,7	4,22 ± 0,09	0,30 ± 0,02
5	2,1 ± 0,4	2,5 ± 0,1	12,00 ± 0,02
6	0,72 ± 0,07	1,68 ± 0,09	7,6 ± 0,7
7	3,7 ± 0,1	3,32 ± 0,02	12,40 ± 0,02
8	1,15 ± 0,09	3,37 ± 0,06	10,60 ± 0,03

Даља испитивања могућег начина везивања комплекса за DNA обухватају испитивање измене EB, као што је описано у општем делу. Промена интензитета флуоресценције раствора EB–DNA након додатка растуће концентрације комплекса **4** – **8** приказана је на слици 52. Опадање интензитета флуоресцентног пика указује да Au(III) комплекси могу да замене EB и интерагују са DNA.¹⁹⁹



Слика 52. Емисиони спектри EB-DNA у присуству комплекса **4 – 8**. $[EB] = 5 \mu M$; $[DNA] = 5 \mu M$; $[Au(III)] = (0,49 - 4,76) \mu M$; $\lambda_{ex} = 527 \text{ nm}$. Стрелице показују промену интензитета емисије након додатка растуће концентрације комплекса¹⁶²

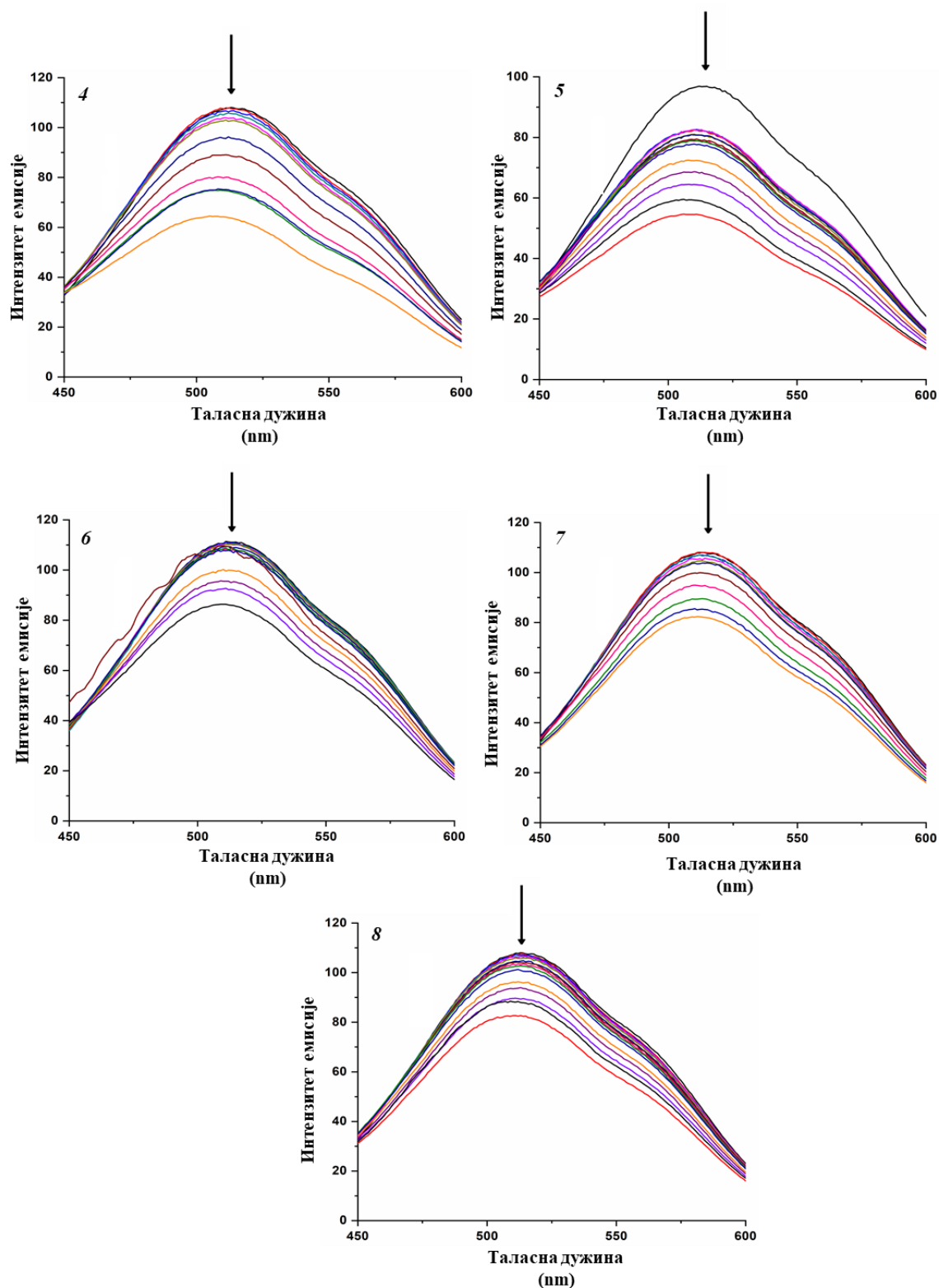
Stern-Volmer-ове константе (K_{sv}), израчунате из нагиба графика I_0/I у функцији од $[Q]$ (једначина 7, слика 53), приказане су у Табели 12. Вредности константи везивања ($10^4 M^{-1}$), указују на способност комплекса да интерагују са DNA.



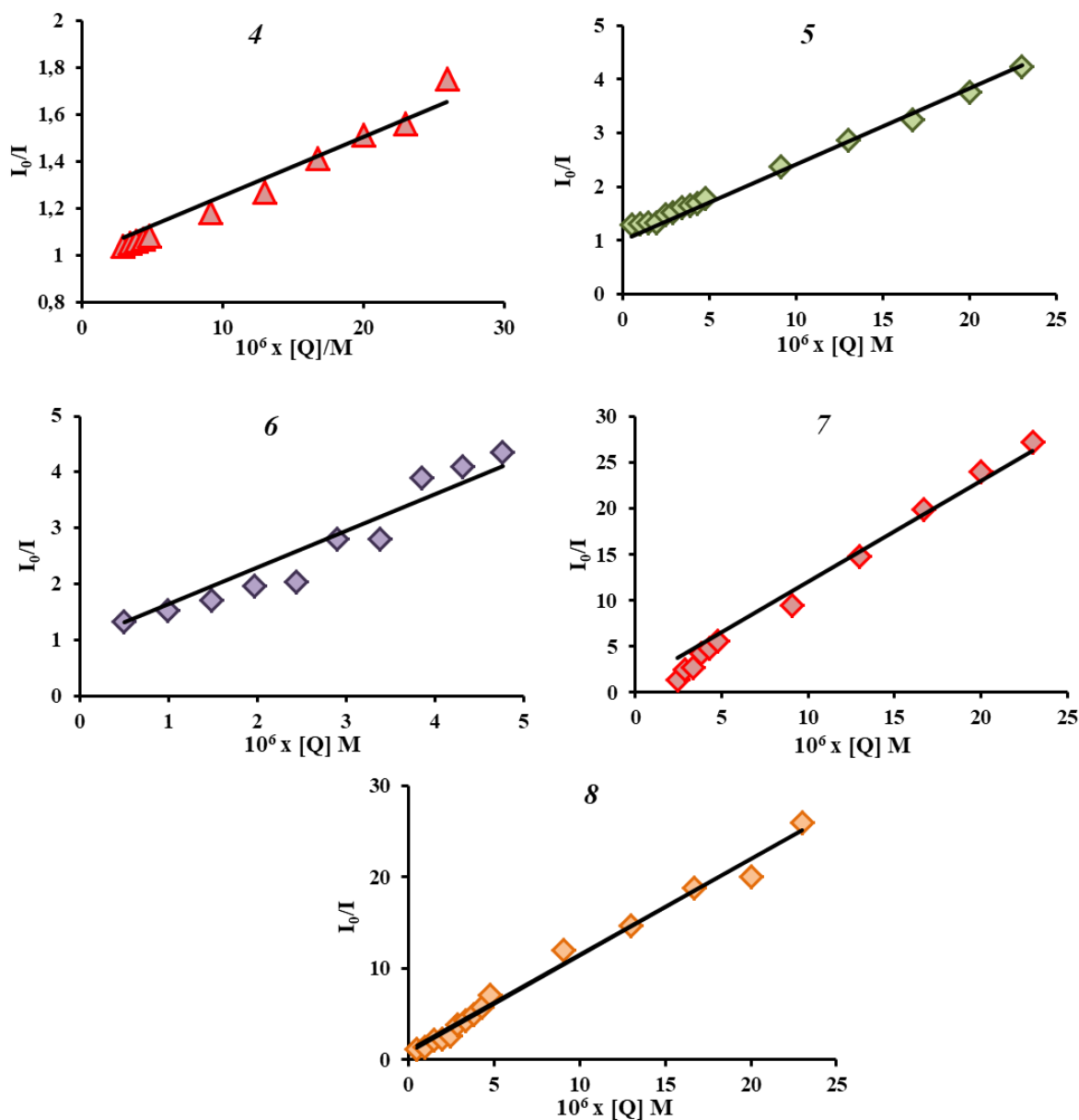
Слика 53. I_0/I у функцији од $[Q]$ за интеракције комплекса **4** – **8** са EB–DNA¹⁶²

У циљу детаљног одређивања начина везивања комплекса **4** – **8** за DNA, изучаване су реакције измене НОЕ. НОЕ (Hoechst 33258) представља синтетички дериват *N*-метилпиперазина са могућношћу везивања за жлеб DNA.²⁰¹ Интензитет флуоресценције НОЕ расте након додатка DNA, док се опадање интензитета флуоресценције система НОЕ-DNA запажа након додатка комплекса који имају могућност да замене НОЕ и вежу се за DNA са већим афинитетом. Публиковани резултати говоре да је везивање за мањи жлеб присутно код малих молекула (лекова, органских боја, итд.), док је везивање за већи жлеб примећено код макромолекула (протеина).¹⁰⁴

Флуоресцентни спектри НОЕ–DNA система након додатка растуће концентрације комплекса **4 – 8** приказани су на слици 54. Опадање интензитета флуоресценције може се објаснити на три начина. Први начин подразумева да се Au(III) комплекси могу везати за НОЕ и као последица тога долази до опадања интензитета флуоресценције НОЕ. Други начин подразумева да Au(III) комплекси могу да замене НОЕ из НОЕ-DNA. У том случају концентрација НОЕ везаног за DNA опада, што за последицу има опадање интензитета флуоресценције. Трећи начин се може објаснити чињеницом да Au(III) комплекси могу да користе НОЕ-DNA као лиганд формирајући нефлуоресцентне DNA–НОЕ–Au(III) комплексе.¹⁶² Добијени резултати за комплексе **4 – 8** потврђују други начин интеракције, а на основу израчунатих вредности константи за НОЕ (Табела 12, слика 55), које су десет пута веће у односу на вредности за ЕВ, може се претпоставити да је у овом случају везивање за жлеб вероватнији начин интеракције комплекса у односу на интеркалацију.

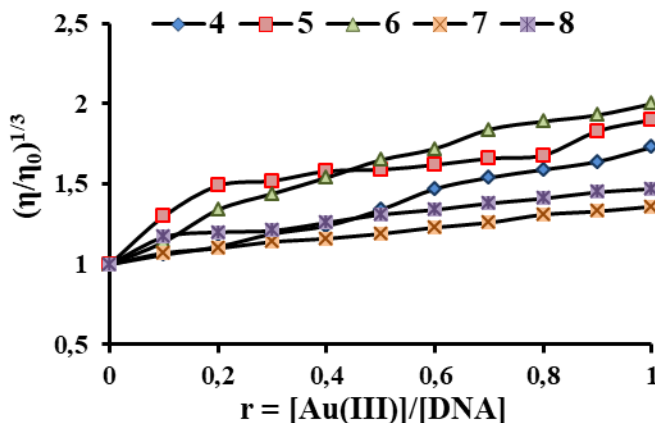


Слика 54. Емисиони спектри HOE-DNA у присуству комплекса **4 – 8**. [HOE] = 5 μM ; [DNA] = 5 μM ; [Au(III)] = (2,9 – 23) μM ; λ_{ex} = 346 nm. Стрелице показују промену интензитета емисије након додатка растуће концентрације комплекса¹⁶²



Слика 55. I_0/I у функцији од $[Q]$ за интеракције комплекса 4 – 8 са HOE-DNA¹⁶²

Међутим, добијене вредности константи за интеракције комплекса са ЕВ (10^4 M^{-1}) и HOE ($10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}$) и даље не могу са сигурношћу да потврде начин везивања за DNA.²⁰² У циљу добијања поузданијих резултата, испитивана је вискозност раствора. Додатак раствора Au(III) комплекса у раствор DNA довело је до повећања вискозности, као што је приказано на слици 56.

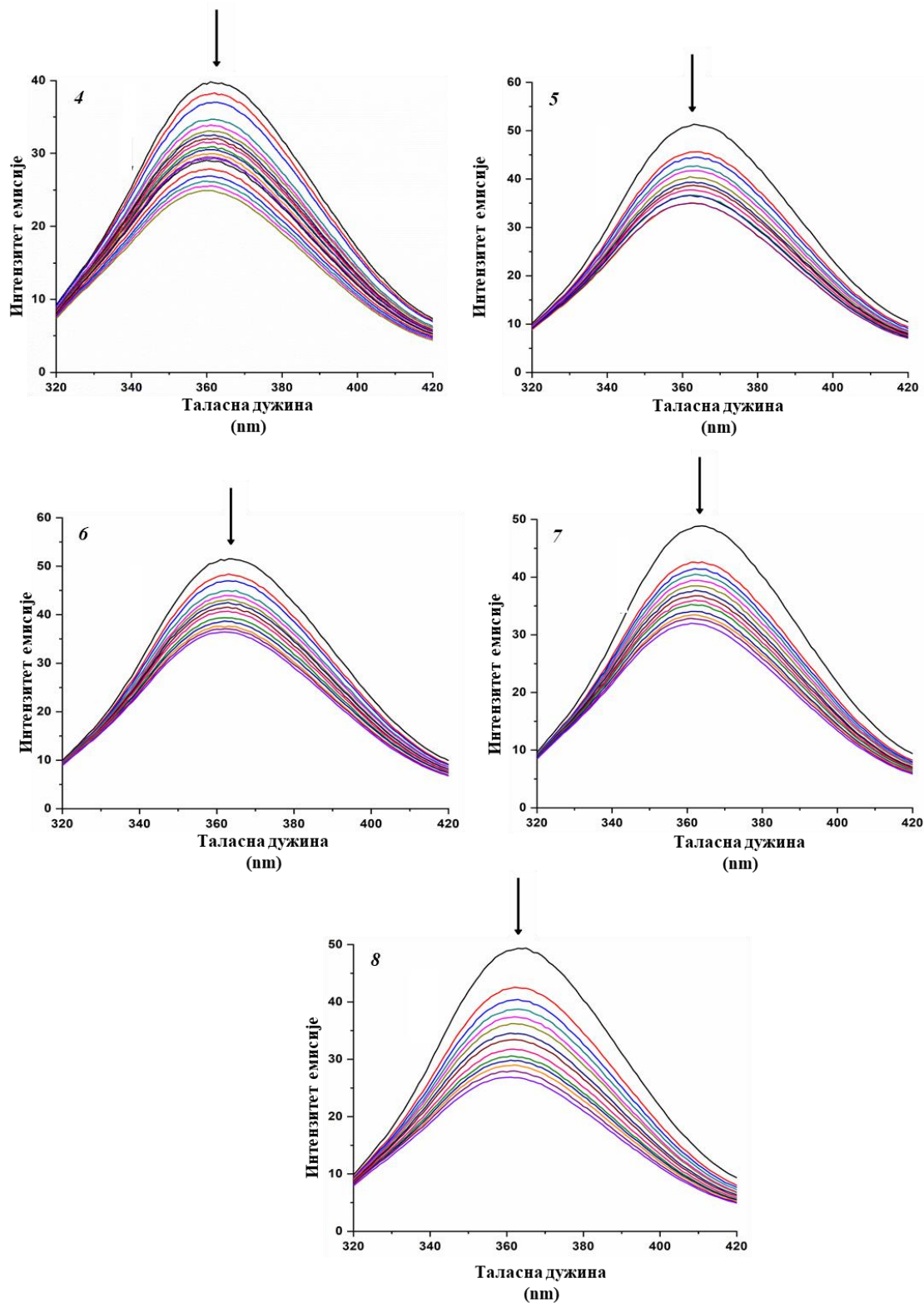


Слика 56. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ DNA ($[DNA] = 11 \mu M$) у раствору пуфера (25 mM Hepes, 30 mM NaCl) у присуству растуће концентрације комплекса **4 – 8** (r)¹⁶²

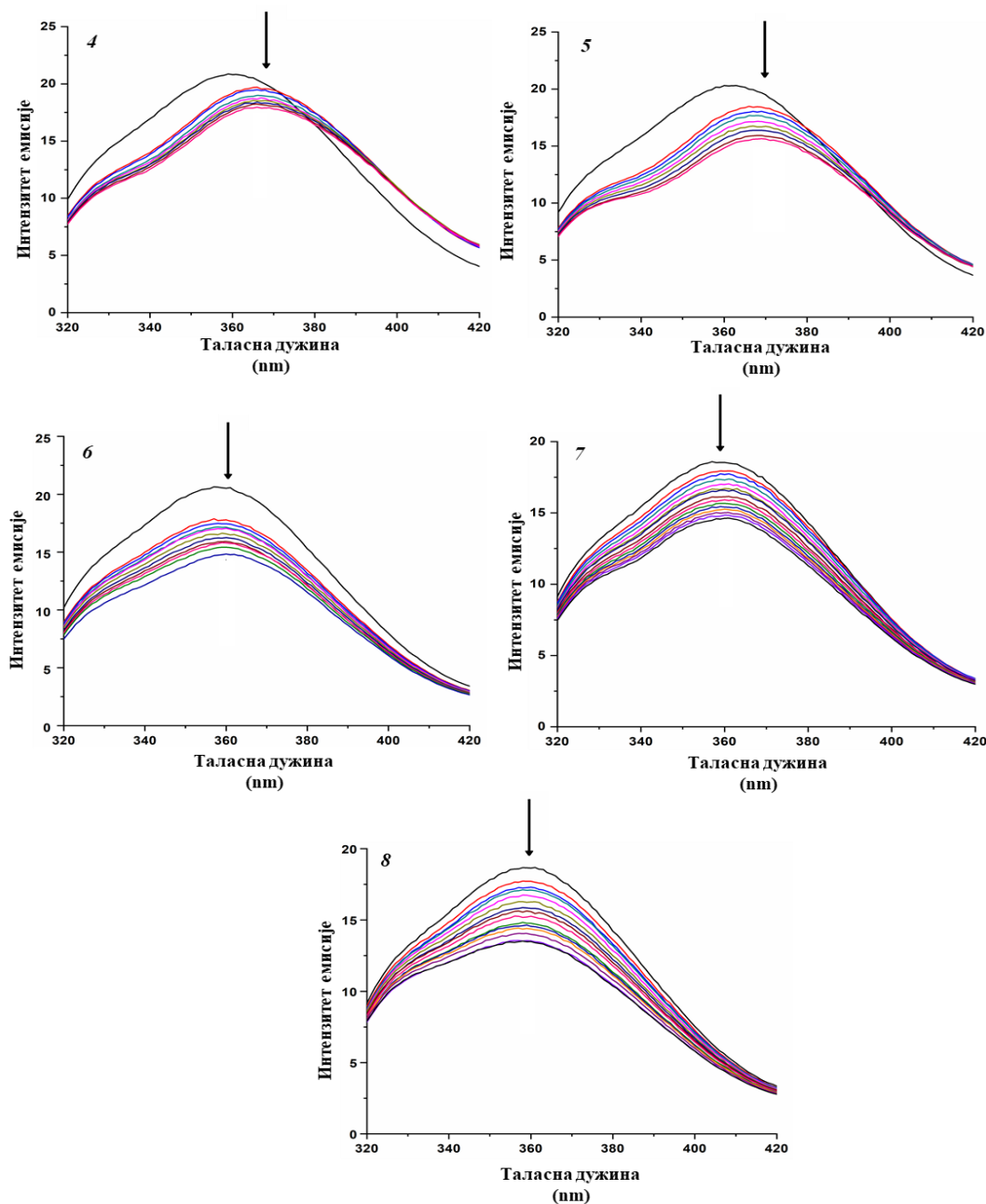
3.1.2.3. Испитивање интеракција комплекса **4 – 8** са BSA и HSA

Раствори BSA и HSA показују интензивну флуоресцентну емисију на око 360 nm када су ексцитовани на 295 nm због триптофанских остатака.²⁰³ Међутим, након додатка комплекса **4 – 8** у раствор BSA/HSA долази до опадања интензитета флуоресцентних пикова (слике 57 – 58), због промена у триптофанском окружењу протеина услед везивања комплекса.²⁰⁴

Додатак комплекса **4 – 8** у раствор BSA изазива плаво померање (λ_{max} од 363 nm на 360 nm за комплекс **4**; 364 nm на 362 nm за комплекс **5**; 364 nm на 362 nm за комплекс **6**; 364 nm на 361 nm за комплекс **7** и 364 nm на 361 nm за комплекс **8**), што је доказ за постојање места за везивање комплекса у хидрофобном центру протеина. Међутим, у случају реакције са HSA добијено је црвено померање (λ_{max} од 360 nm на 369 nm за комплекс **4**; 362 nm на 370 nm за комплекс **5**; 358 nm на 361 nm за комплекс **6**; 358 nm на 361 nm за комплекс **7** и 358 nm на 361 nm за комплекс **8**), које потврђује близину триптофанских и тирозинских остатака.²⁰⁵ Генерално, сви испитивани Au(III) комплекси доводе до значајније промене микро окружења код SA, због јаких интеракција са триптофанским остатком протеина.²⁰⁶



Слика 57. Емисиони спектри раствора BSA у присуству комплекса **4** – **8**. [BSA] = 2 μ M, [Au(III)] = 0,20 – 2,91 μ M; λ_{ex} = 295 nm. Стрелице показују промену интензитета емисије након додатка комплекса¹⁶²



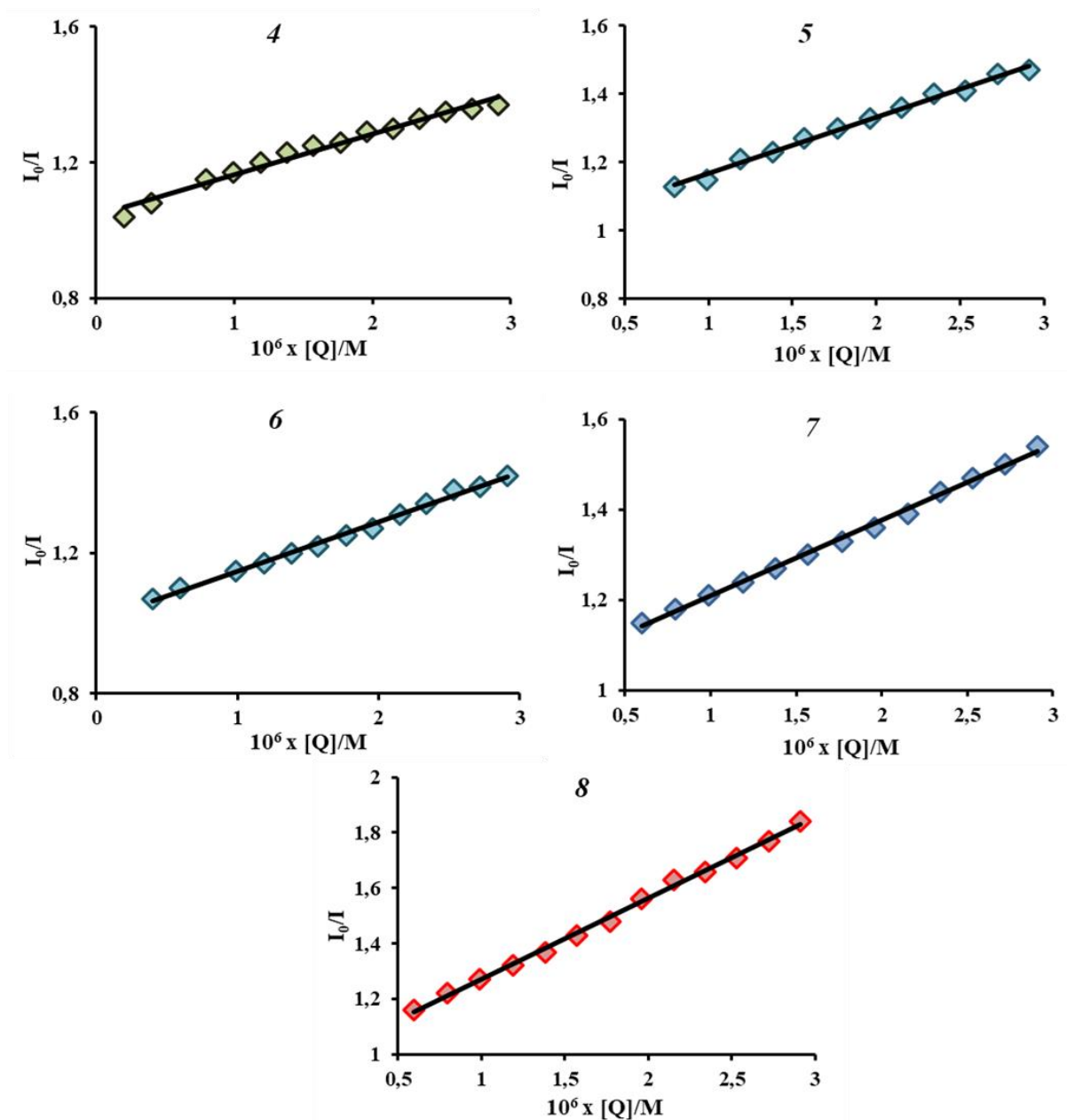
Слика 58. Емисиони спектри раствора HSA у присуству комплекса **4 – 8**. $[HSA] = 2\mu M$, $[Au(III)] = 1,38 - 2,91\mu M$; $\lambda_{ex} = 295\text{ nm}$. Стрелице показују промену интензитета емисије након додатка комплекса¹⁶²

Вредности Stern-Volmer-ове константе (K_{sv}) и константе гашења (k_q) за интеракције комплекса са BSA/HSA израчунате су помоћу Stern-Volmer-ове једначине (једначина 10, слике 59 и 60) и приказане у Табели 13. Вредности BSA/HSA-везујуће константе (K) и број везујућих места за албумин (n) израчунате су коришћењем Scatchard-ове једначине (једначина 11, слике 61 – 62).

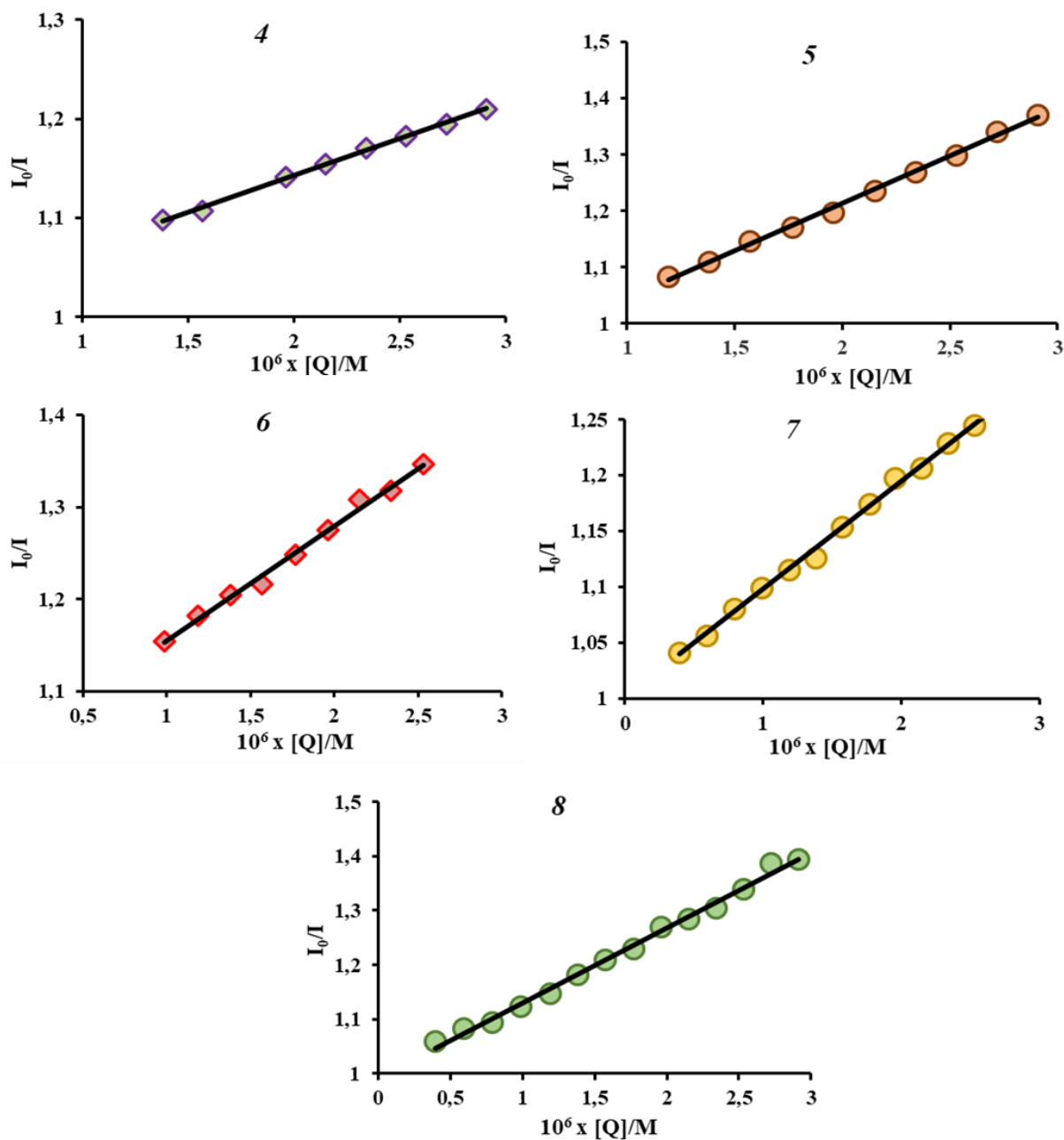
$$I_0/I = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (10)$$

$$(\Delta I/I_0)/[Q] = nK - K\Delta I/I_0 \quad (11)$$

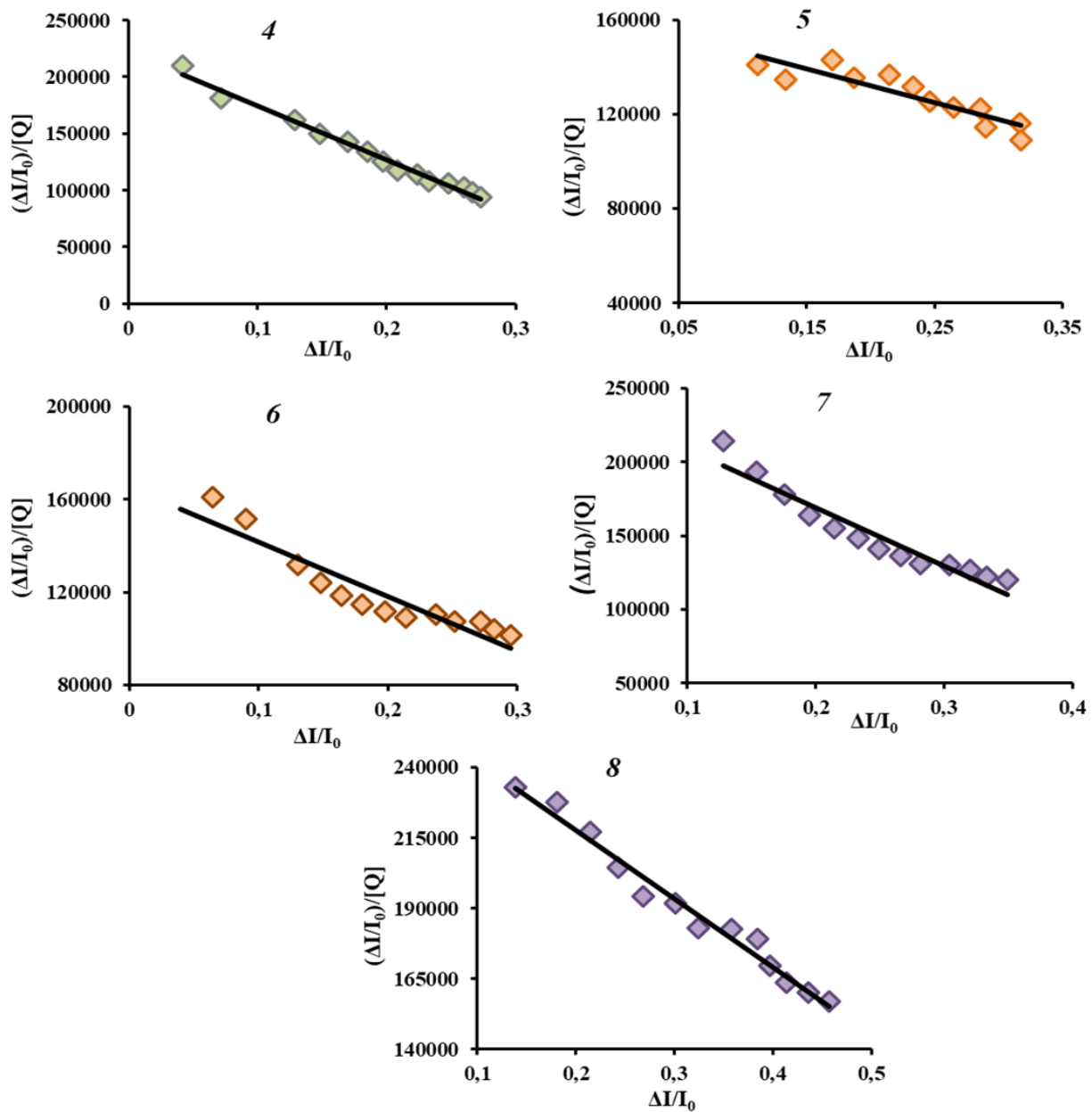
Вредности приказане у Табели 13 указују на добру могућност везивања комплекса за оба SA, са нешто већим потенцијалом за BSA.



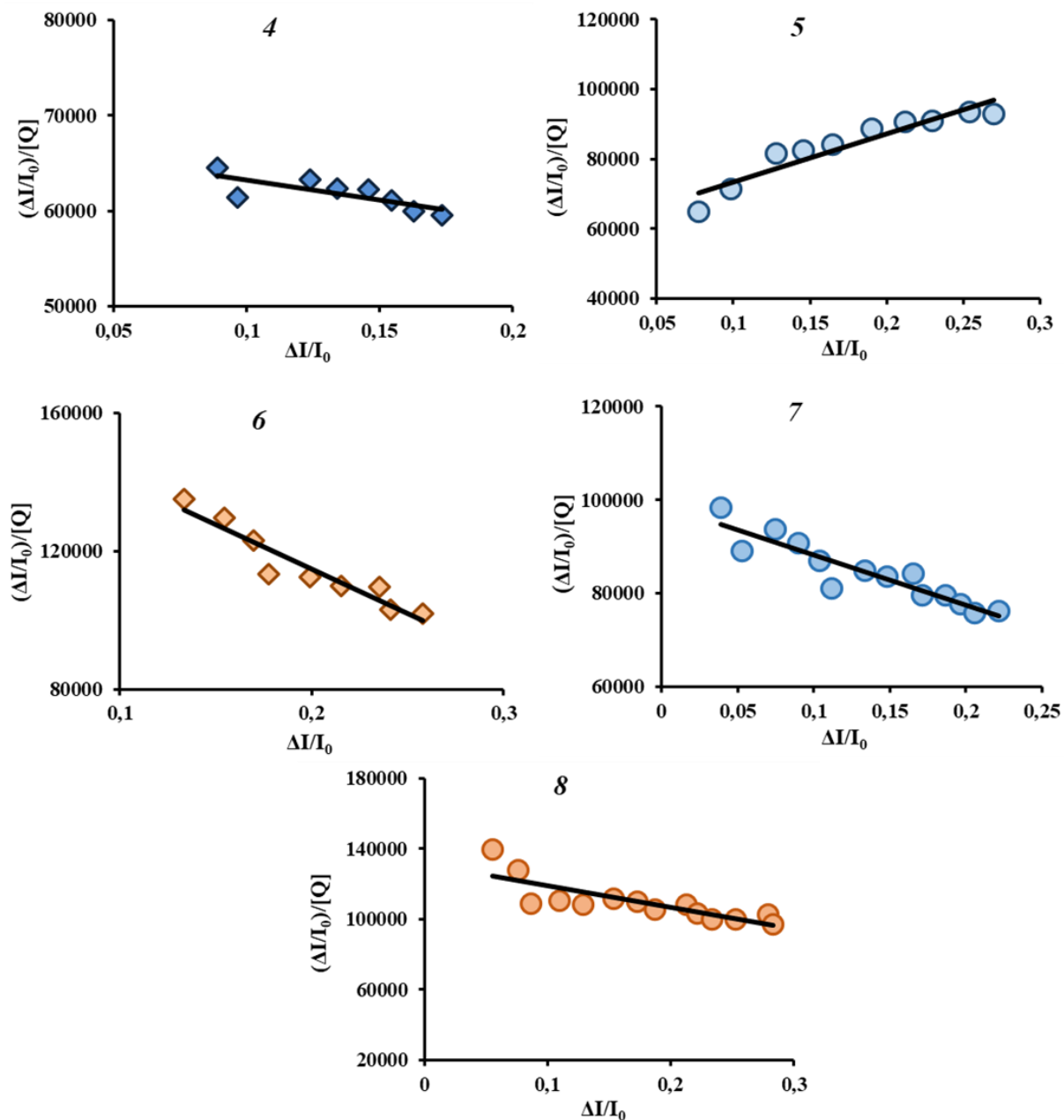
Слика 59. I_0/I у функцији од $[Q]$ за интеракције комплекса 4 – 8 са BSA¹⁶²



Слика 60. I_0/I у функцији од $[Q]$ за интеракције комплекса 4 – 8 са HSA¹⁶²



Слика 61. Scatchard-ови дијаграми за интеракције комплексе 4 – 8 са BSA¹⁶²



Слика 62. Scatchard-ови дијаграми за интеракције комплекса **4** – **8** са HSA¹⁶²

На основу вредности датих у Табели 13 може се закључити да комплекс **8** поседује највећу константу везивања за BSA, док комплекс **5** поседује највећу константу везивања за HSA. Све вредности за константе су у оптималном опсегу (10^5 M^{-1}). Међутим, оне су мање у поређењу са константама за авидин (10^{15} M^{-1}),²⁰⁷ што указује на могућност да Au(III) комплекси буду отпуштени након транспорта помоћу протеина до циљане ћелије.²⁰⁷

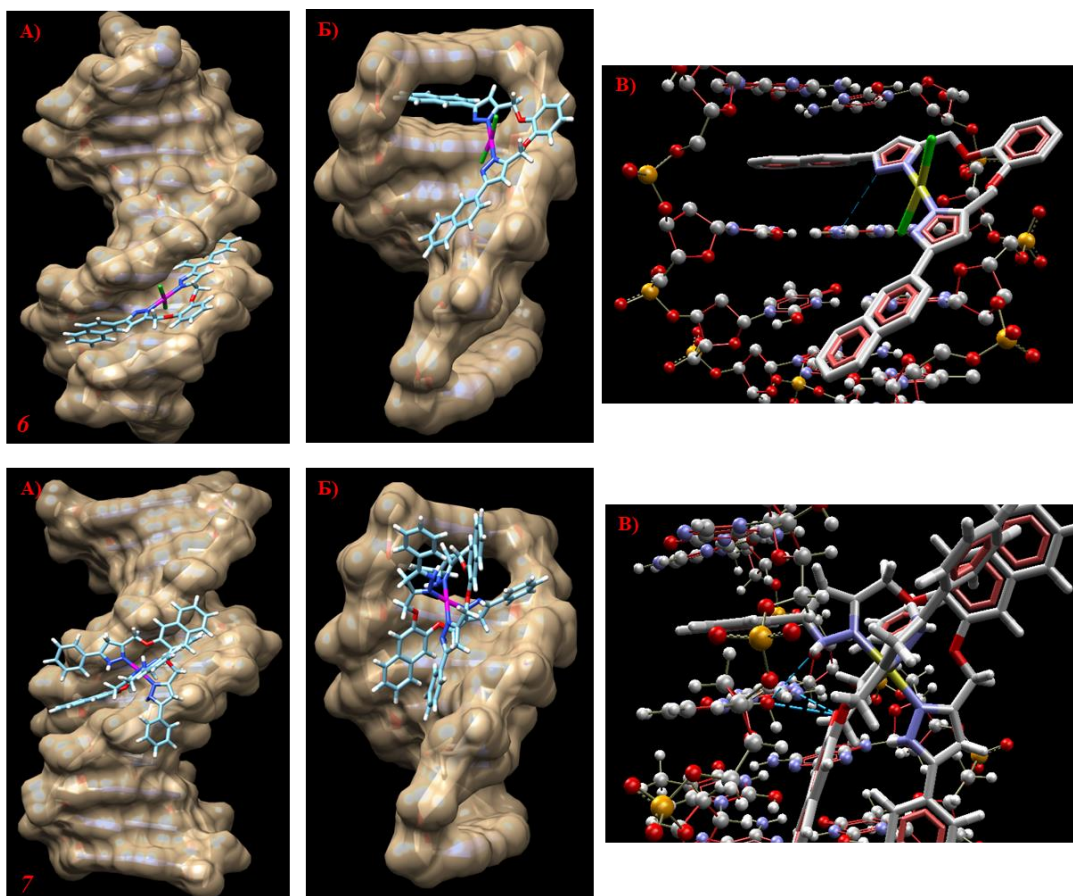
Табела 13. Константе и параметри (K_{sv} , k_q , K и n) за интеракције комплекса **4 – 8** са BSA и HSA¹⁶²

	$K_{sv(BSA)} \times 10^5$ [M ⁻¹]	$k_{q(BSA)} \times 10^{13}$ [M ⁻¹ s ⁻¹]	$K_{(BSA)} \times 10^5$ [M ⁻¹]	$n_{(BSA)}$
4	1,19 ± 0,04	1,19 ± 0,04	4,8 ± 0,2	2,14
5	1,72 ± 0,04	1,72 ± 0,04	1,4 ± 0,2	0,89
6	1,40 ± 0,02	1,40 ± 0,02	2,3 ± 0,3	1,42
7	1,72 ± 0,03	1,72 ± 0,03	3,9 ± 0,4	1,59
8	2,92 ± 0,05	2,92 ± 0,05	2,4 ± 0,1	0,91
	$K_{sv(HSA)} \times 10^5$ [M ⁻¹]	$k_{q(HSA)} \times 10^{13}$ [M ⁻¹ s ⁻¹]	$K_{(HSA)} \times 10^5$ [M ⁻¹]	$n_{(HSA)}$
4	0,74 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,42 ± 0,04	0,63
5	1,56 ± 0,04	1,56 ± 0,04	1,4 ± 0,2	2,29
6	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	2,4 ± 0,3	1,61
7	0,97 ± 0,01	0,97 ± 0,01	1,1 ± 0,1	1,08
8	1,38 ± 0,03	1,38 ± 0,03	1,2 ± 0,3	0,94

3.1.2.4. Молекулски докинг

Молекулска симулација представља користан алат да, у комбинацији са експерименталним подацима, помогне разумевању комплекс-DNA/SA интеракција и идентификује везујућа места.²⁰⁸ MolDock, Docking, Rerank, и Hbond функције бодовања су коришћене за процену афинитета везивања комплекса за DNA/BSA.¹⁷⁸

Комплекси су усидрени у фрагменте DNA који представљају А) каноничну B-DNA (PDB 1BNA) или Б) DNA са интеркалационим размаком (PDB 1Z3F). 1BNA је кристална структура синтетичког DNA додекамера, док је 1Z3F кристална структура 6 bp DNA фрагмента у комплексу са интеркалирајућим антиканцерогеним леком, елиптикином. Најбољи докинг положаји комплекса са DNA су приказани на слици 63,¹⁶² а најбоље рангиране позиције према коришћеним функцијама бодовања су дате у Табели 14.



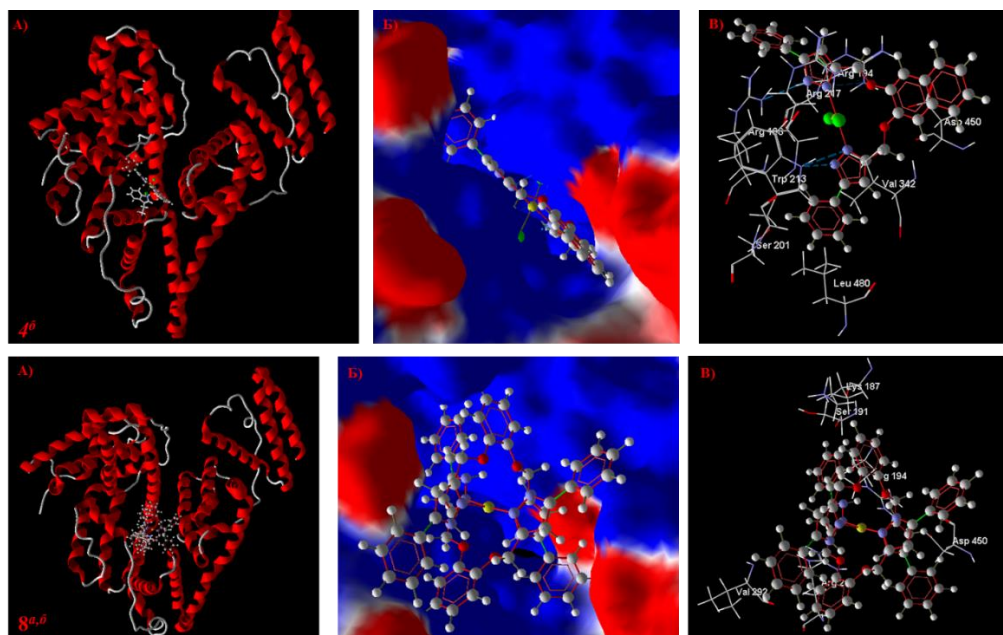
Слика 63. Компјутерски модел интеракције комплекса **6** и **7** са DNA. А) DNA са каноничним размаком; Б) DNA са интеркалационим размаком; В) могућности формирања водоничних веза (плаве испрекидане линије) између комплекса и DNA фрагмената¹⁶²

Табела 14. Вредности DNA докинга испитиваних комплекса **4** – **8**¹⁶²

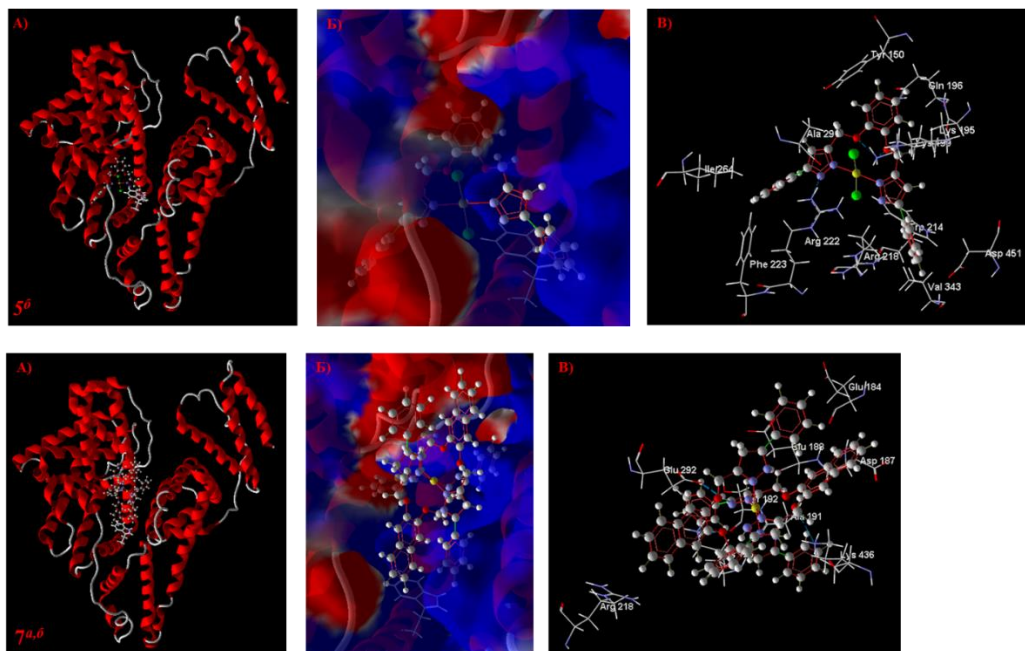
PDB ID DNA		MolDock	Rerank	Docking
1BNA – Канонични размак	4	-236,89	-78,59	-233,41
	5	-213,07	-72,48	-209,78
	6	-170,69	-90,36	-166,79
	7	-248,45	-89,99	-245,29
	8	-172,33	-91,88	-166,89
1Z3F – Интеркалациони размак	4	-265,85	-92,86	-262,83
	5	-178,22	-91,96	-174,51
	6	-147,86	-79,58	-143,51
	7	-215,66	-113,32	-211,45
	8	-155,68	-73,32	-150,33

Докинг резултати се добро слажу са експерименталним подацима. Засновано на докинг резултатима, комплекс **4** има најбољу могућност да буде докован у селектоване DNA фрагменте интеркалацијом, док остали комплекси показују боље резултате за везивање у жлебу.

Резултати добијени за интеракције комплекса и SA приказани су на сликама 64 – 65, док су најбоље рангиране позиције према коришћеним функцијама бодовања приказане у Табели 15.



Слика 64. Најбољи докинг положаји BSA за комплексе **4** и **8** према MolDock, Docking, HBond и Rerank функцијама бодовања; А) резултати молекулског докинга комплекса са BSA; Б) комплекс уграђен унутар активног места BSA у електростатичком погледу; В) места везивања испитиваних комплекса за SA протеине и одабране остатке аминокиселина представљена моделима штапића. Водоничне везе означене су плавим испрекиданим линијама¹⁶²



Слика 65. Најбољи докинг положаји HSA за комплексе 5 и 7 према MolDock, Docking, HBond и Rerank функцијама бодовања; А) резултати молекулског докинга комплекса са HSA; Б) комплекс уграђен унутар активног места HSA протеина у електростатичком погледу; В) места везивања испитиваних комплекса за SA протеине и одабране остатке аминокиселина представљена моделима штапића. Водоничне везе означене су плавим испрекиданим линијама¹⁶²

Табела 15. Вредности докинга испитиваних комплекса 4 – 8 са SA протеинима¹⁶²

PDB ID CA		MolDock	Rerank	HBond	Docking
4F5S – BSA	4 ^a	-233,58	-138,97	-0,75	-160,91
	4 ^b	-251,62	-61,77	-6,97	-132,83
	5 ^a	-136,53	-94,42	-1,16	-146,06
	5 ^b	-125,93	-67,61	-2,06	-126,21
	6 ^{a,b}	-169,59	-122,86	-1,76	-176,85
	7 ^a	-223,73	-102,41	0	-220,83
	7 ^b	-214,24	-98,75	-4,77	-188,62
	8 ^{a,b}	-214,66	-114,58	-3,17	-193,21
1A06 – HSA	4 ^a	-140,95	-103,81	-0,86	-139,91
	4 ^b	-131,36	-119,64	-1,91	-131,07
	5 ^a	-229,42	-95,65	-2,59	-177,08
	5 ^b	-242,57	-71,85	-4,23	-124,17
	6 ^a	-251,13	-69,29	-1,27	-154,71
	6 ^b	-272,59	-46,53	-5,45	-148,21
	7 ^{a,b}	-171,37	-124,52	-2,24	-134,02
	8 ^{a,b}	-212,55	-116,22	-3,33	-140,51

Добијени резултати показују да се комплекси могу везати за џепове на страни I серум албумина са сличним афинитетом за оба протеина. Такође, многобројне водоничне везе између комплекса и одговарајућих остатака аминокиселина су присутне.¹⁶² Ове водоничне везе доводе до додатне стабилизације система SA-комплекс и представљају један од главних фактора за успешан транспорт једињења кроз организам. Генерално, резултати молекулског докинга добро се слажу са резултатима добијеним експерименталним методама.

3.1.3. Резултати испитивања мононуклеарних Au(III) комплекса са дериватима 1,10-фенантролина као инертним лигандима

У овом делу су приказани резултати испитивања мононуклеарних Au(III) комплекса који у својој структури као инертан бидентатни лиганд садрже деривате 1,10-фенантролина, као што су 4,7-дифенил-1,10-фенантролин (dpphen) или 2,9-диметил-1,10-фенантролин (dmphen). Важно је напоменути да у зависности од врсте инертног лиганда ови комплекси поседују различиту геометријску структуру и различит координациони број. Наиме, комплекс са 2,9-диметил-1,10-фенантролином је пентакоординанан (**10**), док је комплекс са 4,7-дифенил-1,10-фенантролином квадратно-планарне геометрије (**9**). Комплекси су синтетисани помоћу процедуре која је представљена на схеми 12, а њихове структуре окарактерисане су мерењем моларне проводљивости и различитим аналитичким методама (IR, UV-Vis, ESI-MS). Вредности моларне проводљивости су потврдиле јонску 1:1 природу комплекса **9**, као и чињеницу да је комплекс **10** неутралан. Такође, у ESI-MS спектрима комплекса потврђено је присуство одговарајућих молекул-јона, док IR и UV-Vis спектри једињења садрже карактеристичне сигнале (Табела 3). На основу добијених резултата анализе,¹⁶³ као и на основу претходно публикованих радова,^{149,164-166} потврђене су структуре комплекса.

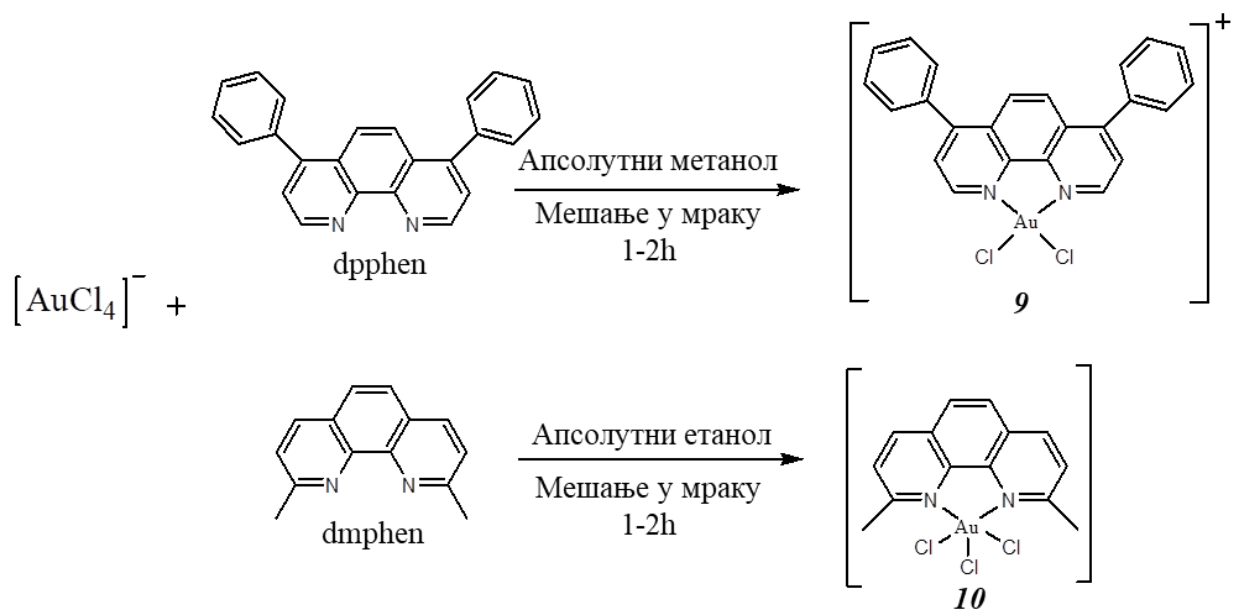
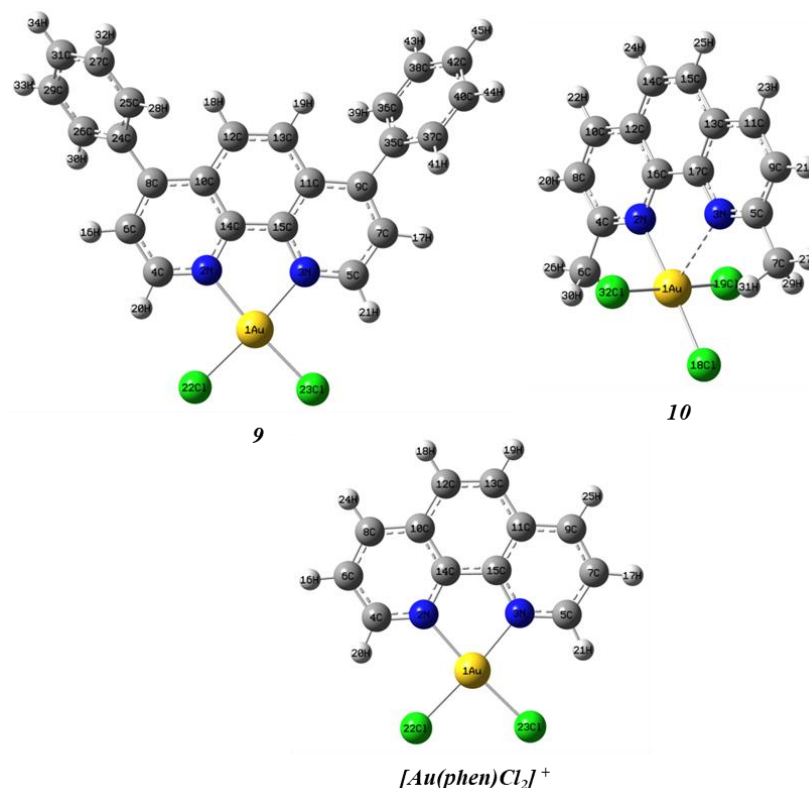


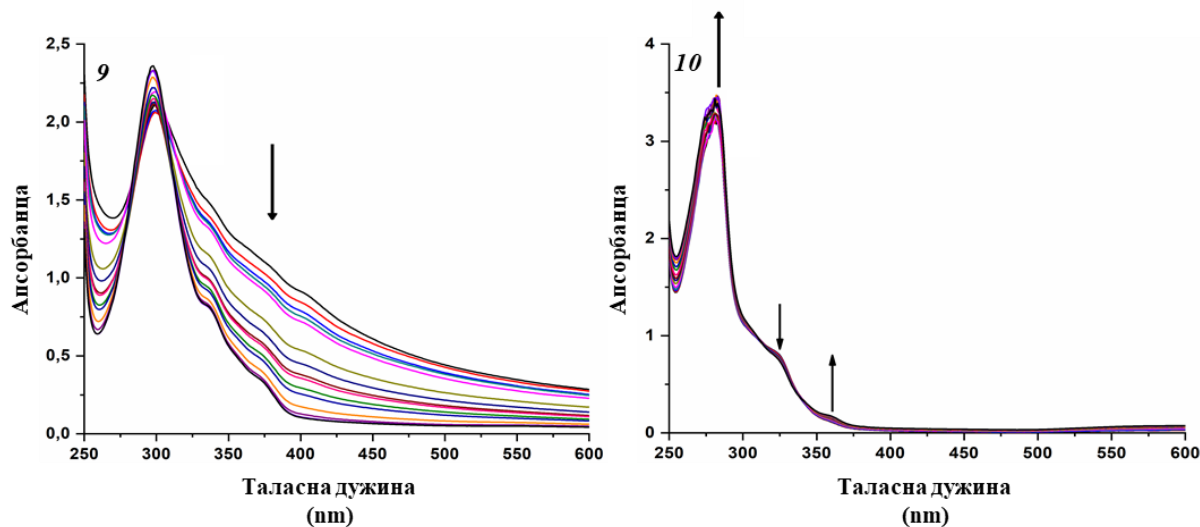
Схема 12. Реакције синтезе Au(III) комплекса **9** и **10**¹⁶³

Геометријски оптимизоване структуре комплекса **9** и **10** су приказане на слици 66. Прорачуни су урађени на ω B97XD/def2-TZVP теоријском нивоу и изведени у циљу анализе таласне функције добијених структура, фокусирањем на Au-N интеракције у комплексу **10**. Због поређења, геометрије комплекса $[Au(phen)Cl_2]^+$ (види слику 66) и 1,10-фенантролина (phen) оптимизоване су на истом теоријском нивоу. Израчунате дужине веза су у складу са већ објављеним резултатима кристалографске анализе.²⁰⁹



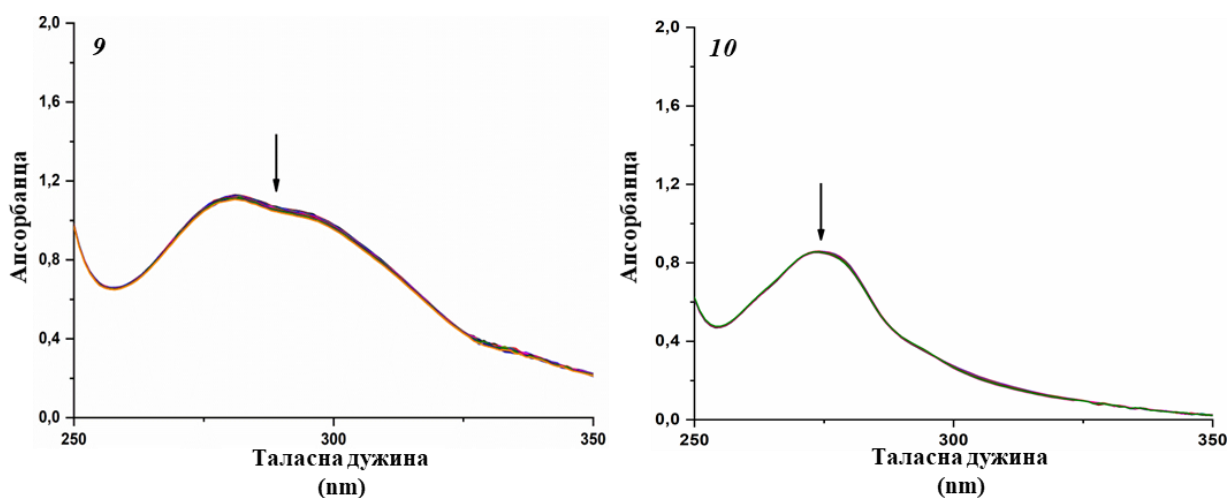
Слика 66. Израчунате (ω B97XD/def2-TZVP) структуре испитиваних Au(III) комплекса¹⁶³

Стабилност комплекса **9** и **10** у воденом раствору анализирана је UV-Vis спектрофотометријски. Комплекси су прво растворени у пар капи *N,N*-диметилформамида, а потом разблажени водом до коначне концентрације од 1×10^{-4} М. Разблажени раствори анализирани су у периоду од 6 h на 298 K. У спектрима се појављују интензивни апсорпциони максимуми у опсегу од 250 – 350 nm који се могу приписати N→Au(III) трансферу електрона (LMCT).^{41,164} Примећено је опадање интензитета сигнала за комплекс **9** и благо повећање интензитета сигнала за комплекс **10**, што је последица хидролизе Au(III)–Cl везе (слика 67) и/или формирања олигомерних врста.²¹⁰ Поред тога, значајна разлика у временски-зависним спектрима ова два комплекса указује на то да је комплекс **10** стабилнији у датим условима.



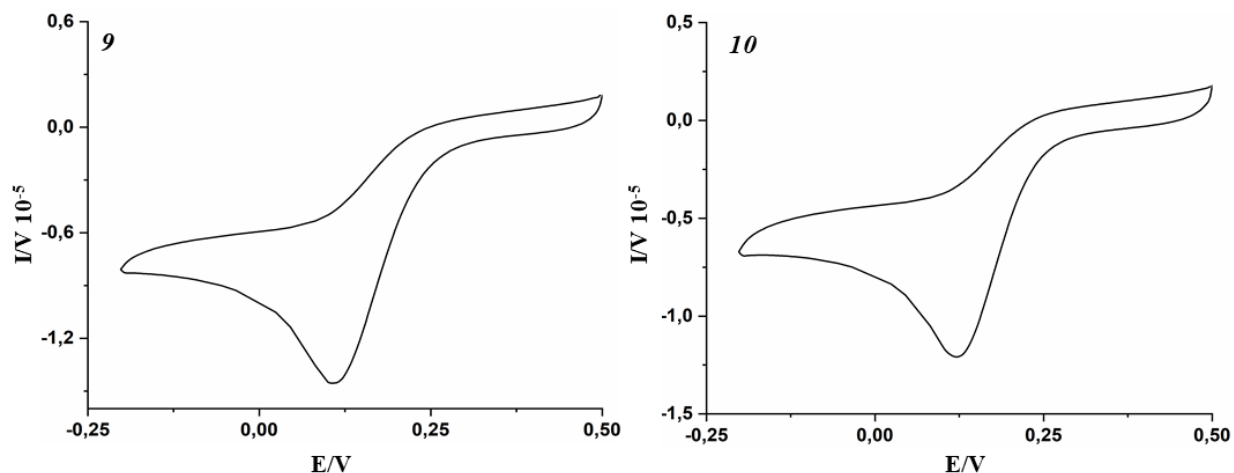
Слика 67. UV-Vis спектри комплекса **9** и **10** у води у периоду од 6 h.
 $[\text{Au(III)}] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}^{163}$

Стабилност комплекса **9** и **10** у пуферу (pH = 7,2) такође је испитивана помоћу UV-Vis спектрофотометрије. Комплекси су прво растворени у пар капи *N,N*-диметилформамида, а потом разблажени пуфером (25mM Hepes, 30mM NaCl, pH = 7,2) до коначне концентрације од $5 \times 10^{-5} \text{ M}$. Разблажени раствори су анализирани у периоду од 6 h на 298 K. У овим спектрима уочавају се интензивни максимуми у апсорпцији у опсегу од 250 – 350 nm (слика 68).^{41,164} Међутим, облик спектра је прилично различит, што може бити последица различите геометријске структуре комплекса.¹⁷⁰ Анализом временски-зависних спектра може се приметити мала промена у интензитету апсорпционих максимума, што доказује да су ови комплекси прилично стабилни у раствору пуфера.



Слика 68. UV-Vis спектри комплекса **9** и **10** у Hepes пуферу (pH = 7,2) у периоду од 6 h.
 $[\text{Au(III)}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}^{163}$

Редокс стабилност комплекса **9** и **10** испитивана је цикличном волтаметријом. Оба волтамограма, слика 69, добијена су под истим експерименталним условима. Волтамограми су снимани брзином од $0,1 \text{ V s}^{-1}$ на собној температури, док је потенцијал електроде био у опсегу $+0,5 \text{ V}$, $-0,2 \text{ V}$ и $+0,5 \text{ V}$. Као помоћни електролит коришћен је $0,1 \text{ M Et}_4\text{NBr}$ у метилен хлориду. Катодни пик присутан је код оба комплекса, на $0,107 \text{ V}$ и $0,121 \text{ V}$, указујући на једноелектронски редокс процес,²¹¹ а одсуство анодног пика може бити доказ за неповратан редукциони процес.



Слика 69. Циклични волтамограми комплекса **9** и **10**. Брзина снимања $0,1 \text{ V s}^{-1}$, стаклена угљенична електрода (GC) коришћена као радна. $[\text{Au(III)}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ¹⁶³

3.1.3.1. Испитивање реакција супституције комплекса **9** и **10**

За испитивања реакција супституције комплекса **9** и **10** са нуклеофилима, као што су Tu, 5'-GMP, GSH и L-Met, такође је коришћена „stopped-flow” метода. Сва поменута испитивања изведена су под условима реакција *pseudo*-првог реда. Реакције су изучаване уз додатак 30 mM NaCl , како би се сузбио солволитички пут супституције.

На основу добијених резултата¹⁶³ утврђено је да се процес супституције комплекса **9** и **10** са Tu одиграва на начин као што је приказано на схеми 13, преко два узастопна реверзибилна процеса.

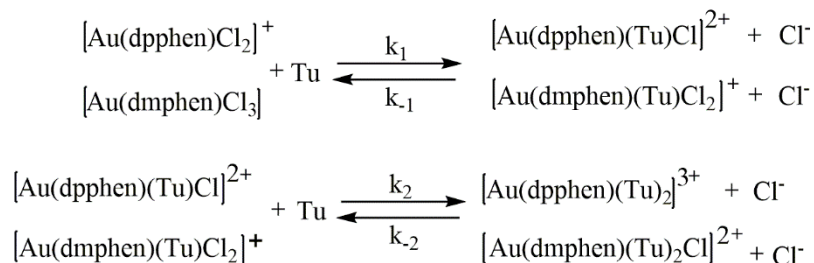
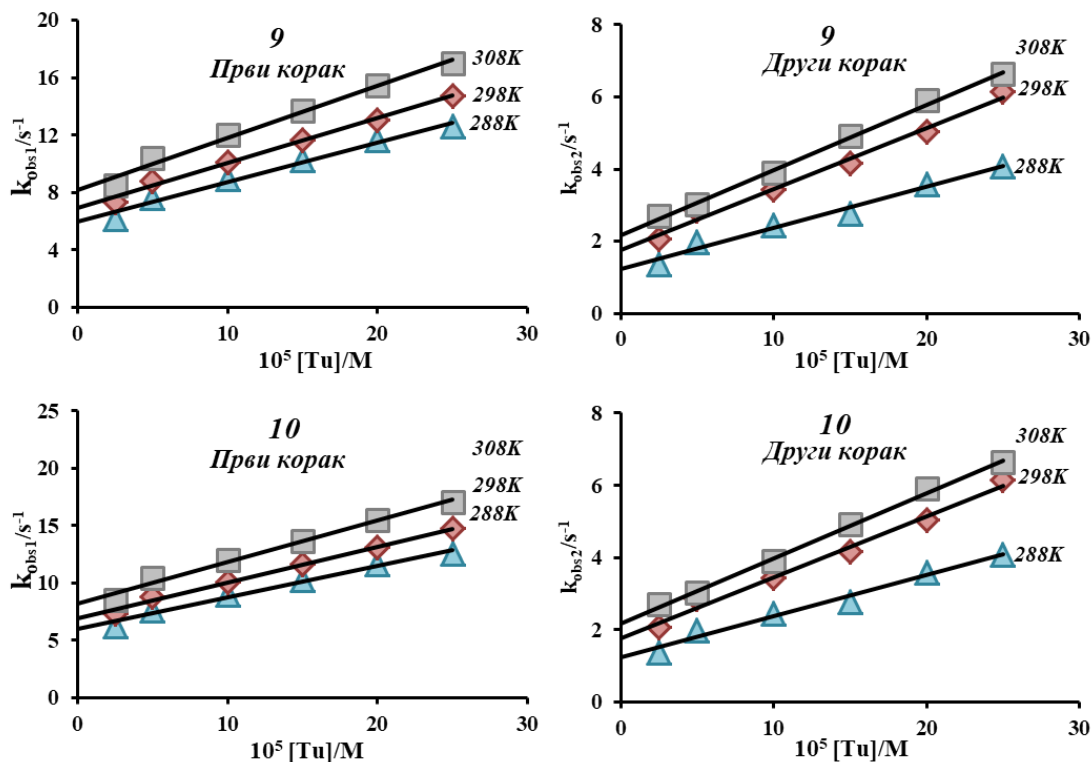


Схема 13. Реакције супституције комплекса **9** и **10** са тиюреом¹⁶³

Зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда за први (k_{obs1}) и за други (k_{obs2}) корак супституције од концентрације Tu описана је једначинама 12 и 13, а графички је приказана на слици 70.¹⁶³

$$k_{\text{obs1}} = k_1[\text{Tu}] + k_{-1}[\text{Cl}] \quad (12)$$

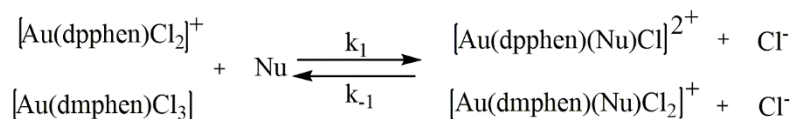
$$k_{\text{obs2}} = k_2[\text{Tu}] + k_{-2}[\text{Cl}] \quad (13)$$



Слика 70. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs1} и k_{obs2} , у функцији од концентрације Tu и температуре за супституционе реакције комплекса **9** и **10** на pH = 7,2 (25 mM HEPES пуфер) уз додатак 30 mM NaCl¹⁶³

Константе брзине директних реакција (k_1 и k_2) израчунате су из нагиба добијених права, а из одсечка су израчунате вредности за константе повратних реакција, k_{-1} и k_{-2} . Све вредности статистички су кориговане и приказане у Табели 16.

Анализом података добијених током испитивања реакција супституције комплекса **9** и **10** са L-Met, GSH и 5'-GMP утврђено је да се процес супституције дешава на начин као што је приказано на схеми 14.



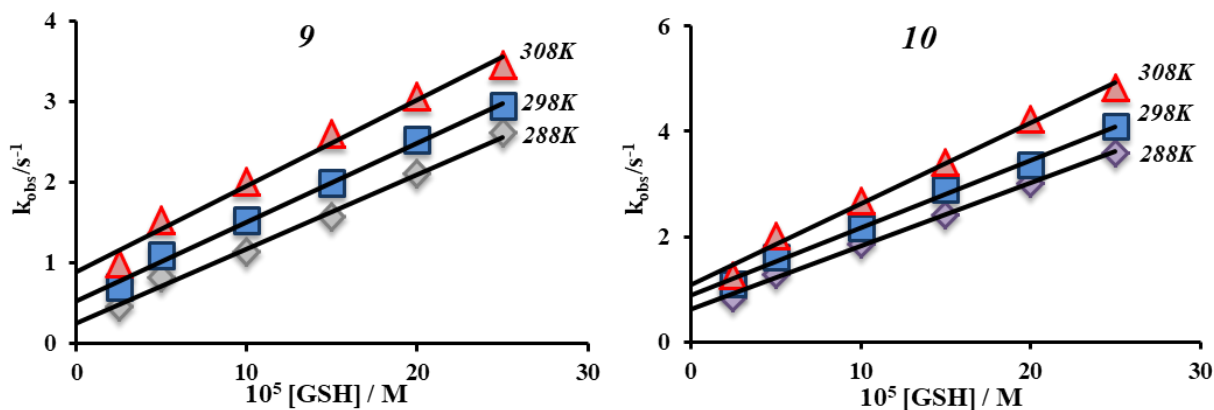
Nu = L-Met, GSH, 5'-GMP

Схема 14. Реакције супституције комплекса **9** и **10** са L-Met, GSH и 5'-GMP¹⁶³

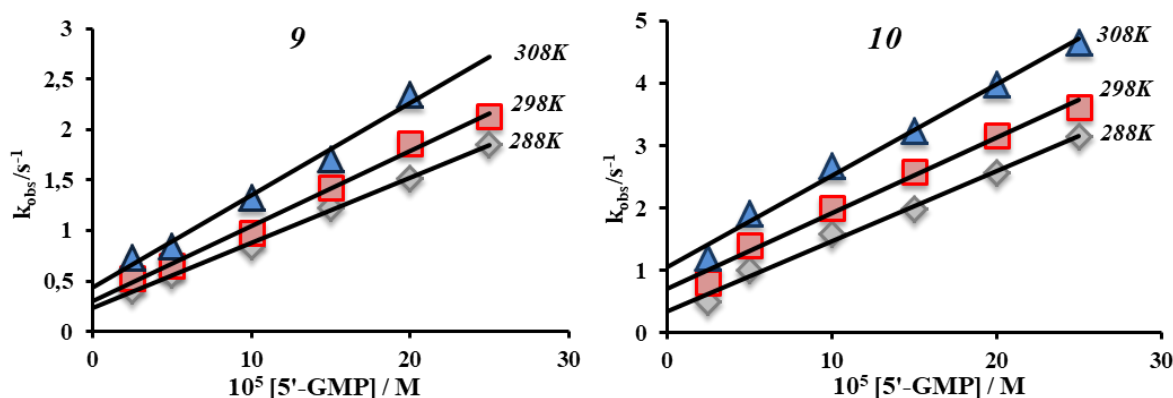
Зависност константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , од укупне концентрације нуклеофила описана је једначином 14 и графички је приказана на сликама 71 – 73:

$$k_{\text{obs}} = k_1[\text{Nu}] + k_{-1}[\text{Cl}] \quad (14)$$

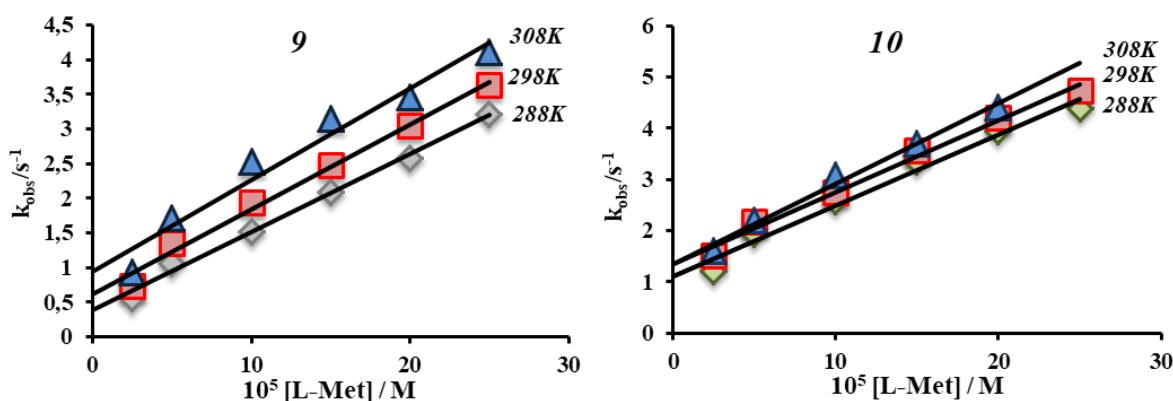
Константе брзине k_1 су одређене из нагиба, док су константе брзине k_{-1} одређене из одсечка добијених линеарних зависности. Све вредности су сумиране у Табели 16.



Слика 71. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , у функцији од концентрације нуклеофила и температуре за супституционе реакције комплекса **9** и **10** са GSH на pH = 7,2 (25 mM Нерес пуфер) уз додатак 30 mM NaCl¹⁶³



Слика 72. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , у функцији од концентрације нуклеофила и температуре за супституционе реакције комплекса **9** и **10** са 5'-GMP на pH = 7,2 (25 mM Hepes пуфер) уз додатак 30 mM NaCl¹⁶³



Слика 73. Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , у функцији од концентрације нуклеофила и температуре за супституционе реакције комплекса **9** и **10** са L-Met на pH = 7,2 (25 mM Hepes пуфер) уз додатак 30 mM NaCl¹⁶³

На основу података приказаних у Табели 16 може се закључити да су сви коришћени нуклеофили добри улазни лиганди за процес супституције испитиваних комплекса. Реактивност нуклеофила опада у низу $Tu > L-Met > GSH > 5'-GMP$, односно примећена је већа реактивност сумпор-донорских нуклеофила у односу на азот-донорске. Тиоуреа показује највећу реактивност, јер поседује својства тиолата (π -донори) и тиоестера (σ -донори и π -акцептори).^{210,212} Поред тога, тиоуреа је најмање стерно заштићени молекул. Јача нуклеофилност L-Met у поређењу са GSH може се објаснити присуством позитивног индуктивног ефекта метил-групе, који повећава нуклеофилност атома сумпора, док је супституција молекулом 5'-GMP повезана са нуклеофилним нападом N7-донорског атома пуринске базе.²¹³ Узимајући у обзир да неки од коришћених нуклеофила поседују редукционе карактеристике, у току ових испитивања редукција комплекса није примећена.

Комплекс **9** је у свим изучаваним системима показао већу реактивност. Овај резултат може се објаснити различитим координационим бројем и геометријом полазних комплекса. Поред тога, две волуминозне метил-групе у структури комплекса **10** додатно отежавају прилаз нуклеофила и формирање прелазног стања.

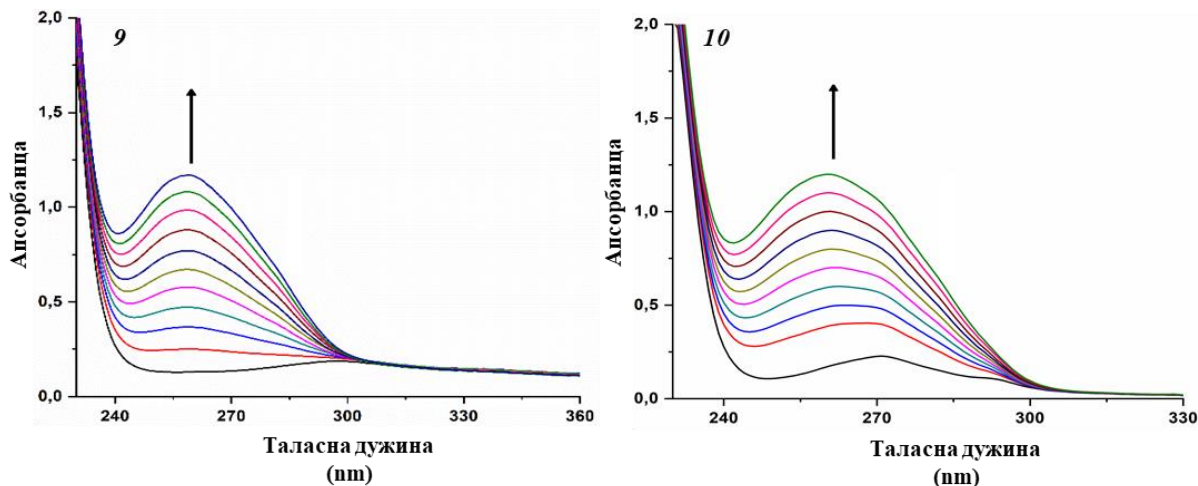
Активациони параметри $\Delta H^\ddagger$ и $\Delta S^\ddagger$ су израчунати коришћењем Еyring-ове једначине (5). Мале вредности за $\Delta H^\ddagger$ и негативне вредности за $\Delta S^\ddagger$ потврђују асоцијативни механизам супституције.

Табела 16. Константе брзине и активациони параметри за супституционе реакције комплекса **9** и **10** са нуклеофилима у 25 mM Hepes пуферу и 30 mM NaCl (pH = 7,2)¹⁶³

		λ [nm]	T [K]	$10^4 \times k_1$ [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{-1} [s ⁻¹]	$\Delta H_1^\ddagger$ [kJ mol ⁻¹]	$\Delta S_1^\ddagger$ [J K ⁻¹ mol ⁻¹]
9	<i>Tu</i>	276	288	$1,4 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,4$	-159 ± 2
			298	$1,6 \pm 0,1$	$6,9 \pm 0,2$		
			308	$1,8 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,3$		
10	<i>Tu</i>	272	288	$0,99 \pm 0,04$	$4,88 \pm 0,06$	$6,8 \pm 0,2$	-159 ± 4
			298	$1,17 \pm 0,06$	$5,9 \pm 0,2$		
			308	$1,3 \pm 0,1$	$7,1 \pm 0,2$		
		λ [nm]	T [K]	$10^4 \times k_2$ [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{-2} [s ⁻¹]	$\Delta H_2^\ddagger$ [kJ mol ⁻¹]	$\Delta S_2^\ddagger$ [J K ⁻¹ mol ⁻¹]
9	<i>Tu</i>	276	288	$1,10 \pm 0,08$	$0,6 \pm 0,1$	$10,9 \pm 0,4$	-144 ± 1
			298	$1,49 \pm 0,09$	$0,9 \pm 0,1$		
			308	$1,63 \pm 0,04$	$1,1 \pm 0,1$		
10	<i>Tu</i>	272	288	$0,65 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,06$	$12,4 \pm 0,6$	-143 ± 2
			298	$0,93 \pm 0,09$	$0,16 \pm 0,1$		
			308	$1,01 \pm 0,09$	$0,20 \pm 0,1$		
		λ [nm]	T [K]	$10^4 \times k_1$ [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{-1} [s ⁻¹]	$\Delta H_1^\ddagger$ [kJ mol ⁻¹]	$\Delta S_1^\ddagger$ [J K ⁻¹ mol ⁻¹]
9	<i>5'-GMP</i>	255	288	$0,32 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,02$	$10,0 \pm 0,7$	-158 ± 2
			298	$0,38 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,05$		
			308	$0,46 \pm 0,06$	$0,43 \pm 0,08$		
10	<i>5'-GMP</i>	255	288	$0,20 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,08$	$10,2 \pm 0,2$	-161 ± 1
			298	$0,24 \pm 0,07$	$0,2 \pm 0,1$		
			308	$0,29 \pm 0,08$	$0,3 \pm 0,1$		
9	<i>GSH</i>	280	288	$0,46 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,06$	$6,8 \pm 0,2$	-166 ± 4
			298	$0,49 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,05$		
			308	$0,6 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,1$		
10	<i>GSH</i>	294	288	$0,40 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,05$	$6,0 \pm 0,2$	-170 ± 4
			298	$0,43 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,07$		
			308	$0,51 \pm 0,08$	$0,68 \pm 0,1$		
9	<i>L-Met</i>	295	288	$0,57 \pm 0,04$	$0,38 \pm 0,07$	$4,7 \pm 0,6$	-172 ± 2
			298	$0,62 \pm 0,06$	$0,6 \pm 0,1$		
			308	$0,7 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$		
10	<i>L-Met</i>	294	288	$0,46 \pm 0,07$	$1,1 \pm 0,1$	$12,1 \pm 0,4$	-148 ± 2
			298	$0,5 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$		
			308	$0,7 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$		

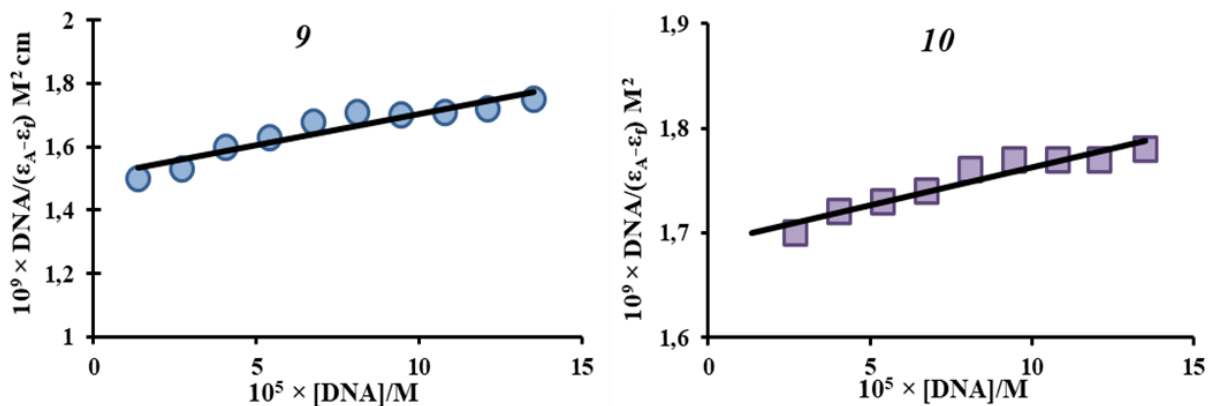
3.1.3.2. Испитивање интеракција комплекса **9** и **10** са DNA

Апсорпциона титрација раствора комплекса **9** и **10** у пуферу (25 mM Hepes, 30 mM NaCl) изведена је коришћењем раствора константне концентрације комплекса ($[Au(III)] = 13,5 \mu M$) и раствора растуће концентрације DNA ($[DNA] = (1,34 - 12,6) \times 10^{-5} M$). Промене настале у UV-Vis спектрима комплекса **9** и **10** у области од 200 - 400 nm након додатка раствора DNA приказане су на слици 74. Повећање концентрације DNA узрокује хиперхромизам главног апсорпционог пика и плаво померање (298 nm $\rightarrow$ 259 nm за комплекс **9**, 272 nm $\rightarrow$ 260 nm за комплекс **10**, слика 74).^{214,215}



Слика 74. Апсорпциони спектри комплекса **9** и **10** у пуферу (25 mM Hepes, 30 mM NaCl) након додатка DNA, $[Au(III)] = 1,35 \times 10^{-5} M$, $[DNA] = (1,34 - 12,6) \times 10^{-5} M$. Стрелице показују промену апсорбанце након додатка растуће концентрације DNA¹⁶³

Константе везивања комплекса за DNA, K_b , израчунате су помоћу једначине 7 (слика 75), дате су у Табели 17. На основу добијених резултата може се закључити да ови комплекси поседују добру моћ везивања за DNA.¹⁶³

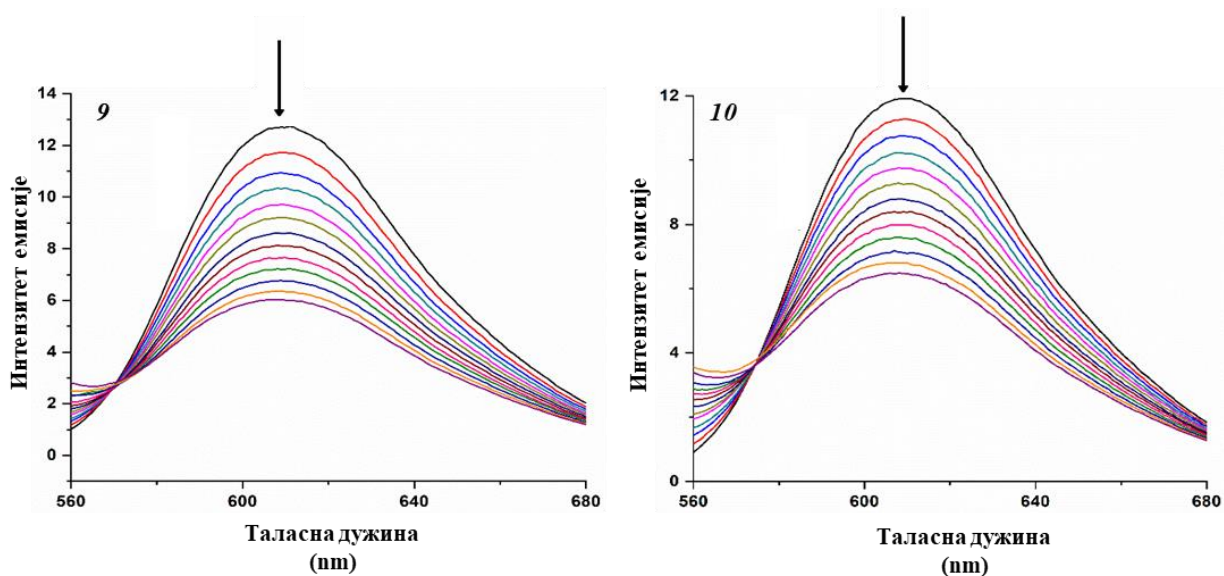


Слика 75. $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ у функцији од $[DNA]$ за комплексе **9** и **10**¹⁶³

Табела 17. Константе везивања (K_b) и Stern–Volmer–ове константе (K_{sv}) за комплексе **9** и **10**¹⁶³

	$K_b \times 10^3$ [M ⁻¹]	$K_{sv} \times 10^4$ [M ⁻¹]
9	$1,29 \pm 0,02$	$4,29 \pm 0,04$
10	$0,421 \pm 0,009$	$3,19 \pm 0,03$

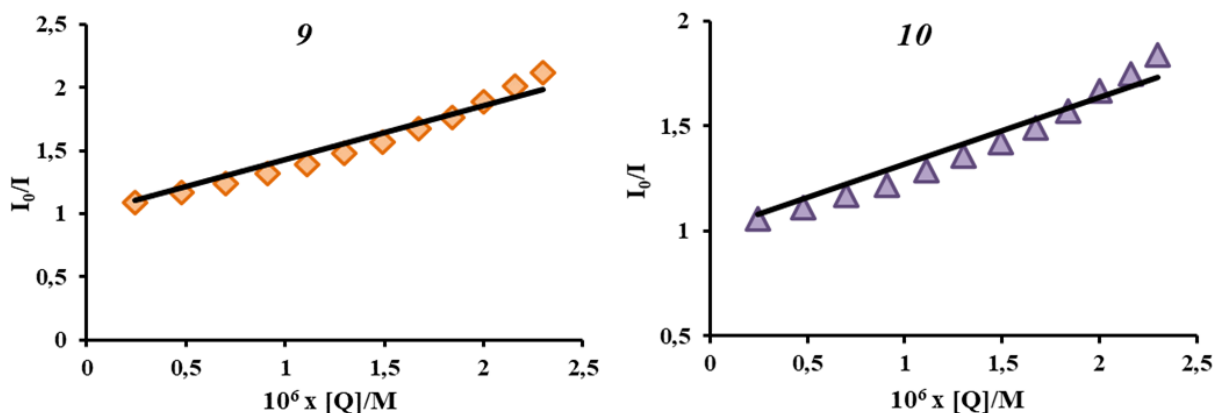
Интеракције комплекса са EB-DNA испитиване су на начин као што је описано у општем делу. Флуоресцентни титрациони спектри раствора комплекса **9** и **10** са DNA приказани су на слици 76.



Слика 76. Емисиони спектри ($\lambda_{ex} = 527$ nm) EB–DNA система ($[EB] = 5 \times 10^{-6}$ M, $[DNA] = 5 \times 10^{-6}$ M) у одсуству и присуству комплекса **9** и **10** ($[Au(III)] = 1 \times 10^{-4}$ M, 62,5 μ L по снимању). Стрелице показују промену интензитета емисије након додатка растуће концентрације комплекса¹⁶³

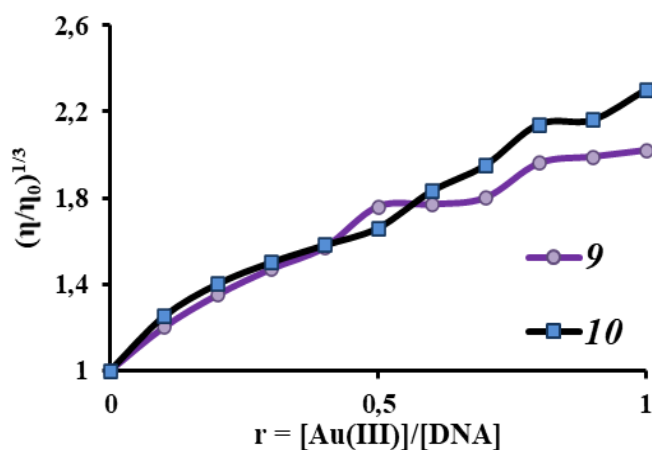
Добијени резултати су показали да интензитет сигнала на 611 nm за комплекс **9** и сигнала на 609 nm за комплекс **10** опада са повећањем концентрације комплекса, што сугерише на чињеницу да комплекси **9** и **10** могу да замене EB у EB–DNA систему и интерагују са DNA.^{172,188,215}

Stern-Volmer-ови дијаграми за EB–DNA (слика 77) потврђују опадање флуоресцентне емисије. Stern-Volmer-ове константе (K_{sv}) израчунате из нагиба дијаграма I_0/I у функцији од $[Q]$ (једначина 8 и слика 77), дате су у Табели 17. Оба Au(III) комплекса показују високе вредности константи, указујући на њихову способност да замене EB и вежу се за DNA.



Слика 77. Stern–Volmer–ов дијаграм за интеракције комплекса **9** и **10** са EB–DNA¹⁶³

У циљу детаљније потврде начина везивања поменутих комплекса за DNA испитивана је и вискозност. Промена вискозитета раствора DNA након додатка комплекса детаљно је описана у општем делу. Додатак растуће концентрације (до $r = 1,0$) комплекса **9** и **10** ($[Au(III)] = 0 - 11 \mu M$) у раствор DNA ($11 \mu M$) доводи до повећања релативне вискозности раствора DNA (слика 78), указујући на интеркалацију, које је израженије у случају комплекса **10**. Ови резултати указују на интеркалацију између комплекса и DNA.^{188,216,217}



Слика 78. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ DNA ($[DNA] = 11 \mu M$) у раствору пуфера (25 mM Нерес, 30 mM NaCl) у присуству растуће концентрације комплекса **9** и **10** (r)¹⁶³

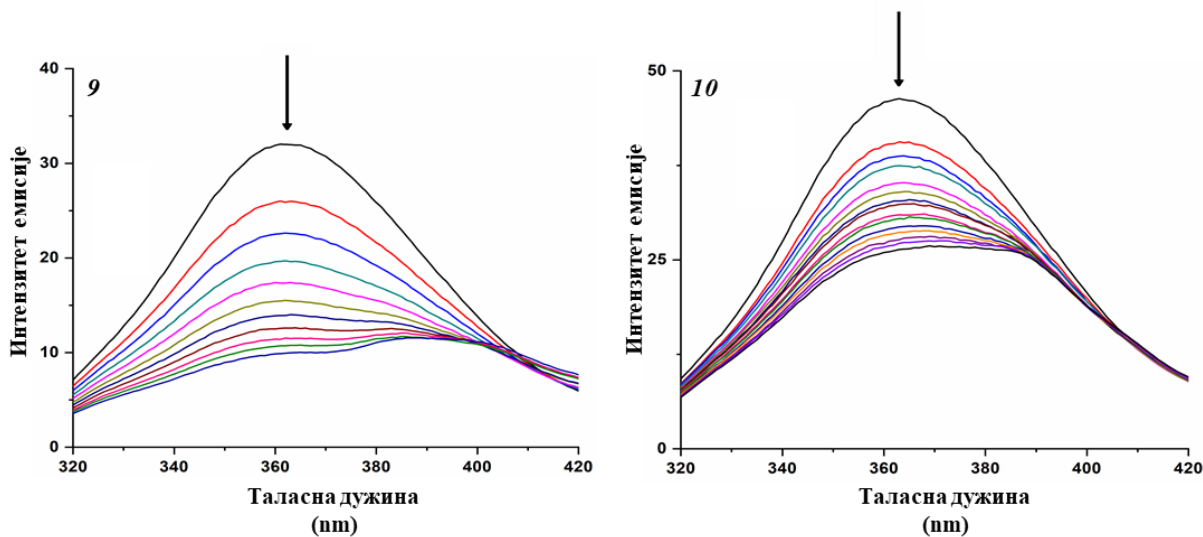
3.1.3.3. Испитивање интеракција са BSA

Испитивање интеракција комплекса **9** и **10** са BSA извршено је на начин као што је описано у општем делу, коришћењем флуоресцентне спектроскопске титрације. Добијени спектри су приказани на слици 79. У спектрима је примећено померање сигнала ка већим таласним дужинама и то за 30 nm код комплекса **9**, а за 11 nm код комплекса **10** (слика 79). Црвено померање указује на формирање Au(III)–BSA продукта, јер долази до промене поларности микрооколине у близини триптофана.

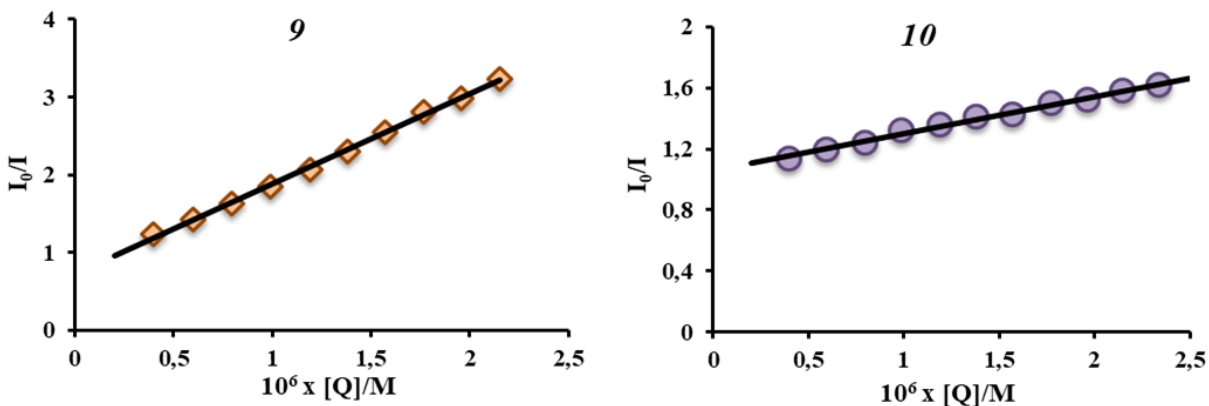
Вредности Stern-Volmer-ове константе (K_{sv}) и константе везивања (k_q) за интеракције комплекса **9** и **10** са BSA израчунате су применом Stern–Volmer-ове једначине (једначина 10, слика 80) и приказане у Табели 18. Вредности везивне константе (K) и број везујућих места по албумину (n) израчунате су коришћењем Scatchard-ове једначине (једначина 11, слика 81). Добијени резултати (Табела 18) указују на добру могућност везивања комплекса.⁹⁵

Табела 18. Константе и параметри (K_{sv} , k_q , K и n) за интеракције комплекса **9** и **10** са BSA¹⁶³

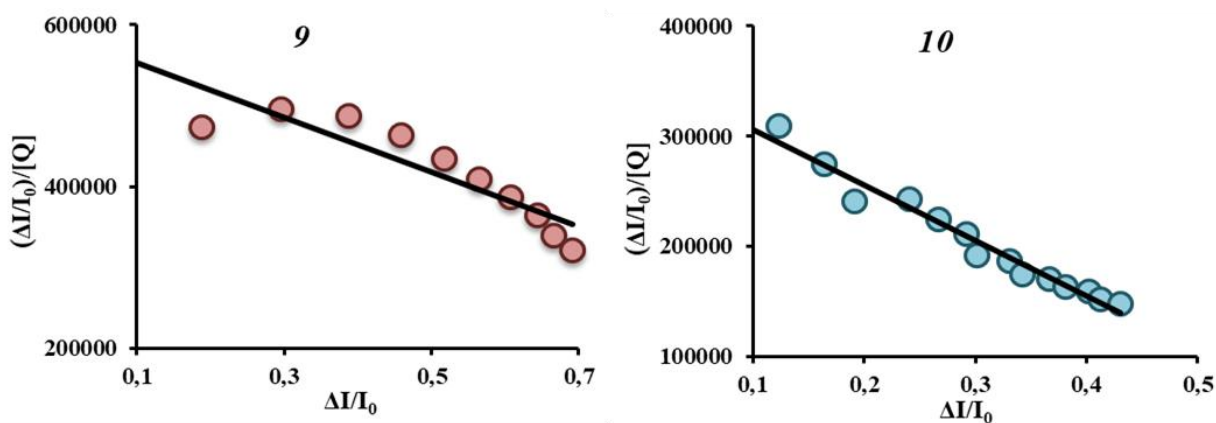
	$K_{sv} \times 10^6$ [M ⁻¹]	$k_q \times 10^{14}$ [M ⁻¹ s ⁻¹]	$K \times 10^5$ [M ⁻¹]	n
9	$1,11 \pm 0,02$	$1,11 \pm 0,02$	$3,4 \pm 0,5$	0,57
10	$0,243 \pm 0,001$	$0,243 \pm 0,001$	$5,0 \pm 0,3$	1,41



Слика 79. Емисиони спектри BSA у присуству комплекса **9** и **10**. [BSA] = 2 μ M, [Au(III)] = 0,40 – 2,91 μ M; λ_{ex} = 295 nm. Стрелице показују промену интензитета емисије након додатка растуће концентрације комплекса¹⁶³



Слика 80. I_0/I у у функцији од $[Q]$ за интеракције комплекса **9** и **10** са BSA¹⁶³



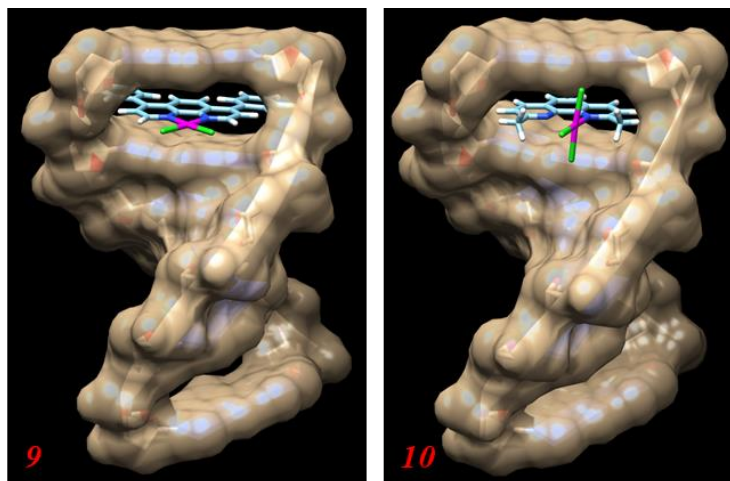
Слика 81. Scatchard-ови дијаграми за комплексе **9** и **10**¹⁶³

Израчунате k_q вредности за комплексе **9** и **10** су веће у поређењу са раније познатим вредностима за биополимерну флуоресценцију ($10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), указујући на присуство статичког механизма.²¹⁸ Такође, интеракције неких Au(III) комплекса са серум албумином могу да укључе и редукцију комплекса. Међутим, наши резултати показују да се комплекси **9** и **10** не редукују у испитиваним системима.

3.1.3.4. Молекулски докинг

У случају DNA докинга испитиване су и упоређене две могуће врсте интеракција: интеркалација и потенцијал комплекса да се веже за мањи жлеб, тзв. „*minor groove*”. Коришћене функције бодовања су идентичне као у делу 3.1.2.4.^{177,178}

Најбољи докинг положаји комплекса **9** и **10** са DNA су приказани на слици 82,¹⁶³ а најбоље рангиране позиције према коришћеним функцијама бодовања дате су у Табели 19.



Слика 82. Компјутерски модел докинг илустрације интеракције испитиваних комплекса и DNA са интеркалационим размаком¹⁶³

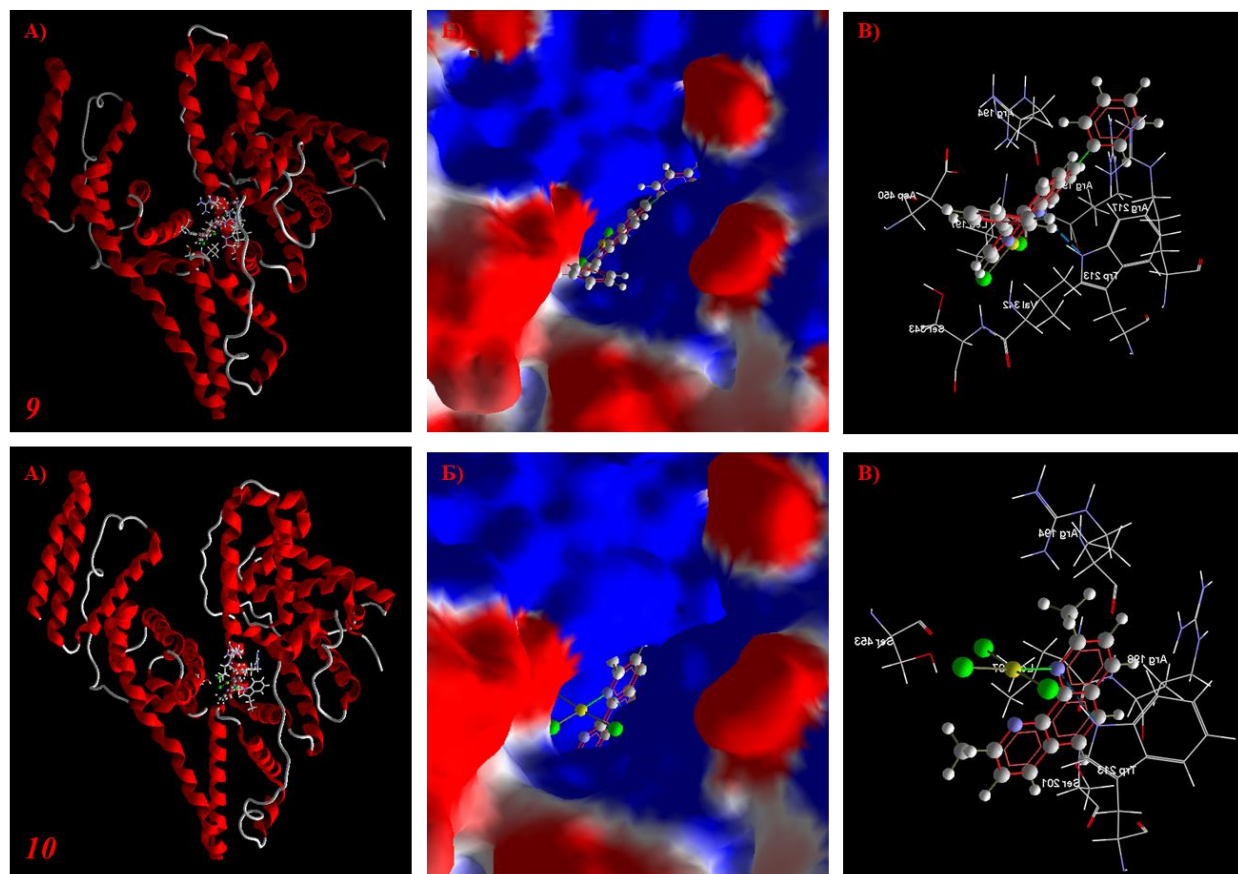
Табела 19. Вредности DNA докинга испитиваних комплекса **9** и **10**¹⁶³

PDB ID DNA		MolDock	Rerank	Docking
1BNA – Канонични размак	9	-188,341	-101,457	-184,853
	10	-124,483	-64,535	-121,225
1Z3F – Интеркалациони размак	9	-154,715	-79,849	-151,298
	10	-117,608	-60,287	-115,231

Добијене вредности показују да комплекс **9** има већи потенцијал за интеракцију са DNA, што се може приписати присуству две додатне фенил групе на инертном 1,10-фенантролинском лиганду и њиховој способности за боље слагање са основним паровима DNA фрагмента. Супротно, јединствена структура комплекса **10** отежала је процес симулације докинга са DNA фрагментима.

Докинг испитиваних комплекса са 1BNA-DNA фрагментом је урађен ради упоређивања различитих типова интеракција са DNA заснованих на MolDock функцији бодовања. Вредности показују да комплекси интерагују са DNA преко интеркалације, што је у сагласности са експерименталним резултатима добијеним флуориметријском методом.

Докинг резултати из MVD програма показују да комплекси **9** и **10** интерагују са BSA. Резултати интеракције приказани су на слици 83, а најбоље ранжирани положаји према коришћеним функцијама бодовања дати су у Табели 20.



Слика 83. Најбољи докинг положаји BSA за комплексе **9** и **10** према MolDock, Docking, HBond и Rerank функцијама бодовања; А) резултати молекулског докинга комплекса са BSA; Б) комплекс уграђен унутар активног места BSA у електростатичком погледу; В) места везивања испитиваних комплекса за BSA и одабране остатке аминокиселина представљена моделима штапића. Водоничне везе означене су плавим испрекиданим линијама¹⁶³

Табела 20. Докинг вредности за интеракције комплекса **9** и **10** са BSA¹⁶³

		MolDock	Rerank	HBond	Docking
BSA	9	-109,098	-66,117	-2,349	-105,949
(PDB ID: 4F5S)	10	-81,501	-38,969	-1,557	-80,182

Добијени резултати потврђују да испитивани комплекси интерагују са везивним лежиштем које се налази у домену I протеина BSA. Према MolDock функцији бодовања, комплекс **9** се јаче везује, што је такође у складу са експерименталним резултатима.

3.1.3.5. Испитивање цитотоксичности

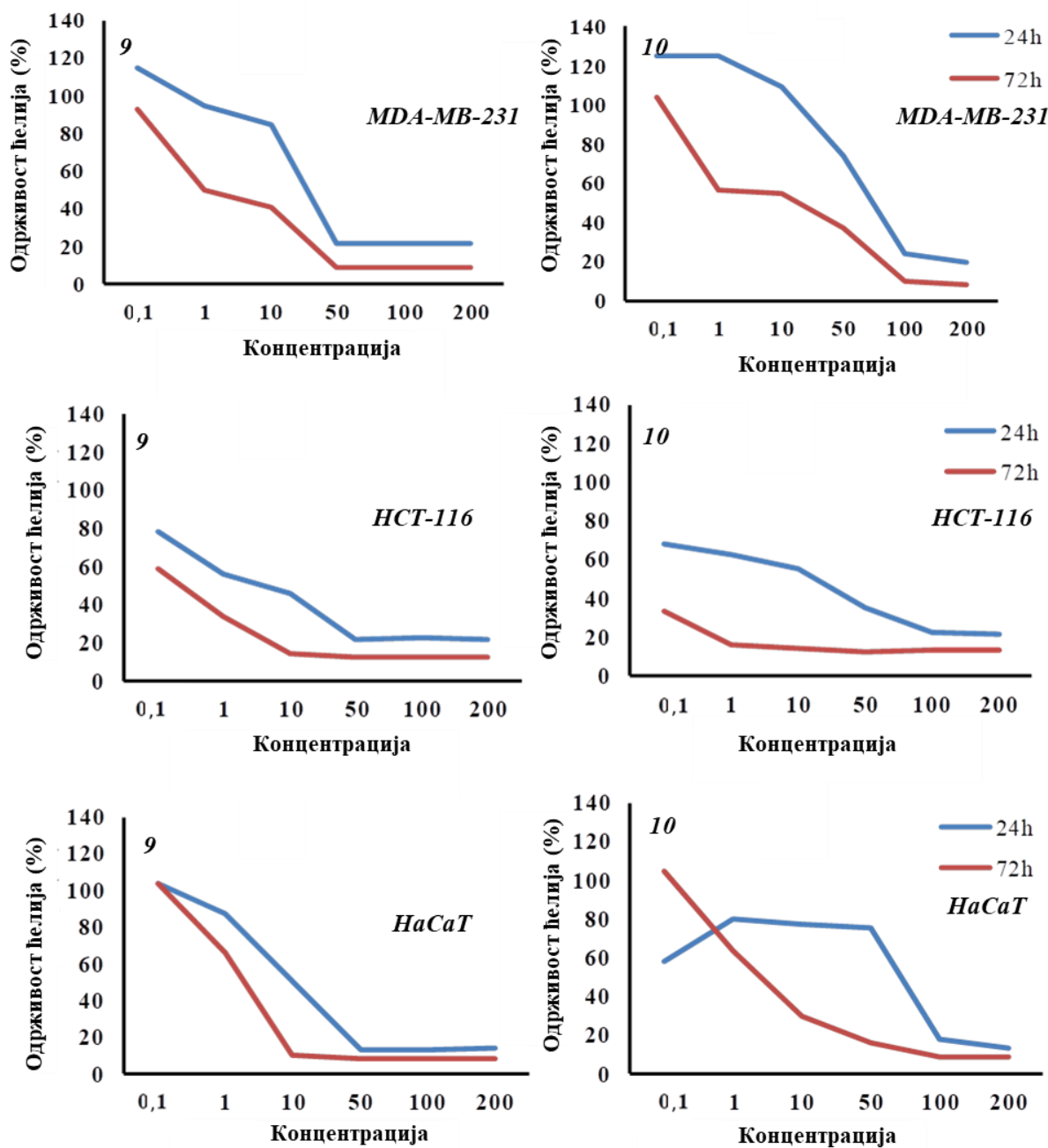
Цитотоксична активност комплекса **9** и **10** на епителним ћелијским линијама карцинома дојке (MDA-MB-231), колоректалног канцера (HCT-116), као и на ћелијама нормалних хуманих кератиноцита (HaCaT) испитивана је 24 h и 72 h након третмана помоћу МТТ теста. Оба комплекса значајно смањују проценат одрживости ћелијских линија у зависности од времена и дозе (слика 84).

Цитотоксична активност изражена је као IC_{50} вредност (Табела 21). Комплекси **9** и **10** показују највећи цитотоксични ефекат према HCT-116 колоректалним канцерогеним ћелијама ($IC_{50} < 25 \mu M$, Табела 20), што је значајан резултат у поређењу са комплексима других јона метала.^{177,212,213,219} Поред тога, испитивани комплекси показују већу цитотоксичну активност од цисплатине на HCT-116²²⁰ и MDA-MB-231 ћелијским линијама.²²¹ Међутим, наши резултати указују да испитивани комплекси не показују селективност према канцерогеним ћелијама, јер утичу и на здраве ћелије.

Табела 21. Резултати МТТ теста одређени након 24 h и 72 h од третмана¹⁶³

	IC_{50} [μM]					
	MDA-MB-231		HCT-116		HaCaT	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h
9	28,16	0,98	3,13	0,14	10,26	1,61
10	75,02	11,75	14,57	0,01	70,58	2,40
K[AuCl ₄]	101,29	150,73	>200	180,36 ^a		
цисплатина		30,8		1,6 ^b		

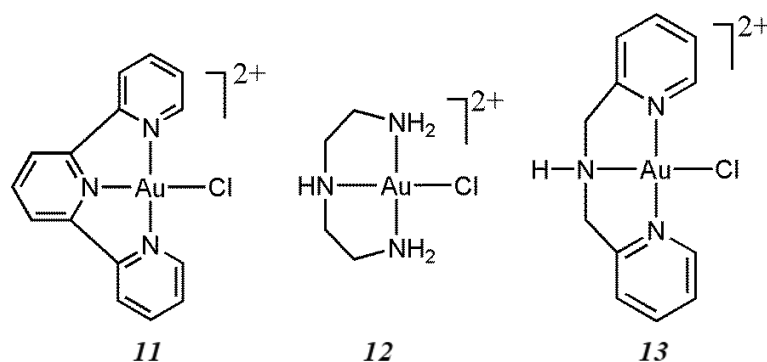
^aРеф. 170; ^b Реф. 222



Слика 84. Ефекти комплекса 9 и 10 на различитим ћелијским линијама након 24 и 72 h од излагања¹⁶³

3.1.4. Резултати испитивања супституционих реакција монофункционалних Au(III) комплекса са сумпор–донорским нуклеофилима

С обзиром на важност познавања интеракција између комплекса и различитих биомолекула, у овом делу су приказани резултати испитивања супституционих реакција монофункционалних комплекса злата **11** – **13** (слика 85) са GSH, L-Met и L-Cys. Пошто стабилност Au(III) комплекса јако зависи од врсте инертних лиганата, у овом случају одабрани су монофункционални комплекси који садрже различите азот–донорске лиганде, као што су терпиридин (terpy), диетилентриамин (dien) или *bis*(2-пиридилметил)амин (bpma).



Слика 85. Структуре испитиваних комплекса **11** – **13**¹⁶⁷

Наиме, велики број истраживања у овој области обухвата испитивање интеракција комплекса и нуклеофила при физиолошким условима.¹⁶⁷ Међутим, узимајући у обзир начин чувања и дозирања неких лекова, ова испитивања су изведена у киселој средини (0,1 М HCl), како би се утврдила стабилност комплекса, као и њихова реактивност са различитим протеолитичким формама нуклеофила.

Пошто нуклеофили GSH, L-Met и L-Cys могу да постоје у различитим протеолитичким облицима зависно од киселости средине, реакције између Au(III) комплекса **11** – **13** и одабраних нуклеофила, у општем случају, могу се представити једначинама приказаним на схеми 15.

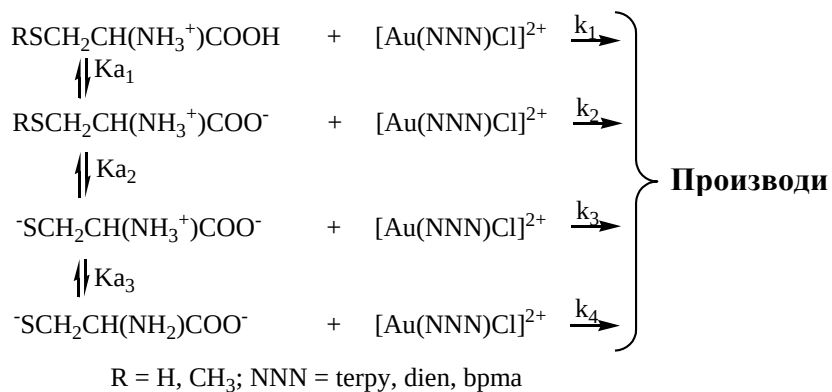


Схема 15. Могући реакциони путеви између комплекса **11** – **13** и нуклеофила¹⁶⁷

Теоријски, узимајући у обзир вредности протеолитичких константи нуклеофила коришћених у овом истраживању за L-Cys (pKa₁ = 1,9, pKa₂ = 8,10, pKa₃ = 10,1), GSH (pKa₁ = 2,05, pKa₂ = 3,40, pKa₃ = 8,72, pKa₄ = 9,49) и L-Met (pKa₁ = 2,28, pKa₂ = 9,21)²²³ при датим експерименталним условима (0,1 М HCl) сва три биомолекула су комплетно протонувана, тако да се реакције окарактерисане константама k₂, k₃ и k₄ на схеми 15 могу занемарити. Експериментални резултати су управо потврдили ову претпоставку. Наиме, на основу добијених кинетичких података супституционе реакције испитиваних комплекса и нуклеофила дешавају се на начин као што је приказано на схеми 16. Реакција директне супституције окарактерисана је константом k₁, а повратна константом k₋₁. Солволитички пут се и у овом случају занемарује, јер је у медијуму присутно 100 mM хлоридних јона.

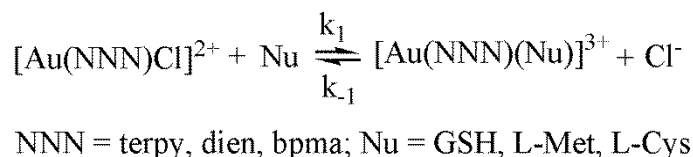
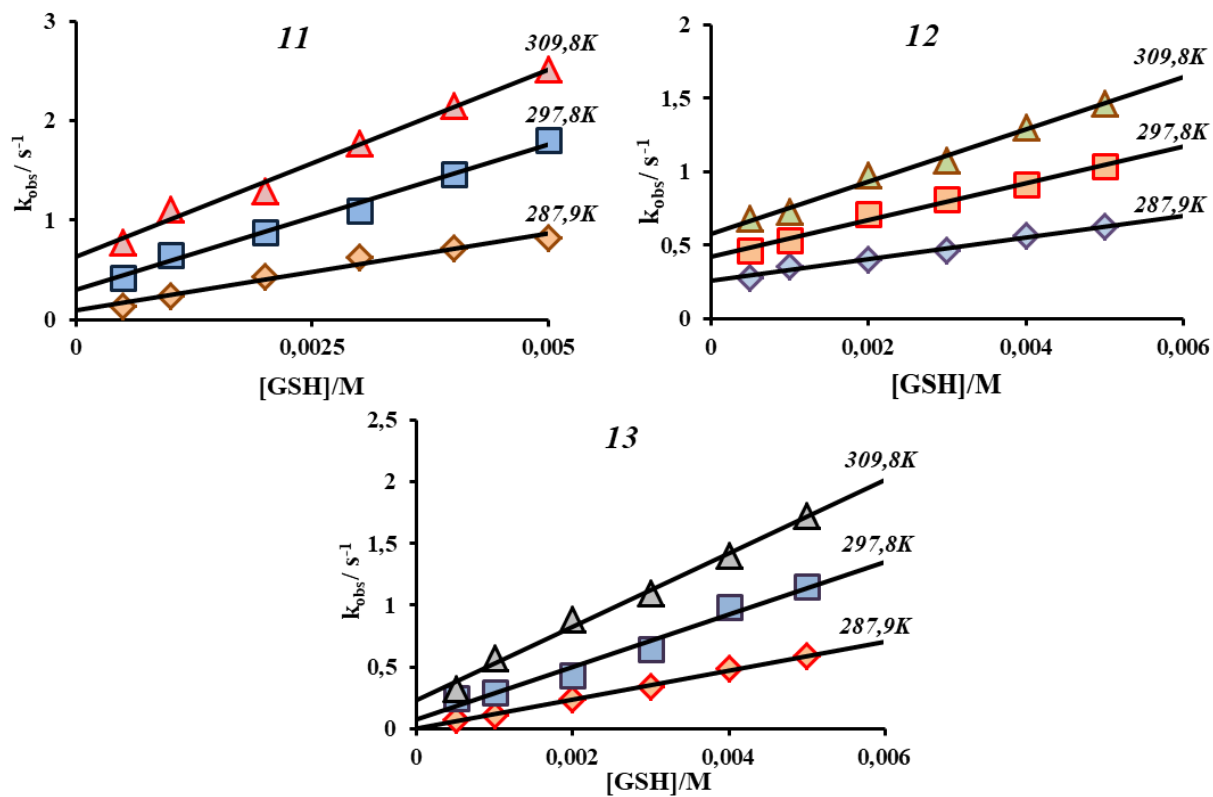


Схема 16. Супституционе реакције комплекса **11** – **13**¹⁶⁷

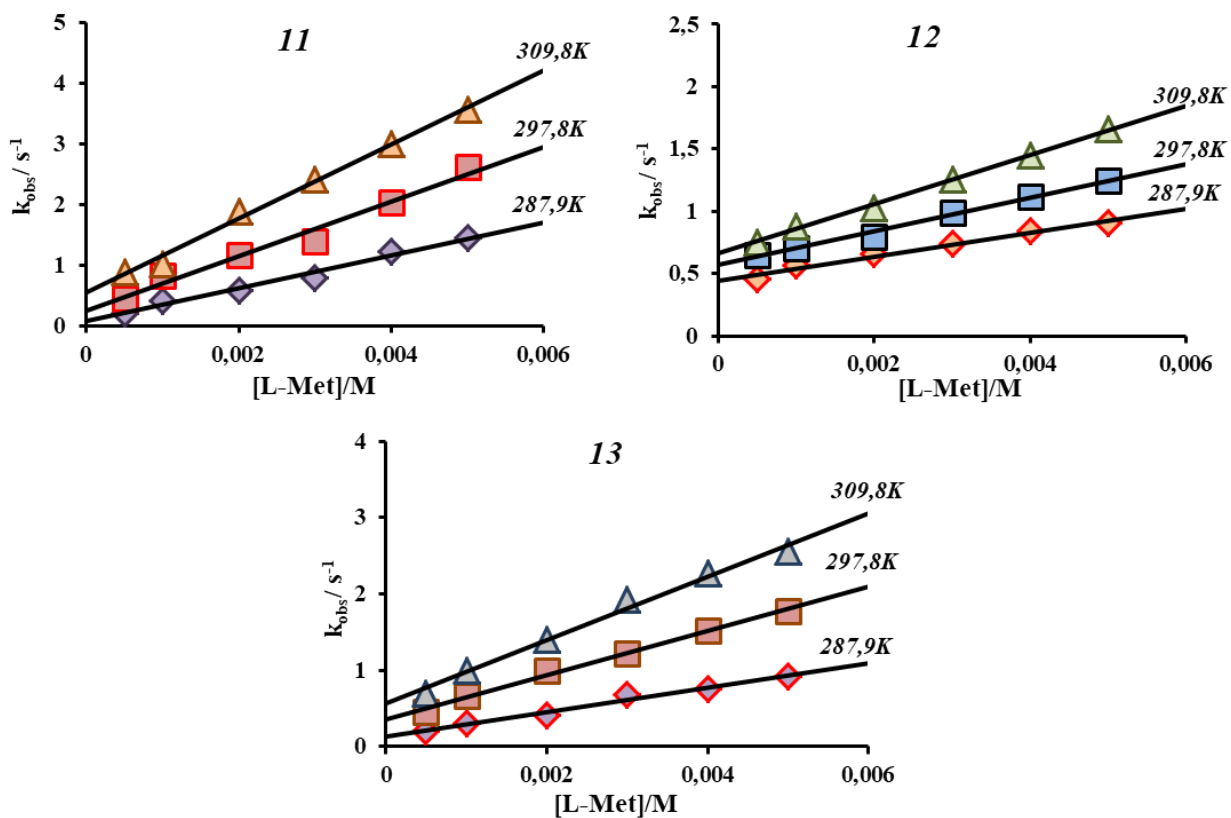
Константе брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs}, за ове супституционе реакције израчунате су помоћу компјутерског програма ProData SX. Линеарна зависност k_{obs} од укупне концентрације нуклеофила описана је једначином (15):

$$k_{obs} = k_{-1} + k_1[\text{Nu}] \quad (15)$$

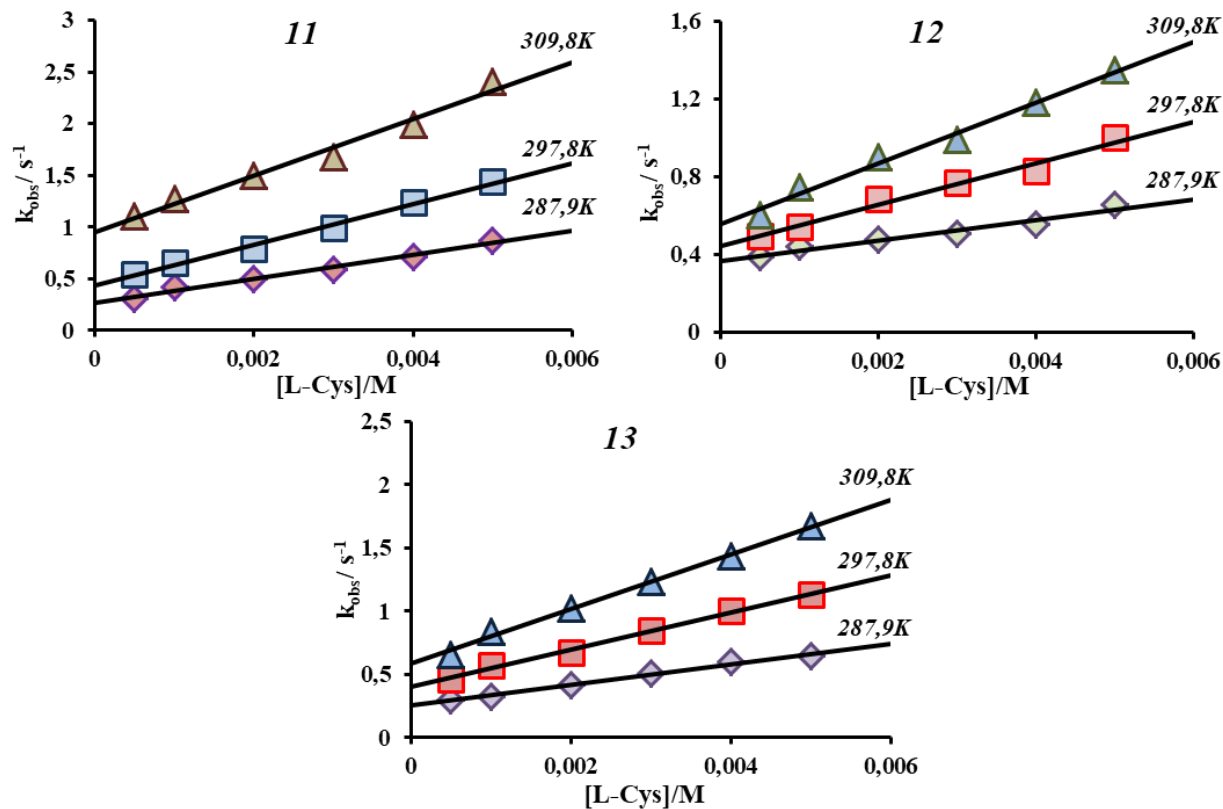
Графичка зависност k_{obs} од концентрације нуклеофила приказана је на сликама 86 – 88. Из нагиба добијених права израчунава се вредност за константу k₁, док се из одсечка одређује константа k₋₁. Реакције су, такође, испитиване на три различите температуре да би се одредиле вредности термодинамичких параметара ΔH[‡] и ΔS[‡]. Сви резултати су сумирани у Табели 22.



Слика 86. Константа брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , у функцији од концентрације нуклеофила (GSH) и температуре за супституционе реакције комплекса **11** – **13** у 0,1 М HCl (pH = 1,0)¹⁶⁷



Слика 87. Константа брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , у функцији од концентрације нуклеофила (L-Met) и температуре за супституционе реакције комплекса 11 – 13 у 0,1 М HCl (pH = 1,0)¹⁶⁷



Слика 88. Константа брзине реакције *pseudo*-првог реда, k_{obs} , у функцији од концентрације нуклеофила (L-Cys) и температуре за супституционе реакције комплекса **11** – **13** у 0,1 М HCl (pH = 1,0)¹⁶⁷

Табела 22. Константе брзине и активациони параметри за супституционе реакције комплекса **11** – **13** у 0,1 М НСl (рН = 1,0)¹⁶⁷

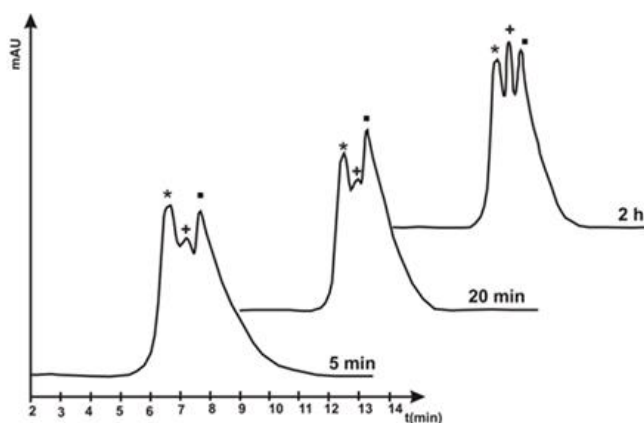
		λ [nm]	T [K]	k_1 [M ⁻¹ s ⁻¹]	$10^{-2} \times k_{-1}$ [s ⁻¹]	$\Delta H^\ddagger$ [kJ mol ⁻¹]	$\Delta S^\ddagger$ [J K ⁻¹ mol ⁻¹]
11	<i>L-Met</i>	370	287,9	270 ± 20	7,52 ± 0,05	24,8 ± 0,6	-111 ± 2
			297,8	450 ± 30	25,0 ± 0,3		
			309,8	610 ± 30	51,0 ± 0,7		
	<i>GSH</i>	325	288,1	160 ± 10	9,3 ± 0,3	27 ± 1	-108 ± 4
			297,9	290 ± 20	29,4 ± 0,5		
			310,1	380 ± 20	63,0 ± 0,6		
	<i>L-Cys</i>	325	287,8	115 ± 7	26,0 ± 0,2	26,2 ± 0,6	-113 ± 3
			297,9	197 ± 8	43,0 ± 0,2		
			309,7	270 ± 20	95,0 ± 0,5		
12	<i>L-Met</i>	295	288,0	9,5 ± 0,6	4,4 ± 0,2	22,1 ± 0,1	-149,3 ± 0,3
			298,2	13,5 ± 0,6	5,6 ± 0,2		
			310,2	19,8 ± 0,6	6,6 ± 0,2		
	<i>GSH</i>	287	288,2	7,4 ± 0,4	2,6 ± 0,1	26,9 ± 0,6	-134 ± 2
			298,1	12,4 ± 0,7	4,2 ± 0,2		
			310,0	17,8 ± 0,9	5,8 ± 0,3		
	<i>L-Cys</i>	245	288,0	5,3 ± 0,6	3,4 ± 0,1	33,7 ± 0,9	-113 ± 3
			298,2	11,0 ± 0,7	4,4 ± 0,2		
			310,2	15,6 ± 0,8	5,6 ± 0,3		
13	<i>L-Met</i>	260	287,9	16 ± 1	1,3 ± 0,3	29,4 ± 0,7	-119 ± 3
			298,0	29 ± 1	3,6 ± 0,3		
			310,3	42 ± 2	5,6 ± 0,6		
	<i>GSH</i>	260	288,0	11,7 ± 0,4	0,063 ± 0,001	28,7 ± 0,8	-124 ± 3
			297,9	21 ± 2	0,81 ± 0,06		
			309,8	30 ± 2	2,3 ± 0,4		
	<i>L-Cys</i>	230	288,2	82 ± 4	2,5 ± 0,1	30,3 ± 0,7	-122 ± 3
			298,1	14,8 ± 0,5	3,9 ± 0,2		
			310,0	21,7 ± 0,8	5,8 ± 0,2		

Анализом података из Табеле 22, може се закључити да је комплекс **11** најреактивнији. Велика реактивност комплекса са терпиридином приписује се структурним и електронским карактеристикама инертног лиганда. Наиме, јака електронска комуникација између пиридинских јединица и јона метала, појачана додатним π -акцепторским ефектом, доводи до делокализације електронске густине преко π -повратне донације. Као резултат, електрофилност јона метала расте, што је већ раније објашњено за одговарајуће Pt(II) и Pd(II) комплексе.²²⁴⁻²²⁷ Комплекс **13** реагује 10 до 15 пута спорије од комплекса са терпиридином, јер присуство тридентатног лиганда са два терминална пиридинска прстена чини јон метала мање електрофилним. И на крају, за комплекс **12**, одсуство ароматичних прстенова резултује најмањом реактивношћу комплекса.

Разлика у реактивности сумпор–донорских нуклеофила већ је позната. L-Met је, као тиостар, због позитивног индуктивног ефекта метил групе најјачи нуклеофил. Тиол, L-Cys, мање је реактиван од глутатиона, јер је у току супституције трипептидом прелазно стање додатно стабилизовано формирањем интрамолекуларске водоничне везе у којој учествује протон тиолне групе, чинећи атом сумпора јачим нуклеофилом.²²⁸

Добијене негативне вредности за $\Delta S^\ddagger$ потврђују асоцијативни механизам супституције. Поред тога, осетљивост брзине реакција за σ -донорске карактеристике нуклеофила такође је повезана са асоцијативним механизмом супституције.

Добро је познато да неки комплекси злата, у зависности од киселости средине у којој се изучавају, могу да подлегну процесу редукције у присуству сумпор–донорских нуклеофила.²²⁹ С тим у вези, испитивана је стабилност комплекса **11** у присуству L-Met помоћу HPLC методе. Резултати су приказани на слици 89. На хроматограму се могу уочити три сигнала, на 6,6 min, 7,2 min и 7,8 min. Интензитет сигнала на 6,6 min, који потиче од комплекса **11**, временом опада, док је истовремено примећено повећање интензитета сигнала на 7,2 min, који потиче од продукта супституције. Сигнал на 7,8 min одговара слободном L-Met. Недостатак пикова који би евентуално припадали оксидованом облику L-Met и одговарајућем Au(I) комплексу искључују редукциони процес.



Слика 89. HPLC хроматограм за реакцију између комплекса **11** ($[Au(III)] = 5 \text{ mM}$) и L-Met ($[L-Met] = 5 \text{ mM}$) на pH 1,0, $T = 310 \text{ K}$, $\lambda = 375 \text{ nm}$; (*) – комплекс **11** (ретенционо време = 6,6 min); (+) – производ супституције (ретенционо време = 7,2 min); (·) – слободан L-Met (ретенционо време = 7,8 min)¹⁶⁷

3.2. Полинуклеарни Au(III) комплекси

У оквиру овог дела детаљно су описани резултати синтезе и карактеризације нових полинуклеарних Au(III) комплекса са алифатичним азот-донорским мостним лигандима, као и резултати испитивања њихових интеракција са различитим биомолекулима, укључујући компјутерске прорачуне и биолошка испитивања.

3.2.1. Резултати испитивања динуклеарних **14 – 16** и тринуклеарних **17 – 19** Au(III) комплекса са алифатичним азот-донорским мостним лигандима

Динуклеарни Au(III) комплекси **14 – 16**, опште формуле $[\text{Au}_2(\text{N-N})\text{Cl}_6]$, и тринуклеарни Au(III) комплекси **17 – 19**, опште формуле $[\text{Au}_3(\text{N-N})_2\text{Cl}_8]^+$, у којима је N-N = 1,4-диаминобутан (dab), 1,6-диаминохексан (dah) или 1,8-диаминооктан (dao), синтетисани су према процедури приказаној на схеми 17. Њихове структуре су потврђене елементалном анализом, мерењем моларне проводљивости и различитим аналитичким методама (IR, UV-Vis, ^1H NMR, ESI-MS) (Табела 3).

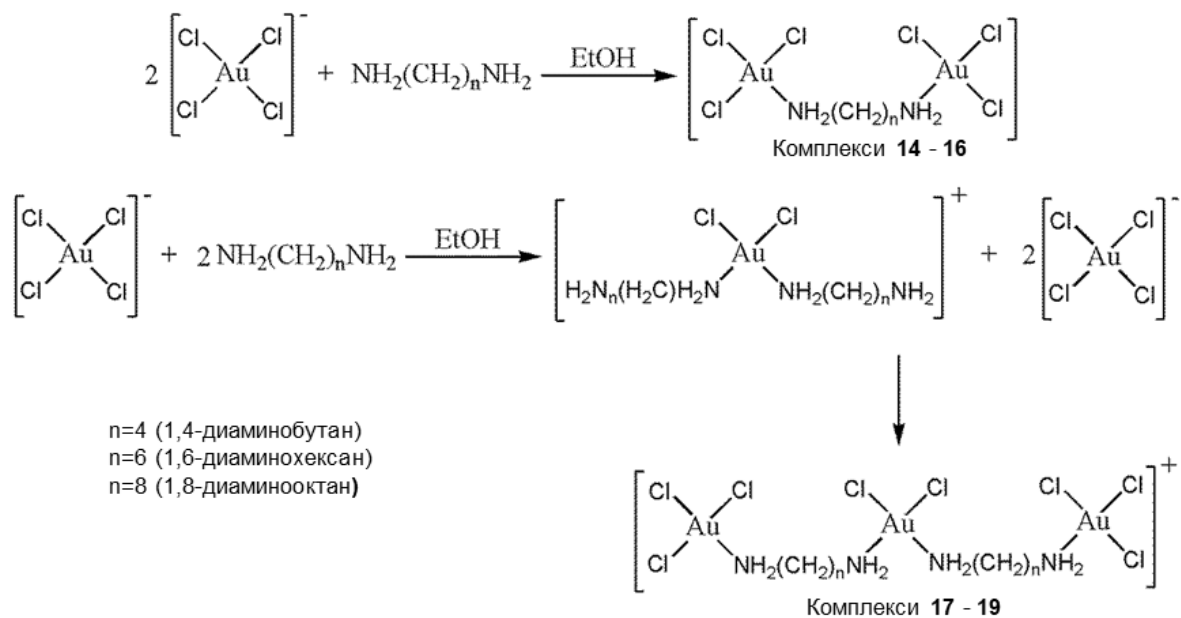


Схема 17. Реакције синтезе динуклеарних **14 – 16** и тринуклеарних **17 – 19** Au(III) комплекса¹⁷⁰

Вредности моларне проводљивости, приказане у Табели 23, потврђују да су комплекси **14 – 16** неелектролити, као и да су комплекси **17 – 19** електролити типа 1:1.

Табела 23. Моларна проводљивост Au(III) комплекса у DMF–у на 298 K¹⁷⁰

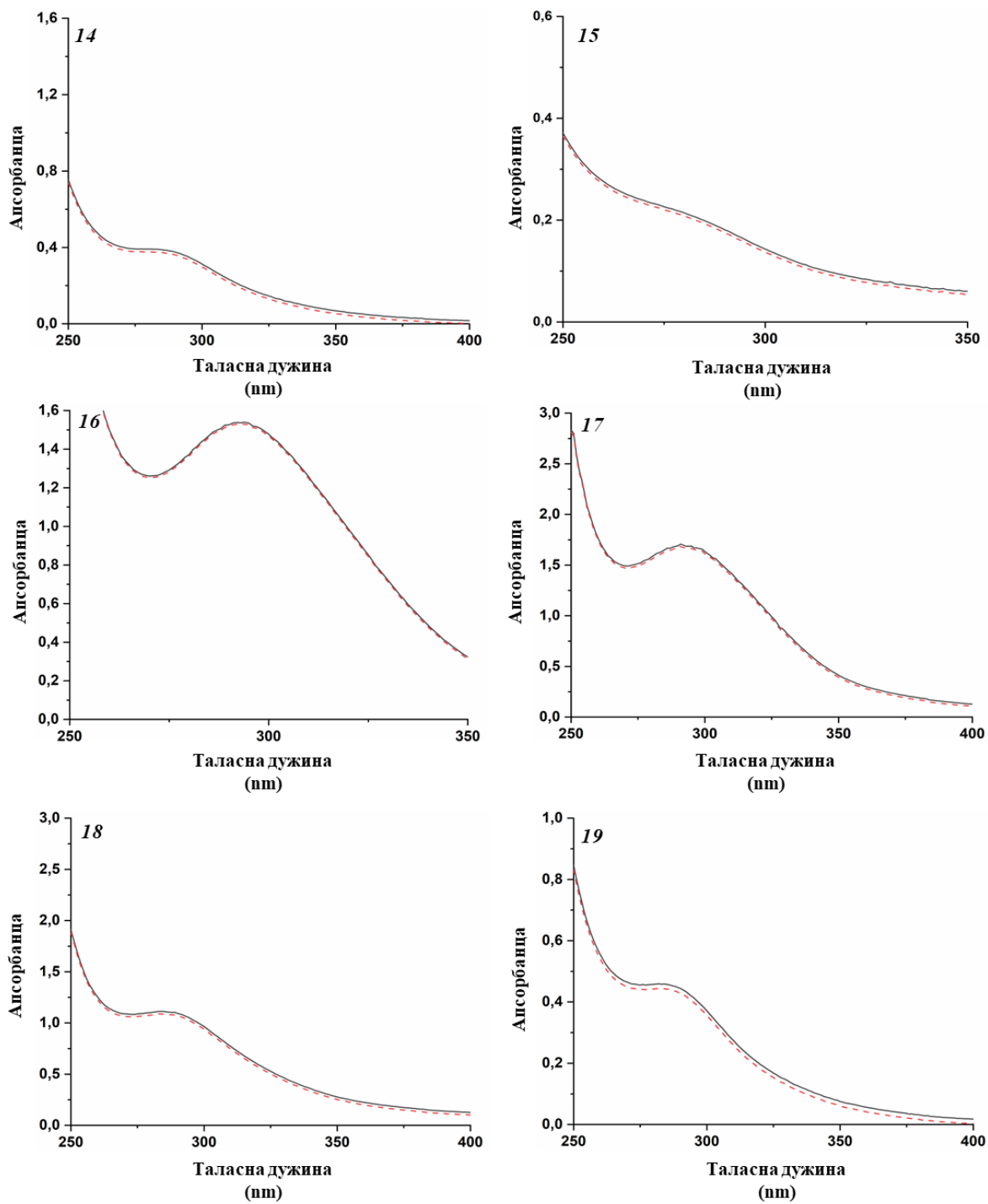
	λ_m [$\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$]
14	<20
15	<20
16	<20
17	93
18	87
19	99

Подаци добијени помоћу ¹H NMR, IR, UV–Vis и ESI–MS метода за динуклеарне и тринуклеарне Au(III) комплексе потврђују структуре приказане на схеми 17. У ¹H NMR спектрима динуклеарних **14** – **15** и тринуклеарних **17** – **18** комплекса одговарајући сигнали лиганда померени су ка вишим вредностима хемијског померања у односу на сигнале слободних (некоординованих) једињења, док су у ¹H NMR спектрима комплекса **16** и **19** ови сигнали померени ка нижим вредностима (Табела 24).¹⁷⁰

Табела 24. ¹H NMR подаци за лиганде и комплексе **14** – **19**¹⁷⁰

Комплекси		Слободан лиганд [δ , ppm]	Координован лиганд [δ , ppm]
14 – 17	dab		
	4H(C1-C4)	2,775	3,040 – 3,065
	4H (C2-C3)	1,614	1,750 – 1,746
15 – 18	dah		
	4H(C1-C6)	2,829	2,987 – 2,991
	4H(C2-C5)	1,672	1,669 – 1,679
	4H(C3-C4)	1,580	1,410 – 1,414
16 – 19	dao		
	4H(C1-C4)	2,606	2,982 – 2,982
	4H(C2-C3)	1,436	1,649 – 1,655
	8H(C3,C4,C5,C6)	1,314	1,352 – 1,355

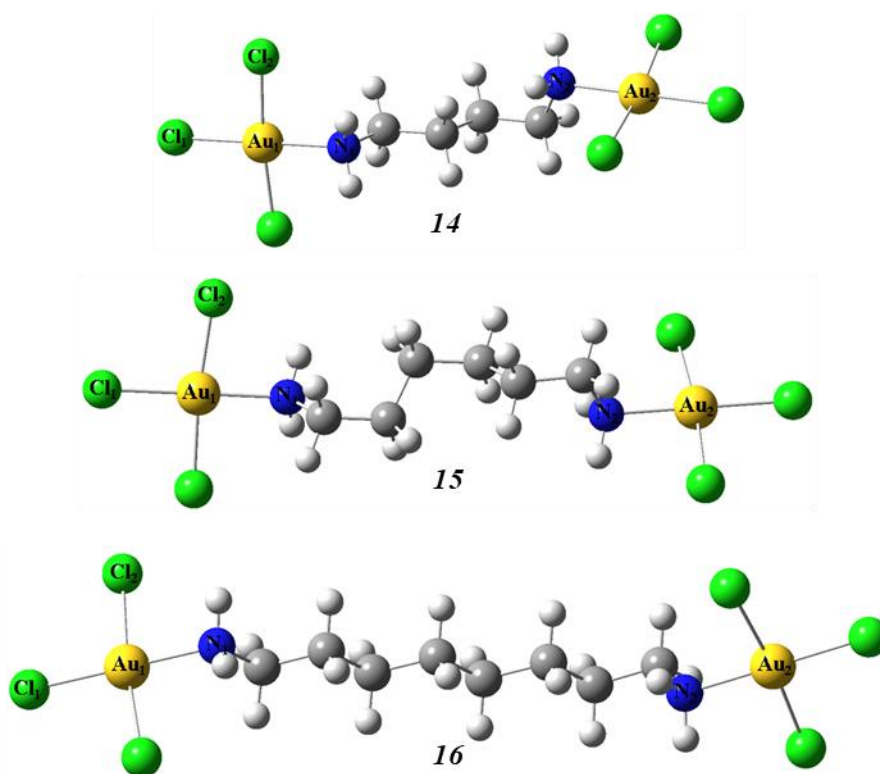
У IR спектрима комплекса **14** – **19** присутне су карактеристичне траке које потичу од NH₂ групе (3600–3200 cm⁻¹), као и траке које потичу од алифатичних C–H веза (2920 – 2940 cm⁻¹). UV-VIS спектри комплекса су снимани у води и PBS пуферу (слика 90). Облик спектра, као и вредности за λ_{max} , су готово идентични за све комплексе (λ_{max} = 285 nm за комплекс **14**, λ_{max} = 286 nm за комплекс **15**, λ_{max} = 293 nm за комплекс **16**, λ_{max} = 293 nm за комплекс **17**, λ_{max} = 287 nm за комплекс **18** и λ_{max} = 287 nm за комплекс **19**).



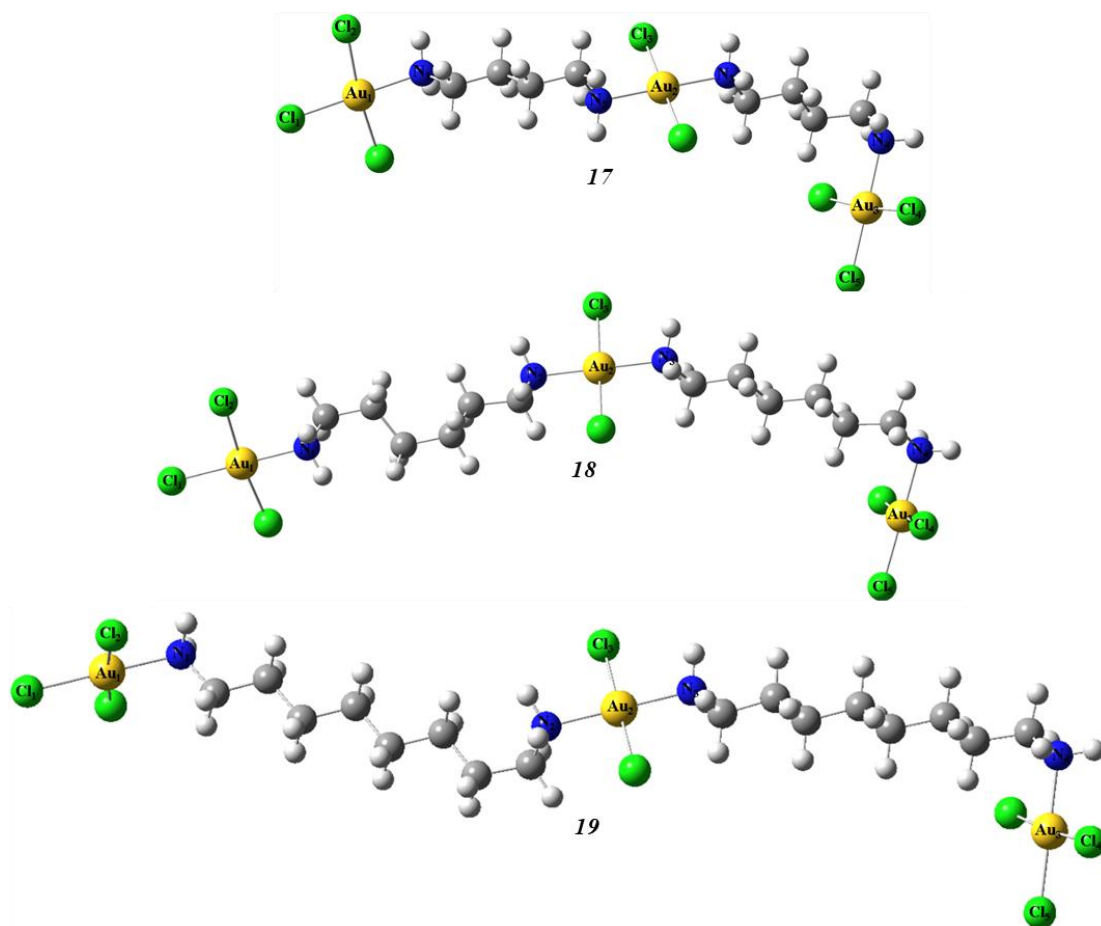
Слика 90. UV-Vis спектри комплекса 14 – 19 у води (црна линија) и у PBS-у (испрекидана линија)¹⁷⁰

У ESI MS спектрима комплекса **14** – **19** детектовани су сигнали који потичу од одговарајућих молекул–јона. У складу са условима под којима је извршена анализа, различите фрагментације комплекса су примећене. Такође, у спектрима су присутни и фрагменти који потичу од полазних лиганата и соли злата.

Да би се добио детаљнији увид у структуре комплекса **14** – **19** извршена су квантно-хемијска израчунавања. Оптимизоване структуре и добијени подаци за динуклеарне Au(III) комплексе су приказани на слици 91 и у Табели 25, а за тринуклеарне Au(III) комплексе на слици 92 и у Табели 26. Резултати су показали да Au(III) јон поседује благо нарушену квадратно-планарну геометрију, као и да су све Au-Cl везе у опсегу од 2,27 – 2,32 Å, док су Au-N везе у опсегу од 2,10 – 2,13 Å, што је у сагласности са раније публикованим резултатима кристалографске анализе мононуклеарних Au(III) комплекса са дипептидима који садрже L-His.²³⁰

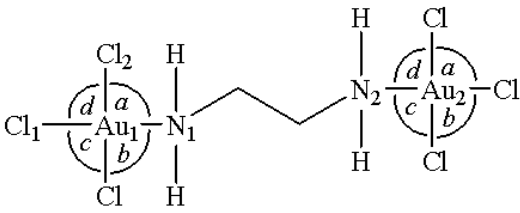


Слика 91. Структуре са минималном енергијом за динуклеарне Au(III) комплексе **14** – **16** добијене помоћу DFT прорачуна¹⁷⁰

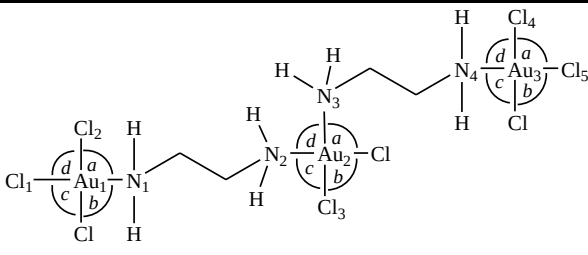


Слика 92. Структуре са минималном енергијом за тринуклеарне Au(III) комплексе 17 – 19 добијене помоћу DFT прорачуна¹⁷⁰

Табела 25. Резултати DFT прорачуна за енергетску разлику HOMO – LUMO орбитала, дужине и углови веза код динуклеарних Au(III) комплекса¹⁷⁰

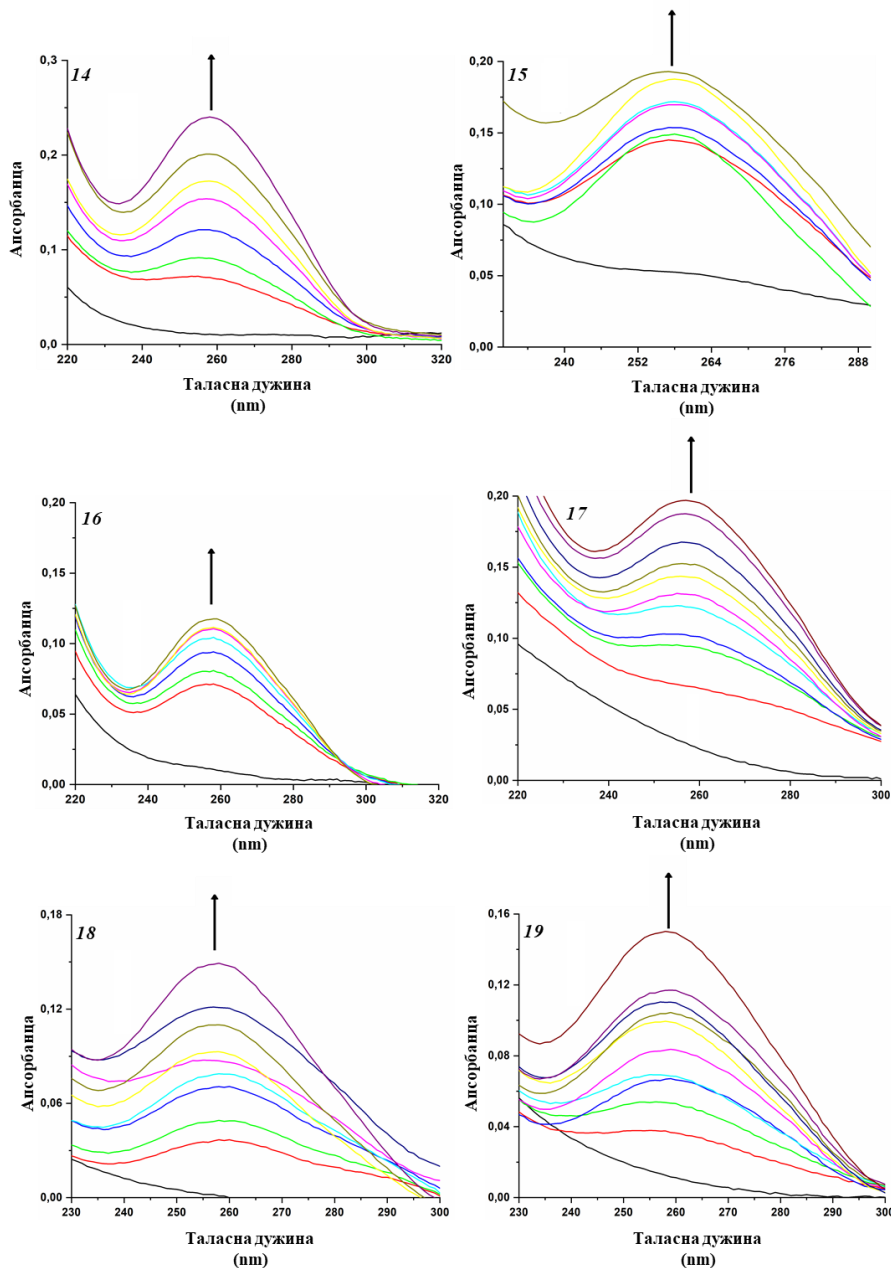
	14	15	16
			
МО енергија [eV]			
LUMO	-4,34	-4,21	-4,10
HOMO	-8,02	-7,91	-7,81
ΔE [eV]	3,68	3,70	3,71
Дужине веза [Å]			
Au ₁ -Au ₂	9,46	11,53	14,34
Au-N	2,11	2,10	2,10
Au-Cl ₁	2,28	2,28	2,28
Au-Cl ₂	2,32	2,32	2,32
Углови веза [°]			
Cl ₁ -Au-N ₁	179,8	179,8	179,8
Cl ₂ -Au-Cl	173,7	173,8	174,0
a	86,7	86,9	86,9
b	87,1	87,0	87,2
c	93,0	93,1	92,9
d	93,2	93,0	93,0

Табела 26. Резултати DFT прорачуна за енергетску разлику HOMO – LUMO орбитала, дужине и углови веза код тринуклеарних Au(III) комплекса¹⁷⁰

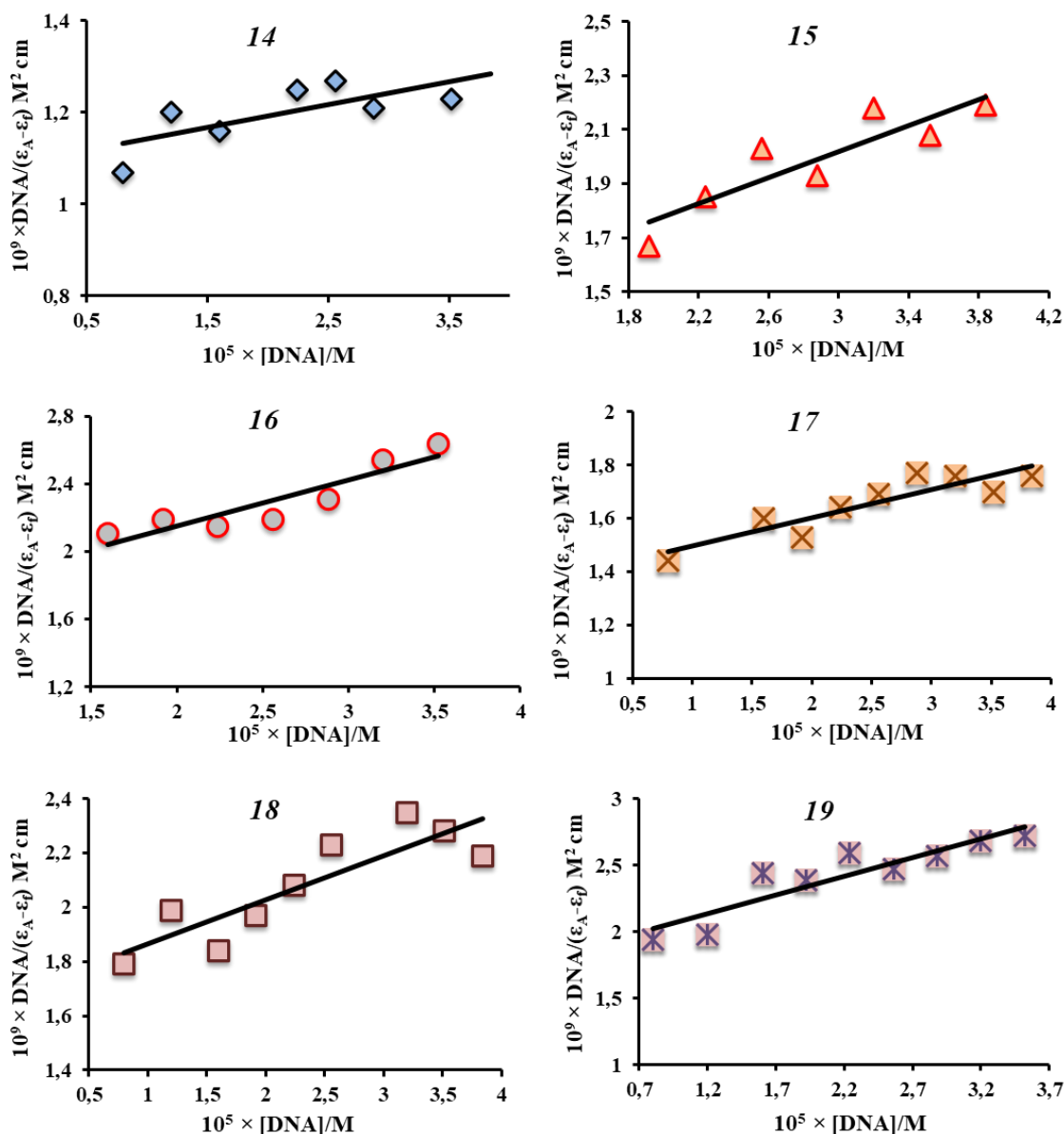
	17	18	19
			
МО енергија [eV]			
LUMO	-8,236	-7,998	-7,776
HOMO	-9,525	-9,165	-8,817
ΔE [eV]	1,289	1,167	1,041
Дужина веза [Å]			
Au ₁ -Au ₂	9,60	10,14	14,27
Au ₂ -Au ₃	8,43	11,50	12,84
Au ₁ -N ₁	2,12	2,11	2,10
Au ₂ -N ₂	2,12	2,12	2,11
Au ₂ -N ₃	2,13	2,12	2,11
Au ₃ -N ₄	2,12	2,11	2,11
Au ₁ -Cl ₁	2,27	2,27	2,28
Au ₁ -Cl ₂	2,32	2,31	2,32
Au ₂ -Cl ₃	2,28	2,28	2,28
Au ₃ -Cl ₄	2,31	2,32	2,32
Au ₃ -Cl ₅	2,27	2,27	2,29
Углови веза [°]			
Cl ₁ -Au ₁ -N ₁	179,7	179,6	179,7
Cl ₂ -Au ₁ -Cl	173,1	173,4	173,6
a-Au ₁	86,3	87,2	86,9
b-Au ₁	86,8	86,2	86,8
c-Au ₁	93,4	93,4	93,1
d-Au ₁	93,5	93,2	93,2
N ₂ -Au ₂ -Cl	176,6	178,1	177,8
N ₃ -Au ₂ -Cl ₃	177,5	177,1	178,2
a-Au ₂	85,2	84,9	85,5
b-Au ₂	92,4	92,6	92,7
c-Au ₂	84,6	85,5	85,2
d-Au ₂	97,8	97,0	96,6
Cl ₅ -Au ₃ -N ₄	179,7	179,7	179,4
Cl ₄ -Au ₃ -Cl	173,3	173,5	174,8
a-Au ₃	93,3	93,2	92,8
b-Au ₃	93,4	93,3	92,4
c-Au ₃	86,7	86,5	88,1
d-Au ₃	86,6	86,9	86,7

3.2.1.1. Испитивање интеракција са DNA

Интеракције динуклеарних и тринуклеарних Au(III) комплекса са DNA су испитиване на исти начин као што је описано у претходним поглављима. Апсорпциони спектри раствора комплекса **14** – **19** константне концентрације у одсуству и присуству DNA приказани су на слици 93, а дијаграми зависности $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$ у функцији од $[DNA]$ представљени су на слици 94.



Слика 93. Апсорпциони спектри комплекса **14** – **19** у 0,01 М PBS–у (pH = 7,4) након додатка DNA, $[Au(III)] = 8 \times 10^{-6}$ М, $[DNA] = (1,6 - 3,84) \times 10^{-5}$ М. Стрелице указују на промену апсорбанце са повећањем концентрације DNA¹⁷⁰



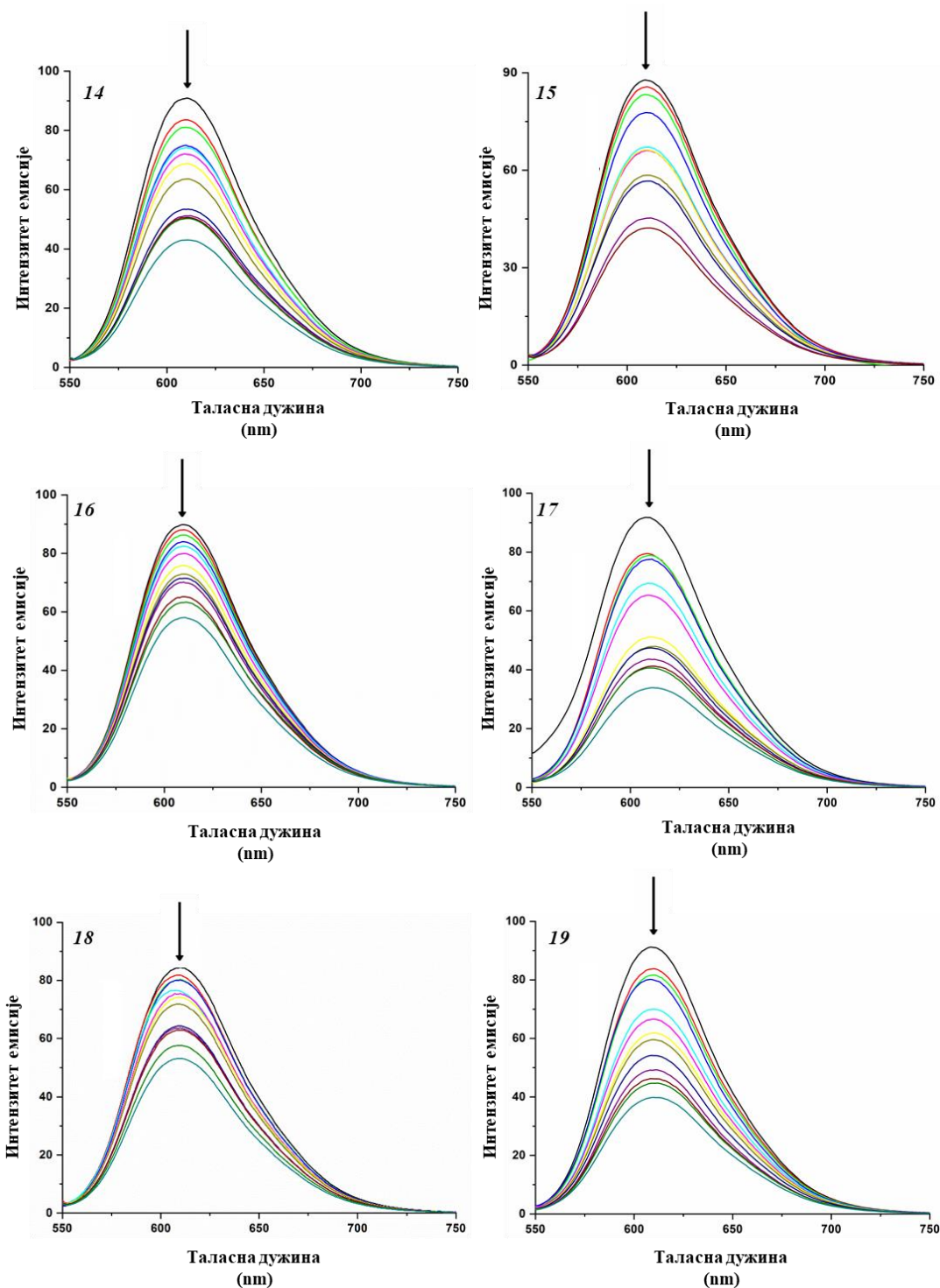
Слика 94. $[\text{DNA}] / (\epsilon_A - \epsilon_f)$ у функцији од $[\text{DNA}]$ за комплексе 14 – 19¹⁷⁰

Додатак DNA у раствор комплекса 14 – 19 доводи до појаве новог сигнала на 258 nm, који је примећен у свим спектрима (слика 93), што указује на присуство интеракција. Константе везивања K_b за све испитиване комплексе израчунате су из дијаграма $[\text{DNA}] / (\epsilon_A - \epsilon_f)$ у функцији од $[\text{DNA}]$, на основу једначине 6 (слика 94), и приказане у Табели 27. Највећа вредност константе је добијена за комплекс 15. У поређењу са K_b вредношћу за EB, ($K_b = (1,23 \pm 0,07) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), за све комплексе су добијене ниже вредности.

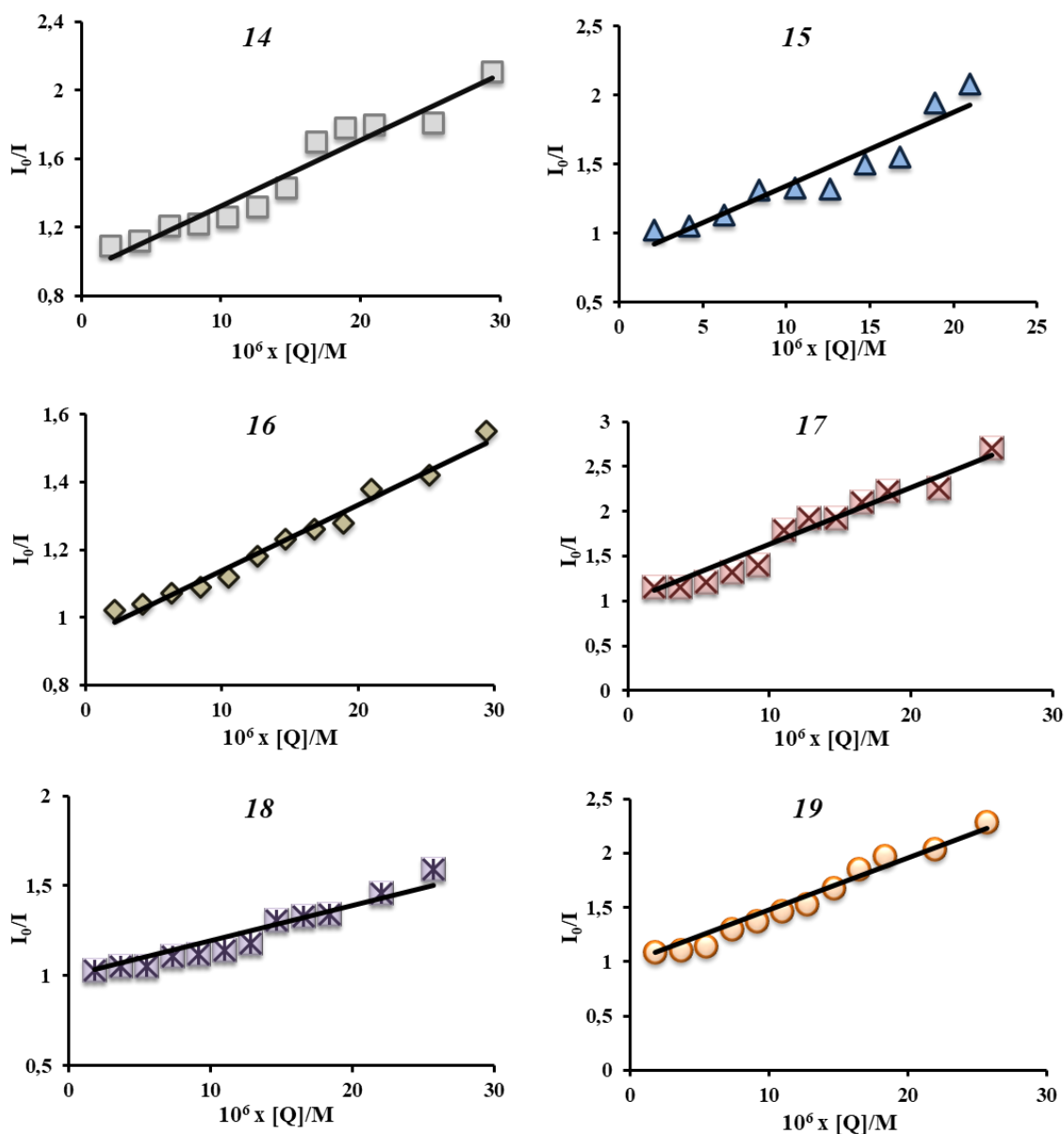
Табела 27. Константе везивања за DNA (K_b) и Stern–Volmer-ове константе (K_{sv}) за комплексе **14** – **19**¹⁷⁰

	$K_b \times 10^4$ [M ⁻¹]	$K_{sv} \times 10^4$ [M ⁻¹]
14	0,372 ± 0,004	3,54 ± 0,04
15	1,91 ± 0,06	4,01 ± 0,05
16	1,69 ± 0,05	1,65 ± 0,02
17	0,750 ± 0,002	6,339 ± 0,004
18	0,985 ± 0,003	1,956 ± 0,002
19	1,56 ± 0,05	4,783 ± 0,002

Емисиони спектри ЕВ везаног за DNA у одсуству и присуству комплекса **14** – **19** су приказани на слици 95, а Stern–Volmer–ови дијаграми на слици 96.



Слика 95. Емисиони спектри ЕВ везаног за DNA у присуству комплекса **14 – 19**.
 $[EB] = 21 \mu\text{M}$, $[DNA] = 21 \mu\text{M}$, $[Au(III)] = 2,1 - 29,4 \mu\text{M}$ за комплексе **14 – 16** и
 $[EB] = 18 \mu\text{M}$, $[DNA] = 18 \mu\text{M}$, $[Au(III)] = 1,83 - 25,7 \mu\text{M}$ за комплексе **17 – 19**;
 $\lambda_{\text{ex}} = 527 \text{ nm}$. Стрелице показују промену интензитета емисије са
повећањем концентрације комплекса¹⁷⁰

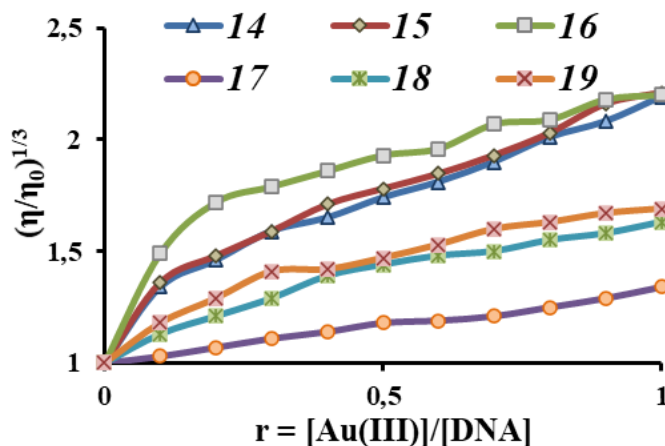


Слика 96. Stern-Volmer-ови дијаграми EB-DNA за комплексе **14 – 19**¹⁷⁰

Повећање концентрације комплекса доводи до значајног опадања интензитета емисионог сигнала на 612 nm. Опадање интензитета EB-DNA флуоресценције указује на чињеницу да сви испитивани комплекси могу да интерагују са DNA.^{172,209}

Stern-Volmer-ови дијаграми за EB-DNA (слика 96) такође потврђују опадање флуоресцентне емисије, док су Stern-Volmer-ове константе (K_{sv}) сумиране у Табели 27. Високе вредности за константе (реда величине 10^4) указују на значајну могућност свих комплекса да замене EB и вежу се за DNA. Иначе, комплекс **17** поседује највећу K_{sv} вредност.

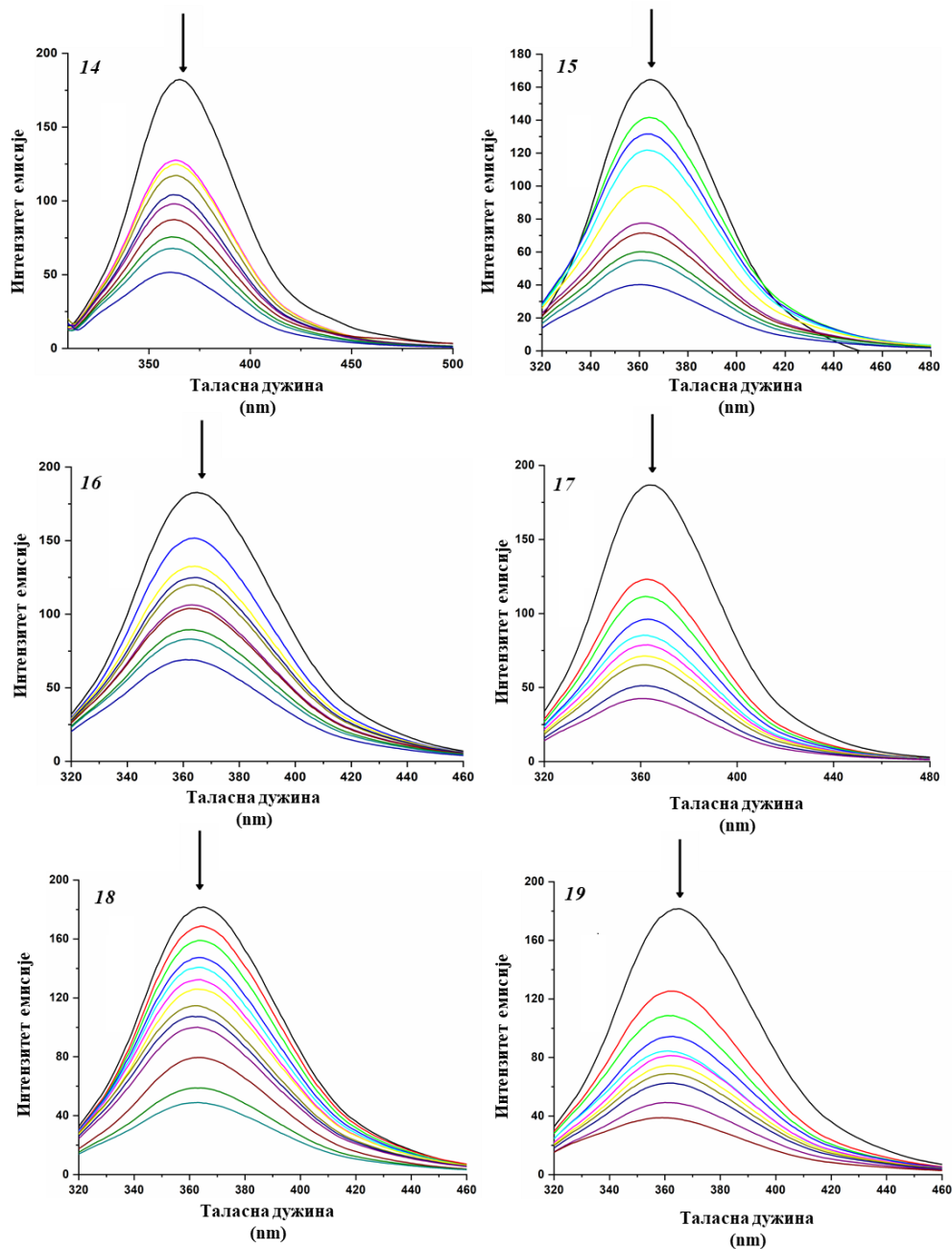
Резултати промене вискозитета раствора DNA у присуству комплекса су приказани на слици 97. Додатак растуће концентрације (до односа 1) комплекса **14** – **19** ($[\text{Au(III)}] = 0 - 12 \mu\text{M}$) у раствор DNA ($[\text{DNA}] = 12 \mu\text{M}$) доводи до повећања релативне вискозности (слика 97), указујући на интеркалацију. Ефекат је најизраженији у случају комплекса **16**.



Слика 97. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ DNA ($[\text{DNA}] = 12 \mu\text{M}$) у раствору пуфера (PBS, pH = 7,4) са повећањем концентрације комплекса **14** – **19** (r)¹⁷⁰

3.2.1.2. Испитивање интеракција са BSA

Интеракције комплекса **14** – **19** са BSA такође су испитиване помоћу флуоресцентне спектроскопије. Промене у емисионим спектрима BSA са повећањем концентрације комплекса **14** – **19** приказане су на слици 98. У спектрима се јасно може уочити опадање интензитета флуоресценције са повећањем концентрације комплекса, док облик спектра остаје непромењен. Опадање интензитета флуоресцентних пикова директна је последица везивања Au(III) комплекса за протеин.

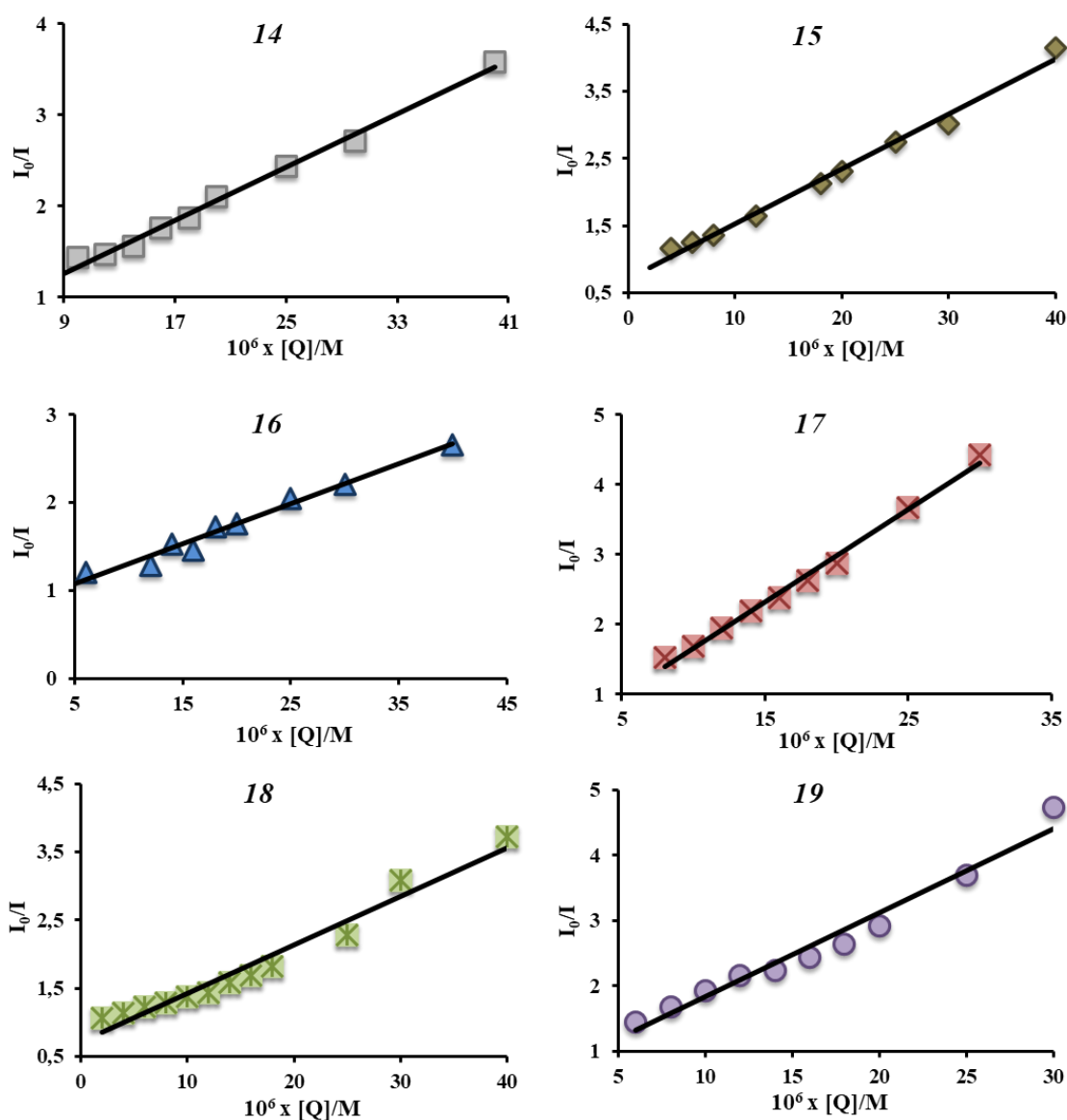


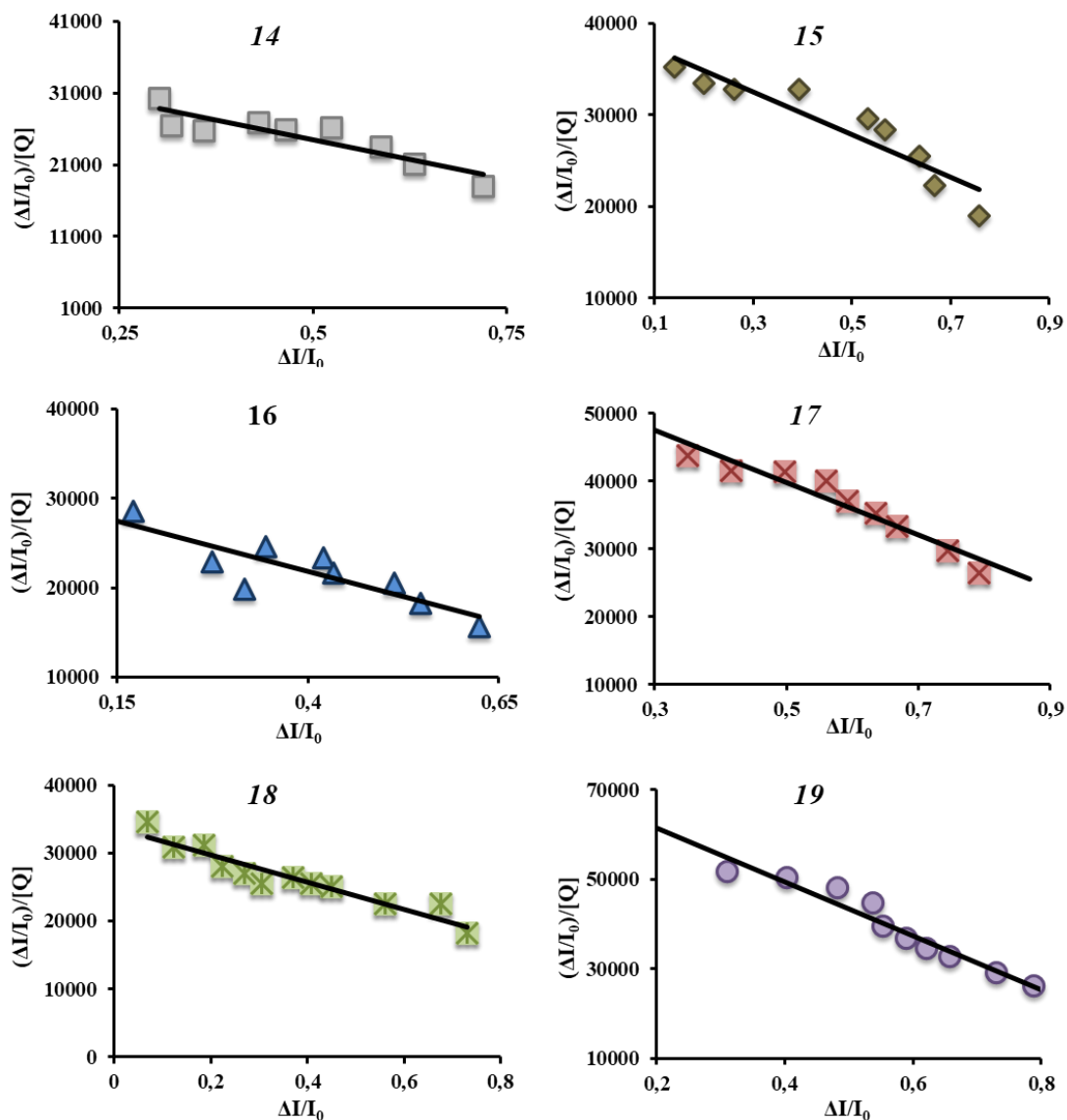
Слика 98. Емисиони спектри BSA у присуству комплекса **14** – **19**. [BSA] = 2μМ, [Au(III)] = 8 – 40μМ; λ_{ex} = 295 nm. Стрелице показују промену интензитета са повећањем концентрације комплекса¹⁷⁰

Вредности Stern–Volmer–ове константе (K_{sv}) и константе гашења (k_q) за интеракције комплекса са BSA су израчунате помоћу Stern–Volmer–ове једначине (једначина 10, слика 99) и сумиране у Табели 28. Вредности за константе везивања (K) и број везујућих места за албумин (n) су израчунате коришћењем Scatchard–ове једначине (једначина 11, слика 100).

Табела 28. Константе и параметри (K_{sv} , k_q , K и n) за интеракције комплекса 14 – 19 и BSA¹⁷⁰

	$K_{sv} \times 10^4$ [M ⁻¹]	$k_q \times 10^{13}$ [M ⁻¹ s ⁻¹]	$K \times 10^4$ [M ⁻¹]	n
14	$6,71 \pm 0,07$	$6,71 \pm 0,07$	$2,05 \pm 0,04$	0,6
15	$8,04 \pm 0,08$	$8,04 \pm 0,08$	$5,82 \pm 0,06$	0,45
16	$4,41 \pm 0,05$	$4,41 \pm 0,05$	$1,84 \pm 0,06$	0,64
17	$13,20 \pm 0,04$	$13,20 \pm 0,04$	$3,87 \pm 0,04$	0,65
18	$7,131 \pm 0,005$	$7,131 \pm 0,005$	$1,98 \pm 0,02$	0,59
19	$12,89 \pm 0,08$	$12,89 \pm 0,08$	$6,02 \pm 0,05$	0,82

Слика 99. I_0/I у функцији од $[Q]$ за интеракције комплекса 14 – 19 са BSA¹⁷⁰



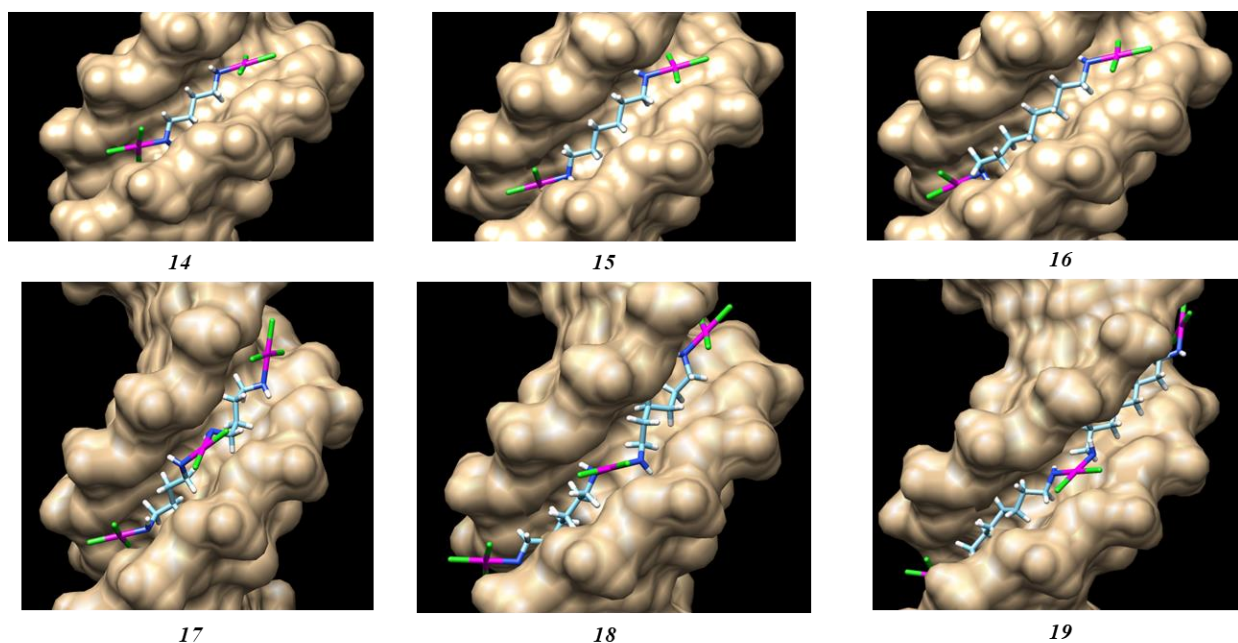
Слика 100. Scatchard-ови дијаграми за комплексе **14** – **19**¹⁷⁰

Испитивани комплекси показују добру способност да се вежу за BSA. И у овом случају комплекс **17** показује највећи потенцијал, $k_q = (1,320 \pm 0,004) \times 10^{13} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Генерално, добијене вредности за константе k_q за све комплексе су веће у односу на публиковане вредности за биополимере ($10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), што додатно потврђује постојање интеракција.²¹⁸

3.2.1.3. Молекулски докинг

Као што је већ напоменуто у делу 3.1.2.4., молекулска симулација представља корисну методу да, у комбинацији са експерименталним подацима, помогне у разумевању комплекс-DNA/BSA интеракција, идентификује број везујућих места и евентуално дефинише начин везивања комплекса.²⁰⁸ Молекулске докинг студије су извршене за интеракције комплекса **14** – **19** са DNA/BSA, док су функције бодовања идентичне онима описаним у делу 3.1.2.4.

Најбољи положаји комплекса и DNA додекамера су приказани на слици 101, док су најбољи положаји према коришћеним функцијама дати у Табели 29. На основу вредности добијених помоћу MolDock, Docking и Rerank, највећа могућност везивања потврђена је за комплекс **19**. Очигледно дужина диаминског ланца игра битну улогу у стабилизацији DNA–Au(III) продукта, указујући на везивање за мањи жлеб.

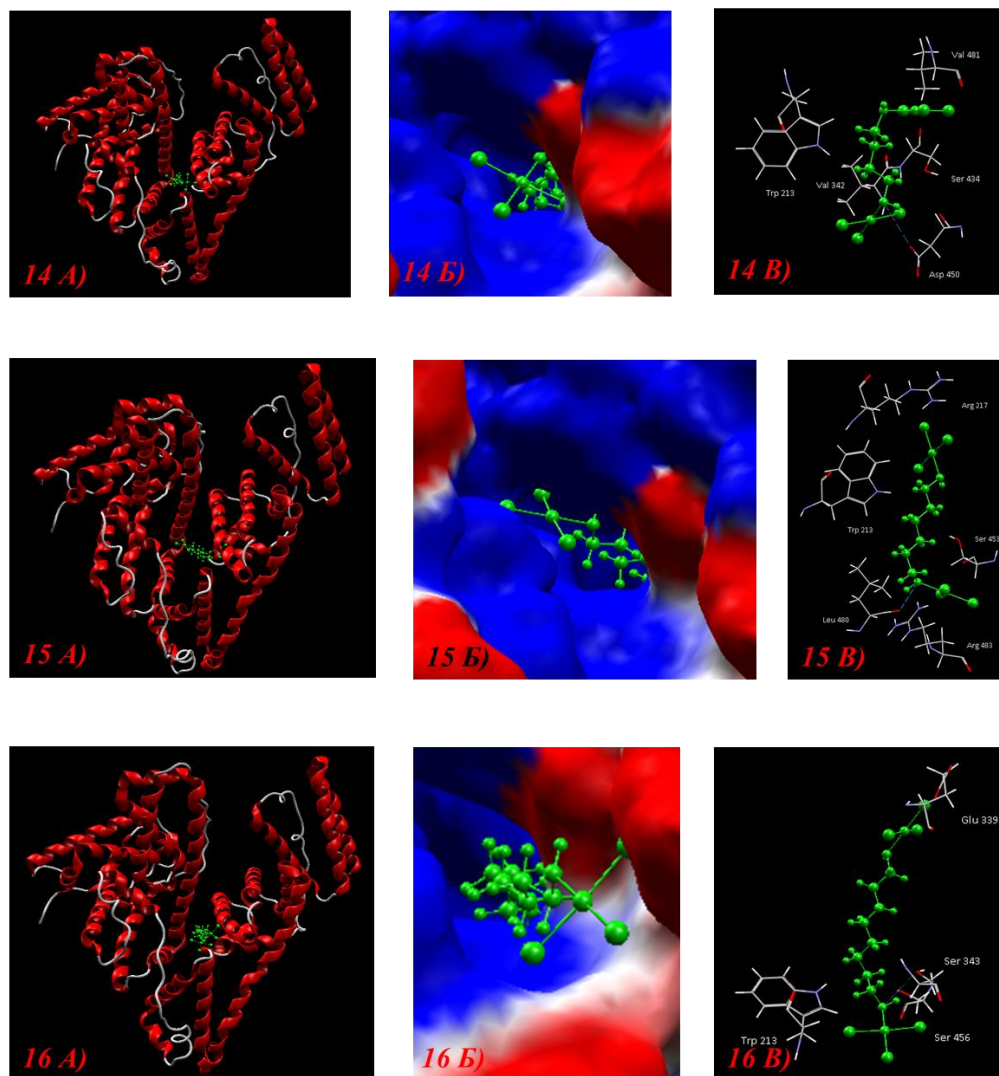


Слика 101. Компјутерски модел интеракције комплекса **14** – **19** са DNA¹⁷⁰

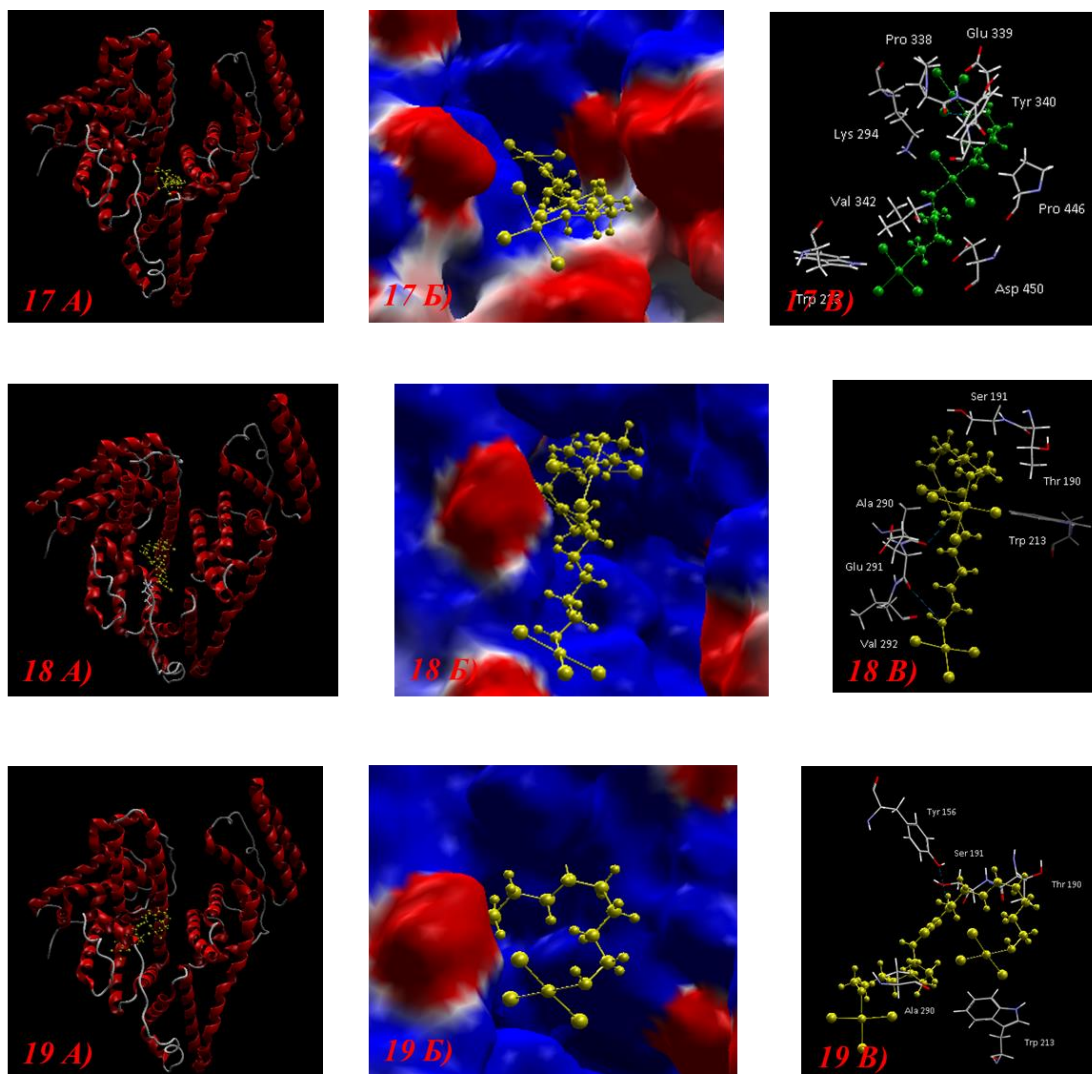
Табела 29. Вредности DNA докинга са комплексима **14** – **19**¹⁷⁰

	MolDock	Docking	Rerank
14	-119,940	-69,218	-117,473
15	-141,179	-81,493	-135,363
16	-138,377	-79,612	-134,255
17	-148,701	-80,249	-132,480
18	-178,235	-95,343	-136,927
19	-185,261	-95,049	-166,871

Докинг резултати из MVD програма, приказани на слици 102 за динуклеарне и на слици 103 за тринуклеарне комплексе, показали су да се комплекси **14** – **19** везују за под-домен IIA (страна I) BSA, што је у сагласности са експерименталним резултатима. Према MolDock, Docking, Rerank и Hbond вредностима (Табела 30), највећи афинитет везивања такође показује комплекс **19**. Ови резултати су дефинитивно потврдили да хидрофобне и електростатичке интеракције, као и водоничне везе, имају важну улогу у процесу везивања Au(III) комплекса за BSA.²³¹



Слика 102. Најбољи положаји за комплексе **14** – **16** са BSA према Hbond вредностима:
 А) резултати молекулског докинга за динуклеарне Au(III) комплексе и BSA;
 Б) комплекси уграђени унутар активне стране BSA у електростатичком погледу;
 В) везујуће стране комплекса **14** – **16** за BSA и са одабраним аминокиселинским остацима представљене помоћу штапног модела. Водоничне везе су приказане плавим испрекиданим линијама¹⁷⁰



Слика 103. Најбољи положаји за комплексе **17 – 19** са BSA према Hbond вредностима:
 А) резултати молекулског докинга за тринуклеарне Au(III) комплексе и BSA;
 Б) комплекси уграђени унутар активне стране BSA у електростатичком погледу;
 В) везујуће стране комплекса **17 – 19** за BSA и са одабраним аминокиселинским остацима представљене помоћу штапног модела. Водоничне везе су приказане плавим испрекиданим линијама¹⁷⁰

Табела 30. Резултати докинга за комплексе **14** – **19** са BSA¹⁷⁰

	MolDock	Docking	HBond	Rerank
14^a	-89,841	-60,484	-0,120	-90,413
14^b	-87,251	-60,934	-0,797	-86,555
15^a	-104,437	-77,520	-0,001	-100,885
15^b	-101,654	-74,746	-1,519	-95,068
16^{ab}	-109,073	-79,894	-0,725	-108,971
17^a	-130,896	-125,655	-1,860	-93,766
17^b	-120,011	-122,715	-2,465	-88,554
18^a	-143,585	-139,862	-1,498	-101,451
18^b	-128,264	-125,148	-2,924	-86,730
19^a	-156,648	-147,947	-0,117	-156,648
19^b	-132,637	-124,799	-2,651	-27,354

^aНајбољи положаји комплекса према MolDock, Docking, и Rerank функцијама бодовања.

^bНајбољи положаји комплекса према Hbond функцији бодовања.

3.2.1.4. Испитивање цитотоксичности

In vitro цитотоксична активност комплекса **14** – **19** и K[AuCl₄] на епителним ћелијским линијама канцера дојке (MDA-MB-231) и колоректалног канцера (HCT-116), као и на ћелијским линијама нормалног хуманог фибробласта плућа (MRC-5), испитивана је помоћу МТТ теста. Комплекси **14** – **19** значајно редукују одрживост MDA-MB-231 ћелијске линије у зависности од времена и дозе са коефицијентом корелације $R > -0,9$. Такође, тестирани Au(III) комплекси значајно, у зависности само од дозе, редукују HCT-116 и MRC-5 ћелијске линије.

Добијени резултати за IC₅₀ вредности су упоређени са публикованим резултатима за K[AuCl₄] и цисплатину, који су коришћени као позитивна контрола.²¹⁹ Тринуклеарни комплекси **17** и **18** показали су најзначајнији цитотоксични ефекат на HCT-116 ћелијама (IC₅₀ < 25 µM, Табела 29), док су динуклеарни комплекси показали значајну цитотоксичну активност на MDA-MB-231, након 24 h и 72 h, у поређењу са цисплатином.²¹⁹

Генерално, Au(III) комплекси показују селективну цитотоксичну активности (Табела 31) са највећим ефектом на ћелијске линије колоректалног канцера (HCT-116). Такође, показују значајан цитотоксични ефекат у поређењу са цисплатином,²¹⁹ али и са другим тестираним једињењима, попут комплекса Pt(IV),²³² селенијум–хидантоин–Pd(II) комплекса²³³ и хелатног–N,O–Pd(II) комплекса.^{219,234} Узимајући у обзир ове чињенице, испитивани полинуклеарни комплекси имају добре предиспозиције за даља испитивања потенцијалне антитуморске активности.

Табела 31. Цитотоксични ефекат - IC₅₀ вредности (μM) Au(III) комплекса (**14** – **19**) и K[AuCl₄] на HCT-116, MDA-MB-231 и MRC-5 ћелијским линијама¹⁷⁰

	IC ₅₀ [μM]					
	MDA-MB-231		HCT-116		MRC-5	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h
14	95,86	89,37	72,62	29,88	57,36	62,88
15	88,84	52,83	56,5	52,03	58,51	57,72
16	77,07	58,54	60,17	37,16	34,23	53,27
17	98,17	75,05	0,25	15,88	51,78	89,23
18	93,92	52,78	23,28	24,18	28,37	29,97
19	98,07	61,67	63,34	133,87	63,81	83,10
K[AuCl₄]	101,29	150,73	>200	180,36	230,49	107,39

Добијени резултати су показали да повећање дужине ланца диаминa утиче на повећање хидрофобних карактеристика и флексибилности једињења, омогућавајући лакши продор у ћелију. Детаљна анализа биотрансформације Au(III) комплекса у нормалним и канцерогеним ћелијама, као и њихови проапоптотски и литски/некротични ефекти, су циљеви будућих истраживања.



4. ЗАКЪУЧАК

На основу добијених резултата у оквиру ове докторске дисертације могу се извести следећи закључци:

- Синтетисани су нови мононуклеарни комплекси Au(III) јона са дериватима *bis*-пиразолилпиридина (**1** – **3**), пиразола (**4** – **8**) и 1,10-фенантролина (**9**, **10**) као инертним азот-донорским лигандима, као и полинуклеарни Au(III) комплекси са алифатичним диаминима као мостним лигандима (**14** – **19**).
- Сви комплекси су окарактерисани елементалном анализом, мерењем електричне проводљивости и различитим аналитичким методама (UV-Vis, IR, ^1H и ^{13}C NMR, MALDI-TOF/ESI-MS), док је структура једног од лиганада из групе деривата пиразола (**L2**) потврђена рендгенском структурном анализом.
- Резултати изучавања супституционих реакција показали су да редослед реактивности изучаваних комплекса Au(III) јона јако зависи од структурних и електронских карактеристика инертних лиганада.
- Реактивност коришћених нуклеофила зависи од врсте донорског атома. Наиме, сумпор-донорски нуклеофили (Tu, L-Cys, L-Met, GSH) су у већини случајева показали бољу реактивност у односу на азот-донорске нуклеофиле (5'-GMP, Guo).
- Резултати испитивања интеракција комплекса са DNA су потврдили да се комплекси **1** – **3**, **9** – **10**, **14** – **19** везују интеркалацијом, док се комплекси са дериватима пиразола (**4** – **8**) везују у жлебовима. Докинг методама потврђени су експериментално добијени резултати.
- За комплексе **4** – **10** и **14** – **19** потврђено је формирање продукта са BSA, док су резултати молекулског докинга показали да се комплекси везују за џепове на страни I серум албумина.
- Резултати биолошких испитивања су показали да комплекс **1** индукује ћелијску смрт на A549, A375 и LS-174 ћелијским линијама у зависности од дозе, утиче на повећање процената ћелија у раној и у касној апоптози на A375 и утиче на ниво реактивних кисеоничних врста. Комплекси **9** и **10** су показали јаку цитотоксичну активност у поређењу са цисплатином на HCT-116 и MDA-MB-231 ћелијским линијама, али и малу селективност према здравим ћелијама, док су тринуклеарни комплекси **17** и **18** показали значајан цитотоксични ефекат на HCT-116.
- На основу свих резултата може се закључити да су тринуклеарни комплекси (**17** – **18**) показали највећу стабилност у физиолошким условима, високе вредности константи везивања за DNA и BSA, као и обећавајућу биолошку активност. Засновано на IC_{50} вредностима, ови комплекси поседују потенцијал за даља испитивања.
- Генерално, резултати добијени у оквиру ове дисертације могу допринети развоју неорганске, координационе, бионеорганске и медицинске хемије, јер омогућавају боље разумевање везе између структуре, хемијских и биолошких карактеристика комплекса Au(III) јона, у циљу проналазка једињења које поседује потенцијалну антитуморску активност.



5. ЛИТЕРАТУРА

1. R. Uson, *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.*, 1978, **8**, 503-504.
2. C. F. Shaw III, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2589-2600.
3. P. J. Sadler, Z. Guo, *Pure & Appl. Chem.*, 1998, **70**, 863-871.
4. M. Gielen, E. R. T. Tiekink, *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005, p507-527.
5. W. E. Smith, J. Reglinski, *Perspect. Bioinorg. Chem.*, 1991, **1**, 183-208.
6. A. Casini, C. Hartinger, C. Gabbiani, E. Mini, P. J. Dyson, B. K. Keppler, L. Messori, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 564-575.
7. C. F. Shaw, *Comments on Inorganic Chemistry: A Journal of Critical Discussion of the Current Literature*, 1989, **8**, 233-267.
8. E. R. T. Tiekink, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2002, **42**, 225-248.
9. S. Nobili, E. Mini, I. Landini, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *J. Med. Chem.*, 2009, **43**, 3541-3548.
10. P. J. Sadler, *Biochemistry*, 1976, **29**, 171-214.
11. P. J. Sadler, *Gold Bull.*, 1976, **9**, 110-118.
12. B. M. Sutton, *Gold Bull.*, 1986, **19**, 15-16.
13. P. I. da Silva Maia, V. M. Deflon, U. Abram, *Future Med. Chem.*, 2014, **6**, 1515-1536.
14. M. Cini, T. D. Bradshaw, S. Woodward, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**, 1040-1051.
15. P. D'Arcy Hart, *Br. Med. J.*, 1946, **2**, 805-810.
16. J. Forestier, *Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris*, 1929, **2**, 287.
17. S. M. Cottrill, H. L. Sharma, D. B. Dyson, R. V. Parish, C. A. McAuliffe, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1989, **1**, 53-58.
18. C. Corti, R. Holliday, *Gold, Science and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 2010, ch. 10
19. C. M. Che, R. W. Y. Sun, W. Y. Yu, C. B. Ko, N. Zhu, H. Sun, *Chem. Comm.*, 2003, **3**, 1718-1719.
20. W. E. Smith, J. Reglinski, S. Hoey, D. H. Brown, R. D. Sturrock, *Inorg Chem.*, 1990, **29**, 5190-5196.
21. A. K. H. Al-Sa'ady, C. A. McAuliffe, K. Moss, R. V. D. Parish, R. Fields, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1984, 491-493.
22. C. F. Shaw III, *Top. Biol. Inorg. Chem.*, 1999, **2**, 187.
23. A. A. Isab, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1982, 135-141.
24. R. H. Thompson, V. P. Whittaker, *Biochem. J.*, 1947, **41**, 342-346.
25. D. T. Hill, *Med. Clin. North Am.*, 1968, **52**, 733.
26. A. Casini, L. Messori, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2011, **11**, 2647-2660.
27. R. Eisler, *J. Inflamm. Res.*, 2003, **52**, 487-501.
28. G. Lewis, C. F. Shaw, *Inorg. Chem.*, 1986, **25**, 58-62.
29. A. J. Canumalla, S. Schraa, A. A. Isab, C. F. Shaw, E. Gleichmann, L. Dunemann, M. Turfeld, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1998, **3**, 9-17.
30. J. Talib, J. L. Beck, S. F. Ralph, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2006, **11**, 559-570.
31. M. D. Đurović, Ž. D. Bugarčić, R. Van Eldik, *Coord. Chem. Rev.*, 2017, **338**, 186-206.
32. A. Laguna, *Modern Supramolecular Gold Chemistry*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008.
33. L. S. Hollins, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 4293-4299.
34. A. M. Mazany, J. P. Fackler, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 801-802.

35. R. G. Raptis, L. C. Porter, H. H. Murray, J. P. Fackler, R. J. Emrich, *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 4408–4412.
36. K. Ortner, L. Hilditch, Y. Zheng, J. R. Dilworth, U. Abram, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 2801–2806.
37. M. J. Calhorda, F. Canales, M. C. Gimeno, J. Jiménez, P. G. Jones, A. Laguna, L. F. Veiros, *Organometallics*, 1997, **16**, 3837–3844.
38. F. Mendizabal, P. Pyykkö, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2004, **6**, 900–905.
39. S. Canales, O. Crespo, M. C. Gimeno, P. G. Jones, A. Laguna, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 7234–7238.
40. A. Đeković, B. Petrović, Ž. D. Bugarčić, R. Puchta, R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 3633–3641.
41. F. Abbate, P. Orioli, B. Bruni, G. Marcon, L. Messori, *Inorg. Chim. Acta*, 2000, **311**, 1–5.
42. L. Messori, F. Abbate, G. Marcon, P. Orioli, M. Fontani, E. Mini, T. Mazzei, S. Carotti, T. O’Connell, P. Zanello, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 3541–3548.
43. J. Vincente, M. T. Chicote, M. D. Bermúdez, P. G. Jones, C. Fittschen, G. M. Sheldrick, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1986, 2361–2366.
44. L. S. Hollis, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 4293–4299.
45. A. J. Canty, N. G. Minchin, P. C. Healy, A. H. White, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1982, 1795–1802.
46. A. L. Bandini, G. Banditelli, F. Bonati, G. Minghetti, M. T. Pinillos, *Inorg. Chim. Acta*, 1985, **99**, 165–168.
47. M. A. Cinellu, L. Maiore, M. Manassero, A. Casini, M. Arca, H. H. Fiebig, G. Kelter, E. Michelucci, G. Pieraccini, C. Gabbiani, L. Messori, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2010, **1**, 336–339.
48. C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, A. Guerri, M. A. Cinellu, G. Minghetti, M. Corsini, C. Rosani, P. Zanello, M. Arca, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 2368–2379.
49. M. Arsenijevic, M. Milovanovic, V. Volarevic, A. Djekovic, T. Kanjevac, N. Arsenijevic, S. Dukic, Z. D. Bugarcic, *Med. Chem.*, 2012, **8**, 2–8.
50. S. S. Al-Jaroudi, M. Fettouhi, M. I. M. Wazeer, A. A. Isab, S. Altuwaijri, *Polyhedron*, 2013, **50**, 434–442.
51. M. Serratrice, M. A. Cinellu, L. Maiore, M. Pilo, A. Zucca, C. Gabbiani, A. Guerri, I. Landini, S. Nobili, E. Mini, L. Messori, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 3161–3171.
52. M. Serratrice, F. Edafe, F. Mendes, R. Scopelliti, S. M. Zakeeruddin, M. Grätzel, I. Santos, M. A. Cinellu, A. Casini, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 3287–3293.
53. A. M. Brun, A. Harriman, V. Heitz, J. P. Sauvage, J. P. Sauvage, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 8657–8663; K. Kilså, J. Kajanus, A. N. Macpherson, J. Mårtensson, B. Albinsson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 3069–3080.
54. S. Mori, A. Osuka, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 8030–8031.
55. B. Bertrand, M. R. M. Williams, M. Bochmann, *Chem. Eur. J.*, 2018, **24**, 11840–11851.
56. Y. Wang, Q. Y. He, R. W. Y. Sun, C. M. Che, J. F. Chiu, *Cancer Res.*, 2005, **65**, 11553–11564.
57. C. T. Lum, L. Huo, R. W. Y. Sun, M. Li, H. F. Kung, C. M. Che, M. C. M. Lin, *Acta Oncol.*, 2011, **50**, 719–726.
58. L. Sun, H. Chen, Z. Zhang, Q. Yang, H. Tong, A. Xu, C. Wang, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **108**, 47–52.
59. J. J. Yan, R. W. Y. Sun, P. Wu, M. C. M. Lin, A. S. C. Chan, C. M. Che, *Dalton Trans.*,

- 2010, **39**, 7700–7705.
60. R. G. Buckley, A. M. Elsome, S. P. Fricker, G. R. Henderson, B. R. C. Theobald, R. V. Parish, B. P. Howe, L. R. Kelland, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 5208–5214.
61. U. Abram, J. Mack, K. Ortner, M. Müller, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1998, 1011–1020.
62. C. Gabbiani, A. Casini, G. Kelter, F. Cocco, M. A. Cinellu, H. H. Fiebig, L. Messori, *Metallomics*, 2011, **3**, 1318–1323.
63. W. Liu, R. Gust, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 755–773.
64. W. Liu, K. Bensdorf, M. Proetto, U. Abram, A. Hagenbach, R. Gust, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 8605–8615.
65. R. W. Y. Sun, D. L. Ma, E. L. M. Wong, C. M. Che, *Dalton Trans.*, 2007, 4884–4892.
66. J. J. Yan, A. L. F. Chow, C. H. Leung, R. W. Y. Sun, D. L. Ma, C. M. Che, *Chem. Comm.*, 2010, **46**, 3893–3895.
67. W. P. To, T. Zou, R. W. Y. Sun, C. M. Che, *Philos. Trans. Royal Soc. A*, 2013, **371**, 20120126.
68. X. S. Xiao, W. L. Kwong, X. Guan, C. Yang, W. Lu, C. M. Che, *Chem. Eur. J.*, 2013, **19**, 9457–9462.
69. T. Zou, C. T. Lum, S. S. Y. Chui, C. M. Che, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 2930–2933.
70. M. A. Cinellu, G. Minghetti, M. V. Pinna, S. Stoccoro, A. Zucca, M. Manassero, *Chem. Comm.*, 1998, **21**, 2397–2398.
71. A. Casini, M. A. Cinellu, G. Minghetti, C. Gabbiani, M. Coronello, E. Mini, L. Messori, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 5524–5531.
72. R. V. Parish, *Interdiscip. Sci. Rev.*, 1992, **17**, 221–228.
73. F. Canales, S. Canales, O. Crespo, M. C. Gimeno, P. G. Jones, A. Laguna, *Organometallics*, 1998, **17**, 1617.
74. A. L. Balch, V. J. Catalano, B. C. Noll, M. M. Olmstead, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 7558–7566.
75. L. Ronconi, D. Aldinucci, Q. Ping Dou, D. Fregona, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2012, **10**, 283–292.
76. H. Zhao, L. Zhou, *Comput. Theor. Chem.*, 2012, **979**, 22–32.
77. C. Marzano, L. Ronconi, F. Chiara, M. C. Giron, I. Faustinelli, P. Cristofori, A. Trevisan, D. Fregona, *Int. J. Cancer Res.*, 2011, **129**, 487–496.
78. Y. Shi, W. Chu, Y. Wang, S. Wang, J. Du, J. Zhang, S. Li, G. Zhou, X. Qin, C. Zhang, *Inorg. Chem. Comm.*, 2013, **30**, 178–181.
79. M. Negom Kouodom, L. Ronconi, M. Celegato, C. Nardon, L. Marchiò, Q. P. Dou, D. Aldinucci, F. Formaggio, D. Fregona, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 2212–2226.
80. J. R. Dilworth, R. Hueting, *Inorg. Chim. Acta*, 2012, **389**, 3–15.
81. U. Abram, K. Ortner, R. Gusf, K. Sommer, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2000, 735–744.
82. K. S. O. Ferraz, J. G. Da Silva, F. M. Costa, B. M. Mendes, B. L. Rodrigues, R. G. dos Santos, H. Beraldo, *Biometals*, 2013, **26**, 677–691.
83. B. N. Bottenus, P. Kan, T. Jenkins, B. Ballard, T. L. Rold, C. Barnes, C. Cutler, T. J. Hoffman, M. A. Green, S. S. Jurisson, *Nucl. Med. Biol.*, 2010, **37**, 41–49.
84. A. Nakajama, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **19**, 369–374.
85. F. Liu, R. Anis, E. Hwang, R. Ovalle, A. Varela-Ramírez, R. J. Aguilera, M. Contel, *Molecules*, 2011, **16**, 6701–6720.
86. P. N. Fonteh, F. K. Keter, D. Meyer, *J. Inorg. Biochem.*, 2011, **105**, 1173–1180.

87. C. Gabbiani, L. Messori, M. A. Cinellu, A. Casini, P. Mura, A. R. Sannella, C. Severini, G. Majori, A. R. Bilia, F. F. Vincieri, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103**, 310–312.
88. P. I. da Silva Maia, A. G. d. A. Fernandes, J. J. N. Silva, A. D. Andricopulo, S. S. Lemos, E. S. Lang, U. Abram, V. M. Defflon, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, **104**, 1276–1282.
89. C. S. Cutler, H. M. Hennkens, N. Sisay, S. Huclier-Markai, S. S. Jurisson, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 858–883.
90. L. Ronconi, C. Marzano, P. Zanello, M. Corsini, G. Miolo, C. Macca, A. Trevisan, D. Fregona, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 1648–1657.
91. M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2013, **124**, 1–19.
92. R. Senthil Kumar, K. Sasikala, S. Arunachalam, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 234–241.
93. S. Rauf, J. J. Gooding, K. Akhtar, M. A. Ghauri, M. Rahman, M. A. Anwar, A. M. Khalid, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, **37**, 205–217.
94. J. K. Barton, A. T. Danishefsky, J. M. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 2172–2176.
95. A. A. R. Despaigne, J. G. D. Silva, P. R. D. Costa, R. G. D. Santos, H. Beraldo, *Molecules*, 2014, **19**, 17202–17220.
96. A. G. Krishna, D. V. Kumar, B. M. Khan, S. K. Rawal, K. N. Ganesh, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1381**, 104–112.
97. O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Crystallogr.*, 2009, **42**, 339–341.
98. L. Pérez Flores, A. J. Ruiz-Chica, J. G. Delcros, F. M. Sánchez-Jiménez, F. J. Ramirez, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2008, **69**, 1089–1096.
99. D. D. Li, J. L. Tian, W. Gu, X. Liu, S. P. Yan, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, **104**, 171–179.
100. P. Shi, Q. Jiang, Y. Zhao, Y. Zhang, J. Lin, L. Lin, J. Ding, Z. Guo, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2006, **11**, 745–752.
101. H. Q. Liu, T. C. Cheung, S. M. Peng, C. M. Che, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1995, 1787–1788.
102. L. Messori, G. Marcon, A. Innocenti, E. Gallori, M. Franchi, P. Orioli, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2005, **3**, 239–253.
103. T. P. Andrejević, D. P. Ašanin, N. D. Savić, N. Lj. Stevanović, M. I. Djuran, B. Đ. Glišić, DNA/BSA binding study of dinuclear gold(III) complexes with aromatic nitrogen-containing heterocycles as bridging ligands, *ICCBIG*, 2021, p312–315, doi:10.46793/iccbi21.312A
104. M. N. Patel, B. S. Bhatt, P. A. Dosi, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2013, **110**, 20–27.
105. N. Grover, T. W. Welch, T. A. Fairley, M. Cory, H. H. Thorp, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 3544–3548.
106. P. R. Chetana, R. Rao, M. Roy, A. K. Patra, *Inorg. Chim. Acta.*, 2009, **362**, 4692–4698.
107. M. Sankarganesh, J. D. Raja, N. Revathi, R. V. Solomon, R. S. Kumar, *J. Mol. Liq.*, 2019, **294**, 111655.
108. S. Moradi, D. Ajloo, T. Lashkarbolonki, R. Alizadeh, A. A. Saboury, *Monatsh. Chem.*, 2013, **144**, 1499–1505.
109. N. Arsenijević, V. Volarević, M. Milovanović, Ž. D. Bugarčić, *Gold(III) complexes, Cytotoxic effects, Encyclopedia of Metalloproteins*, eds., V. N. Uversky et al., Springer, New York, 2013, 922–927.
110. M. P. Kasalović, A. Petrović, J. M. Živković, L. Kuckling, V. V. Jevtić, J. Bogojeski, Z.

- B. Leka, S. R. Trifunović, N. Đ. Pantelić, *J. Mol. Struct.*, 2021, **1229**, 129622.
111. M. Carreira, R. Calvo-Sanjuán, M. Sanaú, X. Zhao, R. S. MAgliozzo, I. Marzo, M. Contel, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **116**, 204-214.
112. S. M. Cutts, A. Masta, C. Panousis, P. G. Parsons, R. A. Sturm, D. R. Phillips, *Meth. Mol. Biol.*, 1997, **90**, 95-106.
113. T. Yang, C. Tu, J. Zhang, L. Lin, X. Zhang, Q. Liu, J. Ding, Q. Xu, Z. Guo, *Dalton Trans.*, 2003, 3419-3424.
114. F. Abyar, L. Tabrizi, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2018, **37**, 3366-3378.
115. L. Tabrizi, P. McArdle, A. Erxleben, H. Chiniforoshan, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **103**, 516-529.
116. J.-G. Liu, Q.-L. Zhang, X.-F. Shi, L.-N. Ji, *Inorg. Chem.*, 2001, **40**, 5045-5055.
117. R. M. Dreizler, K. U. Gross, *Density Functional Theory*, Springer, Berlin, 1990.
118. G. Marcon, L. Messori, P. Orioli, M. A. Cinellu, G. Minghetti, *Eur. J. Biochem.*, 2003, **270**, 4655-4661.
119. X. M. He, D. C. Carter, *Nature*, 1992, **358**, 209-215.
120. E. Bourdon, N. Lorean, D. Blache, *FASEB J*, 1999, **13**, 233-244.
121. W. Christodoulou, P. J. Sadler, A. Tucker, *J. Inorg. Biochem.*, 1998, **70**, 33-39.
122. M. T. Larsen, M. Kuhlmann, M. L. Hvam, K. A. Howard, *Mol. Cell. Ther.*, 2016, **4**, 3-15.
123. K. M. Sand, M. Bern, J. Nilsen, H. T. Noordzij, I. Sandlie, *Front. Immunol.*, 2014, **5**, 682.
124. S. Wang, S. Liu, Y. Zhang, J. He, D. H. Coy, *Health Sci. J.*, 2020, **14**, 1-8.
125. E. L. Gelamo, M. Tabak, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2000, **56**, 2255-2271.
126. M. F. Alam, S. Varshney, M. A. Khan, A. A. Laskar, H. Younus, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, **113**, 300-308.
127. P. E. Pjura, K. Grzeskowiak, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.*, 1987, **197**, 257-271.
128. N. Shahabadi, M. Maghsudi, *Mol. Biosyst.*, 2014, **10**, 338-347.
129. K. Karami, Z. M. Lighvan, S. A. Barzani, A. Y. Fall, M. Poshteh-Shirani, T. Khayamian, V. Eigner, M. Dušek, *New J. Chem.*, 2015, **39**, 8708-8719.
130. A. Pratesi, D. Cirri, D. Fregona, G. Ferraro, A. Giorgio, A. Merlino, L. Messori, *Inorg. Chem.*, 2019, **58**, 10616-10619.
131. J. M. Dixon, S. Egusa, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 2265-2271.
132. S. Govindaraju, S. R. Ankireddy, B. Viswanth, J. Kim, K. Yun, *Sci. Rep.*, 2017, 40298.
133. B. Feher, J. Lyngso, B. Bartok, J. Mihaly, Z. Varga, R. Meszaros, J. S. Pedersin, A. Bota, I. Varga, *J. Mol. Liq.*, 2020, **309**, 113065.
134. H. Alsamamra, I. Hawwarin, S. Abu-Sharkh, M. Abuteir, *J. Bioanal. Biomed.*, 2018, **10**, 43-49.
135. D. B. Kitchen, H. Decornez, J. R. Furr, J. Bajorath, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2004, **3**, 935-949.
136. N. Moitessier, P. Englebienne, D. Lee, J. Lawandi, C. R. Corbeil, *Br. J. Pharmacol.*, 2008, **153**, S7-S26.
137. M. A. Phillips, M. A. Stewart, D. L. Woodling, Z.-R. Xie, *Has Molecular Docking Ever Brought us a Medicine?*, 2018, ch. 8.
138. X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, M. Cui, *Curr. Comput. Aided Drug Des.*, 2011, **7**, 146-157.
139. P. D. J. Grootenhuis, P. A. Kollman, G. L. Seibel, R. L. DesJarlais, I. D. Kuntz, *Anticancer Drug Des.*, 1990, **5**, 237-242.

140. K. Chen, S. J. Adelstein, A. I. Kassis, *J. Mol. Struct. THOCHEM*, 2004, **711**, 49-56.
141. T. Tuttle, E. Kraka, D. J. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 9469-9484.
142. A. Lauria, C. Petella, M. Ippolito, A. M. Almerico, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 2007, **819**, 26-31.
143. P. A. Holt, J. B. Chaires, J. O. Trent, *J. Chem. Inf. Model*, 2008, **48**, 1602-1615.
144. L. H. Hurley, *Nat. Rev. Cancer*, 2002, **2**, 188-199.
145. R. E. Dickerson, H. R. Drew, B. N. Conner, R. M. Wing, A. V. Fratini, M. L. Kopka, *Science*, 1982, **216**, 475-485.
146. R. E. Dickerson, *Meth. Enzymol.*, 1992, **211**, 67-111.
147. A. T. Phan, V. Kuryavyi, D. J. Patel, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2006, **16**, 288-298.
148. C. G. Ricci, P. A. Netz, *J. Chem. Inf. Model*, 2009, **49**, 1925-1935.
149. W. T. Robinson, E. Sinn, *J. Chem. Soc. - Dalton Trans.*, 1975, 726-731.
150. S. K. Pawar, S. Jaldappagari, *J. Pharm. Anal.*, 2019, **9**, 274-283.
151. C. H. Langford, H. B. Gray, in *Ligand Substitution Processes*, Benjamin, New York, 1974, ch.2.
152. I. Gal, in *Mehanizmi neorganskih reakcija*, Naučna knjiga, 1979, ch.2 and 3.
153. J. H. Epsen, in *Chemical Kinetics and Reaction Mechanism*, 2nd ed, McGraw Hill, New York, 1995, ch. 2 and 6.
154. M. L. Tobe, J. Burgess, *Inorganic Reaction Mechanisms*, Addison Wesley Longman Inc, Essex, 1999, 70-112.
155. J. Burges, C. D. Hubbard, in *Advances in Inorganic Chemistry*, eds., R. van Eldik, C. D. Hubbard, Elsevier, Amsterdam, 2003, ch. 2.
156. J. Korzekwa, A. Scheurer, F. W. Heinemann, K. Meyer, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 13811-13823.
157. K. A. Meadows, F. Liu, J. Sou, B. P. Hudson, D. R. McMillin, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 2919-2923.
158. Rigaku Oxford Diffraction, CrysAlisPRO Software System, version 1.171.40.68a, 2019, Rigaku Corporation, Oxford, UK.
159. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A*, 2015, **71**, 3-8.
160. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. C*, 2015, **71**, 3-8.
161. S. Radisavljević, I. Bratsos, A. Scheurer, J. Korzekwa, R. Masnikosa, A. Tot, N. Gligorijević, S. Radulović, A. Rilak-Simović, *Dalton Trans.*, 2018, **47**, 13696-13712.
162. S. Radisavljević, A. Scheurer, D. Bockfeld, D. Čoćić, R. Puchta, L. Senft, M. Pešić, I. Damjanović, B. Petrović, *Polyhedron*, 2021, **209**, 115446.
163. S. Radisavljević, A. Đeković-Kesić, D. Čoćić, R. Puchta, L. Senft, M. Milutinović, N. Milivojević, B. Petrović, *New J. Chem.*, 2020, **44**, 11172-11187.
164. N. S. Akhmadullina, A. O. Borissova, I. A. Garbuzova, V. M. Retivov, R. A. Sandu, Y. F. Kargin, O. N. Shishilov, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 2013, **639**, 392-397.
165. P. M. Olsen, C. Ruiz, D. Lussier, B. K. Le, N. Angel, M. Smith, C. B. Hwang, R. Khatib, J. Jenkins, K. Adams, J. Getcher, F. Tham, Z. G. Chen, E. H. Wilson, J. F. Eichler, *J. Inorg. Biochem.*, 2014, **141**, 121-131.
166. R. Ahmadi, V. Amani, H. R. Khavasi, *Acta Crystallogr.*, 2008, **E64**, 1156-1157.
167. S. Radisavljević, A. Đeković-Kesić, S. Jovanović, B. Petrović, *Transit. Met. Chem.*, 2018, **43**, 331-338.
168. L. Cao, M. C. Jennings, R. J. Puddephatt, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 1361-1368.

169. G. Nardin, L. Randaccio, G. Annibale, G. Natile, B. Pitteri, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1979, **15**, 220-223.
170. S. Radisavljević, D. Ćoćić, S. Jovanović, B. Šmit, M. Petković, N. Milivojević, N. Planojević, S. Marković, B. Petrović, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2019, **24** 1057-1076.
171. a) P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.*, 1985, **82** 270-283. b) P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.*, 1985, **82**, 284-298. c) P. J. Hay, W. R. Wadt, *J. Chem. Phys.*, 1985, **82**, 299-310.
172. F. Dimiza, S. Fountoulaki, A. N. Papadopoulos, C. A. Koutogiorgis, V. Tangoulis, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, A. Terzis, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 8555-8568.
173. a) A. D. Becke, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 5648-5652. b) C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B*, 1988, **37**, 785-789. c) P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski, M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 11623-11627.
174. R. A. Kendal, T. H. Jr Dunning, R. J. Harrison, *J. Chem. Phys.*, 1992, **96**, 6796-6806.
175. H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1981, **78**, 2179-2183.
176. Schrödinger Suite, Protein Preparation Wizard. Schrödinger, LLC; New York, 2015
177. R. Thomsen, M. H. Christensen, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 3315-3321.
178. M. Rostowski, M. Olsson, C. Sondergaard, J. Jensen, *BMC Struct. Biol.* 2011, **11**, 1-6.
179. W. L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2005, **102**, 6665-6670.
180. (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>)
181. R. Supino, *In vitro Toxicity Testing Protocols*, Springer, New York, 1995, p. 37-149.
182. CalcuSyn, v 2.1, BioSoft, Great Shelford Cambridge UK, 2009.
183. M. G. Ormerod, *Analysis of DNA-General Methods. Flow Cytometry, a Practical Approach*, Oxford University Press, New York, 1994, p119.
184. E. Eruslanov, S. Kusmartsev, *Methods Mol. Biol.*, 2010, **594**, 57-72.
185. L. Messori, P. Orioli, C. Tempi, G. Marcon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, **281**, 352-360.
186. L. H. Skibsted, in: A. G. Skypes, (Ed.), *Advances in Inorganic and Bioinorganic Mechanisms*, Academic Press, 1986, 137-183.
187. A. Tarushi, E. Polatoglou, J. Kljun, I. Turel, G. Psomas, D. P. Kessissoglou, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 9461-9473.
188. A. Tarushi, K. Lafazanis, J. Kljun, I. Turel, A. A. Pantazaki, G. Psomas, D. P. Kessissoglou, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **121**, 53-65.
189. A. Tarushi, G. Psomas, C. P. Raptopoulou, D. P. Kessissoglou, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103**, 898-905.
190. D. Wlodkowic, W. Telford, J. Skommer, Z. Darzynkiewicz, *Methods Cell Biol.*, 2011, **103**, 55-98.
191. X. Sun, B. Shi, H. Zheng, L. Min, J. Yang, X. Li, X. Liao, W. Huang, M. Zhang, S. Xu, Z. Zhu, H. Cui, X. Liu, *Cell Death Discov.*, 2018, **9**, 260.
192. I. R. Canelón, M. Mos, P. J. Sadler, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 7874-7880.
193. M. T. Ramen, *Med. Chem.*, 2015, **5**, 37-39.
194. H. H. W. Chen, M. T. Kuo, *Met.-Based Drugs*, 2010, **2010**, 430939.
195. N. U. Perišić-Janjić, S. O. Podunavac-Kuzmanović, J. S. Balaž, Đ. S. Vlaović, *Acta Period. Technol.*, 1998-1999, **29-30**, 173-181.

196. S. O. Podunavac-Kuzmanović, Lj. S. Vojinović, *Acta Period. Technol.*, 2003, **34**, 119-124.
197. A. Casini, G. Kelter, C. Gabbiani, M. A. Cinellu, G. Minghetti, D. Fregona, H.-H. Fiebig, L. Messori, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, **14**, 1139-1149.
198. A. Petrović, M. M. Milutinović, E. T. Petri, M. Živanović, N. Milivojević, R. Puchta, A. Scheurer, J. Korzekwa, O. R. Klisurić, J. Bogojeski, *Inorg. Chem.*, 2019, **58**, 307-319.
199. N. Summa, T. Soldatović, L. Dahlenburg, Ž. D. Bugarčić, R. van Eldik, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2007, **12**, 461-475.
200. S. Pourbeyram, M. Soltanpour, S. Fathalipour, *Anal. Sci.*, 2019, **35**, 739-743.
201. S. Zhu, W. Gorski, D. R. Powell, J. A. Walmsley, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 2688-2694.
202. C. Metcalfe, C. Rajput, J. A. Thomas, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 1314-1319.
203. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Plenum Press, New York, 2006.
204. M. G. Wen, X. B. Zhang, J. N. Tian, S. H. Ni, H. D. Bian, Y. L. Huang, H. Liang, *J. Solution Chem.*, 2009, **38**, 391-401.
205. A. Zianna, G. D. Geromichalos, A. G. Hatzidimitriou, E. Coutouli-Argyropoulou, M. Lalia-Kantouri, G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.*, 2019, **194**, 85-96.
206. S. Singh, K. Sharma, S. K. Awasthi, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 85854-85861.
207. J. Kljun, I. Bratsos, E. Alessio, G. Psomas, U. Repnik, M. Butinar, B. Turk, I. Turel, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**, 9039 – 9052.
208. G. L. Warren, C. W. Andrews, A. M. Capelli, B. Clarke, J. LaLonde, M. H. Lambert, M. Lindvall, N. Nevins, S. F. Semus, S. Senger, G. Tedesco, I. D. Wall, J. M. Woolven, C. E. Peishoff, M. S. Head, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 5912-5931.
209. F. Dimiza, F. Perdih, V. Tangoulis, I. Turel, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.*, 2011, **105**, 476-489.
210. M. T. Ashby, *Comments Inorg. Chem.*, 1990, **10**, 297-313.
211. N. Pantelić, D. M. Stanković, B. B. Zmejkovski, G. N. Kaluđerović, T. J. Sabo, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2016, **11**, 1162-1171.
212. S. G. Murray, F. R. Hartley, *Chem. Rev.*, 1981, **81**, 365-414.
213. P. J. Sadler, R. E. Sue, *Met.-Based Drugs*, 1994, **1**, 107-144.
214. K. C. Skyrianou, F. Perdih, I. Turel, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, **104**, 740-749.
215. A. Tarushi, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, A. Terzis, G. Psomas, D. P. Kessissoglou, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 2678-2685.
216. J. L. García-Giménez, M. González-Álvarez, M. Liu-González, B. Macías, J. Borrás, G. Alzuet, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103**, 923-934.
217. J. Liu, H. Zhang, C. Chen, H. Deng, T. Lu, L. Ji, *Dalton Trans.*, 2003, 114-119.
218. Y. Wang, H. Zhang, G. Zhang, W. Tao, S. Tang, *J. Lumin.*, 2007, **126**, 211-218.
219. V. P. Petrović, M. N. Živanović, D. Simijonović, J. Djorović, Z. D. Petrović, S. D. Marković, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 86274-86281.
220. M. M. U. Mazumder, A. Sukul, S. K. Saha, A. A. Chowdhury, Y. Mamun, *Alexandria J. Med.*, 2018, **54**, 23-26.
221. K. Bielawski, A. Bielawska, T. Slodownik, B. Poplawska, U. Bolkun-Skórnicka, *Acta Pol. Pharm.*, 2008, **65**, 135-140.

- 222. M. M. Zarić, P. P. Čanović, M. S. Pirković, S. M. Knežević, R. S. Živković Zarić, B. Popovska Jovičić, N. Hamzagić, B. Simović Marković, N. Marković, A. Rilak Simović, *Vojnosanitetski pregled*, 2021, **78**, 865-873.
- 223. R. M. Smith, A. E Martell, *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York, 1989.
- 224. B. Pitteri, G. Marangoni, F. V. Viseutim, L. Cattalini, T. Bobbo, *Polyhedron*, 1998, **17**, 475-482.
- 225. B. V. Petrović, M. I. Djuran, Ž. D. Bugarčić, *Met.-Based Drugs*, 1999, **6**, 355-360.
- 226. D. Jaganyi, A. Hofmann, R. van Eldik, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 1680-1683.
- 227. Ž. D. Bugarčić, B. Petrović, E. Zangrando, *Inorg. Chim. Acta*, 2004, **357**, 2650-2656
- 228. M. Milovanović, A. Djeković, V. Volarević, B. Petrović, N. Arsenijević, Ž. D. Bugarčić, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, **104**, 944-949.
- 229. M. D. Đurović, Ž. D. Bugarčić, F. W. Heinemann, R. van Eldik, *Dalton Trans.*, 2014, **43**, 3911-3921.
- 230. B. Warżajtis, B. Đ. Glišić, N. D. Savić, A. Pavić, S. Vojnović, A. Veselinović, J. Nikodinović-Runić, U. Rychlewska, M. I. Djuran, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 2594-2608.
- 231. J. Wei, F. Jin, Q. Wu, Y. Jiang, D. Gao, *Talanta*, 2014, **126**, 116-121.
- 232. D. Lj. Stojković, V. V. Jevtić, G. P. Radić, D. S. Djacić, M. G. Curčić, S. D. Marković, V. M. Djinović, V. P. Petrović, S. R. Trifunović, *J. Molec. Struct.*, 2014, **1062**, 21-28.
- 233. M. N. Živanović, J. V. Košarić, B. Šmit, D. S. Šeklić, R. Z. Pavlović, S. D. Marković, *Gen. Physiol. Biophys.*, 2017, **36**, 187-196.
- 234. M. Milutinović, M. Stanković, D. Cvetković, V. Maksimović, B. Šmit, R. Pavlović, S. Marković, *J. Food Biochem.*, 2015, **39**, 238-250



6. ПРИЛОЗИ



Kinetics and mechanism of interactions of some monofunctional Au(III) complexes with sulphur nucleophiles

Snežana Radisavljević¹ · Ana Đeković Kesić² · Snežana Jovanović¹ · Biljana Petrović¹

Received: 23 January 2018 / Accepted: 23 February 2018 / Published online: 3 March 2018
© Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018

Abstract

Kinetics of the substitution reactions between monofunctional Au(III) complexes, $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$, $[\text{Au}(\text{bpma})\text{Cl}]^{2+}$ and $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ (dien = 3-azapentane-1,5-diamine, bpma = di-(2-picolyl) amine, terpy = 2,2';6',2''-terpyridine), and biologically relevant sulphur ligands, namely glutathione (GSH), L-methionine (L-Met) and L-cysteine (L-Cys), were studied in 0.1 M HCl (pH = 1.0). The reactions were followed under *pseudo*-first-order conditions as a function of ligand concentration and temperature using stopped-flow spectrophotometry. The $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ complex proved to be more reactive than the $[\text{Au}(\text{bpma})\text{Cl}]^{2+}$ and $[\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}]^{2+}$ complexes. The reactivities of the nucleophiles follow the same order for all three complexes, viz. L-Met > GSH > L-Cys. Values of the activation parameters of the reactions support an associative substitution mechanism. In order to confirm that these monofunctional Au(III) complexes undergo a single substitution process in strongly acidic medium, the reaction between $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]^{2+}$ and L-Met was studied by HPLC. At pH = 1.0, only one reaction product was detected.

Introduction

Following the major clinical successes achieved with platinum(II) complexes such as cisplatin towards a variety of cancers, the application of metal complexes in medicine and pharmacy has become a subject of investigation for many scientists over recent decades [1, 2]. However, the use of cisplatin in cancer therapy is often associated with significant disadvantages, including severe normal tissue toxicity and resistance to treatment [3]. Therefore, much attention has been focussed on the discovery of new and alternative metal complexes with improved cytotoxic properties and innovative modes of action [4–10]. In particular, gold compounds have received increased attention in recent years as potential anticancer agents [11, 12].

Gold(III) complexes have been extensively studied as prospective anticancer agents because they are structurally similar to Pt(II) compounds. In fact, Au(III) is isoelectronic with Pt(II) and also forms complexes with square planar geometry. However, under physiological conditions, Au(III) is often rapidly hydrolysed and reduced to Au(I) [13].

Nevertheless, published results show that some gold(III) complexes can display appreciable stability under physiological conditions. They can also be highly cytotoxic *in vitro* towards selected human tumour cell lines [14, 15]. On the other hand, some Au(III) complexes show only very weak interactions with calf thymus DNA and slight modifications of the double helix [16]. Overall, there is clear evidence that for some Au(III) complexes DNA is the primary target, while other complexes have significantly different modes of action.

Taking into account that their biological activities show positive and promising results [17–20] and due to the fact that the Au(III) ion has a high reduction potential, different strategies have been applied in order to synthesize complexes that will be stable under physiological conditions and also show promising cytotoxicity. These strategies are primarily concerned with the judicious selection of inert ligands, since it is known that the reduction potential of Au(III) complexes decreases when the number of aromatic nitrogen donor heterocycles in the coordination sphere increases [13].

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11243-018-0221-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Biljana Petrović
biljanap@kg.ac.rs

¹ Faculty of Science, University of Kragujevac, R. Domanovića 12, Kragujevac 34000, Serbia

² Department of Chemical-Technological Sciences, State University of Novi Pazar, V. Karadžića bb, Novi Pazar 36200, Serbia



Cite this: DOI: 10.1039/c8dt02903b

New gold pincer-type complexes: synthesis, characterization, DNA binding studies and cytotoxicity†‡

Snežana Radisavljević,^a Ioannis Bratsos,^b Andreas Scheurer,^c Jana Korzekwa,^c Romana Masnikosa,^d Aleksandar Tot,^e Nevenka Gligorijević,^f Siniša Radulović^f and Ana Rilak Simović^g *^a

With the aim of assessing whether Au(III) compounds with pincer type ligands might be utilized as potential antitumor agents, three new monofunctional Au(III) complexes of the general formula [Au(N–N′–N)Cl]₂, where N–N′–N = 2,6-bis(5-*tert*-butyl-1*H*-pyrazol-3-yl)pyridine (H₂L^{tBu}, **1**), 2,6-bis(5-*tert*-butyl-1-methyl-1*H*-pyrazol-3-yl)pyridine (Me₂L^{tBu}, **2**) or 2,6-bis((4*S*,7*R*)-1,7,8,8-tetramethyl-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-4,7-methanoindazol-3-yl)pyridine (Me₂*L, **3**) were synthesized. All complexes were characterized by elemental analysis, spectroscopic techniques (IR, UV-Vis, 1D and 2D NMR) and mass spectrometry (MALDI TOF MS). The chemical behavior of the complexes under physiological conditions was studied by UV-Vis spectroscopy, which showed that all compounds were remarkably stable and that the gold center remained in the 3+ oxidation state. The kinetics and the mechanism of the reaction of complexes **1–3** with guanine derivatives (*i.e.* guanosine (Guo) and guanosine-5′-monophosphate (5′-GMP)) and calf thymus DNA (CT DNA) were studied by stopped-flow spectroscopy. The three complexes displayed moderately different rate constants in their reactions with Guo, 5′-GMP and CT DNA, which can be explained by the steric hindrance and σ -donicity of the methyl substituent on the bis-pyrazolylpyridine fragment in complexes **2** and **3**. The measured enthalpies and entropies of activation ($\Delta H^\ddagger > 0$, $\Delta S^\ddagger < 0$) supported an associative mechanism for the substitution process. The interaction of the newly synthesized complexes **1–3** with CT DNA was investigated by UV-Vis and fluorescence spectroscopy, and also by viscosity measurements, which all indicated that complexes **1–3** bound to CT DNA with moderate binding affinity ($K_b = 1.6\text{--}5.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) and stabilized the duplex of CT DNA. Molecular docking indicated that complexes **1–3** interacted with DNA *via* intercalation. Complex **1** reduced the cell survival of all the investigated cell lines (A549, A375, and LS-174) with IC₅₀ values being up to 20 μM . We have shown that **1** induced perturbations of the cell cycle and led to apoptosis in human melanoma A375 cells. Complex **1** also affected the level of reactive oxygen species (ROS) in the same cells. However, pre-treatment of A375 cells with NAC (ROS scavenger) reversed the effect of **1** on their survival.

Received 17th July 2018,
Accepted 30th August 2018

DOI: 10.1039/c8dt02903b

rsc.li/dalton

^aUniversity of Kragujevac, Faculty of Science, R. Domanovića 12, P. O. Box 60, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: anarilak@kg.ac.rs; Fax: +381 (0)34 335040; Tel: +381 (0)34 300262^bI.N.N., Department of Physical Chemistry, NCSR “Demokritos”, 15310 Ag. Paraskevi, Athens, Greece^cInorganic Chemistry, Department of Chemistry and Pharmacy, University of Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany^dDepartment of Physical Chemistry, Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Mike Petrovića Alasa 12-14, 11000 Belgrade, Serbia^eUniversity of Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia^fInstitute for Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14, 11000 Belgrade, Serbia
†This work is dedicated to the deceased Prof. Dr Živadin D. Bugarčić, a great scientist in the field of bio-inorganic reaction mechanisms, teacher and a real friend.

‡Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8dt02903b

Introduction

In the last few years gold(III) complexes have attracted growing attention in the design of new metal-based anticancer therapeutics.^{1–6} Indeed, a number of structurally diverse gold(III) compounds were developed and tested both *in vitro* and *in vivo* with encouraging results.^{7–9} One of the major challenges of the medical development of Au(III) complexes is their stability in aqueous solutions.^{10–12} In order to enhance the stability of the Au(III) center, a number of several Au(III) complexes with multidentate ligands, namely [Au(en)Cl₂][Cl], [Au(dien)Cl][Cl₂], [Au(cyclam)][ClO₄]₂[Cl], [Au(terpy)Cl][Cl₂] and [Au(phen)Cl₂][Cl], has been prepared.¹³ Their cytotoxic properties were tested *in vitro* using the representative human ovarian tumor



Synthesis, characterization, DFT study, DNA/BSA-binding affinity, and cytotoxicity of some dinuclear and trinuclear gold(III) complexes

Snežana Radisavljević¹ · Dušan Ćocić¹ · Snežana Jovanović¹ · Biljana Šmit¹ · Marijana Petković² ·
Nevena Milivojević³ · Nevena Planojević³ · Snežana Marković³ · Biljana Petrović¹

Received: 20 March 2019 / Accepted: 28 August 2019 / Published online: 5 September 2019
© Society for Biological Inorganic Chemistry (SBIC) 2019

Abstract

In this study, we have synthesized a series of dinuclear and trinuclear gold(III) complexes of the general formula $[\text{Au}_2(\text{N}-\text{N})\text{Cl}_6]$ (**1–3**) for dinuclear and $[\text{Au}_3(\text{N}-\text{N})_2\text{Cl}_8]^+$ (**4–6**) for trinuclear compounds, respectively, in which *N–N* is a bidentate ligand (1,4-diaminobutane; 1,6-diaminohexane or 1,8-diaminooctane). These complexes were characterized by elemental analysis, molar conductivity, and spectroscopic techniques (IR, UV–Vis, ¹H NMR, ESI–MS). We performed DFT calculations to get insight into the geometry of the studied complexes. DNA-binding studies were performed by UV–Vis spectrophotometry and fluorescence spectroscopy. The results of competitive reactions between gold(III) complexes and ethidium bromide (EB) towards DNA have shown that selected complexes can displace EB from DNA–EB adduct. In addition, these experiments confirm that polynuclear gold(III) complexes interact with DNA covalently or via intercalation. Furthermore, high values of binding constants of gold(III) complexes towards bovine serum albumin (BSA) protein indicate good binding affinity. In addition, redox stability of complexes in the presence of DNA/BSA was confirmed by cyclic voltammetry. Results of the interactions between gold(III) complexes with DNA/BSA were discussed in reference to molecular docking data obtained by Molegro virtual docker. The cytotoxic activity of synthesized gold(III) complexes was evaluated on human breast cancer cell line (MDA-MB-231), human colorectal cancer cell line (HCT-116), and normal human lung fibroblast cell line (MRC-5). All complexes dose-dependently reduced cancer and normal cells viabilities, with significant cytotoxic effects ($\text{IC}_{50} < 25 \mu\text{M}$) for trinuclear gold(III) complexes (**4, 5**) on HCT-116 cells.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00775-019-01716-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Biljana Petrović
biljana.petrovic@pmf.kg.ac.rs

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, P. O. Box 60, Kragujevac 34000, Serbia

² “Vinča” Institute of Nuclear Science, University of Belgrade, Mike Petrovica Alasa 12-14, Belgrade 11001, Serbia

³ Department of Biology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, P. O. Box 60, Kragujevac 34000, Serbia

PAPER



Cite this: *New J. Chem.*, 2020, 44, 11172

Studies of the stability, nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interactions, cytotoxic activity, DFT and molecular docking of some tetra- and penta-coordinated gold(III) complexes†

Snežana Radisavljević,^a Ana Đeković Kesić,^b Dušan Čoćić,^a Ralph Puchta,^{cde} Laura Senft,^{ib} Milena Milutinović,^f Nevena Milivojević,^{ib} and Biljana Petrović,^{ib} *^a

Two gold(III) complexes, square-planar $[\text{Au}(\text{DPP})\text{Cl}_2]^+(\mathbf{1})$ and distorted square-pyramidal $[\text{Au}(\text{DMP})\text{Cl}_3] (\mathbf{2})$ (where DMP = 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline and DPP = 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline), were studied by different experimental methods. Their stability in water and in buffer solution (25 mM Hepes, 30 mM NaCl, pH = 7.2) was investigated by UV-Vis spectroscopy while their redox stability is confirmed by CV. Substitution reactions between complexes **1** and **2**, and biologically relevant ligands, such as thiourea (Tu), guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP), glutathione (GSH) and L-methionine (L-Met), were studied by a stopped-flow technique, under the pseudo-first order conditions as a function of ligand concentration and temperature. According to the values of the activation parameters, all studied reactions followed an associative substitution mechanism. DNA binding studies of complexes **1** and **2** were performed by UV-Vis and fluorescence spectroscopy and viscosity measurements, as well as interactions with bovine serum albumin (BSA). Density functional theory (DFT) was implemented in order to analyse the wave function of the optimized structures to get better insight into the binding interactions between the inert ligands and gold(III) center. The experimental results of binding studies with DNA and BSA were simulated and compared by performing a molecular docking study. All results demonstrate the strong connection between the reactivity of the complexes toward biologically important targets and their structural and electronic characteristics. The cytotoxic activity of complexes **1** and **2** against different cell lines (MDA-MB-231, HCT-116, and HaCaT) was evaluated 24 and 72 h after treatments. The results indicate reduced viability of cell lines in a time- and dose-dependent manner.

Received 22nd April 2020,
Accepted 5th June 2020

DOI: 10.1039/d0nj02037k

rsc.li/njc

Introduction

The role of heavy metals (Ag, Hg, Au, Al, Pb, and Cd) in biology was usually connected with their toxicity toward living organisms.¹ But, after discovering that some platinum(II) complexes, such as cisplatin, carboplatin and oxaliplatin, show great clinical success

toward different types of cancers, studies on potential applications of transition metal ion complexes in pharmacy and medicine have become widely presented.^{2,3}

Gold was used in ancient Arabic and Chinese medicine, in the treatment of different diseases, like rheumatoid arthritis, malaria or HIV.^{3,4} But, during the last 20 years much interest has been focused on some gold(III) complexes, due to their stability under physiological conditions and *in vitro* cytotoxicity toward some human tumor cell lines.³ Particularly, coinage metals (especially Ag and Au) have been found to be a perfect candidate for this goal, because of a very small damaging impact on the human body. In comparison with cisplatin, gold(III) complexes exhibit different properties (pharmacodynamic or kinetic), with strong cell growth inhibiting effects which makes them promising compounds for biological examination.^{5,6}

Indeed, encouraging results for *in vivo* and *in vitro* investigations were obtained after utilization of gold(III) complexes.⁷ The main problem of the biological development and usage of these

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: biljana.petrovic@pmf.kg.ac.rs; Fax: +381(0)34335040; Tel: +381(0)34336223

^b State University of Novi Pazar, Department of Chemical-Technological Sciences, V. Karadžića bb, 36200 Novi Pazar, Serbia

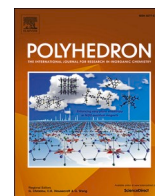
^c Inorganic Chemistry, Department of Chemistry and Pharmacy, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany

^d Computer Chemistry Centre, Department of Chemistry and Pharmacy, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany

^e Central Institute for Scientific Computing (ZISC), University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany

^f University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0nj02037k



New mononuclear gold(III) complexes: Synthesis, characterization, kinetic, mechanistic, DNA/BSA/HSA binding, DFT and molecular docking studies

Snežana Radisavljević^a, Andreas Scheurer^b, Dirk Bockfeld^c, Dušan Čoćić^a, Ralph Puchta^{b,d,e}, Laura Senft^b, Marko Pešić^a, Ivan Damjanović^a, Biljana Petrović^{a,*}

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

^b Inorganic Chemistry, Department of Chemistry and Pharmacy, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany

^c Institut für Anorganische und Analytische Chemie Technische Universität Braunschweig Hagenring 30, 38106 Braunschweig, Germany

^d Computer Chemistry Centre, Department of Chemistry and Pharmacy, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany

^e Central Institute for Scientific Computing (ZISC), University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany

ARTICLE INFO

Keyword:

Gold(III)

DNA

BSA

HSA

Molecular docking

ABSTRACT

Five new gold(III) complexes, with general formula $[\text{Au}(\text{N}-\text{N})\text{Cl}_2]^+$ for complexes 1–3 and $[\text{Au}(\text{N}-\text{N})_2]^{3+}$ for complexes 4–5 (where N–N is 3-((2-((5-phenyl-1H-pyrazol-3-yl)methoxy)naphthalene-3-yloxy)methyl)-5-phenyl-1H-pyrazole – L1, (3-((2-((5-phenyl-1H-pyrazol-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-5-phenyl-1H-pyrazole – L2, (3-((2-((5-naphthalen-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-5-(naphthalen-3-yl)-1H-pyrazole – L3), were synthesized and characterized by elemental analysis, ¹H NMR, IR, UV–Vis, ESI-MS and conductometry. Also, ligand L2 was characterized by X-ray analysis. Stability of complexes in water and in Hepes buffer was confirmed by UV–Vis. Kinetics and mechanism of the substitution reactions of 1–3 with guanosine-5'-monophosphate (5'-GMP), glutathione (GSH) and.

L-Methionine (L-Met) were studied by stopped-flow technique. Obtained results have shown that complex 1 is the most reactive, while the reactivity of the nucleophiles decreases in order: GSH > 5'-GMP > L-Met. Calculated values of the entropy of activation support an associative mechanism. Redox stability of complexes 1–3 was investigated in the presence of the same biomolecules by cyclic voltammetry. Obtained voltammograms showed reduction of gold(III) up to gold(0). DNA binding studies in the presence of ethidium bromide (EB) and 2-(4-hydroxyphenyl)-5-[5-(4-methylpiperazine-1-yl)-benzimidazo-2-yl]-benzimidazole (HOE) were performed by UV–Vis, fluorescence spectroscopy and viscosity measurements, in order to assess the binding mode. The results showed that gold(III) complexes interact with calf-thymus (CT-DNA) via covalently binding mode rather than via intercalation. Also, all complexes shown high values of binding constants for the interactions with bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin (HSA). Furthermore, the binding studies with CT-DNA and BSA/HSA were supported by molecular docking. The strong connection between structure and reactivity of gold(III) complexes toward biologically important molecules was confirmed.

Abbreviations: N-N, Bidentate nitrogen-donor ligand; L1, 3-((2-((5-phenyl-1H-pyrazol-3-yl)methoxy)naphthalene-3-yloxy)methyl)-5-phenyl-1H-pyrazole; L2, (3-((2-((5-phenyl-1H-pyrazol-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-5-phenyl-1H-pyrazole; L3, (3-((2-((5-naphthalen-2-yl)-1H-pyrazol-3-yl)methoxy)phenoxy)methyl)-5-(naphthalen-3-yl)-1H-pyrazole; ESI-MS, Electrospray-ionization MS; 5'-GMP, Guanosine-5'-monophosphate; GSH, Glutathione; L-Met, L-methionine; Hepes, 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid; CV, Cyclic voltammetry; CT-DNA, Calf thymus DNA; EB, Ethidium bromide; HOE, 2-(4-hydroxyphenyl)-5-[5-(4-methylpiperazine-1-yl)-benzimidazo-2-yl]-benzimidazole; BSA, Bovine serum albumin; HSA, Human serum albumin; DFT, Density functional theory; DMF, N,N-Dimethylformamide; k_{obsd1} , k_{obsd2} , Pseudo-first order rate constants; $\Delta S^\ddagger$, Entropy of activation; $\Delta H^\ddagger$, Enthalpy of activation; GC electrode, Glassy carbon electrode; Kb, Intrinsic binding constants; Ksv, Stern-Volmer quenching constant; SA, Serum albumin; kq, Quenching rate constant; n, Number of binding sites per albumin; η , Viscosity of DNA in the presence of complex; η_0 , Viscosity of DNA alone; ωB97XD , Hybrid functionals; def2-SVP, Basis set; PDB 1BNA, Canonical B-DNA; PDB 1Z3F, DNA with an intercalation gap; B-DNA, Crystal structure of DNA in Protein Data Bank; 4F5S, Crystal structure of BSA in Protein Data Bank; DMSO, Dimethyl sulfoxide; THF, Tetrahydrofuran; δ , The chemical shifts; ZPE, Zero-point vibrational energies; MVD, Molegro Virtual Docker version 2013.6.0.1..

* Corresponding author.

E-mail address: biljana.petrovic@pmf.kg.ac.rs (B. Petrović).

<https://doi.org/10.1016/j.poly.2021.115446>

Received 20 July 2021; Accepted 20 August 2021

Available online 29 August 2021

0277-5387/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.



7. БИОГРАФИЈА



Снежана Р. Радисављевић је рођена 06. 10. 1992. године у Ћуприји, где је завршила основну школу „Вук Караџић“ као носилац Вукове дипломе. Школовање је наставила у Технолошкој школи у Параћину, смер техничар за индустријску фармацеутску технологију, коју је такође завршила као носилац Вукове дипломе. Природно-математички факултет у Крагујевцу уписала је 2011. године, где завршава основне академске студије са просечном оценом 9,34, док је мастер академске студије хемије, на истом факултету, завршила са просечном оценом 9,89.

Докторске академске студије хемије уписује 2016. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, смер - неорганска хемија. Под менторством редовног професора др Биљане Петровић истраживање усмерава на испитивање комплекса $Au(III)$. Положила је све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 10. Од априла 2018. године запослена је на Природно-математичком факултету у Крагујевцу као истраживач-приправник, а 2019. године изабрана је у истраживача-сарадника.

У току основних и мастер студија била је корисник стипендије Министарства Републике Србије, са којом наставља и на докторским студијама. Као истраживач ангажована је у настави. Учествовала је у извођењу вежби из предмета Неорганске синтезе и методе карактеризације на мастер академским студијама, Неорганске хемије 1, Хемије атмосфере, Неорганске хемије 2 и Индустријске хемије. Била је корисник DAAD стипендије у периоду 01.10.2018 – 31. 03. 2019. године када је боравила на Универзитету у Ерлангену, Немачка. До сада је учествовала на бројним конференцијама, објавила 14 научних радова и једно поглавље у књизи. Члан је Српског хемијског друштва и Клуба младих хемичара. Поред матерњег, говори и енглески језик (напредни ниво), а служи се и немачким језиком (основни ниво).

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Снежана Р. Радисављевић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Синтеза, карактеризација и биолошка активност мононуклеарних и полинуклеарних комплекса злата(III) са азот-донорским лигандима

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, 10.2.2022. године,

С Радисављевић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Снежана Р. Радисављевић,



дозвољавам



не дозвољавам

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

Синтеза, карактеризација и биолошка активност моноклеарних и полинуклеарних комплекса злата(III) са азот-донорским лигандима

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



дозвољавам



не дозвољавам¹

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

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

- 1) Ауторство
- ☒ 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

у Крагујевцу, 10.2.2022. године,

Срђисављевић
потпис аутора

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